

## 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 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658272

研究課題名（和文）

嫌気性押し出し流れ電気培養集積系を用いたモノクロロ芳香族化合物の脱塩素菌の単離

研究課題名（英文）

Isolation of monochlorophenol-dechlorinating microorganisms using bio-electrochemical enrichment system with plug flow under anaerobic conditions

研究代表者

片山 新太 (KATAYAMA ARATA)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授

研究者番号：60185808

研究成果の概要（和文）：

嫌気的脱塩素反応は、残留性・毒性の低減化の点で、芳香族塩素化合物の浄化に重要な反応である。これまで各種の多塩素芳香族化合物の嫌気的脱塩素菌は単離されてきたが、モノクロロ芳香族化合物の嫌気的脱塩素菌は一例を除き単離されていない。多様と考えられる嫌気的モノクロロ芳香族化合物脱塩素菌の実態は不明のまま残された課題となってきた。そこで、本研究では嫌気性押し出し流れの系および電気培養集積系を作製し、脱塩素微生物の集積を行った。その結果、ポリクロロ芳香族化合物の微生物脱塩素反応は促進されるが、モノクロロ芳香族炭化の脱塩素化は促進されないことが明らかとなった。各種条件での集積系構築を試みたところ、モノクロロフェノール集積系では炭素源の供給が非常にわずかで良いことが明らかとなってきた。そこで、モノクロロフェノールを唯一の炭素源とする嫌気集積系とフェノールを唯一の炭素源とする嫌気集積系により集積を行って脱塩素菌の単離を試みた。その結果、硫酸還元フェノール分解菌の単離に成功し、その菌が4-クロロフェノールを分解することを明らかにした。また、高度に集積した3-クロロフェノール分解集積系を得て、その中で脱塩素を担う微生物の同定に成功した。これによって、これまで殆ど明らかにされてこなかったモノクロロフェノール脱塩素菌とその特徴を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Anaerobic dechlorination is the important reaction in the bioremediation of chlorinated aromatic compounds for decreasing persistency and toxicity of the compounds. There are many reports on the isolation of anaerobic dechlorinator for the polychlorinated aromatic compounds. However, monochlorophenol-dechlorinating anaerobic microorganisms have not been isolated except for few exception. In this study, we have conducted to isolate the monochlorophenol-dechlorinating anaerobic microorganisms. The bio-electrochemical enrichment system, or the enrichment column system with anaerobic plug flow did not enhance the dechlorination of mono-chlorophenol but poly-chlorophenols. Various trials under different conditions suggested that mono-chlorophenol dechlorinating culture did not require other carbon sources such as lactate and formate. Thus, we provided the anaerobic enrichment systems using mono-chlorophenol or phenol as sole source of carbon and energy. The enrichment with phenol resulted in the isolation of anaerobe growing on phenol degradation under sulfate-reducing conditions. The enrichment with 3-chlorophenol was successfully obtained and 3-chlorophenol-dechlorinating anaerobe was identified. These findings expands our knowledge on the mono-chlorophenol dechlorinators and their characteristics.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：境界農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：環境修復

1. 研究開始当初の背景

モノクロ芳香族化合物の嫌氣的脱塩素反応を行う微生物は、嫌気環境中の化学物質の運命に関する研究から、その存在が示されてきたが、単離された例は殆ど無く、その実態は不明のままとなっている。例えば、ある種の水田土壌中では除草剤ベンチオカーブ

(S-4-クロロベンジル-

N,N-ジエチルチオカルバマート)の脱塩素が観察されているが、このベンチオカーブ脱塩素菌は未だに単離されていない (Moon と Kuwatsuka, J. Pesticide Sci. 10:541-547, 1985)。また、クロロフェノール類がフェノールまで脱塩素される集積培養系でも、モノクロロフェノール(MCP)の脱塩素反応を行う微生物は単離は成功していない (Yoshida ら Sci. Total Environ., 381:233-242, 2007)。これまで単離されたのは、3-クロロ安息香酸を脱塩素するDesulfomonile 属菌だけ (Mohn と Tiedje, Microbiol. Rev., 56:482-507, 2002)である。脱塩素菌として有名な Dehalococcoides属菌もMCP の脱塩素反応をすることはできないことが知られている

(Adrian ら, ES&T41:2318-2323, 2007)。この様に、多様と考えられるモノクロ芳香族化合物の嫌氣的脱塩素菌の実態解明は、未だに残された課題となっている。

