

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23246154

研究課題名(和文) 微生物コンソーシアムの動態解析と有機物汚染土壌の浄化への利用

研究課題名(英文) Dynamics of Microbial Consortium and its Application for Remediation of Organic Compounds-contaminated Soil

研究代表者

井上 千弘 (Inoue, Chihiro)

東北大学・環境科学研究科・教授

研究者番号：30271878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,200,000円、(間接経費) 11,460,000円

研究成果の概要(和文)：効率的なバイオレメディエーションの実施のために、多種多様な微生物が生息する土壌中において、有害物質分解微生物の活性を維持することが必要である。本研究では微生物コンソーシアムが実汚染土壌で対象汚染物質の分解能力を安定的に発現させるために必要な要因を解明することを目的とした。研究に使用したコンソーシアムは塩素化エチレン分解コンソーシアム、芳香族炭化水素を優先的に分解するコンソーシアム、および高濃度多環芳香族炭化水素を分解するコンソーシアムである。それぞれについて分解過程での微生物動態解析と微生物間でやり取りされる物質の検討から汚染物質分解過程での共生システムの重要性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：For enforcement of effective bioremediation, it is necessary to maintain the activity of organic pollutant-degrading microorganisms in soil where a great variety of microorganisms inhabit. A purpose of this study is to elucidate a factor necessary for microbial consortium to express ability for degradation of the target pollutant in actual contaminated soil stably. Chlorinated ethylene-degrading consortium, preferential aromatic hydrocarbon-degrading consortium, and highly-concentrated polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading consortium are used in this research. Dynamics of microbial population and substances exchanging among microorganisms during the degradation of each pollutants were analyzed. In addition, the examination of a material exchanged between microbes was carried out. From those results, the importance of symbiosis system of microorganisms in the degradation process of pollutants was elucidated.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・地球・資源システム工学

キーワード：微生物コンソーシアム 土壌汚染 塩素化エチレン 芳香族炭化水素 優占種 遺伝子解析 生物分解

### 1. 研究開始当初の背景

今日の土壤汚染対策においては、浄化費用や環境負荷軽減の観点から汚染土壤の原位浄化手法の適用範囲拡大は喫緊の課題となっており、中でもバイオレメディエーション技術の進展は重要な要素となっている。土壤有機塩素化合物や石油系炭化水素で汚染された土壤のバイオレメディエーションを実施するには、汚染土壤内で対象物質を効果的に分解する微生物を活性化させる必要がある。実験室においては目的微生物のみを単離して純粋培養系で研究することが可能であり、この手法により多くの分解実験が実施され知見が得られている。しかしながら、多種多様な微生物が生息する土壤中において、それらとの厳しい生存競争の中で目的微生物の活性を維持することは困難であり、実験室の液体培養系で高活性を示した微生物が実際の汚染現場ではまったく機能しないことがしばしば生じている。

申請者らは汚染現場の土壤を用いて汚染物質分解微生物を強力に分解する微生物集積培養系(コンソーシアム)の作製を行ってきた。このうち TCE などの塩素化エチレンの脱塩素においては、脱塩素反応を担う *Dehalococcoides* 属細菌がメタン生成細菌との共生関係のもとで増殖することにより分解反応が進行することを見出した。また、灯油の分解では芳香族炭化水素を優先的に分解する微生物コンソーシアムを新たに見出し、このコンソーシアムを構成する主要微生物種のうち芳香族炭化水素の分解に直接関与するのは *Burkholderia* 属細菌であることを見出した。これらの研究により、実汚染サイトのようにさまざまな微生物が共存する系で対象汚染物質の微生物分解を効率よく進めるには、微生物コンソーシアム中での微生物の共生関係を有効利用することが重要であることが示唆された。

