

《様式B》

研究テーマ 「メタゲノム解析による汚染土壌地下水のバイオレメディエーションの効果と安全性の評価」

研究責任者 所属機関名 名古屋大学未来材料・システム研究所

官職又は役職 教授

氏名 片山 新太 メールアドレス katayama.arata@nagoya-u.jp

共同研究者 所属機関名 名古屋工業大学

官職又は役職 准教授

氏名 吉田 奈央子

所属機関名 DOWA エコシステム（株）ジオテック事業部

官職又は役職 部長

氏名 鎌田 雅美

所属機関名 名古屋市環境科学調査センター

官職又は役職 主任研究員

氏名 朝日 教智

所属機関名 名古屋大学

官職又は役職 助教

氏名 栗田 貴宜

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要（1, 000字程度）

塩素系有機溶剤による土壌地下水汚染では、時間はかかっても原位置浄化が可能で安価且つ省エネルギーな嫌気微生物を用いた浄化技術（バイオレメディエーション）が、使われる事例が増えてきた。しかし、バイオレメディエーション実施時において養分注入による活性化あるいは *Dehalococcoides* 属細菌等の脱塩素微生物の導入の際に、病原性微生物の増殖や地球化学的物質循環に関わる微生物に対する副次的影響が懸念されている。そこで、本研究では（1）塩素系有機溶剤による実汚染サイトで、養分（バイオエンゼル®、DOWA エコシステム）注入によるバイオスティミュレーション試験を行い、微生物群の構造と活性をメタゲノム解析により明らかにし、また（2）汚染地下水帯を模擬した砂カラムを用いて、脱塩素微生物を導入し、養分注入条件とコントロール条件との比較から、バイオオーグメンテーション効果を評価した。

バイオスティミュレーション試験では、養分注入1回目（冬期）では微生物による脱塩素反応は余りみられなかったが、養分注入2回目（春期）では脱塩素反応が明瞭みられた。メタゲノム解析の結果から、養分注入によって微生物群集の多様性が減少するが、その後は徐々に元の微生物群集構造に戻るが、それには一年以上かかることが示唆された。また定量PCR解析によって、脱塩素活性と菌数変化の傾向から、*Dehalococcoides* 属細菌が主要な脱塩素菌と推定された。

地下水帯を模擬した砂カラム実験では、初期には、*Dehalococcoides* 属細菌と *Geobacter* 属細菌を導入したカラム（バイオオーグメンテーションを模擬）での脱塩素活性が高かったが、長期的には養分だけを注入したカラム（バイオスティミュレーションを模擬）と脱塩素活性に差は無くなった。バイオオーグメンテーションは、浄化初期から5ヶ月程度まではバイオスティミュレーションよりも浄化速度が高まるが、長期的（6ヶ月以上）には浄化速度に差が無くなることが示唆された。

以上の結果は、養分注入によるバイオスティミュレーションでは養分注入して微生物が増殖している際には多様性が低下し偏った群集構造になるが、長期的には元の群集構造に戻っていくことから、特異的微生物の選択的増殖は微生物全体が増殖している時期に発生しなければ可能性が低いこと、バイオオーグメンテーションは5ヶ月くらいまでは効果が高いが、その後はバイオスティミュレーションと変わらなくなることが示唆された。以上、バイオレメディエーション浄化技術に対して、重要な基礎的知見を得ることができた。今後、学会・論文等で発表していく計画である。