2. 研究の目的

本研究は、これまで殆ど成功例の無い、モノクロ芳香族化合物の脱塩素菌の単離にチャレンジするものである。単離の成功自体が、微生物生態学におけるブレークスルーであり、その脱塩素反応を担う生化学メカニズムや遺伝子は、これまでに無い新たなものの発見が期待される。また、嫌気環境におけるモノクロ芳香族化合物の脱塩素反応という最も遅い反応の促進技術の開発につながることも期待される。

3. 研究の方法

難培養性の微生物の単離では、フラスコを用いて完全混合液体回分培養で集積した後に、寒天培地を用いた単離という方法がとられる

ことが一般的である。しかし、これまでモノクロ芳香族化合物の集積培養は、殆ど失敗に終わっている (Mohn と Tiedje, Microbiol. Rev., 56:482-507, 2002)。そこで、本研究では、いくつかのユニークな条件での集積を比較検討した。(1)嫌気性カラムを用いた押し出し流れ集積系でのモノクロフェノール脱塩素活性集積、(2)電気培養集積系でのモノクロフェノール脱塩素活性集積、(3)各種条件でのバッチ培養でのモノクロフェノール脱塩素活性集積の3つを用いて実施した。

4. 研究成果

(1) 嫌気性押し出し流れ系

嫌気性押し出し流れシステムを構築した。まずアクリル製カラム(長さ504mm、内径73.7mm)に、ブチルゴム栓でキャップをしたサンプリングポート(内径1.5mm)を、カラムの長さに均等に10カ所に取り付けた。カラムはガラスビーズで充填した。ガラスビーズは充填前に10% HNO<sub>3</sub>水溶液に1時間浸漬した後に十分蒸留水で洗浄してpHを中性に戻し、121 °Cで15分オートクレーブし、更に乾燥したものをを用いた。カラムの下端50mmの範囲には、直径2.0 mmのガラスビーズを、その上52mmから452mmの高さに0.5mm径のガラスビーズを充填した。その上部には何も充填しないでサンプリング用の液溜めとした。ガラスビーズの移動を防ぐために、ステンレススチールの網(直径80.2mm、厚さ2mm、孔径0.15mm)を設置した(下端から50-52mmおよび452-454mmの位置)。カラムフランジはボルトで締めて水漏れやガス混入を防いだ。カラム孔隙率は0.38で、間隙体積は920cm<sup>3</sup>であった。充填済みカラムは、注入液の入った600mlの密封瓶に繋ぎ、初期はペリスタルティックポンプ、その後はプランジャー型ポンプで上向流で注入した。注入液は、窒素ガスで1.5時間バブリングした後、ブチルゴム栓で密栓した後に121°C15分オートクレーブした。使用直前に、0.2 mmol/Lのトリニトリル酢酸-チタン (III)、クロロフェノール、酵母エキス、乳酸を添加した。ガスタイトアルミバ

ッグ (1L) を二つ連結して600mlボトルにニードルを差し込んで繋いだ。これによって、ボトル内の液減少分を窒素ガスで補足した。カラム最上部からの溶出液は、三角フラスコ (1 L) に受けた。三角フラスコは、電子天秤の上のせておき、パーソナルコンピュータに計測結果を経時的にモニター・記録した。以上のシステム全体を30°C培養条件下に置いた。ただし、三角フラスコと電子天秤は4°Cに設置した。全てのつなぎはテフロンチューブ又は2重か3重にしたテフロンチューブを用いた。

カラムには間隙体積分の3倍液量までは0.5ml/minの流速で液を注入し、カラム内部を嫌氣的にした。このとき、レサズリンを指示薬として用いた。次にクロロフェノール脱塩素微生物群集を1.0ml/min (水理学的滞留時間0.66日) で注入した。間隙体積3倍液量に相当するだけを循環流として微生物分布を平行させた後に、流速0.5 mL/minの押し出し流れ (水理学的滞留時間1.28日) として溶出液の測定を開始した。注入するクロロフェノールの量は50~100  $\mu\text{mol/L}$ 、酵母エキスは0.01 g/L、そして乳酸ナトリウムは20 mmol/Lとした。

