

(S1-25) *Dehalococcoides mccartyi* UCH-ATV1 を用いた バイオオーグメンテーション実用化のための研究

○小山幹太¹、小川貴弘¹、米塚健太^{2,3}、和知剛²、西村実²、養王田正文¹
(¹農工大・院工、²エンバイオ・エンジニアリング、³製品評価技術基盤機構(現))

1. 背景および目的

我々は、以前、愛知県内のトリクロロエテン (TCE) 汚染サイトより採取した地下水から、TCE をエチレンまで脱塩素化する微生物コンソーシアを構築した。この Aichi コンソーシアは非常に高い分解能を有していたが、比較的多種類の菌が共存していた。その後、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターの内野佳仁氏により、Aichi コンソーシアから *Dehalococcoides* 属細菌の単離が行われ、*D. mccartyi* UCH-ATV1 と命名された¹⁾。単離された *D. UCH-ATV1* は、TCE の完全な脱塩素化に必要な脱塩素酵素のコードする遺伝子である *tceA* と *vcrA* を保有していた。しかし、単離した *D. UCH-ATV1* の増殖は遅く、バイオオーグメンテーションに利用することは不可能であった。一方、矢木修身先生らは、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ていた²⁾。PCR-DGGE および次世代 DNA シーケンサーによる解析により、IBARAKI コンソーシアには *Dehalococcoides* 属細菌以外に *Desulfovibrio* 属と *Clostridium* 属の微生物のみが存在することが示された。そこで、IBARAKI コンソーシアの共存菌を分離し、ATV1 との共培養を行ったところ、高い分解能を有するコンソーシア (ATV1 コンソーシア) の構築に成功した¹⁾。ATV1 コンソーシアは、昨年 9 月 1 日に、微生物によるバイオレメディエーション利用指針に適合していることが確認された。本発表では、本コンソーシアを用いたバイオレメディエーション実用化のためのデータを紹介する。

2. 実験手法

2.1 菌叢解析

培養が終了した ATV1 株コンソーシアの培養液から、ISOIL for beads beating (ニッポンジーン) を用いてゲノム DNA を抽出し、Illumina HiSeq X による 16SrRNA メタゲノム解析を行った。データベースとの比較解析により、属または種レベルまでの分類同定を実施した。なお、分類の指標となる基準株と比較するため、基準株情報のみが登録されたデータベースである、EzTaxon Database (<https://www.ezbiocloud.net/>) を使用した。利用指針の解説の記載に従い、基準株との配列相同性が 98.5% 以上であった場合は基準株と同じ属名および種名を、95.0 以上 98.5 未満であった場合は属名のみをコンソーシアの全構成種に付与した。

2.2 汚染現場の土壌・地下水を用いた室内分解試験

塩素化エチレン類で汚染された土壌に、栄養剤として乳酸ナトリウムおよび酵母エキス、分解微生物として ATV1 株コンソーシアの培養液を添加した。本事業の実施が想定される現場の温度は 15°C 前後であるが、

Study on practical application of *Dehalococcoides mccartyi* UCH-ATV1 for bioaugmentation

Kanta Koyama¹, Takahiro Ogawa¹, Kenta Yonezuka^{2,3}, Tsuyoshi Wachi², Minoru Nishimura² and Masafumi Yohda¹

(¹Tokyo Univ of Agriculture and Technology, ²Embio-Engineering, ³National Institute of Technology and Evaluation)

連絡先: 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16 国立大学法人 東京農工大学 小山幹太

TEL 042-388-7479 FAX 042-388-7479 E-mail kanta.koyama@yohda.net

ここでは、分解の有無を短期間で比較するために、30℃で実施した。塩素化エチレン類の分解については、試料調製直後、および 10、20、30 日後での塩素化エチレン類の濃度測定結果より評価した。濃度計量は、環境省が定める土壤汚染対策法に基づく告示に従い、計量証明事業登録された分析機関が実施した結果を使用した。

2.3 ATV1 株コンソーシアを使用した塩素化エチレン類の室内分解試験

ATV1 株コンソーシアの培養液を用いた 15℃または 30℃における TCE の室内分解試験を実施した。TCE の初期濃度および温度に関する想定は、表 1 の通りである。TCE およびその分解生成物である *cis* DCE、VC、エチレンは、ヘッドスペースガスクロマトグラフィー法によって測定した。試験系に存在する各物質の濃度は、測定結果およびヘンリー定数を用いて算出した。試験は各条件について 2 連で行い、両データの平均値を算出した。

