

(17) テトラクロロエチレンを分解する微生物群の集積培養
および土壌カラムにおけるテトラクロロエチレンの分解

Enrichment of a Microbial Mixed Culture Capable of Dechlorinating
Tetrachloroethene to Ethylene and Ethane, and Dechlorination of
Tetrachloroethene in Soil-column Reactors

上野 俊洋*, 石田 浩昭*, 中村 寛治*
Toshihiro UENO, Hiroaki ISHIDA, Kanji NAKAMURA

ABSTRACT; Chlorinated solvents such as tetrachloroethene(PCE) and trichloroethene(TCE) are common groundwater contaminants. A microbial mixed culture capable of dechlorinating PCE to ethylene and ethane was enriched in a fluidized-bed reactor using soil sediments, anaerobic sludges and activated sludges as inocula. DNA sequence analyses of 16S rDNA clones obtained from the mixed culture showed the existence of clones which have high similarity to 16S rDNA of *Dehalococcoides ethenogenes* 195. This result indicated a high possibility that a bacterium phylogenetically close to *D. ethenogenes* was responsible for complete dechlorination. Soil columns were inoculated with the enrichment culture and continuously fed with PCE and organic compounds. PCE(4 mg/L) was completely dechlorinated to ethylene within 5 h of HRT with 30 mg/L of ethanol, 30 mg/L of lactate, 60 mg/L of propionate or 50 mg/L of sucrose. Although dechlorination was slightly inhibited in the presence of sulfate(64 mg/L), complete dechlorination occurred at 12 h of HRT.

KEYWORDS; tetrachloroethene, dechlorination, electron donor, sulfate, 16S rDNA, *Dehalococcoides*

1. はじめに

テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE) などの有機塩素化合物はドライクリーニングの溶剤や金属の洗浄剤として使用されてきたが、発ガン性や肝機能障害を誘発する可能性が指摘されている。近年、これらの有機塩素化合物による土壌・地下水汚染が各地で明らかになり、大きな問題となっている。これに対して、PCE や TCE は、嫌気条件下、微生物の作用により、ジクロロエチレン (DCE)、塩化ビニル (VC) を経て、エチレンやエタンへ分解されることが知られており、これを応用した微生物処理技術 (bioremediation) の研究開発が行われている¹⁾⁹⁾。この反応は還元的脱塩素化反応であり、利用できる電子供与体 (還元力) として様々な物質が報告されている¹⁾⁹⁾。また、PCE をエチレンにまで完全に脱塩素化する微生物として *Dehalococcoides ethenogenes* 195 が唯一報告されており、この菌は水素のみを電子供与体として利用できる⁹⁾。しかしながら、最適な反応条件や関与する微生物などについては不明な部分が多い。ここでは、流動床リアクターにより集積培養した PCE 分解菌を植種源として土壌カ

* 栗田工業(株)技術開発センター

(Kurita Water Industries Ltd., Corporate Research & Development Center)

ムを作製し、様々な条件で PCE の分解実験を行ったので、その結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 流動床リアクターによる PCE 分解菌の集積培養

培養装置の概要を Fig.1 に示す。培養装置は 4.5 L のガラスカラムからなり、液相部は 4 L である。塩化エチレンのリークを最小限に抑えるため、カラムや配管にはガラス、テフロンあるいはバイトンを使用した。なお、コントロール実験では原水 PCE の 90% 以上が処理水で回収された。

上記培養装置に担体として 100/120 メッシュの天然ゼオライトを添加し、リアクター下部の 3 L 程度が流動状態を維持するようにカラム内の液を循環した。さまざまな植種源（嫌気汚泥、活性汚泥、汚染土壌・地下水）を添加しながら所定濃度の PCE と電子供与体を通水し、PCE 分解菌の集積培養を行った。基礎培地の組成は Table 1 および Table 2 に示す通りであり、水酸化ナトリウムにより pH を 7 程度に調整した。実験は 20 °C の恒温室で行った。

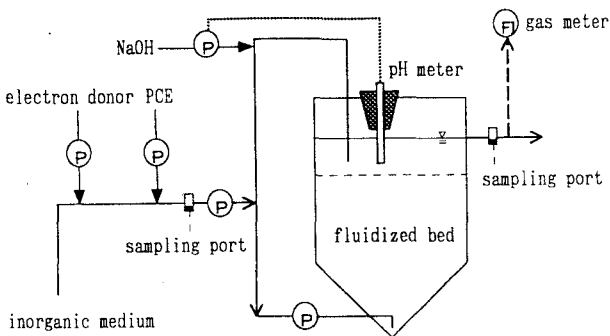


Fig.1. Schematic diagram of Fluidized-bed Reactor.

Table 1. Composition of basal medium for fluidized-bed reactor.

Compound	Concentration
Urea	50 mg/L
KH ₂ PO ₄	50 mg/L
Trace metal solution (Table 2)	0.1 mL/L

Table 2. Composition of trace metal solution.

