

分解菌—メタン菌の共生関係強化によるクロロエチレン類の飛躍的 浄化技術の開発

Development of exponential remediation technologies for chloroethylenes used by strengthen symbiosis between degraders and methanogens

産業技術総合研究所 地質調査総合センター
研究員 吉川 美穂

（研究計画ないし研究手法の概略）

1. 背景および目的

2017年4月の土壤汚染対策法の改正により、クロロエチレン（VC）が特定有害物質に新たに追加された。これに伴い、既に特定有害物質として指定されてきたテトラクロロエチレン（PCE）やトリクロロエチレン（TCE）等の他のクロロエチレン類のみならず、土壌・地下水中の微生物がクロロエチレン類を逐次脱塩素化することで生成するVCも含めた完全浄化を短期間で実現する技術の確立が急務の課題である。本研究では、二価鉄添加により分解菌—メタン菌の共生関係を強化し、微生物による浄化期間の飛躍的な短縮化技術を開発することを目的とする。そのために、二価鉄濃度の最適化や二価鉄添加による微生物リスクの評価、さらなる浄化期間短縮化に向けた検討を行う。これまでの研究で報告者は鉄やメタン菌の含有量が高い汚染サイト地下水では汚染濃度が低いことを明らかとした¹⁾。また実験室内でも鉄添加により分解菌—メタン菌の共生関係を構築でき、クロロエチレン類の完全浄化に要する期間を40%以上短縮可能であることを初めて実証した。この知見を応用する本研究は非常に新規性が高く、浄化期間の短縮化という社会需要の高い研究となる。

2. 微生物コンソーシアムを用いたクロロエチレン類の室内浄化実験

2.1. 使用した微生物コンソーシアム

二価鉄濃度によるクロロエチレン類の嫌氣的脱塩素化の促進効果の違いを、実験室内で保有してきた微生物コンソーシアムを用いて検証した。微生物コンソーシアムは、国内の某汚染サイトの観測井から採取した地下水を接種源とし、リン酸緩衝液を基本とした培地と混合して作製した。ヘッドスペースはN₂とし、電子受容体には初期濃度30 mg/LのPCE、電子供与体には乳酸ナトリウムとイーストを用いた。20℃、暗所の培養器に静置して培養を行った。クロロエチレン類がエチレンまたはエタンに完全に脱塩素化したことを確認した後、新たな培地に1:5-11 (v:v)の比率で植え継ぎ継代培養を行った。なお、基本培地にも塩化鉄は含まれるため、微生物コンソーシアムの二価鉄濃度は0.6 mg/Lであった。

2.2 二価鉄濃度最適化のためのクロロエチレン類脱塩素化実験

2.2.1 実験条件

微生物コンソーシアム作製に用いた基本培地と同じ培地40 mLと5 mLの微生物コンソーシアムを50 mLバイアル瓶内で混合した。微生物コンソーシアムは継代培養12代目もしくは13代目のものを用いた。ヘッドスペースをN₂ガスで満たし密栓した。電子受容体には

初期濃度 30 mg/L の PCE、電子供与体として乳酸ナトリウムとイーストを添加した。二価鉄濃度を、塩化鉄(II)四水和物を用いて 0.5-200 mg/L に調整した。この濃度範囲は、クロロエチレン類で汚染された地下水で検出される濃度²⁾を基に決定した。さらに、メタン生成菌の脱塩素化への関与を確認するために、メタン生成を阻害する 2-ブロモエタンスルホン酸ナトリウム (BES) を添加した条件も作製し、この時の二価鉄濃度は 20 mg/L とした。バイアル瓶は 20℃、暗所の培養器内に静置した。

2.2.2 クロロエチレン類、エチレン、エタン、メタンの分析

バイアル瓶ヘッドスペース中のクロロエチレン類、脱塩素化生成物であるエチレン、エタン、およびメタンの濃度を GC-FID (GC-2014, Shimadzu) で経時的に分析した。得られた結果は、ヘンリー定数を用いて培養液中の濃度に換算した。

2.2.3 微生物叢の解析

実験期間中、経時的に培養液を 1 mL サンプルングし、DNA の抽出を行った。得られた DNA 抽出物は AMPure XP beads (Beckman Coulter) により精製し、細菌、古細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたアンプリコンシーケンス解析を実施した。具体的には、DNA 抽出物を 515F、806R のユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅し、さらにサンプルごとに異なるバーコード配列を付与するための 2nd PCR を行い、AMPure XP beads による再精製を行った後、次世代シーケンサー (Miseq, Illumina) により配列を読んだ。得られた配列を mothur および R のプログラムにより解析し、EzBioCloud 16S database を基に各配列の微生物系統分類を決定した。さらに、製品評価技術基盤機構が公開する微生物有害情報リスト³⁾と照らし合わせ、病原性が報告されている微生物の増殖の有無を確認した。

