

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月19日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656559

研究課題名（和文）ヘキサクロロベンゼンを完全に脱塩素する微生物コンソーシアムの解析

研究課題名（英文）Analysis of a microbial consortium having complete dechlorination ability of hexachlorobenzene

研究代表

井上 千弘（INOUE CHIHIRO）

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：30271878

研究成果の概要（和文）：

残留性有機汚染物質の代表物質としてヘキサクロロベンゼン（HCB）をとりあげ、TCE 脱塩素能力を有する微生物コンソーシアムによる脱塩素反応を詳細に検討した。このコンソーシアムによる HCB からの脱塩素反応はトリクロロベンゼン（TCB）、ジクロロベンゼン（DCB）を経て進行した。遺伝子解析の結果から、脱塩素反応の進行に伴い *Dehalococcoides* 属細菌が増殖すること、既知の脱塩素酵素とは異なる酵素が反応に関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Hexachlorobenzene (HCB) as a representative material of the persistent organic pollutants was examined microbial dechlorination reaction by a consortium having TCE dechlorination ability. The dechlorination pathway from HCB by this consortium proceeded via trichlorobenzene (TCB), dichlorobenzene (DCB). Genetic analysis of the consortium revealed that *Dehalococcoides* sp. grew with progress of the dechlorination, the enzyme(s) which were different from the known dechlorination enzyme(s) participated in a reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・地球・資源システム工学

キーワード：水質汚濁・土壌汚染防止・浄化、有害化学物質、生態学、微生物コンソーシアム、ヘキサクロロベンゼン、脱塩素、速度解析、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

残留性有機汚染物質（Persistent Organic Pollutants；POPs）は、環境中で分解されにくく、生物体内に蓄積されやすく、地球上で長距離を移動して遠い国の環境にも影響を及ぼすおそれがあり、一旦環境中に排出されると人体に有害な影響を及ぼすおそれがある化学物質の総称である。POPs 条約で優先的に対策をとる必要があ

る物質として、アルドリン、DDT、HCB などの農薬やダイオキシン類(PCDDs、PCDFs、コプラナーPCB)を含む合計 12 物質が挙げられている。このうち HCB は、ベンゼンの水素がすべて塩素に置き換わった構造であり、ダイオキシン類と類似の構造を持っている。従来からダイオキシン類をはじめとする POPs 類の微生物分解に関する研究は数多く行われているが、HCB の

ような比較的簡単な構造のものにおいても短時間で完全な分解を実現したような報告はなされていない。

一方、研究代表者らは TCE 脱塩素能力を有する微生物コンソーシアムを用い、HCB の嫌氣的な脱塩素が可能かどうか予備的に検討し、短時間で HCB が完全に消失していることを新たに見出したため、このコンソーシアムを用いた本格的な検討を開始することにした。

2. 研究の目的

本研究では、HCB を対象物質として TCE 脱塩素能力を有する微生物コンソーシアムによる脱塩素反応経路を速度論的な検討により明らかにした上で、遺伝子解析により分解過程における微生物生態系の動態を明らかにし、HCB からの脱塩素過程の詳細を解明することを目的とした。またこの微生物コンソーシアムがダイオキシン類や有機塩素系農薬などの POPs 類に対しどこまでの分解能力を発揮するかの検討を試みた。

3. 研究の方法

バイオレメディエーションを試験的に行っている TCE 汚染現場において採取した地下水を用い、TCE を 10ppm スパイクした合成培地（組成を表 1 に示す）に接種し、嫌気条件下で培養した（培養温度 30℃、振とう速度 120rpm）。エチレンまでの脱塩素が完了したら、新しい培地に前培養液の 1% を接種し経代培養を行った。これを繰り返して高いクロロエチレン類の脱塩素能力を有するコンソーシアムを得た。

表 1 合成培地の組成

KH ₂ PO ₄	0.30 g/l
K ₂ HPO ₄	0.39 g/l
NH ₄ Cl	0.58 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.083 g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.11 g/l
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0.02 g/l
Yeast extract	0.22 g/l
CH ₃ COONa·3H ₂ O	2.97 g/l

このようにして TCE 脱塩素能力を獲得した微生物コンソーシアムを含む培地にヘキサクロベンゼン (HCB) をスパイクして嫌気培養を行い、GC-FID により定期的に HCB とその分解生成物の定量分析を行った。

また、同時に培養液中の細菌から DNA を抽出し、リアルタイム-定量 PCR 法により *Desulfitobacterium* 属と *Dehalococcoides* 属細菌の 16SrRNA 遺伝子、*Dehalococcoides sp.* が保有することが知られている脱塩素遺伝子 *tceA*, *vcrA*, *bvcA* 遺伝子の解析を行い、分解微生物の特定と分解微生物群の群集構造変化を追跡した。リアルタイム-定量 PCR 法に用いたプライマーセットを表 2 に示す。

