

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

S R - 31 - 2000

微生物を用いた汚染土壌・地下水の浄化
機構に関する研究

(特別研究)

Studies on bioremediation mechanisms for contaminated soil and ground water

平成8～10年度

F Y 1996～1998

NIES



NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

環境庁 国立環境研究所

SR-31-2000

微生物を用いた汚染土壌・地下水の浄化
機構に関する研究
(特別研究)

Studies on bioremediation mechanisms for contaminated soil and ground water

平成8～10年度

FY 1996～1998

環境庁 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

特別研究「微生物を用いた汚染土壌・地下水の浄化機構に関する研究」

(期間 平成8～10年度)

特別研究責任者：森田昌敏

特別研究幹事：矢木修身

報告書編集担当：矢木修身・岩崎一弘

序

本報告書は、平成8年度から平成10年度にかけて実施した特別研究「微生物を用いた汚染土壌・地下水の浄化機構に関する研究」を取りまとめたものである。

現在、世界各地の土壌・地下水中からトリクロロエチレンやテトラクロロエチレンなどの揮発性有機塩素化合物が、また水銀や6価クロムなどの重金属が検出され大きな問題となっている。一般に、揮発性有機塩素化合物による汚染の浄化対策として、地下水の揚水・ばっ気法や土壌ガスの真空抽出法が、また重金属の場合には、封じ込めや不溶化等の物理化学的手法が用いられている。しかしながら、広範囲な環境汚染の場合、物理化学的手法では費用がかさむこと、また無害化処理でないことから、新たな浄化技術を開発することが求められている。現在、これらの問題点を解決できる新しい技術として、バイオレメディエーション技術が注目されている。バイオレメディエーション技術とは、生物機能を活用して汚染した環境を修復する技術であるが、汚染物質が根本的に除去されること、省資源・省エネルギー的技術であること、費用が安いこと等の特徴を有しているが、浄化効果や浄化技術の安全性等に関し研究がほとんどなされていないのが現状である。

本研究は、このような状況を踏まえ、汚染土壌・地下水の浄化に有用な浄化微生物を探索し、浄化機構を解明するとともに、微生物による汚染土壌・地下水の浄化効果の試験方法並びに本技術のリスク評価手法の開発を目的として遂行された。

その結果、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレンおよび水銀等により汚染された土壌・地下水の浄化に有効な各種の微生物を分離し、これらの微生物の持つ浄化酵素及び浄化酵素遺伝子を単離・解析し、微生物の持つ浄化機構を明らかにした。また、自然環境を模擬したフラスコ土壌系あるいは土壌シミュレータ系を用いて、微生物の持つ浄化機能の定量化試験方法を開発するとともに、バイオレメディエーション技術のリスク評価手法を提示した。本研究の成果が、土壌・地下水の浄化に大変役立つものと考えている。

研究を推進する上で研究所外の多くの方々にご協力とご助言を頂いた。ここに深く感謝の意を表したい。

平成12年3月

国立環境研究所
所長 大井 玄

目 次

1	研究の目的と経緯	
1.1	研究の目的	1
1.2	研究の構成	1
2	研究の成果	3
2.1	土壌・地下水浄化微生物の開発と浄化機構の解明に関する研究	3
2.1.1	浄化微生物の探索と浄化特性の解明	3
2.1.2	浄化酵素及び浄化遺伝子の単離と諸性質の解明	7
2.1.3	浄化機能強化型微生物の作成	11
2.1.4	浄化微生物の検出法の開発	13
2.2	微生物浄化機能の試験方法の開発に関する研究	18
2.2.1	フラスコ・カラム土壌系による浄化試験方法の開発	18
2.2.2	土壌・地下水シミュレーターによる浄化機能の試験方法の開発	24
2.2.3	バイオリアクターによる浄化機能の試験方法の開発	26
2.2.4	バイオレメディエーション技術のリスク評価手法の開発	28
	[資料]	
I	研究の組織と研究課題の構成	
1	研究の組織	33
2	研究課題と担当者	34
II	研究成果発表一覧	
1	誌上发表	35
2	口頭発表	38

1 研究の目的と経緯

1.1 研究の目的

都市部の再開発に伴い、このような地域の土壌・地下水中から揮発性有機塩素化合物や重金属が検出され大きな問題となっているが、従来の地下水の揚水・ばっ気、真空抽出、重金属の不溶化等の物理化学的手法では根本的な浄化が難しく、新たな浄化技術を開発することが求められている。現在、これらの問題点を解決できる新しい技術として、バイオレメディエーション技術が注目されている。バイオレメディエーション技術とは、微生物機能を活用して汚染した環境を修復する技術であり、微生物の浄化能を高める自浄機能強化法（バイオスティミュレーション）、浄化微生物を導入する微生物導入法（バイオオーグメンテーション）、さらにバイオリアクター法がある。本技術は、分解により汚染物質が根本的に除去されること、省資源・省エネルギー的技術であること、費用が安いことなどの特徴を有しているが、技術開発がほとんどなされていないのが現状である。

本研究では、このような状況を踏まえ、汚染土壌・地下水の浄化に有用な浄化微生物を探索し、浄化機構を解明するとともに土壌環境中において浄化能を発揮できる環境浄化型微生物を創生する。さらに浄化微生物の検出法並びに微生物による汚染土壌・地下水の浄化効果の試験方法を開発するとともに、本技術のリスク評価手法を開発することを目的とする。すなわち、各地の汚染された土壌より、浄化能を有する微生物を探索・分離するとともに浄化能を定量化する。次いで、汚染物質分解酵素の構造と性質及び分解酵素遺伝子を単離し、分解能を強化した微生物を創生する。また、浄化微生物の環境利用に際し、適正管理に資するため、浄化微生物の迅速・高感度検出法を開発する。さらに、自然環境を模擬したフラスコ土壌系あるいは土壌シミュレータ系を用いて、微生物の持つ浄化機能の定量化試験方法を開発する。これらの結果を踏まえ汚染した土壌・地下水を浄化するバイオレメディエーション技術のリスク評価法を開発することを目的とした。

1.2 研究の構成

本研究は以下の2つのサブテーマをもって行われた。各テーマの研究の概要を以下に示す。

(1) 土壌・地下水浄化微生物の開発と浄化機構の解明に関する研究

1) 浄化微生物の探索と浄化特性の解明

土壌・地下水汚染で問題となっているトリクロロエチレン(TCE)、テトラクロロエチレン(PCE)、1,1,1-トリクロロエタン(TCA)等の有機塩素化合物を好氣的及び嫌氣的条件下で分解する微生物を探索するとともに、水銀化合物等の重金属を還元する微生物を環境中より分離し、分解微生物の有害化学物質に対する分解機能を明らかにした。

2) 浄化酵素及び浄化酵素遺伝子の単離と諸性質の解明

有機塩素化合物を好氣的に分解する微生物より酵素添加酵素の単離・精製を行い、その諸性質を調べた。次いで、分解酵素遺伝子のDNA塩基配列を明らかにした。また、水銀還元微生物については還元酵素を単離し諸性質を調べるとともに、遺伝子の単離を行った。

3) 浄化機能強化型微生物の作成

水銀還元に関与する還元酵素遺伝子を導入し、分解能及び還元能を強化した微生物を創生しその諸性質を調べた。

4) 浄化微生物の検出法の開発

選択培地法及び浄化微生物に特異的な遺伝子を対象としたPCR（ポリメラーゼチェーン反応）-MPN（最確値）法等による浄化微生物の高感度、迅速検出法を開発した。

(2) 微生物浄化機能の試験方法の開発に関する研究

1) フラスコ・カラム土壌系による浄化機能の試験方法の開発

汚染土壌を充てんしたフラスコに、有機物、空気、リン、窒素等を添加し、環境中に生息する微生物による浄化機能を評価した。さらに浄化微生物を添加した系における有害物質の分解除去機能を評価し、フラスコ土壌系による有効な浄化機能の試験方法を提案した。

2) 土壌・地下水シミュレーターによる浄化機能の試験方法の開発

汚染土壌を充てんした土壌地下水シミュレーターを用いて浄化機能を評価した。

3) バイオリアクターによる浄化機能の試験方法の開発

バイオリクターに浄化微生物を充てんし、これに汚染物質を含んだ水、土壌をあるいは汚染土壌をスラリー状として充てんし、これに浄化微生物を添加した系での浄化機能を評価した。浄化微生物の移動及び生態系への影響についても評価した。

4) バイオレメディエーション技術のリスク評価手法の開発

浄化微生物の移動及び生態系への影響についても評価した。各サブテーマで得られた成果及び手法を用いてバイオレメディエーション技術の環境影響評価手法を提案した。

2 研究の成果

2.1 土壌・地下水浄化微生物の開発と浄化機構の解明に関する研究

2.1.1 浄化微生物の探索と浄化特性の解明

(1) バイオレメディエーション技術のプロセス

全国各地の土壌・地下水中からトリクロロエチレン、テトラクロロエチレンや1,1,1-トリクロロエタン等の揮発性有機塩素化合物が検出され、これらが発がん性を有することから大きな問題となっている。これまでに揮発性有機塩素化合物による汚染が1,000カ所以上で認められており、1997年度においても各地で新たに汚染が見いだされている。現在、揮発性有機塩素化合物による土壌・地下水汚染対策として、地下水を揚水し、ばっ気による除去や減圧下での土壌ガスの吸引除去等が実施されているが、コストが高いことや無害化処理技術でないなどの点で、バイオレメディエーション (Bioremediation) 技術の活用が期待されている。

バイオレメディエーション技術を適用する場合のプロセスを図1に示す。まず汚染の状況を正確に把握する必

要がある。すなわち汚染物質の種類と濃度、汚染の広がり、汚染土壌の物理化学的性質、地下水の水理学的特性などを調べる。次いでフラスコ、カラム、ライシメーターなどを用いて汚染物質が分解除去可能かどうかのトリータビリティテストを行う。分解が困難な場合には、汚染物質を分解する微生物を分離する。分解能が低い場合には分解菌を育種し分解能を強化する。次に汚染の状況に合わせて処理プロセスを選択する。次いで、パイロットスケール規模での浄化試験を実施した上で現場への適用が可能となる。以上述べたようにバイオレメディエーションの実施に至るには、生物、化学、工学等の多くの分野の研究が関係している。

バイオレメディエーション技術は、汚染土壌・地下水の浄化を目的とする場合、微生物の活用法により2つに分類される。一つは、バイオスティミュレーション (Biostimulation) といわれ、汚染した土壌・地下水に窒素、リンなどの無機栄養塩類、メタン、たい肥などの微生物の増殖に必要なエネルギー源としての有機物、さらに空気や過酸化水素等を導入し、現場に生息している微生物を増殖させて浄化活性を高める方法であり、もう一つはバイオオーグメンテーション (Bioaugmentation) とよばれ、汚染現場に浄化微生物が生息していない場合に、培養した微生物を導入して浄化する方法である。汚染した環境を病人に例えると、栄養をとり体力を増強させるのがバイオスティミュレーションに相当し、症状が重い場合に投薬を用いて治療するのがバイオオーグメンテーションに相当する。

また利用するプロセスにより、固体処理 (Solid phase bioremediation)、スラリー処理 (Slurry phase bioremediation)、原位置処理 (In situ bioremediation)、バイオリクター (Bioreactor) の4種に分類される。

固体処理は、汚染土壌を一定の場所に集め土壌への通気、攪はん、さらに栄養物質 (リン、窒素等の栄養塩類、有機物) を添加して処理する方法であり、表層土壌の油や有機溶媒等の易分解性汚染物質による汚染の浄化に適している。低コストではあるが処理期間が長くなる欠点がある。

スラリー処理は、汚染土壌に水を加えスラリー状にし、これを反応槽中に移し、分解微生物や栄養物質を添加し、

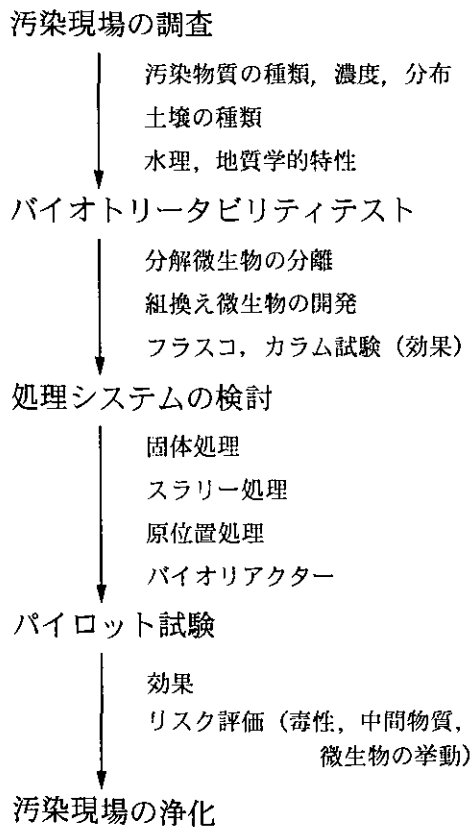


図1 バイオレメディエーションのプロセス

攪はん混合し処理する方法である。汚染物質が2,4-Dやペンタクロロフェノールのように難分解性で、かつ高濃度である場合に適している。

原位置処理は、汚染現場土壤中に栄養物質、酸素あるいは空気、場合によっては分解微生物を添加して土壤の分解能を向上させる方法で土壤の掘削が不要であり、建物が立っている地下土壤の修復が可能である。バイオリアクターは、汚染した地下水をくみ上げて地上で処理することができ、地下水、排水及び排ガスの処理に適している。

バイオレメディエーションにおける最も重要なポイントの一つは、有害物質を分解する微生物の開発である。これまでに、土壤中よりトリクロロエチレンを分解できるメタン資化性菌 *Methylocystis* sp. M株の分離に成功し、トリクロロエチレンの分解特性について検討を加えた。しかし、M株はトリクロロエタンやテトラクロロエチレンを分解できないことから、高濃度のクロロエチレン及びクロロエタンを分解できるさらなる微生物の分離を試みた。

(2) クロロエチレン及びクロロエタン分解菌の分離

全国各地の畑及び水田土壤ならびに揮発性有機塩素化合物を使用している工場の土壤を分離源として、トリクロロエチレン及び1,1,1-トリクロロエタン分解菌の分離を試みた。すなわち、69 mlのバイアルビンに15 mlのMM無機培地(表1)を添加し、これに各地から採取した土壤0.1gを添加し、ブチルゴム栓とアルミシールで密閉した後、ブチルゴム栓を通してヘッドスペースから12 ml

の空気をシリンジで引き抜き、炭素源としてガス状炭化水素5 ml及び酸素5 mlを添加し、これに揮発性有機塩素化合物が水中濃度で約1 mg/lとなるようマイクロシリンジで注入後、30℃で振とうし集積培養を行った。ガス状炭化水素はメタン、エタン、プロパン、及びエチレンをそれぞれ単独で使用した。培養1週間後に分解活性をガスクロマトグラフィーで測定し、対象物質が減少しているものについて、培養液の0.2 mlを新しい培地を含むバイアルビンへ植え継いだ。2回目の集積培養で、1週間後に菌の増殖が認められたサンプルについて分析を行い、分解の認められたサンプルについてさらに、第3回目の集積培養を行った。この操作を繰り返し第4回目の集積培養後、MM寒天平板培地を用いて、分解菌の純粋分離を行った。この結果、エタンを炭素源として増殖し、トリクロロエチレン及び1,1,1-トリクロロエタンを分解するTA 5株とTA27株を分離した。TA 5株は、テトラクロロエチレン汚染土壤から、またTA27株はクリーニング工場周辺土壤から分離された。

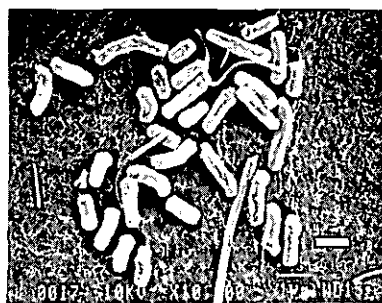
TA 5株と27株について、形態学的及び生理学的検討を加えた。TA 5株とTA27株の電子顕微鏡写真を図2に示すが、TA 5株は大きさ $0.4 \times 1.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$ 、TA27株は $0.4 \times 0.8 \sim 2.5 \mu\text{m}$ のかん菌であり、ベン毛は認められなかった。諸性質を表2に示した。両株ともに運動性は認められず、グラム陽性、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、O-Fテストは、TA 5株で陰性、TA27株ではオキシダーゼ陰性であった。胞子の形成は認められず、メナキノンMK-9(H2)であった。また両株ともに各種の炭素源を資化でき、*Mycobacterium*に属する菌であるこ

表1 MM培地組成

		微量金属溶液 (1L)	
NH ₄ Cl	2140 mg	MnSO ₄ ·4-6H ₂ O	60 mg
K ₂ HPO ₄	1170 mg	H ₃ BO ₃	5 mg
KH ₂ PO ₄	450 mg	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	120 mg	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	28 mg	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	60 mg
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	4.8 mg	NiSO ₄ ·7H ₂ O	6 mg
微量金属溶液	10 ml	CuSO ₄ ·5H ₂ O	6 mg
脱イオン水	1 L	H ₂ SeO ₄	4 mg
	(pH7.0)		



TA5



TA27

図2 *Mycobacterium* TA 5 株およびTA27 株の電子顕微鏡写真

表2 *Mycobacterium* sp. TA 5 およびTA27 株の諸性質

性質	TA5	TA27
形態	桿菌	桿菌
運動性	-	-
グラム染色	+	+
カタラーゼ試験	+	+
オキシダーゼ試験	-	-
O-Fテスト	-	O
メナキノン	MK-9(H ₂)	MK-9(H ₂)
炭素源の資化性		
メタン	-	-
エタン	+	+
プロパン	-	+
エタノール	+	+
グルコース	+	+
酢酸	-	-

O: 酸化

とが判明した。

16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行った結果を図3に示した。TA 5 株は *M. phlei* と類似していたが、従来報告されているものとは一致せず、新種と考えられた。TA27 株は *M. gilvum* と高い相同性を示したが、新菌株と考えられた。

TA 5 株及びTA27 株はいずれも、トリクロロエチレン及び1,1,1-トリクロロエタンを唯一の炭素源として増殖できないが、ほかの炭素源を資化して増殖し、同時にトリクロロエチレンや1,1,1-トリクロロエタンを分解できたが、TA27 株の方がTA 5 株と比較し良好な増殖を示した。

そこでTA27 株を用いてトリクロロエチレン及び1,1,1-

トリクロロエタンの分解特性について検討を加えた。エタン濃度のトリクロロエチレン及び1,1,1-トリクロロエタンの分解に及ぼす影響を調べた。

トリクロロエチレン濃度が1 mg/l の場合、エタン濃度が1%では、エタンが1日で消費され菌の増殖が低かった。したがってトリクロロエチレンの分解も約40%で停止したが、3%の場合では、菌の増殖も良好となり2日

