

テトラクロロエチレン (PCE) をエタンまで還元する 嫌気性微生物コンソーシアの解析

長岡技術科学大学 ○(学)松井康哲 (正) 関口勇地, 大橋晶良, 原田秀樹

1. はじめに

テトラクロロエチレン(PCE)等の揮発性有機塩素化合物による地下水汚染は現在も大きな社会問題であり, 早急な対応が求められている。その汚染に対しては微生物を活用した汚染浄化法等の開発が進められているが, その中でも, 特にPCEに対しては嫌気性微生物による還元的脱塩素反応の活用が有効であることが知られている。いくつかの報告では, 嫌気集積培養系によりPCEは無害なエタンまで完全に還元されることが示されている。還元的脱塩素細菌については, 特に最近の5年間で多くの調査が進められ, 現在まで約20種のPCE還元細菌が分離されている。しかしながらこれらのほとんどの細菌は, PCEを *cis*-DCE までしか還元できず, PCEを無害化可能な嫌気性細菌として分離されているものはわずか1株¹⁾のみである。この細菌は水素を利用しPCEをエチレンにまで還元する細菌であるが, この細菌以外にPCEを無害化できる嫌気性細菌の分離報告はなく, またPCEをエタンまで完全に還元する細菌は全く知られていない。

本研究は, PCEの脱塩素, 無害化を担う細菌の検索を目的とし, 先に報告されているPCEをエタンにまで完全に還元する嫌気性集積培養系(以下コンソーシア)²⁾に着目した。コンソーシア内には, PCEからエタンまでの還元の各ステップを担う嫌気性微生物群が存在するはずである。本研究ではこれまでに, 同コンソーシア内の微生物群を分子生物学的手法により解析し, 微生物群を分子系統的に同定した。また, その結果存在が示唆された細菌群を選択的に培養することにより, PCE還元を担う微生物群の検索を試みた。

2. 実験方法

本研究では, 小松らが培養に成功した嫌気集積培養系²⁾を用いた。この培養系は, 電子供与体としてエタノールが添加され, 10mg/LのPCEを1週間程度でエタンに転換することができる。

コンソーシア内の微生物相の解析では, FISH (fluorescent in situ hybridization) 法の適用と共に, コンソーシア内の細菌由来の16S rRNA 遺伝子を標的とするクローンライブラリの作成を行った。

FISH法はAmannらの手法を参考とした。16S rRNA 標的のDNA probeは, 細菌を特異検出するEUB338 probe, 古細菌を特異検出するARC915 probeを用いた。クローンライブラリの作成では, まず集積培養液中の菌体由来のDNAをビーズビーダー法で抽出し, 16S rDNAをPCR増

幅後(細菌は, 2組のプライマーセット(EUB10F-UNIV1500R, EUB341F-UNIV1500R), 古細菌はARC111F-UNIV1500Rを用いた), その増幅産物を用いてクローニングを行った。そして, ランダムに選択したいくつかのクローン群について *Hae*III を用いた RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 解析を行った。その後, 各パターンを代表するクローンについてその塩基配列を決定した。

選択的培養は, 希釈培養法とコロニー培養法を組み合わせることで試みた。また, PCE等の分析にはガスクロマトグラフィー(FID)を使用した。

3. 実験結果及び考察

3.1. 集積培養コンソーシアの分子系統解析

Fig.1に集積培養系内微生物群の位相差顕微鏡写真を示す。この結果より, コンソーシアは未だ形態的にも多様な微生物で構成されていることが分かる。このコンソーシアに細菌, 古細菌を特異検出するDNAプローブ(EUB338, ARC915)によるFISH法を適用した結果, コンソーシアは多種の形態を持つ細菌群と数種の形態を持つ古細菌(*Methanosaeta*様の菌体を含む)を含むことが判明した。そこで本研究ではコンソーシア内の細菌群と古細菌群の解析を行うこととした。

