

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340070

研究課題名(和文)新規バイオサーファクタントによる塩素化エチレン汚染の拡散防止と修復の加速化

研究課題名(英文)Prevention of diffusion and acceleration of remediation of chlorinated ethylene contamination by new bio-surfactant

研究代表者

高見澤 一裕 (Kazuhiro, Takamizawa)

岐阜大学・応用生物科学部・名誉教授

研究者番号：00159005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規バイオサーファクタントの構造決定と機能把握に関する基礎的研究を行った。テトラクロロエチレン(PCE)に長期間馴養した活性汚泥のろ液にPCE減少活性を見出した。ろ液中のPCE減少活性は、生物由来の有機物がPCE減少に関与すると考えられた。PCEの分解産物は各種クロマトグラフィなどでは検出できなかったことから、活性汚泥中のPCE減少活性物質の一つは界面活性剤のようにPCEの水への溶解度を高めるバイオサーファクタント様物質である可能性が考えられた。部分精製バイオサーファクタント様物質のFT-IR, H-NMRで構造推定を行った結果、本物質はポリオキシプロピルエーテル様物質の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We conducted fundamental research on structure determination and functional understanding of novel biosurfactant. Tetrachlorethylene (PCE)-reducing activity was found in the filtrate of activated sludge which had been acclimatized to PCE for a long time. The PCE-reducing activity in the filtrate was thought to be an organic matter derived from living organisms. Since the degradation products from PCE treated with the filtrate could not be detected by various chromatographies, one of PCE-reducing substances in activated sludge was thought to be a biosurfactant-like substance which increases the solubility of PCE in water. Structural analyses with FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, and MS by use of partially-purified biosurfactant-like substance indicated that the substance could be a polyoxypropyl ether-like compound.

研究分野：微生物工学

キーワード：バイオサーファクタント テトラクロロエチレン 塩素化エチレン 活性汚泥

### 1. 研究開始当初の背景

テトラクロロエチレン (PCE), トリクロロエチレン (TCE), シス-1,2-ジクロロエチレン (cDCE), 塩化ビニル (VC) などの塩素化エチレン類による環境基準を超える地下水・土壌汚染の箇所は日本全体の地下水・土壌汚染の約 37% を占める。汚染の修復工事は進んでいるものの TCE 等による新たな汚染が発見されている。

一般的に、有機系環境汚染物質に汚染されている区域が小規模の場合は、各種の物理化学的方法が研究され、一部は実用化している。掘削土壌置換法、洗浄法、ホットソイル法、抽出法、ジオメルト法、鉄粉混合法、過マンガン酸カリウム酸化法などである。一方、汚染が広範囲に及んでいる場合は現位置でのバイオレメディエーション (BR) や揚水法、ガス吸引法などが適応される。また、重金属や高濃度有機化合物汚染の修復には物理化学的方法が用いられ、低濃度有機化学物質や低濃度オイル汚染の修復には BR や揚水法、ガス吸引法が用いられる。

塩素化エチレン類による環境汚染サイトの修復の際、汚染サイト現地での BR が有効かどうかの判断に、塩素化エチレン類分解細菌の存在の有無がアメリカ合衆国では評価されている。その分解細菌の代表が無酸素環境下で PCE を完全に脱塩素化し、エチレンに変換する *Dehalococcoides mccartyi* 195 株である。この 195 株をはじめ、*Dehalococcoides* 属細菌種や様々な細菌 (*Desulfitobacterium* 属や *Clostridium* 属など) の生化学的、遺伝学的研究が進められてきた。

世界的に塩素化エチレン分解菌に関する研究は順調に進み、バイオレメディエーションは普及し始めてきた。申請者もいくつかのサイトで汚染修復の経験を積むことができた。この経験の中で、バイオレメディエーションは確実に浄化が期待できるが、時間がかかることと地下水下流域での汚染の拡散を防ぎにくいことを学んだ。汚染の拡散を封じ込めれば、塩素化エチレンが留まり、微生物による修復も加速化する。

先行研究で塩素化エチレンを封じ込める (乳化する) 新たなバイオフィアクトを発見した。そこで、このバイオフィアクトの性質と構造を明らかにすることで、塩素化エチレン汚染の拡散防止と修復の加速化への可能性を検討した。