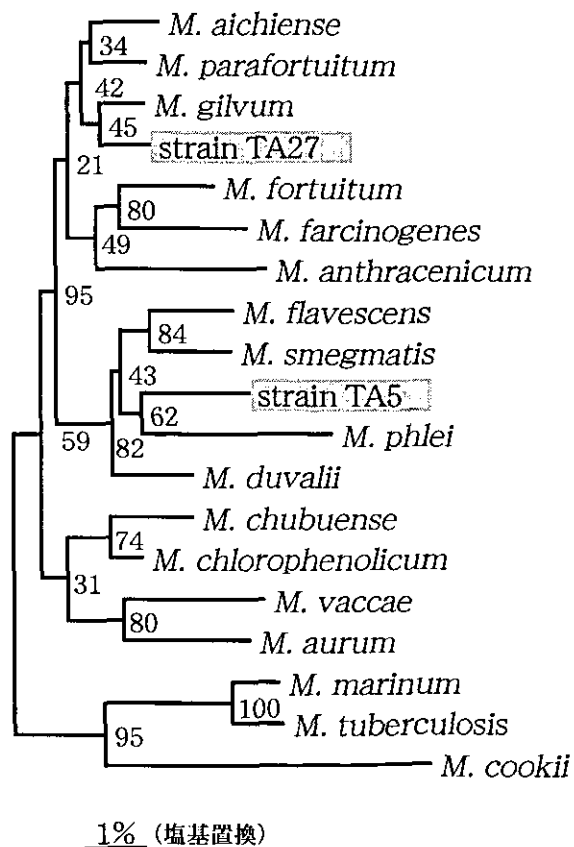


図3 16S rRNA 遺伝子の塩基配列によるミコバクテリウム属細菌の系統樹

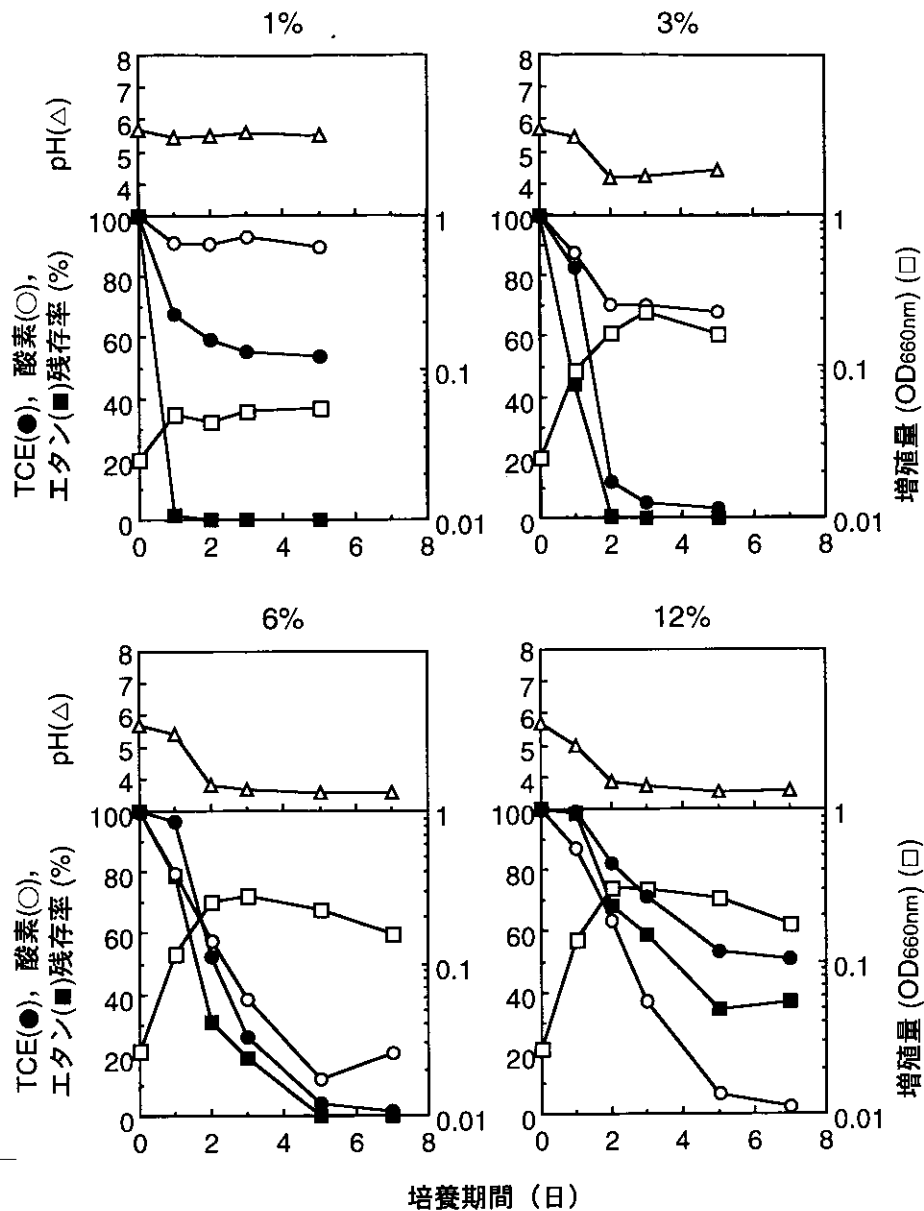


図4 *Mycobacterium* sp. TA27株によるトリクロロエチレン分解に及ぼすエタン濃度の影響
(トリクロロエチレン濃度:1mg/l;初期pH:5.7;培養温度:30℃)

ではほぼ完全にトリクロロエチレンが分解された(図4)。6%及び12%の場合は、菌の増殖がさらに良くなるが、トリクロロエチレンの分解は低下した。増殖に伴いpHが4程度にまで低下した。高濃度のエタンの共存はトリクロロエチレンの分解を阻害することが判明した。

1,1,1-トリクロロエタン濃度が1 mg/lの場合の分解結果を図5に示した。エタン濃度が3%ではエタンが2日で消費され菌の増殖も悪く、1,1,1-トリクロロエタンの分解は低かったが、5%では増殖も良好となり、5日間で1,1,1-トリクロロエタンの約80%が分解された。10%の高濃度では、増殖はやや良好となるが1,1,1-トリクロ

ロエタンの分解は阻害され、トリクロロエチレンの場合と同様に高濃度のエタンの共存が分解を阻害することが判明した。

TA27株の1,1,1-トリクロロエタン分解の最適温度は25~36℃であったが、10℃でも分解活性を有した。また、分解の最適pHは6付近で、やや酸性側が良いこと、またTA27株は、高濃度の50 mg/lのトリクロロエチレン及び150 mg/lの高濃度の1,1,1-トリクロロエタンを分解できた。

トリクロロエチレン及び1,1,1-トリクロロエタンをそれぞれ分解できる微生物は、メタン酸化菌、フェノール

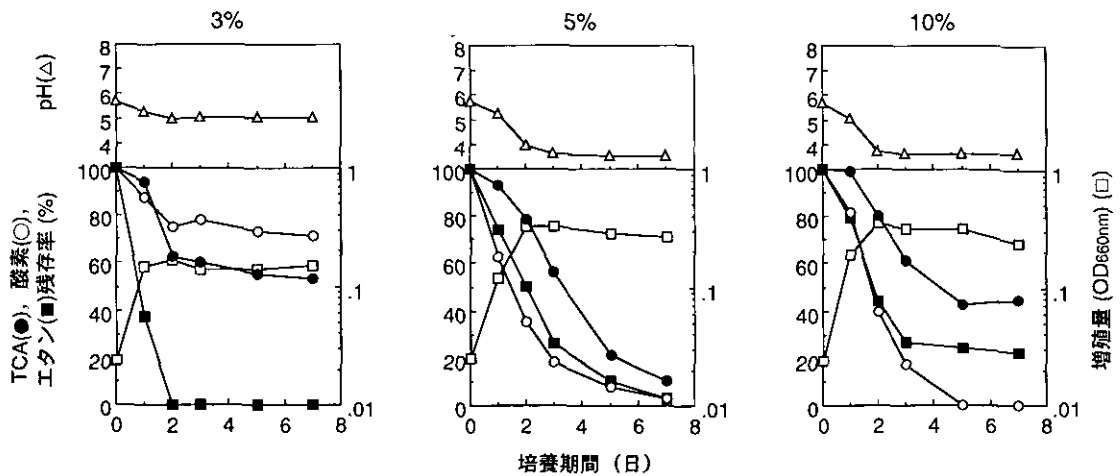


図5 *Mycobacterium* sp. TA27株による1,1,1-トリクロロエタン分解に及ぼすエタン濃度の影響 (1,1,1-トリクロロエタン濃度:1mg/l; 初期pH:5.7; 培養温度:30℃)

分解菌, トリエン分解菌, アンモニア酸化菌等種々見いだされているが, 高濃度の両物質を同時に分解できる菌の発見は, トリクロロエチレンと1,1,1-トリクロロエタンで同時に汚染している土壌の浄化に有用なものと考えられる。TA27株の活用法については今後さらに検討を加える予定である。

(3) テトラクロロエチレン分解菌の分離

テトラクロロエチレンを分解する細菌の分離を試みた。その結果, クリーニング工場排水口側溝の土壌からテトラクロロエチレンを分解する混合微生物系を得た。本混合微生物系を継代培養すると, 分解活性の消失が認められたが, 滅菌土壌またはゼオライトを添加することにより維持することができた。この分解活性の維持効果は添加土壌の種類とは無関係であり, 熱処理でも失われることはなかったが, 酸処理によって失われた。したがって, 分解活性維持に必要な因子は, 金属類あるいは分解菌の住みかとなりうる土壌等の表面構造であることが示唆された。

以上で得られた結果を基に継代・集積培養を15回以上繰り返した結果, 160 mg/lの高濃度テトラクロロエチレンを分解することが可能となった。本混合微生物系によるテトラクロロエチレンの分解経過を図6に示すが, 2 mg/lのテトラクロロエチレンが8日目には約90%が分解され, トリクロロエチレンの生成が認められた。しかしトリクロロエチレンはさらに脱塩素化されcis-1,2-ジクロロエチレン (DCE) になることが明らかとなった。また, 本混合系は, テトラクロロエチレンのほかにトリ

クロロエチレン, 四塩化炭素も分解することができたが, ジクロロメタン, トリクロロエタン, クロロホルムを分解することはできなかった。したがって, テトラクロロエチレンで汚染した土壌の浄化には, 混合培養系を活用して嫌気条件下でトリクロロエチレンに分解し, 次いで好気的な条件下でトリクロロエチレンを分解することが有用と考えられた。

2.1.2 浄化酵素及び浄化遺伝子の単離と諸性質の解明

(1) *Methylocystis* sp. Mの分解酵素及び酵素遺伝子の諸性質

1) 分解酵素の構造

メタン酸化細菌 *Methylocystis* sp. M株のトリクロロエチレン分解能が, 可溶性メタンモノオキシゲナーゼ

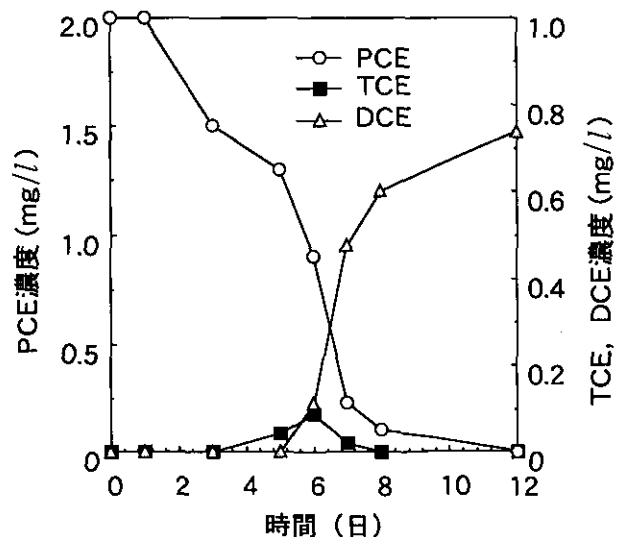


図6 混合培養液によるテトラクロロエチレンの分解

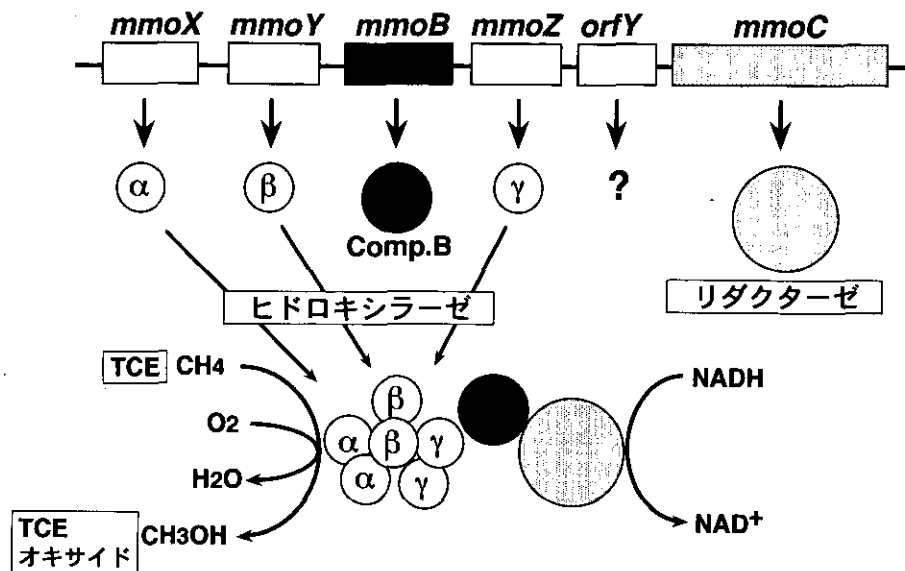


図7 M株のメタンモノオキシゲナーゼ

(sMMO) に由来すること、またsMMOは、図7に示すように、 α 、 β 、 γ の2個ずつのサブユニットからなるヒドロキシラーゼ及びリダクターゼと調節タンパクBよりなるマルチコンポーネント酵素であることをすでに明らかにした。そこで、sMMO遺伝子をクローニングし、全塩基配列を解読した(図8)。このことから以下のことが明らかとなった。

①sMMO遺伝子は全長6 kbで、*mmoX*、*mmoY*、*mmoB*、*mmoZ*、*mmoC*及び機能不明な*orfY*の遺伝子群で構成されていた。

②これまで報告されている2株のメタン酸化細菌のsMMO遺伝子と比較した結果、アミノ酸レベルでも非常に高い相同性が認められた。また、sMMOの活性中心に特徴的な構造等、活性に関与する種々の重要な知見が得られた。

③クローニングされたsMMOを*E. coli*に形質転換し、トリクロロエチレン分解活性を測定したが、分解は認められなかった。これは、分解酵素のコンポーネントの1つであるヒドロキシラーゼが高分子集合体であるため、適正な立体構造を保持できなかったか、または活性中心に鉄イオンが配置されなかったためと考えられた。

2) コンポーネントBの役割

これまでにコンポーネントBのsMMOにおける役割は不明であった。そこでsMMOの分解特性に及ぼすコンポーネントBの効果を調べた。sMMOの分解活性は、バイアルピンを用いて、NADH共存下でプロピレンからプロ

ピレンオキシドへの変換速度を測定し、活性を求めた。コンポーネントBのみを熱処理し、その活性を測定したが、ほとんど活性の低下は認められず、コンポーネントBは熱に安定なタンパクであることが判明した(図9)。またコンポーネントBとヒドロキシラーゼを混合して熱処理すると、ヒドロキシラーゼ単独で熱処理した場合よりも活性の低下が抑制されたことから、コンポーネントBはヒドロキシラーゼの熱安定性に関与していることが示唆された。さらに透析実験から、コンポーネントBはヒドロキシラーゼの活性中心にある鉄-イオウクラスターからの鉄の離脱を阻止していることも示唆された。

3) H₂O₂ shunt系の存在

分解に関与するsMMOの3つのコンポーネントを再構築しsMMO系及びH₂O₂/ヒドロキシラーゼ系(H₂O₂ shunt系)の機能の解明を行った。H₂O₂/ヒドロキシラーゼ系とは、過酸化水素が存在すると、sMMOがヒドロキシラーゼのみで分解活性を示すといわれている系のことであり、その存在の有無を調べた。H₂O₂ shunt系による分解実験は、H₂O₂とヒドロキシラーゼを添加し、さらにプロピレンを加えてプロピレンオキシドへの変換速度を測定し求めた。また、H₂O₂ shunt系によるアルカンの分解実験では、プロピレンの代わりに各種の化合物を添加し、キャピラリーGCにて代謝産物を同定・定量した。H₂O₂濃度を変化させてH₂O₂ shunt系の有無を調べたところ、プロピレンからプロピレンオキシドの生成が認められM株にもH₂O₂ shunt系が存在することが明らかとなった。

Genomic map showing nucleotide sequences for various genes (mmoX, mmoY, mmoB, mmoZ, orfY, mmoC) across a DNA fragment. The sequences are aligned by line number (1 to 580) and gene region. Key genes identified include mmoX, mmoY, mmoB, mmoZ, orfY, and mmoC. The map shows overlapping or adjacent genes with their corresponding DNA sequences.