### 2. 研究の目的

バイオレメディエーションを実施するには、汚染土壤内で対象物質を効果的に分解する微生物を活性化させる必要があるが、多種多様な微生物が生息する土壤中において、目的微生物の活性を維持することは困難であり、実験室で高活性を示した微生物が実際の汚染現場では機能しないことがしばしば生じている。本研究ではバイオレメディエーションの適用範囲を拡大するために、微生物コンソーシアムが実汚染土壤で対象汚染物質の分解能力を安定的に発現させるために必要な要因を解明することを目的とした。研究に使用するコンソーシアムはメタン生成細菌が共生する塩素化エチレン分解コンソーシアムと、芳香族炭化水素を優先的に分解するコンソーシアムであり、分解過程での微生物動態解析と微生物間でやり取りされる物質の検討から汚染物質分解過程での共生システムを解明するとともに、液体と土壤培地

の比較検討から微生物 - 土壤間の相互作用を検討した。

### 3. 研究の方法

本研究の実施期間は3年間とし、メタン生成細菌が共生する塩素化エチレン分解コンソーシアム(嫌気性細菌)、芳香族炭化水素を優先的に分解するコンソーシアム(好気性細菌)の2種類を使用した。基質となる有機汚染物質をスパイクした培養液中からDNAを抽出し、16SrRNA 遺伝子、分解酵素群の遺伝子等の解析を行い、分解微生物群の群集構造変化を追跡した。また、反応生成物や代謝産物などから、特定の微生物の増殖や微生物間でやり取りされる物質を同定し、さらにその物質を培養系に添加した場合における各微生物の動態解析を行い、汚染物質分解過程での共生システムを検討した。同じコンソーシアムを用い、実土壤を模擬した土壤培地を用いた系での分解実験を行い、液体培地での結果との比較を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 塩素化エチレン脱塩素コンソーシアム

TCE 汚染サイトの地下水を起源とした TCE 脱塩素コンソーシアム( TES-1 )の作成を行った。TES-1 中には 16S rRNA 遺伝子解析から TCE からエチレンまで脱塩素呼吸を行う唯一の細菌である *Dehalococcoides* spp. の存在が確認されること、TES-1 中の微生物群集構造は、真正細菌としては Clostridiaceae 科に属する細菌が優占種であるが、脱塩素過程の中で異なる系統分類に属するクローン間で優占種が変動すること、しかし脱塩素挙動には大きな変化は見られなかったことから、優占種となった細菌のコンソーシアにおける役割には変化がないこと、古細菌としては脱塩素過程を通じて *Methanosarcina* spp. だけが検出されることなどを明らかにした( 図 1 )。

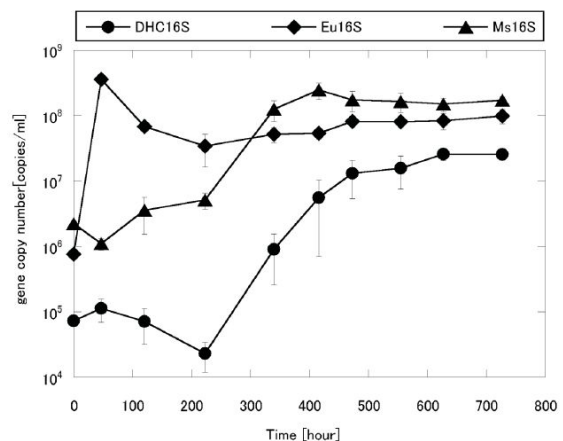


図1 TES-1 による TCE 分解過程での各細菌の 16SrRNA 遺伝子のコピー数の時間変化  
DHC: *Dehalococcoides* spp., Eu: 真正細菌全体, Ms: *Methanosarcina* spp.