### 2. 研究の目的

新規に発見した塩素化エチレンを乳化するバイオフィアクトの性質と構造を明らかとし、その利用による汚染の拡散防止と修復の加速化を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 新規バイオフィアクトの構造決定と機能把握に関する基礎的研究

### 新規バイオフィアクトの特徴解析

塩素化エチレン類として PCE を用いた。PCE に馴化している活性汚泥がバイオフィアクトを生産していた。この活性汚泥を培養し、その培養濾液を順次精製して構造決定を行った。

馴養: 1L の二つ口フラスコに約 700 ml の汚泥を採取し、MLVSS がおよそ 10,000 mg/L 以下となるように希釈した。一つ目の口にはリービヒ冷却器を取り付け、冷却水を流した。もう一つに口にはテフロン栓にセラミック製の散気管を取り付けたエアチューブを通し、シーリング剤で密閉し、溶存酸素濃度 (DO) が 2.0 mg/L 以上となるように曝気した。pH は 7.0-8.5 となるように 10% 水酸化カルシウム水溶液を用いて維持した。栄養源は、培養初期にプロテオースペプトン No. 3 を 3.5 g、リン酸水素二カリウムと硫酸マグネシウム七水和物をそれぞれ 1.0 g ずつ添加した。その後、全有機炭素濃度 (以下 TOC) が 300 mg/L 以下、全窒素濃度 (以下 T-N) が 200 mg/L 以下となった時に、炭素源として PCE またはエタノールを TOC 濃度が 1,000-2,000 mg/L となるように毎日加えた。TOC 濃度及び T-N 濃度の測定は、適宜サンプリングした培養液の上清を TOC-VCSH および TNM-1 (島津) を用いて測定した。

馴養した活性汚泥の濾過: 馴養した汚泥を氷上で十分に冷やしながら 0.2 µm メンブレン濾紙を用いて濾過した。得られた濾液は凍結乾燥にて乾固して残渣を -20 °C で保存した。残渣を供試時に MilliQ 水に懸濁 (= 濾液) し、各試験に用いた。

塩素化エチレンの乳化作用: PCE, トリクロロエチレン (TCE), cis-1,2-ジクロロエチレン (cDCE) について乳化作用を調べるために、濾液とコントロールとして MilliQ 水を 20 mL 容量のバイアル瓶に 5 mL ずつ入れ、テフロンコートのブチルゴム栓とアルミシールキャップにて密栓した。マイクロシリンジを用いて PCE, TCE, cDCE をそれぞれのバイアル瓶に終濃度が 100 mg/L となるように添加した後、20 °C に設定した恒温器内にて 150 rpm で一晩振盪した。振盪後のバイアル瓶の気相から 100 µL の気体をシリンジにて抜き取り、キャピラリーカラム Rt-Q-BOND (30 m × 0.53 mm × 20 µm) を備えた GC-FID; 島津ジーエルシー、東京) で各塩素エチレン類濃度変化を調査した。液相中の塩素化エチレンの分析は、バイアル瓶に 30% の NaCl を添加し、60 °C で 60 分間加温し、気相中から上記同様に気体を抜き取り GC-FID にて分析した。

乳化粒子径: 乳化作用に及ぼす温度の影響を評価するためにゼータサイザー (Malvern, UK) を用いて乳化作用によって生じるミセル

の粒子径を温度ごとに測定した。10, 20, 30 の各温度に達した後, 30 分間保温し, 粒子径を測定した。また, 20 における PCE と濾液の混合液の乳化状態を調べるため, 同じくゼータサイザーでそのミセル粒子の分布を測定した。

既知の界面活性剤との比較: 合成界面活性剤である Tween 20 とバイオサーファクタント (BS) であるサーファクチンナトリウムを比較に用いた。0.25, 0.5, 1.0%(w/v) となるように調製した。それらを 20 mL 容量のバイアル瓶に 5 mL ずつ分注し, PCE を終濃度が 100 mg/L となるように添加した後に密栓し, 20 にて 150 rpm で一晩振とうし, 気相中の残存 PCE 量を上記同様に測定した。

