

B-6 土壌カラムにおけるメタン酸化細菌 *Methylocystis* sp. M株およびトリクロロエチレンの挙動解析

東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻 ○中村明博
東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御センター 栗栖太
同上 矢木修身

1. はじめに

近年、有機塩素化合物による土壌・地下水汚染の対策として、微生物によるバイオレメディエーション技術が注目されている。この技術には、1) 生物を活用するため、常温、常圧で反応が進むので省エネルギー的技術である、2) 薬品を使用しないため二次汚染が少ない、3) 原位置での修復が可能である、4) 低濃度、広範囲の汚染の浄化に適用できる、5) 他の処理法と比較しコストが安い、などの利点があげられる。しかし、現場で実際に浄化を行った研究事例は少なく、地下水中の微生物の挙動はあまり解明されていない。添加した微生物と分解すべき汚染物質の土壌中の挙動を調べ、地下水中でどのように分解が行われるのか、また、分解後の微生物がどのような挙動を示すのかをモデル化することができれば、微生物によるバイオレメディエーション技術の効果が予想できるようになり、実用化に向け非常に有効な情報が得られると予想される。

本研究では、トリクロロエチレン、およびトリクロロエチレン分解微生物 (*Methylocystis* sp. M 株) を対象とし土壌・地下水環境中における挙動を測定した。実験装置には3L容のアクリル製カラムを用い、その中における塩化ナトリウム (トレーサー)、トリクロロエチレン (TCE)、M 株の挙動を測定した。

2. M 株の計数法

M 株¹⁾は、土壌中から分離した運動性を持たないグラム陰性の桿菌で、大きさは $(0.6\sim 1.0) \times (1.0\sim 5) \mu\text{m}$ であり、37°Cでは増殖するが 45°Cでは増殖できない。メタンおよびメタノールを唯一の炭素源として増殖し、TCEの他に、シス、トランス、1,1-ジクロロエチレン、1,2-ジブromエタン、1,1,2-トリクロロエタン、1,2-ジクロロエタン、クロロホルムを共代謝分解することができる。

M 株の計数には ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (アプライドバイオシステムズ社) を用いた。M 株の計数に用いたプライマー (SF-1 5'-GCGTCACCAATTATGAGGAGCTC-3'、SR-3 5'-CCGAGTTTCGTCTGCAGCAA-3') およびプローブ (C821 5'-AGATTGCGGTCGTGAATGTTTCGG AGp-3': 3'端はリン酸キャップ (p) で組成されている) は TCE 分解酵素であるメタンモノオキシゲナーゼ (mmoC) の塩基配列に対応させて設計²⁾した。試薬には TaqMan Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズ社) を用いた。サンプルの前処理として、サンプルをマイクロチューブに入れたまま5分間煮沸し、その後氷で冷却した。反応サイクルは、AmpErase UNG の反応時間として 50°C、2分間を1サイクル、AmpliTaq Gold の活性化および AmpErase UNG の失活時間として 95°C、10分間を1サイクル行う。次に 95°C、15秒間の熱変性のステップ、62°C、1分間のアニーリングおよび伸長反応のステップを 40もしくは 50 サイクル行った。

実際に検量線用に4段階に希釈した M 株溶液 (1×10^8 、 1×10^6 、 1×10^4 、 1×10^2 cells/ml) を3連用意し、得られた蛍光増幅をサイクルごとに対数グラフで表すと図1のようになった。蛍光が指数関数的に増加している領域で threshold line を決定し、蛍光が threshold line に達するときのサイクル数を Ct 値とした。Ct 値と、サンプル初期濃度の対数との関係をプロットすると図2のように直線関係を示した。M 株濃度で 1×10^2 cells/ml (1 tube あたり 2 cells) のサンプルにおいても3本とも PCR 増幅可能で、検出可能であった。

