

微生物を活用するバイオレメディエーション技術の開発とそのリスク評価

Development of Bioremediation Using Microorganisms and Its Risk Evaluation

矢 木 修 身

OSAMI YAGI

日本大学生産工学部応用分子化学科 〒 275-8575 習志野市泉町 1-2-1

E-mail: yagi.osami@nihon-u.ac.jp

Department of Applied Molecular Chemistry, College of Industrial Technology, Nihon University, 1-2-1 Izumi-cho, Narashino, Chiba 275-8575, Japan

キーワード: バイオレメディエーション, トリクロロエチレン, 土壌汚染, メタン酸化細菌, 組換え微生物

Key words: Bioremediation, trichloroethylene, soil pollution, methane oxidizing bacteria, Living modified microorganisms

(原稿受付 2009 年 11 月 15 日 / 原稿受理 2009 年 11 月 19 日)

1. はじめに

このたび学会賞という大変名誉ある賞をいただき大変光栄に存じます。

環境バイオテクノロジーの学理の構築を目指し環境バイオテクノロジー研究会が 1995 年に設立され、2000 年 4 月には環境バイオテクノロジー学会となりました。この間、筆者は、研究会及び学会を通して、バイオレメディエーション技術を活用する土壌・地下水浄化の研究を遂行してきました。特に有害物質分解微生物の分離、その活用とリスク評価手法の開発に取り組みました。受賞講演を中心に、これまでの研究成果を紹介いたします。

2. バイオレメディエーション技術の現状

全国各地の土壌・地下水や工場跡地からトリクロロエチレン (TCE) やテトラクロロエチレン (PCE), シス-1,2-ジクロロエチレン (cis-DCE) およびビニルクロライド (VC) などの揮発性有機塩素化合物が、また砒素、鉛、水銀、六価クロムなどの金属類が、さらにダイオキシン、ベンゼン、硝酸・亜硝酸性窒素等が高い頻度で依然として検出され大きな問題となっている。わが国においては、2007 年度までに合計 4,006 件の土壌汚染が判明しており¹⁾、2008 年度の調査・対策受注件数は 12,000 件以上で受注高は約 1,300 億円以上と報告されている²⁾。汚染土壌の浄化方法として、主に固化・不溶化、化学的酸化、焼却、洗浄等の物理化学的手法が用いられているが、浄化コストが高いため比較的安価で無害化処理技術であるバイオレメディエーション技術が注目され、種々の技術が開発されている。

現場に生息する微生物を活性化するバイオスティミュレーション (Biostimulation) 技術では、汚染した土壌・地下水に窒素、リン等の無機栄養塩類、メタン、堆肥等

の有機物、さらに空気や酸素発生剤 (Oxygen Release Compound, ORC)、水素発生剤 (Hydrogen Release Compound, HRC) 及び過酸化水素等を添加する方法、一方、現場に微生物を投入するバイオオーグメンテーション (Bioaugmentation) 技術では、クロロエチレン分解微生物や油分解微生物の投入技術等が実用化されている。

施工方法により、原位置外処理 (Ex-situ treatment) では、バイオパイル (Biopile)、ウインドローコンポスティング (Windrow composting)、ランドファーミング (Landfarming)、スラリー処理 (Slurry bioreactor) 等があり、原位置処理 (In-situ bioremediation) では好気・嫌気・共役のバイオベンティング (Bioventing)、バイオスパージング (Biosparging)、直接注入 (Direct injection)、地下水循環 (Groundwater circulation)、透過性反応浄化壁 (Permeable reactive barrier)、ファイトレメディエーション、ナチュラルアテニュエーション (Monitored natural attenuation, MNA) などの種々の技術があり、いずれも実用化されている³⁾。

米国のスーパーファンドプログラムでは、1982-2005 年の間に 977 件の土壌浄化プロジェクトが実施され、そのうち 12% の 113 件がバイオレメディエーションである⁴⁾。次々と新しい技術が開発されている。