油膜排除活性測定: 直径 8.5 cm のガラスシャーレに純水を 15 mL 入れ, 水面が安定した後, 原油 50  $\mu$ L を静かに滴下して油膜を形成させた。その中央に濾液, Tween 20, SF, コントロール (MilliQ 水) をそれぞれ各 5  $\mu$ L ずつ静かに滴下した。油膜が除去されることにより形成された円の面積を画像解析ソフト (WinROOF) にて測定し, ガラスシャーレの底面積と油膜排除面積の割合, 各界面活性剤の TOC 量から比活性を算出した。

#### 新規バイオサーファクタントの精製と構造解析

活性汚泥濾液の調製: 大容量高速遠心分離機を用いて, PCE 馴化活性汚泥混合液 1 L を遠心分離して上澄液を得た。この上澄液を, GS-25 (孔径 1  $\mu$ m) フィルターとメンブランフィルター (孔径 0.2  $\mu$ m) で順次ろ過した。活性汚泥濾液 (720 mL) を 2 L ナスフラスコに入れ, 凍結し, 凍結乾燥を行った。ここにメタノール 250 mL を入れ振盪した。ここから約 50 mL を 200 mL ナスフラスコに入れ, エバポレーターで乾固した。この操作を 5 回行った。メタノール溶出画分と非溶出画分を 30 倍に濃縮し, この操作より得られた濃縮活性汚泥濾液を以下の精製に用いた。

塩析・溶媒抽出法による精製: 濃縮濾液を 4 にて攪拌しながら濃塩酸を用いて, pH 2 にした。1 時間ほど攪拌を続け, 攪拌を停止して 4 で一晩以上静置した。酸性化した濾液を遠心し, 沈殿と上清に分離した。沈殿を酸沈殿画分とし, 上清を更に等量のイソプロピルアルコールと穏やかに混合し, 4 で一晩以上静置した。静置後遠心によって, 沈殿 (イソプロピルアルコール沈殿画分) と上清に分離し, 上清をロータリーエバポレーターと凍結乾燥によってイソプロピルアルコールを可能な限り除去した。凍結乾燥後, 適量の MilliQ で乾固残渣を溶解し分液漏斗に移し, 酢酸エチルで抽出を行った。酢酸エチルで抽出した画分を減圧乾固し, 残渣を MilliQ

に溶解した (酢酸エチル抽出画分)。また, 分液漏斗に残った水層も, 一度凍結乾燥を行い, 残渣を MilliQ に溶解した (水層画分)。酸沈殿画分は, NaOH 溶液で pH 8 になるようにして溶解した。酸沈殿画分, イソプロピルアルコール沈殿画分, 酢酸エチル抽出画分, 水層画分の界面活性を上述の油膜排除法で調べ, バイオサーファクタントの分画を試みた。

HPLC による精製: 濃縮濾液から PDA (Photo Diode Array) 検出器を備えた高速液体クロマトグラフィーを用いてバイオサーファクタントの精製を行った。ODS カラム (YMC-Triart C18, 250 x 4.6 mm I.D.) を用い, 50%メタノールをベースの溶離液にし, 100%メタノールにするグラジエントプログラムを適用した。溶出される画分を大きく, 50%メタノール, 50-100%メタノール, および 100%メタノール溶出画分に分けた。この中で最も界面活性 (油膜排除法による) が高かった 100%メタノール溶出画分を更に細かく分取した (溶出時間 65-73 min, 73-76 min, 76-81 min, 81-86 min, 86-100 min) を回収し, 乾固後, それぞれ MeOH で 10 倍濃縮した。73-76 min (画分 1) と 81-86 min (画分 2) を FT-IR 及び ODS+HPLC/CAD による解析に用いた。

HPLC/CAD および FT-IR 解析: 画分 1 と画分 2 を CAD (Corona Charged Aerosol Detection) 検出器を備えた HPLC で解析した。HPLC の条件は上述の PDA-HPLC と同じくした。FT-IR 解析には, 画分 1 と画分 2 の少量を乾固させ, 塩化メチレンに溶解し, KBr ディスクに滴下し, FT-IR (パーキンエルマー Spectrum100) に供した。

<sup>1</sup>H-NMR 解析: 画分 1 と画分 2 を日本電子 ECA-600 (600MHz NMR) に供した。

#### 4. 研究成果

PCE に馴化した活性汚泥培養液中には, PCE を分解し, 塩素原子を Cl<sup>-</sup>の状態にする物質の他にバイオサーファクタント様物質が存在することが, 発表論文 で明らかとなった。本研究では, このバイオサーファクタント様物質の特徴とその構造決定を行った。

