

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21310050

研究課題名（和文） 生物学的環境修復技術の科学的基盤確立に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the establishment of scientific basis for bioremediation

研究代表者

内山 裕夫 (UCHIYAMA HIROO)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00185042

研究成果の概要（和文）：

バイオレメディエーションでは、種々の微生物が存在する複合系によって汚染物質が分解されるが、その系内でのそれぞれの微生物の機能および相互作用については未だ未解明な部分が多い。本研究では、我々が考案した新たな異化的分解菌検出法 SIP-D 法を確立し、浄化能の向上化と分解微生物ネットワークを解明することを目的とした。その結果、高分子化合物の分解には真菌と細菌の複合系が有効であり、また、テトラクロロエチレンと油の分解微生物ネットワークの概要を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要（英文）：

During bioremediation, pollutants are degraded by consortia, but each microbial function and their interactions are still unclear. In this study, we tried to establish a novel method, SIP-D that could detect assimilative degraders, and also to improve degradability of bioremediation and to clear microbial network. Consequently, mixed cultures of fungi and bacteria were effective for degradation of high-molecular-weight pollutant, and overview of microbial networks in tetrachloroethylene and oil degradation were characterized.

交付決定額

(金額単位：円)

|          | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|----------|------------|-----------|------------|
| 平成 21 年度 | 6,000,000  | 1,800,000 | 7,800,000  |
| 平成 22 年度 | 4,000,000  | 1,200,000 | 5,200,000  |
| 平成 23 年度 | 2,700,000  | 810,000   | 3,510,000  |
| 平成 24 年度 | 1,300,000  | 390,000   | 1,690,000  |
| 年度       |            |           |            |
| 総計       | 14,000,000 | 4,200,000 | 18,200,000 |

研究分野：環境微生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：バイオレメディエーション、安定同位体標識、微生物ネットワーク、バイオフィーム、テトラクロロエチレン、油、SIP

## 1. 研究開始当初の背景

平成 15 年に土壤汚染対策法が施行されて以来、有機塩素化合物や重金属による環境汚染に対して有効かつ安価な浄化対策技術を確立することが求められている。微生物を用

いて汚染環境を修復するバイオレメディエーション技術はコストパフォーマンスの良い環境に優しい技術として期待されており、環境ビジネスとしても実施されている。しかし、物理化学的浄化手法に比べて浄化に時間

が掛かるため有効性の向上化が求められている。また、汚染物質の減少のみが重視され、分解中間代謝産物や最終産物の有害性に関しては余り関心が払われていない。バイオレメディエーションでは、分解を直接的に担う微生物と間接的に関与する微生物とが相互に作用しながら存在する複合系によって分解が行われるが、その解明が不十分なために科学的には未だ完成途上にある技術であり、完成度を高める必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、PCE や油等のバイオレメディエーションを対象として、そのビジネス的課題「浄化能の更なる有効化」および学術的課題「分解微生物ネットワークの解明」に取り組み、バイオレメディエーション技術を科学的に裏付けされた完成度の高い環境浄化技術へと発展させることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) SIP-D 法 (Stable Isotope Probing for Dissimilation) : SIP-D は Fig. 1 に示したように 2 つの操作、標識操作 (labeling step, Fig. 1a) と解析操作 (analysis step, Fig. 1b) から構成される。labeling step では  $^{13}\text{C}$  標識された炭素源を用いて微生物群の標識を行うが、それに先立ち、クロロエチン類を除去した培地中で 1 日間のエネルギー飢餓培養を行う。次いで、解析サンプルを 2 つのサブサンプルに分け、それぞれを PCE が存在する区 (WITH-PCE)、及び存在しない区