3. 有害物質分解微生物の分離と分解特性

筆者らは有害物質を対象に分解細菌を探索・分離し、その諸性質を明らかにした。これまでに PCB, TCE, 1,1,1-トリクロロエタン, トリクロロ酢酸, 17 β -エストラジオール, ジベンゾフラン及びダイオキシン等の分解菌および Cs 蓄積菌を分離し、さらに cis-DCE 分解 *Dehalococcoides* 属集積培養系を構築した。分離した分解菌を表 1 に示す。ここでは実用化を目指した *Methylocystis* sp. M 株と組換え *Pseudomonas putida* PpY101/pSR134 及び現

表 1. 分離した有害化学物質分解菌

対象物質	分解菌
PCB	<i>Alcaligenes</i> sp. BM-2 (1980)
トリクロロエチレン	<i>Methylosystis</i> sp. M (1989)
	<i>Mycobacterium</i> sp. TCE-28 (1999)
HgCl ₂	<i>Pseudomonas putida</i> PpY101/pSR134 (1993)
Cs	<i>Rhodococcus erythropolis</i> CS98 (1994)
1,1,1- トリクロロエタン	<i>Mycobacterium</i> sp. TA-27 (1999)
アンモニア	<i>Nitrosomonas europaea</i> (2002)
トリクロロ酢酸	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SS-1 (2004)
17β- エストラジオール	<i>Sphingomonas</i> sp. D12 (2004)
	<i>Rhodococcus</i> sp. ED7 (2009)
ジベンゾフラン	<i>Janibacter</i> sp. YY-1 (2004)
ダイオキシン	<i>Janibacter</i> sp. YA (2005)
cis-DCE	<i>Dehalococcoides</i> sp. 混合系 (2008)
ETBE	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ET-10 (2008)

ETBE : エチル -t- ブチルエーテル

在研究を遂行している *Dehalococcoides* 属細菌の集積培養系について主に紹介する。

3.1. 好氣的トリクロロエチレン分解菌⁵⁻⁷⁾

約 20 年前までは、クロロエチレン類は微生物では分解できない物質であると考えられていたが、1985 年に Willson らが土壌中で TCE が分解されることを報告し注目を浴びた。筆者らも PCE を土壌に添加したところ、1 カ月後に急激に分解が進行し、微生物での浄化の可能性があることを確認し勇気づけられた。そこで、全国各地の土壌を用いて、TCE 分解菌の検索を行い、メタン酸化細菌である強力な TCE 分解菌 *Methylocystis* sp. M 株を分離することができた (図 1)。

M 株は、メタンを唯一の炭素源として増殖し、多量のメタンモノオキシゲナーゼを生成する。このメタンモノオキシゲナーゼの構造を図 2 に示すが、ヒドロキシラーゼ、リダクダーゼおよびコンポーネント B からなるマルチコンポーネント酵素であることが判明した。この酵素はメタンをメタノールに酸化するが、この反応は化学的には、高温、高压で触媒を用いて初めて進行するが、メタンモノオキシゲナーゼは常温、常圧でいとも簡単に反応を進行させると共に、トリクロロエチレンをトリクロロエチレンオキシドに酸化分解する。リダクターゼが NADH からの高エネルギーを運び、このエネルギーを用いてヒドロキシラーゼの場をかりて反応が進行する。M 株を TCE で馴養すると 100 mg/l の TCE も分解が可能であった。

その後、「微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究」という課題で戦略的基礎研究事業に採択され、幅、奥行、高さが 2 m × 1 m × 1.5 m からなる 3 m³ の土壌・地下水ライシメータを製作することができ (図 3)、浄化力と安全性に関する多くの基礎データを取得することができた。

図 3 に示すようにライシメータは中心の壁で 2 室に分れており、これらに川砂及び地下水を充填し、M 株を 1.0 × 10⁷ 匹/cm³ の濃度になるよう 1 回添加した系と無添加の系を作成し、メタン、酸素、窒素、リン及び

