

土壌中の重金属耐性微生物の生態と浄化への利用

Ecology of heavy metal-resistant microorganisms in soils and their use in remediation of contaminated soils

國頭 恭^{1*}・松本 聰²

Takashi KUNITO^{1*} and Satoshi MATSUMOTO²

¹信州大学理学部物質循環学科・²財団法人 日本土壌協会

¹Department of Environmental Sciences, Faculty of Science, Shinshu University

²Japan Soil Association

摘 要

微生物は重金属汚染に適応するため、多様な耐性機構を獲得してきた。このような重金属耐性微生物は、汚染環境中での物質循環に重要な役割を果たしていることが予想される。また微生物のなかには、カドミウムやヒ素といった強毒性の金属を積極的に利用するものも存在する。微生物と重金属との相互作用についての理解の深化は、重金属汚染が土壌生態系へ与える影響を評価する上で有用であるだけでなく、微生物を汚染土壌浄化に利用するという実用的な観点からも重要である。近年、重金属耐性微生物の利用により汚染土壌のファイトレメディエーションの効率を高める方法が注目されている。本稿では、土壌中の重金属耐性微生物の耐性機構、生態、微生物への毒性評価、汚染土壌浄化への微生物の利用について概説する。

キーワード：根圏、重金属、重金属耐性微生物、土壌汚染、
ファイトレメディエーション

Key words：rhizosphere, heavy metal, heavy metal-resistant microorganism,
soil pollution, phytoremediation

1. はじめに

重金属のなかには銅や亜鉛といった必須金属も含まれる。微生物においてこれら必須重金属は、濃度が低い場合には欠乏し、また高濃度のときには毒性を示す。そのため、微生物は重金属の細胞内レベルを調節するための複雑な仕組みを持っている。また一般に生物的機能を持たないとされるカドミウムやヒ素といった強毒性金属を積極的に利用する微生物も存在する。海洋では、カドミウムは栄養塩と類似した鉛直分布を示し、表層で濃度が低く、深いほど濃度が上昇する。これは、亜鉛欠乏の海洋表層においてある種の珪藻が、特異なカルボニックアンヒドラーゼの活性中心に亜鉛の代わりにカドミウムを使用しているためであることが明らかにされている^{1), 2)}。また紅色硫黄細菌のなかには、酸素非発生源型光合成における電子供与体に、一般的な S^{2-} だけでなくAs(III)も利用するものが存在する³⁾。さらにAs(III)を電子供与体として利用する化学合成独立栄養細菌や、電子伝達系の最終電子受容体にAs(V)を利用したヒ酸呼吸する嫌気性細菌も見つかっている⁴⁾。

現在、アジアの発展途上国を中心に、地下水ヒ素汚染により数千万の人々の健康被害が懸念され、人類史上最大の中毒事例であるとされているが、その原因は、地下でのヒ酸還元細菌等の作用によるヒ素溶出である^{4), 5)}。このように、名前のおり微小な微生物の作用によって、環境中での重金属の大規模な分布変化や、人類への甚大な被害が引き起こされる場合もある。

上述した事例からも明らかなように、ある種の微生物は長い進化の過程で重金属をうまく利用したり、その毒性に対応できる優れた能力を獲得している。こういった微生物と重金属との関係を理解することは、重金属汚染が、物質循環を担う微生物に与える影響、つまり生態系への影響を評価・予測したり、あるいは重金属汚染土壌の修復に微生物を利用したりする際に有用であろう。本稿では特に、土壌中での重金属耐性微生物の生態と、近年注目を集めているファイトレメディエーションへの微生物の利用について概説する。

受付：2009年8月19日、受理：2009年9月26日

* 〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1, e-mail: kunito@shinshu-u.ac.jp

2. 微生物の重金属耐性機構

微生物は多様な元素を代謝に利用したり、あるいは様々な毒性元素に対する耐性機構を有している⁶⁾。ここでは、細菌と菌類(糸状菌や酵母)の重金属耐性機構について簡単に説明する。微生物の重金属耐性機構は、大きく以下の五つに分けることができる⁷⁾：(i)細胞内への取り込み阻止、(ii)細胞外への排出、(iii)金属結合タンパク質等による細胞内での隔離、(iv)細胞外での隔離、(v)無毒な形態への変換。このなかでは、特に(ii)から(v)の4つの機構が詳細に研究されている。(ii)では、特に細菌において、重金属を細胞外へ排出する様々なトランスポーターが見つかった(図1)。このトランスポーターによって細胞内重金属濃度を低下させ、重金属耐性を示すことが知られている。(iii)としては、細胞内でメタロチオネインやファイトケラチンといった重金属結合タンパク質・ペプチドに重金属を安定的に結合させたり、菌類では液胞中に重金属を封入してしまう機構が挙げられる。従来、メタロチオネインは動物や菌類等の真核生物にのみ見られる重金属解毒

