

## 論文の内容の要旨

### The Effect of Hydrogen as an Electron Donor on Chloroethene Dechlorination in a Soil Environment and Analysis of Its Microbial Community Structure

論文題目 (土壌中におけるクロロエチレン類の分解に及ぼす水素の影響  
及び微生物の群集構造の解析)

氏名 張 捷

近年、トリクロロエチレン(TCE)やテトラクロロエチレン(PCE)などの発ガン性を有する揮発性有機塩素化合物による地下水・土壌汚染が大きな問題となっている。これらの物質による汚染は、低濃度・広範囲の汚染のため、従来の物理化学の処理では対応が困難なため、バイオレメディエーションの活用が注目されている。

PCE は好気性微生物によって全く分解されず、生分解が困難とされてきたが、最近、土壌中などの嫌氣的条件下では、微生物によって還元的に脱塩素化され、TCE、ジクロロエチレン(DCE)、塩化ビニル(VC)、エチレン(ETH)と、塩素が一個ずつ水素に置換されて、分解していくことが明らかとなってきた。しかし、環境中における PCE の分解は、TCE、DCE 及び VC が生成され、完全分解されにくいいため大きな環境問題になっている。一方、水素は PCE 分解の過程で重要な役割を果たしているといわれているが、土壌中の PCE 分解及び分解微生物への水素の影響については不明の点が多い。これらのことから、土壌中におけるクロロエチレン類の分解に及ぼす水素の影響及びその分解についての微生物の群集構造の解析を行った。

本研究では、蓮田土壌中の PCE 分解に及ぼす電子供与体としての有機酸および水素の影響を検討した。さらに種レベルでの微生物の群集構造を、16SrDNA の V3 領域を含む約 200bp を用いて、PCR-DGGE 法により解析した。微生物の群集構造の解析は多次元法(MDS)を用いて行った。また重要な種については、クローニングを行い、塩基配列を解読して系統解析を行った。さらに、主要な微生物の存在量の定量を real-time PCR 法を用いて行った。これら各手法により得られた結果に基づき、各水素濃度条件下での PCE 分解と微生物の種組成についての関連を検討した。

本研究ではまず、土壌中における PCE の分解に及ぼす酢酸、乳酸、蟻酸、プロピオン酸の影響を検討した。対照として、土壌の自然分解力の検討も行った。電子供与体を添加しないときには、PCE が徐々に分解され、TCE が生成物として検出されたが、PCE は完全に分解されなかった。酢酸、乳酸及びプロピオン酸を添加した場合、PCE の分解が促進されたが *Cis*-DCE が生成物として検出された。プロピオン酸を添加した場合、PCE 分解が促進され 12 日目に、PCE が完全に分解された。酢酸、乳酸を添加した場合、

14 日目に、PCE が完全に分解された。蟻酸を添加した場合、PCE は完全に分解されなかった。

有機酸添加において、PCE の存在する場合と存在しない場合の比較を行った。PCE を添加した場合、酢酸の分解が阻害された。乳酸は 2 日間で速やかに代謝された。蟻酸及びプロピオン酸は 8 日目に完全に分解された。酢酸、乳酸、プロピオン酸の場合で、PCE を添加した時メタン生成量は PCE を添加しない時より生成量が少なかった。蟻酸の場合、逆になった。酢酸と乳酸の場合で、10 日目に水素が検出された。プロピオン酸の場合で、8 日目に水素が検出された。蟻酸の場合では、2 日目に、水素が検出されたが、8 日目に、水素が消失し、14 日目に、再度検出された。

同時に、PCE 分解とメタン及び水素の関係を検討した。メタンの濃度が 50000ppmv になると、水素が検出された。メタンの生成量が 50000ppmv 及び水素の生成量が 40ppmv の場合、PCE 分解が速やかに分解された。これらの結果から、水素とメタンの存在が PCE 分解に大きく影響を与えることが示唆された。