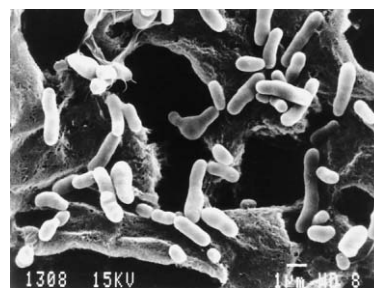


図 1. *Methylocystis* sp. M 株

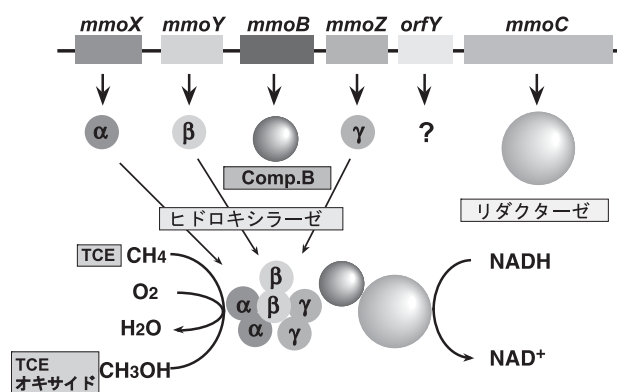


図 2. メタンモノオキシゲナーゼ

TCE を 0.3 mg/l 含む水を連続的に、30 cm/日の速度で通水したところ、流出口で約 30% の TCE の分解が確認された (図 4)。このライシメータ及びフラスコ・カラム試験の結果より、1 g のメタンから 0.5 g の M 株が生成され、1 g の M 株は 0.1 g の TCE を分解できることが判明した。またライシメータで 30% しか分解されなかった理由として、流入水中のメタン濃度が 3 mg/l 程度であったことから、メタンの供給を高めることができれば分解率が向上するものと考えられた。