Compound	Concentration
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,000 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,900 mg/L
ZnCl ₂	700 mg/L
CuCl ₂ ·6H ₂ O	25 mg/L
AlCl ₃ ·6H ₂ O	100 mg/L
H ₃ BO ₃	60 mg/L
NiCl ₂ ·6H ₂ O	240 mg/L
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	420 mg/L
HCl	1 mL/L

2.2 土壌カラムによる PCE の分解実験

土壌カラムの概要を Fig.2 に示す。所定位置から水を採取できるよう土壌カラムは 3 つの 240 mL ガラスカラムで構成し、各カラム間にサンプリングポートを取り付けた。各カラムには下部 5 mm 程度にガラスビーズ（粒径 2 mm）、その上に川砂（平均粒径 0.35 mm、間隙率 0.4）を充填した。カラムや配管にはガラス、テフロンあるいはバイトンを使用した。

上記土壌カラムに所定濃度の PCE と電子供与体を通水した。基礎培地の組成は Table 3 に示す通りであり、実験は 20 °C の恒温室で行った。なお、還元剤として硫化ナトリウムを用いたが、硫化ナトリウム

溶液は酸化されないよう窒素ガス中で保管した。実験開始時に、PCE 分解菌（PCE を *cis*-DCE に分解）の種菌として前述の流動床リアクターの汚泥 10 mL を Fig.2 に示した 2 番目のサンプリングポートに接種した。さらに、運転開始 142 日には、PCE 分解菌（PCE をエチレンに分解）の種菌として流動床リアクターの汚泥 10 mL を再度 2 番目のサンプリングポートに接種した。

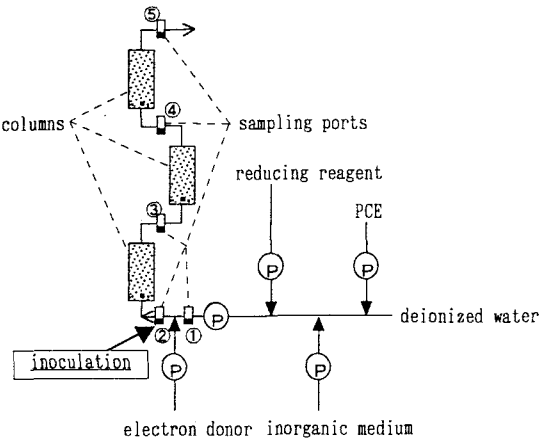


Fig.2. Schematic diagram of Soil column Reactor.

Table 3. Composition of basal medium for soil column reactors.

Compound	Concentration
NH ₄ Cl	38 mg/L
K ₂ HPO ₄	50 mg/L
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	80 mg/L
NaHCO ₃	100 mg/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	17 mg/L
CaCl ₂ ·6H ₂ O	6 mg/L
Trace metal solution	1 mL/L
Na ₂ S·9H ₂ O	250 mg/L

2.3 16S rDNA クローンの制限酵素切断パターンによる分類および系統解析

DNA の抽出、PCR による 16S rDNA の増幅、クローンの取得および塩基配列の決定は中村ら¹⁰⁾の方法に従った。16S rDNA クローンを挿入したプラスミドをテンプレートに、バクテリアには Bact0009 および Bact1492¹¹⁾のプライマーペア (Table 4) を、古細菌には Arch21F¹²⁾および Bact1492 のプライマーペア (Table 4) を用いて PCR 反応を行い、3 種類の制限酵素 (*Bst*U1, *Hha*I, *Rsa*I) で切断した。アガロース電気泳動で得られた切断パターンが 3 種類の酵素でいずれもすべて同じであったものを同一の Phylotype として分類した。クローンの出現頻度が 2 以上の Phylotype について、バクテリアは Bact0009 を、古細菌は Arch21F をプライマーとして使い、代表クローンの塩基配列を前方約 500 bases について決定した。得られた塩基配列データはインターネット上で Ribosomal Database Project (RDP) に送付、近縁種を決定した。

Table 4. PCR primers.

	Primer	Sequence (5' to 3')	Reference
Bacteria	Bact0009	GAGTTTGATCMTGGCTCAG	This study
	Bact1492	ACGGYTACCTTGTTACGACTT	11)
Archaea	Arch21F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	12)
	Bact1492	ACGGYTACCTTGTTACGACTT	11)

2.4 Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) による解析

流動床リアクターで得られたグラニュール状の汚泥から抽出した DNA をテンプレートに、4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) で標識した Bact0009 と 6-carboxyfluorescein (6-FAM) で標識した Bact1492 のプライマーペアを用いて PCR 反応を行った。PCR 増幅産物をアガロース電気泳動にかけ、16S rDNA (約 1.5 kb) 断片を含む部分を切り出し、Gene Elute Agarose Spin Column で精製した。エタノール沈殿により DNA を回収し、少量の滅菌蒸留水に溶解させ、適量を制限酵素 (*Bst*U1, *Hha*I) で切断した。切断した 16S rDNA を ABI PRISM 310 genetic Analyzer により Gene Scan モードで解析し、T-RFLP の Electropherogram を得た。

