

DNA解析手法を用いたVOCs分解微生物の検出および特性評価

四本瑞世 緒方浩基
千野裕之Detection of *Dehalococcoides* Strains and Characteristic Evaluation by Gene AnalysisMizuyo Yotsumoto Hiroki Ogata
Hiroyuki Chino

Abstract

When treating chloroethene-contaminated sites, it is important to have a reliable indicator of the applicability of *in-situ* bioremediation and of successful dechlorination of chloroethenes. For this purpose, detection of *Dehalococcoides* bacteria, which dehalogenate chloroethene and other volatile organic carbons(VOCs), is very effective. We have developed quantitative real-time PCR assays that target 16S ribosomal DNA and three reductive dehalogenase genes with assigned functions(*tceA*, *vcrA*, and *bvcA*) to detect and enumerate the growth of *Dehalococcoides* bacteria. We carried out quantitative analyses of *Dehalococcoides* in 18 samples from chloroethene-contaminated sites using these assays. *Dehalococcoides* 16SrDNA was detected in 17 samples, and 1-3 types of reductive dehalogenase genes were detected in each such sample. Thus, it can be considered that chloroethene-contaminated sites contain at least one strain of *Dehalococcoides* bacteria. The increase in the concentrations of *Dehalococcoides* 16SrDNA and reductive dehalogenase genes corresponded to a decrease in the concentrations of *cis*-DCE and VC. The detection of *Dehalococcoides* bacteria in groundwater at concentrations as low as 10^2 copies/mL enables a reliable determination of the applicability of successful *in-situ* bioremediation for a particular site.

概要

VOCs 汚染地盤の原位置嫌気バイオレメディエーションでは、その適用性を判断する際や、浄化工事が順調に進捗しているかを判断するために、*Dehalococcoides* 属細菌を検出・定量することが非常に有効である。今回、*Dehalococcoides* 属細菌の検出・定量手法として、16SrDNA および、TCE 分解酵素遺伝子である *tceA*、VC 分解酵素遺伝子である *vcrA*、*bvcA* の 4 種類について、リアルタイム PCR 法による測定手法を確立した。本手法を用いて、VOCs 汚染現場を調査したところ、18 サンプル中 17 サンプルで *Dehalococcoides* 属細菌が検出された。その際、分解酵素遺伝子が 1~3 種類検出されたことより、VOCs 汚染現場には、1 種類以上、多いものでは 3 種類の *Dehalococcoides* 属細菌が存在することが明らかとなった。VOCs 分解時における *Dehalococcoides* 属細菌の挙動解析より、*cis*-DCE、VC の分解に伴い、16SrDNA、VOC 分解酵素遺伝子濃度が上昇することを確認した。本測定手法の結果とトリータピリティ試験の結果との関連性から、事前試験で、地下水中に *Dehalococcoides* 属細菌が検出されれば、その濃度が低い場合でも、原位置嫌気バイオレメディエーションの適用性は高いと判断された。

1. はじめに

近年、テトラクロロエチレン（以下、PCE）、トリクロロエチレン（以下、TCE）等の揮発性有機塩素化合物（以下、VOCs）による地下水・土壌汚染の浄化対策として、地盤中に栄養材（水素供与材）を注入して、現地の嫌気性分解微生物を活性化し、VOCsを分解する原位置嫌気バイオレメディエーションを適用する事例が多くなってきた。筆者らは、これまでに、食品添加物を主材とし、安全性が高く、安価な独自の栄養材「クロロクリン」、更に、浄化地盤への浸透性、効果持続性の高い栄養材「クロロクリンW」を開発し、原位置嫌気バイオレメディエーションによる浄化工事に適用してきた¹⁾²⁾。

嫌気性微生物によるVOCsの分解は、栄養材が分解され

る過程で発生する水素とVOCsの塩素が置き換わることで起こり、PCEやTCEは、シス1,2-ジクロロエチレン（以下、*cis*-DCE）、塩化ビニル（以下、VC）を経て、エチレンにまで分解される。PCEやTCEを*cis*-DCEに分解できる微生物には、*Desulfitobacterium*属細菌や*Sulfurospirillum*属細菌など数多く存在するが、*cis*-DCE以降を分解するには、*Dehalococcoides*属細菌の存在が不可欠である。

