

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

山梨大学大学院  
医工農学総合教育部  
博士課程学位論文

2023年9月

大橋 貴志

# 目次

第1章 緒論 .....	1
1. 1  土壤・地下水汚染について .....	1
1. 1. 1  土壤・地下水汚染の背景 .....	1
1. 1. 2  国内の環境関連の法規制と土壤汚染対策法の概要 .....	3
1. 1. 3  土壤汚染対策法における規制対象物質 .....	4
1. 1. 4  今後の土壤汚染対策のあり方 .....	6
1. 2  クロロエテン類汚染の対策技術とバイオレメディエーション（分解微生物） .....	8
1. 2. 1  クロロエテン類汚染の特徴 .....	8
1. 2. 2  クロロエテン類汚染の対策技術 .....	9
1. 2. 3  クロロエテン類汚染の嫌気性バイオレメディエーション .....	11
1. 3  ワイン搾りかすの現状 .....	13
1. 4  本研究の目的と構成 .....	14
第2章 バイオレメディエーションを行うためのワイン搾りかす抽出物（WPE）の開発 .....	25
2. 1  はじめに .....	25
2. 2  方法 .....	25
2. 2. 1  WPE の製造 .....	25
2. 2. 2  WPE の化学的性質 .....	27
2. 3  結果 .....	28
2. 3. 1  WPE の製造 .....	28
2. 3. 2  WPE の化学的性質 .....	29
2. 4  考察 .....	30
第3章 クロロエテン類の脱塩素化におけるワイン搾りかす抽出物の効果 .....	40
3. 1  はじめに .....	40
3. 2  方法 .....	41
3. 2. 1  試薬と材料 .....	41
3. 2. 2  WPE の分画方法 .....	41
3. 2. 3  テトラクロロエチレン(PCE)分解試験で使用する微生物群の取得方法 .....	41
3. 2. 4  PCE 分解試験 .....	41

3. 2. 5	ガスクロマトグラフィー(GC) 分析.....	42
3. 2. 6	統計解析.....	42
3. 3	結果.....	43
3. 4	考察.....	44
第4章	クロロエテン類汚染現場へのワイン搾りかす抽出物の適用.....	50
4. 1	はじめに.....	50
4. 2	方法.....	52
4. 2. 1	試薬と材料.....	52
4. 2. 2	WPE の実汚染現場の適用性試験.....	52
4. 2. 3	実汚染現場の概要.....	52
4. 2. 4	実汚染現場のレイアウトと実施内容.....	52
4. 3	結果.....	54
4. 3. 1	WPE の実汚染現場への適用性を評価するための適用性試験.....	54
4. 3. 2	実汚染現場の概要.....	54
4. 3. 3	<i>Dehalococcoides</i> 属細菌数の変化.....	55
4. 3. 4	地下水と土壌の微生物群集組成.....	55
4. 4	考察.....	56
第5章	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.....	68
5. 1	はじめに.....	68
5. 2	方法.....	69
5. 3	結果.....	70
5. 4	考察.....	71
総論	.....	74
論文内容の要旨	.....	76
SUMMARY OF DISSERTATION.....		78
引用文献.....		81
公表論文.....		89
謝辞.....		90

略語一覧

1,2-DCE : 1,2-ジクロロエチレン (1,2-Dichloroethylene, 1,2-Dichloroethene)

DELCD : 乾式電気伝導度検出器 (Dry Electric Conductivity Detector)

DNAPL : 高密度非水相液体 (Dense Non-Aqueous Phase Liquid)

EC : 電気伝導率 (Electrical Conductivity)

GC : ガスクロマトグラフ (Gas Chromatograph)

LC/MS/MS : 液体クロマトグラフ／タンデム質量分析装置  
(Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometer)

MS : 質量分析計 (Mass Spectrometer)

ORP : 酸化還元電位 (Oxidation-Reduction Potential)

PCE : テトラクロロエチレン (Tetrachloroethylene, Tetrachloroethene)

PID : 光イオン化検出器 (Photo Ionization Detector)

SS : 懸濁物質 (Suspended Solids)

TCE : トリクロロエチレン (Trichloroethylene, Trichloroethene)

TOC : 全有機炭素 (Total Organic Carbon)

VC : クロロエチレン、塩化ビニル (Chloroethylene, Chloroethene)

WPE : ワイン搾りかす抽出物 (Wine Pomace Extract)

## 第1章 緒論

### 1.1 土壌・地下水汚染について

#### 1.1.1 土壌・地下水汚染の背景

土壌は、地中にいる生物が生活する場であり、我々が生きるために必要な農作物を作る場として非常に重要なものである。土壌汚染とは、こういった働きを持つ土壌の中に有害物質（有機溶剤・重金属・油・農薬など）が浸透もしくは混入している状態をいい、何もせずに放置していれば、ヒトへの健康被害だけでなく農作物や植物の生育にも影響を与える可能性がある(張銘, 2019)。

近代において土壌汚染が顕在化したのは明治時代で、当時日本の主要産業であった鉱山採掘による「鉱害」である。その代表的なものは、足尾銅山（栃木県）・別子銅山（愛媛県）・日立鉱山（茨城県）・小坂鉱山（秋田県）で発生した「4大鉱害事件」である。特に有名なものが19世紀後半の明治時代初期に発生した「足尾銅山鉱毒事件」である。これは、足尾銅山から排出された鉱毒ガス・鉱毒水などの鉱毒が鉱山周辺の土壌や河川・海域を汚染して、ヒトへの健康被害（死者・死産は推計 1,000 名強）を含めて甚大な被害が生じた事件である(北川隆司, 2006)。その後、日本は2度の世界大戦を経て1950年代後半から60年代にかけて、重化学工業化が推進され、経済が高度成長を遂げる過程において、工場から排出される有害物質により水や大気などが汚染され、健康への深刻な被害を及ぼす産業公害が日本各地で頻発した。この時期に発生したのが戦後起きた公害の中で、最悪かつ多大な被害を及ぼした4大公害事件である。4大公害事件とは以下の4つの地域で発生した事件で、それぞれで特有の公害病が知られている(環境庁, 1973)。

- ① 水俣病（第一水俣病）：熊本県の水俣湾で発生したメチル水銀化合物による汚染
- ② 新潟水俣病（第二水俣病）：新潟県阿賀野川流域で発生したメチル水銀化合物による汚染
- ③ イタイイタイ病：富山県神通川流域で発生したカドミウムによる汚染
- ④ 四日市ぜんそく：三重県四日市市で発生したコンビナートからの排煙による大気汚染

いずれの事件も環境だけでなく、ヒトの健康に重大な影響を与え、大きな社会問題になったものであるが、その中でも、水俣病はメチル水銀化合物に汚染された魚介類を摂取することで中毒性の神経系疾患が発症して(Fig. 1-1)、後遺症が残るなど人体に深刻な影響を与えたことから、被害者の救済制度として1969年（昭和44）に法律に基づく認定制度が発足し、認定患者には補償協定に基づいて汚染原因企業から医療費や補償費が支給されることになった(新潟県, 2020)。また、認定はされないものの、水俣病被害者救済特別措置法（平成21年施行）による救済対象者など水俣病にもみられる症状を有する被害者に対しては、国の水俣病総合対策医療事業に基づく療養費などが国、県から支給されている。

明治期の4大鉱害事件や昭和の高度成長に伴う4大公害事件が発生したあと、公害対策基本法（1967年8月3日公布、同日施行）が施行され、1970年の「公害国会」といわれる第64臨時会（臨時国会）において、典型7公害（大気汚染、水質汚濁、土壌汚染、騒音、振動、地盤沈下、悪臭）に対して公害関係法律14法が制定および改正が行なわれ規制が厳しくなり、環境汚染は落ち着くかに見えた。しかし、1980年代になるとエレクトロニクス産業が活性化して煙の出ない工場において揮発性有機化合物による土壌・水質汚染が顕在化しつつあった(平田健正, 2002)。これに先立ち、1970年代後半に半導体工場が集中する米国カリフォルニア州のシリコンバレーで、半導体の洗浄に使う1,1,1-トリクロロエタンやトリクロロエチレン(TCE)などのクロロエテン類による地下水汚染が発生した。この地下水を飲用していた付近住民に流産や先天性奇形などの健康被害が引き起こされ(鈴木茂, 1989)、ハイテク産業による地下水汚染として「ハイテク汚染」とも言われた。米国では1980年初頭には米国でスーパーファンド法による土壌・地下水汚染の修復と革新技術の開発が開始されていた。同時期の日本は、半導体や精密機器を大量に生産し、洗浄剤としてのTCEなどの使用目的や方法が米国とほぼ同じであり、シリコンバレーで発見された土壌・地下水汚染と同様の汚染の存在が予想されていた。このような当時の状況で、1982年に全国15の都市で1360検体の地下水を採取する全国規模の地下水汚染調査が実施された。その結果、テトラクロロエチレン(PCE)やTCEなどの揮発性有機塩素化合物が現在の環境基準に照らして全試料のうち3~4%が基準不適合という衝撃的な状況であることが明らかとなった(一般財団法人日本バルブ工業会, 2004; 環境省, 2022; 平田健正, 2008)。

このような状況を鑑み、土壌環境基準や地下水環境基準が整備され、これらの環境基準を担保する調査・対策技術の開発・普及が進められることとなった。

### 1. 1. 2 国内の環境関連の法規制と土壤汚染対策法の概要

Fig. 1-2 に現在の国内の環境関連の法規制体系を示す。複雑化・地球規模化する環境問題に対応できないことから公害対策基本法が廃され、1993 年新たに環境基本法が制定された。

環境基本法の施行時、土壤汚染に関わる環境基準は定められていたものの、これはあくまで環境行政上の望ましい値であり、その遵守に対して法的強制力はなく、汚染した土壤（土地）を修復するための法律は、農用地を対象にした農用地土壤汚染防止法（1971 年施行）のみであった。同じく土壤汚染に対応するための法律として水質汚濁防止法があったが、これは土壤汚染の未然防止を目的としたもので、既に発生した汚染への対策は対象外であった。その後、土壤汚染が判明する事例が増加して社会問題としてクローズアップされてきたこと、土壤汚染対策の実施例の増加によりそのルール化の必要性が認識されてきたことといった土壤汚染をめぐる社会的状況の変化から、土壤汚染対策の法制化の機運が高まってきた。そこで、2003 年 2 月 15 日に市街地（住宅地、商用地、工業用地）の土壤汚染に対応する法律として、土壤汚染対策法が施行された。同法では土壤汚染状況の把握及び土壤汚染によるヒトの健康被害の防止に関する措置等について土壤汚染対策の実施を図ることにより、国民の健康を保護することを目的としている。2023 年年 6 月現在、特定有害物質として 26 物質が指定され、地下水の摂取等によるリスク及び直接摂取によるリスクに対し、それぞれ土壤溶出量基準、土壤含有量基準が定められている。

### 1. 1. 3 土壤汚染対策法における規制対象物質

土壤汚染対策法で規制されている物質は特定有害物質と呼ばれ、第1種特定有害物質（揮発性有機化合物）、第2種特定有害物質（重金属類）、第3種特定有害物質（農薬、PCB）の3つに分類され、26物質（27項目）ある。Table 1-1に、土壤汚染対策法の規制物質の規制基準値およびこれらの主な用途を示す(環境省, 2017)。

第1種特定有害物質は、ベンゼン以外は塩素系の有機溶剤であるクロロエテン類である。用途は、化学製品製造時の溶剤や金属製品工場やクリーニング工場で用いる洗浄剤などである。クロロエテン類は、偶発的な流出事故や過去の不適切な除去作業により、地下水の中で頻繁に検出される。工業用洗浄液や脱脂剤には、こうした塩素化炭化水素が含まれていることが多く(Rajajayavel, Ghoshal, 2015)、先進国を中心に産業界で広く採用されていたが、その発ガン性が指摘され、使用・生産が制限されている。

第2種特定有害物質は、重金属類であるがシアンも重金属類ではないが第2種に含まれる。用途はメッキ、電気部品、薬品、防腐剤、殺虫剤、農薬などである。

第3種特定有害物質は、4つの農薬と変圧器・コンデンサの絶縁油などとして使われたポリ塩化ビフェニル（PCB）である。

地下水基準は地下水を飲み水としてヒトが摂取する際の健康リスクを考慮して設定されている。土壤溶出量基準は土壤中の有害物質が地下水中に溶け出し、地下水中に溶け出した有害物質を飲み水としてヒトが摂取する際の健康リスクを考慮して設定されている。これら2つは水道水の水質基準と同等の値を用いている。また、土壤含有量基準は汚染された土壤が飛散したり、触れたりすることによって生ずる直接摂取による健康リスクを考慮して設定されている。この値もヒトが一生（70年間）汚染された土地に住み続けても、ヒトの健康影響がでないレベルに設定されている。

土壤汚染には自然由来と人為由来がある。自然由来の汚染とは、自然の岩石や堆積物に含まれているカドミウム、鉛、六価クロムなど第2種特定有害物質（重金属類）による土壤汚染のことである。2000年4月に土壤汚染対策法が改正され、自然由来の汚染も対象となった。日本には日本には火山が多く、様々な鉱脈・鉱床が発達しているため、市街地の海成堆積物から重金属が溶出することもあり、全国に汚染地が存在する。

人為由来は、ヒトの経済活動に伴って発生する汚染で、物質も第1種から第3種特定有害物質まで様々である。これらの物質は、当初は規制もなく使用されていたものが多く、漏洩しても回収をしない、敷地内にそのまま埋め立てて廃棄するなどで汚染を発生させた事例が多数ある(花嶋正孝 et al., 1996; 平田健正, 2003)。

環境省では毎年度、都道府県等が把握した土壤汚染事例数を公表している(環境省, 2023)。これによると、2022年度(令和3年度)末までの土壤汚染調査事例数の累計は36,589件で、うち基準不適合事例は16,466件に上っている。また、このうち、土壤の汚染状態が指定基準を超過し、要措置区域等に指定された件数は要措置区域275件、形質変更時届出区域3,299件となっている。

一般社団法人土壤環境センターでは、同センターに所属する土壤汚染調査・対策事業を行っている会員企業の協力を得て、毎年、土壤汚染調査・対策事業の受注件数、受注高等の実績をとりまとめ公表している。これによると、2022年度(令和3年度)の土壤汚染調査・対策事業受注実績受注件数4,612件、受注高887億円となっている(一般社団法人土壤環境センター, 2021)。

また、埋立地におけるによる重金属汚染も問題となっている(阿南修司 et al., 2007; 打木弘一 et al., 2014)。2000年4月に土壤汚染対策法が改正で埋立てに起因する土壤汚染は人為的原因による土壤汚染として扱われることになった。近年では2025年に開催予定の大阪万

博予定地の夢洲（ゆめしま）での土壌汚染がある。夢洲は現在の環境基準が定められた 2003 年以前に自然界に遍在するヒ素・フッ素等が含まれる海底のしゅんせつ土などで埋め立てられたため、土壌の一部は基準に適合しないという(大阪港湾局, 2021)。

土壌汚染対策法では、岩石は対象外であるため、トンネル工事で発生する掘削ズリは土壌汚染対策法の対象外ではあるが、これもいわば人為的汚染であり、その運搬や活用においては適正な対応が求められている(須藤孝一 et al., 2010)。

#### 1. 1. 4 今後の土壌汚染対策のあり方

地球規模の課題である気候変動問題の解決に向けて、2015年にパリ協定が採択され、世界共通の長期目標として、世界的な平均気温上昇を工業化以前に比べて2℃より十分低く保つとともに、1.5℃に抑える努力を追求すること（2℃目標）や、今世紀後半に温室効果ガスの人為的な発生源による排出量と吸収源による除去量との間の均衡を達成すること等を合意された。この実現に向けて、SDGsの取組など、脱炭素に代表される持続可能な社会システムの構築へ世界が取組を進めており、120以上の国と地域が「2050年カーボンニュートラル」という目標を掲げている(環境省, 2021)。

政府は、産業政策・エネルギー政策の両面から、成長が期待される14の重要分野についての実行計画である「2050年カーボンニュートラルに伴うグリーン成長戦略」を策定した。また、東京都では、「2030年カーボンハーフ」を表明するとともに、「ゼロエミッション東京戦略 2020 Update & Report」を策定し、国内外のあらゆる主体に行動の加速を呼びかけている。

気候変動への取り組みが様々な分野で進められる中、土壌汚染対策においても、アメリカ環境保護庁(U.S. EPA)は2021年に気候変動を考慮した土壌汚染対策のマニュアル「Climate Smart Brownfields Manual (U.S. EPA 2021)」を公表した(USEPA, 2021)。このマニュアルは、従来から取り組まれていた浄化対策におけるCO<sub>2</sub>排出量の削減だけでなく、土壌汚染調査から浄化対策、搬出・処理、浄化後の土地の再開発における建物やインフラ整備まで、幅広く気候変動の影響を緩和し、また甚大化する自然災害に適応するような取り組みを紹介している。今後、日本国内での土壌汚染対策においても、このような気候変動に対応した行動が求められると考えられる。

現在、日本国内での土壌汚染対策では、一般的に掘削除去等の対策が実施されることが多いが、搬出する汚染土壌の運搬・処理に大量のエネルギーが使用されるとともに、埋戻し土壌に山砂が使用されることで自然環境に影響を与えており、脱炭素の流れとは逆行している。既報によると、また、掘削除去は環境負荷が大きいだけでなく、対策費用が高額となり、土地取引の負担になるばかりか、土地の利活用が阻害され、いわゆる塩漬け土地と言われるブラウンフィールドの発生につながる可能性も懸念される。

したがって、掘削除去による土壌汚染対策が多くの現場で行われていくことは、環境面・経済面・社会面から見て持続可能とは言えない状況であり、今後は、ヒトの健康被害の防止が確実に図りつつ、環境面・経済面・社会面に配慮した持続可能な土壌汚染対策を実現していくことが大切になってきている。

このような中、東京都では以下の「土壌の3Rとは」が提案されている(東京都環境局, 2022)。

**Reduce** : 土壌の場外搬出入量の削減(掘削範囲の最小化、基準適合土壌の分別管理等)

**Reuse** : 土壌の資源活用(適正な管理の下での盛土利用等)

**Remediation** : 原位置浄化、現場内浄化等

また、グリーン・レメディエーション、サステイナブル・レメディエーションのような概念が提案され取り組みがなされ始めている(Fig. 1-3)。

今後、持続可能な社会構築を考慮した原位置浄化技術などを主体とした土壌浄化対策の重要性が増すものと思われる。

**GR (Green Remediation : グリーン・レメディエーション)**

土壌汚染に伴うヒトの健康リスクや生態リスクだけではなく、土壌汚染対策自体に伴

い発生する外部環境影響負荷を考え、さらにそれを低減するための取組みのこと。外部環境負荷の指標としては、CO<sub>2</sub>等の排出、ガソリン等のエネルギー消費などが用いられる。

**SR (Sustainable Remediation : サステイナブル・レメディエーション)**

環境面だけでなく、社会及び経済的側面も統合的に考慮し、最適で合理的な土壌汚染対策を選定する土壌・地下水汚染対策の新しい取組。社会的な要素（地域住民や労働者のヒトの健康影響、事故等の安全性、地域コミュニティへの影響）、経済的な要素（直接コスト、間接コスト、残存する経済的なリスク）等を含めて評価対象としている。

