

嫌気性細菌群によるトリクロロエチレン脱塩素反応中における メタン生成細菌の影響

Effect of Methanogenic Activity on Trichloroethene Dechlorination by Anaerobic Microbial Consortium

伊勢孝太郎*, 須藤 孝一, 井上 千弘

KOTARO ISE, KOICHI SUTO and CHIHIRO INOUE

東北大学大学院環境科学研究科環境科学専攻 〒980-8579 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-20

* TEL: 022-795-7404 FAX: 022-795-7404

* E-mail: ise@er.kankyo.tohoku.ac.jp

Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, Aoba 6-6-20 Aramaki Aoba-ku 980-8579, Japan

キーワード: トリクロロエチレン, バイオレメディエーション, メタン生成

Key words: trichloroethene, bioremediation, methanogenesis

(原稿受付 2010 年 10 月 15 日 / 原稿受理 2010 年 12 月 6 日)

1. はじめに

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による土壌・地下水汚染のバイオレメディエーションの研究, 実施が盛んに行われているが, 多くのサイトにおいて *cis*-DCE や VC などの有害な物質が蓄積してしまうなどの問題がある。これは PCE から *cis*-DCE まで脱塩素することが出来る細菌は多数存在し, 比較的容易に増殖させることが出来るが, *cis*-DCE からエチレンへと脱塩素することが出来る唯一の細菌である *Dehalococcoides* sp. はその生理学的特性に不明な部分が多く活性化させることが困難なためであると考えられる。

Dehalococcoides sp. の特徴としては, ゲノム解析¹⁾ や単離株の培養などの研究²⁾ から, 電子供与体として水素のみを利用することや炭素源として酢酸を要求すること, 補酵素としてビタミン B₁₂ を要求することなどがわかっている。

水素は嫌気性微生物にとっては重要な物質であり, 多くの嫌気性細菌が電子供与体として利用するため, これらの細菌による競合が起こる。特に水素を電子供与体として利用する絶対嫌気性細菌のメタン生成細菌や硫酸還元細菌は生息域が共通であることから直接の競合相手となる。実験室レベルで試験を行う場合には硫酸イオンを除去することが出来ることから, もっぱらメタン生成細菌と脱塩素細菌の競合についての研究がなされてきた。メタン生成に特異的に作用する阻害剤である 2-Bromoethanesulfonate (BES) をもちいた実験においては, 脱塩素反応は阻害されるとの結果^{3,4)} や阻害は無いが脱塩素経路が変化する⁵⁾ などが報告されているのに対して, メタン生成条件において活発な脱塩素の報告がされてい

る⁶⁾。このことから, メタン生成細菌と脱塩素細菌との関係が単純な水素の競合ではないことがわかる。

本研究では脱塩素細菌のうち特に *Dehalococcoides* sp. とメタン生成細菌との関係を研究するため, 主に *Dehalococcoides* sp. のみが脱塩素可能とされている *cis*-DCE からの脱塩素実験を行った。嫌気環境に普遍的に存在するメタン生成細菌とクロロエチレン類の無害化に欠かすことの出来ない *Dehalococcoides* sp. との関係を明確にすることはバイオレメディエーションの最適な設計に非常に重要なことであると考えられる。

2. 脱塩素細菌に関する既往の研究

塩素化エチレンの嫌氣的脱塩素反応では, *cis*-DCE, 塩化ビニル (VC), エチレンへと脱塩素化される。この脱ハロゲン化反応の中間代謝産物のうち VC は TCE より毒性が強く発ガン性物質であるため, TCE の完全脱塩素化が求められている。嫌氣的脱塩素化は, ハロゲン呼吸による脱塩素化と連動してエネルギーを獲得する⁷⁾ ので, 共代謝のように増殖のための余分なエネルギーを獲得するための炭素源がいらないため効率がよく, 実用化が期待されている。

嫌氣的塩素化エチレンの脱塩素細菌は大きく二つのグループに分けられる。1つは還元的に TCE から *cis*-DCE へ脱塩素するグループで, 分類学的には Firmicutes 門の *Desulfitobacterium* sp., *Dehalobacter* sp. などがある。これら *Desulfitobacterium* 属で単離されているものには *Desulfitobacterium* sp. Y51 株⁸⁾ や, *Desulfitobacterium* sp. PCE-S 株⁹⁾ など, また *Dehalobacter* 属では *Dehalobacter restrictus*¹⁰⁾ などがある。これらの細菌は比較的速く TCE や PCE を *cis*-DCE へと脱塩素するものの, そ