(実験調査によって得られた新しい知見)

1. クロロエチレン類の脱塩素化における二価鉄濃度の最適化

使用した微生物コンソーシアムにより、結果が異なった。継代培養 12 代目では、20-30 mg/L の二価鉄添加時が最も脱塩素化が速く進行し、30 mg/L の PCE をわずか 15 日でエチレンまたはエタンに完全に脱塩素化した (図 1)。実際の汚染現場では *cis*-ジクロロエチレン (*cis*-DCE) や VC の分解の遅延が課題となることが多いが、これらの塩素数の少ないクロロエチレン類の脱塩素化を 20-30 mg/L の二価鉄添加が促進することが本実験から示された。また、二価鉄濃度が 40 mg/L 以上では、二価鉄濃度が高くなるにつれ脱塩素化は遅延し、二価鉄による浄化阻害が生じることが明らかとなった。なお、クロロエチレン類の化学分解により生成するアセチレンが検出されなかったこと、滅菌コントロールでは脱塩素化が確認されなかったことから、本研究で示された脱塩素化は微生物によるものと考えられた。

一方、継代培養 13 代目では、二価鉄濃度 0.5-80 mg/L の範囲ではクロロエチレン類の脱塩素化速度に変化はなく、それ以上の濃度の条件下では脱塩素化が遅延した。このことは、継代培養 13 代目の微生物コンソーシアムでは、二価鉄の添加により増殖しクロロエチレン類の脱塩素化促進に寄与する微生物が十分に集積され、二価鉄添加による更なる効果が見られなかったことが原因だと考えられる。

以上の結果から、クロロエチレン類の嫌氣的脱塩素化は二価鉄濃度 20 mg/L が最適であ

ると結論付けた。ただし、今回用いた 13 代目の微生物コンソーシアムのように、脱塩素化に寄与する微生物が十分に集積された微生物叢においては二価鉄添加による脱塩素化促進効果が無い可能性があるため、事前の確認が必要である。

