

## (21) 嫌気条件下でベンゼンを分解する微生物集積培養系の確立とベンゼン分解微生物群の解析

酒井 名朋子<sup>1\*</sup>・栗栖 太<sup>1</sup>・矢木 修身<sup>2</sup>・山本 和夫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京大学大学院工学系研究科 (〒113-8656東京都文京区本郷7-3-1)

<sup>2</sup>日本大学大学院総合科学研究科 (〒102-0073東京都千代田区九段北4-2-1)

<sup>3</sup>東京大学環境安全研究センター (〒113-8654 東京都文京区本郷7-3-1)

\* E-mail: n\_sakai@env.t.u-tokyo.ac.jp

本研究ではベンゼンによる嫌気条件下での土壌・地下水汚染を解決すべく、知見の少ないメタン生成条件下で蓮田土壌でのベンゼンの分解を把握し、土壌環境中の分解微生物集積培養系を確立し、微生物群を解析した。Bacteriaの群集構造には培養日数の経過に伴い種構成の遷移が見られたが、メタン生成古細菌ではほとんど見られなかった。<sup>13</sup>Cベンゼンを用いた解析では、嫌気共生系で安息香酸を分解する*Syntrophus aciditrophicus* SB及び*Syntrophus gentianae*と近縁の微生物が<sup>13</sup>Cを取り込んだ。しかし、16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく相同性は85%と低いことから、<sup>13</sup>CをDNAに取り込んだ微生物は新規の微生物である可能性が示された。汚染現場にてこの微生物の存在を把握することで土壌浄化能力を評価することができる。

**Key Words :** Benzene, Anaerobic Degradation, Methanogenic Condition, Community Analysis

### 1. はじめに

土壌・地下水におけるベンゼン汚染は、深刻な環境問題となっている。ベンゼンには発がん性、変異原性、経口慢性毒性があり、水・土壌環境中での環境基準・法令でもベンゼンに関する規制がなされている。ベンゼンは水に対する溶解性が比較的高く(1.8g/L、25℃)、汚染は地下水とともに広範囲に広まる。ベンゼンによる汚染要因としてはガソリンスタンド・製油所・油槽所の石油貯留タンクからの燃料油の漏れ出しや、不法投棄現場における廃棄物からの漏洩が挙げられる。土壌・地下水汚染の解決法には生物学的処理、化学的処理及び物理学的処理があるが、物理化学的処理方法にくらべて、生物学的処理は費用・エネルギー消費が少ない、及び穏和な手法であるため生態系に負荷を与えない処理法であるといえる。

生物学的処理において、ベンゼンは好氣的に微生物により分解されるが、嫌氣的に分解されることは難しいとされていた。しかし、ベンゼンが嫌氣的に分解可能ならば、i)テトラクロロエチレンなど嫌氣的な処理が行われ

ている物質の処理と同時処理可能で効率的である、ii)エアレーションが不要で、省エネルギーである、などの利点がある。さらに、メタン生成条件下でのベンゼンの嫌気分解は嫌気度を上げる必要はあるが電子受容体として物質を新たに加える必要がない。

微生物によるベンゼンの嫌氣的分解に関しては現在までに硝酸塩還元条件<sup>1)</sup>、鉄(III)還元条件<sup>2)</sup>、硫酸塩還元条件<sup>3)</sup>、メタン生成条件<sup>4) 5)</sup>での報告がある。このうち硝酸塩還元条件では、ベンゼン分解を行う微生物の単離報告が2例ある。1例目は、最終電子受容体を硝酸塩、ベンゼンを電子供与体として用いることができる微生物で、*Dechloromonas* sp. strain RCB株とJJ株である<sup>6)</sup>。2例目は、最終電子受容体を硝酸塩、ベンゼンを電子供与体及び炭素源として用いることができる微生物で、*Azoarcus* sp. strain DN11株とAN9株である<sup>7)</sup>。しかしながら、この他の条件下においては関与可能性が示唆される微生物に関する報告があるのみである。Rooney-Vargaら<sup>8)</sup>はPCR-DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法を用いて鉄(III)還元条件下でのベンゼン嫌気分解に*Geobacter*属細菌が関係していることを示唆した。Changら<sup>9)</sup>は、港底泥より集積され、メタン生成条件下

でベンゼンを分解する微生物群の *Bacteria* についてのクローンライブラリを作成した。この結果、*Bacteria* クローンの23.5%は *Aquificae* 門に属する微生物と97%の相同性があることを報告しているが、ベンゼン分解との関係については明らかでない。

