

S 4 - 1 5 クロロエテン類を対象とした原位置バイオレメディエーションにおける *Dehalococcoides* 属細菌の挙動解析

○ 崎原盛¹・草場周作¹・養王田正文²・西村実¹
¹(株)アイ・エス・ソリューション・²東京農工大学

1. 概要

テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) などクロロエテン類の生物浄化方法として、徐放性水素供給材を用いたバイオスティミュレーションが確立されている。本工法は、嫌気性細菌の脱ハロゲン呼吸を利用したものであり、PCE の塩素が段階的に水素に置換されて TCE、ジクロロエチレン (DCE) 異性体、塩化ビニル (VC) を経て最終的にエチレンに変換される。本工法の成否は、分解微生物の有無に依存し、微生物によっては中間物質である cis-DCE を分解できず、そのために浄化サイトに cis-DCE の蓄積が見られる場合が多々ある。現在、cis-DCE を分解できるのは、*Dehalococcoides* 属細菌のみである。そこで、本工法を効率的かつ安全に進めるためには、*Dehalococcoides* 属細菌の存在や量、種類をモニタリングすることが重要である。

本稿では、クロロエチレン類複合汚染サイトにおいて、浄化前に *Dehalococcoides* 属細菌の存在を確認し、浄化過程で同細菌の経時変化を調査し、浄化前・過程での *Dehalococcoides* 属細菌のモニタリングの必要性について検討した。

2. クロロエテン類を対象とした原位置バイオレメディエーション

2.1 クロロエテン類分解微生物

クロロエテン類の分解に関与する微生物は、好気性微生物と嫌気性微生物に大別される。各微生物の分解特性を表 1 に示す。土壌・地下水などは一般的に嫌気的条件下にあることから、多くは嫌気性微生物を利用したバイオスティミュレーションが選択されることが多い。

嫌気性細菌によるクロロエテン類分解過程を図 1 に示す。この分解過程では、多くの嫌気性細菌が、TCE の分解までで反応が停止してしまい、その結果 cis-DCE が蓄積されてしまう。現在までに、cis-DCE をエチレンまで分解できる微生物は、*Dehalococcoides* 属細菌のみしかわかっていない。また、*Dehalococcoides* 属細菌の中でも、*Dehalococcoides* sp. strain 195 を代表とした PCE や TCE を主要なエネルギー源とするタイプ (本稿では *Dehalococcoides* 属 TCE 分解菌と定義。ただしこのタイプも分解速度は遅いものの cis-DCE は分解できる。) と、*Dehalococcoides* sp. strain BAV1 を代表とする cis-DCE や VC を主要なエネルギー源とするタイプ (本稿では *Dehalococcoides* 属 DCE 分解菌と定義) に大別される。

表 1 バイオレメディエーションに関与する微生物の特性

	好気性微生物	嫌気性微生物
反応機構	アンモニア酸化性菌、芳香族酸化性菌、メタン酸化性菌などが産生する酸化酵素の共代謝による酸化分解	嫌氣的脱ハロゲン呼吸を行う偏性嫌気性細菌の水素を電子供与体、クロロエテン類を電子受容体とする酸化的リン酸化反応
対象物質	PCE は不可、TCE 以下は完全に分解 (DCE、VC の分解速度が大きい)	全て (PCE、TCE、DCE、VC) 可能。DCE、VC で脱塩素化が止まり、蓄積する場合がある
適用濃度	増殖基質との競争阻害がおり、数 mg/l 程度が限界	高濃度でも対応可能
反応速度	速い	遅い
経済性	連続的に酸素や増殖基質を供給する所要動力が必要でやや劣る	脱塩素化量に見合った電子供与体を供給するだけなので経済的

Identification and quantification of *Dehalococcoides* spp. responsible for in situ bioremediation of chloroethenes.

