

# 微生物の環境浄化力モニタリング法の開発

志村 稔\*

## Development of a Measuring Method for Microbial Degradation of Environmental Pollutants

Minoru SHIMURA

Pollutions of soil and underground water, such as a leakage of gasoline from underground storage, pose significant risks to living organisms. An approach using microorganisms for remediation of polluted environment is applicable to locations where beneath of buildings and bridges. However, any monitoring method of biological remediation activity in soil is unavailable so far. It is essential to estimate a biological activity in soil to proceed remediation activity, therefore, we established a method, combined with a detection of bacteria in soil using a spectral analysis and genetically modified bacteria which release green fluorescence with remediation activity.

キーワード：環境浄化，微生物，モニタリング法

### 1. はじめに

土壌浄化技術には種々のものが実用化されているが、広範囲に及ぶ比較的低濃度の汚染や、構造物直下の汚染に対しては微生物を用いた土壌浄化法が有効な手段であると考えられ、適用が検討されている。特に、鉄道のように移設が容易でなく、稼働停止できない施設には有用であると考えられる。しかし、微生物の浄化力を正しく評価する方法が現状では確立されていない。そこで、本研究では微生物の土壌浄化力を客観的に評価し、反応の進行を適切に管理するための評価手法の確立を目的とした。土壌汚染が酸素が少ない深部にまで及ぶことを考慮し、酸素濃度が低い環境で微生物が有害物質を分解する活動をモニタリングする方法について検討した。

健康リスクを最小限に抑えた健康な生活を送ることを目的として土壌汚染対策法が平成15年に施行された。規制対象物質は、重金属と有機物等に分類され、計25種類が指定されている(表1)。企業活動で使用されていた工場跡地等の再開発・売却時には汚染調査を行わなければならない。規制値の超過が確認された場合には何らかの対応をしなければならない。環境省の調査によると<sup>1)</sup>、鉄道業における汚染調査件数は平成13年度が34件、そのうち超過件数が7件であったのに対し、平成15年度にはそれぞれ37件、16件と増加傾向を示している。基準値を超過した物質は鉛、六価クロム、トリクロロエチレンおよびテトラクロロエチレンとなっている。

汚染が明らかになった場合には汚染土壌の除去等の対策が求められている。汚染が地下水まで及んでいる場合

表1 規制対象物質

<b>重金属等</b>	
鉛	カドミウム 総水銀 ホウ素 フッ素
砒素	六価クロム 全シアン セレン
<b>有機物等</b>	
ジクロロメタン	チオベンカルブ
有機リン	1, 2-ジクロロエタン
PCB	1, 1-ジクロロエチレン
ベンゼン	1, 1, 1-トリクロロエタン
チウラム	1, 1, 2-トリクロロエタン
シマジン	トリクロロエチレン
四塩化炭素	テトラクロロエチレン
1, 3-ジクロロプロペン	
シス-1, 2-ジクロロエチレン	

には揚水曝気、ガス吸引、微生物浄化法などを併用して浄化をするが、有機化合物汚染のうち、汚染が低濃度で広範囲に及ぶ場合は微生物浄化法が有効であると考えられている。特に、構造物の直下に生じた汚染に対しては物理的な措置が困難な場合が多く、微生物処理は有効な手段であろう。ただし、微生物を用いた土壌浄化を効率よく進めるためには、微生物の浄化能力を客観的に評価し、反応の進行を適切に管理することが必要である。

これまでに、蛍光観察法を用いたPCB分解活性の測定方法を開発してきたが<sup>2)</sup>、本研究では、微生物による嫌気環境下での汚染浄化力の可視化による簡易評価手法の確立に取り組んでいる。そのために、今までに研究があまりなされていない嫌気性微生物に焦点を絞って研究を進めている。嫌気環境下でトルエンを分解する微生物に蛍光蛋白質遺伝子を組み込むことで、トルエン分解時に

\* 環境工学研究部(生物工学)