そこで本研究では、これまでに非常に知見の少ないメタン生成条件下でのベンゼン嫌気分解微生物の集積と確立を試みた。また、得られた集積系の微生物群の推移をPCR-DGGE法で調べ、さらに $^{13}\text{C}_6$ ベンゼンを用いた安定同位体探査法(Stable Isotope Probing(SIP)法<sup>10)</sup>)を用いて解析することで、ベンゼン由来の炭素を同化する微生物の特定を行った。

## 2. 実験方法

### (1) ベンゼン嫌気分解実験(集積第一代)

分解実験では、35mLバイアル瓶に超純水(MilliQ水)及び無機塩培地であるMS培地A(MS培地<sup>11)</sup>から $\text{Na}_2\text{SO}_4$  25mMを除いたもの)を17mL、供試土壌(二連の蓮田土壌A,B及びベンゼン汚染土壌ほか、数種の汚染・非汚染土壌)8.5g投入し、ヘッドスペースを $\text{N}_2$ で置換した後ベンゼン飽和溶液をバイアル内の液相中濃度で15mg/Lとなるように添加した。ベンゼン分解が見られたものについてはベンゼンが消失するたびに繰り返し15mg/Lのベンゼンを添加した。サンプルは系内の吸着平衡を促すため1日振とうした後、25℃で静置培養した。また、428日目より蓮田土壌Bに同様にベンゼン30mg/Lを投入した。ベンゼンが消失するたびに繰り返し30mg/Lのベンゼンを添加した。この時Controlにはバイアル瓶にMilliQ水のみを入れ、サンプルと同様にベンゼンを投入した。ベンゼン濃度はGC-FID(島津製作所製、GC2010)を用いてヘッドスペース法にて測定した。使用したカラムはDB624(Agilent Technologies製)、設定温度はInjection部180℃、カラム温度80℃、Detection部220℃とした。

### (2) 集積第二代植え継ぎ実験 I

植え継ぎ実験は35mLバイアル瓶に以下のいずれかのMS培地20mL、実験(1)235日目の蓮田土壌B上清0.2mLを投入した。ヘッドスペースを混合ガス( $\text{N}_2:\text{CO}_2=8:2$ )で置換した後、ベンゼン飽和溶液をバイアル内の液相中濃度で70mg/Lになるように投入した。用いたMS培地はMS培地A及びMS培地B(MS培地<sup>12)</sup>に電子受容体として硝酸塩 $\text{KNO}_3$  10mMを加えたもの)の2種類で、MS培地AはUlrichらによりメタン生成条件下での集積系培養に使用されたもので、一方MS培地BはCoatesらにより硝酸塩還元条件下での単離に使用されたもので、

酢酸塩が含まれている。本実験では、MS培地Aに1)Aのみ 2)Aに硝酸塩( $\text{KNO}_3$  10mM)加えたもの 3)Aに硫酸塩( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  10mM)加えたもの 4)Bのみ 5)Bから酢酸塩を除いたものについて検討した。Controlにはバイアル瓶にMilliQ水のみを入れ、サンプルと同様にベンゼンを投入したものを用意した。培養は25℃にて菌体と培地の接触を増やすため振とう培養を行った。

### (3) 集積第二代植え継ぎ実験 II

植え継ぎ実験は35mLバイアル瓶にMS培地A20mL、実験(1)251日目の蓮田土壌B上清2mLを投入、ヘッドスペースを混合ガス( $\text{N}_2:\text{CO}_2=8:2$ )で置換した後、ベンゼン飽和溶液をバイアル内の液相中濃度で10mg/L投入した。ベンゼンが分解された後、段階的に添加濃度を30mg/L、50mg/Lに高くした。Controlにはバイアル瓶にMilliQ水のみを入れ、サンプルと同様にベンゼンを投入したものを用意した。培養は25℃にて振とう培養を行った。

### (4) 集積第三代植え継ぎ実験

本実験では、35mLバイアル瓶にMS培地A 10mL、植継実験IIで得られた分解微生物系の167日目の上清1mLを投入し、ヘッドスペースを混合ガス( $\text{N}_2:\text{CO}_2=8:2$ )で置換した。植え継いでから分解が見られるようになるまでの期間を短くするため、還元剤であるL-Cysteine HCl 2g/Lと微量栄養源として蓮田土壌抽出液30% v/v、Yeast Extract 1.0g/L、Vitamin B<sub>12</sub> 0.01g/Lを組み合わせることで浄化促進効果を確認した。促進剤を加えない実験は125mLバイアル瓶にMS培地A 100mL、植継実験IIで得られた分解微生物系の87日目の上清10mLを投入し、ヘッドスペースを混合ガス( $\text{N}_2:\text{CO}_2=8:2$ )で置換した。培養は25℃にて振とう培養を行った。