図8 M株のメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子の塩基配列

4) H2O2 shunt系によるトリクロロエチレンの分解

トリクロロエチレンをsMMO系とH2O2 shunt系で分解し、その分解生産物を比較した。分解実験には、14C-トリクロロエチレンを用い、HPLCによって分解生産物を同定・分取し、液シンを用いて定量した。その結果、顕著な差は認められなかった(図10)。H2O2 shunt系では、炭素数4以上の直鎖アルカンを基質とした場合、両系における生産物構成比に差異が認められたが、トリクロロ

エチレンのように鎖長の短い化合物では分解系の構成成分にかかわらず生成物は一定であることが明らかとなった。このことは、ヒドロキシラーゼの活性部位の立体構造がリダクターゼ及びコンポーネントBの結合により変化する可能性を示唆された。

(2) トリクロロエチレン分解活性測定法

M株のトリクロロエチレン分解能を簡便、迅速、かつ

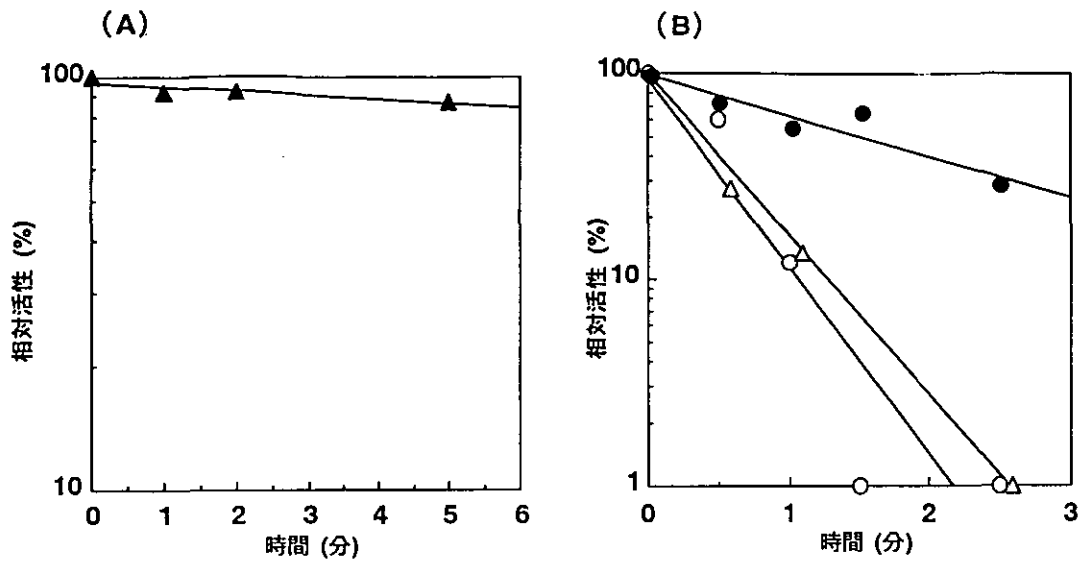


図9 コンポーネントBのヒドロキシラーゼ熱安定性に及ぼす影響
 (A) 60°CにおけるコンポーネントBの熱安定性
 (B) ヒドロキシラーゼの熱安定性。○：ヒドロキシラーゼとコンポーネントBを別々に60°Cで処理
 ●：ヒドロキシラーゼとコンポーネントBを一緒にして加熱処理。△：ヒドロキシラーゼのみで加熱処理

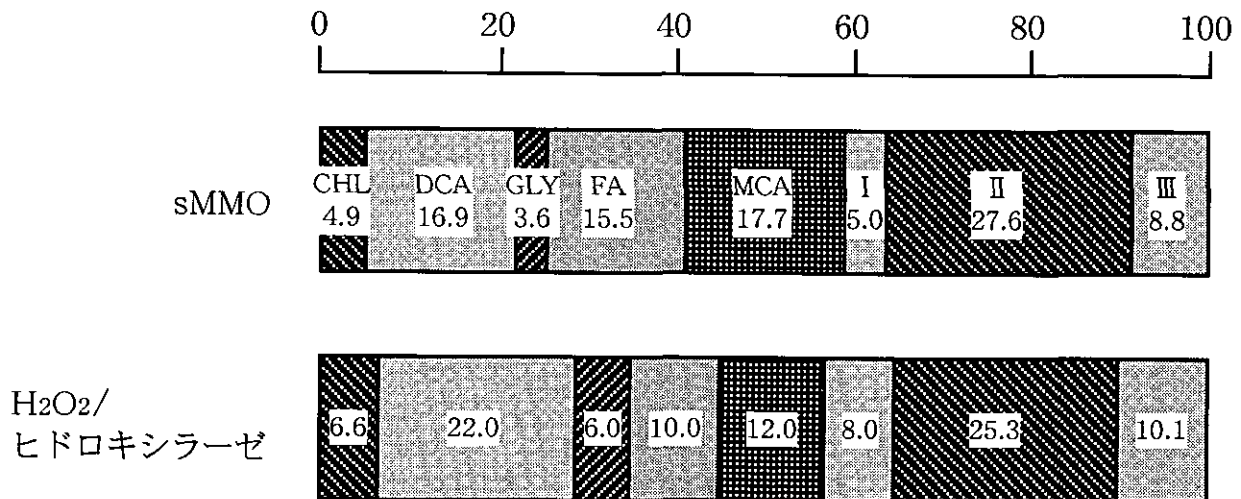


図10 sMMO系およびH₂O₂ shunt系によるトリクロロエチレンの分解
 CHL:クロラール DCA:ジクロロ酢酸 GLY:グリオキシル酸 FA:蟻酸
 MCA:モノクロロ酢酸 I, II, III:未同定

定量的に測定する新たな手法の開発を行った。この結果、TCE分解酵素の基質特異性が広いことを利用してナフタレンをナフトールに変換させ、これをテトラゾール塩と反応させて発色させる簡便な測定法を確立した。本測定法はM株のみならず、ほかのトリクロロエチレン分解菌にも適用でき、また土壌の混入による影響も少ないことから、野外での簡便な測定法として利用可能であることが示唆された。

(3) *Mycobacterium* sp. TA27株の分解酵素

エタン酸化細菌 *Mycobacterium* sp. TA27の粗酵素液を用いて反応至適条件及び安定化条件の検討を行った。酸化酵素の至適pHは7.7であり、タンパク量とプロピレン酸化速度の関係調べたところ、タンパク量の増大に伴い酸化速度の急激な増大が認められことから、TA27株の酸化酵素はマルチコンポーネントエンザイムであることが示された。

2.1.3 浄化機能強化型微生物の作成

(1) 組換え体の作成

これまでプラスミドNR1由来の水銀化合物分解酵素遺伝子群 (*mer* オペロン) を広宿主域ベクター pSUP104 にクローニングして組換えプラスミド pSR134 を作成した (図11)。*mer* オペロンの構造を図12に示すが, *mer* オペロンは, 水銀の菌体内への取り込みを制御する水銀輸送系タンパク, 無機水銀を金属水銀に還元する還元酵素のレダクターゼ及びオペロンの発現を制御する調節タンパクをコードしている。

今回は, *mer* オペロンを連結させたタンデム化による水銀化合物分解能の向上を試みた。すなわち, *mer* オペロンを連結したタンデムプラスミドを作成し, これらのプラスミドを *Escherichia coli* HB101, *Pseudomonas putida* PpY101 に導入した。まず pSR134 から *mer* オペロンのみを切り出し, サブクローニングを行った。さらに *mer* オ

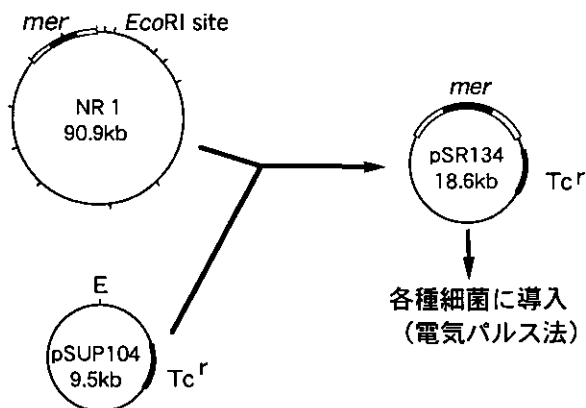


図11 無機水銀分解酵素遺伝子群 (*mer* オペロン) のクローニング

ペロンの転写方向が同じになるようにタンデム化するために非常に多くの制限酵素切断部位がマルチクローニングサイトに存在するプラスミドベクター pSL1190 に組み込んだ。このタンデムプラスミドの作成手順を図13に示した。タンデム化及びサブクローニングしたプラスミドの *mer* オペロン断片近傍の制限酵素解析及びシーケンス解析を行い, その転写方向を確認した (図14)。

(2) 組換え体の諸性質

得られた各種プラスミドを導入した組換え体の諸性質を検討した。まず, 各宿主内に導入された *mer* オペロンの保持数を定量した。各組換え体からプラスミドを抽出し, アガロースゲル電気泳動で解析を行った。その解析結果の画像解析を行い, 組換え体細胞内の *mer* オペロンを一つ組み込んだプラスミド (pSUPmer) 及びタンデムプラスミド (pSUPmer2) コピー数をプラスミド pSR134 を内部標準とした相対値で求めた。その結果, 各宿主内では, いずれのプラスミドもほぼ同数保持されることが認められた (表3)。したがって, *mer* オペロンを連結させたタンデムプラスミド pSUPmer2 を導入した組換え体では, pSUPmer を導入した組換え体の2倍量の *mer* オペロンを保持することが示された。

次いで, 各組換え体の水銀耐性を調べた。各組換え体を各種塩化第2水銀濃度で培養しその生育を測定した。いずれの宿主においてもタンデムプラスミドを保持する株の方が高い水銀耐性能 (図15) を示した。さらに, 水銀還元酵素活性を比較した。水銀還元酵素活性は, 水銀依存性 NADPH 還元酵素活性を測定することによって求めた。すなわち反応液中の NADPH 濃度の変化を吸光度でモニターした (図16)。いずれの宿主においてもタ

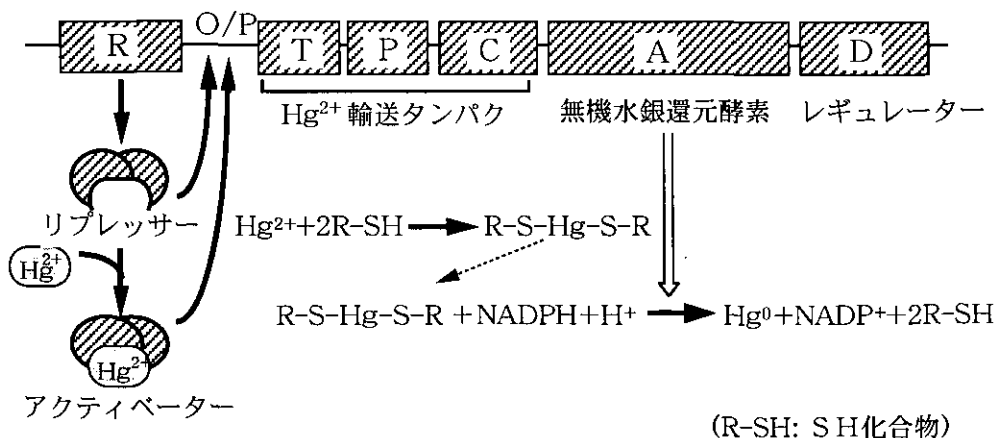


図12 プラスミドNR1の*mer* オペロン

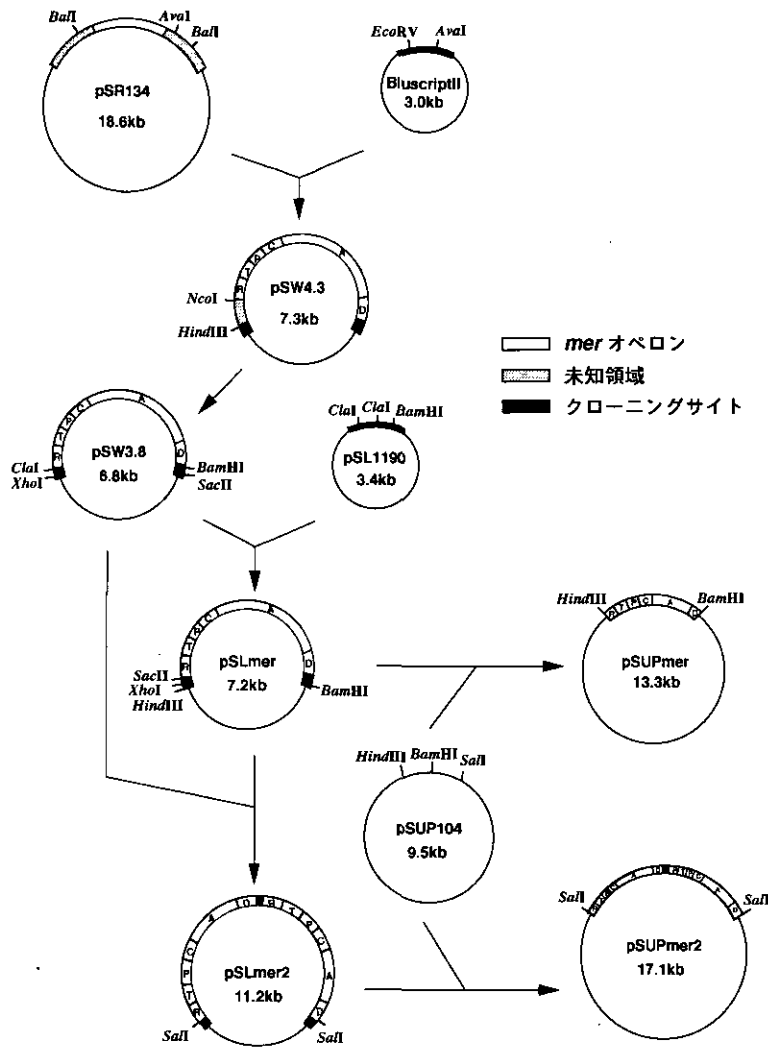


図13 *mer* オペロンをタンデム化したプラスミドの作成

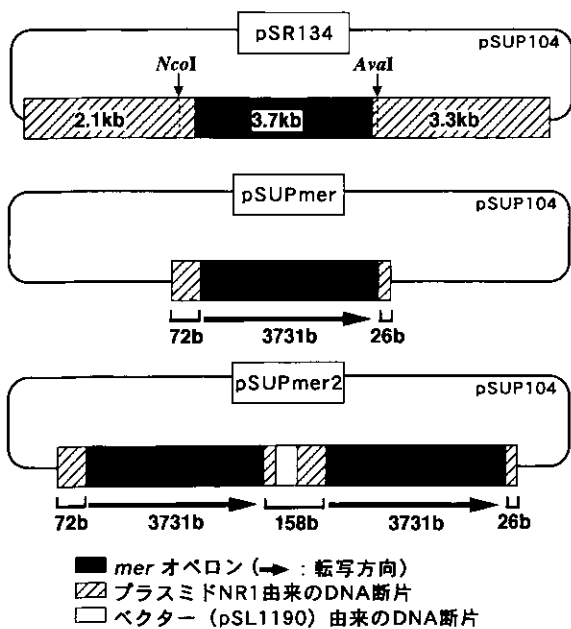


図14 *mer* オペロンをサブクローニングおよびタンデム化したプラスミドの構造

表3 各種プラスミドの宿主内でのコピー数

プラスミド	宿主	
	HB101	PpY101
pSR134	1	1
pSUPmer	1.12	0.97
pSUPmer2	1.01	1.14

pSR134の各宿主内でのコピー数を1とした。

ンデムプラスミドを保持する株の方がNADPH濃度の減少が大きく、高い水銀還元酵素活性を示すことが認められた。したがって、水銀化合物分解酵素遺伝子群 *mer* オペロンのタンデム化が水銀浄化能の強化に有効であることが示唆された。

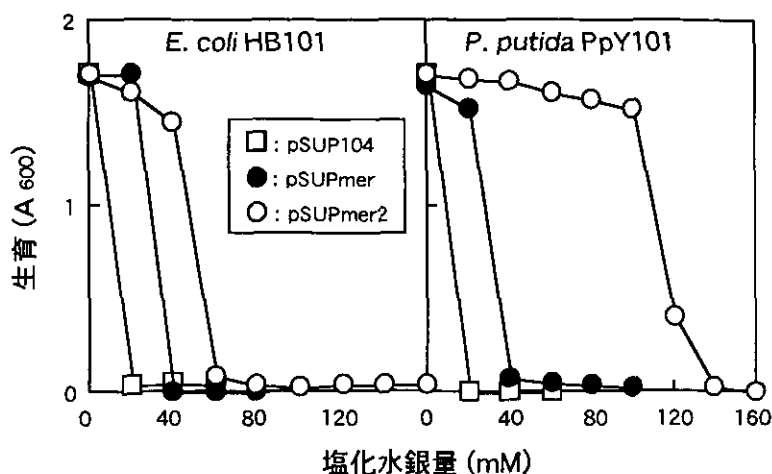


図15 各種プラスミドを導入した組換え体の水銀耐性

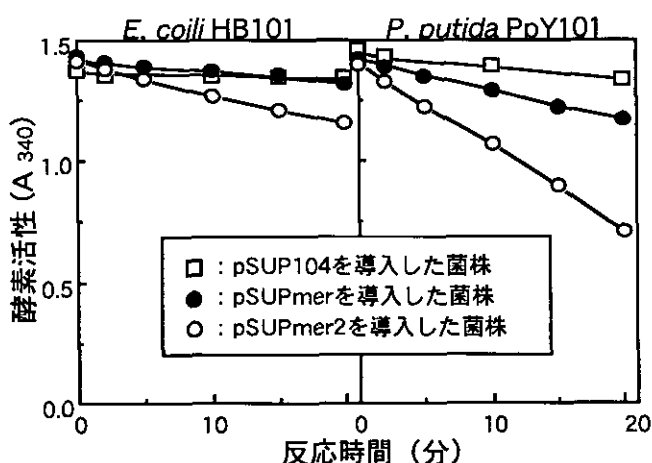


図16 各種プラスミドを導入した組換え体の水銀還元酵素活性

2.1.4 浄化微生物の検出法の開発

環境中において有用微生物を利用する場合、微生物及びその遺伝子の挙動を明らかにすることは特に安全性を評価する上で非常に重要である。しかしながら環境中には非常に多くの微生物が生息しているため標的微生物及びその遺伝子のみを検出・定量する手法の開発を試みた。

(1) 土壌中からの微生物DNAの回収

土壌環境中からの微生物DNAの回収法の検討を行った。火山灰土に水銀化合物分解酵素遺伝子群 (*mer* オペロン) を導入した組換えプラスミド pSR134 を保持する *P. putida* PpY101 を接種し、微生物DNAの回収を行った。回収法として、土壌中の微生物を直接溶菌しDNAを抽出する方法 (直接法)、微生物表面、土壌粒子が電荷を帯びていることを利用したイオン交換樹脂を用いる方法

(イオン交換樹脂法) 及び土壌から微生物を分離した後、に溶菌してDNAを抽出する方法 (間接法) を検討した。その結果、土壌試料を攪はんして微生物細胞を回収した後、酵素及び界面活性剤で溶菌するDNA抽出法 (間接法) が最も高い回収率を示した。次いで、この方法 (図17) を用いて6種類の土壌 (砂質土、沖積土及び火山灰土各2種) からの微生物DNA抽出を行った。各種土壌の物理化学的諸性質を表4に示す。これらの土壌からの微生物DNAの回収量及び回収率を求めた (表5)。得られた回収率と各種土壌の物理化学的諸性質の相関を調べた結果、土壌の粘土率、全炭素量等の土性がDNAの回収率に大きく影響を及ぼすことが判明した (図18)。

土壌からのDNA抽出に影響を及ぼす要因としてフミン酸に着目し、沖積土壌Cに標準フミン酸を加え、微生物DNAの回収量を比較した。フミン酸の添加により

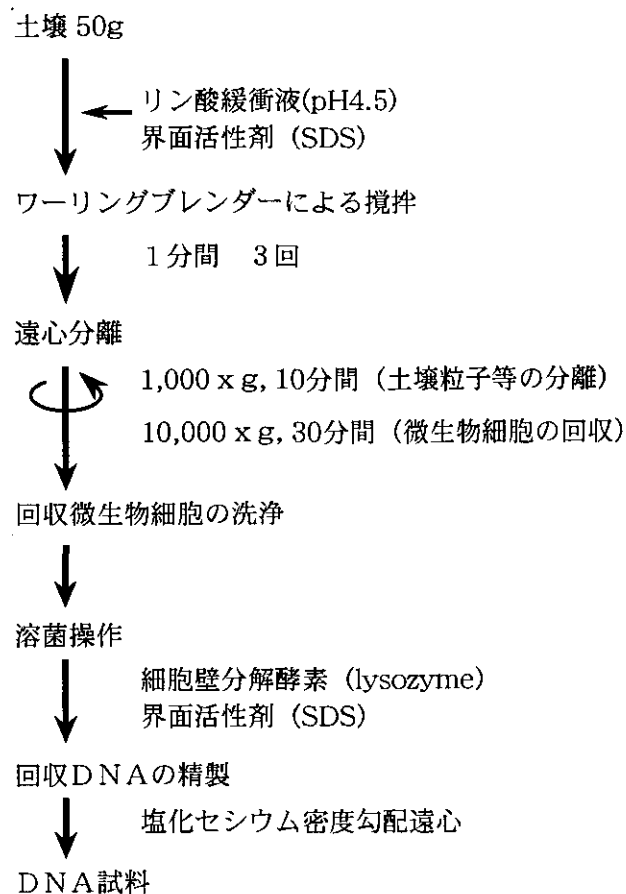


図17 土壌からの微生物DNAの回収法

DNAの回収率は著しく阻害されることが認められた(表6)。したがって、特にフミン酸が多く含まれる土壌試料からの微生物DNAの抽出量は実際よりも低く見積もられる傾向にあることが示された。

