

## &lt;特集&gt;

## 地下水中の塩素化エチレン分解細菌の検出

Detection of Chlorinated Ethene-Dehalogenating Bacteria in Groundwater

○ 中村寛治<sup>1</sup>, 上野俊洋<sup>2</sup>, 石田浩昭<sup>2</sup><sup>1</sup> 東北学院大学 工学部\*<sup>2</sup> 栗田工業株式会社○ Kanji Nakamura<sup>1</sup>, Toshihiro Ueno<sup>2</sup>, Hiroaki Ishida<sup>2</sup><sup>1</sup> Tohoku Gakuin University, Faculty of Engineering<sup>2</sup> Kurita Water Industries Ltd.

## Abstract

Chlorinated ethenes such as tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) were widely used for dry-cleaning and degreasing, respectively. Resultantly they have become main contaminants in groundwater. Under the anaerobic conditions, these compounds are gradually dechlorinated by some bacteria producing their daughter products such as *cis*-dichloroethene (*c*-DCE), vinyl chloride (VC) and ethene (ETH). However, this process does not always proceed to the end product of ETH. We sometimes observe the accumulation of *c*-DCE or VC, which is a carcinogen. Our study showed that *Dehalococcoides* bacteria capable of promoting the dechlorination steps beyond *c*-DCE were essential for complete dechlorination. It is known that *Dehalococcoides* bacteria are difficult to cultivate and isolate. Therefore we decided to apply a molecular technique, real-time PCR, to the detection of the bacteria. The real-time PCR method developed was successfully used for the detection of the bacteria in groundwater. The new method was used for the judgment of the feasibility of the biostimulation using indigenous *Dehalococcoides* population. Also the method was successfully applied to the monitoring of the whole bioremediation process.

## 1 はじめに

塩素化エチレンのテトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) は長期にわたってドライクリーニングの溶剤や金属の洗浄剤として使用されてきた。しかしながら、それらの物質が貯蔵タンク等から漏出し、日本各地で土壌、地下水を汚染している。PCE, TCE は、発ガン性や肝機能障害を誘発する可能性が指摘されており、早急な処理が望まれている。

PCE は Fig.1 に示す様に、嫌気性条件下で微生物の作用により、TCE, シスジクロロエチレン (*c*-DCE), ビニルクロライド (VC) を経て、エチレン (ETH) に還元分解されることが知られている<sup>1),2)</sup>。本反応においては、水素は電子供与体、塩素化エチレンは電子受容体として働く。本反応のために、水素を直に使用する必要はなく、有機

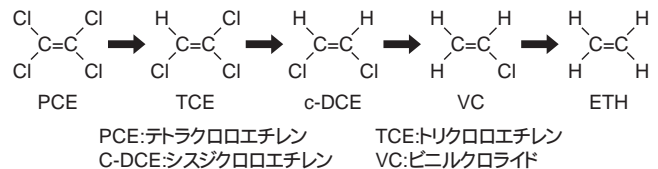


Fig.1 塩素化エチレンの嫌気分解経路

物が嫌氣的に分解される過程で発生する水素を利用できる。また、1997年には、Maymo-GatellらによってPCEからETHまでの完全な脱塩素化反応が一種類の細菌、*Dehalococcoides ethenogenes* 195, によって行われることが明らかとなった<sup>3)</sup>。最近の研究では、*Dehalococcoides* 属細菌が汚染サイト(北アメリカ, ヨーロッパ)に存在する場合は、有機物を注入すると塩素化エチレンの完全な脱塩素化が進むことが報告されており<sup>4)</sup>、塩素化エチレン分解の鍵となる微生物として注目を集めている。我々

\*〒985-8537 宮城県多賀城市中央1丁目13-1  
 TEL:022-368-7045 FAX:022-368-7070  
 E-mail:knaka@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

Tab.1 PCR プライマーおよびハイブリダイゼーションプローブ

名前	塩基配列 (5' to 3')	文献
De624f	CAGCAGGAGAAAACGGAATT	6)
De1232r	GACAGCTTTGGGGATTAGC	6)
De971fL	GTAGTGAAGTCAAAGGGGAACGACC	9)
De997fR	GTAAAGTCAGGAACCTTGCACAGGTG	9)

*Dehalococcoides* 用のプライマーはフォワードプライマー f の場合は 5' 末端の *E. coli* ポジションで、リバースプライマー r は 3' 末端の *E. coli* ポジションで示されている

