

新規*Dehalococcoides*属細菌の単離とそのクロロエチレン類脱塩素化能力藤井 雄太 四本 瑞世
緒方 浩基Isolation of a New *Dehalococcoides* and its Chloroethenes-Dechlorinating PerformanceYuta Fujii Mizuyo Yotsumoto
Hiroki Ogata

Abstract

As a treatment technique for soil and groundwater contamination with chloroethenes, agents are injected into the ground to activate chloroethenes-dechlorinating bacteria. However, new methods for treating sites with fewer chloroethenes-dechlorinating bacteria are required. One solution is injecting isolated and cultivated chloroethenes-dechlorinating bacteria into the ground, called bioaugmentation. In this study, we isolated *Dehalococcoides* from chloroethenes-contaminated groundwater, which can dechlorinate tetrachloroethene and trichloroethene into ethene. Using repeated limiting dilutions, microbial community analysis, and microscopy, we isolated *Dehalococcoides* and renamed it *Dehalococcoides mccartyi* NIT-OBY. Strain NIT-OBY completely dechlorinated high concentrations of trichloroethene in 28 days and then rapidly increased. This result indicates that strain NIT-OBY is useful for practical use.

概 要

クロロエチレン類汚染土壌・地下水の浄化技術は、地盤中に栄養剤を注入してクロロエチレン類脱塩素化細菌を活性化させる工法が実用化されているが、脱塩素化細菌が存在しない現場でも対応できる技術が求められている。その1つに、外部で単離・培養した脱塩素化細菌を注入するバイオオーグメンテーションがある。そこで筆者らは、クロロエチレン類汚染現場の地下水から、PCEやTCEを無害なエチレンまで脱塩素化可能である*Dehalococcoides*属細菌の単離を試みた。菌叢解析と顕微鏡観察を行いつつ限界希釈培養を繰り返すことで単離に成功し、この菌株を*Dehalococcoides mccartyi* NIT-OBY株と命名した。NIT-OBY株は環境基準値の1800倍の濃度のTCEを28日で完全に脱塩素化可能であり、高い増殖能力を示したことから、非常に有望な菌株だと考えられた。今後はNIT-OBY株の実用化を進めていく。

1. はじめに

テトラクロロエチレン（以下、PCE）やトリクロロエチレン（以下、TCE）などのクロロエチレン類は、ドラクリーニングの溶剤や機械部品・半導体などの洗浄剤として、工業的に幅広く使用されてきた。クロロエチレン類は土壌環境中では地下に浸透しやすく、また生物難分解性であることから¹⁾、産業利用に伴って漏出したクロロエチレン類による土壌及び地下水の汚染が各地で確認されている。クロロエチレン類は発がん性や生殖毒性を有することから、その土壌・地下水汚染は大きな社会的問題となっており、適切な浄化対策が求められている。

クロロエチレン類汚染の浄化技術としては、地盤中に栄養剤を注入し、もともと生息するクロロエチレン類脱塩素化細菌を活性化させて浄化を行う手法（嫌気性バイオレメディエーション）が有効である。しかし、地盤中に脱塩素化細菌がほとんど存在しない現場でも対応できる技術が求められている。

その1つに、外部で取得・培養したクロロエチレン類脱塩素化細菌を注入して浄化を行う手法であるバイオオー

グメンテーションが挙げられる。*Dehalobacter*属や*Dehalospirillum*属、*Desulfitobacterium*属、*Desulfuromonas*属、*Geobacter*属、*Sulfurospirillum*属など様々な細菌がPCEやTCEをシス-1,2-ジクロロエチレン（以下、*cis*-1,2-DCE）まで脱塩素化することが知られているが、*Dehalococcoides*属細菌（以下、デハロ菌）のみが、*cis*-1,2-DCEからクロロエチレン（以下、CE）を経由して無害なエチレンまで脱塩素化可能である¹⁾（Fig. 1）。

ただし、デハロ菌を含む地下水をそのまま菌源に使用して培養すると、共存する有害な微生物も増殖する可能性がある。そのため、デハロ菌のみを予め単離・保存しておくことが必要である。単離したデハロ菌を大量に培養してから地盤中に注入することで、脱塩素化細菌が存在しない現場においても、クロロエチレン類汚染土壌・地下水の効率的な浄化が可能になると期待される。

バイオオーグメンテーション技術の開発を目指し、大林組が過去に浄化工事を行ったクロロエチレン類汚染現場の地下水から、独自のデハロ菌の単離を試みた。本報では単離達成までの一連のプロセスと、そのクロロエチレン類脱塩素化能力を検証した結果を報告する。

