

地下圏微生物 —その環境浄化力と解明すべき課題—

竹内 美緒¹⁾・駒井 武¹⁾

1. はじめに

近年, 世界的に土壌・地下水汚染(実質的には地質汚染)が顕在化し, 一部では主に地下水摂取による健康被害が生じていることからその調査・対策が広く求められている。その対策法・浄化法として, これまでに様々な物理・化学・生物学的手法が考案されてきた。これらはいずれも一長一短であり, 汚染物質, 現場の地質・水文学的特性, さらには経済的状況により適性が異なる。ここでは, 特に低コストであることが利点である生物学的手法, バイオレメディエーションを担う微生物について取り上げ, 微生物が持つ多様な環境浄化力について紹介する。

またこれまでに, 様々な地下圏微生物を利用した原位置浄化が試みられているが, その促進には, 地下圏微生物の生態に関する基礎的知見が不可欠である。陸上の地下圏微生物は, 土壌・地下水(地質)

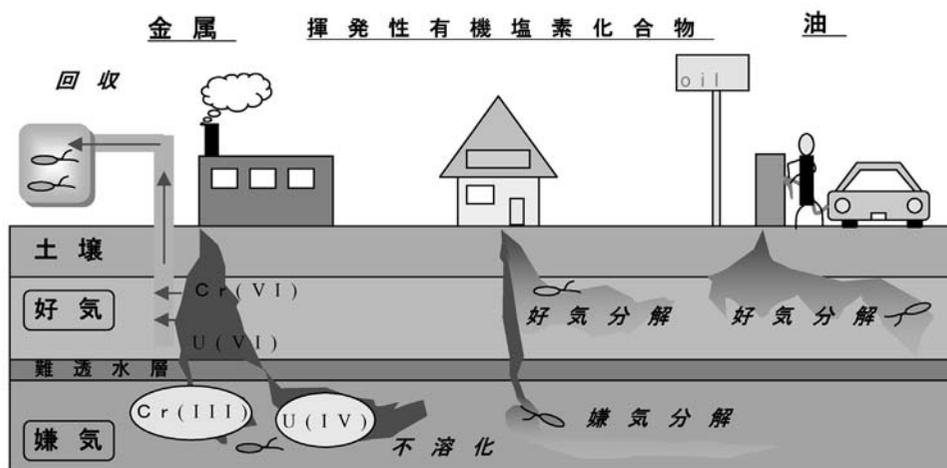
汚染のみならず放射性廃棄物処分等に関連して80年代より多くの研究が行われたものの, 未だ多くの解明すべき課題がある。本報告では, これについても紹介したい。

2. 微生物の環境浄化力

微生物は多様な機能を持つ。その中には自然界の環境浄化力となっているものや, 様々な土壌・地下水汚染対策に利用できるものがある(第1図)。以下, 特に我が国において主要な規制項目である揮発性有機塩素化合物や金属類について具体例を紹介する。

1) 揮発性有機塩素化合物の分解(好気)

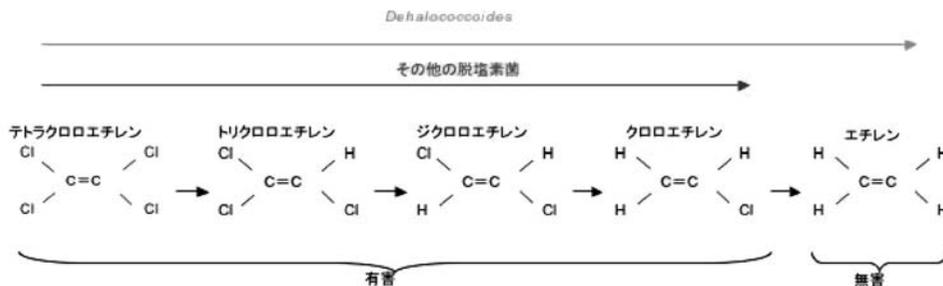
トリクロロエチレン, テトラクロロエチレンなどの揮発性有機塩素化合物は, 我が国における主要な汚染物質の一つである。脱脂溶剤として金属・半導体工