### (5) ベンゼン嫌気分解とメタン生成

メタンの生成はGC-TCD(島津製作所製、GC8A)を用いてヘッドスペース法にて測定した。充填剤はActiveCarbon、設定温度はInjection部120℃、カラム温度110℃、Detection部120℃とした。

### (6) ベンゼン嫌気分解微生物群集構造解析

#### a) PCR-DGGE

ベンゼン嫌気分解実験(集積第一代)の蓮田土壌A、0日・425日・515日、及び集積第二代植え継ぎ実験IIの239日のサンプルを解析に供した。DNA抽出には土壌DNA抽出キットISOIL for Beads Beating(ニッポンジーン製)を用いた。サンプルの濃度が薄い場合には9000rpmで10分遠心分離した後、ペレットを抽出に用いた。*Bacteria*の16S

rRNA遺伝子V3領域を含む部位を増幅するプライマーとして357fGCおよび518rを用いてPCRを行った<sup>13)</sup>。また、メタン生成古細菌を中心とした多くの*Euryarchaeota*門古細菌の16S rRNA遺伝子を増幅するためにプライマーとして357fGC及び691rを用いてPCRを行った<sup>14)</sup>。ただし、多くの*Euryarchaeota*門古細菌の357fGCは、上記Bacteriaの357fGCとは配列が異なる。PCR条件は既報の条件に従った。DGGEでは、ゲルの変性濃度勾配を35%-55%もしくは35%-60%で130V、7時間前後で泳動した。

#### b) Stable-Isotope Probing (SIP) <sup>10)</sup>

植え継ぎ実験IIで得られた微生物群に200日目に<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ベンゼン (純度99%、Cambridge Isotope Laboratories, Inc.s 製) をバイアル内の液相濃度30mg/Lになるように投入した。39日ではほぼ完全に分解された後、菌体を遠心分離で回収し、DNA抽出した。次に、CsCl密度勾配超遠心分離 (45000rpm、40h) にて<sup>13</sup>C-DNAと<sup>12</sup>C-DNAを分離し、遠沈管より密度に従い18フラクションに分割、採取した。この各フラクションをテンプレートとし、上述のBacteriaプライマーを用い、PCR-DGGEを行った。

#### c) 塩基配列の決定

DGGEゲルから目的とするバンドを切り出し、繰り返しPCR-DGGEを行って精製した後、塩基配列の決定に供した。一方、目的バンドに対応するBacteria 16S rRNA遺伝子全長を決定するため、超遠心分離後の6番フラクションDNAについてBacteriaの16S rRNA遺伝子をターゲットに増幅するプライマー9fおよび1492rを用いてPCRを行い<sup>15)16)</sup>、産物をQiagen PCR Cloning Kit を用いてクローニングを行った。それぞれのサンプルをABI3100にて配列を読み、決定した。近縁種はDDBJ/EMBL/GenBank データベースに対するBLASTにて検索した。

### 3. 実験結果

#### (1) ベンゼン嫌気分解実験

本実験では、供試土壌には数種類の汚染土壌・非汚染土壌を用い、微量栄養分を含むMS培地AもしくはMilliQ水を用いたが、唯一蓮田土壌にMilliQ水を加えたものにおいて安定した嫌気ベンゼン分解微生物集積系を得ることに成功した。蓮田土壌にMilliQ水とMS培地Aを加えた分解実験結果をFig.1 に示す。蓮田土壌Bでは100日目から分解の様子が伺え、196日目に初めてベンゼンが検出限界以下に減少した。この後、繰り返し15mg/Lのベンゼンを添加しても最短14日で完全に分解された。この260日目の蓮田土壌Bを集積第二代植え継ぎ実験の接種源として用いた。また、同一培養条件である蓮田土壌Aでも培養から274日目にベンゼンが完全に消失し、繰り返しベンゼンを添加しても分解

