

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15131

研究課題名（和文）微生物共生系を活用した土壌吸着クロロエチレン類の革新的浄化手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a remediation method for soil adsorbed chloroethenes using microbial consortium

研究代表者

吉川 美穂（Yoshikawa, Miho）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・地質調査総合センター・主任研究員

研究者番号：90563734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではクロロエチレン類を完全浄化できる細菌Dehalococcoidesと共生可能なグルコース発酵微生物による汚染物質の溶出促進効果で、土壌に吸着しているクロロエチレン類の浄化促進が可能であるかを検証した。土壌からのクロロエチレン類溶出量の測定方法やクロロエチレン類の反応速度論的解析を検討し、微生物による土壌に吸着したクロロエチレン類の浄化を評価する手法を開発した。また、6種類の土壌および3種類の微生物共生系を用いて土壌に吸着しているクロロエチレン類を溶出・脱塩素化するためのpHや炭素源の最適条件を検討し、同じ微生物共生系を用いても土壌の種類により反応速度が大きく異なることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物による力を活用したクロロエチレン類の浄化に関する研究は低コスト・低環境負荷などの観点から盛んに行われてきているが、浄化技術の普及には至っていない。その最大の原因は土壌粒子へ汚染物質がトラップされ、微生物が利用できないことにある。しかし、クロロエチレン類の微生物による浄化に関する既往の研究は水を媒体としたものが多く土壌を媒体としたものはほとんどなかった。本研究は、同じ微生物共生系を利用しても土壌の種類により大きく浄化速度が異なることを明らかとした点に意義がある。また、土壌存在下での浄化を促進するための諸条件を解明することができ、この成果を基礎データとして浄化技術の開発に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the possibility of promoting the dechlorination of chloroethenes adsorbed on soil by promoting the elution of the contaminants by glucose-fermenting microorganisms that can coexist with Dehalococcoides, bacteria capable of completely dechlorinating and detoxifying chloroethenes. We developed a method to evaluate the dechlorination of chloroethenes adsorbed on soil by measuring the concentrations of chloroethenes eluted from the soil and analyzing the reaction kinetics of dechlorination of chloroethenes. We also determined the optimum conditions such as pH and carbon sources for eluting and dechlorinating chloroethenes adsorbed on soil, using six types of soil and three types of microbial consortia, and clarified that the reaction rates varied greatly depending on the type of soil even when the same microbial consortium was used.

研究分野：地下水・土壌汚染

キーワード：バイオレメディエーション クロロエチレン類 土壌 吸着 グルコース 発酵

## 1. 研究開始当初の背景

国内に潜在する十数万ヶ所の揮発性有機化合物 (VOCs) による地下水・土壌汚染の殆どは、クロロエチレン類による汚染である。微生物の力を活用して土壌・地下水のクロロエチレン類の汚染を浄化する手法はコストが低く、また環境にも優しいという利点から関連研究が国内外で盛んに行われてきている。しかし、微生物を利用した浄化手法の採用率は汚染水に対しては30%に上るものの、汚染土壌に対してはわずか3%である。この最大の要因は、土壌粒子に吸着された汚染物質はトラップされ、微生物による利用が困難であることにある。土壌汚染の微生物による浄化の研究を通じて、クロロエチレン類を完全浄化可能な *Dehalococcoides* との共生菌がグルコースを発酵することで土壌構造が変化する傾向が見られ、この変化によりクロロエチレン類の土壌からの溶出と浄化が促進できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、クロロエチレン類を完全浄化・無毒化できる細菌 *Dehalococcoides* と共生可能なグルコースを発酵する微生物による土壌構造の変化と汚染物質の溶出促進効果で、土壌の浄化促進が可能であるかを検証し、新たな浄化手法を確立することを最終目的とし実施した。具体的には、グルコースの発酵によりどのような土壌構造の変化が生じるのか、グルコースの発酵によりクロロエチレン類の溶出が促進するのか、グルコースの発酵により生じた一連の流れが脱塩素化をどの程度促進するのか、どの微生物のどのような働きが一連の流れに関与しているのかを検証した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. グルコースの発酵による土壌構造の変化

6種類の土壌および3種類の微生物共生系を用いた培養試験を実施した。土壌は汚染サイトから採取した土壌4種類および市販の土壌2種類とし、これらを2 mmメッシュの篩でふるい均質化し風乾した後、ガンマ線滅菌して使用した。微生物共生系は研究室内で培養・保管してきた、*Dehalococcoides* とグルコースを発酵すると想定される微生物が混在しているものを用いた。土壌、微生物共生系、グルコースおよびテトラクロロエチレンを混合し、嫌気条件下で培養した。また、*Lactobacillus* 等のグルコースを発酵する微生物の追添加による実験も行った。一定期間経過後に、土壌構造に変化が生じるかを確認した。

### 3-2. グルコースの発酵によるクロロエチレン類の溶出

3-1.の土壌および微生物共生系を用いて、クロロエチレン類の溶出量を測定する試験を行った。グルコースの代わりに酢酸や乳酸等の炭素源を添加した条件でも試験を行い、比較を行った。また、溶出・脱塩素化の促進を目的として土壌からの水抽出液を添加した条件でも試験を行った。土壌へ吸着しているクロロエチレン類の溶出量の測定方法は、加温とエタノール抽出、固相マイクロ抽出 (SPME) で検討した。得られた検体を GC もしくは GCMS で分析し評価した。

### 3-3. グルコースの発酵によるクロロエチレン類の脱塩素化

3-2.と同じ条件下で培養試験を行い、各条件下における脱塩素化速度定数の算出を行った。添加したテトラクロロエチレンおよびその生成物であるトリクロロエチレン、*cis*-ジクロロエチレン、クロロエチレン、エチレン、エタンの濃度を GC および GC-MS で測定した。クロロエチレン類の反応速度式を構築し、得られたクロロエチレン類の濃度データをヘンリー定数で換算して脱塩素化反応速度定数を算出した。

### 3-4. 脱塩素化促進に関与する微生物の働き

3-3.の試験で脱塩素化速度に差が見られた条件の培養液を用いて、微生物遺伝子の解析を行った。DNA よりも高精度に脱塩素化に関与する微生物を特定できると考え、RNA の抽出、解析を行った。経時的に土壌粒子を含む培養液をシリンジで採取して LifeGuard

Soil Preservation を用いて保存した後、RNA 抽出を行った。抽出した RNA の一部を用いて cDNA を合成し、16S rRNA のアンプリコンシーケンスを行った。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. グルコースの発酵による土壌構造の変化

本研究で使用した土壌では事前の試験で確認されたようなグルコース発酵に伴う土壌構造の変化は確認されなかった。グルコースを発酵する微生物の追添加や、培養温度等条件を変更したが状況は変化しなかった。本研究では土壌を一度風乾していること、微生物共生系の微生物群集が変化していること等が事前の試験と異なり、これらが土壌構造の変化を目視できなかつた要因と考えられる。そのため、グルコースの添加により土壌からのクロロエチレン類の溶出促進効果により浄化が促進するかに重きを置き、研究を進めることとした。

##### 4-2. グルコースの発酵によるクロロエチレン類の溶出

クロロエチレン類の溶出量を測定する手法として、エタノール抽出よりも SPME による抽出・測定の方がより簡便に実施できると考えられた。培養瓶のヘッドスペースガスを GC-MS で測定したところ、溶出量の定量に必要なクロロエチレン類やエチレン・エタンの他に、グルコースを添加した条件下では発酵産物と考えられるアルコール類が検出され、これが溶出促進に繋がった可能性が考えられた。

##### 4-3. グルコースの発酵によるクロロエチレン類の脱塩素化

クロロエチレン類の分解促進効果を反応速度論的に解析するのに必要な、反応速度式の構築を行った。従来の反応速度式では部分的な分解反応しか考慮できていなかったが、本反応速度式により、テトラクロロエチレンからエチレンへの 4 段階の逐次分解全てを考慮することが出来るようになった。R プログラムを用いて実験データを本反応速度式へフィッティングすることにより、反応速度定数を算出し、試験条件間で反応速度を定量比較評価することが可能となった。さらに、得られた反応速度定数をパラメーターとしたクロロエチレン類の分解シミュレーションを実現した。この評価手法を用いて、グルコースの発酵による脱塩素化速度の違い、および pH 等の諸条件、土壌の種類に応じた脱塩素化速度の違いを定量評価することができた。また、脱塩素化速度が速い土壌からの水抽出液を他の土壌を用いた培養瓶に添加すると、土壌の種類によって脱塩素化が促進されるケースと遅延するケースがあることが明らかとなった。

##### 4-4. 脱塩素化促進に関与する微生物の働き

何れの炭素源や土壌の条件においても、*Dehalococcoides* が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ことを確認した。一方で、得られた微生物種のデータが膨大であり、土壌からのクロロエチレン類の溶出を引き起こす微生物種の特定には至らなかった。今後群集構造データの詳細な解析を行うと共に必要に応じてメタトランスクリプトーム解析を進め、微生物学的視点から土壌粒子存在下でのクロロエチレン類の溶出・浄化メカニズムの解明につなげる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miho Yoshikawa, Yoshishige Kawabe, Ming Zhang
2. 発表標題 Bioremediation for the soils contaminated with chloroethenes - Microbial reductive dechlorination in the suspensions with urban soils
3. 学会等名 22nd World Congress of Soil Science (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川辺 能成  (Kawabe Yoshishige)	早稲田大学・理工学術院 創造理工学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------