

塩素呼吸をする PCE 脱塩素細菌による嫌気バイオオーグメンテーションを目指して

Towards for Anaerobic Bioaugmentation by Halorespiration of PCE-Dechlorinating Bacterium

倉根隆一郎*, 鈴木 伸和, 塚越 範彦
RYUICHIRO KURANE*, NOBUKAZU SUZUKI, NORIHIKO TSUKAGOSHI
上中 哲也, 坂井 斉之, 江崎 聡
TETSUYA UENAKA, MASAYUKI SAKAI and SATOSHI EZAKI

株式会社クボタバイオセンター 〒301-0852 茨城県竜ヶ崎市内向陽台5-6

* TEL: 0297-64-7211 FAX: 0297-64-7217

* E-mail: rkurane@kubota.co.jp

Biotechnology Reserch Center, KUBOTA Corporation, 5-6, Koyodai Ryugasaki City, Ibaraki, Japan

キーワード: テトラクロロエチレン (PCE), 嫌気, 塩素呼吸, バイオオーグメンテーション, 脱塩素化細菌
Key words: tetrachloroethene (PCE), anaerobic, halorespiration, bioaugmentation, dechlorinating bacterium

(原稿受付 2005年9月20日/原稿受理 2005年10月23日)

1. はじめに

有機塩素系化合物は国内外で土壌・地下水汚染を引き起こしているが、これらの中でもテトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) などの塩素化エチレン類は、工業的な使用量も多く、汚染事例として数多く報告されている。日本における環境基準値は PCE 0.01 mg/l, TCE 0.03 mg/l に設定されているが、とりわけ PCE は好気条件下で安定であることから PCE 好気分解菌はこれまでに報告されておらず、比較的生分解の難しい汚染物質として位置付けられる。しかしながら、1997年にコーネル大学で PCE を電子受容体としてエチレンまで嫌気条件下で脱塩素化可能な微生物として *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195株が報告された^{3,4,6)}。これを契機にして、さまざまな有機塩素化合物を脱塩素化する *Dehalococcoides* 属細菌や脱塩素化遺伝子が報告されてきた^{1,2,7,8)}。

これらの研究の進捗により、国内外にて PCE 等を対象とした嫌気単独処理方式による原位置バイオスティミュレーション技術が実用化されている。しかしながら、当該浄化手法は処理期間が長期に及ぶこと、より毒性の高い中間体 (*cis*-ジクロロエチレンや塩化ビニル) を蓄積すること、さらに前述した特定の *Dehalococcoides* 属細菌が生息する汚染サイトに限定されることなど多くの問題点を抱えており、未だ浄化手法として普及、浸透していないのが現状である。我々は、このような状況をブレイクスルーし、市場ニーズに的確に合致したバイオレメディエーション技術を確立するべく、嫌気 (微好気)/好気の微生物浄化機能をハイブリッドした「制

限通気式処理プロセス」を考案し、これに基づいて研究開発を推進した。その結果、実用化の要件を満たす強力な PCE 脱塩素化細菌の単離、同定、特性解析、処理プロセス評価などの基礎的検討課題を完遂し、制限通気式処理プロセスが実用化に十分に耐えうるものであることをラボ実験レベルで実証した。

本稿では、新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) による生物機能活性型循環産業システム創造プログラム「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発 (生分解プロジェクト)」より、株式会社クボタが委託を受けて技術開発を行った主な研究開発成果について以下に記述する⁹⁾。

2. 塩素呼吸をする PCE 強力脱塩素化細菌 *Desulfobacterium* sp. KBC1 株の分離・同定

2.1. PCE 脱塩素化コンソーシアの選抜

実用化可能な脱塩素化細菌の単離を目的として、処理プロセス上のハンドリングの容易さを考慮してある程度の酸素耐性 (微好気条件下で生育可能) を有する PCE 脱塩素化コンソーシアの選抜を行った。土壌、汚泥等からなる170サイトの各種環境試料を種菌源として、PCE を対象とした嫌気 (微好気) スクリーニングを実施した。その結果、PCE 脱塩素化能力を有する合計29種のコンソーシアを取得し、これらの中でも最も強力かつ安定した PCE 脱塩素化能力を示すダイコン畑表層土由来の PCE 脱塩素化コンソーシアを選抜した。