表 2 使用したプライマーセット

Dhc1200F	: CTGGAGCTAATCCCCAAAGCT
Dhc1271R	: CAACTTCATGCAGGCGGG
Dsb 406F	: GTACGACGAAGGCCTTCGGGT
Dsb 619R	: CCCAGGGTTGAGCCCTAGGT
TceA1270F	: ATCCAGATTATGACCCTGGTGAA
TceA1336R	: GCGGCATATATTAGGGCATCTT
VerA1022F	: TGCTGGTGGCGTTGGTGCTCT
VerA1093R	: TGCCCGTCAAAAAGTGGTAAAG
BvcA925F	: TGCCTCAAGTACAGGTGGT
BvcA1017R	: ATTGTGGAGGACCTACCT

限界希釈法を用いて HCB 脱塩素細菌の単離を試みた。合わせて同じ微生物コンソーシアムを用い、ダイオキシン、アルドリン、デイルドリン、DDE のスパイクして嫌気培養を行い、これら POPs 類に対する分解能力を評価した。

4. 研究成果

クロロエチレン類の脱塩素能力を有するコンソーシアムを用い、ヘキサクロベンゼン (HCB) の嫌氣的な脱塩素が可能かどうか検討した。HCB を添加した系で10%の植え継ぎを行いながら集積培養を繰り返したところ、HCB 脱塩素活性の高い (1 週間~10日程度でHCB が消失) 安定したコンソーシアムが得られた。図 1 にこのコンソーシアムによる HCB の分解結果の一例を示す。

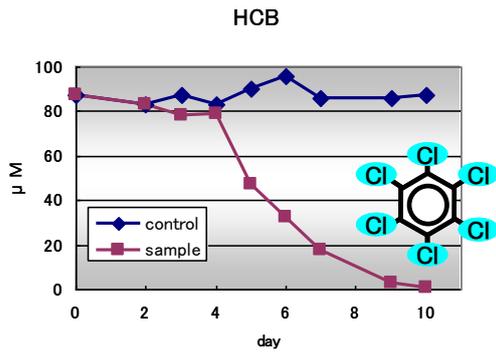


図1 HCBの分解結果

コンソーシアムを用いた場合、約4日間の遅滞期を経た後にHCBの急激な減少が見られ、約10日間で完全にHCBが消失している。これに対し微生物を加えていないコントロールではHCBの分解はほとんど生じていない。また、このコンソーシアムを用い、ペントクロロベンゼン (PeCB) とテトラクロロベンゼン (1,2,4,5-TeCB) の微生物分解を検討したところ、図2、図3に示すように微生物分解が認められた。

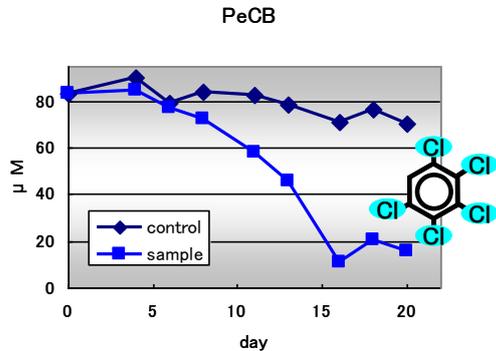


図2 PeCBの分解結果

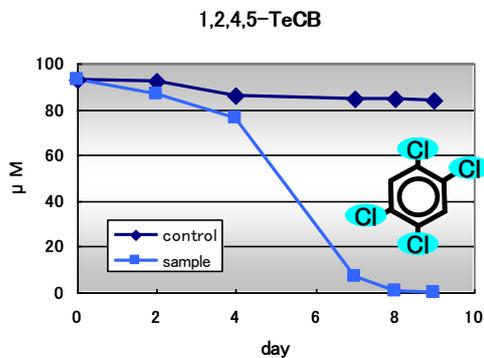


図3 1,2,4,5-TeCBの分解結果

これに対しテトラクロロベンゼンのうち、1,2,3,5-TeCB と1,2,3,4-TeCBでは微生物分解は認められなかった。ただし、1,2,3,5-TeCB や1,2,3,4-TeCBはコンソーシアムを加えていないコントロールにおいても微生物分解の場合とほぼ同等の分解が認められている。また、3種のトリクロロベンゼン (1,2,3-TriCB、1,2,4-TriCB、1,3,5-TriCB) と3種のジクロロベンゼン (1,2-DCB、1,3-DCB、1,4-DCB) においても、1,2,3,5-TeCB や1,2,3,4-TeCBと同様、単一の基質として培養実験を行った場合には微生物分解が認められなかった。

