

(S2-23) 塩素化 VOCs を対象としたコンソーシアを利用する

バイオオーグメンテーション法の開発

○小松大祐¹・米塚健太¹・養王田正文²，西村実³

¹エンバイオ・エンジニアリング・²東京農工大学・³エンバイオ・ホールディングス

1. はじめに

1.1 バイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーション

土壌汚染対策法における対策工法の一つにバイオレメディエーションがある。バイオレメディエーションは、低環境負荷、かつ低コストな工法の一つであり、優れた浄化工法の一つである。しかしながら、汚染物質を分解する主体が微生物であることから、微生物の存在量や微生物の活性を左右する環境要件によって、分解が進まないことや、基準適合まで長期間を要する等その性能が大きく影響されてしまう不安定な側面を持つ。そのため、バイオレメディエーションを上手く進めるためには、微生物の存在量や様々な環境パラメータ等をモニタリングしながら、適切に管理していくことが重要である。

バイオレメディエーションにはバイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーションの2つの手法がある。バイオスティミュレーションは薬剤のみを投入することで、土着の微生物活性化させる手法である。一方、バイオオーグメンテーションは分解性能が優れた微生物を薬剤と一緒に投入する手法である。バイオオーグメンテーションは、近年のDNA解析技術が進歩により、分解菌の全ゲノム解析等も行われており(Yohdaら2017)、安全性や高い分解能力がわかっている微生物等を投入することが可能であることから、バイオスティミュレーションと比較し、工期を短くできる可能性がある反面、投入した微生物が現場に適応できず、十分にその分解活性を維持できない場合がある。

1.2 *Dehalococcoides* 属細菌とそのコンソーシアについて

塩素化エチレン類の分解細菌として知られている *Dehalococcoides* 属細菌は独特の栄養要求性を持ち、成長も遅く、純粋培養時においては、様々な基質を与えないと塩素化エチレン類の分解ができない、もしくは非常に分解が遅いことが知られている(Heら2007)。

上記の性質から、*Dehalococcoides* 属細菌は環境中において、条件が適合したサイトにのみ偏在し、どこの土壌中にも遍在するわけではないため、*Dehalococcoides* 属細菌が存在しなかったり、著しく少ないサイトにおいては、バイオスティミュレーションを実施しても塩素化エチレン類の分解はほとんど起こらない。また、バイオオーグメンテーションを実施しても導入した *Dehalococcoides* 属細菌が土着菌との基質競争等にさらされることや *Dehalococcoides* 属細菌が環境条件に適用できない等の問題から、*Dehalococcoides* 属細菌がうまく機能し

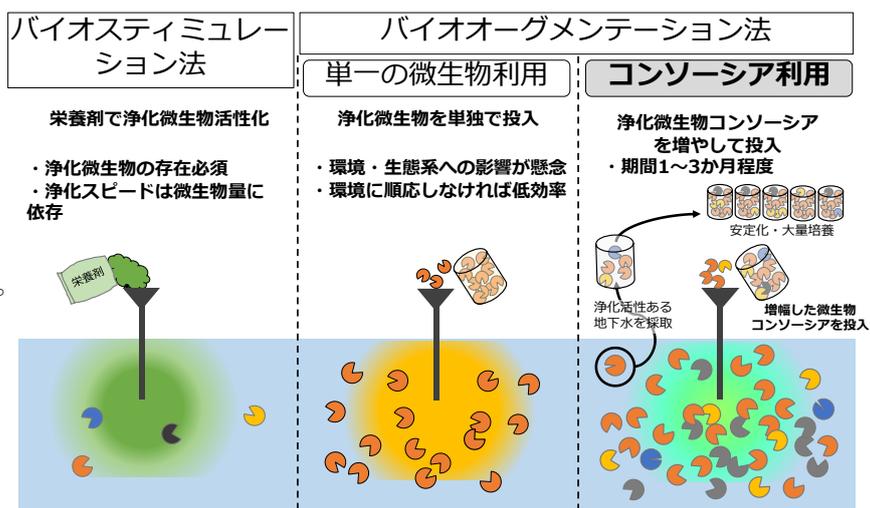


図1 本報告におけるバイオオーグメンテーション

Development of bioaugmentation using consortium capable of degrading chloroethene