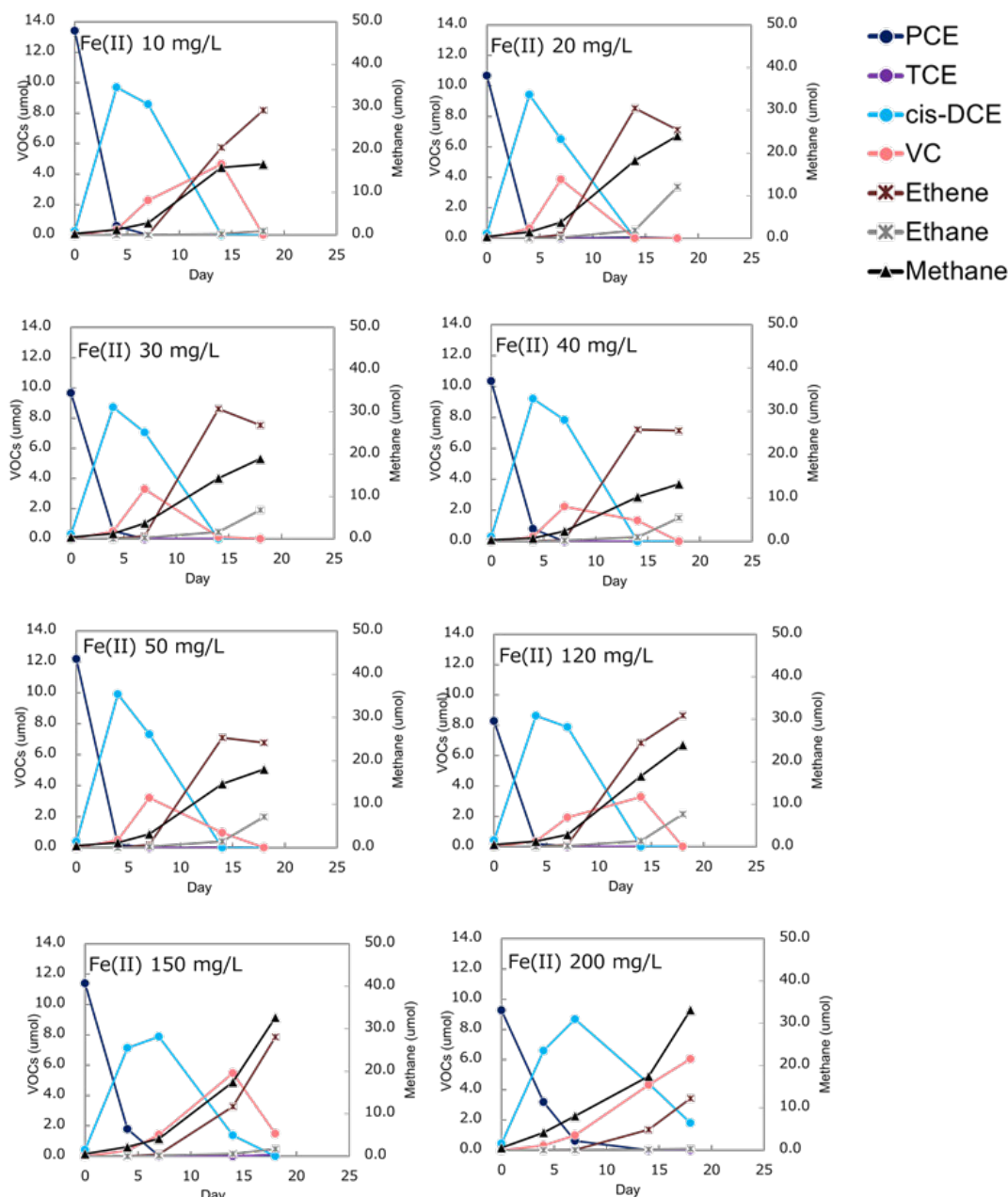


図 1 クロロエチレンの脱塩素化速度の二価鉄濃度による違い

微生物接種源として 12 代目の微生物コンソーシアムを用いた

2. 脱塩素化に寄与する微生物

上述の通り、継代培養 13 代目の微生物コンソーシアムでは二価鉄添加により増殖する微生物が十分に集積しており、脱塩素化を担う微生物とそれを促進する微生物の相互作用を解明しさらなる浄化促進条件を検討するのに適していると考えられたため、本コンソーシアムを用いた脱塩素化実験中の微生物叢を解析した。

二価鉄濃度や実験開始からの経過日数に関わらず各培養液を構成する主要な微生物は、*Parabacteroides*、*Romboutsia*、*Acinetobacter*、*Clostridium*、unclassified *Clostridiaceae*、であった（図 2）。*Parabacteroides* が 3.8-28.2%、*Romboutsia* が 3.8-13.5%、*Acinetobacter* が 18.8-59.7%、*Clostridium* が 3.7-15.9%、unclassified *Clostridiaceae* が 3.2-7.7% を占めた。unclassified *Enterobacteriaceae* の相対存在量は二価鉄濃度 160 mg/L で高かった。また、VC の脱塩素化が進行している 14 日目には Unclassified *Bacteroidales* や *Acetobacterium* が 7 日目と比較して 1.3% 以上高かった。クロロエチレン類を完全に嫌氣的脱塩素化することができる *Dehalococcoides*⁴⁾ は、いずれの培養液からも検出され、0.01-0.12% であった。VC の脱塩素化が報告されている *Dehalogenimonas*⁵⁾ が検出されなかったことから、本実験においてクロロエチレン類の完全脱塩素化を担う微生物は *Dehalococcoides* であると考えられた。なお、実験期間における病原性微生物の相対存在量の増加はみられず、二価鉄を添加することによる病原性微生物の増加リスクは低いと考えられた。