特集：環境技術

蛍光を発するように改良して、その蛍光量から分解力を推測する方法である。

2. 土壌中の微生物検出手法の検討

土壌中には鉱物や動植物が分解されて出来る有機物(腐植物質)などが多量に存在する。腐植は高分子有機物の混合物で、脂肪酸や多糖類だけでなく多環芳香族などの蛍光物質を含み、紫外線を照射すると黄緑色の蛍光を発する。また、腐植は土壌中の無機物質、特に粘土や鉱物と反応して安定化しやすく、土壌を蛍光顕微鏡観察したときに観察される蛍光は、鉱物や土壌粒子表面に吸着している腐植に由来する<sup>3)</sup>。蛍光蛋白質を利用して微生物の浄化力を評価するためには、土壌中の様々な物質と微生物とを区別しなければならない。そこで微生物観察の障害となる物質を効果的に除去する方法を検討した。

緑色蛍光物質で染色した大腸菌を土壌に混ぜ、これを試料とした。鉱物や腐植質と微生物との大きさの違いを利用するのが一番簡単な方法だと考え、試料をリン酸緩衝液に懸濁し、超音波処理で分散させた後に自然沈降させる方法を採用した。超音波処理による微生物の不活性化と沈降速度とを考慮した結果、20分間の超音波処理と10分間の自然沈降が最適であることを明らかにした。沈降後の上澄みをフィルター濾過することによって微生物を捕集し観察した。この処理によって大きな粒子を効率よく除去することが出来、同時に蛍光観察を阻害する蛍光物質を取り去ることが出来た(図1)。

次に土壌中の蛍光物質と微生物の蛍光特性を比較するためにレーザスキャンニングサイトメータ(LSC)を用いて代表的な土壌構成鉱物<sup>4)</sup>の蛍光観察を行った。その結果、土壌を構成する鉱物はオレンジ色(570~630nm)の蛍光がもっとも強く総蛍光量のおよそ半分を占め、次

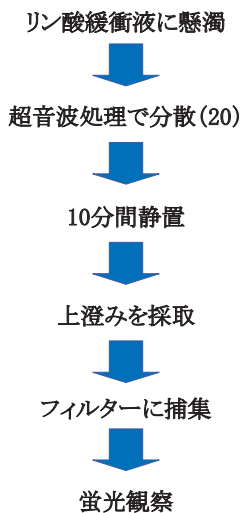


図1 土壌試料の調整方法

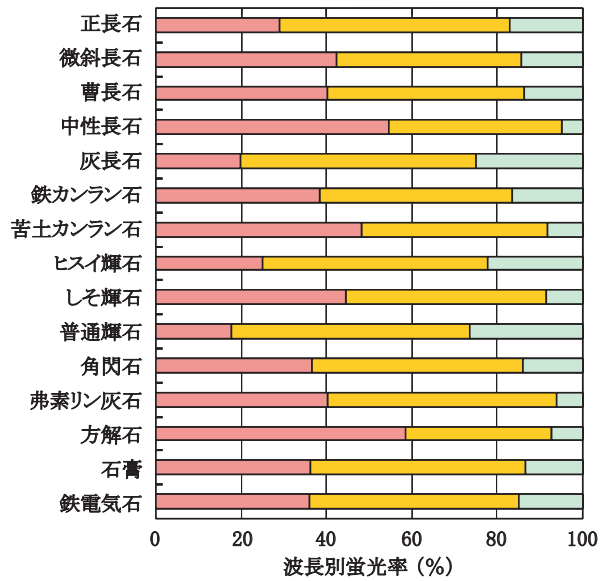


図2 鉱物の蛍光波長の割合 (各鉱物が放つ蛍光(赤, オレンジ, 緑)の割合を示す)

いで赤色(>630nm)が40%、緑色(515~545nm)は10%程度であることが明らかになった(図2)。この結果より、緑色蛍光色素で微生物を染色することによって効率よく土壌中の微生物を観察できることが示唆された。また、鉱物と微生物それぞれについて、赤色蛍光と緑色蛍光の比、オレンジ蛍光と緑蛍光の比を求めグラフを作成した(図3)。すると、鉱物は蛍光比10以下に集団を形成することが明らかになり、蛍光染色した微生物とは明らかに異なることが明らかになった。特に緑色蛍光染色した微生物とは容易に区別できることがわかった。この結果から、オレンジ蛍光と緑蛍光の比が1以下の集団を選択することによって微生物を特異的に選択することができた。実際に、緑色蛍光物質で染色した微生物を土壌に混ぜて測定したところ、図4に示すような結果を得ることができた。この条件では、微生物と同程度の大きさの土壌構成粒子5,000個中、微生物として誤って認識された粒子を10個以下に抑えることができ、土壌中で緑色蛍光を発する微生物を選択的に検出することができることが確認できた。

