

極限環境由来のメタン酸化性菌によるトリクロロエチレンの分解

千葉工業大学 学生会員 ○吉葉 一輝

千葉工業大学 正会員 矢沢 勇樹

1. 目的

本研究は、南関東全域より湧出する古代海水中に生息する有用微生物を探索することを目的としている。そのなかでメタン酸化性菌に着目し、脱脂洗浄剤や溶剤として多量に使用されている発がん性有機塩素化合物であるトリクロロエチレン（TCE）の生物分解を試みる。通常の極限環境微生物は至適環境を創成しなければ培養が難しいのに対し、本研究では大気圧下の好気環境でも扱えるバイオレメディエーション技術を提案するものである。

一般的に TCE を分解できる微生物としてメタン酸化性菌があげられ、メタン基質に対しメタン酸化分解酵素であるメタンモノオキシゲナーゼ（MMO）を生成することでメタンからメタノールを生成、その後、補酵素（PQQ, NAD^+ ）の作用をあわせて最終的に二酸化炭素まで分解する（図1）。MMO 酵素には可溶性型（sMMO）と膜結合型（pMMO）に分類され、特に TCE などの有機化合物の酸化分解に寄与するのは sMMO 酵素といわれているが、一部のメタン酸化性菌でしか生成せず、かつ培養条件に左右される（Binnerup *et al.*, 2005）。

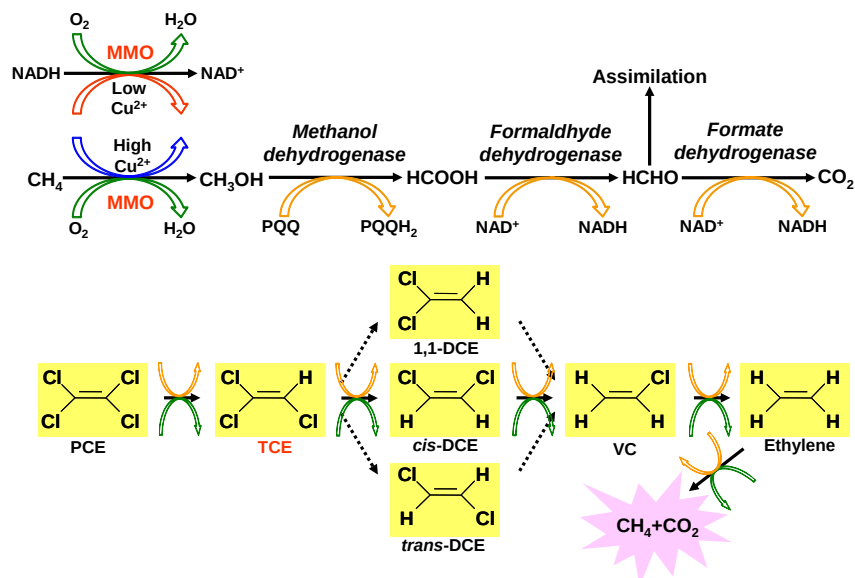


図1 メタン酸化性菌による TCE の生物的酸化分解経路

2. 実験方法

2.1 古代海水（メタン湧出付随水）試料

本実験で用いた古代海水試料は、千葉県天然ガス・ヨウ素製造会社が所有するガス井（地下 500～2,000 m）から汲み上げられたメタン湧出付随水であり、メタンとヨウ素含有海水を分離するセパレータより採取したものである。よって、厳密に地下環境の高圧・嫌気の極限環境ではなく、地上の大気圧に接することで経代的に好気環境に順応した微生物がいる可能性が高い。この古代海水は、ヨウ素が多く含まれる以外は一般海水組成に近く、その生菌数は約 1.0×10^3 cells/mL である。

2.2 古代海水添加によるメタンおよび TCE の生物的酸化分解試験

予備実験として、500 mL 容ガラス製褐色瓶に古代海水 100 mL と NMS 培地 100 mL、さらに TCE 5.0 μL をマイクロシリンジにより加えた。比較として、気相雰囲気（空気またはメタンガス）により置換した条件を設定し、あらかじめシリコンチューブ接続のガラス管を通したシリコン栓で密閉した。シリコンチューブの径は TCE 測定用検知管（GASTEC 社製 132M）に直接接続可能なものを用い、測定するまではピンで封鎖した。培養は 30℃ の恒温槽内にて静置させ、所定時間に気体採取器にて 100 mL 吸引し、濃度（ppm）を計測した。この気相中の TCE 濃度から竹田（1985）の計算式にあてはめ、液中の TCE 濃度に換算した。

キーワード バイオレメディエーション 古代海水 メタン酸化性菌 トリクロロエチレン

連絡先 〒275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1 千葉工業大学 TEL 047-478-0409 E-mail: yuuki.yazawa@it-chiba.ac.jp

上述の結果をもとに、50 mL 容バイアル瓶（褐色）に古代海水 15 mL と NMS 培地 15 mL、さらに TCE を TCE 5.0 μL を加えた。比較として、気相雰囲気（空気またはメタン：空気＝4：1）に設定した条件を設け、シリコン栓にて密閉した。培養は 30°C の恒温槽内にて静置させ、所定時間にヘッドスペース法に従いガスタイトシリンジを用いて 500 μL 採取し、FID ガスクロマトグラフィー（島津製作所製 GC-2014, カラム DB-624）でメタン、TCE を定量した。同様に、ガス分配係数をあてはめ液中の TCE 濃度を求めた。

