〈論 文〉

cis-1,2-ジクロロエチレン分解嫌気性集積培養菌の水素利用機構

小 松 俊 哉* 桃 井 清 至*
松 尾 友 矩** 花 木 啓 祐***

Mechanism of Hydrogen Utilization by Anaerobic *cis*-1,2-Dichloroethylene-degrading Enrichment Cultures

Toshiya KOMATSU*, Kiyoshi MOMONOI*,
Tomonori MATSUO** and Keisuke HANAKI***

* Department of Civil Engineering, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomiokamachi, Nagaoka, Niigata 940-21 Japan

** Department of Urban Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113 Japan

*** Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153 Japan

Abstract

cis-1,2-Dichloroethylene (*cis*-DCE) is frequently found as a groundwater contaminant. *cis*-DCE can be biotransformed via reductive dechlorination to ethylene under anaerobic conditions. We have recently reported a high-rate transformation of *cis*-DCE to ethylene by anaerobic enrichment cultures. A small part of ethylene was further reduced to ethane. Hydrogen appeared to be the actual electron donor for reductive transformation of *cis*-DCE in these cultures. In this study, batch experiments were conducted for investigating the mechanism of *cis*-DCE transformation by these anaerobic enrichment cultures. Hydrogen was used as an electron donor. Addition of 2-bromoethanesulfonate (BES), a specific inhibitor of methanogenesis, did not inhibit reductive dechlorination of *cis*-DCE. The major organisms utilizing hydrogen were not methanogens but homoacetogens. These results suggest that the dechlorinating organisms were homoacetogens. On the other hand, reduction of ethylene to ethane was inhibited in the presence of BES, suggesting a role of methanogens in this transformation.

Batch experiments examining the biodegradability of tetrachloroethylene (PCE) by these cultures were also conducted and it was found that the cultures were able to transform PCE to ethylene at high rates.

Key words: *cis*-1,2-dichloroethylene, anaerobic biotransformation, enrichment culture, hydrogen, homoacetogens

1. はじめに

全国各地で見出されるテトラクロロエチレン

(PCE), トリクロロエチレン(TCE), *cis*-1,2-ジクロロエチレン(*cis*-DCE)などの塩化エチレン類による地下水汚染^{1),2)}に対して、汚染物質を微生物分解させる浄

* 長岡技術科学大学建設系 〒940-21 長岡市上富岡町1603-1

** 東京大学工学部都市工学科 〒113 文京区本郷7-3-1

*** 東京大学先端科学技術研究センター 〒153 目黒区駒場4-6-1

化法（バイオレメディエーション）が根本的な浄化対策技術として期待されている³⁾。嫌気条件下における塩化エチレン類の微生物分解は還元的脱塩素反応によって進行し、それらは最終的に無害なエチレン、エタンに転換する^{4)~9)}。筆者らは¹⁰⁾、汚染地下水レベルの低濃度 *cis*-DCE をかなり速くエチレンに転換する嫌気性菌の集積培養が得られたことを報告し、汚染地下水の嫌気プロセスでのバイオレメディエーションの適用可能性を示した。さらに、集積培養系における還元的脱塩素反応の直接の電子ドナーは水素であると推定したが、バイオレメディエーション適用実現化へ向けて微生物の代謝側面から分解機構をより詳細に検討することが必要である。

現在まで純粋培養菌・集積培養菌による塩化エチレン類の嫌氣的生分解機構に関して多数の報告がされてきたが、塩化エチレン類の化合物がジクロロメタン（塩化メタン類）¹¹⁾のように嫌気性菌の増殖基質として利用されたという報告はない。このことから、塩化エチレン類の嫌氣的生分解は、嫌気性菌が他の一次基質を代謝する過程で同時に進行する二次的反応、すなわち共代謝反応（cometabolism）⁹⁾と考えられる。従って、その生分解機構には嫌気性微生物による一般有機物、および有機物の分解中間体として生成する水素の代謝機構が密接に関わってくる。