タンパク質と考えられてきたが、最近の研究により、細菌においても、真核生物とは異なるタイプのメタロチオネインが発見されている。(iv)には、細胞外に分泌した多糖類やシュウ酸等に重金属を結合・沈殿させる機構が含まれる。(v)としては、例えば毒性の強い Hg^{2+} を Hg^0 に還元し、生成した Hg^0 を拡散によって細胞外の大気中へ放出する仕組みがある。水銀以外にも、ヒ素やセレンも微生物が気化することが知られている(これらガス態金属の一部は毒性を示すが、微生物にとっては細胞外への重要な排出経路として機能する)。なお、銅のような必須重金属の場合は、細胞内で最適濃度に維持する必要があるため誘導的耐性機構を持つ⁷⁾。一方、細胞外莢膜のように本来の機能が重金属解毒以外である耐性機構は、構成的発現の場合が多い⁷⁾。

現在、細菌および菌類で知られている耐性機構の代表例を図1に示す。特に細菌では多様な耐性機構が報告されており、図に示した機構はそのごく一部である。また細菌では、耐性遺伝子の多くがプラスミドやトランスポゾン上に位置しており⁸⁾、後述する耐性遺伝子の水平伝播の原因となっている。図1のように、細菌・菌類ともに、各金属に対して特異的な耐性機構を持つ場合が多い。なお微生物の重金属耐性に関わるトランスポーターの詳細は、佐々木ら⁹⁾の総説を参照されたい。

3. 土壌中での重金属耐性微生物の生態

重金属汚染は、土壌中の様々な微生物活性やバイオマス量を低下させ、有機物分解や窒素循環などに大きな影響を与えることが知られている^{13), 14)}。重金属汚染土壌での酵素活性低下¹⁵⁾の理由としては、重金属による酵素の直接的阻害と、酵素生産する微生物の減少の二つが挙げられるが、後者が主であるとされている¹³⁾。汚染土壌では、微生物はそのストレスに対応するため、増殖よりも細胞維持機能に多くのエネルギーを使い¹⁴⁾、バイオマス量は低下する¹⁶⁾。汚染によって細菌数が低下しない場合でも、その多様性は極めて低下することが報告されている¹⁷⁾。また重金属毒性の強い土壌ほど全細菌数は少ない^{18), 19)}が、これは毒性で全細菌数が抑制されているだけでなく、このような土壌は有機物が少なくpHも低いため、細菌の生育に適していないことも関係している¹⁹⁾。

重金属汚染土壌での耐性菌の役割は大きいことが推測されるため、その出現機構について概説する。重金属耐性菌は重金属汚染土壌で優占しているため、汚染土壌に特有な微生物と考えられがちだが、耐性菌は非汚染土壌からも分離され、またゲノム解析により様々な一般細菌でも重金属耐性遺伝子は見つかっている²⁰⁾。しかしながら、非汚染土壌中の重金属耐性細菌の多様性は低い。たとえば日本各地の

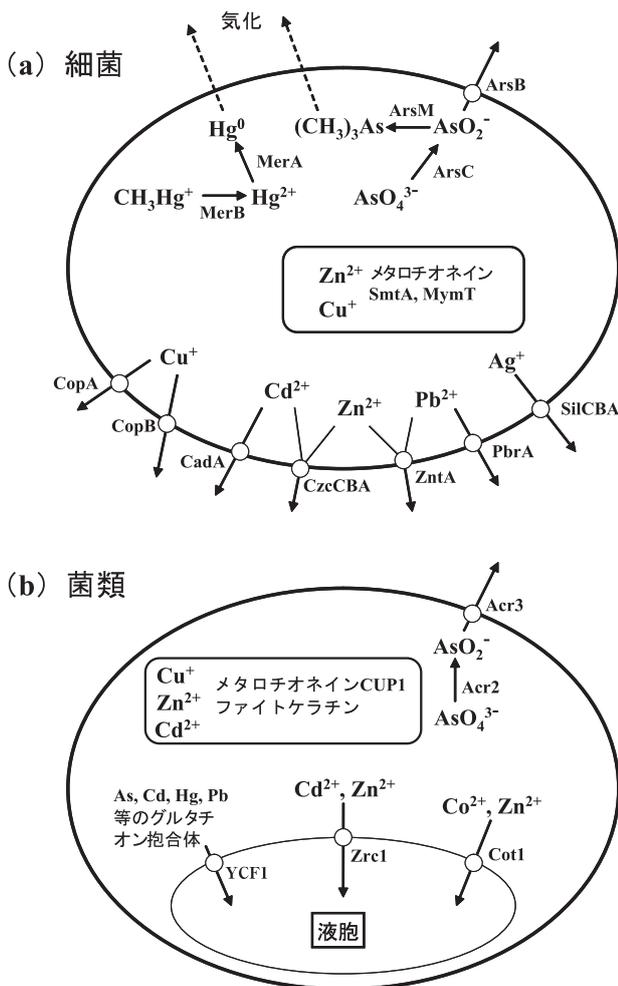


図1 (a)細菌と(b)菌類の重金属耐性機構。細菌の耐性機構は Silver and Phung⁸⁾、菌類では Tamás et al.¹⁰⁾をもとに作成した。また最近報告された Qin et al.¹¹⁾と Robinson¹²⁾の知見も含めている。