のこれまでの研究でも、流動床型リアクターを利用した PCE の連続分解試験で、*Dehalococcoides* 属細菌の存在を確認している<sup>5)</sup>。また、複数の汚染サイトの土壌、地下水を用いて行ったバイアルビンによる TCE 分解試験では、エチレン化が観察された場合のみ *Dehalococcoides* 属細菌が検出された<sup>6)</sup>。この様に、国内由来のサンプルでも *Dehalococcoides* 属細菌の脱塩素化反応への関与を示すデータが得られている。

塩素化エチレン汚染土壌の生物学的浄化、バイオレメディエーション、特に土着細菌を活性化させて浄化するバイオスティミュレーションにおいては、このような分解微生物の存在、挙動を知ることは、浄化開始の判断とそれに続く浄化プロセスの管理には欠かせなくなる。*Dehalococcoides* 属細菌は寒天培地にコロニーを形成せず、従来の培養による方法では検出できない。そこで、本報告では、分子生物学的な手法である Polymerase Chain Reaction (PCR) を利用した検出を紹介する。

一般的な PCR 法は、標的とする DNA に特異的なプライマーペアを利用して、そのプライマーによって挟まれた DNA 部分を増幅し、標的 DNA の存在を検出、確認できる方法であり、我々も PCR 法によって *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA を検出している<sup>6)</sup>。しかしながら、PCR 法での検出では、増幅された DNA の最終的な濃度しか分からないため、標的 DNA の初期濃度を推定することは極めて難しい。

一方、Real-Time PCR 法は標的 DNA のサンプル中での濃度を測定するために開発された手法であり、PCR の過程で増幅される DNA の濃度を Real-Time で逐次検出する方法（最初は検出できないが PCR のサイクル数の増加と共に検出される）である。本方法では標的 DNA の初期濃度が高いほど少ないサイクル数で標的 DNA の合成が検出される。その結果、標的 DNA の初期濃度と、検出されるサイクル数には一定の関係が認められ、それを利用してサンプル中の標的 DNA の初期濃度を算出することが可能となる。本研究では、この Real-Time PCR 法を利用した。

## 2 国内の汚染サイトに生息する塩素化エチレン分解菌の解析

我々が塩素化エチレン分解に *Dehalococcoides* 属細菌が関与していることを見出したのは 2000 年であり、連続処理を行っていた流動床式リアクターのグラニュールでその存在が確認された<sup>5)</sup>。この研究では、グラニュールから抽出された DNA をテンプレートに、ユニバーサルプライマー (Bact0011f, Bact1492r)<sup>7)</sup> を利用して 16S rDNA クローンの取得を行い、ランダムに取得された 16S rDNA クローンの中に *Dehalococcoides* 属細菌に近縁なクローンが存在した（本クローンの塩基配列は 2003 年に報告されたビニルクロライド分解菌 *D. ethenogenes* BAV1<sup>8)</sup> の 16S rDNA 塩基配列と全く同じである）。当時は *D. ethenogenes* 195 として 1997 年に世界で初めて単離された *Dehalococcoides* 属細菌<sup>3)</sup> の 16S rDNA (Accession Number: AF004928) しか比較できる塩基配列はなかった。取得クローンと *D. ethenogenes* 195 の 16S rDNA の相同性は 97.6% であった。比較によってコンセンサスな部分を特定し、Tab.1 中の De624f と De1232r のプライマーペアをデザインした<sup>6),9)</sup>。

本プライマーを利用して、バイアル試験で TCE の分解を検討した 14 種類（14ヶ所の異なる現場の汚染土壌と地下水を植種）のサンプルから抽出された DNA をテンプレートに PCR を行った結果、Tab.2 に示す結果が得られた（バイアル試験の詳細は文献 6 を参照されたい）。

PCR 反応は Pre-heating 94°C-2 分につき、第 1 段階 94°C-20 秒、第 2 段階 54°C-30 秒、第 3 段階 72°C-1 分を 30 サイクル繰り返し、Post extension 72°C-7 分を行った。14 種類のサンプル中、7 種類のサンプルで完全な脱塩素化が起こり、そのバイアルにおいてのみ PCR の増幅産物が検出された。また、PCR 増幅部分の塩基配列は、前述のリアクターから取得された 16S rDNA クローンと全く同じ配列であった。さらに、DNA 増幅が確認されたサンプルに関しては、その上下流の領域も PCR 増幅し<sup>9)</sup>、塩基配列を決定した。その結果、Bact0011f から 148