表 1 試験条件の想定

	設定値	想定
TCE 濃度	10μM (≒1.3mg/L)	本事業で最も適用頻度が高いと想定される濃度
	150μM (≒20mg/L)	本事業の適用できる最大想定濃度
培養温度	30℃	ATV1 株コンソーシアの分解活性の至適温度
	15℃	適用現場の平均の地中温度

3. 結果

3.1 ATV1 コンソーシアの菌叢解析

ATV1 コンソーシアは開発から長期間安定に保存されていた。当初の解析では、*D. mccartyi* UCH-ATV1 以外に *Desulfovibrio*, *Petrimonas* 及び *Clostridium* の 3 種類の菌が同定されていた。そのうちの *Petrimonas* 属細菌については、ゲノム配列が決定され、*Petrimonas sulfuriphila* Ibaraki と命名されている³⁾。しかし、長期培養の過程で微量に存在した微生物が増えた可能性があるため、NGS による菌叢解析を行った。その結果、2 種類の微生物がさらに存在することが明らかになった。微生物の分類同定結果を表 2 に示した。2 種については、基準株との配相同性が低く、種レベルまで分類同定を行うことができなかった。以前 *Clostridium* と同定されていた菌は、*Sedimentibacter* と同定された。

上記以外に、検出下限値以下の共生菌がごく微量に存在している可能性もあるため、現場では、コンソーシアの構成種および TCE の分解活性を確認した上で使用する

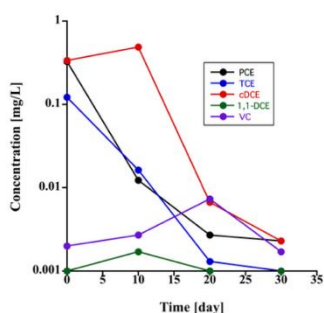
表2 ATV1 株コンソーシアの各構成種の分類同定に関する情報

コンソーシア中での役割	コンソーシア中での名称	基準株との配列相同性	最も高い配列相同性を示した基準株
塩素化エチレン類の分解	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> UCH-ATV1 (ATV1株)	100%	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195株
分解活性向上に寄与 (詳細な機能は不明)	<i>Actinotalea fermentas</i>	99.70%	<i>Actinotalea fermentas</i> M株
	<i>Deslfovibrio desulfuricans</i>	99.60%	<i>Deslfovibrio desulfuricans</i> Essex6株
	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> IBARAKI株	99.70%	<i>Petrimonas sulfuriphila</i> BN3株
	<i>Proteiniclasticum. sp</i>	95.30%	<i>Proteiniclasticum ruminis</i> D3RC-2株
	<i>Sedimentibacter. sp</i>	96.30%	<i>Sedimentibacter acidaminivorans</i> MO-SEDI株

3.2 汚染現場の土壌・地下水を用いた室内分解試験

塩素化エチレン類の濃度推移を図1に示す。この土壌は、PCE、TCE及びcis-DCEで汚染されていたが、ATV1コンソーシアにより30日後にはTCE、cis-DCE、VCの全てで浄化目標値以下となった。ATV1コンソーシアはPCEの脱塩素化はできないが、PCEの脱塩素化が可能な土着微生物が、添加した栄養剤によって活性化されたことに起因すると考えられる。また、1,1-DCEが中間生成物として確認されたが、分解されている。

図1. 各条件での塩素化エチレン類の濃度推移



3.3 ATV1 株コンソーシアを使用した塩素化エチレン類の室内分解試験

ATV1コンソーシアは30°Cで培養され、高いクロロエチレン分解活性をしめしている。しかし、バイオオーグメンテーションで実用化するためには、地下水の温度で十分な活性を示すことが必要である。そこで、30°Cと15°CでTCE分解の室内分解試験を行った(図2)。30°Cでは、10及び150µMのTCEを2週間以内で完全に脱塩素化した。一方、15°Cでは、30°Cと比較して分解は遅いが、2月程度で完全に脱塩素化できていた。