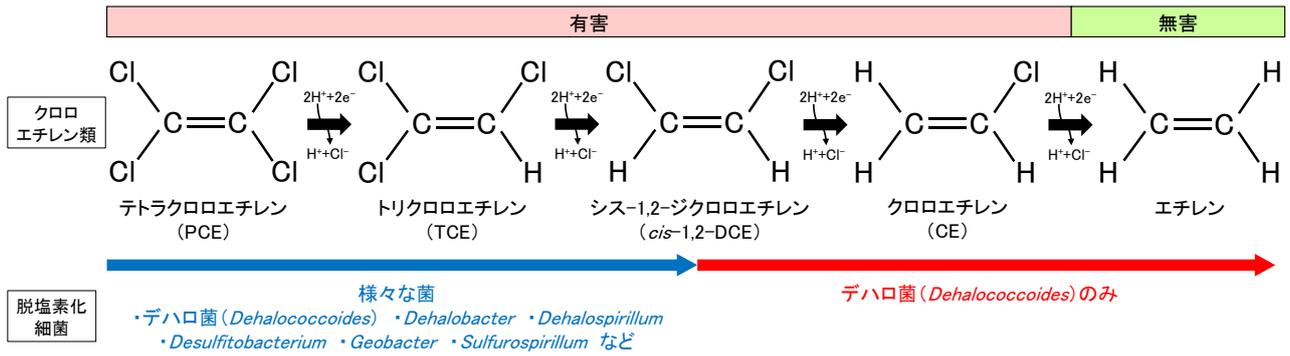


Fig. 1 デハロ菌によるクロロエチレン類の脱塩素化経路
 Dechlorination Pathway of Chloroethenes by *Dehalococcoides*

2. デハロ菌単離の流れ

デハロ菌単離の全体フローをFig. 2に示す。まず、デハロ菌が存在することをDNA解析で確認済みの地下水4種類を菌源に用いて、TCEからエチレンへの脱塩素化能力と、メタン菌の活性の有無を確認し、その結果をもとに菌源を絞り込んだ (3章)。選抜した菌源と、デハロ菌の生育に最適化した培地を用いて限界希釈培養を繰り返した。これにより、デハロ菌を優先的に増殖させ、混在する菌を除去しつつ、培養液中に占めるデハロ菌の割合を高めていき、菌叢解析と蛍光顕微鏡観察により単離の進捗を検証した (4章)。

単離完了が示唆された段階でRFLP解析と電子顕微鏡観察を行い、単離できたことを確認した (5章)。単離後のデハロ菌は全ゲノム解析を行い、その結果をもとに系統解析を実施し、菌の命名を行った (5章)。また、単離したデハロ菌のTCE脱塩素化能力と増殖能力を実験により検証し、実用化に向けた適性を評価した (6章)。

3. TCE脱塩素化能力の確認と菌源の絞り込み

3.1 実験方法

まず、菌源を用いたTCE脱塩素化実験を行った。この実験の目的の一つは、各菌源がTCEからエチレンへの十分な脱塩素化能力を有するか確認することである。もう一つは、メタン菌の活性がない菌源を選択することである。メタン菌はデハロ菌と同じ生育条件で増殖し、この先の工程である限界希釈培養でも除去が困難なため、その活性がない菌源を選定することが非常に重要である。

実験ケースをTable 1に示す。大林組が保有する、クロロエチレン類汚染現場の地下水A~Dの4種類 (ただし、Aは地下水を大林組開発栄養剤「クロロクリン®」で継代培養したもの) を菌源として使用した。炭素源にクロロクリンの主成分であるカルボン酸を用いた「カルボン酸」、炭素源にデハロ菌が直接利用可能な酢酸を用いた「酢酸」、炭素源に酢酸を用い、さらにメタン発酵抑制剤であり、メタン菌を死滅させる効果がある1,1,2-トリクロロエタン (以下、1,1,2-TCA) を添加した「酢酸+TCA」、の3通

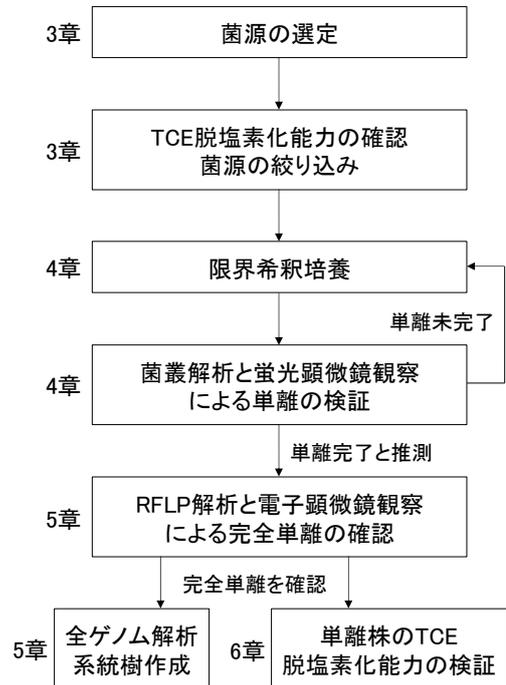


Fig. 2 デハロ菌単離の全体フロー
 Flowchart of *Dehalococcoides* Isolation

Table 1 TCE脱塩素化実験のケース一覧
 Cases of TCE Dechlorination Experiment

ケース名	菌源	炭素源	1,1,2-TCA	気相
A-カルボン酸	A	カルボン酸	なし	N ₂ : CO ₂ = 4 : 1
B-カルボン酸	B			
C-カルボン酸	C			
D-カルボン酸	D			
A-酢酸	A	酢酸	なし	H ₂ : CO ₂ = 4 : 1
B-酢酸	B			
C-酢酸	C			
D-酢酸	D			
A-酢酸+TCA	A	酢酸	あり	H ₂ : CO ₂ = 4 : 1
B-酢酸+TCA	B			
C-酢酸+TCA	C			
D-酢酸+TCA	D			