その為、この細菌の存在を確認することは、本浄化工法の適用性を判断するための重要な評価項目となる。

従来、本浄化工法の適用性判断は、事前に、汚染サイトのサンプルを用いた浄化適用性試験（トリータピリティ試験）を行い、完全にVOCsが分解するかを確認すると共に、分解できたことをもって間接的にVOCs分解微生物の存在を評価してきた。しかし、試験期間として1~3ヶ

Table 1 *Dehalococcoides*属細菌のVOCs分解性
Chloroethene Utilization by *Dehalococcoides* Isolates

<i>Dehalococcoides</i> 属細菌の種類	分解可能なVOCsの種類						各分解酵素遺伝子保有の有無		
	PCE	TCE	<i>cis</i> -DCE	<i>trans</i> -DCE	1,1-DCE	VC	TCE分解酵素 遺伝子	VC分解酵素遺伝子	
							<i>tceA</i>	<i>vcrA</i>	<i>bvcA</i>
195	○	○	○		○	△	○		
BAV1	△	△	○	○	○	○			○
FL2	△	○	○	○		△	○		
VS*		○	○		○	○		○	
CBDB1	○	○							
KB-1/VC*		○	○			○		○	○
GT		○	○		○	○		○	

*:単離菌ではなくコンソーシア,

○:増殖に利用できるVOCs, △:増殖に利用できないが分解可能なVOCs

月間を要するため、適用性を判断するまでに時間を要する課題があった。

*Dehalococcoides*属細菌は、有機酸等が嫌氣的に分解する過程で生成する水素を利用して、VOCsを脱塩素化し、エネルギーを獲得して増殖することができる。VOCs汚染地盤を短期間で浄化するには、地盤中の*Dehalococcoides*属細菌を増殖させる必要があり、この微生物をモニタリングし、活性を最適化させることが非常に重要となる。

そこで、我々は、第一段階として、迅速な適用性判断、および、浄化工事においてVOCs分解菌が増殖・活性化しているかを把握するために、*Dehalococcoides*属細菌の検出・定量手法を開発した。

ここでは、本手法の概要、本手法を用いた国内VOCs汚染現場における*Dehalococcoides*属細菌の調査結果を述べる。更に、VOCsの分解における*Dehalococcoides*属細菌の挙動について解析するとともに、本手法とトリータビリティ試験結果との関連性について報告する。

2. *Dehalococcoides*属細菌について

1997年に、Maymo-Gatell³⁾らにより、初めて、PCEをエチレンにまで完全に分解することができる*Dehalococcoides ethenogens* strain 195が単離されて以来、*Dehalococcoides*属細菌の研究は数多く報告されるようになった。

これまでに報告されている*Dehalococcoides*属細菌とそれら菌のVOCs分解特性について、Sungら⁴⁾がまとめておりTable 1に示した。表から明らかなように、195株以外に、BAV1やGTなど、数種の*Dehalococcoides*属細菌が単離されているが、それぞれ、分解できるVOCsの種類が異なることがわかる。

また、VOCs分解に関わる分解酵素遺伝子として、TCE分解酵素遺伝子である*tceA*、VC分解酵素遺伝子である*vcrA*、*bvcA*の3種類が同定されているが、Table 1より、*Dehalococcoides*属細菌の種類によって保有する分解酵素遺伝子が異なることがわかる。すなわち、地盤中には、様々なタイプの*Dehalococcoides*属細菌が存在しており、分解できるVOCsも異なると考えられる。

そのため、*Dehalococcoides*属細菌の挙動を把握するには、細菌の種の判定に一般的に使用されている遺伝子16SリボソームDNA(16SrDNA)だけでなく、分解酵素遺伝子も同時にモニタリングすることで、より正確な情報が得られると考えられた。

3. *Dehalococcoides*属細菌の検出・定量手法

3.1 DNAの抽出・菌の検出定量方法

*Dehalococcoides*属細菌の検出・定量は、16SrDNA及び、TCE分解酵素遺伝子である*tceA*、VC分解酵素遺伝子である*vcrA*、*bvcA*の4種類の遺伝子について行うこととし、リアルタイムPCR法を利用することとした。

DNA抽出は中村ら⁵⁾の方法に基づいて行った。リアルタイムPCRは、ロシュ・ダイアグノスティック社製のLightCyclerを使用し、検出方法はハイブリダイゼーションプローブ法を用いた。