2.5 分析方法

PCE および TCE はガスクロマトグラフ (GC-17A, 島津製作所) を用い、電子捕獲型検出器 (ECD) で分析した。カラムには DB-624 (0.025 mmID×30 m, 膜厚 1.4 μ m) を用い、カラム温度は 85 $^{\circ}$ C とした。DCE、VC、エチレン、エタン、メタンおよびエタノールはガスクロマトグラフ (GC-9A, 島津製作所) を用い、水素炎イオン化検出器 (FID) により分析した。DCE および VC はカラムに Silicone DC-550 10%+Chromosorb WAW DMCS 60/80 (3.2 mmID×3.0 m) を用い、カラム温度を 45 $^{\circ}$ C とした。エチレンおよびエタンはカラムに Unibeads A 80/100 (3.2 mmID×2.1 m) を用い、カラム温度を 80 $^{\circ}$ C とした。メタンはカラムに Porapak Q 80/100 (3.2 mmID×2.0 m) を用い、カラム温度を 50 $^{\circ}$ C とした。エタノールはカラムに Gaskuropak 54 60/80 (3.2 mmID×2.0 m) を用い、カラム温度を 80 $^{\circ}$ C とした。有機酸は有機酸分析計 (Shodex OA, 昭和電工) により分析した。硫酸イオンはイオンクロマトグラフ (IC7000, 横河アナリティカルシステムズ) により分析した。カラムには Excecpak ICS-A23 を用いた。

3. 結果

3.1 PCE 分解菌の集積培養

流動床リアクターの運転条件を Table 5 に、処理結果を Fig.3 に示す。Fig.3 では塩化エチレン類、エチレン、エタンの mol 濃度を対数で表示した。種菌として実験室で運転しているメタン発酵リアクターの嫌気汚泥を用い、リアクターを運転したところ、PCE は徐々に分解されるようになり、運転開始 91 日にはリアクターに通水した PCE が *cis*-DCE に脱塩素化されるようになった (Fig.3A)。しかし、その後 268 日までは *cis*-DCE がさらに脱塩素化されることはなかった。なお、Fig.3A には処理水の PCE、TCE 濃度を示さなかったが、100 日以降は 1 μ mol/L 以下であった。また、*trans*-DCE や 1,1-DCE が検出されることはなく、0.1 μ mol/L 未満であった。

その後、新たに汚染土壌・地下水や嫌気汚泥、活性汚泥等を植種し (152, 183, 286, 293, 349, 359 日)、電子供与体をメタノールからスクロース、プロピオン酸、*n*-酪酸、メタノールおよびエタノールの混合物に変更した (Table 5)。また、PCE 分解菌の増殖を促進するため、原水の PCE 濃度を上げ、HRT を長くして PCE 負荷を上げた。なお、349 日および 359 日には *cis*-DCE と VC によって汚染された土壌を添加したが、この土壌を採取した汚染現場では後に biostimulation (土着微生物を用いた浄化処理) の現場実証試験が行われ、本土壌に *cis*-DCE をエチレンやエタンに脱塩素化できるポテンシャルがあることが確認されている⁹⁾。

植菌および条件変更の結果、360 日あたりから *cis*-DCE がエチレン、さらにエタンへと脱塩素化されるようになった (Fig.3A)。しかし、処理水のエチレン・エタン濃度は原水 PCE 濃度の 1/10 以下であった。そこで、449 日からは排ガスの分析 (Fig.3B) を行うとともに排ガス量を測定した。排ガスの分析結果を Fig.3B に示す。なお、Fig.3B に PCE、TCE 濃度を示さなかったが、いずれも 0.1 μ mol/L-gas 以下であっ

た。また、メタンガス濃度は70%程度であった。排ガス量は1.2 L/日でほぼ一定あった。449日以降、排出される塩化エチレン類はリアクターに供給したPCEの1%~2%であり（高いときでも5%程度）、排出されるエチレン・エタンは35%程度であった（データ省略）。このように、様々な植種源を添加しながら流動床リアクターを運転することによりPCEをエチレンやエタンに分解する微生物群を集積培養することに成功した。

Table 5. Medium composition and operating condition of fluidized-bed reactor.

	0~208 day	208~252 day	252~349 day	349~547 day
PCE (mg/L)	1.2	6.0	12	12
($\mu\text{mol/L}$)	7.2	36	66	66
Electron Donor (g/L)	Methanol, 0.51	Methanol, 0.51	Methanol, 0.93	Sucrose, 0.69; propionate·Na, 0.15; Butyrate·Na, 0.11; methanol, 0.12; Ethanol, 0.12.
Inorganics	urea, 0.05 g/L; KH_2PO_4 , 0.05 g/L; trace metal solution(table 2), 1 ml/L			
HRT (h)	13	13	24	24

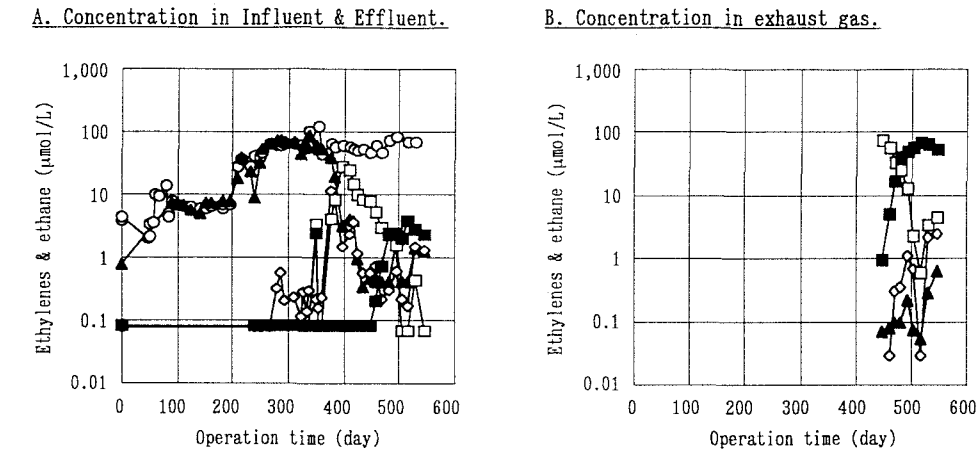


Fig.3. PCE degradation in fluidized-bed reactor. Fluidized-bed reactor(Fig.1) was supplied with PCE(—○—) under the conditions shown on Table 5. *cis*-DCE, —▲—; VC, —◇—; ethylene, —□—; ethane, —■—; in the effluent or the exhaust gas.

3.2 流動床リアクターで集積培養された微生物群の解析

リアクター内では300日あたりから汚泥が直径数mm程度のグラニュール状になった。このグラニュール状汚泥からDNAを抽出、16S rDNAをPCRで増幅し、汚泥を構成する微生物群の解析を行った。解析は16S rDNAクローンを取得し、制限酵素で切断した後、切断パターンで分類する方法、およびPCR増幅産物を直接切断し、T-RFLPにより分類する方法で行った。

結果をTable 6およびFig 4に示す。汚泥からは *Dehalococcoides ethenogenes* Subgroupの近縁種（相同性：97.4%，RDPのsimilarity score：0.856）の16S rDNAクローンが得られ、48得られたバクテリアのクローンのうち4つを占めた（Table 6）。また、T-RFLPでも上述の *D. ethenogenes* Subgroup 近縁種

Table 6. Number of clones classified by restriction pattern and theoretical length of 5' fragment produced by T-RFLP analysis.

	RDP subdivision	Closest strain or clone	(Similarity score of RDP)	Number of clones	<i>Bst</i> UI	<i>Hha</i> I	<i>Rsa</i> I
Bacteria	B1	<i>Dehalococcoides ethanogenes</i> Subgroup	<i>D. ethanogenes</i> str. 195 (0.856)	4	100	201	443
	B2	<i>Desulfobulbus</i> Assemblage	<i>Desulfobulbus aminigenus</i> str. A8444 (0.649)	4	111	96	226
	B3	<i>Syntrophus</i> Group	<i>Smithella propionica</i> str. LYP (0.919)	3	109	94	57
	B4	<i>Escherichia</i> Subgroup	<i>E. coli</i> (0.985)	2	394	372	426
	B5	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Subgroup	<i>D. desulfuricans</i> subsp. <i>desulfuricans</i> ATCC27774 (0.405)	2	236	238	486
	B6	<i>Pelobacter acetylenicus</i> Subgroup	Clone SJA-28 (0.406)	2	392	94	468
	B7	Environmental clone DA101 Subgroup	unnamed organism (0.572)	2	97	—	57
Archaea	A1	<i>Methanosaeta</i>	Unnamed organism (0.846)	30	335	195	79
	A2	MCU, Bourgenae Subgroup	Clone VAL9 (0.852)	5	336	327	263
	A3	<i>Methanosaeta</i>	<i>M. concilii</i> str. Opfikon DSM2139 (0.967)	3	335	195	241

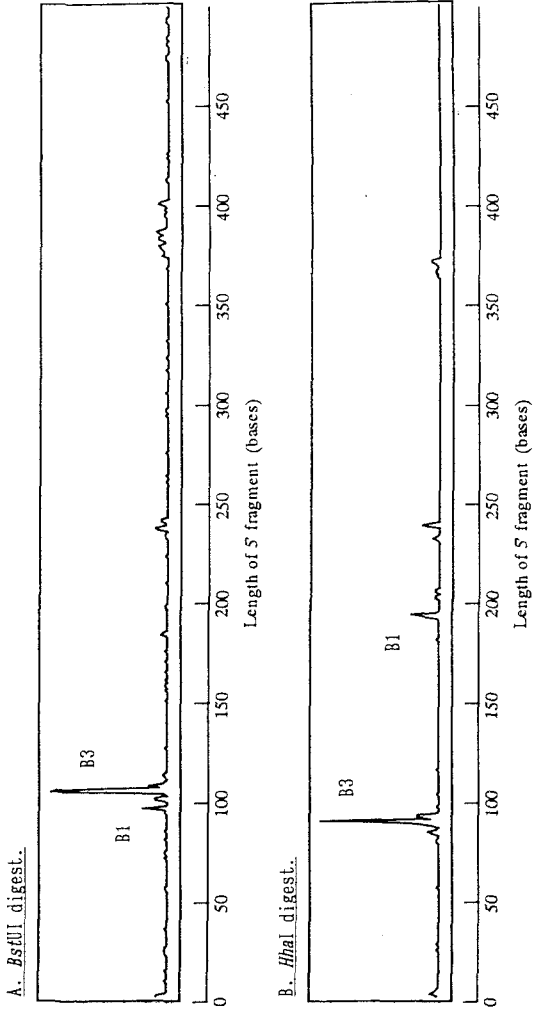


Fig. 4. Electropherograms of 5' T-RFLPs of PCR-amplified 16S rDNA from an enrichment culture capable of dechlorinating PCE to ethylene and ethane.

に一致する切断片長のピーク（それぞれ 96 bases, 195 bases：理論値よりも 4～6 bases 小さく検出される¹⁰⁾）が確認された。これらの結果から、系統学的に *D. ethenogenes* 195 に近いバクテリアが汚泥中に存在していることが明らかとなった。

なお、取得した 96 のクローン（バクテリア：48, 古細菌：48）のうち、出現頻度が 2 以上のものについて塩基配列を決定したが、その中に報告されている病原性菌や日和見感染菌由来のクローンは見あたらなかった。

3.4 各種電子供与体による PCE の分解

流動床リアクターから採取した汚泥を種菌とし、Table 7～9 の条件で 3 系列の土壌カラム（No.1～3）を運転した。汚泥は流動床リアクターの運転開始 215 日後に採取したが、このとき、流動床リアクターでは PCE が *cis*-DCE に脱塩素化されたのみで、それ以降の脱塩素化は認められなかった（Fig.3A）。

Table 7. Experimental conditions of soil column No.1.

Operation time (day)	0～33	33～93	93～205	205～224	224～252	252～343	343～380	380～438	438～540
Electron donor (mg/L)	Methanol 100	Methanol 100	Methanol 140	Ethanol 140	Ethanol 60	Ethanol 30	Ethanol 30	Ethanol 30	Ethanol 30
PCE (mg/L)	1	2	4	3	4	5	4	4	4
(μ mol/L)	(6)	(12)	(24)	(18)	(24)	(30)	(24)	(24)	(24)
Sulfate (mg/L)	0	0	0	0	0	0	0	14	61
HRT (h)	7	15	23	15	15	12	12	12	12

各土壌カラムの PCE 処理結果を Fig.5～7 に示す。いずれの土壌カラムにおいても、運転 100 日あたりから PCE が *cis*-DCE に脱塩素化されるようになったが、140 日までに VC は生成せず、*cis*-DCE 以降の脱塩素化は確認されなかった。一方、流動床リアクターでは PCE がエチレンに分解され始めた。そこで、土壌カラムの運転 142 日に流動床リアクターの汚泥（Fig.3, 運転 356 日）10 mL を土壌カラムの 2

番目のサンプリングポート（Fig.2）に植種した。その結果、いずれの土壌カラムでも脱塩素化が進み、200～300 日には PCE がほぼ完全にエチレンに脱塩素化（エチレン化）されるようになった。エチレン化はプロピオン酸を通水した土壌カラム No.3 で最も早く、運転 200～220 日（植菌後 60～80 日）に観察された（Fig.7）。また、エタノールを通水した土壌カラム No.1 で最も遅く、運転 250～300 日（植菌後 110～160 日）に起こった（Fig.5）。

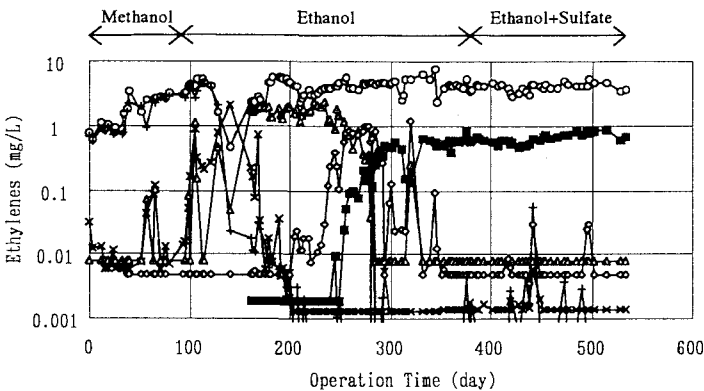


Fig.5. Dechlorination of PCE in soil column reactor No.1. PCE(—○—) was fed to soil column reactor(Fig.2) with methanol or ethanol as the electron donor under the conditions shown on Table 7. PCE, —+—; TCE, —×—; *cis*-DCE, —▲—; VC, —△—; ethylene, —■—; in the effluent.

各土壌カラムでエチレン化が確認された後は電子供与体濃度を段階的に下げながら運転を行った (Table 7～9)。その結果、

いずれのカラムでも PCE はエチレンに分解し (Fig.5～7)、Table 10 に示したように 30～60 mg/L という低濃度のエタノール、乳酸、スクロース (ショ糖) あるいはプロピオン酸で 4 mg/L (24 μ mol/L) の PCE をエチレンに分解し、PCE、TCE および *cis*-DCE を環境基準値 (それぞれ 0.01 mg/L, 0.03 mg/L, 0.04 mg/L) 以下に、また、VC (環境基準項目には含まれていない) を 0.01 mg/L 以下に処理できることがわかった。なお、実験を通して 1,1-DCE や *trans*-DCE およびエタンが検出されることはなかった。

Table 8. Experimental conditions of soil column No.2.

Operation time (day)	0～33	33～93	93～203	203～260	260～281	281～380	380～407
Electron donor (mg/L)	Lactate 740	Lactate 740	Lactate 740	Lactate 350	Lactate 60	Lactate 30	Sucrose 50
PCE (mg/L)	1	2	4	3	4	4	4
(μ mol/L)	(6)	(12)	(24)	(18)	(24)	(24)	(24)
HRT (h)	7	15	15	15	15	15	15

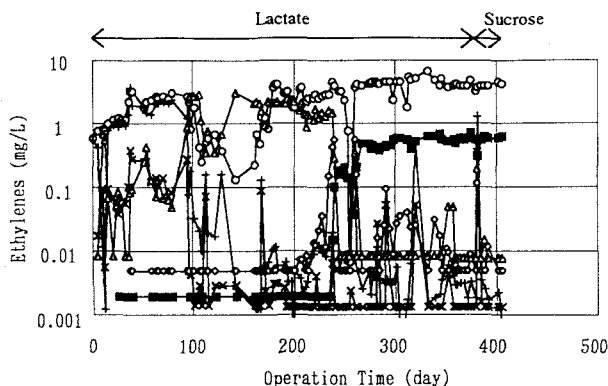


Fig.6. Dechlorination of PCE in soil column No.2. PCE (—○—) was fed to soil column (Fig.2) with lactate or sucrose as the electron donor under the condition shown on Table 8. PCE, —+—; TCE, —×—; *cis*-DCE, —△—; VC, —◇—; ethylene, —■—; in the effluent.