りを4種類の地下水それぞれに用意し、合計12ケースを設定した。

実験の概要図をFig. 3に示す。20 mLのDHB-CO₃培地が入った50 mL容バイアル瓶を、カルボン酸のケースはN₂:CO₂=4:1のガス、酢酸と酢酸+TCAのケースはH₂:CO₂=4:1のガスで置換し、フッ素樹脂コーティングされたブチルゴム栓とアルミキャップで密栓した。カルボン酸のケースのみガスの配合が異なるのは、デハロ菌の生育に必要な水素がカルボン酸の分解時に生成されるためである。

密栓後の容器に菌源を200 μL、ビタミン混合液を200 μL、15 mM硫化ナトリウム水溶液を200 μL、Ti(III)-NTA溶液を200 μL、10 g/L塩化カルシウム二水和物水溶液を200 μL、TCEを0.5 μL添加した。さらに、カルボン酸のケースには850 mMカルボン酸ナトリウム水溶液を200 μL、酢酸のケースには500 mM酢酸ナトリウム水溶液を200 μL、酢酸+TCAのケースには500 mM酢酸ナトリウム水溶液を200 μLと1,1,2-TCAを2 μL添加し、28°Cで静置培養した。TCEの初期濃度は260 μMとなるように設定した。

一定期間経過後に、気相のクロロエチレン類とエチレン、メタンの濃度をガスクロマトグラフで測定し、気液平衡から液相中の濃度を算出した。

3.2 実験結果及び考察

実験後のクロロエチレン類とメタンの濃度の測定結果をTable 2に示す。経過日数が異なるのは、TCEからエチレンへの脱塩素化が完了した、あるいはメタンの発生が確認された段階で測定を終了したためである。地下水Bを使用したケースはいずれもTCEの脱塩素化が途中で停止しており、デハロ菌の活性は低いと推測された。C-カルボン酸とD-カルボン酸は、TCEからエチレンへの脱塩素化は良好に進んだものの、メタンが発生しており、メタン菌の活性が高いことが確認されたため、以降の検討からは除外した。

Table 2の黄色い背景で示した、A-カルボン酸、C-酢酸、D-酢酸、A-酢酸+TCA、C-酢酸+TCAの5ケースでTCEの大部分がエチレンまで脱塩素化しており、かつメタンが一切発生しなかったことから、メタン菌の除去が示唆された。よって、これら5ケースで得られた培養液（以下、初代培養液）を次の段階である限界希釈培養へと進めた。

4. 限界希釈培養

4.1 限界希釈培養の概要

限界希釈培養の概要図をFig. 4に示す。デハロ菌は、固体培地上で単一のコロニーとして取得することが困難な菌である。そのような菌を単離するための手法が限界希釈培養である。まず、電子供与体として水素ガスを、電子受容体としてTCEを、唯一の炭素源として酢酸を添加した、デハロ菌の生育に最適化した培地を多数用意する。

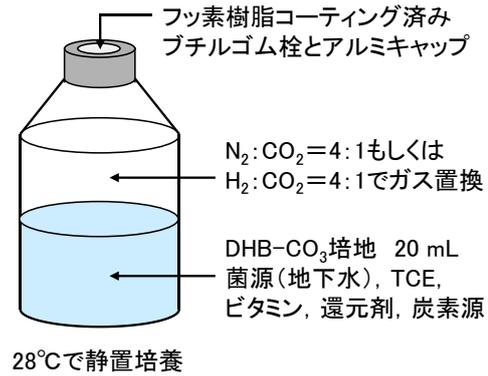


Fig. 3 TCE脱塩素化実験の概要図
Outline of TCE Dechlorination Experiment

Table 2 TCE脱塩素化実験におけるクロロエチレン類の脱塩素化とメタンの発存量
Chloroethenes Dechlorination and Methane Generation in TCE Dechlorination Experiment

ケース名	経過日数	TCE (μM)	cis-1,2-DCE (μM)	CE (μM)	エチレン (μM)	メタン (mM)
A-カルボン酸	35日	0	0	1.0	319.0	0
B-カルボン酸	35日	3.5	287.2	223.5	12.4	0.3
C-カルボン酸	35日	0	0	4.1	369.4	0.1
D-カルボン酸	35日	5.3	1.7	73.8	300.3	0.3
A-酢酸	35日	0	0	192.5	0	9.9
B-酢酸	35日	2.1	627.9	96.3	1.7	0
C-酢酸	35日	1.8	0	211.7	211.9	0
D-酢酸	35日	2.0	0	0.6	240.4	0
A-酢酸+TCA	86日	1.4	0	1.8	178.4	0
B-酢酸+TCA	98日	452.6	71.6	148.7	231.6	0
C-酢酸+TCA	98日	1.2	0.9	1.4	434.9	0
D-酢酸+TCA	86日	463.2	5.3	66.5	0	0

