

(S3-03) *Dehalococcoides* 属細菌を用いたバイオオーグメンテーション利用に関する

## 実験考察

○米塚健太<sup>1</sup>・小松大祐<sup>1</sup>・養王田正文<sup>2</sup>・西村実<sup>3</sup><sup>1</sup>エンバイオ・エンジニアリング・<sup>2</sup>東京農工大学・<sup>3</sup>エンバイオ・ホールディングス

## 1. 背景および目的

第一種特定有害物質に含まれている揮発性塩素化エチレン類のうち、テトラクロロエチレン（PCE）はドライクリーニング溶剤、トリクロロエチレン（TCE）は金属や半導体部品の脱脂洗浄剤等の用途で広く使用された。しかしながら、PCE や TCE そのものおよびその分解中間生成物であるシス-1,2-ジクロロエチレン（cDCE）等による土壌・地下水汚染が、国内外問わず深刻な問題となっている。また、平成 29 年 4 月に土壌汚染対策法の有害物質として追加されたクロロエチレン（別名：塩化ビニルモノマー、VC）は、自然環境中で分解され難いことに加え、上述の塩素化エチレン類よりも高い毒性があり、厳しい基準値（0.002mg/L）が設定されている。

塩素化エチレン類による汚染については、鉄粉やフェントン化剤を注入し浄化する化学的処理が多く採用されている。これらの処理法は高濃度汚染に対して効率的に浄化可能であるものの、低濃度汚染に対しては不向きである。また、生物機能を利用した生物的処理法（バイオレメディエーション）が近年注目されており、低濃度の汚染地に対して効率的に浄化可能な手法としてよく採用されている。バイオレメディエーションでは、特に微生物の物質変換能力を利用した 2 種類の手法が良く知られているが（図 1-1）、実際に我が国で使用されているのは、栄養剤等を投入し、汚染現場に生息する微生物を活性化させて対象物質を分解浄化する、バイオスティミュレーションがほとんどである。本法は、比較的簡便な手法である反面、分解浄化が土着の微生物に依存しているため、工期の長期化を引き起こしやすいことが主なデメリットである。もう 1 つの手法であるバイオオーグメンテーションは、分解微生物を栄養剤等とともに投入するものである。本法では、分解微生物自身や周辺環境に及ぼす影響等、事前に調査しなければならない項目が多く実用化へのハードルが高いが、達成することができれば、低濃度塩素化エチレン類汚染に対して非常に有効な浄化技術となり得る。

塩素化エチレン類を分解可能な微生物は、通気環境（酸素の有無）によって 2 種類に大別されるが（図 1-2）、通気性が悪い地下深度土壌中では、嫌気性細菌の *Dehalococcoides* 属細菌（デハロ菌）が良く取り上げられる<sup>1), 2), 3)</sup>。デハロ菌による塩素化エチレン類分解は図 1-3 に示す脱塩素によって進行するが、デハロ菌の種類によって分解可能な範囲や分解速度が異なっている。また、ほとんどのデハロ菌種で、VC の分解速度が比較的緩慢であることが知られており、実施したサイトでは VC が蓄積し問題となるケースが多い。

そこで本件では、塩素化エチレン類のうち、特に分解が困難な VC に着目し、迅速に分解可能な新規微生物を取得することを目的とした。また、得られた分解微生物のバイオオーグメンテーション利用を最終目標とし、必要な諸情報を実験によって収集した。

## 2. 実験手法

## 2.1 塩素化エチレン類分解菌の分離方法

愛知県某所の TCE 汚染サイトから採取した地下水に、TCE や cDCE、抗生物質を添加して継代培養した培養液を寒天培地に植菌し、塩素化エチレン類分解菌を分離した。

## 2.2 塩素化エチレン類の分解試験方法

得られた分解菌の塩素化エチレン類分解菌の分解活性は、分解菌と塩素化エチレン類を添加した容器内の気相部分（ヘッドスペース）を分取し、ガスクロマトグラフィーによって評価した。

ガスクロマトグラフ装置は Shimadzu GC 1024、検出器は水素炎イオン化検出器（FID）を使用した。ヘッドスペース成分は 100 $\mu$ L を分取し、ガスクロ装置へ注入した。ヘッドスペース成分は、DB-624 カラム（60m by 0.32mm, Agilent Technology）を用いて分離した。

