

塩素化エチレンを無毒化する *Dehalococcoides mccartyi* NIT01 株の分離および特性評価

名古屋工業大学 (学) 日下部 俊弥

名古屋工業大学大学院 (正) 吉田 奈央子

1. 背景および目的

塩素化エチレン汚染土壌・地下水の浄化対策の 1 つとして、塩素化エチレンを還元的にエチレンまで脱塩素化する *Dehalococcoides* 属細菌 (以下, Dhc) を補填するバイオオーグメンテーションが行われつつある。我が国では、これまでに 2 件の Dhc を用いた浄化事業が、経済産業省・環境省告示 4 号「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」(以下, 指針) 適合が確認されている。本研究では、新たに分離したテトラクロロエチレン (PCE) をエチレンまで脱塩素化する *D. mccartyi* NIT01 株を分離し、指針適合確認に必要な特性評価を行った。

2. 実験方法

2.1 NIT01 株の分離

Dhc を分離する接種源として、PCE をエチレンまで脱ハロゲン化する微生物コンソーシア YN3 を用いた¹⁾。Dhc の分離には、限界希釈培養またはアガー培養によるコロニー単離により行った。アガー培養は、1 セット 6 か月を 5 回、限界希釈培養は 1 セット 2 か月を 3 回繰り返した。培養物の純度は、細菌の 16S rRNA ユニバーサルプライマーを用いた PCR 産物の *HhaI* および *HaeIII* を用いた制限酵素消化断片の電気泳動パターン (以下, RFLP) ならびに Miseq によるアンプリコンシーケンシングにより確認した。

2.2 NIT01 株による塩素化エチレン分解試験

NIT01 株は、通常 60 mL 容量の血清瓶に 20 mL の液体培地 (ミネラル塩 + 500 nM 1,2-*cis* ジクロロエチレン + 5 mM 酢酸ナトリウム + 80% H₂ + 20% CO₂) を用い、接種源として容量比 5% の前培養物を継代することで維持し、必要に応じて、異なる塩素化エチレンを添加し分解試験を行った。塩素化エチレンは培養物のヘッドスペースを GC-FID 分析することで定量し、微生物増殖は直接検鏡法により計測した。

2.3 NIT01 株の特性評価

NIT01 株の全ゲノム配列を PacBIO シーケンサーならびに CLC genomics workbench genome finishing module を用いて決定した。NIT01 株の好適生育条件を特定すべく、pH、温度、塩濃度、O₂ 濃度、殺菌剤として 200 ppm 次亜塩素酸ナトリウムが NIT01 株の生育に与える影響を評価した。

3. 結果

3.1 NIT01 株の分離

Dhc の分離のため 6 か月毎にアガーシェイク培養およびコロニーピック培養を 4 回繰り返したが、脱塩素化活性が非常に小さく、分離に至らなかった。一方、限界希釈培養を行った結果、2 回目以降、Dhc に特徴的な円盤形の均一な細胞形態が顕微鏡で観察されたとともに (図 1), RFLP パターンで Dhc 以外のバンドが確認されなかった (図 2)。さらに、アンプリコン解析の結果では 99.4%, 99.5% が Dhc のリードであった。この 2 つの試料で検出されたマイナーリードは試料間で重複しないことから培養物由来でなく実験操作時に汚染した微生物 DNA 由来のリードであると考えられた。これより Dhc が純粋分離されたと判断し、NIT01 株と名付けた。

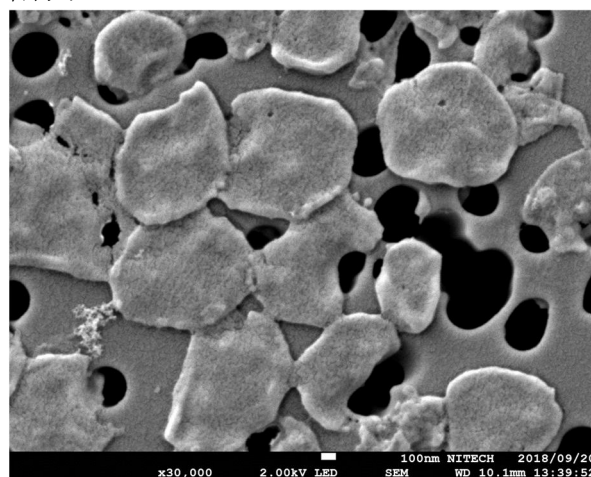


図-1 NIT01 株の電子顕微鏡写真

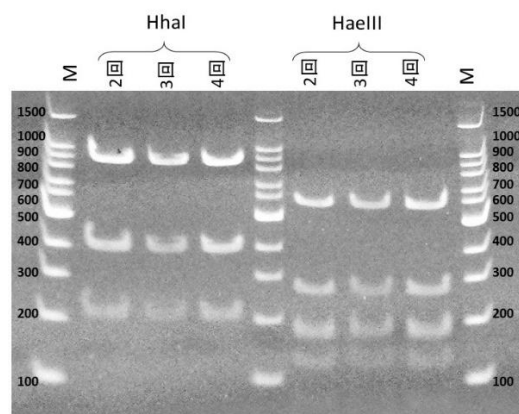


図-2 限界希釈培養物の 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅産物の RFLP 像 (Dhc の想定 *HhaI* 消化産物は、870, 389, 202 (bp), *HaeIII* 消化産物は、574, 268, 179, 168, 126, 80, 66 (bp) であり、泳動像が一致する)

3.2 NIT01 株による塩素化エチレンの分解

NIT01 株による塩素化エチレン分解経路を図 3 に示す. NIT01 株は, トリクロロエチレン(TCE), 1,2-*cis* ジクロロエチレン (*cis*DCE), 1,1-ジクロロエチレン, 塩化ビニル (VC) を脱塩素化し増殖した. また, 増殖はしないものの PCE および 1,2-*trans* ジクロロエチレンを脱塩素化した. 図 4 に, NIT01 株が 2mM TCE を添加した培地における塩素化エチレンの濃度および細胞密度の推移を示す. NIT01 株の前培養物を容量比 5% (最終細胞密度: 0.7×10^7 cells/mL 程度) で接種した結果, 20 日間で *cis*DCE および VC を介してエチレンまで脱塩素化し, 1.7×10^8 cells/mL 程度の菌体密度を得た (図 4).