微生物分解が認められるもののうち、HCBと1,2,4,5-TeCBはほぼ同じ程度の分解速度であるが、PeCBの分解はこれらより遅くなっている。微生物分解が認められたHCB、PeCB、1,2,4,5-TeCBについて、反応生成物の分析を行った。結果を図4から図6に示す。

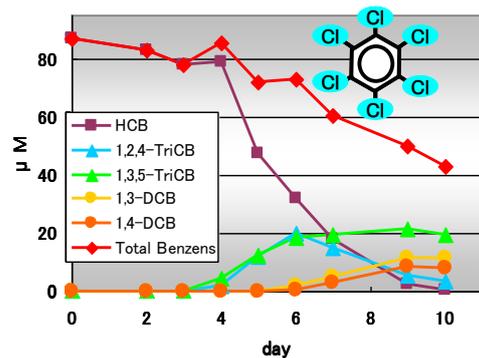


図4 HCBの反応生成物の分析

HCBの場合、HCBの減少に伴って1,2,4-TriCBと1,3,5-TriCBが生成し、次いで生成した1,2,4-TriCBの減少に伴って1,3-DCBと1,4-DCBの生成が認められる。PeCBや1,2,4,5-TeCBの生成は認められない。一方、PeCBの場合、PeCBの減少に伴って1,2,4,5-TeCBと1,2,3,5-TeCBが生成し、次いで1,2,4-TriCBと1,3,5-TriCBが生成しており、逐次的な脱塩素反応が起こっていることがわかる。また、1,2,4,5-TeCBの場合も、まず1,2,4-TriCBが生成し、次いで1,2,4-TriCBの減少に伴って1,3-DCBと1,4-DCBが生成する逐次的な分解反応が起こっていることがわかる。

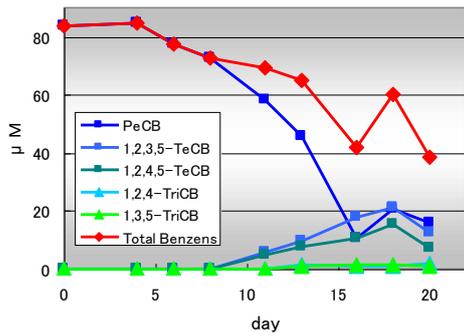


図5 PeCBの反応生成物の分析

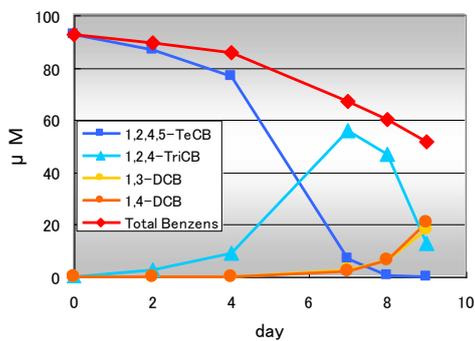


図6 1,2,4,5-TeCBの反応生成物の分析

これらの実験結果により、本実験におけるHCBの脱塩素反応は、既往の研究において提唱されているHCBからの逐次的な脱塩素過程では説明できない。逐次的な脱塩素反応が生じているのならば、HCBが酵素によってPeCBへと分解されて液相中に放出された後、そのPeCBを認識してTeCBへと分解する酵素が存在する筈であり、しかもPeCBが検出されないほどに迅速に分解していることになる。ゆえに、同じ微生物源を用いてPeCBを出発物質とした分解実験において、HCBと同等以下の分解速度を示したことに、大きな矛盾が生じるのである。

以上のことを考慮すると、HCBからTriCBまでの脱塩素反応が、同一酵素、或いは一連の酵素系で進行していると考えられる。すなわち、HCBが酵素による反応を受けた場合、PeCBやTeCBといった形では液相中に放出されずにTriCBまで反応が進行し、そこで初めて放出されるというものである。

一方、PeCBはここで想定した酵素(或いは酵素系)では基質として認識されないと考

えられ、PeCBの分解は別の酵素系によって行われていると考えられる。実際、PeCBの分解実験において分解が生じるまでには誘導期が発生しており、また分解生成物としてTeCBが検出されている。PeCBの分解速度は比較的遅く、またその分解反応は逐次反応で進行していると判断できることから、PeCBの分解を行う新たに誘導されてきたと考えられる酵素系は、従来の研究で報告されているものと同等の酵素系と想定される。