嫌気条件下において一般有機物は嫌気性微生物の働きによって分解され、最終的にメタンに転換するが、分解を担う各種微生物が利用できる基質の範囲が限定されているため、各分解過程に対応した微生物群の共生的な代謝作用によって分解が進行する。それらは大きく、①酸生成菌②水素生成性酢酸生成菌（acetogenic 菌）③ホモ酢酸生成菌④メタン生成菌の4つのグループに分けられる^{12),13)}。

本研究では、前報¹⁰⁾に示した *cis*-DCE 分解集積培養菌を用いて種々のバッチ実験を行い、*cis*-DCE のエチレン、エタンへの転換と主要基質の分解との関連性を調べ、*cis*-DCE の転換には上記のどのグループの微生物群が関与するのかを検討する。さらに、PCE による地下水汚染も頻繁に見られるので、集積培養菌の PCE に対する分解能を調べる。

2. 実験方法

2.1 微生物源

前報¹⁰⁾に示した、*cis*-DCE 分解菌の集積培養系に発展した半連続培養（主要基質としてグルコース、酵母エキス、プロピオン酸、水素を添加した4培養系、添加濃度は主要基質100mgCOD・*l*⁻¹、*cis*-DCE 0.46mg・*l*⁻¹）の fill & draw 時の引き抜き培養液をバッチ実験

Table 1 Conditions of batch experiments degrading *cis*-DCE. Added concentrations of *cis*-DCE were about 0.5mg・*l*⁻¹

Exp. No.	electron donor added	concentration (mgCOD/l)	BES added (mM)
1	none	—	—
	H ₂	10	—
	H ₂	100	—
2	H ₂	100	0
	H ₂	100	1
	H ₂	100	5
3	H ₂	100	0
	H ₂	100	0.2
4	propionate	100	0
	propionate	100	1
5	H ₂	100	—
	propionate	100	—

の微生物源とした。用いた培養液は6バッチ期間以上経過したものであり、*cis*-DCE をかなり速くエチレンに転換できる能力を持っていた。ほとんどのバッチ実験では4培養系の引き抜き培養液を混合したものを用いたが、*cis*-DCE の転換機構を検討した1実験（次節に示す Table 1 の実験5）ではプロピオン酸添加系の培養液のみを用い、また PCE に対する分解能を調べるバッチ実験ではグルコース添加系の培養液と水素添加系の培養液とを別々に用いた。VSS 濃度は測定しなかったが、培養液を直接用いたので100mg・*l*⁻¹から200mg・*l*⁻¹の範囲内にあつたと思われる。

2.2 実験条件

Table 1 に *cis*-DCE の転換機構を検討するために行った5種類のバッチ実験について条件を一覧にして示す。集積培養系における還元的脱塩素反応の直接の電子ドナーは水素と推定されたので、電子ドナーとして主に水素を投与した。*cis*-DCE の添加濃度はすべて約0.5mg・*l*⁻¹とした。実験2～4で用いた2-プロムエタンスルホン酸(BES)¹⁴⁾は、メタン生成菌に対する選択的な阻害剤であり、嫌気性混合培養系においてメタン生成菌の役割を検討する際によく使用される。

PCE 分解実験では PCE (0.65mg・*l*⁻¹ as *cis*-DCE) の他に培養時と同一の主要基質（グルコースまたは水素、100mgCOD・*l*⁻¹）を添加した。

2.3 実験手順

内容積約69ml のバイアルに微生物源の培養液を40ml または50ml 注入し、バイアル内部を N₂ ガスまた

は $N_2 \cdot CO_2$ 混合ガス (9 : 1) で約 5 分間パージしてフロンコートブチルゴム栓とアルミシールで密栓した。その後、エレクトロドナー、*cis*-DCE または PCE, BES (添加系のみ) をシリンジで注入した。そして 25 °C の一定温度下で、ブチルゴム栓が液相部と接するような状態で静置培養した。