##### (1) 新規バイオサーファクタントの特徴解析

塩素化エチレンの乳化作用: 密栓できるバイアル中で PCE と, 活性汚泥濾液または水 (コントロール) を混合し, 気相と液相中の PCE 量を GC-FID で測定した。コントロールでは, 液相中残存 PCE, 全 PCE 量の 26%であった。一方, 濾液ではコントロールと比較して気相中の PCE 量が 60%減少しており, 液相中の PCE 量は 67.5%となり, コントロールの 2.6 倍となった。また, TCE や cDCE においても,

PCE と同様に濾液の乳化効果が確認された。この濾液をオートクレーブ処理すると液相中の PCE 量は 35.1% となり PCE 乳化活性が著しく低下した。したがって、この濾液中の PCE 乳化物質は高温高压で影響を受ける性質がある、生物由来の有機物であることが示唆された。

乳化粒子径：濾液は 10 では褐色透明であったが、20 まで昇温すると白濁した。これは温度によって濾液中の乳化作用を示す物質の性質が変化する可能性が考えられたため、ゼータサイザーを用いて濾液のみの 10、20、30 における粒径を測定した。10 における粒径は 12 nm で、20 では 104 nm、30 では 900 nm と温度が高いと粒径が顕著に大きくなることが確認された。以上のことから、濾液に含まれるサーファクタントは温度が高くなると凝集する性質であることが示唆された。また、PCE 添加後では濾液中の粒径分布は 389 と 4,053 nm に分布が認められたことから、PCE を添加することで濾液中の粒径が増大することが分かった。また、PCE 添加後では白濁も認められた。界面活性剤がコロイド状態で存在し、粒径が 0.05  $\mu\text{m}$  未満では透明であるが、乳化が生じる際にミセル化が生じ、粒径が 1  $\mu\text{m}$  を超えると乳白色になると言われている。以上のことから、濾液中の BS 成分が PCE をミセル内部に取り込み、乳化させることが示唆された。

既知の界面活性剤との比較：PCE の乳化活性について既知の化学合成界面活性剤として Tween 20、バイオサーファクタントとしてサーファクチンナトリウム（以下 BS）を用いて比較した。コントロール（水）に PCE を添加した時の液相中の PCE 量と、各界面活性剤含有水溶液の液相中の PCE 量との差を PCE 乳化量として比較した。界面活性剤濃度 1.0%（w/v）において Tween 20、SF はコントロールよりもそれぞれ最大 178、150  $\mu\text{g}$  多く PCE を液中に保持した。界面活性剤によって PCE がミセル内部に取り込まれ溶解度が増加したと考えられた。既知の界面活性剤においても濾液と同様に気相中 PCE 量は減少することが認められた。一方、濾液では各濃度の Tween 20 や SF と比較して PCE 溶解量が大きくコントロールに対して 219  $\mu\text{g}$  多くの PCE を液中に保持した。各界面活性剤の比活性は、Tween 20 が最も高く、次いで SF、濾液が最も低かった。PCE 乳化量は濾液で最も高かったが、比活性で最も低かった理由としては、濾液中には多くのバイオサーファクタント様物質以外の TOC 成分が含まれており、それらの影響を受けていると考えられた。

油膜排除活性：原油を用いて油膜を形成させた後、濾液と既知界面活性剤の油膜排除能力を比較した。形成された油膜に、濾液、0.25%（w/v） Tween 20 溶液、0.125%（w/v）SF

溶液を滴下すると、油膜の除去が確認された。一方、コントロールとして水を油膜上に滴下しても油膜排除は認められなかった。界面活性剤それぞれの面積比は濾液、Tween 20、SF でそれぞれ 0.22、0.21、0.15 であり、それぞれに表面張力低下作用が認められた。また、オートクレーブ処理した各界面活性剤様溶液における面積比は、濾液、Tween 20、SF の順にそれぞれ 0.05、0.04、0.08 となり、オートクレーブ処理によって油膜排除面積が小さくなり油膜排除活性が低下した。また、滴下した各界面活性剤水溶液中の TOC 量と面積比から比活性を求めた結果、濾液における比活性は  $1.7 \times 10^{-2}$ （面積比  $\text{cm}^2/\mu\text{g}$  TOC）であり、Tween 20 溶液および SF 溶液の比活性は、それぞれ  $3.0 \times 10^{-2}$ （面積比  $\text{cm}^2/\mu\text{g}$  TOC）、 $3.9 \times 10^{-2}$ （面積比  $\text{cm}^2/\mu\text{g}$  TOC）となった。これら既知の界面活性剤と比較すると、濾液の比活性が最も低くかった。しかしながら、濾液中には BS 様物質以外の物質も夾雑したため、比活性が低くなったと考えられる。