(2) PCR法による水銀浄化菌の検出

特定DNAを増幅して検出する技術(ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法:PCR法)を応用して、培養を必要としない迅速な微生物のモニタリング手法の開発を試みた。

表4 供試土壌の物理化学的性質

土壌	pH	砂質土 (%)	シルト (%)	粘土 (%)	有機炭素 (%)	全窒素 (%)	フミン酸画分 (mg/g)
A	7.7	99.7	0.1	0.2	0.37	0.04	13.1
B	6.0	96.4	1.3	2.2	0.67	0.07	57.4
C	6.0	44.6	36.4	19.0	0.73	0.08	129.7
D	6.1	19.9	44.2	35.9	2.44	0.25	198.4
E	6.0	36.3	36.1	27.6	2.94	0.23	198.8
F	5.2	40.1	31.2	28.7	6.19	0.40	473.6

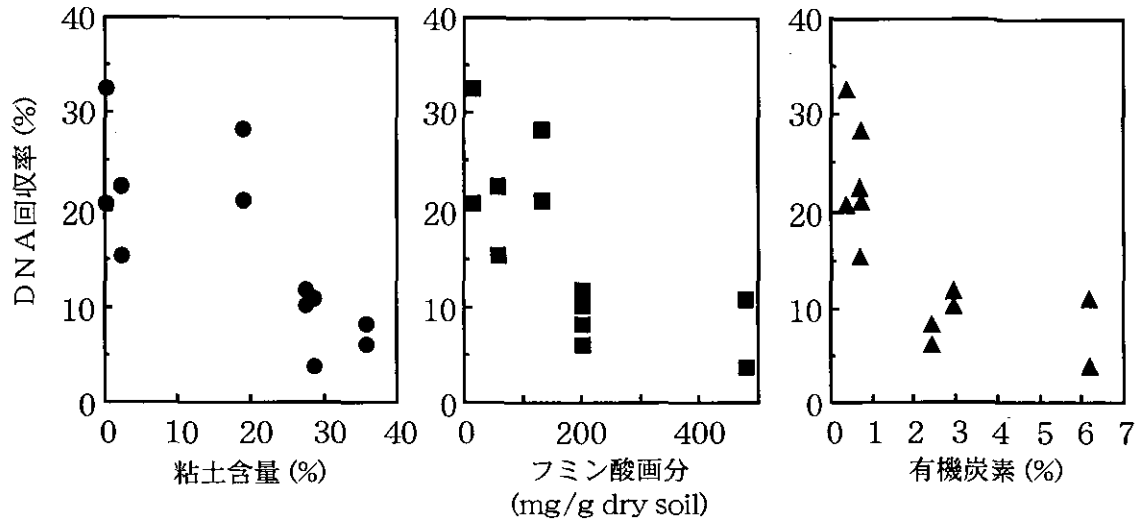


図18 各種土壌からの微生物DNA回収率と各種土性との関係

表5 各種土壌からの微生物DNAの回収率

土壌	回収DNA	
	回収量 (mg/50g dry soil)	回収率 (%)
A	38.1 ± 8.6	26.6 ± 6.0
B	27.0 ± 5.1	18.8 ± 3.6
C	35.3 ± 5.1	24.7 ± 3.6
D	10.7 ± 0.9	7.5 ± 0.7
E	15.7 ± 1.1	11.0 ± 0.8
F	10.3 ± 5.1	7.2 ± 3.5

表6 土壌からの微生物DNA回収に及ぼすフミン酸の影響

土壌	微生物DNA回収量 (ng/g dry soil)
C	706.8 ± 102.7
C フミン酸添加	4.0 ± 1.7

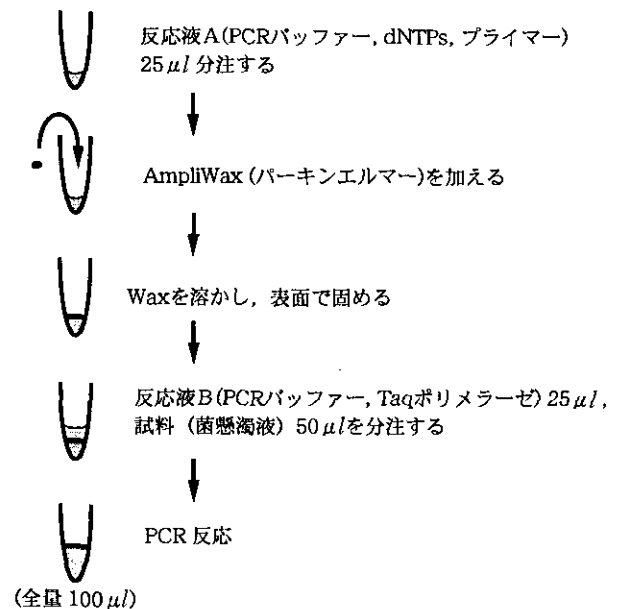


図19 水銀浄化菌の検出のための直接PCRの手順

表7 直接PCRによる水銀浄化菌検出の最適条件

項目	条件
プライマー(µM)	1.0, 2.5, <u>5.0</u> , 7.5
バッファー	pH 8.3, 8.8, <u>9.2</u>
	MgCl ₂ (mM) <u>1.5</u> , 3.5
	KCl (mM) <u>25</u> , 75
酵素	Boehringer, Promega, Stratagene, Toyobo, <u>Takara</u>

まず水銀浄化菌の検出・定量法の開発を行った。*P. putida* PpY101/pSR134の*mer*オペロンの一部を標的DNA塩基配列とし、水銀還元酵素遺伝子を特異的に増幅できるプライマーを設計した。より簡便に検出するために菌体からのDNAの抽出を行わず、直接菌体に対してPCR反応を行った。この検出法の手順及びPCRの最適条件を図19、表7に示す。図19に示した手法で*P. putida*菌体試料に対して直接PCRを行ったところ、目的のDNAが増

幅できることが確認された。次いで、酵素の種類、緩衝液、プライマー濃度等の条件検討を行った結果、反応チューブ (50 μ l) 当たり100細胞まで検出が可能であった (図20)。さらに感度を上げるため同じプライマーを用いて再度PCRを行ったところ (ダブルPCR)、検出限界は1細胞まで向上した (図21)。この手法により標的水銀浄化菌を定量するための最確値法 (MPN法) と組み

合わせたMPN-PCR法を開発した。すなわち、資料の10倍希釈系列を作成しダブルPCRを行い、標的DNAが検出されたサンプル数から試料中の水銀浄化菌数を求めた。その結果、MPN-PCR法で求めた細菌数と顕微鏡観察で計数した細胞数とは良く一致し、本法が水銀浄化の標的DNAを迅速に感度よく検出・定量できる方法であることが示された。

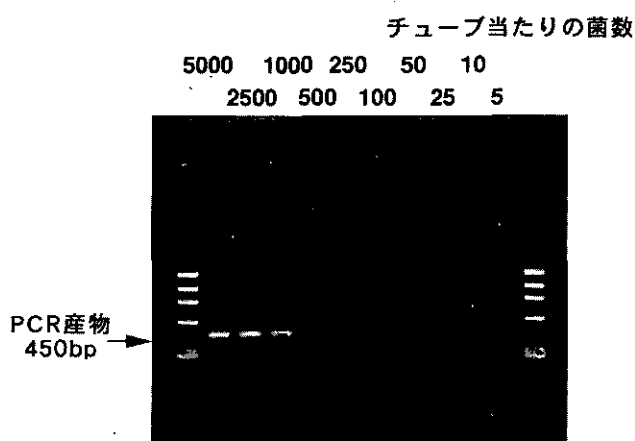


図20 直接PCRによる水銀浄化菌の検出

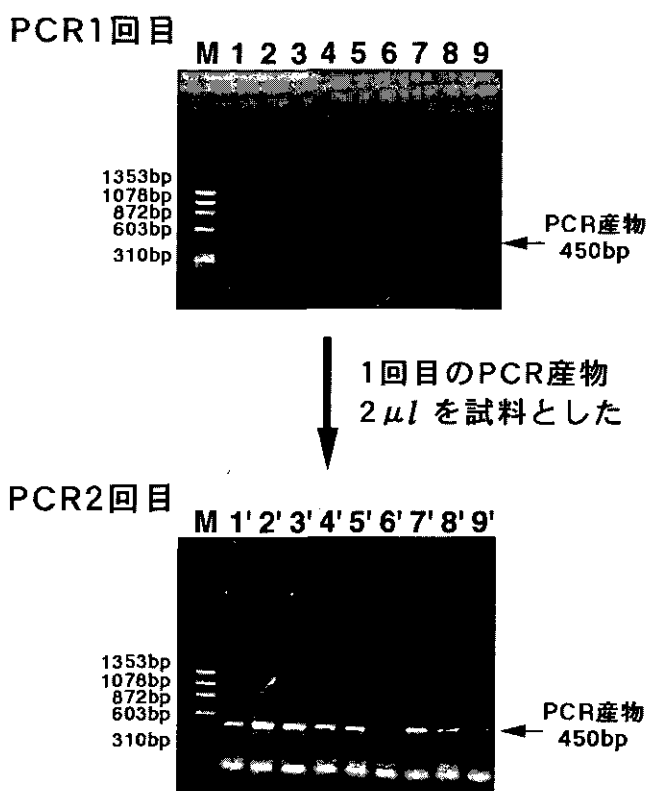


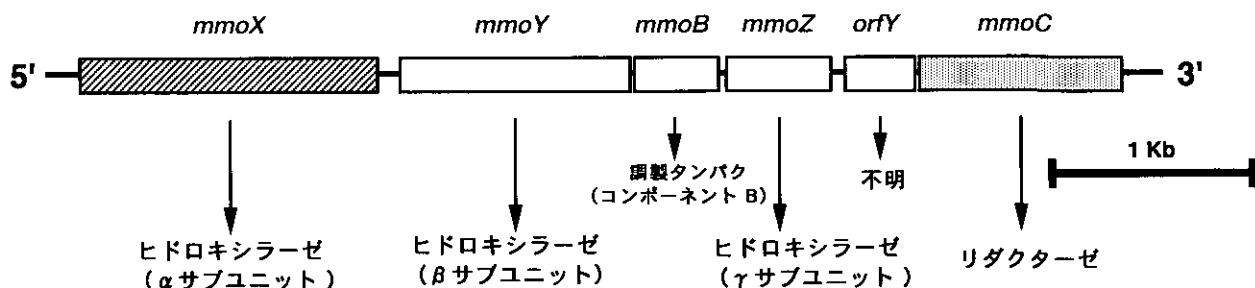
図21 ダブルPCRによる水銀浄化菌の検出

(3) PCR法による *Methylocystis* sp. M 株の検出・定量法

トリクロロエチレン分解菌 *Methylocystis* sp. M 株の検出・定量法の開発を行った。M株はメタンを基質として生育するメタン酸化性菌であり、環境中には多くのメタン酸化性菌が生息している。そこでM株のみを特異的に検出するために、M株のトリクロロエチレン分解酵素遺伝子である可溶性メタンモノオキシゲナーゼ (sMMO) 遺伝子、膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ (pMMO) 遺伝子、及び16S rDNAをクローニングし、塩基配列を解読して分類学的に近縁の細菌と比較した。この結果、M株のsMMO遺伝子群を構成する6個の遺伝子のうち、*orfY*と*mmoC*はほかのsMMO遺伝子との相同性は比較的 low、M株に特異的なオリゴマー作成に適した領域であることが示された。M株の遺伝子*mmoX*及び*mmoC*のみが増幅できるような各種プライマーを設計した (図22)。

より簡便に検出するために、微生物細胞を試料とした直接PCR法による標的DNAの増幅を試みた。M株及びほかのメタン酸化性菌に対して直接PCRを行い (図23)、プライマーの特異性を検討した (図24)。この際のPCRの最適条件を表8に示した。その結果、M株のみを特異的に検出できるプライマーの組み合わせ (CF2-CR1) を見いだした。PCR条件の最適化を行った結果、反応液当たり1000細胞まで検出可能となった (図25)。

さらにトリクロロエチレンによる地下水汚染現場からの検出を試みた。汚染地下水中のトリクロロエチレン等の揮発性有機塩素化合物は直接PCR反応を著しく阻害することが認められた (図26)。そこでこれらの阻害を解除する方法を検討した結果、汚染地下水からのM株の検出にはメンブランフィルターによるろ過処理が非常に有効であることを見だし、ろ過処理によってほぼ100%の回収率で地下水中のM株を検出できることが認められた。



プライマー	増幅断片(bp)	Tm(°C)
XF1-XR4	740	78
XF1-XR5	784	78

プライマー	増幅断片(bp)	Tm(°C)
CF2-CR1	503	68
CF2-CR2	502	68
CF3-CR1	505	68
CF3-CR2	504	68

図22 トリクロロエチレン分解菌M株の検出用プライマー

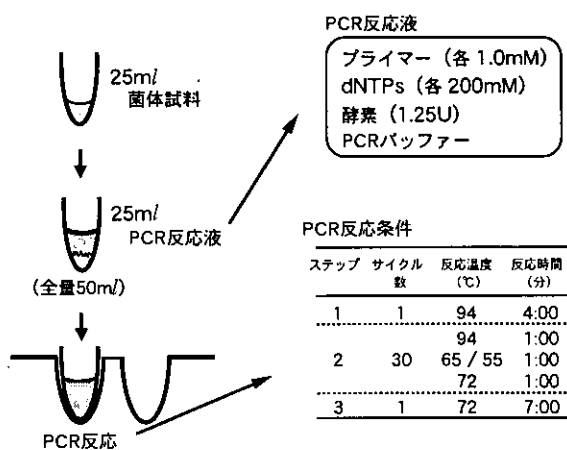


図23 M株検出のための直接PCRの手順

表8 直接PCRによるM株検出の最適条件

前処理	100°C 5分
プライマー	2.5mM
	[CF2 gAATgTCgTTCggCTTgTCCTg] [CR1 CgACgCCATTgCCCTCCgAAA]
PCRバッファー	10mM Tris-HCl pH9.2 1.5mM MgCl ₂ 25mM KCl

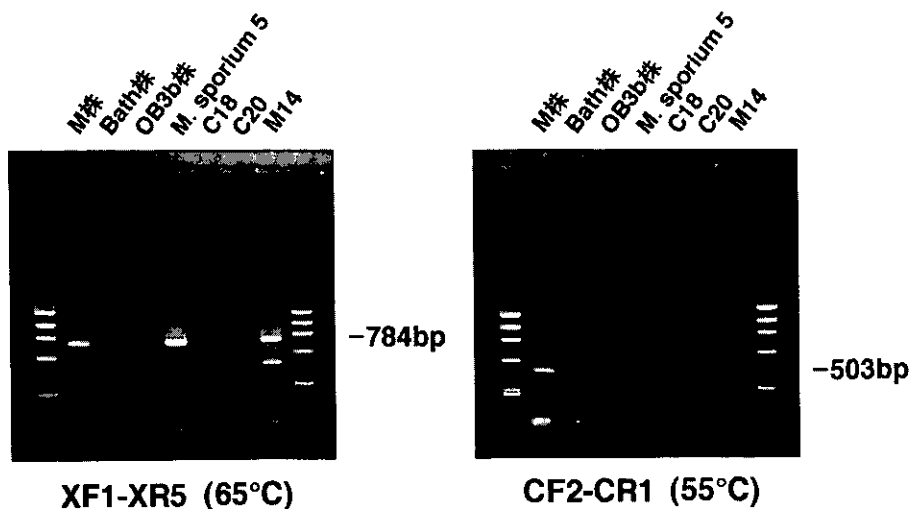


図24 M株検出用プライマーの特異性の検討

(反応チューブ当たりの細胞数)

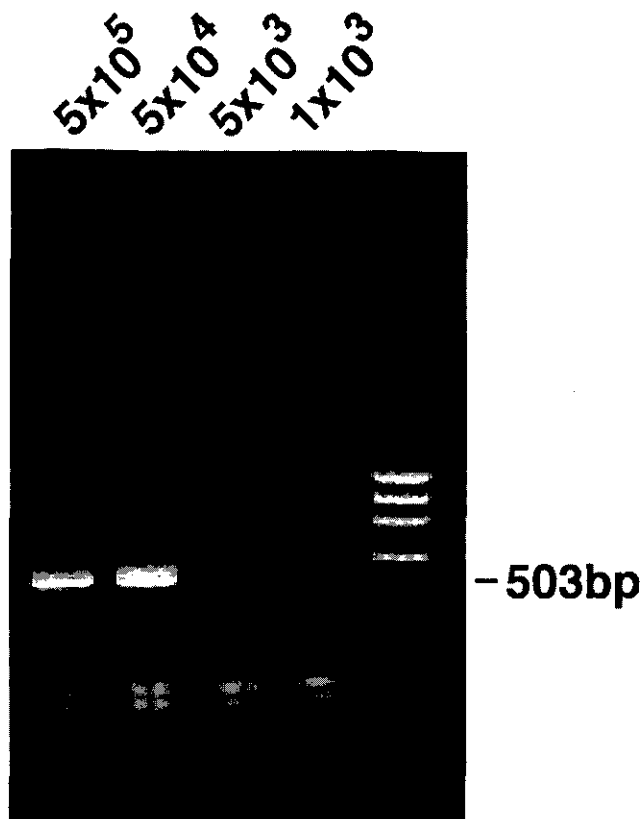


図25 直接PCR法によるM株の検出

2.2 微生物浄化機能の試験方法の開発に関する研究

2.2.1 フラスコ・カラム土壌系による浄化試験方法の開発

(1) 不飽和帯土壌系における浄化能の評価

トリクロロエチレンによる土壌汚染は、地下水のない不飽和帯と地下水のある飽和帯の汚染に分類され、それぞれ異なった浄化対策がとられている。一般に地下水が汚染した場合には、汚染物質が表層土壌よりまず不飽和帯に進入し、次いで飽和帯に達する 경우가多く、不飽和帯の浄化も重要な課題となっている。そこでまず不飽和帯土壌でのM株の浄化能について調べた。すなわち、69 mlのバイアル瓶に20gの湿土壌を添加しこれにトリクロロエチレンを55 μg 添加し、さらにM株を湿土壌1g当たり $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ 細胞数添加し25℃で静置し分解を調べた。トリクロロエチレンは揮発性のため55 μg のうち10 μg が土壌に吸着し、残りの45 μg が気相中に存在した。このため、気相中のトリクロロエチレン濃度はヘッドスペースガスクロマト法で、また土壌中の濃度はヘキサン抽出ガスクロマト法で分析し、両者の濃度の合計量から分解量を算出した。 2.5×10^7 の場合、3日間で45%分解され、 5×10^7 の場合は1日で70%が、 2.5×10^8 では95%が分解され、M株の添加は、不飽和帯土壌の浄化に有効であることが判明した

