土壌微生物による1,1,1-トリクロロエタンの 分解に関する研究

金 鍾国, 鈴木 規之
東京大学工学部都市工学科
(〒113 東京都文京区本郷7-3-1)

中西 準子
東京大学環境安全研究センター
(〒113 東京都文京区本郷7-3-1)

[平成 6 年10月24日受理]

Biodegradation of 1,1,1-Trichloroethane in Soils

Jong Guk KIM, Noriyuki SUZUKI
Department of Urban Engineering, University of Tokyo
(7-3-1, Bunkyo-ku, Hongo, Tokyo 113)

Junko NAKANISHI
Environmental Science Center, University of Tokyo
(7-3-1, Bunkyo-ku, Hongo, Tokyo 113)

[Received October 24, 1994]

Summary

Biodegradation of 1,1,1-trichloroethane (TCA) which is a common contaminant found in groundwater was investigated in soils to predict the behavior and fate of TCA in the environment. TCA was biotransformed in the soil to dichloroethane (DCA) and chloroethane (CA). The biodegradation rate of TCA was related to the organic carbon content in soils. About 16~91% of the initial TCA was transformed to DCA and CA during the experimental period. The measured biodegradation rate constants of TCA were in the range of 0.04d^{-1} to 0.099d^{-1} .

Key words: 1,1,1-trichloroethane, biodegradation, soil, organic carbon, 1,1-dichloroethane

1. はじめに

地下水に侵入した1,1,1-トリクロロエタン (TCA) が地層内で分解反応を受けることが知られている^{1,2)}。TCAの嫌気性微生物による分解経路などはすでに明らかになっているが、馴致などの施されていない一般土壌での分解特性やその支配因子に関する報告は少ない。しかし、地層中にこれらの物質が侵入した場合の環境影響を予測するためには、一般土壌での分解特性データが必

須である。その分解は土壌の嫌気・好気の状態、微生物の種類、栄養塩の状況など種々の条件によって大きく左右されると考えられる^{3,4)}。実際には一般土壌中にTCAなどが侵入した場合、非常に長い時間をかけての馴致が行われると考えられ、この状況を実験室で再現することは困難である。そこで、本研究では地層侵入初期においてこれらの物質が受けるであろう吸着・分解の程度を予測するために土壌に対して馴致等の予備操作なしにTCAを添加し、これがどのように変化するかを調べた。

このような目的で調査を行った例として、Parsonら⁵⁾は、帯水層土壤中の微生物によってTCAが1,1-ジクロロエタン(DCA)に分解されることを示し、また、矢木ら³⁾は蓮田土壌でのTCAの分解などを報告しているが、土壌へのTCAの吸着量、分解量及び生成量の化学量的関係などについてはいずれでも検討されていない。

Vogelら⁶⁾は嫌気性条件下で培養した微生物によりTCAからDCAとクロロエタン(CA)が生成することを示した。小松ら⁷⁾は下水処理場の消化汚泥によりTCAがDCAとCAに分解されることを報告した。また、土壌微生物によるTCA以外の有機塩素化合物の分解については、矢口ら⁸⁾がテトラクロロエチレン(PCE)で汚染されたクリーニング店の排水溝底泥を最少培地で培養した結果、PCEが分解されトリクロロエチレン(TCE)とcis-1,2-ジクロロエチレン(cis-1,2-DCE)が生成されたこと、また、森山ら⁹⁾がTCEを使用した工場の敷地内から採取した土壌で分解実験を行った結果、TCE

がcis-1,2-DCEに分解されたことを報告している。しかしながらこれらの報告は一般土壌に比べて分解能力の高い土壌試料や微生物系を選んで検討を行っており、特別な条件を持たない一般土壌での研究例は少ない。