16SrDNA、*tceA*の検出は、中村らの方法^{5),6)}を用いて行った。*vcrA*、*bvcA*の2種類については、それぞれ、塩基配列が報告されている*Dehalococcoides* sp.VS株及び*Dehalococcoides* sp. BAV1株のVC分解酵素遺伝子のデータ(GenBank accession No. AY322364, AY563562)を利用してプライマーとプローブを設計した。試験に使用したプライマーとプローブをTable 2に示す。PCR反応は、初期変性:95°C・10分、温度変化20°C/sec、変性:95°C・10秒、温度変化20°C/sec、アニーリング:60°C(16SrDNAのみ58°C)・15秒、温度変化20°C/sec、伸長:72°C・25秒、温度変化2°C/secを45サイクル繰り返した。反応液には、LightCycler FastStart DNA Master Plus HybProbe(ロシュ・ダイアグノスティック社製)を使用し、反応液全量20µLに対し、DNAサンプルを2µL、プライマーを0.5µM、プローブを0.2µMとなるように添加した。

3.2 定量方法の妥当性の確認

*Dehalococcoides*属細菌の16SrDNA、TCE分解酵素遺伝子である*tceA*、VC分解酵素遺伝子である*vcrA*、*bvcA*の4種類について、Table 2に示すプライマーとプローブ

Table 2 試験に使用したプライマーおよびプローブ
HybProbes and Primers used to Quantify *Dehalococcoides* spp. RDase Genes and 16SrDNA Genes

プライマー/ プローブ	塩基配列 (5'→3')	ターゲット遺伝子	文献
Dhc624F	CAGCAGGAGAAAACGGAATT	<i>Dehalococcoides</i> sp. 16SrDNA	5)
Dhc1232R	GACAGCTTTGGGGATTAGC	<i>Dehalococcoides</i> sp. 16SrDNA	5)
Dhc971Flu	GTAGTGAACCTGAAAGGGGAACGACC-Fluorescein	<i>Dehalococcoides</i> sp. 16SrDNA	5)
Dhc997Lc	Lc Red 640-GTTAAGTCAGGAACCTGCACAGGTG-Phosphate	<i>Dehalococcoides</i> sp. 16SrDNA	5)
tceA168F	GGGTGACCACGCTAATAAAG	<i>tceA</i> gene	6)
tceA582R	CATTCATGGTTCGCATAGAG	<i>tceA</i> gene	6)
tceA489Flu	GGAAAGATGCCCTAATATATGCCGCC-Fluorescein	<i>tceA</i> gene	6)
tceA515Lc	Lc Red 640-CGAATGGCTCACATAATGCTGGGA-Phosphate	<i>tceA</i> gene	6)
vcrA820F	TACTACAATGATGCAGAGTGGG	<i>vcrA</i> gene	本研究
vcrA984R	AAAGCGTGATAACCTAGATACTTAATAAAC	<i>vcrA</i> gene	本研究
vcrA880Flu	CTACCTCAACCACAAGAACTCAATAAGAGGACG-Fluorescein	<i>vcrA</i> gene	本研究
vcrA914Lc	Lc Red 640-GTGGTATAGCAGGTGCTGGATCATATACTGTATACAAAG-Phosphate	<i>vcrA</i> gene	本研究
bvcA663F	TATAGGTGTAATGCCAATCACCA	<i>bvcA</i> gene	本研究
bvcA824R	GGTCATTATAATACCCTTTATCGACTT	<i>bvcA</i> gene	本研究
bvcA760Flu	GGAACGGGAAATGTGTCAGTTGATGTCC-Fluorescein	<i>bvcA</i> gene	本研究
bvcA789Lc	Lc Red 640-GCTGCCAAAGACACCTGTCCAATAGTCTG-Phosphate	<i>bvcA</i> gene	本研究

を使用しリアルタイムPCRを行った。各遺伝子濃度 10^1 ~ 10^6 copies/PCRtube における、ある一定の蛍光レベルに達するまでのサイクル数を求め、スタンダード濃度とそのサイクル数との関係を Fig. 1 に示した。

これより、サイクル数と各遺伝子濃度の対数との間には直線関係があり、上記方法で、4種類の遺伝子を正確に定量できることを確認した。なお、検出下限値は、PCRチューブあたり10コピーである。

4. VOCs汚染現場の*Dehalococcoides*属細菌調査

4.1 概要

3章の*Dehalococcoides*属細菌の検出法を用いて、実際にVOCs汚染現場より採取した地下水中の*Dehalococcoides*属細菌の調査を行った。結果をTable 3に示す。A~Dは浄化前の地下水、E~Gは浄化中の地下水、H~Mは地下水にVOCsとクロロクリンを添加して継代培養を行った室内培養サンプルである。詳細は次節以降に述べる。

