

活性汚泥の代謝産物によるテトラクロロエチレン分解に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-12-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大野, 勝也 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/51017

活性汚泥の代謝産物による
テトラクロロエチレン分解に関する研究

2014 年

岐阜大学連合農学研究科
生物資源科学
(岐阜大学)

大野 勝也

目次

1. 緒言-----	5
2. 活性汚泥の代謝産物による活性汚泥の PCE 分解-----	13
2.1 活性汚泥の PCE への馴養-----	13
2.1.1 材料および方法-----	13
2.1.1.1. 馴養方法-----	13
2.1.1.2. PCE 減少試験方法-----	14
2.1.1.3. 菌叢解析-----	15
2.1.1.4. 菌の単離-----	16
2.1.2. 結果および考察-----	16
2.1.2.1 PCE への馴養および馴養後の汚泥の PCE 減少効果-----	16
2.1.2.2 菌叢解析-----	17
2.1.2.3. 馴養汚泥からの菌の単離-----	22
2.2. 汚泥濾液による PCE の減少効果-----	23
2.2.1. 材料および方法-----	23
2.2.1.1. 汚泥の濾過-----	23
2.2.1.2. メンブレン濾液の諸性質-----	23
2.2.2. 結果および考察-----	23
2.2.2.1. 汚泥濾液による PCE 減少効果-----	23
2.3. 濾液中の PCE 減少に関与する物質の精製分離-----	27
2.3.1. 材料および方法-----	27
2.3.1.1. 分子量分画-----	27
2.3.1.2. 固相カラム抽出-----	27
2.3.1.3. カラムによる精製-----	28
2.3.2. 結果および考察-----	28

2.3.2.1. 分子量分画-----	28
2.3.2.2. 固相カラムによる特性分析-----	29
2.3.2.3. HPLC 精製分離-----	31
2.4. PCE 減少に関する濾液成分の構造解析-----	31
2.4.1. 材料および方法-----	31
2.4.1.1. MALDI-TOF/MS 解析-----	31
2.4.1.2. アミノ酸配列の推定 (denovo シーケンス解析)-----	32
2.4.2. 結果および考察-----	32
2.4.2.1. PCE 減少に関する物質の質量-----	32
2.4.2.2. PCE 減少に関する物質のアミノ酸配列の推定-----	33
2.5. PCE 減少メカニズム-----	35
2.5.1. 材料および方法-----	35
2.5.1.1. 塩素イオンの挙動解析-----	35
2.5.2. 結果および考察-----	36
2.5.2.1. PCE 減少メカニズム-----	36
2.6. 小括-----	38
3. 活性汚泥のバイオサーファクタントによる PCE 乳化作用-----	39
3.1. 濾液のバイオサーファクタント (BS) 物質の特性-----	39
3.1.1. 材料および方法-----	39
3.1.1.1. 濾液の作成-----	39
3.1.2. 結果および考察-----	39
3.1.2.1. 濾液の性質と BS 様物質の粒度分布-----	39
3.2. 濾液による各有機化合物の乳化作用-----	40
3.2.1. 材料および方法-----	40

3.2.1.1. 塩素化エチレンの乳化作用の検証-----	40
3.2.1.2. PCE 添加時の粒度分布の測定-----	41
3.2.2. 結果および考察-----	41
3.2.2.1. PCE の乳化作用-----	41
3.2.2.2. 各塩素化エチレンの乳化作用と溶解度による違い-----	42
3.2.2.3. 高濃度 PCE の乳化作用-----	43
3.3. 既知の界面活性剤との比較-----	44
3.3.1. 材料および方法-----	44
3.3.1.1. 合成界面活性剤およびサーファクチンナトリウムの PCE 乳化評価--	44
3.3.1.2. 界面活性剤混合水溶液および濾液の TOC 濃度の測定-----	44
3.3.2. 結果および考察-----	44
3.3.2.1. 既知の界面活性剤との PCE 乳化力の比較-----	44
3.4. 油膜排除-----	45
3.4.1. 材料および方法-----	45
3.4.1.1. 油膜排除活性-----	45
3.4.2. 結果および考察-----	46
3.4.2.1. 濾液および各界面活性剤による原油の油膜排除活性-----	46
3.5. 分離・精製-----	47
3.5.1. 材料および方法-----	47
3.5.1.1. 濾液からの BS 様成分の分離・精製-----	47
3.5.2. 結果および考察-----	48
3.5.2.1. BS 様成分の分離および精製-----	48
3.6. 小括-----	51
4. 総括-----	52

5. 参考文献	54
---------	----

6. 謝辭	60
-------	----

1. 緒言

人類は化学的に様々な物質を合成し、自然界に極少量しか存在しない、又は全く存在しない物質を作り出し、医薬分野では消毒薬や薬など、農業分野では農薬など、工業分野では洗剤や乳化剤といったように多様に産業活動に利用されてきた。例えばレイチェルカーソン著書の『沈黙の春』でも有名となったが(9), 1874年に1,1,1-トリクロロ-2,2-ビス(4-クロロフェニル)エタン(通称 DDT)がオトマール・ツァイドラーによって初めて合成され(30), ノーベル生理学・医学賞を受賞したパウル・ヘルマン・ミュラーによって1939年にその殺虫効果が明らかにされた(69)。それ以降、安価に大量合成でき、少量で殺虫効果があることなどの理由で大量生産された。日本でも戦後復興において、この DDT が国民の衛生改善に大いに役立ち、シラミ等が媒介する様々な伝染病の駆逐に成功した。その後、農薬としても利用され農業生産の向上にも役立ってきた。

一方、工業生産にも自然環境に存在しない多くの化学合成物質が生産されており、テトラクロロエチレン(PCE)やトリクロロエチレン(TCE)といった揮発性有機化合物(VOC)の一種は電子基盤、自動車金属部品の脱脂洗浄、ドライクリーニング、フロンガス製造などに利用されてきた。塩素が1774年にスウェーデンの化学者カール・ヴィルヘルム・シェーレによって発見されて以来(77), 塩素化合物は様々な用途に利用されており、C-Cl結合を有する化合物は安定性を持っていることから有機塩素化合物が世界中で大量に合成されるようになった。PCEはDDTが初めて合成された年月より遡ること1821年にマイケル・ファラデーがヘキサクロロエタンを分解することで初めて合成された(80)。国内では1990年の年間およそ100,000 tの消費量(推定値)があり、その後2005年の生産量統計中止になるまで年間およそ50,000 tの消費量で推移していた(53)。

有機塩素化合物であるPCEは構造的に安定であり、それが自然環境下では分解されにくいことから環境汚染といった問題を引き起こした。好気条件下における水中での半減期は180日、嫌気条件下では98日、OHラジカルとの反応性は大気中での速度定数を $1.67 \times 10^{-13} \text{ cm}^3/\text{分子} \cdot \text{sec}$ (25°C)とした時の半減期は96日で(42), 揮発性物質用改良型培養瓶を用いた化学物質審査規制法に基づく好氣的生分解性試験ではPCE濃度100 mg/L, 活性汚泥濃度30 mg/Lの条件下でBOD(生物化学的酸素消費量)の分解率は11%, ガスクロマトグラフ(GC)測定では分解率は0%との報告がある(85)。

PCEの環境中の生物に対する毒性は致死、遊泳阻害、生長(成長)阻害、繁殖などの指標がある。水生生物に対する急性毒性は、甲殻類に対してGHS急性毒性有害性区分Iに相当し、極めて強い有害性を示し、長期毒性としては、オオミジンコの繁殖を指標とした21日間における最大無影響濃度(NOEC)が0.080 mg/L(70), 魚類の急性毒性は、淡水魚で96時間のLC50は4.99~23.8 mg/Lの範囲にあり、このうちゼブラダニオ(*Danio rerio*), ニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)およびアメリカンフラッグフィッシュ(*Jordanella floridae*)ではGHS急性毒性有害性区分IIに相当し、強い有害性を示している(71, 79, 78)。

海水魚ではトウゴロウイワシ (*Menidia beryllina*) およびキプリノドン (*Cyprinodon variegatus*) において 96 時間の LC50 は 9.8~28.1 mg/L(35), 長期毒性としては、ファットヘッドミノー (*Pimephales promelas*), ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) およびトウゴロウイワシ (*Menidia beryllina*) においてふ化率, 致死, 成長などを指標にした場合の 21~32 日間における NOEC が 0.5~2.34 mg/L との報告がある(2, 35, 79). 陸生生物に関しては, 土壌細菌, レタス, ミミズ, 昆虫類等の試験結果の報告があり, ミミズに対する 14 日間の LC50 は 100~320 mg/kg(87), 昆虫類のオサムシに対する致死および行動を指標とした NOEC は 5.0 mg/kg であった(72).

一方, 哺乳類における PCE の影響は次の通りである. PCE の主要な暴露経路は吸入であり, ヒト, ラット, マウスにおいて肺から速やかに吸収され, 経口や経皮吸収も認められている(14, 67, 75). PCE は脂肪組織に分布し蓄積することも認められており(3), ラットの吸入暴露で血液, 脳, 肝臓, 腎臓, 肺, 心臓, 腎周辺の脂肪及び骨格筋に PCE の蓄積が認められ, マウスでは胎盤通過, 胎仔や羊水に分布が確認されている(21, 22). PCE はラット, マウスおよびヒトにおいて暴露経路に関わらず, 大部分が呼気中に排泄され, シトクロム P-450 酸化代謝経路で主に代謝され, 尿中代謝物としてトリクロロ酢酸およびシュウ酸が確認されている(65). シトクロム P-450 経路が飽和すると, グルタチオン還元的代謝経路が増加し, S-(1,2,2-トリクロロビニル)システインが形成され, S-(1,2,2-トリクロロビニル)システインは腎臓の β -リアーゼの作用でジクロロ酢酸とピルビン酸に分解されるが, 腎毒性が指摘されている(6, 15).

またこれまでに, ラットを用いた試験では PCE の発癌性が確認されており(25, 84), 人に対する発癌性の臨床データは報告されていないが, 国際癌研究機関 (IARC) の発癌性リスク一覧においてグループ 2A(ヒトに対する発癌性がおそらくある: Probably Carcinogenic) に位置づけられている. また, アメリカ環境保護庁 (EPA) は 2012 年 2 月に最終健康評価として統合的リスク情報システム (IRIS) に PCE に発癌性がある旨を公表し, 2020 年までにドライクリーニング等で使用されている PCE の段階的使用停止を義務付けた(18). このように PCE 暴露による発癌性や変異原性の可能性が指摘されている.

これら PCE をはじめとする各種有機塩素化合物は土壌・地下水中における汚染が世界各地で問題となっている. 現在, 国内における PCE の水質基準値は 0.01mg/L 以下となっており, アメリカの EPA や EU でも 0.01 mg/L 以下と定められている. WHO のガイドラインでは 0.04 mg/L 以下となっており, 全世界で排出を厳しく制限している. また, 国内では 2003 年に土壌汚染対策法が制定され, 土壌・地下水における各種汚染物質の基準値を超過した場合は除染すること(重金属などの一部は不溶化処理も可)が義務付けられている. ドライクリーニング跡地などでこれまでに多くの汚染が判明している(36). 国内の土壌汚染対策法の対象物質による汚染箇所は経済産業省の試算によると潜在的な汚染を含めて 44 万 ha, その浄化費用は 150 兆円にもなるとされている. 汚染報告は日本全国に広がっており, 未だ完全に除染されていないところも多い. 各市町村で公表されている例として, 平

成 12 年に岐阜県岐阜市のドライクリーニング跡地で PCE の地下水汚染が報告されている(23). 群馬県の坂東工業団地(渋川市北橋町)周辺の対象敷地面積 7,400m²において、昭和 30 年代にカーバイド滓を埋設したことによる PCE, トリクロロエチレン等が検出され、89 地点のうち 73 地点で PCE の基準値超過があり PCE 汚染濃度は最大で 740 ppm であったことが平成 19 年に公表されている(27). 平成 24 年に新潟県阿賀野市の地下水から 0.16 mg/L の PCE の検出が報告されている(64). 平成 25 年の報告で徳島市中吉野町では過去ドライクリーニング跡地において半径約 1km の範囲で PCE は最大 0.014mg/L の土壌溶出濃度が認められたことが公表されている(82). 平成 26 年には東京都東大和市の新学校給食センター建設用地における調査でも土壌ガスとして 0.1 vol ppm が検出されたとの報告もある(31).

PCE は水よりも比重が重いので、地表から浸み込んだ PCE は帯水層へと到達し、深度が深いところへ徐々に汚染が縦方向に広がっていくのである。また、帯水層に到達した PCE は水への溶解度が極めて低いので(25℃で 200 mg/L)、徐々に広範囲の地下水へも汚染が横方向に広がっていくことになる(11, 39).

実際に、土壌汚染対策法が制定されて以来、様々な浄化・除染方法が行われてきており、とりわけ PCE を含む揮発性有機塩素化合物等は汚染サイトから汚染土壌を掘削して外部へ持ち出す掘削搬出法と汚染サイトで浄化が行われる原位置浄化法のどちらかまたは組み合わせ法が行われてきた(11). 掘削除去法のメリットとしては、汚染土壌をそのまま取り除くという方法であるため、汚染濃度に関わらず極めて短期間で完全に汚染源を除染できることに尽きる。掘削後はセメント工場等に持ち込まれ高温で焼却されるため高濃度汚染土壌にも対応できる一方で、デメリットとしては、掘削した部分しか浄化・除染ができないことである(33,56). 例えば、PCE では汚染から時間が経っていると前述したように、深度深くに縦の汚染が広がっている場合は、掘削できる範囲がせいぜい地表から数 m であるため、全ての汚染土壌を取り除くことは不可能である(33). また、地下水への汚染がある場合も掘削除去法では対応できない。さらに、建物が建っている場所も掘削除去が適応不可である(56). これらの理由から掘削除去は建物が無く汚染場所が比較的浅い土壌かつすぐに土地を売買したい場合のみに限られてくる。また、汚染物を外部へ持ち出すことに関して汚染を拡散させてしまう危険も皆無ではない。環境省でも必要以上に汚染土壌を外部へ持ち出すことに警鐘を鳴らしている(40). 一方、原位置浄化法もメリット・デメリットがある。近年では各企業のコンプライアンスの観点から土壌汚染対策法の適応範囲外であっても自主的に汚染調査を行い、浄化を行う場合もある(36).

工場稼働中で建物が建っている場合は原位置浄化法が用いられることが多い。原位置浄化法には物理的方法、化学的方法、生物学的方法(バイオレメディエーション法)が用いられている。物理的方法には地下水の揚水曝気法、エアスパージング法、土壌ガス吸引法、ホットソイル法などが用いられている(38). 揚水曝気法、エアスパージング法などは地下水や帯水層を曝気して揮発性有機化合物を追い出し、活性炭等に吸着させる方法は膨大な時

間と費用がかかり、汚染物質の拡散の危険性もある(37)。土壌ガス吸引法など土壌中の揮発性有機化合物をガス化させて追い出す方法も同様である。またホットソイル法は掘削した土壌をオンサイトで熱分解させる方法であるため、掘削除去法の外部持ち出しがない分だけデメリットを減らしているが基本的にメリット・デメリットにさほど差はない(37)。化学的方法には、フェントン（酸化剤）法、鉄粉法などがある。フェントン法は過酸化水素などと二価鉄を加えて、酸化力の強いヒドロキシラジカル（ $\bullet\text{OH}$ ）を生成させて有機化合物を酸化させる方法であるが(89)、pH が酸性でないと反応が進行しない。また、鉄粉法は0価の鉄粉を用いて還元的に有機塩素化合物の塩素と水素を置換する方法であるが(24)、PCE → トリクロロエチレン → ジクロロエチレン → 塩化ビニル → エチレンと無害化させるまでの反応経路が長い場合途中の分解産物で止まってしまう場合も多く(88)、完全な浄化までには年単位での汚染濃度のモニタリング等も必要になってくる。また、鉄粉を混合できるのは建物がない場所かつ地表面に限られるため、適応できる場所が限定される(37)。バイオレメディエーションはPCEを対象とした場合、嫌気性細菌による浄化が多く行われており、栄養剤を添加して汚染土壌中に存在するPCE分解能を持つ細菌を活性化させる方法（バイオスティミュレーション法）が国内では広く用いられている(43)。しかしながら、必ずしも汚染場所に分解菌が生息しているとは限らず、また栄養剤による活性化の効果も十分に期待値を満たさない(37)。一方で、予め他のサイトなどから分解菌をスクリーニングし、分解効果の高い菌を培養し、直接汚染土壌に混合する方法もアメリカやドイツといった海外では広く採用されている（バイオオーギュメンテーション）(17)。ただし、うまく土壌環境中で生存・増殖できるかといった問題や、汚染濃度によっては適応できない場合もある(37)。嫌気条件下でPCEを分解する微生物としては、*Clostridium bifermentans* DPH-1株(10)や*Desulfitobacterium* sp. KBC-1株(81)、Y51株(20)、*Methanosarcina* sp. DCM株(19)など多くの報告がある。図1-1に示したように、還元・嫌気による反応は完全に脱塩素化されるまでに時間を要し、完全に脱塩素化されずに分解中間産物（トリクロロエチレンやジクロロエチレンなど）で脱塩素化反応が止まる(45)。エチレンまで完全に脱塩素化できるのは*Dehalococcoides mccartyi*（以前は*D. ethenogenes*として報告）195株(54, 59)のみである。また、PCEを好気条件下で分解できる微生物としては*Pseudomonas stutzeri* OX1株(74)や*Trametes versicolor* (ATCC #42530) (58)の2種の報告があるのみである。*P. stutzeri* OX1株は分解経路が完全には証明されていないが、モノオキシゲナーゼの阻害剤を用いた試験で、分解が生じなかったことからエポキシ化が生じている可能性が高い(74)。しかしながら、分解副産物の特定はされていない。一方、*T. versicolor*はトリクロロ酢酸（実際のGC/MSの分析ではクロロホルムとして検出）を分解副産物として生成すると報告されている(58)。*P. stutzeri* OX1株は活性汚泥中から見出されており(74)、単離を行わずに嫌気条件下の活性汚泥でのPCE分解の報告もあるが、好気条件下の活性汚泥を用いたPCE分解メカニズムの正確な評価はほとんど行われてこなかった。本研究では好気条件下における活性汚泥におけるPCE分解メカニズムを報告する。