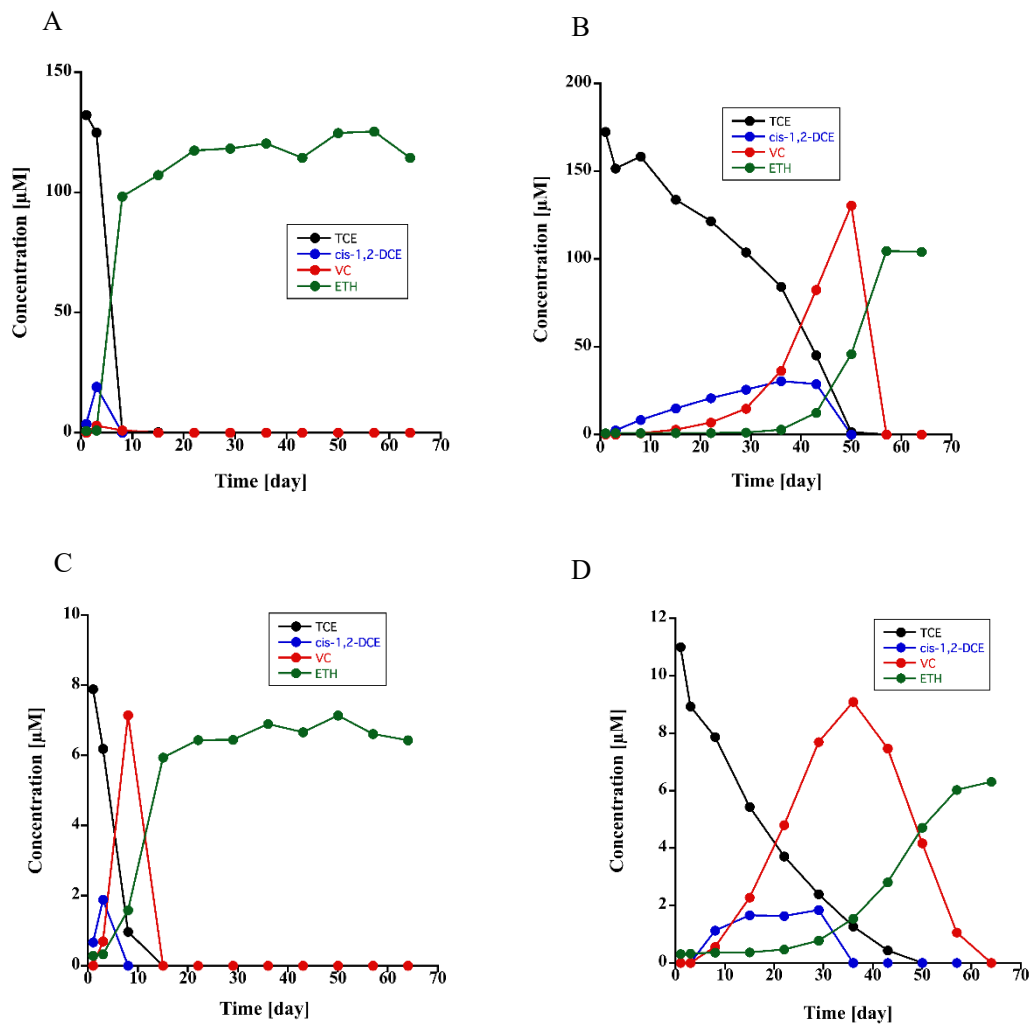


図 2. 各濃度での室内分解試験結果

(A: TCE 濃度 150 μ L · 培養温度 30°C、B: TCE 濃度 150 μ L · 培養温度 15°C

C: TCE 濃度 10 μ L · 培養温度 30°C、D: TCE 濃度 10 μ L · 培養温度 15°C)

4. まとめ

ATV1 コンソーシアが安定に高い TCE 分解能を有することが示された。特に VC を完全に分解できることは特筆に値する。共存菌の安全性も確認されている。土着の微生物と協調することで PCE の完全な脱塩素化が可能である。バイレメ指針に適合したことから、ATV1 コンソーシアを用いた浄化事業を進めたいと考えている。

参考文献

- 1) Yohda M, et al (2017): Isolation and genomic characterization of a *Dehalococcoides* strain suggests genomic rearrangement during culture. Sci Rep. 7:2230.
- 2) Yohda M, et al (2014): Genome sequence determination and metagenomic characterization of a *Dehalococcoides* mixed culture grown on *cis*-1,2-dichloroethene. J Biosci Bioeng. (2015) 120:69-77.

3) Ikegami K, et al (2018): Complete Genome Sequence of *Petrimonas* sp. Strain IBARAKI, Assembled from the Metagenome Data of a Culture Containing *Dehalococcoides* spp. Genome Announc.: e00384-18. doi: 10.1128/genomeA.00384-18.