

氏 名 (本国籍)	大野 勝也 (岐阜県)		
学 位 の 種 類	博士 (農学)		
学 位 記 番 号	農博甲第 6 4 3 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 7 年 3 月 1 3 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当		
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻		
研究指導を受けた大学	岐阜大学		
学 位 論 文 題 目	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		
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授	中 村 浩 平	
	副査 岐阜大学 教授	高見澤 一 裕	
	副査 静岡大学 教授	小 川 直 人	

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

テトラクロロエチレン (以下 PCE) はドライクリーニング跡地や工場跡地において多くの汚染が見つかっている。しかしながら PCE は塩素化エチレンの中でも特に難分解性物質であるため、自然環境下ではほとんど分解されない。これまでの報告では完全に脱塩素化できるのは嫌気性細菌の *Dehalococcoides mccartyi* 195 株のみである。一方、好気条件での分解報告は *Pseudomonas stutzeri* OX1 および *Trametes versicolor* の 2 種のみである。また、PCE は水への溶解性が 200 mg/l(25°C)であり、PCE のように極めて水への溶解性が低い物質は微生物による反応は受けにくい。これらの疎水性の強い物質を微生物が利用するためには、水への溶解性を高めるバイオサーファクタントのような物質を微生物自身が産生していると考えられる。本研究では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用いて好気条件下における PCE 分解機構の解明と PCE のような水への溶解性が極めて低い物質に対する乳化作用を示す活性汚泥中のバイオサーファクタントの特性の解析を目的とした。

まず、活性汚泥を PCE にて長期間高濃度で馴養した。PCE は揮発性であるため、密閉式の 100 ml 容バイアル瓶を用いて馴養後の活性汚泥 20 ml を入れて 120rpm で 24 時間振盪したところ、コントロールの滅菌汚泥と比較して 0.31 mg の PCE 減少が認められた。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) による細菌叢解析では、馴養前後で細菌叢に違いが認められ、GS-FLX によるパイロシーケンス法を用いた解析をすると、馴養前では *Rhodocyclaceae* が 43%、*Azoarcus* 属が 38%、*Thauera* 属が 8% などであったが、馴養後では *Alcaligenes* 属が 70% を占める結果となった。PCE 減少の確認

は汚泥を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過した濾液を用いて反応させ、液中 PCE の残存量をガスクロマトグラフ質量分析計にて測定した。その結果、好気条件下において 24 時間で PCE が 0.61 mg 減少した。このことは、微生物が直接 PCE を取り込むのではなく、メンブレン濾液中に含まれている微生物が産生した物質によって PCE 減少が生じている可能性が示唆された。メンブレン濾液を限外濾過すると分子量 3000 以下の画分にも PCE 減少効果が認められた。濾液中のタンパク質を BCA 法や Qubit によって測定すると、タンパク質として定量でき、PCE 減少と相関が認められた。したがって、PCE 減少に関与する物質は低分子のペプチドのような物質ではないかと考えられた。そこで、メタノール抽出および C18 ODS カラムによって精製した後、HPLC にて C18 カラムで水・メタノールによるグラジエント法を用いて、UV 280 nm で 35 分付近に検出されたピーク部分のみを分取することで精製を行い、続いてマトリックス支援マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-TOF/MS) によって、PCE 減少に関与する微生物生成物の分子量を解析した結果、 $m/z$  998 に極大ピークが確認された。この 998 の物質について MS<sup>2</sup> 解析を行ない、さらに *denovo* シーケンス解析によって、その生成物の組成解析を行なった。その結果、アラニンとグリシンを主体としたペプチドである可能性が示唆された。PCE 減少のメカニズムに関しては、シンクロトロン光を用いた XAFS 解析により C-Cl 結合が反応後に保持されているかを Cl 元素の波形にて確認したところ、C-Cl 結合の波形ではなく、塩化物イオンの波形に類似していた。したがって、C-Cl 結合が切断され、Cl がイオン化していることが示唆された。

次に活性汚泥を氷上にてメンブレンフィルター濾過を行い、バイオサーファクタント様物質を濾液中に抽出した。PCE やその他塩素化エチレンの液相中および気相中の存在量を GC/MS および GC-FID にて測定した結果、コントロール (水) に比べて濾液では PCE の液相中に存在する量が 2.5 倍増加した。その他、トリクロロエチレンや *cis*-1,2-ジクロロエチレンでも乳化作用は認められたが、トリクロロエチレンや *cis*-1,2-ジクロロエチレンよりもオクタノール/水分係数が高い PCE の乳化作用の方が強い傾向にあった。このことから、水に溶けにくい物質ほど乳化作用が高いことが分かった。ゼータサイザーによる粒度分布を調べると、温度が高くなるにつれて平均粒子径が大きくなり、10°Cでは 20 nm、20°Cでは 100 nm、30°Cでは 900 nm であった。20°Cを越えると白濁してくることから非イオン性の界面活性剤の特徴であるクラフト点に達したことが示唆された。また、PCE 添加前の 64、248 nm から添加後では 389、4.053 nm に増大し、ミセル化して PCE を取り込み粒径が増大したと考えられた。さらに、濾液の原油の油膜排除面積を調べた結果、Tween 20 の油膜排除面積比の 0.21 やサーファクタンナトリウムの 0.15 と比較すると、バイオサーファクタント様成分では 0.22 となり最も高い結果となった。このバイオサーファクタント様物質についてはメタノール抽出後、吸光度 220 nm や 280 nm で極大吸収があったことからバイオサーファクタント様物質はタンパク質様物質である可能性が示唆された。