4.2 *Dehalococcoides*属細菌の16SrDNAについて

A~Dは、浄化前の地下水であるが、16SrDNAの濃度は未検出~ 10^5 copies/mLの範囲であった。 10^5 copies/mL以上のサイトではVCが検出される傾向にあった。次に、E~Gは浄化中の地下水であり、16SrDNAの濃度は 10^3 ~ 10^6 copies/mLの範囲であった。Gの 1.8×10^6 copies/mLの値は浄化終了直後の値であり、*Dehalococcoides*属細菌は地盤中でVOCsの分解により 10^6 copies/mL付近まで上昇することがわかった。H~Mは、継代培養サンプルであるため、A~Gに比べて値が高いが、好条件で培養しても、*Dehalococcoides*属細菌数は、最大 10^7 copies/mLオーダーであることがわかり、他の文献⁷⁾と同様の結果であった。

4.3 分解酵素遺伝子について

地下水中の汚染物質の種類に関わらず、TCE分解酵素遺伝子である*tceA*が確認されたのは、18サンプル中8サンプルと少なかった。それに対し、VC分解酵素遺伝子は、

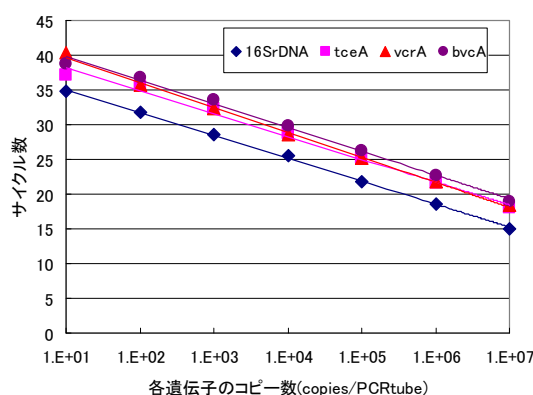


Fig. 1 リアルタイムPCRにおける各遺伝子の検出 Standard Curves for 16SrDNA genes and RDase genes

*Dehalococcoides*属細菌が検出された全ての井戸で、*vcrA* か*bvcA*のどちらか、もしくは両方が検出された。

4.4 16SrDNAと分解酵素遺伝子の関係から

Table 1のように、保有する分解酵素遺伝子の種類により*Dehalococcoides*属細菌の種類が異なることを考えると、*Dehalococcoides*属細菌が確認された国内VOCs汚染現場には、1種類以上、多いものでは3種類の*Dehalococcoides*属細菌が存在すること、*tceA*を保有する*Dehalococcoides*属細菌が存在するサイトは少なく、*vcrA*や*bvcA*といったVC分解酵素遺伝子を保有する*Dehalococcoides*属細菌が存在するサイトは多いことがわかった。

5. *Dehalococcoides*属細菌の特性評価

5.1 目的

VOCs汚染の浄化工事を短期間で行うには、地盤中の*Dehalococcoides*属細菌を増殖・活性化させることが重要である。そこで、*Dehalococcoides*属細菌の特徴を把握するため、*Dehalococcoides*属細菌を増殖させた培養液を用いて、VOCs分解試験を行い、VOCsの分解性と菌の挙動について解析した。

Table 3 国内VOCs汚染現場サンプルの*Dehalococcoides*属細菌調査結果
Concentrations of *Dehalococcoides* spp. 16SrDNA Gene and RDase Genes of VOCs Contaminated Sites

