

バイオオーグメンテーションに用いる *Dehalococcoides* 属細菌培養液の活性確認方法の検討

大成建設（株） 正会員 ○伊藤 雅子
 大成建設（株） 正会員 渡邊 竜麻
 大成建設（株） 正会員 高畑 陽

1. 目的

塩素化エチレン類による地下水汚染に対して、*Dehalococcoides* 属細菌を汚染地盤に導入するバイオオーグメンテーションが実用化されている¹⁾。著者らは、耐圧容器で培養した *Dehalococcoides mccartyi* UCH007 株（UCH007 株）と *Sulfurospirillum* sp. UCH001 株（UCH001 株）の共培養液²⁾を汚染地盤に直接導入する浄化工法を実用化している。使用する耐圧容器は全量約 19 L であるため、浄化対象区の規模に応じて耐圧容器を複数本準備する。しかしながら、複数本の耐圧容器を同様の手順で培養しても、容器毎の細菌の増殖状況にばらつきが生じることがある。また、浄化工事に合わせて培養を開始しても、導入日の変更で予定した日数で培養した培養液を地盤に供給できない場合もある。特に、導入予定日が延長となって培養液を使用するまでに長期的に保管をした場合には遺伝子数は維持されても脱塩素活性が低下する培養事例も散見された。そこで、培養液を送付する数日前に耐圧容器内の培養液の活性状態を確認する試験方法について検討した。

2. 耐圧容器を用いる UCH007 株の培養状況

UCH007 株の培養期間は耐圧容器に設けた試料採取口からシリンジを用いて定期的に培養液を採取し、増殖培地に添加したトリクロロエチレン（TCE）やその分解生成物であるシス-1,2-ジクロロエチレン（*cis*-1,2DCE）、クロロエチレン（VC）の濃度をページ&トラップ GCMS 分析装置で測定した。また、*vcrA* 遺伝子³⁾を定量 PCR 法で測定した。耐圧容器 A で培養した培養液中の塩素化エチレン類の濃度と *vcrA* 遺伝子の経時変化を図-1 に示す。培地に添加した TCE は、培養 17 日目以降に減少傾向を示し、培養 27 日目には添加した TCE の 91%以上が脱塩素化された。しかし、培養液の使用日が変更となったことから、その後も TCE の再添加を 5 回繰り返して 73 日間培養を継続した。*vcrA* 遺伝子コピー数は培養 34 日目の時点で 10^8 以上となり、その後は定常状態となった。

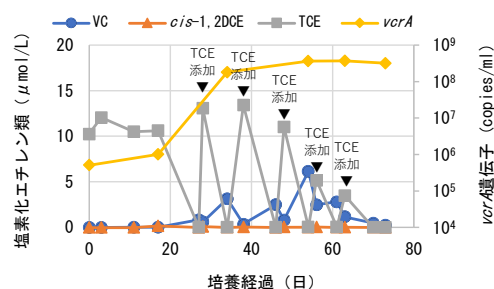


図-1 耐圧容器 A を用いた培養状況

3. Test 培地を用いる活性試験の方法

Dehalococcoides 属細菌の培養では、耐圧容器 A で確認できたように、培養液の脱塩素活性が高い場合には、TCE の添加直後に短期間で脱塩素化が生じる。培養液を使用する直前に脱塩素活性が高い状況であると確認することは、バイオオーグメンテーションの品質管理上、非常に重要である。そこで、耐圧容器から採取した培養液をバイアル瓶（Test 培地）に植菌し、Test 培地で生ずる短期間の脱塩素化に関わる因子（分解生成物や有用遺伝子）の挙動から脱塩素活性を判定する方法を検討した。Test 培地は、脱塩素化が短期間で生じやすい培地組成を検討して用いた。全量 60 ml のガラスバイアルに培地 40 ml を投入して Test 培地を作成し、耐圧容器から採取した培養液 0.4 ml を植菌して 30℃で静置培養した。

耐圧容器 A の培養 67 日目の培養液を Test 培地で検討した結果を図-2 に示す。耐圧容器 A の培養液は、Test 培地に植菌して 3 日目には脱塩素化の兆候が確認され、6 日目には残存する塩素化エチレンの 99%以上が VC となった。*vcrA* 遺伝子数も植菌後に 10 倍以上に増加し、脱塩素活性が高い状態であることが示された。

キーワード バイオオーグメンテーション, *Dehalococcoides* 属細菌, UCH007 株, 塩素化エチレン類
 連絡先 〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町 344-1
 大成建設（株）技術センター TEL045-814-7224

次に、某所でのバイオオーグメンテーション浄化工事で用いるために培養した 31 本の耐圧容器中の培養液について、Test 培地を用いて培養液の品質管理を実施した。一定期間培養後に増加した *vcrA* 遺伝子数を X 軸、TCE から脱塩素化した *cis*-1,2DCE と VC のモル数を全塩素化エチレン類のモル数で除した値を Y 軸にプロットした相関図を図-3 に示す。耐圧容器 A (▲) と同様に 3 日間培養後に十分な活性が確認された耐圧容器は約半分であったが、6 日間培養後には 90% 以上の培養液に十分な活性が確認できた。本試験の結果、最終的に 3 本の耐圧容器を除いた 28 本の耐圧容器を浄化工事用として送付した。