M 株の TCE 代謝生産物としてトリクロロ酢酸、ジクロロ酢酸、トリクロロエタノール等の生成が確認できた。

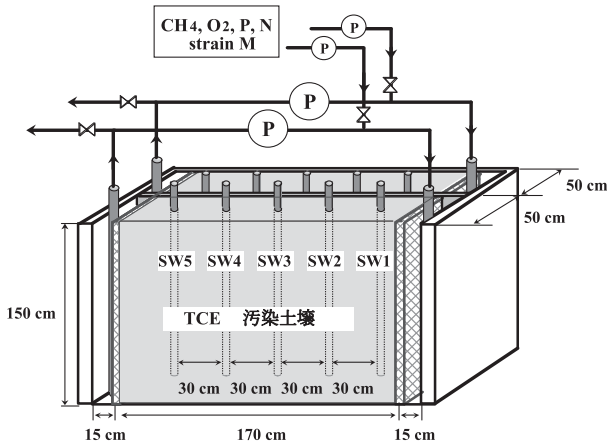


図3. 大型ライシメータ

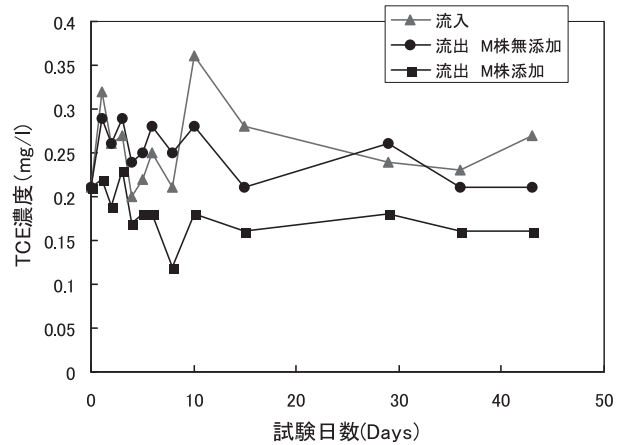


図4. 大型ライシメータにおける TCE 連続分解実験

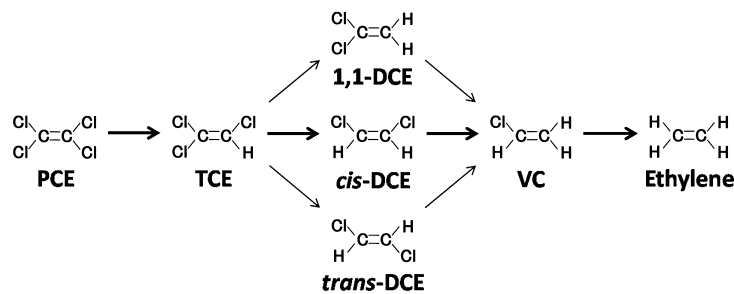


図5. PCE の嫌氣的分解経路

これらの物質は TCE よりも毒性が低く、他の微生物によりさらに分解される物質であった。また M 株の計数は従来の MPN 培養法では 1 カ月を要したものが、Real time PCR 法の開発により半日で計数が可能となり、この手法を用いて M 株の追跡・挙動解析が可能となった。

M 株の安全性に関しては、動物試験としてマウスを用いた経口、経気道及び静脈内投与、ウサギを用いた経皮投与及び眼一次刺激、また生態系への影響としてヒメダカ、ミジンコ及び藻類、土壌微生物として一般細菌、グラム陰性細菌及び糸状菌への影響、さらに土壌の生化学的性質である呼吸活性、フォスファターゼ及びβ-ガラクトシダーゼ活性、土壌の化学的性質である pH、水分含量、全炭素及び全窒素への影響を調べた。その結果、いずれの項目においても悪影響を及ぼす可能性はほとんどないことが明らかとなり、本技術の実用化が可能であると判断された。

3.2. 嫌氣的 cis-ジクロロエチレン分解系

PCE に関しては好氣的分解が困難なことから、嫌氣的微生物による多くの浄化研究がなされている。嫌氣的バイオレメディエーションは、汚染箇所には有機酸や水素発生剤を添加するもので、浄化に長期間を要するが、メンテナンスが容易で、有機塩素化合物の浄化に活用されている。

PCE は嫌氣的微生物の還元的脱塩素化反応によって、塩素が水素と置換されて、図5に示すように TCE, DCE, VC, エチレン (ETH) に分解される。現在多くの土壌・地下水から cis-DCE が検出されている。

PCE を cis-DCE にまで分解できる微生物は数多く存在するが、cis-DCE を脱塩素化できる微生物が少ないためである。現在までのところ cis-DCE を分解できる微生物は *Dehalococcoides* 属細菌のみである。*Dehalococcoides* sp. BAV1 と *Dehalococcoides* sp. strain VS は cis-DCE と VC を電子受容体として利用できる。現在までに分離された *Dehalococcoides* 属細菌を表2にまとめた⁹⁾。*Dehalococcoides* 属細菌は培養が大変困難なために増殖特性において不明な点が多い。

筆者らは cis-DCE を嫌氣的にエチレンまで分解可能な集積培養系を作成し、作成した集積培養系から新たなクロロエチレン類分解菌を探索し、その単離を目的とし実験を行っているので紹介する。

微生物源として蓮田土壌を用い、バイアルピンを用いて乳酸、水素、cis-DCE を添加して嫌気培養を行ったところ、cis-DCE をエチレンにまで分解可能な集積培養系を構築することができた。特に培地に滅菌蓮田土壌を添加すると安定な分解が維持された。集積培養系は、図6に示すように環境基準の250倍に相当する10 mg/l (≒ 10 μmol/bottle) の cis-DCE を2週間でエチレンにまで分解した。集積培養系の DGGE による菌相解析を行った結果を図7に示した。レーン1, 2はそれぞれ DGGE マーカーおよび *Dehalococcoides* 属細菌、レーン3がサンプルである。集積培養系には、*Dehalococcoides* 属細菌 (B) 以外にも硫酸還元菌の *Desulfovibrio* 属細菌 (D) の他に *Sulfurosperium* 属細菌 (A), *Trichococcus* 属細菌 (E), *Frigovirgula* 属細菌 (F) などが存在することが示唆された。

表 2. *Dehalococcoides* 属細菌

<i>Dehalococcoides</i> 属	電子受容体						
	PCE	TCE	DCE			VC	
			cis-	trans-	1,1-		
<i>D. ethenogenes</i> 195	○	○	○		○	(1,2-ジクロロエタン, 1,2-ジプロモエタン)	
<i>D. sp.</i> strain VS			○				
<i>D. sp.</i> strain FL2		○	○	○			
<i>D. sp.</i> strain BAV1			○	○	○	○	(1,2-ジクロロエタン)

