

# 分子生物学的手法による 汚染土壌浄化にかかわる微生物の解析<sup>注)</sup>

宮 晶子\* 軽部 真起子\*\* 珠坪 一晃\*\*

## Microbial Structure Analysis of Contaminated Soils utilizing Molecular Biological Tools

by Akiko MIYA, Makiko KARUBE, & Kazuaki SYUTSUBO

A study was made on the biodegradation of petroleum-contaminated soils using weathered crude oil and phenanthrene as hydrocarbon sources. Experiments were conducted to study oil biodegradation characteristics of soil samples and analyses were made on microbial structures by PCR-DGGE in an attempt to identify dominant petroleum biodegrading bacteria. Study results indicated that the combination of an appropriate propagation method and a microbial analysis could enable estimating biostimulation effects of petroleum-contaminated soils within a relatively short time.

**Keywords:** Contaminated soil, Bioremediation, Molecular biological tools, Microbial structure, PCR, DGGE, Isolation, Petroleum hydrocarbon-contaminated soils, Alkanes

### 1. はじめに

近年、種々の有害物質による土壌、河川水、地下水などの環境汚染を浄化する技術が開発されてきた。微生物による浄化法は分解できる物質の種類や濃度が限定されるものの、常温・常圧の穏やかな条件下で、対象汚染物質を無害な化合物にまで分解できるため、他の浄化法と比較して低コストで浄化が可能な方法として注目されている。

微生物による浄化法としては、通常浄化対象の環境中に存在している土着の微生物群を利用する方法（バイオスティミュレーション）が用いられるが、土着の微生物群のなかに汚染物質分解菌が存在しない場合は、分解菌を添加する方法（バイオオーグメンテーション）が用いられる。

しかし、環境中で微生物を用いるにあたっては、コスト以上に、浄化技術及び浄化終了の評価が事業者や周辺

住民に受け入れられる信頼性の高いものであることが求められる。

### 2. 分子生物学的手法の発展

汚染サイトごとに異なる様々な条件のもとで所定の浄化効果を得るためには、利用微生物のモニタリングと、その結果に基づいた適切な施工法の選択が欠かせない。処理現場の維持管理上は、簡易で迅速な浄化微生物の定量方法の確立が重要である。一方で、周辺環境への影響、浄化終了後の微生物の生残性など、安全性の評価においても、微生物の適正な検出、解析技術が求められる。

従来から利用されている微生物検出技術は、寒天培地や液体培地を利用した培養を伴うものが主流であった。しかし、土壌等の環境中で生育する微生物の大部分が、従来の培養法では検出できないことが知られるようになり、微生物のDNAを指標にした新しい検出方法が開発されてきた。

#### 2-1 分解菌（群）のモニタリング

トリクロロエチレン（TCE）による土壌・地下水汚染は近年、全国で顕在化している。TCEは揮発性の物質であるため、浄化処理方法として真空抽出法や揚水曝気法といった物理的方法が適用されてきた。しかし、これらの方法は高濃度の汚染除去に対しては有効である

\* 株原総合研究所 生物研究室 工学博士

\*\* 株原総合研究所 生物研究室

\*\* (現)(独)国立環境研究所 水圏環境研究領域 水環境物質研究室 工学博士

注) 用水と廃水, 第45巻, 第1号, pp.34~38 (2003) 記載の論文に加筆・修正を行った。

が、低濃度になると時間をかけてもそれ以上なかなか濃度が低下しない、といった課題がある。TCEはある種のメタン資化性細菌が好氣的に分解できることが知られており、低濃度のTCE汚染に対してはわが国でもこれを利用したバイオスティミュレーションの実証試験が行われ、有効性が確認されている<sup>1, 2)</sup>。

メタン資化性細菌は増殖が遅く、培養法を用いた定量では、結果が出るまでに4週間を要する。そこで、メタン資化性細菌のTCE分解活性に関与するメタンモノオキシゲナーゼという酵素の遺伝子を指標にした検出法が開発された。土壌や地下水試料中から直接DNAを抽出し、PCR (polymerase chain reaction) という方法でこの遺伝子に特異的な配列部分だけを増幅させることにより、4~5日で検出が可能になった。PCR法による計数値と従来法であるMPN法(最確値法)による計数値には良い相関関係が得られ、現場の運転管理用のモニタリング方法としては十分に利用可能なことが確認された<sup>3)</sup>。

