

## デハロコッコイデス属細菌の大量培養と野外注入

### The *Dehalococcoides*-containing Dechlorinating Mix Culture; Large-scale Production and Field Demonstration

奥津 徳也\*, 上野 俊洋  
NORIYA OKUTSU\*, TOSHIHIRO UENO

栗田工業株式会社 〒 329-0105 栃木県下都賀郡野木町川田 1-1

\* TEL: 0280-54-2609 FAX: 0280-57-2957

\* E-mail: noriya.okutsu@kurita.co.jp

Kurita Water Industries Ltd., 1-1, Kawada, Nogi-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0105, Japan

キーワード: 土壌・地下水汚染, トリクロロエチレン, バイオレメディエーション, *Dehalococcoides* 属細菌

Key words: contamination of soil and groundwater, trichloroethene, bioremediation, *Dehalococcoides*

(原稿受付 2017年3月24日/原稿受理 2017年4月19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) 等の塩素化エチレンはドライクリーニングの溶剤や金属の洗浄剤として使用されてきたが, 発ガン性や肝機能障害を誘発する可能性が指摘されており, 土壌・地下水汚染が社会問題となっている。

土壌・地下水汚染対策としては, これまで, 掘削除去や揚水処理が多く用いられてきたが, 掘削除去への偏重は, ブラウンフィールド問題の深刻化や搬出汚染土壌の不適正処理につながりかねない。平成 22 年 4 月には, 掘削除去偏重の是正をひとつの目的として, 改正土壌汚染対策法が施行されている。

一方, 微生物を用いた浄化技術 (バイオレメディエーション) は, 揚水処理に比べて浄化期間が短く, 掘削除去よりも低コストであることなどの理由から近年適用されるケースが増えている。バイオレメディエーションは, 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に大別される。前者は有機物や栄養塩等の増殖基質を供給して土着微生物を活性化するものであり, 後者は外来微生物を導入するものである。現在適用されているのは主としてバイオスティミュレーションであるが, 2005 年に経済産業省・環境省により「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」(以下利用指針と称する) が告示されたこともあり, バイオオーグメンテーションも徐々に普及しつつある。

当社は, 環境庁「平成 10 年度土壌汚染浄化新技術確立・実証調査」においてバイオスティミュレーションの現場実証を行い<sup>1)</sup>, その後数多くの現場で実用化を行っている<sup>2)</sup>。また, 2008 年 6 月には, 複合微生物系として初めて, 利用指針に対する適合確認を経済産業大臣・環境大臣から取得, これまでバイオオーグメンテーション

の現場適用を進めてきた。ここでは, 塩素化エチレン分解菌 (*Dehalococcoides* 属細菌) の大量培養と現場適用事例について紹介する。

#### 2. *Dehalococcoides* 属細菌による 塩素化エチレン分解

塩素化エチレン分解反応の概念図を図 1 に示す。嫌気条件下, テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) は, シスジクロロエチレン (*cis*-DCE), クロロエチレン (VC) を経て, エチレン<sup>3)</sup> やエタン<sup>4)</sup> に脱塩素化される。脱塩素化反応において塩素化エチレンは電子受容体となるが, 電子供与体としては, 有機酸<sup>4)</sup> やアルコール<sup>3)</sup>, 糖類<sup>5)</sup>, 酵母エキス<sup>5)</sup>, 有機酸エステル<sup>6)</sup>, 植物油<sup>7)</sup> 等の有機物や水素<sup>8)</sup> が利用できる。

多くの細菌が塩素化エチレン分解菌として単離され, その分解能力が調べられている。例えば, *Dehalospirillum multivorans*<sup>9)</sup>, *Enterobacter agglomerans* MS-1<sup>10)</sup>, *Dehalobacter restrictus* PER-K23<sup>11)</sup> は PCE や TCE を DCE に脱塩素化して増殖できる。しかし, 筆者の知る限り, エチレンまで完全に脱塩素化できる微生物として単離されているのは *Dehalococcoides* 属細菌 (DHC 菌) のみである。報告されている DHC 菌の塩素化エチレン分解能を表 1 に示した。CBDB1 株を除き, いずれの DHC 菌も塩素化エチレンの脱塩素化により増殖することができる。

