

***Rhodococcus jostii* RHA1 株による シス-1,2-ジクロロエチレン分解に対する過酸化水素の影響**

大成建設 正会員 ○渡邊 亮哉
大成建設 正会員 伊藤 雅子
大成建設 正会員 高畑 陽

1. 目的

2014 年 10 月に「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の適合確認を受けた *Rhodococcus jostii* RHA1 株（以下、RHA1 株）は、好氣的条件下でトリクロロエチレン（TCE）及びシス-1,2-ジクロロエチレン（*cis*-DCE）をトルエン、フェノール等の誘導基質を入れることなく、塩化ビニルモノマー（VCM）を経由せずに完全に分解できることが確認されている。また、RHA1 株は 0.1% 程度の過酸化水素に耐性があり、これらの塩素化エチレン類の分解時に必要な酸素を供給する方法として過酸化水素を利用できる可能性がある。本研究では、RHA1 株と過酸化水素を同時に帯水層に供給した際の過酸化水素の挙動と *cis*-DCE の浄化効果を明らかにするため、実汚染土および地下水を用いて実施した室内試験の結果について報告する。

2. 試験方法

表 1 に試験条件を示す。RHA1 株は、コハク酸やイースト酵母を炭素源とした培地により好気培養した後で、菌体を無機塩培地で洗浄・濃縮したものを使用した。70 mL 容ガラスバイアル瓶に塩素化エチレン汚染帯水層から採取した土壌（砂質土、50 g）、地下水（各条件でバイアル瓶内の気相部が最終的に 10 mL になるように地下水量を調整）、および RHA1 株濃縮菌液を投入後、*cis*-DCE 濃縮液を終濃度で 1 mg/L となるように添加し、テフロンコーティングを施したブチルゴムで密栓した。条件 5 では、RHA1 株が菌体外に産生していると推測されるカタラーゼを加えて過酸化水素の分解状況を調べた。各条件につき 6 本のバイアル瓶を作成して 20℃ の恒温室で静置培養し、培養開始から、0、3、7 日経過後の地下水試料（上澄み液）を採取して 2 連ずつ分析を行った。

地下水試料は pH、酸化還元電位（ORP）、過酸化水素、*cis*-DCE の 4 項目を分析した。pH、ORP はハンディータタイプの pH メーター（D-75、堀場製作所）、過酸化水素はデジタルパックテスト（DPM-H₂O₂、共立理化学研究所）、*cis*-DCE は GC-MS（GCMS-QP2010、SHIMADZU）を用いてそれぞれ分析を行った。

表 1 試験条件

条件	土壌量 ^{注1)}	地下水量	RHA1 株 ^{注2)}	過酸化水素 ^{注2)}	カタラーゼ溶液 ^{注3)}
1	50 g	37.5 mL	—	0.02%	—
2			1.0×10^8 cells/mL		
3			5.0×10^8 cells/mL		
4	—	62 mL	—		2 mL
5			—		
6			5.0×10^8 cells/mL		

注1): 湿重量

注2): 地下水中(液相)での終濃度

注3): 添加した過酸化水素を全て分解するのに必要な量を添加

3. 試験結果

試験期間を通じて、地下水の pH は全ての条件で 7.0～7.6 の中性域を示し、ほぼ一定値で推移した。ORP は、条件 6 で 100 mV 近く上昇したがそれ以外は大きな変動は見られず、全ての条件において 250 mV 付近で安定していた。

図 1 に各条件の *cis*-DCE 濃度、図 2 に過酸化水素濃度の経時変化を示す。土壌を添加した条件 1～3 については、3 日後の *cis*-DCE 濃度は 0.55～0.61 mg/L となりほぼ同様に減少したが、その後は条件によって減少量が異なった。過酸化水素は 3 日後に全て消費され、条件 1 では *cis*-DCE が 3 日目以降は減少しなかった。一方、条件 1 に対して

キーワード バイオオーグメンテーション、RHA1 株、シス-1,2-ジクロロエチレン、過酸化水素

連絡先 〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設（株）技術センター TEL 045-814-7226

土壌を添加していない条件4では *cis*-DCE が3日目以降も減少した。この条件では、開始直後に約 400 mg/L の過酸化水素が3日後には 150 mg/L まで減少したが、試験終了時まで過酸化水素は残存していた。本地下水中には 20 mg/L の鉄分が含まれていることを確認しており、過酸化水素が地下水中の鉄分を触媒として分解され、生成したヒドロキシラジカルによって *cis*-DCE が分解したと推察された。一方、条件1では、地下水に加えて土壌に多くの触媒物質（鉄分）が存在していたため、ヒドロキシラジカル反応が短時間で生じて過酸化水素が3日以内に消費されたと考えられた。また、条件1では条件4よりヒドロキシラジカルが培養初期に多く生成したと考えられるが、ヒドロキシラジカルは *cis*-DCE だけでなく土壌中の有機物等との反応によって消費されたため、結果として条件1と条件4の3日目までの *cis*-DCE の分解量が概ね等しくなったものと推測された。