(0039) Experimental discussions of bioaugmentation by *Dehalococcoides* strain.○ Kenta Yonezuka<sup>1</sup>, Daisuke Komatsu<sup>1</sup>, Masafumi Yohda<sup>2</sup>, Minoru Nishimura<sup>3</sup>(<sup>1</sup>EnBio Engineering, <sup>2</sup>Tokyo University of Agriculture and Technology, <sup>3</sup>EnBio Holdings)連絡先：〒101-0044 東京都千代田区鍛冶町 2-2-2 神田パークプラザ 8F (株)エンバイオ・エンジニアリング  
TEL 03-5297-7288 FAX 03-5297-0242 E-mail k\_yonezuka@enbio-eng.com

	バイオスティミュレーション	バイオオーグメンテーション
イメージ		
利用生物	主に微生物	主に微生物
投入資材	栄養剤	分解菌 + 栄養剤
運用手続	容易	面倒
運用期間	数年	数ヶ月～

図 1-1 バイオレメディエーションの種類と特徴

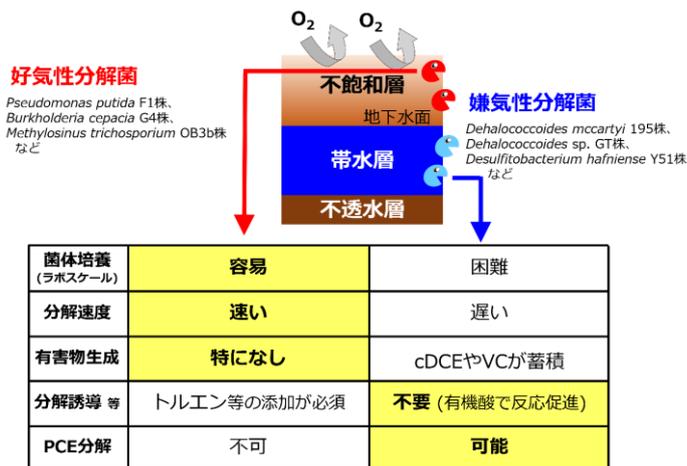


図 1-2 塩素化エチレン類分解菌の種類と特徴

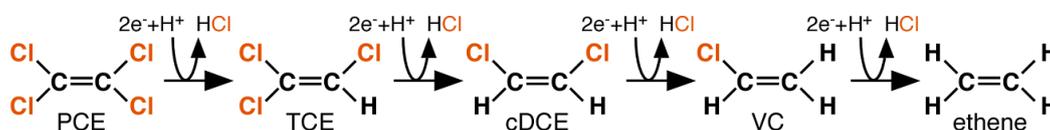


図 1-3 嫌気性分解菌による塩素化エチレン類の分解経路

## 2.2 DNA 抽出

培養液からの DNA 抽出は、ISOIL for Beads Beating Kit (日本ジーン) を用いた。抽出方法は、製品の取扱説明書に従って実施した。回収した DNA は、pH 8.0 の TE バッファーに懸濁し、次の実験で使用するまで -20°C で保存した。

## 2.3 *Dehalococcoides* 属細菌の定量的 PCR (qPCR)

塩素化エチレン分解菌であるデハロ菌の 16S rRNA 遺伝子および塩素化エチレン類分解酵素遺伝子 (*tceA*, *bvcA*, *vcrA*) の発現量を調査するために qPCR を実施した。qPCR 装置は StepOne™ real time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を使用した。16S rRNA 遺伝子、*tceA*、*bvcA* の定量は、TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた TaqMan™ 法で行った。*vcrA* の定量は、Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いた SYBR™ Green Dye 法で実施した。それぞれの実験は、製品の取扱説明書に従って実施した。

## 2.4 ゲノムシーケンス

分解菌群集 (コンソーシア) 中の菌叢を調査するために、ゲノムシーケンスを実施した。フラグメントライブラリーは、SOLiD™ Fragment Library Construction Kit を用いて作製し、ABI SOLiD 3 Plus sequencer (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンスした。

## 3. 実験結果

### 3.1 塩素化エチレン類分解菌 *Dehalococcoides mccartyi* UCH-ATV1 株の取得

愛知県某所の環境試料から、嫌気条件下で塩素化エチレン類を分解可能な微生物を分離した。16S rRNA 遺伝子配列から分解菌が *Dehalococcoides* 属細菌であることに加え、ゲノム配列中に塩素化エチレン類分解酵素遺伝子 (*tceA*, *vcrA*) が存在することも明らかにした。以上の結果から、取得した塩素化エチレン類分解菌を *Dehalococcoides mccartyi* UCH-ATV1 株 (以下 ATV1 株と略記) とし、以降の実験に使用した。

### 3.2 ATV1 株単独での cDCE 分解能

取得した塩素化エチレン分解菌である ATV1 株について、ATV1 株単独での cDCE 分解能を調査した。その結果を図 3-1 に示した。グラフからも明らかなように、cDCE 分解能は著しく低かったが、VC については増加傾向が見られた。