Table 9. Experimental conditions of soil column No.3.

Operation time (day)	0～33	33～93	93～281	281～301
Electron donor (mg/L)	Propionate 810	Propionate 810	Propionate 170	Propionate 60
PCE (mg/L)	1	2	5	4
(μ mol/L)	(6)	(12)	(30)	(24)
HRT (h)	7	15	15	15

Table 10. Electron donors which were able to dechlorinate 4 mg/L (24 μ mol/L) of PCE to ethylene in soil columns.

Electron donor	Concentration
Ethanol	30 mg/L
Lactate	30 mg/L
Sucrose	50 mg/L
Propionate	60 mg/L

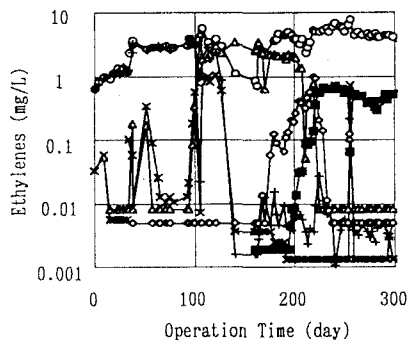
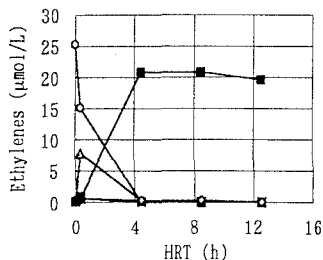


Fig.7. Dechlorination of PCE in soil column No.3. PCE (—○—) was fed to soil column (Fig.2) with propionate as the electron donor under the conditions shown on Table 9. PCE, —+—; TCE, —×—; *cis*-DCE, —△—; VC, —◇—; ethylene, —■—; in the effluent.

各電子供与体によるPCEの分解挙動をFig.8に示す。Fig.8では塩化エチレン類とエチレンの濃度をmol単位で示した。いずれの条件でも3番目のサンプリングポート (Fig.2, HRT 4~5時間にあたる) においてPCEがエチレンに完全分解 (PCE, TCE, *cis*-DCEは環境基準値以下, VCは0.01 mg/L以下) し、各電子供与体によって分解速度に大きな差は認められなかった。

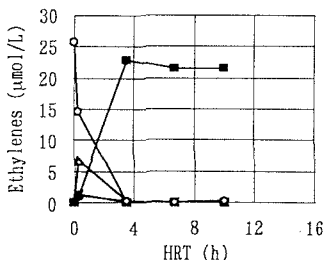
A. Ethanol 30 mg/L.

Average values in reactor No.1
from 351 through 371 day.



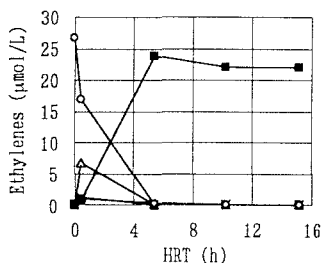
B. Lactate 30 mg/L.

Average values in reactor No.2
from 357 through 376 day.



C. Sucrose 50 mg/L.

Average values in reactor No.2
from 402 through 407 day.



D. Propionate 60 mg/L.

Average values in reactor No.3
from 290 through 301 day.

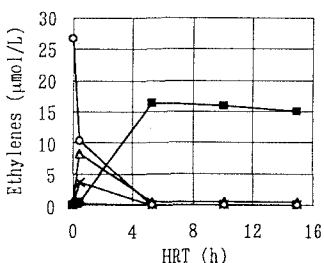


Fig.8. PCE dechlorination profiles with different electron donors in soil columns. PCE, $\circ$ —; TCE, $\times$ —; *cis*-DCE, $\triangle$ —; VC, $\diamond$ —; ethylene, $\blacksquare$ —.

3.5 硫酸存在下でのPCEの分解

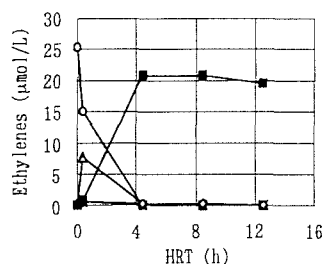
土壌カラム No.1では運転 379 日から培地に硫酸ナトリウムを加え、所定濃度 (Table 7) で硫酸イオンを通水した。結果を Fig.5 および Fig.9 に示す。硫酸濃度を上げた 379 日あたりを除いて PCE はエチレンに分解され、カラム出口 (5 番目のサンプリングポート, Fig.2) では PCE、TCE および *cis*-DCE は環境基準値以下、VC は 0.01 mg/L 以下であった (Fig.5)。しかしながら、HRT 4 時間にあたる 3 番目のサンプリングポートでは、硫酸を通水していなかったときには VC が 0.01 mg/L 以下であったのに対して、硫酸通水後は VC 濃度が高くなった (Fig.9)。このように、HRT 4 時間においては硫酸イオンが PCE の脱塩素化 (VC の分解) を阻害する傾向が認められた。

