

土壌より分離したPCE分解菌群の諸性質に関する研究*

鮫島 暁子^{*1}・小玉 義和^{*1}・中瀬 アルバレス アンジェリーナ^{*2}
高橋 克嘉^{*1}・神力はるな^{*2}・松下 昌代^{*3}・山内 博利^{*1}

Study on the PCE-Degrading Capability of Mixed Culture of Microorganisms

Akiko SAMESHIMA, Yoshikazu KODAMA, Angelina M. ALVAREZ-NAKASE, Katsuyoshi TAKAHASHI,
Haruna KOURIKI, Masayo MATSUSHITA and Hirotochi YAMAUCHI

テトラクロロエチレン (PCE) 汚染土壌を微生物源として、PCE分解活性を持つ微生物群を見出し、その活性維持に最適な培養条件の検討を行った。組成の異なる培地を用いてPCE分解を経時的に調べた結果、培地組成によって分解速度が異なることを確認した。また得られたKY、MIX微生物群から全DNAを抽出し、16S rDNAの部分断片をPCR-DGGE法により解析を行い、培地中の微生物相が異なることを確認した。

キーワード：テトラクロロエチレン (PCE)、土壌細菌、混合菌、PCR-DGGE

1 はじめに

テトラクロロエチレン (PCE) は、機械類や繊維製品の洗浄剤として広く使用されていた。近年、その難分解性や発ガン性が指摘されてから、汚染された土壌などの環境をいかに浄化するか、その技術確立が求められている。現在、有害な揮発性有機塩素化合物を処理する方法として、吸引、汲み上げ、曝気、活性炭による吸着除去、触媒酸化などの物理・化学的な手法が採用されている。しかし、これらの技術は汚染物質の根本的な無害化技術ではないため、浄化処理後の2次処理が必要になる。そこで、注目されているのが、微生物の浄化能力を活用するバイオレメディエーションである。中でも、発ガン性のある有害な揮発性有機塩素化合物を分解する微生物は、汚染土壌や水環境の浄化への応用が期待されている。

本研究では、宮崎県内土壌よりPCE分解に関わる微生物群を見出すとともにPCE分解性を保持した継代培養条件を検討し、PCR-DGGE法に

よる分解菌群集構造の評価を行ったので報告する。

2 実験方法

2 - 1 PCE分解菌群の培養

2 - 1 - 1 土壌の採取

実験に供した土壌は、PCEを溶剤として使用している宮崎県内のクリーニング工場の排水溝より採取した。

2 - 1 - 2 PCE分解菌群の前培養

採取した土壌10gをあらかじめ滅菌したPCEを添加したMMY培地に加え、30℃で1週間前培養を行った。MMY培地の組成 (g/l) は、K₂HPO₄ 7、KH₂PO₄ 2、MgSO₄・7H₂O 0.1、(NH₄)₂SO₄ 1、クエン酸 3 ナトリウム 2 水和物 0.5、酢酸ナトリウム 0.4、Yeast Extract 2 であり、PCEは、培地オートクレーブ滅菌後、0.5μl加えた。

2 - 1 - 3 培地の検討

第1報¹⁾において集積培養を行った微生物群のPCE分解活性を測定した結果、活性が見られなかったことから、再度、培地の検討を行った。

試みとして、滅菌した採取土壌を培地に加えたところ、活性が見られたことから、土壌成分の分析を蛍光X線測定装置により行った。この成分組成をもとに培地の調整を行った (KY培地)。

* 有用土壌環境微生物の調査と育種に関する研究
(第2報)

* 1 資源環境部

* 2 元客員研究員

* 3 南九州大学園芸学部食品工学科

また、比較のために、PCE分解菌群の培養が可能であったMIX培地²⁾を用いてKY培地同様に微生物群の培養を行った。

2 - 1 - 4 培養方法

培養は、図1のようなアルミシールバイアル瓶(ジールサイエンス社製125ml)を用いた。これに、KYあるいはMIX液体培地50mlとPCE2 μ l(64mg/l)を入れ、上部気相の窒素置換を行った後、菌の培養液1mlを加え、ふたにテフロンコートブチルゴムセプタムを用い、さらにアルミシール(S型)をシールした状態で、30℃で1週間静置嫌気培養を行った。その後は、それぞれの液体培地において1週間ごとに継代培養を行った。なお、培地はその都度、調製した。



図1 PCE含有培地による分解微生物群の培養

2 - 2 KY、MIX培地それぞれに含まれる微生物群の分離

KY、MIX培地それぞれに含まれる微生物の分離を試みた。それぞれ1.5%寒天を加えた培地で、出現したコロニーを純粋分離した。その後、それぞれについてPCE分解活性試験を行った。