以上の条件で2,4,6-トリクロロフェノール (2,4,6-TCP) とその脱塩素微生物群集を注入して100日以上長期培養を行ったところ、溶出液の組成が安定し定常状態に至ったものと考えられた。TCPは2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) から4-クロロフェノール (4-CP) に脱塩素された。物質収支から4-CPは、更に脱塩素または分解されているものと推定された。16SrRNA遺伝子を標的としたポリメラーゼサイクル反応を行って変性剤濃度勾配電気泳動ゲルを行って微生物群集構造を調べたところ、*Firmicutes* と *Bacteroidetes* が主体の微生物群集となっていた。カラム途中のサンプリングポートからサンプリングして、2,4,6-TCP、2,4-DCP、4-CPの濃度分布を測定した。微生物反応がI次反応速度式に従うとみなして反応速度係数を求めたところ、2,4,6-TCP $\rightarrow$ 2,4-DCPの反応が1.58 d<sup>-1</sup>、2,4-DCP $\rightarrow$ 4-CPの反応が2.23 d<sup>-1</sup>、4-CP $\rightarrow$ の反応が0.206 d<sup>-1</sup>と見積もられた。この反応速度条件でバイオバリア型透過性反応壁を設計した場合、第1段階、第2段階、第3段階の反応にはそれぞれ126cm、130cmおよび689cmの厚さが必要と推算される。689cm厚の透過壁は実施不可能であるので、10倍弱の速度向上が必要と考えられる。そのためには、4-CP脱塩素・分解微生物の集積が必要不可欠と考えられるが、押し出し流れカラム内では、特異的に集積が難しい。そこで、バッチ条件下

で培養することとした。

## (2) 電気培養集積系

電気培養集積系は、二つのガラスチャンバーを5.3 cm<sup>2</sup>のプロトン交換膜で仕切ったものを用いた。プロトン交換膜はあらかじめ、過酸化水素水 (30%) で洗浄した後、0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で1時間、脱イオン水で1時間洗浄し、脱イオン水に浸漬しておいたものを用いた。それぞれのガラスチャンバーにはサンプリング用の口を付け、テフロンシールしたブチルゴム栓をアルミシールで密栓した。作用電極(カソード)は、グラフアイト棒(5mm直径、15cm長さ)とし、カウンター電極(アノード)は白金線(0.8mm直径、1m長さ)を用いた。飽和 Ag/AgCl 型の参照電極を、作用電極と同じチャンバーにセットして、酸化還元電位の制御を可能とした。電極とチャンバーは5M塩酸で5分殺菌した。電極を3電極型ポテンシオスタットにつなぎ、電位制御を行った。

作製した電気培養集積系の作用電極チャンバーには培地に加えてクロロフェノール脱塩素微生物群集を添加、カウンター電極チャンバーには無機塩培地のみを添加した。クロロフェノールを20  $\mu\text{M}$  およびギ酸を10 mM添加した。培養に際して、作用電極を-500 mV (水素電極換算) に設定した。暗条件下30°Cで、スターラーで攪拌しながら培養した。作用電極チャンバー内の培養液を定期的にサンプリングして、クロロフェノール類の濃度を測定した。この条件で電気培養を行ったところ、モノクロロフェノール3種を加えた作用電極チャンバーでは、脱塩素反応が全く生じなかった。

電気培養の有効性のヒントとなる土壌フリー培養系の形成を調べたところ、ペンタクロロフェノールでは土壌粒子が無くなると脱塩素反応が停止する一方、ジクロロフェノールやモノクロロフェノールでは土壌を含まない土壌フリー集積培養系で脱塩素反応を進めることが分かった。このことは、土壌中の細胞外電子伝達物質が無くとも、ジクロロフェノール以下の脱塩素反応は進むことを示唆しており、電気培養集積系はモノクロロフェノール脱塩素・分解微生物の集積に有利であることは無いことを示唆している。モノクロロフェノールの脱塩素反応は、酸化還元電位が低いことから、電子受容反応としては不利である。そこで、バッチ培養系で硫化ナトリウム系の還元剤を用いることによつ

て、モノクロロフェノール脱塩素・分解菌の集積を行うこととした。

### (3) 各種条件でのバッチ培養系

モノクロロフェノールまたはフェノールを唯一の炭素源として用いるバッチ培養での集積を試みた。有機塩素系溶媒で汚染した履歴を持つ河川底質を接種原として、2-クロロフェノール(2-CP)、3-クロロフェノール(3-CP)、4-クロロフェノール(4-CP)を混合した嫌気培地、またはフェノールを加えた嫌気培地を作製して培養した。数ヶ月の培養で全てのクロロフェノール濃度が減少した。2-CP および 3-CP の脱塩素活性は高かったが、4-CP の脱塩素活性は弱かった。そこで、それを2次的接種原として、モノクロロフェノール1種を入れて集積培養した。また、フェノールの分解も見られたことから、これについても集積培養を行った。