Daisuke Komatsu¹, Kenta Yonezuka¹, Masafumi Yohda², Minoru Nishimura³

(¹EnBio Engineering, ²Tokyo University of Agriculture and Technology, ³EnBio Holdings,)

連絡先：〒101-0044 東京都千代田区鍛冶町 2-2-2 (株) エンバイオ・エンジニアリング

TEL 03-5297-7288 FAX 03-5297-0242 E-mail d_komatsu@enbio-eng.com

ない可能性も考えられる。そこで、筆者らは上述の問題点を解決するため、*Dehalococcoides* 属細菌をいくつかの他の細菌と共培養し、塩素化エチレン類の分解菌コンソーシアを作成した（図 1）。このコンソーシアは *Dehalococcoides* 属細菌の純粋培養時における場合と比較し、圧倒的に塩素化エチレン類の分解が早く、*Dehalococcoides* 属細菌の増殖が早い。これは、*Dehalococcoides* 属細菌以外の細菌が *Dehalococcoides* 属細菌を主に基質面等からサポートしているためと考えられている。このコンソーシアを使えば、元々 *Dehalococcoides* 属細菌が存在しない環境中はもちろんのこと、様々な環境中に対して、*Dehalococcoides* 属細菌の単一菌を導入する場合よりも確実に早い塩素化エチレン類の分解が可能になると考えられる。

さらに 2017 年 4 月からクロロエチレンが土壌汚染対策法における対象物質に追加された。クロロエチレンはテトラクロロエチレンやトリクロロエチレン等を対象とした嫌氣的なバイオレメディエーションの分解過程で生成される分解生成物であり、クロロエチレンがエチレンにまで完全に分解されるまで措置完了とならない。従って、法改正によってバイオレメディエーションによる措置完了のハードルは非常に高くなったといえる。しかしながら、本コンソーシアはクロロエチレンの分解活性も非常に高いことがわかっており、クロロエチレンに対しても非常に有効であることが示されている。以降は、筆者らが作成に関わった塩素化エチレン類の嫌気分解コンソーシアについて報告する。

2. 材料と方法

2.1 *Dehalococcoides* 属細菌の単離

愛知県内某所の TCE 汚染サイトより採取した地下水について、TCE や cis-DCE を添加し、抗生物質を入れながら、継代培養を行った。その後、寒天培地にて培養し、*Dehalococcoides* 属細菌の単離を行った。単離した細菌は脱塩素化酵素の有無を PCR によって調べ、*tceA* と *vcrA* を持っていることを確認し、*Dehalococcoides mccartyi* UCH-ATV1（以降、ATV-1 株とする）とした。

2.2 ATV-1 コンソーシアの作成

先行研究（養王田ら 2014）によって、蓮池の底泥を接種源とし、cis-DCE を添加して継代培養を繰り返すことで、*Dehalococcoides* 属細菌を含む cis-DCE をエチレンにまで完全に分解する IBARAKI コンソーシアを取得した。このコンソーシアについて塩素化エチレン類を除いた培地において数代継代培養し、*Dehalococcoides* 属細菌を除いたコンソーシアを作成した。その後、*Dehalococcoides* 属細菌を除いた IBARAKI コンソーシアに ATV-1 株を加え、ATV-1-IBARAKI コンソーシアを構築した。ATV-1-IBARAKI コンソーシアの中で、最も *Dehalococcoides* 属細菌の脱塩素化を促進しているものとして、*Desulfovibrio* 属細菌が考えられたことから、*Desulfovibrio* 属細菌のコロニーを単離して ATV-1 株との混合培養系を構築し、ATV-1 コンソーシアとした。

2.3 コンソーシアの解析

IBARAKI コンソーシアは 16SrRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE を実施し、主な構成細菌を解析した。ATV-1 コンソーシアは PCR-DGGE、および、次世代シーケンサー（SOLiD 3 Plus (Thermo Fisher Scientific)）により、メタゲノム解析を行い、すべての構成細菌を特定した。