同様に、分解にかかわる酵素の遺伝子を指標とした方法としては、アルカン分解酵素(アルカンヒドロキシラーゼ)遺伝子<sup>4)</sup>やベンゼン、トルエンなどの芳香族分解にかかわる酵素(芳香環水酸化酵素)遺伝子<sup>5)</sup>を指標にした分解菌検出方法が報告されている。酵素遺伝子を指標にする方法は、特定の機能をもった各種微生物をある程度総括的に検出することができるため、特にバイオスティミュレーションの運転管理指標として有効であると言える。

特定の微生物(群)を検出する方法としては前述のPCR法のほか、微生物細胞中のDNAの特定部分を認識するDNA断片(DNAプローブ)を蛍光色素で標識し、細胞内でハイブリダイズさせるFISH (fluorescent in situ hybridization) 法<sup>6)</sup>という方法がある。土壌試料の場合は自家蛍光をもつ粒子が多く存在するため、FISH法の適用は困難なことが多い。これに対し海水等の夾雑物の少ない試料では、非常に有用なツールとして利用できる。石油汚染海水のバイオスティミュレーションによる浄化実験において、栄養塩の添加に伴い特定のアルカン分解菌が微生物群集内で優占化し、その結果アルカンの分解速度を数倍高められることが、FISH法による石油分解菌のポピュレーション調査の結果確認されている<sup>7)</sup>。

これらの検出方法はいずれも、汚染サイトにバイオスティミュレーションが適応可能かどうかを判断するトリータビリティ試験にも利用できると考えられる。

一方、バイオオーグメンテーションにおいては、添加微生物の周辺環境への影響や生残性を確認するために、

特に低濃度まで定量できる技術が求められる。TCE分解を目的としたバイオオーグメンテーションに適応するために、定量PCR法が開発されている。適切なプライマの設計により、フェノール・トルエン資化性細菌 *Ralstonia eutropha* KT-1を地下水試料中で $2.1 \times 10^1$  cells/mlまで8)、またメタン資化性細菌 *Methylocystis* sp. Mを土壌試料中で $1 \times 10^4$  cells/gまで9) 検出できたことが報告されている。

バイオオーグメンテーションにおいても日常的な運転管理上は、より簡易な迅速検出方法が求められる。地下水試料でポリクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法(ELISA)では $1 \times 10^5$  cells/ml、モノクローナル抗体を用いた蛍光免疫測定法では $4 \times 10^3$  cells/mlの検出がいずれも1日で可能であった<sup>10)</sup>。

## 2-2 微生物群集構造の解析

有機性廃水処理に多く用いられている活性汚泥や土壌中では、様々な微生物が作用して物質循環に寄与している。前述のようにこれらの微生物の多くは培養ができないため、従来は微生物群集構造を把握することは難しかった。近年、遺伝子により微生物群集構造を解析する手法が開発され、バイオレメディエーションにおける運転管理あるいは安全性評価への適応例も報告されている。

微生物群集構造解析には、16S rRNA (16S rDNA) 遺伝子という微生物間で共通に保存されている遺伝子配列部分が用いられることが多い。土壌等の試料から遺伝子を抽出し、16S rDNA 遺伝子をPCR法で増幅した後、DNA変性剤の濃度勾配をつけたゲルを用いて電気泳動を行うPCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法では、増幅された様々なDNA断片が塩基配列の違いにより分離される。分離された各バンドはそれぞれ違う個々の微生物のDNA断片に対応し、バンドの太さ(輝度)は微生物群集における相対的な存在比を表すとされている。PCR増幅時にすべてのDNA断片が必ずしも均等に増幅されるわけではないこと、ある程度細胞濃度が高いもの以外は検出できないこと、などの問題はありますが、主要な構成微生物群の変移を追跡する手法として注目されている。

TCE汚染地下水のメタン資化菌を利用した浄化において、メタンの注入によってバイオスティミュレーション開始時に微生物群集構造の多様性が一時的に減少するが、その後多様性が高く、安定した群集構造が形成された。また、実験開始時と群集構造が安定した後では、優占化したメタン資化菌の種類が異なったことが報告されている<sup>11)</sup>。

これ以外の微生物群集構造の解析法としては、蛍光色素を付加したプライマを用いたPCR法により増幅した16S rDNA遺伝子を制限酵素で切断した後、電気泳動で分離、解析するT-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) 法をバイオスティミュレーションのプロセス管理に適用した例が報告されている<sup>12)</sup>。

