

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310041

研究課題名(和文)

嫌気微生物群を用いた透過性反応浄化壁による芳香族塩素化合物分解の解析モデルの構築

研究課題名(英文)

Development of model for analyzing permeable reactive barrier using anaerobic microbes

研究代表者：

片山 新太 (KATAYAMA ARATA)

名古屋大学・エコトピア科学研究所・教授

研究者番号：60185808

研究成果の概要(和文)：

カラムを用いて嫌気性一次元浸透流場を作製し、嫌氣的脱塩素微生物群および嫌氣的酸化分解微生物群による浄化効果を評価するとともに、その分解速度パラメータを回分培養で求めることができることを明らかにした。また、それらの微生物群を逐次的に配列することで嫌気性条件下での完全分解系の構築に成功し、14.2日の滞留時間の条件で3.5 μM/日のペンタクロロフェノール分解速度を達成した。一方、透水係数が発生するガス、微生物バイオマスによって低下することを明らかにし、van genichten式を応用したモデル化により透水係数の低下を予測することに成功した。

研究成果の概要(英文)：

With a column experiment constructing anaerobic one-dimensional infiltrate flow, examined were the remediation capacities of reductive dehalogenation consortium and anaerobic phenol-oxidizing consortium, which showed that degradation parameters can be obtained by batch experiment. The two microbial consortia sequentially combined achieved complete mineralization of pentachlorophenol with 14.2 days of hydraulic retention time and at 3.5 μM days⁻¹. Hydraulic conductivity was greatly affected by gas produced and microbial biomass, a model derivated from van Genichten equation was desgined and succeeded to predict the decrease in hydraulic conductivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：微生物生態工学および環境工学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：環境修復技術、嫌気微生物の解析モデル

1. 研究開始当初の背景

芳香族塩素化合物が、産業廃棄物最終処分地の跡地、大都市地下地盤や地下水に微量検出される例が報告されている。広範囲の低濃度汚染に対し、移動拡散してくる有害化学物質を受動的に浄化する

透過性反応浄化壁型の微生物浄化技術の開発が望まれている。

嫌気性条件で脱塩素呼吸を行う能力を持つ *Dehalococcoides* の研究が中心に進められてきたが、活性維持も難しく不明な点が多いため、浄化技術の開発には至っ

ていなかった。本研究代表者のグループは、*Firmicutes* 門細菌を主とする嫌気微生物群の持つ脱塩素活性を、孔径を制御した無機資材に担持する手法(片山・馬場、特開 2006-320249)を用いて劇的に高めることに成功した(Babaら、*J Biosci Bioeng* 104, 62-68, 2007)。これは、嫌気微生物による反応性浄化壁の技術的可能性を切り開く研究成果である。しかし、嫌気性微生物群を用いた透過性反応浄化壁を設計するためには、浄化パフォーマンスと微生物の動態の関係を明らかにすることが、定量的な解析法の確立のために必要不可欠となっている。

一般に、地下水における汚染物質の動態の推定には、移流分散モデルが用いられる(Zheng & Bennett 2002 *Applied contaminant transport modeling*, John Wiley and Sons, New York, 621pp.)。そのモデルに必要な基礎パラメータを得るための試験を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、透過性反応浄化壁を模した二次元浸透流場を再現する嫌気カラムを用い、嫌気微生物による芳香族塩素化合物の脱塩素化反応および芳香族化合物の嫌氣的酸化分解反応の流れ場を作成し、物質収支、分解に有効な間隙体積と微生物増殖・ガス発生との関係を明らかにし、移流分散モデルにおける微生物分解に伴う基礎的パラメータ変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

汚染物質には、取り扱いが容易で且つ汚染の報告があるポリクロロフェノールを用い、嫌気性浸透流をカラムシステムで作製して、流れ場での嫌気微生物によるポリクロロフェノールの脱塩素およびフェノール分解の