の先の反応は全く起こらず *cis*-DCE が蓄積されてしまう。

もう一方は *cis*-DCE からさらに塩化ビニル (VC), エチレンへの脱塩素化が可能で、これらは分類学的に Chloroflexi 門, Dehalococcoidetes 科の *Dehalococcoides* 属細菌である。これら *Dehalococcoides* 属細菌は TCE のバイオレメディエーションの本命として多くの研究がなされているが、電子供与体としては水素のみを使用するなど条件が非常に限られていることから実験室での培養が難しい。これまで *Dehalococcoides ethenogenes* 195 株と *Dehalococcoides* sp. FL2 株¹¹⁾, *Dehalococcoides* sp. BAV1 株¹²⁾, *Dehalococcoides* sp. CBDB1 株¹³⁾, *Dehalococcoides* sp. GT 株¹⁴⁾, *Dehalococcoides* sp. MB 株¹⁵⁾ の 6 例のみが報告されるにとどまっている。これらの細菌について表 1 にまとめる。これらの単離株は論文として報告されてはいるものの、ATCC や DSMZ などの生物資源センターに正式に寄託された株は一つも無く、限られた研究グループにより独占されていることも研究を難しくしている。

また *Desulfitobacterium hafniense* TCE1 や *Dehalospirillum multivorans* などの発酵などによっても増殖可能な脱塩素細菌の倍加時間が 2~3 時間なのに対して、*D. ethenogenes* 195 や *D. restrictus* などの脱塩素のみで増殖している細菌の倍加時間が 19 時間となっており増殖速度に大きな違いがあることがわかる¹⁰⁾。

3. 脱塩素コンソーシアムの生態学的研究

TCE をエチレンまで無害化することが出来る微生物コンソーシアムとして KB-1¹⁶⁾ や ANAS¹⁷⁾ などが主に研究されている。これらに対する 16S rRNA を対象としたクローンライブラリー解析の結果、これらの微生物コンソーシアムの共通する特徴としては、*Dehalococcoides* sp. の存在が確認されていること。*Bacteroides* sp. や *Clostridium* sp. などの発酵性の細菌が大部分を占めていること。*Desulfitobacterium* sp. や *Dehalobacter* sp., *Geobacter* sp. などの PCE から *cis*-DCE までの脱塩素反応を行うことが出来る脱塩素細菌が存在していることがあげられる。また、*Acetobacterium* sp. などのホモ酢酸生成細菌なども検出される。TCE 脱塩素コンソーシアムにおける *Dehalococcoides* sp. などの脱塩素細菌の割合は多いものでは半数近く¹⁶⁾, 少ないものでは 1% 以下¹⁷⁾ となっており、脱塩素速度もバラツキが大きい。

塩素化エチレンのバイオレメディエーションにおいて、添加される有機物はまず、発酵性の細菌により水素

や酢酸、CO₂ などへと分解される。ここで生成された水素が脱塩素細菌やその他の水素資化性細菌により利用される。しかしながら、実際には *D. ethenogenes* 195 は嫌気消化槽の汚泥上澄み液などの未知の微量栄養素を要求することから¹⁸⁾, 単純な水素の供給だけでは、反応を進行させることは難しい。このため、その他の細菌からの相互作用の影響が大きいと考えられるが、これらの細菌は脱塩素反応のみを行う *Dehalococcoides* sp. や *Dehalobacter* sp. などを除くと嫌気環境中において普遍的に存在している細菌であり、これらの細菌が水素の受給以外にどのような関係を持っているのか不明な点が多い。

メタン生成細菌との関係についての研究もいくつか行われている。これらの研究では水素資化性メタン生成細菌の活動により水素に対する競合を引き起こすために脱塩素細菌の活動が阻害されるとの報告が大半である。図 1 にバイオレメディエーション時の *Dehalococcoides* sp. とメタン生成細菌の関係のイメージを示す。メタン生成を特異的に阻害するとされている BES を用いた実験では、脱塩素反応を阻害する効果などが報告されている^{3,9)}。