## 1.2 クロロエテン類汚染の対策技術とバイオレメディエーション(分解微生物)

### 1.2.1 クロロエテン類汚染の特徴

本研究で対象にしているクロロエテン類は、第1種特定有害物質のうちベンゼンを除く分子構造に塩素原子を持つ物質であり、特にPCE、TCE、およびその分解生成物である1,2-ジクロロエチレン(12DCE) (*cis*-1,2-ジクロロエチレンと *trans*-1,2-ジクロロエチレンの合算)、クロロエチレン(VC)である。VCは沸点が-33.4℃で常温では気体であり、それ以外のクロロエテン類は常温では液体であるものの沸点が約30~120℃と揮発性が高く、ガス化しやすい。近年、いったん土壤に漏洩したクロロエテン類がガス化して再び建物の中に侵入し室内大気を汚染する蒸気侵入という事例も報告されている(Ma et al., 2020)。また、クロロエテン類は可溶性のDNAPL(高密度非水相液体)であり、VC以外は水より比重が大きいため土壤へ漏洩した場合、帯水層の底に到達するまで土壤に浸透する。また、土壤への吸着性も低いので地下水の下流方向に約1,000 m先まで到達するとされており(環境省, 2019)、クロロエテン類は鉛直方向にも水平方向にも拡散しやすい性質がある(Fig. 1-4)。

クロロエテン類は土壤地下水中で環境条件が整えば、土着の微生物により生分解されることが報告されている。しかし、これらの化合物の半減期は、通常、他の揮発性有機化合物よりも長い(Saiyari et al., 2018)、その分解速度は非常に遅く数十年単位で汚染が残存する例も珍しくない。

## 1. 2. 2 クロロエテン類汚染の対策技術

クロロエテン類汚染の対策には、揮発性が高いことや生分解性があるなどの物質特性に応じた対策技術が用いられる。Fig. 1-5 にクロロエテン類に対する主な浄化技術を示す。クロロエテン類を浄化する土壌汚染の除去は、掘削して処理する技術と原位置で処理する技術に大別できる。その他には、暴露経路遮断としての拡散防止や、暴露経路監視として、地下水質を監視する方法がある。嫌気性バイオレメディエーションは原位置でクロロエテン類を微生物により分解する技術である。

### (1) 各対策技術の概要

#### 1) セメント原料化

セメント工場にて、セメントの原料として使用する。汚染土壌は分級などを行い、「原料工程」もしくは「焼成工程」に投入され、全て、キルンと呼ばれる焼成炉の中で 1450℃ の高温で処理される(一般社団法人セメント協会, 2019)。

#### 2) 化学的処理

##### ①金属系還元剤注入・混合

土壌に鉄系還元剤(還元鉄粉など)を注入もしくは混合し、還元反応により有機塩素化合物を脱塩素化させ、無害な物質まで還元分解する方法。分解生成物である 12DCE や VC が発生するが、鉄粉の種類によっては発生しないものが開発されている。

##### ②酸化剤混合注入・混合

土壌に酸化剤(過酸化水素、過硫酸)および触媒を注入もしくは混合し、酸化反応により有機塩素化合物を脱塩素化させ、無害な物質まで酸化分解する方法。酸化剤は、過酸化水素や過硫酸塩がある。例えば、過酸化水素と鉄触媒を用いた場合、強力な酸化物質である OH<sup>•</sup>ラジカルを発生させ、クロロエテン類を分解でき、分解生成物である 12DCE や VC が発生しない。

#### 2) 物理的処理

##### ①生石灰混合

土壌に生石灰を混ぜて、気石灰が土壌中の水分と反応して発熱することを利用し土壌を 100℃ 前後まで加熱し、クロロエテン類を揮発させ、このガス化したものを活性炭で吸着し回収する方法。活性炭は専用施設で再生処理されるが、その過程で回収したクロロエテン類は焼却処分される。

##### ②揚水処理

汚染地下水を揚水井戸から汲み上げて、地上部のばっ気装置でガス化させて活性炭で吸着・回収する方法(Speight, 2020)。この他にも、揚水した地下水とマイクロバブルオゾンと接触させてその場で分解する処理方法もある。

##### ③土壌ガス吸引

不飽和土壌中に吸引井戸を設置し、土間隙にガス化して滞留しているクロロエテン類を、土壌ガスとして地上に設置したポンプで吸引して、活性炭で吸着・回収する処理方法。

#### ④二重吸引

1 つの井戸から地下水と土壌ガスを同時に吸引除去する技術である。揚水した地下水中の対象物質を分解あるいは曝気処理し、土壌ガスに含まれる対象物質は活性炭等に吸着させて除去する処理方法。汚染物質が地下水面付近に存在する場合に効果的である。地下水が高濃度に汚染された現場では、エアースパーキング工法と併用すれば、さらに効果的である。

#### ⑤エアースパーキング

土壌にエアを注入し、土壌中のクロロエテン類をガス化させ、土壌ガス吸引を用いて回収する処理方法である。

### 3) 生物学的処理

クロロエテン類を分解する嫌気性微生物を用いた嫌気性バイオレメディエーションである。土着のクロロエテン類分解微生物を用いるバイオスティミレーションと、外部で培養した外来の分解微生物を用いるバイオオーグメンテーションがある。いずれも水素供与体を供給することで、微生物の脱塩素化反応を促進する。

## (2) 主な対策技術の課題

Fig. 1-6 に主な対策技術の特徴や概念図を示す。掘削-処理は比較的高濃度の汚染土壌にも適用できる。さらに高濃度の場合は、埋め立て処分場で埋め立てる。この方法は、多くの場合、掘削した汚染土壌に代わり清浄土壌を埋め戻すので浄化効果も確実である。ただし、稼働中事業場で建物や地下埋設物を利用中の場合は、当然ながら適用ができない。さらに、掘削-処理する方法は、コストや環境負荷が高い。また、汚染土壌の拡散防止の観点から、環境省からは掘削除去を抑制的に取り扱うよう通知（通知の記の第4の1(6)④ア）がなされている。

このようなことから、掘削をしない原位置浄化が注目されている。原位置処理は掘削にくらべ高濃度汚染には適用できないものの、コストや環境負荷が低い。しかし、掘削処理に比べ、浄化の確実性が低く、浄化に数カ月から数年と時間を要するため、土地の利用時期が決まっていて工期が短い場合などでは適用が見送られる場合が多い。

### 1. 2. 3 クロロエテン類汚染の嫌気性バイオレメディエーション

#### (1) バイオレメディエーションの種類 (好気性、嫌気性)

バイオレメディエーションでは、好気性微生物を用いる場合と嫌気性微生物を用いる場合があり、クロロエテン類汚染に対しては後者が用いられることがほとんどである。過去に好気性微生物によるクロロエテン類の分解が検討されたが、好気性代謝分解では PCE など高塩素化クロロエテン類の分解が困難であること(Bertolini et al., 2023; Dolinová et al., 2017)や、共代謝を用いた分解の場合は、共代謝物質として可燃性のメタンガスやブタンガスを供給する必要がある(Dolinová et al., 2017)などの課題があり、日本国内では普及には至っていない。一方、嫌気性微生物を用いる嫌気性バイオレメディエーションでは、PCE を含めたクロロエテン類を無害なエチレンやエタンまで分解できるため広く普及している(Dutta et al., 2022)。

#### (2) 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

また、バイオレメディエーションには、土着の微生物を活性化させるバイオスティミュレーションと、外部で培養した分解微生物を現地に注入するバイオオーグメンテーションがある。クロロエテン類汚染の嫌気性バイオレメディエーションにおいても、両方の技術が開発されているが、バイオスティミュレーションが適用されることが多い。

バイオオーグメンテーションは、環境省と経済産業省が共同で事業者に対しバイオオーグメンテーション事業の発展及び環境保全に資することを目的として、生態系等への影響に配慮した適正な安全性評価及び管理手法のための基本的な考え方を「バイオレメディエーション利用指針 (平成 17 年 3 月)」として公表し、指針に適合しているかを大臣が確認する制度を導入している。2023 年 5 月時点で、11 件が確認され、うち 5 件がクロロエテン類を対象としたものである。

#### (3) クロロエテン類の分解機構

嫌気性条件下では、嫌気性呼吸の際に硫酸イオンなどの電子受容体を用いてクロロエテン類を二次的に脱塩素化する共代謝と、クロロエテン類を電子受容体として直接利用する還元的脱塩素化呼吸の二つの反応により脱塩素化が起これと考えられている(Maymo-Gatell et al., 1999)。還元的脱塩素化反応による分解は、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と同じである。Fig.1-7 に嫌気性バイオレメディエーションにおけるクロロエテン類の還元的脱塩素化反応により分解機構の概要図を示す。

クロロエテンの分解は、嫌気性微生物が有機酸などの水素供与体を電子供与体、PCE などのクロロエテン類を電子受容体として分解して生成した水素を用いてジクロロエテンやクロロエテンをエテンに順次脱塩素化し、無毒化する(Dolinová et al., 2017)。

#### (4) クロロエテン類分解微生物および水素供与体

*Desulfuromonas* 属細菌、*Dehalobacter* 属細菌、*Desulfitobacterium* 属細菌、*Enterobacter* 属細菌および *Sulfurospirillum* 属細菌を含む様々な嫌気性属は、乳酸、ピルビン酸、ギ酸、および酢酸などの電子供与体/固定炭素源の存在下で PCE を 12DCE に脱塩素化できる(Finneran et al., 2002; Holliger et al., 1998; Krumholz et al., 1996; Scholz-Muramatsu et al., 1995; Sharma,McCarty, 1996)。12DCE のエチレンへのさらなる脱塩素化は、*Dehalococcoides* 属細菌においてのみ報告されている。*Dehalococcoides* 属は *Dehalococcoidia* 綱に属し、PCE と TCE を非毒性代謝物であるエチレンに完全に還元脱塩素化することができる(Maymo-Gatell et al., 1999)。ゲノム解読により、*Dehalococcoides* は、炭素源として酢酸、電子供与体として水素、

電子受容体としてハロゲン化合物を必要とする偏性嫌気性菌であることが明らかになった(Löffler et al., 2000)。水素供与体としてはギ酸、酢酸、グルコース、メタノール(Freedman, Gossett, 1989; Pavlostathis, Zhuang, 1993)、乳酸(DeBruin et al., 1992)などの単一基質、食品副産物である懸濁植物油、糖蜜油(Newman, Pelle, 2006)、糖蜜、乳清(DiStefano et al., 2001; Macbeth et al., 2006)など様々なものが報告されている。これらの水素供与は室内試験で効果を確認されたものは多いが、実際のフィールドで実証または適用されたものは限られる。また食品副産物を利用したものは知見が少ない。

クロロエテンの脱塩素化は、単一の細菌による分解ではなく、微生物のコンソーシアムによる分解で進行する(Li et al., 2021)。実際の地下水・土壌汚染現場では、複数種のクロロエテン類が混在していることが多く、そのような現場では、複数のクロロエテン類分解菌が関与しているため、分解が進みやすいと考えられる。しかし、実際の汚染現場でバイオレメディエーションを実施した場合、必ずしも分解が進まない。これは、クロロエテン分解菌の相互作用に関する知見が不足しているためと思われる。

### 1.3 ワイン搾りかすの現状

#### (1) 背景

地球規模の課題である気候変動問題の解決に向けて、2015年にパリ協定が採択され、世界共通の長期目標として、世界的な平均気温上昇を工業化以前に比べて2℃より十分低く保つとともに、1.5℃に抑える努力を追求すること(2℃目標)や、今世紀後半に温室効果ガスの人為的な発生源による排出量と吸収源による除去量との間の均衡を達成すること等を合意された。この実現に向けて、世界が取組を進めており、120以上の国と地域が「2050年カーボンニュートラル」という目標を掲げている(環境省, 2021)。

食品産業におけるカーボンニュートラルの取り組みは、製造設備の省エネルギー化、クリーンエネルギーへの転換、環境に配慮した部品・原材料への切り替えなどがあるが、食品製造時に発生する食品製造副産物(食品廃棄物)の削減の取り組みも重要である。これらの多くは有効利用されることなく、運搬や焼却の際に二酸化炭素の排出源となっている。このため、発生量の削減のほか、これらを肥料、飼料、化学品、建築等資材、食品素材、燃料などへ有効活用する検討が進められている。

#### (2) ワイン搾りかすの概要

ワイン醸造は、水、肥料、有機肥料など多くの資源を必要とし、大量の廃棄物や副産物を発生させる。例えば、ワイン1本(720mL)は、約1kgのブドウを醸造して製造され、0.2~0.3kgのブドウかす(以下、ワイン搾りかす)が副産物として発生する(Fig.1-8)(Antonić et al., 2020)。ここで、白ワインは果実を搾ってから発酵させるが、赤ワインはブドウを大きな容器に入れ発酵させてから搾るため、赤白とも果皮や果肉、種、梗が残るが、赤ワインは発酵済みの搾りかすである点異なる。

ワイン醸造時に発生するワイン搾りかすは大部分が廃棄処分され有効活用されていない。そのため、この副産物の持続可能な利用方法を提案することは重要である。ワイン搾りかすは、ブドウの果梗、果皮、種子からなり、その主成分は水分(50~72%)である。ワイン搾りかすの成分は、ブドウ品種や醸造方法によって大きく異なるが、エタノール、カルボン酸(酒石酸やクエン酸などの有機酸やフェノール酸)、グレープシードオイル、食物繊維などを含む(Bravo, Saura-Calixto, 1998; Hang, 1988; Nurgel, Canbas, 1998)。

従来、ワイン搾りかすは、グラッパ、グレープシードオイル、肥料、飼料として利用されてきた(Bordiga et al., 2015)ものの、質の不均一性、供給量の不安定性、集約の困難さから大部分が有効利用されていない。近年、ワイン搾りかすの有効活用に関する研究が多く行われている。エネルギーや燃料のためのバイオマスとしての利用や、ポリフェノールなどの未利用生理活性物質の有効利用が検討されている(Arvanitoyannis et al., 2006; Beres et al., 2017; Sirohi et al., 2020)。

ワイン搾りかすを環境修復に利用する研究も本格的に進められている(Kalli et al., 2018)。ワイン搾りかすを多孔質炭素に変換して廃水中の重金属を吸着させ、有害物質を処理する試みがなされている(Nayak et al., 2016)。Yangらは、ブドウの搾りかすを用いたコンポストのような原始的な(人為的な塩素系溶剤の影響を受けていない)生息環境では、有機ハロゲン化合物反応性細菌が生息することを報告している(Yang et al., 2017)。

## 1.4 本研究の目的と構成

クロロエテン類による汚染は国内だけでなく世界共通の課題である。掘削除去は確実に早く汚染を除去できるものの、環境負荷が高く持続可能な対策技術とは言えない。今後、2050年の脱炭素社会に向け、注目を集め実用化されてきている原位置浄化処理の促進が一つの解決になると考える。特に、土着の微生物を活性化することでクロロエテン類を分解・無害化する技術である、嫌気性バイオレメディエーションは有望である。嫌気性バイオレメディエーションを実施するには、水素供与体が不可欠である。

本研究では、ワイン製造時に発生する食品副産物であるワイン搾りかすを原料とした水素供与体「ワイン搾りかす抽出物（Wine Pomace Extract、WPE）を開発した(Fig.1-9)。これまでの水素供与体は室内試験で効果を確認されたものは多いが、実際のフィールドで実証または適用されたものは限られ、食品副産物を利用したものは知見が少ない。

このようなことから、本研究の目的と構成を以下のように設定した。

- ① クロロエテン類による土壌汚染の概要（第1章）  
土壌汚染の概要や、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、本研究の目的を明確化する。
- ② WPEの製造方法および性状分析についての検証（第2章）  
WPEの製造方法や条件について検証し、製造方法の確立を図る。さらにWPEの性状を分析し明らかにする。
- ③ クロロエテン類の脱塩素化におけるWPEの効果についての検証（第3章）  
WPEを用いてクロロエテン類の微生物分解効果を確認するとともに、WPEに含まれる成分の中でどのような成分がその効果に影響を及ぼすか検証する。特にカルボン酸について着目し検証する。
- ④ 実現場でのクロロエテン類の脱塩素化におけるWPEの効果の確認（第4章）  
実際のクロロエテン類汚染地にWPEを注入し、微生物分解効果を確認するとともに、WPEの土壌中での拡散挙動や、土壌微生物群集へ与える影響を確認することで分解効果の確証を得る。
- ⑤ WPE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に関する検証（第5章）  
WPEを用いた嫌気性バイオレメディエーションをクロロエテン類の汚染地に適用するか否かの判断を効率的に実施するための方策について検証を行う。

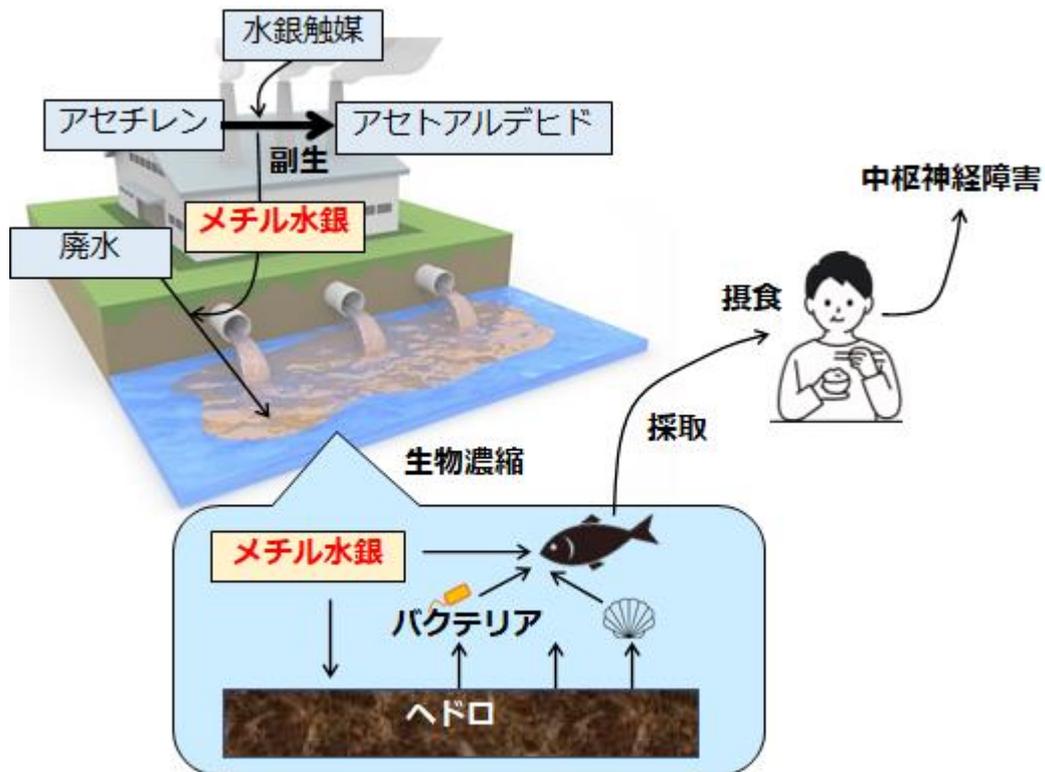


Fig. 1-1 水俣病の発生経路

(参考: 公害の歴史と環境基本法: 環境と公害の基礎知識 1)(郷茂夫, 2016)