非汚染土壌から亜鉛耐性細菌を分離すると、その半数以上はピンク色のコロニーを形成する *Methylobacterium* 属細菌であった²¹⁾。重金属汚染により耐性菌が優占するが、菌類の場合は、もともと非汚染土壌にいた耐性種が競合に有利になり増加するのに対し、細菌では、もともと存在していた耐性菌以外に、新たに耐性を獲得し優占する種もいると推測されている²⁰⁾。土壌に重金属を添加すると短期間で耐性細菌が優占するため、汚染初期では変異による耐性獲得よりも、もともといた耐性細菌の増加が主であろう²²⁾。しかし長期間の汚染により耐性細菌の多様性は増加する²³⁾。新規の耐性細菌出現機構としては、プラスミドやトランスポゾンによる耐性遺伝子の水平伝播や、変異による耐性獲得が考えられるが、急激な汚染では前者により耐性遺伝子が急速に細菌群集内で拡散し、徐々に汚染される場合には、後者の耐性獲得様式が重要であることが指摘されている⁷⁾。また *Insam et al.*²⁴⁾によると、短期間の低汚染では微生物は代謝活性化によりストレスに対応するが、高汚染では微生物群集組成が変化する。また耐性菌でなくても、孢子形成により汚染土壌に多く生残する細菌種も存在する²⁵⁾。

一般に菌類の方が細菌よりも重金属耐性であるため、汚染土壌中で重金属により死滅した細菌を利用して、菌類の活性が増加する場合もある²⁶⁾。また耐性細菌としては、グラム陰性細菌が多く分離される²⁰⁾。

重金属耐性菌は、汚染土壌中の物質循環に重要な役割を果たすだけでなく、重金属毒性を軽減する機能も持つかもしれない。銅含有培地に生育させると銅を吸収して緑色のコロニーになる銅耐性細菌が、銅汚染土壌中に多く存在する²⁷⁾。これら耐性細菌は土壌水から銅イオンを取り込み、死後、銅は有機物に結合した状態で土壌中に放出されるため、土壌中の銅毒性を軽減する可能性がある。しかし、汚染土壌中で優占する耐性菌が利用できる基質の種類は感受性菌よりも少ないため²⁸⁾、汚染土壌中では微生物の機能的多様性が低下して物質循環が攪乱され、土壌肥沃度が低下する可能性も考えられる。

土壌中では重金属毒性が微視的レベルで不均一な可能性がある。例えば *Almås et al.*²⁹⁾によると、長期間重金属汚染された土壌において、土壌粒子の表面付近では重金属毒性が強く、細菌群の耐性度も高いが、微小孔隙中細菌群は重金属の影響が小さく、耐性度も低かった。これには、土壌団粒内部で重金属がより安定な状態で存在していること³⁰⁾が関与しているのかもしれない。

耐性遺伝子が水平伝播により細菌群集内に拡散することは前述したが、興味深いことに世界各地で似通った耐性遺伝子が見つかり、地球規模で水平伝播が起こったことが推測される。例えばベルギーで分離されたカドミウム耐性細菌 *Cupriavidus metallidurans* CH34 のカドミウム・亜鉛・コバルト

耐性遺伝子 *czc* と、日本の対馬で分離されたカドミウム耐性細菌 *Cupriavidus* sp. CT14 株の *czc* 遺伝子はほぼ同一であった³¹⁾。また *czc* 遺伝子はベルギーやザールで分離された多くの耐性細菌でも見ついている³²⁾。水銀耐性 *mer* 遺伝子でも、世界各地で分離された耐性菌のトランスポゾン上 Hg 耐性遺伝子はわずか数タイプに分けられ、かつ各グループ内では相同性がきわめて高いことから、水平伝播により *mer* 遺伝子も世界中に拡散していることが示唆されている³³⁾。

なお重金属汚染が土壌微生物に与える影響は、直接的な毒性だけではなく、重金属が有機物に結合することでその利用性が低下する点^{34), 35)}についても留意する必要がある。

4. 土壌微生物への重金属毒性の評価

土壌中での重金属の形態は、pH や有機物量、粘土含量といった土壌特性に応じて異なり、またその毒性・生物利用性も形態によって異なるため、全重金属濃度を測定しても、微生物や植物への影響を評価・予測することはできない(例外としては、似通った土壌特性をもつ土壌間では、全濃度が毒性・生物利用性と相関を示す場合がある)。そのため、土壌微生物への重金属毒性の推定には、全量ではなく、交換性のよう生物利用性の高い形態を測定する必要がある^{19), 36)}。例えば、土壌特性の大きく異なる銅汚染土壌を供した場合、細菌群の銅耐性度は全銅濃度とは相関を示さないが、交換性銅濃度とは有意な正の相関を示した(図2)。また土壌が重金属汚染されるとその毒性は土壌特性に応じて異なるが、さらにエイジング効果により、時間と共に毒性が低下すること²²⁾にも注意する必要がある。