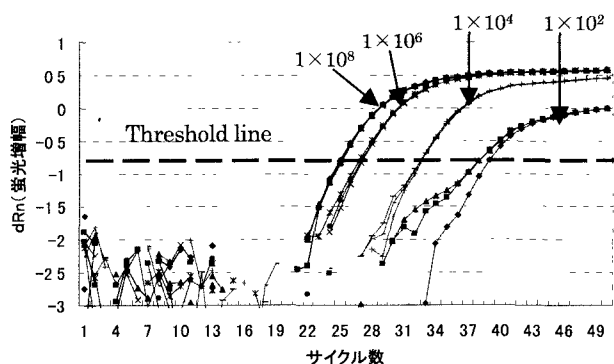


図1 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System
より得られた検量線サンプルの蛍光増幅曲線

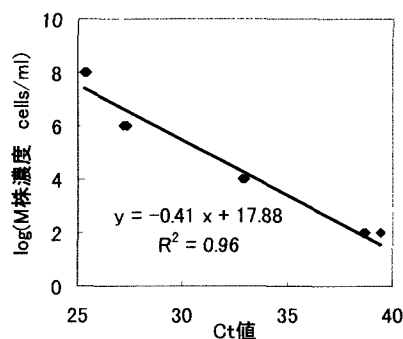


図2 検量線プロット

3. カラム実験・方法

実験装置には図3のような3L容アクリル製カラムを用い、これにオートクレーブ滅菌した土壌(川砂)を充填した。空隙率は48%であった。川砂の粒径分布は、粒径範囲600、600~300、300~150、150~ μm のものがそれぞれ、4.9、74.2、19.4、1.5%であった。途中に4ヶ所のサンプリングポート(SP1~SP4)を設け、SP1~SP3は、素焼き管(塩化ナトリウム、TCE用)または先端に焼結ガラスを装填した管(M株用)からサンプルを採取した。SP4では、土壌を通過してきた液相をシリンジで引き抜いた。最下部~SP1、SP1~SP2、SP2~SP3、SP3~SP4の間の体積はそれぞれ600、700、700、1000mlであった。通水は上向流とし、流量はポンプで0.9~1.0ml/minに調整した。

塩化ナトリウム溶液(5,000 $\mu\text{S}/\text{cm}$)、TCE溶液(0.2ppm)、M株懸濁液(約 $1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$)をそれぞれ単独で連続的に添加し、各サンプリングポートにおける濃度を経時的に測定した。塩化ナトリウム溶液濃度は電気伝導度計、TCE溶液濃度はガスクロマトグラフィー(FID検出器:ヘッドスペース法)による測定を行った。M株は、各サンプリングポートから500 μl ずつサンプルを採取しておき、 -80°C で冷凍保存した。保存しておいたサンプルは後日まとめてリアルタイムPCR法により3連で測定した。

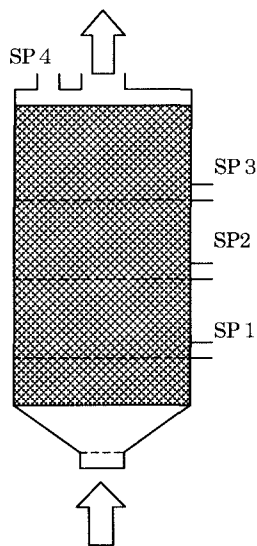


図3 土壌カラムの模式図

4. 結果と考察

各サンプリングポートで採取したサンプルの塩化ナトリウム濃度(SP2は採取しなかった)およびM株濃度の時間変化を図4および図5に示した。TCEは、ほとんど検出されなかったため、実験方法を含め今後の検討が必要である。

添加液の流れが完全なプラグフローだったと仮定すると、各サンプリングポートに達するまでの所要時間はそれぞれ、4.8~5.3、10.4~11.6、16.0~17.8、24.0~26.7時間と予測できる。図4で、塩化ナトリウム濃度はSP1、SP3、SP4でそれぞれ、5.0、16.5、25.5時間後に添加液と同じ濃度に達している。塩化ナトリウムには吸着性がなく、分散の影響しか受けてないことが確認できた。一方図5でM株濃度は、SP1、