LSCを用いて、蛍光比率を計測することによって緑色蛍光を発する土壌中の微生物を検出できることを示した。更なる検出精度の向上を目指して、広範囲(410nm~740nm)の蛍光スペクトル解析を行うことによる微生物検出方法を検討した<sup>5)</sup>。緑色蛍光染色が土壌中の微生物検出に有効なことがわかっているので、緑色蛍光蛋白質を生産する微生物を用いた。この微生物には緑色蛍光蛋白質遺伝子が導入されていて、蛍光染色しなくても緑色蛍光を発する。この微生物を、土壌1gを含む液体培地30mlに接種した。1ヶ月後に土壌の一部を採取し、レー

レーザー蛍光顕微鏡による観察を行った。観察像中(図5)の6点について蛍光スペクトル解析を行った。これら6点における蛍光は肉眼の観察では区別することが出来ないが、蛍光スペクトル解析を行うと図6のように異なることが明らかになった。1番は500～550nm付近に強い蛍光があり、緑色蛍光蛋白質のスペクトルとよく似てい

た。これに対してその他のものは、短波長域や長波長域にも蛍光があり、緑色蛍光蛋白質とはスペクトルが異なることが分かった。これらのことから、微生物由来の蛍光は1番だけであると判断することが出来た。広範囲のスペクトルを解析することによって、特に土壤中に生息する微生物の検出に威力を発揮すると期待される。

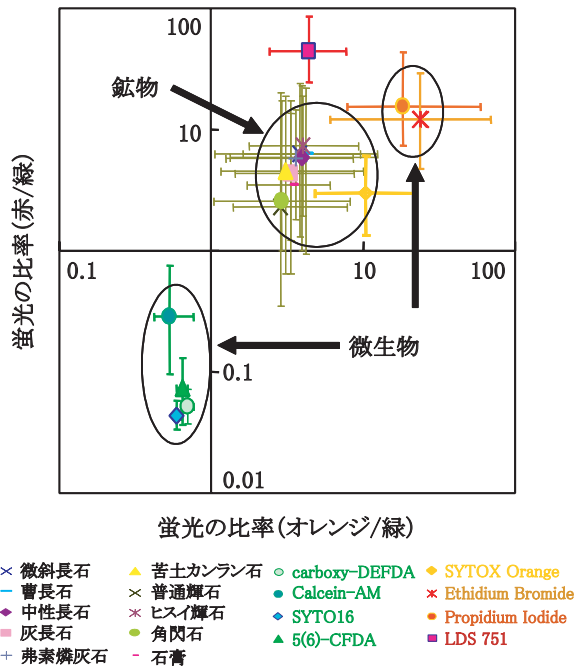


図3 微生物と鉱物の蛍光特性

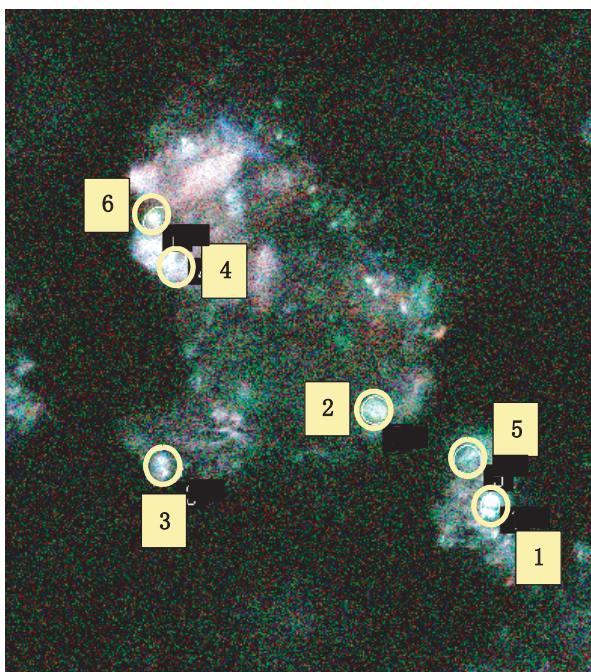


図5 土壌のレーザー蛍光顕微鏡観察像  
(1～6の場所の蛍光スペクトルを解析した。)

