

低炭素数炭素源を用いた *Dehalococcoides mccartyi* NIT01 株の脱塩素化及び病原リスクへの影響評価

名古屋工業大学 学生会員 ○富田竜矢, 正会員 吉田奈央子

1 緒言

塩素化エチレン (以下 CE)汚染地下水の浄化技術として、外部培養した脱ハロゲン化呼吸細菌 (以下 ORB) と栄養剤を注入し、浄化を図るバイオオーグメンテーションが注目されている. ORB は、従属栄養細菌が栄養剤を発酵する際に生成する水素で CE を脱塩素化する細菌である. 従来の土着微生物を活性化するバイオスティミュレーション (1 年以上の浄化が必要)では、持続的な水素徐放のため炭素数が多い C3 以上の高炭素化合物が栄養剤として補填されてきたが、高炭素化合物の代謝産物は多種多様であり、これらの代謝産物を利用する病原性微生物の増殖で病原リスクの増加が懸念される (図 1). バイオオーグメンテーションは、より短期間で浄化可能であるため¹⁾, 我々は代謝経路の少ない C1, C2 の化合物を栄養剤として補填することで、対象土壌の病原リスクを低減できると考えた. 本研究では、病原リスク低減の栄養剤の提案を目的とし、以下の内容を検討した. 実際の CE 汚染地下水に ORB である *D. mccartyi* NIT01 株を接種し、異なる C1, C2 化合物と代表的な C3 以上の化合物を補填した際の 1) 脱塩素化反応を評価・比較を行う, 2) 各微生物菌叢を解析することで、微生物群の病原リスクを低減できるか評価する.

2 実験方法

2.1 試験条件

土着の微生物による脱塩素化への影響の有無を評価するため、水田土壌と実際の CE 汚染現場の地下水の 2 つを接種源に用いた. これに培地等を加えた混合液を調製し、培養瓶に分注した. その後、窒素・二酸化炭素で培養器内を嫌気状態にした. 各炭素化合物, TCE, NIT01 株を加えて 28℃で静置培養した (図 2, 表 1). 培養中のヘッドスペースの TCE, エチレン, その分解過程で生成する cis-DCE, VC の濃度をガスクロマトグラフィーで測定した.