サイト	場所	種類	地下水中の汚染物質	VCの検出	<i>Dehalococcoides</i> 属細菌数	各分解酵素遺伝子保有の有無		
						TCE分解酵素遺伝子		VC分解酵素遺伝子
						16SrDNA (copies/mL)	<i>tceA</i> (copies/mL)	<i>vcrA</i> (copies/mL)
A	中部	地下水 (浄化前)	PCE, TCE, cis-DCE	○	2.3×10 ⁵	○ 5.7×10 ⁵	○ 5.0×10 ⁵	×
B	関東	地下水 (浄化前)	cis-DCE	○	1.9×10 ⁴	×	○ 1.1×10 ⁴	○ 5.0×10 ⁴
B'	関東	地下水 (浄化前)	cis-DCE	×	9.6×10 ²	×	○ 4.5×10 ³	○ 4.2×10 ³
C	九州	地下水 (浄化前)	cis-DCE	○	2.3×10 ⁵	×	○ 9.3×10 ²	○ 3.0×10 ³
C'	九州	地下水 (浄化前)	cis-DCE	×	1.4×10 ⁴	○ 5.1×10 ²	○ 4.4×10 ¹	×
D	関東	地下水 (浄化前)	PCE, TCE, cis-DCE, 1,1-DCE	×	1.5×10 ³	○ 1.3×10 ³	○ 1.3×10 ³	×
D'	関東	地下水 (浄化前)	PCE, TCE, cis-DCE, 1,1-DCE	×	×	×	×	×
E	関東	地下水 (浄化中)	cis-DCE	×	5.5×10 ³	×	○ 6.7×10 ²	×
F	関西	地下水 (浄化中)	PCE, TCE, cis-DCE, 1,1-DCE	○	4.0×10 ⁶	○ 3.5×10 ⁶	○ 1.3×10 ⁷	○ 4.7×10 ⁵
G	九州	地下水 (浄化中)	cis-DCE (基準値以下に減少)	×	○ 1.8×10 ⁶	○ 1.1×10 ⁴	○ 7.2×10 ⁶	○ 4.8×10 ⁶
G'	九州	地下水 (浄化中)	cis-DCE	○	4.9×10 ⁵	○ 7.7×10 ⁴	○ 2.1×10 ⁶	○ 1.6×10 ⁶
G''	九州	地下水 (浄化中)	cis-DCE	○	4.9×10 ⁴	×	○ 9.3×10 ⁴	○ 2.2×10 ⁵
H	関東	地下水培養サンプル	TCE, cis-DCE	—	3.4×10 ⁷	○ 9.8×10 ⁷	○ 1.4×10 ⁸	○ 8.9×10 ⁵
I	中部	地下水培養サンプル	PCE, TCE, cis-DCE	—	2.7×10 ⁷	×	×	○ 6.1×10 ⁷
J	中部	地下水培養サンプル	PCE, TCE, cis-DCE	—	3.9×10 ⁷	×	○ 3.2×10 ⁶	○ 3.4×10 ⁸
K	東北	地下水培養サンプル	TCE, cis-DCE, 1,1-DCE, 1,1,1-TCA	—	1.7×10 ⁷	×	○ 1.5×10 ⁷	○ 8.4×10 ⁸
L	関東	地下水培養サンプル	TCE, cis-DCE, 1,1-DCE	—	7.4×10 ⁷	○ 2.2×10 ⁵	○ 6.9×10 ⁵	○ 2.4×10 ⁵
M	関東	地下水培養サンプル	TCE, cis-DCE, 1,1-DCE	—	5.9×10 ⁵	×	×	○ 1.4×10 ⁶

○：検出下限値以上， ×：検出下限値以下

5.2 方法

5.2.1 実験に使用した VOCs 分解菌液 実験には、Table 3 に示すサンプルのうち、H の継代培養液を用いた。継代培養は、地下水サンプルに、VOCs とクロロクリンを添加して静置培養を行い、VOC が分解された後、TCE を含む新しい培地に植え継ぐことによって実施した。植え継ぎを繰り返し、培養液 1 mL あたり、*Dehalococcoides* 属細菌が 10⁷copies 程度確認できたものを VOCs 分解菌液とした。サンプル H の特徴は、分解酵素遺伝子 *tceA*, *vcrA*, *bvcA* の 3 種類を保有すること、植え継ぎの継ぎの回数が 13 回目になるが、VOCs が完全に分解するまでの期間が 20 日間と比較的早いことである。

5.2.2 VOCs 分解試験及び各遺伝子の定量 100 mL 容器に、地下水を 90 mL、クロロクリンを TOC として 300 mg/L 添加した。次に、VOCs 分解菌液を 10 mL、VOCs を約 10 mg/L となるように添加後、25°C で 70 日間静置培養を行った。経時的にヘッドスペースガスを採取し、ガスクロマトグラフにより VOCs 濃度を測定した。添加した VOCs は、PCE, TCE, cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE,

VC の 6 種類であり、1 試験区あたりそれぞれ 1 種類を添加した。また、*Dehalococcoides* 属細菌のモニタリングは、VOCs 分解試験の試験体から、経時的に液相をシリンジで採取したものについて、3.1 に示した方法により、16SrDNA, *tceA*, *vcrA*, *bvcA* の 4 種類の遺伝子をリアルタイム PCR 法により定量検出した。