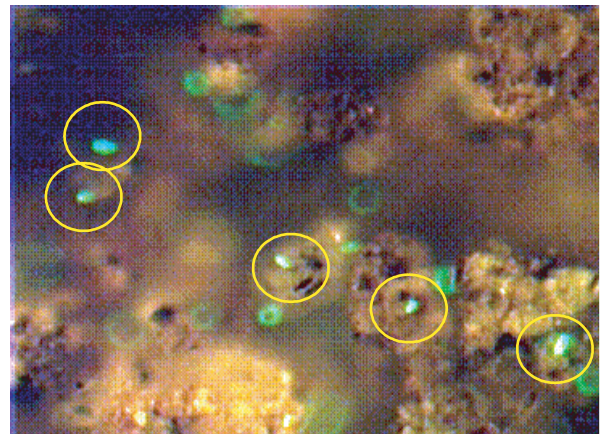


図4 土壌中の微生物検出例  
(○の中が微生物。)

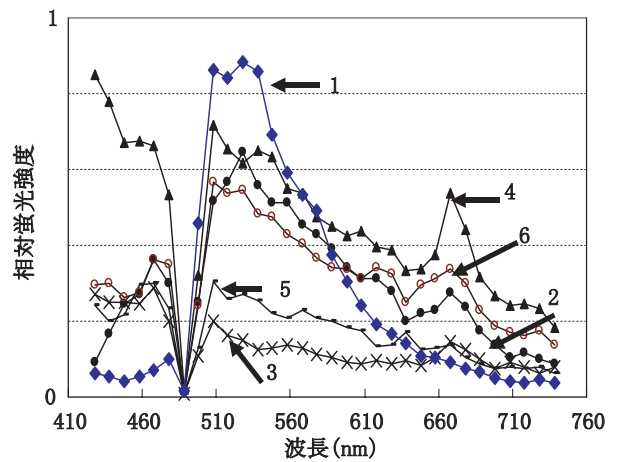


図6 蛍光スペクトル解析結果

(レーザー蛍光顕微鏡写真の1～6の場所の蛍光スペクトル。緑色蛍光蛋白質のスペクトルとの比較から1が微生物であることが分かった。)

### 3. 嫌気性微生物からの汚染物質分解遺伝子の分離

液状物質で土壌が汚染された時、液量が多い場合には汚染される面積が広く、また深いところまで汚染が及ぶことが多い。一般的に地中は地表に比べて酸素濃度が低く、地下水中には酸素が検出されないこともある。このような低酸素環境には嫌気性微生物と呼ばれる多種の微生物が生息している。それらの中には汚染物質を分解出

特集：環境技術

来る菌が報告されており、環境浄化に貢献している。嫌気性微生物は、地表面付近に生息して酸素を利用する微生物に比べて代謝・増殖が遅いことや、純粋培養が困難な場合が多いことから、研究例が少ない。数少ない純粋培養が可能な菌株の中から、トルエン分解菌 *Azoarcus* sp 9506 株と安息香酸分解菌 *Rhodopseudomonas palustris* baa 98 株を選び、それぞれの分解に関与する遺伝子の分離を試みた。

嫌気性微生物は通常大気中では生きられないため、取り扱いには嫌気環境を作り出すことが出来る嫌気グローブボックスを利用した。グローブボックス内部は窒素で満たされていて、付属の銅触媒装置中で酸素を除去し、大気酸素濃度の約1/10万という嫌気状態を維持することができる。培地の調製や植菌などの操作はグローブボックス内部で行い、ガラス容器に分注して酸素を通さないブチルゴム栓でシールした後にグローブボックスから取り出して培養を行った。バイアルには酸素除去剤として酸化チタン-クエン酸ナトリウム溶液を添加し、嫌気環境を維持した。嫌気指示薬としてレサズリンを利用した。レサズリンは嫌気環境では透明で、酸素の混入によりピンク色に変色する性質を持つ。バイアル中の液体がピンク色に変色した場合には酸素の混入があるものとして破棄した<sup>6)</sup>。