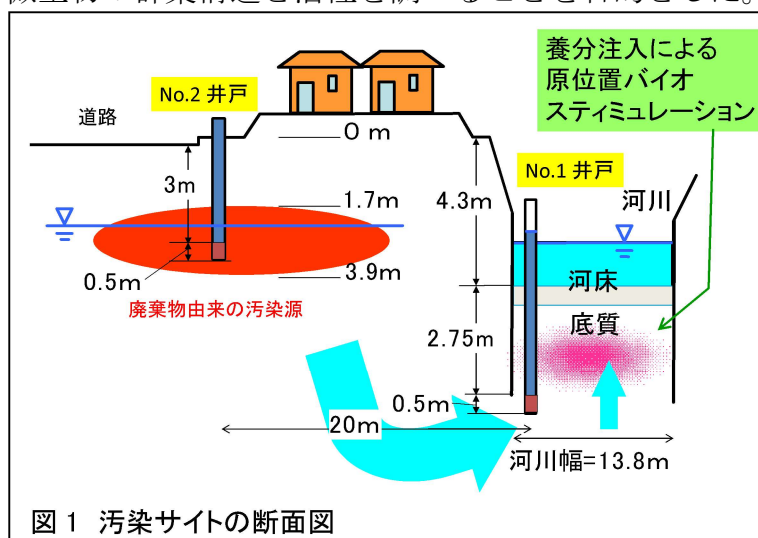
2. 実施内容および成果の説明（A4で、5ページ以内）

1,2-ジクロロエタン、cis-1,2-ジクロロエチレン、1,1,2-トリクロロエタンを主とする有機塩素溶剤で汚染した地下水を対象に、養分（バイオエンゼル®、DOWA エコシステム）注入によるバイオスティミュレーション試験を行って、その効果を評価するとともに、微生物群の構造と活性を調べた。また、同サイトに地下水帯を模擬した砂カラムを設置し、脱塩素微生物 *Geobacter* AY 株（名古屋大学、名古屋市所有）と *Dehalococcoides* YN 集積物（名古屋工業大学所有）を導入（バイオオーグメンテーション）し、その効果を調べた。

(1) 実汚染サイトによるバイオスティミュレーション試験

a. 目的

実汚染サイトで、養分（バイオエンゼル®、DOWA エコシステム）注入を行って浄化促進するバイオスティミュレーション試験を行い、その効果を代謝産物により評価するとともに、地下水帯微生物の群集構造と活性を調べることを目的とした。



b. 試料と方法

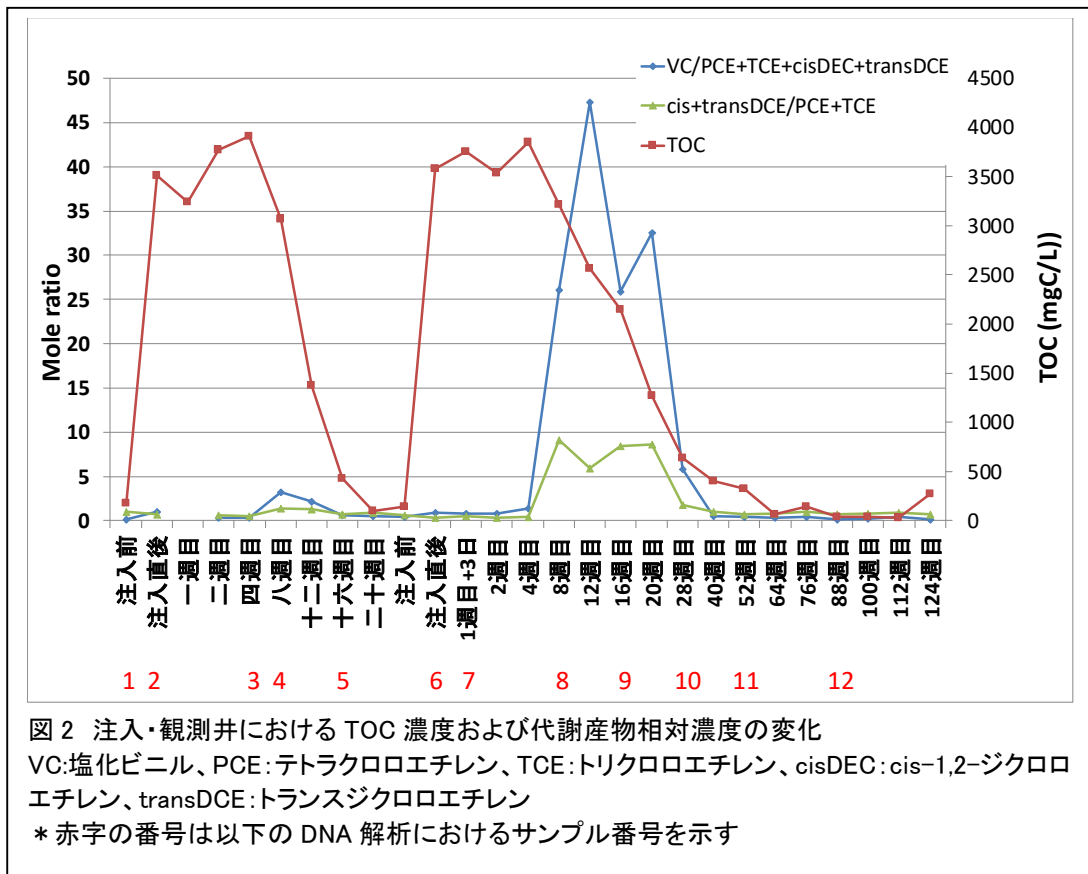
右の断面図に示した汚染サイトで、河川の左岸に養分注入兼観測井を一つ設け、そこで養分注入と試料採取を行った。注入は、地下水試料は、滅菌ペーラーを用いて、2L以上採取し、一部を有機塩素系溶媒の分析（ヘッドスペース GC-MS 法）、水質分析（全有機炭素（TOC）、イオン分析）に供するとともに、2Lを遠心濃縮して冷凍保存し、16S-rRNA 遺伝子を標的としたメタゲノム解析および定量 PCR 解析に用いた。