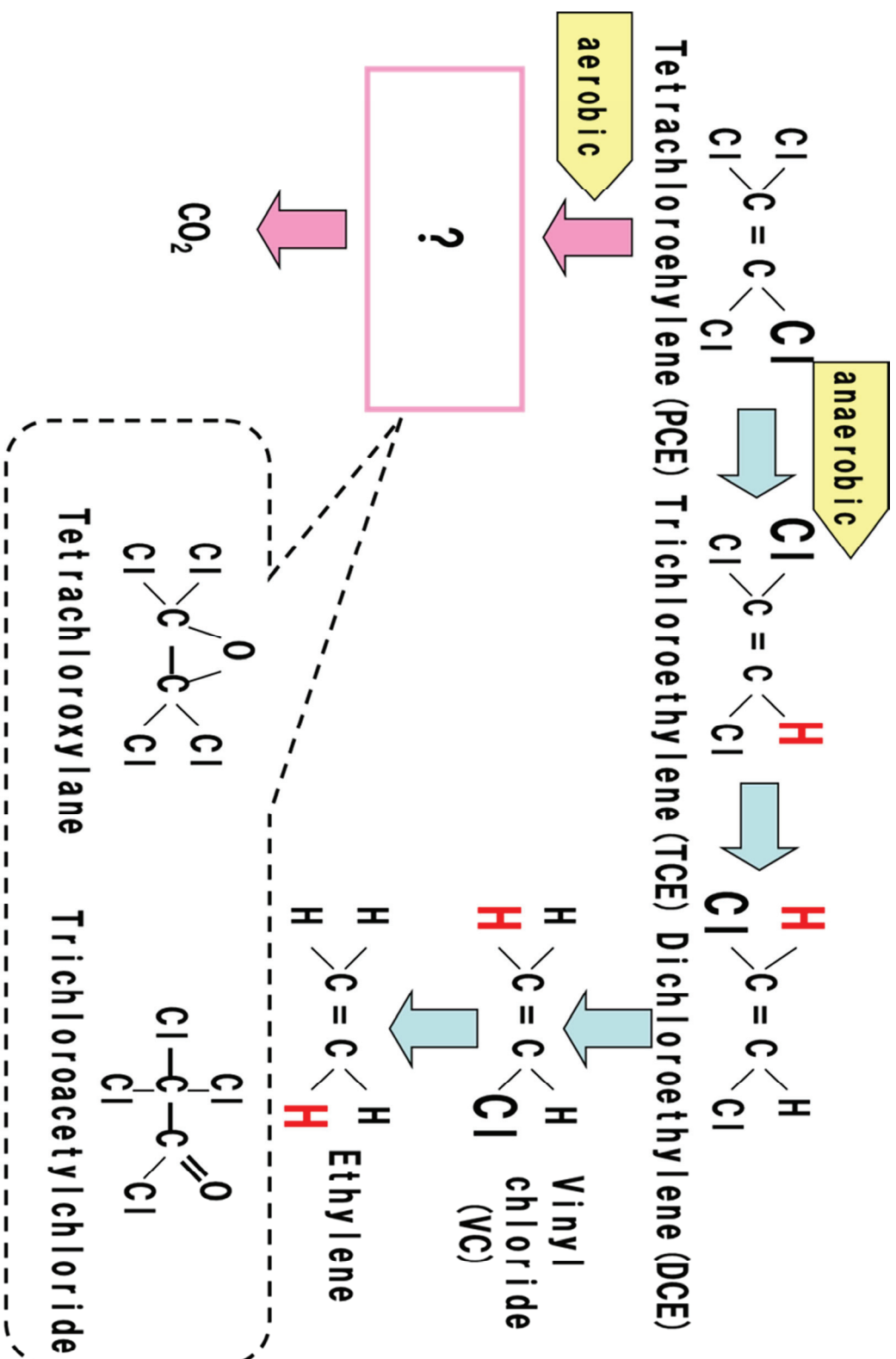


図 1-1. PCE の代謝経路

19 世紀にアメリカで油田からの採掘が盛んとなって以来、人類の経済活動を支えてきたのは石油が主である。石油は精製することにより、天然ガス、ナフサ（ガソリンなど）、重軽油などに分離され、残油はアスファルト等の原料ともなる。

ガソリンスタンド跡地ではガソリン等の汚染、工場跡地では機械油等の鉱物油汚染が近年問題となっており、環境省の中央環境審議会土壌農薬部会土壌汚染技術基準等専門委員会において 2006 年 3 月に油汚染対策ガイドライン(41)が公表されている。石油汚染で問題となるのは石油の主成分であるアルカンなどの炭化水素のみならず、BTEX（ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、キシレン）や MTBE(methyl tert-butyl ether)と総称される物質による汚染も同時に起こる(76)。ベンゼンは発癌性の懸念があり(90)土壌汚染対策法の対象物質である。トルエン、エチルベンゼン、キシレンも中枢神経への毒性があり、人体にとって有毒との報告もある(16)。

また、タンカー座礁等による油の海面汚染も世界で後を絶たず、運搬している原油や燃料である重油が漏洩して海面に流れ出て、海鳥や海獣をはじめ海洋生態系に深刻な被害をもたらす(83)。アメリカでは 1989 年 3 月に起きたエクソンバルディーズ号原油流出事故で積載していたおよそ 20 万 t の原油のうち 4 万 t がアラスカ沖のプリンスウィリアム湾に漏出し海岸線 2,400km に渡って汚染が起きた(49)。イギリスでは 1996 年 2 月、13 万 t の原油を積載したリベリア籍の大型タンカーが、イギリスのミルフォードヘイブン港外で座礁し、合計でおよそ 7 万 t の原油が流出し、国立公園内を含む約 200 km の海岸線が汚染された(50)。一方、四方が海に面しているわが国近海でも座礁による海洋汚染は多く最も有名な事故は 1997 年 1 月、島根県沖で発生したロシア船籍のナホトカ号の重油流出である。積載していた 19,000 t のうち 6,000t が事故時に漏洩し、残りの 12,000t はタンカーとともに海底に沈んだ(83)。2013 年 12 月には和歌山沖で韓国船が座礁しおよそ 9,000L の重油が海洋上に漏出した(51)。

さらに近年では、シェールガスの掘削技術がアメリカやカナダで進み、重要なエネルギー資源となっている。これらの掘削ではフラッキング(水圧破碎)法が主に用いられており、頁岩に含まれているガスを採取することができる。しかしながら、この時、回収し切れなかったメタンガスが地下水への流入することが問題となっている(66)。また、水圧破碎に用いられる薬剤や岩石に含まれていた有害物質等もまた地下水や掘削サイト周辺の湖沼等へ漏洩し、ベンゼン、キシレン、エチルベンゼン、ホルムアルデヒド、バリウム、砒素、カドミウム、クロム、鉛、水銀、界面活性といったものが汚染物質として報告されている(5, 26)。

また、土壌汚染対策法で対象となった前述の PCE を含む揮発性有機塩素化合物（VOC）とその他の第一種に指定されている物質は、根本的に水への溶解性が低い（例えば PCE：150 mg/L、トリクロロエチレン 1280 mg/L、ベンゼン：1800 mg/L などである）ため、前述のように汚染の浄化・除染には化学分解、生物分解をする上でこの溶解度が重要であり、溶解していない場合はほとんど反応できないと考えられる。とりわけ、バイオレメディエーションを行う場合は微生物が物質へアクセスするためには汚染源の水への溶解が重要な

要素である(46).

これらの問題を解決するのが界面活性剤となる。界面活性剤はそれ自体が親水基と親油基を有し、疎水性物質の表面を親油基側で取り囲み、親水基が表側に出るために疎水性物質が水中へ分散し乳化させることができる。ところが、化学的に合成されたものは環境中で分解されずに新たな汚染となる問題が生じる可能性がある。実際に、前述の石油およびその成分一つである芳香族炭化水素、アルカン等や土壌・地下水汚染物質である VOC 以外にもダイオキシン類・ポリ塩化ビフェニル (PCB), などは水への溶解性が極めて低く、バイオレメディエーション法や鉄粉法ではこれら物質の溶解度が分解律速となり分解が容易に進まない場合もある(34). 汚染物質が土壌粒子へ吸着した場合も同様に反応が進みにくい。また、油汚染土壌においても同様に鉱物油の水への溶解度が低く、バイオサーファクタント (以下 BS) BS を含む各種界面活性剤が利用されることがある(60).

一方で生物が生産する界面活性剤は BS と呼ばれ、環境低負荷であると考えられている(62). なぜなら、生物由来かつ低分子であることから生分解性が高いこと、石油などを原料としないことが挙げられる。この利点を生かして環境低負荷な乳化剤として多用途な応用が期待できる。微生物は栄養源確保のため、他の微生物との競争下において様々な物質を炭素源として利用してきた。とくに、リグニンのように分子量の大きな物質に対しては細胞外酵素などを微生物が産生して小さく分解することで細胞内へ取り入れている(8). 一方、疎水性物質に対しては生物由来の界面活性剤である BS を微生物が産生し、そのサーファクタントの乳化作用によって物質の疎水性を低下させ、細胞内へ取り込みやすくすることが知られている(47). BS は古くから研究がされてきており、その BS の構成成分 (または成分組成) からリポペプチド型としてサーファクチン、糖脂質型としてラムノリピッド、ソホロリピッド、マンノシルエリスリトールリピッド、トレハロースリピッドなどの報告がある(52). 例えば *Bacillus subtilis* が産生するサーファクチンは脂質とアミノ酸 10 個から成るリポペプチド型であり(4), *Pseudomonas* 属が生産するラムノリピッドはラムノースと脂質から成る(44). ソホロリピッドは *Candida bogoriensis* が産生する低発泡性である(73). また、マンノシルエリスリトールリピッドは *Candida antarctica* が産生しマンノースとエリスリトールと脂肪酸から構成される(68). トレハリピッドは *Rhodococcus erythropolis* 3C-9 株が生産するトレハロースと脂質から成る(48), いずれも糖脂質型 BS である。その他、脂肪酸やリン脂質などを産生する微生物の報告もあり、*Penicillium spiculispurum* Lehman は多塩基脂肪酸である γ -ヒドロキシ- β - δ -ジカルボキシペンタデコイン酸のラクトン体 ($C_{17}H_{28}O_6$) を産生することが知られている(13).

これまでの報告としては例えば、*P. aeruginosa* や *P. fluorescence* が産生するラムノリピッドによって n-アルカンの水への溶解性が高まったという報告がある(92). また、*P. aeruginosa* が産生したラムノリピッドを用いて、この PCE の溶解性を向上させたという報告もある(12). その他 BS の役割として、重金属で汚染された土壌の重金属を抽出に応用させた例もある(61). 近年、一部の保湿作用のある BS は肌の低刺激性から化粧品へも応用さ

れてきており、BS の需要はますます高まっている(1).

一方、活性汚泥法における BS の研究はラムノリピッドを用いた 2,4-ジクロロフェノールの分解率の増加の報告などがある(86)が、活性汚泥中の微生物が生産する BS についての報告はない。我々は電子部品製造工場の廃液処理に用いられている活性汚泥を PCE にて馴養したところ、微生物が産生する物質が PCE を分解することを報告した。本研究では、上記同様に馴養した活性汚泥中に BS が含まれることを見出し、さらにその特性を検討した。これら一連の研究結果を博士論文としてまとめ、提出する。

2. 活性汚泥のペプチド様代謝産物による PCE 分解作用

緒言

これまでに多くの PCE 生分解の報告があるが、嫌気性細菌による脱塩素化反応による PCE 分解が多く、完全分解の報告は *Dehalococcoides mccartyi* 195 株 (55) のみである。一方、好気反応では *Pseudomonas stutzeri* OX1 株(75)と *Trametes versicolor* (ATCC #42530) (59)の 2 件の報告があるが、いずれも低濃度 PCE を対象としている。また、活性汚泥といった複合微生物系における報告はほとんどない。活性汚泥を用いた場合、汚泥自体への吸着や好気の場合は曝気による揮発といった問題もあり(42), 正確な評価がこれまでに行なわれてこなかった。電子基盤製造工場では化学合成された様々な有機化合物を処理しており、難分解性物質の分解性能を有すると考え、本研究では、PCE にて馴養することで PCE を分解できる菌を有効に殖やす方法を用い、活性汚泥を用いた好気条件における高濃度 PCE 分解のメカニズム解明を目的とした。

2. 1. 活性汚泥の PCE への馴養

2. 1. 1. 材料および方法

2. 1. 1. 1. 馴養方法

馴養装置は図 2-1 に示した。電子基盤製造工場の廃液処理に用いられている活性汚泥を適宜採取し、1,000 mL の二つ口フラスコに 70 mL 入れ、栄養液体培地 630 mL にて 10 倍希釈した。液体培地はプロテオースペプトン No.3 (BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA) を 10 g, リン酸水素二カリウム (特級, 和光純薬, 大阪) を 3g, 硫酸マグネシウム七水和物 (特級, 和光純薬, 大阪) を 3 g を 1,000 mL の Milli-Q 水 (18 M Ω cm, Millipore, Billerica, MA, USA) に溶解させ、121 $^{\circ}$ C, 20 分間オートクレーブ処理したものを用いた。フラスコの一つ目の口にはリービッヒ冷却器を取り付け、冷却装置から冷却水を流した。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ーチューブを通し、シーリング剤で密閉し、溶存酸素濃度(DO)が 2.0mg/L 以上となるように曝気した。また、汚泥の沈殿を防ぐためにマグネチックスターラーと攪拌子にて緩やかに攪拌した。温度は室温とし 20-25 $^{\circ}$ C の範囲で常時空調を調整した。pH は 7.0-8.5 となるように 10%水酸化カルシウム水溶液 (オートクレーブ処理したもの) を用いて維持した。栄養源は、初期の液体培地で培養後、全有機炭素 (以下 TOC) 濃度が 300 mg/l 以下、全窒素 (以下 T-N) 濃度が 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 (特級, 和光純薬, 大阪) を TOC 濃度として 1,000-2,000 mg/L となるように毎日加えた。PCE は 1.16 g 添加, エタノールは 0.5 g 添加すると TOC 濃度としてそれぞれ 235 mg/L と 410 mg/l となった。窒素

源・リン源としてはリン酸水素二アンモニウム（特級，和光純薬，大阪）または硫酸アンモニウム（特級，和光純薬，大阪）を 0.7 g(T-N 濃度でそれぞれ 210 mg/L, 159 mg/L 増となる)添加した．TOC 濃度及び T-N 濃度の測定は汚泥を約 2 ml をエッペンドルフチューブに採取し，卓上微量高速遠心機 CT-15（日立工機，東京）を用いて 4℃，10,000 rpm で 3 分間遠心分離した．上清のみを採取して適宜希釈し，680℃燃焼触媒酸化方式である TOC-VCSH および TNM-1（島津，京都）を用いて TOC および T-N 濃度を測定した．検量線は 105℃で乾熱したフタル酸水素カリウムを 50mg/l となるように溶解したものをを用いて測定し，以降試料はプロトコール（島津 TOC-VCSH 付属説明書）に従い測定した．

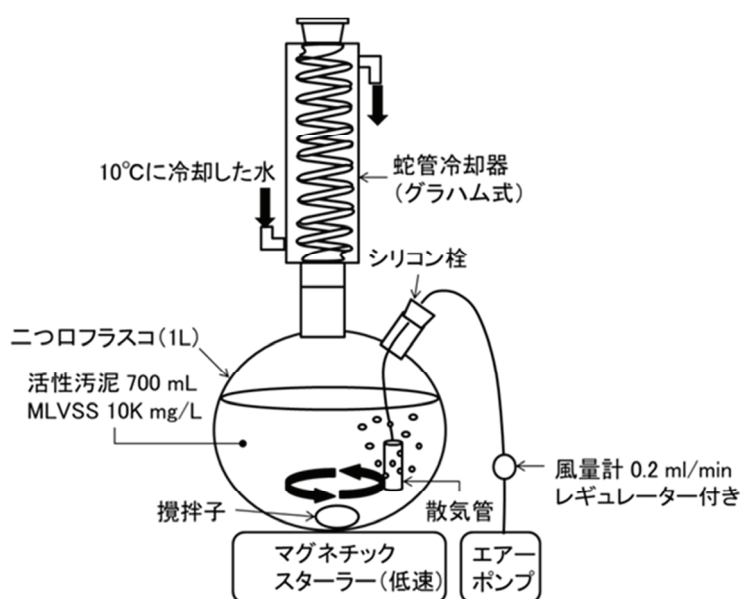


図 2-1. 馴養装置

2. 1. 1. 2. PCE 減少試験方法

馴養した汚泥は最初の 1 ヶ月経過後 PCE 濃度が 0.001 mg/L（検出下限）以下となったところで，PCE の揮発分を除く純粋な PCE 分解量を調べるために密閉系の試験において PCE の分解活性を測定した．密閉試験における PCE の分解活性は 100 mL 容量のバイアル瓶に 20 mL の馴養した汚泥を投入し，エタノールに溶解させた PCE 4 mg を添加し（液相の初期の濃度として 80 mg/L であった），テフロンコートブチル栓およびアルミシールキャップを用いて密栓した．また，コントロールとしてオートクレーブ滅菌した活性汚泥と PCE を上記同様にバイアル瓶に投入して密栓した．液相 20 mL に対して，気相が 80 mL であり，十分に気相スペースを取ることで好気条件が保てるようにした．各バイアル瓶を 20℃に設定した恒温振とう機内にて 120 rpm にて巡回振とうし，攪拌および液相内の好気条件を保持させた．24 時間後の液中の残存 PCE 濃度を GC/MS にて測定し，分解活性を把握した．

ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GCMS) による PCE の定量

本試験ではヘッドスペースサンプラー Turbo Matrix 40 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) およびガスクロマトグラフィー質量分析計 QP2010 plus (島津, 京都) を用いた. ヘッドスペースは 60℃にて 40 分間加温した. GC カラムは DB-624 (L 60m×0.32 mm id, df 1.8 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使い, オープン初期温度は 35℃とした. 検出器の EI-MS は 200℃, 70 eV とした.

サンプルの前処理

前処理はバイアル瓶の液相から 1 mL 採取し、適宜 Milli-Q 水にて希釈を行い、30% 濃度になるように NaCl (特級, 和光純薬, 大阪) を添加した。バイアル瓶はテフロンコート of ブチル栓並びにアルミシールキャップにて密栓し、GC/MS にセットした。

検量線の作成

11 種揮発性有機化合物混合標準液 (1,1-ジクロロエチレン, ジクロロメタン, *cis*-1,2-ジクロロエチレン, 1,1,1-トリクロロエタン, 四塩化炭素, 1,2-ジクロロエタン, ベンゼン, トリクロロエチレン, *cis*-1,3-ジクロロプロペン, *trans*-1,3-ジクロロプロペン, 1,1,2-トリクロロエタン, テトラクロロエチレン)の各 1mg/ml メタノール溶液, 和光純薬, 大阪)を 1 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 50 ppb となるようにそれぞれメタノール (特級, 和光純薬, 大阪)にて希釈し, 標準液として検量線を作成し, PCE の定量に用いた.