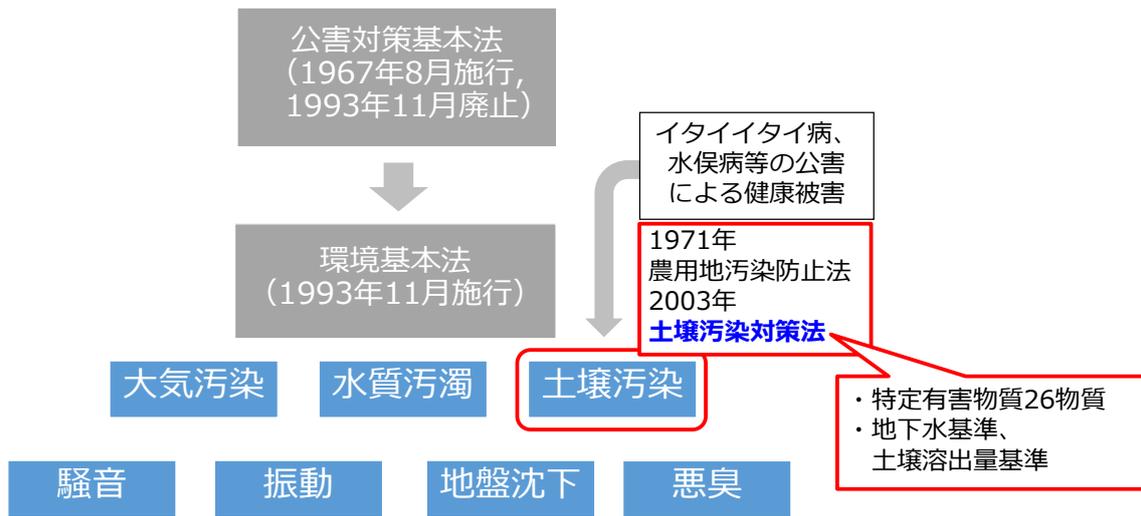


Fig. 1-2 日本における環境規制の概要

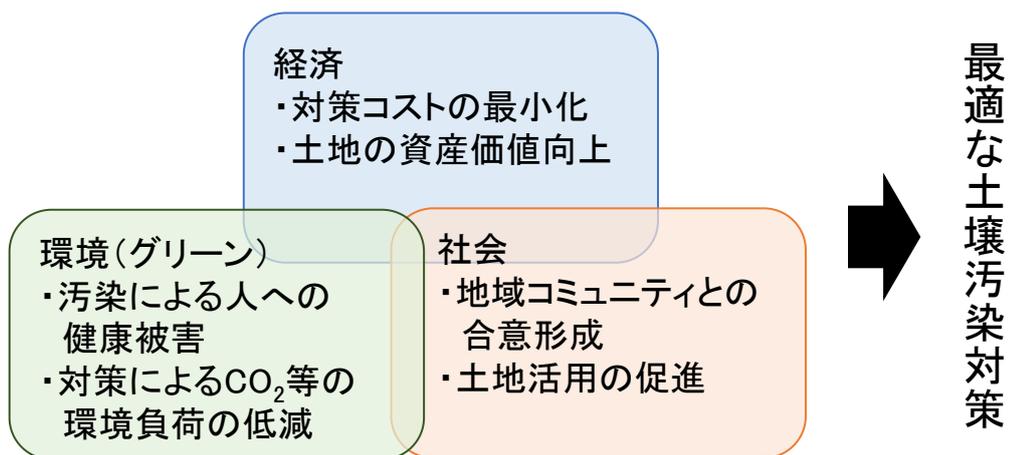


Fig. 1-3 GR と SR の概要と概念図

GR: Green Remediation、グリーン・レメディエーション

SR: Sustainable Remediation、サステイナブル・レメディエーション

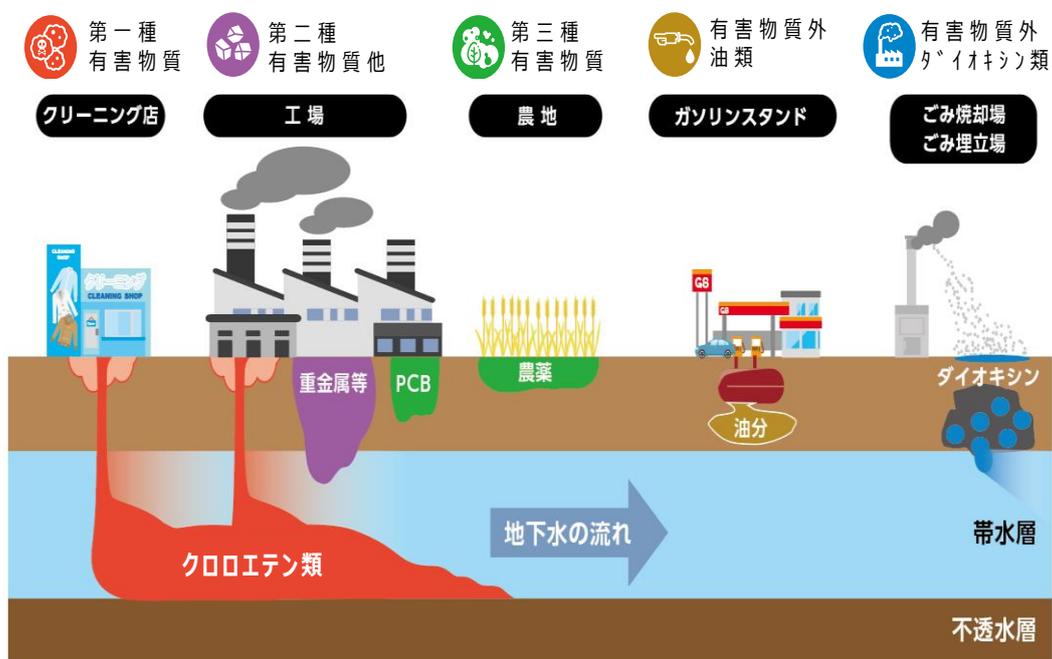


Fig. 1-4 クロロエテン類による土壌・地下水汚染の特徴

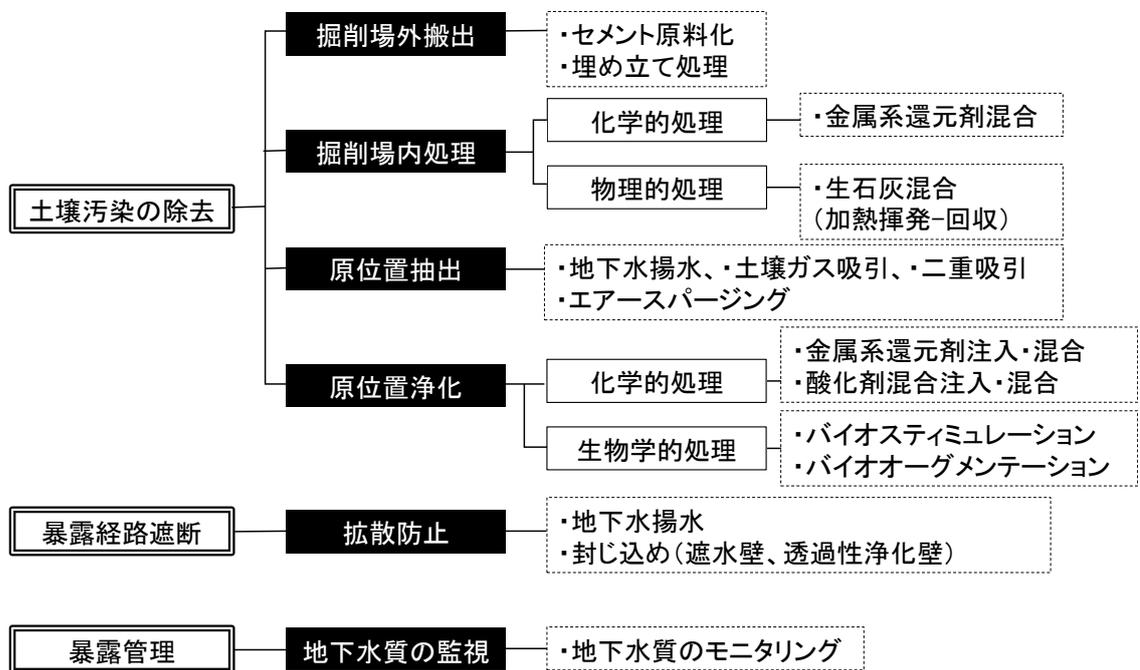


Fig. 1-5 クロロエテン類の浄化技術の概要

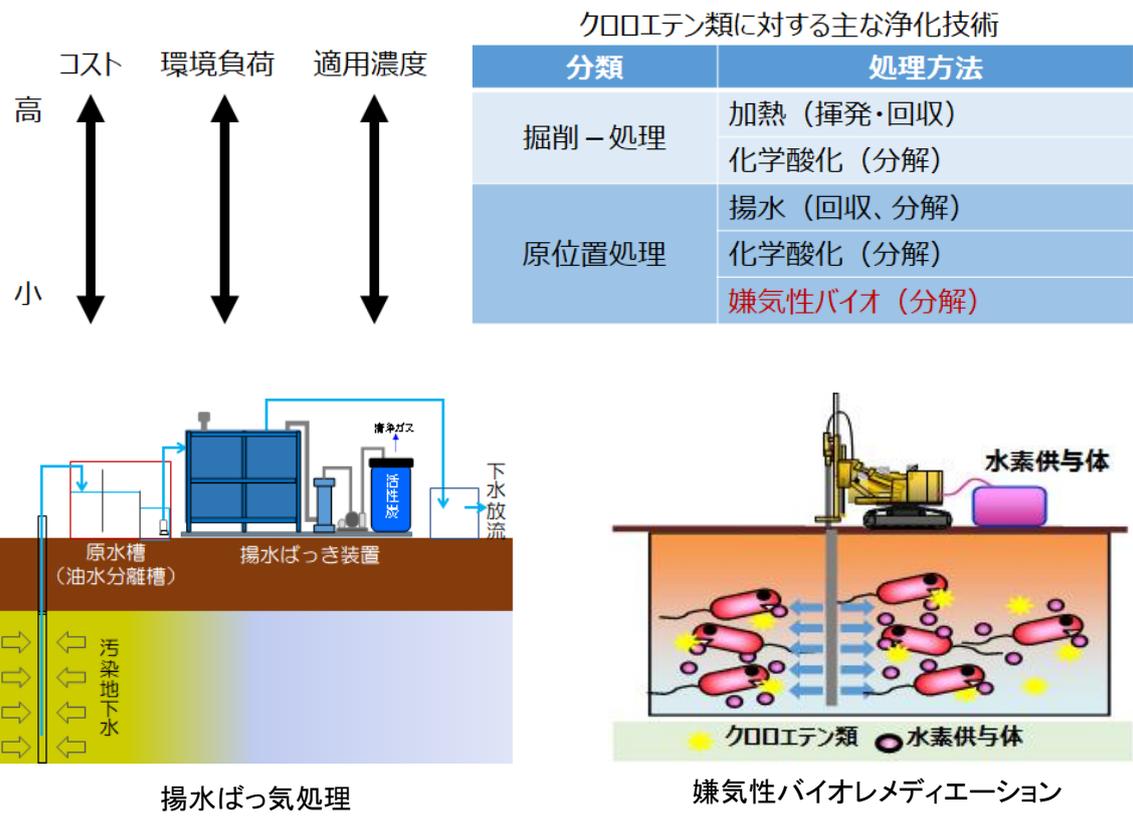
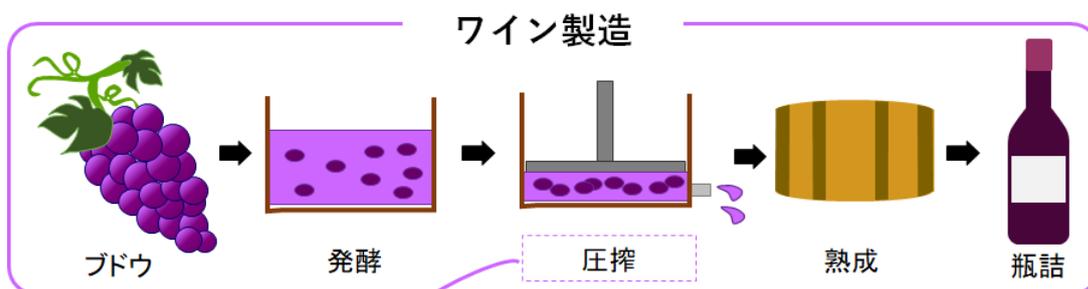


Fig. 1-6 クロロエテン類に対する主な浄化技術





ワイン搾りかす

Fig. 1-8 赤ワイン製造時のワイン搾りかすの発生.

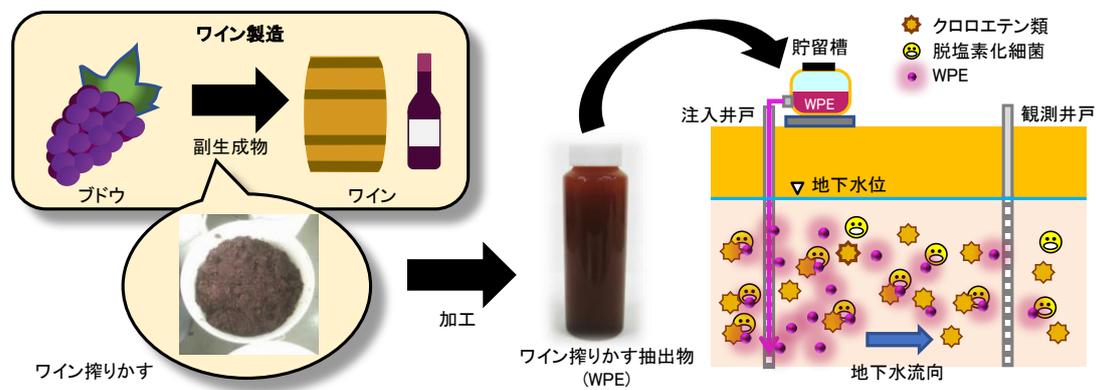


Fig. 1-9 本研究の概要

Table 1-1 土壤汚染対策法の規制基準と規制物質の用途 (環境省, 2017)

区分	物質名	地下水 (mg/L)	土壌溶出量 (mg/L)	土壌含有量 (mg/kg)	現在及び過去の用途
第1種特定有害物質 (揮発性有機化合物)	四塩化炭素	0.002 以下	0.002 以下	-	フロン原料、溶剤、脱脂洗浄
	1,2-ジクロロエタン	0.002 以下	0.002 以下	-	クロロエチレン原料、洗浄剤、溶剤
	1,1-ジクロロエチレン	0.004 以下	0.004 以下	-	クロロエチレン原料、洗浄剤、溶剤
	1,2-ジクロロエチレン	0.1 以下	0.1 以下	-	化学合成の中間体(用途無し)
	1,3-ジクロロプロペン	0.04 以下	0.04 以下	-	農薬(土壌燻蒸剤、殺菌剤)
	ジクロロメタン	0.002 以下	0.002 以下	-	脱脂洗浄
	テトラクロロエチレン	0.02 以下	0.02 以下	-	ドライクリーニング、脱脂洗浄、溶剤
	1,1,1-トリクロロエタン	0.01 以下	0.01 以下	-	金属洗浄、溶剤
	1,1,2-トリクロロエタン	1 以下	1 以下	-	1,1-ジクロロエチレンの原料、溶剤
	トリクロロエチレン	0.006 以下	0.006 以下	-	金属洗浄、溶剤
	ベンゼン	0.03 以下	0.03 以下	-	合成ゴム、合成皮革・洗剤の原料
	クロロエチレン	0.01 以下	0.01 以下	-	塩化ビニルの原料
	カドミウム及びその化合物	0.01 以下	0.01 以下	150 以下	顔料、メッキ、電池、合金
	六価クロム化合物	0.05 以下	0.05 以下	250 以下	メッキ、皮なめし、顔料
第2種特定有害物質 (重金属類)	シアン化合物	検出されないこと	検出されないこと	50 以下 (遊離シアンとして)	金属精錬、メッキ、医薬品
	水銀及びその化合物、 アルキル水銀	水銀が 0.0005 以下、かつアルキル水銀が検出されないこと	水銀が 0.0005 以下、かつアルキル水銀が検出されないこと	15 以下	電池、蛍光灯、合金、触媒、農薬
	セレン及びその化合物	0.01 以下	0.01 以下	150 以下	電気部品、感光体、太陽電池
	鉛及びその化合物	0.01 以下	0.01 以下	150 以下	蓄電池、鉛管、はんだ、塗料
	砒素及びその化合物	0.01 以下	0.01 以下	150 以下	医薬品、防腐剤、殺虫剤、農薬
	ふっ素及びその化合物	0.8 以下	0.8 以下	4000 以下	ガラス製造、アルミ精錬
	ほう素及びその化合物	1 以下	1 以下	4000 以下	ほう酸、電気メッキ、特殊硝子
	シマジン	0.003 以下	0.003 以下	-	除草剤
	チオベンカルブ	0.006 以下	0.006 以下	-	除草剤
	チウラム	0.02 以下	0.02 以下	-	殺菌剤、ゴムの加硫促進剤
	ポリ塩化ビフェニル	検出されないこと	検出されないこと	-	電気絶縁体、変圧器、コンデンサ
	有機リン化合物	検出されないこと	検出されないこと	-	殺虫剤、殺菌剤、除草剤

## 第2章 バイオレメディエーションを行うためのワイン搾りかす抽出物(WPE)の開発

### 2.1 はじめに

本章では、ワイン搾りかすに各種のアミノ酸、糖分、有機酸、ポリフェノールが含まれていることに着目し、これらを水素供与体として有効活用できないかと考え、その適否を検討することとした。これまでに提案されている水素供与体の多くは液状であるため、土壤に注入すると広く拡散する傾向がある(Newman and Pelle 2006)。ワイン搾りかすは水に溶けない固体であるため、土壤に注入することは困難である。このため、ワイン搾りかすを液状化することが課題であった。

そこで、本研究ではワイン搾りかすから有効成分を抽出した液状薬剤であるWPE (Fig. 2-1) を製造することとした。本章ではWPEの製造方法やその製造条件について検討した結果を示す。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 WPEの製造

##### (1) WPE製造方法

実規模でのWPEの製造例を以下に示す (Fig. 2-2)。通常は、マスカット・ベリーA種を使用した赤ワイン製造時に発生したワイン搾りかすを用いた。マスカット・ベリーAは雑種ブドウ品種 [*Vitis labruscana* (Bailey) x *Vitis vinifera* (Muscat Hamburg)] で、その赤ワインは日本で最も人気のあるものの一つである。本研究では、基本的に2019年に山梨県内のワイナリーから回収したワイン搾りかすを使用した。WPEは、ワイン搾りかす 108 kg と水道水 229 kg、25%水酸化ナトリウム (食品添加物グレード) 54 kg を混合し、4週間浸漬することで調製した。4週間後、混合物をフィルターバッグに入れ、プレスして未溶解の固形物を分離した。次に、フィルターバッグを通過した液に 10%塩酸 (食品添加物グレード) を加えて pH を約 2 に調整し、pH を調整した液を 3 日間放置した後、上澄みを分離して回収した。上澄みの重量は、pH 調整液の重量の約 8 割であった。この上澄み液を WPE として、以下の試験に使用した。

#### (2) アルカリ浸漬期間の検討

本試験では、山梨県内の同じワイナリーより 2019 年に入手した赤ワイン製造時に発生したワイン搾りかすを使用した。製造方法は、2. 2. 1 (1) に示す方法にて作成したが、使用したワイン搾りかすの量を 250 g として、その他の材料も配合比は変えずに試験に供した。また、アルカリ浸漬期間のみを 1 週間、2 週間、4 週間、8 週間と変化させた。いずれの WPE も最終の pH は 2 に調整した。

#### (3) WPE の最終 pH の検討

本試験では、山梨県内の同じワイナリーより 2016 年と 2019 年に入手した赤ワイン製造時に発生したワイン搾りかすを使用した。製造方法は、2. 2. 1 (1) に示す方法にて作成した。

#### (4) ワイン搾りかすの生産年などの検討

本試験では、山梨県内の同じワイナリーより 2016 年と 2019 年に入手した赤ワイン製造時に発生したワイン搾りかすを使用した。製造方法は、2. 2. 1 (1) に示す方法にて作成したが、使用したワイン搾りかすの量を 250 g として、その他の材料も配合比は変えずに試験に供した。同様にワイン搾りかすから果皮と種子を選別し、それぞれを原料に WPE を製造した。いずれの WPE も最終の pH は 2 に調整した。