4. RNA 定量を用いる活性確認法の検討

上記の Test 培地による活性試験法は、活性を確認するまでに数日の時間を要することから、より短期間で評価できる手法として RNA を定量する方法を検討した。本試験は全量 720 ml のバイアル瓶で UCH007 株を 20~22℃で 46 日間培養した培養液（培養液①）と 167 日間培養した培養液（培養液②）を用いて検討した。培養液 10 ml をフィルターろ過し、RNeasy PowerSoil Total RNA Kit (QIAGEN) と RNeasy PowerSoil DNA Elution Kit (QIAGEN) を用いて同一試料から RNA と DNA を抽出した。RNA は、PrimeScript™ RT reagent Kit (タカラバイオ) で cDNA を合成し、抽出した DNA と cDNA の *vcrA* 遺伝子を測定した。*vcrA* 遺伝子の DNA、cDNA の定量結果を表-1 に示す。培養液②の DNA は 6.8×10^7 copies/ml であり培養液①とほぼ同等の遺伝子数であったのに対し、培養液②の cDNA は 1.3×10^2 copies/ml と培養液①と比較して非常に低かった。同培養液について Test 培地で評価した結果、培養液②では TCE から VC や *cis*-1,2-DCE が殆ど生じず、*vcrA* 遺伝子の増加量も低くなり、cDNA (RNA 定量) の遺伝子量が低くなっている結果と一致した。

5. まとめ

耐圧容器で培養する UCH007 株の培養状況を確認する方法として、Test 培地による活性試験法の有効性を確認した。また、試験期間を短縮するため、*vcrA* 遺伝子の DNA だけでなく RNA を定量 PCR 法により定量する方法も品質管理方法として使用できる可能性が示された。今後は、耐圧容器で培養した培養液について、RNA 定量による活性確認法を検討していく予定である。

参考文献

- 1) 渡邊竜麻, 伊藤雅子, 高畑陽: 第 27 回地下水・土壌汚染とその防止に関する研究集会講演集, pp213-216, 2022.
- 2) 高畑陽: バイオオーグメンテーションの実用化への可能性と課題, 環境バイオテクノロジー学会誌, Vol. 13, No. 1, pp19-23 2013.
- 3) Ritalahti, K. M., B. K. Amos, Y. Sung, Q. Wu, S. S. Koenigsberg, F. E. Löffler: Appl. Environ. Microbiol., Vol. 72, No. 4, 2765-2774, 2006.

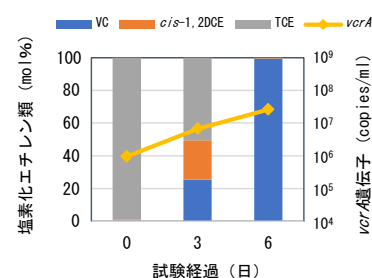


図-2 Test 培地による活性試験結果

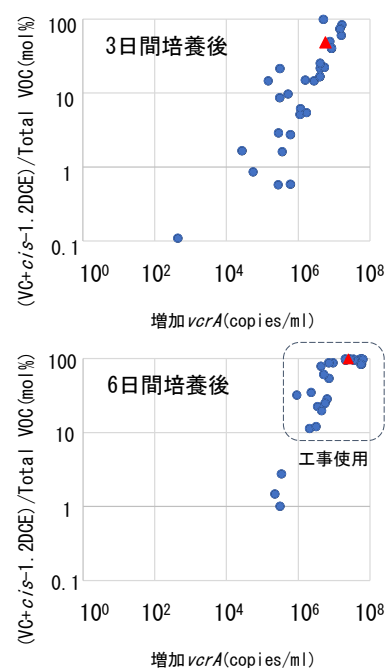


図-3 培養後の *vcrA* 遺伝子数と分解生成物の生成率との相関

表-1 *vcrA* 遺伝子定量結果

試験No.	培養時間 (日)	DNA (copies/ml)	RNA⇒cDNA (copies/ml)
培養液①	46	1.7×10^8	6.6×10^7
培養液②	167	6.8×10^7	1.3×10^2

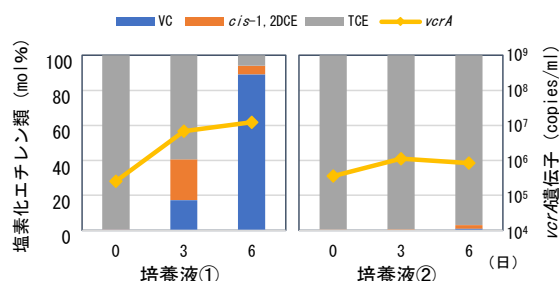


図-4 Test 培地による活性試験の比較