本研究では比較的研究の例が少ない一般土壌試料を用いて土壌による分解特性を調べ、分解速度及び土壌中の有機炭素量と分解速度の関係を検討した。

2. 実験方法

2.1 供試土壌

実験に用いた土壌の特性をTable 1に示す。土壌Aは成田市の水田表層から採取し、土壌B, C, D, Eは東大農学部附属農場の水田と畑から採取した。

2.2 試薬類

TCAはキシダ化学製特級、DCAは東京化成製、CAはAldrich Chemical Co., Inc., メタノールはキシダ化学

Table 1 Characteristics of soils

Soil	Moisture (%)	pH	Organic carbon (% , dry basis)	Source
soil (A)	43.7	6.9	5.0	paddy field
soil (B)	44.4	7.0	9.2	paddy field
soil (C)	37.2	6.2	8.8	field
soil (D)	46.0	7.2	7.1	field
soil (E)	45.7	7.3	3.7	field

Fig. 1 Schematic diagram of the purge&trap GC/MS system

製の残留農薬分析用を、水は蒸留水を用いた。

2. 3 水試料の分析方法

分析装置の概略をFig. 1に示す。水中の濃度はバージ&トラップ(P&T)ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)法で分析を行った。容量30mlの水分析用バージ管に試料を10ml採取し、ヘリウムガス(40ml/min.)で10分間バージする。気化成分をトラップ管(Tenax-TA)に捕捉した後、トラップ管を180℃で5分間加熱し、GC/MSで分析を行った。

2. 4 土壌試料の分析方法

2. 4. 1 加熱気化法の操作方法

土壌試料に吸着したTCA及び分解生成物は、加熱気化P&T法で分析した。Fig. 1中の容量30mlの土壌分析用サンプル管(図中の②)に土壌を採取して密閉し、ヘリウムガス(20ml/min.)を流しながらサンプル管を180℃で5分間加熱し、土壌中の吸着成分を気化させた。気化成分は氷-水で冷却したチューブを通して水分を除去した後、トラップ管(Tenax-TA)に捕捉しP&T法と同様にトラップ管を加熱し、GC/MSで分析を行った。TCA、DCA及びCAはGCの保持時間とマススペクトルから確認を行った。水試料と土壌試料のGC/MSの測定条件をTable 2に示す。

2. 4. 2 回収率の測定

土壌に吸着したTCA、DCA及びCAの回収率を求めるため、Fig. 1の土壌分析用サンプル管に土壌A 2gを採取し、TCA、DCA、CAの標準物質をそれぞれ1, 10, 100ng添加したのち、上記の方法にしたがって加熱気化P&T法で分析し、回収率を求めた。また、土壌B、C、D、EにTCAのみを添加し、同様の操作を行い、これらの土壌におけるTCAの回収率を求めた。

2. 5 土壌への吸着量の測定

TCAと分解生成物DCA、CAの土壌への化学吸着量を求めるため、オートクレープで加熱滅菌した土壌Aの10gに水100mlを加え、TCA、DCA、CAそれぞれ10 μ gを添加したのち、直ちにテフロンシリコン栓及びアルミキャップでシールして、上下を逆向きにして20℃の恒温室で静置した。1~14日後に水中濃度と土壌中濃度を分析した。土壌を入れないコントロールについても同様に操作して実験を行った。また、性質の異なる各土壌での化学吸着量を調べるため、同様に滅菌した土B、C、D、Eの20gと水100mlをバイアル瓶にいれ、TCAのみ15 μ gを添加して、同様に7日後に水と土壌中の濃度を分析した。

2. 6 土壌によるTCAの分解実験

容量120mlのバイアルに土壌試料を20g入れ、TCA155ppbの水溶液を100ml注入すると、ほぼ気相部がなくなるので、直ちにテフロンシリコン栓およびアルミキャップでシールした。バイアル瓶は上下を転倒して20℃暗所に静置し、2, 7, 16, 26, 41, 51, 64日に一本ずつバイアル瓶をとり出し、水相と土壌中の成分をそれぞれ分析した。

培養バイアル瓶に土壌と水溶液を添加した状態で瓶の気相がほとんどなくなったため、バイアル気相部のガス置換は行わなかった。確認のため培養1週間後にバイアル瓶の水中の溶存酸素を測定した結果、ほぼ0に近かったため、実験条件は嫌気状態と考えられる。