本研究では、PCE で馴養した活性汚泥由来の微生物が産生する PCE 分解効果のある

低分子のペプチドによる PCE 分解メカニズム解明と PCE や油などの疎水性物質の乳化や油膜排除効果のあるバイオサーファクタントの特徴を明らかにすることができた。

## 審査結果の要旨

本論文は、新規のテトラクロロエチレン (PCE) を乳化するバイオサーファクタントに関する研究である。

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 PCE にて長期間高濃度で馴養した。PCE は揮発性であるため、密閉式の 100 ml 容バイアル瓶を用いて馴養後の活性汚泥 20 ml を入れて 120rpm で 24 時間振盪したところ、コントロールの滅菌汚泥と比較して 0.31 mg の PCE 減少が認められた。PCE 減少の確認は汚泥を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブレン濾紙で濾過した濾液を用いて反応させ、液中 PCE の残存量をガスクロマトグラフ質量分析計にて測定した。その結果、好気条件下において 24 時間で PCE が 0.61 mg 減少した。これは、微生物が直接 PCE を取り込むのではなく、メンブレン濾液中に含まれている微生物が産生した物質によって PCE 減少が生じている可能性が示唆された。メンブレン濾液を限外濾過すると分子量 3000 以下の画分にも PCE 減少効果が認められた。濾液中のタンパク質を BCA 法や Qubit によって測定すると、タンパク質として定量でき、PCE 減少と相関が認められた。したがって、PCE 減少に関与する物質は低分子のペプチドのような物質であることが示唆された。そこで、メタノール抽出および C18 ODS カラムによって精製した後、HPLC にて C18 カラムで水・メタノールによるグラジエント法を用いて、UV 280 nm で 35 分付近に検出されたピーク部分のみを分取することで精製を行い、続いてマトリックス支援マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-TOF/MS) によって、PCE 減少に関与する微生物生成物の分子量を解析した結果、 $m/z$  998 に極大ピークが確認された。この 998 の物質について MS<sup>2</sup> 解析を行ない、さらに *denovo* シーケンス解析によって、その生成物の組成解析を行なった。その結果、アラニンとグリシンを主体としたペプチドである可能性が示唆された。PCE 減少のメカニズムに関しては、シンクロトロン光を用いた XAFS 解析により C-Cl 結合が反応後に保持されているかを Cl 元素の波形にて確認したところ、C-Cl 結合の波形ではなく、塩化物イオンの波形に類似していた。したがって、C-Cl 結合が切断され、Cl がイオン化していることが示唆された。

次に活性汚泥を氷上にてメンブレン濾過を行い、バイオサーファクタント様物質を濾液中に抽出した。PCE やその他塩素化エチレンの液相中および気相中の存在量を GC/MS および GC-FID にて測定した結果、コントロール (水) に比べて濾液では PCE の液相中に存在する量が 2.5 倍増加した。その他、トリクロロエチレンや *cis*-1,2-ジクロロエチレンでも乳化作用は認められたが、トリクロロエチレンや *cis*-1,2-ジクロロエチレンよりもオクタノール/水分配係数が高い PCE の乳化作用の方が強い傾向にあった。このことから、水に溶けにくい物質ほど乳化作用が高いことが分かった。ゼータサイザーによる粒度分布を調べると、温度が高くなるにつれて平均粒子径が大きくなり、

10℃では 20 nm、20℃では 100 nm、30℃では 900 nm であった。20℃を越えると白濁してくることから非イオン性の界面活性剤の特徴であるクラフト点に達したことが示唆された。また、PCE 添加前の 64、248 nm から添加後では 389、4.053 nm に増大し、ミセル化して PCE を取り込み粒径が増大したと考えられた。さらに、濾液の原油の油膜排除面積を調べた結果、Tween 20 の油膜排除面積比の 0.21 やサーファクチンナトリウムの 0.15 と比較すると、バイオサーファクタント様成分では 0.22 となり最も高い結果となった。このバイオサーファクタント様物質についてはメタノール抽出後、吸光度 220 nm や 280 nm で極大吸収があったことからバイオサーファクタント様物質はタンパク質様物質である可能性が示唆された。

本研究では、PCE で馴養した活性汚泥由来の微生物が産生するバイオサーファクタントの特徴を明らかにした。

以上について、慎重に審議し、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値があるものとして認めた。

なお、学位論文の基礎となる学術論文は以下のとおりである。

1. 大野勝也、中村浩平、高見澤一裕：活性汚泥由来微生物の生成物によるテトラクロロエチレンの分解、環境技術、43、37-45、2014
2. 大野勝也、奥村健一、矢田ひかる、中村浩平、高見澤一裕：活性汚泥中のバイオサーファクタントの特徴、環境技術、印刷中