## 2. 2. 2 WPE の化学的性質

### (1) LC/MS/MS による WPE 中のカルボン酸の定量分析

Waters Acquity H-class UPLC システムと Waters TQ-XS トリプル四重極質量分析計 (Waters Corporation, Wilmslow, UK) を組み合わせて使用した。分析対象物のクロマトグラフィー分離は、Acquity UPLC HSS T3 カラム (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  100 mm; Waters Corporation, Milford, MA, USA) で行った。分離に使用した溶離液は、超純水で希釈した 0.1% (v/v) ギ酸 (A) およびアセトニトリル中の 0.1% (v/v) ギ酸 (B) である。流速は 0.3 mL/分、カラム温度は 40  $^{\circ}\text{C}$  に維持した。オートサンプラーコンパートメントを 15 $^{\circ}\text{C}$  に冷却し、5  $\mu\text{L}$  を注入した。総実行時間は 10 分であった。最初の 3.5 分間は、移動相は 99% 溶液 A と 1% 溶液 B であり、3.6 分から 5.0 分までは 100% 溶液 B であり、5.1 分から 10 分までは、99% 溶液 A と 1% 溶液 B でアイソクラティック溶出を維持した。弱い洗浄と強い洗浄はそれぞれ水 / アセトニトリル 70/30 (v/v) である。サンプルは 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過した。

すべての分析物の検出には、ネガティブ ESI モードで動作する Xevo TQ-XS 質量分析計を使用した。質量分析計は選択的反応モニタリング (SRM) モードで操作し、すべての分析物の定量を行った。 $m/z$  値は、酒石酸が 149.0 $\rightarrow$ 86.9、リンゴ酸が 132.9 $\rightarrow$ 115.1、乳酸が 89.0 $\rightarrow$ 43.0、コハク酸が 190.9 $\rightarrow$ 111.1、*p*-クマル酸が 162.9 $\rightarrow$ 118.8、没食子が 169.9 $\rightarrow$ 125.0、シリンギン酸は 196.9 $\rightarrow$ 122.9 である。キャピラリー電圧 = 1.0 kV、コーン電圧 = 30 V、脱溶媒ガスフロー = 1000 Lh<sup>-1</sup>、コーンガスフロー = 150 Lh<sup>-1</sup>、ネブライザーガス = 7.0 bar、脱溶媒温度 = 500  $^{\circ}\text{C}$ 、イオン源温度 = 150  $^{\circ}\text{C}$  に設定した。WPE サンプルは 3 連で分析した。カルボン酸標準溶液を測定して標準曲線を描き、WPE 中のカルボン酸の濃度を算出するために使用した。データの取得と解析には、MassLynx<sup>TM</sup> ソフトウェア、バージョン 4.1 (Waters) を使用した。

### (2) 化学的性質

WPE の化学的性質は、日本工業規格 (JIS K0102、工業廃水の試験方法) に従って、ガラス電極法による pH (JIS K0102 12.1)、燃焼酸化-赤外線 TOC 法による全有機炭素 (以下、TOC) (JIS K0102 22.1)、インドフェノールブルー吸光光度法によるアンモニア態窒素、亜硝酸態窒素、硝酸態窒素 (JIS K0102 42.2, 43.2.1)、モリブデンブルー吸光光度法によるリン酸態リン (JIS K0102 46.1)、懸濁物質法による懸濁物質濃度 (JIS K0102 14.1) について分析した。

### (3) 糖類

WPE 中の糖類は、フェノール硫酸法で分析した (DuBois et al., 1956)。

### (4) アミノ酸

WPE 中のアミノ酸は、全自動アミノ酸分析機 (JLC-500/V, 日本電子) で分析した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 WPE の製造

#### (1) WPE 製造方法

ワイン搾りかすの果皮や梗は固いため、アルカリ溶液に浸漬しこれを軟化させて有効成分が抽出しやすくなることを期待してアルカリ溶液浸漬を実施した。このほかにも、さらに抽出効率を上げるために、食品用摩砕機(スーパーマスコロイダー 小型生産用 MKCA6-5、標準処理能力 35~120 kg/h)を用いてペースト状にしてからアルカリ溶液で浸漬することを試みたが、食品用摩砕機(スーパーマスコロイダー)の材料投入口(ホッパー)でワイン搾りかすの梗が詰まる、ワイン搾りかすの投入・破砕物の回収に相当の労力がかかることが明らかとなった。また、すり潰しの有無で抽出されるカルボン酸に差がなかったことから(Table 2-1)、当初通りワイン搾りかすは有姿のまま使用することとした。

アルカリ溶液への浸漬期間、WPE の最終 pH、ワイン搾りかすの生産年の検討結果については後述する。

アルカリ溶液浸漬中は、週に 1 回程度攪拌を行った。アルカリ溶液浸漬液から固形物を分離するため、不織布製のろ過袋を用いてろ過を行った。ろ過方法として、①遠心分離、②食品用圧搾機による圧搾および、③重石を載せて圧搾する 3 つの方法について比較検証を行った。いずれも脱水率は①70% (1 回遠心) 78% (2 回遠心)、②72%、③72%でほぼ同レベルであった。このことから、以後は作業の労力が最も小さい、③重石を載せて圧搾する方法でろ過を実施することとした。

圧搾して得たアルカリろ液は pH 12 程度の強アルカリでハンドリングが困難なため、これを中和することとした。ただし、中性では腐敗の懸念があるため pH 2 に調整した。pH 調整後の溶液には懸濁物があり、これが土壌へ注入する際に詰まる原因となる。そこで、pH 調整後の溶液を沈殿分離し、上澄み部分を WPE とすることとした。pH 調整後の溶液の懸濁物質(以下、SS)は 10,000~18,000 mg/L で、沈殿分離後の上澄みは 200~360 mg/L であった。WPE の SS は製造制度を考慮し 500 mg/L 以下にすることとした。

なお、ろ過分離後に発生するろ過残渣は、使用したワイン搾りかすとほぼ同重量となった。また、沈殿分離後に発生する沈殿残渣は、沈殿分離前の懸濁液の約 20%となった。

これらの検討により、WPE の製造方法を 2.2.1 (1) に示す方法に決定した。

#### (2) アルカリ浸漬期間の検討

WPE 製造時のアルカリ浸漬期間について、1、2、4、9 週間と変化させ、WPE 中のカルボン酸の定量分析を行った。なお、アルカリ浸漬期間以外は、2.2.1 (1) に示す方法と同様に実施した。その結果、カルボン酸濃度は 1、2 週間よりも 4 週間のほうが高くなったものの、4 週間と 9 週間では大きな差が生じなかった(Table 2-2)。2 週間から 4 週間にかけて各カルボン酸濃度が急に数値が上昇していることから、この間に最適な浸漬期間があると思われるが、ワイン搾りかすの品質のばらつきを考慮し、アルカリ浸漬期間は、4 週間が最適と判断した。

#### (3) WPE の最終 pH の検討

Table 2-3 に、WPE 製造時の pH 調整後の pH について、2、4、5、6、7、8 と変化させ、WPE 中のカルボン酸(L-乳酸、L-酒石酸、コハク酸、L-リンゴ酸の 4 種)の定量分析を行った結果を示す。pH 2 で L-乳酸がやや高い値となったものの、L-酒石酸、コハク酸、L-リンゴ酸においては各 pH で大きな差が生じなかった。このことから、WPE の pH は中性では腐敗の懸念があるため pH 2 とすることとした。

#### (4) ワイン搾りかすの生産年などの検討

Table 2-4 に、WPE 製造に使用するワイン搾りかすの生産年による品質のばらつきを検証するため、生産年 2016 年、2019 年、2020 年のワイン搾りかすで WPE を製造しカルボン酸を定量分析した結果を示す。各生産年でのばらつきが生じた。

ワイン搾りかすから果皮と種子を選別し、それぞれを原料に作成した液体状薬剤の成分比較を行った結果、果皮を原料とした液体状薬剤では前述の有機酸 4 種、ポリフェノール 3 種の存在が確認されたが、種子を原料としたものでは、*p*-クマル酸、シリング酸が確認されず、この 2 物質は果皮由来であることが明らかとなった（データ示さず）。

また、液体状薬剤の沈殿物に含まれる有機酸およびポリフェノールを分析したが、その量は上清に比べ極僅かであった（データ示さず）。このことから、今回確認された有機酸およびポリフェノールは液体状薬剤の上清に大部分が存在すると言える。

### 2. 3. 2 WPE の化学的性質

#### (1) LC/MS/MS による WPE 中のカルボン酸の定量分析

ワイン製造時に発生するワイン搾りかすには、潜在的な水素供与体としてカルボン酸が含まれており、特に酒石酸が多い(Nurgel,Canbas, 1998)。そこで、今回調製した WPE に含まれるカルボン酸の分析を行った。Table 2-5 に、LC/MS/MS を用いて 2. 2. 1 (1) に示す方法で製造した WPE に含まれるカルボン酸を定量分析した結果を示す。WPE には、7 種類のカルボン酸が含まれており、含有量の多い順に L-乳酸、L-酒石酸、コハク酸、*p*-クマル酸、シリング酸、L-リンゴ酸、没食子酸であった。

#### (2) 化学性状

Table 2-6 に WPE の化学的性質を示す。なお、pH 値は製造工程で 2~3 に調整した。有機物含有量の指標である TOC は平均 16000 mg/L、アンモニア態窒素は平均 150 mg/L、亜硝酸態窒素と硝酸態窒素は平均 37 mg/L、リン酸態リンは平均 56 mg/L、SS は平均 280 mg/L であった。WPE の pH は酸性であるが、WPE の添加量が少ないため、PCE 分解試験時の試験液の pH は 7~8 である。この pH は、*Dehalococcoides* 属細菌の脱塩素化能力を阻害しない。また、WPE の pH が低いことは、製品の保存性を向上させるのに適している。TOC は、WPE に含まれる有機物の量を推定するための指標である。実際の汚染現場において、WPE の残存量や広がりを観察するのに有効である。亜硝酸性窒素、硝酸性窒素、リン酸性リンは、微生物の生育に必要な成分であり、WPE 中には微量に含まれていることが分かった。SS は、WPE に含まれる可溶性固形物の量を示している。SS が多いと注入井戸を塞いでしまい注入に支障をきたすため、土壌への拡散を考慮して、WPE の SS 濃度が 500 mg/L 以下になるように調製した。

#### (3) カルボン酸以外の水素供与体の検討（アミノ酸および糖類）

WPE には、糖類が 1.5 g/L（フェノール硫酸法）、アミノ酸が 302 mg/L（アミノ酸自動分析装置）が含まれていた。

## 2.4 考察

### WPE の製造条件の検討

本研究では、WPE に含まれるカルボン酸を指標に検証を進めることとした。スケールアップに際し、ワイン搾りかすからの有効成分のさらなる抽出と省力化を試みたが、ワイン搾りかすをすり潰すことは市販の食品用摩砕機の投入口の加工などの工夫が必要であり、またすり潰す工程そのものの労力が大きいことが明らかとなった。さらに、すり潰しの有無で抽出されるカルボン酸に差がなかったことから、事前のすり潰しは実施しないこととした。

アルカリ浸漬は 4 週間が必要であることが明らかとなった。カルボン酸は果皮と果肉の間に多く含まれ、ブドウの梗や種には少ないとの報告(do Nascimento Silva et al., 2015)があるため、比較的早期にカルボン酸が溶出するものと考えたが、果皮からの溶出にも一定の時間がかかることが明らかとなった。アルカリ浸漬 4 週間経過するとドロドロとしたペースト状になることで溶出が進むものと考えられる。ここで、ワイン搾りかすをすり潰すとペースト状になるため、カルボン酸の抽出が早まる可能性が考えられる。しかし、今回の試験では、すり潰しの有無で、カルボン酸濃度に大きな差はなかった。これは、この試験では、アルカリ浸漬期間を 14 週間と長めにしたため、十分に抽出が進んでいたことが原因と考えられる。

アルカリろ液の pH 調整では、調整後の pH を 2~8 にして比較したが、いずれの pH でもカルボン酸の濃度に大きな違いが無かった。pH 調整の過程でカルボン酸濃度は影響を受けないことが明らかとなった。

ワイン搾りかすの生産年による違いを検証した結果、一定のばらつきがみられた。天然の材料であることやワイナリーのワイン製造方法のばらつきが影響していると思われる。今後は、このばらつきをどこまで許容できるかの検証や、ばらつきを小さくするための方策、例えば事前にワイン搾りかす中のカルボン酸量を測定し、それに応じてアルカリ浸漬する際の原料配合を変えるなどが考えられる。ただし、原料を多く使うとコストアップになることに留意が必要であり、この点も大きな課題と考えられる。以後の本研究では室内試験では 2019 年産のワイン搾りかすを 2. 2. 1 (1) に示す材料配合比と製造手順で製造したものを使用した。4 章の野外試験では 2020 年産のワイン搾りかすを用いているが、配合比や製造手順は同様とした。

### WPE の化学的性質

ブドウの成分は、品種、成熟度、衛生状態などの内的要因だけでなく、外的要因、例えば、その土地の気候条件やブドウ栽培方法によって変化することがある。同様に、ワイン醸造の工程や条件も、ワイン搾りかすの組成に大きな影響を与える。本研究では、ワイン搾りかすの組成の一貫性を確保するため、特定のワイナリーで毎年同じ醸造方法で生産されたワイン搾りかすを原料として WPE を製造した。

ワイン搾りかすからカルボン酸を効率的に抽出する方法として、有機溶媒を用いた化学抽出、酸・アルカリ抽出、超音波や破碎による物理抽出など様々な方法が提案されているが (Antonić et al., 2020; El Achkar et al., 2018; Filippi et al., 2021)、どの抽出方法が最適かについては、コンセンサスを得られていない。本研究では、アルカリマセレーションによりワイン搾りかすからカルボン酸を抽出した。アルカリマセレーションは、ブドウの果皮や茎からリグニンを除去し (Filippi et al., 2021)、それによって果皮や茎を柔らかくし、その後のプレス工程で果皮や茎を WPE から容易に分離することができる。L-酒石酸、コハク酸、リンゴ酸は、果皮と果肉の間に存在する。

L-乳酸は、ワイン醸造工程でマロラクティック発酵を経て L-リンゴ酸に由来するものである。L-リンゴ酸濃度は L-乳酸濃度よりも低いいため、本研究で使用したワイン搾りかすは、

アルコール発酵とマロラクティック発酵を同時に行い、マロラクティック発酵が十分に進行した後に回収したものと推測される。実際に供給元のワイナリーに問い合わせたところ、同時発酵を行っていることを確認した。ただし、通常の赤ワインの製造工程では、アルコール発酵後にワイン搾りかすは分離回収され、圧搾液に対しマロラクティック発酵を行う。この場合、回収したワイン搾りかすのL-リンゴ酸の濃度はL-乳酸の濃度より高くなる。

*p*-クマル酸、シリング酸、没食子酸は、通常、ブドウにカルボン酸エステル形で存在する。これらの物質は、ワインの搾りかすのアルカリ浸漬によって抽出されたものと思われる。ブドウ中のこれらの物質の含有量は、L-乳酸やL-酒石酸に比べて低い傾向にあり、WPE中のカルボン酸の濃度もこの傾向と一致している (Table 2-5)。

WPE中のL-乳酸濃度が25 mMであり、試薬グレードのL-乳酸から調製した50 mM L-乳酸溶液のTOCが約1300 mg/L (データ示さず) であることから、WPE中のL-乳酸のTOCは約650 mg/L であると考えられる。他のカルボン酸の存在を考慮すると、WPEのTOCは13,000~18,000 mg/L と高いことがわかる (Table 2-6)。このTOCは有機物の濃度を意味し、水素供与体は有機物であることが多い。実際、WPEには糖質(フェノール硫酸法で1.5 g/L) やアミノ酸(アミノ酸自動分析装置で302 mg/L) が含まれており、カルボン酸以外の水素供与体として機能した可能性がある。今後、WPEに含まれる糖類やアミノ酸がクロロエテンの脱塩素化に与える影響について検討する必要がある。



Fig. 2-1 赤ワイン製造工程で出るワイン搾りかす(左)とそのワイン搾りかす抽出物(右)



Fig. 2-2 実規模での WPE 製造工程

Table 2-1 WPE の粉碎によるカルボン酸濃度への影響

カルボン酸	濃度 (μM)	
	すり潰しなし	すり潰しあり
L-乳酸 (L-Lactic acid)	11000 ± 580	12000 ± 500
L-酒石酸 (L-Lactic acid)	18000 ± 500	17000 ± 710
コハク酸(Succinic acid)	1600 ± 68	1500 ± 53
p-クマル酸(p-Coumaric acid)	410 ± 3.2	390 ± 7.8
シリング酸(Syringic acid)	320 ± 2.1	310 ± 1.1
L-リンゴ酸 (L- Malic acid)	350 ± 8.6	350 ± 5.2
没食子酸 (Gallic acid)	85 ± 2.1	83 ± 2.1

データは 3 回の推定値の平均値±標準偏差

Table 2-2 WPE のアルカリ浸漬時間によるカルボン酸濃度への影響

カルボン酸	濃度 (μM)					
	1 週間	2 週間	4 週間	9 週間	14 週間	
L-乳酸	12000 ±	1000 ±	11000 ±	880 ±	27000 ±	1400 ±
L-酒石酸	7700 ±	280 ±	7800 ±	190 ±	18000 ±	670 ±
コハク酸	1100 ±	110 ±	1100 ±	89 ±	2800 ±	140 ±
α-クマル酸	270 ±	1.9 ±	290 ±	2.2 ±	500 ±	4.0 ±
シリンゴ酸	140 ±	3.7 ±	160 ±	1.4 ±	310 ±	2.5 ±
L-リンゴ酸	2.5 ±	4.3 ±	22 ±	7.5 ±	120 ±	7.5 ±
没食子酸	53 ±	1.0 ±	64 ±	0.38 ±	150 ±	8.3 ±

データは 3 回の推定値の平均値 ± 標準偏差

Table 2-3 WPE の最終 pH がカルボン酸濃度に及ぼす影響

カルボン酸	濃度 (μM)							
	pH 2	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8		
L-乳酸	21000 ± 710	14000 ± 430	13000 ± 510	10000 ± 330	13000 ± 380	12000 ± 500		
L-酒石酸	28000 ± 170	30000 ± 450	31000 ± 300	31000 ± 200	32000 ± 510	32000 ± 520		
コハク酸	1200 ± 68	1300 ± 17	1300 ± 25	1400 ± 59	1400 ± 34	1300 ± 42		
L-リンゴ酸	290 ± 0	330 ± 7.5	340 ± 75	350 ± 7.5	430 ± 7.5	370 ± 15		

データは 3 回の推定値の平均値 ± 標準偏差

Table 2-4 ワイン搾りかすの生産年とWPE中のカルボン酸濃度

カルボン酸	濃度 (μM)								
	2016年			2019年			2020年		
L-乳酸	8900	±	1300	11000	±	580	26000	±	970
L-酒石酸	16000	±	1400	18000	±	450	41000	±	720
コハク酸	1300	±	150	1600	±	68	2700	±	140
p-クマル酸	300	±	1.4	410	±	3.2	—	±	—
シリング酸	280	±	3.0	320	±	2.1	—	±	—
L-リンゴ酸	240	±	38	350	±	8.6	760	±	20
没食子酸	95	±	6.8	85	±	2.1	—	±	—

データは3回の推定値の平均値±標準偏差

—:分析せず

Table 2-5 LC/MS/MS による WPE のカルボン酸濃度

カルボン酸	濃度 (μM)
L-乳酸	25000 ± 1400
L-酒石酸	17000 ± 600
コハク酸	2800 ± 140
α-クマル酸	510 ± 2.5
シリング酸	330 ± 0.68
L-リンゴ酸	170 ± 10
没食子酸	120 ± 2.1

データは 3 回の推定値の平均値 ± 標準偏差

Table 2-6 WPE の化学的性質

化学的性質	WPE*	
	最小値	最大値
pH	2.3	2.9
全有機炭素 (TOC: Total Organic Carbon) (mg/L)	13000	18000
アンモニア態窒素 (mg/L)	60	240
硝酸態窒素、亜硝酸態窒素 (mg/L)	8	110
リン酸態リン (mg/L)	20	93
懸濁物質 (SS: Suspended Solids)(mg/L)	200	360