2 - 3 PCE分解活性試験

PCE分解活性は、ヘキサンにより培養後のPCEを抽出し、非放射線源式電子捕獲型検出器付柳本ガスクロマトグラフG2800EN(以下ECD-N/GC)を用いて定量した。ECD-N/GC条件は、カラム: DMCS 3mm \times 3m、カラム温度: 90℃、キャリアガス: He、検出器: 非放射線源式電子捕獲型検出器(ECD-N)、試料注入量: 3 μ lとした。

標準液は、市販のPCE及びTCE(トリクロロエチレン)を適宜調製して使用した。

2 - 4 至適温度の検討

KY及びMIX液体培地について分解微生物群の生育至適温度の検討を行った。10、15、20、25、30、35、40、50、60、70℃で培養を行い、PCE分解活性試験を行った。

2 - 5 至適pHの検討

KY及びMIX液体培地について分解微生物群の生育至適pHの検討を行った。それぞれの液体培地を各pH(pH3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0)に1N NaOHまたは1N HClで調整後、30℃にて培養を行い、PCE分解活性試験を行った。

2 - 6 PCE分解経時変化試験

至適温度及び至適pHでの、PCE分解活性試験を1週間行い、KY及びMIX培地両方の微生物群のPCE分解の経時変化を調べた。

2 - 7 検知管によるヘッドスペースガス分析

培養後のKY及びMIX培地は、バイアル瓶を開封したとき、特異な臭気がしたため、バイアル瓶中のヘッドスペースに含まれるガス成分の簡易分析を行った。分析は、テドラーバッグに培養後のバイアル瓶の内容物をすべて入れ、密封し、5lの窒素を充填した後、図2に示す操作により測定を行った。



図2 検知管によるガス分析

2 - 8 培養後のKY培地の沈殿物の分析

培養後のKY、MIX液体培地に発生した、黒い沈殿物の無機成分分析は、ICP発光分析装置(セイコー-SPS-1500VR)により行った。

2 - 9 硫酸還元菌の定性試験

硫酸還元菌選択培地を用いて硫酸還元菌の定性試験を行った。その培地組成は、(溶液1(mg/l)) NH₄Cl 1,000、Na₂SO₄ 1,000、CaCl₂ · 2H₂O 100、FeSO₄ · 7H₂O 200、MgSO₄ · 7H₂O 2,000、C₆H₅CH(OH)COONa(70%) 3,500、Yeast Extract 1,000、H₂O 980ml、(溶液2(g/l)) K₂HPO₄ 10、H₂O 200、(溶液3(g/l)) HSCH₂COONa 0.45、H₂O 10であり、各溶液はpH7.1~7.4に合わせ、オートクレーブ滅菌した。使用直前にボイルした溶液1に溶液2を10ml及び溶液3を無菌的に加え、気泡が入らないように混和した。KY及びMIX培養液について培養原液を含む10倍希釈溶液を5段階作製し、滅菌済み試験管(シリコ栓付き)に調製した液体培地7.5mlを入れたものにそれぞれ1mlずつ加えた。試験管上部を窒素置換し、嫌気パック中(アネロパック 三菱ガス化学社)において30℃、暗条件下で3日間培養を行った。なお、各希釈段階につき、5本の培養管を作製した。

2 - 10 硫酸還元菌の分離及び活性試験

二重皿法を用いて硫酸還元菌の分離を行った。培地は、2-7で使用した硫酸還元菌選択培地(溶液1)に寒天15gを加えて使用した。外ぶたと内皿を同じ向きにして乾熱滅菌したガラスシャーレの内皿をはずして外ぶたにのせ、KY及びMIX培地の希釈培養液(10倍、10²倍)1mlを外ぶたに入れ、硫酸還元菌選択培地を20ml加え、緩やかに混和を行った。培地固化後、その上に1.5%寒天溶液を流し込み気泡が入らぬよう内皿を落とした。培地が固まったことを確認し、寒天の蒸発乾固を防ぐため、二重皿をビニールに包んで30℃、暗条件下で3日間培養を行った。培養後、黒色で輪郭の不明瞭な円形のコロニーを掻き取り、滅菌水1mlに溶解したものを、再び二重法により菌の培養を行った。さらに出現した黒色コロニーをあらかじめ滅菌シャーレに硫酸還元菌選択培地を固化させたものに画線塗抹し、嫌気パック中にて培養を行い、単離菌になるまで植継を繰り返した。その後、KY、MIX培地で培養を行い、PCE分解活性試験を行った。

