〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
34 (4) 366-370 (1988)

トリクロロエチレンの土壌微生物による分解

森山 登, 寺尾通徳, 川田邦明, 植村達夫, 白井文雄
新潟県衛生公害研究所

Biotransformation of Trichloroethylene in Soil

NOBORU MORIYAMA, MICHINORI TERAOKA, KUNIYUKI KAWATA,
TATSUO UEMURA and FUMIO SHIRAI
Niigata Prefectural Research Laboratory for Health and Environment,
314, Sowa, Niigata 950-21, Japan

(Received March 8, 1988)

Biotransformation of trichloroethylene (TCE) in a soil sample was examined in sealed vials.

A soil sample was collected from the ground inside the metal welfare factory; it was located in the area where groundwater was contaminated by a degreaser, TCE, and *cis*-1,2-dichloroethylene (*cis*-DCE), which had not been used in the vicinity.

TCE was transformed into *cis*-DCE in 1 week in the collected unsterilized soil suspension. On the other hand, TCE did not degrade in the sterilized soil suspension. When 0.05 ml soil suspension was transferred to another sterilized soil suspension, this transformation was observed. This reaction was stopped by heating in boiling water for 10 min. Therefore, this transformation was considered to be due to a microbial dechlorination.

The *trans*-1,2-dichloroethylene, 1,1-dichloroethylene and vinyl chloride were not detected by this TCE biotransformation.

The *cis*-DCE did not further degrade at least in 3 weeks. It can therefore be presumed that *cis*-DCE contained in groundwater near the factory is a biotransformation product of TCE.

Keywords—biotransformation; trichloroethylene; soil; *cis*-1,2-dichloroethylene; groundwater contamination

はじめに

テトラクロロエチレン (PCE) やトリクロロエチレン (TCE), 1,1,1-トリクロロエタンなどの低沸点有機塩素化合物は金属製品の脱脂, 洗浄やドライクリーニングの洗浄剤などに広く用いられている。最近これらによる地下水汚染が欧米のみならず国内でも明らかにされ,¹⁾ 地下水が飲料に用いられることも多いことから, 公衆衛生上社会問題化している。

Parsons らは水と泥土をバイアルにとり密栓をした系で, 滅菌と非滅菌の場合での PCE と TCE に対する分解反応の違いから, これらの系では PCE や TCE が嫌氣的に生分解してジクロロエチレン (DCE) 類が生成すると報告しており,²⁾ Kleopfer らも同様な手法で TCE が嫌氣的に土壌微生物により 1,2-DCE に分解すると報告している。³⁾ Vogel らはカラムを用い, メタン生成下

の嫌氣的な条件で PCE が TCE, DCE, 塩化ビニルへと分解し最終的に二酸化炭素まで分解する可能性を指摘している。⁴⁾

更に, 空気に天然ガスを混合したガスを暴露した土壌カラムを用いた系や分離細菌を用いた密閉系での実験から TCE が好氣的に二酸化炭素にまで分解するという報告がある。⁵⁾ わが国では松重らが蓮田の土壌で PCE と TCE の生分解性を認めたが TCE の分解物は検出できなかったと報告している。⁶⁾

TCE を脱脂, 洗浄に使用した金属製品工場周辺で認められた TCE による汚染地下水から, その周辺では使用されていない *cis*-1,2-ジクロロエチレン (*cis*-DCE) が同時に検出されたことから, *cis*-DCE が TCE の微生物による分解生成物である可能性が指摘された。⁷⁾ しかし, 地下水汚染地の土壌を用いて微生物分解性を証明してい

る例はわが国では見あたらない。そこで地下水から検出された *cis*-DCE の由来を明らかにするために地下水汚染地から土壌を採取し、TCE にたいする分解性と生成物の検討を行った結果について報告する。

実験方法

1. 試料の採取 新潟県内の過去に TCE を使用した金属製品工場の敷地内から 1986 年 6 月に表層 30—50 cm から採取し、 -80°C で保存した土壌を用いた。

2. 試薬 TCE は和光純薬工業製特級、*cis*-DCE (97%) は Aldrich Chemical Co., Inc. 製、その他の有機ハロゲン化合物は市販の標準液を用い、メタノールは和光純薬工業製残留農薬試験用を用いた。ハートインフュージョンブイヨン (HIB) 培地は栄研化学製粉末、25 g を 1 l の水に溶かし使用した。