2.2. PCE 脱塩素化コンソーシアからの特定脱塩素化細菌の単離

前述した PCE 脱塩素化コンソーシア中の脱塩素化細菌は、寒天培地上でのコロニー形成能が弱い難分離性の嫌気性細菌であったことから、フローサイトメーターを利用した分離方法を試みた。選抜したコンソーシア中の生細胞を蛍光色素 CFDA (カルボキシフルオレセイン二酢酸) で染色し、フローサイトメーターを用いた直接分離を 2 回繰り返すことにより、コロニー形成を伴うことなく難分離性のコンソーシアから特定の脱塩素化細菌を単離することに成功した。最終的には、寒天培地上でコロニーを形成させ、各コロニーの 16S rDNA の塩基配列を解析して、単一菌であることを確認した (図 1)。

本分離手法が、従来法のコロニー分離法、薬剤耐性分離法、低温殺菌法、集積培養法等に比べ、極めて迅速かつ容易に難分離性の特定微生物の分離を成し得るものであること、ならびに嫌気微生物への適用が可能であることなどを実証した (嫌気微生物への適用は世界初)。

2.3. PCE 脱塩素化細菌の同定

フローサイトメーターで単離した PCE 脱塩素化細菌の 16S rDNA の塩基配列を決定し、さらに本菌の生理学的諸性質の結果と併せ、本菌株を *Desulfitobacterium* sp.