5.3 結果

5.3.1 各 VOCs の分解性と各遺伝子濃度の変化 Table 4 に静置培養 70 日までにおける各 VOCs の分解性と、試験前後における *Dehalococcoides* 属細菌の 16SrDNA, *tceA*, *vcrA*, *bvcA* の増減を示した。

Table 4 に明示したように、添加した VOCs のうち、PCE, TCE, cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE については分解が認められ、この分解に際して、16SrDNA, *tceA*, *vcrA*, *bvcA* の遺伝子濃度は、試験開始時と同程度を維持するか、その 10~100 倍以上に上昇した。一方、VC の分解は認められず、各遺伝子濃度も減少した。

5.3.2 TCE の分解と各遺伝子の経時変化 TCE を添加した際の VOCs の挙動と *Dehalococcoides* 属細菌

16SrDNA, *tceA*, *vcrA*, *bvcA* の経時変化を, Fig. 2 に示した。これより, TCE を添加した場合, TCE が減少し, *cis*-DCE が上昇した7日目では, どの遺伝子濃度も変化が認められなかった。14日目には, *cis*-DCE が分解して VC が増加しており, 16SrDNA と *tceA*, *vcrA* も上昇した。*bvcA* は, VC が分解するに伴い, 大きく上昇した。

以上より, *tceA* は, *cis*-DCE の分解に対応して上昇したことから, TCE から *cis*DCE までの分解には, *Dehalococcoides* 属細菌以外の菌が関与していること, 3種類の *Dehalococcoides* 属細菌のうち, *bvcA* を保有する *Dehalococcoides* 属細菌は, VC 分解時に関与していることが示唆された。

5.3.3 VC の分解と各遺伝子の経時変化 VC を添加した際の VOCs の挙動と *Dehalococcoides* 属細菌の 16SrDNA, *tceA*, *vcrA*, *bvcA* の経時変化を, Fig. 3 に示した。これより, 試験開始から 70 日を経過しても VC の減少は認められなかった。各遺伝子濃度も経時的に減少傾向を示した。ところで, 先の Fig. 2 で述べたように, *cis*-DCE の分解生成物として生成した VC は短期間で分解され, 各遺伝子, 特に, VC 分解酵素遺伝子 (*vcrA*, *bvcA*) も上昇していた。

このように, VC そのものを添加した場合に, VC の分解が認められない原因については, VC そのものに, 微生物への阻害効果があり, *Dehalococcoides* 属細菌の共生菌が増殖できず, 結果として, *Dehalococcoides* 属細菌も増殖できなかつたと推察している。

6. 本手法のトリータビリティ試験との関連性

6.1 トリータビリティ試験の結果

原位置嫌気バイオレメディエーション工法の適用性を判断するために, 事前に, 汚染サイトの地下水と土(地下水しか採取できない場合は地下水のみ)を用いてトリータビリティ試験を実施する。Table 3に示すサイトB, C, Dでは, トリータビリティ試験を実施しており, その結果をTable 5に示した。

これより, トリータビリティ試験では, 地下水BおよびB'で約2ヶ月, 地下水CおよびC'では約2~3ヶ月, 地下水DおよびD'では約1ヶ月でVOCsが完全に分解された。これより, B,C,D全てのサイトで原位置嫌気バイオレメディエーション工法の適用性が高いと判断された。

6.2 遺伝子検出試験結果との関係について

サイトB, C, Dの遺伝子検出試験の結果は先の5章で述べた通りであるが, ここでは, Table 5に再度併記した。

サイトB 及びCでは, 地下水中の*Dehalococcoides*属細菌数(16SrDNA)は, $10^2 \sim 10^5$ copies/mL 検出された。トリータビリティ試験結果との関係から, *Dehalococcoides* 属細菌の検出試験で, 地下水中に*Dehalococcoides*属細菌が検出されれば, その濃度が地下水1mLあたり10の2乗オーダーと低い場合でも, 原位置嫌気バイオレメディエーション工法の適用性は高い, と判

Table 4 各VOCsの分解性と試験前後の各遺伝子濃度の増減
VOCs Degradation and Dynamics of 16SrDNA Genes and RDase Gene Concentrations

初発のVOCsの種類	初発のVOCからVCまでの分解性	16SrDNAの増減	各分解酵素遺伝子の増減		
			<i>tceA</i>	<i>vcrA</i>	<i>bvcA</i>
PCE	○	±	±	±	±
TCE	○	+	+	+	++
<i>cis</i> -DCE	○	±	±	±	+
<i>trans</i> -DCE	○	+	±	±	++
1,1-DCE	○	+	+	+	+
VC	×	--	--	--	-