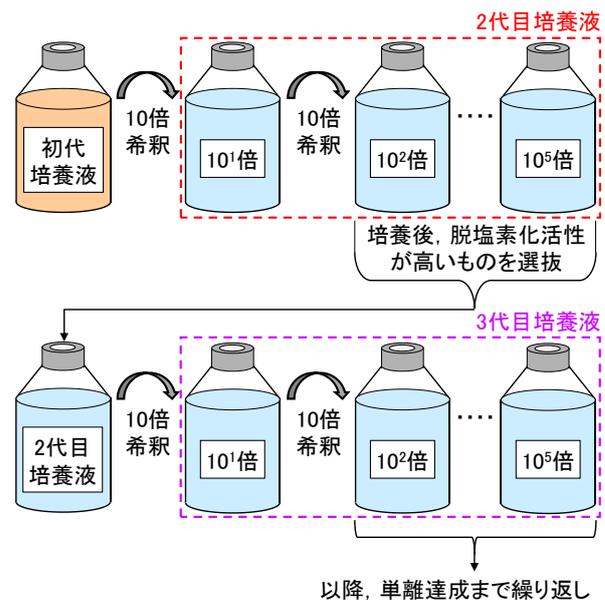


Fig. 4 限界希釈培養の概要図
Outline of Limiting Dilution

この培地に、3.2節で得られた初代培養液を 10^1 倍、 10^2 倍、 \dots 10^5 倍、と段階希釈して培養する。一定期間経過後に、気相のクロロエチレン類濃度を測定し、脱塩素化活性が高い培養液を選抜し、それを再度段階希釈して培養するという工程を繰り返す。これにより、デハロ菌のみを優先的に増殖させ、混在する菌を除去・淘汰しつつ、徐々に培養液中に占めるデハロ菌の割合を高めていく。

他の菌がほぼ除去された段階で、最終的に培地中に菌が数匹しか入らない濃度まで希釈すると、デハロ菌のみが存在する、目的の培養液を得られる可能性がある。この手法を用いてデハロ菌の単離を進めた。

4.2 各培養液の経緯

限界希釈培養に供した5つの培養液のうち、C-酢酸とD-酢酸は開始後に容器内が陰圧となった。このことから、容器内の二酸化炭素と水素が大量に消費され、メタン菌などの他の菌が増殖したと示唆されたため、以降の作業を停止した。A-カルボン酸とA-酢酸+TCAは、より単離に適した条件であるA-酢酸+TCAの限界希釈培養で良好な経過が見られたため、A-カルボン酸の作業は途中で停止した。C-酢酸+TCAは最終的にデハロ菌の単離に至らなかった。よって、以降はA-酢酸+TCA（以下、A試料）の結果に絞って記述する。

4.3 A試料の限界希釈培養開始から2代目培養液までの単離プロセス

4.3.1 実験方法 20 mLのDHB-CO₃培地が入った50 mL容バイアル瓶をH₂:CO₂=4:1のガスで置換し、フッ素樹脂コーティングされたブチルゴム栓とアルミキャップで密栓した。これにビタミン混合液を200 μ L、15 mM硫化ナトリウム水溶液を200 μ L、Ti(III)-NTA溶液を200 μ L、10 g/L塩化カルシウム二水和物水溶液を200 μ L、500 mM酢酸ナトリウム水溶液を200 μ L、TCEを0.5 μ L添加した。これを単離用培地とする。

単離用培地にA試料の初代培養液を100 μ L添加し、 10^1 倍希釈サンプルとした。単離用培地に 10^1 倍希釈サンプルを100 μ L添加したものを 10^2 倍希釈サンプルとし、順次 10^5 倍希釈サンプルまで作製して、28°Cで静置培養した。これらのサンプルを2代目培養液とした。

また、2代目培養液 10^3 倍希釈サンプルのTCE脱塩素化が完了した段階で、真正細菌の16S rRNA V3/V4領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析を行った。プライマーには341fと805r²⁾を用いた。増幅産物のシーケンシングは次世代シーケンサーillumina Miseqを用い、2×300 bpの条件で行った。Fastx toolkitを用いて、解析で得た各リードのうち、配列の読み始めが使用プライマーと完全一致する配列のみを抽出した。プライマー配列を削除した後の配列は解析パイプラインQIIME Version 2.0を用い、相同性97%を閾値としてOperational Taxonomic Unit（以下、OTU）に分類し、各OTUの代表配列を出力した。取得した代表配列はGreengenesデータベースを参照して系統推

Table 3 A試料2代目培養液のアンプリコンシーケンス解析結果
Microbial Community Composition of the Second A-Culture

微生物	割合 (%)	リード数
<i>Dehalococcoides</i>	21.2	3809
<i>Propionicimonas</i>	17.6	3157
<i>Sphingomonas</i>	11.0	1981
<i>Sphingomonas</i>	7.0	1263
<i>Clostridiales</i>	6.9	1230
<i>Azospira</i>	6.5	1158
<i>Desulfovibrio</i>	5.5	990
<i>Porphyromonadaceae</i>	5.5	985
<i>Christensenellaceae</i>	4.5	816
<i>Sedimentibacter</i>	2.1	368
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	1.0	183
<i>Christensenellaceae</i>	1.0	177
<i>Sedimentibacter</i>	1.0	171
その他 (1%以下)	9.3	1662
合計	100.0	17950