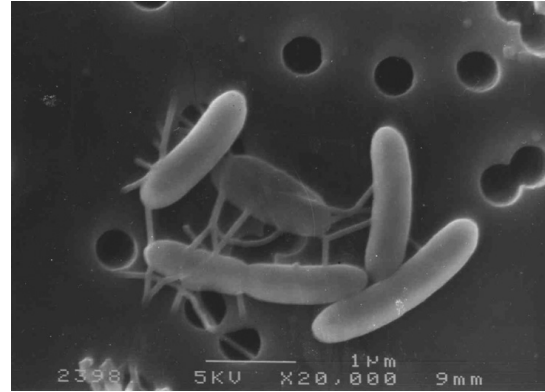


図 2. *Desulfitobacterium* sp. KBC1 株の電子顕微鏡 (SEM) 写真。

KBC1 株と命名した。図 2 に KBC1 株の電子顕微鏡写真、表 1 にバイオオーグメンテーションを行う上での特徴的な菌学的特性を示す。

3. PCE 脱塩素化細菌 *Desulfitobacterium* sp. KBC1 株の基本特性

KBC1 株は、以下の優れた特徴を有する実用性の高い嫌気性微生物であることをラボ実験レベルで明らかにし

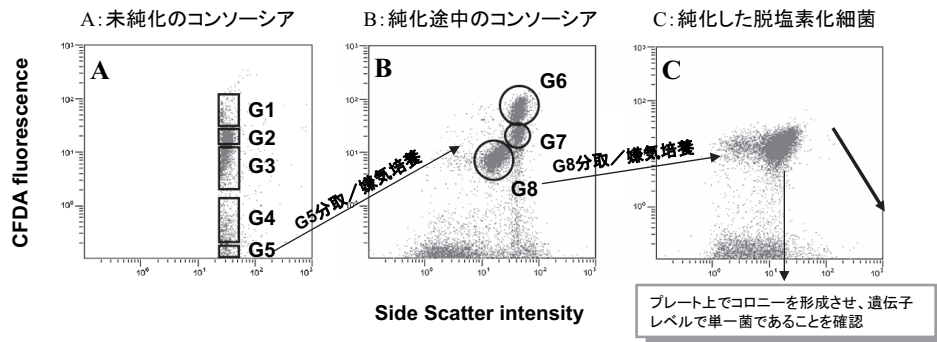


図 1. フローサイトメーターを利用した PCE 脱塩素化細菌の単離プロセス。

表 1. *Desulfitobacterium* sp. KBC1 株の菌学的性質

株の名称菌	<i>Desulfitobacterium</i> sp. KBC1
グラム染色	陽性
分離源	茨城県竜ヶ崎市内の非汚染畑土壌
形態	curved rod
大きさ (µm)	0.5×2.0–2.5
生育範囲 (温度 °C)	10–42 (実汚染サイトへの適用可能)
生育範囲 (pH)	7.0–9.0
電子供与体	ピルビン酸, 乳酸, ギ酸, 酪酸 (水素, エタノールは不可)
電子受容体	フマル酸, 亜硫酸, チオ硫酸, PCE (硫酸, 硝酸は不可)
酸素耐性	酸素耐性あり (ハンドリング容易)
PCE 脱塩素化活性	低濃度 (0.01 mg/l) から高濃度 (150 mg/l) の PCE を高速に TCE まで脱塩素化 酸素分圧0.5%の微好気条件でも脱塩素化可能 (現場適用性)

た。

1) 乳酸・酪酸・ピルビン酸などを電子供与体として、低濃度 (0.01 mg/l) から高濃度 (150 mg/l) の PCE を TCE にまで高速に脱塩素化し、分解過程において毒性の高い中間体である *cis*-ジクロロエチレン (*cis*-DCE)、や塩化ビニル (VC) を蓄積しない (世界最高水準の PCE 脱塩素化能力)。

2) 完全な嫌気条件下だけではなく、0.5%程度の酸素が存在するフェジーな微好気条件においても生育でき、通常の脱塩素化能力を発揮する (適用条件の拡大、実用的ハンドリング性)。

3) 既知の PCE 脱塩素化細菌に比べ、10°C 付近の低温度領域における脱塩素化能力に優れる (適用時期の拡大)。

4) 酸素耐性を有し、好気条件下においてもある程度の保存安定性を保持する (実用的ハンドリング性)。

4. PCE 脱塩素化細菌 *Desulfitobacterium* sp. KBC1 株を用いた処理プロセスの基礎検討

嫌気 (あるいは微好気) 条件と好気条件を交互に繰り返す「制限通気式処理法 (特許出願)」を適用することにより、高濃度の PCE (汚染水 60 mg/l) ならびに PCE/TCE 高濃度複合汚染を従来の嫌気単独処理法に比して 1/3 という短期間で完全分解できることをラボ試験レベルで実証した。図 3 に制限通気式処理法による PCE の完全無害化データを示す。