++ : 100倍以上に増加, + : 10倍以上に増加, ± : 大きく変化せず, - : 1/10以下に減少, -- : 1/100以下に減少

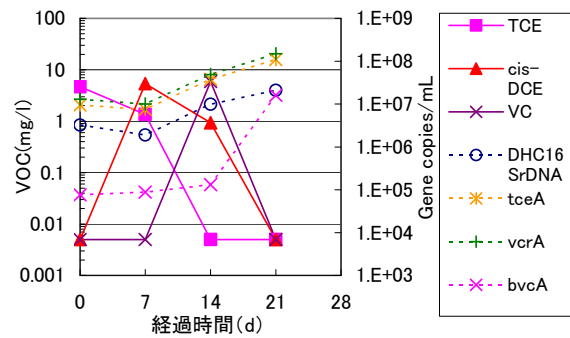


Fig. 2 TCE添加区におけるVOCs分解と各遺伝子濃度の変化
Time Course of TCE degradation and *Dehalococcoides* 16SrDNA Genes and RDase Gene Concentrations

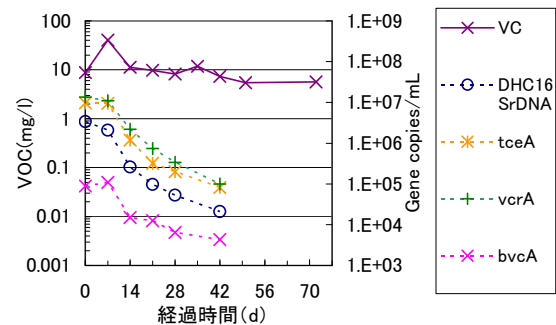


Fig. 3 VC添加区におけるVOCs分解と各遺伝子濃度の変化
Time Course of VC degradation and *Dehalococcoides* 16SrDNA Genes and RDase Gene Concentrations

断できることが示された。

*Dehalococcoides*属細菌の検出試験は, 3.1に示したように, DNAの抽出とリアルタイムPCRによる測定で結果が得られるため, 結果を得るまでの期間は2日間程度と非常に早い。*Dehalococcoides*属細菌の検出試験による適用性判断は, トリータビリティ試験の結果が得られるまでの事前評価手法として, 非常に有効性が高いと考えられた。

一方, サイトDでは, 浄化前の地下水中の*Dehalococcoides*属細菌は, 地下水Dで 10^3 copies/mL, 地下水D'では, 検出下限値(16 copies/mL)以下であった。しかし, トリータビリティ試験では, DおよびD'ともに, 約1ヶ月でVOCsが分解された。そこで, 地下水D'のトリータビリティ試験終了サンプルを用いて*Dehalococcoides*属細菌の検出試験を実施したところ,

Table 5 *Dehalococcoides*属細菌調査結果とトリータビリティ試験との関連性
Relation Between Concentrations of *Dehalococcoides* spp. and Treatability Test

サイト	地下水中のVOCs		トリータビリティ試験の結果						地下水中の <i>Dehalococcoides</i> 属細菌 検出試験結果			
	地下水中の 汚染物質	VCの検出	VOCが分解するまでの期間(日)					適用性の 有無	<i>Dehalococcoides</i> 属細菌数	各分解酵素遺伝子		
			PCE	TCE	<i>cis</i> -DCE	1,1-DCE	VC			TCE分解酵 素遺伝子	VC分解酵素遺伝子	
			16SrDNA (copies/mL)	<i>tceA</i> (copies/mL)	<i>vcrA</i> (copies/mL)	<i>bvcA</i> (copies/mL)						
B	<i>cis</i> -DCE	○	—	14日	64日	—	64日	有	1.9×10 ⁴	×	○ 1.1×10 ⁴	○ 5.0×10 ⁴
B'	<i>cis</i> -DCE	×	—	8日	64日	—	64日	有	9.6×10 ²	×	○ 4.5×10 ³	○ 4.2×10 ³
C	<i>cis</i> -DCE	○	—	—	68日	—	88日	有	2.3×10 ⁵	×	○ 9.3×10 ²	○ 3.0×10 ³
C'	<i>cis</i> -DCE	×	—	—	68日	—	68日	有	1.4×10 ⁴	○ 5.1×10 ²	○ 4.4×10 ¹	×
D	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE	×	17日	17日	31日	17日	31日	有	1.5×10 ³	○ 1.3×10 ³	○ 1.3×10 ³	×
D'	PCE, TCE, <i>cis</i> -DCE, 1,1-DCE	×	17日	17日	31日	31日	31日	有	×	×	×	×