濾液中に存在する界面活性作用を示す物質は、オートクレーブによって、PCE 乳化作用や油膜排除活性が失われること、また、タンパク質濃度測定用蛍光色素と反応することなどから、PCE 馴養活性汚泥中に存在する微生物が生産する界面活性物質、バイオサーファクタントである可能性が示された。この物質は既知の化学合成界面活性剤やバイオサーファクタントと同様の活性（PCE 乳化活性や油膜排除活性）を示したことから、それを精製構造決定した。

## (2) 新規バイオサーファクタントの精製と構造解析

活性汚泥濾液の調製：活性汚泥濾液中のバイオサーファクタント様物質の活性が低くなったため、凍結乾燥による濃縮を行った。濃縮率 30 倍で油膜排除面積比 0.35 程度であった。

塩析・溶媒抽出法による精製：既知のバイオサーファクタントには、ペプチド脂質型、高分子型、糖脂質型の大きく 3 つの分類があり、それぞれ、酸沈殿、イソプロピルアルコール沈殿、酢酸エチル抽出の画分に分けられる。濃縮濾液の一部を用いて、これらの分画を行い、活性画分から凡その構造を推定した。しかしながら、いずれの画分にも油膜排除活性は見いだされず、水層画分も同様であった。全ての画分を混合して、元の濾液濃度に近い状態にしても、同様に油膜排除活性は検出されなかった。理由は不明だが、分画過程で何かしらの活性画分の損失が考えられたため、濃縮濾液を逆相カラムの HPLC 精製に直接供することにした。

HPLC による精製：図 1 に 100%メタノール溶出分画後の油膜排除結果を示した。2 つの油膜排除活性の高い山が確認できた。この画分に BS 様物質が含まれている可能性が高いと考え、油膜排除の高かった 73-76 min(画分 1)と 81-86 min(画分 2)を今後の解析に用いた。PDA より画分 1 が含まれる 74 min に 225-250 nm 程のピークが確認された。しかし、画分 2 においては PDA においてピークは確認できず、UV で検出されない物質である可能性が示唆された。このため画分 1 と画分 2 は異なる物質が含まれていると考えられた。

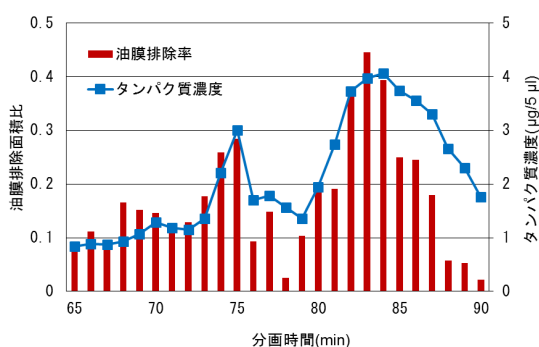


図 1. 濃縮濾液の ODS-HPLC 精製。100%メタノール溶出画分の油膜排除活性とタンパク質濃度プロファイル

HPLC/CAD および FT-IR 解析：画分 2 には PDA (200 nm-800 nm) で明確な吸収が見られなかった。そこで画分 2 と画分 1 を再度 CAD を備えた ODS-HPLC に供した。その結果、画分 1 と画分 2 では明らかに CAD による検出パターンが異なり、違う物質があると考えられた。また画分 2 において単一のピークが確認され、画分 2 のバイオサーファクタント様物質は UV で検出できない物質である可能性が示唆された。