が見られたことを確認した。

一方、同一土壌を用いてMS培地Aを添加した蓮田土壌A及びBでは196日間で分解の様子が伺えず、350日目に初めてベンゼンが検出限界以下に減少した。

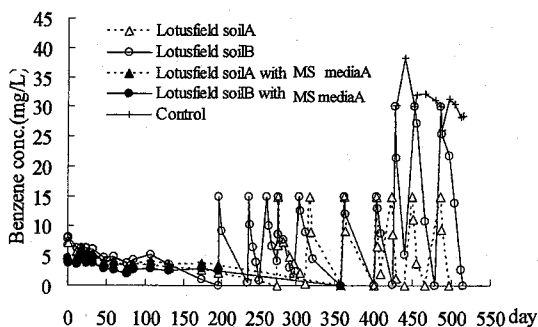


Fig.1 Anaerobic bioremediation of benzene in cultures containing lotus field soils

#### (2) 集積第二代植え継ぎ実験 I

分解微生物群の集積を進める集積培地への植え継ぎを試みた。植え継ぎではMS培地Aに加え、ベンゼン分解菌 *Dechloromonas* sp. strain RCB株とJJ株の分離に用いられていた培地(MS培地B)も用いた。さらに、MS培地に硝酸塩と硫酸塩を投入し、硝酸塩還元条件、硫酸塩還元条件で分解が促進されないか検討した。本実験では分解微生物群に基質を十分に与えるために唯一の炭素源であると考えられるベンゼンをバイアル内液相濃度で70mg/L投入した。結果をFig.2 に示す。培養後100日以上経過しても、MilliQ水のみでのControlと大きな差が見られなかった。したがって、これらの植え継ぎ条件ではベンゼン分解微生物群の分解活性を維持することができないと考えられた。

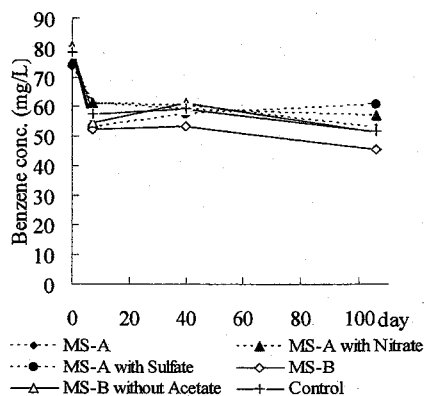


Fig.2 Anaerobic biodegradation of benzene in cultures using several artificial media

### (3) 集積第二代植え継ぎ実験Ⅱ

本実験では、植え継ぎにおける接種原を0.2mLから2mLに増量し、ベンゼンの液相濃度を10mg/Lにした。結果をFig.3に示す。集積第二代A,B,CはともにMS培地Aに植え継ぎを行った同一条件下での3連のサンプルである。74日目に、投入したベンゼンがA,Bにおいて0.5mg/L以下に、Cにおいて2.6mg/Lに減少し、植え継ぎ後も分解活性を保持していることを確認した。

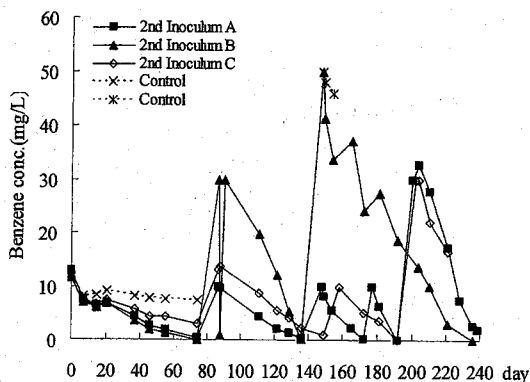


Fig.3 Anaerobic biodegradation of benzene in cultures using MS medium A

この後Bに90日目に30mg/L、148日目に50mg/L投入したところ、ベンゼン濃度が高くなっても分解がみられた。ベンゼンを何度か継ぎ足すことにより、Aにおいて分解速度が87日目から136日目では0.2mg/L/dayであったのが、177日目から192日目では0.67mg/L/dayに速くなった。

### (4) 集積第三代植え継ぎ実験

本実験では、植え継いでから分解が始まるまでの時間を短縮するため、様々の促進剤の効果を検討した。促進剤として、MS培地Aにそれぞれ蓮田抽出液、Vitamin B<sub>12</sub>、Yeast Extractを加えたもの及び、MS培地AにL-Cysteine HClを加え、さらにVitamin B<sub>12</sub>、Yeast Extractを加えたものについて検討した。結果をFig.4に示す。この結果、最も分解速度の早かったものはMS培地AにVitamin B<sub>12</sub>のみを加えたものであることがわかった。MS培地AにL-Cysteine HClを添加した系では97日を経過しても分解促進効果が見られなかった。