土壌微生物への重金属毒性の評価は、前述したとおり交換性形態の測定によりある程度可能である。しかし、さらに精確な評価には、土壌水中のフリー金属イオンを測定する必要がある³⁷⁾。例えば *Saeki et al.*³⁸⁾では、土壌細菌群の重金属耐性度はフリーイオン活量モデル(free-ion activity model)で概ね説明できた。この報告では土壌水中フリーイオン活量を推定しているが、さらに細胞膜表面でのイオン活量を推定する試みもある³⁹⁾。このようにフリーイオン活量モデルの有用性は多くの論文で実証されているが特にカドミウムの場合は、塩化物イオンが共存するとその取り込み・毒性の推定がフリーイオン活量モデルでは不可能な場合が多い⁴⁰⁾。*Campbell*⁴¹⁾によると、フリーイオン活量モデルが適用できない事例は大きく3グループに区分でき、(i)金属が疎水性の複合体を形成する場合、(ii)フリー金属イオンと $H^+ \cdot Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ とが細胞取り込み口で競合する場合、(iii)金属がアミノ酸やクエン酸などの低分子の親水性配位子と複合体をつくる場合、である。

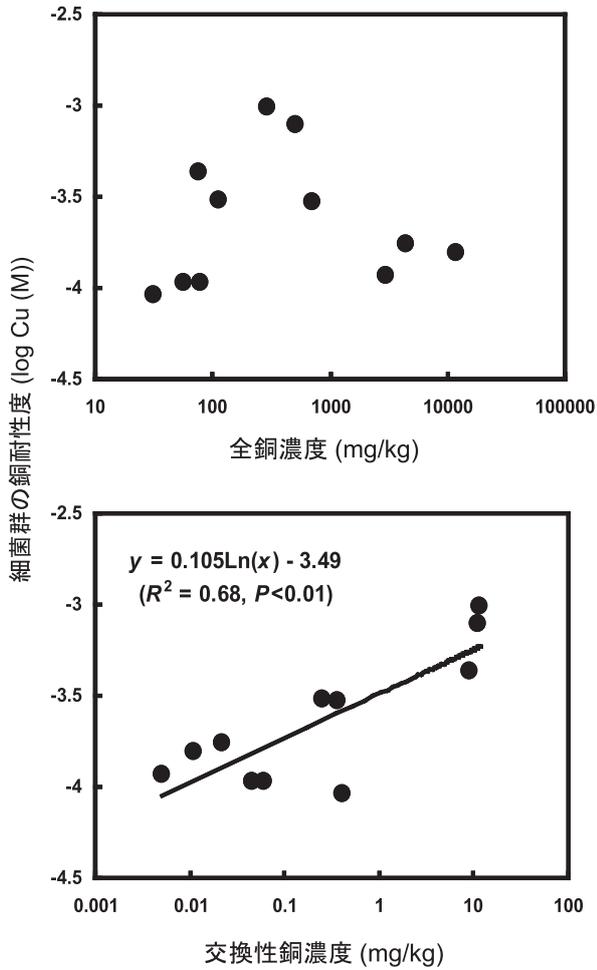


図2 土壌細菌群の銅耐性度 (IC_{50}) と、土壌中の全銅濃度・交換性銅濃度との関係¹⁹⁾。細菌群の銅耐性度は、銅無添加汚染地上のコロニー数の50%になる銅添加培地中の銅濃度 (M) を対数表示したものである。

なお土壌水中のフリー金属イオン活量は、その調査時点での重金属毒性の強度(intensity)を示すことに留意する必要がある。土壌中で、フリー金属イオンは他の形態の重金属と平衡状態にあり、フリーイオンが系外へ流出したり、生物に取り込まれた後は、他の形態からフリーイオンが供給される。そのため、長期的な重金属毒性・生物利用性を評価するためには、強度だけでなく容量(capacity)も評価しなければならない。

また土壌の酸化還元電位も重金属毒性に大きな影響を与える。例えばカドミウム汚染された水田土壌では、夏季に湛水により還元化が進行し、カドミウムは硫化物として沈殿して毒性が低下するため、汚染された畑土壌に比べてカドミウム耐性菌は少ない⁴²⁾。逆にヒ素では、還元化が進行すると鉄酸化物が溶解してヒ素が放出されるため、ヒ素汚染水田土壌では強ヒ素耐性菌が出現する⁴²⁾。還元状態の土壌における、微生物への重金属毒性評価についてはあまり研究されていない。國頭ら⁴³⁾は、水田土壌において酸揮発性硫化物と、その測定時に同時に抽出される金属との量的関係から、微生物への重金属毒性を推定

表1 重金属による土壌汚染・毒性の微生物指標²⁰⁾。

土壌細菌群の重金属耐性度 (IC_{50})
全細菌数に占める耐性細菌の比率
土壌酵素活性
土壌呼吸活性
土壌有機炭素に占める微生物バイオマス炭素の比率 (Cmic/Corg)
qCO_2
基質誘導呼吸 (SIR)
比呼吸速度
遅滞時間
比増殖速度
菌類と細菌の寄与率