(WITHOUT-PCE) と称して、それぞれを  $^{13}\text{C}$ -炭素源を添加して標識する。脱ハロゲン呼吸細菌は PCE 存在時 (WITH-PCE) でのみ  $^{13}\text{C}$  標識されることになるが、脱ハロゲン呼吸を行わない他の細菌は PCE の有無に左右されずに同等に標識されることになる。標識後、2 つの実験区それぞれから DNA を抽出し、密度勾配超遠心分離により  $^{13}\text{C}$  の取り込まれた重い DNA 画分を分離する。次いで、analysis step では、WITH-PCE と WITHOUT-PCE の 2 つ実験区の  $^{13}\text{C}$ -DNA を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) に供する。WITH-PCE と WITHOUT-PCE の DGGE プロファイルと比較し、WITH-PCE と WITHOUT-PCE の両方に出現する DNA バンドは対象候補から除外し、WITH-PCE に特異的に出現している DNA バンドを脱ハロゲン呼吸細菌由来とする。以上が SIP-D 法の原理であり、Fig. 1 に従って操作する。

(2) テトラクロロエチレン分解実験と分解産物の分析：硫化ナトリウムとシステイン塩酸塩の添加により還元状態を維持した土壤マイクロゾムを作成した。このマイクロゾムにテトラクロロエチレン (以下 PCE) を添加し分解を観察した。経時的にサンプルの一部を採取し、PCE、トリクロロエチレ

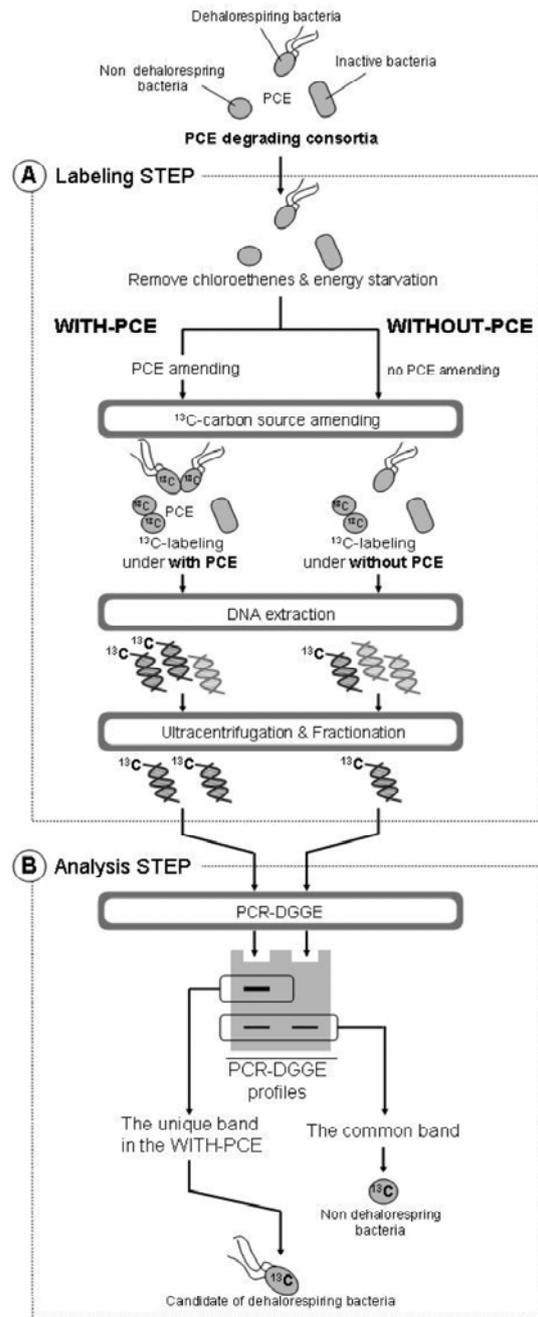


Fig. 1 SIP-D の操作概要

ン (TCE)、ジクロロエチレン類 (DCEs)、塩化ビニル (VC) 等のクロロエチン類はガスクロマトグラフィー質量分析計 GC-MS 2010 (島津) で、エチレン、メタン、二酸化炭素等は GC-3900 (日立) ガスクロマトグラフィーにて測定した。

(3) ベンゼン分解に係わる各種微生物の検出：石油実汚染土壤に無機塩培地を加えたマイクロゾムを作成し、好気条件下でベンゼンの分解実験を行った。本手法のストラテジーを Fig. 2 に示した。その概要は以下の通りである。A 図：培養非依存的手法として、SIP 法では  $^{13}\text{C}$  ベンゼンを用いて同化菌