Sakari Sakihara, Syusaku Kusaba, Masafumi Yohda, Minoru Nishimura

連絡先: 〒101-0041 東京都千代田区神田須田町 2-3-16 千代田パルコビル 6 階 株式会社アイ・エス・ソリューション 崎原盛 TEL 03-5297-7288 FAX 03-5297-0242 E-mail: sakihara@enbiotec.co.jp

2.2 原位置バイオスティミュレーションを適用する際の留意点

嫌気性バイオスティミュレーションの場合、汚染浄化サイトに生息する微生物の分解能を利用することから、適用サイトに目的の分解微生物が存在するか否かが重要となってくる。

上野ら(2002)の報告では、国内の14箇所のTCE汚染サイトから土壌・地下水を採取し、*Dehalococcoides*属細菌の検出を試みたところ、TCEを完全に分解できる7箇所のサンプルから

*Dehalococcoides*属細菌が検出されたが、*cis*-DCEで分解が停止した5箇所と全く

分解が進行しなかった2箇所のサンプルでは、*Dehalococcoides*属細菌が検出されなかった。また、Hendrichsonら(2002)による北米・欧州を対象とした同様の調査(24箇所で実施)でも、完全脱塩素化が観察された21箇所では*Dehalococcoides*属細菌が検出され、*cis*-DCEで分解が停止した3箇所では検出されなかった。よって、原位置バイオスティミュレーションを適用しエチレンまでの完全浄化をする場合、*Dehalococcoides*属細菌の存在が重要となる。また、*Dehalococcoides*属細菌が存在するといつても、必ずしも分解に関与するとは限らない。

そこで、本稿では実際の浄化サイトを用いて、浄化前・浄化中におけるクロロエテン濃度と*Dehalococcoides*属細菌のモニタリングを行い、モニタリングの必要性について検証した。

3. 試験方法および結果

3.1 浄化前における*Dehalococcoides*属細菌の存在・種類の確認

適用サイトは深度GL-3.0m~7.0mに*cis*-DCEの蓄積があるクロロエテン類複合汚染が確認されたサイトである。原位置バイオスティミュレーション適用サイトとし、図2の3地点とした。

はじめに、3地点(図2の地点1から地点3)の地下水の上流及び下流に観測井を設置し、地下水を採取し微生物DNAを抽出した。*Dehalococcoides*属細菌由来16SrRNA遺伝子をターゲットとしたPCRにより*Dehalococcoides*属細菌の存在を確認した。DNAポリメラーゼはEx Taq(タカラバイオ)を使用し、反応は加熱後(94℃、2min)変性(94℃、1min)、アニーリング(58℃、1min)、伸長(72℃、1.5min)を1サイクルとし、25サイクル行った。PCR反応溶液の組成は、タカラバイオの推奨する条件とした。

その後、Real Time PCR法により、*Dehalococcoides*属TCE分解菌及び*Dehalococcoides*属DCE分解菌について定量した。*Dehalococcoides*属TCE分解菌はtceA遺伝子、*Dehalococcoides*属DCE分解菌はbvcA遺伝子をターゲットとした。

TaqMan Master mix(Applied Biosystems)を使用し、反応は加熱(50℃、2min)変性後(95℃、10sec)、加熱(95℃、15sec)と伸長(60℃、1min)を1サイクルとし、40サイクル行った。Real Time PCR反応溶液の組成はApplied Biosystemsが推奨する条件とした。

PCRの結果、地点1および地点2では、*Dehalococcoides*属細菌の存在は確認できた。しかし、地点3では*Dehalococcoides*属細菌は検出されなかった。Real Time PCRの結果を、表2に示す。

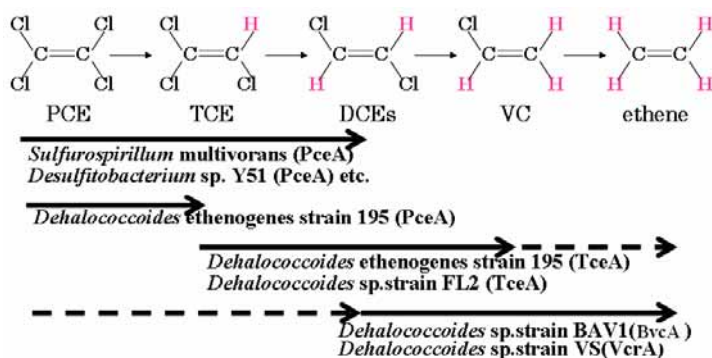
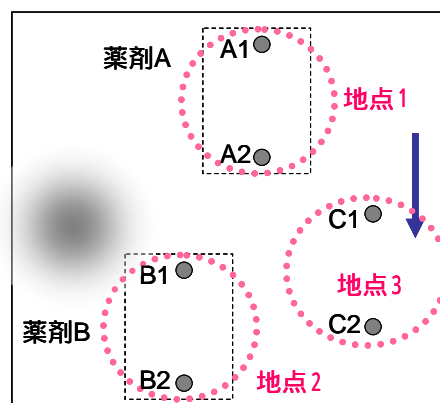