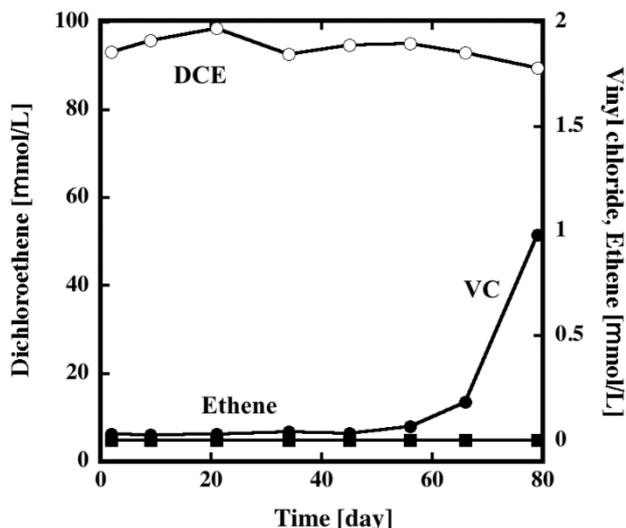


図 3-1 塩素化エチレン類分解菌 ATV1 株単独の cDCE 分解能

### 3.3 分解を向上する ATV1 株コンソーシアの構築

ATV1 株単独では塩素化エチレン類の分解が著しく低かったことから、ATV1 株の培養液に複数種の微生物を含むカクテルを添加し、分解活性を向上させるコンソーシアの構築を試みた。数回の継代培養によって得られたコンソーシアでの塩素化エチレン類の分解活性を調査し、その結果を図 3-2A にまとめた。分解基質である TCE は迅速に減少し、分解 10 日で完全に消失した。分解中間産物である cDCE および VC については、一時的な増加が見られたものの分解 10 日目にはほぼ完全に消失した。エチレンについては時間とともに増加傾向を示した。

構築したコンソーシアの組成について、ゲノムシーケンスにより調査した。16S rRNA 遺伝子を元に各コンソーシアの組成比率を図 3-2B にまとめた。主たる塩素化エチレン類分解菌である *Dehalococcoides* 属以外に、*Clostridium* 属、*Desulfovibrio* 属、*Petrimonas* 属の 3 属種の存在が認められた。

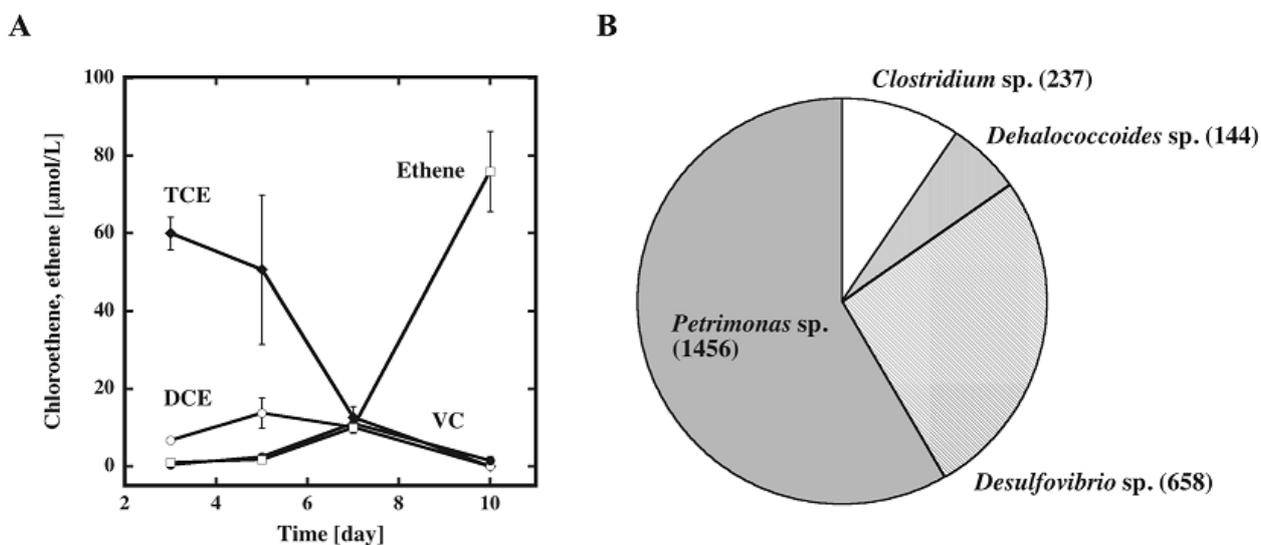


図 3-2 新たに構築した分解菌コンソーシアの諸特性。(A) TCE 分解能、(B) 16S rRNA 遺伝子に基づいた組成。

#### 4. 考察

本件では、塩素化エチレン類分解菌として、ATV1 株を含む分解菌コンソーシアを新たに取得した。得られたコンソーシアは、cDCE および TCE からエチレンまで完全に分解可能であったにも関わらず (Data not shown)、ATV1 株単独では分解速度の大幅な遅延と VC の蓄積が確認された (図 3-1)。以上の結果から、コンソーシア中の他種の微生物が、ATV1 株の塩素化エチレン類の分解や ATV1 株の生育等、何らかの補助をしていると考えられた。