3. 結果および考察

3.1 古代海水の TCE 生物学的酸化分解の簡易評価と微生物の観察

500 mL 容の反応系に対し、極限環境由来の古代海水中に生息するメタン酸化性菌による TCE の生物学的酸化分解について評価したところ、培養 1 週間目にして初濃度の約 1,000 の 1 まで液中の TCE 濃度が低下した。特に、メタン雰囲気下において減少が大きく、その分解速度から 1 次反応であることがわかった。その分解速度定数は、空気雰囲気下が 0.02 h^{-1} 、メタン雰囲気下が 0.03 h^{-1} であった。

培養後の顕微鏡観察から、メタン雰囲気かつ TCE を添加した条件において図 2 に示すように約 2 μm の球状細菌が確認された。特に、この細菌は TCE の添加濃度が高いものほど占有して観察された。

3.2 古代海水中メタン酸化性菌によるメタンおよび TCE の生物学的酸化分解

3.1 の結果をもとにして、50 mL 容の反応系に対してガスクロマトグラフィーによる精密評価を行った。図 3 に各条件における気相中のメタン濃度の経時変化を示す。比較として空気雰囲気の TCE 添加・無添加のものを示すが、古代海水中には約 1 mmol/L 以上のメタンが溶存していることがわかった。メタン雰囲気において、TCE 添加のほうが気相中メタン濃度は顕著に減少した。このことから古代海水中にはメタン酸化性菌または MMO 酵素を有する細菌が生息していることが示唆される。

図 3 の結果に対応して、気相中の TCE 濃度から変換した液相中 TCE 濃度の経時変化を図 4 に示す。3.1 の結果と同様に TCE 濃度の減少は顕著であり、約 2 週間で TCE は検出されなかった。その分解反応は 1 次反応であり、メタン 80% 雰囲気下の分解速度定数は 0.034 h^{-1} 、空気雰囲気下で 0.027 h^{-1} であり、メタン共存の場合に TCE の生物学的酸化分解が促進されることがわかった。分解過程においてジクロロエチレン（cis-DCE）も確認された。

以上の結果から、極限環境由来の湧出古代海水中にはメタン酸化性菌の生息が確認され、また発がん性有機塩素化合物である TCE の生物学的分解が認められたことからバイオレメディエーションとしての新技術が期待される。

参考文献

- 1) Binnerup, S.J. *et al.* (2005), "Methane oxidising bacteria as environmental indicators", pp.15-25, Norden (Copenhagen).
- 2) 竹田一郎 (1985), 分析化学, 34, 203-204.

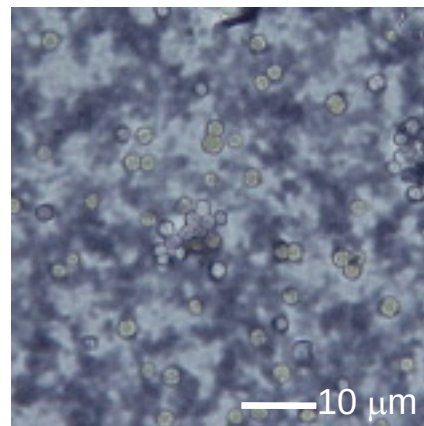


図 2 培養後に観察された微生物

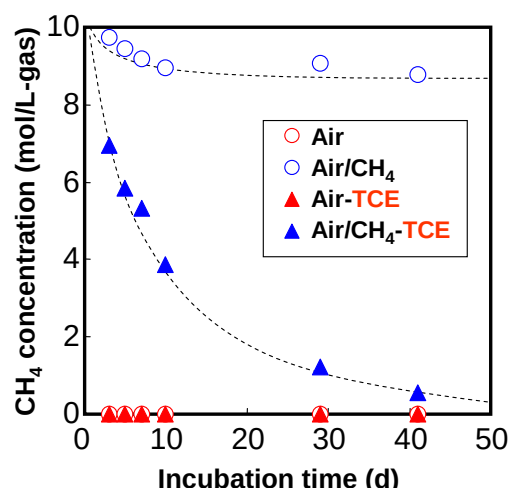


図 3 培養条件における気相中メタン濃度の経時変化

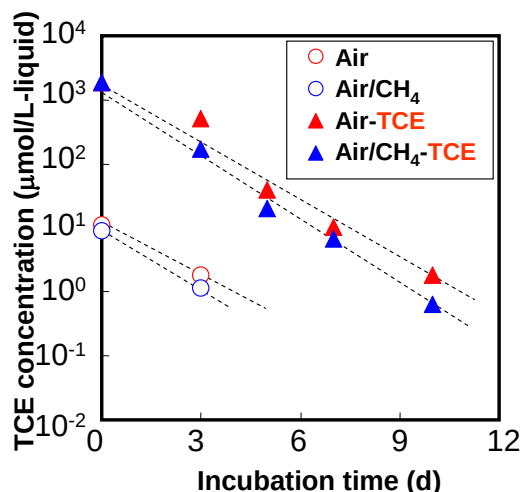


図 4 培養条件における液相中 TCE 濃度の経時変化