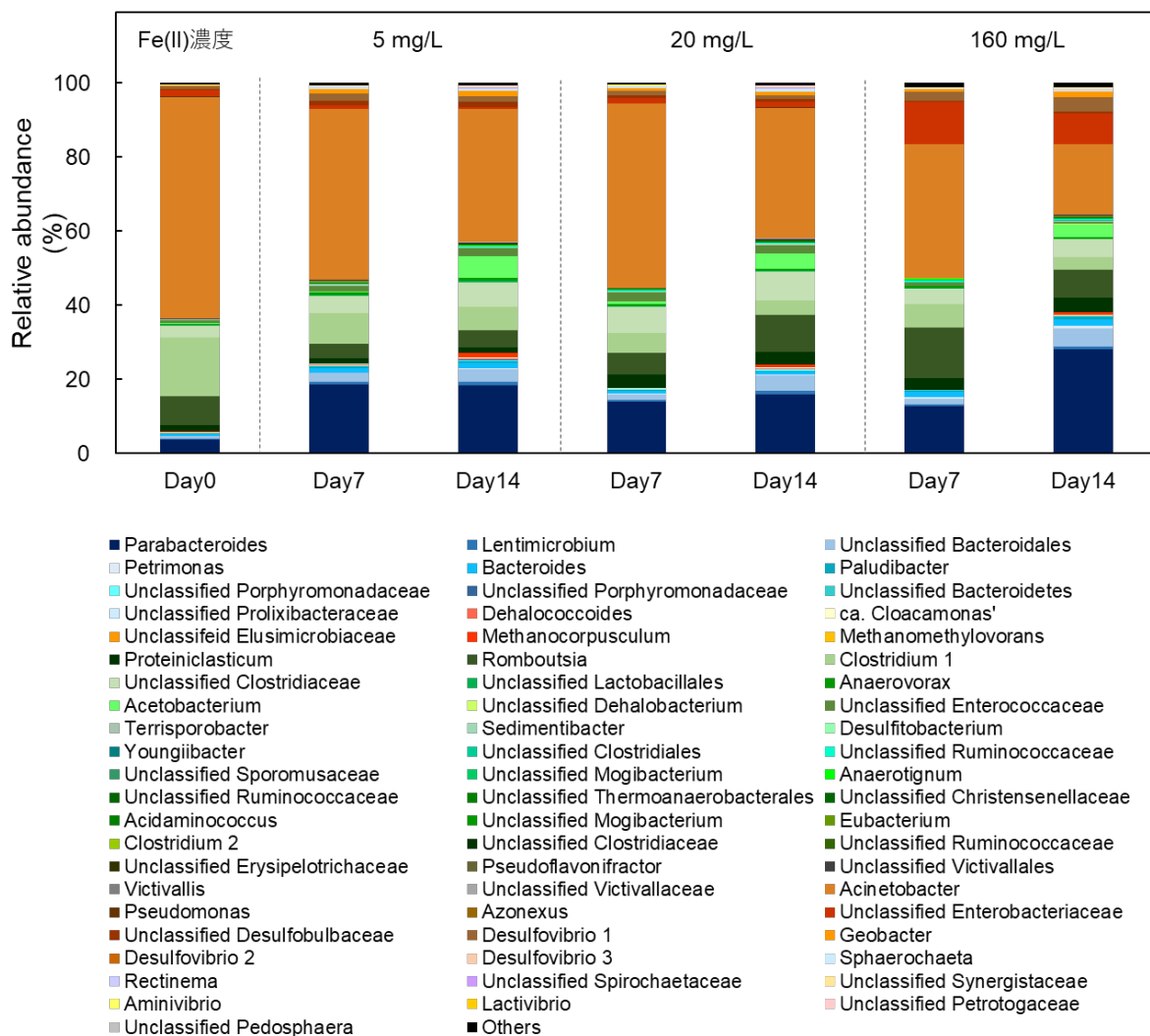


図 2 13 代目の継代培養を用いた脱塩素化実験における微生物の相対存在量
相対存在量は属レベルで表示

ネットワーク解析により、脱塩素化を担う *Dehalococcoides* に関連のある微生物の特定を試みた。SparCC プログラムによる解析で、*Dehalococcoides* と *Methanocorpusculum sinense*、*Acetobacterium wieringae*、*Bacteroidales* に関連があることが示唆された(図 3)。報告者の既往の研究¹⁾においても、二価鉄添加による脱塩素化促進に伴いメタン生成菌 *Methanocorpusculum sinense* が増殖することが確認されており、脱塩素化促進にメタン生成菌が関連している可能性を再確認した。*Acetobacterium wieringae* は水素と二酸化炭素から酢酸を生成する微生物であり⁶⁾、*Acetobacterium wieringae* が生成した酢酸を炭素源として *Dehalococcoides* が利用している可能性が推察された。また、脱塩素化に不可欠なコバラミンを合成している⁷⁾可能性も考えられた。コバラミン等のコバミドの形態に応じで *Dehalococcoides* による利用可否が決まるため、本研究においてもコバミドの抽出と構造の特定を試みたが、濃度が低く特定には至らず、今後の検証課題とした。*Bacteroidales* に関しては、目レベルまでしか系統分類を特定できなかったため具体的な役割は推察できなかった。相同性の高い近縁種 (DQ677001, 100%) が鉄還元環境から検出されているため、二価鉄が存在する環境に順応している微生物であると考えられる。