2.3 微生物菌叢解析および病原リスク評価

DNA 抽出キット (ISOIL for Beads Beating)で抽出

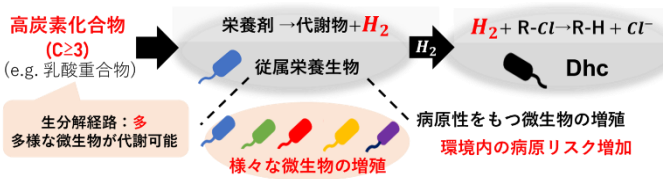


図 1 高炭素化合物と病原リスク

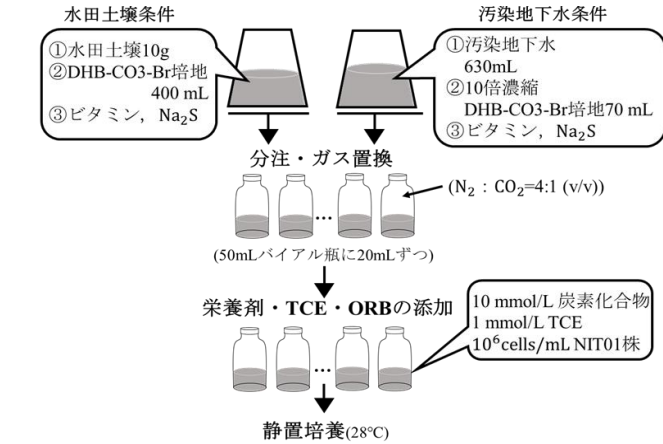


図 3 異なる培養条件の調製手順

表 1 添加した各炭素化合物

炭素数	炭素化合物	培養物名	
		水田土壌	汚染地下水
C1	メタノール CH ₃ O	psMET(n=3)	gwMET(n=3)
	ギ酸塩 HCO ₂ ⁻	psFOR(n=3)	gwFOR(n=3)
C2	酢酸塩 C ₂ H ₃ O ₂ ⁻	psACE(n=3)	gwACE(n=3)
	シュウ酸塩 C ₂ O ₄ ²⁻	psOXA(n=3)	gwOXA(n=3)
	エタノール C ₂ H ₆ O	psETH(n=3)	gwETH(n=3)
C3	乳酸塩 C ₃ H ₅ O ₃ ⁻	psLAC(n=1)	gwLAC(n=3)
C6	クエン酸塩 C ₆ H ₅ O ₇ ³⁻	psCIT(n=1)	gwCIT(n=3)
C7	安息香酸塩 C ₇ H ₅ O ₂ ⁻	psBEN(n=1)	gwBEN(n=3)
-	添加無し	psNON(n=1)	gwNON(n=3)

した DNA を鋳型として 16SrRNA の V3/V4 領域に特異的なプライマーを用いた PCR 増幅を行った. PCR 産物は精製の後, MiSeq (Illumine)でシーケンシングし, QIIME で菌種の解析を行った. 菌種が特定されなかったものはシーケンシングデータをもとに BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)で特定した. 菌叢全体の 1%以上を占めるものを病原リスクの指標(TRBA466)に照合し, Risk group2 以上のものをリスク有として評価した.

3 実験結果および考察

3.1 各炭素化合物添加時の脱塩素化反応

水田土壌を接種源として用いた系では, psNON と比べて C1, C2 化合物を添加した系は脱塩素化が進

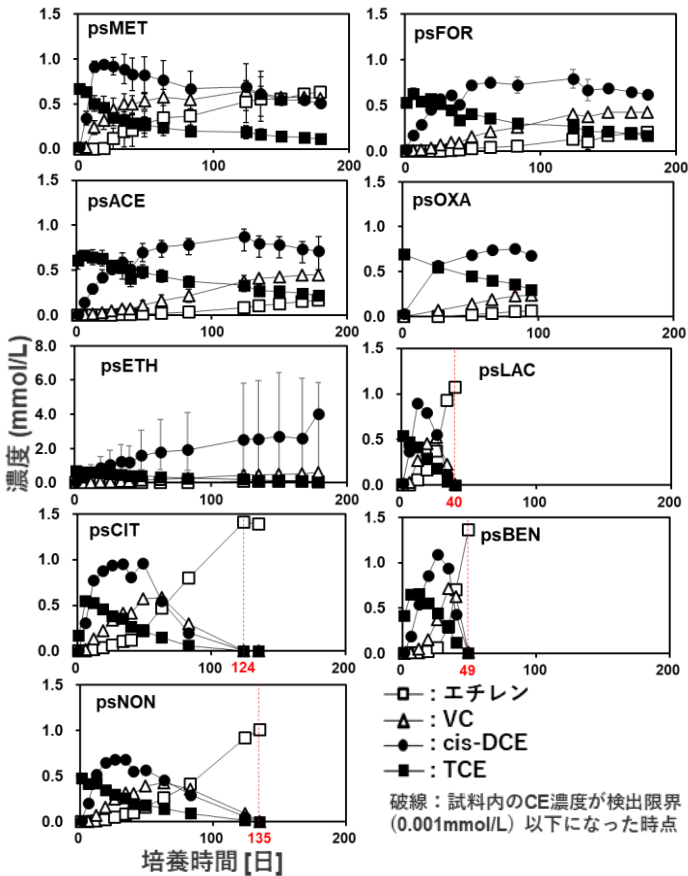


図3 各培養系におけるCE濃度の推移（水田土壌）

※psOXAのみ遅れて培養を開始したため培養期間が短い。行しなかった(図3)。対して、C3以上のpsLAC, psCIT, psBENはそれぞれ40日、124日、49日でpsNONの135日に相当する脱塩素化の進行を確認した。汚染現場の地下水を接種源とした系では、gwFORは78日、gwOXAにおいては40日までに全ての試料でCE濃度が検出限界以下まで低下し、gwLAC, gwCITに比べ迅速な脱塩素化の進行を確認した(図4)。このように、水田土壌と汚染地下水をそれぞれ接種源とした系において脱塩素化の進行を促進させる炭素化合物が異なることが示された。加えて、エタノールの添加が脱塩素化を促した観察された既往研究もあり²⁾、土壌の成分や、土着の微生物菌叢などが脱塩素化の進行に影響することが示唆された。