3. 器具 バイアル、テフロンライナー付きゴム栓及びアルミニウムシールは日電理化硝子社製を使用した。

4. 分解性試験 内容積 70 ml のバイアルに土壌を湿重で 10 g、滅菌蒸留水 (121°C , 15 分) を 50 ml、滅菌 HIB 培地を 250 μl 添加し、滅菌したテフロンライナー付きゴム栓をし、アルミニウムシールで密栓した。これに TCE を 25 μg (メタノール溶液として 5 μl) 及び 200 μg (メタノール溶液として 4 μl) 添加しシール部分を下にして 25°C の暗所で静置培養した (非滅菌区)。培養期間中は 1 日 1 回手で軽く振とうした。対照として、土壌を含む同一組成液をバイアルに調製し、密栓後 121°C , 15 分で滅菌したものに TCE を添加して用いた (滅菌区)。

一定時間後のバイアル中の TCE の消失及び DCE の生成量はヘッドスペース・ガスクロマトグラフ法で FID 検出器を用いて定量した。⁷⁾ また、カラム充填剤として性質の異なる 2 種を用いていずれの充填剤においても標準と試料の保持時間が一致することを確認した。

更に分解生成物をガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) によっても確認を行った。

5. 加熱処理試験 分解性試験と同組成の土壌と HIB 培地と水を含むバイアルを調製し滅菌した。これに TCE 分解が完了したことを確認したバイアルびんから土壌懸濁液を滅菌シリンジで採取し 50 μl ずつ添加し、更に TCE を 200 μg (メタノールとして 4 μl) を加えた。別に非滅菌土壌懸濁液に替えて滅菌した土壌懸濁液 50 μl を添加したもの及び対照として土壌懸濁液を添加しないものを調製した。 25°C 暗所で 5 日から 10 日培養後シール部分を下にして沸騰水中で 10 分間加熱処理をし、冷却後再び培養をし、その後の分解反応の進行状況

を測定した。

6. ガスクロマトグラフ (GC) 分析条件 GC: 島津製作所製 GC-7 A (FID 付き)。データ処理装置: 島津製作所製クロマトパック C-R 1 B. 1) カラム——ガラスカラム, $2\text{ m} \times 3\text{ mm i.d.}$ に 25% tricresyl phosphate で被覆した Chromosorb W (AW, DMCS), 60—80 メッシュを充填したもの。カラム温度: 80°C 。注入口及び検出器温度: 120°C 。キャリアガス: 窒素, 40 ml/分。

2) カラム——ガラスカラム, $5\text{ m} \times 3\text{ mm i.d.}$ に 5% SP-1200 と 1.75% Bentone 34 で被覆し Chromosorb W (AW, DMCS), 60—80 メッシュを充填したもの。カラム温度: 80°C 。注入口及び検出器温度: 120°C 。キャリアガス: 窒素, 40 ml/分。

7. GC-MS 分析条件 GC-MS: 日本電子製 DX-300 (ガスクロマトグラフ Hewlett Packard 5790 A 及びデータ処理装置 JMA-3500 付き)。カラム: ガラスカラム, $2\text{ m} \times 2\text{ mm i.d.}$ に 5% SP-1200 と 1.75% Bentone 34 で被覆した Chromosorb W (AW, DMCS), 60—80 メッシュを充填したもの。カラム温度: 35°C 。注入口温度: 100°C 。キャリアガス: ヘリウム, 20 ml/分。イオン化電圧: 70 eV。

結果と考察

1. TCE の分解

cis-DCE は ECD に対する相対感度が TCE に比べてきわめて低いため、FID による測定が必要であること、現地の地下水で最高 7100 $\mu\text{g/l}$ と比較的高濃度の TCE が検出されていること⁷⁾ などからバイアル当りの TCE の添加量を 25 μg 及び 200 μg とした。また、ヘッドスペース・ガスクロマトグラフ法分析による繰り返し精度は変動係数で 10—20% とされており、⁸⁾ 200 μg の標準を用いた 4 回の実験 ($n=4$) の結果は TCE で 5.2—7.6%, *cis*-DCE で 5.0—8.2% の変動が認められた。

また、TCE 等は土壌に吸着するが⁹⁾ 本実験系では TCE 等の吸着は無視できた。これは用いた土壌が砂質で強熱減量も 0.9% と有機物含有量が低いこと、かつ添加量も比較的高濃度であるためと考えられた。

バイアルびん中の TCE の分解と生成物を 1 週間おきに 3 週間まで測定した結果を Table I に示した。

25 μg , 200 μg 添加ともに滅菌区の TCE 量に変化は認められないのに比べ、非滅菌区では培養 1 週間で TCE は消失し、ほぼこれに対応する量の *cis*-DCE が生成した。したがってこの TCE の *cis*-DCE への変換は生物的反応であると推測された。クロマトグラム上からは *trans*-1,2-ジクロロエチレン (*trans*-DCE), 1,1-DCE