3. 結果及び考察

3. 1 土壌からのTCA等の回収率

土壌AにTCA、DCA、CAを添加して加熱気化法で分析して得られた回収率をTable 3に示す。添加量10ng、

Table 2 Analytical conditions for GC/MS

GC	Apparatus	HP 5890 J
	Column	DB-624 (30m×0.54mm)
	Temp. program	10℃, 5 min. +6℃/ min. to 160℃, 3 min.
	Carrier gas	He, 15ml/min.
MS	Apparatus	JEOL JMS-DX302
	Ionization mode	EI
	Ionization voltage	70eV
	Ionization current	300 μ A
	Chamber temp.	200℃
	Separator temp.	180℃

100ng の場合90～107%の良好な回収率が得られている。添加量 1 ng の場合 TCA, DCA の回収率は91,93%で良好であるが, CA の回収率は55%と低い。しかし, 添加量 1 ng は水中濃度として0.01 $\mu\text{g/L}$ に相当し, これは以後の分解実験での添加濃度155ppb に比べて非常に低い濃度なので, 本実験で TCA 分解反応の物質収支を考察する上では大きな問題はないと考えられる。

土壌 B, C, D, E に TCA を添加して得られた回収率を Table 4 に示す。TCA の回収率は, 土壌の有機炭素量と吸着量が変化してもほぼ100%の値を示した。以上より, 本実験で用いる加熱気化法は, 土壌中の TCA, DCA, CA の含有量の測定に有効であることが確認された。

3. 2 土壌への吸着量

滅菌処理した土壌 A に TCA, DCA, CA を添加し, 水中濃度を経時的に分析した結果を Fig. 2 に示す。初期濃度は各物質とも100 $\mu\text{g/L}$ で, これが1日経過後, TCA は91 $\mu\text{g/L}$, DCA は87 $\mu\text{g/L}$, CA は87 $\mu\text{g/L}$ となり, 14日経過後に TCA, DCA, CA がそれぞれ80,81,77 $\mu\text{g/L}$ となった。一方, 土壌を添加してないコントロールでの水中濃度は14日後に TCA, DCA, CA が98, 97, 96 $\mu\text{g/L}$ で殆ど変化はなかった。

この結果から, 吸着は14日後にはほぼ平衡に達し, TCA, DCA, CA の初期添加量のそれぞれ20%, 19%,

23%, が吸着され, 化学吸着量は各物質間にあまり大きな差は見られないことが分かる。また, 一日目に最終吸着量の45～68%が吸着された。各化学物質のオクタノール/水分配係数 (K_{ow}) はTCA, DCA, CA が2.49, 1.79, 1.43であるから吸着量はTCA>DCA>CAの順になることが予想されたが, 実際には吸着量の違いは小さかった。

性質が異なる滅菌処理をした土壌 B, C, D, E に

Fig. 2 Adsorption of TCA, DCA, CA to pasteurized soil A at 20°C

Table 3 Recoveries of TCA, DCA and CA from soil A by thermal desorption

Added (ng)	Recoveries (%)		
	TCA	DCA	CA
1	91	93	55
10	97	107	98
100	95	94	90

Soil 2g, Purge gas : He, 20ml/min., Heating condition : 180°C, 5min.
TCA=1,1,1-trichloroethane, DCA=1,1-dichloroethane, CA=chloroethane

Table 4 Recoveries of TCA from soil B, C, D and E by thermal desorption

Soil	soil (B)	soil (C)	soil (D)	soil (E)
Recovery (%)	99	96	97	101

15ng of TCA was added on each soil samples

Soil 2g, Purge gas : He, 20ml/min., Heating condition : 180°C, 5min.
TCA=1,1,1-trichloroethane, DCA=1,1-dichloroethane, CA=chloroethane

Table 5 Adsorption of TCA and organic carbon content in pasteurized soil B, C, D and E

Soil	soil (B)	soil (C)	soil (D)	soil (E)
Organic carbon (%)	9.2	8.8	7.1	3.7
Amount adsorbed (μg)	2.2 (14.2%)*	2.2 (14.2%)*	1.8 (11.6%)*	1.4 (9.0%)*