実験 5 以外は同一条件のバイアルを 2 個準備して (duplicate) 反応過程を追っていった。

2.4 分析方法

主な分析項目は前報と同様に塩化エチレン類、エチレンおよびエタン、ガス組成である。分析方法も前報と同じとした。また、実験 3 では遠心分離 (12,000rpm, 10min) の上澄み部分をサンプルとして、揮発性脂肪酸 (酢酸, プロピオン酸等) を FID ガスクロマトグラフで定量した (充填剤: FAL-M 10% Shimalite TPA 60-80)。

3. 結果および考察

実験方法で述べたように実験 5 以外のバッチ実験は二連で行ったが、同条件の 2 個のバイアルの分析値に顕著な差は常に見られなかった。以下に示すデータはその一方のバイアルでの値である。

3.1 集積培養菌の *cis*-DCE 転換機構

3.1.1 水素添加量の影響

Fig. 1 に実験 1 での *cis*-DCE の分解を示す。水素添加量が多いほど分解が速いことから、*cis*-DCE の還元的脱塩素反応は、水素利用の何らかの主要な微生物反応の共代謝反応として進行することが示唆された。なお、エレクトロドナー無添加系の場合も分解が起きているが、培養液上澄中に残存していた有機物 (10 mgCOD・ l^{-1} 程度) の分解に起因して還元力が生じたためと考えられる。

Fig. 1 Effect of the amount of hydrogen addition on *cis*-DCE degradation (Exp. 1)

3.1.2 水素をエレクトロドナーとした場合のメタン生成阻害剤 BES の影響

Fig. 2 に実験 2 の各系でのメタン生成量、水素消費量および *cis*-DCE の分解を示す。4 日目までのメタン生成量は BES 無添加系の生成量を基準とすると、1 mM 添加系では 5 % (阻害率 95%), 5 mM 添加系では 3 % (阻害率 97%) となり、BES 添加によりメタン生成が非常に強く阻害されたことがわかる。一方、水素消費速度は、1 mM 添加系の場合は無添加系とほぼ等しく、BES には影響を受けなかった。これに対し 5 mM 添加系の場合は無添加系よりも僅かに遅かった。

Fig. 2 Effect of the specific methanogenic inhibitor BES on (A) methane production, (B) hydrogen consumption, (C) *cis*-DCE degradation in Exp. 2

ここで、BES 無添加系を含めて水素消費量とメタン生成量が対応していないことがわかる。すなわち、BES 無添加系では水素がメタンに転換した以外に 4 日目頃までは何らかの物質が蓄積していたと考えられる。また、BES 添加系では水素が明らかにメタン以外の何らかの物質に転換していたと言えよう。この点については次の実験 3 で検討する。

今度は *cis*-DCE の分解を比較する。BES 1 mM 添加系での分解速度は、メタン生成がほぼ完全に阻害されたにもかかわらず、無添加系とほぼ等しかったことがわかる。なおデータは示さないが、生成した塩化ビニル (VC) についてもエチレンへの転換速度がほぼ等しかった。一方、BES 5 mM 添加系では分解速度が僅かに遅く、若干阻害を受けたと言える。BES 1 mM 添加系の結果から、本集積培養系における *cis*-DCE のエチレンへの転換はメタン生成菌の共代謝反応ではないことが明らかになった。

かつては、低濃度の塩化エチレン類の還元的脱塩素反応にはメタン生成菌が重要な役割を果たしていると考えられていた^{4),15)}。しかし、純粋培養のメタン生成菌は PCE を TCE までにしか脱塩素できず、しかも全エ

レクトロンフローのうち還元的脱塩素反応に使われる割合は僅か80,000分の1程度にすぎない¹⁶⁾。メタン生成菌が還元的脱塩素反応に重要と考えられていたのは、混合系において BES を添加した場合、メタン生成反応だけではなく還元的脱塩素反応も阻害された^{4),15)}からである。だが、それらの阻害は高濃度 (5 mM) の BES を添加した場合の結果である。従って、還元的脱塩素反応がメタン生成菌の共代謝反応ではないにもかかわらず阻害された本実験の BES 5 mM 添加系の結果を踏まえると、それらの研究での BES 添加系における阻害も、実際にメタン生成菌が還元的脱塩素反応に関与していたために起きたとは断定できない。BES は極めて低濃度の場合もメタン生成に対して阻害効果を示すので (同様のバッチ実験で0.1mM 添加した場合、85%阻害された)、メタン生成菌の役割を検討する際には、メタン生成反応のみを阻害させるように、できるだけ低濃度で添加すべきであろう。

