

#### 様式4（公表用）

氏名	大橋 貴志
博士の専攻分野の名称	博士（農学）
学位記番号	医工農甲 第130号
学位授与年月日	令和5年9月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学 生命農学コース
学位論文題目	ワイン搾りかすを利用したクロロエテン類汚染土壌に対する バイオレメディエーションの効果
論文審査委員	主査 准教授 久本 雅嗣 副査 教授 奥田 徹 教授 舟根 和美 准教授 新森 英之 准教授 大槻 隆司 准教授 乙黒 美彩

### 学位論文内容の要旨

工業用洗浄液や脱脂剤に広く使用されているクロロエテンは発がん性があり、その不適切な処理により土壌や地下水が汚染されている。クロロエテン類で汚染された土壌や地下水を浄化する技術として、微生物を用いたバイオレメディエーションがある。本研究では、ワイン製造時に発生するブドウの搾りかすから抽出したワイン搾りかす抽出物（Wine Pomace Extract: WPE）を用いたクロロエテン汚染土壌のバイオレメディエーションの効果について研究を行った。

WPEの作製の方法は、ワイン搾りかすの前処理としてのすり潰しは有効性が低いことや、アルカリ浸漬期間は4週間が最適であった。WPEに含まれるカルボン酸類をLC-MS/MSにて分析した結果、L-酒石酸、L-乳酸、コハク酸、L-リンゴ酸、シリング酸、*p*-クマル酸、没食子酸の7種が存在した。

クロロエテン類の脱塩素化におけるワインの搾りかす抽出物の効果について、WPE、WPE分画産物および、カルボン酸類を用いたテトラクロロエテン（PCE）分解試験を実施した。WPEは、クロロエテン類の嫌気性バイオレメディエーションを明らかに促進した。WPE由来の画分を用いたPCE分解試験では、L-乳酸、L-酒石酸などを含む水溶出画分はPCEの脱

#### 様式 4 (公表用)

塩素化を促進したが、シリンジ酸を主体とするメタノール溶出画分は促進しなかった。また、L-乳酸、L-酒石酸、シリンジ酸の標準溶液を用いた PCE 分解試験では、L-乳酸と L-酒石酸は PCE の脱塩素化を促進したが、シリンジ酸は脱塩素化を促進しなかった。この結果から、WPE に含まれる L-乳酸と L-酒石酸は、嫌気性微生物によるクロロエテン類の分解において水素供与体として機能することが認められた。

実現場でのクロロエテン類の脱塩素化における WPE の有効性の評価を行った。地中に WPE を注入し、3 か所の井戸でモニタリングを実施した。試験前の地下水の pH は中性に近く、*Dehalococcoides* 属細菌は  $1.0 \times 10^2$  レベルで存在していた。また、TCE とその分解産物である 1,2-ジクロロエチレン (12DCE)、クロロエチレン (VC) が検出された。このことから、現地実証サイトでは自然減衰による微生物分解が起きていると推測された。WPE 注入後、すべての井戸で 12DCE と VC の濃度が一旦上昇した後に減少し、*Dehalococcoides* 属細菌の数が増加した。WPE の浸透は、地下水の総有機炭素 (TOC) 濃度や電気伝導率 (EC) を測定し、TOC や EC は地下水流向の下流にある井戸で 70 日目頃に明確な増加を示した。

さらに、地下水と土壌の微生物群集の組成変化について分析を行った。地下水では、WPE 注入後 103 日目に *Betaproteobacteria* 綱 (*Proteobacteria* 門) が優勢となり 58.7% を占めた。*Betaproteobacteria* 綱には、TCE を共代謝することが報告されている鉄酸化細菌、土壌細菌、水素酸化細菌が最も多い割合で存在した。これらの細菌の存在は、還元的脱塩素化と同時に好氣的共代謝による脱塩素化が行われていたことが示唆された。*Dehalococcoides* 属が属する *Dehalococcoidetes* 綱は、WPE 注入前後において地下水中の微生物群集組成全体に占める割合は少なかった。土壌では、WPE 注入後 103 日目に *Gammaproteobacteria* 綱および *Betaproteobacteria* 綱が優勢となった。*Gammaproteobacteria* 綱の主要な種は乳酸を分解して増殖する *Pseudomonas* 属であった。これは WPE 中の乳酸分解により水素が発生し、脱塩素菌に利用された可能性を示唆している。206 日目の土壌には、*Deltaproteobacteria* 綱と *Nitrospira* 綱が最も多く存在し、*Nitrospira* 綱の細菌種の多くは好気性硝化細菌であった。*Dehalococcoides* 属細菌が属する *Dehalococcoidetes* 綱は、WPE 注入前に 2.6% であったが、206 日目では 11.6% と増加した。これらの結果は、これらの細菌がクロロエテンの脱塩素化に直接的または間接的に関与している可能性を示唆しており、WPE 注入により還元的脱塩素化のみならず嫌気的および好氣的共代謝分解も促進される可能性があると考えられた。