\*測定値の最大値と最小値は、8回製造された各バッチのWPEについて示した。  
使用したワイン搾りかすの生産年は2019年産7回、2020年産1回。

## 第3章 クロロエテン類の脱塩素化におけるワイン搾りかす抽出物の効果

### 3.1 はじめに

PCE や TCE などのクロロエテン類は、金属産業やドライクリーニング産業で溶剤として広く使用されている(McCarty, 2010)。国際がん研究機関 (IARC) によると、TCE と VC は、ヒトに対する発ガン性の「証拠の強さ」が最も高いため、グループ 1 に分類される(IARC, 2014)。クロロエテン類の不注意な取り扱いや保管による土壌や地下水の汚染は、ヒトの健康に悪影響を与えている(Moran et al., 2007)。地下水や土壌の浄化技術には、地下水揚水技術(Park, 2016)や土壌ガス吸引(USEPA, 2012)などの物理化学的処理法がある。しかし、これらの技術は多くのコストとエネルギーを必要とし(Park, 2016)、低濃度の汚染物質に対する効果が低い。ここ数十年、微生物を用いたバイオレメディエーションが開発され、実用化されており(Bradley, 2003)、嫌気性地下環境におけるクロロエテン類の主な分解経路である微生物による還元的脱塩素化が広く研究されている(Dolinová et al., 2017)。クロロエテン類を分解できる嫌気性微生物は、有機酸などの水素供与体が分解して生成した水素を電子供与体、PCE などのクロロエテン類を電子受容体として、PCE などをジクロロエチレン (DCE) から VC を経てエチレンまで順次脱塩素化し、無害化する(Dolinová et al., 2017)。還元的脱塩素化とは、嫌気的条件下で水素供与体から生成した水素がクロロエテン類の塩素原子に置換される連続的な電子移動プロセスである。この過程で PCE は TCE や DCE の異性体 (主に *cis*-1,2DCE, *trans*-1,2DCE, 1,1-DCE) を経て VC に分解され、最終的にはエチレンなどの無害な物質に分解される。多くの微生物が TCE を DCE に分解することが知られているが(Saiyari et al., 2018)、*Dehalococcoides* 属と *Propionibacterium* 属の一部が PCE と 1,2DCE をエチレンに分解することが報告されている(Chang et al., 2011)。水素供与体としては、単一基質としてギ酸、酢酸、グルコース、メタノール(Freedman, Gossett, 1989; Pavlostathis, Zhuang, 1993)、乳酸(De Bruin et al., 1992)、乳化植物油(Newman, Pelle, 2006)、糖蜜、ホエー (DiStefano et al., 2001; Macbeth et al., 2006)などがある。また、実際に汚染された土地のバイオレメディエーションのために、ポリ乳酸をベースにした市販品もある(Jin et al., 2005; Sandefur, Koenigsberg, 1999)。国内でもいくつかの製品が市販されている(松浦健一, 2010; 浅川翔太 et al., 2018)。ワインの搾りかすには、有機酸として酒石酸、乳酸、リンゴ酸、フェノール酸が含まれており(Ribéreau-Gayon et al., 2021)、これらは水素供与体として機能すると考えられる。これまでに提案されている水素供与体の多くは液状であるため、土壌に注入すると広く拡散する傾向がある(Newman, Pelle, 2006)。ワイン搾りかすは水に溶けない固体であるため、土壌に注入することはできない。

第2章に示すように本研究ではワイン搾りかすから抽出したカルボン酸などを含有する WPE を開発した。WPE は、ワインの搾りかすを水酸化ナトリウムでアルカリ性にして可溶化・液状化することで製造したもので、WPE には7種類のカルボン酸などを含む液体であることが明らかとなった。

本章では、1) WPE がクロロエテン類の微生物分解に寄与していることを確認すること、2) 特定した物質がクロロエテン類の微生物分解に機能しているかどうかを明らかにすることを目的に次のような検証を行った。WPE を用いて PCE 試験を行いその分解効果を検証した。次に、WPE を由来の L-乳酸、L-酒石酸などを含む水溶抽出分とシリング酸を主体とするアルコール抽出分を用いた PCE 分解試験において有効成分の絞り込みを行い、さらに、L-乳酸、L-酒石酸、シリング酸の試験液を用い PCE 分解試験を行い、分画成分を用いた場合の結果と比較検証を行い、有効成分について考察した。

### 3. 2 方法

#### 3. 2. 1 試薬と材料

PCE (純度 99%以上) および混合標準液 (PCE、TCE、1,2DCE、VC を含む 14 種類のクロロエテン類のメタノール溶液中の混合標準液 (土壌汚染物質分析用各 1 mg/mL メタノール溶液)) は富士フイルム和光純薬株式会社 (日本、大阪) から購入した。混合物標準液は、ガスクロマトグラフィー用標準液を使用した。その他に使用した化学物質は、特に指定がない限り、すべて試薬グレード以上のものである。PCE 飽和液は、約 0.9 mM の PCE 水溶液として調製した。WPE は 2. 2. 1 (1) に示す方法にて作成したものをを使用した。

#### 3. 2. 2 WPE の分画方法

WPE を逆相カラム (Strata C18-E55  $\mu\text{m}$ , 70  $\text{\AA}$ , 10 g/60 mL, Phenomenex, Inc., 米国) で分離した。カラムを蒸留水で平衡化した (カラム 3 容量)。凍結乾燥した WPE (28 mg) を別々にカラムにロードし、蒸留水 (3 カラム容量) を加えて有機酸を溶出させた。この溶出液を水溶性画分とした。次に、メタノール (3 カラム容量) を加え、メタノール溶出画分を得た。

2 つのフラクションを減圧・温度 (<35°C) で濃縮させ、抽出物を別々に凍結乾燥し、それぞれ 22 mg および 10 mg を得た。

#### 3. 2. 3 テトラクロロエチレン(PCE)分解試験で使用する微生物群の取得方法

クロロエテン類を分解できる微生物群として、大阪府の TCE 汚染地から採取した土壌混合地下水を使用した。土壌混合地下水は、2019 年 9 月 24 日に採取した。採取時の pH は 6.7、電気伝導率は 0.62 mS/cm、*Dehalococcoides* 属細菌数は  $1.1 \times 10^4$  copies/mL であった。土壌混合地下水 1 L をガラス容器に入れ、これに WPE (6 mL) と PCE 飽和液 (2 mL) を添加した。この混合物を 30°C でインキュベートした。数週間ごとに、この混合液を別の 100 mL 容器に移し、同じ場所から採取した土壌混合地下水 100 mL を繰り返し添加した。さらに、数ヶ月ごとに、WPE (6 mL) と PCE 飽和液 (2 mL) を添加した。この培養地下水を微生物群として使用した。培養地下水中の脱塩素能力を有する微生物は、*Dehalococcoides* 属の 16S リボソーム RNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR により測定した (He et al., 2003; Kurata et al., 2001)。

#### 3. 2. 4 PCE 分解試験

PCE 分解試験、He らの方法を一部参考にした (He et al., 2003)。PCE 分解試験は、ガラス瓶 (123 mL) 中で行った (Fig. 3-1)。ガラス瓶に、濃度が 28 mg/L となるように溶解した WPE、WPE 由来の水溶出画分またはメタノール溶出画分を 700  $\mu\text{L}$ 、または各試験水溶液 (100 mM L-乳酸溶液、100 mM L-酒石酸溶液または 100 mM シリング酸溶液) を 110  $\mu\text{L}$  加えた。その後、土壌懸濁液を 5.5 mL 添加し、培養地下水を加えて全量を 107.4 mL とした。

土壌懸濁液は、クロロエテン汚染現場から採取した土壌 30 g に滅菌水 100 mL を加えて調製した。コントロールは、土壌懸濁液と培養地下水のみから構成されたものである。懸濁液は、テフロンライニングされたブチルゴム製のストッパーとアルミニウム製のシールでしっかりと密閉した。

ガラス瓶内を窒素ガスでパージして嫌気環境を作り、PCE 飽和液 2.6 mL をマイクロシリングでガラス瓶に注入した。培養した地下水に、1 mL あたり約 0.9  $\mu\text{mol}$  の PCE を含む PCE 飽和液を添加した。WPE の 2 つの画分を用いた PCE 分解試験では、カラム分画の収率に応じて、WPE、水溶出画分、メタノール溶出画分のそれぞれ 28 mg、12 mg、10 mg を添加した。3 種のカルボン酸を用いた PCE 分解試験では、最終濃度は L-乳酸、L-酒石酸、シリング酸がそれぞれ 0.1 mM、PCE が 22.7  $\mu\text{M}$  とした。ガラス瓶を 30°C で静置し、任意のタイム

ングで各クロロエテンの濃度を測定した。

### 3. 2. 5 ガスクロマトグラフィー(GC) 分析

ガラス瓶内の培養液中のクロロエテン類 (VC、1,2DCE、TCE、PCE) の定量は、Freedman and Gossett (Freedman and Gossett 1989) の方法を改変して実施した。本研究では、乾式電解導電率検出器 (DELCD) を備えたガスクロマトグラフ (GC-310C、テクノインターナショナル、日本) を用いたヘッドスペースガスインジェクション法を用いた。試料は、6%シアノプロピルフェニルポリシロキサンを充填したキャピラリーカラム (UA-624、長さ 30 m、内径 0.53 mm、膜厚 3.0  $\mu\text{m}$ 、フロンティア・ラボ 株式会社、日本) に注入された。DELCD からの出力は、PeakSimple クロマトグラフィーソフトウェア (SRI Instruments Inc.) で分析した。カラムオーブンを 40°C に加熱し、その温度で 1 分間保持した。その後、8°C/分で 72°C まで、5°C/分で 100°C まで、10°C/分で 120°C まで昇温させた。0.05 mL のヘッドスペースガス注入で得られた GC ピーク面積をガラス瓶内の化合物の質量と直接関連付けるために、GC キャリブレーションファクターを決定した。1,2DCE は *cis*-1,2DCE と *trans*-1,2DCE の和とした。

なお、分析値が定量下限値未満の場合、図には定量下限値を示した。各クロロエテンの定量下限は下表の通りである。

物質名(略語)	定量下限値 ( $\mu\text{M}$ (mg/L))
Tetrachloroethene (PCE)	0.006 (0.001)
TCE (Trichloroethene)	0.023 (0.003)
1,2-Dichloroethene (12DCE)	0.041 (0.004)
Vinyl chloride (VC)	0.032 (0.002)

### 3. 2. 6 統計解析

分散分析 (ANOVA) は、JMP™ (Version 17, SAS Institute, Cary, NC, USA) ソフトウェアを用いて実施した。3 反復の平均値間の有意な差 ( $p < 0.05$ ) は、Tukey (HSD) 多重比較検定を用いて同定した。

### 3.3 結果

当初、PCE 分解試験は、WPE および WPE をカラム分画した際に得られた画分について実施した。WPE やその画分を添加しなくても（無添加）、PCE や TCE の分解は進み、その分解生成物である 1,2DCE や VC が生成された（Fig. 3-2）。

WPE 由来の画分を用いた PCE 分解試験では、水溶出画分において PCE の分解により VC が生成されたが、その後その濃度は低下した。一方、メタノール溶出画分では、PCE の分解により VC が生成されたが、その後、その濃度は低下していない。WPE または水溶性フラクシオンの添加による VC 濃度の減少は、以前に報告されたように、VC がエチレンに分解されたためと考えられる(He et al., 2003; MayméGatell et al., 1997)。LC-MS 分析により、水溶性画分には L-乳酸と L-酒石酸が相当量含まれていることがわかった。一方、メタノール溶出画分には、シリング酸、没食子酸、*p*-クマル酸が含まれていた。

WPE、L-乳酸、L-酒石酸、シリング酸を用いて、別の PCE 分解試験を実施した。WPE を用いた PCE 分解試験における L-乳酸の最終濃度が 0.1 mM であったため、L-酒石酸およびシリング酸の最終濃度も 0.1 mM に設定した。Fig. 3-3 にその結果を示す。*Dehalococcoides* 属細菌は、試験開始時に培養地下水中に  $1.1 \times 10^4$  copies/mL 存在した。

無添加の場合、PCE から TCE と 1,2DCE への順次分解が進むものの、1,2DCE 濃度の上昇は 10 日後に停滞し、10 日目以降は 1,2DCE の分解物である VC の濃度がわずかに上昇した（Fig. 3-3 (A)）。一方、WPE を添加した場合、PCE 濃度が急激に減少したのに対し、1,2DCE の濃度は同期間中に増加した。VC の濃度上昇は、1,2DCE の濃度上昇よりやや遅れて起こった。1,2DCE の濃度は 10 日目に最も低くなったが、VC の濃度は 10 日目にピークを迎え、その後減少した（Fig. 3-3 (B)）。L-乳酸および L-酒石酸の試験液を添加した場合、PCE は 5 日目頃に定量下限値（0.006  $\mu$ M）に達したが、1,2DCE および VC は 5 日目をピークにその後急速に減少した（Fig. 3-3 (C)、(D)）。シリング酸添加の場合、PCE の分解がコントロールの場合よりも遅れていた。対照例では、PCE は約 12 日で初期濃度の 1/42 まで減少した。一方、シリング酸を添加した場合、PCE は 12 日目に初期濃度の 1/1.32 まで減少し、TCE と 1,2DCE が生成した（Fig. 3-3 (E)）。

Fig. 3-4 は、PCE 分解試験において、WPE、L-乳酸、L-酒石酸、またはシリング酸を添加した後の 40 日目の VC の濃度を示す。比較のため、コントロール（無添加）サンプルの結果も示している。WPE、L-乳酸、L-酒石酸を添加した試料の VC 濃度は、対照試料に比べ有意に低い値を示した。WPE、L-乳酸、L-酒石酸添加サンプルの VC 濃度に有意な差は見られなかった。WPE は L-酒石酸および L-乳酸と同様に VC の分解を促進した。

### 3.4 考察

WPE には 7 種類の主要カルボン酸などを含む液体であることが明らかとなった。本章では、WPE がクロロエテン類の嫌気性バイオレメディエーションに効果があるかを検証した。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 の脱塩素化を促進したが、シリング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、シリング酸の試験液を用いた別の 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、シリング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の分解において水素供与体として機能することが示唆された。

#### WPE とカルボン酸を用いた PCE 分解試験

培養地下水のみを使用した場合(コントロール)、PCE の順次分解は 1,2-DCE で停止した。培養地下水に WPE を添加すると、1,2-DCE から VC への分解が急速に進行した (Fig. 3-2)。 *Dehalococcoides* 属と *Propionibacterium* 属の一部は PCE と 1,2-DCE をエチレンに分解することが報告されており (Chang et al., 2011)、WPE がこれらの微生物にとって水素供与体として機能し PCE の還元脱塩素化を促進したと考えられる。

WPE の添加により観察された VC 濃度の低下は、以前に報告されたように、VC がエチレンに分解されたためと考えられる (He et al., 2003)。WPE に含まれる 7 つのカルボン酸は、その化学構造に基づいて 2 つのグループに分類することができる。すなわち、脂肪族骨格を持つ L-乳酸、L-酒石酸、コハク酸、L-リンゴ酸と、芳香族骨格を持つシリング酸、フマル酸、没食子酸である。本研究では、L-乳酸だけでなく酒石酸も PCE の微生物による脱塩素化を促進したことから (Fig. 3-3)、同じく WPE の脂肪族化合物であるコハク酸や L-リンゴ酸が L-乳酸と同様の促進作用を持つことが示唆された。

Men らは、L-乳酸の代謝過程で *Dehalococcoides* 共生体が生成する酢酸と水素を、適度な濃度で *Dehalococcoides* 属細菌に供給し続けることで、クロロエテン類への脱塩素化を促進すると報告している (Men et al., 2012)。今回の報告と同様に、WPE 中の L-乳酸、L-酒石酸、コハク酸、L-リンゴ酸は代謝され、脱塩素化プロセスに重要な水素が生成されたと考えられる。

一方、フェノール酸であるシリング酸は、L-乳酸や L-酒石酸よりも PCE の分解速度が遅い (Fig. 3-3)。シリング酸は、赤ワイン由来のワインポマス中のアントシアニンがアルカリ加水分解されることで生成する (Forester, Waterhouse, 2008)。

これは、L-乳酸や L-酒石酸が脂肪族骨格であるのに対し、シリング酸は芳香族骨格であるため、嫌気性微生物によって分解されにくく、結果的に水素の供給量が少なくなるためと思われる。PCE がシリング酸試験液でコントロールよりゆっくり分解されたという発見は、さらなる検証が今後必要である。

L-乳酸と WPE は、PCE の微生物分解のための水素供与体として、分解速度および濃度低減の点で同等である。ポリ乳酸をベースにした市販の水素供与体である Hydrogen Release Compound (HRC™) は、水素供与体として乳酸を提供する (Jin et al., 2005; Sandefur, Koenigsberg, 1999)。WPE は、クロロエテンの微生物分解のための水素供与体として、HRC™ と同様に効果的である。

実際の汚染サイトの地下水環境において、クロロエテンを分解する微生物叢は、汚染サイトごとに異なる。そのため、1 種類の水素供与体しか使用しないバイオレメディエーションでは、分解が進まない場合が生じる可能性がある。Gibson と Sewell は、帯水層の固形物から調製したメタン生成スラリー中の PCE の脱ハロゲン化に対する一般的な発酵生成物の添加の効果を研究した (Gibson and Sewell 1992)。彼らは、乳酸、プロピオン酸、クロトン酸、

酪酸、およびエタノールが脱ハロゲン化を刺激したが、酢酸、メタノール、およびイソプロパノールは刺激しなかったと報告した(Gibson, Sewell, 1992)。Kengen らは、乳酸、ピルビン酸、フルクトース、フマル酸、リンゴ酸を電子供与体とすることで脱塩素化が可能になるが、水素、ギ酸、酢酸では不可能であるとした(Kengen et al., 1999)。Santharam らは、PCE 汚染サイトの浄化に関するパイロットフィールド研究を行い、大豆油メチルエステル、乳酸、酵母エキスが混合物が浄化に有効であることを報告した(Santharam et al., 2011)。WPE には、有機酸やフェノール酸などのカルボン酸だけでなく、糖類やアミノ酸も含まれていた。糖やアミノ酸はクロロエテンのバイオレメディエーションを促進することが報告されている(DiStefano et al., 2001; Zhuang et al., 2011)。したがって、様々な水素供与体を含む WPE は、クロロエテン分解菌の増殖条件が異なる実際の汚染現場において、どの水素供与体もクロロエテンの嫌気性分解に有効であることから、汎用性があることが示唆された。