○, (): 電子受容体として作用する

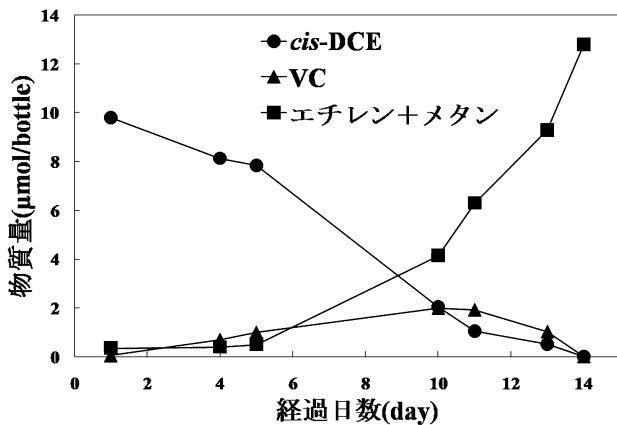


図 6. 集積培養系による cis-DCE の分解

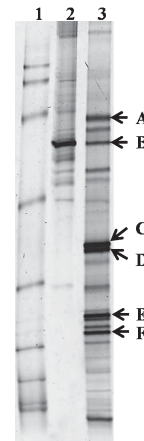


図 7. 集積培養系の DGGE

さらに、Real-time PCR を用いて集積培養系に存在する *Dehalococcoides* 属細菌のコピー数を調べた結果、培養液 1 ml あたり 10^7 以上存在することが明らかとなった。

集積培養系から DNA を抽出し、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子を特異的に増幅し、クローニング・シーケンスを行って得られた配列から系統樹を作成した (図 8)。得られた 15 クローンのうち約半数のサンプルが 1,377 bp の範囲で従来の *Dehalococcoides* 属細菌と差異を示し、集積培養系に存在する *Dehalococcoides* 属細菌は大変多様性に富んでいると判断された。

一方、3 種類 (VcrA, TceA, VcrA) の脱ハロゲン酵素をコードするプライマーを用いてそれぞれの存在の有無を調べた結果、VcrA の存在が確認された。シーケンスの結果、得られた 14 クローンは全て既存の菌株を持つ vcrA と一致しなかったことから、集積培養系には新規性のある vcrA が存在すること、また vcrA は大変多様性に富んでいることが判明した。現在、*Dehalococcoides* 属細菌の単一化を試みている。今後は、様々な機能を有する *Dehalococcoides* 属細菌が見出されていくものと期待される。

3.3. 水銀化合物浄化菌⁹⁾

TCE, cis-DCE 以外の対象物質として水銀、ダイオキシン、エストラジオールの浄化研究も遂行し、特に、組換え水銀分解菌 *Pseudomonas putida* PpY101/pSR134 については、浄化力とリスク評価を行った。大腸菌 NR-1

プラスミドにコードされる mer-オペロン (図 9) をプラスミド pSUP104 に組み込み、組換えプラスミド pSR134 を作成し、これを *P. putida* PpY101 に導入し *P. putida* PpY101/pSR134 を構築した。HgCl₂ 40 mg/l を含む土壌スラリー中、組換え菌を添加し好意的に反応させたところ、食塩を添加することにより水銀除去能は向上し、1.2% 添加で 70% の水銀が浄化された。計数法の開発、土壌中の挙動、土壌微生物への影響など組換え菌の安全性の評価も実施し、組換え菌の安全性評価法の手法開発に多くの知見を提供した。

4. 微生物によるバイオレメディエーション利用指針

土壌・地下水汚染の浄化を目的とするバイオレメディエーション技術の安全性評価手法及び管理手法等のためのガイドラインが 2005 年 3 月に制定されたが、本ガイドラインは、2003 年 6 月に制定された「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法) の「生物多様性への影響の評価手法」が基本となっている。