ワイン搾りかす抽出物を用いたクロロエテン類汚染地の原位置バイオレメディエーション実施判断の効率化の評価を行った。6 つの汚染地に対し水質環境の測定と脱塩素化試験を行い、自然減衰の兆候を確認することでワイン搾りかす抽出物を用いた嫌気性バイオレメディエーションの適用可否を判断できるか検証した。その結果、自然減衰の兆候を表す各

## 様式4（公表用）

種指標のうち、*Dehalococcoides* 属細菌が存在しない、pH が 6.0 未満、硝酸塩濃度が高い場合、ワイン搾りかす抽出物を用いた嫌気性バイオレメディエーションの適用は困難と判断することが妥当であった。しかし、現状では、汚染地データの母数が少ないため、今後データを収集してより信頼性のある判断方法を確立していく必要がある。

以上より、WPE に含まれる乳酸や酒石酸などの有機酸が水素供与体となりクロロエテン類の脱塩素化に有効であった。また、フィールド実証試験では WPE を土壤に注入すると、WPE に含まれる乳酸が *Gammaproteobacteria* 綱の *Pseudomonas* 属細菌によって分解され、水素が生成されると言える。生成した水素は、*Deltaproteobacteria* 属の硫酸還元菌および硫黄還元菌、*Dehalococcoidetes* 属の *Dehalococcoides* 属、*Betaproteobacteria* 属の *Aquabacterium* 属による還元脱塩素化や *Hydrogenophaga* 属による共代謝分解に利用されることが明らかとなった。

### 論文審査結果の要旨

博士論文公聴会において、口頭発表と質疑応答（60分）、その後に審査員全員による最終試験が実施された。本論文は、「ワイン搾りかすを利用したクロロエテン類汚染土壤に対するバイオレメディエーションの効果」と題し、6章より構成されている。

第1章では、土壤汚染の概要や、クロロエテン類の嫌気性バイオレメディエーションやワイン搾りかすの利活用の現状について整理し、本研究の目的について記している。

第2章では、WPE の製造方法および性状分析について検証した。WPE の作成方法については、ワイン搾りかすの前処理としてのすり潰しは有効性が低いことや、アルカリ浸漬期間は4週間が最適であることを明らかにした。

第3章では、クロロエテン類の脱塩素化におけるワインの搾りかす抽出物の効果について、WPE、WPE 分画産物および、カルボン酸類を用いた PCE 分解試験を実施した。その結果、WPE に含まれる L-乳酸と L-酒石酸は、嫌気性微生物によるクロロエテン類の分解で水素供与体として機能することについて示した。

第4章では、実際の汚染現場においてクロロエテン類の脱塩素化における WPE の効果を確認するため、フィールド実証試験による WPE の有効性の評価を行った。現場における実証試験は、TCE が土壤に漏出してから少なくとも20年が経過している工場跡地で実施した。WPE 注入後、すべての井戸で 12DCE と VC の濃度が一旦上昇した後に減少し、*Dehalococcoides* 属細菌の数が増加した。WPE を水素供与体として用いた TCE の分解においても、嫌気性微生物による脱塩素化反応が機能したと考えられる。地下水と土壤の微生物群集の組成変化について分析を行った。地下水では、還元的脱塩素化と同時に好氣的共代

#### 様式 4 (公表用)

謝による脱塩素化が行われていた。土壌では、WPE 注入後、細菌がクロロエテンの脱塩素化に直接的または間接的に関与している可能性を示唆しており、WPE 注入により還元的脱塩素化のみならず嫌気的および好氣的共代謝分解も促進される可能性について記している。

第 5 章では、ワイン搾りかす抽出物を用いたクロロエテン類汚染地の原位置バイオレメディエーション実施判断の効率化の評価を行った。6 つの汚染地に対し水質環境の測定と脱塩素化試験を行い、自然減衰の兆候を確認することでワイン搾りかす抽出物を用いた嫌気性バイオレメディエーションの適用可否を判断できるか検証した。その結果、自然減衰の兆候を表す各種指標のうち、*Dehalococcoides* 属細菌が存在しない、pH が 6.0 未満、硝酸塩濃度が高い場合、ワイン搾りかす抽出物を用いた嫌気性バイオレメディエーションの適用が困難と判断することが妥当であると記載されている。

大橋貴志氏は博士(農学)の学位にふさわしい基礎・専門知識に加えて、優れた課題解決能力を有しているものと判断した。これまで企業の社員として仕事と研究の両立で培われた発表能力および質疑応答能力は優れており、高いレベルであった。筆頭著者として国際学術論文 2 報および国内学術論文 1 報を発表しており、国内の学会や研究集会で継続して研究報告を行っている。担当した審査員全員の合意のもと、本論文は博士(農学)の学位論文として相応しい内容であると認め、最終試験に合格と判定した。