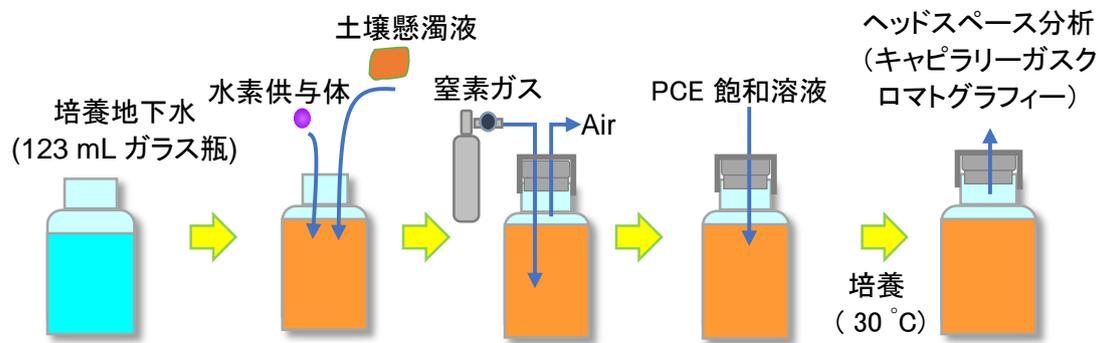


Fig. 3-1 PCE 分解試験の概略図

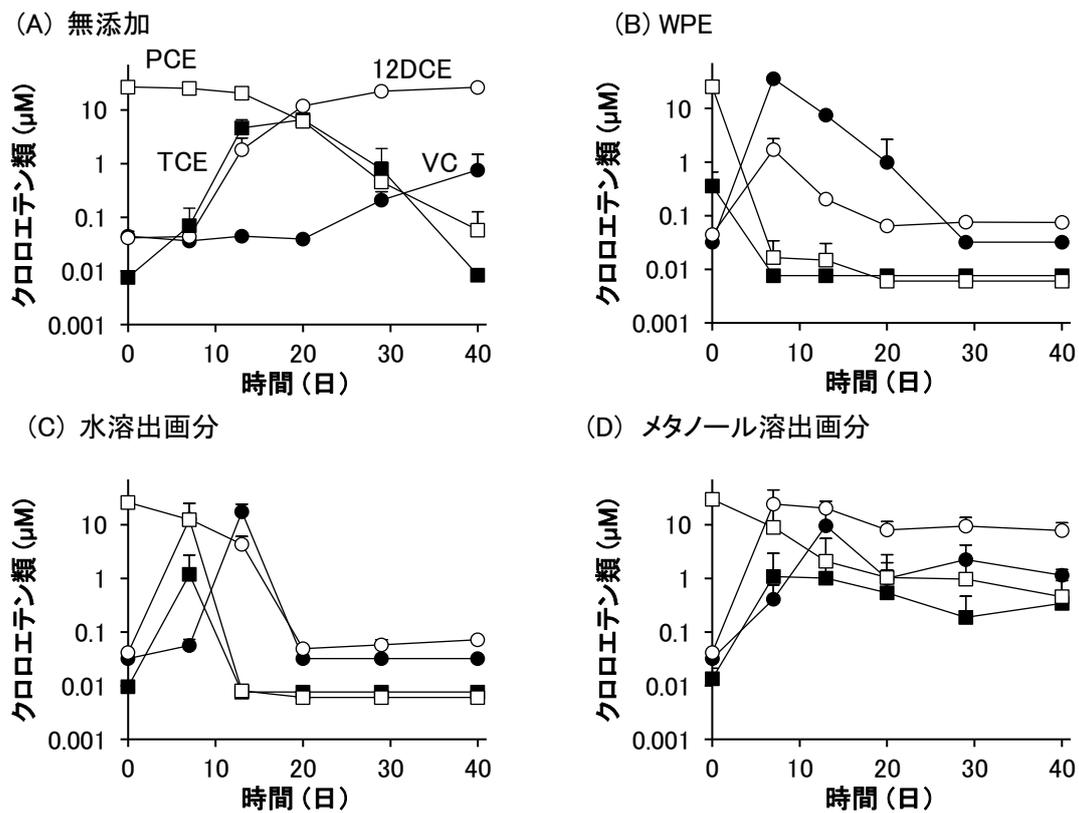


Fig. 3-2 培養地下水を用いた PCE 分解試験

PCE(□)、TCE(■)、1,2DCE(○)、VC(●)  
 値は平均値±SD(n = 3)

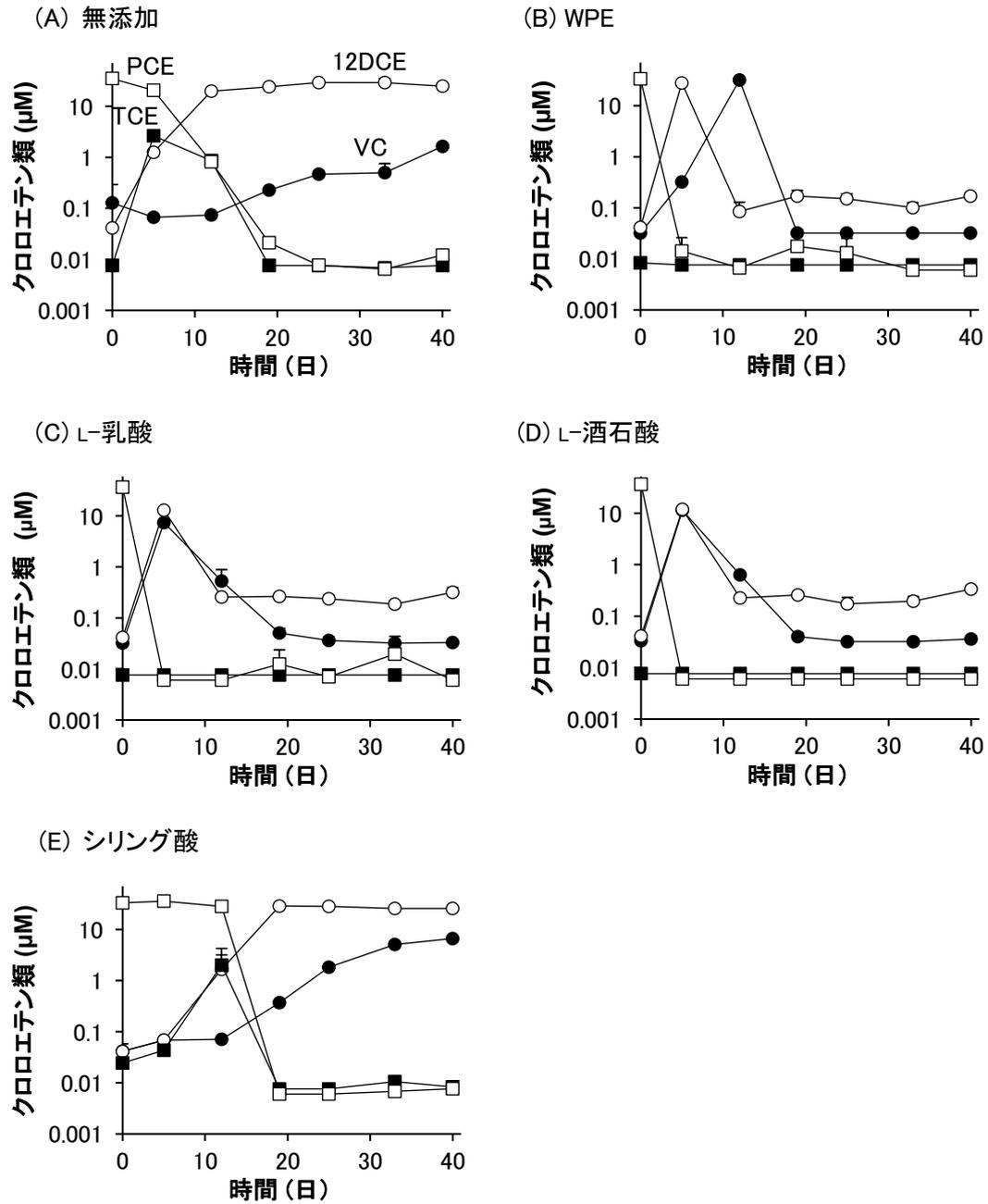


Fig. 3-3 WPE または 3 種類のカルボン酸を用いた PCE 分解試験

PCE(□)、TCE(■)、1,2-DCE(○)、VC(●)  
 値は平均値±SD(n = 3)

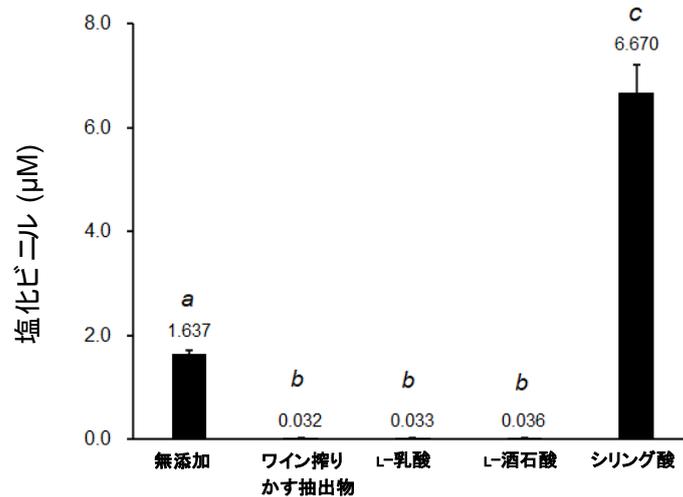


Fig. 3-4 PCE 分解試験で WPE、L-乳酸、L-酒石酸、シリング酸を添加した後の 40 日目の塩化ビニル濃度

データは三回繰り返し測定 of 平均値  
 データの比較には ANOVA を実施した  
 各データ間で文字が異なる値は有意に異なる (Tukey の検定、 $p < 0.05$ )

## 第4章 クロロエテン類汚染現場へのワイン搾りかす抽出物の適用

### 4.1 はじめに

PCE、TCE、およびそれらの変換生成物である 12DCE、VC などのクロロエテン類は、地下水汚染の代表格である(Abelson, 1990)。クロロエテン類は、偶発的な流出事故や過去の不適切な除去作業によって、地下水から頻繁に検出される。工業用洗浄液や脱脂剤には、これらの塩素系炭化水素が含まれていることが多い(Rajajayavel, Ghoshal, 2015)。先進国を中心に産業界で広く使用されているが、発ガン性があるため、使用や生産が制限されている。また、クロロエテン類は、適切な取り扱いや廃棄を實踐できなかった工場跡地の土壌や地下水から検出される環境汚染物質の一つである。

クロロエテン類は可溶性の DNAPL (高密度非水相液体) で、オクタノール-水分配係数 (Log K) および土壌吸着係数 (土壌中の Log K) が小さいため、土壌中で適度に収着する。水よりも密度が高いため、帯水層の底に到達するまで土壌に浸透する。これらの化合物の半減期は、通常、他の揮発性有機化合物の半減期よりも長い(Saiyari et al., 2018)。

クロロエテン類を分解できる嫌気性微生物を用いた嫌気性バイオレメディエーションは、クロロエテン類で汚染された土壌や地下水の浄化に用いられる方法の一つである(Atlas, Philp, 2005)。嫌気性条件下では、硫酸イオンなどの電子受容体を用いた嫌気性呼吸の過程でクロロエテン類が二次的に脱塩素化される共代謝と、クロロエテン類を直接電子受容体として用いる脱塩素呼吸の二つの反応によって脱塩素化が起これると考えられている(Maymo-Gatell et al., 1999)。

クロロエテン類の生物学的還元的脱塩素化、および有機ハロゲン化物反応菌の同定と特徴付けについては、実験室およびフィールドで相当な研究が行われている。クロロエテン類は、嫌気性微生物によって分解され、有機酸などの水素供与体を電子供与体、PCE などのクロロエテン類を電子受容体として分解して生じた水素を利用して、DCE や VC をエチレンに順次変換する(Dolinová et al., 2017)。 *Desulfuromonas*、*Dehalobacter*、*Desulfitobacterium*、*Enterobacter*、*Sulfurospirillum* などの様々な嫌気性属は、乳酸、ピルビン酸、ギ酸、酢酸などの電子ドナー/固定炭素源の存在下で PCE を 12DCE に脱塩素化できる(Finneran et al., 2002; Holliger et al., 1998; Krumholz et al., 1996; Scholz-Muramatsu et al., 1995; Sharma, McCarty, 1996)。

12DCE をさらに脱塩素化してエチレンに変換することは、*Dehalococcoides* 属細菌でのみ報告されている。*Dehalococcoides* 属細菌は PCE と TCE を非毒性の代謝物であるエチレンに完全に還元的脱塩素化することができる(Maymo-Gatell et al., 1999)。ゲノム解読により、*Dehalococcoides* 属細菌は、炭素源として酢酸、電子供与体として水素、電子受容体としてハロゲン化合物を必要とする偏性嫌気性生物であることが明らかになった(Löffler et al., 2013)。

水素供与体としては、様々なものが報告されている。ギ酸、酢酸、グルコース、メタノール(Freedman, Gossett, 1989; Pavlostathis, Zhuang, 1993; X. Zhang et al., 2022)、乳酸(De Bruin et al., 1992)は単一基質だが、食品副産物、例えば浮遊植物油、糖蜜油 (Newman, Pelle, 2006)、糖蜜、乳清は複合基質 (DiStefano et al., 2001; Macbeth et al., 2006)である。

クロロエテンの脱塩素化は、単一の細菌による分解ではなく、微生物のコンソーシアムによる分解で進行する(Li et al., 2021)。実際の地下水や土壌の汚染現場では、複数種のクロロエテン類が混在していることが多く、そのような現場では、複数のクロロエテン分解菌が関与するため、分解が進みやすいと考えられる。しかし、実際の汚染現場でバイオレメディエーションを実施すると、必ずしも分解が進まないことがある。これは、クロロエテン分解菌の相互作用に関する知見が不足しているためと思われる。

本研究では、ワイン搾りかすから有機酸などを抽出して WPE を調製し、クロロエテン類

の嫌気性バイオレメディエーションにおいて水素供与体として使用した。食品副産物を用いたバイオレメディエーションに関する実験室試験は数多く行われているが、実際の汚染現場に適用して地下水の浄化能力を検証したバイオレメディエーション手法はほとんどない(He et al., 2003; Macbeth et al., 2006)。食品副産物を広く利用するためには、バイオレメディエーションの効果を実験室で検証するだけでは不十分で、実際の汚染現場でその効果を実証することが必要であることがわかる。

本研究では、WPE によるバイオレメディエーションの評価を目的として、自然浸透法により WPE を土壤に注入し、

- (1) 地下水および土壤中のクロロエテン類濃度の低下
- (2) 注入後の地下水特性の変化から WPE の土壤への浸透を推定
- (3) 地下水および土壤中の脱塩素化能を有する *Dehalococcoides* 属細菌の数および微生物叢への影響

を検討した。

## 4. 2 方法

### 4. 2. 1 試薬と材料

混合物標準液 (14VOC 混合物標準液 (各 1 mg/mL メタノール溶液)) は、富士フィルム和光純薬株式会社 (日本、大阪) から購入した。混合物標準液は、ガスクロマトグラフィー用の標準液として使用した。その他の使用した化学物質は、特に指定がない限り、すべて試薬グレードを使用した。WPE は 2. 2. 1 (1) に示す方法にて作成したものを使用した。

### 4. 2. 2 WPE の実汚染現場の適用性試験

WPE の実汚染現場への適用性を評価するためのラボ試験 (適用性試験) を実施した。適用性試験の一部は、過去の報告 (He et al., 2003) に基づき実施された。123 mL のガラス瓶に WPE を 0.7 mL、実汚染現場で採取した地下水を 109.3 mL 加え、総量を 110 mL とした。対照となるガラス瓶には、地下水のみを入れた。ガラス瓶は、PTFE (ポリテトラフルオロエチレン) ライニングのブチルゴム栓とアルミシールで密栓し、窒素ガスでパージして嫌気的環境を整えた。この溶液を 30°C で静置し、任意の時間におけるクロロエテン類の濃度を測定した。地下水中の TCE、12DCE、VC の濃度はヘッドスペースガスクロマトグラフィー (HS-GC) で分析し、乾式電気伝導度検出器 (DELCD)、光イオン化検出器 (PID) を使用した。12DCE の濃度は、*cis*-1,2DCE と *trans*-1,2DCE の濃度の和とした。

### 4. 2. 3 実汚染現場の概要

実汚染現場は、鉱物油や有機溶剤を扱う大阪の工場跡地で、TCE の使用履歴があった。事前の汚染調査により、地下水と土壤に TCE、12DCE、VC が存在することを確認した。

現地実証サイトでは、土壤の透水係数の測定に Creager 法 (Justin et al., 1945) を採用した。Creager 法は、対象となる土壤の 20% 粒径 (D20) から透水係数の近似値を推定する。本試験では、井戸設置時に実施したボーリング調査から中礫 (粒径 4.75 mm 以上) を除いて採取した試料について粒度分布曲線を作成し、Creager 法により D20 から透水係数を算出した。

試験地における地下水の流速は、浸透速度が動水勾配に比例するというダルシーの法則 (Kalbus et al., 2006) に従い、以下の式で算出した：

$$v = ki$$
$$i = \Delta h/l$$

ここで、 $k$  : 透水係数、 $i$  : 動水勾配、 $\Delta h$  : 水頭差、 $l$  : 観測点間距離

地下水は実際には間隙を流れるため、実際の流速はダルシー流速を間隙率で割って算出した (Kalbus et al., 2006)。

### 4. 2. 4 実汚染現場のレイアウトと実施内容

#### (1) 井戸の配置と WPE 注入

Fig. 4-1 に井戸配置と土質断面の模式図を示す。井戸 T-1 は、WPE を注入するために設置した。モニタリング井戸 M-1 と M-2 は、注入井戸 T-1 からそれぞれ 3.5 m と 5 m の位置に、地下水の流れ方向 (推定) の下流側に設置した。

入井戸 T-1 には、2 倍に希釈した WPE (全有機炭素 (TOC) 6600 mg/L) 約 1000 L を、約 2 日間かけて自然流下で注入した。

## (2) 地下水および土壌のモニタリング

地下水と土壌のモニタリングは、井戸 T-1、M-1、M-2 で行った。地下水モニタリングは、WPE 注入 31 日前、注入直前、注入後約 7 ヶ月まで任意の間隔で実施した。土壌は、WPE 注入 31 日前、WPE 注入後約 3.5 ヶ月および約 7 ヶ月後に、ボーリングによる土壌サンプルの採取によりモニタリングを行った。

## (3) 地下水および土壌中のクロロエテン濃度の分析

地下水中の TCE、12DCE、VC の濃度を HS-GC 法で分析し、検出には DELCD と PID を使用した。12DCE の濃度はシス型とトランス型の濃度の合計から算出した。土壌中の TCE、12DCE、VC 濃度の分析は、土壌と蒸留水を 1 : 10 の割合で混合し、2 時間振とうした後、上澄みを採取して地下水と同様の方法で分析した。

## (4) 地下水の性状測定

地下水の性状は、以下のように測定した。酸化還元電位（以下、ORP）、電気伝導率（以下、EC）、pH は、マルチパラメーター水質計（YSI proDSS; YSI Inc., 米国）の電極を井戸に挿入して同時に測定した。その他のパラメータは、地下水サンプルを用いて実験室で分析した。TOC は燃焼酸化-赤外線 TOC 法により、硫酸塩はイオンクロマトグラフィーにより測定した。

## (5) 微生物モニタリング

### 1) *Dehalococcoides* 属細菌数

土壌および地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌の数は、同菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR によって決定した(He et al., 2003; Kurata et al., 2001)。

### 2) 次世代シーケンサーによる微生物相の解析

16S rRNA 遺伝子アンプリコンに基づく次世代シーケンサーを用いて、土壌と地下水中の細菌微生物相を解析した。真正細菌の 16S rRNA 遺伝子量は、リアルタイム PCR で測定した。

真正細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅するために、プライマー 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') とシーケンス解析に必要な配列を含む 802R-ミックス (5'-TACNVGGGGTATCTAATCC-3'、5'-TACCAGTATCTAATTC-3') を PCR 増幅に用いた(Cai et al., 2013)。得られた PCR 増幅産物を精製し、MiSeq (Illumina 社) でのシーケンス解析に供した。データ解析は、得られた配列データを OUT (相同度  $\geq 97\%$ ) に分類し、Greengene (DeSantis et al., 2006) を用いて行い、系統分類の推定には Silva の Living Tree (<http://A16S16S.rRNA.Databases>) に対する相同性検索、[www.arb-silva.de/projects/living-tree/](http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/)) を実施した。各分類群に属する配列データ数を集計し、系統構造を棒グラフで示した。

### 3) 統計解析

分散分析 (ANOVA) は、JMP™ (Version 17, SAS Institute, Cary, NC, USA) ソフトウェアを用いて実施した。3 反復の平均値間の有意な差 ( $p < 0.05$ ) は、スチューデントの *t*-テストを用いて確認した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 WPEの実汚染現場への適用性を評価するための適用性試験