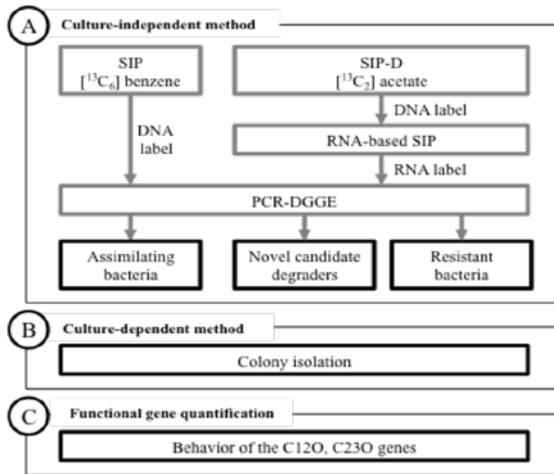


Fig. 2 ベンゼン分解菌ネットワークの解析法

(Assimilating degrader)を検出し、SIP-D法では $[^{13}\text{C}]$ 酢酸を用いて異化菌(Candidate co-metabolic degrader)および分解に何らかの関与を示す菌(No benzene degrader)を検出することを目的とした。更に、RNA SIPを行うことで、SIP-D法で検出した菌をより詳細に同化分解菌と共代謝分解菌、Non degraderに細分類した。B図：次に、バイオレメディエーションの過程で、ベンゼンを唯一炭素源とした平板培養法によって菌株を単離した。これらの菌を培養非依存的手法と比較した。C図：最後に、ベンゼン分解過程における機能遺伝子の挙動を追うため、カテコール1、2 (C120) 遺伝子とカテコール2、3 (C230) 遺伝子を Real-time PCR によって定量し、いずれのカテコール開裂を経て代謝されるのかについて調査した。

(4) 抱水クロラール分解能とバイオフィーム形成の関連性検証実験：抱水クロラール分解菌からバイオフィーム形成に係わる遺伝子 *lapA* の5'末領域断片を抽出し、PCRを用いて一部領域を増幅した後に pSC200 と連結し、次いで、抱水クロラール分解菌に形質導入した。Single cross-over (一点交叉) を経て染色体上に操作を加えた DNA 断片をコードした変異株では、ラムノースの添加によって Lap A タンパク断片が発現し、親株とほぼ同等になる。

バイオフィーム形成の観察は試験管を用いて行った。試験管に被試験菌体を接種し、一定時間の振盪培養後にガラス管壁に付着したバイオフィームをクリスタルバイオレットで染色し、次いで、エタノールに溶かし込んだ後に OD595 で測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 解析手法 SIP-D の高度化

本研究では、我々が開発した SIP-D 法 (Stable Isotope Probing for Dissimilation) の高度化に取り組んだ。まず本手法によって検出

される対象菌種について検討した結果、*Dehalococcoides* 属細菌等の偏性脱ハロゲン呼吸細菌および *Desulfitobacterium* 属細菌等の脱ハロゲン呼吸細菌の存在を検出することは可能であるが、*Clostridium* 属細菌の様な共代謝による分解菌に対しては困難である事が明らかにされた。次いで、用いるべき適切な標識炭素源について検討した結果、標識炭素源の種類に関わらず常に検出される脱ハロゲン呼吸細菌が存在する一方、炭素源固有に検出される株も存在することが明らかとなり、有効な SIP-D 法の実施には各種標識炭素源の混合物を用いることが提案された。さらに、環境サンプルに SIP-D 法を適用した結果、土着性の潜在的 PCE 分解菌として *Dehalobacter* 属細菌の特定に成功し、SIP-D 法は環境試料の解析に有効であることが示された。

##### (2) テトラクロロエチレン分解微生物ネットワークの解明

###### ① $^{13}\text{C}$ -テトラクロロエチレン (PCE) 由来分解産物の同定

PCE 分解微生物ネットワークを解明するため、まず PCE 完全無機化プロセスの全体像を検出した。クロロエチン類の既知分解経路では、エチレン炭素骨格 (C=C) が保持されたままで分解が進行するが、塩素化アルコール類や塩素化有機酸類が分解産物として生じるならば、エチレン炭素骨格の C=C が C-C に変換し、その結果、C=C を有する化合物量が減少すると予想される (Fig. 3)。すなわち、PCE