2 - 11 鉄還元菌の定性試験

鉄還元菌選択培地であるグルコース・アスパラギン

ン培地を用いて鉄還元菌の定性試験を行った。培地組成(g/l)は、K₂HPO₄ 3、KH₂PO₄ 0.8、KCl 0.2、MgSO₄ · 7H₂O 0.2、Yeast Extract 0.5、アスパラギン 5、グルコース 20、クエン酸鉄()1であり、pHはHClあるいはNaOHで7に調整した。

KY、MIX培養原液及び希釈液各1mlを試験管に7mlずつ分注した鉄還元菌選択液体培地に植菌し、30℃で5日間培養を行った後、菌の生育状態と鉄還元の有無を調べた。判定法は、10%酢酸に溶解した0.2%、トリジピリジル溶液1mlを培養後の試験管に加え、赤変したものを二価鉄生成陽性とみなした。また、上記とは別に鉄還元菌選択液体培地7mlにKY、MIX培養原液及び希釈液各1mlを加えたものを用意し、80℃にて15分間加熱処理した後、30℃にて培養し、トリジピリジル溶液を用いて鉄還元性の判定を行った。この方法により陽性を示した菌は、鉄還元性の孢子形成菌(Bacillaceae)とみなした。

2 - 12 鉄還元菌の分離及び活性試験

鉄還元菌存在確認の後、鉄還元菌選択培地であるグルコース・アスパラギン培地及びラクトース・アスパラギン培地(培地組成:前者培地組成のグルコースをラクトース置換)を用いてKY、MIX培地に含まれる微生物群より、鉄還元菌の分離を試みた。滅菌シャーレにKY、MIX培養原液及び希釈液各1mlをそれぞれ分注し、0.001% TTC(2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride)水溶液と1.5%寒天を加えた各鉄還元菌選択培地をそれぞれ15ml加えて固化し、30℃で5日間暗条件下で嫌気静置培養を行った。培養後、出現した赤いコロニーを同様の寒天培地に画線塗抹し、嫌気静置培養を行い、単離菌になるまで同様の植継を行った。その後、KY、MIX培地で培養を行い、PCE分解活性試験を行った。

2 - 13 GC-MSによるヘッドスペースガス分析

ヘッドスペース中に含まれる成分にPCE及びTCEの分解生成物を確認するため、ヘッドスペースガスクロマトグラフ質量分析計(パーキンスエルマー社製 HS40、島津製作所製 QP-5000)による測定を行った。

2 - 14 PCR-DGGE

DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

法は、微生物に共通の遺伝子の増幅を行い、同じ遺伝子断片を、わずかな塩基配列の違いによって遺伝子変性剤の濃度勾配をつけたアクリルアミドゲル中で電気泳動的に分離する手法であり、今回、図3のフローに従い実験を行った。

PCE含有液体培地による微生物群の培養

遠心分離による微生物の回収

微生物の全遺伝子の抽出

抽出した全遺伝子を鋳型としたPCR
(16S rDNA断片の増幅)

尿素濃度勾配ゲルによる電気泳動

DGGE断片のゲルからの切出し

クローニング
シーケンス

図3 PCR-DGGE実験手順

2 - 14 - 1 遺伝子の抽出

KY及びMIX培養液50mlをアルコール滅菌した濾紙(5A)でそれぞれろ過した後、濾紙は少量の滅菌水で洗い、ろ液25mlを50mlのプラスチック遠沈管に移し、遠心分離(15,000rpm、2min)した。上清を取り除いた後、滅菌水5mlを加え、10秒間攪拌し、遠心分離(15,000rpm、2min)し、同様の操作をさらに2回行った。最終的に残った沈殿に1mlの滅菌水を加え、10秒間の攪拌の後、マイクロチューブに移し、遠心分離(15,000rpm、2min)した。上清を取り除き、GenTLE(TaKaRa社製)540 μ lを加え、攪拌し、GenTLE60 μ lを加えた後、再度攪拌し、70 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。その後GenTLE300 μ lを加え、緩やかに転倒混和し、氷上にて2分間静置後、再び転倒混和し、遠心分離(12,000rpm、5min)を行い、上清を2mlのマイクロチューブへ移した。それにイソプロパノール600 μ lを加え、攪拌し、遠心分離(12,000rpm、5min)を行った。その後上清を除去し、冷70%エタノール200 μ lを加え、攪拌し、遠心分離(12,000rpm、5min)をし、上清を除去した。真空遠心によりエタノールを取り除いた後、TE15 μ lを加えて溶解し、PCR用鋳型

とした。

2 - 14 - 2 PCR反応

PCRには、プライマ-5Fと531R、dNTPs、Ex. Taqポリメラーゼ(TaKaRa社)を用いて16S rDNAの約500bpの増幅を行った。

2 - 14 - 3 PCR-DGGE

アクリルアミド濃度は8%、尿素濃度勾配は、20~50%及び30~50%に調製した。

装置は、BIO-RAD社製DCodeユニバーサルミュレーション検出システムを用いた。泳動条件は、電圧150V、泳動層温度60 $^{\circ}$ C、泳動用緩衝液1 \times TAEで5~7時間で行った。