2.4 分解性能試験

塩素化エチレン分解の分解は、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 μ 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。

3. 結果と考察

3.1 IBARAKI コンソーシアと ATV-1 株

取得された IBARAKI コンソーシアについて、cis-DCE 分解能及び PCR-DGGE の結果について、図 2 に示す。IBARAKI コンソーシアは 20 日程度で cis-DCE をエチレンにまで完全に脱塩素化する能力を持つ。また、PCR-DGGE のそれぞれのバンドから DNA 抽出・解析した。IBARAKI コンソーシアの主な構成細菌を DGGE のバンド横に示す。IBARAKI コンソーシアには *Dehalococcoides* 属細菌として *Dehalococcoides mccartyi* の近縁種が確認された。また、それ以外にも主に 2 種の優先種が存在していることが明らかになった。

cis-DCE の集積培養を行うことで、IBARAKI コンソーシアにおける cis-DCE の分解能力は徐々に高まり、安定してきたことから、今回検出された *Dehalococcoides* 属細菌以外の 2 細菌は、cis-DCE の脱塩素化に何らかの関わりがある可能性が高いと考えられた。

一方、全くの別サイトから単離された ATV-1 株は、純粋培養においては塩素化エチレン類の脱塩素化が非常に遅いこともわかっており、過去の報告 (Men ら 2012) 等を踏まえ、この IBARAKI コンソーシアの *Dehalococcoides* 属細菌と ATV-1 株を用いて、ATV-1-IBARAKI コンソーシアを作成した。その分解性能を図 3 に示す。結果から、TCE の完全脱塩素化は確認されたものの、エチレンまでの完全脱塩素化までは至らなかった。この結果を受け、さらにシンプルかつ ATV-1 株の脱塩素化を促進させることを目的として、元の IBARAKI コンソーシアの中で優先していた 2 種のうち、*Dehalococcoides* 属細菌の脱塩素化を促進していると推定された *Desulfovibrio* 属細菌を単離して、ATV-1 株との混合培養系を作成し、ATV-1 コンソーシアとした。