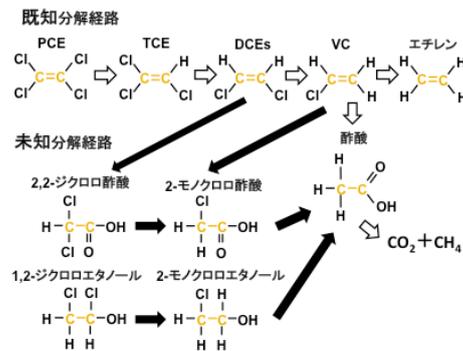


Fig. 3 テトラクロロエチレン分解経路

と TCE、DCEs、VC、エチレン濃度の総和を意味する総合エチレン炭素骨格 (C=C) 濃度が減少し、これを測定することにより未知分解経路の有無を推定することが可能となる。そこで本研究では、PCE 分解土壌試料を用いて、PCE 分解に伴う分解産物の総量変化を検討した結果、エチレン骨格を有す化合物の総量は分解進行に伴ってほぼ一定で変動しないことから、エチレン骨格を有さない分解中間産物を生じる新たな未知分解経路が存在する

可能性は低く、存在しても非常に微弱な活性を有すものと推定された。

②クロロエテン類を直接的、間接的に分解する微生物の解明

上記のPCE分解経路に関する結果より、当初想定していた分岐鎖的な分解経路の存在確立は極めて低く、Fig. 3に示された既知分解経路でPCE分解が進行しているものと考えられた。従って、PCE分解に係わる微生物ネットワークは比較的少数メンバーで構成された単純なものであると推定されたため、分解系を構成する微生物叢の解析を行った。用いた土壌においてPCE分解に関与していた微生物は *Dehalococcoides* sp. 株と *Dehalobacter* sp. 株、TCE分解に関与していた微生物は *Dehalococcoides* sp. 株と *Dehalobacter* sp. 株、*cis*-1,2-DCEの分解に関与していた微生物は *Dehalobacter* sp. 株と *Clostridium* 属細菌、VCの分解に関与していた微生物は *Clostridium* 属細菌であることが示唆され、また、間接的にPCE分解に関与する微生物は *Sedimentibacter* sp. 株と *Clostridium* 属細菌であることが示され、PCE分解に係わる微生物ネットワークは予想通りに比較的少数メンバーで構成されていることが明らかとなった。これら微生物の諸性質を今後解明することにより、より効果的な浄化が可能になると考えられる。

(3) 油分解微生物ネットワークの解明

PCE等の揮発性有機塩素化合物と並んでバイオレメディエーションの主たる対象となっている油の分解に関し、直接的な油分解菌およびそれによって生じる分解産物を利用する間接的な分解菌を検出・解析し、油分解に関する微生物ネットワークについて検討した。本研究には油の一構成成分であるベンゼンによる実汚染土壌を用い、Fig. 2に示した通り、SIPとSIP-Dの培養非依存的手法と、スクリーニング法による単菌取得の培養依存的手法を組み合わせた総合的解析手法を用い、ベンゼン分解初期段階と中期段階とで分解に関与する菌を評価した。第一段階では、直接分解には関与しない *Xenophilus* 属細菌と酢酸同化型 *Pseudomonas* 属細菌が同定された。第二段階では、ベンゼン同化分解菌 *Pseudomonas* 属細菌、*Rhodococcus* 属細菌、*Frankia* 属細菌と *Simplicispira* 属細菌、そして、新たに同定された異化分解型 *Pseudomonas* 属細菌と直接分解に関与しない *Pseudomonas* 属細菌と *Hydrogenophaga* 属細菌が主に同定された。以上より、ベンゼン同化分解菌のみならず、異化分解菌、そして直接的には分解に関与しないがベンゼン分解に何らかの影響を与える菌を共に特定することができ、分解過程に伴って変動するベンゼン分解に関する微生物ネットワークを描く