次に、有機酸の代謝物質としての水素が PCE 分解に影響を与えると考えられたことから、土壤中における PCE 分解に及ぼす水素の添加濃度について検討を加えた。すなわち 1ml 水素を一回のみ及び 2 日に 1 回添加する場合、さらに 10ml を 1 回及び 2 日に 1 回添加する場合及び水素を添加しない場合について PCE の分解を調べた。水素を添加しない場合、PCE 分解はほとんど促進されなかったが 48 日目に、PCE が完全に分解されたが VC が、反応系中に残存した。1ml 水素を頻繁に添加する時、PCE 分解が促進され、14 日目に、完全に分解された。しかし VC が反応系中に残存した。10ml 水素を一回に添加する場合、PCE 分解が促進され、14 日目に、完全に分解された。無毒な ETH が最終の生成物とし、得られた。10ml 水素を頻繁に添加した場合、PCE の分解が阻害され、TCE が生成物として検出された。

本実験においても、水素とメタンの関係について検討を加えた。1ml 水素を一回のみ添加した場合時および水素を添加しない場合、メタンの生成量はほぼ同程度であった。1ml 水素を頻繁に添加する場合、最初の二週間、メタン生成量が増加したが、16 日目から 48 日目までの間で、メタン生成量は変化しなかった。水素が他の微生物代謝で使われたと考えられた。48 日目から 55 日目までの間で、メタンの生成量がさらに増加した。この増加量は直接に水素を使用して生成のメタン量ではなく、他の有機物の代謝物とし、増加量と考えられ。この考えは有機酸の代謝実験で証明された。10ml 水素が一回に添加する時、最初の一週間で、メタンの生成量が水素の消費に伴って増加され、10 日目以後、水素が一定濃度を保持され、この時、メタンの生成量も一定量を保持した。この時の水素の消費に関しては、その 68% がメタンを生成に利用され、14.5% が酢酸生成に利用され、PCE の分解に 9.2% が利用された。10ml 水素を頻繁に添加した場合、最初、水素は速やかに消費され、同時にメタンが生成され、六日目以後、メタン生成量は水素濃度の増加に伴って、減少した。高濃度水素時、メタン生成が阻害されると考えられた。

水素の濃度が 100ppmv から 200ppmv まで保持されれば、PCE が完全に ETH まで分解されると考えられた。

土壌中におけるクロロエチレン類の分解に及ぼす水素の影響を明らかにするため、さらに、微生物の群集構造と PCE の分解について検討を加えた。特定な種を real-time PCR 方で測定した。以下のような結果を得た。

微生物群集構造はPCE分解経過及び水素濃度の変化に伴い変化した。各水素濃度条件下で、多量のgamma proteobacteria, beta proteobacteriaが存在した。10ml水素を一回のみ添加する場合、*Clostridium magnum*、*Dehalococcoides* sp. BVA1 及び*Dehalococcoides* sp. などの細菌が検出された。この条件下で、PCEが完全にETHまで分解された。1ml水素を頻繁に添加する時、*Clostridium* sp. T7 及び*Dehalobacter* sp. E1 が検出された。これらの細菌はPCEからDCEs及びVCまで分解に対しての役割がある細菌であると考えられる。10ml水素を頻繁に添加する時、*Desulfobacteraceae* が検出された。この細菌はPCEからTCEまで分解に対しての役割がある細菌であると考えられる。*Dehalococcoides*が土壌中に存在することが確認されたことから、real-time PCR方を用い、*Dehalococcoides*の定量を行った。*Dehalococcoides*が  $10^5$ cells/ml程度、供試土壌に存在した。10ml水素を一回に添加する時、最初の二週間で、*Dehalococcoides*が少し増殖し、14 日後、急激に増殖した。*Dehalococcoides*が  $10^7$ cells/ml以上になれば、クロロエチレン類が完全にETHまで分解されると考えられた。他の水素添加条件下で、*Dehalococcoides*が  $10^7$ cells/ml以下であった。

以上の結果から、水素の濃度が 100ppmv から 200ppmv まで保持されれば、*Dehalococcoides* が増殖でき、クロロエチレン類が無毒な ETH まで分解できるものと考えられた。これらの知見はクロロエチレンで汚染した環境の修復に大変有用な基礎データを提供するものと考えられる。