図1 嫌気性微生物による分解過程

→ : 分解可 - - -> : → のクロロエテン類がないと分解不可



● : 汚染源 □ : 注入エリア → : 地下水流れ

図2 適用浄化サイト

表2 . 各観測井における *Dehalococcoides* 属細菌数

	地点1		地点2		地点3	
	A1	A2	B1	B2	C1	C2
<i>Dehalococcoides</i> 属 TCE 分解菌数	2.41E+02	3.96E+04	2.15E+05	2.41E+02	-	-
<i>Dehalococcoides</i> 属 DCE 分解菌数	6.37E+04	6.37E+04	3.12E+02	1.15E+03	-	-

: Real Time PCR 法における検出限界以下 (2.41E + 01 copies/tube)

表2より、地点1および地点2では、存在量の違いはあるものの *Dehalococcoides* 属 TCE 分解菌および DCE 分解菌の存在が確認された。地点3においては、いずれも検出されなかった。地点3で検出されなかった理由としては、当地点の地下水が高アルカリ性 (pH 9 ~ 11) のため、生育が困難な土壌・地下水環境が形成されたためと考えられる。

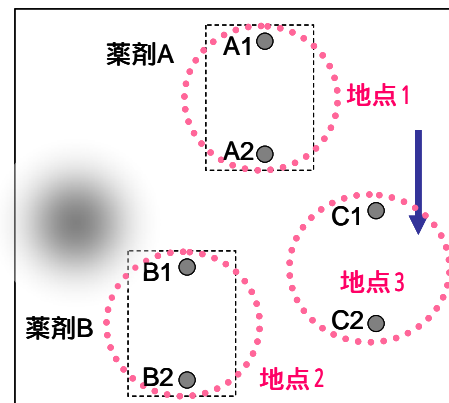
3.2 原位置バイオスティミュレーション適用サイトの選定

3.1にて *Dehalococcoides* 属細菌の存在が確認された地点1、地点2で、徐放性水素供給剤を用いた原位置バイオスティミュレーションを開始した。地点1では薬剤Aを、地点2では薬剤Bを用いた。*Dehalococcoides* 属細菌が確認されなかった地点3は、浄化の効果が期待できないことから、適用サイトから除外した。

注入範囲は各エリアともに 1.5m x 1.5m とし、注入深度は GL - 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0m の6深度とした。

3.3 浄化中における *Dehalococcoides* 属クロロエテン類分解細菌のモニタリング

薬剤を注入前、注入30日後、60日後におけるクロロエテン類の濃度と *Dehalococcoides* 属クロロエテン類分解菌数の推移を Real Time PCR 法にて測定した。反応条件および反応溶液の組成は、3-1に準じた。結果を図3に示す。