促進剤を加えず同一条件で行ったこれまでの集積第三代植え継ぎ実験では、およそ10mg/L分解するのに141日必要であった。MS培地AにVitamin B<sub>12</sub>のみを加えたものはおよそ10mg/L分解するのに69日必要であったことと比較すると、Vitamin B<sub>12</sub>に分解促進効果があることがわかった。

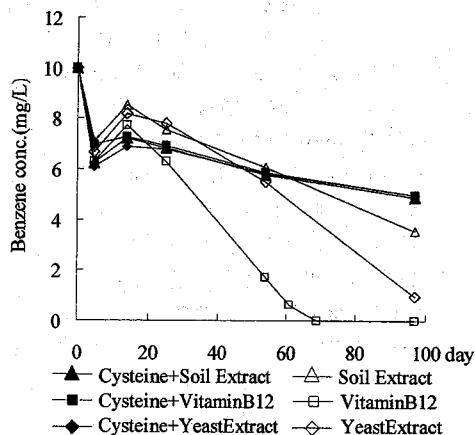


Fig.4 Effect of trace elements on benzene degradation in cultures

### (5) ベンゼン嫌気分解とメタン生成条件

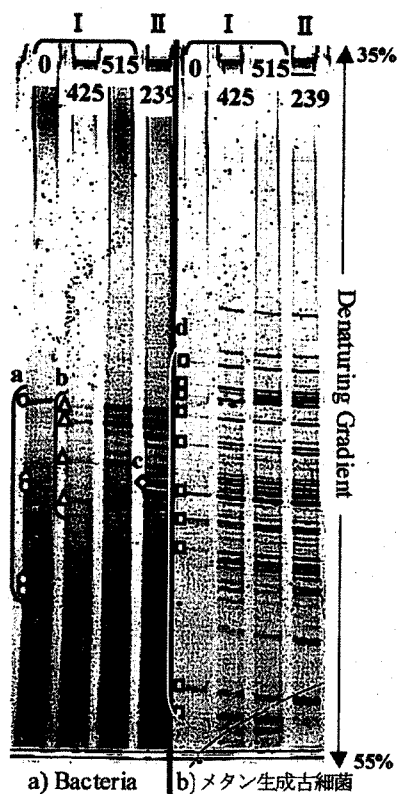
本研究において、ベンゼンの嫌気分解と同時に、メタンの生成が確認されている。本実験と同時期、同期間に取られたデータではないが、実験Ⅰの蓮田土壌Aでは、ベンゼン分解：メタン生成=1：8.9、実験Ⅰの蓮田土壌B235日目の上清2mLを20mLのMS培地Aに植え継いだ集積第二代では、ベンゼン分解：メタン生成=1：6.3という結果が得られている。ベンゼン分解とメタン生成の関係は、化学量論的には下式<sup>9)</sup>で表される。



本集積系内では、存在する泥の影響により、分解はまだ化学量論には従っていないと考えられる。

### (6) ベンゼン嫌気分解微生物の群集構造解析

Fig.5はベンゼン嫌気分解実験(集積第一代)での蓮田土壌Aの培養0、425、515日目、及び土壌Aから植え継いだ集積第二代植え継ぎ実験Ⅱの培養239日目の微生物群集構造解析をBacteriaおよびメタン生成古細菌を含むEuryarchaeota門古細菌について行った結果である。Fig.5a)はBacteria、b)はEuryarchaeota門古細菌(メタン生成古細菌)を示している。Bacteriaに関して、培養0日で見られたバンド群aとは全く異なるバンド群bが425日に見られた。さらに植え継ぎにより、新たなバンドcが出現した。一方メタン生成古細菌では、培養0日のバンド群dは425日の培養経過後も存在し続け、植え継ぎにおいても変化が見られなかった。