次いで、画分 1 と画分 2 の FT-IR 解析を行った。結果を図 2 に示した。3000  $\text{cm}^{-1}$  以上にピークが確認できなかったため、アミン N-H 基や芳香環を持たない物質であることが考えられた。また 1500-2500  $\text{cm}^{-1}$  にも目立ったピークが無いことから二重結合も無いことが考えられる。1790-1650  $\text{cm}^{-1}$  に強いピークが無いことからエステル結合も無いことが分かった。一方、2850-2980  $\text{cm}^{-1}$  に特徴的なピークが確認され、アルカン(C-H)基があり、1100  $\text{cm}^{-1}$  のピークはエーテル(C-O)基があると考えられ、まとめると CHO のみの組成であると示唆された。既知のバイオサーファクタントである、サーファクチンはアミンを持っていることや、emulsan 系のような FT-IR 結果とは類似していないため新規性の高いバイオサーファクタントであることが考えられた。ついで、油膜排除活性が最も高かった画分 2 について  $^1\text{H-NMR}$  解析を行った。

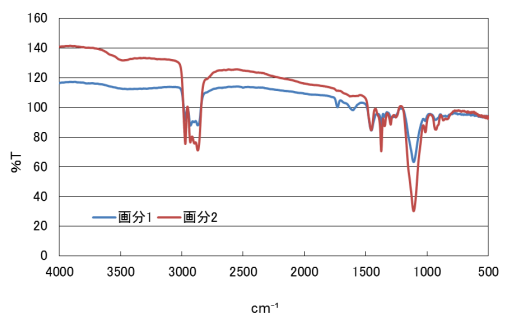


図 2. 画分 1 と画分 2 の FT-IR スペクトラム

$^1\text{H-NMR}$  解析：画分 2 の  $^1\text{H-NMR}$  解析の結果、イソプロピルエーテル [  $-\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$  ] を基本骨格にもつ構造を有することが示された。また、質量分析 (ESI-MS) の結果、画分 2 の分子量が約 770 であった。これらの結果を統合すると、イソプロピルエーテルの 13 回重合体である、ポリオキシプロピレン時オールエーテルである可能性が考えられた。

この物質は合成界面活性剤として、広く使用されている物質の一つであり、何らかの理由で実験系内に混入した可能性が考えられた。

PCE 馴化培養活性汚泥から、PCE 乳化作用をもつ微生物由来の界面活性物質の精製を試みた。しかしながら、精製された物質は微生物由来と考えることは困難であった。活性汚泥から、再度精製を試みたが、濾液中の界面活性 (界面活性物質生産性) には再現性 (安定性) が無く、研究期間内での再実験は叶わなかった。洗浄などの作業で、上述のような合成界面活性剤が混入するのであれば、濾液中には界面活性が安定して存在すると考えられた。しかしながら、そのようなことは無く、本研究開始時の活性汚泥濾液中の界面活性 (PCE 乳化活性・油膜排除活性) は、濃縮することなく測定可能であり、本研究期間経過に伴って、徐々に低下した。よって、活性汚泥中には実験開始当初は、バイオサーファクタント様物質の生産菌が多く存在したが、継代培養を続けるうちにそれが徐々に減少 (または消失) してしまい、僅かに混入した合成界面活性物質を本研究では精製した可能性も考えられる。

複雑な微生物の集団である活性汚泥から、バイオサーファクタントのような有用物質を安定生産する技術の確立も重要である。しかしながら、今後は活性汚泥中のバイオサーファクタント生産菌を分離し、それらの塩素化エチレン汚染の拡散防止と修復の加速化を研究課題とする。

## 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 3 件)

高見澤一裕,中村浩平,佐藤健,岩橋均,  
山田博子,バイオレメディエーションの  
実際 テトラクロロエチレン類及び灯  
油汚染サイトの修復,土と微生物,査読  
有,70巻,2016,45-50  
大野勝也,奥村健一,矢田ひかる,中村  
浩平,高見澤一裕,活性汚泥中のバイオ  
サーファクタントの特徴,環境技術,査  
読有,44巻,2015,161-169  
大野勝也,中村浩平,高見澤一裕,活性  
汚泥由来微生物によるテトラクロロエ  
チレンの分解,環境技術,査読有,43巻,  
2014,357-365

(4)研究協力者  
( )

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高見澤 一裕 (TAKAMIZAWA, Kazuhiro)  
岐阜大学・応用生物科学部・名誉教授  
研究者番号: 00159005

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: