



Title	グルコン酸を水素供与体としたクロロエチレン類の嫌気性バイオレメディエーションに関する研究
Author(s)	藤井, 雄太
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/85300
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

グルコン酸を水素供与体としたクロロエチレン類の
嫌気性バイオレメディエーションに関する研究

藤井 雄太

2021年5月

大阪大学大学院工学研究科
環境・エネルギー工学専攻

目次

緒論	1
第1章 グルコン酸を水素供与体として用いたクロロエチレン類分解微生物集積系の構築	4
1.1 はじめに	4
1.2 実験材料及び方法	4
1.2.1 集積系構築の植種源	
1.2.2 集積系の構築	
1.2.3 化学分析	
1.2.4 微生物群集解析	
1.2.4.1 DNA 抽出	
1.2.4.2 リアルタイム PCR	
1.2.4.3 T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析	
1.2.4.4 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析	
1.3 実験結果	8
1.3.1 集積系のクロロエチレン類脱塩素化特性	
1.3.2 集積系の微生物数の経時変化	
1.3.3 集積系の微生物叢	
1.4 考察	13
1.4.1 クロロエチレン類の脱塩素化に対するグルコン酸の水素供与体としての有用性	
1.4.2 集積系の微生物叢の特徴	
1.5 要約	16
第2章 クロロエチレン類の脱塩素化に用いる水素供与体としてのグルコン酸の汎用性	17
2.1 はじめに	17
2.2 実験方法	17
2.2.1 TCE 脱塩素化試験	
2.2.2 化学分析	
2.2.3 微生物群集解析	
2.2.3.1 DNA 抽出、リアルタイム PCR	
2.2.3.2 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析	
2.3 実験結果及び考察	19
2.3.1 地下水の微生物叢の特徴	
2.3.2 クロロエチレン類の脱塩素化挙動	
2.3.3 脱塩素化試験中の真正細菌・古細菌及び <i>Dehalococcoides</i> 属細菌の挙動	
2.3.4 クロロエチレン類の脱塩素化におけるグルコン酸の水素供与体としての汎用性	
2.4 要約	29

第3章 グルコン酸を用いた地下水汚染サイトにおけるクロロエチレン類浄化の実証試験.....	30
3.1 はじめに.....	30
3.2 浄化サイトの概況と浄化工事の内容.....	30
3.2.1 サイトの概況	
3.2.2 工事の詳細	
3.2.3 地下水モニタリング	
3.2.3.1 化学分析	
3.2.3.2 DNA抽出、リアルタイムPCR	
3.3 浄化実証試験の結果.....	32
3.3.1 クロロエチレン類の浄化	
3.3.2 地下水質の変化	
3.3.3 <i>Dehalococcoides</i> 属細菌数の変動	
3.4 考察.....	35
3.4.1 クロロエチレン類汚染地下水の原位置浄化におけるグルコン酸の水素供与体としての有効性	
3.4.2 グルコン酸が地下水質に与える影響	
3.4.3 他の水素供与体に対するグルコン酸の優位性	
3.5 要約.....	38
総括ならびに結論.....	39
参考文献.....	42
業績一覧.....	46
謝辞.....	47

緒論

テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) などのクロロエチレン類は、ドライクリーニングの溶剤や機械部品・半導体などの洗浄剤として工業的に幅広く使用されてきた (Yoon *et al.*, 2002; Miyake *et al.*, 2003; Rastkari *et al.*, 2011)。クロロエチレン類は土壤環境中では地下に浸透しやすく、また生物難分解性であることから (Dolinová *et al.*, 2017)、産業利用に伴って漏出したクロロエチレン類による土壤及び地下水の汚染が各地で確認されている (Burstion *et al.*, 1993; Carter *et al.*, 2008; Jo *et al.*, 2010)。クロロエチレン類は発がん性や生殖毒性を有することから (Khattak *et al.*, 1999; Wartenberg *et al.*, 2000; Boffetta *et al.*, 2003)、その土壤・地下水汚染は大きな社会的問題となっており、適切な浄化対策が求められている。特に近年では、PCE、TCE 等の代謝によって生成するジクロロエチレン (DCE) やクロロエチレン (VC) が土壤・地下水環境中で残存する事例が多く見られるようになり、VC が新たに土壤汚染対策法の特定有害物質に追加されたことから、環境中に漏出した元の物質だけでなく、その代謝物も含めたクロロエチレン類の包括的な浄化が求められるようになってきた。

クロロエチレン類汚染の浄化技術として、高濃度汚染に対しては掘削除去や地下水揚水処理などの物理化学的手法の適用が有効であるが、比較的低濃度の汚染に対しては費用対効果が低いという問題がある。一方、クロロエチレン類は生物難分解性であるものの、一部の微生物により分解・無機化されることから、比較的低濃度のクロロエチレン類汚染の浄化技術には、地盤中に存在する微生物を利用したバイオレメディエーションが経済性の高い手法として実用化されている (Bradley, 2003; Pant and Pant, 2010)。クロロエチレン類汚染のバイオレメディエーションには、嫌気性または好気性の微生物代謝を利用する選択肢が存在するが (Mattes *et al.*, 2010)、実際の浄化工事では、より経済性に優れた嫌気性のバイオレメディエーションが主に用いられている (Tiehm and Schmidt, 2011)。図 0-1 に示す通り、土壤や地下水中などの嫌気環境下において PCE や TCE は、有機物の分解によって生じる水素を電子供与体、クロロエチレン類を電子受容体とした逐次的な脱塩素化反応により、DCE、VC を経由して無害なエチレンやエタンへと変換される (Tiehm and Schmidt, 2011; Dolinová *et al.*, 2017)。*Dehalobacter* 属や *Dehalococcoides* 属、*Dehalospirillum* 属、*Desulfitobacterium* 属、*Desulfuromonas* 属、*Geobacter* 属、*Sulfurospirillum* 属など様々な細菌がクロロエチレン類を嫌氣的に脱塩素化することが知られているが、DCE 以降を脱塩素化できるのは主に *Dehalococcoides* 属細菌に限られ、*Dehalococcoides* 属細菌が存在しない汚染地盤では DCE 以降の脱塩素化が停止してしまう (Dolinová *et al.*, 2017; Saiyari *et al.*, 2018)。そのため、嫌氣的脱塩素化を利用した浄化においては *Dehalococcoides* 属細菌を含む脱塩素化微生物を効率的に増殖・活性化させ、その機能を十分に発揮させることが重要である。

脱塩素化微生物を増殖・活性化させるためには、強い嫌気環境の形成に寄与し、クロロエチレン類脱塩素化の水素供与体として働く有機物の投入が不可欠となる (Leeson *et al.*, 2004; Aziz *et al.*, 2013)。有機物の種類により分解性及び 1 分子あたりの水素発生量が異なり、嫌気環境の形成や脱塩素化反応への寄与が大きく異なることから (Thauer *et al.*, 1977; Leeson *et al.*, 2004)、投入する有機物の選択は浄化の成否や効率を決定する重要な因子とされている。既往研究では、酢酸や酪酸などの有機酸、メタノールやエタノールなどのアルコール類、糖蜜、植物油など、様々な有機物の水素供与体としての利用が検討されているが (Bradley, 2003; Leeson *et al.*, 2004; Schneidewind *et al.*, 2014)、現状では、乳酸やポリ乳酸エステル (商標名: HRC® (Regenesis 社)) がクロロエチレン類の脱塩素化に有望な水素供与体として最も広

く利用されている (Leeson *et al.*, 2004; Aziz *et al.*, 2013)。しかし、より安価で脱塩素化効果が高い水素供与体のさらなる探索は、クロロエチレン類の嫌気性バイオレメディエーションの普及のために重要な永遠の課題とも言える。

我々は、新たな水素供与体の候補としてグルコン酸に着目した。グルコン酸は化学式が $C_6H_{12}O_7$ で表されるカルボン酸の一種である。天然には蜂蜜やワイン、酢、米、植物、果物など様々な食品に含まれており、pH 調整剤などの食品添加物や金属の洗浄用として主に利用されている (Ramachandran *et al.*, 2006; Cañete-Rodríguez *et al.*, 2016)。グルコン酸はこれまでにクロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体としての利用例はないが、その分解過程で乳酸を生成するため (Sokatch and Gunsalus, 1957; Tsukahara *et al.*, 2002)、水素供与体として作用することができるうえ、乳酸よりも効果が長期間持続する可能性がある。また、乳酸やポリ乳酸に比べて解離し得る電子当量あたりの価格が安価であるため (Leeson *et al.*, 2004; Singh and Kumar, 2007)、バイオレメディエーションを低コスト化できる可能性もある有望な水素供与体の候補であると考えられる。

グルコン酸をクロロエチレン類脱塩素化の新たな水素供与体として実用化する上では、その有効性をラボスケールの実験やパイロットスケールの実証試験で事前に検証する必要がある。また、水素供与体として酢酸や乳酸、HRC を用いて TCE の脱塩素化を行った場合、地下水によっては脱塩素化が *cis*-1,2-DCE や VC で停止してしまうという報告もあることから (Carr and Hughes, 1998; Koenigsberg *et al.*, 2002; Mészáros *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2015)、グルコン酸についても性状の異なる様々な地下水に対しても完全脱塩素化を達成させることができるか確認しておくことも極めて重要である。

そこで本研究では、クロロエチレン類のバイオレメディエーションのための新たな水素供与体としてのグルコン酸の有効性を明らかにすることを目的とした一連の検討を実施した。本論文は緒論、3 章からなる本論、及び総括ならびに結論で構成されている。この緒論においては、研究の背景と目的を明示した。本論第 1 章では、グルコン酸を水素供与体として使用し、クロロエチレン類汚染現場で採取した地下水から脱塩素化微生物集積系の構築を試み、集積系による TCE の脱塩素化能力の評価と菌叢解析を行うことを通じて、水素供与体としてのグルコン酸の有効性を検証した。第 2 章では、クロロエチレン類で汚染された複数のサイトから採取した地下水を微生物源とした TCE の脱塩素化実験を行い、グルコン酸が多種多様な地下水に対してクロロエチレン類を完全に脱塩素化できるかを検討し、水素供与体としての汎用性を確認した。第 3 章では、TCE と *cis*-1,2-DCE、VC で汚染された地下水汚染サイトでグルコン酸注入による浄化実証を行うことで、グルコン酸が実際の汚染現場においても水素供与体として利用可能であることを検証した。総括ならびに結論では、本研究で得られた結果をもとに、水素供与体としてのグルコン酸の適用可能性を考察し、今後の展望を述べた。

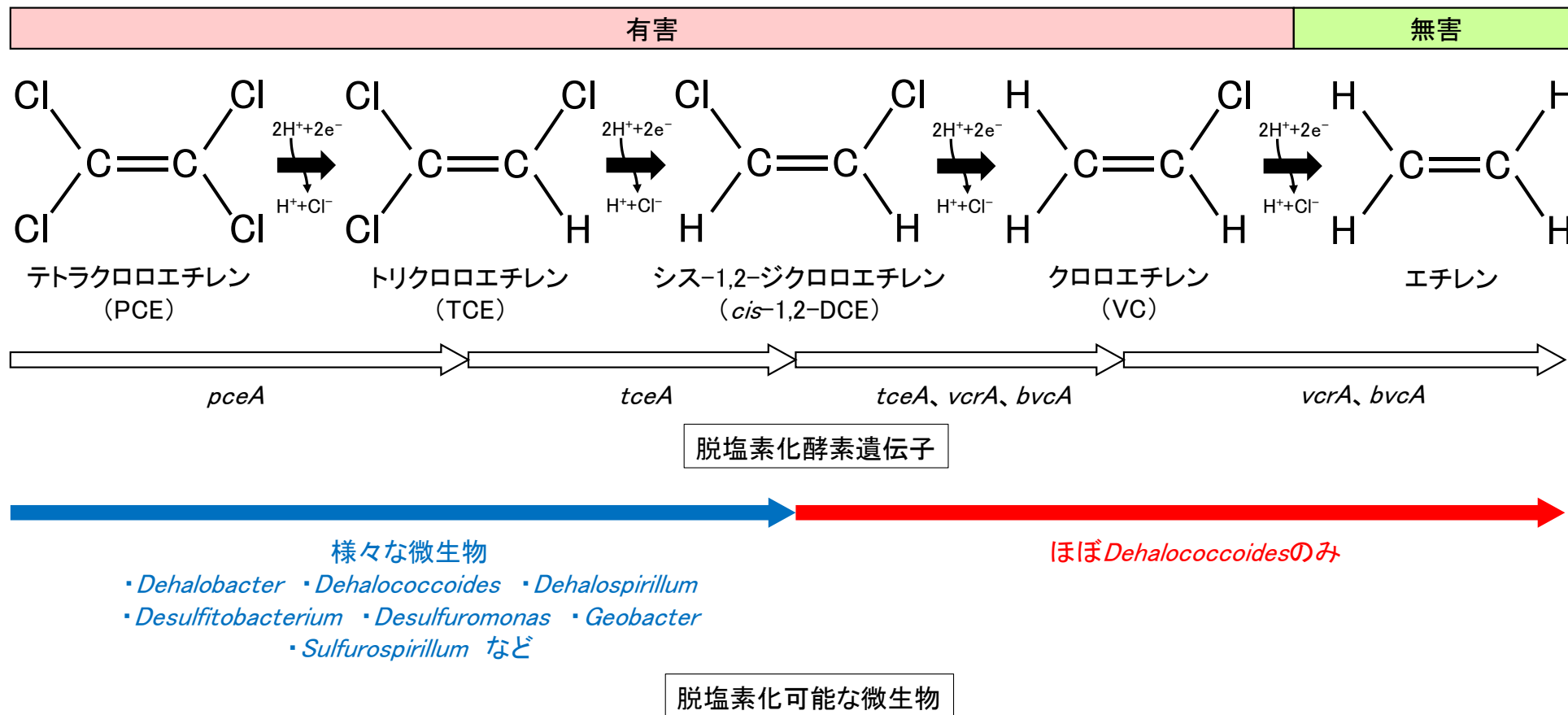


図 0-1 クロロエチレン類の脱塩素化経路と各段階に關与する脱塩素化酵素遺伝子及び微生物 (Tiehm and Schmidt, 2011; Dolinová *et al.*, 2017)

第1章 グルコン酸を水素供与体として用いたクロロエチレン類分解微生物集積系の構築

1.1 はじめに

クロロエチレン類の嫌気性バイオレメディエーションの電子供与体には様々な有機物がいわれてきたが、グルコン酸を利用する試みは本研究が初の事例である。そのため、グルコン酸がクロロエチレン類の脱塩素化のための水素供与体として適用可能かを検討するにあたり、まずグルコン酸が *Dehalococcoides* 属細菌を含むクロロエチレン類の脱塩素化に関与する微生物群の増殖・活性化、及びクロロエチレン類脱塩素化能力の誘導に有効かどうかを明らかにする必要がある。

そこで本章では、グルコン酸を唯一の水素供与体として使用して、クロロエチレン類汚染現場で採取した *Dehalococcoides* 属細菌を含む地下水から TCE を脱塩素化する微生物集積系の構築を試み、その集積系のクロロエチレン類脱塩素化能力の評価と菌叢解析を行った。

1.2 実験材料及び方法

1.2.1 集積系構築の植種源

集積系構築のための植種源には、神奈川県某所にある機械工場敷地内の TCE 土壌・地下水汚染現場(地下水の TCE 濃度 1.0 mg/L 程度) から 2008 年に採取した土壌と地下水を用いた。採取時に、地下水中に *Dehalococcoides* 属細菌が存在することは確認済みである。この土壌と地下水の混合物 20 L を 20 L 容のポリ容器に入れ、飽和 TCE 水溶液 100 mL、グルコン酸ナトリウム 55.8 g、尿素 3.6 g、リン酸二水素ナトリウム 0.6 g、炭酸水素ナトリウム 20 g と、表 1-1 に示す組成の微量元素濃縮液 200 mL を添加し、22～23°C に維持した部屋で静置培養した。

1～4 ヶ月おきに培養液の半量 (10 L) を別の 20 L 容ポリ容器に移し、水道水を 10 L 加え、飽和 TCE 水溶液 100 mL、グルコン酸ナトリウム 55.8 g、尿素 3.6 g、リン酸二水素ナトリウム 0.6 g、炭酸水素ナトリウム 20 g と微量元素濃縮液を 100 mL 添加した。この植え継ぎ操作を約 10 年間繰り返したものを本研究における集積系構築の植種源 (種菌液) として用いた。

表 1-1 微量元素濃縮液の組成 (上木と遠藤, 1993 を一部改変)

物質名	濃度 (g/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	20
FeCl ₂ ·4H ₂ O	40
H ₃ BO ₃	0.01
ZnCl ₂	0.287
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.048
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.048
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.125
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.223
NaI	0.83

1.2.2 集積系の構築

1.2.1 で示した種菌液 5 L と水道水 4.85 L を 10 L 容のポリ容器に入れ、TCE 濃度が 9 mg/L (0.68 $\mu\text{mol/L}$) となるように飽和 TCE 水溶液 100 mL を加えた。さらに、グルコン酸ナトリウム 18.6 g、尿素 1.2 g、リン酸二水素ナトリウム 0.2 g、炭酸水素ナトリウム 10 g と微量元素濃縮液 50 mL を添加し、22~23°C に維持した部屋内で静置培養した。

週 1 回の頻度で培養液中のクロロエチレン類濃度 (TCE、*cis*-1,2-DCE、VC) を測定し、TCE 濃度と *cis*-1,2-DCE 濃度が定量下限値である 0.01 mg/L (TCE : 0.076 $\mu\text{mol/L}$ 、*cis*-1,2-DCE : 0.103 $\mu\text{mol/L}$)、VC が 0.05 mg/L (0.8 $\mu\text{mol/L}$) を下回ったことが確認された場合に、培養液 5 L を別の 10 L 容ポリ容器に移し、水道水 4.85 L と飽和 TCE 水溶液 100 mL、炭酸水素ナトリウム 10 g、微量元素濃縮液 50 mL を加えた。さらに、添加後の全有機体炭素 (TOC) 濃度が 600 mg/L となるように、グルコン酸ナトリウム : 尿素 : リン酸二水素ナトリウム = 9.3 : 0.6 : 0.1 の割合で加え、22~23°C の部屋内で静置培養を繰り返す集積培養を行った。

1.2.3 化学分析

集積培養において、培養液中のクロロエチレン類濃度 (TCE、*cis*-1,2-DCE、VC) は、光イオン化検出器とカラム (NBW-310SS30、長さ 30 m、内径 0.53 mm、膜厚 3 μm 、日本電子) を搭載したガスクロマトグラフ (GC-8610、日本電子) を用い、カラム温度 70°C (一定) の条件で測定した。pH はポータブル pH メーター (B-212、堀場製作所) で測定した。また、培養液を孔径 0.45 μm のセルロースアセテート製フィルター (Advantec) でろ過し、全有機体炭素計 (TOC-V CPN、島津製作所) を用いて溶存性有機体炭素 (DOC) 濃度を測定した。

1.2.4 微生物群集解析

1.2.4.1 DNA 抽出

培養液中の微生物 DNA は、以下に示す方法 (Zhou *et al.*, 1996) を用いて培養液より抽出した。培養液を孔径 0.2 μm のポリカーボネート製メンブレンフィルター (Merck) でろ過し、そのフィルターをマイクロチューブに入れ、直径 0.1 mm のジルコニア/シリカビーズ (BioSpec Products) と DNA 抽出緩衝液を加えて Bead Beater (MS-100、トミー精工) を用いて 3,000 rpm で 30 秒間粉碎した。凍結融解を 3 回繰り返した後、ドデシル硫酸ナトリウムを 2% (w/v) となるように加えて 65°C で 60 分間保温し、再び Bead Beater を用いて 3,000 rpm で 2 分間粉碎した。その後遠心分離 (20,400 $\times g$ 、10 分、25°C) して得た上清を再度遠心分離 (20,400 $\times g$ 、5 分、25°C) して、その上清をクロロホルム抽出に供した。イソプロパノールを添加後に静置、遠心分離 (20,400 $\times g$ 、30 分、25°C) し、DNA を沈殿させた。沈殿は 70% エタノールで洗浄後に乾燥させて TE Buffer に溶解させた後、PCR Clean-Up Mini Kit (チヨダサイエンス) を用いて精製し、以下の各解析に使用した。

1.2.4.2 リアルタイム PCR

LightCycler 1.5 (Roche) を用いたリアルタイム PCR 法により、*Dehalococcoides* 属細菌に特異な 16S rRNA 遺伝子、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子と真正細菌、古細菌の 16S rRNA 遺伝子を定量した。*tceA* は TCE と *cis*-1,2-DCE の脱塩素化酵素を、*vcrA* と *bvcA* は *cis*-1,2-DCE と VC の脱塩素化酵素をコードする遺伝子である (図 0-1、表 1-2)。

プライマーとプローブは表 1-3 に示すものを用いた。*vcrA*、*bvcA* 遺伝子増幅のためのプライマー及びプローブは、それぞれ *Dehalococcoides* sp. VS 株及び *Dehalococcoides* sp. BAV1 株の VC 分解酵素遺伝子配列 (GenBank accession No. AY322364、AY563562) をもとに、DNASIS Pro (日立ソリューションズ) を用いて設計した。

PCR 反応液 (20 μ L) の調製には、LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} HybProbe (Roche) を使用し、DNA サンプルは 2 μ L、プライマー及びプローブはそれぞれ 0.5 及び 0.2 μ M となるように添加した。PCR は、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子については、初期変性：95°C・10 分の後、変性：95°C・10 秒、アニーリング：60°C (16S rRNA 遺伝子のみ 58°C) ・15 秒、伸長：72°C・25 秒を 45 サイクル繰り返して実行した。真正細菌、古細菌の 16S rRNA 遺伝子の PCR は、初期変性 95°C・10 分の後、変性：95°C・10 秒、アニーリングと伸長：52°C (古細菌は 60°C) ・30 秒を 50 サイクル繰り返して実行した。

表 1-2 クロロエチレン類の脱塩素化に関与する遺伝子の詳細 (Saiyari *et al.*, 2018)

遺伝子	遺伝子がコードする酵素により 脱塩素化される物質	遺伝子を保有する代表的な微生物
<i>tceA</i>	TCE、 <i>cis</i> -1,2-DCE	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 195
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> FL2
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> KB1/VC
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BTF08
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> ANAS1
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 11a5
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> UCH007
<i>vcrA</i>	<i>cis</i> -1,2-DCE、VC	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> VS
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> GT
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BTF08
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> ANAS2
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> 11a
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> IBARAKI
<i>bvcA</i>	<i>cis</i> -1,2-DCE、VC	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> UCH007
		<i>Dehalococcoides mccartyi</i> BAV1

表 1-3 リアルタイム PCR で使用したプライマーとプローブ

ターゲット 遺伝子	プライマー プローブ名	塩基配列 (5'→3')	文献
<i>Dehalococcoides</i> 16S rRNA	Dhc624F	CAGCAGGAGAAAACGGAATT	上野ら, 2010
	Dhc1232R	GACAGCTTTGGGGATTAGC	
	Dhc971Flu	GTAGTGAAGTCAAAGGGGAACGACC-Fluorescein	
	Dhc997Lc	Lc Red 640-GTTAAGTCAGGAACCTTGCACAGGTG-Phosphate	
<i>tceA</i>	tceA168F	GGGTGACCACGCTAATAAAG	中村ら, 2006
	tceA582R	CATTCATGGTTCGCATAGAG	
	tceA489Flu	GGAAGATGCCCTAATATATGCCGCC-Fluorescein	
	tceA515Lc	Lc Red 640-CGAATGGCTCACATAATTGCTGGGA-Phosphate	
<i>vcrA</i>	vcrA820F	TACTACAATGATGCAGAGTGGG	本研究
	vcrA984R	AAAGCGTGATAACCTAGATACTTAATAAAC	
	vcrA880Flu	CTACCTCAACCACAAGAAGTCAATAAGAGGACG-Fluorescein	
	vcrA914Lc	Lc Red 640-GTGGTATAGCAGGTGCTGGATCATATACTGTATACAAAG-Phosphate	
<i>bvcA</i>	bvcA663F	TATAGGTGTAATGCCAATCACCA	本研究
	bvcA824R	GGTCATTATAATACCCTTTATCGACTT	
	bvcA760Flu	GGAACGGGAAATGTGCAGTTTGTATGTCC-Fluorescein	
	bvcA789Lc	Lc Red 640-GCTGCCAAAGACACCTGTTCCAATAGTCTG-Phosphate	
真正細菌 16S rRNA	Bac1055YF	ATGGYTGTCGTCAGCT	Ritalahti <i>et al.</i> , 2006 を改変
	Bac1392R	ACGGGCGGTGTGTAC	
	Bac1115Probe	FAM-CAACGAGCGCAACCC-TAMRA	
古細菌 16S rRNA	ARC787F	ATTAGATACCCSBGTAGTCC	Yu <i>et al.</i> , 2005 を改変
	ARC1059R	GCCATGCACCWCCTCT	
	ARC915F	FAM-AGGAATTGGCGGGGAGCAC-TAMRA	

1.2.4.3 T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析

真正細菌及び古細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした T-RFLP 解析を行った。PCR プライマーは、真正細菌 16S rRNA 遺伝子には 27f と 1392r、古細菌 16S rRNA 遺伝子には Ar109f と Ar902r を用いた (Sang *et al.*, 2009)。プライマーのうち 27f と Ar902r は 5'末端を 6-carboxyfluorescein (FAM) で蛍光標識した。反応液 (50 μ L) は TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を用いて調製し、DNA サンプルを 5 μ L、各プライマーを真正細菌の PCR では 1 μ M、古細菌では 0.5 μ M となるように添加した。PCR 条件は、真正細菌では、初期変性：95°C・10 分の後、熱変性：95°C・1 分、アニーリング：57°C・1 分、伸長：72°C・3 分を 18 サイクル繰り返し、最後に伸長を 72°C・10 分を行った。古細菌では、初期変性：94°C・5 分の後、熱変性：94°C・1 分、アニーリング：55°C・1 分、伸長：72°C・1.5 分を 30 サイクル繰り返し、最後に伸長を 72°C・6 分を行った。PCR 産物は PCR Clean-Up Mini Kit を用いて精製した。精製した PCR 産物は、*HhaI* (真正細菌と古細菌の両方) と *TaqI* (古細菌のみ) により、それぞれ 37°C と 65°C で 5 時間の制限酵素処理を行った。*HhaI* と *TaqI* はタカラバイオ株式会社より購入した。制限酵素処理後の PCR 産物は、Hi-Di ホルムアミド (Applied Biosystems)、1200 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) と混合し、95°C で 3 分間変性させた後、キャピラリー電気泳動 (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) に供し、付属のソフトウェア (GeneMapper. Software Version 4.0) を用いてデータ解析を行った。

1.2.4.4 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析

真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子 V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析は、株式会社生物技研に委託して実施した。プライマーには 515f と 806r (Caporaso *et al.*, 2011) を用いた。増幅産物のシーケンシングは、illumina Miseq (Illumina) を用い、2×300 bp の条件で行った。解析で得た各リードのうち低クオリティリードを除去した後、USEARCH Version 10.0.240 (<https://www.drive5.com/usearch/>) を用いてキメラ配列のチェックを行った。フィルタリング後の配列は、QIIME Version 1.9.0 (<http://qiime.org/>) を用い、相同性 97% を閾値として Operational Taxonomic Unit (OTU) に分類し、各 OTU の代表配列を出力した。取得した代表配列は、EzBioCloud 16S database (<https://www.ezbiocloud.net/>) を参照し、系統推定を行った。得られたシーケンスデータは、DRA010105 のアクセッション番号で日本 DNA データバンク (DDBJ) のデータベースに登録した。

1.3 実験結果

1.3.1 集積系のクロロエチレン類脱塩素化特性

集積系の培養液中におけるクロロエチレン類濃度、pH、DOC 濃度の経時変化をそれぞれ図 1-1a、b、c に示す。添加した TCE は速やかに減少し、それに伴いほぼ同モルの *cis*-1,2-DCE が生成した (図 1-1a)。さらに、*cis*-1,2-DCE の減少に伴って VC が生成し、その後 VC も減少した。以上の TCE から VC までの脱塩素化ならびに VC の消失は、植え継ぎを繰り返しても継続して確認された。実験初期の 1 度目の植え継ぎでは VC の消失までに 42 日を要したが、その後は 35、29、20 日と徐々に短縮され、植え継ぎによる脱塩素化能力の向上が示された。また、水素供与体として添加したグルコン酸ナトリウム由来の DOC 濃度は直線的に減少し (図 1-1c)、グルコン酸の分解がクロロエチレン類の脱塩素化と同時に進行していることが観察された。さらに、DOC 濃度の減少速度は、1、2 度目の植え継ぎでは約 10.5 mg/L/日、3 度目では 11.2 mg/L/日となり、植え継ぎに伴いわずかながら上昇したことから、クロロエチレン類の脱塩素化と同様に、グルコン酸の分解能も植え継ぎにより高まったことが示唆された。培養液の pH

は、TCE の脱塩素化過程において若干低下したが、おおむね中性付近で維持された (図 1-1b)。

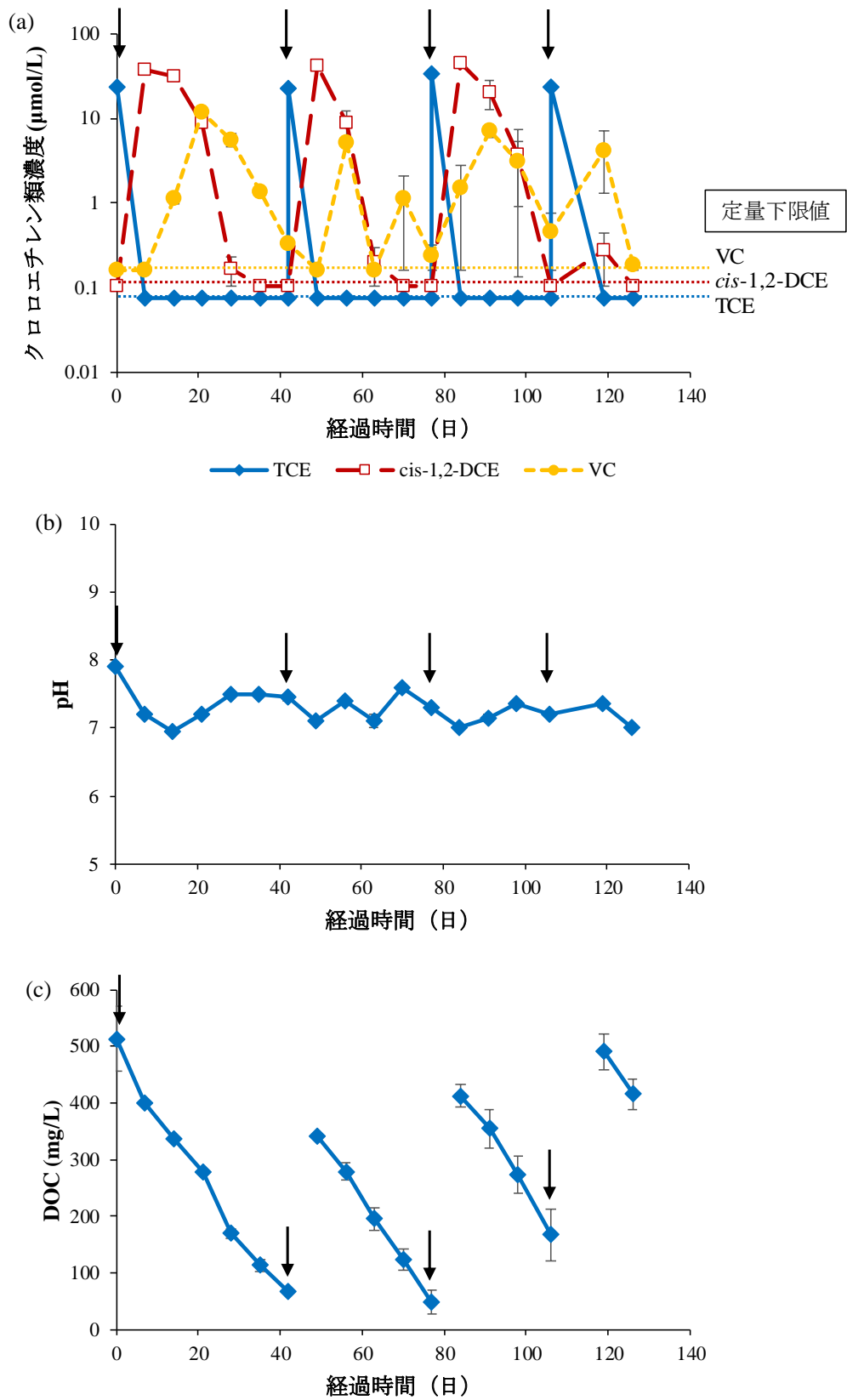


図 1-1 集積系の培養液中におけるクロロエチレン類濃度 (a)、pH (b)、DOC 濃度 (c) の経時変化 (矢印は植え継ぎのタイミング)

1.3.2 集積系の微生物数の経時変化

培養液中の真正細菌及び古細菌の 16S rRNA 遺伝子数、ならびに *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子数の経時変化を図 1-2a、b に示す。真正細菌の 16S rRNA 遺伝子数は $10^8 \sim 10^9$ copies/mL、古細菌の 16S rRNA 遺伝子数は約 10^7 copies/mL でほぼ一定であり、集積系内の微生物濃度に大きな変化は見られなかった(図 1-2a)。*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子数は植え継ぎの直後には減少するが、脱塩素化の進行に伴って増加する傾向が見られた(図 1-2b)。培養期間を通じて見ると、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数はおおむね $10^5 \sim 10^6$ copies/mL、*tceA* と *vcrA* は $10^6 \sim 10^8$ copies/mL であったが、*bvcA* は培養期間の経過に伴い 10^3 copies/mL から $10^5 \sim 10^6$ copies/mL に増加した。

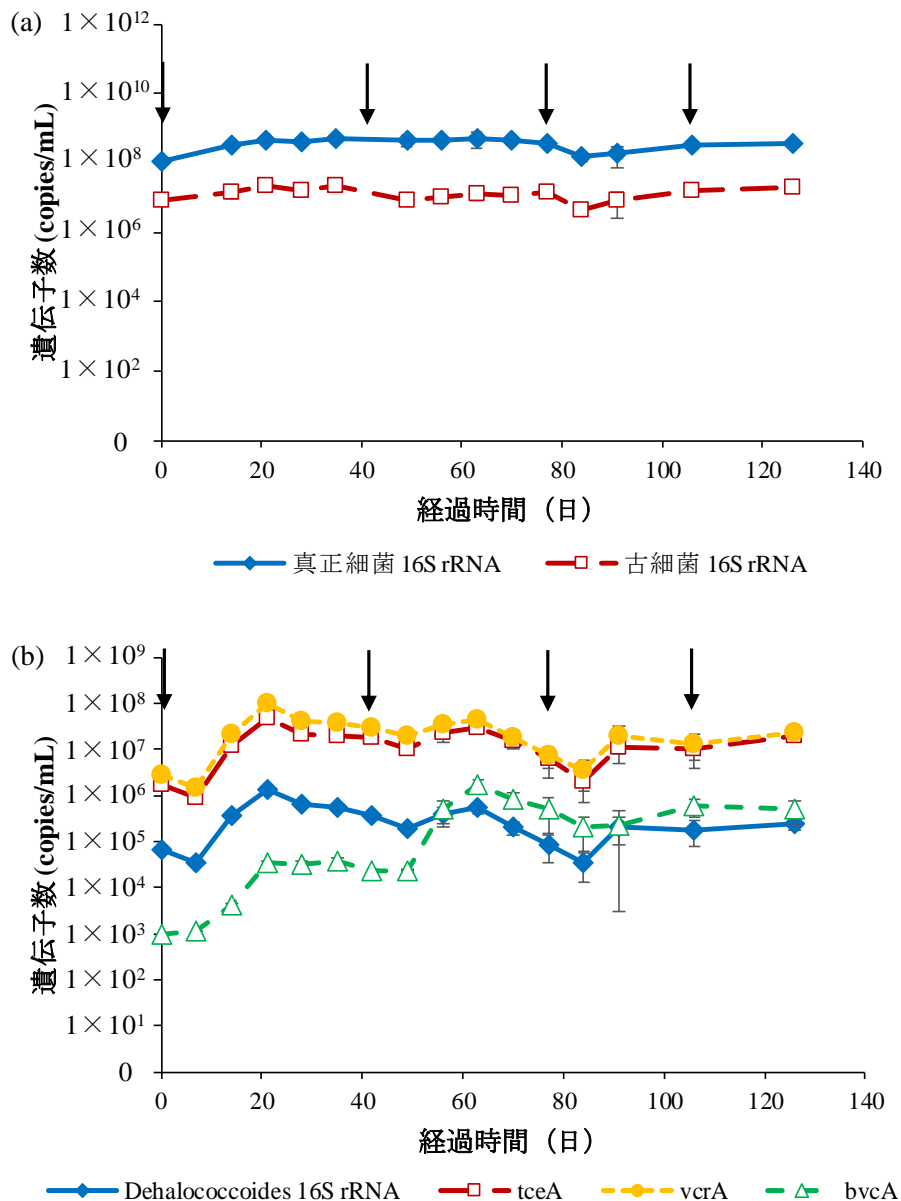


図 1-2 集積系の培養液中における真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子数 (a)、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子数 (b) の経時変化 (矢印は植え継ぎのタイミング)

1.3.3 集積系の微生物叢

培養液の真正細菌、及び古細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした T-RFLP 解析結果の経時変化を図 1-3 に示す。真正細菌 16S rRNA 遺伝子の *HhaI* 断片の解析では、578-581 bp の T-RF が常に全体の約 80% を占め、最も優占した (図 1-3a)。古細菌 16S rRNA 遺伝子の解析においては、*HhaI* 断片では 47 bp と 525-527 bp の T-RFs、*TaqI* 断片では 275-276 bp と 382-384 bp の T-RFs が全体の 80~98% を占めた (図 1-3b、c)。真正細菌、古細菌ともに、残りの 2~20% を占める微生物群の構成は時間により変化したものの、約 130 日の実験期間を通じて微生物叢の構成に大きな変化は見られなかった。