I : 1<sup>st</sup> culture II : 2<sup>nd</sup> culture

Fig.5 Community analysis of anaerobic benzene degrading culture

次に、集積第二代の200日目のサンプルに $^{13}\text{C}_6$ ベンゼンを添加してSIP法を行い、密度ごとのフラクションに対しPCR-DGGEを行った。結果をFig.6に示した。密度の重い方から第1フラクションとし、最も密度が軽いのは第18フラクションである。そのうちバンドが鮮明に見られた第6フラクションから第10フラクションでの結果を示した。特に第6フラクションと第10フラクションを比較すると、濃いバンドの位置が異なっていることがわかる。このうちバンドの濃淡差の大きいバンドAとBを切り出し塩基配列を解読したところ、バンドAとBの配列は互いに1塩基違いであることがわかった。また、第6フラクションのDNAをクローニングすることにより、バンドBの16S rRNA遺伝子-V3領域において完全に一致するクローンを得、バンドBで示される微生物の16S rRNA遺伝子全長を得ることができた。ここで、バンドBと完全に一致する16S rRNA遺伝子-V3領域を持つクローンの16S rRNA遺伝子の相同性検索を行った。その結果、分離された微生物は、*Syntrophus gentianae*<sup>17)</sup> [X85132]と85.1% (相同塩基数 1204/1414)、*Syntrophus aciditrophicus* SB<sup>18)</sup> [CP000252]と84.5% (相同塩基数



Fig.6 Stable Isotope Probing analysis of anaerobic benzene degrading culture

1196/1414)の相同性があることがわかった。続いて、分離されていない微生物の塩基配列に検索対象を広げた結果、Uncultured bacterium clone ZZ14C7 16S ribosomal RNA gene<sup>19)</sup> [AY214193]と98% (相同塩基数 1414/1435)の相同性があることがわかった。

#### 4. 考察

##### (1) 土壌からのベンゼン嫌気分解現象の確立

本研究では供試土壌として蓮田土壌を用いたMilliQ水中でベンゼンの分解が確認されたが、分解が始まるまでに最短でも100日程度必要であった。これは集積系中の環境がベンゼン嫌気分解に最適な条件に移行するのに必要な期間だと考えられる。他の供試土壌では358日経過後にもベンゼンの分解は見られなかった。ベンゼンは非常に安定な物質<sup>20)</sup>で、微生物による嫌氣的分解が起こりづらく、嫌氣的にベンゼンを分解する微生物はベンゼンで汚染された環境に存在しない場合があることが示された。

## (2) ベンゼン嫌気分解微生物の植え継ぎ

集積第2代植え継ぎ実験Ⅰでは、Ulrichらによりメタン生成条件下での集積系培養に使用された培地に加え、Coatesらにより硝酸塩還元条件下での単離に使用された培地について検討した。さらに、微生物にとって硝酸塩還元条件下および硫酸塩還元条件下でより有利である可能性を考慮し、硝酸塩および硫酸塩を投入した。しかし、植え継ぎ実験Ⅰでは全く効果が見られなかった。また、培地Bの利用に際しては、ベンゼン分解微生物がAcetateを基質として利用し、分解が促進されることを期待したが、ベンゼンは分解されなかった。Acetateを入れたMS培地Bではベンゼン分解菌以外の微生物が優占する恐れがあるので、この培地の使用を中止した。

これらの結果を受け、集積第2代植え継ぎ実験ⅡではMS培地Aを用い、電子受容体は投入しなかった。これは、できるだけ集積第1代培養条件（蓮田土壌とMilliQ水のみ）に近い環境にするためである。ここでは植え継ぎ実験Ⅰと同じ接種源を用いて植え継ぎ量を10倍に増やしたところ、ベンゼンが分解された。これより、接種源約1%では分解微生物は活性を保つことができず植え継ぎに際しての接種割合が重要であり、環境条件や存在する分解微生物数及び共生系の構築などが影響すると考えられる。

また、植え継ぎ実験Ⅱではベンゼン濃度を70mg/Lから10mg/Lに下げた。高いベンゼン濃度による微生物の増殖阻害を避けるためであったが、Fig.3では50mg/Lのベンゼンを分解できることが示されているとおり、70mg/Lが増殖阻害する影響は少ないと考えられる。既往の研究においても、メタン生成条件下ではベンゼン濃度が77mg/Lでの分解が報告されている<sup>2)</sup>。

さらに集積第3代植え継ぎ実験では、新しい培地内でのベンゼン嫌気分解微生物の馴養速度を早めるため、栄養と嫌気度について検討した。栄養に関して、蓮田土壌固有の栄養素が分解微生物に有利に働いている可能性を考えて蓮田土壌抽出液、微量ミネラルを豊富に含むYeast Extract、これまでの報告<sup>20)</sup>で嫌気条件でのベンゼン分解促進に効果があることが示唆されていたVitamin B<sub>12</sub>を用いた。これまで還元剤には(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>OやNa<sub>2</sub>S・9H<sub>2</sub>Oを用いてきたが、ここでアミノ酸の一種であり広く還元剤として用いられるCysteineをメタン生成古細菌用培地<sup>21)</sup>濃度のおよそ10倍の濃度で投入した。この結果、全般的に見るとCysteineを投入した系で分解が見られず、投入しない系で速やかな分解が確認された。これはCysteineを多量に入れたため、ベンゼン嫌気分解に関与しないCysteineを基質とする微生物が増殖し、ベンゼン嫌気分解微生物が優占できないことで引き起こされたと推測できる。また、本実験においてVitamin B<sub>12</sub>がベンゼン嫌気分解に何らかの促進作用があることが明らかとなった。