○：検出下限値以上， ×：検出下限値以下

16SrDNAは10⁵~10⁶copies/mL，分解酵素遺伝子(*tceA*，*vcrA*)においても同レベルで検出された。すなわち，トリータビリティ試験に使用したD'の地下水と土には*Dehalococcoides*属細菌が存在したことを示しており，地下水中の検出下限値以下で測定できなかった菌が増殖したか，検出試験を実施しなかった土中に*Dehalococcoides*属細菌が存在したと考えられた。

このように，地下水中に*Dehalococcoides*属細菌が検出されない場合においても，トリータビリティ試験の結果によっては適用性があると判断されるケースもあり得る，ことが示された。今後，土中の*Dehalococcoides*属細菌の存在も考慮した原位置嫌気バイオ浄化の適用性判定法も検討していく必要がある。

7. まとめ

VOCs 汚染地盤の原位置嫌気バイオレメディエーションでは，その適用性を判断する際や，浄化工事が順調に進捗しているかを判断する為に，*Dehalococcoides* 属細菌を検出・定量することが非常に有効である。

今回，*Dehalococcoides* 属細菌の検出・定量手法として，16SrDNA および，TCE 分解酵素遺伝子である *tceA*，VC 分解酵素遺伝子である *vcrA*，*bvcA* の4種類について，リアルタイム PCR 法による測定手法を確立した。

本手法により，VOCs 汚染現場の*Dehalococcoides* 属細菌調査を13サイト，18サンプルにて行った。その結果，17サンプルで*Dehalococcoides* 属細菌が検出された。その際，分解酵素遺伝子は1~3種類検出されたことより，VOCs 汚染現場には，1種類以上，多いものでは3種類の*Dehalococcoides* 属細菌が存在することがわかった。

Dehalococcoides 属細菌を増殖させた培養液によるVOCs 分解試験では，添加したVOCsのうち，PCE，TCE，*cis*-DCE，*trans*-DCE，1,1-DCEの分解が認められ，この分解に際して，16SrDNA，*tceA*，*vcrA*，*bvcA*の遺伝子濃度は試験開始時と同程度を維持するか，その10~100倍以上に上昇した。特に，16SrDNA，*tceA*，*vcrA*，*bvcA*濃

度は，*cis*-DCE や 1,1-DCE が分解して VC が増加するに伴い上昇することから，*Dehalococcoides* 属細菌が，VOCs の中でも，*cis*-DCE 以降の分解を担っていることが示された。

本報告で提案した検出手法による結果とトリータビリティ試験との関連性より，地下水中に*Dehalococcoides* 属細菌が検出されれば，その濃度が地下水 1mL あたり10の2乗オーダーと低い場合でも，原位置嫌気バイオレメディエーション工法の適用性は高いと考えられた。本手法は，2日間で結果が得られるため，トリータビリティ試験で結果が得られるまでの事前評価手法として，非常に有効性が高いと考えられた。

参考文献

- 1) 四本瑞世，他：VOCs 汚染地盤の原位置バイオ浄化工事におけるクロロクリンの適用，大林組技術研究所報，No.71，(2007)
- 2) 緒方浩基，他：嫌気バイオ栄養材「クロロクリンW」の開発，大林組技術研究所報，No.72，(2008)
- 3) Maymo-Gatell X et al : Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene, *Science*, 276,1568~1571,(1997)
- 4) Sung, Y et al : Quantitative PCR Confirms Purity of Strain GT, a Novel Trichloroethene-to-Ethene-Respiring *Dehalococcoides* Isolate, *Appl. Environ. Microbiol.* 72,1980~1987,(2006)
- 5) 中村寛治，他：塩素化エチレン分解に関与する微生物の解析および検出，土壤環境センター技術ニュース，No.7，p1~5,(2003)
- 6) 中村寛治，他：TCE 還元デハロゲナーゼ遺伝子の取得・解析および定量PCRによる浄化現場での検出，環境工学研究論文集，第43巻，p119~125,(2006)
- 7) 水本正浩，他：複合微生物系を利用したバイオオーグメンテーション浄化技術の開発，土壤環境センター技術ニュース，No.15，p1~8,(2008)