

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 張 捷 (ちょう しょう)

本論分は、現在、土壌・地下水汚染で大きな問題となっている揮発性有機塩素化合物であるテトラクロロエチレン(PCE)に着目し、土壌中においてPCEの分解を促進するための電子供与体として有機酸の添加効果ならびに水素の添加効果について検討し、水素の添加が有効であることから、水素の濃度の分解に及ぼす影響ならびに水素の濃度を変えたときの微生物群集構造の解析を行い、土壌の持つ揮発性有機塩素化合物に対する浄化能を解明することを目的としたものである。論文は、8章より構成されている。

第1章では、研究の背景と目的、及び論文の構成について述べている。

第2章では、PCEの嫌氣的分解に関するこれまでの知見を整理している。すなわち、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いるが、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されることが明らかになっていること、環境中では、多くの場合シス-DCEで分解が停止してしまうこと、分解には、メタン生成菌や硫酸還元菌、脱ハロゲン菌が関与していることを整理し、これらの微生物の環境中での挙動を制御している要因を解明することが、分解メカニズムを解明する上で重要であることを説明している。

第3章では、土壌中におけるPCEの分解能の測定方法、有機塩素化合物の分析方法、分解に及ぼす因子である、有機酸、水素、メタンの分析方法、さらに微生物解析の手法であるDNAの抽出法、クローニング法、PCR-DGGE群集解析法、シーケンス解析法について説明している。

第4章では、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は完全に分解されていない。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シス-DCEが生成物として検出され、プロピオン酸を添加した場合、12日目にPCEが完全に分解され、酢酸、乳酸を添加した場合、14日目に、PCEが完全に分解され、蟻酸を添加した場合PCEは完全に分解されなかった。

酢酸、乳酸、プロピオン酸添加の場合、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いこと、酢酸と乳酸添加の場合、10日目に水素が検出され、プロピオン酸の場合、8日目に水素が検出されたことを報告した。水素が生成されたという結果は、これまでに水素の濃度を正確に測定した報告がないことから、大変興味深いデータといえる。

同時に、PCE分解とメタン及び水素の関係を検討している。メタンの濃度が50000ppmvになると、水素が検出され、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を結論付けたが、この指摘も大変興味深い。

第5章では、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可能性が高いことから、土壌中におけるPCE分解に及ぼす水素の添加濃度の効果について検討を加えた。水素の添加濃度を変えた予備実験を行い、最終的に4種類の、水素添加条件下で実験を行った。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、それと水素を添加しない対照の系について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、1mlと低濃度の水素を頻りに添加した場合、PCE分解が促進されて14日目に完全に消失したが、VCが反応系に残存した。一方、高濃度水素系である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、無毒なETHが最終の生成物として得られた。10ml水素を頻りに添加した場合、PCEの分解が阻害され、TCEが生成物として検出されたことを報告した。水素の添加が、分解に大きく影響をしていることを明らかにした。

さらに、本実験条件下で、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り、1ml水素を頻りに添加した場合、最初の2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。10ml水素を一回のみ添加する時、最初の一週間で、水素の消費に伴ってメタンが生成され、10日目以後一定濃度の水素が保持された。この時の水素の消費に関しては、その68%がメタンに生成に、14.5%が酢酸の生成に利用され、PCEの分解に9.2%が利用された。また、水素の濃度が100ppmvから200ppmvまで保持されれば、PCEが完全にETHまで分解されると報告した。低濃度の水素が、土壌中におけるPCEの分解に重要であることを明らかにしたことは興味深い。

第6章では、クロロエチレン類の分解に及ぼす水素の影響の機構を明らかにするため、微生物の群集構造とPCEの分解について検討を加えた。微生物群集構造は、PCE分解経過に伴い変化し、水素添加条件下で、多量のプロテオバクテリア、プロテオバクテリアが存在した。10ml水素を一回のみ添加する場合、*Colstridium 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水素を頻りに添加する時、*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水素を頻りに添加する時、*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。これらの結果は、大変興味深いものである。

第7章では、*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法を用い、*Dehalococcoides*の定量を行った。*Dehalococcoides*が 10^2 cells/ml程度、蓮田土壌に存在した。10ml水素を一回に添加する時、最初の2週間で、*Dehalococcoides*が少し増殖し、14日後、急激に増殖した。*Dehalococcoides*が 10^6 cells/ml以上存在すれば、クロロエチレン類が完全にETHまで分解されると報告した。

以上述べてきたように、本研究は、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水素が分解に大きく関与し、水素濃度が低く保たれたときに、PCEが無害のエチレンまで分解されることを明らかにした。また、水素濃度と土壌中の微生物構造との関係を検討し、水素濃度が低いときに、*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結論づけた。これらの結果は、土壌中におけるクロロエチレン類の分解・除去するためのバイオレメディエーション技術の開発に大変貴重な知見を提供するとともに、都市環境工学の学術の発展に大きく寄与するものである。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。