

(0050) 原位置由来微生物コンソーシアを利用するバイオオーグメンテーション法の開発

○小松大祐¹・佐藤万仁²・平野隆²・栗原裕子³・田村紀義⁴・養王田正文⁵

¹株式会社アイ・エス・ソリューション・²一般社団法人沖縄総合科学研究所

・³オーピーバイオファクトリー株式会社・⁴PaGE Science 株式会社・⁵東京農工大学

1. はじめに

1.1 バイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーション

土壤汚染対策法における対策工法の一つにバイオレメディエーションがある。バイオレメディエーションは、低環境負荷、かつ低コストな工法の一つであり、優れた浄化工法の一つである。しかしながら、汚染物質を分解する主体が微生物であることから、微生物の存在量や微生物の活性を左右する環境要件によって、分解が進まないことや、基準適合まで長期間を要する等その性能が大きく影響されてしまう不安定な側面を持つ。そのため、バイオレメディエーションを上手く進めるためには、微生物の存在量や様々な環境パラメータ等をモニタリングしながら、適切に管理していくことが重要である。

バイオレメディエーションにはバイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーションの2つの手法がある。バイオスティミュレーションは薬剤のみを投入することで、土着の微生物活性化させる手法である。一方、バイオオーグメンテーションは分解性能が優れた微生物を薬剤と一緒に投入する手法である。バイオオーグメンテーションは、近年のDNA解析技術が進歩により、分解菌の全ゲノム解析等も行われており(Yohdaら 2017)、安全性や高い分解能力がわかっている微生物等を投入することが可能であることから、バイオスティミュレーションと比較し、工期を短くできる可能性がある反面、投入した微生物が現場に適応できず、十分にその分解活性を維持できない場合がある。

考えられる原因として、投入する微生物の栄養要求性や適用できる環境がサイトとあっていないことで、分解微生物が生残できずに死滅してしまうことや、土着の微生物と基質の競合が起こることで、投入した微生物が基質を十分取り込むことができず、死滅してしまうことが考えられる。

1.2 バイオオーグメンテーションの新手法

そこで、バイオオーグメンテーションの短所を克服し、かつ、長所を活かすために、我々は元々サイトに生息している微生物を利用してオーグメンテーションを行う手法を試みた。

サイトから土壤・地下水を採取し、分解微生物およびその分解微生物に関わる微生物群（コンソーシア）を順化培養し、分解に関わる可能性がある微生物コンソーシアを増殖させ、VOCsの分解活性を高めた後に、サイトに戻す手法を試みた(図1)。本手法のメリットは、①微生物を元々サイトから取得しているため、その環境に合った生残性が高い微生物が取得できること、②バイオオーグメンテーションの特長である基準適合までに要する期間が短いこと、③元々サイト由来の微生物のため、生態系に与える影響が最小限、である。

本研究においては、沖縄県のあるサイトにおいて、微生物コンソーシアの取得と構築、解析、また、実サイトにおける実証試験の実施を行い、微生物コンソーシアの有用性について、確認することができたことから、以下にその結果を報告する。

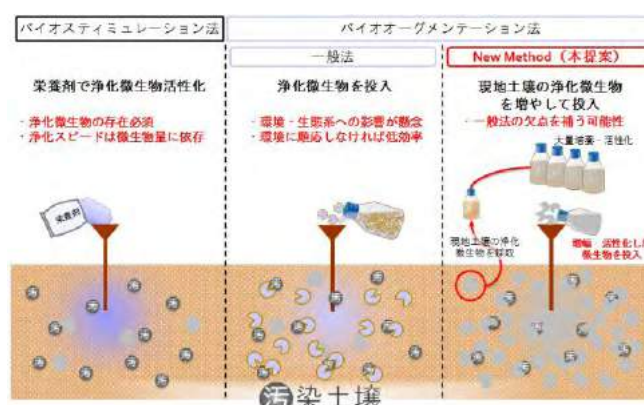


図1 本報告で用いる手法

New method for in-situ bioremediation using Chloroethene degradation consortia

Daisuke Komatsu¹, Kazuhito Sato², Takashi Hirano², Yuko Kurihara³, Noriyoshi Tamura⁴, Masafumi Yohda⁵

(¹In Situ Solutions Co., Ltd., ²Okinawa Institute of Advanced Sciences, ³OP Bio Factory Co., Ltd.,

⁴PaGE Sciences Co., Ltd., ⁵Tokyo University of Agriculture and Technology)

連絡先: 〒101-0044 東京都千代田区鍛冶町 2-2-2 (株)アイ・エス・ソリューション

TEL 03-5297-7288 FAX 03-5297-0242 E-mail d_komatsu@is-solution.com

2. 材料と方法

2.1 分解微生物コンソーシアの取得とサイトの探索

沖縄県内において、様々な地点の湧水や土壌についてサンプリングを行った。サンプリングは湧水を中心に、一部ボーリングマシンによる土壌サンプリングも行った。サンプリング後は、速やかに実験室に持ち帰り、試験に用いた。

2.2 分解微生物コンソーシアの構築とその培養方法

嫌氣的に塩素化 VOCs の分解が促進される条件で培養をおこなった。気相はアルゴンで置換し、炭素源や微量ミネラル、アミノ酸類、そして水素を添加し、TCE もしくは PCE を添加して培養を行った。定期的に VOCs の濃度測定を行い、分解が確認された場合、培養液の一部を新しい培地に接種し、継代を行った。数代継代後、あるサイト由来のサンプルから、安定して塩素化 VOCs を分解できるコンソーシアが入手できた。

2.3 事前の室内試験

実証試験の実施サイトが決定した後、取得した塩素化 VOCs 分解コンソーシアについて、実際の土壌に対する効果の有無や、コンソーシアの添加率、また、使用する薬剤の検討を行うための事前検討を行った。事前検討において、実証試験を実施するサイトの土壌・地下水を 100mL 容バイアルに入れ、そこに VOCs や浄化薬剤、そしてコンソーシアを添加し、ラボスケールにおける塩素化 VOCs の分解試験を行った。

2.4 実証試験の実施

実証試験は沖縄県内のあるサイトにおいて、関係者に合意をとった後に行った。汚染の詳細な原因などは不明であるが、当該サイトは地下水において環境基準を超えない濃度ではあるものの、PCE や TCE、その分解生成物が検出されていることが事前のモニタリングからわかっている。

実証試験は井戸注入によって実施した。井戸の配置と深度方向を図 2 に示す。井戸は周囲の観測井戸と中心の注入井戸からなる。反応区においては、ポリ乳酸系の薬剤を予めコンソーシアを注入する試験施工範囲全体に注入した。ポリ乳酸系の薬剤注入 2 週間後、VOCs の分解が終了し、VOCs が検出されないことを確認した培養後のコンソーシアを注入井戸からおよそ 5L 程度注入した。対照区においてはポリ乳酸系の薬剤を注入した 2 週間後に約 5L のミネラルウォーターを注入した。注入後は約 120 日間にわたって地下水のモニタリングを継続した。

3. 結果と考察

3.1 コンソーシアの分解活性など

取得した塩素化 VOCs 分解コンソーシアについて培養系における分解活性を図 3 に示す。取得した塩素化 VOCs 分解コンソーシアは PCE や TCE を速やかに脱塩素化し、エチレンにまで分解する。また、*Dehalococcoides* 属細菌は非常に高い密度(1.0×10^9 copies/100mL 以上)でコンソーシア内に存在していることもわかった。

3.2 事前の室内試験

結果を図 4 に示す。結果から、土壌の体積に対して 0.1% 程度の添加で分解活性を十分に示すことが分かった。また、使用する薬剤についても水素等は必要なく、ポリ乳酸系の薬剤で問題ない事が確認された。