2. 1. 1. 3. 菌叢解析

活性汚泥から ISOIL for Beads Beating (日本ジーン, 東京)を用いてゲノム DNA 抽出を行った. 抽出したゲノム DNA はサーマルサイクラー (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)にて PCR を行った. PCR は $1 \mu\text{l}$ ($10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) の抽出した DNA と 341FGC primer ($5' -\text{CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG}-3'$), 518R primer ($5' -\text{ATTACGCGGCTGCTGG}-3'$), $10\times\text{buffer}$, 5 mM dNTP , 25 mM MgCl (タカラバイオ, 大津) および Go Taq HS ($5 \text{ U}/\mu\text{l}$) (Promega, Madison, MI, USA) を用いて, 次の条件で PCR を行った. 95°C で 15 分間後, 95°C で 30 秒, 55°C で 30 秒, 72°C で 1 分を 35 サイクル, 最後に 72°C で 15 分間. PCR 産物は 100 bp のマーカーで電気泳動を行って確認した. 次に変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE)を用いて馴養前後の菌叢を確認した. PCR 産物は DCode system (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) を用いてプロトコールに従って行った. ゲル濃度勾配は 20 %および 50 %,で行い, $180\text{--}200 \text{ V}$ で 2 時間電気泳動した. 電気泳動後は SYBRR Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて染色後, Safe Imager Blue Light Transilluminator (Invitrogen)にてバンドを確認した. 特異的なバンドについてはゲルから切り出し, ExoSAP-IT (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いて 37°C で 15 分

および 72 °C で 15 分処理を行い精製した。精製後は 16SrDNA 領域を PCR にて増幅させ、増幅物を Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit 並びに PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて 16S rDNA シーケンスを行った。16S rDNA の塩基配列は BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) によって相同性解析を行なった。

また、増幅された 16S rDNA を Roche 454 GS-FLX (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いたパイロシーケンス法による菌叢解析をタカラバイオ (大津) に委託し解析した。

2. 1. 1. 4. 菌の単離

馴養後の活性汚泥をオートクレーブ滅菌した 0.01 M リン酸緩衝生理食塩水 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.45 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.225 g, NaCl 8 g を 1L の MilliQ 水に溶解) を用いてクリーンベンチ (BIO CLEAN BENCH, SANYO, 大阪) 内にて 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} に希釈をした。寒天培地, King' s B 培地, 1/10 nutrient Agar 約 10ml を直径 10cm のシャーレに入れ, 希釈した液を 0.1 ml 塗抹した。3 日後, 5 日後, 7 日後, 10 日後にそれぞれ形成したコロニーを白金耳にて掻き採り, LB 培地に塗抹してコンタミネーションがないか確認した。コンタミネーションがないことを確認した後, コロニーの一部を掻き採り, LB 斜面培地に塗抹して再度コンタミネーションがないことを確認した後, 斜面培地のコロニーを掻き採り液体 LB 培地に懸濁させた。懸濁後は吸光度計 (Biospec-mini, 日立, 東京) を用いて, OD600 の値を測定し, 吸光度が最大となったところで培養を完了した。培養後の液に上記同様に密閉式バイアル瓶を用いて培養液を入れ, PCE が 100 mg/L となるように添加した後, 24 時間後の PCE の残存量を GC/MS にて測定した。

2. 1. 2. 結果および考察

2. 1. 2. 1. PCE への馴養

活性汚泥に PCE を定期的に投入して馴養を行った。馴養した活性汚泥を適宜採取し、ヘッドスペース GC/MS にて測定したところ, PCE の濃度が 0.001 mg/L (検出下限) 以下まで減少していることを確認した。この時, エアレーション等の影響により PCE の揮発が考えられるため, 揮発分を除いた純粋な PCE 減少量を調べることにした。馴養した活性汚泥による PCE 減少量を密閉試験により確認した。結果を図 2-2 に示した。オートクレーブ滅菌した汚泥では 24 時間後の PCE 残存量が 0.91 mg (バイアル瓶全容量に対する液相の割合が 16% に対して液中の PCE は添加量の 23%) であったのと比較してオートクレーブしていない活性汚泥では PCE 残存量が 0.60 mg まで減少していた。その差を汚泥による PCE 減少効果であると考えると 0.31mg の PCE を減少させたことになる。またこの時, GC/MS ではトリクロロエチレン, ジクロロエチレン, トリクロロ酢酸, ジクロロ酢酸などの分解産物は検出されなかった。

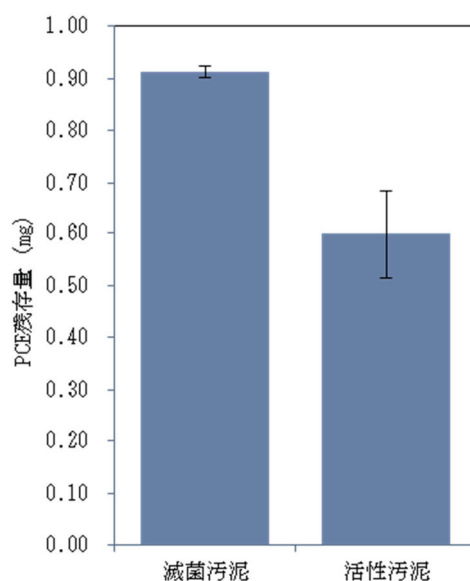


図 2-2. 馴養した活性汚泥による PCE 減少 (密閉試験)
N=3 の平均値, バーは標準偏差を示す.

2. 1. 2. 2. 菌叢解析

PCE 馴養後の活性汚泥の菌叢解析 (DGGE)

PCE にて馴養した汚泥中の菌叢変化を調べるために, 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を行った結果, 馴養前後でバンドパターンが変化していた (図 2-3). 馴養後では No.1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 14, 25 といったバンドが特異的に認められ, これらバンドを 16S rDNA シーケンスした結果を表 2-1 に示した. No.1, 2, 3, 4 は *Pseudomonas* sp., No.5, 6 は *Flavobacterium* sp., No. 13, 14 は *Lysobacter* sp., No.25 は *Mesorhizobium* sp.との相溶性が高い結果となった. 従って, PCE への馴養により, PCE 減少に関連した菌叢に変化したと考えられた. しかしながら, DGGE では定量性がなく, 検出された菌が馴養後に増加した優占菌であるかを特定することはできないと考えられた. その問題点を解決するために次の解析を行なった.

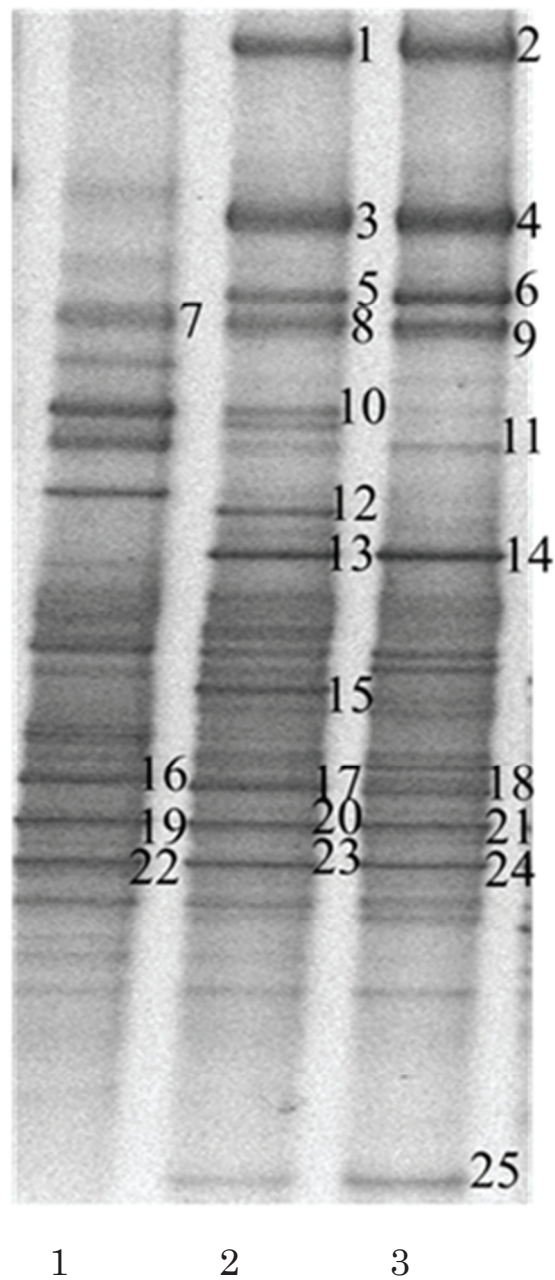


図 2-3. 馴養前後の DGGE 解析結果

1. 馴養前, 2.馴養開始 1 週間後, 3. 馴養開始 1 ヶ月後

表 2-1. DGGE 解析後の菌の相同性解析結果

Band NO.	Bacteria	Homology (%)
1	<i>Pseudomonas putida</i>	98
2	<i>Pseudomonas putida</i>	97
3	<i>Pseudomonas</i> sp.	95
4	<i>Pseudomonas</i> sp.	95
5	<i>Flavobacterium</i> sp.	97
6	<i>Flavobacterium</i> sp.	97
7	<i>Flavobacterium</i> sp.	97
8	<i>Cytophaga</i> sp.	98
9	<i>Cytophaga</i> sp.	98
10	<i>Bdellovibrio</i> sp.	99
11	<i>Pseudomonas fluorescence</i>	100
12	<i>Flavobacteriaceae</i> bacterium	88
13	<i>Lysobacter</i> sp.	92
14	<i>Lysobacter</i> sp.	95
15	<i>Cytophaga</i> sp.	89
16	Uncultured <i>Thauera</i> sp.	99
17	Uncultured <i>Thauera</i> sp.	99
18	Uncultured <i>Thauera</i> sp.	99
19	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	98
20	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	97
21	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	98
22	<i>Rhodopsedomonas</i> sp.	99
23	<i>Rhodopsedomonas</i> sp.	98
24	<i>Rhodopsedomonas</i> sp.	99
25	<i>Mesorhizobium</i> sp.	95

各バンド No.は図 1 中の No.に対応

PCE 馴養後の活性汚泥の菌叢解析 (GS-FLX)

菌叢分布および各菌の変化を定量的に把握するために、パイロシーケンス法を用いる GS-FLX による解析を Takara に委託して行なった。委託解析の結果を図 2-4, 2-5 に示した。馴養前は 74 属 590 種が確認され、馴養後は 71 属 550 種となり、活性汚泥環境特有の菌の多様性は変わらなかった。ところが、馴養前後では各菌の存在比が大きく異なっており、馴養前の主な菌の全体の菌数に対する存在比は *Rhodocyclaceae* が 43%, *Azoarcus* 属が 38%, *Thauera* 属が 8%などであったが、馴養後では *Alcaligenes* 属のみで 72%を占める結果となった。したがって、DGGE で検出された種とは異なるものの、馴養前後で菌の多様性は変化しないが、各菌の存在比が変化することが認められた。さらに、*Alcaligenes* 属の種に着目して種の内訳を図 2-6 に示した。存在比が高い順から *A. faecalis* と相同性が高い種が 36%, *A. sp. F 78* が 25%, *A. sp. IS-18* が 18%, *A. sp. IS-17* が 12%などであっ

た. これらの 4 種で 86%を占めており, *Alcaligenes* 属の中でも種の存在比に偏りがあることが認められた. 以上のことから, 高濃度の PCE で馴養すると, それらの条件に合致した特異的な菌種が優占して増加すると考えられた.

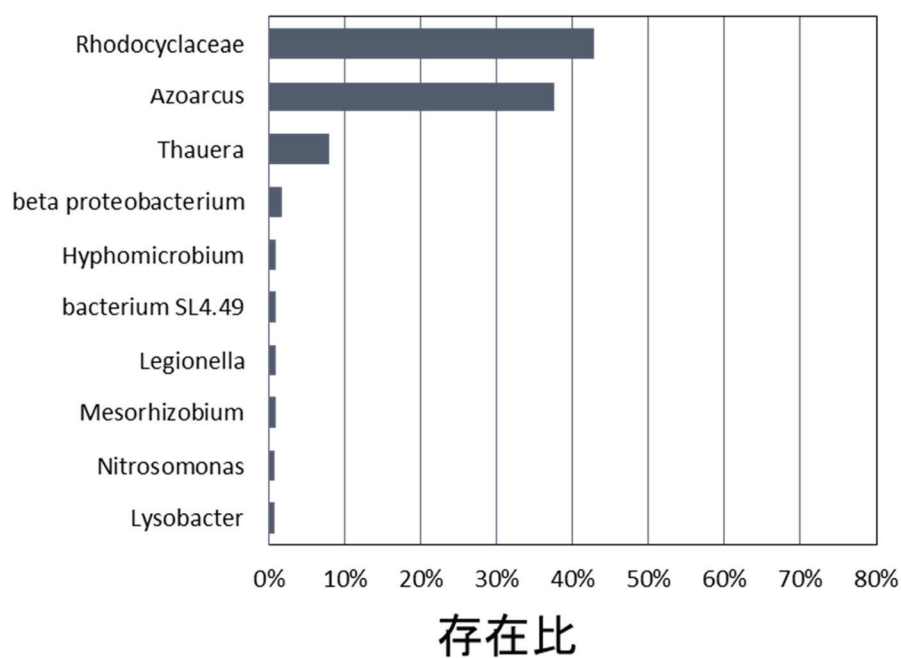


図 2-4. 馴養前の GS-FLX による菌叢解析結果 (存在比 1%以上のもの)

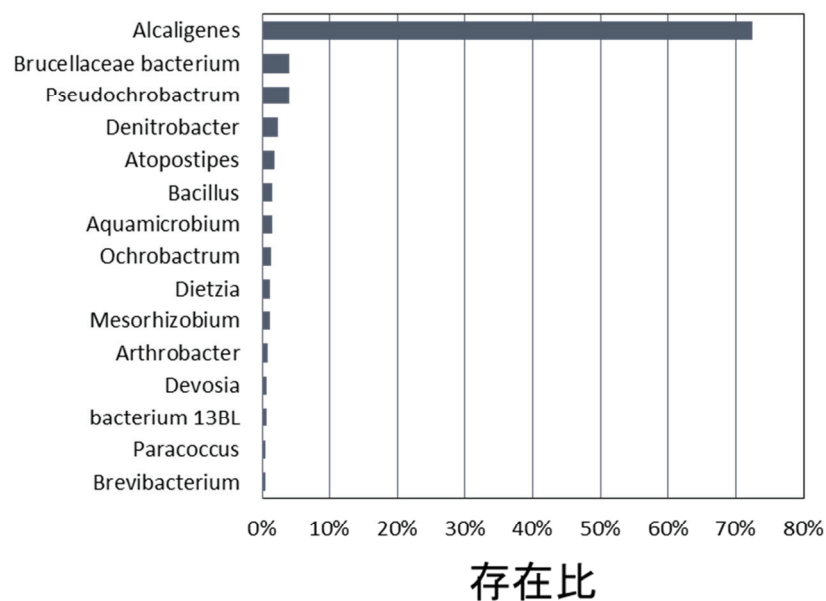


図 2-5. 馴養後の GS-FLX による菌叢解析結果（存在比 1%以上のもの）

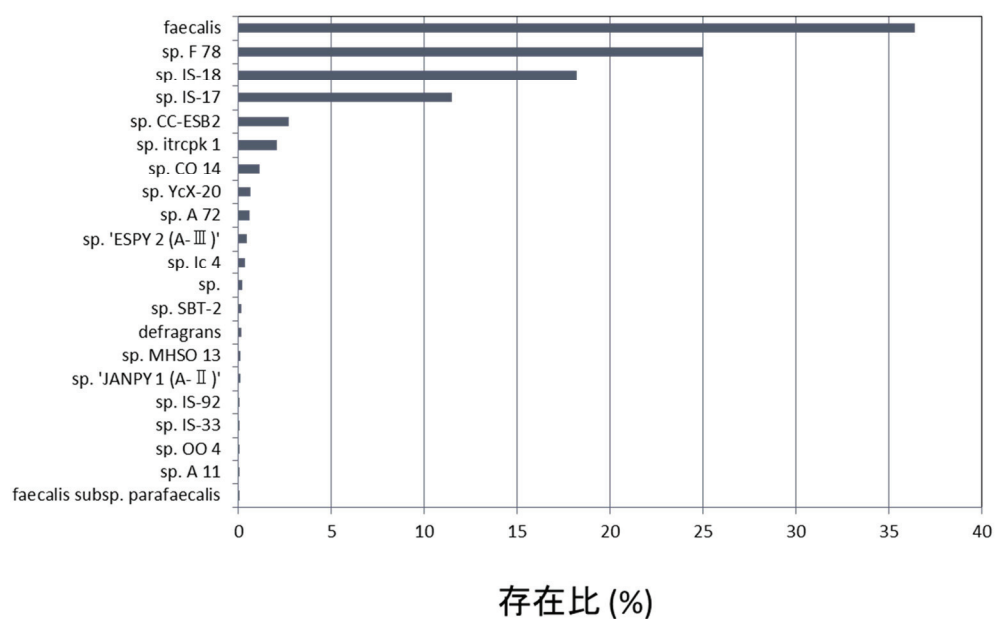


図.2-6. GS-FLX による解析結果. Alcaligenes 属の種（株）ごとの存在比.

2. 1. 2. 3. 馴養汚泥からの菌の単離

Alcaligenes 属が PCE 減少に関与しているかを調べるために、表 2-2 に示した通り、*Alcaligenes* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Ochrobactrum* sp., *Stenotrophomonas* sp.などいくつかの菌を単離した。それぞれ、液体培地で 1 週間以上培養した後、上記同様に密閉式のバイアル瓶に入れ PCE を 100 mg/L となるように添加したが、いずれも PCE の減少は確認できなかった。また、これらの菌を混合しても結果は同様であった。単離した菌では PCE 減少能を持たないか、培地で生育させることによって PCE 減少能が発揮されない可能性も考えられた。

表 2-2. 単離菌の相同性解析結果

株	菌名	相同性(%)
1	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain CD261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97
2	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain B_IV_2L49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
3	<i>Ochrobactrum oryzae</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 102588	97
4	<i>Ochrobactrum</i> sp. CCBAU 10752 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96
5	<i>Ochrobactrum oryzae</i> strain Esfahan Compost 1 16S ribosomal RNA gene	97
6	<i>Ochrobactrum</i> sp. CCBAU 10752 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
7	<i>Ochrobactrum oryzae</i> strain Esfahan Compost 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95
8	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain CD261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
9	<i>Alcaligenes</i> sp. CRR1 27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97
10	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain CD-232 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
11	<i>Ochrobactrum</i> sp. CCBAU 10752 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
12	<i>Paracoccus denitrificans</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 12442	98
13	<i>Alcaligenes</i> sp. 2EBS14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91
14	<i>Ochrobactrum oryzae</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 102588	98
15	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain CD261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
16	<i>Alcaligenes</i> sp. OCPSB6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	82
17	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> strain CCUG 54932 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
18	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> strain CCUG 54932 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97
19	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain PMS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95
20	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> strain CCUG 54932 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96
21	<i>Defluviobacter</i> sp. QDZ-C 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	80
22	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i> strain CCUG 54932 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97
23	<i>Alcaligenes faecalis</i> strain NBAII PF-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98

2. 2. 汚泥濾液による PCE の減少効果

2. 2. 1. 材料および方法

2. 2. 1. 1. 汚泥の濾過

活性汚泥中のフロックに PCE が吸着や凝集されている可能性がある。その確認を行うため、まず、孔径約 1 μm のガラスフィルターGS-25 (ADVANTEC, 東京) を用いて 1. 1. 1 で馴養した活性汚泥の吸引濾過を行った。次に菌が PCE 減少に関与しているかを調べるために、濾液中の菌体を除去した。孔径 0.2 μm のメンブレン濾紙 (ADVANTEC, 東京) を用いて吸引濾過してメンブレン濾液とした。それぞれの濾液を用いて PCE の濃度を上記同様にして濾液 20 mL に PCE を 2 mg/L 添加し、24 時間後にヘッドスペース GC/MS にて測定した。コントロールとして MilliQ 水を用いた。コントロール中の PCE 残存量から各濾液中の PCE 残存量を引いた量を PCE 減少量とした。また、経時的な PCE 量の変化を確認するためにメンブレン濾液を用いて 0, 0.5, 1, 4, 6, 20, 48 時間後の PCE 減少量を確認した。0 時間目は PCE を投入し、密栓後 30 秒間攪拌した後に PCE 濃度を GC/MS により測定した。

2. 2. 1. 2. メンブレン濾液の諸性質

メンブレン濾液の性質を調べるために、(a)熱処理として 100°C で 30 分間加熱を 2 回繰り返したものと、121°C で 30 分間オートクレーブ処理をしたもの、(b)活性炭処理としてガラス漏斗に 5C の濾紙 (ADVANTEC, 東京) を置いた上に予め MilliQ 水で洗浄した粒状活性炭 (和光純薬, 大阪) を厚さ 8 cm 程度に敷き詰め、ゆっくりと濾液を注いで自然濾過した。これを数回繰り返し、褐色の濾液の色が透明になるまで行ったもの、(c)液中に窒素ガスを 5 分間吹き込み窒素置換したもの、(d) pH を 7.2 (未調整) から 1 M の塩酸および 2 M の NaOH にて 2.0, 5.0, 9.0, 10.0, 12.0 に調整したもの、(e) 20 ml の濾液に 1180 units のカルボキシペプチダーゼ Y 酵母由来 (118 units/mg protein, オリエンタル酵母, 東京) および 300 units のプロティナーゼ K (30 mAnson-U/mg, Merck, Darmstadt, Germany) の 2 種類のタンパク質分解酵素でそれぞれ 37°C, 3 時間処理したもの、について PCE 減少の変化を調べた。さらに、タンパク質による PCE 吸着を調べるために (f) ウシ血清アルブミン (BSA, 和光純薬, 大阪) を用いて PCE の減少効果を調べた。PCE 減少量の確認方法は上記 1. 1. 2 と同様とした。