定を行った。

4.3.2 実験結果及び考察 2代目培養液のうち、 10^3 と 10^5 倍希釈サンプルで培養開始73日後にTCEからエチレンまでの脱塩素化が確認された。

2代目培養液 10^3 倍希釈サンプルのアンプリコンシーケンス解析の結果をTable 3に示す。この段階で微生物叢に占めるデハロ菌の割合は21.2%であった。デハロ菌はその16S rRNA遺伝子領域の塩基配列をもとにPinellas, Cornel, Victoriaの3つのサブグループに分類され³⁾、今回得られた塩基配列のデータから、このデハロ菌はVictoriaグループに属する可能性が高いと考えられた。

4.4 A試料の3代目培養液から4代目培養液までの単離プロセス

4.4.1 実験方法 2代目培養液の 10^5 倍希釈サンプルを単離用培地に100 μ L植え継ぎ、再度限界希釈培養を行った（3代目培養液）。3代目培養液のTCE脱塩素化が完了した段階で再度植え継いで限界希釈培養を行い（4代目培養液）、4代目のTCE脱塩素化が完了したところで、 10^5 倍希釈サンプルの顕微鏡観察による菌の定量と、アンプリコンシーケンス解析を行った。

4.4.2 実験結果及び考察 撮影した蛍光顕微鏡写真をPhoto 1に示す。細長い棒状である桿菌との混在が見られるが、デハロ菌と思われる円形の細胞の優占率が高い状態となっており、総菌数は 4.8×10^7 cells/mLであった。

4代目培養液 10^5 倍希釈サンプルのアンプリコンシーケンス解析の結果をTable 4に示す。この段階でデハロ菌が65%、硫酸還元菌の一種である*Desulfovibrio*が34.6%、というほぼ2種のみで構成される培養液となっていた。*Desulfovibrio*が残っていた理由としては、直接*Desulfovibrio*がクロロエチレン類を脱塩素化する報告は

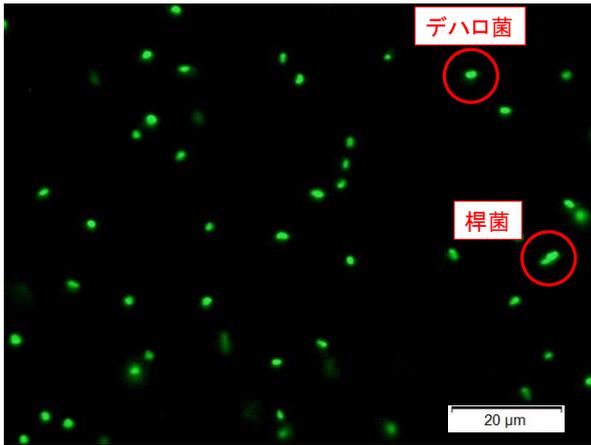


Photo 1 A試料4代目培養液の蛍光顕微鏡写真
Photomicrograph of the Fourth A-Culture

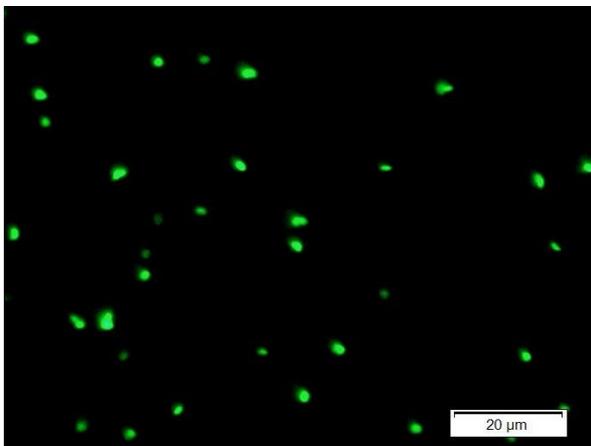


Photo 2 A試料5代目培養液の蛍光顕微鏡写真
Photomicrograph of the Fifth A-Culture

ないものの、別の硫酸還元菌がPCEやTCEを一部脱塩素化するという報告があり⁴⁾、*Desulfovibrio*も同様にTCEをcis-1,2-DCEに脱塩素化してエネルギーを獲得していることが考えられた。

4.5 A試料の5代目培養液の単離プロセス

4.5.1 実験方法 4代目培養液の 10^5 倍希釈サンプルを植え継いで限界希釈培養(5代目培養液)を行った。この際、4代目のサンプルの総菌数が多く、微生物叢に占めるデハロ菌の占める割合が大きかったことから、5代目は $10^1 \sim 10^5$ 倍希釈に加えて 10^6 倍希釈サンプルも作製した。 10^6 倍希釈サンプルのうち1本で、49日後にTCEがエチレンまで脱塩素化したため、再度顕微鏡観察を行った。

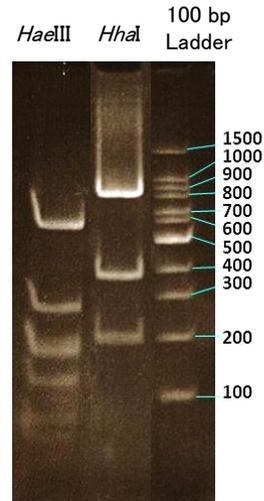
4.5.2 実験結果及び考察 撮影した蛍光顕微鏡写真をPhoto 2に示す。単離完了の判断はできなかったが、デハロ菌と考えられる円形の細胞で占められていることを確認した。