以上のように、本集積培養菌では還元的脱塩素反応の進行にメタン生成が不可欠でないことがわかった。しかし一方、水素消費速度が若干遅かった BES 5 mM 添加系において還元的脱塩素反応が阻害された

Fig. 3 Effect of BES on hydrogen metabolism in Exp. 3

Fig. 4 Effect of BES on *cis*-DCE transformation in Exp. 3

ことから、その進行が水素消費量に支配されたことが示唆される。これは実験1の結果とも一致する。

次の実験3は、水素の転換過程で蓄積する物質を明らかにするために行った類似の条件の実験である。各系での水素の転換過程をFig. 3に、*cis*-DCEの転換をFig. 4に示す。この実験のBES添加系(0.2mM)も実験2のBES 1 mM添加系と非常に類似した転換パターンを示したことがわかる。すなわちBES添加系はBES無添加系と比較して、メタン生成はかなり阻害されたものの(4日目の時点での阻害率88%), 水素消費速度および*cis*-DCEの塩化ビニル(VC), エチレン(ETY)への転換速度はほぼ等しかった。そして、培養液中に酢酸が蓄積していたことが判明した。このことは水素からホモ酢酸生成反応が起きていたことを示しており、また両系ともに水素消費量と、その転換物質(メタンおよび酢酸)の合計量は収支がよく取れている。還元的脱塩素反応の進行が水素消費量に支配された実験1, 2の結果, および本実験の結果から、本集積培養系の還元的脱塩素反応は水素利用ホモ酢酸生成菌の共代謝反応と考えられる。

さて、上記のように*cis*-DCEのエチレンへの還元的脱塩素反応はBESの影響を受けなかったのに対して、エチレン(ETY)からエタン(ETA)への還元(水素付加)はもともと僅かしか進行しない反応だが、BES添加系では全く起きなかったことがわかる。従ってエチレンからエタンへの還元反応は、還元的脱塩素反応と転換機構が異なり、メタン生成菌の共代謝反応と考えられる。なおデータは示さなかったが、実験2においてもBES添加系ではエタンが全く生成しなかった。

3.1.3 プロピオン酸をエレクトロンドナーとした場合の転換機構

実験4はプロピオン酸をエレクトロンドナーとしてBES添加の影響を検討したものである。Fig. 5に各系でのメタン生成量および*cis*-DCEの分解を示す。BES添加系(1 mM)でのメタン生成は、BES無添加系と比較して4日目の時点で86%阻害された。一方、*cis*-DCEの分解に関しては、水素をエレクトロンドナーとした実験の結果とは異なり、BES添加系ではほとんど進行しなかったことがわかる。BES添加によりメタン生成が阻害されると、熱力学的条件からacetogenic菌によるプロピオン酸の酢酸と水素への分解反応も強く阻害される¹²⁾。従って、おそらく直接のエレクトロンドナーとなる水素が生成しなかったため、還元的脱塩素反応が進行しなかったものと考えられる。ただし、この実験結果だけでは還元的脱塩素反応がacetogenic菌の共代謝反応でないとは断定でき

Fig. 5 Effect of BES on (A) methane production, (B) *cis*-DCE degradation in Exp. 4

ない。

次の実験5では、プロピオン酸添加系における*cis*-DCE転換機構をより明らかにするためプロピオン酸添加系の培養液だけを微生物源として用い、エレクトロンドナーとしてプロピオン酸または水素を添加した。Fig. 6に各系での*cis*-DCEの転換を示す。プロピオン酸添加系だけでなく水素添加系の場合にも*cis*-DCEのエチレン(ETY), エタン(ETA)への転換は進行し、しかも水素添加系の方が僅かではあるが転換が速かったことがわかる。従って、プロピオン酸を添加した集積培養系においても、水素添加集積培養系と同様に水素が直接のエレクトロンドナーとして機能すると考えられる。この実験結果から、還元的脱塩素反応がacetogenic菌の共代謝反応ではないことが示されたと言えるだろう。