#### 3. *Dehalococcoides* 属細菌を含む複合微生物系の 大量培養

バイオオーグメンテーションに利用するための分解微生物 (以下「利用微生物群」と称する) を取得するた

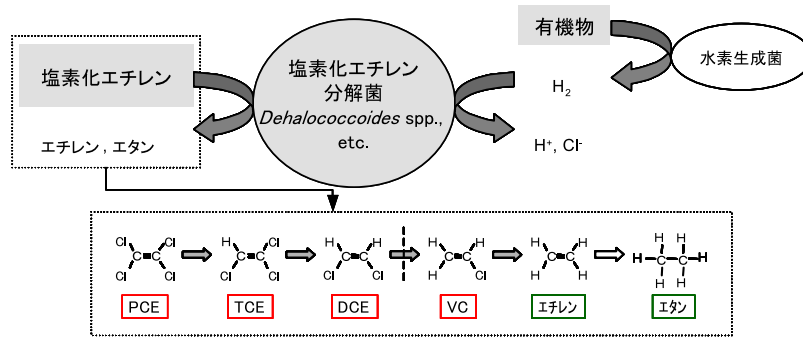
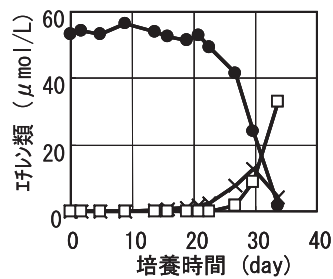
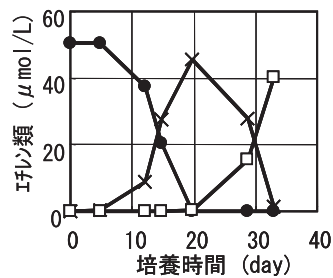


図1. 塩素化エチレン分解反応の概念図

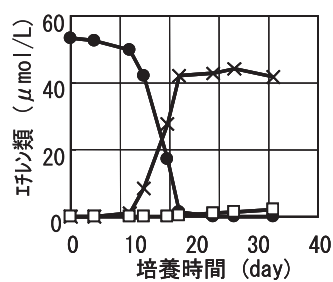
a) VC集積培養体によるcis-DCE分解



b) cis-DCE集積培養体によるcis-DCE分解



c) cis-DCE集積培養体によるcis-DCE分解 (ただしb)を継代培養したもの)



●-●-: cis-DCE, -x-x-: VC, -□-□-: エチレン

図2. VC集積体およびcis-DCE集積体によるcis-DCEの脱塩素化

表1. 報告されている Dehalococcoides 属細菌

菌株	PCE	TCE	cis-DCE	VC
195 株 <sup>14)</sup>	+	+	+	
VS 株 <sup>15)</sup>		+	+	+
BAV1 株 <sup>16)</sup>			+	+
CBDB1 株 <sup>17)</sup>	+	+		
GT 株 <sup>18)</sup>		+	+	+

“+”は脱塩素化により増殖できることを示す。

め、集積培養を行った。実際の現場では、自然状態で PCE や TCE が cis-DCE に変換され、cis-DCE が比較的高濃度に残留している場合が多く見受けられる。バイオオーグメンテーションの実用化には cis-DCE 以降の分解がより重要となるため、ここでは cis-DCE を確実にエチレンにまで脱塩素化する微生物群の取得を試みた。集積培養中、図2に示すように、cis-DCE で培養した場合、しばしば VC の脱塩素化能が失われることがあったため、最終的には VC で集積培養を行った(電子供与体は有機酸)。

その結果、Trichococcus pasteurii を優占種とし、DHC菌を含む培養体が得られた。この培養体から DNA を抽出し、3種の制限酵素 (BstU1, HhaI, Sau96I) を用いて T-RFLP 解析を行ったところ、図3 (BstU1 を用いた結果) に示すようにエレクトロフェログラムは単純な形態となった。また、利用微生物群にヒト病原体が存在しないことを確認するため、95種類の代表的ヒト病原体について特異的な遺伝子配列を対照とした定量 PCR を実施した。その結果、これらの該当遺伝子の濃度は定量下限値 (約 2.5 × 10<sup>2</sup> copies/mL) 未満であった。

これらの結果より、本「利用微生物群」は有意な数の病原性細菌を含まないことが明らかとなり、バイオオーグメンテーション利用の安全性を十分に確保できると考えられた。「利用微生物群」をろ過して Trichococcus pasteurii 等の細菌を除去し、DHC菌の比率を高めた試料の電子顕微鏡写真を示す(図4)。赤血球状の微生物が DHC菌であろうと考えている。

広範囲の帯水層を対象に DHC菌を利用したバイオオーグメンテーション技術を適用するには、より多くの培養液を生産する能力が必要である。実際に米国では、4000 L の発酵槽を用いた DHC菌の培養実績が報告されている<sup>12)</sup>。そこで、200 L 容量の発酵槽(図5)を用いた大量培養方法を開発した。培養の一例を図6に示す。