5. 完全単離の確認と系統解析

5.1 実験方法

Table 4 A試料4代目培養液の
アンプリコンシーケンス解析結果
Microbial Community Composition
of the Fourth A-Culture

微生物	割合 (%)	リード数
<i>Dehalococcoides</i>	65.0	37112
<i>Desulfovibrio</i>	34.6	19754
その他 (1%以下)	0.4	250
合計	100.0	57116



デハロ菌のHaeIII消化断片サイズ
574, 268, 179, 168, 126, 80, 66 bp
デハロ菌のHhaI消化断片サイズ
870, 389, 202 bp

Fig. 5 A試料6代目培養液のRFLP解析結果
RFLP Analysis of the Sixth A-Culture

5.1.1 RFLP解析 TCEの脱塩素化が完了した5代目培養液の 10^6 倍希釈サンプルを用いて、限界希釈培養(6代目培養液)を行った。6代目培養液の 10^3 倍希釈サンプルから微生物DNAを抽出し、制限酵素にHaeIIIとHhaIを用いたRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析を行った。

5.1.2 走査型電子顕微鏡を用いた観察 6代目培養液の 10^3 倍希釈サンプルを用いて、走査型電子顕微鏡(以下、SEM)による観察を行った。

5.1.3 全ゲノム解析と系統樹作成 6代目以降の培養液は、TCEからエチレンへの脱塩素化が完了するたびに、希釈倍率10倍で単離用培地に植え継ぎを繰り返した。脱塩素化に要する期間がほぼ一定になった段階で、1Lスケールの培養を行った。この培養液を3L作製し、微生物DNAを抽出して、一分子リアルタイムDNAシーケンサーPacBio Sequel Ieを用いた全ゲノム解析を行った。その結果得られた全ゲノム配列のうち、16S rRNA遺伝子領域の塩基配列をもとに系統樹を作成した。

5.2 実験結果及び考察

5.2.1 完全単離の確認 RFLP解析の結果をFig. 5に

示す。RFLP泳動パターンが*HaeIII*, *HhaI*ともにデハロ菌特有のパターンであり⁵⁾, 他の菌由来のバンドが認められないことから, 完全に単離できたことが示された。

SEMで撮影した培養液の顕微鏡写真をPhoto 3に示す。血小板状の特徴的な物体がデハロ菌であり, 黒い影はサンプルを載せている台に空いた穴である。微細な粒子は菌体が破裂した残骸と考えられる。デハロ菌以外の微生物は観察されず, SEM写真からも完全に単離できたことが確認された。

5.2.2 系統解析 16S rRNA遺伝子領域の塩基配列をもとに作成した, デハロ菌の系統樹をFig. 6に示す。今回単離したデハロ菌はPinellasグループに属していることが判明し, *Dehalococcoides mccartyi* NIT-OBY株(以下, NIT-OBY株)と命名した。

Table 3のアンプリコンシーケンス解析を行った段階では, サンプル中のデハロ菌は*Dehalococcoides* sp. UCH007株⁶⁾らと同じVictoriaグループに属すると考えていたが, 最終的に単離したNIT-OBY株はPinellasグループに属していた。この理由としては, 当初はVictoriaグループのデハロ菌が優占していたものの, ごくわずかに存在していたPinellasグループのNIT-OBY株が, 限界希釈培養を重ねる間に優占していったことが考えられる。

全ゲノムで比較した場合, 今回単離したNIT-OBY株は, *Dehalococcoides mccartyi* 195株⁷⁾との相同性が最も高く, 全ゲノムの相同性が98.82%であった。

6. 単離株のTCE脱塩素化能力の検証

6.1 実験方法

6.1.1 TCE脱塩素化実験 20 mLのDHB-CO₃培地が入った50 mL容バイアル瓶をH₂:CO₂=4:1のガスで置換し, フッ素樹脂コーティングされたブチルゴム栓とアルミキャップで密栓した。これにビタミン混合液を200 μL, 15 mM硫化ナトリウム水溶液を200 μL, Ti(III)-NTA溶液を200 μL, 10 g/L塩化カルシウム二水和物水溶液を200 μL, 500 mM酢酸ナトリウム水溶液を200 μL, TCEを1 μL添加