9506株からのトルエン分解遺伝子群とbaa98株からの安息香酸分解遺伝子群については、既報7、8)よりその塩基配列を得ることが出来たので、それを参考にDNA複製酵素連鎖反応(PCR)による増幅・分離を試みた。PCRは、高温で安定なDNA複製酵素と高温になるとDNAの二本鎖がほどける性質を利用して目的の遺伝子を増幅する方法である。分解遺伝子群の両末端の20塩基と同じ塩基配列をもつ一組の一本鎖DNA分子(PCRプライマー)を合成し、9506株のゲノムDNAを鋳型としてPCR反応を行うことによって目的とする遺伝子を増幅することが出来る。増幅した遺伝子断片をアガロースゲル電気泳動によって分離し、その一部をDNAシーケンサで解析し、目的の遺伝子であることを確認した。baa98株の場合にも同様の手法を用いて、安息香酸分解遺伝子群を得た。

9506株のトルエン分解遺伝子群とbaa98株の安息香酸分解遺伝子群は分解酵素遺伝子の発現制御に関与する遺伝子群と分解酵素遺伝子群本体から成る構成をしており、両株共に、制御遺伝子群と分解酵素遺伝子群は別々のユニットを構成していることがわかっている(図7)。制御遺伝子群が環境中の汚染物質を検知すると、分解酵素遺伝子群の発現を誘導し、実際に分解を行う酵素蛋白質が生産されると考えられている。そこで、分解遺伝子群に緑色蛍光蛋白質遺伝子を挿入することによって、両菌株の分解活性の可視化が達成可能と考えた(図8)。

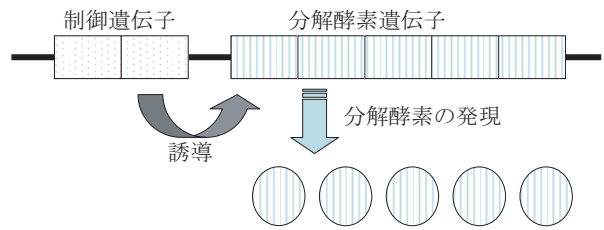


図7 分解酵素の発現制御

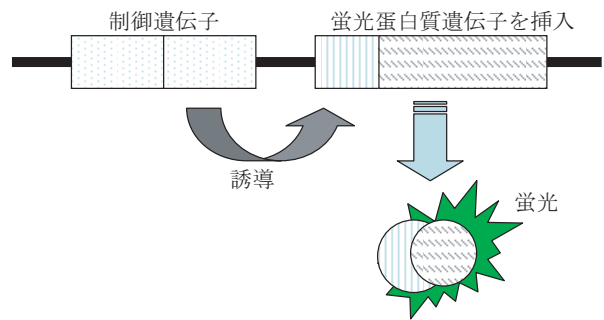


図8 蛍光蛋白質を利用した分解能力の可視化

4. 蛍光発色性微生物の作成

汚染物質の分解が行われていることを可視化するために、分解酵素遺伝子と緑色蛍光蛋白質遺伝子とを融合した人工遺伝子を作成した<sup>9)</sup>。緑色蛍光蛋白質はオワンクラゲというクラゲが生産する蛋白質で、紫外光を照射すると緑色の蛍光を発する性質を持つ。この時にその他の分子を必要としないことが特徴である。人工遺伝子が設計通りに作られたことはDNA塩基配列の解析によって確認した。この人工遺伝子を導入された微生物は、分解酵素生産時に緑色蛍光蛋白質も同時に生産し、結果として微生物細胞全体から緑色蛍光を発すると期待できる。本研究では5つあるトルエン分解遺伝子のうちの1つと緑色蛍光蛋白質遺伝子とを融合した人工遺伝子を9506株に、また7つある安息香酸分解菌遺伝子の1つと緑色蛍光蛋白質遺伝子とを融合した人工遺伝子をbaa98株にそれぞれ導入することにした。また、2章で述べたように、緑色蛍光を発する微生物は土壌粒子と容易に区別できるため、土壌中で汚染物質を分解中の微生物だけを検出できるはずである。