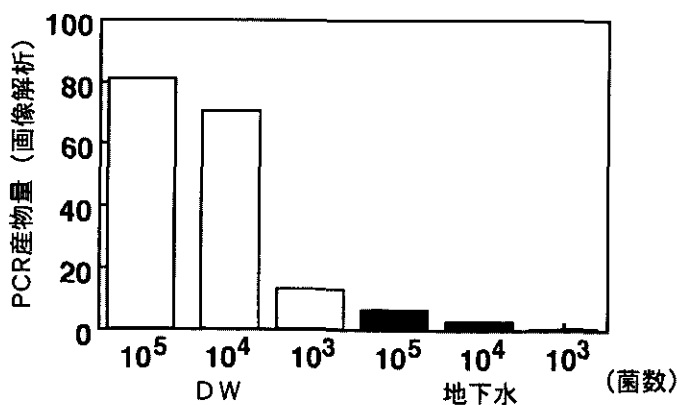
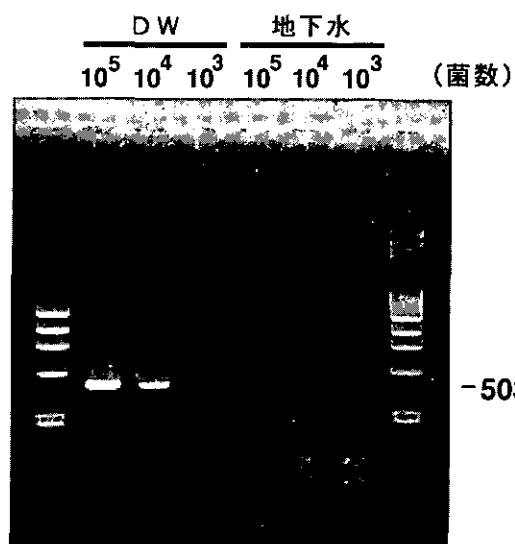


図26 直接PCRによる地下水中のM株の検出

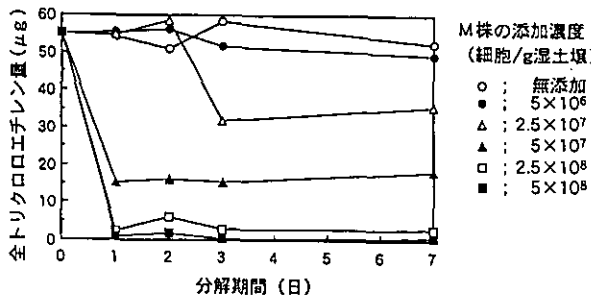


図27 不飽和帯土壌中のトリクロロエチレン分解に及ぼすM株濃度の影響

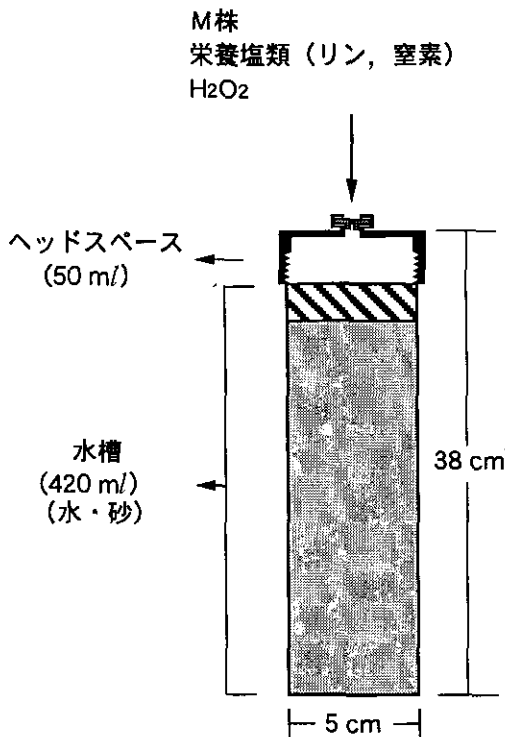


図28 土壌カラム

(図27)。またM株による分解反応は土壌中で進行するが、土壌中のトリクロロエチレンの減少につれて、気相中のトリクロロエチレンが気-固相平衡反応により土壌中に移行し、分解されることが確認された。

2) 飽和帯土壌における分解

次に地下水のある飽和帯のトリクロロエチレン分解に及ぼすM株の効果を調べた。500 ml容ガラスカラムに川砂を充てんした後、各濃度のトリクロロエチレンを添加して汚染土壌・地下水モデル系を作成した(図28)。これにM株を 2.5×10^6 及び 2.5×10^7 /mlになるよう添加し20℃でトリクロロエチレンの分解を調べた(図29)。M株が高濃度の場合、トリクロロエチレン濃度が0.2 mg/lでは1日でほぼ完全に分解され、1, 10, 20 mg/lでは、それぞれ90%, 30%, 20%以上が分解された。M株はトリクロロエチレン汚染土壌の浄化に大変有効であることが判明した。

M株のトリクロロエチレンの分解に及ぼす H_2O_2 の添加効果を調べた。M株 5×10^6 細胞/g土壌の場合に20 mg/lの H_2O_2 を添加した場合、DOの増大が認められると同時に1 mg/lのトリクロロエチレンの分解が促進された(図30)。

トリクロロエチレンの分解が1日で停止することから、完全分解を目指しM株の繰り返し添加効果を調べた。トリクロロエチレン1 mg/lに、M株 5×10^6 細胞/g土壌を繰り返し添加したところ、2回の添加で95%以上の分解が認められ、繰り返し添加効果が確認された(図31)。

さらに、内径3 cm、長さ40 cm、内容量280 mlのステンレス製カラムに汚染土壌を充てんし(図32)、TCE 1

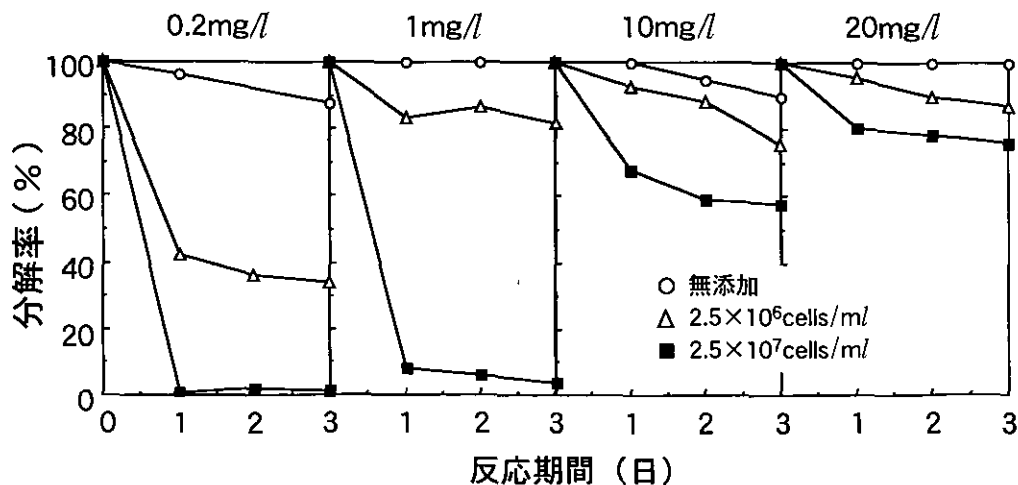


図29 TCE分解に及ぼすTCE濃度とM株濃度の影響

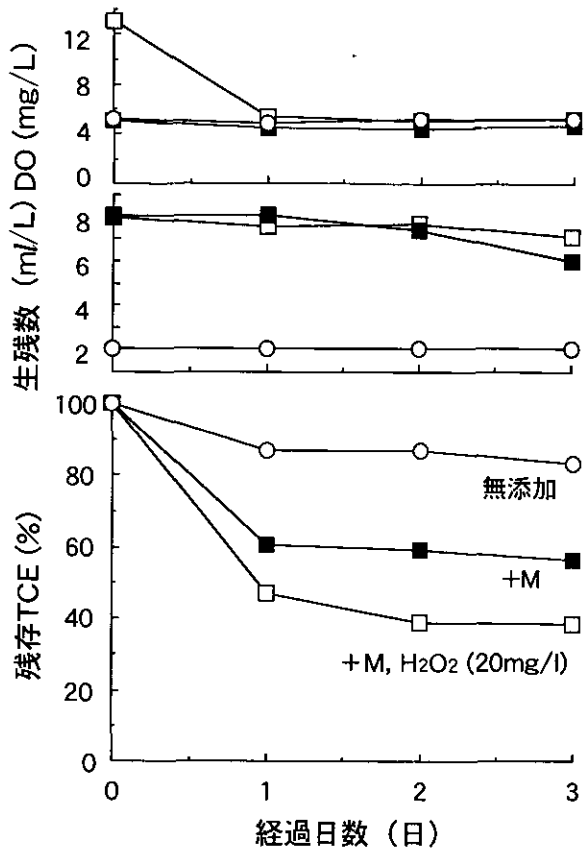


図30 トリクロロエチレンの分解に及ぼす過酸化水素の効果

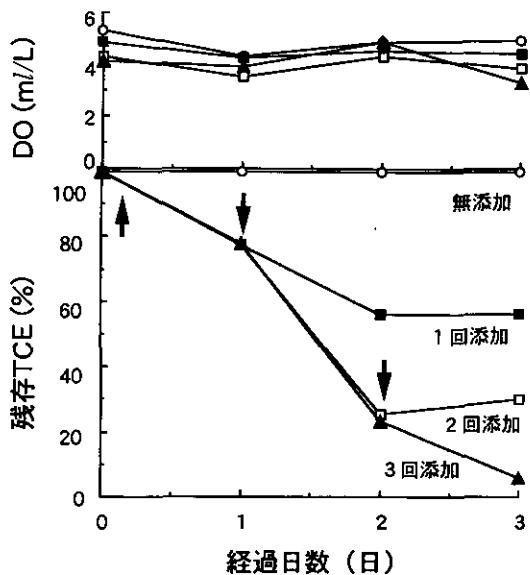


図31 トリクロロエチレンの分解に及ぼすM株の繰り返し添加効果

mg/lに調整した現場地下水を下部より通水し、流出水のTCE濃度が一定になった後に、M株 1.4×10^9 、 2.8×10^9 、 2.8×10^{10} cellsをそれぞれのカラムに接種し、メタン、酸素、窒素、リン、TCEを添加した地下水を70 ml/dayの流

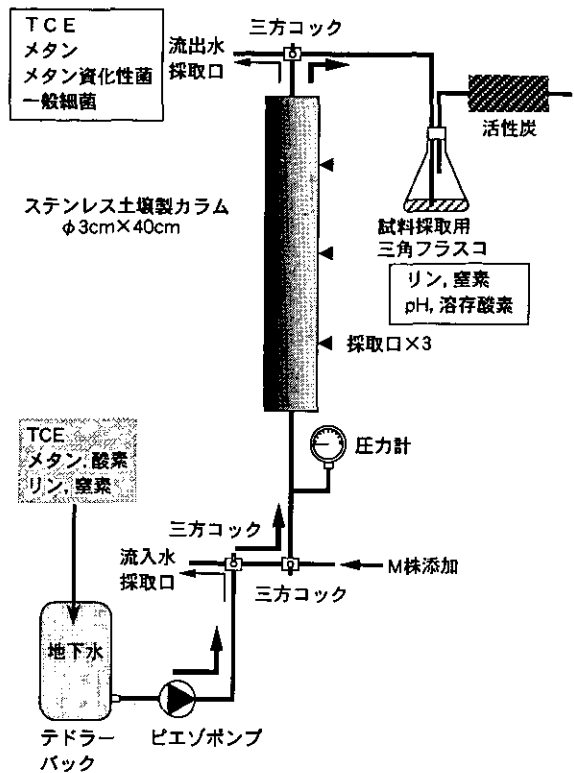


図32 カラム実験方法

速で通水し、流入・流出水のTCE、メタン、メタン酸化性菌数の測定を行った。TCEはM株を添加した系で2日目から分解が認められM株の添加量の増大によりTCE分解量は増大した。16日目で 2.8×10^9 cellsのとき40%の除去率が得られ、現場への適応性が示唆された(図33)。

(3) 生態系への評価

同時に図32に示したカラムを用いて、バイオレメディエーション技術の生態系へ影響評価を行った。M株をカラム当たり 5×10^6 cells/mlになるように添加し、表9に示す条件で地下水を通水し、流入水及び流出水中の窒素及びリン濃度(図34)、一般細菌数(図35)、pH、メタン濃度(図36)、DOそしてM株数を測定した。メタン、酸素、窒素、リンにM株を添加した系は、M株を添加しない系と比較して著しく高いメタンの消費が認められ、流出水中のM株濃度は 10^4 cells/mlのオーダーであった。M株添加による流出水中へのpH、DO、一般細菌への影響は認められなかった(図37)。

(4) 浄化微生物の生残・増殖性

1) 土壌の種類の影響

接種微生物の土壌中での生残、増殖に及ぼす要因について検討を加えた。すなわち土壌に接種した*P. putida*

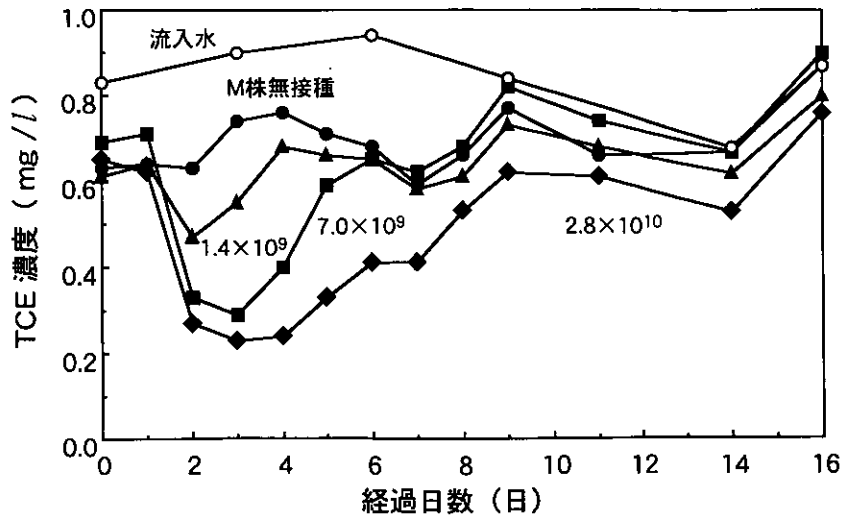


図33 流入・流出水中のTCE濃度変化

表9 カラムシミュレーター実験条件

	カラム1	カラム2	カラム3	カラム4
	対照	M株接種	栄養添加	M株接種 栄養添加
M株 (細胞数)	-	1.4×10^9	-	1.4×10^9
NH ₄ -N (mg-N/l)	-	-	10	10
PO ₄ -P	-	-	50	50
メタン	-	-	添加	添加
酸素	-	-	添加	添加
TCE (mg/l)	1	1	1	1
流速 (ml/day)	140	140	140	140

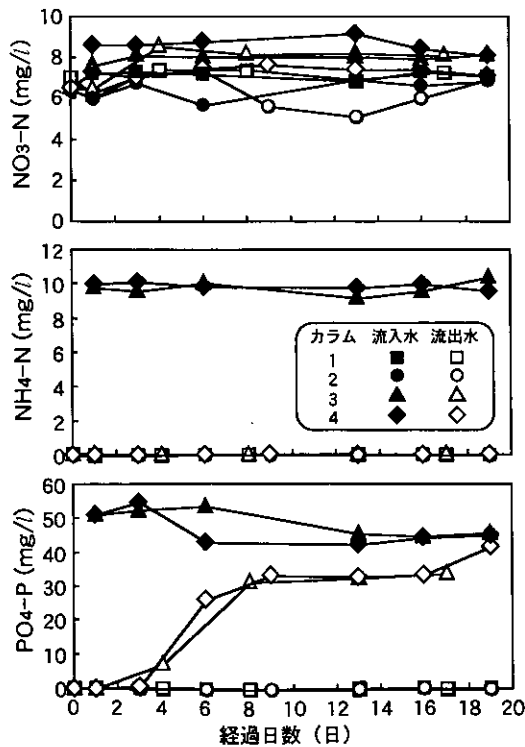


図34 流入・流出水中のリンおよび窒素濃度の変化

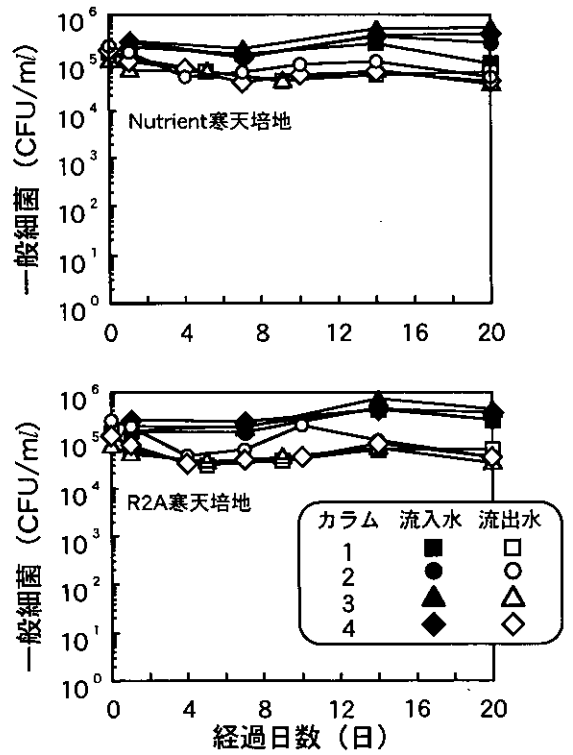


図35 流入・流出水中の一般細菌数の変化

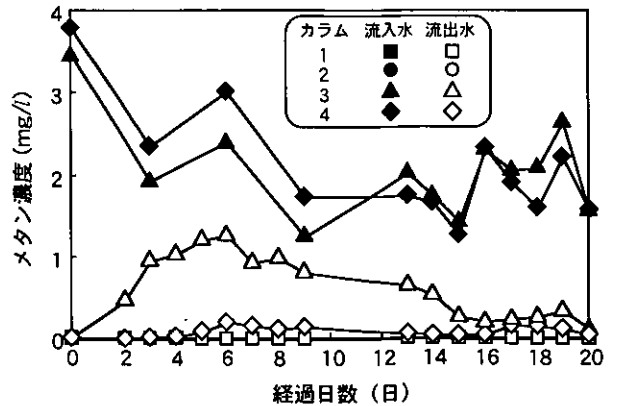


図36 流入・流出水中のメタン濃度の変化

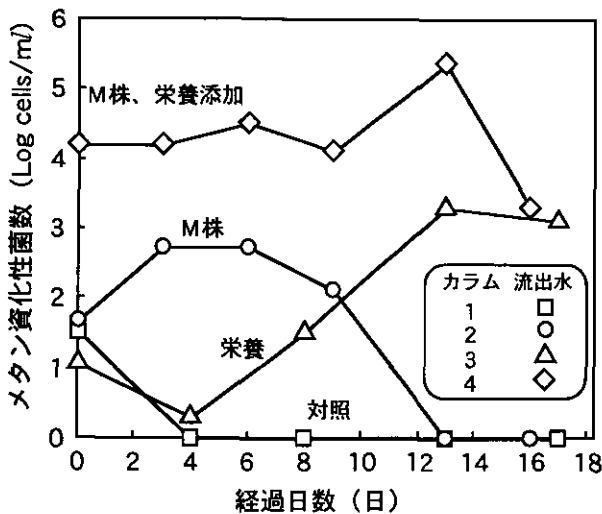


図37 流出水中のメタン産生性菌数の変化

PpY101/pSR134の生残数の変化を6種類の土壌で調べた。土壌の性質を表10に示した。その結果、pHの低い火山灰土1, 2, 砂質土2で菌数は大きく減少した。土壌に消石灰を加えて、土壌pHが約7になるように補正した場合、いずれの土壌でも生残性が良くなった。特に、pHの低い火山灰土などで生残性が大きく高まり、土壌間差も小さくなった(図38)。