クローンライブラリの作成では, 細菌および古細菌のライブラリ内からランダムに20以上のクローンを選択し, それらをRFLP解析によりパターン化した結果, 細菌・古細菌とも10程度の異なるパターンが出現した。この結果は, コンソーシアが多様な細菌・古細菌により構成されていることを示し, これは上記の顕微鏡観察の結果とも一致していた。

Fig.2-AにEUB10F-UNIV1500Rで作成したクローンライブラリのRFLP解析結果を示す。ライブラリ内で比較的高頻度で検出された2種類のクローンは, ランダムに選出した中の約1/5程度を占めていた。その16S rDNAクローンの塩基配列を解析した結果, クローンライブラリ内で優占化していたクローンはそれぞれ *Desulfitobacterium chlororespirans*, および *Clostridium sticklandii* の16S rDNAとの相同性が極めて高いことが分かった(約97%程度の相同性)。特に *Desulfitobacterium chlororespirans*³⁾は2,3-ジクロロフェノール等の塩素化合物を電子受容体として利用する細菌として知られているが, PCE等の還元能は報告されていない。

Fig.2-BにEUB341F-UNIV1500Rで作成したクローンラ

Keywords: テトラクロロエチレン, 還元的脱塩素反応, 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリ

〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 水圏環境制御研究室 TEL:0258-17-1611

ライブラリのRFLP結果を示す。ライブラリ内で高頻度で検出されたクローンはランダムに選出した中の約1/3程度を占めており、そのクローンの塩基配列は、*Dehalococcoides ethenogenes*の16S rDNAとの相同性が極めて高かった(約99%の相同性)。それ以外でもPCE等の分解能を有す細菌等(*Dehalobacter* sp., *Desulfitobacterium* sp., *Desulfotomaculum* sp.)と高い相同性を示すクローンが検出された。異なるプライマーセットを用いて作成したクローンライブラリ内の菌相が異なっていた理由としてはプライマーのかみ合わせに原因があると考えている。

Fig.2-CにARC111-UNIV1500Rで作成した古細菌のクローンライブラリを示す。高頻度で検出されたクローンはランダムに選出した中の半数以上を占めていたことから、存在率が高いことが分かった。この16S rDNAクローンの塩基配列は、現在までに分離されている微生物の塩基配列との相同性が約90%と低かった。従って、このクローンは、未だ分離のされていない種であることが示唆された。それ以外では*Methanosaeta* sp.と高い相同性を示すクローンや、未だ分離のされていない古細菌と考えられるクローンが検出された。

3.2. 集積系内のPCE分解微生物の培養の試み

コンソーシアの分子系統解析の情報を基に、集積培養内で比較的多く存在すると思われる細菌群の培養・分離を試みた。まず、比較的高頻度で検出された*Desulfitobacterium*、及び*Clostridium*に属すると思われる細菌の分離を試みた。*Desulfitobacterium*の培養には、エタノールなどの各種電子供与体及びチオ硫酸を電子受容体として、集積培養系を植種源として嫌氣的に希釈培養を行った。*Clostridium*の培養には、酵母エキスを基質として同じく嫌氣的に希釈培養を行った。その結果、*Desulfitobacterium*を培養するための系からは、*Pelobacter propionicus*に極めて近縁な細菌などが分離されたが、*Desulfitobacterium*に属する細菌の培養は不可能であった。一方、*Clostridium*の培養系では、検出されたクローンと同じ16S rDNA配列を持つ細菌が分離された。それらの分離株に関し、現在PCE等の還元能の有無を調査しているが、まだ還元能は確認されておらず、PCE分解に関与する微生物群の詳細は今のところ不明である。

今後、コンソーシア内でPCE等の脱塩素能を有す微生物の分離作業を電子供与体・受容体、培養温度などの条件を変更する等の方法で進めると共に、*Desulfitobacterium*属細菌を特異的に検出するプローブの開発を検討している。