### 3. 分子生物学的手法による石油汚染土壌の微生物群集構造解析

石油類による環境汚染は、船舶事故等による原油あるいは燃料油の流出による広域の海洋汚染がよく知られているが、陸上においても事故や備蓄タンク、パイプライン、工場等からの漏洩により土壌や地下水などが汚染された例が数多く報告されている。

石油の構成成分は多岐にわたるため、汚染サイトに応じて汚染の質やバイオレメディエーションの効果が大きく異なるのが特徴である。また処理対象の環境に応じて土着の石油分解微生物の種類や量も大きく異なっている。そのため、例えば石油汚染土壌のバイオレメディエーションによる浄化の可否を判断するためには、長期間(5~6週間以上あるいは数箇月)のトリータビリティ試験を行うことが通常必要である。

バイオレメディエーションによる石油汚染土壌修復の高効率化、安定化のためには、土着微生物群の群集構造と石油分解特性との関係を明確化し、土壌に応じた最適な施工法を開発する必要がある。

そこで、土壌土着微生物群集の構造と土壌の石油分解能との関係を明確化するために、履歴の異なる石油汚染土壌について、原油あるいはフェナントレンを炭素源とした集積培養実験を行い、ガスクロマトグラフマスペクトロメトリ(GC-MS)による各土壌の石油分解特性の把握と、分子生物学的手法(PCR-DGGE法)による優占石油分解細菌の同定を試みた。

#### 3-1 実験方法

石油分解実験は2種類の履歴の異なる石油汚染土壌(土壌I, 土壌II)について容量50 mlのガラス遠沈管を用いて行った。遠沈管には、2 gの土壌と予め熱処理し軽質分を除去した原油(Weathered crude oil, 以下W.oilとする)あるいはC<sub>0</sub>-フェナントレンを10 mg, 培地として滅菌水を10 ml, 更に無機栄養塩を添加し、28℃で2週間振とう培養を行った。分解実験終了時に培養液をサンプリングし、細菌数(CFU)の計測及び、16S rDNA遺伝子を標的にしたPCR-DGGE法による微生物群集構造解析に供した。また、各土壌の石油分解の

様相を調査するために、培養液中から石油成分の抽出を行いGC-MSによる分析を行った。また対照系として、炭素源の添加をせずに同様に操作した土壌についても解析を行った。

培養終了時の各土壌集積培養体から、栄養寒天培地(Tryptic Soy Broth-agar)を用いて菌の単離を行った。単離した各菌は、液体栄養培地で一晚増殖させた後、W.oilを単一炭素源として添加した液体無機培地に1%(容量%)入れ、2週間振とう培養したものをGC-MS分析することで、菌の石油分解特性を調査した。

#### 3-2 結果と考察

石油分解実験に供試した土壌の細菌数は10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> CFU/g-soil程度であったが、W.oilあるいはフェナントレンを添加して培養を行った系列では、2週間後の培養終了時には10~1000倍にまで菌数の増加が観察され、石油汚染に応じた微生物群集が形成されたことがわかった。

土壌Iでは土壌IIに比べてアルカンの分解が良好であり、培養後1週間目には約90%が分解された。一方、多環芳香族炭化水素(PAHs)の分解に関しては土壌IIの方が優れており、ナフタレン、フェナントレン、フルオレンはほぼ完全に、ジベンゾチオフェン(DBTs)についても80%程度が分解された(図1)。このように、土壌によって異なる石油分解特性が示された。

図2には、これら石油分解土壌の微生物群集構造をPCR-DGGE法により解析した結果を示した。I, II土壌

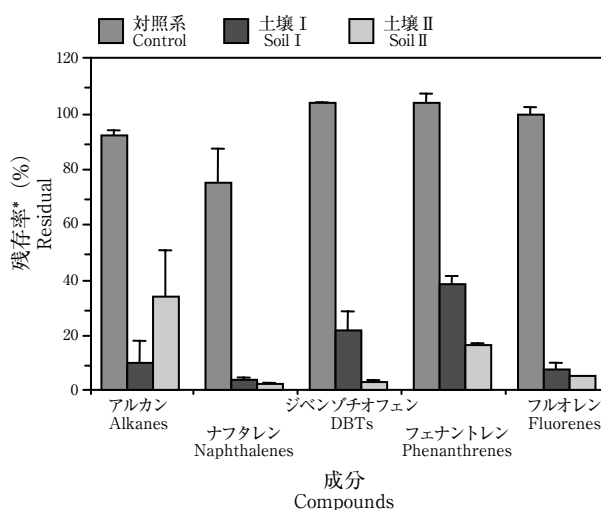


図1 各土壌のW.oil(原油)主要構成成分の分解 (\*各成分の初期濃度を100%としたときの残存率(%))