2. 2. 2. 結果および考察

2. 2. 2. 1. 汚泥濾液による PCE 減少効果

濾液ごとの PCE 減少効果

フロックを除去するために、まず、孔径 1 μm の GS-25 ガラス繊維濾紙を用いて濾過を行った。さらに、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターを用いて菌を除去し、メンブレン濾液を作成した。これらの濾液を用いて密閉条件下で PCE 減少効果を確認し、結果を表 2-3 に示した。振とう 24 時間後の PCE 残存量を GC/MS で測定し、コントロールとの差から GS-25 濾液では PCE 減少量が 0.45mg であり、コントロールに対して 54% の PCE が減少していた。さらにメンブレン濾液では、24 時間後にコントロールの PCE 残存量に対して 0.61mg の PCE 減少量であり、コントロールに対して 74% の PCE 減少率であった。メンブレン濾液では図 2-2 の活性汚泥と滅菌汚泥の PCE 残存量の差である 0.31mg に比べて約 2 倍の PCE 減少量であったことから、フロックなどに吸着した PCE は減少できず、PCE 減少を阻害していたと考えられた。また、菌を除去したメンブレン濾液でも同様に PCE 減少効果が高かったことから、菌そのものではなく、濾液中に放出された菌の生成物や代謝物が PCE 減少効果を示していることが示唆された。

表 2-3. 汚泥濾液における PCE 減少効果

濾過方法	PCE減少量 mg*	PCE減少率 %**
GS-25	0.45 $\pm$ 0.10	54
メンブレン	0.61 $\pm$ 0.03	74

*PCE 減少量＝コントロール (MilliQ 水) の PCE 残存量－各濾液中の PCE 残存量

**PCE 減少率＝{1－(各濾液の PCE 残存量/コントロール)} $\times$ 100

経時的な PCE 減少効果および濾液の諸性質

メンブレン濾液中に含まれる PCE 減少に関与する微生物の生成物の特性を調べるために、PCE との反応時間を調べた。結果を図 2-7 に示した。4 時間で約 1 mg の PCE が減少しており、以降も一定の値であったことから、PCE との反応は 4 時間以内に飽和状態になったと考えられた。また、メンブレン濾液を(a)熱処理、(b)活性炭に吸着、(c)嫌気 (窒素置換) 条件、(d)pH を調整 (pH 2.0, 5.0, 7.2, 9.0 10.0 12.0)、(e)タンパク質分解酵素 (カルボキシペプチダーゼ Y とプロティナーゼ K) 処理をそれぞれ行って PCE 減少効果調べた結果を図 2-8 に示した。100 $^{\circ}\text{C}$ で処理した場合は PCE 減少効果が約 50%に留まり、121 $^{\circ}\text{C}$ では PCE 減少効果はほぼ失活していた。活性炭処理では約 15%まで PCE 減少効果が低下しており、活性炭に吸着される物質であることが分かった。嫌気条件下では PCE 減少効果が未処理の時より 28%低下した。また、最も活性の高かった pH は 10.0 であり、元のメンブレン濾液の pH 7.2 の場合よりも 1.4 倍の PCE 減少効果を示した。一方で、酸性側では pH 7.2 の時

よりも 0.7 倍の PCE 減少効果となり、活性の低下が確認された。タンパク質分解酵素であるカルボキシペプチダーゼやプロテイナーゼ K 処理後では PCE 減少効果が約 50%となったことから、一部の PCE 減少に関与する物質が酵素の影響を受けて失活したことが考えられた。これらの結果から、メンブレン濾液に含まれる PCE 減少に関与する活性汚泥中の微生物の生成物は熱で失活し、活性炭に吸着され、タンパク質分解酵素で分解される物質であると推定できる。なお、図 2-8-f に示したようにウシ血清アルブミンと PCE を反応させても PCE は減少しなかったことから、PCE は単純にタンパク質等へは吸着されず、活性汚泥の濾液による PCE 減少作用は特有であることが考えられた。

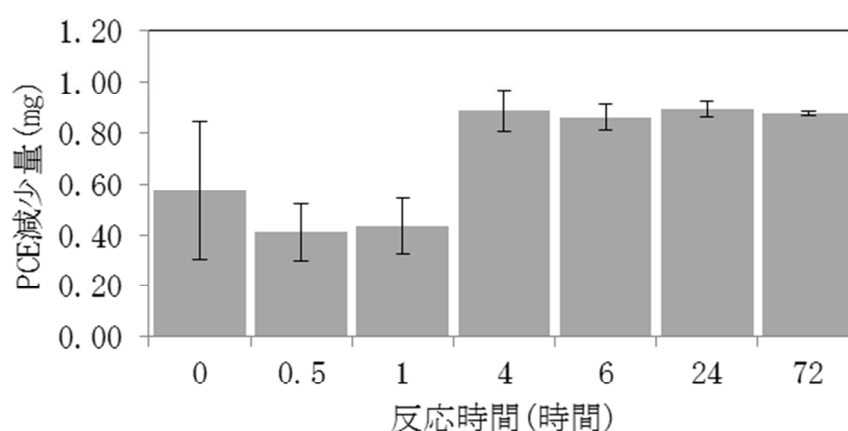


図 2-7. メンブレン濾液における経時的な PCE 減少効果

PCE 減少量=各反応時間におけるコントロール (MilliQ 水) との PCE 残存量の差。バーは誤差範囲を示す。

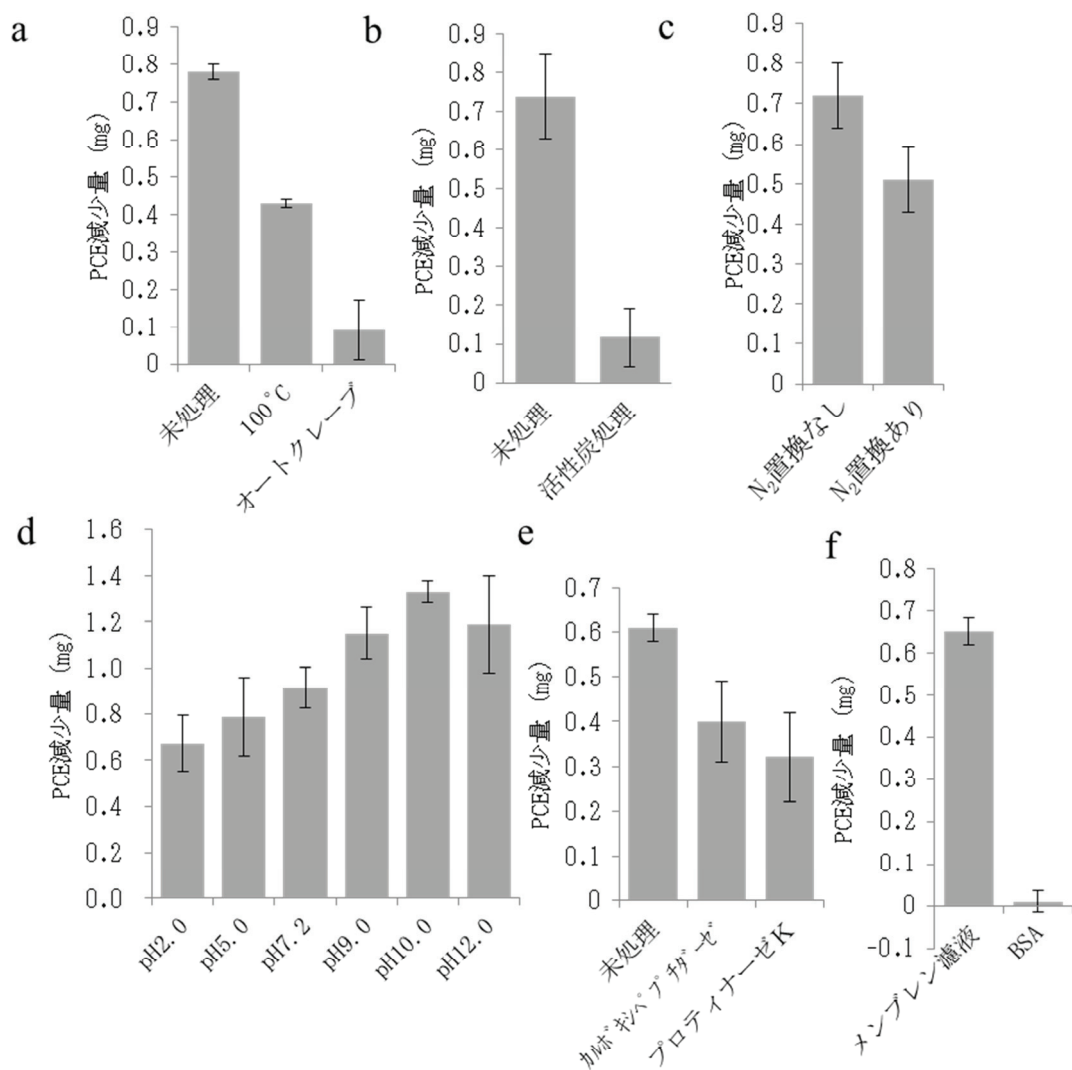


図 2-8. 各処理を行ったメンブレン濾液による PCE 減少

a. 熱処理, b. 活性炭処理, c. 好気・嫌気条件, d. pH, e. タンパク質分解酵素処理, f. タンパク質と PCE の作用

PCE 減少量は各コントロールとの差を示す。バーは誤差範囲。

2. 3. 濾液中の PCE 減少に関与する物質の精製分離

2. 3. 1 材料および方法

2. 3. 1. 1. 分子量分画

濾液中のタンパク質様物質のおおまかな分子量を調べるために、メンブレン濾液を限外濾過チューブ Vivaspin 20 (GE healthcare Japan, 東京) を用いて分子量分画を行った。Vivaspin の分画分子量 (MWCO) 10,000, 5,000, 3,000 の順に濾液約 20 ml を入れ, 8,000 × g にて 30 分～1 時間遠心分離を行い, 上記の分子量ごとに分画した。限外濾過膜上側の上清と下側の限外濾過液の 2 種類を試料とし (MWCO ≥10,000, 10,000-5,000, 5,000-3,000, <3000), それぞれ 24 時間後の PCE 残存量を確認した。各濾液のタンパク質濃度を Qubit (Invitrogen, Avenue Carlsbad, CA, USA) にてプロトコールに従い測定した。タンパク質量あたりの PCE 減少量を比活性として算出した。

2. 3. 1. 2 固相カラム抽出

濾液に含まれるタンパク様物質の特性を調べるために、20 ml のメンブレン濾液を固相抽出カートリッジの逆相アプリケーションキット (Inert Sep; GL-science, 東京) を用いて固相抽出を行った。逆相カートリッジは充填材として CN-U, C2, C8, C18 および PH (表 2-4) の 5 種類がそれぞれ 500 mg/3 ml 充填してある。濾液を固相カラム通液後、カラムに次の溶媒を 0.1%ギ酸, アセトニトリル および メタノールの順で通液し, 溶出させた。各通液および溶出液の PCE 減少活性を調べるために、通液, 0.1%ギ酸溶出液は真空凍結乾燥にて乾固し, アセトニトリルおよびメタノールはロータリーエバポレーターにて乾固し, 適宜 MilliQ 水に懸濁した後, 1. 1. 2 に示した通り密閉したバイアル瓶にて PCE 2 mg を添加して 24 時間後の PCE 残存量を GC/MS にて測定した。

表 2-4 固相担体と官能

固相担体	官能基
C2	Si-C ₂ H ₅
C8	Si-(CH ₂) ₇ CH ₃
C18	Si-(CH ₂) ₁₇ CH ₃
PH	Si- 
CN	Si-(CH ₂) ₃ -CN

2. 3. 1. 3. カラムによる精製

カラム精製分離

汚泥中の PCE 減少に関与する菌の生成物を絞り込むためメタノール抽出およびカラム精製を行った。まず、0.2 μm メンブレン濾液 500 mL を凍結乾燥し、メタノール (HPLC 用, 和光純薬, 大阪) 500 mL に懸濁した。密栓式のガラス瓶に移し、120 rpm にて 2 時間振とうした。振とう後は遠心チューブに移し、3,000 $\times$ g にて 10 分間遠心し、沈殿物と上清に分けた。上清のみを取り出し、ロータリーエバポレーターにてメタノールを蒸散させ、抽出物を乾固した。乾固した汚泥由来の抽出物は 100 mL の MilliQ 水に懸濁させた。懸濁水を再度、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターにてろ過した。その濾液をペリスタリックポンプにて 10 mL/min の速度で ODS カラム (YMC, DispoPack-AT ODS-25 μm :120 g) に通液した。通液後のカラムに 0.5%メタノールを 500 mL 通液洗浄し、100%メタノール 500 mL でさらに通液し、その通液を回収した。回収した通液メタノールを再度エバポレーターにて蒸散・乾固した。この乾固によって得られた精製物を MilliQ 水に適宜懸濁し、PCE 減少量を確認した。PCE 減少量の確認は 1. 1. 2 の方法と同様である。

HPLC 精製分離

次にカラム精製物を高速液体クロマトグラフィー Agilent-1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US) にて Triart C18 ODS カラム:長さ 250 mm $\times$ 内径 4.6 mm $\times$ 粒径 5 μm (YMC, 京都) を用いて以下の条件で分離を行なった; 流速, 1 mL/min; 移動相, 0-100% メタノール; カラム温度, 40 $^{\circ}\text{C}$; 注入量, 20 μl ; 検出器, UV 280 nm における吸光度。検出されたピークの画分を採取し、ロータリーエバポレーターにより乾固し、適宜 MilliQ 水に懸濁させ、1. 1. 2 同様の方法で PCE の減少を確認した。

2. 3. 2. 結果および考察

2. 3. 2. 1. 分子量分画

2.2.2.1 で明らかとなった PCE 減少に関与する活性汚泥由来の菌の生成物がタンパク質様物質であるかを確認するために、限外濾過膜を用いて分子量分画を行い、各分画液の PCE 減少効果を調べた。また、分画液中のタンパク質濃度を調べ、タンパク質量あたりの PCE 減少量 (比活性) を調べた。これらの結果を表 4 に示した。まず、MWCO 10,000 の限外濾過膜で分画したところ、10,000 以下の画分で未分画のメンブレン濾液と同様に 0.20 mg の PCE 減少効果があった。さらに、MWCO 10,000 以下の分画液を MWCO 5,000, 3,000 の順で分画しても PCE 減少効果はそれぞれ 0.38 mg と 0.37 mg で維持されていた。MWCO 10,000 の限外濾過液のタンパク質量あたりの比活性は 0.081 となり、未分画液では 0.043 であったのと比較して 2 倍となったことが認められた。MWCO 5,000, 3,000 の限外濾過後ではそれぞれ約 3.0 倍と 3.5 倍となっていた。このことから、PCE 減少に関与する微生

物生成物はタンパク質を構成するより小さい単位の分子量 3,000 以下のペプチド様物質であることが示唆された。

表 2-5. 分画分子量 (MWCO) 液ごとの PCE 減少量

分画液(MWCO)	PCE 減少量 (mg)	タンパク質量(mg)	比活性 (A/B)
	- A	- B	
元のメンブレン濾液	0.22±0.06	5.08±0.40	0.043
≥10,000	0.09±0.03	1.11±0.11	0.081
<10,000	0.20±0.01	2.76±0.25	0.072
5,000 – 10,000	0.09±0.03	0.66±0.12	0.14
<5,000	0.38±0.02	3.12±0.23	0.12
3,000 – 5,000	0.10±0.02	0.72±0.05	0.14
<3,000	0.37±0.04	2.86±0.10	0.13

2. 3. 2. 2. 固相カラムによる特性分析

表 5 にメンブレン濾液の各固相カラム通液および溶出液における PCE 減少効果を示した。C2 および CN-U 充填カラムの通液における PCE 減少量はそれぞれ 0.10 mg であったが、未処理 PCE 減少量の 0.09 mg と比較して有意な差は認められなかった。C8 および C18 充填カラム通液における PCE 減少量は 0.06 mg であり、pH における減少量は 0.03 mg であった。これらの通液は未処理の PCE 減少量 (0.10 mg) と比較して有意な差が認められた。これらの通液の結果から、PCE 減少に関与するペプチド様物質は C8, C18 または PH 充填材で保持される性質がある極性の低い物質であると考えられた。一方、タンパク質に注目すると、C2 充填カラムに保持されたタンパク質はアセトニトリルのみで溶出された。C8 充填カラムで保持されたタンパク質は 0.1%ギ酸、アセトニトリル、メタノール全てに溶出が確認された。しかしながら、これらの溶出液では PCE 減少は確認されなかった。C18 においては全ての溶出液においてタンパク質が検出されたが、PCE 減少はアセトニトリルおよびメタノール溶出液で認められた。C18 アセトニトリル溶出液の PCE 減少比活性は未処理と比較して 6 倍高くなっており、他のカラム通液や固相抽出液と比べても最も高い比活性となっていた。PH 充填カラムにおいては PCE 減少が 0.1%ギ酸の溶出液においてわずかに認められたが、タンパク質は検出されなかった。それに対して、アセトニトリル溶出液ではタンパク質がわずかに検出されたが、PCE 減少は認められなかった。以上のことから、PH 充填カラムは保持が強く PCE 減少に関与する物質が溶出されなかったことが示唆された。CN-U 充填カラムは、アセトニトリル溶出液でタンパク質が検出されたが、PCE 減少は確認されなかった。したがって、PCE 減少に関与する物質は、CN-U 充填材に保持されなかったと考えられた。

表 2-6. 各固相カラムごとの PCE 減少効果

カラム	処理	PCE 減少量 (mg)-A	タンパク質量 (mg)-B	比活性 A/B
-	未処理	0.09 ± 0.02	2.56	0.03
C2	通過画分	0.10 ± 0.01	1.98	0.05
C2	0.1%FA 溶出画分	減少なし	N.D.	-
C2	ACN 溶出画分	0.06 ± 0.03	0.77	0.08
C2	MeOH 溶出画分	減少なし	N.D.	-
C8	通過画分	0.06 ± 0.03	1.91	0.03
C8	0.1%FA 溶出画分	減少なし	0.40	-
C8	ACN 溶出画分	0.06 ± 0.00	0.74	0.08
C8	MeOH 溶出画分	減少なし	0.55	-
C18	通過画分	0.06 ± 0.00	1.91	0.03
C18	0.1%FA 溶出画分	No	0.42	-
C18	ACN 溶出画分	0.10 ± 0.00	0.53	0.19
C18	MeOH 溶出画分	0.06 ± 0.02	0.66	0.04
PH	通過画分	0.03 ± 0.01	1.94	0.01
PH	0.1%FA 溶出画分	0.04 ± 0.03	N.D.	-
PH	ACN 溶出画分	減少なし	0.53	-
PH	MeOH 溶出画分	減少なし	N.D.	-
CN-U	通過画分	0.10 ± 0.02	2.12	0.05
CN-U	0.1%FA 溶出画分	減少なし	N.D.	-
CN-U	ACN 溶出画分	減少なし	0.60	-
CN-U	MeOH 溶出画分	減少なし	N.D.	-

FA: ギ酸, ACN: アセトニトリル, MeOH: メタノール.

PCE 減少量はコントロール中の PCE 残存量と各画分の PCE 残存量の差.

減少なしはコントロールと画分間の PCE 残存量に差がなかったことを示す.

N.D. は Qubit の検出下限以下 (≤ 0.01 mg) であることを示す.