第1図 様々な微生物の環境浄化力。

1) 産総研 地圏資源環境研究部門

キーワード: 土壌・地下水汚染, 地質汚染, バイオレメディエーション, 地下圏微生物



第2図 揮発性有機塩素化合物の嫌気分解。

場で用いられてきた他、クリーニング店で用いられてきたため汚染が広範囲に広がっている。好気性微生物(酸素を電子受容体として用いるもの)は、様々な酸化酵素を持つ。これらのうちフェノール、トルエン、アンモニア、メタンなどを酸化する酵素は揮発性有機塩素化合物も分解することができる(Nelson *et al.*, 1987; Little *et al.*, 1988; Arciero *et al.*, 1989; Wackett *et al.*, 1989)。好氣的分解では、エチレンの水素が全て塩素で置換されているテトラクロロエチレンは分解されないものの、それ以外のは二酸化炭素と塩素イオンにまで分解される。この分解は共代謝(酵素の基質特異性が低いため、たまたま分解してしまう)であるため、微生物の増殖には他の炭素源を必要とする。地下環境中に豊富に存在する基質はメタンであることから、自然界ではメタン資化(酸化)細菌が重要な役割を担っている。特にメタンガス田地域では、活性の高いメタン資化細菌を含む浅層地下水が存在し、汚染の浄化にも利用することができる。この地下水を実際の汚染透水層に注入することにより、分解促進効果があることが確認されている(Takeuchi *et al.*, 2004)。従来は、単一の汚染物質分解菌を汚染地層中に注入して浄化を促進する手法(バイオオーグメンテーション)が主に研究されてきたが、活性の高いメタン資化細菌を含む地下水のような、自然界に存在する活性の高い(あるいは高めた)複合微生物を利用する汚染浄化は、社会的受容が得られやすく、より実用性の高い手法としてプライミングバイオオーグメンテーションと新たに提案され、今後の研究の発展が期待されている(Singer *et al.*, 2005)。

2) 揮発性有機塩素化合物の分解(嫌気)

揮発性有機塩素化合物は、嫌気性微生物によっても分解される。古くはメタン生成菌などについて報告

されたが、その機構は詳細にはわかっていない(Fathepure and Boyd, 1988)。1997年、*Dehalococcoides ethenogenes*という新たな揮発性有機塩素化合物分解微生物が報告された(Maymo-Gatell *et al.*, 1997)。本菌はこれまでの例と異なり、揮発性有機塩素化合物を電子受容体として利用することができる、つまり汚染物質をエネルギー獲得に利用して増殖することができるものであった。嫌気分解では、脱塩素反応によりテトラクロロエチレンも分解されるが(第2図)、多くの場合、有害なジクロロエチレンやクロロエチレンで反応が止まってしまう。しかし *D. ethenogenes*は無害なエチレンまで分解することができる画期的な微生物であった。このような揮発性有機塩素化合物を電子受容体とする呼吸様式は脱塩素呼吸(halorespiration)と呼ばれ、電子供与体としては水素や酢酸等が用いられる。脱塩素呼吸を行なうものは他にも、*Dehalobacter*, *Dehalospirillum*, *Desulfobacterium*, *Desulfuromonas*, *Clostridium*, *Geobacter*など様々な種類が報告されている(Löffler *et al.*, 2005)。しかし、エチレンまで完全に分解できるのは、現在のところ *Dehalococcoides*属に限られている。

山形県米沢盆地の屋代川低地には粘土質主体な第四紀層が存在し、浅層では顕著な透水帯はみられず、停滞性の地下水が存在すると考えられている(岸ほか, 1978)。地圏環境評価研究グループでは山形県との共同研究としてこの地域に存在する汚染現場を対象とし、長期観測を実施している。その結果、汚染物質であるテトラクロロエチレン濃度が減少し、次第に分解産物であるジクロロエチレンやエチレンが検出されるようになった(川辺ほか, 2004)。また現場の地下水は、有機物を多く含み、還元的環境であることが確認された。これらの結果は嫌気性微生物による分解が進行していることを示唆するものである。そこで、