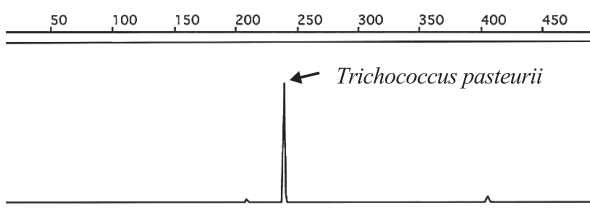


図3. VC集積培養体の T-RFLP 解析結果

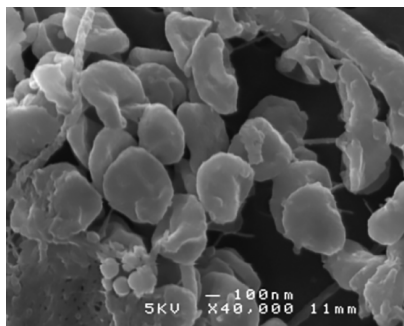


図4. 利用微生物群の電子顕微鏡写真



図5. 200 L 容量の発酵槽

約1%の植菌により、1カ月程度で150 Lの培養液を生産することが可能である。

#### 4. *Dehalococcoides* 属細菌を含む複合微生物系の野外注入

「利用微生物群」を用いたバイオオーグメンテーションは、小規模パイロット試験において、栄養剤のみを注入するバイオスティミュレーションよりも浄化期間が短縮できることが確認されている<sup>13)</sup>。ここでは、より広範囲でバイオオーグメンテーションを実施した事例を紹介する。

地下水中のPCE濃度0.01~0.5 mg/Lの範囲に培養液注入井戸（オーグメンテーション井戸）を5本設置した（図7）。全ての井戸には、深度GL-2~GL-10 m程度の帯水層に対してスクリーンを設置した。各オーグメンテーション井戸につき、各10 L（DHC菌16S rDNA：約 $1 \times 10^8$  copies/mL）、計50 Lの培養液を栄養剤とともに注入した。

MW-1におけるモニタリング結果を図8に示す。培養液および栄養剤の注入60日目までは、PCE濃度の増減が確認された。栄養剤注入2回目を実施した後（注入90日後）は、VCの分解生成物であるエチレン濃度が0.01 mg/Lに増加した。以降は、TOC濃度の低下に伴

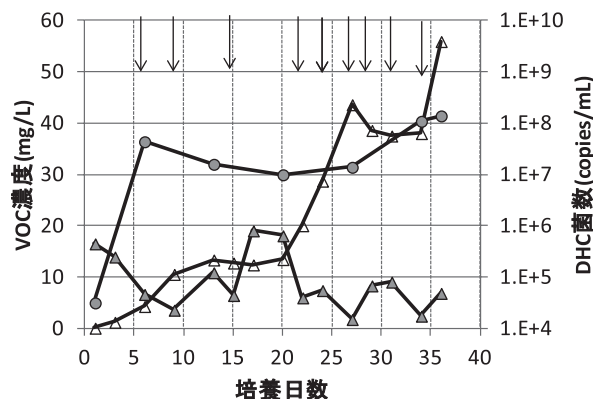


図6. 200 L 発酵槽における培養例  
 図中、▲：VC、△：エチレン、●：DHC菌の16S rRNA数を示す。  
 また、矢印はVCガスを追添加した時期を示す。

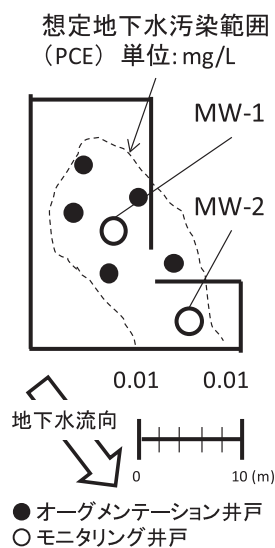


図7. PCEの汚染状況および井戸配置図

う一時的なPCE濃度のリバウンドが観測されたものの、注入210日後において、PCE、TCE、およびcis-DCE濃度が全て分析下限値（0.001 mg/L）未満にまで低下した。また、注入270日目においては、VC濃度も分析下限値（0.001 mg/L）未満にまで低下した。

DHC菌16S rDNAのコピー数は、施工前において10 copies/mL程度であった。培養液および栄養剤の注入を行った後は、速やかに増殖し、注入90日後には $1.0 \times 10^4$  copies/mL以上にまで増加した。

#### 5. おわりに

本稿では、当社における*Dehalococcoides*属細菌を含むコンソーシアムを利用したバイオオーグメンテーション技術に関し、大量培養方法と現場適用事例を述べた。大量培養方法の確立により、広範囲の汚染現場への適用が進められ、適用事例も10件を超えた。今後は、塩素化エチレンに限らず、様々な汚染物質に対して、バイオオーグメンテーション技術の活用が実現できるよう研究開発を進めていきたい。