2. 3. 2. 3 HPLC 精製分離

図 7 に示したように、HPLC 分析の結果、UV280nm で 36 分付近に最大ピークが認められた。この時のメタノール割合は 100%であったことから、C18 の ODS カラムに保持された物質でメタノール溶出されたものである。この極大ピークを含む画分と極大ピーク以外（主にメタノール割合が低い）の画分にて PCE 減少活性を調べたところ、極大ピークを含む画分に PCE 減少活性が認められた。このことから、HPLC による精製分離できたことが示唆された。

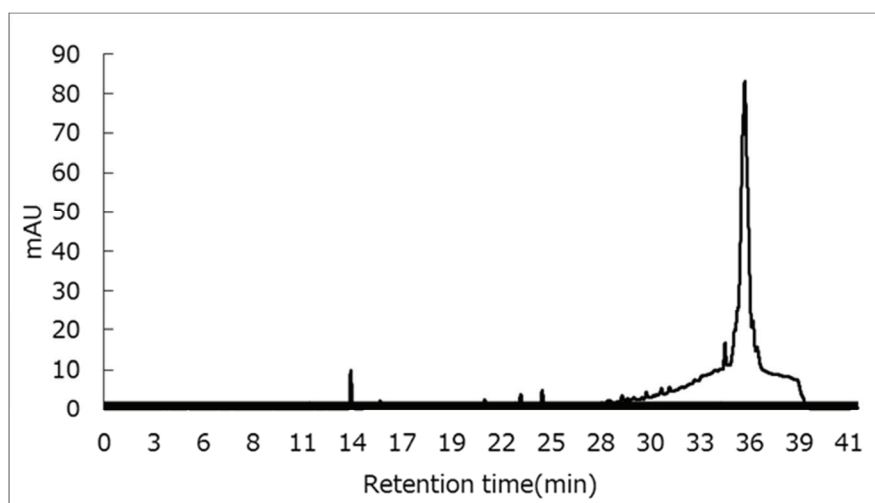


図 2-9. メンブレン濾液メタノール抽出物の HPLC 結果 (UV 280 nm)

2. 4. PCE 減少に関与する濾液成分の構造解析

2. 4. 1. 材料および方法

2. 4. 1. 1. MALDI-TOF/MS 解析

MS 解析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法—飛行時間質量分析計 (MALDI-TOF/MS) である Axima Resonance および Performance (Shimadzu, 京都) を用いて HPLC 分離精製物の質量を測定した。サンプルを金属プレートに 1 μ l 滴下してやや風乾させ、マトリックス試薬としてペプチド等の低分子に用いられている CHCA (α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸) 10 mg を 0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を加えた 70%アセトニトリル溶液に懸濁後そのうち 1 μ l を乾燥させたサンプルの上に滴下し、再度風乾させた。同様にキャリブレーション用のスタンダード物質も適宜水に溶かした後、上記同様に金属プレート上にマトリックス試薬とともに固定した。金属プレートを装置に挿入した後、プロトコールに従い、測定

を行った。測定条件は下記に示したとおりである。

Resonance: Positive ion mode, Performance: リフレクトロンモード

Collision Energy: 70-80 eV

Profile : 200 回 (積算値として)

キャリブレーション : peptide calibration standad II (buruker)

MS² 解析

MS 解析で得られた分子量をプリカーサーイオンとして MS 解析時よりも Collision Energy を 20-30eV 高くしてプロダクトイオンを生成させた。プロダクトイオンを元に組成・構造を推定した。

2. 4. 1. 2. アミノ酸配列の推定 (denovo シーケンス解析)

MALDI-TOF/MS の MS² 解析で得られた結果を元に PEAKS Studio 6 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, Canada)にて denovo シーケンスを行い、アミノ酸配列を推定した。MS² の解析結果から得られたアミノ酸配列を統計化し、該当率の高いアミノ酸を選んで配列の組み合わせを絞り込んだ。

2. 4. 2. 結果および考察

2. 4. 2. 1. PCE 減少に関与する物質の質量

MALDI-TOF/MS 解析結果を図 2-10, 2-11 に示した。図 2-10 の AXIMA Resonance では m/z 998 に極大イオンピークが検出された。図 2-11 の AXIMA Performance でも同様に m/z 998 に極大イオンピークが認められた。2 つの異なった装置で同様の結果が得られたことから、PCE 減少に関与するペプチド様物質の質量は 998 であることが示唆された。

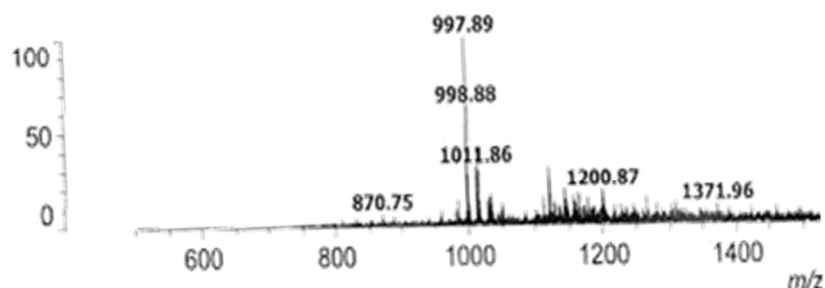


図 2-10. AXIMA Resonance による MALDI-TOF/MS 測定時の MS スペクトル

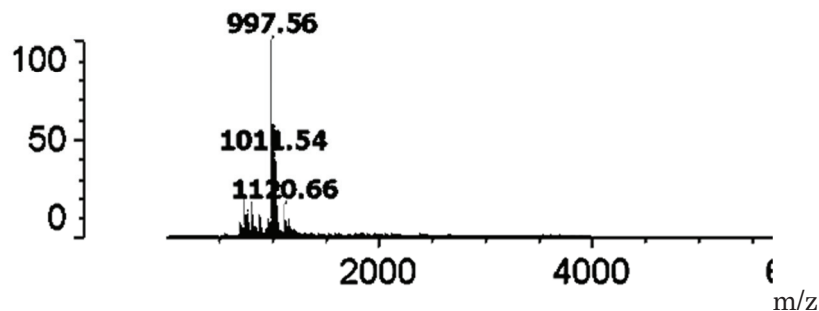
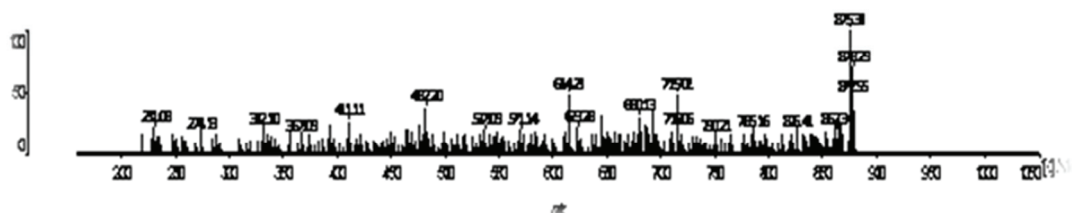


図 2-11. AXIMA Performance による MALDI-TOF/MS 測定時の MS スペクトル

2. 4. 2. 2. PCE 減少に関与する物質のアミノ酸配列の推定

4.1.1 で検出された m/z 998 をプリカーサーイオンとして、 MS^2 解析を行なったプロダクトイオンのマスマスペクトルの結果の一つを図 2-12 に示した。ペプチド結合は C 末端側または N 末端側からアミノ酸ごとに切断が起こり、a イオンまたは b イオンを生成する。このペプチド結合が切れたところの分子量からアミノ酸を推定する。しかしながら、 MS^2 解析を延べ 184 回行ったが、切断部位にバラつきがあるためマスマスペクトルから直接アミノ酸配列を推定することは非常に困難であった。そこでペプチドであることを前提としてアルゴリズムによる *denovo* シーケンス解析を行なった。得られたアミノ酸配列の検出延べ回数（図 2-13）を元に統計処理を行い、配列順ごとに該当するアミノ酸をまとめた結果を表 2-7 に示した。この結果からアラニン、アラニン、グリシン、グリシンまたはアラニン、グリシン、グリシン、グリシン、グリシン、グリシン、グリシン、グリシンまたはアラニン、アラニンであると推定された。なお、最後の 3 アミノ酸の検出率は低かった。また、この組み合わせは 6 通りである（図 2-14）。ところが、全アミノ酸の分子量を合計すると 744 から 772 となっており、 m/z 998 から 226 から 254 足りない。この不足分はプロダクトイオンがうまく生成しなかった分のアミノ酸であるか、脂質や糖などの結合やペプチドの修飾が生じている可能性も考えられた。



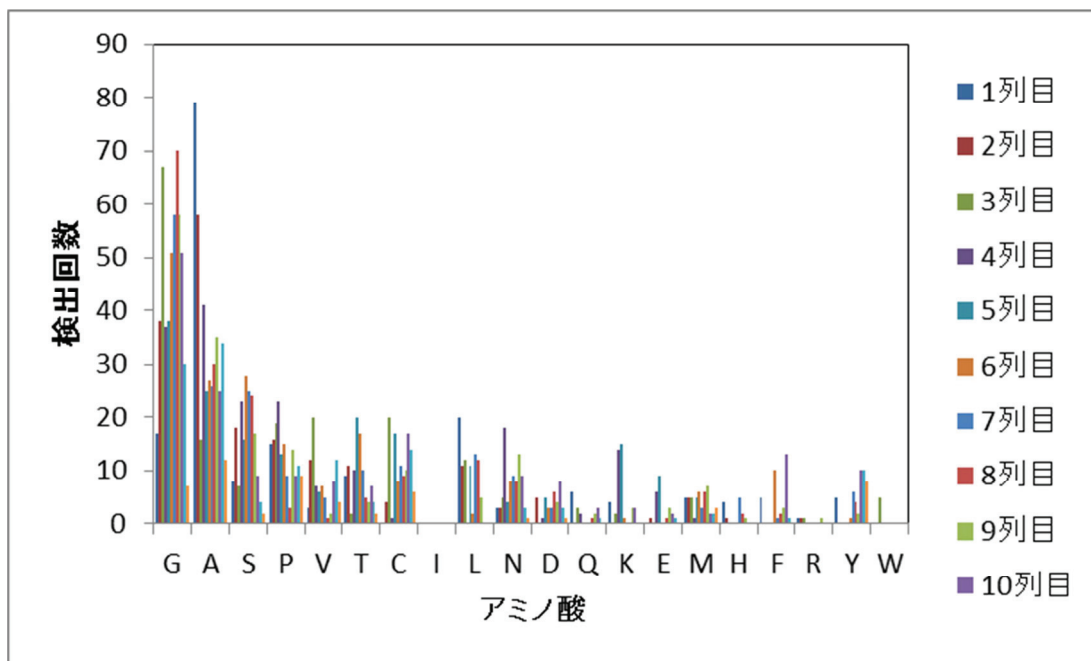


図 2-13. denovo シーケンス解析後の該当アミノ酸の統計結果

表 2-7. denovo シーケンス解析による配列ごとのアミノ酸該当率

	1列目	2列目	3列目	4列目	5列目	6列目	7列目	8列目	9列目	10列目	11列目	12列目
G	9.2	20.7	36.4	20.1	20.7	27.7	31.5	38.0	31.5	29.0	23.1	12.7
A	42.9	31.5	8.7	22.3	13.6	14.7	14.1	16.3	19.0	14.2	26.2	21.8
S	4.3	9.8	3.8	12.5	8.7	15.2	13.6	13.0	9.2	5.1	3.1	3.6
P	8.2	8.7	10.3	12.5	7.1	8.2	4.9	1.6	7.6	5.1	8.5	16.4
V	1.6	6.5	10.9	3.8	3.3	3.8	2.7	0.5	1.1	4.5	9.2	7.3
T	4.9	6.0	1.1	5.4	10.9	9.2	5.4	2.7	2.2	4.0	3.1	3.6
C	0.0	2.2	10.9	0.5	9.2	4.3	6.0	4.9	5.4	9.7	10.8	10.9
I	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
L	10.9	6.0	6.5	0.0	6.0	1.1	7.1	6.5	2.7	0.0	0.0	0.0
N	1.6	1.6	2.7	9.8	2.2	4.3	4.9	4.3	7.1	5.1	2.3	1.8
D	0.0	2.7	0.0	0.5	2.7	1.6	1.6	3.3	2.2	4.5	2.3	1.8
Q	3.3	0.0	1.6	1.1	0.0	0.0	0.0	0.5	1.1	1.7	0.8	0.0
K	2.2	0.0	1.1	7.6	8.2	0.5	0.0	0.0	1.6	1.7	0.0	0.0
E	0.0	0.5	0.0	3.3	4.9	0.0	0.0	0.5	1.6	1.1	0.8	0.0
M	2.7	2.7	2.7	0.5	2.7	3.3	1.6	3.3	3.8	1.1	1.5	5.5
H	2.2	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	1.1	0.5	0.0	0.0	0.0
F	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	5.4	0.5	1.1	1.6	7.4	0.8	0.0
R	0.5	0.5	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
Y	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	3.3	2.2	1.1	5.7	7.7	14.5
W	0.0	0.0	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

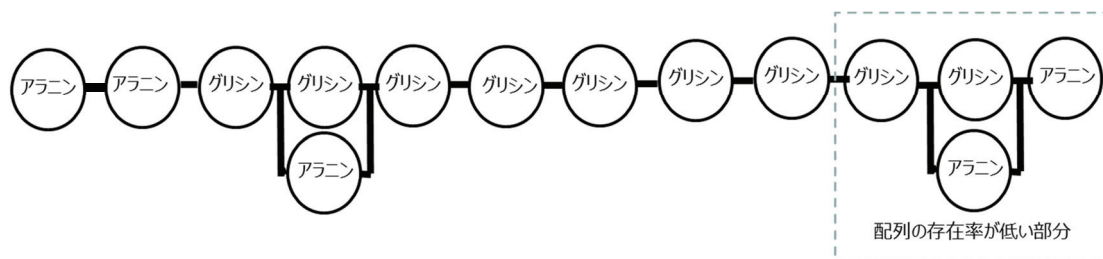


図 2-14. 推定されたアミノ酸配列

2. 5. PCE 減少メカニズム

2. 5. 1. 材料および方法

2. 5. 1. 1. 塩素イオンの挙動解析

イオン交換クロマトグラフィーによる解析

汚泥の $0.2 \mu\text{m}$ 濾液を用いて陰イオン交換クロマトグラフィー(761 Compact IC, Metrohm, Herisau, Switzerland)にて塩素イオン濃度を測定した。溶離液は 3.2mM の Na_2CO_3 および 1.0mM の NaHCO_3 混合液を用いた。再生液は 40mM の H_2SO_4 標準試料として塩化ナトリウム (和光, 特級) を 20mg/l になるように作成し, Milli-Q 水にて 10 倍希釈して測定したのち, 濾液中を PCE 添加直後と 24 時間振とう後で比較を行った。

シンクロトロン光による XAFS 解析

PCE の分解を確認するために, PCE 中の C-Cl 結合の状態変化をシンクロトロン光による X 線吸収微細構造 (XAFS) 解析を行なった。カラム精製・脱塩後の活性汚泥中の微生物の生成物約 2mg を 10mL の MilliQ 水によく混和し, さらに PCE 4mg を混和し, 比較対象としてウシ血清アルブミン (BSA) を同様にして PCE と混和した。それぞれ密栓後 24 時間 120rpm , 20°C にて旋回振とうした。さらに凍結乾燥により濃縮した。分析はいちシンクロトロン光センターの BL6N1 軟 X 線 XAFS を用いた。条件は以下の通りである。光エネルギー: $1.75 - 6\text{k eV}$ ($0.7-0.2\text{ nm}$), ビームサイズ: $0.6\text{ mm} \times 0.2\text{ mm}$, 分解能 $[E/\Delta E]$: $>2,000$ (3k eV 時), 分子数: $7 \times 10^{16}\text{ Photons/sec}$ (3k eV 時)。試料台の上に濃縮物を塗布し, 装置内に挿入した。はじめに塩素元素の吸収ピークを確認し, $2,780-2,900\text{ eV}$ の範囲にある塩素元素の吸収ピークの波形を確認することで隣接する化合物との結合状態を確認した。結合状態比較のために, 隣接する元素が NH として塩化アンモニウム (NH_4Cl), P として窒化塩化リン ($\text{Cl}_6\text{N}_3\text{P}_3$), Na として塩化ナトリウム (NaCl), N としてクロラミン B ($\text{C}_6\text{H}_5\text{ClNNaO}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$), O として過塩素酸カリウム (KClO_4) および次亜塩素酸

ナトリウム ($\text{Na}(\text{ClO})_2$), Ca として塩化カルシウム (CaCl_2), H として塩酸(HCl)を測定した. また, PCE 以外に C-Cl 結合を持つ物質としてジクロロ酢酸(Cl_2CHCOOH)およびトリクロロ酢酸 (Cl_3COOH) を測定した. XAFS 測定データは XAFS 専用解析ソフトウェアである IFEFFIT/Ahtena ver. 0.8.056 (Matt Newville, シカゴ大学, Chicago, USA) を用いて各スペクトル波形をノーマライゼーション処理した.

2. 5. 2. 結果および考察

2. 5. 2. 1 PCE 減少メカニズム

メンブレン濾液によって PCE がどのように減少しているかを調べるために, 分解産物の定性分析や遊離塩素の量を確認した. 例えば, GC/MS にて還元分解産物としてトリクロロエチレンやジクロロエチレンなど, 酸化分解産物としてジクロロ酢酸やトリクロロ酢酸などを測定した. PCE を測定する際には常にこれらの物質も測定を行っており, これまでに検出されなかった. このことは, これまでに報告されている嫌気・好気反応とは異なった反応であると考えられた. 一方, 遊離塩素の検出としては, イオンクロマトグラフィーにて定量を行ったが, コントロールとの有意な差が認められなかった (表 2-8). そこで, 元素レベルで測定可能なシンクロトロン光による XAFS 解析を用いて PCE 由来の塩素の結合状態の違いを微生物の生成物との反応性有無で比較した.