本現場について微生物に関する定性 (16S rRNA 遺伝子を用いた微生物相解析) ならびに定量 (*Dehalococoides* 属細菌を対象とした Q-PCR) 解析を行なった結果, 既知の嫌気性揮発性有機塩素化合物分解菌としては *Dehalococoides* 属細菌が存在し, 汚染濃度の高い井戸を中心に分布していることが明らかになり, 微生物による浄化力が存在することが確認された (竹内, 未発表). このように微生物による環境浄化力が自然に存在する場合には, お金をかけて積極的浄化を実施せずとも, 適切に浄化プロセスを監視・管理することでリスク対策とする, MNA (Monitored Natural Attenuation; US EPA, 1999, 駒井・川辺, 2004) が適用可能である. しかし, 本現場では, 泥質な難透水層に汚染物質が保持され, 少しずつ下層の透水層に供給されている可能性が指摘されている. このような現場においては, 汚染が長期化するおそれがあるため, 難透水層における汚染物質の挙動を解明しなくては汚染の減衰を正確に推定することができない. また, 本現場ではこのような難透水層は同時に微生物の浄化力にとっても重要な役割を果たしていると考えられる. 透水層において *Dehalococoides* 属細菌が増殖し, 汚染物質を分解するために必要な酢酸などの有機酸, 水素等の基質は有機物を豊富に含む難透水層から, おそらくそこに存在する嫌気性従属栄養細菌の働きにより生産され, 供給されていると考えられるためである. そこで我々のグループでは, 掘削により地質試料を採取し, 難透水層から透水層にかけての汚染物質や微生物, 様々な化学物質の挙動, すなわちそこに存在する微生物生態系を解明し, 汚染減衰推定ならびに難透水層を対象とした地圏環境リスク評価システムのためのパラメータを得る計画を実行中である (竹内, 2006).

3) 有害金属類の形態変換

微生物は様々な有害金属類の形態を変えることにより, 無害化や不溶化を促進することもできる. クロムやウランは六価では溶存性が高く, 移動しやすく, 毒性も高い, これらが還元されて三価クロム, 四価ウランになると, 不溶化し, 毒性も低下する. 嫌気性微生物の中には六価のクロムやウランを電子受容体として利用して還元することができるものがある. 六価クロムの還元は好気性・嫌気性従属栄養細菌の両方で知られている. 中には芳香族化合物を電子供与体

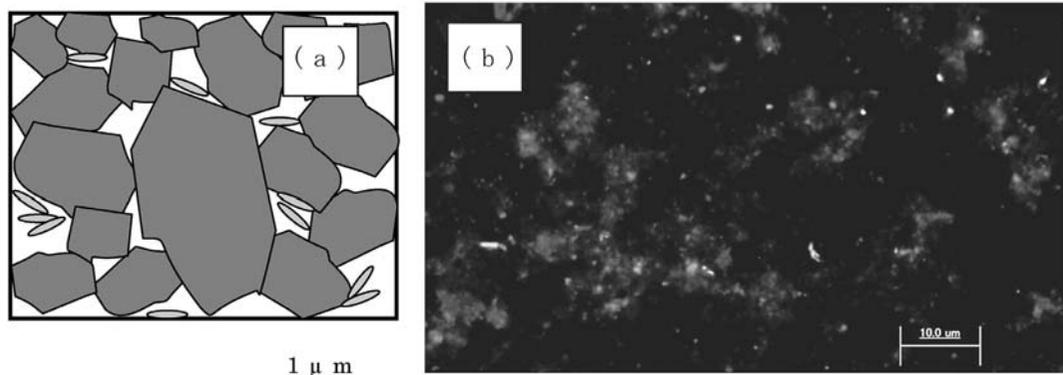
とするものもあり, 芳香族化合物とクロムの複合汚染に適應できると期待されている (Lovley and Coates, 1997). ウランについても *Geobacter*, *Shewanella* など還元能力を持つものが知られているが, *Anaeromyxobacter dehalogenans* は同時に 2-クロロフェノールの脱塩素も可能であり, これもまた複合汚染に有効と考えられている (Wu *et al.*, 2006a). ウランについては原位置でのバイオレメディエーションの実証試験も行われている (Wu *et al.*, 2006b). エタノールを添加してウラン還元菌の増殖を促進させるだけでなく, pH を 6.0-6.2 に調整することにより, 競合するメタン生成菌を抑制するなど, 生態系を考慮した工夫がなされている.

有機化も無毒化の一つの形態である. 無機態のヒ素は三価, 五価共に毒性の高い物質であるが, 有機態では毒性が低下する (貝瀬ほか, 1998). 好気性・嫌気性細菌ともにモノメチル, ジメチル, トリメチル化合物を生成するものが知られている (Bentley and Chasteen, 2002). 特に, メタン生成菌の *Methanobacterium formicicum* は無機のヒ素をアルシンやモノメチル-, ジメチル-, トリメチルアルシンといったガスに効率よく変換して揮発化させることができるため (Michalke *et al.*, 2000), 土壌汚染浄化に利用できる可能性がある.