c. 結果と考察

(i) 有機塩素溶媒の脱塩素反応

養分注入と試料採取を一つの井戸で行ったため、注入液により汚染地下水が押し出られるため単純に有機塩素系溶剤の濃度変化を調べることは出来ない。トレーサーとして、臭化ナトリウムを注入して観察したところ、臭化物イオン濃度の変化がほぼ TOC の濃度変化と対応していたことから、バイオエンゼル®濃度が減少し始めるところから以降は、汚染地下水が注入・観測井から採取出来たものと考えられる。地下水の流れとともに元の有機塩素系溶媒の濃度も変化することから絶対濃度での増減からは、

脱塩素反応を評価しにくいことから、低塩素有機溶剤を代謝産物と想定して、低塩素有機溶媒の高塩素有機溶媒に対する相対的モル比によって脱塩素反応の有無を評価した(図2)。



1回目(冬季)の注入では、代謝産物相対濃度の増加がほとんど見られなかったが、2回目(春季)の注入では、代謝産物相対濃度が大きく増加し、脱塩素反応が進んでいることが示唆された。これより、バイオエンゼル®のスティミュレーション効果が確認された。また、繰り返しの注入によって効果が大きくなることも示唆された。

(ii) 微生物群集構造変化

図3に偏性脱塩素微生物として知られる *Dehalococcoides* 属細菌(図中 DHC) および *Dehalobacter* 属細菌(図中 DHB)、また汚染サイトから単離された1, 2-ジクロロエタンに対して脱塩素能を持つ *Geobacter* 属細菌(図中 Geo) に特異的にみられる 16S-rRNA 遺伝子配列を利用した定量 PCR 反応を行い、全細菌数(図中 Eubac)とともに、微生物数の変化を示す。その結果、1回目の養分注入では、全細菌数(Eubac)は養分注入直

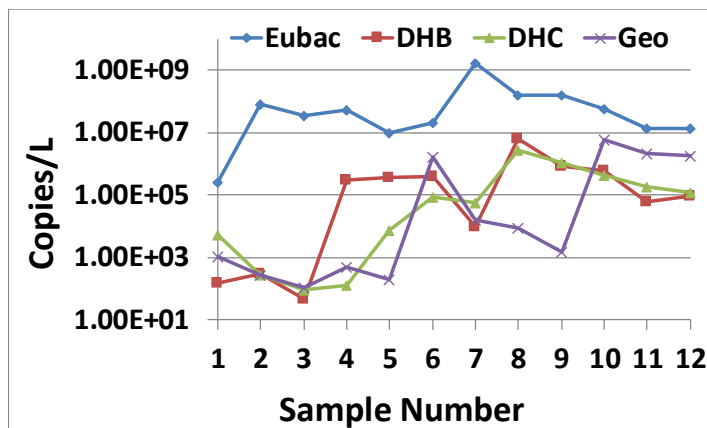


図3 各種細菌の 16S-rRNA 遺伝子のコピー数の変化
 * 横軸のサンプル番号は、図2の赤字のサンプル番号に対応する。各微生物を示すシンボルの意味は本文中に記す。

後から増加して高い菌数が保たれたのに対し、脱塩素細菌の増加は8週以降（サンプル番号4以降）にのみ見られた。2回目の養分注入後の増加が著しかった *Dehalococcoides* 属細菌（DHC）が脱塩素に関与しているものと推察された。

16S-rRNA 遺伝子のメタゲノム解析を行った結果を図4に示す。地下水中の微生物群集構造は、養分注入1回目では主たる微生物が *Proteobacteria* 門から *Firmicutes* 門へと変化するにとどまったが、養分注入2回目では優占微生物が *Bacteroidetes* 門へと変化した（サンプル番号7~9）。即ち、優占微生物が嫌気性細菌群へと変化したことをしめしており、2回目の養分注入によって地下水環境が嫌気性となって脱塩素反応が進んだことを示唆している。