SP2、SP3、SP4でそれぞれ8、12、23、27時間後にピークに達している。さらに、一度ピークに達した後には減少し、その後定常状態になっていた。

また、ピークの大きさも定常状態の濃度も $SP1 > SP2 > SP3 > SP4$ となっており、カラム中の移動に伴いM株の到達量が減少していた。30時間で各サンプリングポートを通過したと思われる菌体数をグラフから算出すると、SP1、SP2、SP3、SP4でそれぞれ、 1.2×10^9 、 6.2×10^8 、 4.2×10^8 、 5.9×10^7 cellsであった。30時間での総添加量は 3.3×10^9 cellsであり、添加液の流れをプラグフローと仮定した場合の各サンプリングポートにおける到達量はそれぞれ、 2.7×10^9 、 2.0×10^9 、 1.3×10^9 、 2.7×10^8 cellsと予想される。これらの数値から到達率を計算するとそれぞれ44.5、31.2、32.6、21.6%であった。

M株濃度のピークが遅れることや、到達量が減少することに関しては、吸着による影響が大きいと考えられた。また、M株濃度がピーク後に減少し定常状態になることが観察されたが、この原因については現在検討中である。

5. まとめ

本研究では、土壌カラムを用いた実験系においてM株の挙動を測定できることが確認できた。今後はこれらの結果をもとにモデル化を試み、土壌中で起こっている現象や効果の予測を行い、バイオレメディエーション技術の実用化に近づけていきたいと考えている。

6. 参考文献

- 1) 矢木修身ら,揮発性有機塩素化合物の微生物による分解、除去,水環境学会誌,第15巻,第8号,493-498,1992
- 2) I. R. McDonald, et al, The soluble methane monooxygenase gene cluster of the trichloroethylene-degrading, methanotroph *Methylocystis* sp. strain M, Appl. Environ. Microbiol., 63, 1898-1904, 1997
- 3) T. Kikuchi, et al, Quantitative and specific detection of a trichloroethylene-degrading methanotroph, *Methylocystis* sp. strain M, by a most probable number-polymerase chain reaction method, Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, 2673-2681, 2001

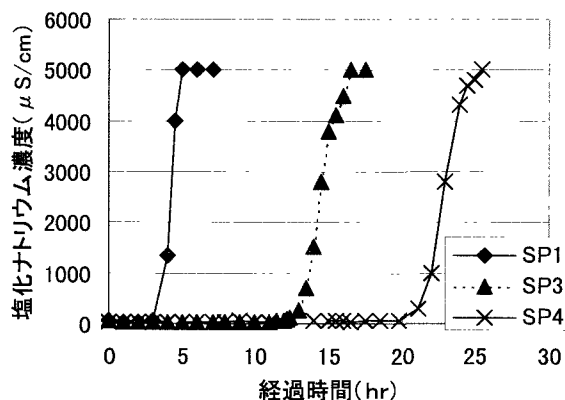


図4 各サンプリングポートで測定された塩化ナトリウム濃度の時間変化

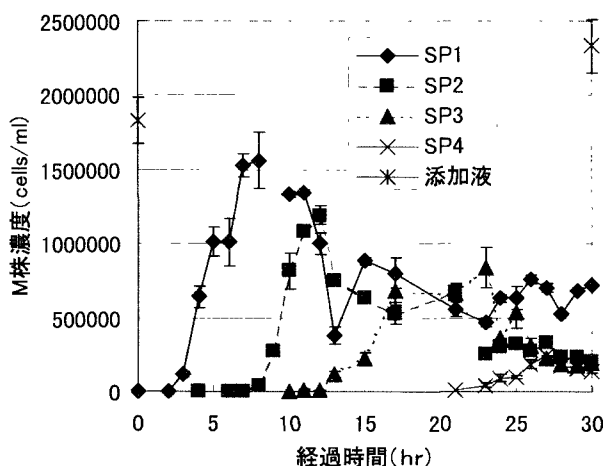


図5 各サンプリングポートで測定されたM株濃度の時間変化