15 μg of TCA was added on each soil samples

*The value in parenthese means the ratio of adsorbed TCA to added TCA

TCA=1,1,1-trichloroethane

Fig. 3 Relation between adsorbed TCA and organic carbon content in soils

TCA を添加して 7 日後の吸着量 ($\mu\text{g}/20\text{g}$ soil) 及び各土壌の有機炭素量を Table 5 に示す。有機炭素量の比較的多い水田土壌 B 及び畑土壌 C の方が、有機炭素量が比較的少ない土壌 D, E よりも吸着量が多い。Fig. 3 に土壌 B, C, D, E の 7 日目の吸着量と有機炭素量の関係を示す。有機炭素量が 9.2% の土壌 B では注入量の 14.2% が吸着し、有機炭素量が 3.7% の土壌 E で吸着量は 9.0% で約 1.6 倍の差があり、有機炭素量が多いほど吸着量が多い傾向が観察される。

同様な関係は中西ら¹⁰⁾ が土壌 10g に水 80ml, TCA 0.1 μg を添加して 1 ~ 31 日間行った吸着実験でも観察されている。彼らは、表土には初期添加量の 9 ~ 23%, 泥炭土で 30 ~ 55% の TCA が吸着され、有機物含量が高い泥炭土で吸着量が多いと報告している。また、成瀬ら¹¹⁾ は土壌 2g に水 50ml, TCE 11 μg を添加し、吸着量を測定した結果、3 日で黒ボク土では 48%, 褐色森林土では 23% が吸着がされ有機炭素量 7.9% の褐色森林土より有機炭素量が 10.4% の黒ボク土に大量の TCE が吸着されたことを報告している。

Fig. 4 Degradation of TCA to DCA and CA in various soils

3. 3 土壌による TCA の分解

3. 3. 1 実験結果

土壌 B, C, D, E での TCA の分解実験の結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 は各バイアル瓶での TCA, DCA, CA のそれぞれの存在量の経時変化を示したもので、水と土壌に含まれる成分の和である。なお、TCA から非生物学的に生成することが知られている 1,1-ジクロロエチレン (1,1-DCE) とビニルクロライド (VC) についても GC/MS での検索を行ったが、検出されなかった。

水田土壌 B では一週間のタイムラグののち急激に分解が進行し、14日間で TCA は約50%に減少する。一方、畑土壌 C, D では同様に一週間のタイムラグののち分解が開始されるが、その速度は遅く土壌 C では約20日後に TCA が約50%に減少し、60日ではほぼ消失する。土壌 D では30日後に TCA が約50%に減少した。

水田土壌 B では DCA は一週間後に生成し、約45日後に最大に達した後、ほぼ一定の値を維持する。CA の生成は二週間後に始まり、40日後にピークに達してはば一定ないし減少傾向を示す。このことは水田土壌 B では約40日間で TCA が消失し、新たに DCA が供給されなくなったことの結果と考えられる。畑土壌 C では DCA の増加は約30日後まで続き、その後ほぼ一定となる。CA は2週間増加傾向が継続する。畑土壌 D は畑土壌 C と類似しているが、さらに反応が遅い。また、土壌 E では実験期間中ほとんど分解が起きなかった。以上の結果から、いずれの土壌でも $TCA \rightarrow DCA \rightarrow CA$ の同じ経路で分解が起きていると推定される。最初の TCA が分解される第一段階は濃度に関して一次反応で近似できたが、DCA と CA の分解は一次反応で表現できなかった。

矢木ら³⁾が土壌中での TCA の分解を調べた結果では黒ボク土と蓮田土を用いて実験を行った結果、黒ボク土では1～3日のタイムラグののち7日までに20%が分解

された後反応が止まった。しかし、嫌気性の発達した蓮田土壌では50～1000ppb の濃度が約5日程度で50%分解され、14日にはいずれの濃度でもほぼ完全に分解されたことを報告している。また、Parson ら⁵⁾も土壌微生物によって TCA が嫌氣的に DCA に分解されることを報告している。以上の事例より嫌気状態は分解に関する重要な因子であり、嫌気的である方がより分解が促進される印象を受ける。これらは、本実験で観察された分解の様子に合致している。即ち、分解が始まるまでの約一週間のタイムラグはバイアル瓶内が好気性から嫌気性になるために必要とした時間であると解釈でき、また、水田土壌 B が畑土壌 C, D より速く分解が進んだのは水田土壌 B がより嫌気的狀態であったためと解釈できる。また、鶴川ら¹²⁾は TCA の汚染がある井戸水について調査を行った結果、TCA と共に当該地域に排出源のない DCA が検出されたことを報告している。このことは実際のフィールドでも TCA が DCA に分解されることを示唆している。