2) pHの影響

土壌pHと接種した*P. putida*の生残との関係を明らかにするために、2種類の土壌を用いて調べた。 $10^6 \sim 10^7/g$ を土壌添加した場合、火山灰土の場合、接種した*P.*

*putida*の菌数は、pH 6.4以下の土壌では時間の経過とともに減少した。特に、pHが低い土壌ほど菌数は早めに減少し、pH 4.2では1日後に検出限界である $10^2/g$ 以下に減少した。一方、pH 7以上の土壌では、1日後に 10^8 ぐらまで増加し、その後4週目まで菌数はほとんど変化しなかった(図39)。砂質土でも、土壌pHと*P. putida*の生残数との関係は火山灰土と同じような傾向にあった。火山灰土と砂質土のデータを合わせて、土壌pHと*P. putida*接種後1週目の生残数との関係を見ると、pH約7.5に極大をもつ2次曲線で近似できた(図40)。

土壌に接種する*P. putida*の生残性を高めるため、資材に吸着させて土壌に添加する方法を試みた。その結果、バーミキュライトやカオリンなどの粘土に菌を吸着させて、土壌に接種すると生残性が高まることが認められた。

3) 土壌中における微生物の局在性

山口県農業試験場の水田ほ場の無窒素肥料区・化学肥料区・堆肥多量区から採取した3種類の土壌にBHC分解菌を細毛管孔隙(平均直径: $0.19 \sim 3 \mu m$, 毛管水の分布部位)、粗毛管孔隙(平均直径: $3 \sim 48 \mu m$, 毛管重力水の分布部位)に入るような方法で添加し、経時的に土壌中のBHC分解菌を計数し、その生残性を調べた。BHC分解菌の生残性はいずれの処理区においても、細毛管孔隙の方が粗毛管孔隙よりも高い傾向があり、特に無窒素区でこの傾向が顕著であった。その生残性は、投与肥料の種類によって異なっており、両孔隙ともに無窒素区で

表10 供試土壌の性質

		pH	T-C (%)	T-N (%)	砂 (%)	シルト (%)	粘土 (%)	CEC (meq/100g)
砂質土	1	6.6	0.07	0.01	99.7	0.1	0.2	3.2
砂質土	2	5.9	0.48	0.05	96.4	1.3	2.2	4.4
沖積土	1	6.2	0.51	0.06	44.6	36.4	19.0	12.1
沖積土	2	6.1	2.69	0.24	19.9	44.2	35.9	27.9
火山灰土	1	5.9	3.17	0.26	36.3	36.1	27.6	19.0
火山灰土	2	5.2	7.20	0.48	40.1	31.2	28.7	29.4

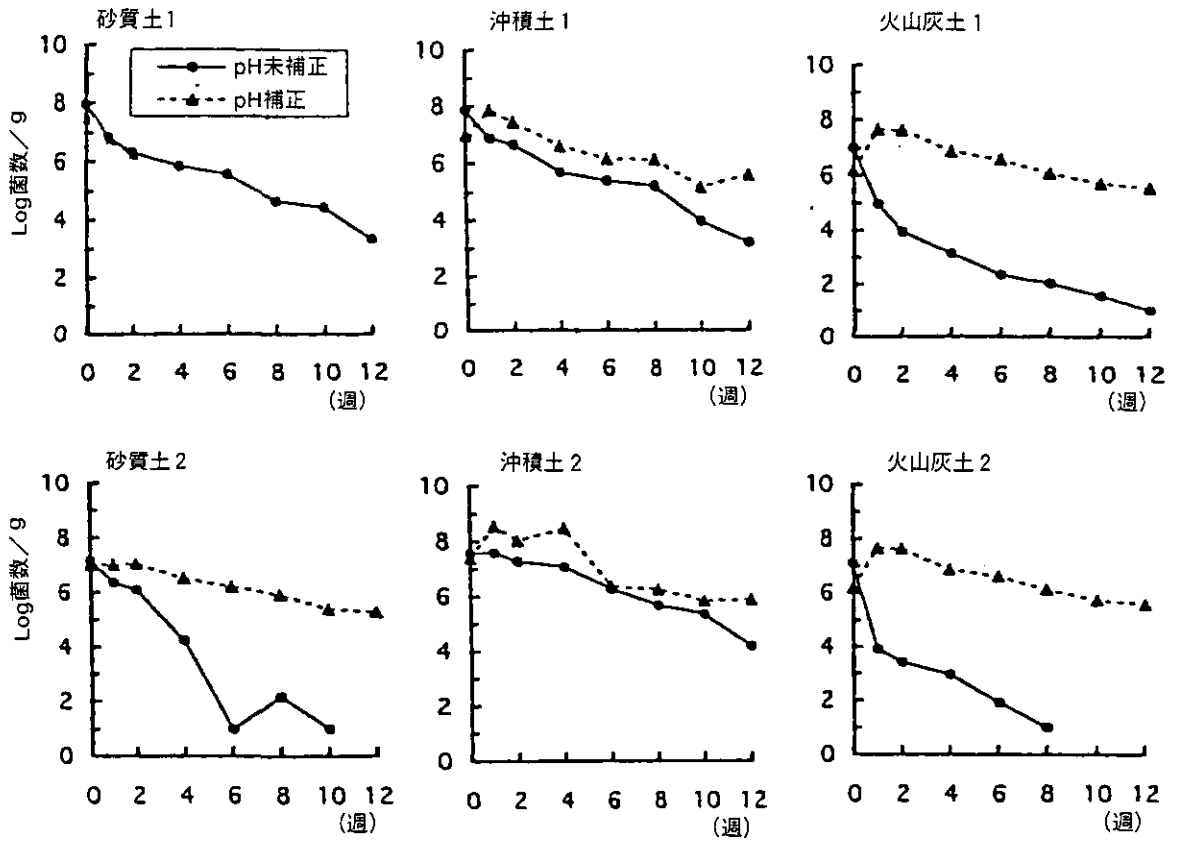


図38 各種土壤中での*P. putida*数の変化

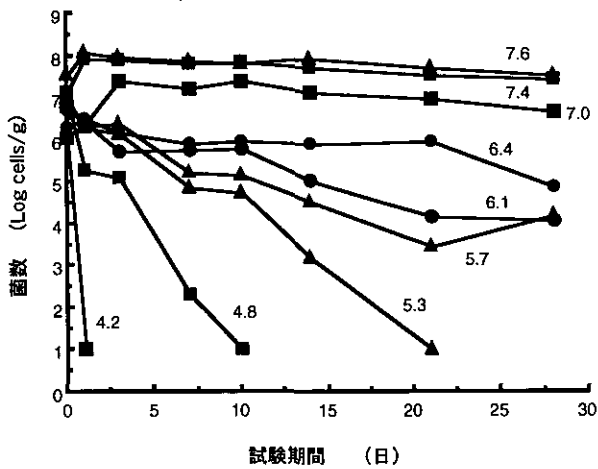


図39 火山灰における各種pHでの*P. putida*数の変化

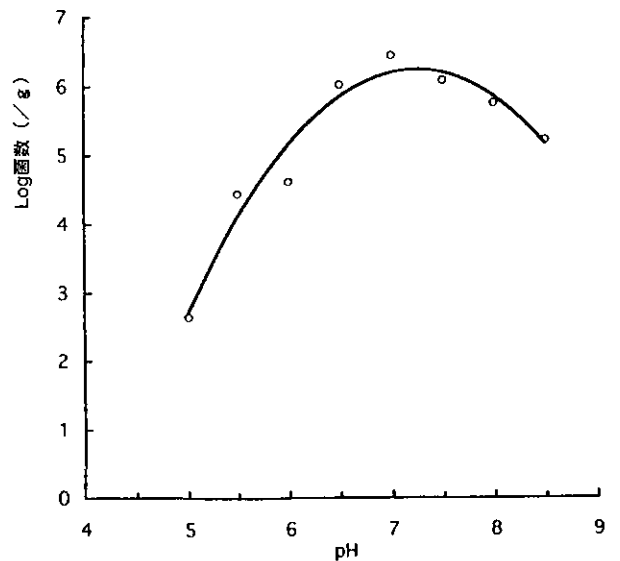


図40 pHと1週後の菌数との関係

最も高く、以下堆肥多量区、化学肥料区の順に低下した(図41)。

以上の事実は、細毛管孔隙の方が粗毛管孔隙よりもBHC分解菌の生残に好適な土壌部位であること、及びその生残性が投与肥料の種類によって少なからぬ影響を受

けることを示している。また、原生動物等の捕食者が細毛管孔隙には入ることができない大きさであることから、細毛管孔隙に添加されたBHC分解菌はその捕食を免れていることが推測された。

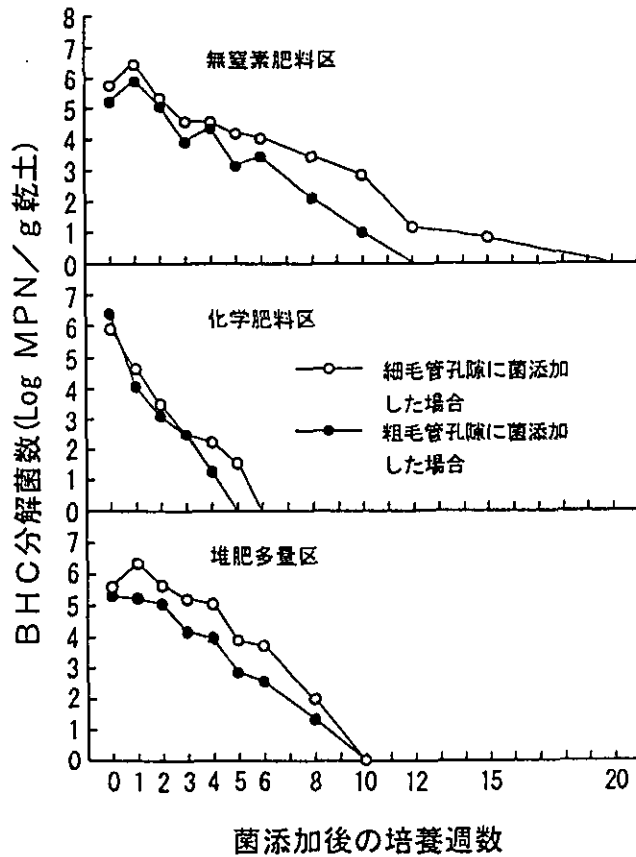


図41 土壌の2種類の毛管孔隙に添加したBHC分解菌の生残性およびそれに及ぼす施肥来歴の影響
—オートクレーブ未処理土壌の場合—

2.2.2 土壌・地下水シミュレーターによる浄化機能の試験方法の開発

土壌シミュレーターを用いて、土壌中におけるM株の挙動及び生態系への影響を検討した。屋内ライシメーター (60W×45D×50Hcm)、屋外ライシメーター (80W×57D×50Hcm) に黒ボク土壌を充てんし、表層から10cmまでの土壌が約 10^8 cells/g乾土になるようM株を添加した(図42)。0~10、10~30cmの深さの土壌試料を採取し、M株を計数した。また、表層土壌について、一般細菌、

グラム陰性菌、糸状菌を計数するとともに、呼吸活性及び各種土壌酵素活性を測定した。さらに、水分含量、pH、全炭素、全窒素を測定した。M株接種による土壌中の水分含量、pH、全炭素、全窒素への影響はほとんど認められなかった(図43)。

接種したM株では、表層では、7日後に $1/5 \sim 1/10$ に減少したが、7日目以後は 10^7 /g乾土のオーダーで一定となった。10~30cmの深さには、28日後に $10^2 \sim 10^4$ /g乾土が検出された。M株は比較的土壌中での生残性

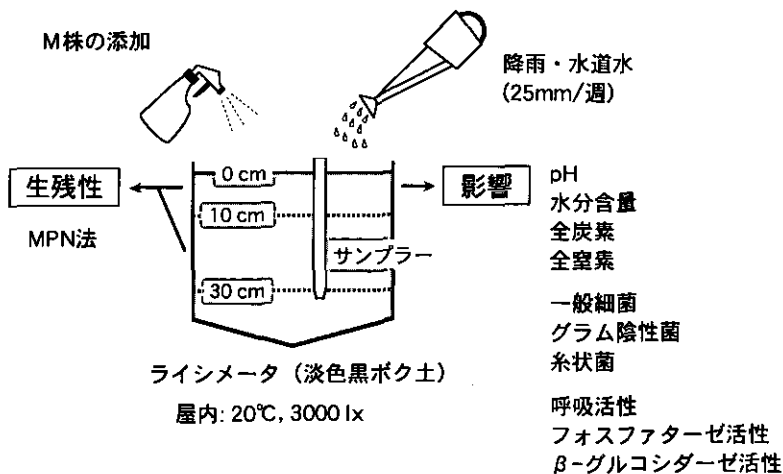


図42 土壌ライシメーターにおけるM株の生残性と環境影響試験

が高い微生物であると考えられた (図44)。

土壌微生物数の変動を測定した結果、一般細菌は $10^6 \sim 10^7$ 、グラム陰性菌は $10^4 \sim 10^5$ 、糸状菌は $10^4/g$ 乾土のオーダーで検出され、M株の接種による影響及び屋内外の相違は認められなかった (図45)。また、呼吸活性に及ぼすM株の添加の影響はほとんど認められなかったが、フォスファターゼ活性、グルコシダーゼ活性においてM株添加により活性の一時的な増大が認められた (図46)。

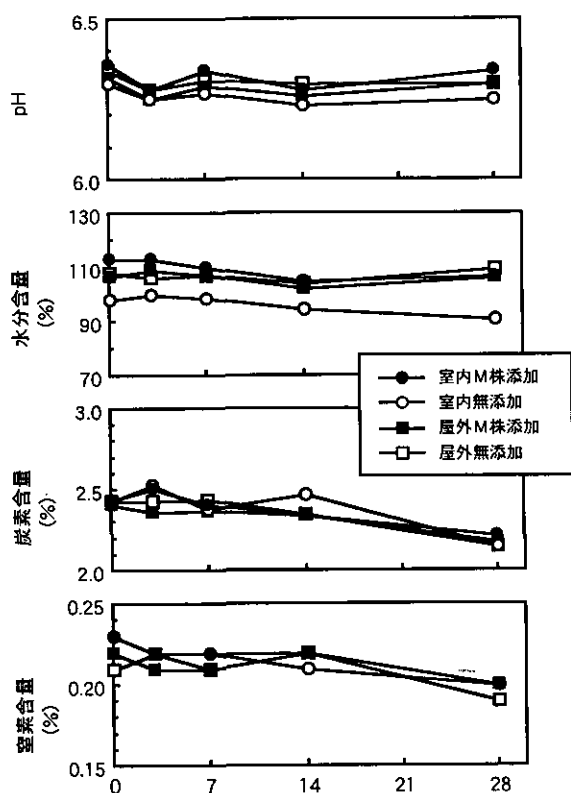


図43 ライシメーターにおけるM株のpH, 水分含量, 炭素含量および窒素含量に及ぼす影響

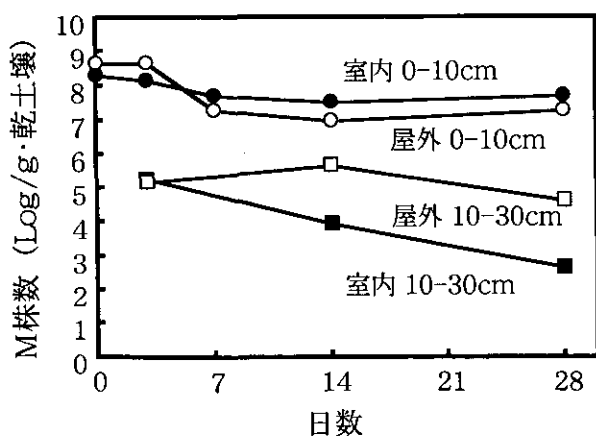


図44 土壌ライシメーターにおける *Methylocystis* sp. Mの生存性

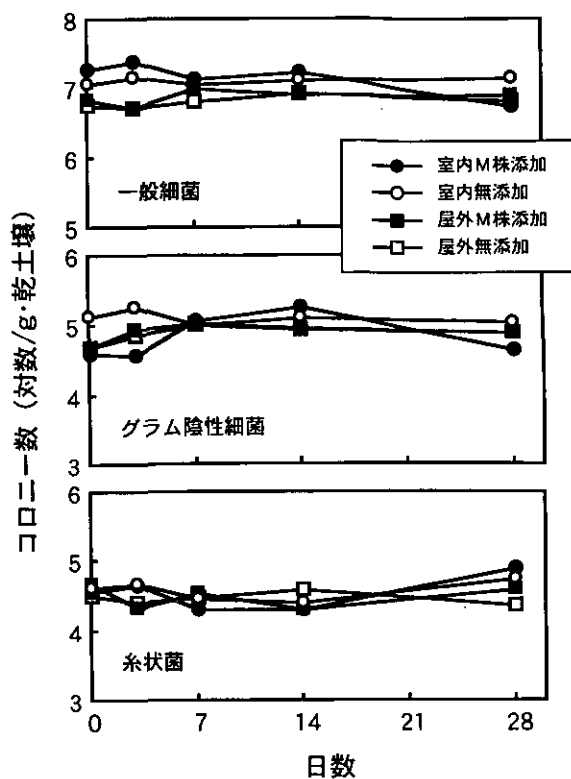


図45 ライシメーターにおけるM株の土壌微生物に及ぼす影響

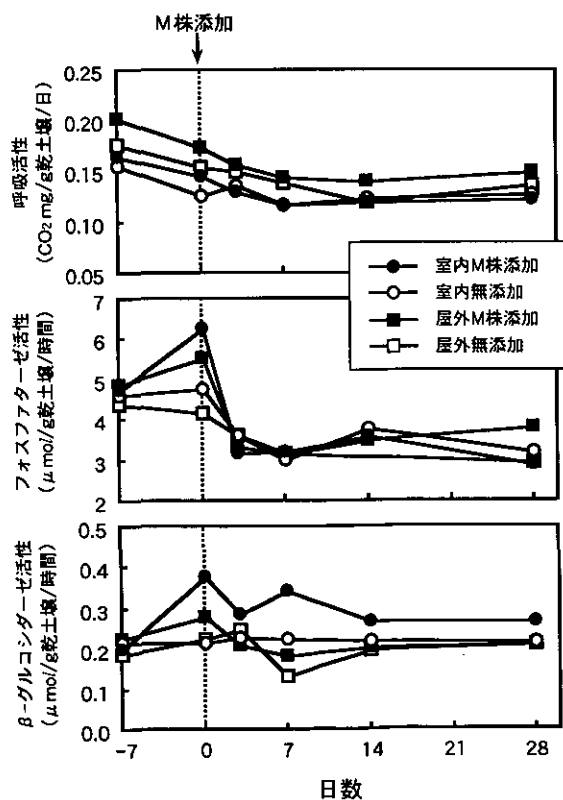


図46 ライシメーターにおけるM株の土壌呼吸活性および酵素活性に及ぼす影響

2.2.3 バイオリアクターによる浄化機能の試験方法の開発

(1) 水銀の浄化

水銀汚染の浄化に関しては水銀を不溶化する方法も考えられるが、ここでは汚染現場から除去するため水銀を気化して回収する方法の可能性を検討した。

大腸菌のプラスミドNR1由来の水銀還元酵素遺伝子群 (*mer* オペロン) を組み込んだ組換え微生物 *P. putida* PpY101/pSR134 (図47) を用いて水銀除去実験を行った。本菌株はチオールが存在下で水銀イオン (Hg^{2+}) を金属水銀 (Hg^0) に還元気化する能力を有しており、反応系から無期水銀を除去することが可能である。まず、本菌株の増殖培養系における水銀除去特性を検討した。培養液中から除去される金属水銀は揮発性であるため密閉できる155 ml容バイアルビンを用いて水銀除去試験を行った (図48)。各濃度の塩化第二水銀を添加した10 mlの栄養培地に本菌株を接種し、振とう培養を行った。培養液を遠心分離し、得られた上清中の水銀濃度を定量して増殖に伴う水銀除去特性を経時的に調べた。本菌株による増殖培地からの水銀除去反応においては、チオールを必要としなかった。これは栄養培地中にはチオールの役割をするアミノ酸等の有機物が豊富に含まれているためであると考えられた。本菌株は、100 mg/lの塩化第二水銀を含む培地中でも増殖が可能であり、また28時間でほぼすべての水銀を培地中から除去でき、非常に高い水銀除去能を有していることが示された (図49)。

