

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006 年～2008 年

課題番号：18310063

研究課題名（和文） バイオモニタリングに基づく土壌・環境の浄化・改善・保全

研究課題名（英文） Purification of soil environment based on bio-monitoring

研究代表者：

久保 幹（KOB0 MOTOKI）

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：60249795

研究成果の概要：

環境診断技術においては、窒素循環（アンモニア 亜硝酸、亜硝酸 硝酸）の測定方法を新たに確立し、バクテリア量解析と併せ、土壌精密診断技術（窒素物質循環）を完成させた。本診断技術により、100 サンプルを超えるデータベース作成を行った。

窒素循環においては、アンモニアが蓄積する傾向があることを見出し、律速となっている反応を明らかにした。さらに、その反応に関与する微生物の分離・同定を行った。また、当該微生物を投与することにより、窒素循環が顕著に活性化することを示し、窒素物質循環の促進が可能であることを明らかとした。

一方、環境浄化・改善・保全においては、石油汚染土壌の浄化を中心に取り組んだ。具体的には、バイオモニタリングに基づき、石油分解菌を投与し、また制御することにより、半年程度要していた処理を2カ月程度まで短縮できた。最終的に、バイオモニタリングに基づいた高効率バイオレメディエーションシステムを完成させた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,000,000	0	7,000,000
2007 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	15,100,000	2,430,000	17,530,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：バイオモニタリング・バイオレメディエーション・無機化・環境 DNA

1. 研究開始当初の背景

環境汚染の状況を的確に知るためには、化学物質等の汚染物質を分析すると共に生物を指標とした診断をする必要がある。しかしながら、生物を指標とした診断システムは十分に研究されていなかった。特に生物を用いた環境浄化に関しては、微生物挙動の正確な

把握が不可欠であった。

2. 研究の目的

これまで、独自に構築してきた環境 DNA を指標としたバクテリアモニタリングに加えて、環境微生物が関与する物質循環を指標とした環境診断技術を構築することを目的と

した。併せて、物質循環に密接に関与する微生物の特定およびモニタリング技術の構築も目指した。さらに、具体的な環境浄化・保全・改善においては、石油汚染土壌の効率のよい浄化を行うため、本研究で開発したバイオモニタリングシステムに基づいた高効率バイオレメディエーション技術の構築を目指した。

3. 研究の方法

生物指標および物質循環を指標とした環境診断技術に関しては、「アンモニア 亜硝酸」および「亜硝酸 硝酸」のそれぞれの物質変化量を測定することにより実施した。環境DNA解析法は、これまでに構築した環境DNA解析法に基づき実施した。

バイオレメディエーションに関しては、これまでに分離した石油分解菌を用い、石油汚染浄化を指標とし、効率のよいシステム構築を行った。

4. 研究成果

(1) 土壤精密診断：窒素循環において、「環境バクテリア数」、「アンモニア 亜硝酸」、および「亜硝酸 硝酸」の3点を解析する技術構築を行い、それぞれの反応速度を定量化する手法を確立した。

(2) 「アンモニア 亜硝酸」の反応が律速反応であることが明らかとなったため、本反応を活性化させる微生物の探索を実施した。その結果、独立性アンモニア酸化細菌が有効であることを見出し、40株を分離し、活性の強かった20株を同定した。本菌株をアンモニア蓄積土壌環境中に投与することにより、「アンモニア 亜硝酸」への変換を活性化した。

(3) 環境浄化・保全・改善に関しては、石油汚染土壌の効率のよい浄化を行うため、本研究で開発したバイオモニタリングを導入したバイオレメディエーションシステムを構築した。具体的には、汚染環境中の微生物数をモニタリングすること、また投与する石油分解菌の挙動を正確に把握することにより、微生物量を正確に制御することが可能となった。その結果、従来の工期が半年要していたものに対し、2カ月程度で浄化が行われることになった。最終的に効率のよいバイオレメディエーションシステムを構築することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{ 雑誌論文 } (計 24 件)

1.Utilization of biomass based on biorefinery-Development of novel bioactive peptides from soybean waste- Y. Matsumiya and M. Kubo, Research Trends, *in press*, (2009). 査読有

2.Construction of an efficient bioremediation system for petroleum hydrocarbon-contaminated soils using specific hydrocarbon-degrading bacteria and bacterial biomass monitoring, K. Hatayama, Y. Sakihama, Y. Matsumiya, and M. Kubo, Soil Contamination Research Trends, Editor J. B Dominguez, Nova Science Publishers Inc. New York, (2008). 査読有

3.Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay, K. Kubota, Y. Matsumiya, D. Koma, C. Y. Chung, and M. Kubo, Biodegradation, 19, 749-757, (2008). 査読無

4.石油汚染土壌の高効率生物処理技術 特殊微生物と微生物挙動解析技術による石油汚染土壌の浄化、松宮芳樹、久保幹、箕田正史、クリーンテクノロジー、18巻、30-33、(2008)。査読無