4. 実験に用いた TCE 脱塩素コンソーシアム

ここでは、我々が実際の TCE 汚染サイトから採取した地下水を用いて作成した TCE 脱塩素コンソーシアム

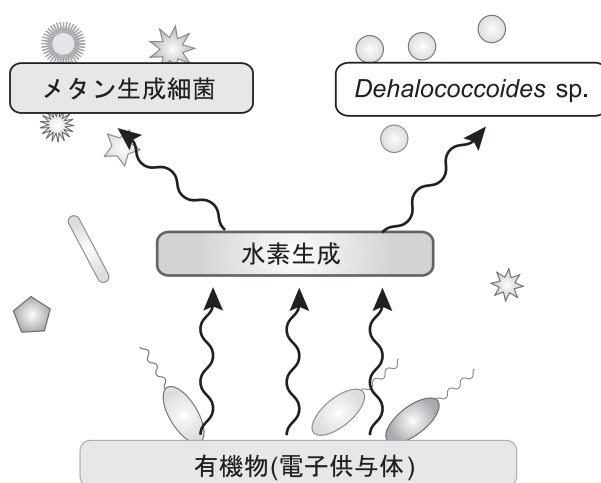


図 1. バイオレメディエーション時の脱塩素細菌とその他の細菌との水素の競合のイメージ。

表 1. 単離された *Dehalococcoides* 属細菌の代謝可能なクロロエチレン類

<i>Dehalococcoides</i> sp. strain	Metabolic electron acceptors	Chloroethenes cometabolized	Group ^a	Reference
195	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE	VC	Cornell	[2]
FL2	TCE, <i>cis</i> -DCE, <i>trans</i> -DCE	PCE, VC	Pinellas	[11]
BAV1	<i>cis</i> -DCE, <i>trans</i> -DCE, 1,1-DCE, VC	PCE, TCE	Pinellas	[12]
CBDB1	PCE, TCE	Not determined	Pinellas	[20]
GT	TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE, VC	None	Pinellas	[14]
MB	TCE → <i>trans</i> -DCE	Not determined	Cornell	[15]

^a Hendrickson らによる 16S rRNA 遺伝子の配列による分類¹⁹⁾

を用いた研究を紹介する。この汚染サイトでは、実際に微生物による TCE 分解実験が試みられていた。TCE の継代培養では、無機塩類に酵母抽出物と酢酸ナトリウムを添加した培地を用いて TCE を 0.076 (mmol/L) とするよう添加した。添加した TCE が全てエチレンへと脱塩素された後に同様な手順により継代培養を行った。添加した TCE は約 2 週間で *cis*-DCE、VC を経由してエチレンへと無害化された。脱塩素中は活発なメタン生成が見られた。

TCE を無害化することが出来たことから、*Dehalococcoides* sp. などの脱塩素細菌が存在するのではないかと考え、*Dehalococcoides* sp., *Desulfitobacterium* sp., *Dehalobacter* sp. について特異的なプライマーを用いて PCR を行ったところ、*Dehalococcoides* sp. と *Desulfitobacterium* sp. の存在が確認された。さらにこの微生物コンソシアムに対して、16S rRNA を対象としたクローンライブラリー解析を行ったところ、130 クローンの内のほとんどが *Trichococcus* sp. や *Bacteroides* sp. などの発酵性の細菌で構成されていることが確認された。また *Desulfitobacterium* sp. も検出されたが、*Dehalococcoides* sp. のクローンは検出されなかった。Real-time PCR を用いた定量分析の結果からは 1 ~ 10% の割合で存在しているものと考えられる。

5. *cis*-DCE の脱塩素挙動

Dehalococcoides sp. とメタン生成細菌との関係を調べるため、*cis*-DCE を添加して、脱塩素挙動を調べた。*cis*-DCE の脱塩素実験において、発酵により生成した水素は速やかに消費されて、そのほとんどがメタン生成に利用された。またメタン生成が起こった後に VC の生成がゆっくりと始まっている。このことから、メタン生成により多量の水素が消費されたことによって *cis*-DCE の脱塩素速度を著しく遅くさせていることが示唆された。そこで、メタン生活性を抑えるために、メタン生成に特異的な阻害剤である BES を添加して、脱塩素反応への影響を調べた。

BES を 2.0 mM 添加して脱塩素実験を行ったところ培養後 1000 時間を超えた時点においてもメタン生成は完全に抑制された。しかしながら、VC の生成は見られず *cis*-DCE の脱塩素反応も完全に阻害されてしまった。一方、BES の添加量を 0.2 mM に減らして同様の実験を行ったところ、初期のメタン生成は抑制されたが、200 時間以降、メタン生成が進行した後に VC の生成が見られ、*cis*-DCE の脱塩素反応が確認された。これらのことから、*Dehalococcoides* sp. による *cis*-DCE の脱塩素反応が起こる前にはメタン生成反応が起こる必要があることが示唆された。

6. *Methanosarcina mazei* (DSM No. 2053) の菌体懸濁液を用いた実験

メタン生成細菌の活動が脱塩素反応に影響を与えていることが示唆されたことから、脱塩素コンソシアム中のメタン生成細菌の優占種である *M. mazei* の菌体懸濁液を用いて、また、この効果が *Dehalococcoides* sp. に