次いで、気化した金属水銀を強制的に系外に排除するための通気システム及び排出された空気中の金属水銀の

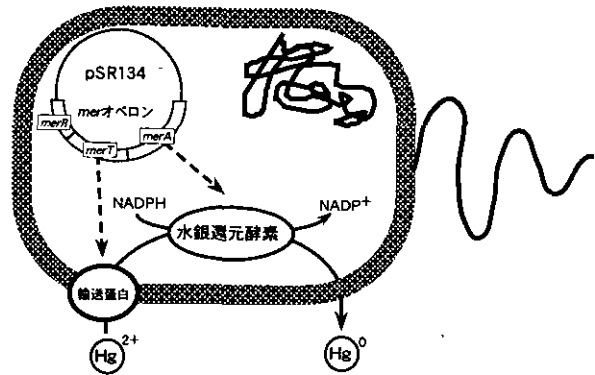


図47 組換え微生物 *Pseudomonas putida* PpY101/pSR134

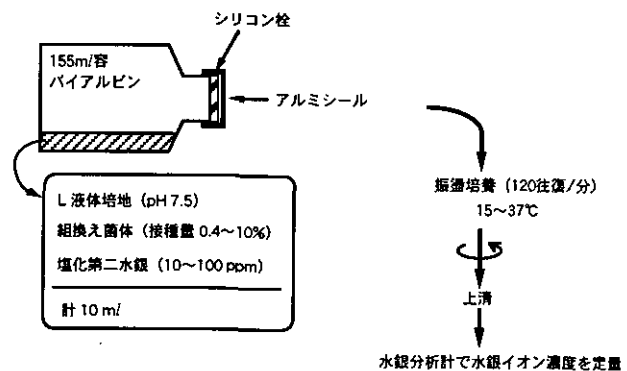


図48 増殖系における塩化第二水銀の分解除去実験

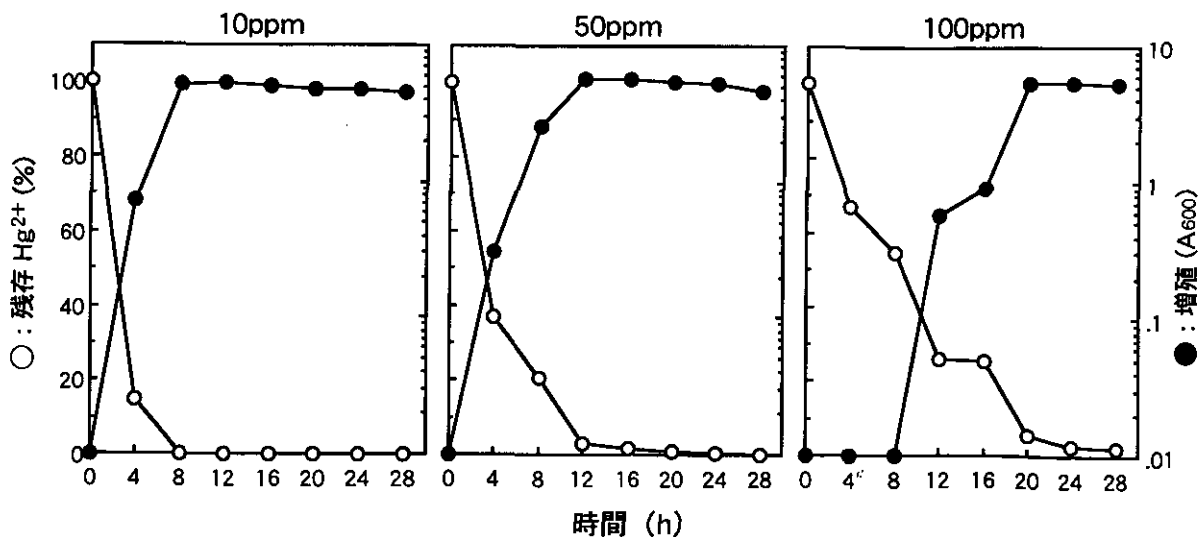


図49 水銀除去に及ぼす初発水銀濃度の影響 (接種量2%)

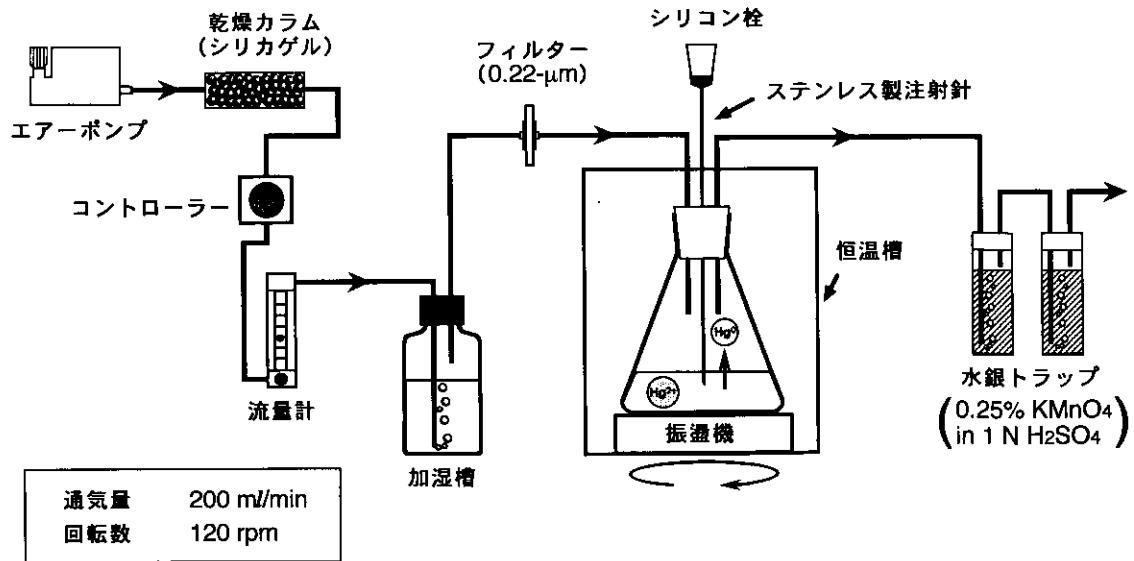


図50 水銀除去バイオリアクター

回収装置を備えたバイオリアクターを設計した (図50)。還元化された金属水銀はエアークンプレッサーから送り出された空気によって強制的に反応フラスコから排出され硫酸過マンガン酸カリ溶液の水銀トラップ中に捕集される。上記のリアクターを用いて水銀浄化菌 *P. putida* PpY101/pSR134 によるリン酸緩衝液からの水銀除去実験を行った。水銀除去反応を行う 500 ml 容三角フラスコにリン酸緩衝液、チオール及び洗浄菌体を加え全量を 200 ml とした。通気量を 200 ml/min とし、120 rpm の振とう条件で反応を行った。増殖を伴わない休止菌体による水銀除去反応にはチオールの添加が必須であることが示された。上記の反応条件で、水銀除去に影響を及ぼすと考えられるチオールの種類・濃度、反応温度、pH、菌体濃度についての検討を行った。三角フラスコにとりつけたステンレス製注射針から経時的にサンプリングを行い、遠心分離して得られた上清中の水銀濃度を定量した。また反応終了後に水銀トラップ中に捕集された金属水銀量の定量も行った。リアクターから除去され水銀トラップ中に捕集された水銀量とリアクター内に残存する水銀量及び反応前に添加した水銀量を定量した結果、この水銀除去リアクター装置は反応液から除去された水銀が 100% 回収でき、水銀の収支がとれる有効なシステムであることを確認した。

水銀除去の最適条件は、5 mM のチオグリコール酸ナトリウム、30℃、pH 7.0、反応液 1 l 当たり菌体 0.5 g (乾燥重量) であり、このとき 40 ppm の塩化第二水銀が 24

時間で完全に緩衝液から除去された。

さらに、自然水中からの水銀除去試験を行った。水銀を添加した河川水、海水からこのシステムを用いて水銀除去を試みたところ、河川水からは約 45%、海水からは約 90% の除去が認められた (図51)。ろ過河川水からは約 90% 以上の水銀が除去されたことから、自然水中のほかの生物との相互作用あるいは懸濁物質により水銀除去が妨害されることが示唆された。さらに、土壌スラリー中からの水銀除去を試みた結果、添加した水銀の約 20% を除去するにとどまり、土壌粒子に吸着した水銀を遊離させることが重要であることが認められた。

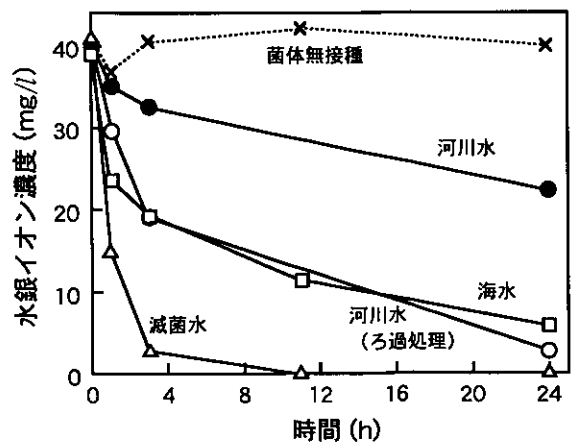


図51 自然水中からの水銀除去

(2) トリクロロエチレンの分解

アルギン酸ゲルで固定化したM株を充てんしてTCEを連続的に分解する上向流式20L容バイオリアクターを作成し、その分解特性を評価した。運転開始より約2週間は流入1mg/lトリクロロエチレンの80~90%が分解されたが、それ以降徐々に分解活性は低下し、メタン添加の賦活化操作を行っても回復しなかった。これより、定常的分解運転の継続化には、反応槽と賦活槽の分離、遊離菌体の利用等が示唆された。

2.2.4 バイオレメディエーション技術のリスク評価 手法の開発

バイオテクノロジーのガイドラインとしてOECDより1997年に*Pseudomonas*の環境利用における考慮事項が発表された。表11に示すように利用微生物の一般的性質、人への影響、環境及び農業への影響が骨子となっている。また通産省より野外における組換え微生物の工業化利用のガイドラインが1998年5月に、環境庁より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のガイドラインが1999年3月に作成された。環境庁から出された

表11 環境利用の際の考慮事項

I. 一般的性質
分類, 同定, 分離源, 培養
1. 分類学的位置
2. 同定法
3. 増殖形態
4. 増殖特性, 生残, 増殖, 伝播
5. 模擬環境中での挙動, マイクロコズム等
6. 使用経験 (環境利用, データの集積)
微生物の遺伝的特性
7. 遺伝子の性質 (プラスミドの有無, 挿入配列), 安定性
8. 遺伝子の伝達
II. 人への影響
微生物の性質
9. 病原性
10. 伝染性
11. 感染量
12. 宿主域, 変化
13. 生息域
14. 人体外での生残性
15. 伝播の方法
16. 生物学的安定性
17. 抗生物質耐性
18. 毒性
19. アレルギー性
20. 予防と治療法
III. 環境及び農業的考察
生体学的特性
21. 分布と地域特性分布, 気候上の特性
22. 環境中の物質循環への重要な弊害 生物地球化学的サイクル (窒素の代謝) 毒性物質の生成 (分解生成物)
23. 病原性, 宿主域, 感染
24. 他の生物との相互作用
25. 生残性, 孢子
26. 伝播方法, 物理的 (降雨), 生物的 (ペン毛)
環境利用
27. 封じ込め, 汚染の解消 (殺菌剤, 自殺遺伝子)
28. 検出法, 特異性, 感度, 再現性

ガイドラインのフローを図52に示す。すなわち適用現場の汚染調査，利用微生物の一般的性質，人に与える影響，生態系に与える影響を調べた上で，室内模擬実験を

行い，これらの基礎データを基に現場試験計画を立て，影響評価を予測した上で現場試験を実施する。この試験で得られたデータを基に現場への適用が可能になる。パ

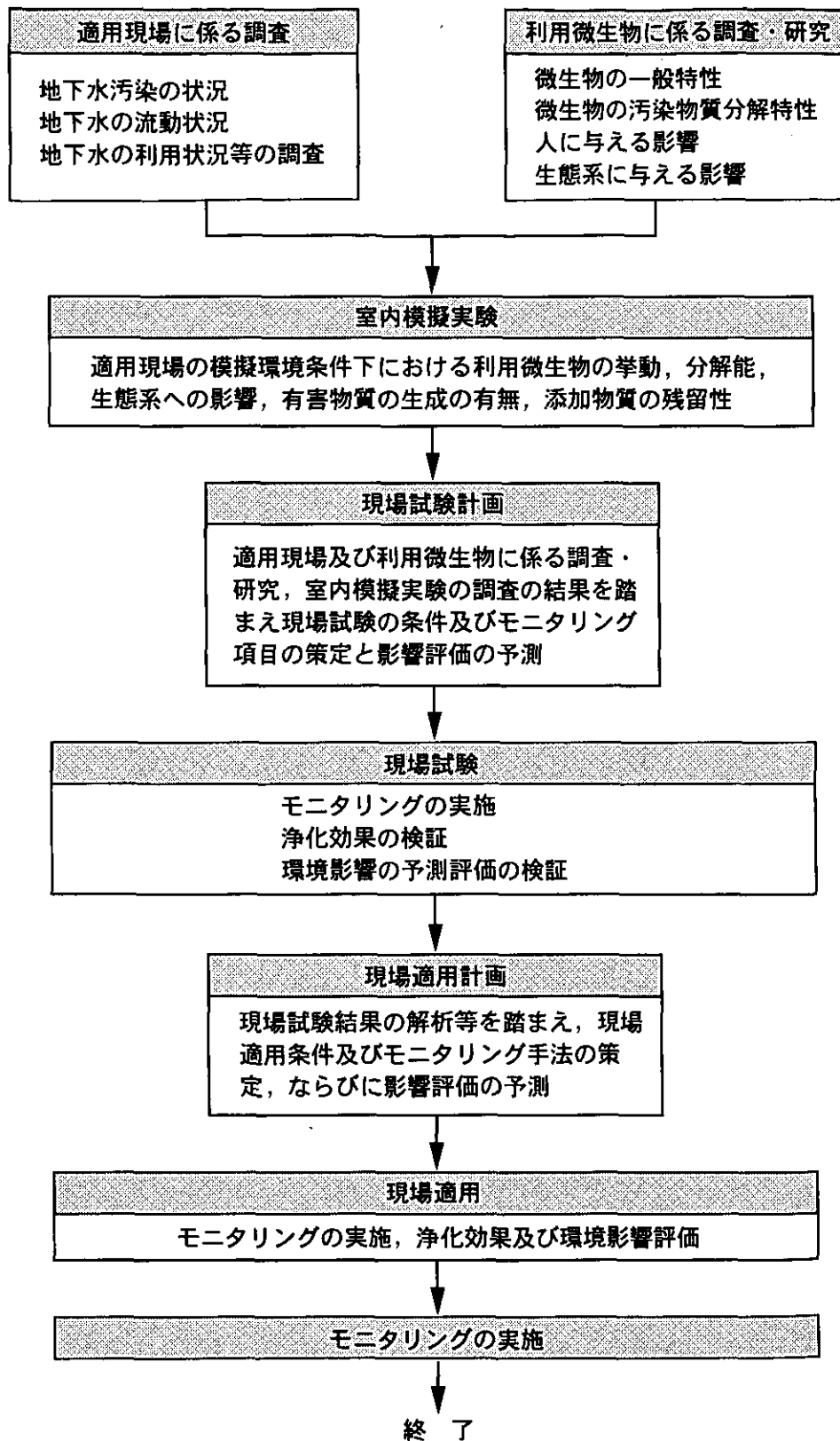


図52 環境影響評価に必要な項目と調査等の流れ

バイオレメディエーションのリスク評価のポイントを表11に示したが、本研究の成果が環境庁のバイオレメディエーションのガイドラインの作成に大いに寄与したものと考えている。現在つくられている環境庁のガイドラインは、地下水汚染に単一の微生物を使用する場合のガイドラインであり、すべてのバイオレメディエーションに適

応できない。不飽和土壌の浄化、河川、湖沼の浄化へは別の考え方を加える必要がある。

今後、バイオレメディエーション技術適用に対する十分な生態系影響評価の実施及び社会的受容（パブリックアクセプタンス）を得た上で、実際の汚染現場で実施していきたいと考えている。

[資 料]

I 研究の組織と研究課題の構成

1 研究の組織

[A 研究担当者]