以上の結果から、*Dehalococcoides* による脱塩素化をさらに促進するためには、*Methanocorpusculum sinense*、*Acetobacterium wieringae*、*Bacteroidales* との関係を強化することが有力視されると結論づけた。今後は、これらの微生物種の増殖条件の解明、単離菌を用いた相互作用の解明、コバラミン等の促進物質の構造決定などを進めることで、さらなる浄化期間の短縮技術の開発に取り組む予定である。

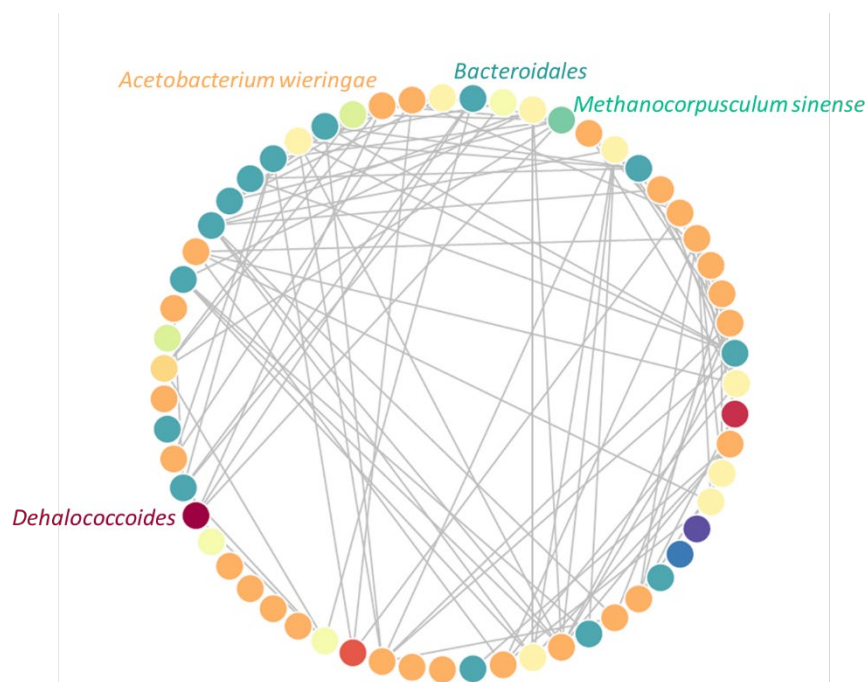


図 3 クロロエチレン類脱塩素化コンソーシアムにおける微生物叢のネットワーク
ノードは各 OTU (>97%)、エッジは SparCC correlation>0.5 の関係であることを示す

引用文献

- 1) Yoshikawa, M., Zhang, M., Kawabe, Y., Katayama, T.: Effects of ferrous iron supplementation on reductive dechlorination of tetrachloroethene and on methanogenic microbial community, FEMS Microbiology Ecology, 97(5), fiab069, 2021.
- 2) van der Zaan, B., Hannes, F., Hoekstra, N. et al.: Correlation of *Dehalococcoides* 16S rRNA and chloroethene-reductive dehalogenase genes with geochemical conditions in chloroethene-contaminated groundwater, Applied and Environmental Microbiology, 76(3), 843–850, 2010.
- 3) 製品評価技術基盤機構: 微生物有害情報リスト,
<https://www.nite.go.jp/nbrc/mrinda/list/>
- 4) Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M. et al.: *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(Pt2), 625–635, 2013.
- 5) Yang, Y., Higgins, S.A., Yan, J. et al. Grape pomace compost harbors organohalide-respiring *Dehalogenimonas* species with novel reductive dehalogenase genes. The ISME Journal, 11:2767–80, 2017.
- 6) Braun, M., Gottschalk, G.: *Acetobacterium wieringae* sp. nov., a new species producing acetic acid from molecular hydrogen and carbon dioxide, Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie, 3(3), 368–376, 1982.
- 7) Puentes Jácome, L.A., Wang, P.H., Molenda, O. et al.: Sustained dechlorination of vinyl chloride to ethene in *Dehalococcoides* enriched cultures grown without addition of exogenous vitamins and at low pH. Environmental Science & Technology, 53(19), 11364–11374, 2019.

(発表論文)

- 1) 吉川美穂、片山泰樹、川辺能成、張 銘: 二価鉄濃度がクロロエチレン類の嫌氣的脱塩素分解に及ぼす影響. 第 58 回環境工学研究フォーラム, オンライン, 2021.11.
- 2) 吉川美穂、片山泰樹、川辺能成、張 銘: クロロエチレン類の嫌氣的脱塩素化における二価鉄添加条件の最適化. 第 26 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, pp. 1–4, 2022.6.