各塩素のスペクトル結果を図 14 に示した. 隣接する原子とその結合様式により PCE 由来の塩素原子のスペクトル形状が異なるために, もし, C-Cl 結合が切断され, 他の原子と結合した場合はピーク形状が変化すると考えられる. 馴養段階で塩素原子の蓄積があるため, ODS18 カラムを用いて精製を行い, カラム精製物を用いて PCE と反応させた. BSA と PCE を反応させた場合は, 塩素原子のスペクトルが変化せず, PCE のみのピークと完全に一致した. a-1 に PCE を MilliQ 水に溶解させた時の塩素スペクトルを示した. 微生物の生成物の濃度を調整した場合は, a-ii, a-iii, a-iv に示すように微生物の生成物の濃度が高くなるにつれて高エネルギー側にシフトし, a-iv の微生物の生成物が 250 mg では, 完全にピーク形状の山が 2 つから 1 つに変化していた. このことは, PCE と微生物の生成物が反応することにより, PCE 中の C-Cl 結合が切断されていることが示唆され, その量が 250 mg では完全に C-Cl 結合が切断されたと考えられる. 次に, 反応後の塩素原子の状態を調べるために, 他の塩素化合物を調べた. 既に ODS カラム精製による脱塩をしたために, 反応液中に含まれている元素は限られている. 共有結合として P-Cl, N-Cl, O-Cl, O=Cl について検討した結果を図 14-b-i, ii, iii, iv, v, vi に示した. b-i, b-ii は PCE 以外の C-Cl 結合をもつジクロロ酢酸とトリクロロ酢酸を調べたものであり, PCE の塩素のピークと形状は変わらなかったことから, C-Cl 結合特有のピーク形状であることが裏づけされた. 一方, P, N, O と共有結合している化合物はいずれも 2 つの山のピークがあり, とくに vi の O=Cl をもつ化合物では高エネルギー側にシフトしており, 大きくピークが変化していた. 微生

物の生成物との反応後のピークとは一致しなかった。そこで、塩素とイオン結合している化合物について調べた結果を図 14 -c-i, ii, iii, iv に示した。いずれのイオン化合物もピークが PCE と微生物の生成物と反応させた後のピークの位置と一致しており、とくに ii の塩化カルシウムと iv の塩化ナトリウムのピークと形状が酷似していた。これらのことから、PCE と活性汚泥中の微生物の生成物が反応することで PCE の C-Cl 結合が切断され、遊離した塩素がイオン化していることが示唆された。イオンクロマトグラフィーで検出できなかった問題としては、イオン化した塩素原子が微生物の生成物に吸着され、溶液では分析できなかったと考えられる。実際、XAFS 解析でも未濃縮の反応液では塩素原子のピークが検出されなかった。

表 2-8. 濾液における PCE 反応前後の塩素イオン濃度

	PCE 添加直後	24 時間反応後
塩素イオン濃度(mg/L)	198±5	202±10

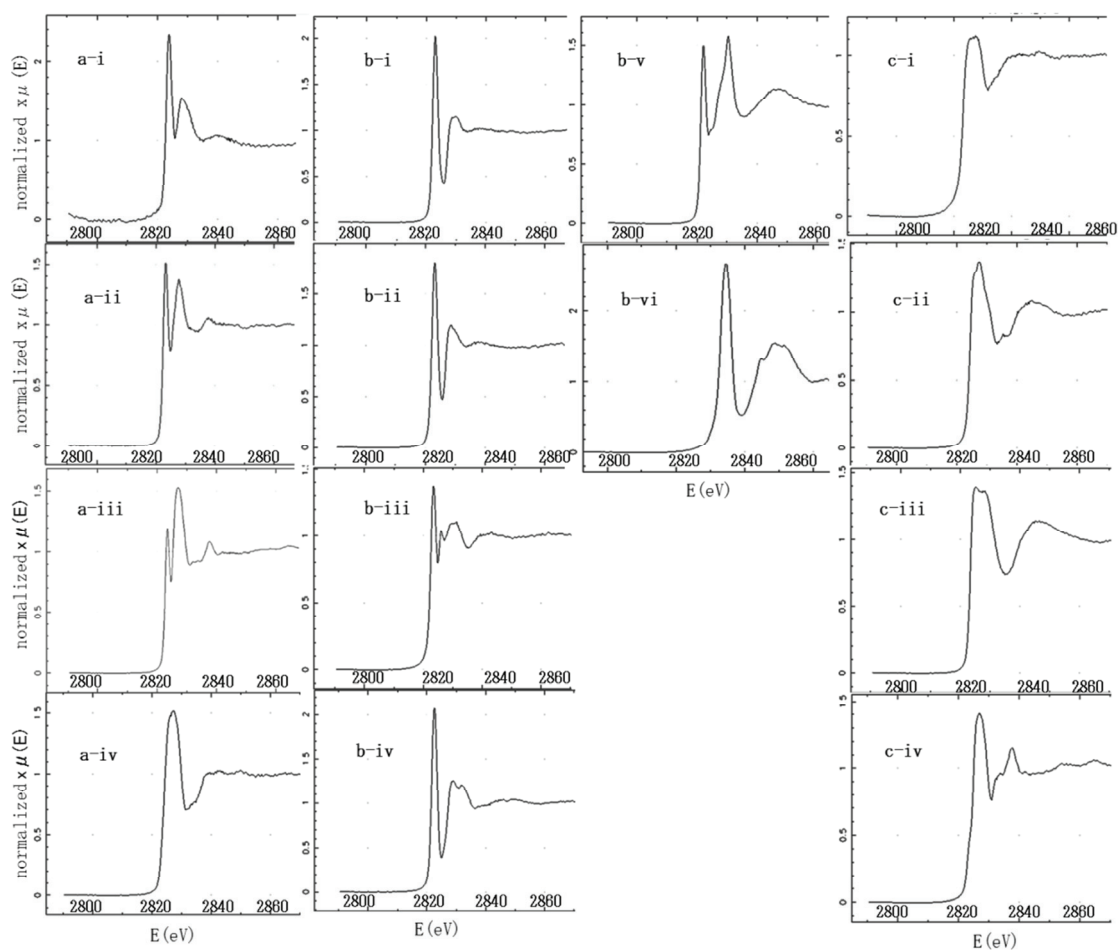


図 14. XAFS 解析による結合元素および状態の違いによる塩素元素の各スペクトル

a : カラム精製した活性汚泥中の微生物の生成物と反応後の塩素原子スペクトルの違い. i : 生成物 0 mg (未反応の PCE), ii : 生成物 25 mg, iii : 生成物 125 mg, vi : 生成物 250 mg
b : 塩素と共有結合している化合物の各塩素スペクトル. i : トリクロロ酢酸, ii : ジクロロ酢酸 (C-Cl), iii : 窒化塩化リン (P-Cl, N-Cl), iv : クロラミン B (N-Cl), v : 次亜塩素酸ナトリウム (O-Cl), vi : 過塩素酸カリウム (O=Cl, O-Cl)
c : 塩素とイオン結合している化合物の各塩素スペクトル. i : 塩化アンモニウム, ii : 塩化カルシウム, iii : 塩酸, vi : 塩化ナトリウム

2. 6 小括

電子基盤製造工場の廃液処理に用いられている活性汚泥を高濃度 PCE にて馴養することで、好氣的雰囲気下にて PCE を減少させることができた。好氣条件下における活性汚泥の PCE 処理として懸念される①揮発効果と②吸着効果について、密閉式のバイアル瓶を用いることで①揮発効果を抑え、活性汚泥の濾過液を用いることで②吸着効果を除外した。さらには、菌体を除去したメンブレン濾液で PCE の減少が認められたことは、所謂、活性汚泥の濾液中に PCE 減少に関与する物質が放出されたことが示唆された。この PCE 減少に関与する物質の性質としては、BCA 法や Qubit でタンパク質として定量でき、分子量が 3K 以下であることから、ペプチド様物質ではないかと考えられた。MALDI-TOF/MS 解析により m/z 998 の物質であること、MALDI-TOF/MS² と *denovo* シーケンス解析によると、アラニンとグリシンで構成されるペプチドである可能性が示唆された。このような、低分子のペプチドが PCE を分解するという報告はこれまでにない。活性汚泥の菌叢解析では、馴養によって *Alcaligenes* 属が 70%を占める結果となり、この *Alcaligenes* が PCE 分解に非常に重要な役割をしているのではないかと考えられた。なお、*Alcaligenes* 属による PCE の分解は報告がない。最後に分解メカニズムの検証をシンクロトロン光による XAFS 解析を用いて行った。塩素原子に着目して波形解析を行なうと、反応前 PCE の C-Cl 結合特有の波形から分解反応後には Na や Ca といった塩素イオン化合物の波形へと変化していた。よって、PCE の C-Cl 結合が切断され、塩素がイオン（化合物）の状態で存在していることが示唆された。以上のことから、活性汚泥を PCE で好氣的な条件下で馴養すると、*Alcaligenes* 属を中心とした細菌によって産生される低分子ペプチドによって PCE の C-Cl 結合が切断・分解されるメカニズムを推定することができた。

3. 活性汚泥のバイオサーファクタントによる PCE 乳化作用

緒言

第一章では菌類が生成する PCE 分解に関与する低分子ペプチド様物質を活性汚泥中から見出し、PCE 分解メカニズムを解明した。菌類が炭素源として PCE を利用するために PCE を分解する酵素様物質を産生するのと同様に、活性汚泥中の菌類は疎水性物質を有効に利用するために界面活性剤を産生することが知られている(45)。生物が作る界面活性剤は環境中で分解されやすく、生体への毒性も低いと考えられている(49)。この性質を利用して、環境中の疎水性汚染物質の浄化、例えば土壌・地下水汚染や、海洋汚染など幅広い活用が気体でできる(45)。近年では、化粧品やナノ材料としての注目も高くなっている(48)。

本研究では、PCE のような疎水性物質を炭素源として与えた場合に、活性汚泥中の菌類が産生する界面活性物質の特性を評価することを目的とした。

3. 1 濾液のバイオサーファクタント (BS) 様物質の特性

3. 1. 1. 材料および方法

3. 1. 1. 1. BS 様物質を含む濾液の作成

1. 1. 1. 同様に馴養した活性汚泥を氷上で十分に冷やしながら 0.2 μm メンブレンフィルター (ADVANTEC, 東京) で濾過した。作成した濾液は真空凍結乾燥を行い、乾固し、 -20°C で保存した。供試時は適宜 MilliQ 水 (18 M Ω ; Millipore, Merck, Darmstadt, Germany) に懸濁させ、各試験に用いた。

3. 1. 1. 2. 温度による粒度分布の変化

濾液の性状を目視にて観察した後、ゼータサイザー (Malvern, UK) を用いて氷上濾液の 10, 20, 30°C における粒度分布を測定した。測定条件としては温度によって粒度が時間とともに変化することがあり、バラつきが生じるため、各温度に達した後 30 分間保温した時に粒子径の大きさを測定し、粒度分布の比較を行った。

3. 1. 2. 結果および考察

3. 1. 2. 1. 濾液の性質と BS 様物質の粒度分布

濾液は 10°C では褐色透明であったが、 20°C まで昇温すると白濁した (図 3-1)。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 10, 20, 30°C における濾液中の粒度分布を測定した。結果を図 3-2 に

示した. 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, 比較的低温下で BS 様物質がミセルを形成したのではないかと考えられた.

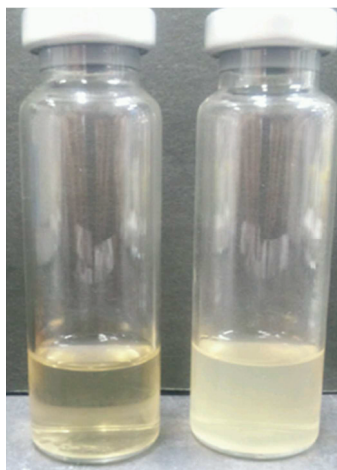


図 3-1. 温度変化による濾液の性質への影響
左 10℃, 右 20℃

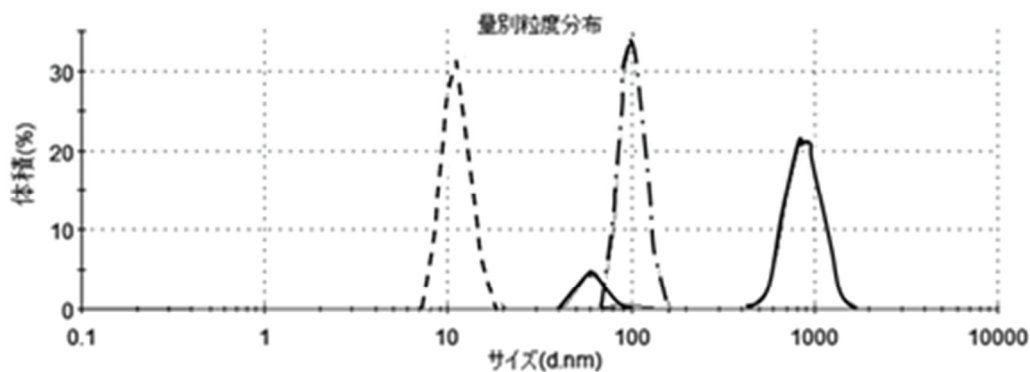


図 3-2. 温度変化における濾液中の粒度分布の違い

3. 2. 濾液による各有機化合物の乳化作用

3. 2. 1. 材料および方法

3. 2. 1. 1. 塩素化エチレンの乳化作用の検証

GC-FID による測定

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, 濾液およびコントロールとして Milli-Q 水を 20 ml 容量のバイアル瓶に

5 ml ずつ入れ、テフロンコートの子チルゴム栓とアルミシールキャップにて密栓した（2. 1. 1. 2. 参照）。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℃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 μ l の気体をシリンジにて抜き取り、GC-FID（GC-2014; 島津, 京都）GC キャピラリーカラム Rt-Q-BOND(30 m $\times$ 0.53 mm $\times$ 20 μ m; 島津ジーエルシー, 東京)にて次の条件下で分析した。カラム初期温度; 120℃, カラム昇温速度; 15℃/ min, カラム最終温度; 220℃, カラム最終温度保持時間; 14.0 min, 検出器温度; 240℃, 気化室温度; 200℃, キャリアガス; He (0.55 kg/cm²), H₂ 圧; 0.56 kg/cm², 空気圧; 0.41 kg/cm². 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℃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。

ヘキサン抽出

反応後の各バイアルの液相から 1 ml ずつ反応液を採取し、ヘキサン 4 ml と NaCl 0.3 g を含んだ密栓済みのバイアル瓶に添加した。濾液中には界面活性物質の存在が考えられたため、飽和濃度の NaCl を加えることによってヘキサンや PCE のエマルションを解乳化させた。バイアル添加・攪拌後に反応液中の PCE をヘキサン相に抽出した。分液漏斗にてヘキサン相 5 μ l を分取し、ヘキサン中に含まれる PCE をガスクロマトグラフィー(GC-2014)で定量した。

3. 2. 1. 2. PCE 添加時の粒度分布の測定

濾液及びコントロールとして Milli-Q 水を 20 ml バイアル瓶に 5 ml ずつ入れ、テフロン栓とアルミシールキャップで密栓した。PCE を 5 μ l（濃度としては 1620 mg/l となる）添加し、攪拌した。10℃または 20℃にて 150 rpm で 1 時間反応させた。反応後の液からそれぞれ 1 ml ずつ採取し、ヘキサン 4 ml と NaCl 0.3 g を含んだ密栓済みのバイアル瓶に加えた。汚泥濾液中には界面活性物質の存在が考えられたため、飽和濃度の NaCl を加えることによってヘキサンや PCE のエマルションを解乳化させた。バイアルをよく攪拌し、反応液中の PCE をヘキサン相に抽出した。ヘキサン相 5 μ l を採取し、液中に含まれる PCE をガスクロマトグラフィー（GC-2014）にて定量した。さらに、ゼータサイザーにて 10, 20℃における粒度分布を測定し比較した。

3. 2. 2. 結果および考察

3. 2. 2. 1. PCE の乳化作用

3.1.1 同様の濾液を用いて PCE 乳化作用を確認した。結果を表 3-1 に示した。コントロール（水）では液相中に残存 PCE 量は気液相を合わせた全 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．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 BS は高温高压で影響を受ける性質があることが示唆された．

表 3-1. 濾液の添加による液相中への PCE 溶解度の向上

	気相中の PCE 量 (μg)	液相中の PCE 量 (μg)	液相中の PCE 存 在率 (%)
水	428 $\pm$ 20	143 $\pm$ 5	26.0
濾液	151 $\pm$ 16	313 $\pm$ 41	67.5
濾液（オートクレーブ処理）	382 $\pm$ 15	178 $\pm$ 7	35.1

20 ml 容バイアル瓶に 5 ml の水または濾液と PCE を 500 μg をそれぞれ添加してから 24 時間後の PCE 量（3 連の平均値 $\pm$ 標準偏差）．

3. 2. 2. 2. 各塩素化エチレンの乳化作用と溶解度による違い

PCE, TCE, cDCE をそれぞれ濾液に添加し，攪拌混合した後，各塩素化エチレンの液相中の塩素化エチレンの残存量を測定することで，液相中に溶解した各塩素化エチレンの量として評価した結果を表 3-2 に示した．PCE においては 107 から 251 μg へと約 2.35 倍増加したのに対して，TCE では 306 から 356 μg ，cDCE では 406 から 460 μg とそれぞれ 1.16 倍，1.13 倍増加した．オクタノール/水分配係数 (log Pow) は PCE, TCE, cDCE の順に高く，水に溶けにくいと言える．従って濾液は水に溶けにくい物質ほど，液中への溶解量を増加させることが認められた．以上のことから，濾液中の BS 成分は疎水性の高さに比例して乳化力が高くなることが示唆された．

表 3-2. 各塩素化エチレン溶解量の比較

	液相中の塩素化エチレン量 (μg)		濾液中の溶 解量増加率 (倍)	O/W (log Pow)
	水	濾液		
PCE	107 $\pm$ 5	251 $\pm$ 10	2.35	2.90
TCE	306 $\pm$ 14	356 $\pm$ 22	1.16	2.42
cDCE	406 $\pm$ 11	460 $\pm$ 17	1.13	1.48

O/W はオクタノール/水分配係数．

塩素化エチレン量は 3 連の平均値 $\pm$ 標準偏差．

3. 2. 2. 3. 高濃度 PCE の乳化作用

次に常温・常圧下における溶解度以上の PCE を添加した場合の乳化作用を調べた。PCE を 5 ml 中に 5 μ l 添加した (PCE が全て溶解したとすると PCE 濃度は 1620 mg/l となる) ところ、低濃度(100 mg/l)の PCE 添加時より顕著な白濁が確認された。そこで、20℃条件下における粒径分布を高濃度(1620 mg/l)の PCE 添加前後で測定した (図 3-3)。その結果、PCE 添加前の濾液中の粒径分布は 64 と 248 nm に最大ピークをもつ分布があったのに対して、PCE 添加後では濾液中の粒径分布は 389 と 4,053 nm に最大ピークをもつ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 μ 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 μ m を超えると乳白色になると言われている (49, 50)。

次にヘキサン抽出によって液相中に溶解している PCE 濃度を測定した (表 3-3)。20℃で反応させると、コントロール (水) に溶解している PCE 濃度は 251.3 mg/l であった。濾液の PCE 濃度は 1383.4 mg/l であり、コントロールの 5.5 倍となった。また、反応時に添加した PCE 濃度は 1620 mg/l であり、PCE は濾液の液相中に 85%が溶解したと考えられた。

一方、10℃で反応させるとコントロール (水) に含まれる PCE 濃度は 281.1 mg/l であり、20℃で反応させた場合より液相中 PCE 濃度が増加した。濾液中の PCE 濃度は 1722.3 mg/l であり、添加した PCE の全てが濾液の液相中に溶解した。コントロールと比較すると、PCE 濃度はそれぞれ 6.1 倍増加した。高濃度で PCE を添加すると、20℃と 10℃で比較すると、液相中 PCE 濃度は 10℃の低温の方が液相中の増加率が高かった。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。

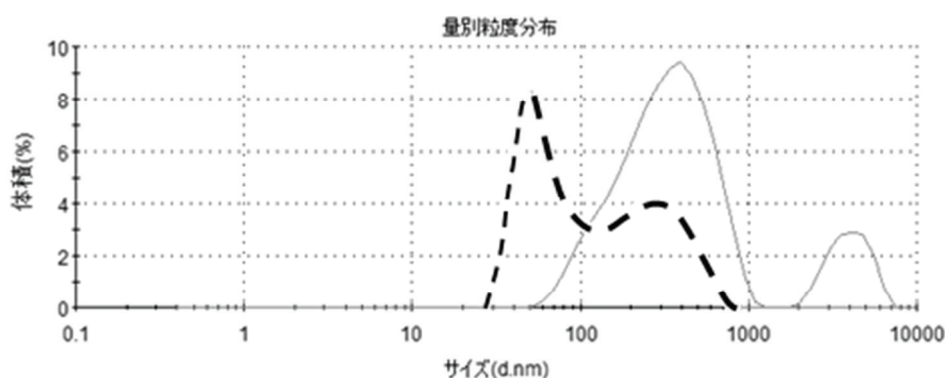


図 3-3. PCE 添加前後の粒度分布の違い (20℃)

表 3-3. 高濃度 PCE 添加時の液相中の濾液による乳化効果

	PCE 溶解度 (mg/l)	
	20℃	10℃
コントロール (水)	251.3 (±24.6)	281.1 (±15.7)
濾液	1383.4 (±154.3)	1722.3 (±53.5)

3. 3. 既知の界面活性剤との比較

3. 3. 1. 材料および方法

3. 3. 1. 1. 合成界面活性剤およびサーファクチンナトリウムの PCE 乳化評価

合成界面活性剤である Tween 20 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) と BS であるサーファクチンナトリウム (和光純薬, 東京, 以下 SF) を比較に用いた. 各々 Milli-Q 水にて 0.25, 0.5, 1.0%(w/v) となるように調製した. 20 ml 容量のバイアル瓶に 5 ml ずつ分注し, テフロンコーのブチルゴム栓とアルミキャップで密栓した. PCE を終濃度が 100 mg/l となるように添加した後, 20℃にて 150 rpm で一晩振とうし, 気相中の残存 PCE 量を上記 (3. 2. 1. 1) 同様に測定した.

3. 3. 1. 2. 各界面活性剤混合水溶液および濾液の TOC 濃度の測定

2. 1. 1. 1 同様に上清を適宜希釈して燃焼触媒酸化方式である TOC-VCSH を用いて各界面活性剤の水溶液ならびに濾液の TOC 濃度を測定した.