そこで、77 日後の培養液に対して、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析を実施し、集積系を構成する主要な微生物群を特定した (図 1-4)。解析で得られた 47145 リードの 16S rRNA 遺伝子のうち、*Trichococcus* 属が 56.6% を占め、最も優占していた。次いで *Malikia* 属が 15.2% を占め、その他に真正細菌では *Azospira* 属、*Clostridium* 属、*Sulfurospirillum* 属、*Cloacamonas* 属、*Rectinema* 属、古細菌では *Methanosaeta* 属、*Methanospirillum* 属が主な構成種として検出された。ここで、*Dehalococcoides* 属の存在割合は 0.01% であった。*Dehalococcoides* 属以外で脱塩素化に関与することが報告されている細菌の属では、*Geobacter* 属、*Sulfurospirillum* 属がそれぞれ 0.6%、1.5% で検出された。一方、TCE を脱塩素化することが知られている *Dehalobacter* 属や *Desulfitobacterium* 属は検出されなかった。

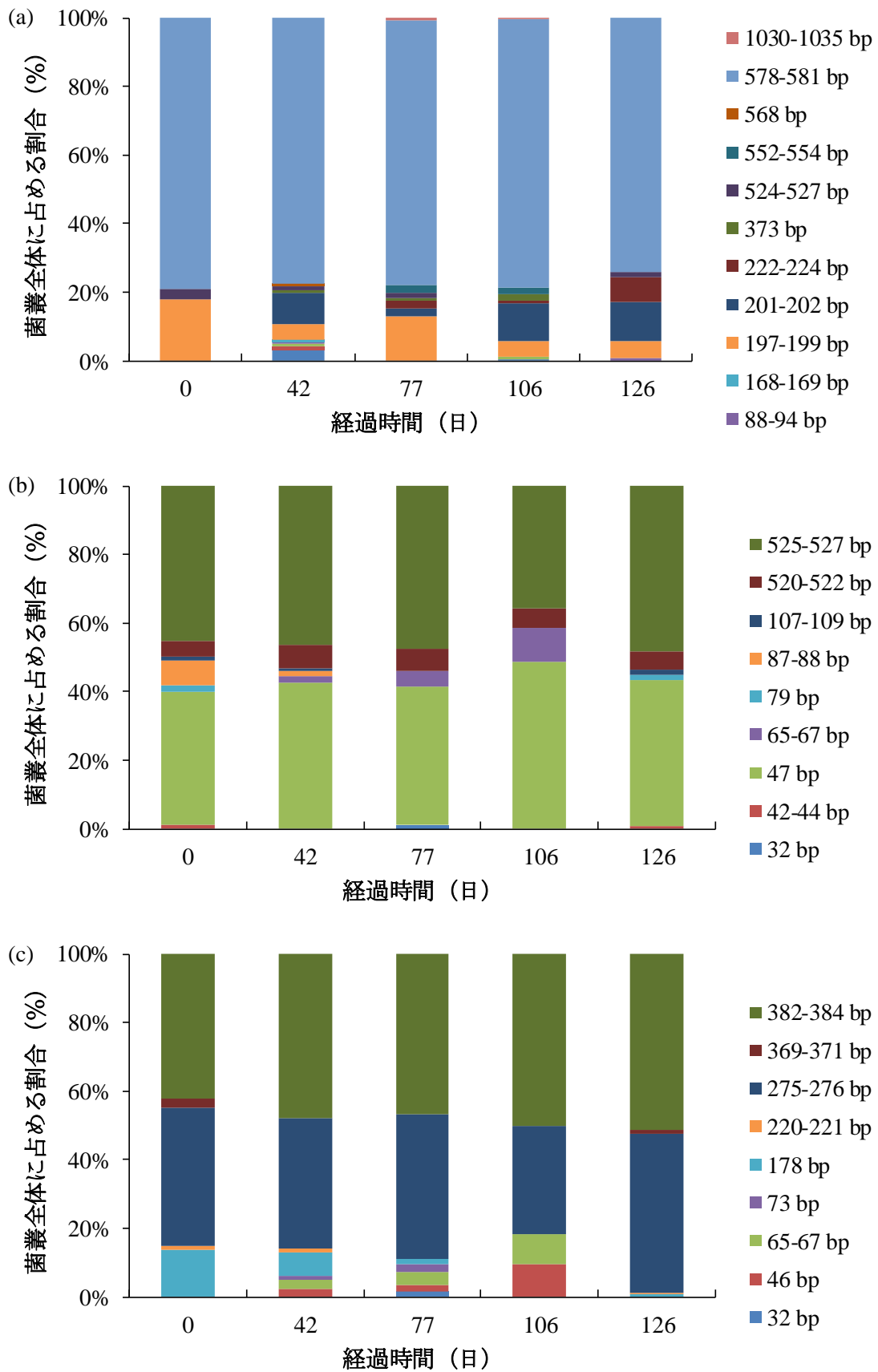


図 1-3 集積系における真正細菌 16S rRNA 遺伝子-*HhaI* 断片 (a)、古細菌 16S rRNA 遺伝子-*HhaI* 断片 (b)、古細菌 16S rRNA 遺伝子-*TaqI* 断片 (c) の T-RFLP 解析結果の経時変化

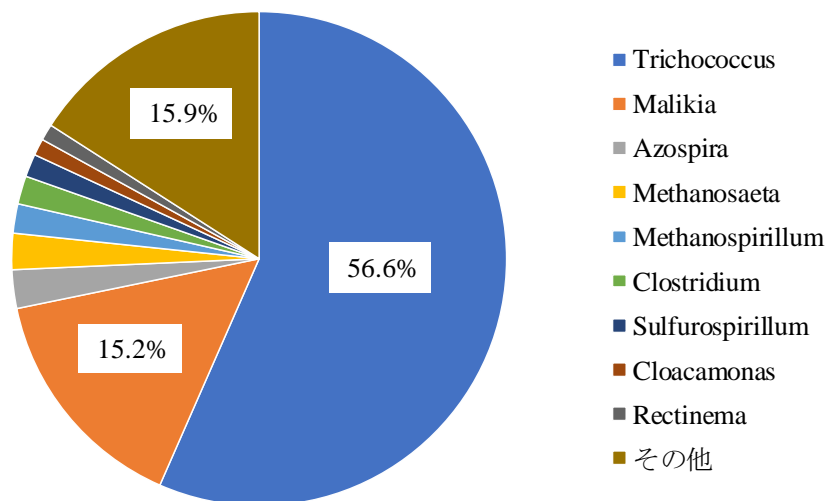


図 1-4 集積系（77 日後）の 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析に基づく微生物叢構成（菌叢に占める割合が 1%以上のものを個別に示し、1%未満のものはその他にまとめた）

1.4 考察

1.4.1 クロロエチレン類の脱塩素化に対するグルコン酸の水素供与体としての有用性

本研究で使用した地下水を採取した汚染サイトでは、水素供与体を何も注入しておらず、有意な TCE の脱塩素化は観察されていなかった。一方、本研究で構築した集積系では、植え継ぎ後に添加したグルコン酸ナトリウムに由来する DOC が直線的に減少し、それに伴って TCE から VC への脱塩素化と VC の消失が順次進行した（図 1-1a）。また、クロロエチレン類の脱塩素化能力が、DOC 減少速度の上昇と同調して向上することが確認された。これらのことから、グルコン酸が嫌氣的に分解される過程で発生した水素が利用されてクロロエチレン類の脱塩素化が進行したものと示唆された。ここで、集積系の構築の際にはグルコン酸だけでなく尿素も添加していたが、添加した全水素供与体由来の炭素と理論的水素生成量のうち、尿素由来のものはそれぞれ 4%と 8%を占めるに過ぎないことから、尿素の水素供与体としての寄与はほとんどなかったものと推察される。

本研究と同様に、TCE を初発クロロエチレンとして脱塩素することができる様々な集積系の性能を表 1-4 に示す。既往研究では TCE 濃度が本研究よりも 1 オーダー高く、また、温度等の脱塩素化実験の各種条件も異なるため、単純に比較することはできないが、既往研究の集積系による TCE の完全脱塩素化に必要な期間は本研究の集積系と同程度かやや短い。本研究では 10 L のポリ容器を用いて集積系を構築したため、気相を N_2 や CO_2 で置換しなかった。そのため、維持管理は簡便であるものの、植え継ぎ直後には必ずしも集積系の全体で嫌気環境が構築されているとはいえず、脱塩素化微生物が機能するには十分適切な環境が整っていたとは言い難い。このような条件でも安定的にクロロエチレン類の脱塩素化が進行したのは、図 1-5 に示すように、グルコン酸が既往研究で汎用されてきた水素供与体（乳酸やメタノール等）に比べて分子量が大きく、その分解過程で水素や CO_2 が多く発生することが理由として挙げられる。本研究では、直接培養液中で生じた水素や CO_2 を測定してはいないが、グルコン酸の速やかな分解を通じて発生した多量の水素や CO_2 によって十分な嫌気環境が形成され、クロロエチレン類の脱塩素化が促進されたと推測される。以上のことから、グルコン酸は、これまでにクロロエチレン類の脱塩素化に汎用されてきた乳酸やメタノール等と同様に有用な水素供与体である可能性が示唆された。

表 1-4 本研究及び既往研究の TCE を用いて構築した集積系のクロロエチレン類脱塩素化能力と優占種の比較

水素供与体	TCE の完全脱塩素化 に要した日数 (日)	TCE 濃度 (μM)	気相	液量 (L)	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	優占種	文献
グルコン酸	20~42	22~33	空気	10	22~23	<i>Trichococcus</i> 属 (57%)、 <i>Malikia</i> 属 (15%)	本研究
乳酸	24	200	80% N_2 /20% CO_2	0.5	室温	<i>Dehalococcoides</i> 属 (35%)、 <i>Clostridiaceae</i> 科 (20%)、 <i>Desulfovibrio</i> 属 (17%)、 <i>Eubacterium</i> 属 (12%)	Richardson <i>et al.</i> , 2002
乳酸	24	24~120	80% N_2 /20% CO_2	0.05	25	<i>Clostridium</i> 属、 <i>Bacteroides</i> 属、 <i>Citrobacter</i> 属	Freeborn <i>et al.</i> , 2005
メタノール	不明 (TCE を 14 $\mu\text{mol/L/day}$ で脱塩素化)	100~300	嫌気チャンバー中 で培養	不明	室温	<i>Dehalococcoides</i> 属 (約 60%)、 <i>Methanomethylovorans</i> 属、 <i>Geobacter</i> 属	Duhamel and Edwards, 2006
乳酸+メタノール	10	320	96.5% N_2 /3.5% H_2	0.01	30	<i>Acetobacterium</i> 属 (60%)、 <i>Dehalococcoides</i> 属 (10%)、 <i>Clostridium</i> 属 (10%)	Ziv-El <i>et al.</i> , 2011
酢酸+マレイン酸	25	50	85% N_2 /5% CO_2 /10% H_2	0.02	不明	不明	Futagami <i>et al.</i> , 2011
乳酸+メタノール	4	500	N_2	0.1	30	<i>Clostridia</i> 綱、 <i>Bacteroidia</i> 綱、 <i>Dehalococcoidea</i> 綱 (3~21%)	Delgado <i>et al.</i> , 2014
酢酸+ピルビ ン酸+ H_2 で集 積後、右のうち 1 種を添加	乳酸 メタノール 酢酸 H_2	20 40 40 以上 40 以上	空気 (培地は N_2 で脱気)	0.1	不明	<i>Petrimonas</i> 属、 <i>Dehalococcoides</i> 属 (9%) <i>Spirochaetaceae</i> 科、 <i>Dehalococcoides</i> 属 (10%) <i>Geobacter</i> 属 <i>Pseudomonas</i> 属	Wen <i>et al.</i> , 2015
乳酸	20	300	不明	不明	30	不明	Wen <i>et al.</i> , 2016

脱塩素化できるクロロエチレン類の種類を踏まえると、*Geobacter* 属と *Sulfurospirillum* 属が主に TCE から *cis*-1,2-DCE への脱塩素化を担い、*Dehalococcoides* 属が *cis*-1,2-DCE 以降の脱塩素化を行ったものと考えられた。また、脱塩素化微生物の存在割合が相対的に低かった理由として、本研究ではグルコン酸ナトリウムを高濃度で添加したため、グルコン酸を利用して増殖する *Trichococcus* 属や *Malikia* 属が優占化したことが考えられた。このことは、グルコン酸ナトリウムの添加濃度を調整することにより、*Dehalococcoides* 属や他の脱塩素化微生物の優占度を高められる可能性があることを示唆している。その検証のためには、低濃度のグルコン酸を添加した実験を今後実施することも必要である。

1.5 要約

本章では、グルコン酸のクロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体としての有効性を検証することを目的として、グルコン酸を唯一の水素供与体として添加し、TCE を脱塩素化する微生物集積系の構築を試みた。その結果、構築した集積系では、植え継ぎを繰り返しても TCE から VC への脱塩素化ならびに VC の消失が安定して生じることが確認され、グルコン酸が TCE 脱塩素化の水素供与体として利用可能であることが示された。他方、微生物叢の解析結果から、乳酸やメタノールなど、他の水素供与体を用いた既往研究の集積系と比べ、本研究で構築した集積系は独特の微生物構成を有していることが明らかとなった。微生物叢に占める *Dehalococcoides* 属や他の脱塩素化微生物の割合は少なかった一方、*Trichococcus* 属と *Malikia* 属が最も優占しており、これらの微生物がグルコン酸を分解し、クロロエチレン類の脱塩素化のための水素供給と嫌気環境の形成に大きく寄与していたと推察された。以上の結果から、グルコン酸ナトリウムの添加濃度を最適化することにより、脱塩素化微生物の割合をさらに高め、集積系のクロロエチレン類の脱塩素化能力を向上できる可能性があると考えられた。

第2章 クロロエチレン類の脱塩素化に用いる水素供与体としてのグルコン酸の汎用性

2.1 はじめに

第1章では、グルコン酸を唯一の水素供与体として使用し、クロロエチレン類汚染現場で採取した *Dehalococcoides* 属細菌を含む地下水から TCE を脱塩素化する微生物集積系を構築することに成功した。これにより、水素供与体としてのグルコン酸の有効性を確認することができたが、1種類の地下水のみを対象とした結果であり、必ずしも一般化できる知見とは言えない。そのため、その実用化を進める上では、微生物叢や共存汚染物質等の状況が異なる多種多様な地下水を対象として、最終的に *cis*-1,2-DCE や VC を残存させることなく、クロロエチレン類を完全に脱塩素化可能であることを検証し、グルコン酸の水素供与体としての汎用性を明らかにしておくことが必要である。

そこで本章では、クロロエチレン類で汚染された複数のサイトから採取した地下水を微生物源として使用し、グルコン酸を唯一の水素供与体として添加するバイオスティミュレーション（汚染地域に元々生息している微生物を活性化させて汚染物質の分解を促進させる手法）を模擬した TCE の脱塩素化試験を行い、その結果に基づいてグルコン酸の水素供与体としての有用性を検証した。

2.2 実験方法

2.2.1 TCE 脱塩素化試験

本章では、クロロエチレン類で汚染された5箇所のサイトから採取した地下水を微生物源として使用した。各地下水を採取したサイトは、機械工場、車両基地、または研究所の敷地内に位置している。汚染サイトでは、いずれも未対策の状態の数年間に渡り複数のクロロエチレン類の濃度が基準値を超過しており、汚染範囲は約 900~2,200 m² に渡っている（表 2-1）。さらに、サイトによっては油や金属類による汚染も確認されている。地下水は採取した後、ポリ容器に満水近くまで入れヘッドスペースがほとんどない状態とし、本実験で使用するまで 5°C で冷蔵保存した。

各地下水を微生物源として用い、グルコン酸を水素供与体として添加した TCE の脱塩素化試験を以下の手順で実施した。150 mL 容ガラス瓶に各地下水を 119.1 mL 入れ、表 2-2 に示す組成の栄養剤濃縮液を 3 mL、5%酵母エキス (YP-21CM、富士食品工業) 水溶液を 0.4 mL、表 1-1 の微量元素濃縮液を 1 mL、5%炭酸水素ナトリウム水溶液を 10 mL、飽和 TCE 水溶液を 1.5 mL 添加した。ガラス瓶にブチルゴム栓で蓋をし、上下逆さにして 22~23°C に維持した実験室内で静置し（試験体）、脱塩素化試験を開始した。試験開始後は、1~2 週間に 1 回の頻度で培養液中のクロロエチレン類（TCE、*cis*-1,2-DCE、VC）濃度を測定し、脱塩素化の進行状況を確認した。また、全てのクロロエチレン類が定量下限値である 0.01 mg/L（TCE : 0.076 μmol/L、*cis*-1,2-DCE : 0.103 μmol/L、VC : 0.160 μmol/L）未満に達したことが確認された後、一部の試験系では培養液 27 mL を別の 150 mL 容ガラス瓶に移し、水道水を 92.1 mL、栄養剤濃縮液（表 2-2）を 3 mL、5%酵母エキス水溶液を 0.4 mL、微量元素濃縮液（表 1-1）を 1 mL、5%炭酸水素ナトリウム水溶液を 10 mL、飽和 TCE 水溶液を 1.5 mL 添加し、同様の条件で静置培養による試験を継続した。

表 2-1 本研究で使用了地下水を採取した汚染サイトの詳細

所在地	敷地の用途	汚染範囲 (m ²)	クロロエチレン類の 汚染物質と最大濃度 (mg/L)	その他の 汚染物質	土質	汚染水位 (m)	
A	埼玉県	機械工場	1,500	TCE : 3.2 <i>cis</i> -1,2-DCE : 0.56 VC : 0.036	無	0~3 m : 粘性土 3~9 m : 粘土混じり砂礫 9 m~ : 凝灰質シルト	3~9
B	千葉県	車両基地	2,200	PCE : 0.076 TCE : 0.054 <i>cis</i> -1,2-DCE : 38.9 VC : 未測定	油	0~4 m : 盛土、砂、シルト 4~10 m : シルト 10 m~ : 砂	0~4 10~26
C	福島県	機械工場	1,700	TCE : 0.01 未満 <i>cis</i> -1,2-DCE : 4.2 VC : 0.02	無	0~4 m : 盛土、粘土、砂礫 4~9 m : シルト質粘土 9~13.5 m : 砂 13.5 m~ : シルト	9~13.5
D	栃木県	機械工場	2,200	PCE : 4.7 TCE : 3,300 <i>cis</i> -1,2-DCE : 13 VC : 未測定	As、B、Pb	0~3.5 m : 埋土、軽石 3.5~9 m : 凝灰質粘土 9~23 m : 粘土質砂礫 23 m~ : 凝灰岩	9~23
E	神奈川県	研究所	900	PCE : 0.16 TCE : 0.037 <i>cis</i> -1,2-DCE : 0.048 VC : 未測定	As、Pb	0~4 m : 埋土 4~9 m : シルト混じり砂礫 9~11 m : 砂 11 m~ : シルト	4.5~11