必須の栄養とされているビタミン B₁₂ によるものかを評価するため、ビタミン B₁₂ についても脱塩素反応への影響を調べた。図 2 は *cis*-DCE の脱塩素実験を行った際の培養後 123 日後のエチレン生成量を示している。(A) は通常の培養条件で、(B) は通常の培養条件に *M. mazei* の懸濁液を添加したもの、(C) は通常の培養条件にビタミン B₁₂ を添加したもの、(D) は *M. mazei* の懸濁液とビタミン B₁₂ を添加したものである。*M. mazei* の懸濁液を添加した場合には明らかに脱塩素活性が上昇し、エチレンの生成量が増加している。またビタミン B₁₂ を添加した場合には通常の培養条件における結果と比較して、大きな違いは見られなかった。このことから、*M. mazei* の菌体の存在が *Dehalococcoides* sp. による脱塩素反応に影響を示していることがわかった。また、ビタミン B₁₂ を添加した場合においても、脱塩素速度には影響が見られなかったことから、*M. mazei* の脱塩素反応への影響がビタミン B₁₂ の供給のみではないことが示唆された。

7. おわりに

これまでメタン生成細菌と *Dehalococcoides* sp. との関係では、メタン生成細菌による水素の消費の問題から、メタン生成細菌の活動を抑えることで脱塩素反応を促進させる試みがされてきた。ところが本研究ではメタン生成反応が起こった後に脱塩素反応が進んでおり、メタン生成細菌と *Dehalococcoides* sp. との間に水素の競合以外の関係があることが示唆された。この効果に関しては、まだ検討の余地があるがメタン生成細菌の大半を占める *Methanosarcina* sp. の存在が大きく影響しているものと考えられる。*Methanosarcina* sp. はビタミン B₁₂ を比較的高濃度に蓄積するものとして知られていることから、*Dehalococcoides* sp. へのビタミン B₁₂ の供給源となっておりとも考えられる。しかしながら、*Methanosarcina* sp. の懸濁液を用いた実験の結果からはビタミン B₁₂ のみの影響ではないことが示唆された。既存の単離株である *Dehalococcoides ethenogenes* 195 株では合成培地に嫌気消化槽の汚泥上澄み液を添加することにより飛躍的に

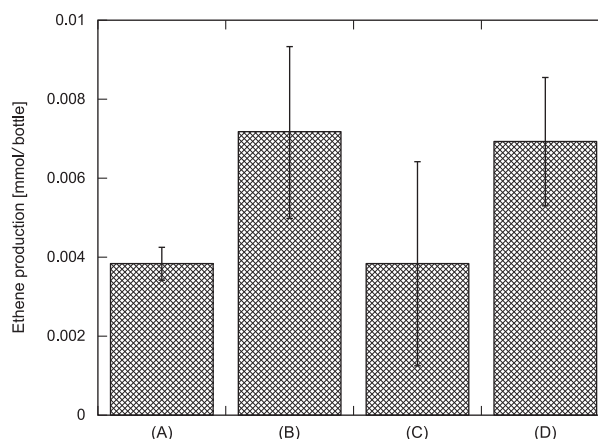


図 2. 培養後 123 日後のエチレン生成量。

(A) 通常の培養条件 (B) *Methanosarcina* 懸濁液を添加した系 (C) ビタミン B₁₂ (0.5 mg/L) を添加した系 (D) *Methanosarcina* 懸濁液とビタミン B₁₂ を共に添加した系