3-CP 脱塩素活性は、無機塩に微量元素およびビタミンを強化した合成培地で、気相を二酸化炭素を20%含む窒素ガスとし、硫化ナトリウムで還元して培養することにより、安定に継代培養で維持することが出来た。この集積培養系は、ヘッドスペースに水素ガスを注入すると、3-CP 脱塩素が高まった。この微生物群集は、3-CP だけでなくジクロロフェノール類も脱塩素したが、メタ位の脱塩素のみを行った。主要微生物として、Spirochaetes, Bacteroidetes, Proteobacteria の3つの門に属する微生物が存在することが、16SrRNA 遺伝子の部分破裂から推定された。ギ酸・乳酸・水素ガスは脱塩素を阻害しないが、酢酸やグルコースは阻害した。酸素があると脱塩素反応は止まった。エチレンの存在も脱塩素活性に影響しなかったことから、メタン菌は官許していないことが推察された。また、この脱塩素活性には培地中に含まれるイオウ化合物が影響していることが示唆された。また、3-CP 無しで継代すると脱塩素活性は失われた。活性の有無と顕微鏡観察の結果から、大型の桿菌が3-CP の脱塩素反応に関与していることが明らかとなった。そこで、培養物を1 $\mu$ m 孔径のメンブレンフィルターでろ過してフィルター上の微生物を継代したところ、Desulfomonile 属細菌であることが明らかとなった。この菌が3-CP 脱塩素菌であることが推定された。また、この3-CP 脱塩素微生物群は、炭素源の供給が非常にわずかで良いことが明らかとなった。

フェノールを唯一の炭素源フェノール分解性硫酸還元細菌 DS 株を分離した。1 mM

のフェノールを電子供与体、10 mM の硫酸塩を電子受容体として添加した嫌気性炭酸水素塩緩衝化培地を用いて、30°C嫌气的条件下でフェノール分解性硫酸還元細菌を集積した。集積培養物におけるフェノールの分解を確認後、集積培養物をフェノールと硫酸塩を添加した新鮮培地へ植え継ぎし、フェノール分解活性を維持した。フェノール分解と共に硫酸還元が起こっていることが確認された。そこで、嫌気性ロールチューブ法を用いて嫌気性微生物株を分離した。この分離菌株の純粋性を位相差顕微鏡での細胞形態の観察と16S rRNA 遺伝子塩基配列を調べることによって確認した。純粋性を確認した分離菌株を DS 株と命名した。16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づき、DS 株の最近縁微生物は、約98%~99%の類似度で硫酸還元細菌の [Desulfobacterium] *anilini* AK1 株(Ahn et al., 2009)および [Desulfobacterium] *anilini* Ani1 株(Schnell et al., 1989)だった(1493塩基を比較)。系統樹上では、DS 株は、[Desulfobacterium] *anilini* AK1 株および [Desulfobacterium] *anilini* Ani1 株と同じグループを形成し、そのグループは他の硫酸還元細菌の各種とは離れて位置づけられた。このため、DS 株は AK1 株と Ani1 株ともに [Desulfobacterium] *anilini* の新規の硫酸還元細菌菌株である可能性があった。DS 株は、嫌気性のグラム陰性桿菌(レモン型)で、フェノールに加え、安息香酸、4-ヒドロキシ安息香酸、4-メチルフェノール、更には4-クロロフェノール等の芳香族化合物や、酢酸塩、酪酸塩およびピルビン酸のような脂肪酸を、電子供与体基質として酸化分解し、硫酸塩を電子受容体基質として還元して増殖する能力を持っていた。DS 株は、0 から 2.5% (w/v) の NaCl 濃度範囲で増殖した(最適 NaCl 濃度は0 から 0.085%, w/v)。本研究の結果から、DS 株は、淡水から海洋環境までの広範囲の無酸素環境で生存可能な硫酸還元細菌であり、フェノールなどの芳香族化合物で汚染された無酸素環境のバイオレメディエーションのための微生物材料として利用できることが示された。

### 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 4 件)

① Chunfang Zhang, Daisuke Suzuki, Zhiling Li, Lizhen Ye, Arata Katayama (2012) Polyphasic characterization of two microbial consortia with wide dechlorination spectra for chlorophenols, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(5), 512-517, DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.05.025 査読有り

② Chunfang Zhang, and Arata Katayama (2012) Humin as an electron mediator for microbial reductive dehalogenation, *Environmental Science and Technology*, 46, 6575-6583, DOI: 10.1021/es3002025 査読有り

③ Daisuke SUZUKI, Daisuke BABA, Velayudhan Satheja SANTHI, Robinson David Jebakumar SOLOMON, Arata KATAYAMA (2013) Use of a glass bead-containing liquid medium for efficient production of a soil-free culture with polychlorinated biphenyl-dechlorination activity, *World Journal of Microbiology and Biothechnology*, in printing, DOI: 10.1007/s11274-013-1310-8 査読有り