実証試験場の既存井戸から採取した地下水を用いて処理能力試験を実施した。地下水中には TCE、12DCE、VC が存在した。このとき採取した地下水中の *Dehalococcoides* 属細菌の数は  $1.0 \times 10^2$  copies/mL であった。処理能力試験の結果を Fig. 4-2 に示す。WPE を注入していない対照サイトでは、28 日間の試験期間中、12DCE と VC の濃度はほとんど変化していない。一方、WPE を注入した部位では、12DCE 濃度が減少し、VC 濃度は一時的に上昇した後、減少する傾向を示した。これらの結果から、実汚染現場への WPE 注入により、地下水中のクロロエテン類濃度が低下することが確認された。

### 4.3.2 実汚染現場の概要

実汚染現場において井戸設置時に実施した土壌調査の結果、地下水位は -2.77 m であった。飽和層は主に砂にシルトが混合したものであった。地層は概ね、地表面下 0 ~ -3.0 m は礫質砂、-3.0 ~ -9.7 m は砂質ローム、-7.4 ~ -7.9 m は粘土質が混在していた。実汚染現場の砂質ロームの透水係数は、粒径 20% で Creager 法により  $1.75 \times 10^{-5}$  m/s と推定された（データ示さず）。また、試験地の透水勾配は T-1 から M-2 方向に約 0.008 m/m であった（試験時のモニタリングデータによる、データ示さず）。また、透水係数に動水勾配を乗じたダルシー流速は  $1.4 \times 10^{-7}$  m/s であった。

地下水は実際には間隙を流れるため、ダルシー流速を推定間隙率 0.25（砂質ローム）で割ることにより、実流速を  $5.6 \times 10^{-7}$  m/s と算出した (Bonazountas, Wagner, 1981)。

地下水中のクロロエテン類は、主に 12DCE と VC からなり、TCE は低濃度であった。

Fig. 4-3 は、地下水中のクロロエテン類濃度の経時変化を示したものである。T-1 に WPE を注入後、分解生成物である 12DCE と VC の濃度は急激に低下したが、その後上昇し、それぞれ 70 日目、120 日目あたりから再び減少に転じた。TCE の濃度は WPE 注入後 1 ヶ月間は上昇傾向にあったが、その後は定量下限値 (0.003 mg/L) 未満で推移した。M-1 および M-2 では、12DCE および VC の濃度は WPE 注入後にわずかに上昇し、70 日目頃に減少する傾向が見られた。

Fig. 4-4 は、地下水の TOC、EC、ORP、pH の経時的な変化を示したものである。WPE は有機物と電解質を含む液体であるため、TOC と EC を測定することで、WPE の土壌への浸透について何らかの知見が得られると期待された。WPE 注入前の各井戸では、TOC が 240 ~ 400 mg/L と高い値を示していた。このサンプルは、井戸を設置した直後に採取されたもので、井戸設置時の掘削による土壌の乱れのため、比較的多くの油膜が一時的に存在していた。TOC の値が高いのは、採取した試料に油分が含まれていたためと思われる。WPE 注入後、T-1 の TOC はさらに上昇し、70 日目以降に減少した。一方、M-1 および M-2 では、70 日目頃以降に TOC が増加した。EC は、注入前の各井戸で 0.44 ~ 0.6 mS/cm の範囲であった。WPE 注入後、T-1 の EC は急激に増加し、70 日目以降に減少し始めた。一方、M-1 および M-2 の EC は徐々に増加し、70 日目以降に横ばいとなった。ORP は両井戸とも WPE 注入後に減少し、その後は -400 から -500 mV で推移した。T-1 の pH は WPE 注入直後に 5 以下に減少したが、140 日目頃には注入前に近い 6.9 に回復した。一方、M-1 および M-2 の pH は注入直前には 6.8 から 6.9 であったが、WPE 注入後は 6.5 から 6.6 程度に緩やかに減少し、204 日目以降に 6.7 から 6.9 に再び増加した。Table 4-1 に、土壌中のクロロエテン類濃度の変化を示す。T-1、M-1、M-2 周辺のクロロエテン類汚染土壌の深さは、地権者から提供された情報によると、地表面下 -3.0 から -5.0 m の範囲であった。WPE 注入前のクロロエテン類の濃度は、9 深度中 5 深度（クロロエテン類 3 種は各 3 深度）で BLQ (Below the Limit of Quantification) であった。クロロエテン類が定量された 4 つの深度では、T-1 の深度 -4.0 m

における 12DCE の最大濃度は 0.024 mg/L と低濃度であった。この 4 つの深度では、T-1 の -4.0 m 深度を含む 3 つの深度で 204 日目に濃度がさらに減少した。一方、WPE 注入前にクロロエテン類が定量されなかった 2 つの深度 (T-1 および M-1 の -3.0 m 深度) では、204 日目に低濃度のクロロエテン類が検出された。

#### 4. 3. 3 *Dehalococcoides* 属細菌数の変化

フィールド実証地では、WPE 注入前の 3 つの井戸で、*Dehalococcoides* 属細菌の平均数は約  $5.0 \times 10^4$  copies/mL であった。WPE 注入後、T-1 では一時的に *Dehalococcoides* 属細菌の数が減少したが、その後 pH の上昇とともに増加した (Fig. 4-4 (D))。

M-1 では、55 日目頃からわずかに増加し、試験期間中はほぼ横ばいで推移した。M-2 では、55 日目以降に増加し、140 日目頃には WPE 注入前の 5 倍の数値となった。140 日目以降は、すべての井戸でわずかに減少する傾向を示した (Fig. 4-5)。

#### 4. 3. 4 地下水と土壌の微生物群集組成

WPE 注入前後の地下水と土壌の微生物相の変化を観察した。測定地点は、WPE 注入による影響が最も顕著であった M-1 を選択した。WPE 注入 31 日目の地下水と土壌(地下 4.0 m) の微生物相の変化をそれぞれ Fig. 4-6 (A)、Fig. 4-6 (B) に示す。WPE 注入前は *Deltaproteobacteria* が優勢で全体の 21.4% を占めていたが、WPE 注入後 103 日目には *Betaproteobacteria* が優勢となり 58.7% を占めた。WPE 注入後 206 日目には、*Deltaproteobacteria* が 25.5%、*Betaproteobacteria* が 23.3% となった。一方、*Dehalococcoides* 属が属する *Dehalococcoidetes* (*Chloroflexi* 門) は、WPE 注入前の 4.8% から注入後 103 日目に 2.0%、206 日目に 3.8% に変化していることがわかった。地下水中の真正細菌数は、注入後 103 日目に  $1.1 \times 10^7$  copies/mL と約 2 倍になったが、206 日目には注入前の水準に戻った。一方、*Dehalococcoides* 属は WPE 注入前後で大きな変化はなく、 $1.0 \times 10^4$  のレベルで推移した。土壌微生物相は、当初 *Deltaproteobacteria* (36.4%) が優勢であったが、WPE 注入後 103 日目に *Gammaproteobacteria* (26.5%) および *Betaproteobacteria* (26.5%) が地下水と同じように優勢となり、WPE 注入後 206 日目に *Gammaproteobacteria* (26.5%) および *Betaproteobacteria* (26.5%) が優勢となった。WPE 注入後 206 日目には、*Deltaproteobacteria* が 20.0% と再び優勢となり、*Gammaproteobacteria* と *Betaproteobacteria* は無視できる程度となった。*Dehalococcoidetes* は、WPE 注入前の 2.6% から、WPE 注入後 103 日目に 4.2%、206 日目に 11.6% に変化した。土壌中の真菌数も WPE 注入後 103 日目に 4 倍の  $2.8 \times 10^8$  copies/mL に増加し、206 日目には注入前の水準に戻ったが、*Dehalococcoides* 属細菌は注入後 103 日目に約 5 分の 1 まで減少し、206 日目には注入前の水準に戻った。

一方、*Dehalococcoides* 属細菌は注入後 103 日目に約 1/5 に減少し、206 日目以降は注入前の水準に戻り、概ね  $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$  copies/mL で維持された。

#### 4.4 考察

本研究では、食品副産物から調製した WPE によるクロロエテン類のバイオレメディエーションの有効性を実際の汚染現場で検証した。

現場実証地は TCE および鉍物油の使用履歴があり、TCE が土壌に漏出してから少なくとも 20 年が経過している。試験前の地下水の pH は中性に近く、*Dehalococcoides* 属細菌数は  $1.0 \times 10^2$  レベルで存在していた。また、TCE とその分解産物である 12DCE、VC も検出された。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進行していることが推察された(Wiedemeier et al., 1998a)。*Dehalococcoides* 属細菌は、現地に存在する水素供与体からの水素供給により還元的脱塩素化を行ったものと考えられる。水素供与体としては、土壌中の有機物(主に植物残渣や動物残渣、微生物細胞およびそれらの分解物)や腐植物の他に、現地で確認された鉍物油が考えられる(X. Zhang et al., 2022)。

また、実汚染現場で採取した地下水を用いた適用性試験により、WPE の添加により 12DCE と VC の濃度が低下することが確認された (Fig. 4-2)。WPE には 4 種の有機酸 (L-乳酸、L-酒石酸、コハク酸、リンゴ酸) が含まれており、この有機酸が水素供与体となって脱塩素化反応が進行したものと考えられる。

このことから、WPE はサイト内に生息するクロロエテン分解菌による自然減衰を促進すると判断し、フィールド実証試験を実施した。

フィールド実証試験では、WPE 注入後、すべての井戸で 12DCE と VC の濃度が上昇し、その後減少したこと、また *Dehalococcoides* 属細菌数が増加する傾向が見られたことから、WPE 注入がクロロエテンの分解に何らかの影響を与えたと考えられる。

TCE の主要な分解経路の 1 つが還元的脱塩素化である。これは、嫌気性条件下で水素供与体から生じた水素が、クロロエテンの塩素原子と置換される連続的な電子移動プロセスである。この過程で、TCE はジクロロエチレン異性体 (主に *cis*-DCE、*trans*-DCE および 1,1-DCE) から VC へ、さらに最終的にはエチレンなどの無害な物質に変換される。この一連の分解には様々な微生物が関与するが、多くの微生物は DCE までは分解できるものの、VC まで分解するのは、*Dehalococcoides* 属細菌のみであるとの報告がある(Antoniou et al., 2019)。本研究でも WPE が水素供与体となって同様な分解機構により TCE の分解が生じたと考えられる。*Dehalococcoides* 属細菌は、TCE をエチレンに完全に変換できることから、*Dehalococcoides* 属細菌の増殖は TCE およびその分解産物である 1,2-DCE や VC への分解を促進していることが示唆された。

TCE や VC の発ガン性はグループ 1 でヒトに対する発ガン性があるかどうかの「証拠の強さ」が最も大きい (International Agency for Research on Cancer, IARC)。したがって、これらの分解生成物を蓄積させることなく無害なエチレンまで速やかに分解することは重要と考える。

しかし、本試験は汚染サイトの一部で実施され、試験場周辺に TCE などの汚染物質が存在していたため、周辺からの TCE の流入、すなわち T-1 では 35 日頃まで、M-2 では 105 日頃以降の TCE 濃度の上昇が確認された。この周辺からの TCE の流入は、今回観測されたクロロエテン類の濃度変化に影響を与え、室内試験で見られたような分解生成物の生成と最終的な還元といった明確な順次分解を確認することができなかったと思われる。

WPE の浸透は、M-1 および M-2 の TOC と EC の変化により確認した。TOC は有機物濃度の指標であり、WPE に含まれる有機酸や多糖類などの有機物の総量をおおよそ反映している。EC は電解質濃度の指標で、WPE に含まれる塩類や窒素などの無機物や一部のイオン化した有機酸の数をおおよそ反映している。この 2 つの指標を測定することで、WPE が飽和土壌層に浸透していく様子を観察することができた。TOC は WPE 注入後 70 日目頃まで増加したが、EC は注入後徐々に増加し、70 日目頃からは横ばいになった。これらの変化は、

WPE の浸透に起因すると考えられる。試験地点における地下水の実流速の計算値  $5.6 \times 10^{-7}$  m/s から、地下水は 70 日間で 3.9 m 移動したと推定され、WPE 中の有機酸が土壤に吸着・脱着しながら移動したと仮定すると、約 70 日後には地下水が 3.5~5.0 m の深さに到達したと考えるのが妥当であると考えられる。

ORP は地下水の酸化還元状態を示し、自然減衰によるクロロエテンの還元的脱塩素化には -100 mV 以下の還元状態が必要であることが報告されている(Wiedemeier et al., 1998a)。地下水の ORP は、WPE 注入前は約 -200 mV であったが、WPE 注入後は -400 mV に達し、その後もこの値を維持していた。

自然減衰によるクロロエテン類の還元的脱塩素化には、地下水の pH が 5~9 の範囲が適していると報告されている(Wiedemeier et al., 1998a)。T-1 では、酸性である WPE の注入により、一時的に pH が 5 程度まで低下し、この影響で *Dehalococcoides* 属細菌の数が一時的に減少したが、pH の回復に伴い増加した。このことから、提案した pH 5 以下の細菌生育阻害範囲 (pH 5 以下、pH 9 以上) は適切であると考えられる。実際の WPE を用いたバイオレメディエーションでは、pH や ORP がバイオレメディエーションに適した地下水の性状の範囲から外れないように管理することが重要である。

クロロエテン類の嫌気性バイオレメディエーションのためには機能的脱塩素化細菌の形成が重要である。還元的脱塩素化は、クロロエテン類の完全な脱塩素化を行うための重要な経路であり、発酵性、メタン生成性、鉄および硫酸還元性の微生物群によって行われる。還元的脱塩素微生物は、クロロエテンで汚染された地下水、土壤から分離、特定、特性評価がなされている。これまで同定されている還元的脱塩素微生物として、*Proteobacteria* 門、*Firmicutes* 門、*Chloroflexi* 門の微生物が報告されている。*Dehalogenimonas* 属、*Dehalobacter* 属、*Dehalococcoides* 属に属する細菌は、専ら嫌気性でクロロエテン類のみを代謝する。*Desulfoluna* sp.、*Desulfovibrio* sp.、*Sulfurospirillum* sp.、*Desulfitobacterium* sp. は適応的代謝を行う通性細菌である(Dutta et al., 2022)。

本研究では、WPE 注入後に地下水および土壤の微生物相が変化することを確認した。WPE 注入前後で地下水および土壤の微生物群集組成に大きな変化が見られ、特に *Proteobacteria* 門の *Betaproteobacteria* 綱、*Deltaproteobacteria* 綱、*Epsilonproteobacteria* 綱、*Gammaproteobacteria* 綱が関与していることが確認された。

地下水と土壤の両方で、WPE 注入前は *Deltaproteobacteria* 綱が優勢であり、この綱には硫酸還元菌 (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema* など) および硫黄還元菌 (*Desulfuromonas* など) が含まれており、これらはすべて PCE の嫌気条件下での共代謝分解が報告されている(Saiyari et al., 2018)。

脱塩素反応を担う還元的デハロゲナーゼ遺伝子 (RDase 遺伝子) については、*Deltaproteobacteria* クラスの細菌の 10.4% が保有しており、この値は、*Alphaproteobacteria* 綱の 7.8%、*Betaproteobacteria* 綱と *Epsilonproteobacteria* 綱の 0.14%、*Gammaproteobacteria* 綱の 0.4% と他の *Proteobacteria* よりも高い (Liu, Högblom, 2018 年)。自然減衰の進行は、これらの細菌の存在によるものと思われる。

クラス *Betaproteobacteria* は、微生物群集組成全体の 58.7% を占め、WPE 注入後 103 日目の地下水中の主要なクラスであった。

*Betaproteobacteria* 綱の細菌のうち、鉄酸化細菌 *Gallionella* spp.、土壤細菌 *Aquabacterium* spp.、水素酸化細菌 *Hydrogenophaga* spp. が最も多い割合で存在した。*Aquabacterium* spp. は短鎖塩素化パラフィンを、*Hydrogenophaga* spp. は TCE を好氣的に共代謝することが報告されている(Hellal et al., 2021; Wu et al., 2021)。

したがって、これらの細菌の存在は、この時期、還元的脱塩素化と同時に好氣的な共代謝による脱塩素化が行われていた可能性を示唆している。Kotik らもクロロエテンのバイオレ

メデイエーションにおいて、好気性および嫌気性脱塩素菌が共存することを報告している (Kotik et al., 2013)。好氣的共代謝はオキシゲナーゼ酵素を有する微生物などがクロロエテン類を増殖のための基質やエネルギー源として使うことなく分解する機構である。

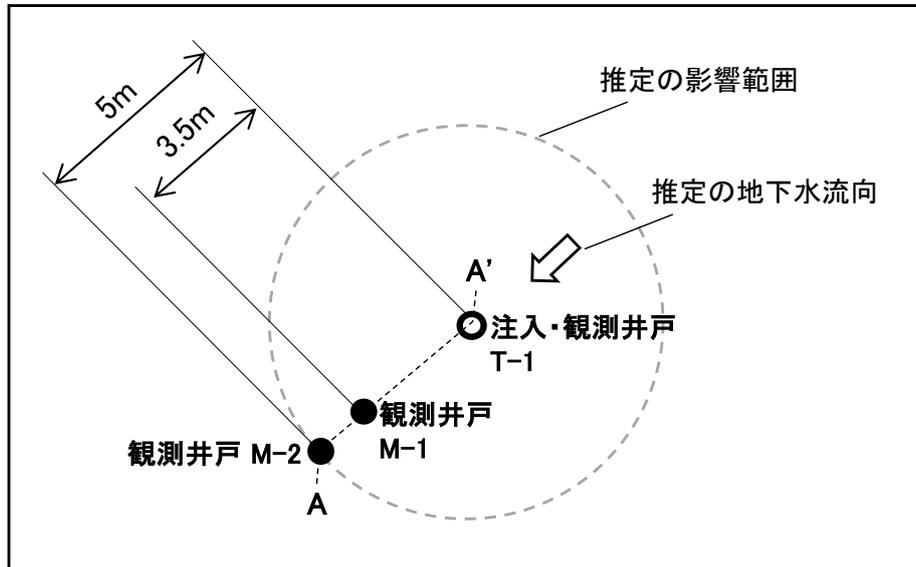
WPE 注入後 206 日目の地下水中の主要な細菌は、*Betaproteobacteria* 綱と *Deltaproteobacteria* 綱であった。還元的脱塩素化および嫌氣的共代謝分解が可能な微生物が存在した。

*Dehalococcoides* 属細菌が属する *Dehalococcoidetes* 綱は、WPE 注入前 4.8%、注入後 103 日目 2.0%、注入後 206 日目 3.8%と、地下水の微生物群集組成全体に占める割合は少なかった。WPE 注入後 103 日目の土壌では、クラスβ蛋白質細菌に加えて、クラスγ蛋白質細菌が 26.5%を占め、主要な細菌クラスであった。クラス *Gammaproteobacteria* 綱の主要な種は *Pseudomonas* 属であった。

*Pseudomonas* 属は乳酸を代謝してピルビン酸を基質として増殖することが知られているため (Li et al., 2021)、*Pseudomonas* 属は WPE に含まれる乳酸を分解して増殖した可能性が考えられる。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がある。

注入後 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。*Nitrospira* 綱は、米国の TCE と cis-12DCE で汚染された 300 の修復サイトから収集された好気性細菌集団にも見られた (Guan et al., 2013; Miller et al., 2007)。*Dehalococcoides* 属細菌が属する *Dehalococcoidetes* 綱は、当初土壌中の全微生物群集組成に占める割合は大きくなかったが、その後徐々に増加し、WPE 注入前は 2.6%、注入後 103 日目では 4.2%、注入後 206 日目では 11.6%であった。これらの結果は、これらの細菌がクロロエテン類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だけでなく、嫌氣的および好氣的共代謝的分解も促進される可能性があると考えられる。本研究では分解のメカニズムは明らかにされていないが、WPE を土壌に注入すると、*Gammaproteobacteria* 綱の *Pseudomonas* 属によって WPE に含まれる乳酸が分解され、水素が生成される。生成した水素は、*Deltaproteobacteria* 綱の硫酸還元菌および硫黄還元菌、*Dehalococcoidetes* 綱の *Dehalococcoides* 属による還元脱塩素化に利用されたものと考えられる。また、さらに WPE に含まれるアンモニアや分解生成物 (メタン)、クロロエテン類の分解生成物であるエチレンなどが *Betaproteobacteria* 綱の *Aquabacterium* 属、*Hydrogenophaga* 属による共代謝分解に利用されたものと考えられる (Fig. 4-7)。