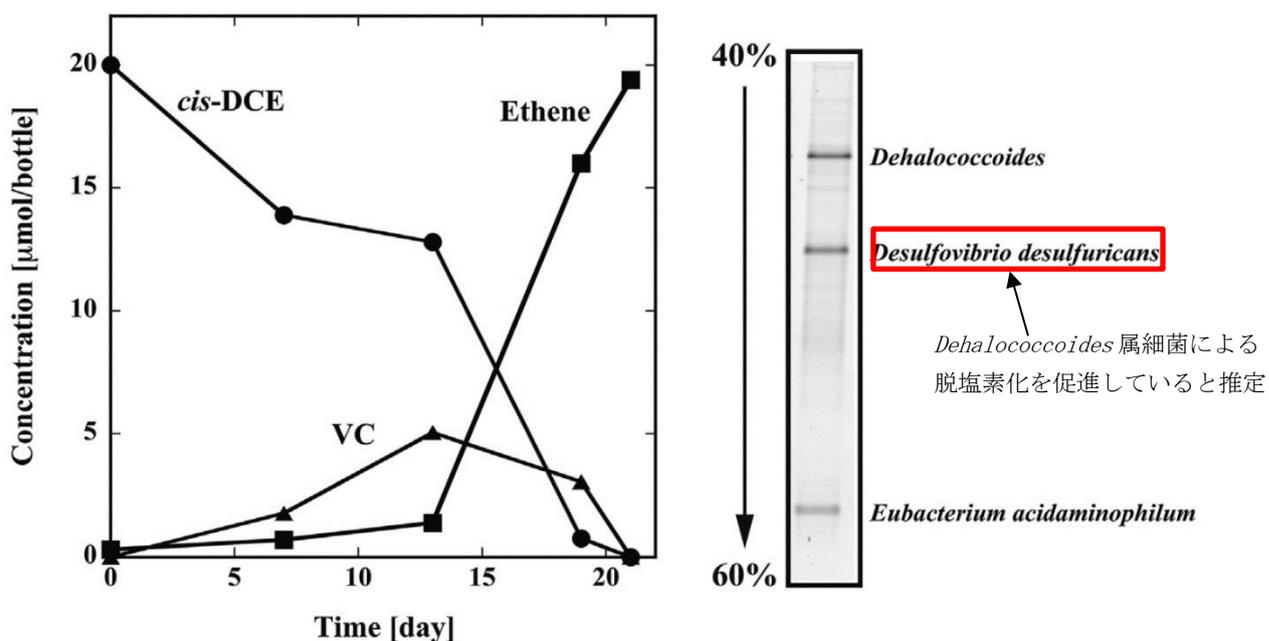


図 2 IBARAKI コンソーシアの塩素化エチレン類分解性能と菌叢解析結果

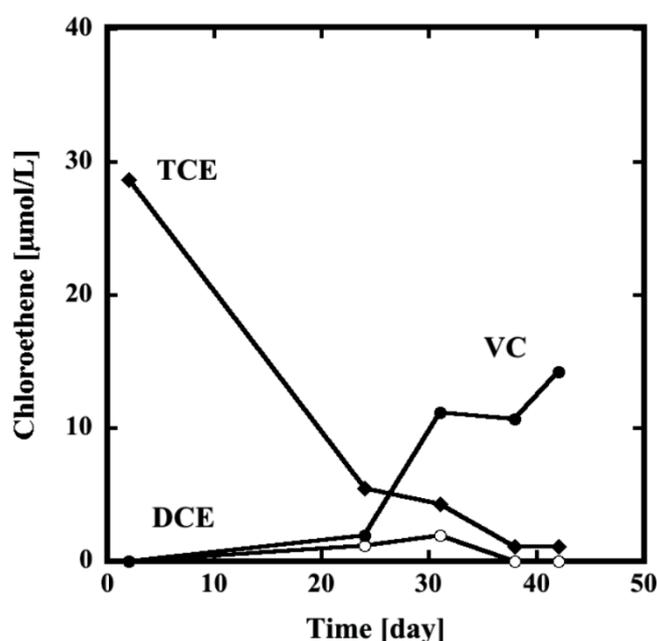


図 3 ATV-1-IBARAKI コンソーシアの塩素化エチレン類分解性能

3.2 ATV-1 コンソーシアについて

ATV-1 コンソーシアの塩素化エチレン類脱塩素化性能及びメタゲノム解析の結果を図4に示す。

結果から、ATV-1 コンソーシアは試験室レベルでおよそ $60 \mu\text{mol/L}$ (約 8mg/L) の TCE をわずか 10 日程度でほぼ完全エチレンにまで脱塩素化する能力を有することがわかった。

しかしながら、PCR-DGGE 解析で意図的に導入した *Desulfovibrio* 属細菌以外の細菌が新たに 2 種類確認された。この 2 種はこれまでの IBARAKI コンソーシアの PCR-DGGE 解析でも未確認であったことから、PCR によるバイアスやそもそも菌数が少なかった等の理由から、IBARAKI コンソーシアの PCR-DGGE 解析では検出されなかったと考えられる。