した。還元状態の土壌における微生物への重金属毒性評価については、さらなる研究が必要であろう。

土壌微生物は、植物や土壌動物よりも重金属に感受的であり³⁷⁾、また汚染に迅速に応答するため、重金属毒性の早期指標に利用できる。重金属汚染・毒性の微生物指標としては、表1の微生物特性が挙げられる。このなかでも、土壌細菌群の重金属耐性度¹⁹⁾、³⁸⁾や耐性細菌の比率²²⁾は重金属毒性をよく反映し、かつ各金属ごとの毒性を評価するのに適している。両者とも、重金属毒性により細菌群集内で感受性細菌が減少し、競合に有利になった耐性細菌が増加する⁴⁴⁾ことを利用している。なお菌類では、耐性能を持たなくても孢子形成により汚染土壌中で生残するものが多いため、この指標には適していない。これら以外にも、土壌有機炭素に占める微生物バイオマス炭素の比率 (Cmic/Corg) や qCO_2 (微生物バイオマス炭素量当たりの呼吸速度) もしばしば利用される。Cmic/Corg は、重金属汚染土壌中で微生物バイオマス量が低下することを利用した指標である。この指標は、重金属毒性によってバイオマス量が低下することだけでなく、上述したように、重金属結合によって土壌有機物の微生物利用性が低下することも反映していると考えられる。また qCO_2 は、微生物が重金属ストレスに対応するため、代謝を活発化させていることを利用した指標である。

5. 重金属汚染土壌浄化への耐性微生物の利用

微生物を利用した重金属汚染修復の代表的研究例は、微生物による重金属の生物取着を汚染排水処理へ利用する試みである。この研究は古くから、そして多数の研究者によって実施されてきたが、現在までのところ、その商業的利用は皆無である。それは、イオン交換樹脂に比較して、生物取着では重金属の選択性が低いことや耐久性が低いことによる⁴⁵⁾。また生物取着は、重金属汚染土壌の修復には利用しにくい。それに対し現在では、耐性微生物を主として利用するのではなく、補助的利用により重金属のファイトレメディエーション効率を高める、というアプローチが注目を浴びている。

重金属汚染土壌の浄化には、(i)掘削除去法、(ii)封じ込め法、(iii)吸収・分解・洗浄除去法の三つが

ある⁴⁶⁾。微生物の利用が検討されているのは、ファイトレメディエーションの中でも、植物を用いて土壌から重金属を除去するというファイトエクストラクションであり、(iii)の浄化法に含まれる。

ファイトエクストラクションへの耐性微生物利用の一つ目としては、微生物の耐性遺伝子を植物に組み込み、浄化効率を高めるといえるものである(図3)。酵母でカドミウムや鉛のグルタチオン抱合体を液胞に輸送するタンパク質 YCF1(図1)を植物で発現させると、その植物はカドミウムや鉛に耐性を示し、かつ多量に集積した⁴⁷⁾。水銀耐性細菌由来の水銀還元酵素 MerA(図1)を、バイオマスが大きいため浄化効率が高いと考えられる木本植物で発現させ、 Hg^{2+} を Hg^0 に還元・気化させたり⁴⁸⁾、MerAと有機水銀分解酵素 MerB(図1)の両方を植物で発現させ、有機水銀を Hg^0 として気化させることに成功している⁴⁹⁾。ただしこの場合は、水銀は回収されるのではなく、大気中に放出され希釈されるだけである。またヒ素耐性細菌由来のヒ酸還元酵素 ArsC(図1)と大腸菌由来の γ -グルタミルシステインシンターゼ(グルタチオンやファイトケラチン合成に関わる酵素)を植物で発現させたところ、As(V)がArsCによってAs(III)に還元され、グルタチオンやファイトケラチンと結合・解毒されることで、植物のヒ素耐性と集積量が増加した⁵⁰⁾。

二つ目の利用法としては、ファイトエクストラクションに植物生長促進根圏細菌群(plant growth-promoting rhizobacteria; PGPR)を利用するというものである^{51), 52)}(図3)。様々な微生物が植物の重金属集積を促進することは以前から知られていた⁵³⁾が、最近の研究により、その促進作用は(i)植物の