ただしいずれの場合も、反応の進行に伴って物質収支が取れなくなっており、今後さらに検討が必要である。

次にHCB、PeCB、1,2,4,5-TeCBを分解した各系について、*Desulfitobacterium*属と*Dehalococcoides*属細菌を対象にしたリアルタイム定量PCRを行い、これらの細菌のサンプル内での存在比率を求める実験を行った。結果を図7に示すが*Dehalococcoides*属の16SrRNA遺伝子は、 $10^6 \sim 10^7$ copy/ml、値が得られたが、*Desulfitobacterium*属の16SrRNA遺伝子は検出限界に近い値でしか増幅されなかった。従って、クロロベンゼンの分解に関与しているのは*Dehalococcoides*属細菌であると推定される。

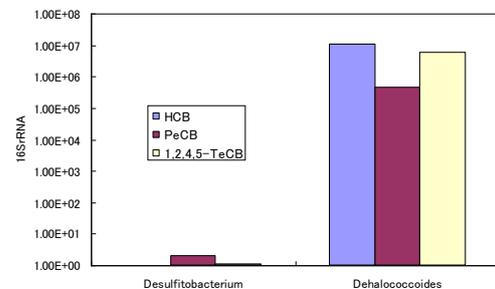


図7 各集積培養中の*Desulfitobacterium*属と*Dehalococcoides*属細菌の存在量(単位:1mLあたりの16SrRNA遺伝子のコピー数)

また、脱塩素酵素遺伝子である*tceA*・*vcrA*・*bvcA*を対象にしたリアルタイム定量PCRを行った。全ての系において3つの脱塩素酵素がほぼ同じ濃度で存在することが確認できた。しかし、その遺伝子量は、*Dehalococcoides*属を対象にしたリアルタイム定量PCRで定量された遺伝子量と比較し

て 1/1000 程度である事から (図 8)、これらの酵素遺伝子を持つ *Dehalococcoides* 属細菌の存在率は、これらの酵素以外の酵素を持つ *Dehalococcoides* 属細菌と比較して非常に低いと言える。よって、クロロベンゼンの分解には、これらの酵素以外の分解酵素を保持する *Dehalococcoides* 属細菌が関与していると思われる。

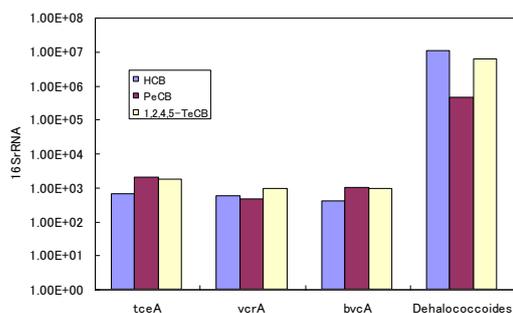


図 8 各集積培養中の脱塩素遺伝子類の存在量(単位: 1mL あたりの各遺伝子のコピー数)

TCE 脱塩素能力を獲得した微生物コンソーシアムから、限界希釈法を用いて HCB 脱塩素細菌の単離を試みたが、求める細菌の単離はできなかった。

同じ微生物コンソーシアムを用い、ダイオキシン、アルドリン、ディルドリン、DDE をスパイクして嫌気培養を行い、これら POPs 類に対する分解能力を評価したが、有意の分解性を示す結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Bacosa H., Suto K., Inoue C. Degradation potential and microbial community structure of heavy-oil enriched microbial consortia from mangrove sediments in Okinawa, Japan. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48 巻, 2013 年, 835-846 (査読あり) DOI: 10.1080/10934529.2013.761476
2. Bacosa H., Suto K., Inoue C. Bacterial Community Dynamics during the Preferential Degradation of Aromatic Hydrocarbons by a

Microbial Consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 74 巻, 2012 年, 109-115 (査読あり) DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.04.022

3. Kotaro Ise, Koichi Suto, Chihiro Inoue Microbial Diversity and Changes in the Distribution of Dehalogenase Genes during Dechlorination with Different Concentrations of cis-DCE. *Environmental Science & Technology*, 45 巻, 2011 年, 5339-5345 (査読あり) DOI: 10.1021/es104199y

[学会発表] (計 2 件)

1. Bacosa H., Inoue C. Unlocking the microbial black box in contaminated environments using a combination of different molecular techniques. *International Conference on Interdisciplinary Research Innovation*, 2012 年 12 月 5 日, Malolos, フィリピン
2. Koichi Suto, Kotaro Ise, Sho Nakazora, Chihiro Inoue, Microbial Structure of TCE degrading cultures obtained from several contaminated groundwater around Japan, 8th *International Symposium of Subsurface Microbiology*, 2011 年 9 月 14 日, Garmisch-Partenkirchen, ドイツ

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 千弘 (INOUE CHIHIRO)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授
研究者番号: 30271878

(2) 研究分担者

須藤 孝一 (SUTO KOICHI)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授
研究者番号: 90291252

(3) 連携研究者

()

研究者番号: