

2S1-PM4 嫌気、好気微生物の混合培養による効率的有機物分解

○春田 伸, 加藤創一郎, 崔 宗均, 五十嵐泰夫
(東大・院・農)

効率的に固体有機物を分解している堆肥化過程でも、好気的環境だけでなく、部分的に嫌気的な環境が混在している。実際、堆肥化過程からも嫌気微生物が分離されており、嫌気的な代謝も有機物分解に関与していると予想される。我々は堆肥化過程を植種源として馴養し、リグノセルロースを効率的に分解する微生物集団を安定に継代培養することに成功している。その培養系は固体リグノセルロース基質（稲わら、綿、ろ紙など）のほかにペプトンや酵母エキスを含む液体培地を用いた静置条件である。密栓はせず、気相は大気と通じているが、植菌後、数時間で培養液中の酸化還元電位は -400mV 以下まで低下し、培養過程を通して還元状態が維持されている。稲わらを基質とした例では、4 日間の培養で添加した稲わらの50%以上を分解する。ただしこの微生物集団を強制通気による好気条件や気相ガス置換による無酸素条件で培養すると、分解率は著しく低下する。構成微生物種をPCR-DGGE法および培養法により解析したところ、数十代継代培養を繰り返しても以下に示す7種の細菌が変わらず検出された。それらは 16S rDNA 塩基配列の相同性からそれぞれ 1. *Clostridium straminisolvens* CSK1 (*C. thermocellum* 近縁の新種)、2. *Clostridium thermosuccinogenes*、3. *Pseudoxanthomonas taiwanensis*、4. *Bordetella* sp.、5. *Brevibacillus agri*、6. *Virgibacillus pantothenicus*、7. *Bacillus licheniformis*、と考えられた。特に分解中の稲わら付着面分からは CSK1 株および2の *Clostridium* 属細菌が特徴的に検出され、CSK1 株にのみセルロース分解活性が見られた。これら *Clostridium* 属細菌は大気相下、静置条件では増殖できないことから、微生物集団内では他細菌の酸素消費による嫌気的環境の提供によって初めて生育可能になっていると推測した。

そこで嫌気性セルロース分解細菌 CSK1 株に分離した細菌を混合し、2 種混合培養系でのセルロース分解を検証した。好気条件で生育可能な上記3から7の分離株のうち、3、4、5との共培養でろ紙分解が観察されたことから、これら細菌は CSK1 株の生育に十分な嫌気的環境を形成できると考えられた。しかし分解率を元の微生物集団と比較すると70~90%と低かった。そこでさらにこれら効果の見られた3種の細菌を組合せた3、4、5およびCSK1株から成る4種混合培養系を構築したところ、元の微生物集団と同等のろ紙分解率を示すようになった。混合培養では培養液中の水溶性糖および酢酸濃度が低く抑えられており、好気性細菌は培養液中の酸素消費だけでなく、セルロース分解に伴う生産物を消費することでセルロースの分解促進に寄与していることが示唆される。加えて、分離株 3 の純粋培養上清をセルロース分解細菌 CSK1 株の培養液に添加すると増殖促進が観察されたことから、他の要因もあると推測される。ただし同様の混合培養を CSK1 株の代わりにその近縁種である *C. thermocellum* IAM 13660^T を用いて行ったところ、セルロース分解は混合当初は見られるものの、数代の継代培養後には消失した。一方、元の微生物集団にメタン発酵汚泥を添加し上記同様の条件で継代培養を繰り返したところ、メタン生成アーキアの安定的な存在と稲わら分解に伴うメタン発生が確認された。以上のように、好気微生物の存在により嫌気微生物を微生物集団内に安定に維持することが可能であるが、高い機能を保持するためには酸素消費だけでなく、適当な組合せによる密接な関係が必要であると考えられる。

Combination of anaerobic and aerobic microorganisms for effective bio-degradation of organic substances

○ Shin HARUTA, Souichiro KATO, Zhong Jun CUI, Yasuo IGARASHI
(Grad. Sch. Agri. Life Sci, Univ. Tokyo)

Key words microbial community, microbial degradation, lignocellulosic materials

2S1-PM5 塩素呼吸をするPCE脱塩素細菌による嫌気バイオオーグメンテーションを目指して

○倉根隆一郎, 鈴木 伸和, 塚越 範彦, 上中 哲也,
坂井 斉之
(株式会社 クボタ)

現在、テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) などの塩素化エチレン類による土壌・地下水汚染は、全国各地で深刻な問題を引き起こしている。これらの中でも、比較的低濃度かつ広範囲に及ぶ汚染サイトでは、有機酸等の栄養剤を地中に注入することにより、現場に棲息する特定の嫌気性微生物を活性化し、PCEやTCEを最終的にエチレンにまで段階的に脱塩素化する嫌気バイオスティミュレーション技術が国内外で実用化されている。しかしながら、その一方では、[1] 浄化スピードが著しく遅い(数年間を要する)、[2] より毒性の高い中間体 (cis-DCEやVC) を蓄積する、[3] 特定の嫌気性微生物 (*Dehalococcoides* 属細菌) が棲息していないサイトには適用できない、などの多くの問題点を抱えているのが現状である。我々は、前述したバイオスティミュレーション技術の欠点を解消することを主な目的として、強力なPCE脱塩素細菌の単離から始まり、新規処理プロセスの確立に至るまで、新たな嫌気バイオオーグメンテーション技術の実用化に向けて研究開発を行っている。PCEを強力に脱塩素化する嫌気分解コンソーシアを取得し、これにフローサイトメトリー (FCM) を用いた直接分離法を適用することにより、コロニー形成を行うことなく難分離性の PCE 脱塩素細菌の迅速な単離に成功した。本細菌は、低濃度 (0.1mg/l) から高濃度 (150mg/l) のPCEをTCEにまで世界最速レベルで脱塩素化でき、それに加えて高度な酸素耐性を持つことを明らかにした。さらに、微量の酸素が存在するファジーな環境条件 (微好気) や幅広い温度領域 (10~42℃) で分解性を示すことから、バイオオーグメンテーションへの適用が極めて有望な嫌気性微生物として位置付けられた。なお、本細菌を 16SrDNA の塩基配列から *Desulfotobacterium* sp. KBC-1株と同定した。

次いで、上記 KBC-1 株を活用した処理プロセスとして、嫌気 (微好気) / 好気微生物浄化機能を効率的にハイブリッドした「制限通気式処理プロセス」を考案し、室内試験レベルで PCE 実汚染土壌を用いて分解試験を行ったところ、毒性の高い中間体 (cis-DCE, VC) を全く蓄積することなく、対照区の嫌気単独処理方法に比して 1 / 3 の期間で浄化が完了できることを明らかにした。これにより、本処理プロセスが現場でのリスクマネジメントの可能な短期間浄化手法として、十分に実用化に耐えうることを確認した。現在は、嫌気性微生物のバイオオーグメンテーション適用第一号を目指し、利用微生物の安全性評価試験の実施、ならびに現場環境を想定したスケールアップ試験に着手し、早期実用化に向けて加速化している。

本研究開発は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) から委託を受けて、「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発」プロジェクトの一環として実施したものである。

Bioaugmentation of tetrachloroethylene-contaminated environment by using anaerobic dechlorinating bacteria

○ Ryuichiro KURANE, Nobukazu SUZUKI, Norihiko TSUKAGOSHI,
Tetsuya UENAKA, Masayuki SAKAI
(KUBOTA Corporation)

Key words bioaugmentation, chlorinated ethene, tetrachloroethylene, *Desulfotobacterium* sp.