表 2-2 栄養剤濃縮液の組成

物質名	濃度 (g/L)
グルコン酸ナトリウム	93
尿素	6
リン酸二水素ナトリウム	1

2.2.2 化学分析

培養液中のクロロエチレン類 (TCE、*cis*-1,2-DCE、VC) 濃度と DOC 濃度は、第 1 章 1.2.3 に準じた方法で測定した。

2.2.3 微生物群集解析

2.2.3.1 DNA 抽出、リアルタイム PCR

TCE 脱塩素化試験に供した地下水と試験体の培養液中の微生物 DNA は、第 1 章 1.2.4.1 に準じた方法で抽出及び精製を行った。精製後の DNA を使用し、真正細菌及び古細菌の 16S rRNA 遺伝子と、*Dehalococcoides* 属細菌に特異な 16S rRNA 遺伝子、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子を第 1 章 1.2.4.2 に準じたリアルタイム PCR 法により定量した。

2.2.3.2 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析

本研究で使用した地下水に対し、真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子 V4 領域を対象としたアンプリコンシーケンス解析を、株式会社生物技研に委託して実施した。プライマーには 515f と 806r (Caporaso *et al.*, 2011) を用い、1st PCR は 4 反復で実施した。増幅産物のシーケンシングは、illumina Miseq (Illumina) を用い、2×300 bp の条件で行った。Qiime2 version 2020.2 (<https://qiime2.org/>) を用いてプライマー配列と 3'末端の 50 bp、キメラ配列、ノイズ配列を除去した後、相同性 97%を閾値として OTU に分類し、各 OTU の代表配列を出力した。取得した代表配列は、EzBioCloud 16S database (<https://www.ezbiocloud.net/>) を参照し、系統推定を行った。

2.3 実験結果及び考察

2.3.1 地下水の微生物叢の特徴

本研究で使用した地下水の 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析に基づく微生物叢構成 (分類単位は綱) を図 2-1 に示す。リード数は A が 60644、B が 53605、C が 58009、D が 51921、E が 58927 であった。A ではメタン生成菌である *Methanomicrobia* が 31.3%、 β -*Proteobacteria* が 17.2%、*Bacteroidia* が 12.2%を占めた。B では α -*Proteobacteria* が 38.7%と最も多く、次いで *Bacilli* が 22.7%を占めた。C では *Clostridia* が 50.1%、D では α -*Proteobacteria* が 44.3%とそれぞれ約半分を占めた。E は *Ignavibacteriae* が 17.2%と最も多かったが、多様性が高く様々な微生物で構成された。

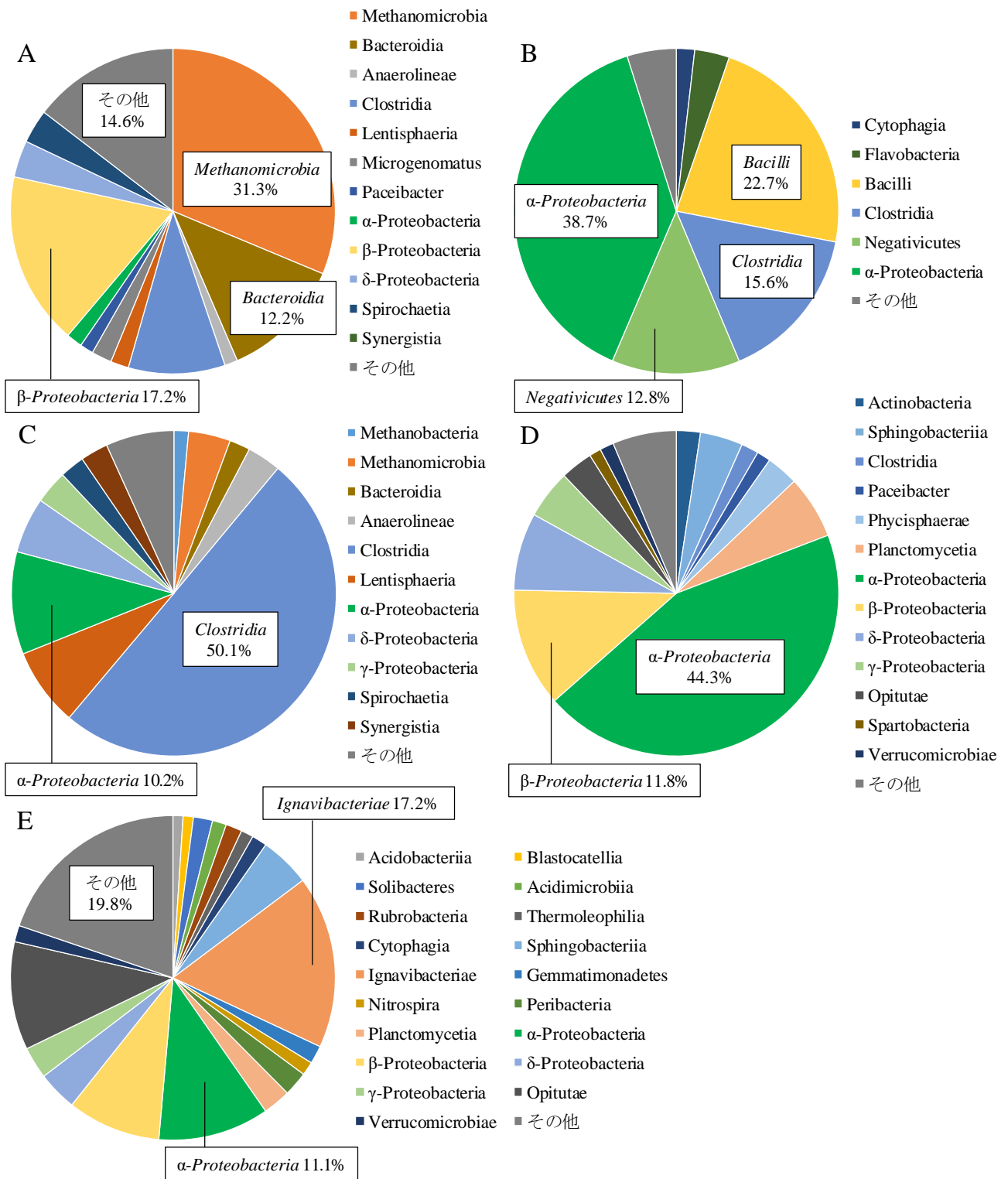


図 2-1 使用した地下水の 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析に基づく微生物叢構成 (分類単位は綱。菌叢に占める割合が 1%以上のものを個別に示し、1%未満のものはその他にまとめた)

16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析により明らかとなった各地下水の微生物叢から、クロロエチレン類の脱塩素化に関与することが知られている種を含む微生物を属レベルで抽出した。それらの割合を図 2-2 に示す。*Geobacter* は全ての地下水で検出され、特に A では他の地下水より多く、微生物叢の 2.5%を占めた。*Sulfurospirillum* は A でのみ検出され、その存在比は微生物叢の 0.5%であった。また、*Dehalobacter* は C のみで検出されたが、その存在比は微生物叢のわずか 0.005%であった。

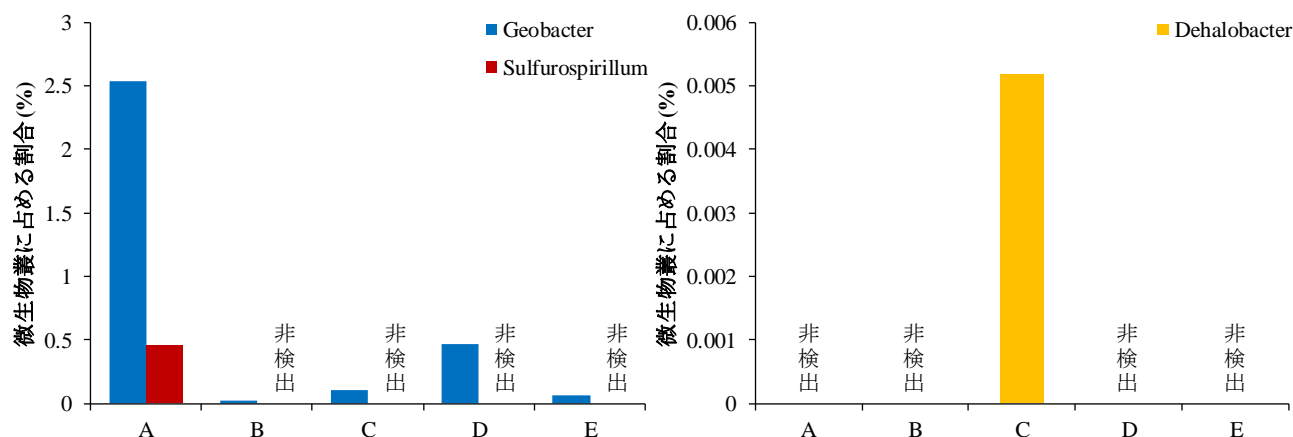


図 2-2 使用した地下水の微生物叢に占める脱塩素化に関与する微生物の割合（分類単位は属）

地下水中の真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子の定量結果を図 2-3a に示す。真正細菌の 16S rRNA 遺伝子数は A で約 10^{10} copies/mL、B と C で約 10^9 copies/mL、D と E で約 10^7 copies/mL であり、試料により最大 3 オーダーの差があった。同様に、古細菌の 16S rRNA 遺伝子数も、A と C が約 10^8 copies/mL、B、D、E は約 10^5 copies/mL と大きく異なった。

また、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析では *Dehalococcoides* はいずれの地下水でも検出されなかった（図 2-1）。しかし、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子の特異的に定量検出したところ、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子は A と C の地下水で検出され、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子は全ての地下水において検出された（図 2-3b）。B、D、E ではいずれの遺伝子も 10^3 copies/mL 未満であったが、A では 16S rRNA 遺伝子と *bvcA* 遺伝子が $10^3 \sim 10^4$ copies/mL、*vcrA* 遺伝子が約 10^5 copies/mL、C では *tceA* と *vcrA* 遺伝子が約 10^4 copies/mL 検出された。しかし、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子が比較的多かった A と C でも、真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子数の合計に対する *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子の割合は $1/10^7 \sim 1/10^6$ と非常に少ないため、5~6 万リードの 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析では検出されなかったものと言える。すなわち、地下水における *Dehalococcoides* 属細菌の存在数の判定には同属の特異的定量が必要であることが示唆された。

本研究で使用した 5 種類の地下水の微生物叢の解析から、地下水ごとに微生物群集全体の存在量及び構成が大きく異なり、脱塩素化に関わる微生物の種類や存在量にも顕著な差のあることが明らかとなった（図 2-1~2-3）。すなわち、グルコン酸がクロロエチレン類の脱塩素化のための水素供与体として、汎用的に使用できるかどうかを評価する本研究の目的に適した、微生物叢の異なる様々な地下水を選定することができたと言える。

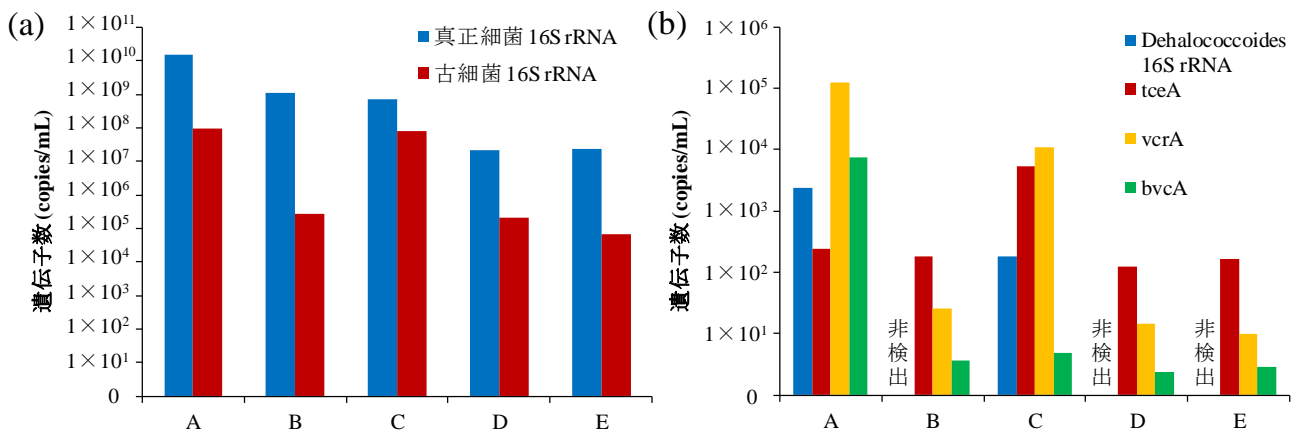


図 2-3 使用した地下水の真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子数 (a)、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子数 (b)

2.3.2 クロロエチレン類の脱塩素化挙動

各地下水を用いた TCE 脱塩素化試験におけるクロロエチレン類濃度と DOC 濃度の経時変化を図 2-4 に示す。クロロエチレン類の脱塩素化は A において最も早く進行し、7 日で TCE が全て脱塩素化された。また、7 日後に蓄積が認められた *cis*-1,2-DCE も 14 日後には消失し、28 日までに TCE、*cis*-1,2-DCE、VC が全て定量下限値未満に達した。B では TCE の脱塩素化に 48 日を要し、完全脱塩素化には 5 種類の地下水の中で最も長い 104 日を必要とした。C では TCE と *cis*-1,2-DCE の脱塩素化は比較的早く進行し、48 日で検出されるクロロエチレン類は VC のみとなったが、その後、VC の脱塩素化が開始されるまでに長いラグ期が見られ、VC が定量下限値未満に達したのは 89 日後であった。D は、有意な TCE の脱塩素化が認められるまでに 5 種類の中で最も長い 63 日間を要した。一方、*cis*-1,2-DCE 以降の脱塩素化は速やかに進行し、89 日後に完全脱塩素化を達成した。E においても C、D と同様に、TCE は 89 日で完全に脱塩素化された。

以上の結果から、微生物叢の異なる 5 種類の地下水のいずれにおいてもクロロエチレン類の完全脱塩素化が達成されたが、その速度は地下水ごとに顕著に異なることが明らかとなった。全体としては A において脱塩素化が最も早く進行した。特に TCE に関しては、A における脱塩素化は 7 日で完了したのに対し、C では 28 日、B と E では 48 日を要し、最も遅い D では 63 日もの時間が必要であり、地下水ごとに大きな差が見られた。本研究の TCE 脱塩素化試験では気相部の窒素置換等による嫌気化を行っていないため、各地下水の微生物によるグルコン酸の利用やクロロエチレン類に対する分解ポテンシャル等の特性が脱塩素化能力の差異に顕著に反映されたものとも考えられた。すなわち、A の地下水はメタン生成菌である *Methanomicrobia* が微生物叢の約 1/3 を占め (図 2-1)、クロロエチレン類の嫌氣的脱塩素化に適した嫌氣的な微生物叢が構築されており、さらに、クロロエチレン類の脱塩素化に関与する *Geobacter* や *Sulfurospirillum* が他の地下水よりも高濃度で存在したことから (図 2-2)、クロロエチレン類の脱塩素化が他より速やかに進行したものと示唆された。

実験開始時の DOC 濃度は、B 以外では約 520~720 mg/L であったが、B では約 1,000 mg/L と他の地下水に比べて高かった (図 2-4)。試験系に添加したグルコン酸由来の DOC 濃度は 600 mg/L 程度であることから、B 以外の地下水の実験開始時の DOC 濃度はおおむね妥当な値であったと言える。一方、B はクロロエチレン類に加えて油による汚染も確認されていたサイトであることから (表 2-1)、地下水に

油が残留していたために DOC 濃度が他より高濃度であったものと推察された。脱塩素化試験中には、いずれの地下水でも脱塩素化の進行に伴って DOC 濃度も減少し、完全脱塩素化が完了した時点では、A は 100 mg/L 程度減少して約 500 mg/L になった。また、それ以外では 200~650 mg/L 減少して 350 mg/L 程度にまで低下した。これに加え、各地下水を採取したサイトでは未対策の状態数年間に渡り、クロロエチレン類の脱塩素化がほとんど観察されていなかったことも踏まえると、添加したグルコン酸が水素供与体として消費され、クロロエチレン類の脱塩素化が進行したことが強く支持される。ここで、理論的には 1 mol の TCE をエチレンまで脱塩素化するために必要な水素は 3 mol である (図 0-1)。グルコン酸ナトリウムの分子式が $C_6H_{11}NaO_7$ であることを踏まえると、水素 3 mol の生成に必要なグルコン酸は 0.27 mol であることから、本実験の初期 TCE (約 0.076 mmol/L) を全てエチレンまで脱塩素化するために必要なグルコン酸は 0.021 mmol/L となる。これを炭素に換算すると約 1.5 mg-C/L となり、本実験における DOC 濃度の減少量に比べ非常に少ない。グルコン酸の一部は、酸化により水素を生成せずに分解された可能性がある。また、嫌気分解で生成した水素は、メタン生成や硫酸還元など別の反応でも消費される他、気相への揮発や土粒子への吸着などによっても利用可能量が減少することが想定される。これらの種々の要因のため、脱塩素化での必要量よりも多量のグルコン酸が消費されたものと考えられる。前述の通り、A ではメタン生成菌を中心とした嫌気的な微生物叢が構築されていたのに対し、B~E ではメタン生成菌はほぼ存在せず、A に比べて好気的な微生物叢が構築されていたものと考えられる (図 2-1)。そのため、B~E では、グルコン酸の好気分解が多く生じ、A に比べて DOC 濃度の低下が大きくなった可能性が考えられた。ここで、グルコン酸は微生物により容易に分解される一方 (Ramachandran *et al.*, 2006)、油の分解には長い時間を必要とするため (Gros *et al.*, 2014)、油由来の DOC の存在が推測された B において観察された DOC 濃度の減少は、グルコン酸の分解によるものである可能性が高い。第 1 章で構築した、グルコン酸を水素供与体とするクロロエチレン類分解微生物集積系では、本研究と同程度の濃度の TCE 脱塩素化における DOC 濃度の減少量は約 450 mg/L であった (図 1-1c)。すなわち、TCE を完全脱塩素化するために必要となるグルコン酸量は、他の水素供与体を用いた既往研究 (Dolinová *et al.*, 2017) でも報告されているように、対象となる地下水の嫌気度や微生物叢、特に水素を競合する微生物の存在量により異なることが示唆された。このことから、クロロエチレン類の完全脱塩素化を達成し、かつ、グルコン酸の残留に伴う副次的な影響を回避するためには、汚染サイトの物理化学的及び生物学的特徴を事前に把握した上で、グルコン酸の添加量を決定する必要があると言える。

