

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651089

研究課題名(和文) 未知環境微生物群の機能強化による重金属汚染土壌のオンサイト修復技術の開発

研究課題名(英文) Development in on-site remediation of the heavy metal-contaminated soils by the metabolic activation of as-yet-unidentified microorganisms

研究代表者

堀 知行 (Hori, Tomoyuki)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：20509533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、重金属汚染土壌の分子診断法および修復活性化法の提案を目指し、主要な有害重金属類の一種であるセレンの還元 (Se^{6+} [拡散性・有毒] Se^{4+} [非拡散性・有毒] $\text{Se}(0)$ [非拡散性・低毒性]) に関する新規な環境微生物群 (Dechloromonas属細菌群、Thauera属細菌群、Hydrogenophaga属細菌群、Geothrix属細菌等) を次世代シーケンサー解析と化学分析技術の融合によって明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the microorganisms involved in the reduction of selenate and selenite in the heavy metal-contaminated soils using a combination of the biogeochemical analyses and high-throughput sequencing of 16S rRNA genes. The contaminated soils were incubated anaerobically with acetate (as the electron donor) and selenate (as the electron acceptor). The concentration of selenate and selenite were determined by ICP-AES during the incubation. And the illumina deep sequencing of the 16S rRNA gene amplicons monitored the transition of the microbial community. As a result, the novel species within the genera Dechloromonas, Thauera, Hydrogenophaga, and Geothrix, were identified as selenate-reducing and/or selenite-reducing bacteria, thereby playing key roles in the bioremediation of the heavy metal-contaminated site.

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：環境技術 水質汚濁・土壌汚染防止・浄化 生物圏現象 地球化学 微生物

1. 研究開始当初の背景

(1) 改正土壌汚染対策法の施行が 2010 年 4 月から始まり、汚染状況把握のための制度拡充、汚染土壌処理に関する規制の厳格化に伴って、土壌汚染の調査・対策件数の増加および土壌汚染地を所有する個人や中小企業への負担増大が予想されている。汚染土壌対策の主流である掘削除去では、その実施にコストがかかること、さらには掘削後の搬出土壌の不適正処理によって汚染拡散が引き起こされることなどが社会問題化している。国民の健康が保護される安心で安全な生活環境、健全な自然生態系を確保してゆくためには、掘削除去に代わる、確実かつ低コスト・低環境負荷型の新しい環境修復技術の開発が必要不可欠である。

(2) 掘削除去に代わる土壌修復技術として、微生物を利用して汚染環境を浄化する「バイオレメディエーション」が有望視されている。本手法は、自然の浄化機能を活用するため、汚染除去にかかるコストを抑えることができ、さらにその土地固有の自然生態系への影響を和らげられるという点で優れている。しかし、必ずしも十分な環境修復効果が得られておらず、その適用は国内の原位置浄化実施総数の約 10%に留まっている。そのため、バイオレメディエーションの更なる高効率化・多機能化が求められている。

(3) 土壌汚染対策法で指定されている特定有害物質(25種)のうち、重金属汚染は揮発性有機化合物や農薬による汚染と比べて、汚染到達深度は浅いものの、汚染件数、汚染面積や汚染土量が大きいという特徴がある。特に、国内での汚染状況が最も深刻な重金属類である「六価クロム」と「六価セレン」の対策が求められている。これらの広く薄く大量に存在する重金属汚染土壌の修復には原位置の環境微生物群を利用した低コスト・低環境負荷型のバイオレメディエーションが有効と考えられる。

(4) 土壌などの自然環境に存在する微生物の多くが未培養であると判明してから、数十年が経過したが、この間の分子生態学的手法の進展により、培養を介することなく、未知環境微生物群の全体像(種類や分布)が捉えられるようになった。さらにごく最近登場した次世代シーケンサーは、環境中の微生物遺伝子情報の大量取得を可能にし、それによって環境微生物のより詳細な群集動態を解明できるまでになった。一方で、化学分析技術も成熟段階にあり、環境中の金属元素動態を厳密に把握できるようになってきている。このような異分野にまたがる最先端技術の台頭は、環境学研究に新たな潮流を生み出しつつある。バイオレメディエーションの効率化や多機能化に向けた第一のステップは、分