3. 3. 2 TCA の分解量と生成量との関係

Table 6 に土壌微生物による TCA の減少量と DCA 及び CA の生成量の経時変化を総モル量で示した。

水田土壌 B では51日の培養で TCA 115n mol が完全に分解され、DCA と CA とで合計 105n mol が生成し、TCA 添加量の約91%に相当する量が DCA と CA に転換した。畑土壌 C と D では同じ期間に TCA の減少により78%と60%が DCA と CA に転換した。実験初期の16日目までは3つの土壌ともほぼ TCA の分解量に相当する DCA と CA が生成したが、その後損失量が増加して、51日目の損失量は初期添加量の17～9%になった。土壌吸着成分については分析しているので吸着によるものではない。従って何らかの反応による損失と考えられる。TCA は非生物学的に1,1-ジクロロエチレン (1,1-DCE)

Table 6 Material balance and transformation ratio in the degradation experiments

Time (days)	Soil (B)			Soil (C)			Soil (D)		
	Quantity (n mol)		Transformation ratio * (%)	Quantity (n mol)		Transformation ratio * (%)	Quantity (n mol)		Transformation ratio * (%)
	TCA	DCA+CA		TCA	DCA+CA		TCA	DCA+CA	
0	115	0	0	115	0	0	115	0	0
16	51	61	53	81	28	24	95	18	16
26	16	92	80	32	73	63	61	42	37
41	4	105	91	14	86	75	45	59	51
51	0	105	91	5	90	78	30	69	60

TCA=1,1,1-trichloroethane, DCA=1,1-dichloroethane, CA=chloroethane

* transformation ratio means the ratio (DCA+CA) to TCA added

や酢酸になること⁶⁾が報告されているが、本実験では1,1-DCEの生成は検出されなかった。酢酸については調べることが出来なかった。

Vogelら⁶⁾は大型生物膜法によるTCAの分解実験でTCAが分解し、ほぼ同じ量のDCAに転換していること、またDCAからCAが生成していることを報告している。このことは本研究で証明された反応経路が土壌以外の系でも見られることを示唆している。

3. 3. 3 分解速度と有機炭素量の関係

TCA濃度の時間変化の片対数プロットをFig. 5に示す。Fig. 5からTCAの濃度に関して1次反応を仮定したときの分解速度定数 k 値を求めた。土壌中の有機炭素量と分解速度定数 k 値との関係をFig. 6に示す。各土壌で約一週間のタイムラグのち分解が開始されたため、 k 値はこのタイムラグを除いて、反応が起ころいはじめた7日目を0日目として求めた。

各土壌の分解速度定数 k 値は土壌Bが 0.099 、土壌Cが 0.067 、土壌Dが 0.040day^{-1} であった。本実験条件で

Fig. 5 Biodegradation rate constant (k) of TCA by various soils

Fig. 6 Relation between biodegradation rate constant (k) and organic carbon content in soils

分解速度を左右するのは嫌気及び好気状態の程度、有機物と微生物の量などが考えられるが、実際の分解速度は有機炭素量が多いほど分解が速い傾向が見られた。また、土壌Eについては分解が見られず、分解速度定数は0であった。

土壌中での分解速度に関する研究でRobertら¹⁾は一般のフィールドで求めたTCAの分解速度定数は 0.003day^{-1} と報告している。また、Kleckaら²⁾が有機炭素含量が少ない(0.06~1.2%)帯水層の土壌試料にTCA $100\mu\text{g/l}$ を添加して求めた分解速度定数は $0.014\sim 0.016\text{day}^{-1}$ と報告している。本実験で得られた分解速度定数はこれらに比べてやや大きい、これは供試土壌の有機炭素量及びそれに関連すると思われる微生物の量の違いのためと考えられる。

分解速度は、土壌微生物の土壌への馴致や他の因子によって大きく変動する可能性がある。本実験で得られた分解速度定数は、このような因子が現れる以前のいわば初期値に相当する値であり、土壌がTCAを分解できる潜在力を表すものと考えられる。