4) 有害金属類の回収

微生物はまた, 様々な元素を回収する能力を持っており, このような微生物は担体 (アルギン酸, 多孔質ガラス, ナイロンなど) に保持させることにより, リアクターとして地下水や土壌洗浄水処理に利用が可能と期待されている.

これまでにクロム (Srinath *et al.*, 2002), 銀 (Pümpel *et al.*, 1995), ウラン (Suzuki and Banfield, 2004), ヒ素 (Takeuchi *et al.*, 2007) などを回収するものが知られている. 回収のメカニズムは主に二通りあり, 一つは細胞表面の様々な官能基や, 細胞外多糖などへの吸着である (Brierley, 1990). 多くの場合, 細胞表面はカルボキシル基やリン酸基を多く含むため, 細胞は電氣的にマイナスを帯びており, 陽イオン金属が主に吸着する. しかし, 細胞表面の構造は微生物の種類によって大きく異なるため, 様々な微生物について吸着能力が検討されている. もう一つは細胞内への蓄積である. 近年ヒ素を高濃度に回収することが発



第3図 沖積層泥層中の微生物. a) 模式図, b) 堆積物懸濁液中のLIVE/DEAD試薬で染色した生細胞と死細胞. 実際は生細胞が緑, 死細胞が赤に染色されるため, 識別できる. (撮影, 竹内).

見された微生物, *Marinomonas communis*は, 回収したヒ素の約半分が細胞外に吸着していたが, 残りの半分は細胞内へ取り込んだことが明らかになっている (Takeuchi *et al.*, 2007). このような細胞内への代謝に伴う取り込みは, 海洋細菌に多くみられる可能性が示唆されており, そのメカニズムをさらに解明することにより, 遺伝子工学的応用も可能と期待される。

3. 地下圏微生物研究の課題

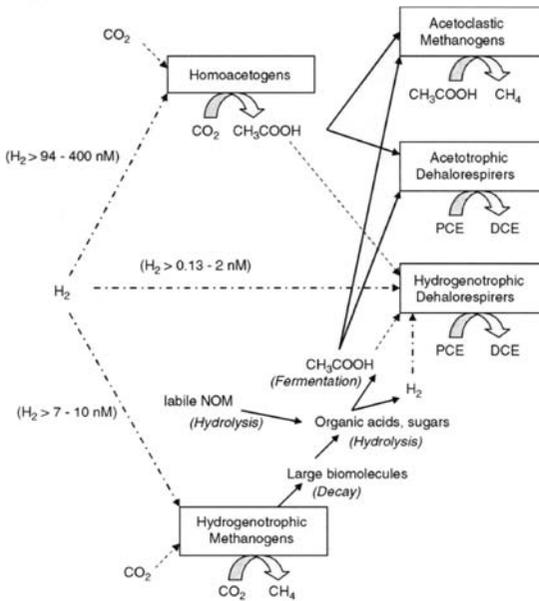
上に述べた通り, 微生物は様々な環境浄化力を持っている。しかし, これらの微生物を利用して, 特に原位置で浄化を促進させるためには, まだ地下圏微生物について解明すべき課題が多く残されている。それは *in vitro* (実験室) と *in situ* (現場) の解離である。実験室において得られる微生物のデータと, 実際の現場でのデータはしばしば異なる。実験室ではうまくいく汚染物質の分解が原位置ではうまくいかないケースも少なくない。なぜならば, 地下の微生物は地質構造, 地下水流動, 化学環境, さらに他の生物との複雑な関係において生きていたためであり, これらを少しずつ解明していく必要がある。

1) 空間の制限

実験室で培養される微生物は快適な培地の中で指数関数的に増殖しているが, 自然環境中では多くが, 例えば生きてはいるが増殖できない状態 (*viable but nonculturable*) などの生きがよいとは言えない状態で

あることが知られている (McDougald *et al.*, 1998)。地質中における微生物活動の制限要因は, 一つは物理的な空間と考えられる。例えば沖積層について水銀ポロシメーターで空隙サイズ分布を調べた研究では, 粘土層の空隙サイズは $0.03\text{--}2\mu\text{m}$ であると報告されている (Tanaka *et al.*, 2003)。微生物のサイズは一般に $1\mu\text{m}$ 程度であることを考慮すると, このような環境では通常実験室でみられる指数関数的増殖はほぼあり得ないことになる。