謝辞

本研究で利用した集積培養系は、長岡技術科学大学、小松俊哉助教授より分譲いただきました。ここに記して感謝いたします。

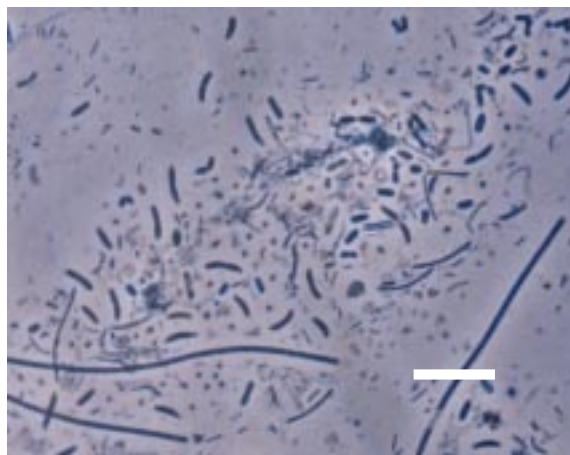


Fig.1 Micrograph of a PCE dechlorinating microbial consortium. bar:10µm

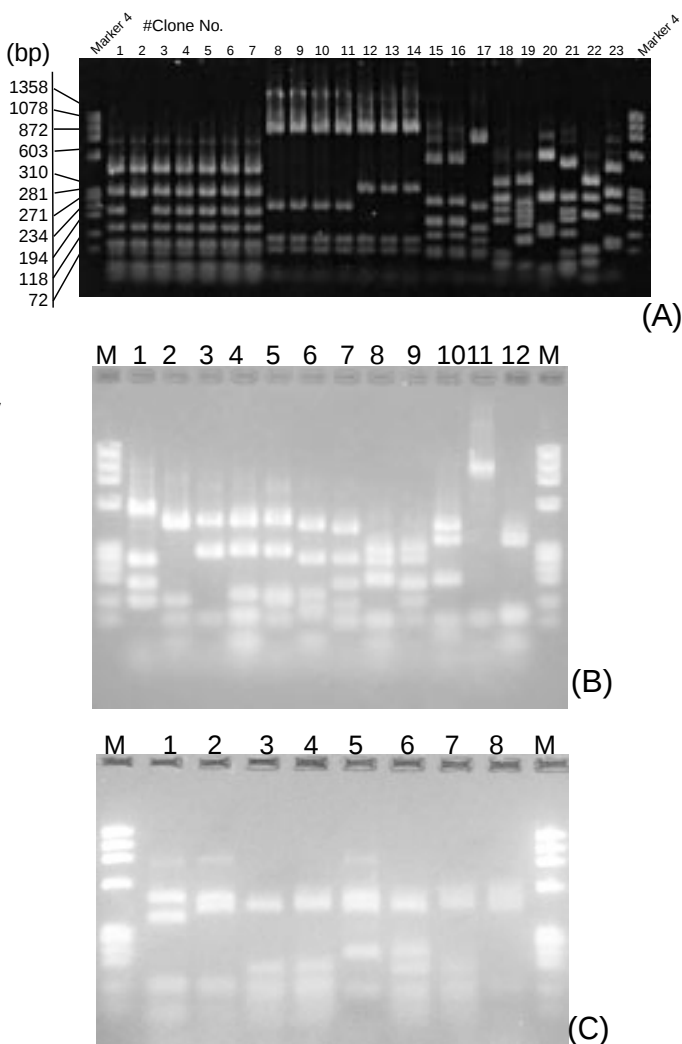


Fig.2 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns of 16S rDNA clones digested with *Hae*III restriction enzyme. [(A): bacteria-EUB10F-UNIV1500R, (B): EUB341F-UNIV1500R, (C): archaea-ARC111F-UNIV1500R]

参考文献

- 1) Maymo-Gatell et al. (1997), Nature 276: 1568-1571
- 2) Komatsu et al. (1997), Wat. Sci. Tech. 36 (6-7): 125-132
- 3) Sanford et al. (1996), Appl. Environ. Microbiol. 62(10):3800-3808