塩素化エチレン類の分解能向上を目的として、単離した ATV1 株に複数種の微生物を含むカクテルを混合して構築したコンソーシアは、ATV1 株を分離する前のコンソーシアと同等レベルの分解能を示した (図 3-2A)。遺伝子配列レベルでコンソーシア中に存在する微生物を調査した結果、分解菌であるデハロ菌以外に 3 属種の微生物種が確認された (図 3-2B)。本研究では、塩素化エチレン分解における各々の役割について明らかにすることはできなかったが、公表論文等から下記の役割を担っているのではないかと考えられた：

##### (1) *Desulfovibrio* 属

硫酸を還元して硫化水素を生成する硫酸還元細菌である<sup>4)</sup>。デハロ菌の脱塩素は、低い還元電位を維持することが重要であることから、反応系を適切な酸化還元電位に調整しているのではないかと考えられる。また、コンソーシアの培養時に、硫化物に由来すると思われるコロニーの黒色化も観察されている (Data not shown)。

##### (2) *Petrimonas* 属

酢酸生成菌として知られている<sup>5)</sup>。脱塩素では、分解反応の促進を目的として、電子供与体である酢酸や乳酸等の有機酸を添加する機会が多い。この微生物によって生成された酢酸も、デハロ菌の脱塩素を補助していると考えられる。

##### (3) *Clostridium* 属

病原性を有するものや、アルコールや有機酸等を発酵生産するもの等が知られている。有機酸の生成は、上述の *Petrimonas* 属と同様に脱塩素の補助を担うと思われる。加えて、*Clostridium* 属の中には、塩素化エチレン類分解菌として報告されているものも存在するため<sup>6)</sup>、塩素化エチレン類分解を直接的に行っているかもしれない。

#### 5. まとめ・今後の展望

本件では、塩素化エチレン類に対して分解活性を持つコンソーシアから、新たに ATV1 株の分離に成功した。16S rRNA 遺伝子配列をはじめとする各種遺伝子解析により、ATV1 株が *Dehalococcoides* 属細菌であること、塩素化エチレン類の分解酵素をコードする遺伝子である *tceA* および *vcrA* を有していることを実験的に明らかにした。

ATV1 株単独では、塩素化エチレン類の分解能力が著しく低かったものの、複数種の微生物を含むコンソーシアの形で利用することで、より効率的に塩素化エチレン類の分解が可能であることも明らかにした。またこのコンソーシアは、cDCE や VC の一時的な蓄積は起こるものの、その後迅速に分解されるため、これらの化合物による二次汚染を起こさずに浄化可能である。このコンソーシアを浄化技術として確立するためには、さらに実験的知見を収集する必要があるが、特に VC を迅速に浄化可能な技術として、今後、汚染環境浄化の一助となることを期待したい。

#### 参考文献

- 1) Holliger C., Wohlfarth G., Diekert G. (1998) : Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria., *FEMS Microbiol Rev.*, 22, pp383-398.
- 2) Futagami T., Goto M., Furukawa K. (2008) : Biochemical and genetic bases of dehalorespiration., *Chem Rec.*,8(1), pp1-8.
- 3) Arp D.J., Yeager C.M., Hyman M.R. (2001) : Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene., *Biodegradation*, 12(2), pp81-103.

- 4) Postgate J.R., Campbell L.L. (1966) : Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria., *Bacteriol Rev.*, 30(4), pp732-738.
- 5) Grabowski A., Tindall B.J., Bardin V., Blanchet D., Jeanthon C. (2005) : *Petrimonas sulfuriphila* gen. nov., sp. nov., a mesophilic fermentative bacterium isolated from a biodegraded oil reservoir., *Int J Syst Evol Microbiol.*, 55(3), pp1113-1121.
- 6) Chang Y.C., Hatsu M., Jung K., Yoo Y.S., Takamizawa K. (2000) : Isolation and characterization of a tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH-1., *J Biosci Bioeng.*, 89(5), pp489-491.