利用対象微生物として、1) 分類・同定された単一微生物又はそれらを混合した微生物系および 2) 特定の培養条件で集積培養された複合微生物系であって、その組成が安定的に構成されたもの (コンソーシア) の 2 種類が挙げられている。

生態系等への影響評価は、

- 1) 利用微生物の浄化終了後の増殖の可能性

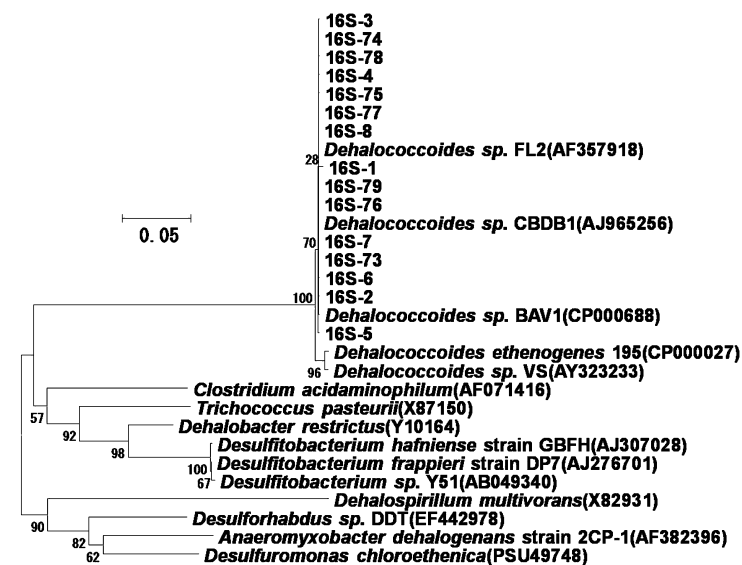


図 8. 集積培養系中の Dehalococcoides 属細菌の 16SrDNA 解析

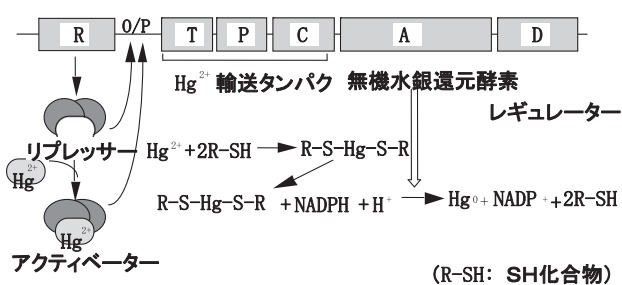


図 9. プラスミド NR1 の mer オペロン

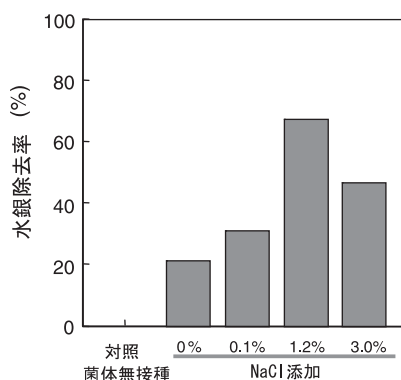


図 10. 土壌スラリーからの水銀除去

- 2) 作業区域における他の微生物群集への影響
 - 3) 作業区域及びその周辺における主要な動植物及び人に対する有害な影響を及ぼす可能性
 - 4) 浄化対象物質及び分解生産物の拡散の可能性
- に関し実施することとしている。

本ガイドラインに基づいて、2006年3月に、初めて(株)クボタから提出された浄化事業計画に対して、環境省および経産省より利用指針への適合が確認された。本ガイドラインの申請に対する、確認の第1号である。これまでの利用指針への適合を表3にまとめた。今後も、次々と申請がなされるものと考えられる。

5. 今後の課題

5.1. 新機能微生物の開発

バイオレメディエーションは、ダイオキシン、PCBや毒性の強い物質等の難分解性物質に対しての適用が困難であった。ところが、最近これらの物質を分解する微生物が次々と見出され、汚染の浄化に有効であることが判明した。現在、環境中の微生物の数%しか培養できないと考えられているが、酸化還元、低栄養、高温等の培養条件を検討することで新たな微生物の開発が可能である。環境中の全DNAを回収するメタゲノム解析で、未