TABLE I. Biotransformation of Trichloroethylene in Unsterilized Soil Suspension

Time (weeks)	Amounts (μmol)			
	Sterilized soil		Unsterilized soil	
	TCE	<i>cis</i> -DCE	TCE ^{c)}	<i>cis</i> -DCE ^{c)}
0 ^{a)}	0.199	0	0.192	0
1	0.166	0	0	0.192
2	0.179	0	0	0.177
3	0.194	0	0	0.179
0 ^{b)}	1.62	0	1.64	0
1	1.43	0	0	1.58
2	1.52	0	0	1.35
3	1.61	0	0	1.36

a) Vials with 25 μg (0.190 μmol) of TCE.b) Vials with 200 μg (1.52 μmol) of TCE.

c) Values are averages for duplicate samples.

Fig. 1. Biotransformation of Trichloroethylene to *cis*-1,2-Dichloroethylene in Unsterilized Soil SuspensionA: with 200 μg of TCE, B: with 25 μg of TCE.○: Relative amount of remaining TCE ($100 \times \mu\text{mol}$ of TCE in unsterilized soil suspension/ μmol of TCE in sterilized soil suspension), Δ : relative amount of produced *cis*-DCE ($100 \times \mu\text{mol}$ of *cis*-DCE in unsterilized soil suspension/ μmol of TCE in sterilized soil suspension).

及び塩化ビニルの生成は認められなかった。

微生物による TCE の還元的な脱塩素化による生成物は 1,2-DCE で 1,1-DCE は生成しないこと,³⁾ 1,2-DCE では *trans* の生成はわずかで *cis* の生成量が多い²⁾ という報告がある。今回の結果では *cis*-DCE が特異的に生成したが、これらと類似点が多く、微生物による TCE の還元的な脱塩素化によるものと考えられた。

なお、生成した *cis*-DCE の 3 週間以内の濃度の変動

Fig. 2. Heat Inactivation of Transformation of Trichloroethylene to *cis*-1,2-Dichloroethylene

■: Heat sterilized soil suspension was transferred to already sterilized soil suspension. ▼, Δ , ●, ○, □: Unsterilized soil suspension was transferred in each case to already sterilized soil suspension. TCE (200 μg) was added. Arrows indicate when the heat treatments were applied.

A: Remaining TCE, $100 \times \mu\text{mol}$ of TCE in soil suspension/ μmol of TCE in control soil suspension (sterilized), B: produced *cis*-DCE, $100 \times \mu\text{mol}$ of *cis*-DCE in soil suspension/ μmol of TCE in control soil suspension (sterilized).

係数は3.6—7.4%と分析に伴う変動と同程度であり、特に減少傾向は認められなかった。したがって *cis*-DCE は3週間後も安定でガスクロマトグラムからは他の物質に変化している兆候は認められず、使用した土壌では TCE に比較して *cis*-DCE の分解が起こりにくかった。

Fig. 1 に培養初期の滅菌区に対する非滅菌区の TCE の残存率と *cis*-DCE の生成率の経時変化を示した。TCE は3日目までは変化せずその後急激に減少し、7日目には0となった。これとは逆に *cis*-DCE の生成は3日目までは0で7日目で100%近くまで達した。

これは密閉系で嫌氣的に行われたこれまでの報告^{2,3)} が数週経過後の分解を観察しているのに比べ、本実験での分解速度が早いことを示している。この理由として培養条件の違いとともに、分解に関与する微生物の違いによるものと考えられた。

2. 加熱による TCE 分解反応の停止

本実験で認められた分解が微生物による生分解反応であることを更に証明するため、TCE の分解が完了した

バイアル中の土壤懸濁液を 50 μ l ずつ分解性試験で対照として用いたものと同組成の滅菌バイアルに加え、培養 5, 7, 8, 10 日後に加熱処理した。なお、加熱前の濃度に対する加熱後の濃度の比の平均は TCE で 0.95 ± 0.07 ($n=4$), *cis*-DCE で 1.03 ± 0.06 ($n=4$) であったことから、いずれの化合物の濃度も加熱前後で差は認められなかった。

培養 12 日までの、対照に対する土壤懸濁液を添加した区の TCE の残存率と *cis*-DCE の生成率を Fig. 2 に示した。

TCE の分解と *cis*-DCE の生成は滅菌土壤懸濁液を添加した区では起こらず、非滅菌土壤懸濁液を添加した区でのみ生じており、かつ加熱処理をするとその後の反応は停止した。滅菌土壤懸濁液を添加した区では好気条件下での HIB 寒天平板塗布法による菌数測定では生菌を認めなかったが、非滅菌土壤懸濁液を添加した区では培養開始直後、 10^3 個/ml のオーダーで生菌数が認められ、培養 1 日目以降 10^7 個/ml のオーダーで推移することが確認された。また、本条件での加熱処理後の生菌数の測定では平板上にコロニーを確認できなかったことから、ほとんどが死滅することが確認された。