試験期間中の微生物群の分類学的多様性をシャノン指数と Chao 指数の二つの多様性指数で評価した（図4）。二つの多様性指数とも同様の傾向を示した。まず養分注入によって、分類学的多様性指数は大きく減少した

が、その後徐々に増加し、2回目の養分注入によって再度減少した後、徐々に増加した。養分注入後に群集構造が徐々に多様化していく様子を詳細に解析すると、徐々に元々の地下水帯の微生物群集構造に近づいていることが明らかとなった。また、その期間は80週を超える長期間かかることも明らかとなった。即ち、養分注入による地下水帯の微生物生態系の攪乱は、元に戻るまでに1年以上かかると考えられる。これは、地下水帯の微生物生態系を理解するために重要な知見を与えるものである。

(2) 地下水帯を模擬した砂カラムによるバイオオーグメンテーション試験

a. 目的

上記と同じ汚染サイトに、地下水帯を模擬した砂カラムを設置し、脱塩素微生物 *Geobacter* AY 株（名古屋大学、名古屋市所有、1,2-ジクロロエタンをエチレンに脱塩素する能力を有す）と *Dehalococcoides* YN 集積物（名古屋工業大学所有、塩素化エチレンをエチレンまで脱塩素する能力を有す）を導入（バイオオーグメンテーション）し、