2 - 14 - 4 クローニング

電気泳動後のアクリルアミドゲルをエチジウムブロマイド染色を行い、UVによりバンドを確認し、ゲルカッターにて切り出しを行った。

得られたDGGE断片からDNAの精製を行い、クローニングを行った。クローニングには、pGEM-T Easy Vector System (Promega)を用いて行った。すなわち、精製したDNAとpGEM-T Easy Vector0.5 μ lを、Ligase1 μ l、2 \times Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase0.5 μ lを用いてLigation反応をし、1時間放置後、エタノール沈殿を行った。遠心分離(10,000rpm、15min)を行い、上清を除去し、70%エタノール100 μ lを加え、再び遠心分離(10,000、10min)後、上清を除去し、5分間の真空遠心により完全にエタノールを除いた。得られた沈殿をTE6 μ lに溶解し、3 μ lを形質転換に使用した。まず、JM109の50 μ lにDNA3 μ lを加え、氷上で30分間静置後、ヒートブロックで42 $^{\circ}$ C、3分間加温し、再び氷上で5分間静置した。15mlプラスチック遠沈管にSOCl₂と処理したDNAを入れ、37 $^{\circ}$ Cで45分間緩やかに振とうし、遠心分離(5,000rpm、2min)した。上清を500 μ l除去し、残りを攪拌した後、X-Gal50 μ lとIPTG100 μ lを加え、LA寒天培地に塗抹し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。LA寒天培地に生育したコロニーのうち、Whiteコロニーを釣菌し、LA液体培地及びLA寒天培地に植菌し、12~16時間、37 $^{\circ}$ Cで培養(液体培地は振とう培養)を行った。対照としてBlankであるBlueコロニーも同様に培養を行った。

2 - 14 - 5 プラスミドの抽出

培養後のLA液体培地より 1 mlを取り、遠心分離 (14,000rpm、1 min) を行い、上清を除去した後、Plasmid prep kit (BIO-RAD社製) を用いてプラスミドの抽出を行った。まず、Cell Resuspension Solution200 μ lを加え、攪拌し、懸濁させ、Cell Lysis Solution250 μ lを加え、緩やかに混和転倒した。Nentralization Solution250 μ lを加え、緩やかに混和転倒後、遠心分離 (14,000 rpm、5 min) を行った。スピフィルターをセットした新たなマイクロチューブを用意し、それに上清を移した後、Quantum Matrix200 μ lを加え、ピペティングを行った。遠心分離 (14,000rpm、30sec) の後、Wash Bufferによる洗浄を2回行い、スピフィルターを新しいマイクロチューブに移し、TEを25 μ l加え、遠心分離 (14,000rpm、1 min) を行った。同様の操作を再度行い、精製プラスミド50 μ lを得た。

2 - 14 - 6 EcoR によるインサートチェック

マイクロチューブに得られた精製プラスミド 2 μ lを移し、10 \times H Buffer 5 μ lとEcoR、超純水 43 μ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。その後、0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、Positive transformant (陽性) であることを確認した。分子量マーカーには、 λ -Hind I 及び λ -EcoT14digest (ともにTaKaRa社製) を用いた。

2 - 14 - 7 シーケンス反応及び解析

シーケンス反応には、BigDye (ABI社製) 及びユニバーサルプライマー21M13、M13RVを用いて調製を行った。反応後、スピカラムにより精製を行い、シーケンスをABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems社製) により解析した。解析には同社製のソフト Microseq 16S rDNASequence Databasesを用い、さらにデータベース上で検索を行った。

3 結果及び考察

3 - 1 培地組成

採取した土壌の蛍光X線分析による結果を表 1 に示す。

表 1 を参考に様々な検討を行った結果、表 2 に示すKY培地組成がPCE分解微生物群の生育に適

していることが明らかになった。併せてMIX培地の組成も表 3 に示す。また、PCE分解活性試験のクロマトグラフ結果も図 4 に示す。図 4 に見られるようにKY、MIX培地両方において当初64 mg/l含まれていたPCEのほとんどがTCEに分解され、また、さらにTCEも分解されていることが明らかになった。このことから、それぞれの培地中の微生物群をPCE分解微生物群と推定した。