知遺伝子の機能解析手法の開発とその応用が期待される。

5.2. ハイブリッド技術の開発

一般に、嫌気性微生物は高塩素化有機化合物の分解に適しており、好気性微生物は低塩素化有機化合物の分解に適している。両者を併用する手法が開発されればさらに分解の効率は高くなるものと考えられる。また高濃度汚染に有効な物理化学的手法と低濃度汚染に有効なバイオレメディエーションとの併用技術の開発が求められている。さらにガイドラインの中でコンソーシアも評価対象微生物として認められたので、複合汚染に有効なコンソーシアの開発が重要な課題となろう。

5.3. ナチュラルアテニューエーション

ナチュラルアテニューエーションは土壌や地下水の自然の浄化力を定量化する技術であり、現在米国で注目されている研究の一つである。浄化力は嫌気・好氣的分解、拡散、揮発、吸着等の作用に基づいている。定量化には地下水・土壌中の汚染物質濃度、有機物含量、溶存酸素、pH、酸化還元電位、アルカリ度および硬度、さらに地下水流速等のデータの収集が必要である。汚染が疑われ

表 3. バイオレメディエーション利用指針適合確認

適合確認日	事業社名	事業名称
2006.3.31	(株)クボタ	テトラクロロエチレン含有汚染土壌の浄化 <i>Desulfitobacterium</i> sp. KBC1
2006.10.30	前田建設工業 (株)	白色腐朽菌利用によるダイオキシン類汚染土壌の浄化 ウスキイロカワタケ
2008.6.9	栗田工業 (株)	塩素化エチレン汚染地下水および土壌の浄化 <i>Dehalococcoides</i> 属コンソーシア
2009.5.29	(株)奥村組 (株)アイアイビー	石油の好気分解, <i>Novosphingobium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp.
2009.5.29	大成建設 (株)	嫌気性菌によるベンゼン分解

開発されないで放置されている土地のことをブラウンフィールドと呼んでいるが、ブラウンフィールドの浄化にナチュラルアテニューエーションの活用が効果的である。今後環境中の分解機能遺伝子の解析により、ナチュラルアテニューエーションの信頼性を著しく高めることが可能と考えられる。

バイオレメディエーション技術は、自然の浄化力を活用するものであり、更なる発展が期待される。

6. 終わりに

これまで、国立環境研究所、東京大学、日本大学においてバイオレメディエーション技術の開発研究を遂行してきた。内山裕夫先生、岩崎一弘先生、栗栖太先生、高村義親先生、中嶋睦安先生、ならびに研究室の多くの卒業生や研究生、さらにお世話になった多くの方々のおかげでこのような研究が遂行でき受賞することができました。ここに心より感謝申し上げます。

本研究で得られた知見が、地球環境の保全に役立つことを願っております。

文 献

- 1) 環境省. 2009. 環境白書, 平成 21 年度版.
- 2) 土壌環境センター. 2009. 土壌汚染状況調査・対策に関する実態調査結果報告.
- 3) Atlas, R.M., and J. Philp. 2005. Bioremediation, ASM Press, p. 366.
- 4) U.S.EPA. 2007. EPA-542-R-07-012.
- 5) 矢木修身. 2002. 微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究. CREST 報告書, p. 211.
- 6) 中村明博, 栗栖 太, 矢木修身. 2005. トリクロロエチレン分解細菌 *Methylocystis* sp. M 株の土壌カラム中における挙動のモデル化. 水環境学会誌. 28: 445-450.
- 7) 矢木修身. 2007. バイオレメディエーションの現状と今後の課題. 環境科学会誌. 20: 359-369.
- 8) He, J. et al. 2005. Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloro-ethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. Environ. Microb. 7: 1442-1450.
- 9) 岩崎一弘, 矢木修身. 2006. 遺伝子組換え生物の第 1 種使用における安全性評価. 環境バイオテクノロジー学会誌. 6: 7-15.