重金属集積を直接高めるものと、(ii)植物生長を促進させることで重金属集積量を増加させる間接的なもの、の二つに分かれることが判明した。(i)の作用としては、微生物による土壌中重金属の生物利用性の変化がある⁵⁴⁾。根圏において、PGPRはシデロフォア(鉄獲得のために分泌するキレート剤だが、重金属とも結合することが知られている)等の物質を分泌することで、重金属溶出を促進することが報告されている⁵⁵⁾。またファイトエクストラクションでは、重金属ストレスに応じて植物が生成するエチレンによって植物生長が悪化することが問題となるが、その際、(ii)の作用が重要となる。PGPRのなかには、エチレンの前駆物質である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)を分解する細菌が存在し、この細菌をファイトエクストラクションに利用することで、ACC分解により根内エチレン濃度が低下して根の生長がよくなり、重金属集積量が増加することが報告されている^{56), 57)}。また重金属汚染土壌でファイトエクストラクション効率を高めた細菌は、シデロフォアや、植物ホルモンであるインドール酢酸、ACC分解するACCデアミナーゼを生産していた⁵²⁾。植物根圏では、根から分泌された有機物やpH上昇により重金属毒性が低下し^{58), 59)}、耐性細菌の比率が低下する事例が報告されている⁵⁹⁾。しかし、この効果は植物種等の条件により異なる。例えば、ファイトエクストラクションで多く利用される重金属超集積植物(hyperaccumulator)の根圏では、重金属耐性細菌の比率はきわめて高い^{60), 61)}。そのため、ファイトエクストラクションに利用するPGPRは重金属耐性であることが望ましい。

なお菌根菌の場合は、重金属汚染土壌のファイトレメディエーションへの効果については一致した結果が得られていない^{52), 54)}。

6. おわりに

重金属耐性微生物を環境浄化に利用する試みは古くから行われてきたが、現在までのところ実際に利用された例は極めて少なく、基礎研究の段階でとどまっていた。唯一、重金属耐性細菌が実際に利用されているのは、重金属耐性の鉄酸化細菌を利用して鉱石から金属を溶出させるバクテリアリーチング⁶²⁾であろう。しかし近年の研究の進展により、“assisted phytoremediation”という様式で、重金属耐性微生物が汚染土壌浄化に実際に利用される可能性が高くなってきた。根圏での微生物と植物との相互作用については未解明の部分が多いため、この浄化法の確立にはさらなる研究が必要であり、今後の進展が待たれる。

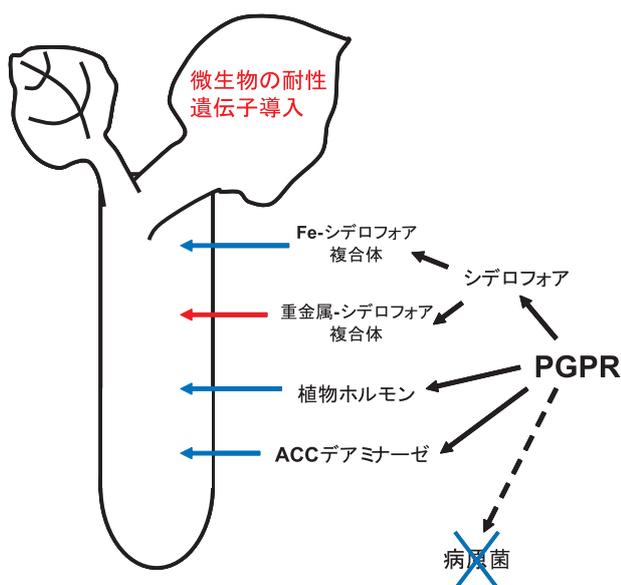


図3 重金属耐性微生物のファイトレメディエーションへの利用。青は、土壌からの重金属除去を促進する直接的影響、赤は、植物生長促進を介した間接的影響を示す。PGPR：植物生長促進根圏細菌群。