表 1 蛍光X線分析による土壌中成分分析結果

element	g/100g	element	g/100g	element	g/100g
Si	57.3	Ca	0.391	Sr	0.050
Al	19.6	S	0.196	Zn	0.038
Fe	10.1	P	0.128	Mn	0.032
K	8.5	Cl	0.100	Cu	0.030
Ti	1.69	Zr	0.084	Ni	0.017
Na	0.996	V	0.064	Nb	0.010
Mg	0.672	Rb	0.053	As	0.009

表 2 KY培地

組 成	(mg/1,000ml)
Yeast Extract	2,000
Na ₂ HPO ₄	500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	100
KH ₂ PO ₄	100
CaCl ₂ · 2H ₂ O	70
K ₂ HPO ₄	30
FeCl ₃ · 6H ₂ O	30
AlCl ₃ · 6H ₂ O	30
pH	7.4

表 3 MIX培地

組 成	(mg/1,000ml)
KH ₂ PO ₄	7,000
K ₂ HPO ₄	2,000
Yeast Extract	2,000
NaHCO ₃	200
KCl	30
NH ₄ Cl	30
FeCl ₃ · 6H ₂ O	30
MgCl ₂ · 6H ₂ O	20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1
pH	7.4

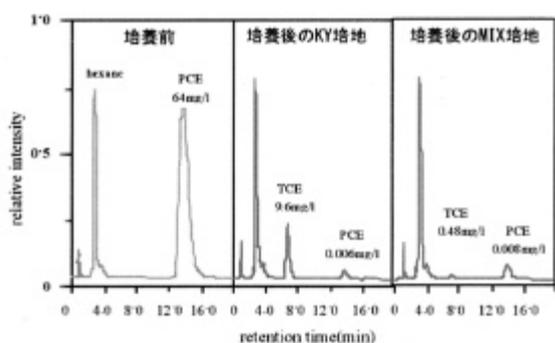


図4 培養後の培地中残存PCE濃度の測定

3 - 3 KY、MIX培地における分解微生物群の生育至適温度

各温度条件で培養し、ECD-N/GCにおいてPCE分解活性を測定した結果を図5に示す。MIX培地における微生物群（以下MIX微生物群）は、30～35において80～90%の活性を示すのに対し、KY培地における微生物群（以下KY微生物群）は、20～35の広い範囲において100%近い活性を示し、また、15、40においてもなお、60%の活性を保持していた。これらの結果より、KY培地の方がMIX培地と比較してより広い温度帯で微生物群を増殖させることが明らかになった。

また、PCE分解微生物群が増殖することにより、それぞれの培地において白から黒へと培地の色が変化した。KY微生物群は35で、MIX微生物群は30を頂点として最も黒い濁り及び沈殿物を生じた。このことは、至適生育温度とも一致していた。全体的にKY微生物群の方が、MIX微生物群よりも培地を濃い黒色にし、多くの沈殿を生じさせていた。

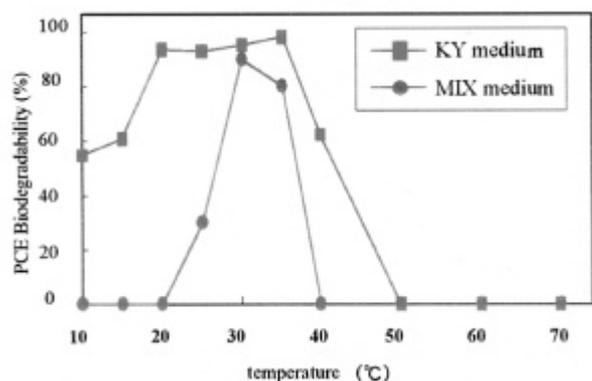


図5 KY、MIX培地それぞれの微生物群における至適生育温度

3 - 4 KY、MIX培地における分解微生物群の生育至適pH

各pH条件で培養し、ECD-N/GCにおいてPCE分解活性を測定した結果を図6に示す。KY微生物群は、pH 5～9の間で、80%以上の活性を示したのに対し、MIX微生物群は、pH 7.5で80%近くの活性を示したにすぎなかった。これらの結果より、至適pHについても至適温度と同様にKY培地の方が広い範囲において微生物群を増殖させることが明らかになった。