3.2 微生物菌叢解析

汚染地下水を接種源とした中で、脱塩素化が進行した系・NONおよび元々の地下水を対象に解析を行った結果、地下水, gwNON, gwFOR, gwOXAではリスクを有する菌体は確認されなかった一方、gwLACではClostridium属, gwCITではEnterobacter属の増殖に伴いリスクを有する菌体の割合はそれ

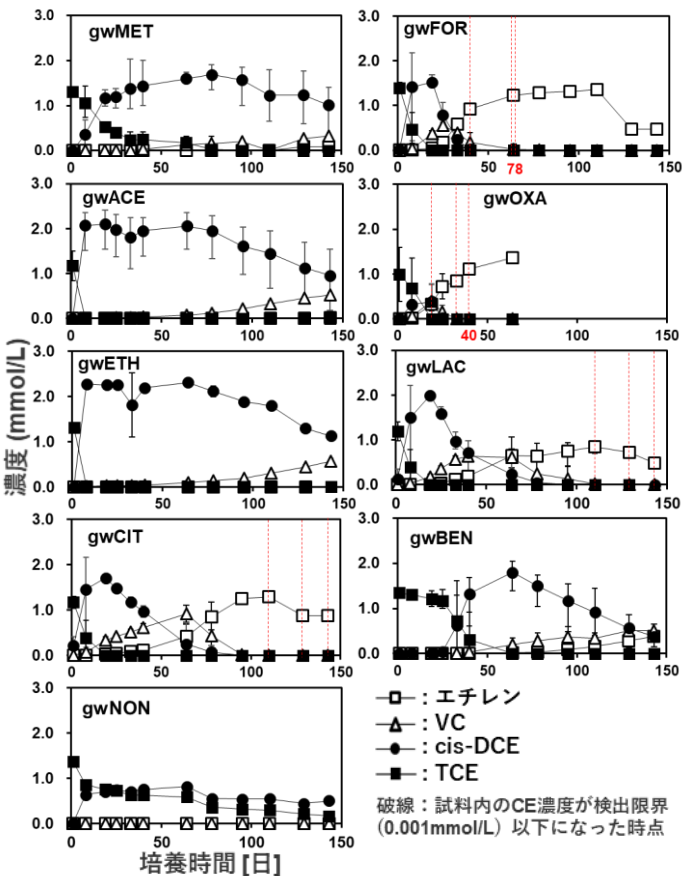


図4 各培養系におけるCE濃度の推移（汚染地下水）

表2 各試料の病原リスク

培養物	菌体密度 [cells/mL]	リスク有の 菌種	リスク有の 菌体割合 [%]
地下水	2.1E+8	-	0%
gwNON	2.7E+8	-	0%
gwFOR	3.0E+8	-	0%
gwOXA	2.6E+8	-	0%
gwLAC	3.5E+8	<i>C. butyricum</i>	21%
gwCIT	4.7E+8	<i>E. kobei</i> , <i>E. ludwigii</i>	47%

ぞれ21%、47%となった(表2)。

4 結論

病原リスクを抑えた栄養剤として低炭素化合物の利用可能性が示された。また、現地の土壌に元々含まれる成分や微生物菌叢による脱塩素化・病原リスクへの影響が示唆され、バイオオーグメンテーションに用いる炭素化合物の選定に大きく関わることを示唆される。

参考文献

(1) Lebrón et al., (2007) : Rem. 17, 2, 5-17
(2) Alfredo Perez-de-Mora, et al (2014) : Environ. Sci. Technol. 48, 5770-5779