3.1.4 転換機構のまとめ

本節で検討した結果をまとめると、水素を主要基質として添加した集積培養菌による*cis*-DCE転換機構はFig. 7のように表すことができる。主要基質の水素はホモ酢酸生成菌とメタン生成菌(水素利用)によって利用され、各々酢酸、メタンに転換する。このうち酢酸はさらに酢酸利用メタン生成菌によって利用さ

Fig. 6 Effect of the type of electron donors on *cis*-DCE transformation (Exp. 5)

れ、メタンに転換する。*cis*-DCE からエチレン (ETY) への還元的脱塩素反応は水素利用ホモ酢酸生成菌の共代謝反応と考えられる。すなわち、ホモ酢酸生成菌によって利用される水素の一部によって還元的脱塩素反応が進行する。*cis*-DCE 添加濃度が $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の場合、それをエチレンに還元するのに必要な化学量論的 COD 量は約 $0.17 \text{ mg COD} \cdot \text{l}^{-1}$ であるので、水素投与量 ($100 \text{ mg COD} \cdot \text{l}^{-1}$) のうち還元的脱塩素反応に使われる比率は数百分の1である。一方、エチレン (ETY) からエタン (ETA) への水素付加反応は、水素利用メタン生成菌の共代謝反応と考えられる。Fig. 7 にはメタン生成阻害剤 BES を添加した場合の影響も示している。なお、BES の添加によって還元的脱塩素反応が促進されたわけではないので、BES 無添加系における水素利用もホモ酢酸生成菌が優勢になっていたと考えられる。

また、主要基質がプロピオン酸、グルコースなどの集積培養菌の場合も、それらの嫌気分解過程で生成する水素を利用して同機構で *cis*-DCE の転換が進行するものと考えられる。

3.2 *cis*-DCE 分解集積培養菌の PCE 分解能

Fig. 8 にグルコース添加系および水素添加系での

Fig. 7 Hypothetical roles of homoacetogens and methanogens for *cis*-DCE transformation in hydrogen-fed enrichment culture

Fig. 8 PCE transformation by (A) glucose-fed enrichment culture, (B) hydrogen-fed enrichment culture

PCE の転換を示す。両系ともに添加直後には PCE の分解は全く起きなかったが、15日目頃から分解が開始し20日目までに TCE の蓄積はなく完全に *cis*-DCE 以降に転換した (検出限界は PCE が $0.001 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ as *cis*-DCE, TCE が $0.002 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ as *cis*-DCE)。なお、他の DCE 異性体は生成しなかった。

さらに、20日目にバイアルを開封し、 N_2 ガスパージにより揮発性物質を除去してから PCE と主要基質 (同濃度) を再添加した。再添加時における PCE の分解は非常に速く、両系ともに 2 日以内に完全に *cis*

-DCE 以降に転換した。一方 cis-DCE 以降の転換に関しては、グルコース添加系では4日目までにほぼ完全にエチレン (ETY) に転換したのに対して、水素添加系の転換速度は若干遅かった。これは集積培養菌の cis-DCE 転換活性¹⁰⁾とも一致する。

筆者らは35°CにおいてPCEからcis-DCEまでの転換は容易に進行することを示したが¹⁷⁾、本実験の結果から、25°Cの場合もPCEの転換過程においてcis-DCEまでの転換が律速となることはないと考えられる。従って、PCE (あるいはTCE) からエチレンへ転換する集積培養菌を得ることはcis-DCE分解菌の集積に比べて困難ではないであろう。

4. ま と め

cis-DCE 分解集積培養菌を微生物源として用いてバッチ実験を行い、低濃度 cis-DCE の転換機構およびPCE分解能を検討した結果、以下のことが明らかになった。