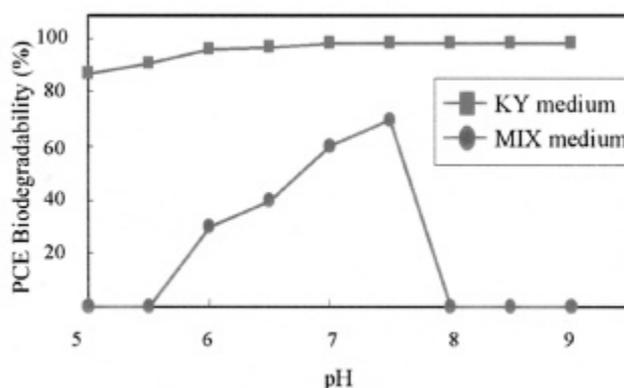


図6 KY、MIX培地それぞれの微生物群における至適生育pH

3 - 5 KY、MIXそれぞれの微生物群によるPCE分解の経日変化

KY、MIX培地両方の微生物群によるPCE分解の経日変化を調べた結果を図7に示す。このグラフより培地組成の違いによる微生物群のPCEの分解速度が異なることを確認した。KY微生物群については、培養開始1日目にはPCEをほとんど分解し、同時に発生したTCEもその後緩やかに分解し、7日目にはPCE、TCEともに分解した。また、MIX微生物群については、PCEを緩やかに分解し、KY微生物群と同様に7日目にはすべて分解し、TCEについては終始わずかにしか検出されなかったが、これも最終的には分解した。これらの結果より、PCEの分解速度、分解の形態が異なったことから、KY、MIX培地それぞれに含まれる微生物群の菌相に違いがあることが推測された。

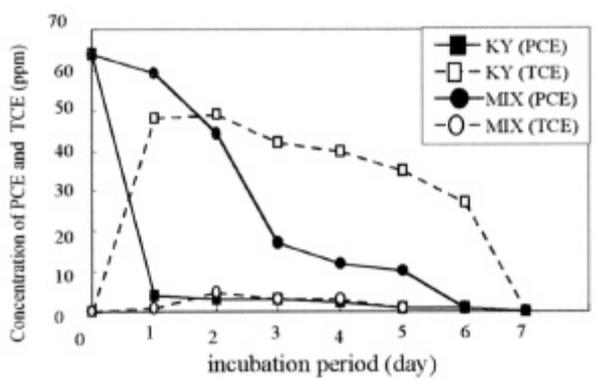


図7 嫌気条件下におけるPCE分解の経時的変化

3 - 6 検知管によるヘッドスペースガス分析結果

ヘッドスペースガスに含まれる成分の分析をガス検知管により行った結果を表4に示す。ガスの中でKY、MIX培養バイアル瓶ヘッドスペースに最も多く含まれていたのは硫化水素であった。次いでメチルメルカプタン、アミン類、メルカプタン類であった。

表4 ガス検知管によるヘッドスペースガス分析結果

Gas Name	Used GDT	KY(mg/l)	MIX(mg/l)
NH ₃	(kita)105SD	0.7	1.2
H ₂ S	(kita)120SE	17	11.5
(C ₂ H ₅ NH + (CH ₃) ₃ N)	(kita)222S	0.8	2
CH ₃ SH	(gas)71	6	7
(C ₂ H ₅) ₃ N	(kita)213S	0	0.6
Amines	(gas)180	4	6
Mercaptans (gas)70L		5	6.5

GDT : gas detector tube (ガス検地管)
 (kita): 北川製, (gas): gastec製

3 - 7 KY培地の沈殿物の分析結果

表5は培養後のKY培地沈殿物のICPによる分析結果を示したものである。沈殿物の主成分は鉄であることが明らかになったことから、硫化鉄ではないかと推測された。

表5 ICPによる沈殿物の分析結果

element	(mg/l)	element	(mg/l)
Fe	41.8	K	2.7
Ca	18.8	Mg	2.4
Al	14.3	Co	0.8
Na	3.7		

3 - 8 硫酸還元菌の有無

2 - 7に従い、培養を行った結果を図8に示す。硫酸還元菌の有無は、鉄イオンを含む硫酸還元菌選択液体培地の黒変(硫酸還元による硫化鉄の生成)によって硫酸還元菌の生育の有無の判定を行う。KY微生物群では、濃度の薄いものでも黒い沈殿を生じたことから、硫酸還元菌の存在を確認した。また、MIX微生物群についても同様に黒い沈殿が見られたが、KY微生物群ほど多量ではなかったことから、その存在量が少ないのではないかと考えられた。これらのことから、KY、MIX培地に含まれる微生物群の菌相に違いがあることが推測された。