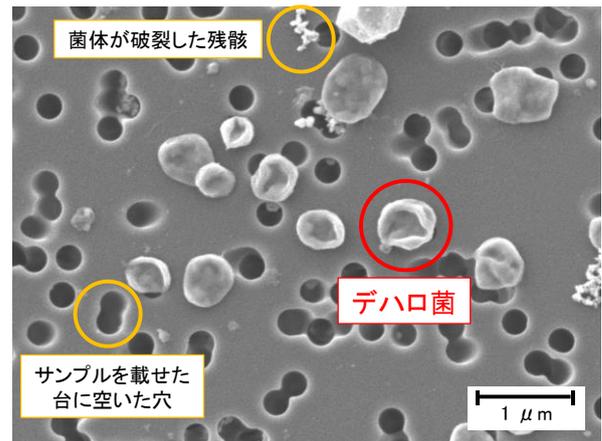


Photo 3 A試料6代目培養液のSEM写真
Scanning Electron Micrograph of the Sixth A-Culture

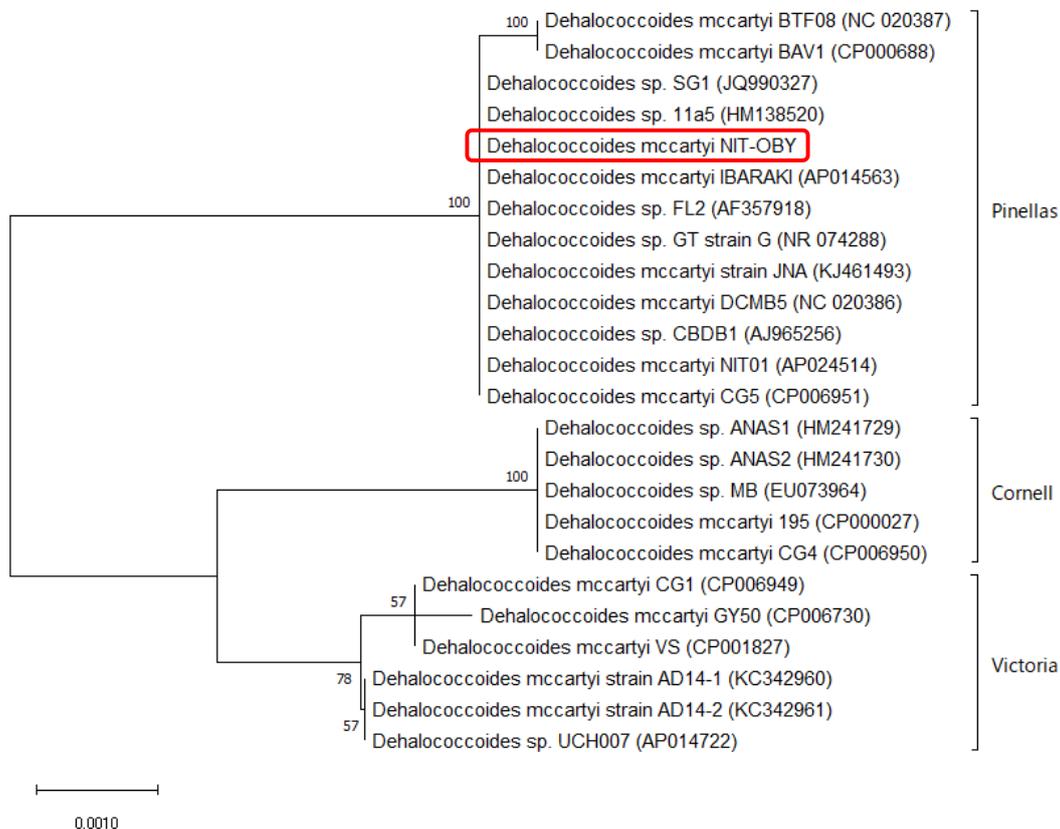


Fig. 6 16S rRNA遺伝子領域の塩基配列をもとに作成したデハロ菌の系統樹
Phylogenetic Tree of *Dehalococcoides* Based on 16S rRNA Gene Sequences

した。さらに単離したNIT-OBY株の純粋培養液を200 μL添加し、28°Cで静置培養した。一定期間ごとに、培養液中のクロロエチレン類濃度をガスクロマトグラフで測定した。

6.1.2 リアルタイムPCR 経時的に培養液を採取してZhouら⁸⁾の方法で微生物DNAを抽出し、リアルタイムPCR (Polymerase Chain Reaction) 装置LightCycler 96を用いて、デハロ菌に特異な16S rRNA遺伝子を定量した。プライマーとプローブはTable 5に示すものを用いた。PCRは初期変性：95°C・10分の後、変性：95°C・10秒、アニーリング：58°C・60秒、伸長：72°C・30秒を45サイクル繰り返して実行した。

6.2 実験結果及び考察

NIT-OBY株を用いたTCE脱塩素化実験の結果をFig. 7に示す。本実験の初期TCE濃度18 mg/Lは、TCEの地下水環境基準値0.01 mg/Lの1800倍である。TCEの脱塩素化は経時的に速やかに進行し、中間代謝物のcis-1,2-DCEとCEを含め、28日で定量下限値の0.01 mg/L未満まで低下した。

一般的な嫌気性バイオレメディエーションでは、クロロエチレン類による汚染の浄化に数か月の期間を要する。本実験は培地中での反応であるため一概には比較できないが、非常に高濃度のTCEを28日という短期間で完全に脱塩素化したことから、NIT-OBY株はバイオオーグメンテーションの実用化に向けて、十分な性能を有していることが示唆された。

また、デハロ菌の16S rRNA遺伝子数は実験開始時の 1.8×10^6 copies/mLから、28日後には 2.5×10^9 copies/mLと約1000倍に増加した。迅速に高い菌体濃度まで培養できることは現場適用の面で重要であり、この点からもNIT-OBY株は実用化に向けて非常に有望な菌株であると考えられる。