3.3 NIT01 株の特性評価

NIT01 株の好適生育条件について試験した結果, 25-30°C の温度, pH7.0-7.7, 培地中に含まれるミネラル塩を NaCl 濃度に換算した場合で 1.3% (電気伝導度では 21 mS/m) 以下, 好適塩濃度として 0.3% (6.2 mS/m) であった (図 5). 次亜塩素酸および酸素存在下では脱塩素化が全く行われないことが示された. NIT01 株は 1463 の CDS を含む全長 1.3Mbp のゲノムを有し, 19 つの還元的脱ハロゲン化酵素を保有していた. このゲノム配列について, 病原性ならびに病原性に関わる遺伝子に関して調査を行った結果, 病原性に関わる遺伝子は見つからなかった. 16S rRNA 遺伝子ならびに全ゲノム配列の類似度 (average nucleotide identity) は, 既知株の *D. mccartyi* CBDB1 株に対し, それぞれ 100%, 99.54% であった.

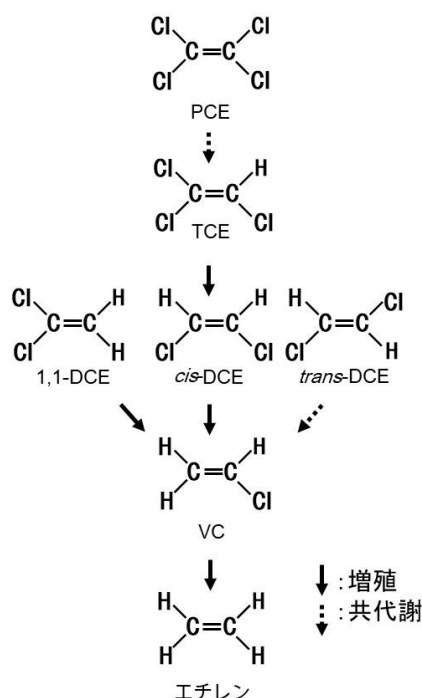


図-3 NIT01 株による塩素化エチレンの分解経路

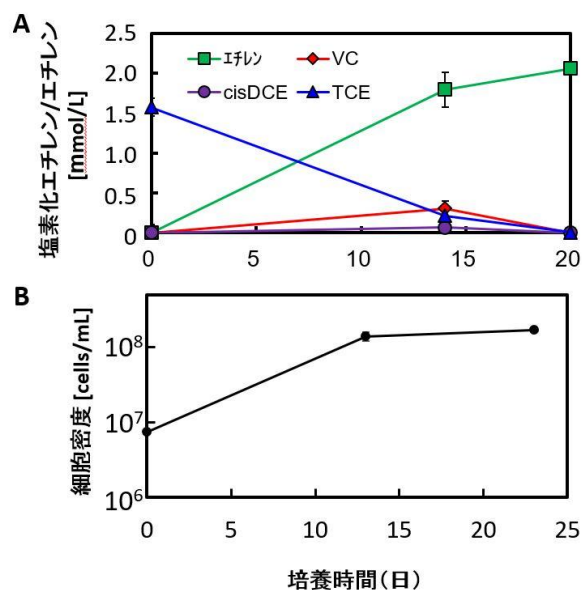


図-4 NIT01 株による TCE の分解 (A) ならびに細胞増殖 (B)

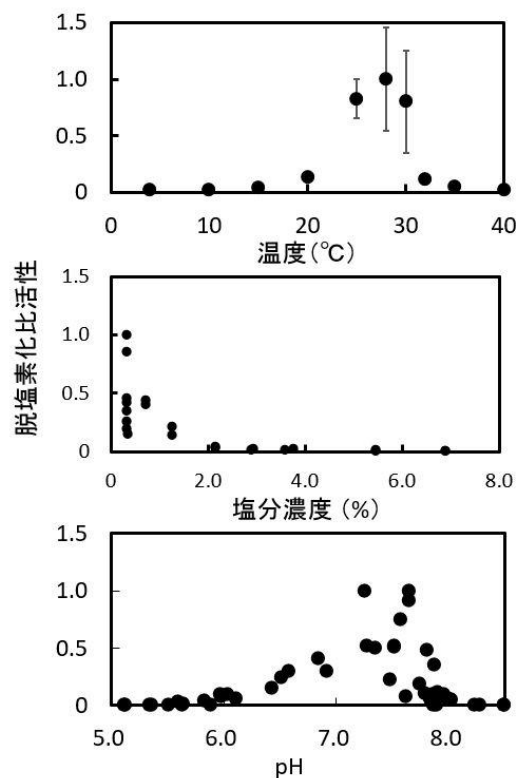


図-5 NIT01 株による *cis*DCE 脱塩素化の好適条件

4. 結論

全ての塩素化エチレンを脱塩素化可能な *D. mccartyi* NIT01 株を分離した. NIT01 株は温度 25-30°C, pH7-7.7, 塩濃度 1.3%未満を好適条件とし, 病原性に関わる遺伝子を持たず酸素曝気もしくは次亜塩素酸による失活が可能である.

5. 参考文献

¹ M Ismaeil, N Yoshida, A Katayama (2017) *BioMed Res. Int.* Article ID 9191086, pp1-12.