最終的に次世代シーケンサーによるメタゲノム解析によって、ATV-1 コンソーシアの組成を確定した。

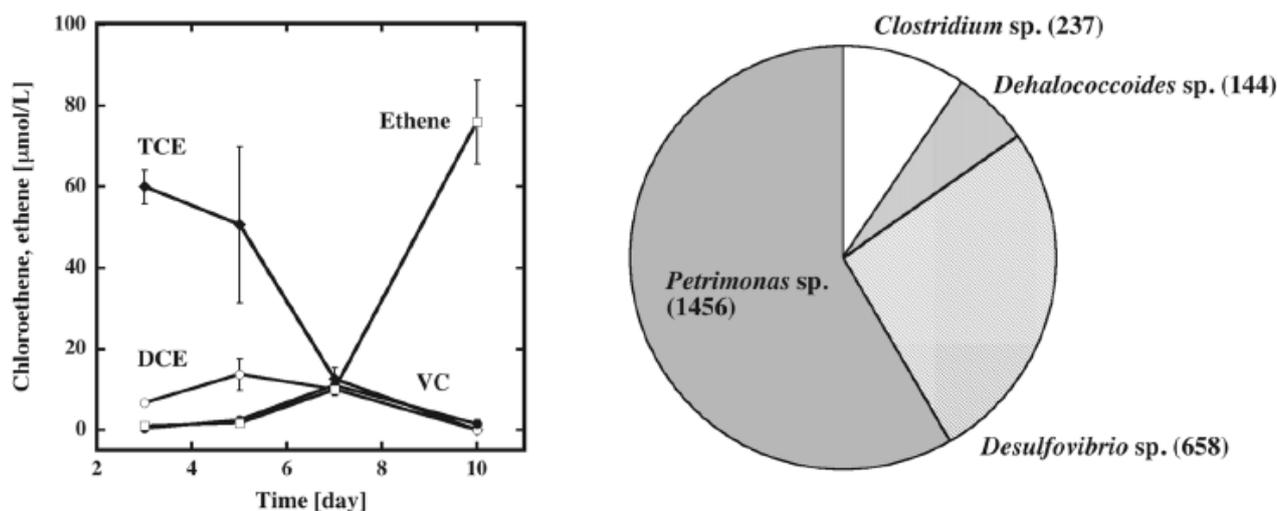


図4 ATV-1 コンソーシアの塩素化エチレン類分解性能と菌叢解析結果

5. まとめ

本研究により優れた分解性能を有する ATV-1 コンソーシアを取得することができ、また、その組成も明らかとなった。今後は ATV-1 コンソーシアのバイオレメディエーション利用指針取得とともに、実汚染サイトの試料を用いた室内試験、実サイトへの試験施工を経て、実用化する予定である。

なお、ATV-1 コンソーシアの構成細菌の詳細や解析詳細についても今後、実施予定である。

参考文献

- 1) He J. Z., Holmes V. F., Lee P. K. H., Alvarez-Cohen L. (2007): Influence of vitamin B₁₂ and cocultures on the growth of *Dehalococcoides* isolates in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2847–2853.
- 2) Masafumi Yohda, Osami Yagi, Ayane Takechi, Mizuki Kitajima, Hisashi Matsuda, Naoaki Miyamura, Tomoko Aizawa, Mutsuyasu Nakajima, Michio Sunairi, Akito Daiba, Takashi Miyajima, Morimi Teruya, Kuniko Teruya, Akino Shiroma, Makiko Shimoji, Hinako Tamotsu, Ayaka Juan, Kazuma Nakano, Misako Aoyama, Yasunobu Terabayashi, Kazuhito Satou, and Takashi Hirano (2015): Genome sequence determination and metagenomic characterization of a *Dehalococcoides* mixed culture grown on cis-1,2-dichloroethene, *J Biosci Bioeng* **120**, 69-77.
- 3) Masafumi Yohda, Kentaro Ikegami, Yuto Aita, Mizuki Kitajima, Ayane Takechi, Megumi Iwamoto, Tomomi Fukuda, Noriyoshi Tamura, Junji Shibasaki, Seiji Koike, Daisuke Komatsu, Sakari Miyagi, Minoru Nishimura, Yoshihito Uchino, Akino Shiroma, Makiko Shimoji, Hinako Tamotsu, Noriko Ashimine, Misuzu Shinzato, Shun Ohki, Kazuma Nakano, Kuniko Teruya, Kazuhito Satou, Takashi Hirano, Osami Yagi (2017): Isolation and genomic characterization of

a *Dehalococcoides* strain suggests genomic rearrangement during culture, *Scientific Reports* 7, Article number: 2230.

- 4) Men Y. J., Feil H., VerBerkmoes N. C., Shah M. B., Johnson D. R., Lee P. K. H., West K. A., Zinder S. H., Andersen G. L., Alvarez-Cohen L., (2012): Sustainable syntrophic growth of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 with *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and *Methanobacterium congolense*: global transcriptomic and proteomic analyses. *ISME J.* **6**: 410–421.