7. まとめ

本報では、大林組が保有するクロロエチレン類汚染現場の地下水を菌源に用いて、クロロエチレン類脱塩素化細菌であるデハロ菌の単離と性能評価を試みた。その結果と得られた知見を以下に示す。

- 1) 限界希釈培養を繰り返すことで、4種類の菌源のうち1つから単離に成功し、*Dehalococcoides mccartyi* NIT-OBY株と命名した。NIT-OBY株は、*Dehalococcoides mccartyi* 195株との相同性が最も高く、全ゲノムの相同性が98.82%であった。
- 2) NIT-OBY株のTCE脱塩素化能力を検証した結果、地下水環境基準値の1800倍の濃度のTCEを28日で完全に脱塩素化可能であり、その過程で菌体濃度が約1000倍に増加した。このことから、NIT-OBY株は高いクロロエチレン類脱塩素化能力と増殖能力を有し、実用化に向けて有望な菌株であると考えられた。

Table 5 リアルタイムPCRで使用したプライマーとプローブ

Primers and Probes Used for Quantitative PCR		
名称	塩基配列 (5'→3')	文献
Dhc624F	CAGCAGGAGAAAACGGAATT	9)
Dhc1232R	GACAGCTTTGGGGATTAGC	9)
Dhc Probe	CACCTGTGCAAGTTCCTGACT TAACAG	本研究

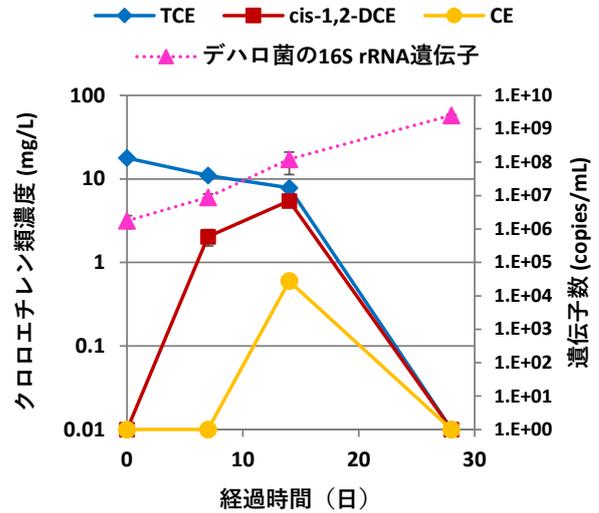


Fig. 7 NIT-OBY株によるTCEの脱塩素化
TCE Dechlorination by *Dehalococcoides mccartyi* NIT-OBY

今後は、NIT-OBY株を用いたバイオオーグメンテーション技術の開発を目指し、NIT-OBY株の安全性の確認と大量培養技術の確立を進めていく予定である。

謝辞

本研究の実施にあたり、名古屋工業大学の吉田奈央子准教授に多大なるご指導及びご協力を賜りました。ここに深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Dolinová, I., Štrojsová, M., Černík, M., Němeček, J., Macháčková, J., and Ševců, A.: Microbial degradation of chloroethenes: a review, *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 24, No. 15, pp. 13262-13283, 2017
- 2) Herlemann, D. P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J. J., and Andersson, A. F.: Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea, *The ISME Journal*, Vol. 5, pp. 1571–1579, 2011
- 3) Hendrickson, E. R., Payne, J. A., Young, R. M., Starr, M. G., Perry, M. P., Fahnestock, S., Ellis, D. E., and Ebersole,

- R. C.: Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 2, pp. 485-495, 2002
- 4) Saiyari, D. M., Chuang, H. P., Senoro, D. B., Lin, T. F., Whang, L. M., Chiu, Y. T., and Chen, Y. H.: A review in the current developments of genus *Dehalococcoides*, its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater, *Sustainable Environment Research*, Vol. 28, No. 4, pp. 149-157, 2018
- 5) 吉田奈央子, Ismael, M., 日下部俊弥, 片山新太: 新規 *Dehalococcoides* 属細菌の分離の試み, 第24回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会, pp. 588-589, 2018
- 6) Uchino, Y., Miura, T., Hosoyama, A., Ohji, S., Yamazoe, A., Ito, M., Takahata, Y., Suzuki, K., and Fujita, N.: Complete genome sequencing of *Dehalococcoides* sp. strain UCH007 using a differential reads picking method, *Standards in Genomic Sciences*, Vol. 10, No. 102, 2015
- 7) Löffler, F. E., Yan, J., Ritalahti, K. M., Adrian, L., Edwards, E. A., Konstantinidis, K. T., Müller, J. A., Fullerton, H., Zinder, S. H., and Spormann, A. M.: *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* classis nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum *Chloroflexi*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 63, No. 2, pp. 625-635, 2013
- 8) Zhou, J., Bruns, M. A., and Tiedje, J. M.: DNA recovery from soils of diverse composition, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 2, pp. 316-322, 1996
- 9) 上野俊洋, 奥津徳也, 水本正浩, 石田浩昭: 塩素化エチレンを対象とした嫌気性バイオレメディエーション技術の開発と現場適用, *環境バイオテクノロジー学会誌*, Vol. 10, No. 2, pp. 79-89, 2010