以上のことから、本反応が微生物による生分解反応であり、かつ分解に関与する菌は 100°C で 10 分間の加熱処理により死滅することが分かった。

3. 分解生成物の GC-MS による同定

GC-MS により分解生成物の確認をした。

その結果、*cis*-DCE 標準品と同一の保持時間に、標準品とよく一致するマススペクトル (Fig. 3) が得られた。したがって生成物が *cis*-DCE であることが確かめられた。

4. 地下水汚染地との関連

土壤採取地点周辺の地下水中には TCE とともにこの地域で使用していない *cis*-DCE が検出されている。この地域の地下水中の *cis*-DCE 濃度の TCE 濃度に対する比率は 0.1–21 であり、最高濃度は TCE で $7100 \mu\text{g/l}$, *cis*-DCE で $5100 \mu\text{g/l}$ と高濃度であるにもかかわらず *trans*-DCE は検出されていない。⁷⁾

本実験では供試土壤が砂質で有機物含有量が低いため微生物を増殖しやすくすることを目的に少量の HIB 培

Fig. 3. A Typical Mass Spectrum of a Biotransformation Product of Trichloroethylene

Operating condition ; column : 5% SP-1200+1.75% Bentone 34 on Chromosorb W (AW-DMCS, 60–80 mesh), 2 m $\times$ 2 mm i.d., column temperature : 35°C , injection temperature : 100°C , carrier gas : He, 20 ml/min, ionization voltage : 70 eV.

地を添加したが、現地土壤に TCE を *cis*-DCE に分解する微生物分解活性が存在することは明らかであり、環境においても TCE の *cis*-DCE への微生物分解が起きていることを確信させた。

更に本実験の結果では *trans*-DCE が生成しなかったことも環境中で *cis*-DCE が高濃度であるにもかかわらず *trans*-DCE が検出されないことと一致した。

また、生成した *cis*-DCE の分解が TCE に比較して起こりにくいという実験結果から、環境では一旦生成された *cis*-DCE による汚染が今後も更に継続することが予想され、TCE とともに *cis*-DCE の監視が必要であると考えられた。

結 語

新潟県内の TCE による地下水汚染地域から採取した土壤により微生物的に TCE が *cis*-DCE に分解されることを確認した。TCE の分解生成物として *trans*-DCE, 1,1-DCE 及び塩化ビニルの生成は認められなかった。

TCE の分解はほぼ 1 週間で終了したが、生成した *cis*-DCE の分解は 3 週間では認められなかった。これらは環境においても TCE が *cis*-DCE に微生物分解し、生成した *cis*-DCE の汚染が今後も継続する可能性を示している。

分解条件や機構を更に明らかにするため現在分解菌株の分離を試みている。

引 用 文 献

- 1) T. Trouwborst, *Sci. Total Environ.*, **21**, 41 (1981); G.W. Page, *Environ. Sci. Technol.*, **15**, 1475 (1981); 佐谷戸安好, 中室克彦, 安藤正典, 石塚美恵子, 佐野 仁, 頭本藤雄, 水質汚濁研究, **6**, 39 (1983); 玉川勝美, 大金由夫, 相原良之, 広島紀以子, 加藤 恵, 三島靖子, 関 敏彦, 角田 行, 衛生化学, **31**, 214 (1985).

- 2) F. Parsons, P.R. Wood, J. DeMarco, *J. Am. Water Works Assoc.*, **76**, 56 (1984); F. Parsons, G.B. Lage, *ibid.*, **77**, 52 (1985).
- 3) R.D. Kleopfer, D.M. Easley, B.B. Haas, Jr., T.G. Deihl, D.E. Jackson, C.J. Wurrey, *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 277 (1985).
- 4) T.M. Vogel, P.L. McCarty, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1080 (1985).
- 5) J.T. Wilson, B.H. Wilson, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 242 (1985); M.J.K. Nelson, S.O. Montgomery, E.J. O'Neill, P.H. Pritchard, *ibid.*, **52**, 383 (1986).
- 6) 松重一夫, 矢木修身, 須藤隆一, 第21回水質汚濁学会講演要旨集, 東京, 1987年3月, p.205.
- 7) 川田邦明, 尾崎邦雄, 横山ひろみ, 黒崎裕人, 用水と廃水, **29**, 221 (1987).
- 8) 日本規格協会編, “用水・排水中の低分子量ハロゲン化炭化水素試験方法,” JIS K 0125, 1987, p.4.