脱塩素化速度が最も速かった A と最も遅かった B を対象として、植え継ぎによる脱塩素化能力の変化を調査した。これは実際の浄化現場においては、グルコン酸の繰り返し注入を行うことを模擬したものである。A では、TCE の完全脱塩素化に要する期間が 1 バッチ目から順に 28、55、37、34 日となり、植え継ぎを繰り返しても安定して脱塩素化が進行した (図 2-4a)。4 バッチ目には生成した *cis*-1,2-DCE が 26 日間で消失したが、*cis*-1,2-DCE が消失した時点で VC は検出されておらず、VC の脱塩素化も短時間で進行した。一方、B では植え継ぎを繰り返すことで 104、35、19 日と徐々に短い期間で完全脱塩素化を達成できるようになった (図 2-4b)。VC の脱塩素化には最初のバッチでは 41 日を要したものの、2 バッチ目には 14 日に短縮された。さらに 3 バッチ目には、TCE 添加から 19 日後に TCE と *cis*-1,2-DCE だけでなく VC も検出されなくなり、*cis*-1,2-DCE と VC の生成、分解までを含めた TCE の完全脱塩素化の逐次反応が非常に速やかに進行したことが確認された。すなわち、A と B 共に植え継ぎを繰り返すことにより、安定して速やかに脱塩素化が進むようになった。このことから、水素供与体としてグルコン酸を用い、繰り返し注入等を行って脱塩素化に関与する微生物群集を馴致することで、異なる性状の

地下水に対しても有害な VC を長期間残留させることなく、クロロエチレン類の浄化を進めることができることが確認された。

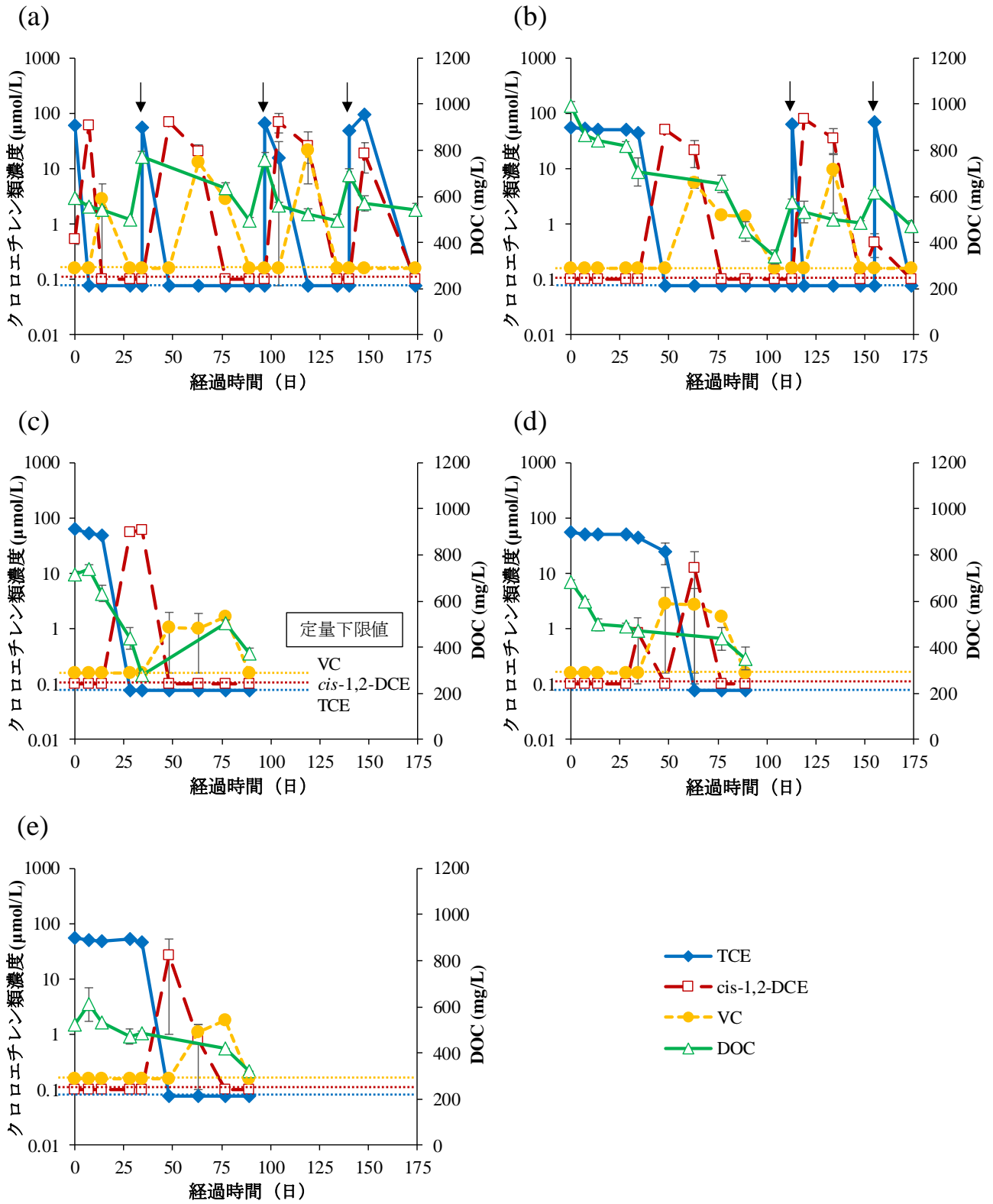


図 2-4 各地下水を用いた TCE 脱塩素化試験中のクロロエチレン類濃度と DOC 濃度の経時変化 (矢印は植え継ぎのタイミング)

2.3.3 脱塩素化試験中の真正細菌・古細菌及び *Dehalococcoides* 属細菌の挙動

TCE 脱塩素化試験中の真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子数の経時変化を図 2-5 に示す。真正細菌の 16S rRNA 遺伝子数は、いずれの地下水を用いた試験系でも 7 日後以降に 10^{10} copies/mL 程度まで増加し、その後は同程度の濃度で推移した。古細菌の 16S rRNA 遺伝子数は、いずれの地下水を用いた試験系でも 28~34 日後に 2 オーダー増加して、A と C は約 10^{10} copies/mL、B、D、E は約 10^8 copies/mL に達し、B、D、E はその後さらに増加して A、C と同様に約 10^{10} copies/mL に達した。

また、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子数の経時変化を図 2-6 に示す。TCE と *cis*-1,2-DCE が脱塩素化され VC が生成したのとほぼ同時期（A では 14 日後、B~E では 48 日後）に各遺伝子数が大きく増加した。このことから、*Dehalococcoides* 属細菌の活動によりクロロエチレン類の脱塩素化が進行したことが示唆された。*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数は最大 10^5 copies/mL 程度、*vcrA* 遺伝子数は最大 10^7 copies/mL 程度まで増加した。一方、*tceA* 遺伝子数の増加は B と C のみで観察され、約 10^6 copies/mL まで達した。*bvcA* 遺伝子数は、A、B、D においては経時的に増加して、A と D では最大で 10^5 copies/mL 程度に達したが、C と E では終始 10^3 copies/mL 未満であった。このような *tceA* と *bvcA* 遺伝子の挙動から、各地下水中には、保有する機能遺伝子の異なる *Dehalococcoides* 属細菌が元々存在しており、それらがグルコン酸添加後に増加したものと考えられた。本研究では各機能遺伝子の保有微生物の推定は行っていないが、例えば、B と C の地下水では、*Dehalococcoides mccartyi* FL2 株や 11a5 株のような *tceA* 遺伝子を保有する *Dehalococcoides* 属細菌が多く存在し、A、B、D の地下水では *Dehalococcoides mccartyi* BAV1 株のような *bvcA* 遺伝子を保有する *Dehalococcoides* 属細菌が多く存在していた可能性が考えられた (Saiyari *et al.*, 2018)。

植え継ぎを行い、TCE の脱塩素化を繰り返した A と B では、植え継ぎ直後には希釈により *Dehalococcoides* 属細菌に関する各遺伝子数が減少したものの、脱塩素化の進行に伴い再び増加する傾向が確認された (図 2-6a、b)。特に、元々 *Dehalococcoides* 属細菌が少なく、クロロエチレン類の脱塩素化能力が低かった B において、植え継ぎを重ねるたびに脱塩素化に関連する全ての遺伝子数が増加し続け、*Dehalococcoides* 属細菌の集積効果が顕著に認められた (図 2-6b)。

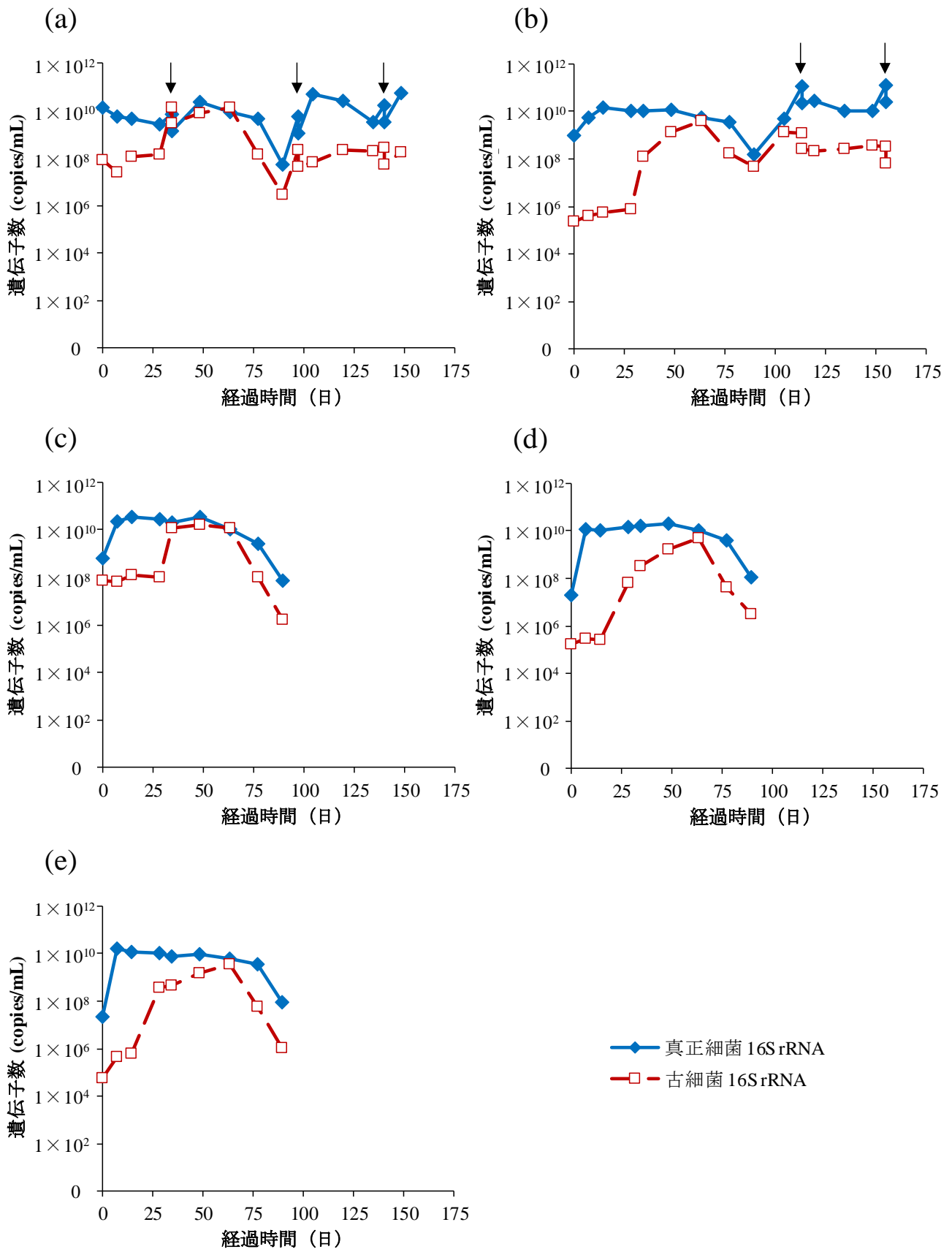


図 2-5 各地下水を用いた TCE 脱塩素化試験中の真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子数の経時変化 (矢印は植え継ぎのタイミング)

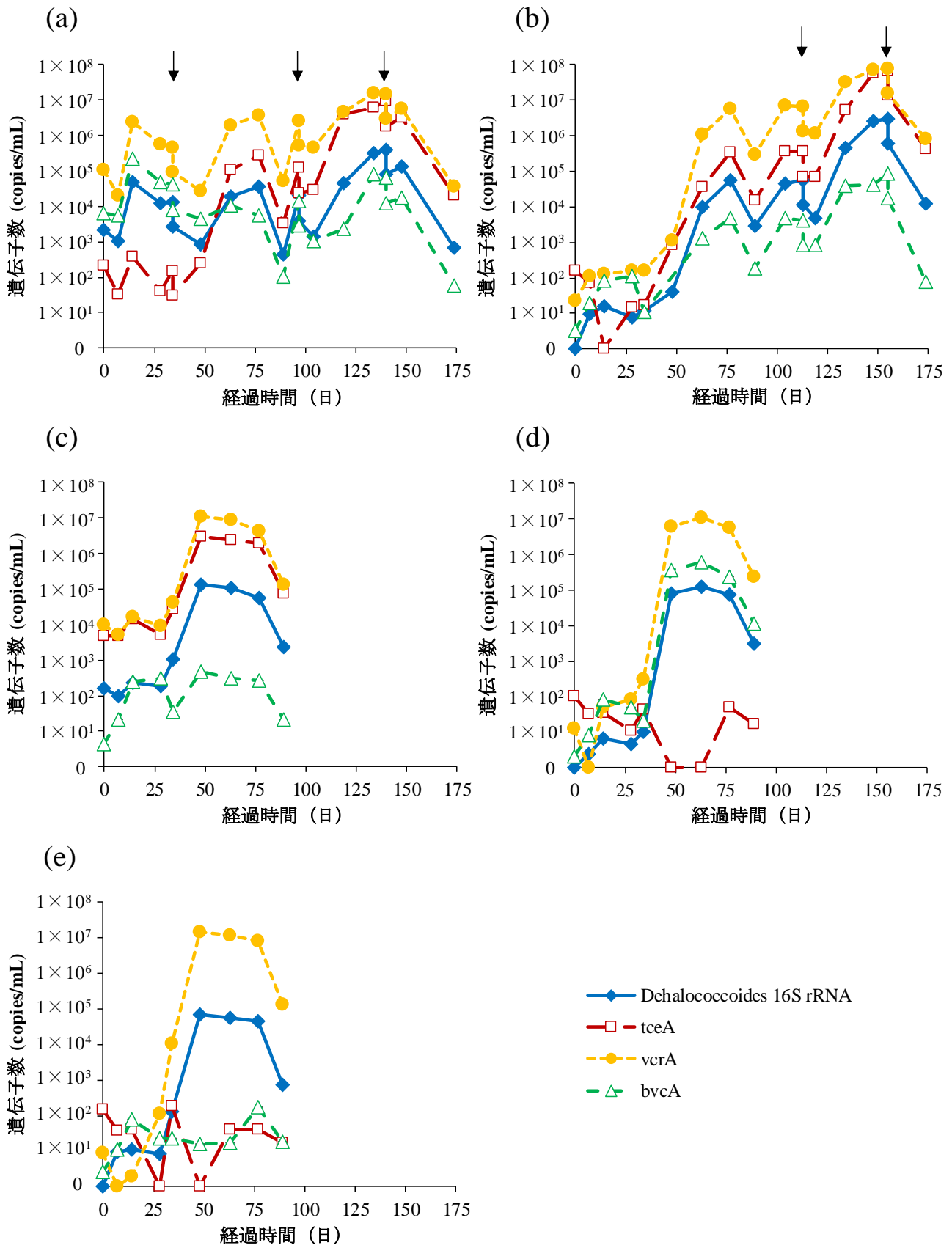


図 2-6 各地下水を用いた TCE 脱塩素化試験中の *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子数の経時変化 (矢印は植え継ぎのタイミング)

2.3.4 クロロエチレン類の脱塩素化におけるグルコン酸の水素供与体としての汎用性

本研究では、グルコン酸を唯一の水素供与体として用い、クロロエチレン類で汚染された様々なサイトから採取した微生物叢の異なる地下水を用いて TCE の脱塩素化試験を行った。その結果、脱塩素化速度に差は見られたものの、全ての地下水で TCE の完全脱塩素化を達成することができた。また、元々は脱塩素化能力が低く、完全脱塩素化に長期間を要した地下水であっても、植え継ぎとそれに伴うグルコン酸の添加を繰り返すことにより、有害な代謝物である VC の長期間の蓄積を伴わず、TCE の完全脱塩素化を速やかに進行させることが可能となった（試料 B）。また、全ての地下水で脱塩素化の進行に伴い *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数と *vcrA* 遺伝子数が増加し、さらにグルコン酸を添加して植え継ぎを繰り返すことで脱塩素化に関連する全ての遺伝子数を大きく増加させることができた。これらの結果より、グルコン酸は微生物叢の異なる多様な地下水においてクロロエチレン類の嫌気分解を促進し得る、汎用性の高い水素供与体であると言える。

酢酸や乳酸、HRC を水素供与体として用いたクロロエチレン類の脱塩素化では、長期間の浄化を行った後も *cis*-1,2-DCE や VC が完全には除去されずに蓄積することが頻繁に報告されている（Carr and Hughes, 1998; Koenigsberg *et al.*, 2002; Mészáros *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2015）。一方、グルコン酸を添加して集積した本研究では、異なる微生物群集を有する多様な地下水においても、最終的に *cis*-1,2-DCE や VC が残存することなく TCE の完全な脱塩素化が行われた（図 2-4）。今後さらに試験数を増やして確認する必要はあるものの、グルコン酸は広範なサイトにおいて、*cis*-1,2-DCE や VC を残存させずにクロロエチレン類の浄化を行うことのできる有用な水素供与体である可能性が考えられた。使用した土壌・地下水や添加したクロロエチレン類の濃度が異なるため単純には比較できないものの、HRC を水素供与体として用いて行われた既往研究の TCE 脱塩素化試験では、本研究の C、D の実験期間とほぼ同じ 88 日経過後でも、*cis*-1,2-DCE や VC が分解されずに残存することが確認されている（Miura *et al.*, 2015）。この既往研究では、HRC を添加しても地下水中の微生物叢はほとんど変化しておらず、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数も最大 10^2 copies/mL 程度であった。また、HRC 由来の DOC 濃度が 115 mg/L しか減少していないことから、微生物の総量もあまり増えていない可能性があり、クロロエチレン類の脱塩素化に適した微生物叢が構築されなかったために *cis*-1,2-DCE や VC の蓄積に至ったものと推測される。一方、本研究では、A~E の全ての地下水でグルコン酸の添加により真正細菌と古細菌の 16S rRNA 遺伝子数が増加し（図 2-5）、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数も 10^5 copies/mL 程度まで増加した（図 2-6）。また、第 1 章でグルコン酸を水素供与体を用いて構築したクロロエチレン類分解微生物集積系では、グルコン酸を分解する *Trichococcus* や *Malikia* が優占化することが確認された（図 1-4）。これらの比較から、グルコン酸を水素供与体として用いた場合、微生物の総量及び脱塩素化微生物群の増殖を含む微生物叢の最適化が HRC を用いた場合よりも速やかに進行したため、*cis*-1,2-DCE や VC を蓄積することなくクロロエチレン類の完全脱塩素化を安定的に達成できたものとも推察された。

また、5 種類のいずれの地下水を用いた場合でも、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数と *vcrA* 遺伝子数が 10^3 copies/mL を上回った時点で TCE の脱塩素化が顕著に進み始めることが観察された（図 2-4、2-6）。そのため、グルコン酸は *Dehalococcoides mccartyi* VS 株や GT 株のような、*vcrA* 遺伝子を保有する *Dehalococcoides* 属細菌の活性を特に高められる可能性がある（Saiyari *et al.*, 2018）。このことから、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子と *vcrA* 遺伝子はグルコン酸を用いた浄化の進行を判断するバイオマーカー（ 10^3 copies/mL に達すると脱塩素化が進行）として活用することができると示唆された。

2.4 要約

本章では、クロロエチレン類の嫌気分解を促進する水素供与体として、グルコン酸が多種多様な地下水に対しても、*cis*-1,2-DCE や VC を残存させることなく完全に脱塩素化することが可能かどうか検証することを目的とした実験的検討を行った。クロロエチレン類で汚染された異なるサイトから採取した様々な微生物叢を持つ地下水を使用し、唯一の水素供与体としてグルコン酸を用いて TCE の脱塩素化試験を実施した。その結果、脱塩素化速度は地下水により異なったものの、使用した 5 種類の地下水全てにおいてクロロエチレン類の完全脱塩素化が達成された。全ての地下水で脱塩素化の進行に伴ってグルコン酸由来の DOC 濃度が減少し、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数と *vcrA* 遺伝子数が大きく増加したことから、グルコン酸の分解により発生した水素を *Dehalococcoides* が利用し、クロロエチレン類の脱塩素化が進行したことが示唆された。また、元々は脱塩素化能力が低く、TCE の完全脱塩素化に長い期間を要した地下水に対しても、グルコン酸の添加を繰り返すことで、脱塩素化に関連する全ての遺伝子数が大きく増加し、有害な代謝物である VC を長期蓄積することなく、完全脱塩素化を速やかに進行させることが可能となった。以上より、グルコン酸は異なる性状や微生物叢を持つ地下水に添加しても、TCE をはじめとしたクロロエチレン類の嫌気分解を促進し、クロロエチレン類汚染環境の浄化で求められている完全脱塩素化を可能とする、汎用性の高い有望な水素供与体であることが示された。

第3章 グルコン酸を用いた地下水汚染サイトにおけるクロロエチレン類浄化の実証試験

3.1 はじめに

ここまで、第1章においてグルコン酸のクロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体としての有効性を確認し、第2章において多様な地下水における汎用性も確認することができた。ただし、これらはあくまでラボスケールの実験による検証であり、グルコン酸を実際の土壌・地下水汚染現場で適用するためには、パイロットスケールの実証試験において十分な脱塩素化促進効果を発揮できるかを検証する必要がある。

そこで本章では、TCEと *cis*-1,2-DCE、VCで汚染された実際の地下水汚染サイトにおいて、グルコン酸の注入によるクロロエチレン類の浄化実証を行った。

3.2 浄化サイトの概況と浄化工事の内容

3.2.1 サイトの概況

本浄化実証は国内某所にある稼働中の機械工場敷地内で実施した。当サイトでは1990年代半ば頃からTCEと *cis*-1,2-DCE、VCによる地下水汚染が確認されていた。浄化範囲と注入井戸、観測井戸の配置を図3-1に示す。対象地は地表面から深度3m程度までは粘性土の盛土が施されており、盛土層の下部には礫と細砂、中砂を主体とした粘土混じり砂礫層が深度9m程度まで堆積し、さらにその下には均質な凝灰質シルトが厚く堆積していた(図3-2)。地下水位は深度3m付近にあり、数地点の地下水位データから、地下水は北東方向へ流れていると推定された。

当サイトでは2000年から高濃度汚染域に揚水井戸を設置し、汚染地下水を揚水した後曝気してクロロエチレン類を揮発させて除去するという処理を行ってきた。しかし、クロロエチレン類の濃度が低下するに従って2013年頃から浄化がほとんど進行しなくなった。そのため、バイオレメディエーションを実施して浄化を促進させる必要性が出てきた。

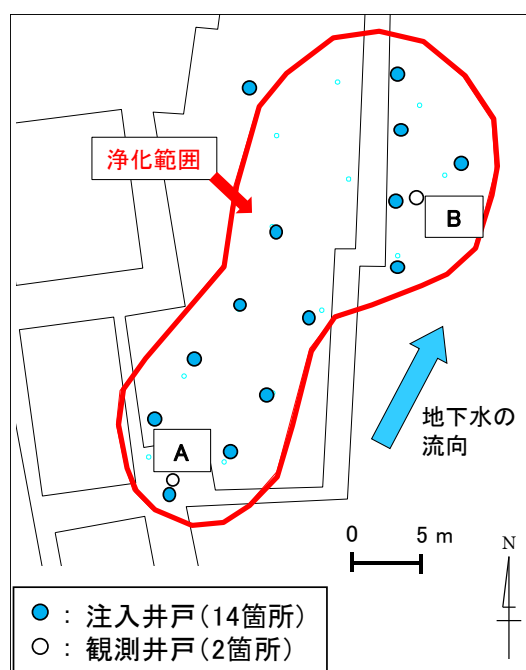


図3-1 浄化範囲と注入井戸、観測井戸の配置

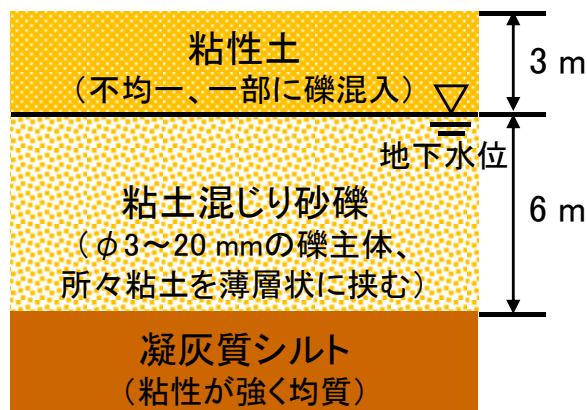


図 3-2 対象地の土質構造

3.2.2 工事の詳細

グルコン酸を用いた嫌気性バイオレメディエーションによる浄化工事は2回実施した。第1回工事では2018年1月8日～2月22日にグルコン酸を主成分とする薬剤を注入し、その前後を含む2017年11月10日～2018年7月31日に地下水質のモニタリングを行った。第2回工事では2019年6月19日～8月8日に薬剤を注入し、2019年5月14日～12月3日にモニタリングを行った。

図3-1に示す通り、2016年7月時点におけるTCE及びcis-1,2-DCEの地下水環境基準不適合範囲を重ね合わせた、約620 m²の範囲を浄化対象エリアとした。薬剤の注入井戸は14箇所、観測井戸はA、Bの2箇所設置した。注入井戸はφ10 cm、深さ9 mで有孔管を深度3～9 mの位置に設置した構造とした。

薬剤は主成分のグルコン酸ナトリウムと、窒素成分として尿素、リン成分としてリン酸二水素カリウムを重量比9.3 : 0.6 : 0.1で含み、さらにpH緩衝剤としてグルコン酸ナトリウムの1/3重量の炭酸水素ナトリウムを混合したものとした。この薬剤を0.5%の重量濃度となるように水道水で希釈して水槽に貯留し、配管を通じて注入井戸から重力沈降により注入した。注入は休日を除く昼夜連続作業で実施した。各注入井戸には水位センサーを設置し、既定の深度まで注入後自動的に止まるよう制御することで、薬剤が井戸から溢れないようにした。結果として、第1回工事では各井戸24～49 m³、合計505 m³を注入し、第2回工事では各井戸29～56 m³、合計534 m³を注入した。

3.2.3 地下水モニタリング

第1回、第2回工事共に、薬剤注入前に1回、注入完了後に8回(2回/月で4ヶ月間)の頻度で定期モニタリングを実施した。2箇所の観測井戸より地下水を採取し、以下に示す各種分析を行った。なお、採取した試料は、分析まで5°Cで冷蔵保存した。

3.2.3.1 化学分析

クロロエチレン類(TCE、cis-1,2-DCE、VC)濃度は、シングル四重極型質量選択検出器を搭載したガスクロマトグラフ(5977B、Agilent Technologies)を用い、公定法(ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析法、JIS K 0125 5.2.1)で測定した。pHはマルチ水質計(MM-43X、東亜ディーケーケー)で、酸化還元電位(ORP)はORP計(ORP Testr 10、ニッコー・ハンセン)で、全有機体炭素(TOC)濃度は全有機体炭素計(TOC-V CPN、島津製作所)で測定した。

3.2.3.2 DNA 抽出、リアルタイム PCR

地下水からの DNA 抽出及び精製は第 1 章 1.2.4.1 に準じた方法で行った。精製後の DNA を使用し、*Dehalococcoides* 属細菌に特異な 16S rRNA 遺伝子、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子を第 1 章 1.2.4.2 に準じたリアルタイム PCR 法により定量した。

3.3 浄化実証試験の結果

3.3.1 クロロエチレン類の浄化

観測井戸 A と B におけるクロロエチレン類濃度の経時変化を図 3-3 に示す。井戸 A、B 共に 1 回目の薬剤注入後に TCE 濃度が大きく低下し、基準値以下に達した。井戸 A ではそれに伴い *cis*-1,2-DCE と VC の濃度が上昇したが、井戸 B では VC の一時的な増加を除き、*cis*-1,2-DCE と VC の濃度に顕著な変化は見られなかった。その後、2 回目の注入前（浄化工事開始 491 日後）には井戸 B の TCE 以外が基準値を上回っていたが、2 回目の注入後には両井戸において全物質の濃度が速やかに低下した。620 日後には全ての物質が基準値以下となり、目標としたクロロエチレン類の浄化を達成した。

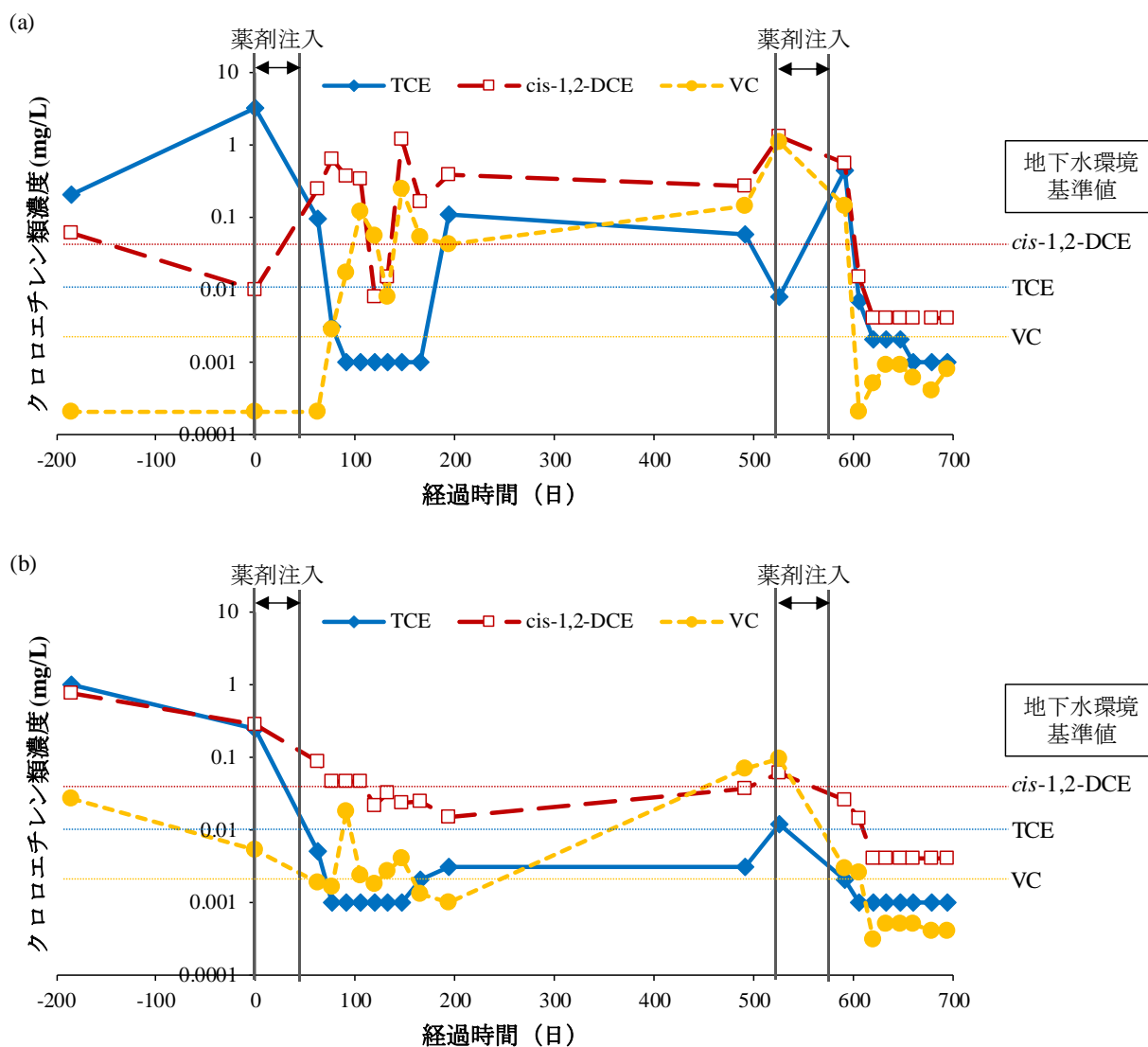


図 3-3 観測井戸 A (a) と観測井戸 B (b) におけるクロロエチレン類濃度の経時変化
(定量下限値は TCE : 0.001 mg/L、*cis*-1,2-DCE : 0.004 mg/L、VC : 0.0002 mg/L)

3.3.2 地下水質の変化

観測井戸 A と B における pH、ORP、TOC 濃度の経時変化をそれぞれ図 3-4a、b、c に示す。pH は 5.9 ~ 8.4 であり、おおむね中性の範囲であったが、薬剤の注入後に上昇した (図 3-4a)。ORP は工事開始時には約 100 mV であり、1 回目の注入後には上昇した (図 3-4b)。一方、2 回目の注入後には負の値に低下した。TOC 濃度は薬剤注入前には約 0.5 mg/L であったが、薬剤注入後に一時的に大きく上昇し、2 回目の注入後には最大 870 mg/L に達した (図 3-4c)。しかし、1 回目、2 回目共に、薬剤注入終了後に再度低下し、注入終了後約 120 日が経過すると注入前と同程度まで低下した。

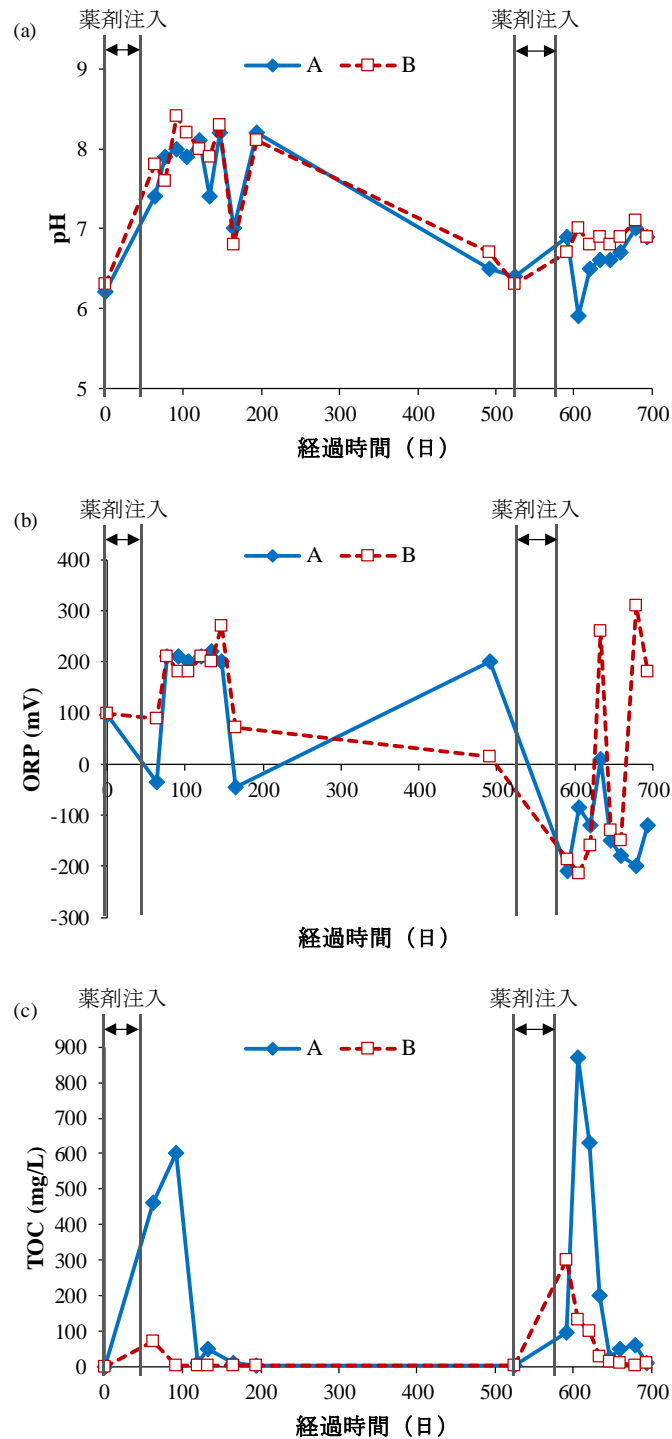


図 3-4 観測井戸 A と B における pH (a)、ORP (b)、TOC 濃度 (c) の経時変化

3.3.3 *Dehalococcoides* 属細菌数の変動

観測井戸 A と B における *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子数の経時変化を図 3-5 に示す。井戸 A、B 共に薬剤の注入に伴うクロロエチレン類の脱塩素化に対応して各遺伝子数が増加する傾向が見られた。井戸 A では、薬剤注入前には全ての標的遺伝子が非検出であったが、注入開始 120 日後に *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、及び *vcrA*、*bvcA* 遺伝子数が大きく増加し、194 日後には *tceA* 遺伝子数も増加した（図 3-5a）。注入 2 回目では、注入終了後間もなく各遺伝子数が大幅に増加したが、クロロエチレン類濃度の低下（図 3-3a）に呼応して、速やかに減少した。一方、井戸 B では注入 1 回目の後には各標的遺伝子数が徐々に増加した（図 3-5b）。2 回目の注入後には、最も低濃度であった *tceA* 遺伝子数が顕著に増加し、注入終了後には他の遺伝子数も一時的に増加したが、クロロエチレン類濃度の低下（図 3-3b）に伴い、全ての標的遺伝子数が減少した。