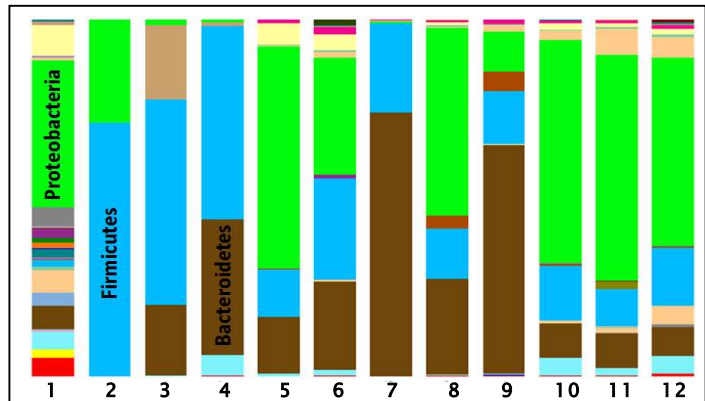


図4 16S-rRNA 遺伝子のメタゲノム解析による地下水帯の群集構造の門レベルでの変化。横軸の番号は、図2の赤字サンプル番号に対応する。

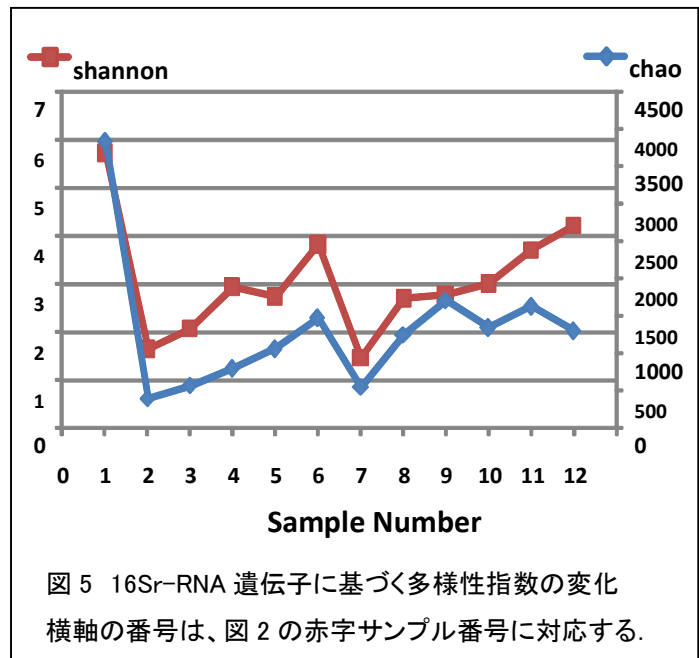


図5 16Sr-RNA 遺伝子に基づく多様性指数の変化。横軸の番号は、図2の赤字サンプル番号に対応する。

その脱塩素の浄化効果を調べた。

b. 試料と方法

約 12L の砂カラム(図 6)を現場に 3 セット用意し、何も添加しないもの(コントロール)、養分(バイオエンゼル®、DOWA エコシステム)のみを継続導入したもの(バイオスティミュレーション)、養分と脱塩素微生物(*Geobacter* AY 株と *Dehalococcoides* YN 集積物)を初期導入して養分を継続導入したもの(バイオオーグメンテーション)を用意し、カラム出口の有機塩素溶媒の濃度変化から、バイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーションの効果を評価した。有機塩素溶媒の濃度はヘッドスペース GC-MS 法、バイオエンゼル®の濃度は TOC 法で確認した。カラムは水ジャケットをつけて保温した(20°C~18°C、一時 16°C)。温度変化は熱電対でモニタリングした。地下水通水量は約 0.14mL/min に設定し、実通水量および間隙体積に基づく滞留時間(約 3 週間)を考慮して浄化効果を評価した。

c. 結果と考察

カラムからの流出水量に基づいて求めた 1,2-ジクロロエタン(DCA)と cis-1,2-ジクロロエチレン(cDCE)の脱塩素反応速度を図 7 に示す。30,000mL(約 150 日)の流出水量までは、DCA の脱塩素反応速度は、バイオオーグメンテーション(図中 Aug)とバイオスティミュレーション(図中 Sti)で、ほぼ同一であったが、cDCE の脱塩素反応速度はオーグメンテーションの方が高かった。脱塩素微生物注入の効果と考えられる。この間、温度は 20°C~18°C に保たれていた。出口 TOC 濃度はコントロールに比べて

100mg-C/L 高く保たれていたが、流出量 35,000mL 頃(170 日後頃)から 50,000mL 頃(250 日後頃)まで、バイオオーグメンテーションカラムとバイオスティミュレーションカラムの流出 TOC 濃度は殆どコントロールと変わらなくなった。微生物の増殖に