● : 汚染源 □ : 注入エリア → : 地下水流れ

図2 適用浄化サイト

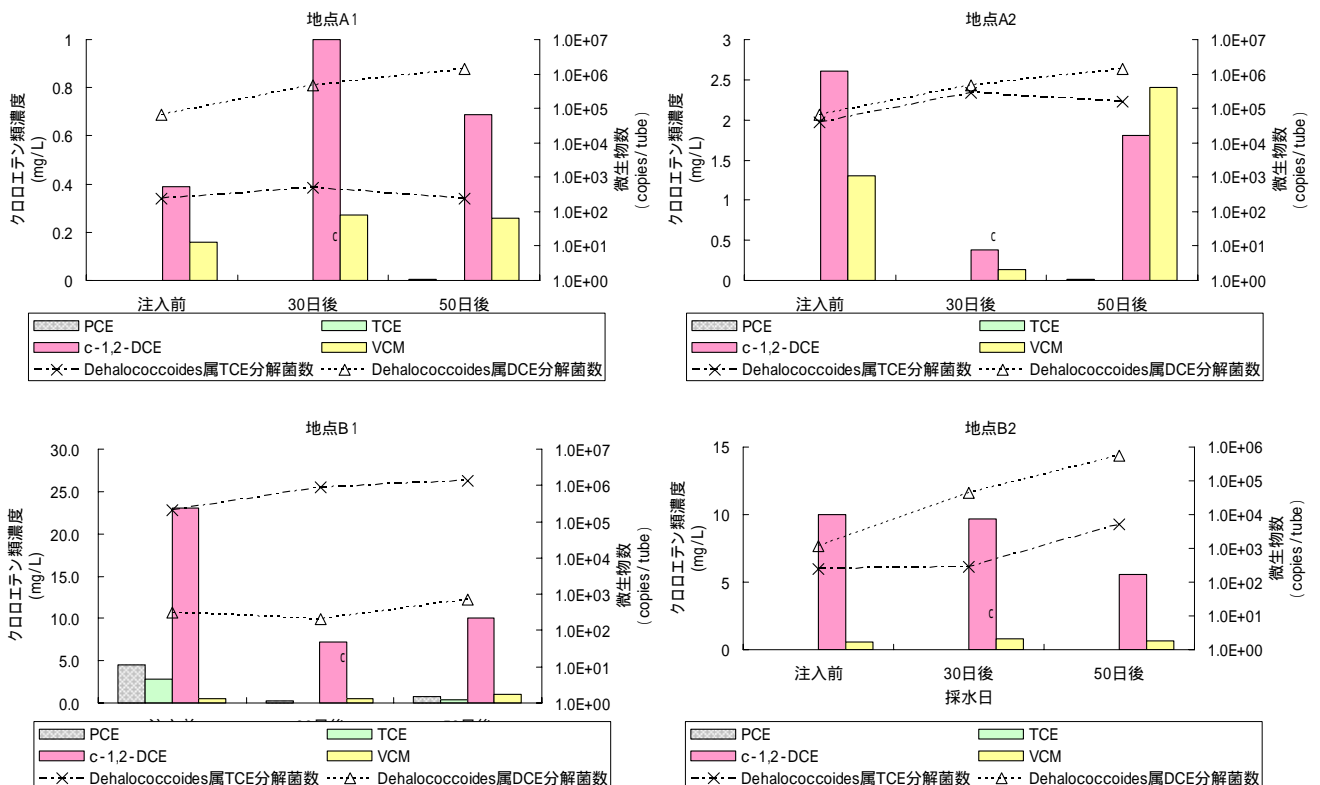


図3 . 各観測井におけるクロロエテン類濃度と *Dehalococcoides* 属細菌数の推移

図3の結果から、各薬剤注入後、全地点において、クロロエテン類の脱塩素化に伴って *Dehalococcoides* 属 TCE 分解菌および DCE 分解菌の増殖が確認された。これより、薬剤の効果的注入により、微生物の増殖を促進することができた。また、PCE および TCE の汚染が見られないエリア (A1、A2、B2) では、*cis*-DCE および VC の脱塩素化に伴って、*Dehalococcoides* 属 DCE 分解菌の増殖が顕著であるのに対し、PCE および TCE の複合汚染が見られる B1 地点では、*Dehalococcoides* 属 TCE 分解菌の増殖が顕著であった。よって、今回の適用サイトでは、汚染物質の濃度に応じて分解微生物の挙動が変化し、効果的にクロロエテン類を分解していることが分かった。

4. まとめ

3の結果より、*Dehalococcoides* 属細菌の有無を浄化前に確認することで、浄化サイトの浄化能力の把握することができた。浄化中のモニタリングを行うことで、メインで働く分解菌を把握することで、効率よく原位置バイオスティミュレーションを管理することが出来た。今後は、ナチュラル・アテニューエーションの際の浄化の計画・管理などに活用していきたいと考えている。

[参考文献]

- 1)上野俊洋、他：土壌汚染とその防止対策に関する研究集会、第8回講演集、361(2002)
- 2)E.R.Hendrickson, et al, Appl.Enviroon.Microbiol.,68(2),485(2002)