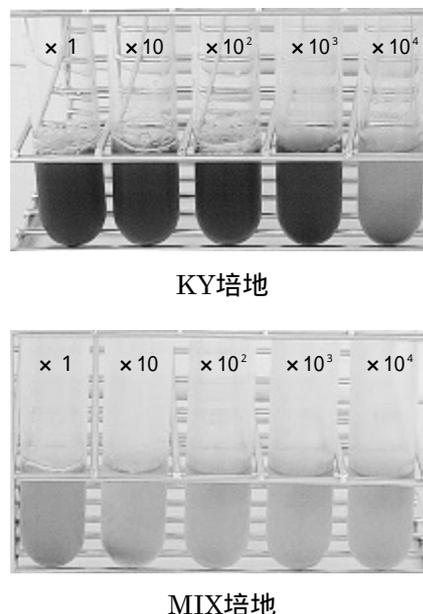


図8 硫酸還元菌定性試験

3 - 9 硫酸還元菌の分離

2 - 8に従って分離した結果、KY微生物群、MIX微生物群ともに、黒色で輪郭の不明瞭な円形のコロニーが確認されたため、硫酸還元菌と判断した。

単離した硫酸還元菌をKY、MIX培地で培養を行い、PCE分解活性試験を行ったが、活性は認められなかった。培養の際、KY、MIX培地には特有の臭気があり、黒色沈殿が見られたが、活性は見られなかったことから、色の変化及び臭気は活性とはあまり関係はないものと判断した。

3 - 10 鉄還元菌の有無

鉄還元菌の存在確認をジピリジル法により行った結果を図9に示す。

2 - 10に従って、培養を行った後、ジピリジル溶液を加えたところ、二価鉄生成陽性である赤変が認められ、鉄還元菌の存在がKY、MIX微生物群ともに確認された。さらに孢子形成菌についての実験を行った結果、KY、MIX微生物群ともに陽性を示した。これらのことから、KY、MIX微生物群のどちらも鉄還元菌及び鉄還元孢子形成菌を有していると判断した。

また、鉄還元菌についてPCE分解活性試験を行った結果、硫酸還元菌と同様、活性は見られなかった。KY、MIX微生物群の単離菌のPCE分解活性もなかったことから、PCE分解は、種々の微生物の共存及び共代謝により分解が進むものと推察された。

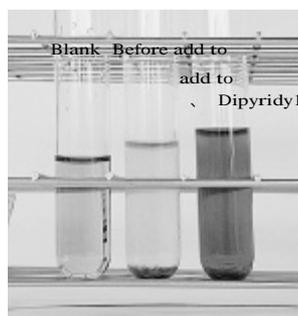


図9 鉄還元菌の判定（ジピリジル法）

3 - 11 GC-MSによるヘッドスペースガス分析結果

バイアル瓶ヘッドスペース中に含まれるガス成分のGC-MSによる分析結果を表6に示す。

KY微生物群のPCE分解生成物は、TCEを経由して、1,1,2トリクロロエタン、トリクロロエチレン、シス-1,2ジクロロエチレン、トランス-1,2ジクロロエチレンと分解されているが、ほとんどはシス-1,2ジクロロエチレンにまで分解されてい

ることが明らかになった。また、MIX微生物群のPCE分解生成物も、トリクロロエチレンを経由するが、シス-1,2ジクロロエチレンのみが分解生成物となっていた。このことから、経日変化の分解速度や分解形態の違いが裏付けられた。さらにKY、MIX微生物群の菌相の違うことも示唆された。また、KY、MIX微生物群の最終分解生成物がシス-1,2ジクロロエチレンであったことから、さらなる検討を行う必要があり、また、新たな菌の検索も必要であると考えられた。

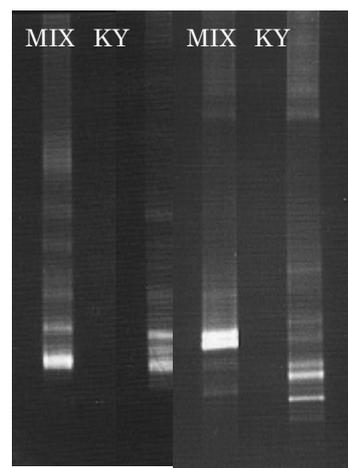
表6 ヘッドスペースガス分析結果

	KY	MIX
塩ピモノマー	nd	nd
1,1-ジクロロエチエン	nd	nd
ジクロロメタン	nd	nd
トランス-1,2-ジクロロエチエン	2.07	nd
シス-1,2-ジクロロエチエン	22.32	27.12
1,1,1-トリクロロエタン	nd	nd
1,2-ジクロロエタン	nd	nd
トリクロロエチレン	2.70	2.24
1,2-ジクロロプロパン	nd	nd
1,1,2-トリクロロエタン	6.00	nd
テトラクロロエチレン	nd	nd

nd：非検出

3 - 12 PCR-DGGE法による電気泳動結果

PCR-DGGE法による泳動結果を図10に示す。



尿素濃度： 20～50% 20～50%
泳動時間： 5h 7h

図10 PCE分解微生物群のPCR-DGGE解析結果

当初、尿素濃度勾配を20～50%及び30～50%につけて実験を行っていたが、どちらもほとんど変わらなかったことから、20～50%に限って行った。

その結果、KY微生物群とMIX微生物群のバンドを比較すると、上部は、ほとんど変わらない泳動バンドを示していた。しかし、中程から下段にかけては、同じ箇所にバンドが見いだせるものもあるが、特に下段については全く違ったバンドになっていた。電気泳動を5時間行った写真では、バンドの間隔が狭く確認しづらいが、7時間泳動を行った写真ではそれがはっきりと確認できた。このことから、KY、MIX微生物群菌相の違いが示唆された。