Fig. 1 Biodegradation of compounds in W.oil by bacteria in each soil (Initial concentration of each compound was set at 100%)

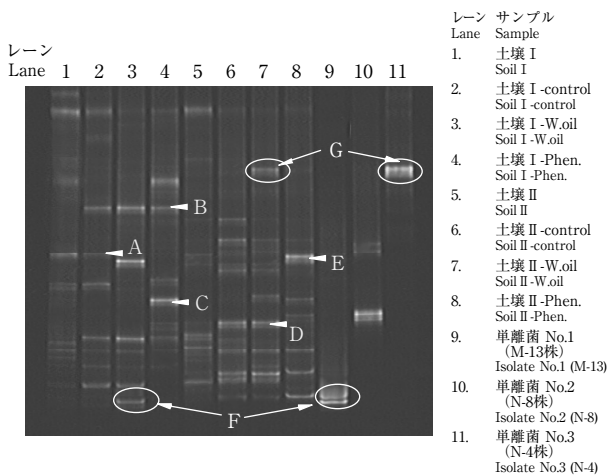


図2 石油集積土壌のPCR-DGGE解析による微生物群集構造解析  
**Fig. 2** DGGE profiles of petroleum hydrocarbon-contaminated soil samples

間において主要なバンドすなわち細菌種のパターンは異なり、土壌により異なった微生物群集構造が形成されていることが分かった。一方、同一の土壌サンプルで培養条件（炭素源）が異なる場合では、いくつかのバンドの一致が見られた（バンドA, B, D）。また図2には、W.oil集積培養土壌より単離した、アルカン分解細菌の泳動パターンも示した（レーン9）。これらの細菌に対応するバンドが、W.oil集積培養系のI-W.oil（バンドE）から検出され、遺伝子配列を解析したところ、*Rhodococcus* sp.（単離菌M-13株＝バンドE）に近縁な細菌であることがわかった。アルカン分解能の低かった土壌IIでは、この細菌の存在は確認できなかった。

一方フェナントレン集積培養系では、土壌間で主要なバンドの一致（I-Phen. とII-Phen. のバンドC）が見られたが、多環芳香族炭化水素分解菌とは同定できなかった。代表的なバンドについてそれぞれの塩基配列をデータベース上で既知の塩基配列と比較し、同定した結果を表に示す。

土壌Iから検出、単離した*Rhodococcus* sp. に近縁な細菌（M-13株）と、土壌IIから検出、単離した*Pseudomonas* sp. に近縁な細菌（N-4株）のアルカン分解特性を比較調査した結果を図3に示した。M-13株は、全アルカン成分の95%以上を分解する分解能を有することが示されたが、一方のN-4株は、直鎖アルカン（C10～C36）を約50%分解したが、分岐鎖アルカン（プリスタン・フィタン）については、分解していないことが明らかとなった。土壌Iが高いアルカン分解能を持っていること、土壌Iから検出・単離されたアルカン

表 16s rDNAによる相同性解析結果  
**Table** Results of 16s rDNA sequence similarity analysis

バンド	最近縁種	相同性(%)
Band	Closest sequence	Similarity(%)
A	Uncultured bacterium IAFESB3 (AF273321)	99
B	Uncultured bacterium DGGE band F (AF087803)	100
C	Uncultured beta proteobacterium clone 36-9 (AF351219)	96
D	Uncultured bacterium DF05 (AF247777)	99
E	Uncultured beta proteobacterium GC152 (AF204242)	94
F	<i>Rhodococcus</i> sp. 67-BEN001 (AY044096)	100
G	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> strain LB19 (AF390747)	100

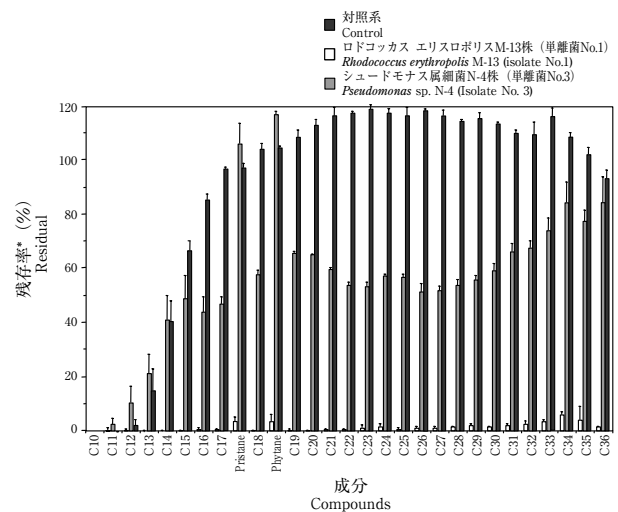


図3 *Rhodococcus erythropolis* M-13株と*Pseudomonas* sp. N-4株のアルカン成分の分解

(W. oilの初期濃度を100%としたときの残存率(%)で示す)