5.Purification and characterization of chitinase A of *Streptomyces cyaneus* SP-27, An enzyme participates in protoplast formation from *Schizopyllum commune* mycelia., S. Yano, N. Rattanakit, A. Honda, Y. Noda, M. Wakayama, A. Plikomol and T. Tachiki, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 72 54-61 (2008). 査読有

6.Mini-Review; Endophytic Bacteria In the Rice Plant, H. Mano, and H. Morisaki, *Microbes and Environments*, 23, 109-117 (2008). 査読有

7.Cloning and expression of *Methylovorus mays* No. 9 gene encoding -glutamylmethylamide synthetase: an enzyme usable in theanine formation by coupling with the alcoholic fermentation system of baker's yeast, S. Yamamoto, M. Wakayama and T. Tachiki, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 72, 101-109 (2008). 査読有

8. Theanine production of coupled fermentation with energy transfer using -glutamylmethylamide synthetase of *Methylovorus mays* No. 9, S. Yamamoto, Y. Morihara, M. Wakayama and T. Tachiki, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 72, 1206-1211 (2008). 査読有
9. Effect on epidermal cell of soybean protein-degraded products and structural determination of the root hair promoting peptide, Y. Matsumiya, S. Sumiyoshi, and M. Kubo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 37-43, (2007). 査読有
10. Purification of *Aspergillus* sp. S1-13 chitinases and their role in saccharification of chitin in mash of solid-state culture with shellfish waste, N. Rattanakit, S. Yano, A. Plikomol, M. Wakayama and T. Tachiki, *J. Biosci. Bioeng.*, 103, 535-541 (2007). 査読有
11. 環境微生物の細胞表面特性および界面との相互作用、森崎久雄、オレオサイエンス、第8巻、71-76 (2008)。 査読無
12. Cloth colorization caused by microbial biofilm, Y. Tsuchiya, J. Ota, Y. Ishida, and H. Morisaki, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 64, 216-222 (2008). 査読有
13. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field., H. Mano, F. Tanaka, C. Nakamura, H. Kaga and H. Morisaki. *Microbes and Environments*, 22, 175-185, (2007). 査読有
14. 生量調整を応用した大規模汚染土壌浄化、畑山耕太、久保幹、山田和寛、環境浄化技術、6巻、39 - 42、(2007)。 査読無
15. Effect of charcoal from woody waste on the soil bacterial biomass and its plant-growth promoting effect. S. Sanpa, K. Imaki, J. Konishi, A. Shibata, Y. Matsumiya, M. Kubo, *Woody Carbonization Res*, 2, 37-42 (2006).
16. Cloning and expression of *Pseudomonas taetrolens* Y-30 gene encoding glutamine synthetase: an enzyme available for theanine production by coupled fermentation with energy transfer, Y. Yamamoto, M. Wakayama and T. Tachiki, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 70, 500-507 (2006).
17. Cloning and expression of an -1,3-glucase gene from *Bacillus circulans* KA-304: the enzyme participates in protoplast formation of *Schizophyllum commune*, S. Yano, M. Wakayama and T. Tachiki, *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 70, 1754-1763 (2006).
18. Isolation and characterization of a bluegill-degrading microorganism, and analysis of the plant growth-promoting effect of the degraded products. S. Sanpa, S. Sumiyoshi, T. Kujira, Y. Matsumiya, M. Kubo, *Biosci. Biotech. Biochem*, 70, 340-347, (2006).
- 〔学会発表〕(計31件)
1. 共同報告「*Gordonia* 属及び *Rhodococcus* 属のアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子の解析」(山下祐司、松宮芳樹、久保幹 『日本農芸化学会』2009年大会要旨集、2009)。
2. 共同報告「実石油汚染土壌の解析と高効率バイオレメディエーション」(久保田謙三、松宮芳樹、久保幹 『日本農芸化学会』2009年大会要旨集、2009)。
3. 共同報告「LEDを用いた炭化水素分解菌への光の影響解析」(小瀬貴久、久保田謙三、松宮芳樹、土谷健一、金森章雄、久保幹 『日本農芸化学会』2009年大会要旨集、2009)。
4. 「バイオマス由来根毛形成促進ペプチドの植物根への取り込み解析」(松宮芳樹、久保田謙三、久保幹 『日本農芸化学会』2009年大会要旨集、2009)。
5. 共同報告「バイオプラスチックの生分解が土壌バクテリアへ及ぼす影響解析」(吉村圭祐、久保田謙三、松宮芳樹、金子信行、久保幹 『日本農芸化学会』2009年大会要旨集、2009)。
6. 共同報告「Monitoring of oil-degrading

bacteria by real-time PCR during bioremediation」(Rungroch SUNGTHONG, Mikiko IMADA, Kenzo KUBOTA, Kouta HATAYAMA, Yoshiki MATSUMIYA, Motoki KUBO 『日本農芸化学学会』2008年大会要旨集, 2008).

7. 共同報告「土壌細菌による大豆タンパク質の分解とその分解物が植物生長に及ぼす影響」(村尾有香、松宮芳樹、佐藤貴宣、久保幹 『日本農芸化学学会』2008年大会要旨集、2008).