硫酸は 14 mg/L 通水したときにはカラム出口で 4 mg/L 程度、61 mg/L 通水したときには 40 mg/L 程度

であり（データ省略）、硫酸還元反応が起きていると考えられた。また、いずれの条件においてもカラム出口では酢酸やプロピオン酸などの有機酸は検出されず、メタンが検出され、メタン生成が起こっていることが確認された。メタンは、硫酸を通水していなかった 343～380 日では 8 mg/L 程度であったが、硫酸を通水するとメタン濃度は低くなり、61 mg/L の硫酸を通水した 438～540 日は 2 mg/L 程度となった（データ省略）。

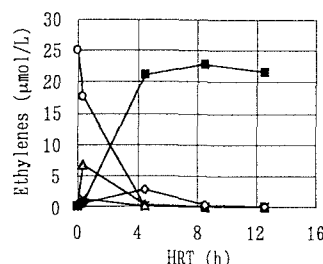
A. No sulfate.

Average values from 351 through 371 day.



B. Sulfate 14 mg/L.

Average values from 382 through 407 day.



C. Sulfate 61 mg/L.

Average values from 442 through 540 day.

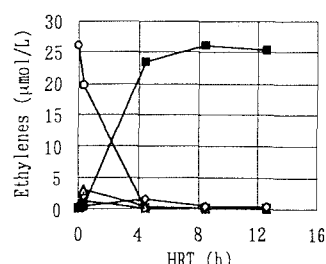


Fig.9. PCE dechlorination profiles in soil column No.1 in the presence or absence of sulfate. PCE, $\circ$; TCE, $\times$; *cis*-DCE, $\blacktriangle$; VC, $\diamond$; ethylene, $\blacksquare$.

4. 考察

本実験では、流動床リアクターにより PCE をエチレンやエタンに分解する微生物群を集積培養することに成功した。本リアクターでは供給した PCE の 35%程度が塩化エチレン類やエチレン、エタンとして回収された。残りの PCE が何に分解されているかは明らかでないが、Vogel ら²⁾はメタン生成条件下で PCE の一部が CO_2 に無機化されることを報告しており、本リアクターでも PCE の一部は同様の反応で分解されていることが推察される。

流動床リアクターでは当初 PCE が *cis*-DCE にまでしか脱塩素化されなかったが、微生物源を植種し、また、電子供与体をメタノールから糖類、有機酸、アルコールを含む混合物に変更することにより、さらに脱塩素化が進み、エチレンやエタンが生成するようになった。一方、エチレン・エタン化が起こる直前に添加した土壤には *cis*-DCE をエチレンやエタンに脱塩素化するポテンシャルがあることが確認されている⁹⁾。また、本流動床リアクターの汚泥を PCE とメタノールで培養することによりエチレンが生成することが確認されている¹³⁾。これらのことから、PCE がエチレンやエタンに脱塩素化されるようになったのは、電子供与体組成を変更したためというより、むしろエチレン・エタン化能をもつ微生物が植種されたためと考えられる。流動床リアクターの汚泥を解析した結果、汚泥中に *Dehalococcoides ethenogenes* Subgroup の近縁種が存在することがわかったが、*D. ethenogenes* 195 は PCE をエチレンに脱塩素化できるバクテリアであり⁹⁾、本リアクターではこの *D. ethenogenes* の近縁種が PCE のエチレン化を担っているものと推察された。

土壤カラムでは、流動床リアクターで集積培養した汚泥を植種することにより PCE がエチレンに脱塩

素化されるようになり、長期間にわたって PCE を連続的に処理することができた。Ellis ら⁹⁾は TCE と乳酸で集積培養した TCE 分解菌を土壤に植種し、乳酸を供給することにより地下水中の TCE をエチレンに分解処理できたことを報告しているが、本実験によって得られた汚泥も bioaugmentation (外来微生物を用いた浄化処理) のための植種源として利用できるものと考えられた。

PCE の脱塩素化に利用できる電子供与体としては、乳酸、安息香酸、プロピオン酸、酪酸、メタノール、エタノール、水素などが報告されている¹¹⁻¹³⁾が、土壤カラムではエタノール、乳酸、プロピオン酸およびスクロースが利用できることが確認された。電子供与体の必要最小量は明らかでないが、30~60 mg/L という低濃度の電子供与体 (Table 10) で 4 mg/L の PCE をエチレンに脱塩素化できることがわかった。

土壤カラムによる PCE 分解実験では 3 つの電子供与体通水条件で土壤カラムを運転したが、HRT 4~5 時間では電子供与体によって PCE の分解速度に大きな差は観察されなかった。しかしながら、エチレン化が起こるまでに要する期間は電子供与体の通水条件によって異なり、プロピオン酸を通水したリアクター No.3 で最も短期間でエチレン化が起こるようになった。一般に脱塩素化反応において直接電子供与体として働くのは水素であり、水素に対する親和性はメタン菌よりもエチレン化菌の方が高いとされている¹⁴⁾¹⁵⁾。Fennell ら⁹⁾はエタノールを用いた場合に比べてプロピオン酸を用いた方が系内の水素濃度が低く維持されるため、水素をめぐる競合においてメタン菌よりもエチレン化菌の方が有利になると述べている。本実験においてもプロピオン酸を通水した土壤カラムの方が系内の水素濃度が低く維持されたため、エチレン化菌がより速く増殖できたものと推察された。