引用文献

- 1) Lane, T. W. and F. M. M. Morel (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4627-4631.
- 2) Lane, T. W., M. A. Saito, G. N. George, I. J. Pickering, R. C. Prince and F. M. M. Morel (2005) A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, 435, 42.
- 3) Kulp, T. R., S. E. Hoefft, M. Asao, M. T. Madigan, J. T. Hollibaugh, J. C. Fisher, J. F. Stolz, C. W. Culbertson, L. G. Miller and R. S. Oremland (2008) Arsenic (III) fuels anoxygenic photosynthesis in hot spring biofilms from Mono Lake, California. *Science*, 321, 967-970.
- 4) Oremland, R. S. and J. F. Stolz, (2003) The ecology of arsenic. *Science*, 300, 939-944.
- 5) Agusa, T., R. Kubota, T. Kunito, T. B. Minh, P. T. K. Trang, C. Chamnan, H. Iwata, P. H. Viet, T. S. Tana and S. Tanabe (2007) Arsenic pollution in groundwater of Vietnam and Cambodia: a review. *Biomed. Res. Trace Elements*, 18, 35-47.
- 6) Wackett, L. P., A. G. Dodge and L. B. M. Ellis (2004) Microbial genomics and the periodic table. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 647-655.
- 7) Rouch, D. A., B. T. O. Lee and A. P. Morby (1995) Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *J. Ind. Microbiol.*, 14, 132-141.
- 8) Silver, S. and L.T. Phung (2005) A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 587-605.
- 9) 佐々木祥人・皆川貴洋・宮寄厚・草野友延 (2002) 重金属トランスポーター - 生物機能による汚染重金属回収系の構築にむけて. 環境バイオテクノロジー学会誌, 2, 83-93.
- 10) Tamás, M. J., J. Labarre, M. B. Toledano and R. Wysocki (2005) Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. In: M. J. Tamás and E. Martinoia, eds., *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*, Springer-Verlag, Berlin, 395-454.
- 11) Qin, J., B. P. Rosen, Y. Zhang, G. Wang, S. Franke and C. Rensing (2006) Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 2075-2080.
- 12) Robinson, N. J. (2008) A bacterial copper metallothionein. *Nat. Chem. Biol.*, 4, 582-583.
- 13) Bååth, E. (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Wat. Air Soil Pollut.*, 47, 335-379.
- 14) Giller, K. E., E. Witter and S. P. McGrath (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1389-1414.
- 15) 金沢晋二郎・森敬太・広木幹也・松本聰 (1993) 重金属汚染土壌のエキソセルラーゼ活性. 環境科学会誌, 6, 251-258.
- 16) Dahlin, S. and E. Witter (1998) Can the low microbial biomass C-to-organic C ratio in an acid and a metal contaminated soil be explained by differences in the substrate utilization efficiency and maintenance requirements? *Soil Biol. Biochem.*, 30, 633-641.
- 17) Gans, J., M. Wolinsky and J. Dunbar (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309, 1387-1390.
- 18) Kunito, T., K. Senoo, K. Nagaoka, H. Oyaizu and S. Matsumoto (1997) Distribution of Cu-resistant bacteria and non-resistant bacteria in several Cu-contaminated soils in Japan: usefulness of the tolerance level as an index of Cu contamination in soil. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1190-1193.
- 19) Kunito, T., K. Saeki, H. Oyaizu and S. Matsumoto (1999) Influences of copper forms on the toxicity to microorganisms in soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44, 174-181.
- 20) Kunito, T., H. Oyaizu and S. Matsumoto (1998) Ecology of soil heavy metal-resistant bacteria and perspective of bioremediation of heavy metal-contaminated soils. *Recent Res. Devel. Agric. Biol. Chem.*, 2, 185-206.
- 21) Kunito, T., S. Shibata, S. Matsumoto and H. Oyaizu (1997) Zinc resistance of *Methylobacterium* species. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 729-731.
- 22) Kunito, T., K. Senoo, K. Saeki, H. Oyaizu and S. Matsumoto (1999) Usefulness of the sensitivity-resistance index to estimate the toxicity of copper on bacteria in copper-contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44, 182-189.
- 23) Barkay, T., S. C. Tripp and B.H. Olson (1985) Effect of metal-rich sewage sludge application on the bacterial communities of grasslands. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 333-337.
- 24) Insam, H., T. C. Hutchinson and H. H. Reber (1996) Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. *Soil Biol. Biochem.*, 28, 691-694.
- 25) Ohya, H., Y. Komai and M. Yamaguchi (1986) Zinc effects on a soil bacterial flora characterized by fatty acid composition of the isolates. *Biol. Fertil. Soils*, 2, 59-63.
- 26) Rajapaksha, R. M. C. P., M. A. Tobor-Kapłon and E. Bååth (2004) Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Appl. Environ. Microbiol.*