Tab.2 TCE 分解バイアルでの *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA 検出結果

番号	サイト名	最終生産物	PCR 検出結果	No.148 DNA 塩基
1	A	ETH	検出	A
2	B	ETH	検出	G
3	C	ETH	検出	G
4	D	ETH	検出	G
5	E	ETH	検出	R
6	F	ETH	検出	A
8	G	ETH	検出	A
7	H	DCE	未検出	—
9	I	DCE	未検出	—
10	J	DCE	未検出	—
11	K	DCE	未検出	—
12	L	TCE	未検出	—
13	M	TCE	未検出	—
14	N	TCE	未検出	—

R=A : G

番目の塩基が A あるいは G である以外は全く同じ塩基配列を示した (*D. ethenogenes* BAV1 の 16S rDNA は 148 番目の塩基は A) . Tab.2 には各々のバイアルで A, G あるいは R (A, G 両方のピークが検出された場合) のどれが検出されたかを示してある . A と G の出現頻度はほぼ半々であった . これらの塩基配列の差と分解性と間に関係は見出せなかった .

以上の結果から , TCE のエチレン化には *Dehalococcoides* 属細菌が必要であると共に , 国内の汚染サイトには *D. ethenogenes* BAV1 の 16S rDNA と同じ , あるいは 1 ベースのみ異なる 16S rDNA を持った *Dehalococcoides* 属細菌が広く分布していることが明らかとなった .

### 3 Real-Time PCR による *Dehalococcoides* 16S rDNA の定量検出

Real-Time PCR を行うため , ロシュ・ダイアグノスティック製 LightCycler を使用した . 検出には , PCR 合成される特異的な DNA の内部の塩基配列を利用してデザインされた 2 つの連続する蛍光標識プローブが , DNA に並んで結合した場合のみ検出される方法 , ハイブリダイゼーションプローブ法を適用した . 反応液の全容量は 20 $\mu$ L とし , サンプル 1 $\mu$ L に対して , 0.5U の Ex Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造製) , 添付緩衝液 (MgCl<sub>2</sub> 含まず) 2 $\mu$ L および 10pmol のプライマーを使用した . その他 , dNTP200 $\mu$ M , DMSO5% (v/v) , MgCl<sub>2</sub>3mM , BSA250 $\mu$ g/mL , 蛍光標識プライマー 2 種類 (3' FITC 標識 , 5' LC Red 640 標識および 3' リン酸化) をそれぞれ 4pmol の濃度になるように添加した . Real-Time PCR に使用したプライマー (De624f, De1232r) およびハイブリダイゼーションプロ-

ブ (De971fL-3' FITC 標識 , De997fR-5' LC Red 640 標識および 3' リン酸化) は Tab.1 に示す通りである . また , 前述の流動床式リアクターのグラニュールから得られた *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA クローン<sup>5)</sup> を Real-Time PCR のスタンダードとして利用した .

ハイブリダイゼーションプローブ法では , プライマーセット (De624f, De1232r) および 2 種類のハイブリダイゼーションプローブ (De971fL, De997fR) が必要となる . これらに関しては , 相互に反応して , ダイマー等を作らないことを確認した . その後 , MgCl<sub>2</sub> 濃度およびアニリング温度を検討し , それぞれ , 3mM , 54 $^{\circ}$ C が最適であることを確認した (詳しい測定条件は文献 9 を参照されたい) . 本条件で , 16S rDNA スタンダードの濃度を 10<sup>1</sup>~10<sup>7</sup>copies/PCR-tube に変化させて測定した場合の , 濃度と PCR のサイクル数 (蛍光強度が一定のレベルに達した点 , Crossing Point でのサイクル数) との関係を図 2 に示す . 16S rDNA 濃度の上昇に伴って Crossing

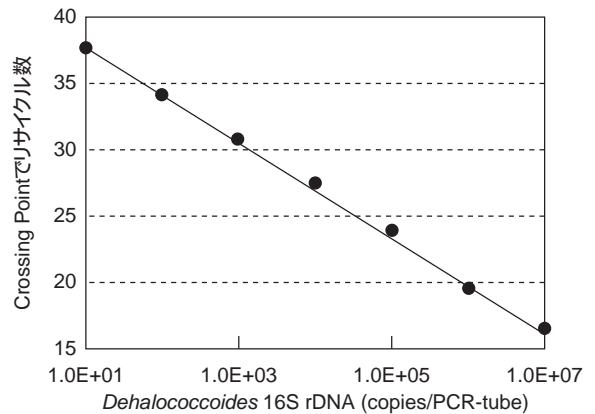


Fig.2 Real-Time PCR による検出結果

Point でのサイクル数は減少し、設定した条件で良好な検量関係が得られることが明らかとなった。また、この時、PCR チューブ当たり添加する 16S rDNA のコピー数を 10 以下の範囲でも検討したが、検出されない場合があったため、定量下限値は 10copies/PCR-tube とした。