土壤カラムでは 30 mg/L のエタノールで 4 mg/L の PCE をエチレンに分解できた。その後、14 mg/L あるいは 61 mg/L の硫酸を通水したが、カラム出口 (HRT 12 時間) での処理水質に差はなかった。しかし、カラム途中で VC 濃度が上昇し、PCE の脱塩素化が硫酸イオンによって阻害される傾向が認められた。Lorah ら¹⁰⁾も硫酸イオンによって TCE 分解速度が低下し、VC が蓄積することを報告している。PCE の脱塩素化に対する硫酸の阻害機構は明らかでないが、エチレン化菌と硫酸還元菌による競合や硫酸還元反応で生成する硫化水素による阻害が考えられる。

5. まとめ

- 1) 流動床リアクターにより PCE をエチレンおよびエタンに分解する微生物群を集積培養した。
- 2) 流動床リアクターの汚泥より *Dehalococcoides ethenogenes* Subgroup の 16S rDNA クローンが得られた。*D. ethenogenes* 195 は PCE をエチレンに脱塩素化するバクテリアとして報告されているが、本リアクターでは系統学上 *D. ethenogenes* に近いバクテリアが PCE のエチレン化を担っているものと推察された。
- 3) 流動床リアクターで集積培養された汚泥を植種することにより、土壤カラムにおいて PCE がエチレンに脱塩素化されるようになり、長期間にわたって連続的に PCE を処理することができた。このことから、本実験によって得られた汚泥が bioaugmentation の植種源として利用できるものと考えられた。
- 4) 土壤カラムによる実験では、エタノール、乳酸、スクロース、プロピオン酸が電子供与体として利用でき、それぞれ 30 mg/L、30 mg/L、50 mg/L、60 mg/L の電子供与体で 4 mg/L の PCE を完全分解し、HRT 4~5 時間で PCE、TCE、*cis*-DCE を環境基準値以下に、また、VC を 0.01 mg/L 以下にすることができた。
- 5) 硫酸イオン (61 mg/L) はカラムの途中 (HRT 4 h) で PCE の脱塩素化を若干阻害 (VC 濃度が上昇) したが、カラム出口 (HRT 12 h) では完全に分解された。

参考文献

- 1) D.L.Freedman, *et al.*, Biological Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene to Ethylene under Methanogenic Conditions, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 55(9), 2144(1989)
- 2) W.P.deBruin, *et al.*, Complete Biological Reductive Transformation of Tetrachloroethene to Ethane, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 58(6), 1996(1992)
- 3) 小松俊哉ら, テトラクロロエチレンの分解除去を目的とした嫌気性ろ床のスタートアップと処理特性. 水環境学会誌, 19(6), 465(1996)
- 4) Beemann, *et.al.*, A Field Evaluation of In Situ Microbial Reductive Dehalogenation by the Biotransformation of Chlorinated Ethenes, Bioremediation of Chlorinated and PAH Compounds, p.14, BATTELLE PRESS (1994)
- 5) D.E.Ellis, *et.al.*, Bioaugmentation for Accelerated In Situ Anaerobic Bioremediation, *Environ. Sci. Technol.*, 34(11), 2254(2000)
- 6) 上野俊洋ら, 塩素化エチレン汚染土壌・地下水に対する嫌気性微生物処理の現場実証, 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会第7回講演集, p.275(2000)
- 7) Wei-Min Wu, *et al.*, Dechlorination of PCE and TCE to Ethene Using an Anaerobic Microbial Consortium, Bioremediation of Chlorinated Solvents, p.45, BATTELLE PRESS(1995)
- 8) D.E.Fennell, *et al.*, Comparison of Butyric Acid, Ethanol, Lactic Acid, and Propionic Acid as Hydrogen Donors for the Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene, *Environ. Sci. Technol.*, 31(3), 918(1997)
- 9) X.Maymo-Gatell, *et al.*, Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene, *Science*, 276(6), 1568(1997)
- 10) 中村寛治ら, フェノールによるトリクロロエチレンのコメタボリズムにおいて出現する微生物群の解析, 環境工学研究論文集, 36, 1(1999)
- 11) D.Y.Guschin, *et.al.*, Oligonucleotide Microchips as Genosensors for Determinative and Environmental Studies in Microbiology, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 63(6), 2397(1997)
- 12) E.F.Delong, Archaea in Coastal Marine Environments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5685(1992)
- 13) 上野俊洋ら, 嫌気性微生物によるテトラクロロエチレンの無害化, 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会第6回講演集, p.113(1998)
- 14) C.R.Smatlak, *et.al.*, Comparative Kinetics of Hydrogen Utilization of Tetrachloroethene and Methanogenesis in an Anaerobic Enrichment Culture, *Environ. Sci. Technol.*, 30(9), 2850(1996)
- 15) Y.Yang, *et.al.*, Competition for Hydrogen within a Chlorinated Solvent Dehalogenating Anaerobic Mixed Culture, *Environ. Sci. Technol.*, 32(22), 3591(1998)
- 16) M.M.Lorah, *et.al.*, Anaerobic and Aerobic Biodegradation of Chlorinated Solvents in a Freshwater Wetland, Natural Attenuation, p.27, BATTELLE PRESS(1998)