ことができた。

(4) 浄化能の向上化と分解微生物の生態解明、および将来展望

上記の通り、PCE及び油分解に関する微生物ネットワークの構成微生物を明らかにすることが出来たため、次いで、分解に係わる微生物間の相互作用について検討した。バイオレメディエーションにおいて、汚染物質分解の主役は“細菌”であることが通説となっている。しかし、実汚染浄化現場の土壌中には、細菌、真菌、藻類、原生動物など様々な生物が存在して微生物群集構造を形成している。本研究では、高分子有機化合物の分解における細菌と真菌の関係に着目し、難分解性化合物である多環芳香族化合物(PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)を対象として、細菌と真菌の分解における相互関係について検討した。PAHsとしてピレンを選択し、林地土壌から単離した分解細菌4株の混合系と分解真菌7株の混合系、およびそれら1:1株を混合した計3種類の混合培養系を作成してそれぞれのピレン分解能と菌叢を観察した。その結果、細菌混合系、真菌混合系ではそれぞれ56%、39%のピレン分解に対し、真菌・細菌混合系では67%と分解能の促進効果が認められ、また、真菌と細菌を1:1に組み合わせた混合系では真菌による代謝産物1-hydroxypyreneと1-methoxypyreneが細菌によりさらに分解されることが確認された。また、走査型電子顕微鏡(SEM)観察により、分解過程において細菌が真菌の菌糸体に多数付着している事が明らかにされた。以上より、真菌の分解によって生じる様々な代謝産物が細菌によってさらに分解され、かさ高く分子量の大きな難分解性化合物はまず真菌によって修飾され、次いで細菌によってさらに低分子化されることが示唆された。また、その過程には真菌と細菌が接触し、何らかの相互作用が存在することが示唆された。バイオレメディエーションの有効性を高めるためにはこのような微生物間相互作用にも着目し、活用することが可能であることが示された。一方、バイオレメディエーションの主役である環境微生物の生態を理解することは、本技術が科学に裏付けられたものとする上でも必須である。本研究では、有機塩素化合物の一種であるクロラールの分解菌についてその生態学的側面を検討した。クロラールは水と容易に反応して抱水クロラールとして存在するが、農薬・医薬品の合成用中間体として使用され、またリン肥料からの溶出等により中国では土壌・地下水の汚染物質となっている。我々が単離した抱水クロラール分解菌 *Pseudomonas putida* LF54 (LF54株) は抱水クロラールを唯一生育炭素源として利用できるため、バイオレメディエーション

での活用が期待されている。本研究ではクロラール分解能の向上化を目指して、LF54株の脱クロル反応について検討した。トランスポゾンを用いた変異株作成により脱クロル酵素遺伝子の単離を行う過程で、抱水クロラール分解パターンに異常が認められた7変異株が単離され、それらの挿入領域を解析した結果、バイオフィーム形成に係わる *lapA* に変異をきたした株であることが判明した (Fig. 4)。



Fig. 4 *lapA* と変異部位

抱水クロラール分解とバイオフィーム形成との関連性が示唆されたため、これを検証するためコンディショナル ミュータント (conditional mutant) を作成して精査したところ、Fig. 5 に示された通り、*lapA* に変異が入ったことによってバイオフィーム形成能を欠損した変異株が、ラムノース添加によって形成能を回復して分解能も取り戻し、明らかに両者に関連性のあることが立証された。このような関連性は全くの新しい知見であ

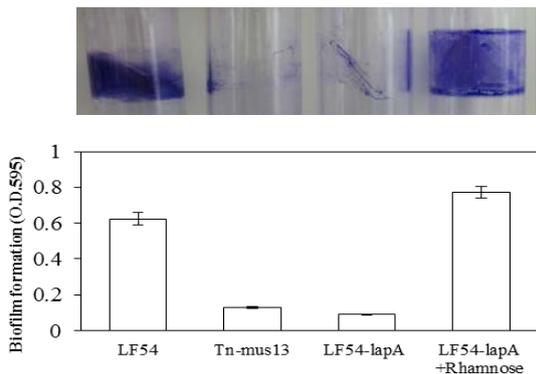


Fig. 5 各種 *lapA* 変異株によるバイオフィーム形成

り、環境微生物のバイオフィーム形成と化合物分解性との関連性に、今後、着目して行く必要があるだろう。環境微生物を用いるバイオレメディエーションの今後の在り方に大きな影響を与える発見であると考え。