3. 3. 2. 結果および考察

3. 3. 2. 1. 既知の界面活性剤との PCE 乳化力の比較

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, BS として SF 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結果を表 3-4 に示した. 界面活性剤の濃度が高くなると, 気相中 PCE 量は減少した. 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 μg 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. しかしながら, 既知界面活性剤の PCE 乳化量 (活性) を TOC 量あたり

の比活性で比較すると、1.0%において0.25、0.5%(w/v)時よりも低下した。これは臨界ミセル濃度に到達したと考えられる。一方、濾液では各濃度の Tween 20 や SF と比較して PCE 溶解量が高くコントロールに対して 219 μg 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 TOC 成分が含まれており、BS 様物質由来の TOC 以外の影響を受けていると考えられる。

表 3-4. 各界面活性剤の PCE 乳化量の比較

界面活性剤 (w/v)	PCE 乳化量(μg)	TOC あたりの PCE 乳化量(μg)
Surfactin 0.25%	45 $\pm$ 12	0.006
Surfactin 0.5%	106 $\pm$ 16	0.007
Surfactin 1.0%	150 $\pm$ 19	0.005
Tween 20 0.25%	59 $\pm$ 13	0.009
Tween 20 0.5%	122 $\pm$ 17	0.009
Tween 20 1.0%	178 $\pm$ 21	0.007
濾液	219 $\pm$ 24	0.003

PCE 乳化量=コントロールの液相中の PCE 量－各界面活性剤水溶液の液相中の PCE 量
(3 連の平均値 $\pm$ 標準偏差)。

3. 4. 油膜排除

3. 4. 1. 材料および方法

3. 4. 1. 1. 油膜排除活性

界面活性剤の表面張力低下作用を評価する方法として油膜排除活性測定法を用いた(51)。水面に形成された油膜の排除は、滴下したサンプルの有する表面張力低下作用によって生じる。油膜が排除される範囲は、サンプルの表面張力低下作用だけでなく、油膜の厚さにも関係する。そこで、一定の厚さの油膜を形成するために、底面積の等しいガラスシャーレを用いた。また、ガラスシャーレの中央の油膜が排除されることによって、縁側に油膜が寄せられて厚みが出ることを考慮し、油膜排除面積の大きさが等しくなるようにサンプル濃度を調製した。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 μl 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 (Milli-Q 水) をそれぞれ各 5 μl 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 ; 三谷商事, 福井) 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（3.3.1.2 参照）から比活性を算出した。

3. 4. 2. 結果および考察

3. 4. 2. 1. 濾液および各界面活性剤による原油の油膜排除活性

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。この時のガラスシャーレ底面積と油膜排除面積の比（以下面積比）を表 3-5 に示した。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 1.7×10^{-2} （面積比）であり，Tween 20 溶液および SF 溶液の比活性は，それぞれ 3.0×10^{-2} （面積比）， 3.9×10^{-2} （面積比）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。例えば，*Acinetobacter* sp. ACS4 株由来の素抽出した BS の精製前後で乳化活性を測定し，分子量 10,000 で透析分離した透析試料の乳化活性が 132 U/mg であったのに対して陰イオン交換クロマトグラフィー精製後では 916 U/mg まで上昇したとの報告がある(52)。本試験でも油膜排除面積の比活性が低かったことおよび，上記 3.3.2.1 で示した通り PCE 乳化作用においても同様に比活性が低かったことは，濾液由来の BS 様物質の精製によって，比活性が増加すると期待される。

表 3-5. 各界面活性剤の油膜排除効果

		面積比 (cm ²)	TOC (g/l)	比活性 (面積比)
濾液	未処理	0.22±0.052	2.52	1.7×10 ⁻² (±4.1×10 ⁻³)
	AC 処理	0.05±0.019	2.52	0.3×10 ⁻² (±1.5×10 ⁻³)
0.25%(w/v) Tween 20	未処理	0.21±0.039	1.42	3.0×10 ⁻² (±5.4×10 ⁻³)
	AC 処理	0.045±0.013	1.42	0.6×10 ⁻² (±1.9×10 ⁻³)
0.125%(w/v) SF	未処理	0.15±0.021	0.75	3.9×10 ⁻² (±12×10 ⁻³)
	AC 処理	0.085±0.021	0.75	2.5×10 ⁻² (±5.6×10 ⁻³)

面積比=油膜排除面積/油膜面積

3 連の平均値±標準偏差. AC=オートクレーブ処理

3. 5. 分離・精製

3. 5. 1. 材料および方法

3. 5. 1. 1. 濾液からの BS 様成分の分離・精製

メタノール抽出

濾液 20 ml を凍結乾燥し, 完全に脱水乾固した後, 元の量以上のメタノールに溶解させ, 120rpm にて一晩振盪抽出した. この溶液を 5000×g で 10 分間遠心分離し, 上清のみを取り出し, エバポレーターにて乾固させ, 上清と同量の Milli-Q 水に溶解させた. また, 遠心分離にて沈降分離させた残渣については再度上清と同量の Milli-Q 水に溶解させた. メタノール抽出画分と残渣について, それぞれ 3. 4. 1. 1 と同様に油膜排除活性を調べた.

TLC 分離

薄層シリカゲルプレート(TLC; Merck, Darmstadt, Germany)にメタノール抽出画分をスポットし, クロロホルム:メタノール=5:1 にて展開を行い, UV 照射下にて確認し, 5% のリンモリブデン酸エタノール溶液, 10%硫酸水溶液, 3%ニンヒドリンメタノール溶液をそれぞれ噴霧し, 140℃で加熱してスポットを観察した.

HPLC 分離

メタノール抽出物を LC-2010AHT(SHIMADZU, 京都)にて Triart C18 カラム:長さ 250 mm×内径 4.6 mm×粒径 5 μm (YMC, 京都)を用いて以下の条件で分析を行なった;流速,

1 ml/min; 移動相, 0-100%メタノール; カラム温度, 40°C; 注入量, 20 μ l; 検出器, UV 220, 256, 280 nm における吸光度.

3. 5. 2. 結果および考察

3. 5. 2. 1. BS 様成分の分離および精製

表 3-6 に示した通り, 濾液を凍結乾燥後にメタノール抽出画分に油膜排除効果 (10.4×10^{-2} cm²/μg TOC) が認められた. 凍結乾燥物のメタノール抽出残渣 (MiliQ 水に再懸濁) では油膜排除効果はほとんど認められなかった. このことから, 活性汚泥由来の BS 様物質はメタノール中に溶解する疎水性物質であることが示唆された. さらに, このメタノール抽出物の吸光度を調べると, 220, 280 nm 付近に極大波長のピークが認められた. 一方, SF では 220 nm 付近にのみ極大波長が認められた (図 3-4). 次に, TLC によってクロロホルム: メタノール=5:1 で展開するとスポット部がわずかに UV 照射下で発色した. またニンヒドリンには Rf 値 0.98 付近にわずかに発色スポットが認められ, スポット部分ははっきりと発色が認められた. リンモリブデン酸や硫酸では発色が認められなかった. 以上のことから BS 様物質は糖脂質ではなく, アミノ基を有するリポペプチド型である可能性が示唆された. 次に水/メタノールのグラジエント条件で C18 カラムにて HPLC を行い, 220, 256, 280 nm で検出されたピークを図 3-5 に示す. 220 nm (図 3-5 A) では 1.498, 3.183, 6.835, 35.486 min に, 256 nm (図 3-5 B) では 4.080, 35.104 min に, 280 nm (図 3-5 C) では 44.841 min にそれぞれピークが認められた. 220 nm および 256 nm で認められたリテンションタイム前半の水の割合が多い部分のピークは極性の高い水溶性の色素由来の物質ではないかと考えられる. またリテンションタイム後半のメタノール割合が高い部分のピークで 220 nm では 35.486 min に, 256 nm では 35.104 min に, 280 nm では 44.841 min に観察されたピークは, いずれも極性が低く疎水性の高い物質であると考えられた. また 220 nm で観察されたことからペプチド結合を有する物質であり, 280 nm では芳香環を有するタンパク質様物質であることも考えられた. 以上のことから, PCE で馴養した活性汚泥濾液中には特有のペプチド構造を持つ BS 物質が存在する可能性が示唆された.

表 3-6 メタノール抽出画分の油膜排除効果

	面積比 (cm ²)	TOC (g/l)	比活性 (面積比)
メタノール抽出画分	0.47	0.90	10.4×10^{-2}
メタノール抽出残渣	0.07	1.62	0.9×10^{-2}

面積比=油膜排除面積/油膜面積

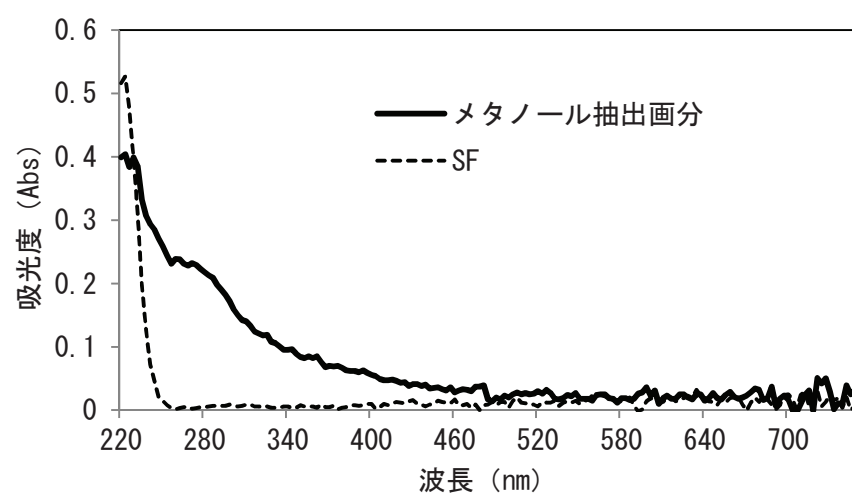


図 3-4. メタノール抽出画分と SF の吸収波長スペクトル

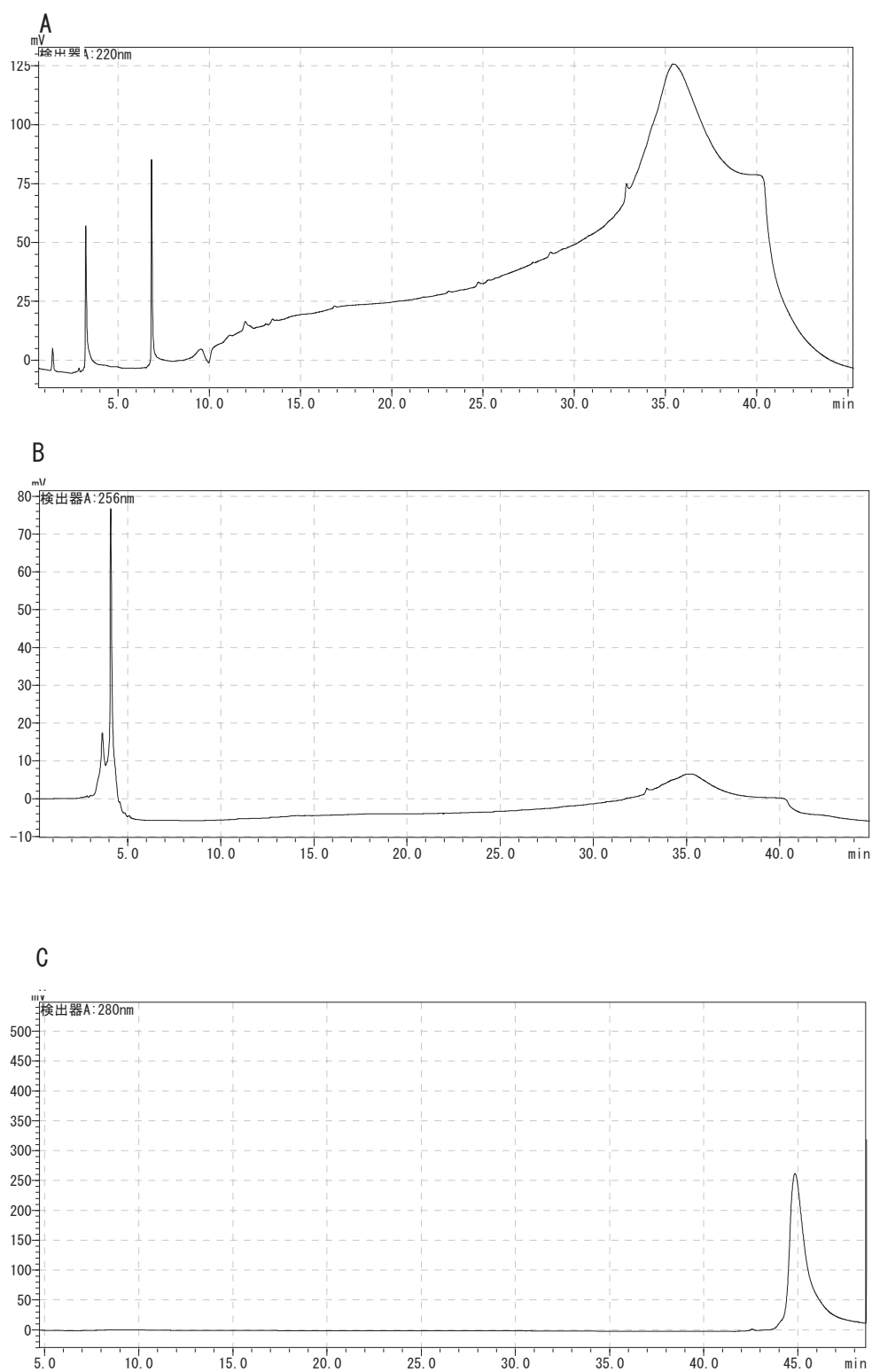


図 3-5. メタノール抽出画分の HPLC によるピーク（波長ごと）

A: 220 nm, B: 256 nm, C: 280 nm

3. 6. 小括

PCE で馴養した汚泥は、氷上で濾過した濾液における液相中の PCE 存在率は 67.5% であり、水における PCE の液相中の存在率の約 2.6 倍となっており、PCE を乳化させることが分かった。既知の界面活性剤である Tween 20 やサーファクチンナトリウムと比較しても同等以上の乳化力を示した。また、塩素化エチレンの乳化作用は O/W が高い溶媒、つまり水への溶解度が低いほど効果が高いことが分かった。原油に対する油膜排除効果も認められ、Tween 20 やサーファクチンナトリウムと比較しても油膜排除面積は同等以上であったが、TOC あたりの活性では低い結果となった。これは濾液中には BS 以外の成分も含まれていることから、精製することで比活性が高くなると考えられた。氷上濾液を部分的に精製すると、メタノール抽出物に油膜排除効果が認められ、比活性が向上した。このメタノール抽出物の吸収スペクトルを測定すると、220 nm と 280 nm にピークが認められた。またこの物質はタンパク質定量キットである Qubit によっても定量できる。このことから、濾液中に含まれる BS 様物質はサーファクチンなどのように、ペプチド結合を有する地歩ペプチド型の BS である可能性がある。本研究では PCE で馴養した汚泥がペプチド型の BS 様物質を産生し、低温下でも塩素化エチレンの乳化作用や原油の油膜排除効果を示すことが明らかとなった。

4. 総括

本研究では PCE に馴養することで活性汚泥による PCE の分解メカニズムの解明と生成されたバイオサーファクタントの特徴の把握を目的とした。

まず、電子基盤の製造工場の廃液処理に用いられている活性汚泥を好気条件で高濃度の PCE で馴養すると高濃度の PCE を好気条件で減少させることができた。また、その菌叢は馴養前後で大きく異なっており、馴養前では優占していなかった *Alcaligenes* 属が馴養後では 70%を占める結果となった。このことは、馴養によってその炭素源を利用し得る種が自然淘汰的に優位に生息できた結果であると考えられる。これまでに PCE の好気分解は *Pseudomonas stutzeri* OX1 株(74) や *Trametes versicolor* (ATCC #42530) (58)による報告のみであり、*Alcaligenes eutrophus* JMP134 によるトリクロロエチレンの好気分解は知られているが(32)、*Alcaligenes* 属による PCE 分解の報告はこれまでにない。本研究では *Alcaligenes* 属による新たに PCE 分解の可能性を見出した。

活性汚泥微生物そのものではなく、活性汚泥中の菌の生成物が PCE を減少させることが明らかとなった。PCE 減少に関与している菌の生成物は分子量が 3,000 以下であり、MS 解析結果から分子量 998 の低分子ペプチドである可能性が示唆された。denovo シーケンス結果から、アミノ酸であるアラニンとグリシンで構成されているペプチドである可能性も示唆された。一方、*Alcaligenes* 属を中心とした汚泥中の菌の生成物による PCE 減少メカニズムは PCE 中の C-Cl 結合を切断し、Cl がイオン化合物となる分解であることが分かった。以上のことから、*Alcaligenes* 属を中心とした活性汚泥中の菌が生成したアラニン・グリシンで構成される m/z 998 の低分子ペプチドが PCE の C-Cl 結合を切断することで分解するというメカニズムが明らかとなった。好気分解の *Pseudomonas stutzeri* OX1 株や *Trametes versicolor* はトルエン-o-キシレンモノオキシゲナーゼやシトクロム p450 などの酵素であると考えられており(58, 74)、その分子量は 40,000-60,000 程度とかなり大きな立体構造を持つ(7, 58, 28)。*Dehalococcoides* 属による脱塩素化反応においてもやはり分子量 45,000 や 62,000 など大きな立体構造をもつ酵素が見出されている(63)。それに対して、本研究では分子量 998 などの立体構造を持たない低分子ペプチドが PCE を分解する働きを有することを見出した。このように低分子のペプチドが PCE などの塩素化合物を分解するという報告は無く、新規のメカニズムである。今後は他の C-Cl 結合を持つ化合物への応用や、菌の生成物を用いた廃液処理システムのみならず土壌・地下水汚染の浄化への応用も期待できる。

次に、PCE で馴養した活性汚泥中に、BS 様成分が存在することが分かった。この BS 様物質は 20℃でも 10℃でも PCE 乳化力に顕著な差は認められなかったことから、低温環境でも界面活性効果を示すことが期待される。例えば、冬であったり、北方であったり、気温の低い時期や地域の環境浄化の乳化剤や油汚染等の油膜排除剤等にも利用できると可能性がある。また、この BS 様物質は PCE などを乳化し、特にオクタノール/水分分配係数が高

い物質に対して、乳化作用が強いことも分かった。これまでに PCE の乳化報告のあった BS は、PCE 濃度が 400 mg/l などであり(12)、本研究ではさらに高濃度の PCE の 1722 mg/l (10℃)、1383 mg/l (20℃)に達することが分かり、非常に乳化作用の強い BS が活性汚泥中に産生されていると考えられた。PCE などの塩素化エチレン以外としては原油に対する油膜排除効果も認められた。これら乳化作用、油膜排除効果ともに既知の界面活性剤である Tween 20 や SF と同等以上の効果があったことから、非常に有効な乳化剤や油膜除去能があると考えられる。活性汚泥中における微生物は疎水性物質を炭素源として利用する場合に疎水性物質を乳化し、水との親和性を高めることによって、容易にアクセスできるようにしていると考えられる。これまでに単離菌による BS の研究は多くされてきている(4, 13, 44, 48, 56, 68, 73, 92, 93)。しかし複合微生物における BS の評価はほとんどされてこなかった。これからは、活性汚泥だけでなく、土壌や地下水中など多様な微生物が生息している環境下における BS の多様性とその機能に関する研究が、疎水性物質の処理や浄化対策を進めるに当たって重要である。本研究ではメタノール抽出をして、HPLC で分画することまでできた。また、その BS 様成分はサーファクチン (47) のようなペプチド結合を有することが分かったことから、おそらくリポペプチド型であると考えられる。今後、構造が明らかとなれば新規の環境低負荷であるバイオサーファクタントとして様々な乳化剤や洗剤としての利用が期待できる。