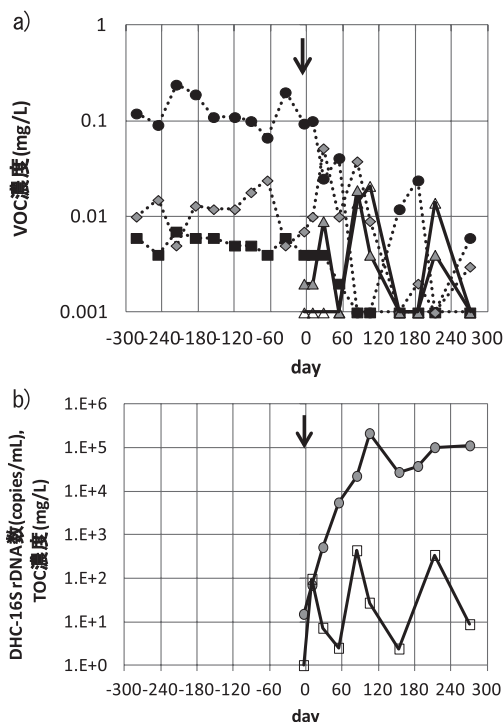


図8. バイオオーグメンテーション適用サイトにおけるモニタリング結果

a) VOC濃度の推移。●: PCE, ■: TCE, ◆: *cis*-DCE, ▲: VC, △: エチレン。b) DHC菌の16S rDNA数およびTOC濃度の推移。●: DHC菌の16S rDNA数, □: TOC濃度。

図中矢印は、培養液および栄養剤を注入した時期を示す。

## 謝 辞

本技術開発の一部はNEDOプロジェクト「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術開発」の一環として実施したものです。開発にあたって多岐にわたるご指導をいただきました東北学院大学工学部の中村寛治教授に心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治. 2002. 嫌気性微生物を用いたバイオレメディエーションの現場実証. 土壤環境センター技術ニュース. 4: 13-18.
- 2) 塩谷 剛, 上野俊洋, 石田浩昭, 橋本正憲. 2010. 嫌気性バイオレメディエーション法による塩化ビニルモノマー汚染地下水の浄化効果. 第16回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集. 612-615.
- 3) Freedman, D.L. and J.M. Gossett. 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2144-2151.
- 4) de Bruin, W.P., M.J. Kotterman, M.A. Posthumus, G. Schraa, and A.J. Zehnder. 1992. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1996-2000.
- 5) 小松俊哉, 桃井清至, 松尾友矩, 花木啓祐. 1995. *cis*-1,2-ジクロロエチレン分解嫌気性菌の集積培養. 水環境学会誌. 18: 396-404.
- 6) Koenigsberg, S.S., A. Willett, and P. Rohdenburg. 2004. Biological treatment of residual DNAPL with slow-release electron donor HRC-X. Proceedings of the fourth international conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. 2E-07.
- 7) Solutions-IES. 2006. Using the emulsified oil process. pp. 1-9. SERDP and ESTCP. Protocol for enhanced in situ bioremediation using emulsified edible oil (ER-0221). Arlington. USA.
- 8) DiStefano, T.D., J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1992. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3622-3629.
- 9) Neumann, A., H. Scholz-Muramatsu, and G. Diekert. 1994. Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. Arch. Microbiol. 162: 295-301.
- 10) Sharma, P.K. and P.L. McCarty. 1996. Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to *cis*-1,2-dichloroethene. Appl. Environ. Microbiol. 62: 761-765.
- 11) Holliger, C., D. Hahn, H. Harmsen, W. Ludwig, W. Schumacher, B. Tindall, F. Vazquez, N. Weiss, and A.J. 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: 313-321.
- 12) Vainberg, S., C.W. Condee, and R.J. Steffan. 2009. Large-scale production of bacterial consortia for remediation of chlorinated solvent-contaminated groundwater. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36: 1189-1197.
- 13) Okutsu, N., W. Tamura, M. Mizumoto, T. Ueno, H. Ishida, and T. Iizumi. 2012. Field demonstration of bioaugmentation in trichloroethene-contaminated groundwater. Water Practice & Technology. 7.
- 14) Maymó-Gatell, X., U. Chien, J.M. Gossett, and S.H. Zinder. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. Science. 276: 1568-1571.
- 15) Cupples, A.M., A.M. Spormann, and P.L. McCarty. 2003. Growth of a *Dehalococcoides*-like microorganism on vinyl chloride and *cis*-dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR. Appl. Environ. Microbiol. 69: 953-959.
- 16) 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.
- 17) Bunge, M., L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W.G. Lorenz, J.R. Andreesen, H. Görisch, and U. Lechner. 2003. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. Nature. 421: 357-360.
- 18) 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: 1980-1987.