真菌と細菌の相互作用と並んでバイオフィーム形成による細胞間情報伝達など、様々な微生物間で相互作用を持ちながら化合物分解が進行することは自然環境中では恐らく普遍的な現象であり、今後はメタゲノミクスやメタボロミクス等の先端技術を駆使して環境微生物の生態解明がさらに進み、その成果を活用したバイオレメディエーションが実施されることを期待する。

## 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16件)

① Wanjun Zhang, Huhe, Yuanbai Pan, Nobuhiko Nomura, Toshiaki Nakajima, Hiroo Uchiyama, Dechlorination of chloral hydrate is influenced by the biofilm adhesion protein LapA in *Pseudomonas putida* LF54, Applied and Environmental Microbiology, 79 (13), 2013, DOI: 10.1128/AEM.00804-13 査読有

② Eri Hara, Masato Kurihara, Nobuhiko Nomura, Toshiaki Nakajima, Hiroo Uchiyama, Bioremediation field trial of oil-contaminated soil with food-waste compost, Journal of JSCE, 1, 125-132, 2013 査読有

③ Yosuke Tashiro, Yutaka Yawata, Masanori Toyofuku, Hiroo Uchiyama, Nobuhiko Nomura, Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms, Microbes & Environments, 28(1), 13-24, 2013, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23363620> 査読有

④ Shouhei Yamasaki, Nobuhiko Nomura, Toshiaki Nakajima, and Hiroo Uchiyama, Cultivation-independent identification of candidate dehalorespiring bacteria in tetrachloroethylene degradation, Environmental Science & Technology, 46(14), 7709-7716, 2012, DOI: 10.1021/es301288y 査読有

⑤ Shuozhi Wang, Nobuhiko Nomura, Toshiaki Nakajima, Hiroo Uchiyama, Case study of the relationship between fungi and bacteria associated with high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation, Journal of Bioscience and Bioengineering, 113(5), 624-630, 2012, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.01.005 査読有

⑥ Huhe, Nobuhiko Nomura, Toshiaki Nakajima, Hiroo Uchiyama, Assimilative and co-metabolic degradation of chloral hydrate by bacteria and their bioremediation potential, Journal of Bioscience and Bioengineering, 111, 448-453, 2011, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.12.003 査読有

[学会発表] (計7件)

① Yuanbai Pan, Comprehensive analysis of benzene-degrading microorganisms and functional genes under mesophilic aerobic

conditions using modified and conventional stable-isotope probing methods, 2013 International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology, 2013年3月5日～8日, 江南大学 (中国)

② Shuozhi Wang, Interactions between fungi and bacteria associated with degradation of PAHs, BioMicroWorld 2011, 2011年9月14日～16日, Torremolinos Congress Center (スペイン)

③ Shohei Yamazaki, Interactions between fungi and bacteria associated with degradation of PAHs, BioMicroWorld 2011, 2011年9月14日～16日, Torremolinos Congress Center (スペイン)

④ 鈴木雄大、Analysis of tetrachloroethylene dissimilate-degradation microbes in microcosm by SIP-D method、日本微生物生態学会第26回大会、平成22年11月24日～26日、つくば、筑波大学

⑤ 皆川匠、Evaluation of analysis range of SIP-D method、日本微生物生態学会第26回大会、平成22年11月24日～26日、つくば、筑波大学

[図書] (計1件)

① Eri Hara, Hiroo Uchiyama, Springer-Verlag, Soil Biology 32 「Fungi as Bioremediators」 Chapter 5; Degradation of Petroleum Pollutant Materials by Fungi, 2013, 117-133

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内山 裕夫 (UCHIYAMA HIROO)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号：00185042

### (2) 研究分担者

野村 暢彦 (NOMURA NOBUHIKO)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：60292520