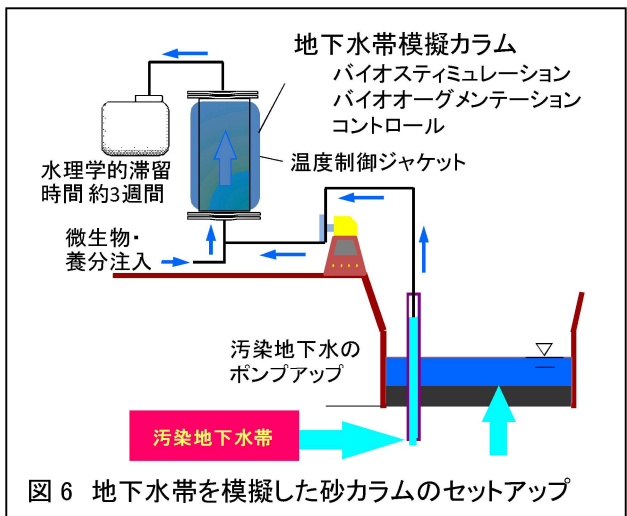


図 6 地下水帯を模擬した砂カラムのセットアップ

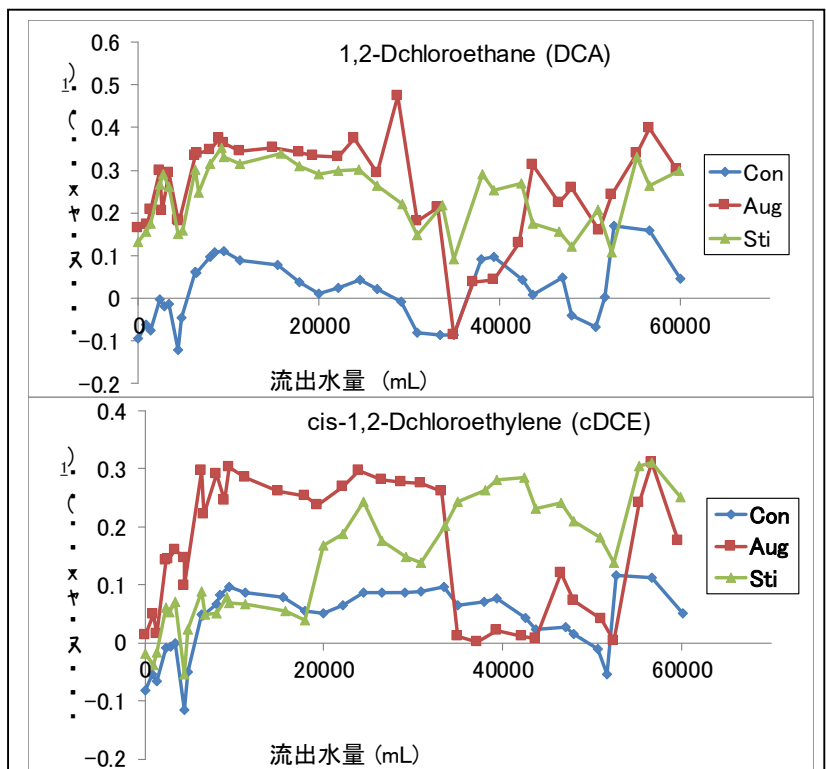


図 7 1,2-ジクロロエタン(DCA)と cis-1,2-ジクロロエチレン(cDCE)の一次反応速度定数とカラム流出水量. Con: コントロール、Aug: バイオオーグメンテーション、Sti: バイオスティミュレーション

よってバイオエンゼル®の添加量が不足したものと推測される。ここで、設定温度を16°Cとした。この期間はバイオオーグメンテーションよりもバイオスティミュレーションの方が、脱塩素反応速度が高くなった（cDCE でより顕著であった）。流出量50,000mL（約250日後）より栄養供給頻度を高めたところ反応速度は高まったが、バイオオーグメンテーションとバイオスティミュレーションの間で差は殆どみられなかった。長期的には、バイオオーグメンテーション効果が失われることが示唆された。

トランス-1,2-ジク

ロロエチレンの様に、養分注入効果がみられない有機塩素化合物もあった（図8）が、全体的には嫌氣的脱塩素反応が促進される化合物が多く、養分注入によって脱塩素反応速度が増加し、バイオスティミュレーションの有用性が示唆された。

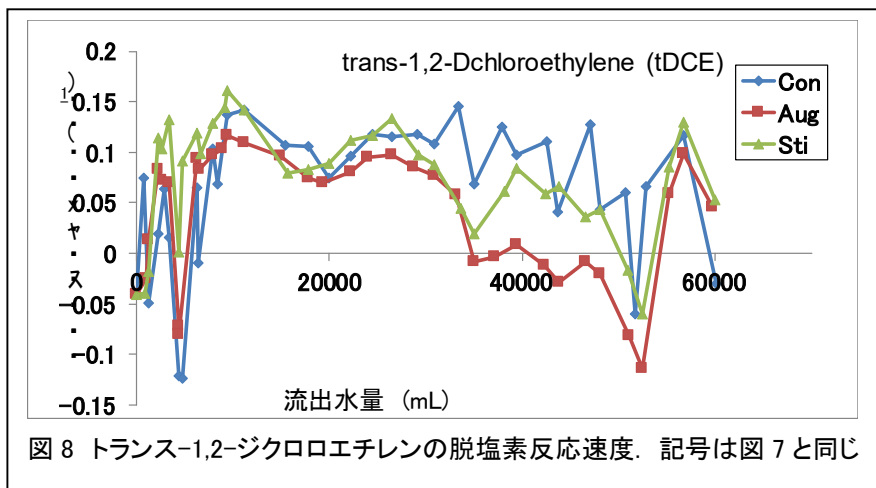


図8 トランス-1,2-ジクロロエチレンの脱塩素反応速度. 記号は図7と同じ

(3) まとめ

本研究では、実汚染サイトでの養分注入によるバイオスティミュレーション試験における微生物群集構造を解析し、短期的には微生物群集の多様性は低下して偏った群集構造になるが、長期的には元の群集構造に戻っていくことを明らかにした。このことは、特異的微生物の選択的増殖の可能性は一時的なもので、長期的には微生物群集構造は安定していることを示唆するものである。従って、病原性微生物などの増殖は、この養分注入して微生物が増殖している期間を調べれば良いと考えられる。また、地下水帯を模擬した砂カラムを用いた嫌気分解微生物を注入するバイオオーグメンテーション試験では、実験開始150日後くらいまでは効果が高いが、その後はバイオスティミュレーションと変わらなくなることが明らかとなった。従って、微生物を注入するバイオオーグメンテーションでは、150日の浄化効果が有意義な場合や、オーグメンテーションによって分解できなかったものが分解されるようになる等の大きな効果が認められないと経済的理由から採用されにくいことが予想された。実サイトにおける微生物浄化技術の適用に役立つ基礎的知見が得られた。

以上