TES-1 を用い、ジクロロエチレン (DCE) 類を出発物質として、それらの脱塩素挙動を解析した。cis-DCE を出発物質とした場合、TCE を出発物質とした場合と異なり *Dehalococcoides* spp. は速やかに増殖し、cis-DCE の脱塩素が生じた。初期 cis-DCE 濃度を高くした場合、塩化ビニルからエチレンへの脱塩素速度が減少するようになり、このとき TES-1 中の脱塩素酵素遺伝子のうち、*tceA* が残存し、*vcrA* と *bvcA* が減少したことから、TES-1 中の *Dehalococcoides* spp. は複数種存在することを明らかにした。

この脱塩素コンソーシアムにおけるメタン生成細菌の役割を解明するために、メタン生成阻害剤である BES を添加した培養系で *Methanosarcina* spp. の菌体量を制御した。このときの脱塩素挙動を解析したところ、*Dehalococcoides* spp. によるクロロエチレン類の脱塩素反応には、コンソーシアム中に共存している *Methanosarcina* spp. の存在が大きく影響していることを明らかにした。*Dehalococcoides* spp. の増殖収率の解析等から *Methanosarcina* spp. は *Dehalococcoides* spp. の生育に必要なビタミン B12 類似の増殖因子を提供していることが推察された。また詳細は示さないが、このコンソーシアム中に多数存在する Clostridiaceae 科に属する細菌の一部が水素を生産し、その水素を利用してメタンの生成とクロロエチレン類の脱塩素が生じていると推定された。以上の結果に基づき、本実験で得られた脱塩素コンソーシアム中の微生物間の相互関係の概念図を図 2 に示す。

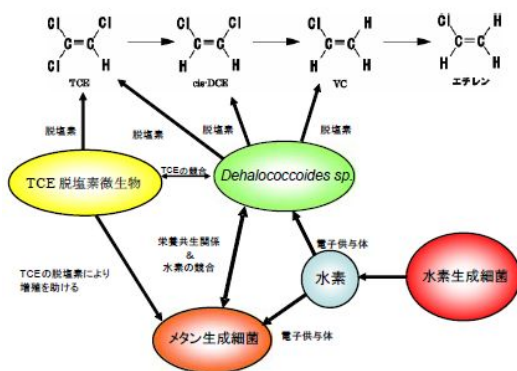


図 2 脱塩素コンソーシアムを構成する微生物間の相互関係 (概念図)

### (2) 芳香族炭化水素分解コンソーシアム

秋田市八橋油田周辺の石油汚染土壌から石油中の単環芳香族を脂肪族炭化水素の約 10 倍の速度で分解する微生物コンソーシアムを得た。このコンソーシアム (Y コンソーシアム) を用いて、芳香族 - 脂肪族炭化水素 2 成分系での分解実験を行ったところ、Y コンソーシアムは石油を用いた場合と同様に、芳香族炭化水素を優先利用した (図 3)。

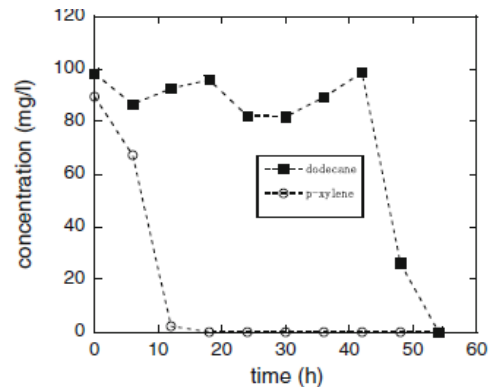


図 3 Y コンソーシアムによる p-キシレン (芳香族) - ドデカン (脂肪族) 2 成分系の分解挙動

この芳香族炭化水素を優先的に分解する Y コンソーシアムを用い、芳香族 - 脂肪族炭化水素 2 成分系および石油の分解過程における微生物の動態を詳細に解析したところ、コンソーシアムは *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Rhodanobacter* sp. 属の細菌が優占種になっていることが明らかになった (図 4)。また *Burkholderia* 属細菌が芳香族炭化水素を直接的に分解し、その分解生成物を *Cupriavidus* 属細菌がさらに利用することなどが示された。またこのコンソーシアムを出発とした土壌培養系から DNA を抽出し、16SrRNA 遺伝子のクローンライブラリーを作製し、液体培地での結果との比較を行い、両者で構成微生物種には大きな違いのないことを示した。

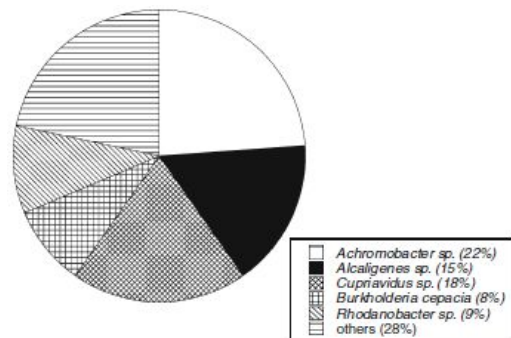


図 4 Y コンソーシアムを構成する微生物種の解析結果

### (3) PAH 分解コンソーシアム

東日本大震災によって生じた宮城県内 3 箇所 (気仙沼、石巻、仙台) の石油汚染土壌を採取し、抽出した DNA を次世代シーケンサーによりその微生物相を解析した。解析した試料は気仙沼が 6 地点 (K1~K6)、石巻 1 地点 (I1)、仙台 3 地点 (S1~S3) である。各試料中に存在する細菌を綱 (Class) (結果を図 5 に示す) 目 (Order) 属 (Genus) レベルで分類しその比較を行った。

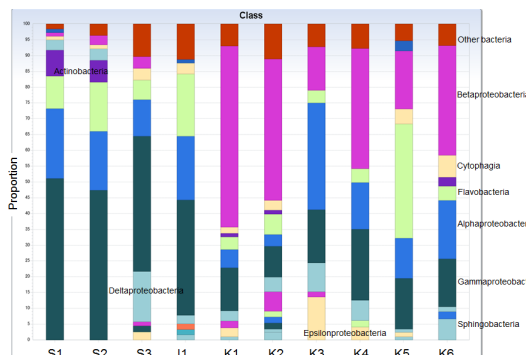


図5 石油で汚染された津波堆積物中の細菌相の比較（綱レベルでの対比）

これらの試料から灯油を炭素源とした集積培養を行い、さらに PAH(多環芳香族炭化水素)を炭素源とした集積培養を行って、PAH 分解能力の高いコンソーシアムを新たに作成し、構成微生物種を解析したところ、芳香族炭化水素の優先的分解を担っているのは *Azospirillum* 属細菌であることが推定された。この細菌を単離(*Azospirillum* sp. T7c 株と命名)し、各種基質の分解能力を検討した結果、1000 mg/L という極めて高い濃度のピレンを完全分解するなど高い PAH 分解能力が認められた。また、このコンソーシアムの群集構造を検討したところ、このコンソーシアムは *Azospirillum* 属細菌を含む 4 種類の細菌が主要構成細菌として共生していることが示された。

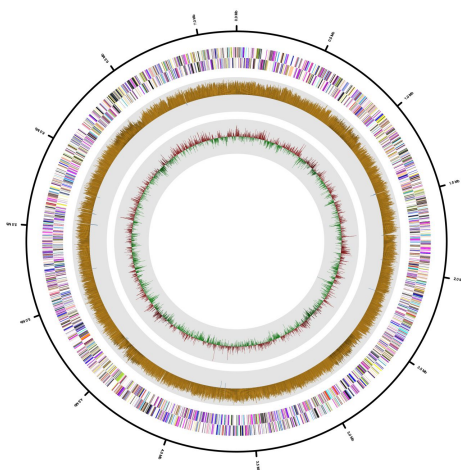


図6 *Azospirillum* sp. T7c 株の全ゲノム解析結果

*Azospirillum* sp. T7c 株の全ゲノム解析を行った結果(図6) 全遺伝子の 3.5%が芳香族分解に係る遺伝子であり、そのうち 4 つの遺伝子が多環芳香族の最初の攻撃に関する

遺伝子、7 つの遺伝子がカテコールの分解に関与する遺伝子であることなどが判明した。

以上、さまざまな微生物が共存する系で対象汚染物質の分解が効率よく進行する際には、数種類の微生物の共生関係が成立しており、実汚染サイトでのバイオレメディエーションを構築する上で重要な知見が示された。

## 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 4 件)

Bacosa H., Suto K., Inoue C.: Degradation potential and microbial community structure of heavy oil-enriched microbial consortia from mangrove sediments in Okinawa, Japan..[Journal of Environmental Science and Health, Part A, 48(8), (2013), 835-846] 査読あり、DOI: [10.1080/10934529.2013.761476](https://doi.org/10.1080/10934529.2013.761476)

Bacosa H., Suto K., Inoue C. : Bacterial Community Dynamics during the Preferential Degradation of Aromatic Hydrocarbons by a Microbial Consortium. [International Biodeterioration and Biodegradation, 74, (2012), 109-115] 査読あり、DOI: [10.1016/j.ibiod.2012.04.022](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.04.022)

Kotaro Ise, Koichi Suto, Chihiro Inoue : Microbial Diversity and Changes in the Distribution of Dehalogenase Genes during Dechlorination with Different Concentrations of cis-DCE.[Environmental Science & Technology, 45(12), (2011), 5339-5345] 査読あり、DOI: [10.1021/es104199y](https://doi.org/10.1021/es104199y)

Hernando Pactao Bacosa, Koichi Suto, Chihiro Inoue : Preferential utilization of petroleum oil hydrocarbon components by microbial consortia reflects degradation pattern in aliphatic-aromatic hydrocarbon binary mixtures.[World journal of microbiology & biotechnology, 27(5), (2011), 1109-1117] 査読あり、DOI: [10.1007/s11274-010-0557-6](https://doi.org/10.1007/s11274-010-0557-6)

〔学会発表〕(計 7 件)

H. Bacosa, C. Inoue : Unlocking the microbial black box in contaminated environments using a combination of different molecular techniques. International Conference on Interdisciplinary Research Innovation. (マニラ、フィリピン) (2012.12.4~6)

中空翔、須藤孝一、白鳥寿一、井上千弘: Dehalococcoides 属細菌を含む微生物群における生物的メタン生成の脱塩素反応に及ぼす影響 資源・素材 2012 (秋田) (2012. 9.11 ~13)

H. Bacosa, C. Inoue : Degradation of phenanthrene under methanogenic conditions

by microbial consortia from tsunami inundated rice paddy soils. Annual Meeting of Canadian Society of Microbiologists. (バンクーバー、カナダ) (2012.6.20~23)

H. Bacosa, C. Inoue : PAH degradation potential and diversity of microbial communities from tsunami sediments in Miyagi, Japan after the Great East Japan Earthquake. 112th General Meeting of the American Society for Microbiology (ASM) (サンフランシスコ、アメリカ) (2012.6.16~20)

H. Bacosa, C. Inoue : Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading microbial populations in tsunami sediments from different locations in Miyagi, Japan The 6th Japan-Finland Biotechnology Symposium (仙台) (2012.6.4~8)

Koichi Suto, Kotaro Ise, Chihiro Inoue : Microbial Structure of TCE degrading cultures obtained from several contaminated groundwater around Japan. 8<sup>th</sup> International Symposium of Subsurface Microbiology ( Garmisch-Partenkirche, ドイツ) (2011.9.14)

H. Bacosa, C. Inoue : Microbial Community Dynamics within an Aromatic Hydrocarbons-Preferring Consortium during Degradation of Petroleum Oil. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌) (2011.9.6~10)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者：  
井上 千弘(東北大学・大学院環境科学

研究科・教授)  
研究者番号：3 0 2 7 1 8 7 8

(2) 研究分担者：  
須藤 孝一(東北大学・大学院環境科学  
研究科・准教授)  
研究者番号：9 0 2 9 1 2 5 2  
畑山 正美(東北大学・大学院環境科学  
研究科・助教)  
研究者番号：3 0 4 4 7 1 4 8

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：