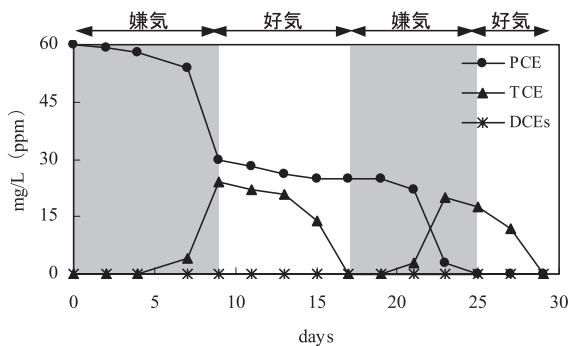


図 3. 制限通気式処理法による高濃度 PCE の無害化パターン。

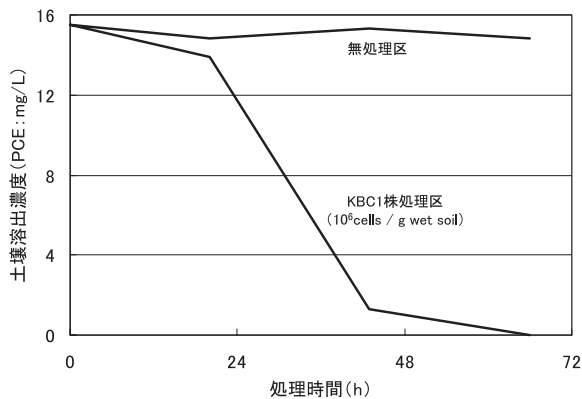


図 4. PCE 高濃度汚染土壌を対象にした KBC1 株による脱塩素化効果。

KBC1 株を用いた制限通気式処理法は、単に高濃度 PCE 汚染を高速に無害化するだけでなく、その分解過程において毒性の高い中間体である *cis*-DCE や VC を蓄積しないことを実証した (安全性の高い処理プロセス)。また、実際の PCE 汚染土壌を用いたラボ実験においても、上記モデル実験と同等の良好な効果を確認した。図 4 に PCE 実汚染土壌を用いた PCE 脱塩素化データを示す。この結果より、土壌中の土着微生物との競合が予想される条件においても、KBC1 株は高速に脱塩素化能力を発揮できることが明らかになった。

5. おわりに

制限通気式処理プロセスの強みは、特定の脱塩素化細菌 *Desulfitobacterium* sp. KBC1 株を投入することにより、毒性の高い中間体を蓄積することなく低濃度 (0.01 mg/l) から高濃度 (150 mg/l) の PCE 汚染を高速に無害化できる点にある (従来技術の 1/3 の浄化期間)。言い換えれば、バイオレメディエーションにおける短期間浄化と安全性の向上ならびに適用サイトの拡張を促進し、ひいてはリスクマネジメント強化と浄化終了後の土地の再利用促進を含めた産業基盤の活性化に寄与できる浄化技術であると考えられる。その一方で、制限通気式処理プロセスでは従来の嫌気単独処理法に新たに好気処理プロセスを付加する必要があることから、今後解決しなければならない技術的な課題も未だ残されている。

嫌気性微生物の環境修復事業への利用 (バイオオーグメンテーション) は世界的にも例は少なく、特にリスクマネジメントに関わる利用微生物の安全性評価や現場生態系への影響評価など、実用化に向けてのハードルは数多く残されているが、遺伝子レベルの微生物モニタリング技術を駆使することにより、効率的に実用化を促進することができると考えている。

謝 辞

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) から委託を受けて「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発」プロジェクトの一環として実施したものである。本紙面をお借りして関係各位に謝意を表します。

文 献

- 1) He, J., K.M. Ritalahti, K.-L. Yang, S.S. Koenigsberg, and F.E. Löffler. 2003. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* 424: 62–65.
- 2) Muller, J.A., B.M. Rosner, G. von Abendroth, G. Meshulam-Simon, P.L. McCarty, and A.M. Spormann. 2004. Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4880–4888.
- 3) Maymo-Gatell, X., T. Anguish, and H. Zinder. 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3108–3113.
- 4) Maymo-Gatell, X., Y. Chien, J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276: 1568–1571.

- 5) Tsukagoshi, N., S. Ezaki, T. Uenaka, N. Suzuki, and R. Kurane. 2005. Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. Appl Microbiol Biotechnol. (in press)
- 6) Seshadri, R., L. Adrian, D.E. Fouts, et al. 2005. Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. Science 307: 105–108.
- 7) Krajmalnik-Brown, R., T. Holscher, I.N. Thomson, F.M. Saunders, K.M. Ritalahti, and F.E. Löffler. 2004. Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6347–6351.
- 8) Futagami, T., Y. Tsuboi, A. Suyama, M. Goto, and K. Furukawa. High frequent deletion of tetrachloroethene (PCE) dehalogenase gene in *Desulfitobacterium* sp. Y51. June 18–22. 2004. 7th Int. Symp. Environ. Biotechnol. Chicago.