地域環境研究グループ

統括研究官	森田昌敏
上席研究官	兜 眞徳
新生物評価研究チーム	矢木修身・中嶋信美・岩崎一弘
水圏環境部	
水環境質研究室	内山裕夫・富岡典子
土壌環境研究室	向井 哲・服部浩之

[B 客員研究員]

五十嵐泰夫	(東京大学大学院)	(平成8～10年度)
魚住 武司	(東京大学)	(平成8～9年度)
和泉 好計	(鳥取大学)	(平成9～10年度)
岡田 光正	(東邦大学)	(平成10年度)
大竹 久夫	(広島大学)	(平成8～10年度)
小沢 秀明	(長野県衛生公害研究所)	(平成9年度)
川澄 俊之	(日本女子大学)	(平成8～9年度)
神戸 敏明	(筑波大学)	(平成8～10年度)
日下部 功	(筑波大学)	(平成8～10年度)
国府田悦男	(筑波大学)	(平成8～10年度)
児玉 徹	(信州大学)	(平成8～10年度)
榎原 靖	(名古屋市環境科学研究所)	(平成8～10年度)
祥雲 弘文	(筑波大学)	(平成8～10年度)
杉崎善治郎	(東京理科大学)	(平成8～10年度)
瀬戸 裕之	(東京理科大学)	(平成8～10年度)
高村 義親	(茨城大学)	(平成8～10年度)
田中 秀夫	(筑波大学)	(平成8～10年度)
中嶋 睦安	(日本大学)	(平成8～10年度)
南條 吉之	(鳥取県衛生研究所)	(平成8～10年度)
西原 宏史	(茨城大学)	(平成8～10年度)
西村 行正	(東京理科大学)	(平成8～10年度)
東 照雄	(筑波大学)	(平成10年度)
平田 強	(麻布大学)	(平成9～10年度)
藤井 貫明	(千葉大学)	(平成8～9年度)
福田 雅夫	(長岡技術科学大学)	(平成8～10年度)
古川 謙介	(九州大学)	(平成8～10年度)
芳生 秀光	(摂南大学)	(平成10年度)

村上 和雄	(東京家政大学)	(平成9年度)
矢崎 仁也	(日本大学)	(平成8～10年度)

[B 共同研究員]

橋本 学	(東和科学)	(平成8年度)
久保田克之	(東和科学)	(平成8～10年度)
今野 聡	(浅野工事)	(平成8～10年度)
大橋 貴志	(浅野工事)	(平成8～10年度)
斉藤 智	(CREST)	(平成9～10年度)
橋本 顯子	(CREST)	(平成9～10年度)
五十嵐隆夫	(CREST)	(平成9～10年度)
佐伯 聡	(CREST)	(平成9～10年度)
倉林 輝世	(筑波大学)	(平成8年度)
篠原 優子	(筑波大学)	(平成8～9年度)
米久 滋	(筑波大学)	(平成8～9年度)
中村 英達	(筑波大学)	(平成8～9年度)
土川 美保	(日本女子大学)	(平成8～10年度)
佐藤 大輔	(日本大学)	(平成8年度)
牧野 史絵	(東京理科大学)	(平成8年度)
荒田 良司	(日本大学)	(平成9～10年度)
菊池 健	(茨城大学)	(平成9～10年度)
岸根 加奈	(日本大学)	(平成9年度)
中杉 奈央	(東京家政大学)	(平成9～10年度)
斉藤 紀子	(麻布大学)	(平成9～10年度)
湯川 聖士	(長岡技術科学大学)	(平成9年度)
鎌形 香子	(筑波大学)	(平成10年度)
榎木 淳子	(筑波大学)	(平成10年度)
荒井 幸葉	(東邦大学)	(平成10年度)
西澤 昌人	(日本大学)	(平成10年度)

2 研究課題と担当者 (*客員研究員)

(1) 微生物を用いた汚染土壌・地下水の浄化機構に関する研究

森田昌敏・兜 眞徳・矢木修身・中嶋信美・岩崎一弘・内山裕夫・富岡典子・向井 哲・服部浩之・大竹久夫*・小沢秀明*・神戸敏明*・日下部功*・魚住武司*・和泉好計*・岡田光正*・祥雲弘文*・杉崎善治郎*・瀬戸裕之*・高村義親*・古川謙介*・芳生秀光*

(2) 微生物浄化機能の試験方法の開発に関する研究

森田昌敏・兜 眞徳・矢木修身・中嶋信美・岩崎一弘・内山裕夫・富岡典子・向井 哲・服部浩之・五十嵐泰夫*・川澄俊之*・国府田悦男*・児玉 徹*・神原 靖*・田中秀夫*・中嶋睦安*・南條吉之*・西原宏史*・西村行正*・東 照雄*・平田 強*・藤井貴明*・福田雅夫*

II 研究成果発表一覧

1 誌上発表

発表者	題目	掲載誌	巻(号)	ページ	刊年
矢木修身	ニューバイオテクノロジー産業	月刊浄化槽	237	20-23	1996
矢木修身	環境水中における微生物の挙動と影響	月刊浄化槽	239	22-27	1996
矢木修身	土壌中における微生物の挙動とその影響	月刊浄化槽	240	4, 20-23	1996
矢木修身	組換え生物の活用と法制度	月刊浄化槽	243	7, 25-29	1996
H. Yoshida, O. Yagi	Provisional method for evaluating environmental effects of bioremediation.	OECD Environment Monograph.	117	79-92	1996
矢木修身, 内山裕夫, 岩崎一弘	バイオレメディエーションの水域環境への適応	恒星社厚生閣, (生物機能による環境修復)		9-21	1996
成瀬洋児, 渡辺正敏, 土山秀樹, 伊藤英一, 矢木修身	トリクロロエチレン, テトラクロロエチレンの土壌からの揮散	用水と廃水	38(3)	9-21	1996
矢木修身	米国におけるバイオレメディエーションの現状	バイオサイエンスとインダストリー	55(1)	30-33	1997
藤田正憲, 矢木修身	バイオレメディエーションエンジニアリングー設計と応用ー	エヌ・ティ・エス		pp505	1997
H. Nishihara, H. Miwa, M. Watanabe, M. Nagashima, O. Yagi, Y. Takamura,	Random amplified polymorphic DNA(RAPD) analyses for discriminating genotypes of microcystis cyanobacteria.	Biosci. Biotech. Biochem.	61	1067-1072	1997
T. Kurabayashi, K. Iwasaki, H. Uchiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, O. Yagi	Characteristics of <i>Escherichia coli</i> HB101 and <i>Pseudomonas putida</i> PpY101 harboring a recombinant plasmid with tandem insertion of the mercury resistance operon.	Biosci. Biotech. Biochem.	61	1187-1189	1997

発表者	題 目	掲 載 誌	卷(号)	ページ	刊年
H. Tanaka, T. Shinji, K. Sawada, Y. Monji, S. Seto, M. Yajima, O. Yagi	Development and application of a bioluminescence ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria.	Water Research.	31(8)	1913-1918	1997
O. Yagi, K. Iwasaki, A. Hashimoto	Bioremediation of polychlorinated compounds.	Biotechnology for Water Use and Conservation. (OECD 728)		239-245	1997
I. R. McDonald, H. Uchiyama, S. Kanbe, O. Yagi, J. C. Murrell	The soluble methane monooxygenase gene cluster of the trichloroethylene-degrading methanotroph <i>Methylocystis</i> sp. strain M.	Environ. Microbiol.	63	1898-1904	1997
T. Shimomura, F. Suda, H. Uchiyama, O. Yagi	Biodegradation of trichloroethylene by <i>Methylocystis</i> sp. strain M immobilized in gelbeads in a fluidized-bed bioreactor.	Water Research.	31	2383-2388	1997
O. Yagi, M. Nishimura	Environmental biotechnology, The Japan Perspective, Biotechnology in the Sustainable Environment.	Plenum Press.	54	201-207	1997
H. Uchiyama, C. Kato, E. Kokufuta, O. Yagi	Quantitative colorimetric determination of trichloroethylene degradation activity and implications for environmental use.	Environmental Technology.	18	1123-1131	1997
O. Yagi, H. Uchiyama, K. Iwasaki	Bioremediation of soil and groundwater contaminated with volatile chlorinated compounds by a methane-utilizing bacterium.	Bioremediation of Soil and Groundwater Contamination.	13	141-154	1998
Y. Shinohara, H. Uchiyama, O. Yagi, I. Kusakabe	Purification and characterization of component B of a soluble methane monooxygenase from <i>Methylocystis</i> sp. M.	J. Ferment. Bioeng.	85(1)	37-42	1998
Y. Okubo, O. Yagi	Current status of soil pollution and bioremediation in Japan.	Bioremediation Technologies.	13	115-140	1998

発 表 者	題 目	掲 載 誌	卷(号)	ページ	刊年
矢木修身, 岩崎一弘, 内山裕夫, 中村邦彦, 田中秀夫	微生物を活用する水銀汚染土壌の浄化 技術の開発	重点領域研究「人間地球 系」研究報告集BO14-E22	197	188-195	1998
富沢広喜, 矢木修身	揮発性有機塩素化合物の水飽和土壌中 における分解	雨水技術資料	28	13-19	1998
矢木修身, 岩崎一弘	揮発性有機塩素化合物分解微生物	日本微生物生態学会誌	13(3)	165-170	1998

2 口頭発表

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
矢木修身	バイオレメディエーションの実用化に向けて何をなすべきか	環境バイオテクノロジー研究会	京都	8. 4
岩崎一弘, 土川美保, 内山裕夫, 矢木修身, 川澄俊之	直接PCRによる標的微生物の検出	日本農芸化学会1996年度大会	京都	8. 4
服部浩之, 岩崎一弘, 矢木修身, 内山裕夫	接種微生物の土壌中での生残と定着への試み	日本土壌肥料科学会第33回大会	東京	8. 4
矢木修身	バイオレメディエーションの水域環境への適応	平成8年度日本水産学会春季大会	藤沢	8. 4
O. Yagi	Environmental biotechnology, The Japan perspective.	Biotechnol. Sustainable Environ.	Knoxville	8. 4
矢木修身, 岩崎一弘	バイオレメディエーション技術の適応による土壌・地下水の浄化	平成8年度日本生物工学会シンポジウム	大阪	8. 7
K. Iwasaki, O. Yagi, H. Uchiyama	Bacterial removal of mercury from soil by <i>Pseudomonas putida</i> containing a recombinant plasmid.	The 1996 Int. Symp. Subsurface Microbiol.	Davos	8. 9
矢木修身	バイオレメディエーションの実用化に向けて何をなすべきか	環境バイオテクノロジー研究会第1回シンポジウム	東京	8. 9
M. Hashimoto, H. Uchiyama, H. Goda, O. Yagi	Degradation of TCE in water unsaturated soil by <i>Methylocystis</i> sp strain M.	The 1996 Int. Symp. Subsurface Microbiol.	Davos	8. 9
O. Yagi	Bioremediation of polychlorinated compounds.	OECD Workshop. Mexico '96 Biotechnol. wateruse & Conserv.	Mexico	8.10
O. Yagi	Bioremediation of TCE and TCA contaminated soil and ground water.	5th. Pac. Rim Biotechnol. Conf. & Bio. EXPO '96	Seoul	8.11

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
O. Yagi	Bioremediation of soil and groundwater contaminated with organic chlorinated compounds.	Int. Semin. PCB Management.	Tokyo	8.12
恩田謙介, 新庄尚史, 宮 晶子, 矢木修身, 内山裕夫	免疫測定によるメタン資化性細菌M株の特異的検出法の開発	第31回日本水環境学会	札幌	9. 3
富岡典子, 米久 滋, 内山裕夫, 矢木修身, 鈴木健一朗, 中原忠篤	メタン資化性菌 <i>Mycobacterium</i> sp.TA27株の1,1,1-トリクロロエタン分解能の検討	日本農芸化学会1997年度大会	東京	9. 4
内山裕夫, 神戸佐和, 矢木修身	<i>Methylocystis</i> sp. strain M sMMO 遺伝子解析と系統研究	日本農芸化学会1997年大会	東京	9. 4
矢木修身, 岩崎一弘, 内山裕夫, 尾川 毅	土壌カラムにおける <i>Methylocystis</i> sp. M株の挙動	日本農芸化学会1997年度大会	東京	9. 4
岩崎一弘, 矢木修身, 服部浩之, 内山裕夫, 尾川 毅	メタン資化性菌を活用したバイオレメディエーション技術の評価	日本農芸化学会1997年度大会	東京	9. 4
岩崎一弘, 中村英達, 矢木修身, 内山裕夫, 祥雲弘文	直接PCR法によるトリクロロエチレン分解菌の特異的検出	日本農芸化学会1997年度大会	東京	9. 4
沖野祥平, 矢木修身, 岩崎一弘, 田中秀夫	組換え微生物による土壌スラリー中からの塩化第二水銀除去システム	平成9年度日本生物工学会大会	東京	9. 9
内山裕夫, 篠原優子, 矢木修身, 日下部功	<i>Methylocystis</i> sp. strain M メタンモノオキシゲナーゼのコンポーネントBの性質及び役割	平成9年度日本生物工学会大会	東京	9. 9
K. Iwasaki, O. Yagi, H. Uchiyama, M. Tsuchikawa T. Kawasumi	Detection and enumeration of <i>Pseudomonas putide</i> by a direct PCR method.	V1. International Congress on <i>Pseudomonas</i> : Molecular Biology and Biotechnology.	Madrid	9. 9

発表者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
岩崎一弘, 土川美保, 矢木修身, 川澄俊之	直接PCR法による水銀浄化微生物の迅速な モニタリング	社団法人環境科学会1997 年会	北九州	9.10
矢木修身, 岩崎一弘	揮発性有機塩素化合物分解微生物	日本微生物生態学会	広 島	9.11
矢木修身, 岩崎一弘, 久保田克之, 郷田浩志, 橋本 学, 荒田良司, 中嶋睦安	メタン資化性菌を用いたTCE汚染土壌のバ イオオグメンテーションに関する基礎的 研究	第32回日本水環境学会年 会	習志野	10. 3
岩崎一弘, 矢木修身, 大橋貴志, 今野 聡	日本海重油流出事故現場における微生物生 態影響評価	第32回日本水環境学会年 会	習志野	10. 3
岩崎一弘, 菊池 健, 矢木修身, 内山裕夫, 高村義親	直接PCR法による地下水中のTCE分解菌の 特異的計数	日本農芸化学会1998年度 大会	名古屋	10. 4
米久 滋, 富岡典子, 矢木修身, 中原忠篤	1,1,1-トリクロロエタン分解菌 <i>Mycobacterium</i> sp. TA27 のエタン酸化酵素 の精製と性質	日本農芸化学会1998年度 大会	名古屋	10. 4
矢木修身, 荒田良司, 久保田克之, 岩崎一弘, 服部浩之, 向井 哲, 佐伯 聡, 中嶋睦安	土壌カラムを用いたバイオレメディエーシ ョンのリスク評価	日本農芸化学会1998年度 大会	名古屋	10. 4
矢木修身, 久保田克之, 郷田浩志, 岩崎一弘, 荒田良司, 中嶋睦安	土壌カラムを用いたTCE分解におよぼすメ タン資化性菌接種量の影響	日本農芸化学会1998年度 大会	名古屋	10. 4
矢木修身, 久保田克之, 荒田良司, 岩崎一弘, 郷田浩志, 中嶋睦安	メタン資化性菌を用いるTCE汚染土壌のバ イオトリータビリティ試験	日本農芸化学会1998年度 大会	名古屋	10. 4
岩崎一弘, 沖野祥平, 矢木修身, 田中秀夫	組換え微生物による水中からの塩化第二水 銀の除去	日本農芸化学会1998年度 大会	名古屋	10. 4
矢木修身, 今野 聡, 大橋貴志, 岩崎一弘, 富岡典子	プロパン資化性トリクロロエチレン分解菌 の諸性質と分解特性	日本農芸化学会1998年度 大会	名古屋	10. 4

発表者	題目	学会等名称	開催都市名	年月
橋本颯子, 岩崎一弘, 中杉奈央, 村上和雄, 矢木修身	<i>Mycobacterium</i> sp. TA27 株による TCE の分解	日本農芸化学会 1998 年度 大会	名古屋	10. 4
矢木修身, 岩崎一弘	バイオレメディエーション技術の環境安全性評価に関する研究	環境バイオテクノロジー 研究会第 4 回シンポジウム	東京	10. 6
O. Yagi, A. Hashimoto, K. Iwasaki and M. Nakajima	Degradation of volatile chlorinated compounds by <i>Mycobacterium</i> sp.	The First International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds.	Monterey (USA)	10. 5
K. Onda, H. Shinjo, A. Miya, S. Taguchi, O. Yagi and K. Iwasaki	Development of a immunoassay method for monitoring <i>Methylocystis</i> sp strain M.	The First International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds.	Monterey (USA)	10. 5
O. Yagi, K. Iwasaki, S. Mukai, H. Hattori, R. Arata, M. Nakajima	Risk assessment of bioremediation for TCE contaminated soil and groundwater using a methane utilizing bacterium.	Eighth International Symposium on Microbial Ecology.	Halifax (Canada)	10. 8
K. Iwasaki, S. Okino, H. Tanaka and O. Yagi	Mercurichloride treatment in aqueous solution by recombinant <i>Pseudomonas putida</i> .	Eighth International Symposium on Microbial Ecology.	Halifax (Canada)	10. 8
新庄尚史, 恩田健介, 宮 晶子, 矢木修身, 岩崎一弘	蛍光抗体法による TCE 分解菌 <i>Methylocystis</i> sp. M の特異的検出	第 1 回日本水環境学会シンポジウム	草津	10. 9
大橋貴志, 今野 聡, 岩崎一弘, 矢木修身	ナホトカ号流出重油の分解に関する研究	平成 10 年度日本生物工学会大会	東広島	10. 9
五十嵐隆夫, 久保田明弘, 田中 浄, 内山裕夫, 矢木修身	乳酸菌 <i>Lactobacill usplantarum</i> が生成する偽カタラーゼ	第 71 回日本生化学会大会	名古屋	10. 10
今野 聡, 大橋貴志, 矢木修身, 岩崎一弘	プロパン資化性 <i>Mycobacterium</i> sp. TCE28 株の休止菌体を用いた TCE 分解特性	第 14 回日本微生物生態学会	京都	10. 11

発 表 者	題 目	学会等名称	開催都市名	年月
岩崎一弘, 矢木修身, 久保田克之, 菊池 健, 高村義親	トリクロロエチレン分解菌M株の迅速定量 法の開発	第33回日本水環境学会年 会	仙 台	11. 3
齊藤 智, 岩崎一弘, 矢木修身	トリクロロエチレン汚染の土壤微生物生態 系に及ぼす影響	日本農芸化学会大会	福 岡	11. 3

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告
SR-31-2000

平成12年3月31日発行

編集 国立環境研究所 編集委員会

発行 環境庁 国立環境研究所

〒305-0053 茨城県つくば市小野川16番2

電話 0298-50-2343 (ダイヤルイン)

印刷 朝日印刷株式会社

住所 〒309-1117 茨城県真壁郡協和町向川澄82-1

Published by National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-0053 Japan

March 2000

本報告書は再生紙を使用しています。