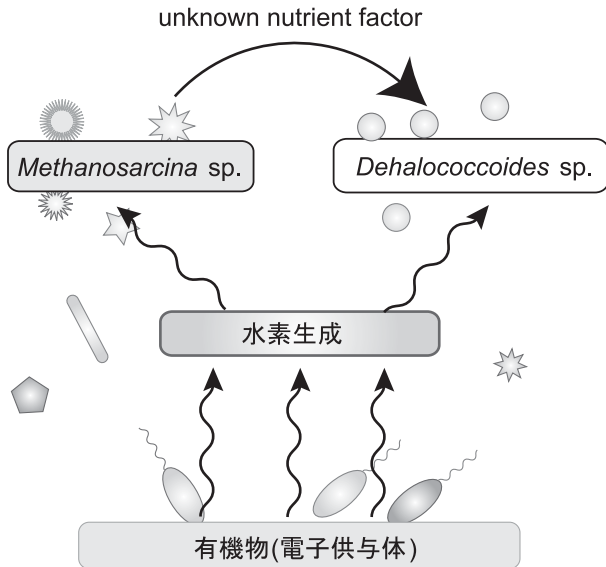


図3. 想定される *Dehalococcoides* sp. と *Methanosarcina* sp. との関係。

増殖速度が向上することが確認されていることから²⁾, *Methanosarcina* sp. から *Dehalococcoides* sp. に必須の栄養成分が供給されていると考えられる。これらのことから図3のような *Dehalococcoides* sp. と *Methanosarcina* sp. との関係が考えられる。しかしながら、どのような物質が供給されているかは、さらに研究を進めるなかで特定していく必要がある。

文 献

- Seshadri, R., L. Adrian, D.E. Fouts, J.A. Eisen, A.M. Phillippy, B.A. Methe, N.L. Ward, W.C. Nelson, R.T. Deboy, H.M. Khouri, J.F. Kolonay, R.J. Dodson, S.C. Daugherty, L.M. Brinkac, S.A. Sullivan, R. Madupu, K.T. Nelson, K.H. Kang, M. Impraim, K. Tran, J.M. Robinson, H.A. Forberger, C.M. Fraser, S.H. Zinder, and J.F. Heidelberg. 2005. Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides* ethenogenes. *Science* 307(5706): 105–108.
- Maymogatell, X., Y.T. Chien, J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276(5318): 1568–1571.
- Löffler, F.E., K.M. Ritalahti, and J.M. Tiedje. 1997. Dechlorination of chloroethenes is inhibited by 2-bromoethanesulfonate in the absence of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(12): 4982–4985.
- Ye, D.Y., J.F. Quensen, J.M. Tiedje, and S.A. Boyd. 1999. 2-bromoethanesulfonate, sulfate, molybdate, and ethanesulfonate inhibit anaerobic dechlorination of polychlorobiphenyls by pasteurized microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1): 327–329.
- Chiu, P.C. and M. Lee. 2001. 2-bromoethanesulfonate affects bacteria in a trichloroethene-dechlorinating culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5): 2371–2374.
- Bradley, P.M. and F.H. Chapelle. 1999. Methane as a product of chloroethene biodegradation under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 33(4): 653–656.
- Holliger, C., G. Wohlfarth, and G. Diekert. 1998. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 22(5): 383–398.
- Suyama, A., R. Iwakiri, K. Kai, T. Tokunaga, N. Sera, and K. Furukawa. 2001. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 65(7): 1474–1481.
- Miller, E., G. Wohlfarth, and G. Diekert. 1997. Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. *Arch. Microbiol.* 168(6): 513–519.
- Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss, and A.J.B. Zehnder. 1998. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Arch. Microbiol.* 169(4): 313–321.
- He, J., Y. Sung, R. Krajmalnik-Brown, K.M. Ritalahti, and F.E. Löffler. 2005. Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environ. Microbiol.* 7(9): 1442–1450.
- He, J.Z., 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(6944): 62–65.
- Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke, and H. Gorisch. 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Nature* 408(6812): 580–583.
- Sung, Y., K.M. Ritalahti, R.P. Apkarian, and F.E. Löffler. 2006. Quantitative PCR confirms purity of strain GT, a novel trichloroethene-to-ethene-respiring *Dehalococcoides* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3): 1980–1987.
- Cheng, D. and J.Z. He. 2009. Isolation and Characterization of “*Dehalococcoides*” sp. Strain MB, Which Dechlorinates Tetrachloroethene to trans-1,2-Dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(18): 5910–5918.
- Adrian, L., J. Rahnenführer, J. Gobom, and T. Holscher. 2007. Identification of a chlorobenzene reductive dehalogenase in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(23): 7717–7724.
- Duhamel, M. and E.A. Edwards. 2006. Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by *Dehalococcoides*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58(3): 538–549.
- Freeborn, R., K. West, V. Bhupathiraju, S. Chauhan, B. Rahm, R. Richardson, and L. Alvarez-Cohen. 2005. Phylogenetic analysis of TCE-dechlorinating consortia enriched on a variety of electron donors. *Environ. Sci. Technol.* 39(21): 8358–8368.
- Hendrickson, E.R., J.A. Payne, R.M. Young, M.G. Starr, M.P. Perry, S. Fahnestock, D.E. Ellis, and R.C. Ebersole. 2002. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout north America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2): 485–495.
- Maymogatell, X., V. Tandoi, J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1995. Characterization of an H₂-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinylchloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11): 3928–3933.