微生物パラメータを明らかにした。

① 脱塩素カラム試験

ガラスビーズカラムに、ペンタクロロフェノール脱塩素微生物群を詰め、上昇流として長期脱塩素活性をモニタリングした。脱塩素反応に必要な水素は、乳酸で供給した。カラム出口のクロロフェノールおよび代謝産物を3~4日ごとに濃度測定し、定常状態になるのを確認した。平均滞留時間・カラム体積から微生物の脱塩素化速度を求める。電子供与体の乳酸および関連脂肪酸濃度を測定し、脱塩素化速度と電子供与体の消費速度との関係を明らかにした。ガス発生量を測定するとともに、水素濃度、メタンガス濃度、二酸化炭素濃度を測定し、炭素に関わる物質収支をとって、浄化効率を評価した。

微生物流出速度から微生物群集の増殖速度を推定すると同時に、微生物バイオマスおよび微生物群集構造を測定して、微生物群集遷移を明らかにする。基礎パラメータおよび微生物情報に基づいた、微生物の増殖と脱塩素化速度の関係を明らかにした。

② 嫌気性酸化カラム試験

電子供与体をフェノールとし、電子受容体として鉄(III)または添加無し(発酵型)のカラムを作製し、連続運転して定常状態を得て微生物の増殖速度と嫌氣的酸化分解速度の関係を明らかにした。

③ 脱塩素と嫌気性酸化の組合せ技術

還元的脱塩素微生物群と嫌気性酸化分解微生物群を浸透流場で組み合わせることによって、ペンタクロロフェノールを嫌気性的に完全分解することを試みた。

④ 透水係数変化

嫌気性条件で発生するガスによる透水係数の変化を、カラムへのガス飽和水の導入によって再現し、モデル化を行った。

以上から、嫌気性微生物を用いた透過性反

応浄化壁に適用できる浄化解析モデルの基礎パラメータを求めた。

4. 研究成果

①脱塩素カラム試験

微生物を用いた反応性透過壁(バイオバリア)のモデルとして、ペンタクロロフェノール

(PCP)の嫌気性脱塩素反応における物質収支と速度を、集積培養物を充填した一次元浸透流場(カラム)で試験した。塩素収支から、滞留時間7.6日で50 μM のPCPの殆どはフェノールまで脱塩素され、一部が3-クロロフェノールへと変化することが明らかとなった。塩素除去効率は、36 $\mu\text{M d}^{-1}$ に達した。PCP初期濃度を100 μM としたところ、当初の活性は1.5倍に高まったが、7.4ポアボリューム(PV)(58日)で活性を失った。脱塩素菌の高濃度PCPへの感受性を示唆した。炭素収支から、電子供与体として導入した乳酸は、水素以外に、酢酸、プロピオン酸、 CO_2 、 CH_4 へ変換されるとともに、一部は微生物バイオマスへ変換していたことが確認された。回分培養による速度論解析から、1 μM の塩素消費で1.99 mg I^{-1} バイオマス増加が起こることが示された。モノー式がよく一致し、比増殖速度は1.38 d^{-1} 、半飽和定数は0.29 μM と推算された。回分培養試験の結果は、連続浸透流場(カラム)での結果とよく一致した。回分培養で得られるパラメータが連続浸透流場へ適用できることが示唆された。

②嫌気性酸化カラム試験

定常状態で解析したところ、50 μM フェノールの嫌気性分解には、1400 μM の鉄(III)酸化物が消費していた。鉄(III)酸化物は、1PV(96ml)で0.13 mmoles 消費した。計算によって、0.25 moles の鉄(III)酸化物で1923 PV(13076日=約35年)の浄化が可能であることが示された。