#### 4 地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA の検出

検出に当たっては、100mL 地下水から DNA を抽出し、50%の回収率で、最終的に 50 $\mu$ L の TE (10mM Tris-HCl[pH 8.0], 1mM EDTA) に溶解した<sup>9)</sup>。それゆえ、測定時に使用する 1 $\mu$ L のサンプルには 1mL 地下水由来の DNA が含まれ、定量下限値は上記の結果から 10copies/mL-地下水となる。

Real-Time PCR 検出法を利用して、塩素化エチレン類で汚染された A サイト地下水中に *Dehalococcoides* 属細菌が生息するか否かを検討した。対象地下水は汚染サイト内の 8ヶ所のモニタリング井戸 MW1 から MW8 由来とした。検出結果を Fig.3 に示す。8ヶ所のモニタリ

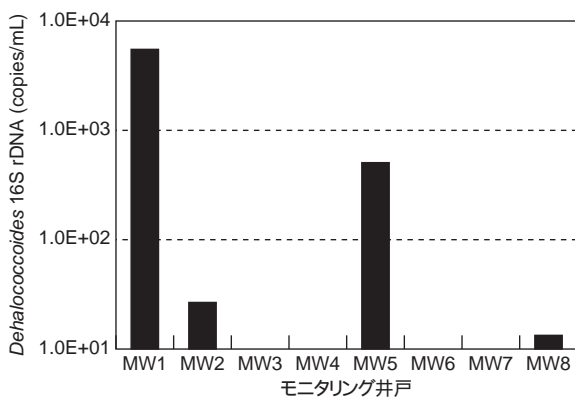


Fig.3 *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA 検出結果

(MW3, MW4, MW6, MW7 は定量下限値 10copies/mL 以下)

グ井戸の内、半数の 4ヶ所から *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA が検出され、最も濃度が高かったのは MW1, 5.6 × 10<sup>3</sup> (copies/mL) であった。また、本検出で増幅された 16S rDNA はその塩基配列を決定したが、前述のリアクターから取得された 16S rDNA クローンの該当部分の塩基配列と同一であった。残り半分の 4ヶ所のモニタリング井戸では検出されなかったが、本汚染サイト内には *Dehalococcoides* 属細菌が生息することが明らかとなった。

以上の結果から、A サイトでは土着の *Dehalococcoides*

属細菌を利用したバイオスティミュレーションが可能と判断、有機源として有機酸を窒素/リン源と共に地下水に注入した。注入は間欠的に汚染サイト全域で行われた(地下水の循環はない)。本サイトの主要な汚染物質は *c*-DCE (TCE から自然条件下で変換された) であり、浄化開始時、地下水中の濃度は約 1mg/L であった。Fig.3 に示したモニタリング井戸 MW2 では、地下水中の *c*-DCE 濃度は、浄化開始後約 100 日間は約 1mg/L で変化がなかったが、その後徐々に濃度が低下し、140 日目で約 600 $\mu$ g/L、200 日目で約 300 $\mu$ g/L、300 日目で 10 $\mu$ g/L (定量下限値) 以下となった。しかしながら、370 日目から 440 日目まで再び約 50 $\mu$ g/L となり、その後は 10 $\mu$ g/L 以下で安定した。*c*-DCE の中間代謝産物である VC は浄化開始時には約 10 $\mu$ g/L の濃度で地下水中に存在し、170 日目までは徐々に上昇、約 70 $\mu$ g/L に達した。その後は減少傾向に転じ、340 日目で 5 $\mu$ g/L (定量下限値) 以下となった。

480 日間の浄化期間中の MW2 での *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA の地下水での濃度変化を Fig.4 に示す。浄化開始時には 10<sup>1</sup>copies/mL レベルであった