8. 共同報告「アンモニア酸化細菌を用いた窒素循環の活性化に関する研究」(佐藤貴宣、松宮芳樹、久保幹 『日本農芸化学学会』2008年大会要旨集、2008).

9. 共同報告「窒素循環と土壌微生物数の関係解析による土壌評価」(諸江泰宏、佐藤貴宣、松宮芳樹、久保幹 『日本生物工学会』2008年大会要旨集、2008).

10. 共同報告「長鎖炭化水素分解菌による石油汚染土壌の浄化 - 環境DNA解析法による微生物モニタリング -」(久保田謙三、吉田智紀、今田三紀子、崎濱由梨、松宮芳樹、久保幹、『日本農芸化学学会』2007年大会要旨集、2007).

11. 共同報告「環境DNA解析法を用いた土壌バクテリア数と無機化の関係解析」(佐藤貴宣、吉田智紀、松宮芳樹、村尾有香、S. Sirilak、久保幹、『日本農芸化学学会』2007年大会要旨集、2007).

12. 共同報告「2,6DCPIP法による長鎖炭化水素分解菌の網羅的解析」(久保田謙三、崎濱由梨、駒大輔、松宮芳樹、久保幹 『日本生物工学会』2007年大会要旨集、2007).

13. 共同報告「実用化を目指したバイオレメディエーションシステムの開発(2) - 大規模土壌混練装置の開発 -」(畑山耕太、吉田智紀、今田三紀子、崎濱由梨、今田雄司、山田和寛、渡辺真康、久保幹 『日本生物工学会』2007年大会要旨集、2007).

6. 共同報告「変異型サーモライシンの自己分解点の改変による安定性の向上の解析」(松宮芳樹、村田尚子、井上國世、久保幹、『日本農芸化学学会』2007年大会要旨集、2007).

14. 共同報告「農地における無機化活性と土壌バクテリア数の関係解析」(村尾有香、高島康仁、佐藤貴宣、久保田謙三、松宮芳樹、久保幹、『日本生物工学会』2006年大会要旨集、2006).

15. 共同報告「変異型サーモライシンの自己分解点の改変による安定性の向上」(村田尚子、松宮芳樹、井上國世、久保幹、『日本生物工学会』2006年大会要旨集、2006).

16. 共同報告「大豆ミール分解物(DSP)と各種植物ホルモンの生理活性効果の差異」(松宮芳樹、平野聡子、住吉紗世子、久保幹、『日本生物工学会』2006年大会要旨集、2006).

17. 共同報告「光照射による炭化水素分解菌 *Gordonia* sp. NDKY76A の生育及び炭化水素分解菌の活性化」(羅景珠、重実大介、土谷健一、金森章雄、久保幹、『日本生物工学会』2006年大会要旨集、2006).

5. 共同報告「環境DNA解析法による活性汚泥処理能のモニタリング」(尾崎有弥、木村彰成、羅景珠、松宮芳樹、久保幹、『日本生物工学会』2006年大会要旨集、2006).

〔図書〕(計4件)

1. 土壌・地下水汚染の浄化・修復技術 - 浄化技術からリスク管理、事業対策まで - (分担執筆) 微生物量調整・維持による石油汚染土壌の高効率化技術、193 - 205 久保幹、NTS、(2008).

2. -グルタミルエチルアミド(テアニン)の合成、pp 78-84、微生物によるものづくり - 化学法に代わるホワイトバイオテクノロジーの全て - 山本幸子、立木隆、上田充美監修、シーエムシー出版(2008)

3. 環境定量技術を導入した石油汚染土壌バイオレメディエーション装置の開発、松宮芳樹、久保幹、NTS、バイオプロセスハンドブック(分担執筆)、(2007).

4. 生命体の科学と技術、久保幹、吉田真編、培風館(2006).

〔産業財産権〕

出願状況(計14件)

1. 『炭化水素で汚染された土壌又は水の浄化方法』久保幹、特願2006-210398(2006).

2. 『バイオレメディエーションに伴う土壌環境の新規診断技術』、久保幹他、特願 2009 68788(2009).
3. 『バイオレメディエーションにおける環境影響評価技術』、久保幹他、特願 2009 69038(2009),
- 3 『バイオレメディエーションのための方法及びシステム』、久保幹, 山田和寛, 渡辺真康, 今田雄司, 特願 2007-142551, (2007).
4. 『バイオレメディエーションのための方法及びシステム』、久保幹, 山田和寛, 渡辺真康, 今田雄司, 特願 2007-142551 (2007)
5. 『炭化水素分解菌の挙動解析方法及び土壌浄化方法』、久保幹他、特願 2008-071301 (2007)
6. 『バイオレメディエーションに伴う土壌環境の新規診断技術』、久保幹他、特願 2009 68788(2009)

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保 幹 (KUBO MOTOKI)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：60249795

(2)研究分担者

森崎 久雄 (MORISAKI HISAO)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：50125671

立木 隆 (TACHIKI TAKASI)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号：60026573

(3)連携研究者

なし