地圏資源環境研究部門では, 昨年沖積層における微生物によるメタン生成を評価するため, 地質情報部門や深部地質センターとの共同により, 沖積層の掘削調査を行い, 現在様々な物理・化学・微生物学的分析, 解析を進めている (吉岡, 2006)。その一つとして, 空隙サイズ分布と微生物活性との関連に注目している。分析の結果, 狭い空間にも多くの生きた微生物が存在することが明らかになりつつある (第3図)。このような取組みにより, 現場における微生物活動の詳細が明らかになると考えられる。微生物を活性化させるバイオスティミュレーションにおいては「過増殖」による目詰まりが問題になることがある。狭い空間の中でいかに効率よく活性化させるか, というのも重要な課題である。このように, 地質中のマイクロスペースと微生物活性に注目することは今後重要となるであろう。また, そのような狭い空隙で生きている微生物は, 増殖することなく, 自らの細胞を維持するだけの状態で生きている可能性がある。そのような微生物の状態に関する生理学的研究もさらに必要と考えられる。



第4図 嫌気的なテトラクロロエチレン汚染透水層に水素を添加した際の炭素 (dashed line), 電子 (dot-dashed line), および両方 (solid line) の流れの模式図 (Ma et al., 2006).

2) 他の微生物との相互作用

もう一つの課題は、我々がよく知っている微生物は実験室で純粋培養される微生物である点である。実際の自然界では、多くの微生物が他の微生物との相互作用のもとに存在している。地下微生物に限らず、近年様々な微生物間共生が知られるようになった (Kamagata and Tamaki, 2005)。ある微生物が生産する物質が他の微生物に必要な基質となり、またその微生物が生産する物質がまた別の微生物の基質になる、という現象である。また同じ基質を複数の微生物が利用する場合、微生物間で競合が生じる。例えば、脱塩素反応に必要な水素は、脱塩素菌だけでなく、硫酸還元菌、酢酸生成菌、メタン生成菌にも使われる (第4図)。しかし、脱塩素菌は多くのメタン生成菌に比べて低い水素濃度に適しているため、自然環境中では水素濃度を脱塩素菌に適した低濃度に制御することによりメタン生成をある程度抑制することができる (Ma et al., 2006)。実験室で純粋に培養している微生物が自然界で他の微生物との間にどのような相互作用があるのか。この複雑な関係の解明は長い道のりではあるが、一つずつ光をあてていかななくてはな

らない。

4. まとめ

土壌・地下水汚染における微生物学研究は、実験室レベルでは多くのことが明らかになっており、ほぼ全ての汚染物質に対応できる微生物が発見されている。今後の課題は実際の汚染現場でどのような現象が起きているのかを解明すること、そしてどのようにしてこれらの微生物の力を現場の地層中でうまく活用し、汚染浄化を効率よく促進できるのか、複雑な相互作用を解明していくことであり、今後ますます地質学や地球化学を含めた学際的な取組みが求められると考えられる。

参考文献

- Arciero, D., Vannelli, T. and Hopper, A.B. (1989) : Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 640-643.
- Bentley, R. and Chasteen, T.G. (2002) : Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 250-271.
- Brierley, C.L. (1990) : Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. *Geomicrobiol. J.* 8: 201-223.
- Fatpure, B.Z. and Boyd, S.A. (1988) : Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 49: 149-156.
- Kamagata, Y. and Tamaki, H. (2005) : Cultivation of uncultured fastidious microbes. *Microbes Environ.* 20: 85-91.
- Little, C.D., Palumbo, A.V., Herbes, S.E., Lidstrom, M.E., Tyndall, R.L. and Gilmer, P.J. (1988) : Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 951-956.
- Löffler, F.E., Sanford, R.A. and Ritalahti, K.M. (2005) : Enrichment, cultivation, and detection of reductively dechlorinating bacteria. *Methods in enzymol.* 397: 77-111.
- Lovley, D.R. and Coates, J.D. (1997) : Bioremediation of metal contamination, *Curr. Op. Biotechnol.* 8: 285-289.
- Ma, X., Novak, P.J., Semmens, M.J., Clapp, L.W. and Hozalski, R.M. (2006) : Comparison of pulsed and continuous addition of H₂ gas via membranes for stimulating PCE biodegradation in soil columns. *Wat. Res.* 40: 1155-1166.
- Maymo-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J.M. and Zinder. (1997) : S.H. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 274, 1568-1571.
- McDougald, D., Rice, S.A., Weichart, D. and Kjelleberg, S. (1998) : Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 1-9.
- Michalke, K., Wickenheiser, E. B., Mehring, M., Hirner, A. V. and Hensel, R. (2000) : Production of Volatile Derivatives of Metal (loid)s by Microflora Involved in Anaerobic Digestion of