## (3) ベンゼン嫌気分解微生物の群集構造解析

Fig.5では、培養日数が経過するとともにBacteriaのバンドパターンに変化が見られたが、メタン生成古細菌のバンドパターンには大きな変化は見られなかった。

ベンゼン由来の<sup>13</sup>Cを取り込んでいるとみられるバンドと同一の配列を持つクローンに対して行った 16S rRNA 遺伝子のデータベース解析の結果、相同性が高かった *Syntrophus aciditrophicus* SB および *Syntrophus gentianae* は、ともに嫌気安息香酸分解微生物として報告されている<sup>18)22)</sup>。これらの微生物は  $\delta$ -Proteobacteria に属し、メタン生成古細菌 もしくは硫酸還元菌と共生系を築いている。ただし、16S rRNA 遺伝子の相同性が85%であることから、*Syntrophus aciditrophicus* SB や *Syntrophus gentianae* とは大きく異なる未知の微生物であるといえ、このような分解経路を持つかどうかは更なる研究が必要である。また、Uncultured bacterium clone ZZ14C7 16S ribosomal RNA gene はベンゼン汚染された地下水から採取された塩基配列である。このことから、本集積培養系の中で特定した配列を持つ細菌は、ベンゼンの嫌気分解に関与している可能性が高いことが示唆された。これにより、汚染現場にて本研究で特定された配列を持つ微生物の存在を把握することで土壌の自然浄化能力を評価することができる。

## 5. 結論

メタン生成条件下での嫌気性ベンゼン分解現象の確立とその微生物解析の結果、以下の知見が得られた。

- 1) 蓮田土壌よりベンゼン嫌気分解微生物集積系を得ることができた
- 2) ベンゼン嫌気分解微生物集積系を植え継ぐ際、接種源を10% v/v程度とし、Vitamin B<sub>12</sub>を促進剤として使用するのがよい
- 3) PCR-DGGE解析の結果、培養経過とともにBacteriaのバンドパターンに変化が見られたが、メタン生成古細菌のバンドパターンには大きな変化は見られなかった
- 4) SIP解析の結果、*Syntrophus aciditrophicus* SBおよび*Syntrophus gentianae*と16S rRNA遺伝子の85%の相同性を持つ微生物が<sup>13</sup>Cベンゼン由来のDNAを持つ。このDNAを持つ微生物はベンゼン汚染された地下水に生息する微生物の16S rRNA遺伝子と98%の相同性を持ち、ベンゼンの嫌気分解に関与している可能性が高いことが示唆された

