

II-461

フェノール分解菌によるトリクロロエチレンの分解

大阪大学工学部 学生員 片岡孝治、正員 池道彦、正員 藤田正憲
姫路工業大学工学部 武尾正弘

1. はじめに

日本各地で報告されている揮発性有機塩素化合物による地下水及び土壌の汚染は、低濃度の汚染が広範囲に及んでいるのが特徴であり、現在も高濃度に汚染された土壌から徐々に溶け出す物質が地下水の移動に乗ってその汚染範囲を拡大し続けている。このように広範囲に及ぶ低濃度の汚染は、旧来の物理化学的な手段だけでは浄化が難しいため、微生物を用いてこの問題を解決する研究が盛んになっている。生物を活用して汚染された環境を回復する技術はバイオレメディエーション(bio-remediation)とよばれるが、具体的には汚染物質の代謝能力を持つ微生物を現場で増殖させることにより、汚染物質を分解・無害化して浄化をすすめるやり方が主流になる。現場で分解菌を増殖させその能力を発揮させるには、栄養基質を投入して土着の分解菌を優先的に増殖させる方法(= bio-stimulation)と、分解菌を投入する方法(= bio-augmentation)が考えられるが、いずれの方法にも一長一短がある。ここでは、代表的な有機塩素化合物であるトリクロロエチレンの汚染浄化の可能性をフェノール分解菌による分解特性を種々検討することにより評価した。

2. 実験材料及び方法

2-1. 土壌中のフェノール分解菌の計数

特別な汚染を受けていないと考えられる大阪大学工学部敷地内の土壌について、文献¹⁾に準じて全菌数とフェノール分解菌数を計数した。この時試料を均一にするために、湿土50gを450mlのトリポリリン酸溶液に懸濁してホモジナイザーにかけた。培地として、全菌数の計測にはCGY培地を、フェノール分解菌の計数には単一炭素源としてフェノールを125、250、500mg/lの各濃度で含む無機塩培地を用いた。

2-2. 各種フェノール分解菌によるトリクロロエチレンの分解試験

当研究室に保有する菌株から、フェノール分解能を有する7菌株を用いた。このうち *Acinetobacter calcoaceticus* AH、*Pseudomonas putida* BH、*Pseudomonas putida* PpG1064 の3株がフェノール分解菌として分離されたものであり、*Acinetobacter* sp. YAD、*Acinetobacter* sp. YAF、*Alcaligenes* sp. YAJ の3株はアニリン分解菌、PN1株はパラニトロフェノール分解菌として分離されたものである。これらの各菌株をフェノールを500mg/l含む無機塩培地で増殖させて対数増殖期の菌体を得た。菌体は洗浄後、OD₆₀₀が2.0になるように50mM 磷酸カリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁して分解試験に供した。分解試験は120ml容のバイアル瓶にトリクロロエチレンを1ppm含む菌体懸濁液を20ml入れ、25℃、100rpmで振盪して行い、ヘッドスペース法でトリクロロエチレン濃度の変化を測定した。トリクロロエチレンの分析はECDで行った²⁾。

3. 結果及び考察

3-1. 土壌中のフェノール分解菌の計数結果

土壌中の全菌及びフェノール分解菌の計数結果を表1に示す。全菌数はコロニーの増加がほぼ停止する7日目の値を採用した。フェノール分解菌数は出現したコロニーを新しいフェノール培地にレプリカして培養し、増殖のあったコロニー数として求めた。

フェノールを125mg/lの濃度で含む培地の計数から全菌の約10%がフェノール分解能を持つことが示されたが、培地フェノール濃度を上げると阻害のためかその比率は低下した。土壌中にはかなり高い比率で

フェノール分解菌が存在しており、これらがすべてトリクロロエチレンを分解することが出来るならばバイオレメディエーションは bio-stimulation により充分に可能と考えられた。一方で、高濃度のフェノールで増殖阻害を受ける分解菌が認められることから、bio-stimulation の条件については十分な検討が必要ともいえる。

表 1 全菌及びフェノール分解菌の計数結果

	C G Y	フェノール 125 ppm	フェノール 250 ppm	フェノール 500 ppm
C F U / g - 乾土	6.97×10^6	6.40×10^5	2.63×10^5	2.06×10^5
C G Y に対する割合		9.18 %	3.77 %	2.96 %

3-2. 各種フェノール分解菌によるトリクロロエチレンの分解試験結果

フェノール分解菌による試験結果を図1に示す。フェノール分解菌として分離した3株は図1に、その他の4株は図2に示した。図1ではフェノール分解菌の中でも分解率に差があり、各菌株が異なる分解特性を持つことがうかがえる。またアニリン分解菌が順調にトリクロロエチレンを分解したのに対して、パラニトロフェノール分解菌は、全く分解能力を示さなかった（図2）。以上より、フェノールを単一炭素源として増殖することが出来る菌の中にも、トリクロロエチレン分解能を示さないものや、その分解活性が低いものも存在していることが明らかになった。従って、フェノール分解菌によって効率よくバイオレメディエーションを行うためには、トリクロロエチレン分解能の高いものを選別・利用する必要がある。すなわち現場にトリクロロエチレン分解能がない又は低いフェノール分解菌しか存在していない場合には、フェノールによる bio-stimulation は有効ではなく、分解能の高い菌を bio-augmentation で補わなければならないといえる。

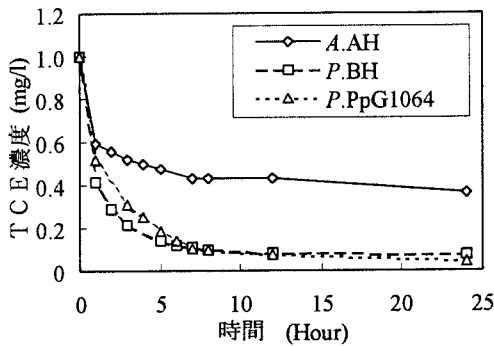


図 1 フェノール分解菌による T C E 分解

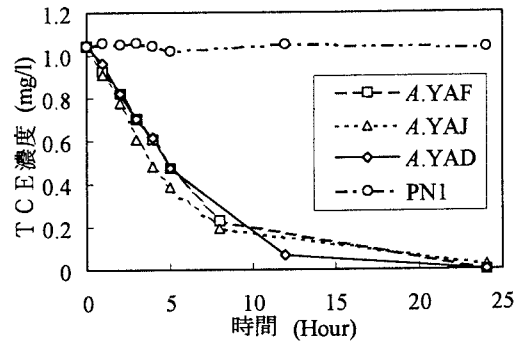


図 2 その他の菌による T C E 分解

以上のように、バイオレメディエーションを適用する場合にはあらかじめ現場の分解菌とそのトリクロロエチレン分解特性を十分に調査しておくことが重要であり、その結果に基づいて bio-stimulation と bio-augmentation を使い分けることが必要である。

参考文献：1 土壤微生物研究会編：土壤微生物実験法、養賢堂（1975）

2 M.Fujita, M.Ike, J.Hioki, K.Kataoka, and M.Takeo : Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes. J.Ferment.Bioeng. Vol.79, No.2, pp.100-106(1995)