土壌を添加していない条件4～6では、カタラーゼを添加した条件5と RHA1 株を導入した条件6で試験の開始直後に過酸化水素が全て消費された。この結果から、カタラーゼ反応による過酸化水素の分解は、ヒドロキシラジカル反応より速く生じ、RHA1 株が菌体外にカタラーゼを生成して過酸化水素を分解していることが示された。一方、条件5で試験開始から3日間で約 20% 程度の *cis*-DCE の分解が生じていることから、カタラーゼ反応とヒドロキシラジカル反応は同時に生じていると推察された。

土壌が存在している条件3では、条件6と同量の RHA1 株を導入しているにもかかわらず、過酸化水素は試験開始時に全て分解されず残存した。この原因として、土壌の存在によりヒドロキシラジカル反応が条件4と比較して高い比率で過酸化水素に関与した一方で、生成したヒドロキシラジカルにより RHA1 株によるカタラーゼ生成が阻害を受けたと考えられた。条件3は条件2と比較すると3日目以降も *cis*-DCE が減少したことから、RHA1 株の導入量を多くすれば、ヒドロキシラジカルによる影響を受けても一定数の RHA1 株が *cis*-DCE の分解活性を維持でき、過酸化水素から生成した酸素を用いて *cis*-DCE の微生物分解が可能であったと推測された。

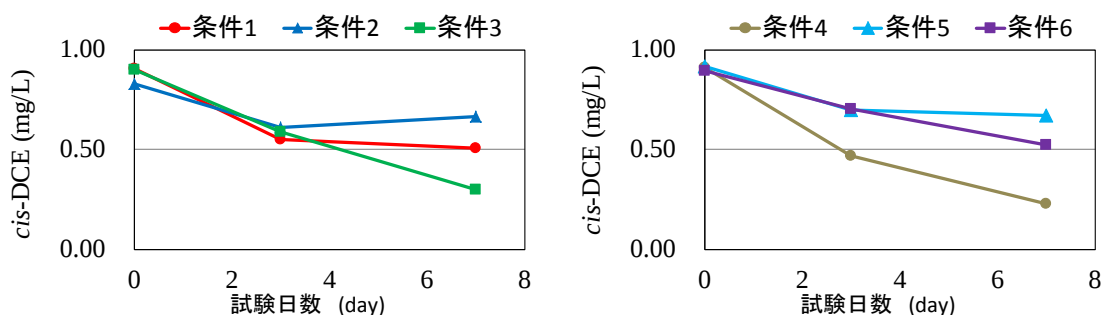


図1 *cis*-DCE 濃度の経時変化

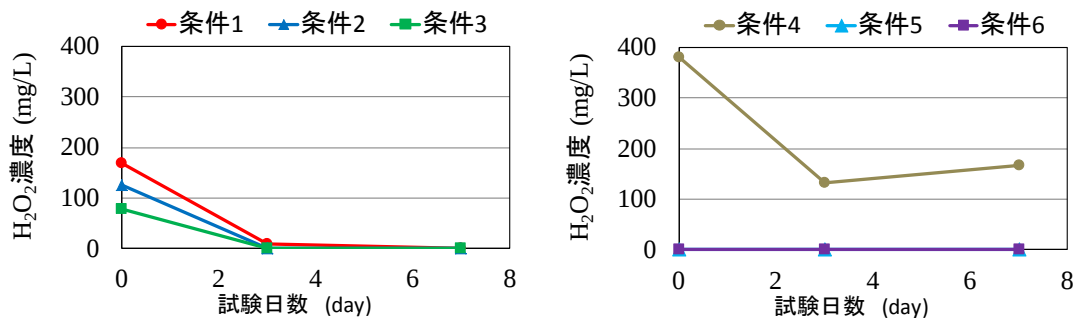


図2 過酸化水素濃度の経時変化

4. まとめ

- 1) 帯水層中に RHA1 株と過酸化水素を同時に導入した場合、過酸化水素はカタラーゼ反応とヒドロキシラジカル反応の両者により、注入から短時間で酸素に分解されることが示された。
- 2) カタラーゼ反応はヒドロキシラジカル反応より速く進行するが、ヒドロキシラジカルによって RHA1 株による酵素反応が阻害を受けるため、阻害分を考慮した菌体導入量が必要であると考えられた。