③脱塩素と嫌気性酸化の組合せ技術

嫌気性脱塩素と嫌気性酸化を組み合わせた50 μM のPCP完全分解系の構築を行った。還元的脱塩素カラムと嫌気性酸化カラムを組合せ、水理学的滞留時間14.2日で、世界最高の分解速度3.5 μM /日を達成した。最初の脱塩素カラムでは、乳酸を電子供与帯としてPCP代謝産物としてフェノールと3-クロロフェノールが流出した。次の嫌気性酸化カラムでは、鉄還元条件でフェノール及び3-CP両方とも分解した。乳酸を20mM導入した際には、鉄(III)酸化物の消費が大きかったが、乳酸濃度を最低限の4mMに減少したところ、長期間の良好な完全分解を達成できた(200PV=3000日相当)。炭素収支から、50 μM のPCPと4mMの乳酸の導入に対して、81%が CO_2 へ3%が CH_4 へ、微生物バイオマスへ8%が変換されたこの間、カラム内に当初設置した微生物群集構造は脱塩素カラムおよび嫌気性酸化分解カラムとも殆ど変化していなかった。逐次嫌気分解システムは、透水性反応浄化壁による芳香属塩素化合物の完全分解の可能性を明らかにした。

⑤ 透水係数変化

バイオバリアは、浄化壁中における微生物増殖と微生物が生成するガスのために、いずれ透水性が低下して寿命を迎えるが、これまでその寿命予測法は存在しなかった。そこで、寿命予測法の確立を目指し、バイオバリアをモデル化したカラム試験を行うとともに、水・ガス・微生物から成る三相系の固有浸透係数の経時変化予測式を構築した。適切なパラメータ値を代入した予測式によって、カラム試験の実測値が良く再現された。このことから、構築した予測式による寿命予測が可能であることが示唆された。カラム試験では、微生物が局所的に増殖することによって透水性の低下に大きな影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計9件)すべて査読有

- ① Song, D. J. and Katayama, A. (2010) Approach for estimating microbial growth and the biodegradation of hydrocarbon contaminants in subsoil based on field measurements: 1. Model development and verification, *Environmental Science and Technology*, 44, 767-773
- ② Zhiling LI, Yasushi Inoue, Suyin Yang, Naoko Yoshida, and Arata Katayama (2010) Mass balance and kinetic analysis of anaerobic microbial dechlorination of pentachlorophenol in a continuous flow column, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 326-332.
- ③ Zhiling LI, Suyin YANG, Yasushi INOUE, Naoko YOSHIDA, and Arata KATAYAMA (2010) Complete anaerobic mineralization of pentachlorophenol (PCP) under continuous flow conditions by sequential combination of PCP-dechlorinating and phenol-degrading consortia, *Biotechnol. Bioeng.*, 107, 775-785
- ④ Song, D. J. Kitamura, M. and Katayama, A. (2010) Approach for estimating microbial growth and the biodegradation of hydrocarbon contaminants in subsoil based on field measurements: 2. Application in a field lysimeter experiment, *Environmental Science and Technology*, 44, 6795-6801
- ⑤ Suyin Yang, Atsushi Shibata, Naoko Yoshida, Arata Katayama (2009) Anaerobic mineralization of pentachlorophenol (PCP) by combining PCP-dechlorinating and phenol-degrading cultures, *Biotechnology and Bioengineering, Biotechnology and Bioengineering*, 102, 81-90
- ⑥ Naoko Yoshida, Lizhen Ye, Daisuke Baba and Arata Katayama (2009) A Novel *Dehalobacter* sp. is involved in extensive 4,5,6,7-tetrachlorophthalide (fthalide) dechlorination *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2400-2405
- ⑦ Naoko Yoshida, Lizhen Ye, Daisuke Baba and Arata Katayama (2009) Reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls and dibenzo-*p*-dioxins in an enrichment

culture containing *Dehalobacter* species. *Microbes and Environments*, 24, 343-346

〔学会発表〕(計30件)

- ① 宋徳君、打木弘一、片山新太(2010)原位置バイオマーカーに基づく汚染修復速度の予測方法、第20回環境地質学シンポジウム、早稲田大学、東京、2010年12月3日～4日 (Proceedings of the 20th Symposium on Geo-Environments and Geo-Technics 2010, 199-204)
- ② A. Katayama, F.M. Liu, I. Suzuki, N. Yoshida, K. Asahi, D. Suzuki and Y. Inoue (2010) A Case Study of Passive Bioremediation of Contaminated Groundwater using River Sediment as Microbial Barrier, 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 14-18 September 2010, Palacongressi, Rimini – Italy
- ③ Zhiling LI, Yasushi INOUE, Daisuke SUZUKI, Lizhen YE and Arata KATAYAMA (2010) Complete anaerobic mineralization of PCP in a continuous flow column by a consortium requiring no electron acceptor, 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 14-18 September 2010, Palacongressi, Rimini – Italy
- ④ 片山 新太(2010) 多孔性微生物資材を用いたハロゲン化有機物の分解浄化技術、第54回粘土科学討論会、名古屋大学、2010年9月7日～8日
- ⑤ Arata Katayama, Dejun Song, Mitsuru Kitamura, Yasushi Inoue (2010) Changes in Microbial Community during the Natural Attenuation of Soil contaminated with Oil, BIT's 1st Annual World Congress of Petroleum Microbiology (WCP), 2010 : Challenges and Opportunities in Metagenomics Era, Dalian, China, July 25-27, 2010
- ⑥ Arata Katayama, Fengmao Liu, Kiyotoshi Asahi, Naoko Yoshida, Daisuke Suzuki, Yasushi Inoue (2010) Passive Bioremediation Technologies of Soil and Groundwater Using Anaerobic Microbial Populations, 3rd Annual World Congress of Industrial Biotechnology 2010, Dalian, July 25-27, 2010
- ⑦ Arata Katayama, Zhiling Li, Takashi Miyamoto, Naoko Yoshida, Daisuke Suzuki, Yasushi Inoue (2010) Anaerobic degradation of chlorinated phenols under continuous flow conditions, 12th IUPAC

- International Congress of Pesticide Chemistry, Melbourne, Australia, 4th- 8th July 2010
- ⑧ Zhiling LI, Yasushi INOUE, Daisuke SUZUKI, Arata KATAYAMA (2010) Anaerobic microbial decomposition of chlorinated phenols, Water and Environment Technology Conference 2010 (WET2010) Yokohama, Japan on the 25th-26th June 2010
- ⑨ 原茂樹、清水陽平、井上康、吉田奈央子、片山新太(2010)嫌気性微生物群を用いた透過性反応浄化壁の寿命予測法に関する研究、第44回日本水環境学会年会、福岡大学七隈キャンパス、2010年3月15日～17日
- ⑩ Truong, H. T., Inoue, Y. and Katayama, A. (2008.9) Modeling Surfactant-Enhanced Bioremediation of Residual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Saturated Porous Media, HydroPredict 2008, International interdisciplinary conference on Prediction for hydrology, ecology and water resources management using data and models to benefit society, Tristar Hotel, Prague, Czech Republic, 15-18th September 2009
- ⑪ Zhiling LI, Yasushi INOUE, Naoko YOSHIDA, Suyin YANG, and Arata KATAYAMA (2009.9) Complete dechlorination of pentachlorophenol in an anaerobic microbial column, R'09 Twin World Congress, Resource Management and Technology for Material and Energy Efficiency, Nagoya Japan/ Davos Switzerland, 14th-16th September 2009
- ⑫ Katayama A., Yoshida N, Baba D, Li Z, Yang S, Shibata A, Mizoguchi T, Taira A, Shimizu Y, Miyamoto T, Inoue Y. (2009.8) Enrichment of anaerobic bio-dechlorination activity of chlorinated aromatics from paddy soil for bioremediation technology, the 29th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin 2009), Beijing, 23rd-28th August 2009
- ⑬ 宮本隆史、井上康、吉田奈央子、片山新太 (2009) 嫌気性資材を用いた脱塩素反応を行うバイオバリアに関する研究、第15回地下水汚染とその防止対策に関する研究集会、名古屋（名古屋国際会議場白鳥ホール、名古屋市熱田区熱田西町）2009年6月18日～19日
- ⑭ 原茂樹、清水洋平、溝口卓弥、井上康、吉田奈央子、片山新太 (2009) 複合微生物群を用いたトリクロロフェノールの嫌氣的脱塩素化カラムの活性と透水性、第15回地下水汚染とその防止対策に関する研究集会、名古屋（名古屋国際会議場白鳥ホール、名古屋市熱田区熱田西町）2009年6月18日～19日
- ⑮ 楊素銀、李智灵、大畑奈緒子、土居良一、井上康、片山新太 (2009) 脱塩素菌群と嫌気性酸化分解菌群を組み合わせたペンタクロロフェノールの無機化促進、日本農薬学会34回大会、東京大学、2009年3月17日～19日
- ⑯ 片山新太、柴田敦司、馬場大輔、楊素銀、吉田奈央子 (2008) 水田土壌由来の嫌気微生物群による多様な芳香族化合物の分解、第24回微生物生態学会、北海道大学、シンポジウム「嫌気性微生物の応用に関する最近の話題」2008年11月25日～28日
- ⑰ 井上康、下條佑樹、片山新太 (2008) Two-region, three-site モデルによる多孔体中の一次元微生物輸送プロセスの再現、日本地下水学会2008年秋季講演会（福岡大会）九州大学医学部百年講堂、2008年11月20日～22日
- ⑱ 片山新太、楊素銀、吉田奈央子、柴田敦司、馬場大輔 (2008) 嫌気性条件での芳香族塩素化合物の微生物分解、日本農芸化学会中部支部第153回例会、名古屋大学 シンポジオン、2008年11月1日（シンポジウム「無酸素下で働く微生物－嫌気性菌の世界～環境と健康の視点から～」）
- ⑲ 宮本隆史、井上康、片山新太、吉田奈央子、奥村洋 (2008) 担体と生分解性プラスチック、嫌気性微生物群を用いた芳香族塩素化合物の脱塩素反応を行う透過性反応壁、土木学会平成20年度全国大会、東北大学川内北キャンパス・仙台国際センター、平成20年9月10日～12日
- ⑳ Yang, S., Shibata, A., Yoshida, N., and Katayama, A. (2008.8) Complete mineralization of pentachlorophenol by combined anaerobic microbial population (poster presentation), The 12th International Symposium on Microbial Ecology, Microbial Diversity – Sustaining the Blue Planet, Cairns, Australia, 17th-22nd August, 2008
- 〔図書〕（計1件）
- ① 片山新太 (2010) 嫌氣的脱ハロゲン化と環境保全、「難培養微生物研究の最新技術II～ゲノム解析を中心とした最前線と将来展望」（監修：大熊盛也、工藤俊章）シーエムシー出版、東京 p.197-210

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

①

名称：有機物汚染土壌における微生物分解容量の評価方法、及び汚染土壌修復速度の予測方法

発明者：片山新太、宋徳君、基礎地盤コンサルタンツ株式会社

権利者：名古屋大学、宋徳君、基礎地盤コンサルタンツ

種類：特許

番号：特開 2010-213607

出願年月日：2009年3月16日

国内外の別：国内

②

名称：1,2-ジクロロエタンをエチレンに無害化するジオバクター属細菌

発明者：吉田奈央子、朝日教智、片山新太

権利者：名古屋大学、名古屋市

種類：特許

番号：特願 2010-177483

出願年月日：2010年8月6日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 新太 (KATAYAMA ARATA)

名古屋大学エコトピア科学研究所・教授

研究者番号：60185808

(2) 研究分担者

三宅 克英 (MIYAKE KATSUhide)

名古屋大学大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90252254

井上 康 (INOUE YASUSHI)

名古屋大学エコトピア科学研究所・助教

研究者番号：10293468

(3) 連携研究者 該当なし