1) エレクトロンドナーが水素の場合、メタン生成阻害剤 BES の添加によりメタン生成反応が強く阻害されても cis-DCE からエチレンへの還元的脱塩素反応は影響を受けなかった。従って還元的脱塩素反応がメタン生成菌の共代謝反応ではないことが明らかになった。

2) BES 添加系、無添加系ともに水素利用の中心はメタン生成菌ではなくホモ酢酸生成菌であった。さらに還元的脱塩素反応の進行程度は水素消費量に支配された。従って、還元的脱塩素反応は水素利用ホモ酢酸生成菌の共代謝反応と考えられる。

3) 一方、エチレンからエタンへの水素付加反応は、還元的脱塩素反応と転換機構が異なり、水素利用メタン生成菌の共代謝反応と推定された。

4) 主要基質がプロピオン酸、グルコースなどの集積培養系の場合も、それらの嫌気分解過程で生成する水素を利用して同機構で cis-DCE の転換が進行するものと考えられる。

5) cis-DCE 分解集積培養菌のPCEに対する分解能を調べたところ、PCEは再添加時に極めて速く cis-DCE 以降に転換した。従ってPCEあるいはTCEからエチレンに転換する集積培養菌を得るのも困難でないと考えられる。

(原稿受付 1994年12月5日)

(原稿受理 1995年4月21日)

参 考 文 献

1) 環境庁水質保全局 (1983) 昭和57年度地下水汚染実態調査結果。

- 2) 環境庁水質保全局 (1989) 昭和63年度地下水汚染実態調査結果 (ジクロロエチレンの地下水汚染状況について)。
- 3) 平田健正 (1994) 土壌・地下水汚染の浄化対策の現状と課題, 水環境学会誌, 17, 86-90.
- 4) Freedman, D. L. and Gossett, J. M. (1989) Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2144-2151.
- 5) DiStefano, T. D., Gossett, J. M. and Zinder, S. H. (1991) Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethene to ethane by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2287-2292.
- 6) DiStefano, T. D., Gossett, J. M. and Zinder, S. H. (1992) Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3622-3629.
- 7) de Bruin, W. P., Kotterman, M. J. J., Posthumus, M. A., Schraa, G. and Zehnder, A. J. B. (1992) Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1996-2000.
- 8) Carter, S. R. and Jewell, W. J. (1993) Biotransformation of tetrachloroethylene by anaerobic attached-films at low temperatures, *Water Research*, 27, 607-615.
- 9) McCarty, P. L. (1992) Transport, fate and in-situ bioremediation of chlorinated solvents in groundwater, 2nd National Symposium on Groundwater Contamination, Yokohama, Japan, 116-135.
- 10) 小松俊哉, 桃井清至, 松尾友矩, 花木啓祐 (1995) cis-1,2-ジクロロエチレン分解嫌気性菌の集積培養, 水環境学会誌, 18, 396-404.
- 11) Freedman, D. L. and Gossett, J. M. (1991) Biodegradation of dichloromethane and its utilization as a growth substrate under methanogenic conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2847-2857.
- 12) Harper, S. R. and Pohland, F. G. (1986) Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment, *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 585-601.
- 13) 野池達也 (1987) 嫌気性排水処理法の原理, 水質汚濁研究, 10, 652-656.
- 14) Zinder, S. h., Anguish, T. and Cardwell, S. C. (1984) Selective inhibition by 2-bromoethanesulfonate of methanogenesis from acetate in a thermophilic anaerobic digester, *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1343-1345.
- 15) Fathepure, F. Z. and Boyd, S. A. (1988) Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens, *FEMS Microbiology Letters*, 49, 149-156.
- 16) Fathepure, F. Z. and Boyd, S. A. (1988) Dependence of tetrachloroethylene dechlorination on methanogenic substrate by *Methanosarcina* sp. strain DCM, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2976-2980.
- 17) 小松俊哉, 桃井清至, 松尾友矩, 花木啓祐 (1992) 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, 26, 255-265.