遺伝子を嫌気性微生物に導入するための方法が確立していないので、大腸菌の研究に使用されている幾つかの方法の適用を検討した。すなわち、微生物を化学的に処理する化学方法、パルス電圧によって遺伝子を取り込ませる電子穿孔法、アスベストやカーボンナノチューブを用いて細胞膜に孔をあけて遺伝子を取り込ませる方法、およびバクテリア間での遺伝子伝播現象を利用した接合伝達法を試行した。遺伝子導入が成功したことは、融合遺伝子に連結させた抗生物質(カナマイシン)耐性遺伝

子に由来する、カナマイシン耐性の有無によって判断できる。各遺伝子導入法を試みた後、カナマイシンを含む培地で培養したところ、接合伝達法で遺伝子導入を試みたものから良好な増殖を示す株が得られた。

遺伝子導入した菌株を嫌気的な条件で培養し、9506株にはトルエンを、baa98株には安息香酸を与えたところ、菌体から緑色の蛍光が発せられていることが確認できた(図9)。

また、トルエンが存在する嫌気環境で生育し緑色蛍光を発する9506株を、酸素がある環境に移すことによって蛍光が消え、その後トルエンのある嫌気環境に戻すことによって再び蛍光が発せられることを確認した。酸素がある環境では緑色蛍光が観察されなかったことから、9506株に導入された緑色蛍光蛋白質遺伝子は嫌気的な条件下でトルエンが存在する時に発現が誘導されることが明らかになった。baa98株でも、嫌気条件下に於いて安息香酸によって緑色蛍光蛋白質が生産されることを確認した。また、安息香酸(図10, A)に構造が類似した物質である、サリチル酸(図10, B)を与えた場合には、安息香酸の場合と同様に蛍光が観察され、蛍光の強さも同

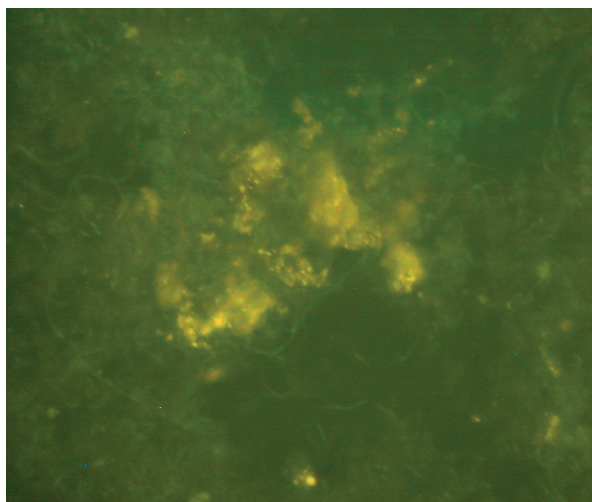


図9 トルエン存在下で9506株が発する緑色蛍光(嫌気環境でトルエンを与えると、トルエン分解と同時に緑色の蛍光が観察された。小さな点が緑色蛍光遺伝子を持つ9506株で、その周辺には増殖の過程で形成されたバイオフィルムが観察された。)

程度だったことから、モニタリング可能な物質が複数にわたることが確認された。一方、カテコール(図10, C)を添加した実験では緑色蛍光が観察されなかった。この結果からベンゼン環に置換しているカルボン酸基が安息香酸分解酵素の誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 5. 結論

本研究では微生物による環境汚染物質分解能力を客観的に評価するのに必要な要素技術の開発に取り組んだ。結果をまとめると以下の通りである。

- (1) 蛍光比率(赤/緑とオレンジ/緑)を利用することによって土壤中に生息する微生物を検出する手法を開発した。
- (2) 緑色蛍光蛋白質を生産する微生物の検出には蛍光スペクトル解析が有効であることを示した。
- (3) 嫌気性微生物を利用したトルエンレポータ株を開発した。