4. 結 論

一般土壌でのTCAの分解に関する研究は数少ない。一般土壌にTCAが侵入した場合その物質が受ける変化を予測するため、いくつかの水田土壌と畑土壌にTCAを添加し加熱気化P&T法を用いて吸着・分解特性について検討を行った。その結果、

- 1) 土壌試料の分析に用いた加熱気化P&T法は有効な方法であり、回収率も十分であった。
- 2) 同じ土壌でTCA, DCA, CAの各物質間の化学吸着量の差は小さかった。性質が異なる土壌へのTCAの吸着は、有機炭素量が多いほど吸着量が増える傾向であった。
- 3) 土壌中でTCAは分解してDCA, CAが生成し、土壌中の成分も含めて実験初期においては分解量と生成量との収支はほぼ一致した。
- 4) TCAの分解速度定数を求めると水田土壌Bで 0.099 、畑土壌CとDでは 0.067 , 0.040day^{-1} であり、有機炭素量が多いほど分解の速度定数が高い傾向が得られた。

要 約

地下水汚染物質であるTCAが実土壌で起きる変化を予測するため、水田土壌と畑土壌を用いて吸着及び分解実験を行った。TCA, DCA, CAの吸着実験の結果、各物質間の化学吸着量の差は小さかったが、TCAの土壌への吸着量は有機炭素量が多いほど吸着量が増えた。加熱気化P&T法により土壌中のTCAなどは十分に回収された。また、実験期間中TCA初期添加量の16~91%が

DCA とCAに転換した。分解速度定数は有機炭素量が多いほど高い傾向が得られた。

文 献

- 1) Roberts,P.V., Schreiner,J., and Hopkins,G. D.: Field study of organic water quality changes during groundwater recharge in the Palo Alto baylands. *Water Res.*, **16**, 1025-1035 (1982)
- 2) Klecka,G.M., Gonsior,S.J., and Markham,D. A.: Biological transformations of 1,1,1-TCA in subsurface soils and groundwater. *Environ. Toxicol. Chem.*, **9**, 1437-1451 (1990)
- 3) 矢木修身：土壤微生物による有害塩素化合物の分解. *BIO INDUSTRY*, **7**, 40-47 (1990)
- 4) Galli,R., McCarty,P.L.: Biotransformations of 1,1,1-TCA, Trichloromethane, and Tetrachloromethane by a *Clostridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 837-844 (1989)
- 5) Parson,F., Lage,G.B., and Rice,R.: Biotransformations of chlorinated organic solvents in static microcosms. *Environ.Toxicol. Chem.*, **4**, 739-742 (1985)
- 6) Vogel,T.M.,and McCarty,P.L.: Abiotic and biotic transformation of 1,1,1-TCA under methanogenic conditions. *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 1208-1213 (1987)
- 7) 小松俊哉, 桃井清志, 松尾友矩, 花木啓介：揮発性有機塩素化合物の嫌気的生分解性と反応機構. 環境工学研究論文集, **29**, 255-265 (1992)
- 8) 矢口久美子, 渡辺 学, 平田一郎, 伊藤 武, 濱田 昭：嫌気性土壤細菌によるテトラクロロエチレンの生分解に関する研究. 水質汚濁研究, **14**, 479-486 (1991)
- 9) 森山 登, 寺尾通徳, 川田邦明, 植村達夫, 白井文雄：トリクロロエチレンの土壤微生物による分解. 衛生化学, **34**, 366-370 (1988)
- 10) 中西成子, 日野隆信：バイアルを保存容器とする水・ヘキサン抽出法による土壤中のトリクロロエチレンなどの定量. 衛生化学, **39**, 29-36. (1993)
- 11) 成瀬洋児, 渡辺正敏, 土山秀樹, 伊藤英一, 矢木修身：トリクロロエチレンの土壤への吸・脱着について. 水環境学会誌, **16**, 346-353 (1993)
- 12) 鶴川昌弘, 宮野啓一, 布浦雅子：地下水汚染における揮発性有機塩素化合物等の動態. 全国水道研究発表会, **41**, 569-571 (1990)