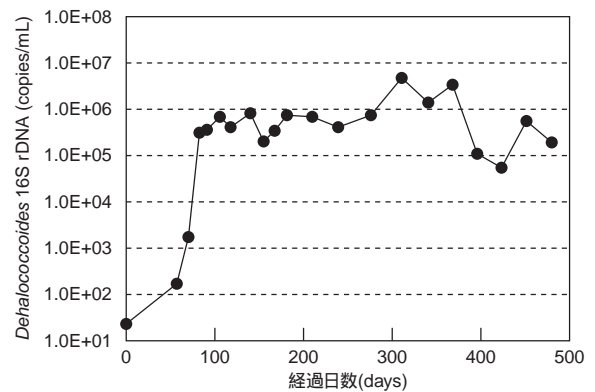


Fig.4 MW2 地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA 濃度変化

16S rDNA 濃度は、浄化開始後急激に上昇し、100 日目までに 10<sup>5</sup>copies/mL レベルまで達した。その後は 1 × 10<sup>6</sup>copies/mL 付近で安定し、400 日目以降は若干低下傾向を示した。この様に、浄化の進行、つまり *c*-DCE の分解に伴って *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA の濃度が上昇することが明らかとなった。Fig.3 に示した他の 7 本のモニタリング井戸も MW2 と同様に、浄化の進行とそれに伴う地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA の濃度上昇が観察された。本結果より、*Dehalococcoides* 属細菌が現場での塩素化エチレン分解で主要な役割を果たしていることが示された。また、*Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA が、塩素化エチレン汚染現場での浄化進

行において有効な指標として利用できることが明らかとなった。

## 5 まとめ

本研究では、塩素化エチレン分解能を有する *Dehalococcoides* 属細菌が TCE, *c*-DCE, VC の脱塩素化反応に深く関与していることを示すと共に、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rDNA を標的とした Real-Time PCR による定量検出法を紹介した。また、本検出法を汚染現場に適用して、初期段階での土着 *Dehalococcoides* 属細菌存在の確認、つまり土着細菌によるバイオスティミュレーション適用の可否判断が可能であることを示した。さらに浄化開始後、地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌 16S rDNA 濃度をモニタリングすることによって、*Dehalococcoides* 属細菌の現場での増殖 (= 分解) 挙動を把握できることを明らかにした。以上の結果から、*Dehalococcoides* 属細菌を利用するバイオスティミュレーション技術が、管理可能なプロセスとして汚染現場で適用できる目処が得られた。

このように、従来の培養を基にした微生物検出法で対象微生物が検出できなくとも、DNA を標的とした Real-Time PCR により、対象微生物の挙動が把握できることが示された。本手法はサンプル処理から検出まで約 1 日で完了し、培養を基本とした従来の検出法よりはるかに迅速である。また、対象微生物の DNA に関する情報 (16S rDNA が利用されることが多い) が得られていれば、どのような種類の微生物に対しても適用可能である。今後、環境微生物の分野で様々な分解微生物に関する研究が進み、遺伝情報がさらに整備、蓄積されれば、適用例はさらに増え、Real-Time PCR の利用範囲は益々広がると考えられる。

## [ 参考文献 ]

- 1) Freedman, D. L. and Gossett, J. M.: Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2144-2151 (1989).
- 2) de Bruin, W. P., Kotterman, J. J., Posthumus, M. A., Schraa, G., Zehnder, A. J. B.: Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1996-2000 (1992).
- 3) Maymo-Gatell, X., Chien, Y. T., Gossett, J. M. and Zinder, S. H.: Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene, *Science*, **276**, 1568-1571 (1997).
- 4) Hendrickson, E. R., Payne, J. A., Young, R. M., Starr, M. G., Michael, P. P., Fahnestock, S., Ellis, D. E. and Ebersole, R. C.: Molecular Analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 485-495 (2002).
- 5) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治: テトラクロロエチレンを分解する微生物群の集積培養および土壌カラムにおけるテトラクロロエチレンの分解, 環境工学研究論文集, **38**, 163-174 (2001).
- 6) 上野俊洋, 石田浩昭, 中村寛治: 塩素化エチレン分解に関与する *Dehalococcoides* 属細菌の解析, 地下水・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, 361-362 (2002).
- 7) Guschin, D. Y., Mobarry, B. K., Proudnikov, D., Stahl, D. A., Rittmann, B. E., and Mirzabekov, A. D.: Oligonucleotide microchips as biosensors for determinative and environmental studies in microbiology, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2397-2402 (1997).
- 8) He, J., Ritalahti, K. M., Yang, K-L., Koenigsberg, S. S. and Löffler, F. E.: Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium, *Nature*, **423**, 62-65 (2003).
- 9) 中村寛治, 上野俊洋, 石田浩昭: 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, 土壌環境センター技術ニュース, **No.7**, 1-5 (2003).