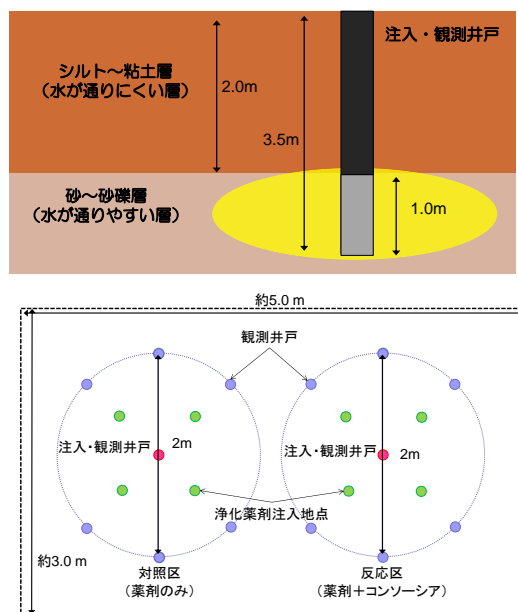


図 2 観測、注入井戸

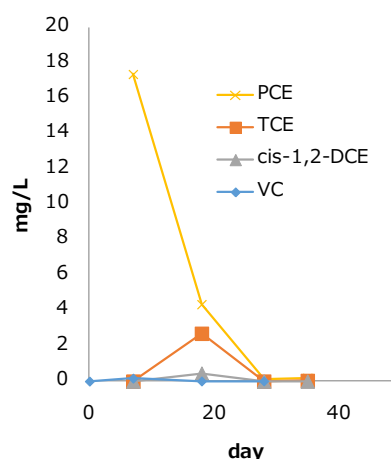


図 3 コンソーシアの塩素化 VOCs 分解

3.3 実証試験結果

3.3.1 VOCs 濃度について

注入井戸における地下水モニタリング結果を図5に示す。対照区においては、濃度にばらつきがあり、突発的に検出下限値未満となる日もあるが、基本的にはTCE濃度が緩やかに減少していき、80日後以降、TCEが検出下限値未満となった後、cis-DCE濃度が上昇し、およそ120日目でピークとなった。このことは、ポリ乳酸系の薬剤により、土着の *Dehalococcoides* 属細菌をはじめとする分解微生物が徐々に増えていき、TCEの脱塩素化反応が進行したことを示すと考えられる。なお、120日目の時点においてもTCEの分解生成物であるcis-DCEはほとんど分解されていないと考えられる。

また、CE(クロロエチレン)は期間中、検出されなかったことから、対照区における脱塩素化反応は120日間において、cis-DCEで止まっている可能性が高い。一方、反応区においては、TCEが速やかに減少していき、30日前後で定量下限値未満となった。cis-DCEは20日前後でピークを迎え、CEも30日後にピークを迎えた。その後は、cis-DCEが定量下限値前後で検出された。このことは、反応区においては、投入されたコンソーシアにおいて速やかにVOCsの脱塩素化反応が起きたことを示すと考えられる。

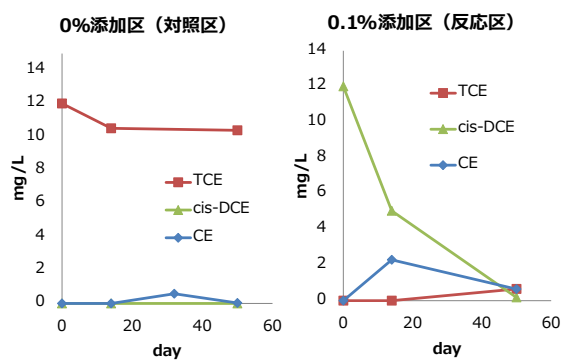


図4 事前室内試験の結果

3.3.2 *Dehalococcoides* 属細菌について

16SrRNA 遺伝子を基にした *Dehalococcoides* 属細菌のコピー数を図5に示す。*Dehalococcoides* 属細菌は、モニタリング期間中、対照区においては検出下限値前後のコピー数を維持していた一方、反応区においては、投入したコンソーシアの影響により、投入直後に *Dehalococcoides* 属細菌が 1.0×10^9 copies/100mL の密度で存在し、最大値を示している。その後、 1.0×10^8 copies/100mL 程度で約50日間にわたりその密度は維持された。VOCs濃度も50日以内にCEの発生まで確認されていることから、VOCsの脱塩素化反応は、*Dehalococcoides* 属細菌が 1.0×10^8 copies/100mL 程度を維持している50日間において特に活発であると考えられる。その後、VOCs濃度が低下した、60日目を以降は徐々に密度は減少傾向となり、100日目でほとんど検出下限値近くにまで *Dehalococcoides* 属細菌の密度はさがった。本サイトはVOCs濃度が低いことから、はっきりしたことは言えないが、投入されたコンソーシア中の *Dehalococcoides* 属細菌は地下水中のVOCsを脱塩素することで、密度を維持していた一方、VOCs濃度が十分下がった後には、基質がなくなったことで徐々にその密度を減らしていった可能性が考えられる。そのことは、投入された *Dehalococcoides* 属細菌はVOCsが脱塩素化されて役目を終えた後に、すみやかにその密度を減らすことを示唆している。