- Sewage Sludge Appl. Environ. Microbiol. 66: 2791-2796.
- Nelson, M.J.K., Montgomery, S.O., Mahaffey, W.R. and Pritchard, P.H. (1987) : Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. Appl. Environ. Microbiol. 53, 949-954.
- Pümpel, T., Pernfuß, B., Pigher, B., Diels, L. and Schinner, F. (1995) : A rapid screening method for the isolation of metal-accumulating microorganisms. J. Ind. Microbiol. 14: 213-217.
- Singer, A.C., van der Gast, C.J. and Thompson, I.P. (2005) : Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. TRENDS in Biotechnol. 23, 74-77.
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W. and Garg, S.K. (2002) : Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. Chemosphere, 48: 427-435.
- Suzuki, Y. and Banfield, J.F. (2004) : Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from a uranium-contaminated site. Geomicrobiol. J. 21: 113-121.
- Takeuchi, M., Nanba, K., Yoshida, M., Nirei, H. and Furuya, K. (2004) : Natural groundwater of a gas field utilizable for a bioremediation of trichloroethylene-contamination. Environ. Geol. 45, 891-898.
- Takeuchi, M., Kawahata, H., Lallan, G., Kita, N., Morishita, Y., Ono, Y. and Komai, T. (2007) : Arsenic Resistance and Removal by Marine and Non-marine Bacteria, J. Biotechnol. 127: 434-442.
- Tanaka, H., Shiwakoti, D.R., Omukai, N., Rito, F., Locat, J. and Tanaka, M. (2003) : Pore size distribution of clayey soils measured by mercury intrusion porosimetry and its relation to hydraulic conductivity. Soils and Foundations 43: 63-73.
- US EPA (1999) : Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites. Office of Solid Waste and Emergency Response Directive (OSWER) 9200.4-17P.
- Wackett, L.P., Brusseau G.A., Householder, S.R. and Hanson, R.S. (1989) : Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2960-2964.
- Wu, Q., Sanford, R.A. and Löffler, F.E. (2006a) : Uranium (VI) reduction by Anaeromyxobacter dehalogenans strain 2CP-C. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3608-3614.
- Wu, W.M., Carley, J., Gentry, T., Ginder-vogel, M.A., Fienen, M., Mehlhorn, T., Yan, H., Caroll, S., Pace, M.N., Nyman, J., Luo, J., Gentile, M.E., Fields, M.W., Hickey, R.F., Gu, B., Watson, D., Cirpka, O.A., Zhou, J., Fendorf, S., Kitanidis, P.K., Jardine, P.M. and Criddle, C.S. (2006b) : Pilot-scale in situ bioremediation of uranium in a highly contaminated aquifer. 2. Reduction of U (VI) and geochemical control of U (VI) bioavailability. Environ. Sci. Technol. 40: 3986-3995.
- 貝瀬利一・櫻井照明・片瀬隆雄 (1998) : 水圏生態系における砒素の動態、砒素をめぐる環境問題、東海大学出版、東京。P 27-46。
- 川辺能茂・駒井 武・小川桂子・坂本靖英・大岩敏男・MNA フォローアップ部会 (2004) : 山形県における有機塩素化合物汚染のMNAに関する研究-減衰挙動と地下水質との関連性について-、第10回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集。
- 岸 和男・菅野敏夫・永井 茂 (1978) : 山形県米沢盆地における水理地質、地質調査所月報, 29 (9) 567-592.
- 駒井 武・川辺能茂 (2004) : MNA, 土壌・地下水汚染の原位置浄化技術、平田建正 (監), (株)シーエムシー出版, 121-128.
- 竹内美緒 (2006) : 部門グラント紹介、難透水層汚染の浄化に向けた汚染物質の挙動と微生物浄化機能の評価, GREEN NEWS, No.14, p.7.
- 吉岡秀佳 (2006) : 十大ニュースから、メタン生成菌に関する研究の紹介, GREEN NEWS, No.12, p.4. (http://unit.aist.go.jp/georesenv/green-news_backNo/No12_april/12-p4.html).

TAKEUCHI Mio and KOMAI Takeshi (2006) : Clean-up power of microbes and future challenges in subsurface microbiology.

<受付: 2006年10月23日>