**Fig. 3** Biodegradation of alkanes included in weathered crude oil by isolated bacterial strains. (Initial concentration of each compound was set 100%)

分解菌*Rhodococcus* sp. M-13株が直鎖、分岐鎖アルカンについて95%以上の分解能をもつことから、*Rhodococcus* sp. M-13株が土壌中でのアルカン分解に関与していることが示唆された。

以上の結果から、適切な培養法と微生物群集解析法を組み合わせるにより、石油汚染土壌のバイオスティミュレーション効果の予測が比較的短期間でできる可能性が示唆された。

#### 4. 今後の展望

以上の研究例からも明らかのように、汚染物質の浄化を行おうとする環境に応じて環境汚染物質の分解能、換言すれば汚染物質の分解を担う微生物群集の構造は異なる

っており、バイオレメディエーションを効率的かつ安定的に施工するための指針を作成していくためには、より多くの事例について、土着の微生物群集構造の把握と、それらが汚染物質分解に果たす役割に関する知見を蓄積していくことが重要であると考えられる。また、これらの分子生物学的な微生物群集構造解析技術は、バイオレメディエーションの有効性や安全性を評価するための基盤となる技術でもあり、今後の更なる発展が期待される。

#### 参考文献

- 1) 北川政美, 下村達夫, 谷口紳: バイオレメディエーション実証試験, 造水技術, 22, 2, 58~62, (1996)
- 2) 北川政美, 長谷川武, 江口正浩, 河合達司, 中村寛治, 岡村和夫: メタン酸化細菌を利用したトリクロロエチレン (TCE) 汚染地下水の現位置実証試験, 第9回衛生工学シンポジウム講演要旨集, 250~255, (2001)
- 3) 下村達夫, 内山裕夫, 矢木修身: PCR法を用いたTCE分解メタン酸化性細菌の迅速計測, 第4回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究会講演集, 59~64, (1995)
- 4) 清和成, 河野哲郎, 森一博: 環境汚染物質の分解菌をモニタリングするPCR法, バイオサイエンスとインダストリー, 60, 2, 39~40, (2002)
- 5) 鈴木朝香, 帆秋利洋: 芳香族分解菌に特異な遺伝子の検出法, 大成建設技術研究所報, 31, 215~218, (1998)
- 6) R. I. Amman, L. Krumholz and D. A. Stahl: Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology, J. Bacteriol., 172, 762~770, (1990)
- 7) 珠坪一晃, 瀧寛則, 原山重明: 石油の微生物分解に及ぼす栄養塩濃度の影響, 第34回日本水環境学会年会講演集, 533, (2000)
- 8) 中村寛治, 渋谷勝利, 岡村和夫: バイオレメディエーションにおける微生物の利用及びその検出-我が国における実証試験を例に-, 土と微生物, 56, 1, 37~44, (2002)
- 9) H. Shinjo, K. Onda, A. Miya, M. Kitagawa, O. Yagi and K. Iwasaki: Quantitative Determination Specified Trichloroethylene degrading microorganism, *Methylocystis* sp. strain M, in the proceeding of International aquatic environmental workshop, An overview of environmental remediation technologies and structuring social systems to reduce environmental problems, 107~110, (2000)
- 10) K. Onda, H. Shinjo, A. Miya, S. Taniguchi, O. Yagi and K. Iwasaki: Development of an Immunoassay Method for Monitoring *Methylocystis* sp. strain M, in the proceeding of the First International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, (1998)
- 11) 谷佳津治, 那須正夫: 環境中の微生物モニタリング-バイオレメディエーションを例として, 環境技術, 30, 6, 27~32, (2001)
- 12) 中村寛治, 石田弘昭, 飯泉太郎, 鈴木義彦: バイオステイミューレーションのプロセス管理を目的とした16S rRNA遺伝子による微生物群集構造の解析, 環境工学論文集, 38, 175~186, (2001)