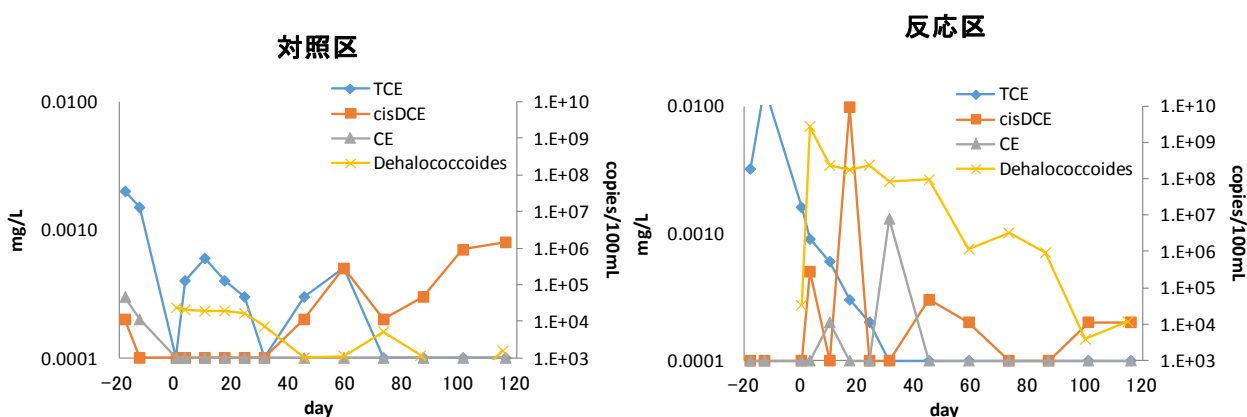


図5 試験施工における注入井戸のVOCs濃度の変化と *Dehalococcoides* 属細菌コピー数 (0日はコンソーシア注入日を示す。-14日前後で薬剤を注入)

4. まとめ

土壤汚染対策法の改正があり、2017年度からCEが新たに対象物質に追加された。CEは塩素化VOCsの嫌氣的なバイオレメディエーションにおいて、最終的な分解生成物であるエチレンの一段階前の物質であり、エチレンまで脱塩素化される前に必ず生成する物質である。そのため、今後、嫌氣的なバイオレメディエーション

ンを行う場合には、CEが分解されるまで対策が完了せず、これまでと比較し、分解全物質基準適合となるまでに長期間を要してしまう可能性が高い。

そこで、筆者らは、初期からより分解スピードが速いバイオオーグメンテーションが有効と考えている。ただし、バイオオーグメンテーションは *Dehalococcoides* 属細菌単独で投入した場合、生残性が悪いことや、脱塩素化反応の活性が十分発揮できない等により、浄化がうまくいかないことがある。原因の一つとして、*Dehalococcoides* 属細菌の特殊な栄養要求性 (Heら2007) や適応できる環境が特殊なこと挙げられる。しかしながら、本報告のコンソーシアを用いる手法を適用すれば、*Dehalococcoides* 属細菌の生残性や活性を栄養面や環境面からサポートする微生物を同時に投入するため、投入された *Dehalococcoides* 属細菌の生残性や活性が保たれ、脱塩素化反応がより確実に、速やかに行われると考えられる。過去の報告において、*Dehalococcoides* 属細菌が他の細菌類と培養することで、その活性や生残性が促進されるという報告 (Menら2012) もこのことを支持する。また、元々サイトにいた微生物群しか含まれていないため、生態系に及ぼす影響は外部から微生物を投入するのと比較すれば、少ないと考えられる。

今後は、さらにスケールの大きい試験施工や、実施工に向けた大量培養法の確立等を視野に検討する予定である。また、コンソーシアの適用範囲について、同一サイトでなくても、地質や水質が似ている他サイトにおいて適用できる可能性についても検討する必要があると考えられる。

謝辞

本研究は沖縄県の委託事業であるライフサイエンスネットワーク形成事業「原位置由来微生物コンソーシアを利用するバイオオーグメンテーション法の開発と沖縄県内汚染土壌への利用」によって実施した。

参考文献

- 1) Masafumi Yohda, Kentaro Ikegami, Yuto Aita, Mizuki Kitajima, Ayane Takechi, Megumi Iwamoto, Tomomi Fukuda, Noriyoshi Tamura, Junji Shibasaki, Seiji Koike, Daisuke Komatsu, Sakari Miyagi, Minoru Nishimura, Yoshihito Uchino, Akino Shiroma, Makiko Shimoji, Hinako Tamotsu, Noriko Ashimine, Misuzu Shinzato, Shun Ohki, Kazuma Nakano, Kuniko Teruya, Kazuhito Satou, Takashi Hirano, Osami Yagi(2017) : Isolation and genomic characterization of a *Dehalococcoides* strain suggests genomic rearrangement during culture, Scientific Reports 7, Article number: 2230.
- 2) He J. Z., Holmes V. F., Lee P. K. H., Alvarez-Cohen L. (2007) : Influence of vitamin B₁₂ and cocultures on the growth of *Dehalococcoides* isolates in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2847–2853.
- 3) Men Y. J., Feil H., VerBerkmoes N. C., Shah M. B., Johnson D. R., Lee P. K. H., West K. A., Zinder S. H., Andersen G. L., Alvarez-Cohen L.,(2012). Sustainable syntrophic growth of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 with *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and *Methanobacterium congolense*: global transcriptomic and proteomic analyses. *ISME J.* **6**: 410–421.