## 6. おわりに

(社)土壌環境センターが会員に対して行ったアンケートによれば、平成18年度に行われた汚染調査のうち89%は自主的なものであった。また汚染が発見された事例3245件のうち、85%が自主的な調査によるものであった。つまり、汚染の可能性が低いと考えられる土地でも土壌汚染が判明することが多いという状況である。

鉄道運輸機構の資料によると、平成12年から16年の間に鉄道関連施設(駅、工場、操車場(跡地含む))におけるヒ素、鉛、フッ素等の重金属による基準値の超過事例が6件確認されている。いずれの場合も汚染原因の特定はできていない。また、北海道環境保全技術協会は、操車場、車両工場では、燃料油の地下浸透や、塗料からの重金属、変電設備からのPCB汚染等の可能性があることを事業者らに注意喚起している。土壌環境基準が設定される以前から操業している工場等においては特に注意しなければならないだろう。

本研究の一部は新エネルギー・産業技術総合開発機構の委託による生分解・処理メカニズムの解析と制御技術

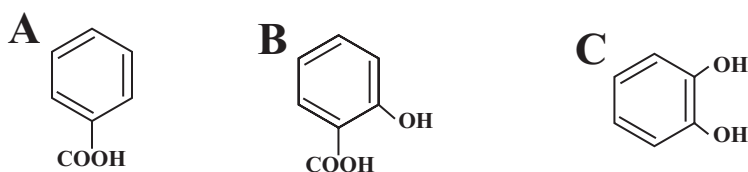


図10 実験に使用した物質。A: 安息香酸 B: サリチル酸 C: カテコール

## 特集：環境技術

の開発の一環として行った。

## 文献

- 1) 環境省 水・大気環境局 土壌汚染対策法の施行状況及び土壌汚染調査・対策事例等に関する調査結果 平成15年, 平成17年
- 2) 志村稔, 金原和秀, 早川敏雄: 微生物による環境汚染物質分解能力の蛍光観察による測定手法, 鉄道総研報告, Vol.20, No.1, pp.41-44, 2006
- 3) Shimomura, Y., Ohno, R., Kawai, F., Kimbara, K., "Method for assessment of viability and morphological changes of bacteria in the early stage of colony formation on a simulated natural environment." Appl Environ Microbiol. Vol. 72, pp.5037-5042, 2006.
- 4) 米林 甲陽: 土壌肥料研究における新しい分析手法 5-NMR法による土壌有機物の研究, 日本土壌肥科学雑誌. Vol. 64, pp.206-211, 1993
- 5) Shimura, M., Shimomura, Y., Kimbara, K., and Hayakawa, T., "A detection method for GFP expressing *Azoarcus* sp. in sludge using confocal microscope," presented at the International Society for Microbial Ecology-ISME, Wien, Austria, August 20-25, 2006.
- 6) Kasai, Y., Kodama, Y., Takahata, Y., Hoaki, T., Watanabe, K., "Degradative capacities and bioaugmentation potential of an anaerobic benzene-degrading bacterium strain DN11," Environ. Sci. Technol. Vol. 41, pp.6222-6227, 2007.
- 7) Gypsy, R. A., Ana M. R., and Alfred M. S., "Benzylsuccinate Synthase of *Azoarcus* sp. Strain T: Cloning, Sequencing, Transcriptional Organization, and Its Role in Anaerobic Toluene and m-Xylene Mineralization," J. Bacteriol. Vol. 183, pp. 6763-6770, 2001.
- 8) Eglund P.G., Gibson, J., Harwood, C.S., "Benzoate-coenzyme A ligase, encoded by *badA*, is one of three ligases able to catalyze benzoyl-coenzyme A formation during anaerobic growth of *Rhodospseudomonas palustris* on benzoate," J Bacteriol. Vol. 177, pp.6545-51, 1995.
- 9) Shimura, M., Kimbara, K., and Hayakawa, T., "A GFP reporter in *Azoarcus* sp. (DSMZ9506) for monitoring of toluene transformation activity," presented at the International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (IBBS-13), Madrid, Spain, September 4-9, 2005.