④ Zhiling Li, Yasushi Inoue, Takuya Mizoguchi, Yohei Simizu, Naoko Yoshida and Arata Katayama (2012) Simulation of the Reductive Dechlorination Processes in a Lab-Scale Anaerobic Biobarrier with the Enriched TCP Dechlorination Consortium, *Transactions of Tianjin University*, 18: 441-449, DOI: 10.1007/s12209-012-1768-8 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

① Daisuke SUZUKI, Arata KATAYAMA (2011) "Influencing factors on monochlorophenol-dechlorinating activities of anaerobic microbial communities enriched from a contaminated river sediment", The 4th Congress of European Microbiologists, Geneva, Switzerland, Jun. 26-30, 2011

② Daisuke SUZUKI, Daisuke BABA, Velayudhan Satheja SANTHI, Robinson David Jebakumar SOLOMON, Arata KATAYAMA (2011) "Composition of microbial populations of polychlorinated

biphenyl-dechlorinating soil-free culture", International Symposium on EcoTopia Science 2011, Nagoya University, Nagoya, Japan, Dec. 9-11 2011.

③ 鈴木大典, 片山新太 (2011) 「3-モノクロロフェノール脱塩素嫌気性集積培養物の細菌群集構成とクロロフェノール脱塩素活性」, 第27回日本微生物生態学会, 2011年10月8-10日、京都大学

④ 鈴木大典, 片山新太 (2012) 「3-クロロフェノール脱塩素活性に対する硫黄還元細菌, 硫酸還元細菌およびメタン生成古細菌の影響」, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012年3月22-26日、京都女子大学

⑤ Chunfang ZHANG, Daisuke SUZUKI, Zhiling LI, Lizhen YE, Arata KATAYAMA (2012) Polyphasic characterization of two anaerobic microbial consortia dechlorinating wide spectra of phenols with lower levels of chlorination, WET2012 Water and Environment Technology Conference (June 28-30, 2012. The University of Tokyo, Tokyo, Japan)

⑥ Daisuke SUZUKI, Arata KATAYAMA (2012) Characteristics of a 4-chlorophenol degrading, sulfate-reducing bacterium isolated from a river sediment contaminated with chlorinated solvents, The power of the small-the 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology –ISME-14, The Bella Center, Copenhagen Denmark, 19-24 August 2012

⑦ Zhiling LI, Yasushi INOUE, Daisuke SUZUKI, Lizhen YE and Arata KATAYAMA (2012) Long-term Anaerobic Mineralization of PCP in a Continuous-Flow System Using Only Lactate as an External Nutrient, the 4<sup>th</sup> International Conference on Soil Pollution and Remediation (SOILREM 2012), 23-26 September, 2012, Yantai Oriental Haitian Hotel, No. 12 Haiyun Rd. Laishan, China

⑧ Arata Katayama, Zhiling Li, Chunfang Zhang, Dongdong Zhang, Suyin Yang, and Daisuke Suzuki (2012) Microbial cofinment technology of groundwater contaminated with halogenated organic pollutants, First International Symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-1), November 11-13, 2012, Noyori Conference

Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan  
(Invited)

⑨ Chunfang Zhang, Zhiling Li, Daisuke Suzuki, and Arata Katayama (2012) Microbial reductive dechlorination of pentachlorophenol mediated by humin, First International Symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-1), November 11-13, 2012, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan

⑩ Daisuke Suzuki, Zhiling Li, Chunfang Zhang and Arata Katayama (2012) Influence of electron donors and electron acceptors on the 3-chlorophenol dechlorination activity of anaerobic enrichment culture, First International Symposium on Advanced Water Science and Technology (ISAWST-1), November 11-13, 2012, Noyori Conference Hall, Nagoya University, Nagoya, Japan

⑪ 鈴木大典、片山新太 (2012) 3-クロロフェノール脱塩素嫌気性集積培養物における脱塩素菌の推定、第28回日本微生物生態学会大会(豊橋技術科学大学、豊橋) 2012年9月19日-22日

〔図書〕(計1件)

鈴木大典、片山新太 (出版決定) 93人に役立つ土壌微生物 「微生物の事典」 (朝倉書店)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

該当なし

○取得状況 (計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.er.esi.nagoya-u.ac.jp/rescwe/tairyou/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片山新太 (KATAYAMA ARATA)  
(名古屋大学エコトピア科学研究所・教授)  
微生物生態工学・環境工学

研究者番号 : 60185808

### (2) 研究分担者

鈴木大典 (SUZUKI DAISUKE)  
(名古屋大学エコトピア科学研究所・助教)  
嫌気微生物学  
研究者番号 : 10591076

### (3) 連携研究者

該当なし