子生態学分野における最先端機器「次世代シーケンサー」と化学分析技術を融合活用することで、汚染現場で実際に活躍している未知環境微生物群を同定し、その能力を最大限に引き出してやることにある。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、「微生物還元反応により重金属汚染土壌を低レベル毒性化した後、低速度で拡散させ、人体や生活環境への影響を極小化しながら自然に循環させる」という独自コンセプトのもと、最新の次世代シーケンサーを用いた環境メタゲノミクスと ICP-AES 等の化学分析技術を有機的に結びつけることで、重金属汚染土壌の還元、即ち六価クロム還元(Cr^{6+} [拡散性・有毒] Cr^{3+} [非拡散性・無毒])および六価セレン還元(Se^{6+} [拡散性・有毒] Se^{4+} [非拡散性・有毒] $\text{Se}(0)$ [非拡散性・低毒性])に関与する未知環境微生物群の実体を明らかにし、さらに得られた知見に基づく当該汚染土壌の分子診断法および修復活性化法の提案を目指した。

(2) 環境微生物群による金属代謝機構の「共通原理」に迫る着想のもと、本研究課題に取り組むことにより、微生物酸化還元を受ける様々な金属元素(鉄、ヒ素など)の環境動態機構解明や地球炭素循環への影響評価に対して、有用かつ普遍的な知見を与えることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 重金属汚染土壌の培養試験：六価クロム(0.68 mg/L)または六価セレン(0.007 mg/L)で汚染された重金属土壌を環境浄化企業より譲渡頂いた。汚染土壌 5g に滅菌水を添加し、20ml のスラリーを作成した。土壌スラリーを嫌氣的にガラスバイアルに封入し、前培養に供することで内在する環境微生物群の代謝を活性化させた。さらに重金属類を電子受容体、酢酸を電子供与体とする本培養試験を行った。クロム培養試験では、培養開始時に 3 mM の酢酸と 0.1 mM の六価クロムを添加し、さらに六価クロムを培養 6 日目と 8 日目に同濃度で追加添加した。培養 0、4、8、11、15 日にサンプリングを行い、化学分析に供した。またセレン培養試験では、培養開始時に 3 mM の酢酸と 0.15 mM の六価セレンを添加し、さらに六価セレンを 2、4、6 日目に同濃度で追加添加した。培養 0、1、2、4、8 日にサンプリングを行い、化学分析に供した。なお対照区としてオートクレーブ滅菌土壌に同様に電子供与体および電子受容体を添加した系、電子供与体は加えるものの電子受容体を添加しない系を用意した。酢酸濃度は HPLC により測定し、六価クロム、六価

セレン、四価セレンの濃度は ICP-AES によって測定した。

(2) 次世代シーケンサーによる環境メタゲノム解析：微生物的な還元反応が観察されたセレン土壌に焦点を当て、経時的に採取した培養スラリーを以下の 16S rRNA 遺伝子に基づく環境メタゲノミクスに供した。(i) DNA 抽出：ビーズ法を用いて土壌微生物群を破碎した後、フェノールとクロロホルムを用いた精製ステップを経ることで破碎溶液中のタンパク質を除去した。その後、RNA 消化処理を行うことで DNA を精製し、定量を行った。(ii) PCR 増幅：抽出 DNA を鋳型として用い、16S rRNA 遺伝子 V4 領域 (約 300 bp) を標的として PCR を行った。(iii) PCR 産物の精製：得られた PCR 産物をマグネチックビーズおよびゲル切り出しによって二段階で精製し、その濃度を蛍光定量により測定した。(iv) 次世代シーケンサー解析：精製 PCR 産物を次世代シーケンサー (MiSeq、イルミナ) による大規模塩基配列解読に供した。各スラリーから遺伝子断片を数千から数万リード解読し、キメラチェック後に系統解析を行った。

4. 研究成果

(1) 汚染土壌における重金属還元：クロム汚染土壌の嫌気培養試験では、本培養区に加えて上述の対照区 においても Cr^{6+} の減少が見られた。さらに酢酸濃度は、すべての処理区で培養期間を通して減少せずに、ほぼ一定の値を示した。これは、 Cr^{6+} の減少が微生物による還元依存したものでなく、土壌吸着や土壌化学成分による還元起因することを強く示唆している。一方でセレン汚染土壌では、本培養区において Se^{6+} の減少が観察され、それに連動して Se^{4+} の上昇が起こった。対照区 においては添加した Se^{6+} が蓄積し続けた。また本培養区ではセレン還元の観察される時期に酢酸濃度の減少が見られた。対照区 においても酢酸の減少が見られたが、本培養区と比べると減少量は少なかった。対照区 における酢酸の減少は、添加セレン以外の汚染土壌に残存する電子受容体 (酸化鉄等) の還元によるものと考えられた。本培養区における酢酸酸化とセレン還元は化学両論的にほぼ一致しており、六価セレンは土壌に内在する微生物によって還元されている事が強く示唆された。

(2) 環境メタゲノミクスによるセレン還元微生物の同定：セレン培養土壌を経時的に採取し、DNA 抽出後、16S rRNA を標的とした PCR および次世代シーケンサーによる環境メタゲノミクスに供した。その結果、セレン還元が見られた時期に脱ハロゲン呼吸細菌として知られる新規な *Dechloromonas* 属細菌群 (*Dechloromonas hortensis*, *Dechloromonas*

aromatica, *Dechloromonas denitrificans* の近縁種等) が大幅に増加していた。さらに鉄還元細菌として知られる *Geothrix fermentans* や硝酸還元能を有する *Thauera* 属細菌群 (*Thauera butanivorans*, *Thauera chlorobenzoica*, *Thauera phenylacetica* 等)、*Hydrogenophaga* 属細菌群 (*Hydrogenophaga pseudoflava*, *Hydrogenophaga bisanensis*, *Hydrogenophaga palleronii* 等)、*Azoarcus indigenus*, *Acidovorax oryzae* 等の近縁種が対照区 と比べて、有意に上昇していた。よってこれら多種多様な嫌気呼吸菌がセレン還元に関与していることが強く示唆された。一方で、酢酸利用性のメタン生成菌はほとんど検出されず、金属元素 (セレンや鉄) の還元が汚染土壌における主要な最終電子受容反応であることが明らかになった。本研究により、新規な環境微生物群が重金属汚染土壌におけるセレン還元に関与していることが示され、本細菌群がセレン汚染土壌の分子診断法を確立する上で指標微生物として有効であること、汚染土壌修復活性化法として電子供与体 (特に酢酸等) の添加が効果的であることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

“Biodegradation potential of organically enriched sediments under sulfate- and iron-reducing conditions as revealed by the 16S rRNA deep sequencing”, 堀知行, 木村真人, 青柳智, Navarro R. Ronald, 尾形敦, 迫田章義, 片山葉子, 高崎みつる, J. water environ. technol., in press (2014), 査読有

“IODP337「下北八戸沖石炭層生命圏掘削」に参加して 世界最大の「ちきゅう」微生物学研究室”, 堀知行, 日本微生物生態学会誌, vol.28, pp.24-25, 2013.03, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

“Effects of supplementation with sulfate and lepidocrocite on the composition and activity of microbial communities in Hedoro (organically enriched sediment)”, 堀知行, 木村真人, 青柳智, Navarro R. Ronald, 尾形敦, 迫田章義, 片山葉子, 高崎みつる, The 22th Korea-Japan Symposium on Water Environment - Current and Future Sewage Treatment Technology-, テグ (韓国), 2013.10.21-22

“ 選択的二段培養法により得られた新しい鉄還元細菌群の系統と機能 ”，青柳智，成廣隆，花田智，田尾博明，鎌形洋一，堀知行，日本農芸化学会 2013 年度大会，仙台、2013.03.24-28

“ 東日本大震災によって打ち上げられたヘドロの嫌気分解ポテンシャルの評価 ”，木村真人，山田奈海葉，青柳智，片山葉子，高崎みつる，堀知行，日本水環境学会，大阪，2013.03.11-13

“ Enrichment and phylogenetic characterization of microorganisms involved in reduction of highly crystalline iron(iii) oxides ”，堀知行，青柳智，成廣隆，竹内浩士，花田智，鎌形洋一，Microenergy 2012, Aarhus (Denmark), 2012.05.06-09

“ Population dynamics and functional flexibility of methanogenic consortia in anaerobic digesters ”，堀知行，日中バイオテクノロジー国際シンポジウムーバイオテクノロジーと農業・環境ー，東京，2012.05. 13-14

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀 知行 (HORI, Tomoyuki)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：20509533