本研究で供試した廃液処理に用いられている活性汚泥は PCE などの難分解性物質で馴養することで、その物質を利用できる菌が優占的に増殖し処理できるような菌叢へと変化すると考えられる。その処理メカニズムに関与する物質は菌代謝産物である酵素やバイオサーファクタントなど多様である。PCE 分解に関与する物質が、酵素のようなタンパク質ではなく、ペプチドという低分子の物質であり、酵素のように働き、熱安定性や酸・アルカリ性条件下でも活性を維持できたことは、エネルギーを用いずに常温・常圧下での処理ができるメリットがある。また、バイオサーファクタントは活性汚泥といった複合微生物系において、PCE などの疎水性物質を処理する上で非常に重要な役割をしており、生物由来ということで、環境中でも容易に分解されると考えられる。これら菌の生成する代謝物をうまく利用することで、塩素系有機化合物を含む廃液処理のみならず、土壌・地下水汚染などの環境浄化にも活用できる。例えば、高い分解能力を予め持った菌を投入するバイオオーグメンテーションのように菌を直接土壌・地下水中に投入しなせず、バイオサーファクタントで汚染物を乳化させ、PCE 処理剤という形でペプチド様物質を投入する方法が提案できる。さらに今後 PCE 以外にも様々な物質への応用ができれば、様々な分野において環境低負荷な処理方法として提案できるものと期待される。

5. 参考文献

- 1) Ameotra S. S., Makkar R. S. (2004), Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecule. *Curr. Opin. Microbiol.*, 7(3), 262–266.
- 2) Ahmad, N., Benoit, D., Brooke, L., Call, D., Carlson, A., Defoe, D., Huot, J., Moriarity, A., Richter, J., Shubat, P., Veith, G. and Walbridge, C. (1984) Aquatic Toxicity Tests to Characterize the Hazard of Volatile Organic Chemicals in Water: A Toxicity Data Summary - Parts I and II. EPA 600/3-84-009, U.S.EPA, Environmental Research Lab, Duluth, MN: 103.
- 3) Altmann, L., Bottger, A. and Wiegand, H. (1990) Neurophysiological and psychophysical measurements reveal effects of acute low-level organic solvent exposure in humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 62, 493–499.
- 4) Arima K., Kakinuma A., Tamura G. (1968), Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31(3), 488-494.
- 5) Bamberger M., and Oswald R. E. (2012), Impacts of Gas Drilling on Human and Animal Health. *J. Environ. Occupat. Health Policy*, 22 (1), 51~77.
- 6) Bartels M. J. (1994), Quantitation of the tetrachloroethylene metabolite N-acetyl-S-(trichlorovinyl) cysteine in rat urine via negative ion chemical ionization gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Biol. Mass Spectrom.*, 23, 689~694.
- 7) Bertoni G., Martino, M., Galli, E., and Barbieri, P. (1998), Analysis of the Gene Cluster Encoding Toluene/o-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol* 64 (10), 3626~3632.
- 8) Bugg T. DH, Ahmad M., Hardiman E. M, and Singh R. (2011), The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22(3), 394~400.
- 9) Carson R. (1962), *Silent Spring*. Fortieth Anniversary ed. pp. 18 ~ 27. A MARINER BOOK, HOUGHTON MIFFLIN COMPANY, Boston New York.
- 10) Chang Y. C., Hatsu M., Jung K., Yoo Y. S. and Takamizawa K. (2000), Isolation and characterization of a tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermentans* DPH-1. *J. Biosci. Bioengineer.*, 89, 489~491.
- 11) 地下水学会(2006) 地下水・土壤汚染の基礎から応用.
- 12) Clifford J. S, Ioannidis M. A., and Legge R. L. (2007) Enhanced aqueous solubilization of tetrachloroethylene by a rhamnolipid biosurfactant. *J. Colloid Inter. Sci.*, 305, 361~365.
- 13) Clutterbuck P. W., Raistrick H., and Rintoul M. L. (1931), On the production from

- glucose by *Penicillium spiculispurum* Lehman of a new polybasic fatty acid, C₁₇H₂₈O₆ (The lactone of γ -hydroxy- β - δ -dicarboxypentadecic acid). The Royal Society, 220, 301-330.
- 14) Dallas, C.E., Muralidhara, S., Chen, X.M., Ramanathan, R., Varkonyi, P., Gallo, J.M. and Bruckner, J.V. (1994) Use of a physiologically based model to predict systemic uptake and respiratory elimination of perchloroethylene. *Tox. Appl. Pharm.*, 128, 60~68.
 - 15) Dekant W., Metzler M. and Henschler D. (1986), Identification of S-1,2,2-trichlorovinyl-N-acetylcysteine as a urinary metabolite of tetrachloroethylene: Bioactivation through glutathione conjugation as a possible explanation of its nephrocarcinogenicity. *J. Biochem. Toxicol.*, 1 (2), 57~72.
 - 16) Dennison J. E., Bigelow P. L., Mumtaz M. M., Andersson M. E., Dobrev I. D., and Yanga R. S. H. (2005), Evaluation of Potential Toxicity from Co-Exposure to Three CNS Depressants (Toluene, Ethylbenzene, and Xylene) Under Resting and Working Conditions Using PBPK Modeling. *J. Occupat. Environ. Hygiene*, 2 (3), 127~135.
 - 17) 独立行政法人科学技術振興機構研究開発戦略センター (2009) 環境技術 科学技術・研究開発の国際比較 2009 年版, 58~59.
 - 18) EPA Releases (2012). Final Health Assessment for Tetrachloroethylene (Perc)/Public health protections remain in place, USA.
 - 19) Fathepure B. Z. and Boyd S. A. (1998), Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain DCM. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2976~2980.
 - 20) Futagami, T., Tsuboi Y., Suyama A., Goto M. and Furukawa K. (2005), Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfotobacterium* sp. strain Y51: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 534~541.
 - 21) Gamier, R., Bedouin, J., Pepin, G. et al. (1996) Coin-operated dry cleaning machines may be responsible for acute tetrachloroethylene poisoning: Report of 26 cases including one death. *Clinical. Toxicol.*, 34 (2), 191~197.
 - 22) Ghantous, H., Danielsson, B.R.G., Dencker, L., Gorczak, J. and Vesterberg, O. (1986) Trichloroacetic acid accumulates in murine amniotic fluid after tri-and tetrachloroethylene inhalation. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 58, 105~114.
 - 23) 岐阜市ホームページ 地テトラクロロエチレン等による地下水汚染 地下水汚染モニタリング調査(テトラクロロエチレン等による)より.
 - 24) Gillham R. W. and O'Hannesin S. F. (1994), Enhanced Degradation of Halogenated

- Aliphatics by Zero-Valent Iron. Groundwater, 32 (6), 958~967.
- 25) Green T., Odum J., Nash J. A., Foster J. R. (1990) Perchloroethylene-induced rat kidney tumors: An investigation of the mechanisms involved and their relevance to humans. Toxicol. Appl. Pharmacol., 103 (1), 77~89.
- 26) Gross S. A., Avens H. J., Banducci A. M., Sahmel J., Panko J. M., and Tvermoes B. E. (2013), Analysis of BTEX groundwater concentrations from surface spills associated with hydraulic fracturing operations. J. Air & Waste Manag. Associat., 63 (4), 424~432.
- 27) 群馬県ホームページ 坂東工業団地周辺土壤汚染対策 坂東工業団地周辺の土壤調査結果についてより
- 28) Guengerich F. P., Wang P., Davidson N. K. (1982), Estimation of isozymes of microsomal cytochrome P-450 in rats, rabbits, and humans using immunochemical staining coupled with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Biochem., 21 (7), 1698~1706.
- 29) Guerra-Santos, L., Käppeli, O., and Fiechter, A. (1984). Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. Environ. Microbiol. 48 (2), 301-305.
- 30) Gunther F. A. (1945), Aspects of the chemistry of DDT. J. Chem. Educ., 22 (5), 238.
- 31) 東大和市ホームページ 新学校給食センター建設用地の土壤汚染より
- 32) Harker A. R., and Kim Y. (1999), Trichloroethylene degradation by two independent aromatic-degrading pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Appl. Environ. Microbiol. 56 (4), 1179~1181.
- 33) 平田健正(2000). 土壤・地下水汚染の修復技術と課題 環境技術 29(237), 36-37.
- 34) 本間憲之 (2008) 原位置バイオレメディエーションによる有機塩素化合物汚染土壌・地下水の浄化技術. 三井造船技報 193, 17~22.
- 35) Horne, J.D., Swirsky, M.A., Hollister, T.A., Oblad, B.R. and Kennedy, J.H. (1983) Aquatic Toxicity Studies of Five Priority Pollutants. Rep.No.4398, Final Report, EPA Contract No.68-01-6201, 55 NUS Corp., Houston, TX: 196 (U.S. EPA, 2002 より).
- 36) 一般社団法人 土壤環境センター (2013). 土壤汚染状況調査・対策に関する実態調査結果 (平成 16-25 年度).
- 37) 今村 聡 (2004). 地下水・土壤汚染 13.揮発性有機化合物・油汚染の原位置浄化技術地下水学会誌第 46 巻第 1 号 51~59.
- 38) 環境省(2009). 水・大気環境局：掘削除去以外による土壤汚染対策の事例, 平成 19 年度土壤汚染対策法の施行状況及び 土壤汚染調査・対策事例等に関する調査結果環境省巻末資料.
- 39) 環境省 (2011). 水・大気環境局土壤環境課：土壤汚染対策法に基づく調査及び措置に

関するガイドライン Appendix-1.特定有害物質を含む地下水が到達し得る「一定の範囲」の考え方.

- 40) 環境省 中央審議会 (2002). 今後の土壤汚染環境保全対策の在り方について (答申)
- 41) 環境省中央環境審議会土壤農薬部会土壤汚染技術基準等専門委員会 (2008). 油汚染対策ガイドライン—鉱油類を含む土壤に起因する油臭・油膜問題への土地所有者等による対応の考え方—.
- 42) 経済産業省 環境リスク評価室 (2003). 化学物質の環境リスク評価 第2巻 第1編 化学物質の環境リスク初期評価等 (第2次とりまとめ)
- 43) 経済産業省製造産業局生物化学産業課 (2005) 環境省水・大気環境局総務課環境管理技術室, 微生物によるバイオレメディエーション利用指針の解説.
- 44) Jarvis F. G., Johnson M. J. (1949), A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. Chem. Soc.*, 71 (12), 4124~4126.
- 45) 刈米 孝夫 (1980) 界面活性剤の性質と応用 幸書房, pp 83-85.
- 46) Kengen S. W. M., Breidenbach C. G., Felske A., Stams A. J. M., Schraa G., and Vos W. M. (1999), Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene to cis-1,2-Dichloroethene by a Thermophilic Anaerobic Enrichment Culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(6), 2312~2316.
- 47) Kim E.-S., Lee D.-H., Yum B.-W., Chang H.-W. (2005), The effect of ionic strength and hardness of water on the non-ionic surfactant-enhanced remediation of perchloroethylene contamination. *J. Hazard. Material.*, 119 (1-3), 195-203.
- 48) 北本 大;生物が作り出す自己組織化材料 (2008), バイオサーファクタントの多彩な機能とその応用. 薬学雑誌, 128 (5), 695~706.
- 49) Kitamoto D., Yanagishita H., Shinbo T., Nakane T., Kamisawa C., and Nakahara T. (1993), Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J. Biotechnol.*, 29(1-2), 91-96.
- 50) 木津 良一, 安藤 京子, 早川 和一 (1998) 日本海重油流出事故. 衛生化学 44 (5), 321~333.
- 51) 木原 洸, 原正一, 野中晃二, 山川賢次, 宮崎英樹 (1998) 流出油回収技術の現状と課題. 船舶技術研究所報告 35(6), 315~329.
- 52) 国際石油産業環境保全連盟 (IPIECA) (2009), 報告書. 第5巻.
- 53) Kosaric N. (1993), Biosurfactan:Production, Properties, Application. *Surfactant science series*, 48.
- 54) クロロカーボン衛生協会 (2011) クロロカーボン適正使用ハンドブック (改訂版) 追補 (改訂2版)
- 55) Lee P. K. H., Cheng D., Hu P., West K. A., Dick G. J., Brodie E. L., Andersen G. L.,

- Zinder S. H., He J., and Alvarez-Cohen L. (2011), Comparative genomics of two newly isolated *Dehalococcoides* strains and an enrichment using a genus microarray. ISME J., 5(6), 1014~1024.
- 56) Lin, S. C., Minton, M. A., Sharma M. M., and Georgiou, G. (1994) Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. Appl. Environ. Microbiol. 60(1), 31~38.
- 57) 前川統一郎 (200) Lin, S. C., Minton, M. A., Sharma M. M., and Georgiou, G. (1994) Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. Appl. Environ. Microbiol. 60(1), 31-38.
- 58) 4) 原位置浄化の進め方 土壌・地下水汚染: 原位置浄化技術の開発と実用化 第 2 章 13-27 シーエムシー出版 東京.
- 59) Marco-Urrea E., Gabarrell X., Sarrà M., Caminal G., Vicent T., and Reddy C.A. (2006), Novel aerobic perchloroethylene degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Environ. Sci. Technol., 40, 7796~7802.
- 60) Maymó-Gatell X., Chien Y. T., Gossett J. M., and Zinder S. H. (1997), Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. Science, 276, 1568~1571.
- 61) Mulligan C. N., Yong R. N., and Gibbs B. F. (2001), Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. Engineer. Geology, 60 (1~4), 371~380.
- 62) Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F., James S., and Bennett H. P. J.(1999), Metal Removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactants Surfactin. Environ. Sci. Technol., 33 (21), 3812~3820.
- 63) Mulligan C. N. (2005) Environmental applications for biosurfactants. Environ. Pollution, 133(2), 183~198.
- 64) Müller, J. A., Rosner B. M., Abendroth G., Meshulam-Simon G. M., McCarty P. L., and Spormann A. M. (2004) Molecular Identification of the Catabolic Vinyl Chloride Reductase from *Dehalococcoides* sp. Strain VS and Its Environmental Distribution. Appl. Environ. Microbiol. 70 (8), 4880~4888.
- 65) 新潟県ホームページ 地下水継続監視調査におけるテトラクロロエチレン等の環境基準超過について 第 2 報より
- 66) Ogata, M., Takatsuka, Y. and Tomokuni, K. (1971) Excretion of organic chlorine compounds in the urine of persons exposed to vapours of trichloroethylene and tetrachloroethylene. Br. J. Ind. Med., 28, 386~391.
- 67) Osborn S. G., Vengosh A, Warner, N. R. and Jackson R. B. (2011) Methane contamination of drinking water accompanying gas-well drilling and hydraulic fracturing. Nation. Acad Scienc., 108 (20), 8172~8176.

- 68) Pegg, D.G., Zempel, J.A., Braun, W.H. and Watanabe, P.G. (1979) Disposition of (14C) tetrachloroethylene following oral and inhalation exposure in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 51, 465~474.
- 69) Printed in Environment.(2001), *Microbiol.*, 3, 229~236.
- 70) Richards T. (1990). Marking times. *Brit. med. J.* 301, 744~746.
- 71) Richter, J.E., Peterson, S.F. and Kleiner, C.F. (1983), Acute and Chronic Toxicity of Some Chlorinated Benzenes, Chlorinated Ethanes, and Tetrachloroethylene to *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 679~684.
- 72) Roderer, G. (1990), *Testung Wassergefahrdender Stoffe als Grundlage fur Wasserqualitätsstandards. Testbericht: Wassergefahrdende Stoffe*, Fraunhofer-Institut fur Umweltchemie und Okotoxikologie, Schmallenberg (U.S. EPA, 2002 より).
- 73) Rombke, J., Bauer, C. and Hilt, J. (1991) Study of the acute toxicity for the earthworm of tetrachloroethene. According to the OECD Guideline for testing of chemicals No. 207. *Battelle 61 Institute* (ECB, 2001 より).
- 74) Ron E. Z. and Rosenberg E. (1972), Glucosyl- and Acetyltransferases Involved in the biosynthesis of glycolipids from *Candida bogoriensis*. *J. Biol. Chem.*, 247(5), 1375-1386.
- 75) Ryoo D., Shim H., Canada K., Barbieri P., and Wood T. K. (2000), Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nature Biotech.*, 18, 775~778.
- 76) Schumann, A.M., Quast, J.F. and Watanabe, P.G. (1980) The pharmacokinetics and macromolecular interactions of perchloroethylene in mice and rats as related to oncogenicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 55, 207~219.
- 77) Seagren, E. and Becker, J. (2002). Review of Natural Attenuation of BTEX and MTBE in Groundwater. *Pract. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manage*, 6(3), 156~172.
- 78) Severinghaus J. W. (2002). Priestley, the furious free thinker of the enlightenment, and Scheele, the taciturn apothecary of Uppsala. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 46, 2~9
- 79) Smith, A.D., A. Bharath, A., Mallard, C., Orr, D., Smith, K., Sutton, J. A., Vukmanich, J., McCarty, L.S. 62 and Ozburn, G.W. (1991) The Acute and Chronic Toxicity of Ten Chlorinated Organic Compounds to the American Flagfish (*Jordanella floridae*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 20, 94~102
- 80) Shubat, P.J., Poirier, S.H., Knuth, M.L. and Brooke L.T. (1982), Acute Toxicity of Tetrachloroethylene and Tetrachloroethylene with Dimethylformamide to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 28, 7~10

- 81) Thomas J. M. (1991). The Royal Institution & Michael Faraday: A Personal View. Bull. Hist. Chem. II, 4~8.
- 82) Tsukagoshi N., Ezaki S., Uenaka T., Suzuki N., and Kurane R. (2006), Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69, 543~553.
- 83) 徳島市ホームページ 特定有害物質等による土壌汚染の発見に係る届出について（平成25年4月22日付け届出分）より
- 84) 徳田 廣(1991) 海洋における流出石油の自然浄化と生物への影響 日本海水学会誌 45 (5), 276~282.
- 85) Toraason M., Clark J., Dankovic D., Mathias P., Skaggs S., Walker C. (1999), Dwight Werren Oxidative stress and DNA damage in Fischer rats following acute exposure to trichloroethylene or perchloroethylene. Toxicol., 138 (1), 43~53.
- 86) 通商産業省 (1976) 通商産業公報 (1976 年 5 月 28 日), 製品評価技術基盤機構化学物質管理情報.
- 87) Uysal A., Türkman A. (2005), Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor. Proces. Biochem., 40, 2745~2749.
- 88) Vonk, J.W., Adema, D.M.M. and Barug, D. (1986) Comparison of the effects of several chemicals on microorganisms, higher plants and earthworms. Contaminated soil, 1st international conference. Dordrecht, Netherlands (ECB, 2001 より).
- 89) 矢木 修, 内山 裕夫(1989) 揮発性塩素化脂肪族炭化水素の微生物分解, 微生物, 5, 535~545.
- 90) Yoshida M., Lee B-D. and Hosomi M.(2000), Decomposition of aqueous tetrachloroethylene by Fenton oxidation treatment. Water Scienc. Technol., 42 (1-2), 203~208.
- 91) 財団法人化学物質評価研究機構 (CERI) (2008), 安全性評価技術研究所: 有害性評価ベンゼン.
- 92) Zhang Y., and Miller R. M. (1995) Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. Appl. Environ. Microbiol., 61(6), 2247~2251.
- 93) Zhang. Y., and Miller, R. M. (1992), Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl. Environ. Microbiol, 58 (10), 3276-3282.

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり，終始変わらぬ懇切丁寧なご指導を賜りました岐阜大学応用生物科学部 高見澤 一裕教授，中村 浩平准教授，岐阜大学大学院連合農学研究科 鈴木 徹教授，静岡大学農学部 小川直人教授に心から厚く御礼申し上げます。

また，色々と研究等を手伝っていただいた環境微生物工学研究室の卒業生の奥村健一さん，同じく卒業生の齋藤友里栄さん，矢田ひかるさん，吉岡優さん，その他研究室の皆様により感謝を申し上げます。

最後に，これまでの研究活動を大いに支えていただいたイビデン（株）とその皆様に心から厚く御礼申し上げます。