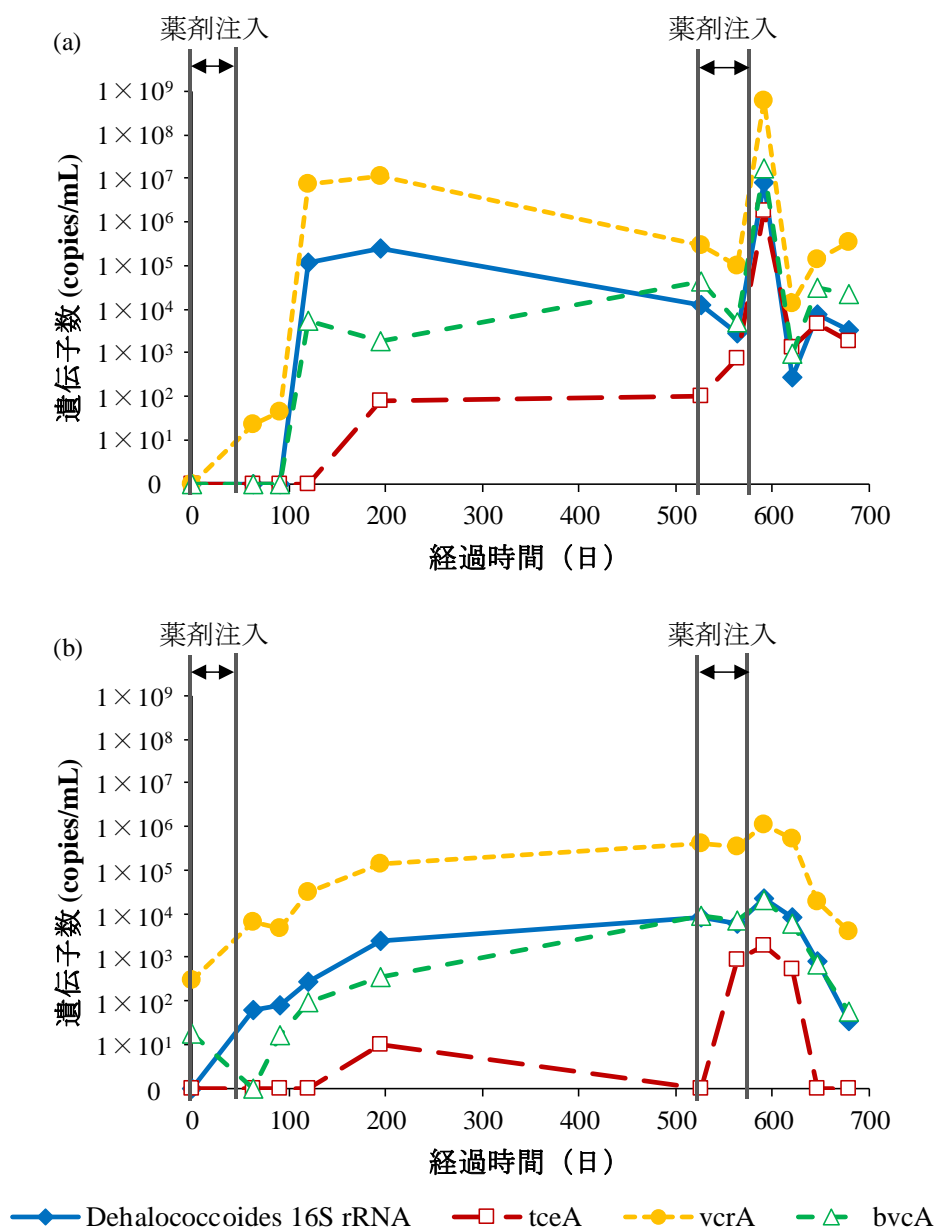


図 3-5 観測井戸 A (a) と観測井戸 B (b) における *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数、*tceA*、*vcrA*、*bvcA* 遺伝子数の経時変化

3.4 考察

3.4.1 クロロエチレン類汚染地下水の原位置浄化におけるグルコン酸の水素供与体としての有効性

2 回の薬剤注入による浄化実証の結果、冬季（1 月～2 月）に実施した 1 回目の薬剤注入では、TCE は一時的に基準値以下まで低下したものの、*cis*-1,2-DCE と VC の十分な低減には至らなかった（図 3-3a）。直接測定は行っていないが、冬季は外気温が低く、野外試験であるために注入薬剤の水温は外気温に近かったものと推測される。ORP の上昇（図 3-4b）にも反映されているように、水温が低かった冬季には注入薬剤中の溶存酸素（DO）濃度が高く、微生物の活性も低かったため、クロロエチレン類の脱塩素化に必要な嫌気状態が十分維持されず、完全には浄化が進行しなかった可能性がある。一方、夏季（6 月～8 月）に実施した 2 回目の薬剤注入では、希釈水の温度が高く、薬剤中の DO の量が少なく、さらに高水温で好気微生物の活動が活発化したために DO が消費されて ORP が低下し（図 3-4b）、十分な嫌気条件が維持されたと考えられる。その結果、*cis*-1,2-DCE と VC の脱塩素化も進行し、全てのクロロエチレン類が基準値以下となり、目標とした浄化が達成された。これらのことから、嫌気状態を維持しやすい夏季など暖かい時期を中心に薬剤注入を行うことにより、グルコン酸を主成分とする薬剤を用いたクロロエチレン類汚染地下水の浄化が可能であることが実証された。

浄化期間中、薬剤の注入後には A、B 両観測井戸共に、一時的に TOC 濃度が大きく上昇し、その後急激に減少した（図 3-4c）。観測井戸 B では上流側に多くの注入井戸があることから（図 3-1）、注入された薬剤の微生物による効率的な消費が行われなかったとすれば、複数の注入井戸、特に近傍の井戸から注入された薬剤が多少の拡散はあったとしても流下し、順次到達すると想定される。その場合は、観測井戸 A よりも長期に渡り TOC 濃度の上昇が継続するものと考えられる。しかし、A、B 両観測井戸で一時的に TOC 濃度の上昇が認められた期間はほぼ同じであったことから、主に地盤中の微生物による薬剤の分解で TOC 濃度が低下したものと考えられる。グルコン酸が嫌氣的に微生物分解される過程では多くの水素が生成することから（図 1-5）、本浄化実証のモニタリングでは直接測定してはいないものの、注入した薬剤中のグルコン酸が分解され、水素が生成したものと考えられる。さらに、クロロエチレン類と *Dehalococcoides* 属細菌の挙動から（図 3-3、3-5）、グルコン酸由来の水素を電子供与体として利用し、*Dehalococcoides* 属細菌がクロロエチレン類を脱塩素化することで、浄化が達成されたものと推察された。本浄化実証では他の微生物の挙動解析は実施していないため詳細は不明であるが、通常的地盤中には *Dehalococcoides* 属細菌以外にもクロロエチレン類を脱塩素化する微生物（図 0-1）が存在しており、それらも浄化に関与していた可能性は十分にある。第 1 章でグルコン酸を水素供与体として用いて構築した脱塩素化微生物集積系と、第 2 章で使用したクロロエチレン類で汚染されたサイトから採取した地下水では、*Dehalococcoides* 属に加えて、TCE の脱塩素化能力を有する *Dehalobacter* 属や *Geobacter* 属、*Sulfurospirillum* 属（Dolinová *et al.*, 2017）も検出されている。本浄化実証でもこれらの微生物群が TCE から *cis*-1,2-DCE への脱塩素化に関与した可能性があることから、今後、クロロエチレン類の脱塩素化に対する各種微生物群の寄与を明らかにすることも必要である。

3.4.2 グルコン酸が地下水質に与える影響

本浄化実証では pH は薬剤の注入後に上昇したが（図 3-4a）、これはグルコン酸の注入で予想される pH 低下を緩和するために緩衝剤として添加した、炭酸水素ナトリウムの影響であると考えられた。ただし、2 回目の注入前には初期と同程度の pH まで低下したことから、少なくともグルコン酸と pH 緩衝剤を共に使用した場合、薬剤由来の pH 変化は時間経過により回復するものと考えられる。

ORP は 1 回目の注入後に上昇し、2 回目の注入後に低下した (図 3-4b)。上述の通り、これらの変化には実施時期 (1 回目: 冬季 (1 月~2 月)、2 回目: 夏季 (6 月~8 月)) が関わっていることが示唆された。また、2 回目の注入後には何度か ORP が急上昇することがあったが、これらは台風の通過により大量の雨水が井戸に流入したことに起因すると考えられた。1 回目の注入後にグルコン酸由来の TOC 成分がほぼ完全に消費された後、時間経過と共に OPR が正の値に転じたため、2 回目の注入後ももう少し長期間モニタリングを継続すれば、ORP が注入前と同程度に戻る可能性はある。

また、TOC 濃度の測定結果と井戸の配置に関する前述の考察から、注入したグルコン酸が地盤中の微生物によって分解されたことが示唆された。そのため、地下水中にグルコン酸を注入しても長期間残留して地下水質に悪影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上のことを総合すると、グルコン酸を主成分とする薬剤の注入が地下水質に与える影響は一時的なものであり、時間経過により元の状態に回復可能なことが明らかになった。ただし、本浄化実証では地下水中の微生物群集の変化は調査しておらず、グルコン酸が微生物群集の構造や機能に与える影響に関しては更なる調査が必要である。

3.4.3 他の水素供与体に対するグルコン酸の優位性

クロロエチレン類汚染浄化のための水素供与体として用いられる、グルコン酸を含む様々な有機物が嫌気分解される際の、生成水素 1 kmol あたりの価格と効果持続期間を表 3-1 に示す。本浄化実証で使用したグルコン酸ナトリウムは、既往の浄化工事で実績のある乳酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、酪酸ナトリウムなどのカルボン酸塩に比べて生成水素 1 kmol あたりの価格が安価である。また、浄化工事で非常に多くの実績がある HRC と比較しても生成水素 1 kmol あたりの価格が約 1/5~1/3 と非常に安価である。一方、メタノールやエタノールなどのアルコール類はグルコン酸ナトリウムと比べて生成水素 1 kmol あたりの価格が約 1/20~1/10 とさらに安価であるが、これらの物質は地盤中での分解が速く、水素供与体としての寿命が 1~7 日と非常に短い。それらと比較して乳酸ナトリウムは地盤中における寿命が約 7 倍長く、またグルコン酸はその分解過程で乳酸を生成する (Sokatch and Gunsalus, 1957)。そのため、グルコン酸ナトリウムは乳酸ナトリウムと同等以上、すなわちアルコール類の 7 倍以上の寿命を有すると推測される。メタノールやエタノールは寿命が短いがゆえに拡散範囲が非常に狭く、注入井戸の数や注入回数が多くなる。寿命の差の約半分が拡散範囲の差であると仮定すると、注入井戸の数が 3 倍、注入回数が 7 倍になると想定されるため、注入作業に要するコストも含めると結果的にグルコン酸ナトリウムの方が安価になると見積もられる。以上のことから、本浄化実証で使用したグルコン酸はコスト面で他の水素供与体に比べて優位性を有する可能性が十分にあると考えられる。

様々な水素供与体を用いたクロロエチレン類汚染地下水の浄化実証における実績の比較を表 3-2 に示す。クロロエチレン類の初期濃度や汚染の範囲、サイトの地盤・地下水の状況などが各々の実証で異なるため一概には比較できないものの、HRC や植物油などを水素供与体を使用した場合は、本浄化実証と同程度あるいはそれ以上の期間が経過しても、全てのクロロエチレン類が基準値以下となるまでには浄化を達成できていない (中島ら, 2002; 本間ら, 2006; 上野ら, 2009; 鶴岡ら, 2017)。そのため、本浄化実証で使用したグルコン酸は浄化速度や効果の持続期間の面でも、他の水素供与体に比べて優位性を有する可能性が高いと考えられる。

表 3-1 様々な水素供与体が嫌気分解される際の生成水素 1 kmol あたりの価格と効果持続期間
(Leeson *et al.*, 2004; Singh and Kumar, 2007)

物質名	分子式	価格 (\$/kg)	生成水素 1 kmol あたりの価格 (\$/kmol-H)	水素供与体としての寿命
グルコン酸ナトリウム	C ₆ H ₁₁ NaO ₇	2.0	19.8	不明
乳酸ナトリウム	C ₃ H ₅ NaO ₃	2.2~4.4	20.6~41.2	7~60 日
ポリ乳酸エステル (HRC)	(C ₃ H ₄ O ₂) _n	11.0~15.4	66.1~92.6	9~18 ヶ月
プロピオン酸ナトリウム	C ₃ H ₅ NaO ₂	4.4~6.6	30.2~45.4	不明
酪酸ナトリウム	C ₄ H ₇ NaO ₂	4.4~6.6	24.3~36.4	7~60 日
メタノール	CH ₃ OH	0.2	1.2	1~7 日
エタノール	C ₂ H ₅ OH	0.4~0.6	1.7~2.1	1~7 日

表 3-2 様々な水素供与体を用いた浄化実証における実績の比較
(地下水環境基準値は PCE : 0.01 mg/L、TCE : 0.01 mg/L、*cis*-1,2-DCE : 0.04 mg/L、VC : 0.002 mg/L)

水素供与体	汚染物質	濃度 (mg/L)		浄化期間 (日)	文献
		浄化前	浄化後		
グルコン酸 ナトリウム	PCE	非検出		620	本研究
	TCE	0.24~3.2	地下水環境		
	<i>cis</i> -1,2-DCE	0.01~0.28	基準適合		
	VC	0.0002~0.0053			
HRC	PCE	0.28	0.01~0.1	約 550	中島ら, 2002
	TCE	0.1	0.01~0.1		
	<i>cis</i> -1,2-DCE	0.37	0.1~1		
	VC	0.001	データ不掲載		
植物油	PCE	0.49~2.4	地下水環境	770	本間ら, 2006
	TCE	0.49~0.64	基準適合		
	<i>cis</i> -1,2-DCE	0.56~1.9	0.37~1.6		
	VC	0~0.03	0.03~0.27		
有機酸主体 栄養剤	PCE	非検出	地下水環境	約 910	上野ら, 2009
	TCE	約 10	基準適合		
	<i>cis</i> -1,2-DCE	約 10			
	VC	約 0.01	0.01~0.1		
ポリ乳酸系 ポリマー	PCE	約 0.01	地下水環境	570	鶴岡ら, 2017
	TCE	約 0.01	基準適合		
	<i>cis</i> -1,2-DCE	0.1~1	0.01~0.1		
	VC	0.1~1	0.01~0.1		

3.5 要約

本章では、グルコン酸が実地下水汚染サイトにおけるクロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体として利用可能かを検証するため、TCE と *cis*-1,2-DCE、VC で汚染された地下水汚染サイトでグルコン酸注入による浄化実証と地下水質のモニタリングを行った。その結果、グルコン酸の注入により、クロロエチレン類の脱塩素化を進める主要な微生物である *Dehalococcoides* 属細菌が増殖し、620 日でクロロエチレン類濃度が全て基準値以下となり、浄化が達成された。グルコン酸の注入後には地下水質（pH、ORP、TOC 濃度）の変化が見られたが、その影響は一時的なものであり、時間経過により地下水質は元の状態に回帰した。グルコン酸は、水素供与体として用いられる他のカルボン酸塩と比べて生成水素 1 kmol あたりの価格が安価であり、アルコール類よりも寿命が長いこと、コスト面で優位性を有する可能性が十分にある。また、サイトの状況が異なるため一概には比較できないものの、本浄化実証では他の水素供与体を使用した事例に比べて短期間で浄化を達成したこと、グルコン酸は浄化速度や効果の持続性の面でも他の水素供与体に対して優位性を有する可能性が高い。すなわち、グルコン酸は、パイロットスケールの浄化実証でもクロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体として有効であり、他の水素供与体に対して優位性を有することが示された。

総括ならびに結論

産業利用に伴って漏出したクロロエチレン類による土壌及び地下水の汚染が各地で確認されている。クロロエチレン類は発がん性や生殖毒性を有することから、その土壌・地下水汚染は大きな社会的問題となっており、適切な浄化対策が求められている。クロロエチレン類汚染の浄化技術としては、地盤中に存在する微生物を利用したバイオレメディエーションが実用化されている。特に経済性に優れた嫌気性のバイオレメディエーションにおいては、土壌や地下水中の PCE や TCE は、嫌気環境下で有機物の分解によって生じる水素を電子供与体、クロロエチレン類を電子受容体とした逐次的な脱塩素化反応により、DCE、VC を経由して無害なエチレンやエタンへと変換される。様々な細菌がクロロエチレン類を嫌氣的に脱塩素化することが知られているが、DCE 以降を脱塩素化できるのは主に *Dehalococcoides* 属細菌に限られるため、脱塩素化を利用した浄化においては *Dehalococcoides* 属細菌を中心とした脱塩素化微生物を効率的に増殖・活性化させ、その機能を十分に発揮させることが重要である。脱塩素化微生物を増殖・活性化させるためには、強い嫌気環境の形成に寄与し、クロロエチレン類脱塩素化の水素供与体として働く有機物の投入が不可欠となる。既往研究では乳酸やポリ乳酸など様々な有機物の利用が検討されているが、我々は、新たな水素供与体の候補としてグルコン酸に着目した。グルコン酸はこれまでにクロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体としての利用例はないが、その分解過程で乳酸を生成するため、水素供与体として作用することができ、乳酸よりも効果が長期間持続する可能性がある。また、乳酸やポリ乳酸に比べて解離し得る電子当量あたりの価格が安価であるため、バイオレメディエーションを低コスト化できる可能性もある有望な水素供与体の候補である。

本研究では、クロロエチレン類のバイオレメディエーションのための新たな水素供与体として、グルコン酸の有効性を明らかにすることを目的とした一連の検討を実施した。その過程で得られた結果をもとに、水素供与体としてのグルコン酸の適用可能性を考察した。

第1章では、グルコン酸のクロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体としての有効性を検証することを目的として、グルコン酸を唯一の水素供与体として添加し、TCE を脱塩素化する微生物集積系の構築を試みた。その結果、構築した集積系では、植え継ぎを繰り返しても TCE から VC への脱塩素化ならびに VC の消失が安定して生じることが確認され、グルコン酸が TCE 脱塩素化の水素供与体として利用可能であることが示された。他方、微生物叢の解析結果から、本研究で構築した集積系は、乳酸やメタノールなど、他の水素供与体を用いた既往研究の集積系とは異なる独特の微生物構成を有していることが明らかとなった。微生物叢に占める *Dehalococcoides* 属や他の脱塩素化微生物の割合は少なかった一方、*Trichococcus* 属と *Malikia* 属が最も優占しており、これらの微生物がグルコン酸を分解し、クロロエチレン類の脱塩素化のための嫌気環境の形成と水素供給に大きく寄与していたと推察された。また、グルコン酸ナトリウムの添加濃度を最適化することにより、脱塩素化微生物の割合をさらに高め、集積系のクロロエチレン類の脱塩素化能力を向上できる可能性があると考えられた。

第2章では、グルコン酸を水素供与体として用いて、多種多様な地下水に対してもクロロエチレン類の嫌気分解を促進し、*cis*-1,2-DCE や VC を残存させることなく完全に脱塩素化することが可能かどうか検証することで、その汎用性を評価した。クロロエチレン類で汚染された異なるサイトから採取した

様々な微生物叢を持つ地下水を使用し、唯一の水素供与体としてグルコン酸を用いて TCE の脱塩素化試験を実施した結果、脱塩素化速度は地下水により異なったものの、使用した 5 種類の地下水全てにおいてクロロエチレン類の完全脱塩素化が達成された。全ての地下水で脱塩素化の進行に伴ってグルコン酸由来の DOC 濃度が減少し、*Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数と *vcrA* 遺伝子数が大きく増加したことから、グルコン酸の分解により発生した水素を *Dehalococcoides* が利用し、クロロエチレン類の脱塩素化が進行したことが示唆された。また、元々は脱塩素化能力が低く、TCE の完全脱塩素化に長い期間を要した地下水に対しても、グルコン酸の添加を繰り返すことで、脱塩素化に関連する全ての遺伝子数が大きく増加し、有害な代謝物である VC を長期蓄積することなく、完全脱塩素化を速やかに進行させることが可能となった。以上より、グルコン酸は異なる性状や微生物叢を持つ地下水に添加しても、TCE をはじめとしたクロロエチレン類の嫌気分解を促進し、クロロエチレン類汚染環境の浄化で求められている完全脱塩素化を可能とする、汎用性の高い有望な水素供与体であることが示された。

第 3 章では、グルコン酸が実地下水汚染サイトにおいてもクロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体として利用可能かを検証するため、TCE と *cis*-1,2-DCE、VC で汚染された地下水汚染サイトでグルコン酸注入による浄化実証と地下水質のモニタリングを行った。その結果、グルコン酸の注入により、クロロエチレン類の脱塩素化を担う主要な微生物である *Dehalococcoides* 属細菌の増殖が認められ、620 日でクロロエチレン類濃度が全て基準値以下となる浄化目標が達成された。グルコン酸の注入後には地下水質 (pH、ORP、TOC 濃度) の変化が見られたが、その影響は一時的なものであり、時間の経過に伴って地下水質は元の状態に回帰した。すなわち、グルコン酸は、パイロットスケールの浄化実証でも、クロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体として有効であることが検証された。サイトの状況が異なるため一概には比較できないものの、本浄化実証では他の水素供与体を使用した事例に比べて短期間で浄化を達成したことから、浄化速度や効果の持続性の面でも他の水素供与体に対して優位性を有する可能性が高いものと考えられた。

以上の一連の研究から、グルコン酸は、異なる性状や微生物叢を持つ地下水に対して、*Dehalococcoides* 属細菌をはじめとしたクロロエチレン類の脱塩素化に関与する微生物群を増殖・活性化させ、完全脱塩素化を可能とする効果的な水素供与体であることが示された。そして、実地下水汚染サイトにおいてグルコン酸注入による浄化実証を行った結果、既往の水素供与体と比較して短期間でクロロエチレン類の浄化を達成し、実工事における有効性や優位性も確認することができた。これらのことから、グルコン酸を用いることでクロロエチレン類のバイオレメディエーションの工期を短縮し、低コスト化できる可能性が高く、水素供与体としての適用可能性は大きいと考えられる。また、グルコン酸の添加により地下水中の微生物叢は、クロロエチレン類の脱塩素化に適した特有の構成に変化することが判明した。このように、これまでに検討されることがなかった、クロロエチレン類脱塩素化のための水素供与体としてのグルコン酸の性能を定量的に評価し、その効果が発揮されるメカニズムの一端を解明することができたという点で、非常に有用な知見が得られたと言える。

一方、本研究においてはグルコン酸の添加量に関する詳細な検討は実施できていない。地下水中の微生物叢や含まれる有機物、他の電子受容体、共存汚染物質といった、各サイトの条件に応じた適切なグルコン酸の添加量を更なる研究により見出すことができれば、*Dehalococcoides* 属細菌を含む脱塩素化に関与する微生物の割合をさらに高め、より効率的なクロロエチレン類汚染の浄化を達成できると考えら

れる。第1章ではグルコン酸を水素供与体として構築した集積系の微生物叢を詳細に解析したが、他の地下水を用いた場合や、実汚染サイトにおける微生物叢の動態についても今後調査を行い、グルコン酸による浄化促進のメカニズムをより詳細に理解していくことも重要であろう。また、近年はバイオオーグメンテーション（外部で予め培養した分解微生物を汚染地域に導入して浄化を行う手法）の実用化に向けた研究が進められていることから、*Dehalococcoides* 属細菌の導入によるバイオオーグメンテーションにおいてもグルコン酸が有効であるか検証していくことも、今後の研究課題である。今後も、実汚染現場においてグルコン酸の注入によるクロロエチレン類の浄化実績を積み重ねていくことで、より安全・安心な土地の利用や人間の健康な生活に貢献できる技術の確立が期待できる。

参考文献

- Aulenta, F., Pera, A., Rossetti, S., Papini, M. P., and Majone, M.** (2007) Relevance of side reactions in anaerobic reductive dechlorination microcosms amended with different electron donors. *Water Research*, 41(1), 27-38.
- Aziz, C. E., Wymore, R. A., and Steffan, R. J.** (2013) Bioaugmentation considerations. In: Stroot, H. F., Leeson, A., and Ward, C. H. (Eds.) *Bioaugmentation for Groundwater Remediation*. Springer Science and Business Media, New York, USA, 141-169.
- Boffetta, P., Matisane, L., Mundt, K. A., and Dell, L. D.** (2003) Meta-analysis of studies of occupational exposure to vinyl chloride in relation to cancer mortality. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 29(3), 220-229.
- Bradley, P. M.** (2003) History and ecology of chloroethene biodegradation: a review. *Bioremediation Journal*, 7(2), 81-109.
- Burston, M. W., Nazari, M. M., Bishop, P. K., and Lerner, D. N.** (1993) Pollution of groundwater in the Coventry region (UK) by chlorinated hydrocarbon solvents. *Journal of Hydrology*, 149, 137-161.
- Cañete-Rodríguez, A. M., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Hornero, J. E., Ehrenreich, A., Liebl, W., and García-García, I.** (2016) Gluconic acid: properties, production methods and applications—an excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process Biochemistry*, 51(12), 1891-1903.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., and Knight, R.** (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(1), 4516-4522.
- Carr, C. S. and Hughes, J. B.** (1998) Enrichment of high-rate PCE dechlorination and comparative study of lactate, methanol, and hydrogen as electron donors to sustain activity. *Environmental Science and Technology*, 32(12), 1817-1824.
- Carter, J. M., Lapham, W. W., and Zogorski, J. S.** (2008) Occurrence of volatile organic compounds in aquifers of the United States. *Journal of the American Water Resources Association*, 44(2), 399-416.
- Delgado, A. G., Kang, D. W., Nelson, K. G., Fajardo-Williams, D., Miceli, J. F., Done, H. Y., Popat, S. C., and Krajmalnik-Brown, R.** (2014) Selective enrichment yields robust ethene-producing dechlorinating cultures from microcosms stalled at *cis*-dichloroethene. *PLOS ONE*, 9(6), e100654.
- Dolinová, I., Štrojsová, M., Černík, M., Němeček, J., Macháčková, J., and Ševců, A.** (2017) Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13262-13283.
- Duhamel, M., and Edwards, E. A.** (2006) Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by *Dehalococcoides*. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(3), 538-549.
- Freeborn, R. A., West, K. A., Bhupathiraju, V. K., Chauhan, S., Rahm, B. G., Richardson, R. E., and Alvarez-Cohen, L.** (2005) Phylogenetic analysis of TCE-dechlorinating consortia enriched on a variety of electron donors. *Environmental Science and Technology*, 39(21), 8358-8368.
- Futagami, T., Okamoto, F., Hashimoto, H., Fukuzawa, K., Higashi, K., Nazir, K. H. M. N. H., Wada, E.,**

- Suyama, A., Takegawa, K., Goto, M., Nakamura, K., and Furukawa, K.** (2011) Enrichment and characterization of a trichloroethene-dechlorinating consortium containing multiple “*Dehalococcoides*” strains. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(7), 1268-1274.
- Gros, J., Reddy, C. M., Aeppli, C., Nelson, R. K., Carmichael, C. A., and Arey, J. S.** (2014) Resolving biodegradation patterns of persistent saturated hydrocarbons in weathered oil samples from the *Deepwater Horizon* disaster. *Environmental Science and Technology*, 48(3), 1628-1637.
- Jo, Y. J., Lee, J. Y., Yi, M. J., Kim, H. S., and Lee, K. K.** (2010) Soil contamination with TCE in an industrial complex: contamination levels and implication for groundwater contamination. *Geosciences Journal*, 14(3), 313-320.
- Khattak, S., K-Moghtader, G., McMartin, K., Barrera, M., Kennedy, D., and Koren, G.** (1999) Pregnancy outcome following gestational exposure to organic solvents: a prospective controlled study. *The Journal of the American Medical Association*, 281(12), 1106-1109.
- Koenigsberg, S. S., Sandefur, C. A., Lopus, K. A., and Pasrich, G.** (2002) Facilitated desorption and incomplete dechlorination: observations from 350 applications of HRC. In: Gavaskar, A. R., and Chen, A. S. C. (Eds.) *Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds – 2002. Proceedings of the Third International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds* (Monterey, CA, May 2002), 2B-56.
- Leeson, A., Beevar, E., Henry, B., Fortenberry, J., and Coyle, C.** (2004) Principles and practices of enhanced anaerobic bioremediation of chlorinated solvents. Air Force Center for Environmental Excellence and the Environmental Security Technology Certification Program, Arlington, Virginia, USA.
- Mattes, T. E., Alexander, A. K., and Coleman, N. V.** (2010) Aerobic biodegradation of the chloroethenes: pathways, enzymes, ecology, and evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 445-475.
- Mészáros, É., Sipos, R., Pál, R., Romsics, C., and Márialigeti, K.** (2013) Stimulation of trichloroethene biodegradation in anaerobic three-phase microcosms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84, 126-133.
- Miura, T., Yamazoe, A., Ito, M., Ohji, S., Hosoyama, A., Takahata, Y., and Fujita, N.** (2015) The impact of injections of different nutrients on the bacterial community and its dechlorination activity in chloroethene-contaminated groundwater. *Microbes and Environments*, 30(2), 164-171.
- Miyake, Y., Sakoda, A., Yamanashi, H., Kaneda, H., and Suzuki, M.** (2003) Activated carbon adsorption of trichloroethylene (TCE) vapor stripped from TCE-contaminated water. *Water Research*, 37(8), 1852-1858.
- Pant, P. and Pant, S.** (2010) A review: advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *Journal of Environmental Sciences*, 22(1), 116-126.
- Rainey, F. A.** (2015) *Trichococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-7.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., and Larroche, C.** (2006) Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 185-195.
- Rastkari, N., Yunesian, M., and Ahmadkhanika, R.** (2011) Exposure assessment to trichloroethylene and perchloroethylene for workers in the dry cleaning industry. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(4), 363-367.
- Richardson, R. E., Bhupathiraju, V. K., Song, D. L., Goulet, T. A., and Alvarez-Cohen, L.** (2002) Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a

combination of molecular techniques. *Environmental Science and Technology*, 36(12), 2652-2662.

- Ritalahti, K. M., Amos, B. K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S. S., and Löffler, F. E.** (2006) Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2765-2774.
- Saiyari, D. M., Chuang, H. P., Senoro, D. B., Lin, T. F., Whang, L. M., Chiu, Y. T., and Chen, Y. H.** (2018) A review in the current developments of genus *Dehalococcoides*, its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater. *Sustainable Environment Research*, 28(4), 149-157.
- Sang, N. N., Soda, S., Inoue, D., Sei, K., and Ike, M.** (2009) Effects of intermittent and continuous aeration on accelerative stabilization and microbial population dynamics in landfill bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(4), 336-343.
- Schneidewind, U., Haest, P. J., Atashgahi, S., Maphosa, F., Hamonts, K., Maesen, M., Calderer, M., Seuntjens, P., Smidt, H., Springael, D., and Dejonghe, W.** (2014) Kinetics of dechlorination by *Dehalococcoides mccartyi* using different carbon sources. *Journal of Contaminant Hydrology*, 157, 25-36.
- Singh, O. V. and Kumar, R.** (2007) Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(4), 713-722.
- Sokatch, J. T. and Gunsalus, I. C.** (1957) Aldonic acid metabolism. I. Pathway of carbon in an inducible gluconate fermentation by *Streptococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 73(4), 452-460.
- Spring, S., Wagner, M., Schumann, P., and Kämpfer, P.** (2005) *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate- and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 621-629.
- Strepis, N., Sánchez-Andrea, I., van Gelder, A. H., van Kruistum, H., Shapiro, N., Kyrpides, N., Göker, M., Klenk, H. P., Schaap, P., Stams, A. J. M., and Sousa, D. Z.** (2016) Description of *Trichococcus ilyis* sp. nov. by combined physiological and *in silico* genome hybridization analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10), 3957-3963.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., and Decker, K.** (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(1), 100-180.
- Tiehm, A. and Schmidt, K. R.** (2011) Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes – aspects of field application. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 415-421.
- Tsukahara, T., Koyama, H., Okada, M., and Ushida, K.** (2002) Stimulation of butyrate production by gluconic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria. *The Journal of Nutrition*, 132(8), 2229-2234.
- Wartenberg, D., Reyner, D., and Scott, C. S.** (2000) Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence. *Environmental Health Perspectives*, 108(2), 161-176.
- Wen, L. L., Zhang, Y., Pan, Y. W., Wu, W. Q., Meng, S. H., Zhou, C., Tang, Y., Zheng, P., and Zhao, H. P.** (2015) The roles of methanogens and acetogens in dechlorination of trichloroethene using different electron donors. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(23), 19039-19047.
- Wen, L. L., Yang, Q., Zhang, Z. X., Yi, Y. Y., Tang, Y., and Zhao, H. P.** (2016) Interaction of perchlorate and trichloroethene bioreductions in mixed anaerobic culture. *Science of the Total Environment*, 571, 11-17.

- Yoon, J. H., Jung, J., Chung, H. H., and Lee, M. J.** (2002) EPR characterization of carbonate ion effect on TCE and PCE decomposition by gamma-rays. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 253(2), 217-219.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J., and Hwang, S.** (2005) Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(6), 670-679.
- Zhang, C., Yang, H., Yang, F., and Ma, Y.** (2009) Current progress on butyric acid production by fermentation. *Current Microbiology*, 59(6), 656-663.
- Zhou, J., Bruns, M. A., and Tiedje, J. M.** (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 316-322.
- Ziv-El, M., Delgado, A. G., Yao, Y., Kang, D. W., Nelson, K. G., Halden, R. U., and Krajmalnik-Brown, R.** (2011) Development and characterization of DehaloR², a novel anaerobic microbial consortium performing rapid dechlorination of TCE to ethene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 1063-1071.
- 上木厚子, 遠藤銀朗 (1993) 偏性嫌気細菌の分類と培養. 上木勝司, 永井史郎, 嫌気微生物学. 養賢堂. pp. 285-306.
- 上野俊洋, 大口誠賜, 石田浩昭 (2009) 嫌気性バイオレメディエーションによる塩素化エチレン類および1,2-ジクロロエタン複合汚染サイトの浄化事例, 第15回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会, 519-524.
- 上野俊洋, 奥津徳也, 水本正浩, 石田浩昭 (2010) 塩素化エチレンを対象とした嫌気性バイオレメディエーション技術の開発と現場適用, 環境バイオテクノロジー学会誌, 10(2), 79-89.
- 鶴岡佑樹, 虫明晋哉, 伊藤浩, 小瀧光生, 篠田功 (2017) バイオスティミュレーション用薬剤の改良 実汚染サイトへの適用検討, 第23回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会, 628-633.
- 中島誠, 武曉峰, 茂野俊也, 内山裕夫, 染谷孝, 西垣誠 (2002) ポリ乳酸エステルを用いた嫌気性微生物分解の促進による地下水中塩素化脂肪族炭化水素 (CAHs) の浄化, 地下水学会誌, 44(4), 295-314.
- 中村寛治, 水本正浩, 上野俊洋, 石田浩昭 (2006) 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, 43, 119-125.
- 本間憲之, 合田雷太, 加藤洋一 (2006) 植物油によるVOC汚染サイトの浄化実施例, 第12回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会, 715-720.

業績一覧

(1) 学術論文 (○：博士論文を構成する論文)

1. ○**Fujii, Y., Mitsuka, K., Ogata, H., Inoue, D., and Ike, M.** (2020) Development and characterization of a chloroethenes-dechlorinating consortium using gluconate as a hydrogen donor. *Journal of Water and Environment Technology*, 18(4), 212-225.
2. ○**藤井雄太, 三塚和弘, 佐藤祐輔, 緒方浩基, 井上大介, 池道彦** (2020) クロロエチレン類による地下水汚染サイトのグルコン酸を用いた生物学的浄化, 土木学会論文集 G (環境), 76(7), 269-276.
3. ○**藤井雄太, 三塚和弘, 緒方浩基, 井上大介, 池道彦** (2021) クロロエチレン類の脱塩素化に用いる水素供与体としてのグルコン酸の汎用性, 水環境学会誌, 印刷中.

(2) 発表

1. **藤井雄太, 三塚和弘, 佐藤祐輔, 緒方浩基, 井上大介, 池道彦**, クロロエチレン類による地下水汚染サイトのグルコン酸を用いた生物学的浄化, 第 57 回環境工学研究フォーラム, A31, 2020 年 12 月 10 日.

(3) 受賞

1. **藤井雄太**, 第 57 回環境工学研究フォーラム論文賞, 2021 年 1 月 22 日.

謝辞

本研究の遂行および本論文作成にあたり、終始懇切なる御指導と御高配を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 教授 池道彦博士に心から深く感謝の意を表します。

本研究の論文査読にあたり、多くの貴重な御助言を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 教授 近藤明博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行および本論文作成にあたり、絶えず懇切丁寧な御指導と御助言を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 准教授 井上大介博士に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、貴重な御助言を頂きました、常葉大学 社会環境学部 社会環境学科 講師 黒田真史博士（旧所属：大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 助教）に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、多くの御支援を頂きました、山岡ゆり子氏（旧所属：大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 技官）、事務補佐員 森田真紀氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、分析手法に関して親身な御指導と御助言を頂きました、静岡大学 グリーン科学技術研究所 石澤秀紘博士（旧所属：大阪大学大学院 工学研究科 環境・エネルギー工学専攻）に心から感謝致します。

本研究の遂行および本論文作成にあたり、絶えず御親切な御指導ならびに多大なる御助言を賜りました、株式会社大林組 技術研究所 自然環境技術研究部 緒方浩基氏に深く感謝の意を表します。

本研究における共同研究者として、実験データの取得に関して数々のご助言やご協力を頂きました、株式会社大林組 技術研究所 研究支援推進部 三塚和弘氏に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行および本論文作成にあたり、浄化実証の実施やデータのご提供に多大なるご協力を頂きました、株式会社大林組 エンジニアリング本部 環境技術第一部 佐藤祐輔氏に深く感謝致します。

本研究の遂行および本論文作成にあたり、絶えず御配慮と御援助を頂き、貴重な御助言を賜りました、株式会社大林組 技術研究所 千野裕之博士に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行および本論文作成にあたり、数々の有益な御助言を賜りました、株式会社大林組 エンジニアリング本部 環境技術第一部 西田憲司氏、技術研究所 自然環境技術研究部 四本瑞世氏、技術本部 未来技術創造部 大島義徳氏に厚く御礼申し上げます。

研究活動全般に渡って懇切なる御指導、御協力を賜りました、株式会社大林組の皆様心より感謝の意を表します。

また、研究活動を支え常に暖かい激励を下さいました、池研究室の諸兄・諸姉と、良き刺激を与えてくれた友人達に深く感謝致します。

最後に、研究生活に深い理解を示し、終始多大なるご支援を賜りました家族に心より感謝致します。