- ol., 70, 2966-2973.
- 27) Kunito, T., K. Nagaoka, N. Tada, K. Saeki, K. Senoo, H. Oyaizu and S. Matsumoto (1997) Characterization of Cu-resistant bacterial communities in Cu-contaminated soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 43, 709-717.
 - 28) Doelman, P., E. Jansen, M. Michels and M. van Til (1994) Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biol. Fertil. Soils*, 17, 177-184.
 - 29) Almås, Å. R., J. Mulder and L. R. Bakken (2005) Trace metal exposure of soil bacteria depends on their position in the soil matrix. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 5927-5932.
 - 30) Wilcke, W. and M. Kaupenjohann (1997) Differences in concentrations and fractions of aluminum and heavy metals between aggregate interior and exterior. *Soil Sci.*, 162, 323-332.
 - 31) Kunito, T., T. Kusano, H. Oyaizu, K. Senoo, S. Kanazawa and S. Matsumoto (1996) Cloning and sequence analysis of *czc* genes in *Alcaligenes* sp. strain CT14. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 699-704.
 - 32) Diels, L. and M. Mergeay (1990) DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1485-1491.
 - 33) Yurieva, O., G. Kholodii, L. Minakhin, Z. Gorlenko, E. Kalyaeva, S. Mindlin and V. Nikiforov (1997) Intercontinental spread of promiscuous mercury-resistance transposons in environmental bacteria. *Mol. Microbiol.*, 24, 321-329.
 - 34) Hattori, H. (1996) Decomposition of organic matter with previous cadmium adsorption in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 42, 745-752.
 - 35) Schwesig, D., K. Kalbitz and E. Matzner (2003) Effects of aluminium on the mineralization of dissolved organic carbon derived from forest floors. *Eur. J. Soil Sci.*, 54, 311-322.
 - 36) Kunito, T., K. Saeki, S. Goto, H. Hayashi, H. Oyaizu and S. Matsumoto (2001) Copper and zinc fractions affecting microorganisms in long-term sludge-amended soils. *Bioresource Technol.*, 79, 135-146.
 - 37) McGrath, S.P. (2001) Bioavailability of metals to soil microbes. In: H.E. Allen, ed., *Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, Florida, 69-86.
 - 38) Saeki, K., T. Kunito, H. Oyaizu and S. Matsumoto (2002) Relationships between bacterial tolerance levels and forms of copper and zinc in soils. *J. Environ. Qual.*, 31, 1570-1575.
 - 39) 小山博之・小林安文・T.B. Kinraide・我妻忠雄 (2008) 細胞膜表面のイオン活動度から見えるもの. 土肥誌, 79, 500-504.
 - 40) Nolan, A. L., E. Lombi and M. J. McLaughlin (2003) Metal bioaccumulation and toxicity in soils: why bother with speciation? *Aust. J. Chem.*, 56, 77-91.
 - 41) Campbell, P. G. C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: A. Tessier and D.R. Turner, eds., *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley, Chichester, 45-102.
 - 42) 広木幹也 (1999) 重金属と微生物. 日本土壤微生物学会(編), 新・土の微生物(4)環境問題と微生物, 博友社, 5-28.
 - 43) 國頭 恭・戸谷仁美・長岡一成・佐伯和利・相川良雄・松本 聰 (2008) 水田土壌中における微生物に対する重金属毒性の評価. 第14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, 526-531.
 - 44) Díaz-Raviña, M. and E. Bååth (1996) Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2970-2977.
 - 45) Gadd, G. M. (2000) Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 11, 271-279.
 - 46) 松本 聰 (2008) 汚染土壌の修復. 科学, 78, 194-198.
 - 47) Song, W.-Y., E. J. Sohn, E. Martinoia, Y. J. Lee, Y.-Y. Yang, M. Jasinski, C. Forestier, I. Hwang and Y. Lee (2003) Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nat. Biotechnol.*, 21, 914-919.
 - 48) Rugh, C.L., J. F. Senecoff, R. B. Meagher and S. A. Merkle (1998) Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat. Biotechnol.*, 16, 925-928.
 - 49) Bizily, S. P., C. L. Rugh and R. B. Meagher (2000) Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nat. Biotechnol.*, 18, 213-217.
 - 50) Dhankher, O. P., Y. Li, B. P. Rosen, J. Shi, D. Salt, J. F. Senecoff, N. A. Sashti and R. B. Meagher (2002) Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression. *Nat. Biotechnol.*, 20, 1140-1145.
 - 51) Lebeau, T., A. Braud and K. Jézéquel (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ. Pollut.*, 153, 497-522.
 - 52) Gamalero, E., G. Lingua, G. Berta and B. R. Glick (2009) Beneficial role of plant growth promoting bac-

- teria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant responses to heavy metal stress. *Can. J. Microbiol.*, 55, 501-514.
- 53) Salt, D. E., M. Blaylock, N. P. B. K. Kumar, V. Dushenkov, B. D. Ensley, I. Chet and I. Raskin (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technology*, 13, 468-474.
- 54) Lasat, M. M. (2002) Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.*, 31, 109-120.
- 55) Whiting, S. N., M. P. de Souza and N. Terry (2001) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 3144-3150.
- 56) Glick, B. R. (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.*, 21, 383-393.
- 57) Arshad, M., M. Saleem and S. Hussain (2007) Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends Biotechnol.*, 25, 356-362.
- 58) Youssef, R. A. and M. Chino (1989) Root-induced changes in the rhizosphere of plants. II. Distribution of heavy metals across the rhizosphere in soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 35, 609-621.
- 59) Kunito, T., K. Saeki, K. Nagaoka, H. Oyaizu and S. Matsumoto (2001) Characterization of copper-resistant bacterial community in rhizosphere of highly copper-contaminated soil. *Eur. J. Soil Biol.*, 37, 95-102.
- 60) Schlegel, H. G., J.-P. Cosson and A. J. M. Baker (1991) Nickel-hyperaccumulating plants provide a niche for nickel-resistant bacteria. *Bot. Acta*, 104, 18-25.
- 61) Lodewyckx, C., M. Mergeay, J. Vangronsveld, H. Clijsters and D. van der Lelie (2002) Isolation, characterization, and identification of bacteria associated with the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* subsp. *calaminaria*. *Int. J. Phytoremediat.*, 4, 101-115.
- 62) Rawlings, D. E. and T. Kusano (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.*, 58, 39-55.



國頭 恭

Takashi KUNITO

1989年県立鳥取西高等学校卒業／1993年東京大学農学部農芸化学科卒業／1998年東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻博士課程修了／同年愛媛大学農学部助手／1999年同大学沿岸環境科学研究センター助手／

2003年信州大学理学部准教授、現在にいたる。専門は土壌微生物学、環境化学。学生時代から重金属に関連した研究をしており、愛媛大学在職中は、海棲動物の重金属の化学形態や解毒機構、地下水のヒ素汚染などについても取り組んだ。現在は、重金属だけでなく、森林土壌中でのリンや窒素の循環に関わる研究もしている。

松本 聰

Satoshi MATSUMOTO

P14参照