3 - 13 シーケンス結果

シーケンスの結果について、データベースで検索を行ったところ、「mlel-2」と98%の高い相性が得られた。DGGE-DNAとの相同性を表7に示す。この微生物は、製薬工場の排水バイオリクターから検出された菌であることが分かっている。高い相同性を示した微生物は、他に *Bacteroides sp.* があげられ、「mlel-2」もこの微生物の近縁種ではないかと推測された。また、この菌はKY微生物群、及びMIX微生物群共通の上部の泳動バンドより検出されたことから、両方の微生物群に存在することが明らかになった。

表7 データベースシーケンスとDGGE-DNAとの相同性

DGGE-DNA1	6 : agagttgacfcgcccagatgaacgctagcagcaggctaacacatgcaagcaggg
mlel-2	(98%) 1 : *****
DGGE-DNA1	66 : ggacgacggagtagcaaacacccggtagcgcgacggcgcgggtagcagcgat
mlel-2	61 : *****
DGGE-DNA1	126 : gcaccacccatcaggggaaataaccggcgaagtcggacfaaccgcaaaaca
mlel-2	120 : **n*****
DGGE-DNA1	186 : gggccaccgctggatattgtaagaaftcgcgatagtgggcatgctccat
mlel-2	180 : *****
DGGE-DNA1	246 : ttggtagttggtaggtaacctaccacggcagcagcagcagcagcagcagcagc
mlel-2	240 : *****
DGGE-DNA1	306 : ggtcccccactgtagcagacggaccagactcctcagggaggcagcagcagcagc
mlel-2	300 : *****
DGGE-DNA1	366 : tttggcaatggggcggagccctgaccacagcagcagcagcagcagcagcagc
mlel-2	360 : *****
DGGE-DNA1	426 : gttcgtaacctc ttgcaggggnaaagtcggcagcagcagcagcagcagcagc
mlel-2	420 : *****
DGGE-DNA1	485 : ctgagaaagatcggcgaactccgaccagcagcagcagcagcagcagcagc
mlel-2	480 : *****

Another : *Bacteroides sp.* asf 519 (93%) , *Bacterium mpn-isolate group 6* (93%)

4 まとめ

- (1) 宮崎県内土壌より、PCE分解微生物群を見出し、その活性維持に最適な培養条件を確立した。
- (2) KY、MIX微生物群の2つのPCE分解微生物

群を得たが、その生育至適温度は、それぞれ20~35、30~35であった。また、生育至適pHは、KY微生物群が5~9、MIX微生物群が7.5であった。

- (3) KY、MIX微生物群のPCE分解経時変化を調べたところ、培地組成の違いにより分解速度が異なることが明らかになり、また、分解過程が異なること及び菌相の違うことが示唆された。
- (4) KY、MIX微生物群ともに硫酸還元菌及び鉄還元菌の存在が確認されたが、それぞれ単菌では、PCE分解活性が見いだせなかったことから、種々の微生物による共存及び共代謝によりPCEは分解されるものと推測された。
- (5) KY、MIX微生物群のヘッドスペースガス分析の結果、PCEの分解最終生成物がシス-1,2ジクロロチレンであることが明らかになった。さらに、KY、MIX微生物群では、TCEを経てシス-1,2ジクロロチレンに至るまでの分解過程が異なることから、両微生物群の菌相の違いが示唆された。また、PCEの分解最終生成物がシス-1,2ジクロロエチレンであったことから、脱塩素化し、無害化を行うために、さらなる検討及び新たな微生物の検索が必要であると考えられた。
- (6) PCR-DGGE法を用いた微生物群解析の結果、「mlel-2」を見出したが、この微生物はKY、MIX両方に存在することが明らかになり、他に高い相同性を示した *Bacteroides sp.* の近縁種ではないかと推測された。

5 参考文献

- 1) 小玉義和他．宮崎県工業技術センター研究報告No.44, 1-3(1999)
- 2) 永淵義孝他．用水と廃水．Vol38 No.12, 1996.

6 謝辞

本研究を行うにあたり、ご助言をいただいた南九州大学食品工学科の松下昌代教授ならびに同講座卒業論学生の皆様に深謝します。

また、試料測定の際にご助力いただきました衛生環境研究所の富山典孝主任研究員に深謝します。