## 6. 参考文献

- 1) Burland, S.M., and Edwards, E.A.: Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65 p529-533, 1999
- 2) Lovley, D.R., Woodward, J.C., and Chapelle, F.H.: Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.62 p288-291, 1996
- 3) Lovley, D.R., Coates, J.D., Woodward, J.C., and Phillips, E.J.P.: Benzene oxidation coupled to sulfate reduction, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.61 p953-958, 1995
- 4) Kazumi, J., Caldwell, M.E., Suflita, J.M., Lovley, D.R., and Young, L.Y.: Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments, *Environmental Science & Technology*, vol.31 p813-818, 1997
- 5) Ulrich, A.C., and Edwards, E.A.: Physiological and molecular characterization of anaerobic benzene-degrading mixed cultures, *Environmental Microbiology*, vol.5 p92-102, 2003
- 6) Coates, J.D., Chakraborty, R., Lack, J.G., O'Connor, S.M., Cole, K.A., Bender, K.S., Achenbach, L.A.: Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*, *letters to Nature*, vol.411, 1039-1043, 2001
- 7) Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M., and Watanabe, K.: RNA-Based Isotope Probing and Isolation of Anaerobic Benzene Degrading Bacteria from Gasoline-Contaminated Groundwater, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.72 p3586-3592, 2006
- 8) Rooney-Varga, J.N., Anderson, R.T., Fraga, J.L., Ringelberg, D., and Lovley, D.R.: Microbial Communities Associated with Anaerobic Benzene Degradation in a Petroleum Contaminated Aquifer, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.65 p3056-3063, 1999
- 9) Chang, W., Um, Y.-S. and Holman, T.R.P.: Molecular Characterization of Anaerobic Microbial Communities from Benzene-Degrading Sediments under Methanogenic Conditions. *Biotechnology Progress*, vol.21 p1789-1794, 2005
- 10) Radajewski, S., McDonald, I.R., and Murrell, J.C.: Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms *Current Opinion in Biotechnology*, vol.14 p296-302, 2003
- 11) Edwards, E.A., Wills, L.E., Reinhard, M., and Grbic-Galic, D.: Anaerobic degradation of Toluene and Xylene by Aquifer Microorganisms under sulfate-reducing condition, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.58 p794-800, 1992
- 12) Bruce, R.A., Achenbach, L.A., and Coates, J.D.: Reduction of (per)chlorate by a novel organism isolated from paper mill waste, *Environmental Microbiology*, vol.1 p319-329, 1999
- 13) Muyzer, G., Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.59 p695-700, 1993
- 14) Watanabe, T., Asakawa, S., Nakamura, A., Nagaoka, K. and Kimura, M.: DGGE method for analyzing 16S rDNA of Methanogenic archaeal community in paddy field soil, *FEMS Microbiology Letters*, vol.232 p153-163, 2004
- 15) Ten, L.N., Im, W.-T., Kim, M.-K. and Lee, S.-T.: A plate assay for simultaneous screening of polysaccharide and protein-degrading micro-organisms, *Letters in Applied Microbiology*, vol.40 p92-98, 2005
- 16) Reysenbach, A.L., Longnecker, K., and Kirshtein, J.: Novel Bacterial and Archaeal Lineages from an In Situ Growth Chamber Deployed at a Mid-Atlantic Ridge Hydrothermal Vent, *Applied and Environmental Microbiology*, vol.66 p3798-3806, 2000
- 17) Wallrabenstein, C., Gorny, N., Springer, N., Ludwig, W. and Schink, B.: Pure culture of *Syntrophus buswellii*, definition of its phylogenetic status, and description of *Syntrophus gentianae* sp.nov., *Syst. Appl. Microbiol.*, vol.18 p62-66, 1995
- 18) Jackson, B.E., Bhupathiraju, V.K., Tanner, R.S., Woese, C.R., McInerney, M.J.: *Syntrophus aciditrophicus* sp.nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms, *Archives of Microbiology*, vol.171 p107-114, 1999
- 19) DDBJ/EMBL/GenBank database: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>
- 20) Coates, J.D., Chakraborty, R., McInerney, M.J.: Anaerobic Biodegradation - a new era, *Research in Microbiology* vol.153 p621-628, 2002
- 21) ATCC medium : 1045 Methanobacteria merdium
- 22) Schocke, L. and Schink, B.: Energetics and biochemistry of fermentative benzoate degradation by *Syntrophus gentianae*, *Archives of Microbiology*, vol.171 p331-337, 1999

(2006. 5. 26 受付)

Selective cultivation of benzene degrading microbial consortia  
under anaerobic condition and their analysis

Nahoko SAKAI<sup>1\*</sup>, Futoshi KURISU<sup>1</sup>, Osami YAGI<sup>2</sup>, Kazuo YAMAMOTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Urban Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

<sup>2</sup> Advanced Research Institute for the Science and Humanities, Nihon University

<sup>3</sup> Environmental Science Center, The University of Tokyo

Anaerobic benzene degradation is a remarkable tool for bioremediation of contaminated soil and ground water. In this study selective cultivation of benzene degrading anaerobic microbial communities was performed by successive dosing of benzene into soil samples collected from lotus field. PCR-DGGE analysis revealed considerable progressive change in the Bacterial communities whereas negligible change among the Methanogenic Archaea. According the result from <sup>13</sup>C<sub>6</sub>benzene Stable Isotope Probing, some bacteria (mainly in the heavier fraction of <sup>13</sup>C-DNA) shared 85% homology in 16S rRNA gene with *Syntrophus aciditrophicus* SB and *Syntrophus gentianae* which are known to have symbiotic relationship in anaerobic benzoate degradation. However based on such low homology, the bacteria obtained in this study cannot be certainly identified. This result helps to judge natural attenuation in contaminated soil.