(A)



(B)

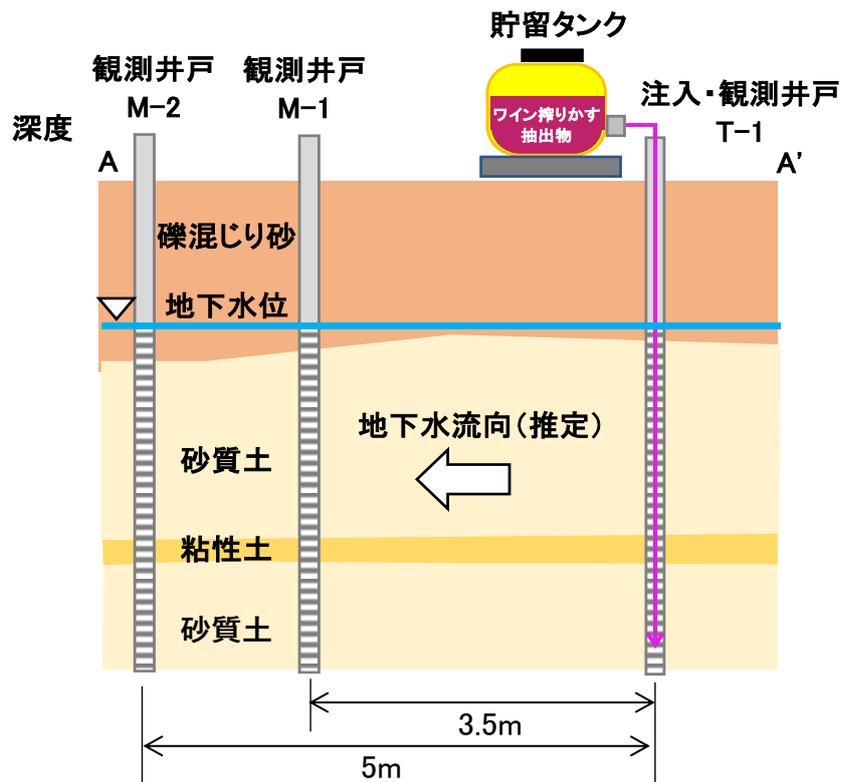
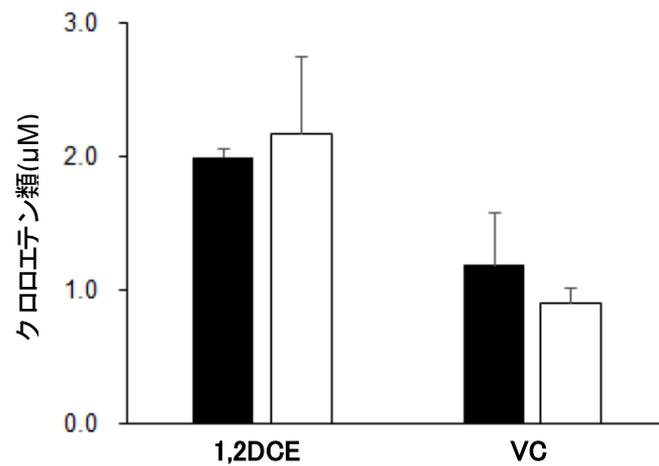


Fig. 4-1 実証試験場のレイアウト(A)とA-A'に沿った断面(B) (縮尺なし)

(A) 対照



(B) WPE

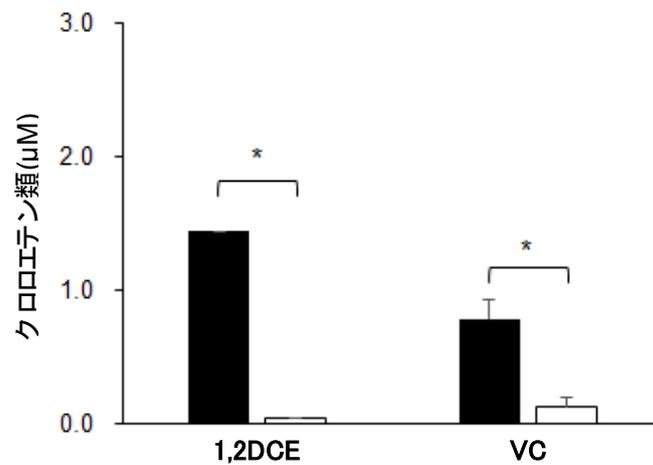


Fig. 4-2 実汚染地下水へ WPE 添加後のクロロエテン類の濃度

黒いバーは WPE 添加後 0~21 日目までの平均値、白いバーは添加後 28~50 日目までの平均値

データはすべて 3 回の繰り返し測定 of 平均値 ± 標準偏差 (n = 3)

アスタリスクの付いたバーは、Student's t-test により有意差が示された ( $p < 0.05$ )

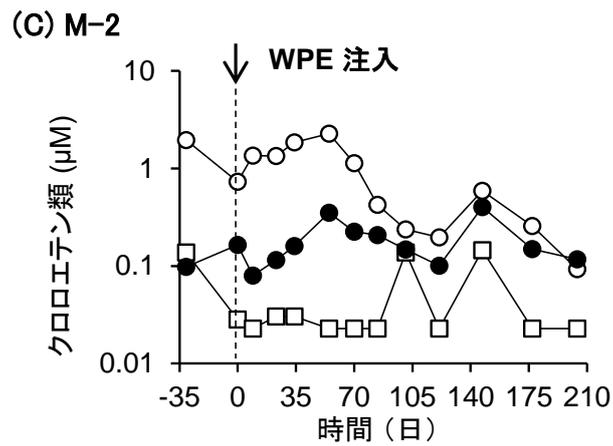
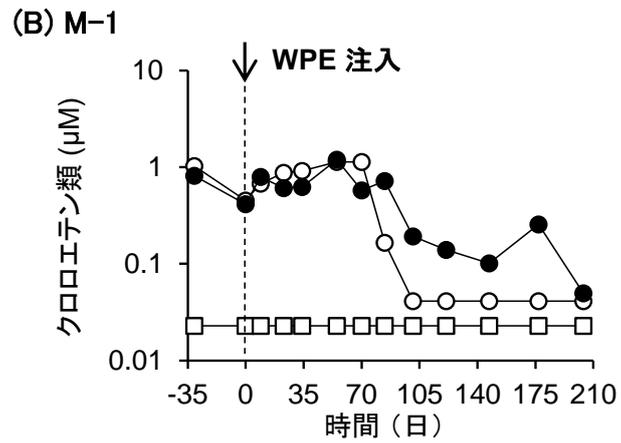
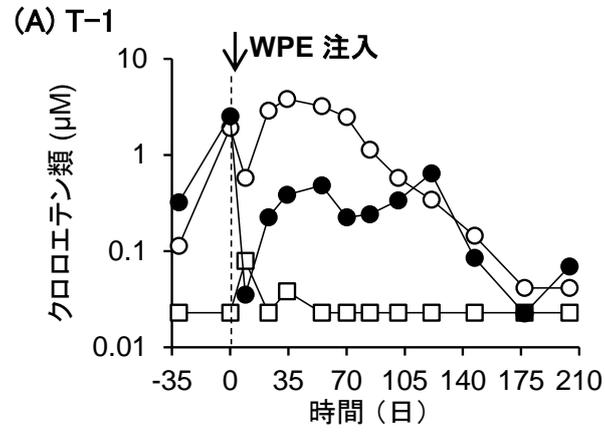


Fig. 4-3 地下水中のクロロエテン濃度の変化

TCE(□)、12DCE(O)、VC(●)

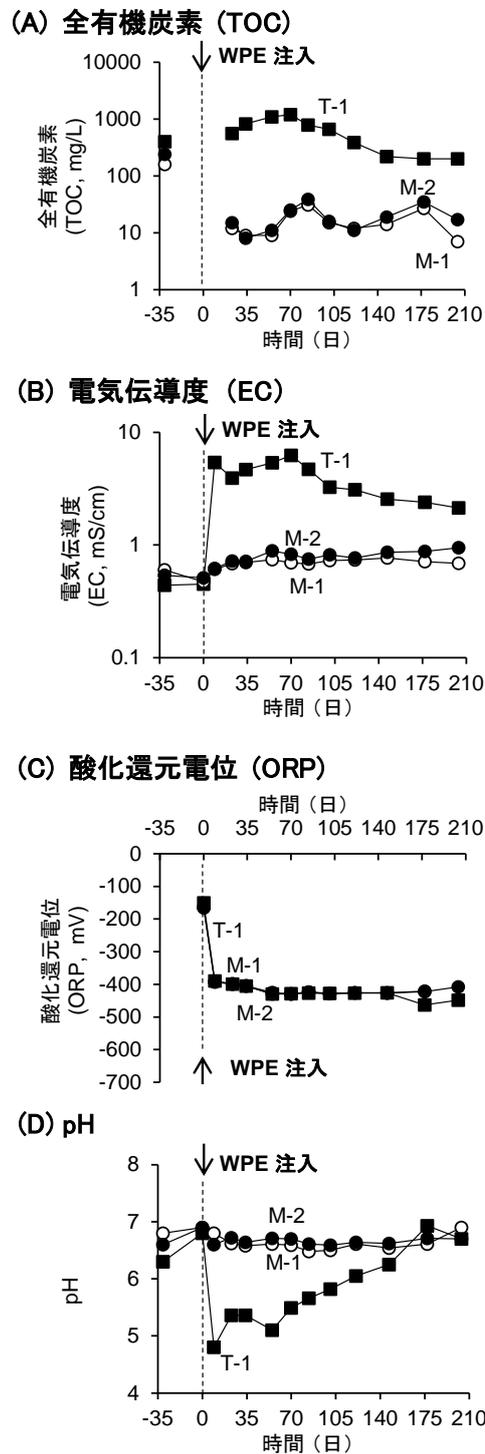
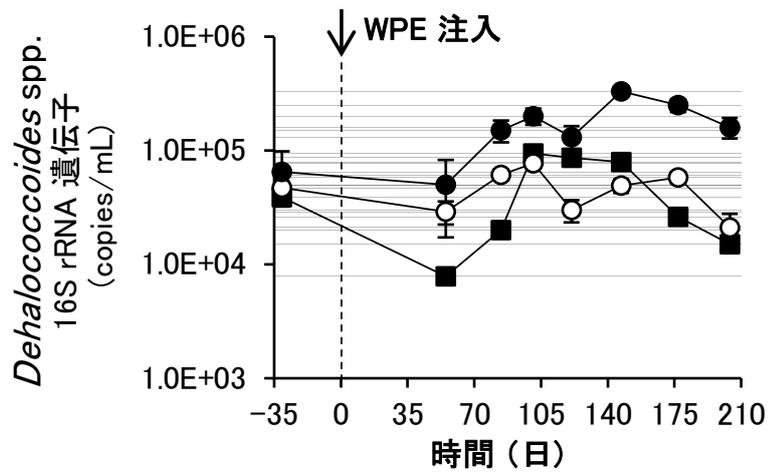


Fig. 4-4 地下水特性の変化

T-1(■)、M-1(O)、M-2(●)

(A) 地下水



(B) 土壌

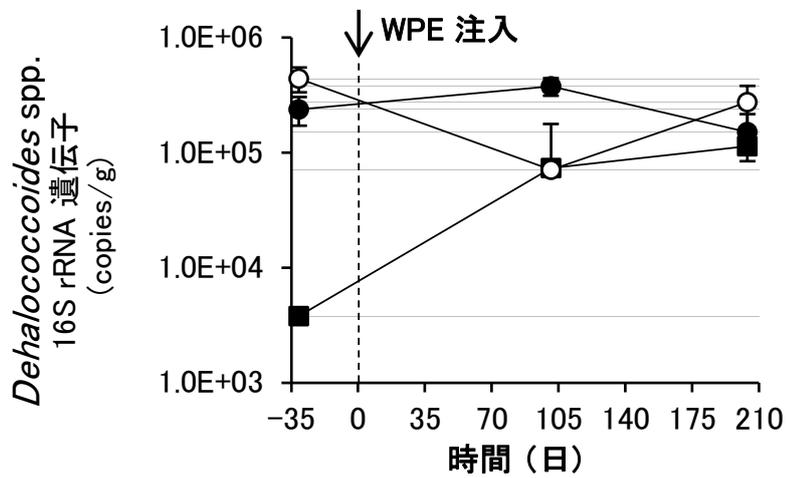


Fig. 4-5 (A) 地下水および(B) 土壌\*中のデハロコッコイデス属菌数の変化

T-1(■)、M-1(O)、M-2(●)

値は平均値±SD(n = 3)

\*土壌サンプリング深度は地下 4m

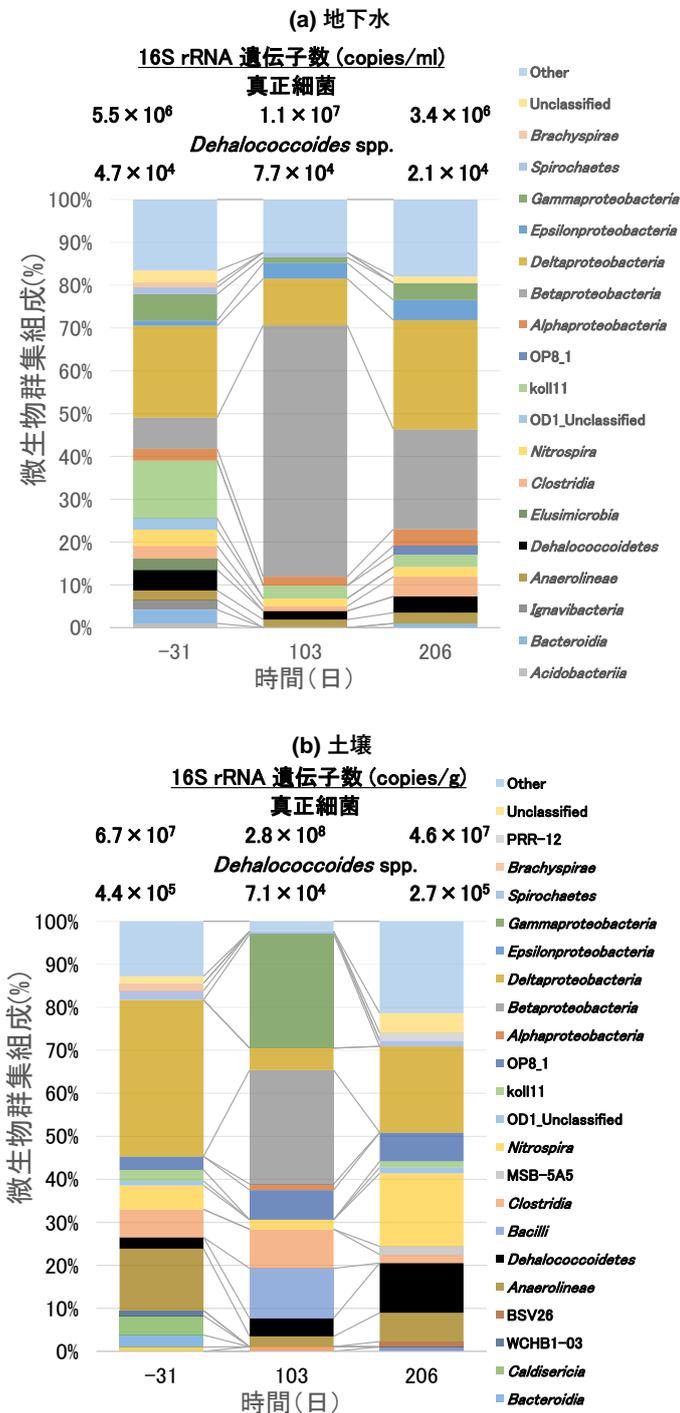


Fig. 4-6 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシング(細菌叢解析)により同定された M-1 の(a)地下水と(b)土壌\*における微生物群集組成

相対存在量が1%以上の微生物種は個別に、1%未満の微生物種は「その他」に分類して示した

\*土壌サンプリング深度は地下4m

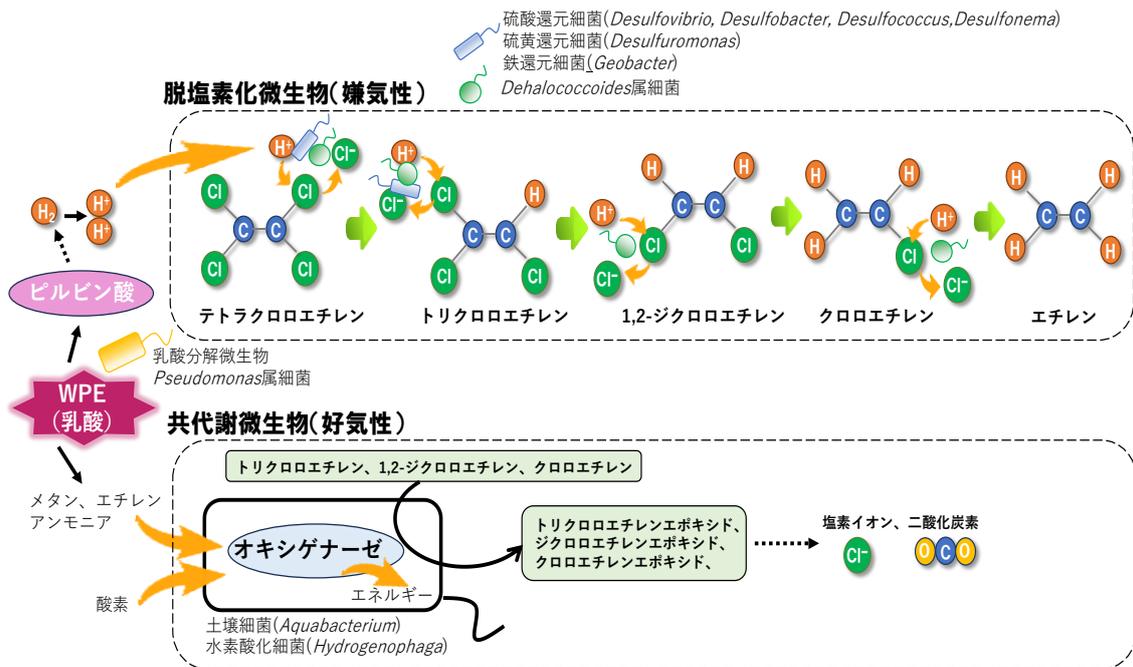


Fig. 4-7 WPE によるクロロエテン類の分解機構の概念

Table 4-1 土壌中のクロロエテン濃度の変化

## (A) T-1

深度* (G.L.-m)	時間 (日)	TCE (mg/L)	12DCE (mg/L)	VC (mg/L)	DHC** (copies/g)
	-31	ND	0.008	ND	NT
3.00	101	ND	ND	ND	NT
	204	ND	ND	0.0008	NT
	-31	ND	0.024	0.0013	3.8×10 <sup>3</sup>
4.00	101	ND	0.006	ND	7.3×10 <sup>4</sup>
	204	ND	ND	ND	1.1×10 <sup>5</sup>
	-31	ND	ND	ND	NT
5.00	101	ND	0.006	0.0005	NT
	204	ND	ND	ND	NT

## (B) M-1

深度* (G.L.-m)	時間 (日)	TCE (mg/L)	12DCE (mg/L)	VC (mg/L)	DHC** (copies/g)
	-31	ND	ND	ND	NT
3.00	101	ND	ND	ND	NT
	204	ND	0.012	ND	NT
	-31	ND	0.004	0.0011	4.4×10 <sup>5</sup>
4.00	101	ND	ND	ND	7.1×10 <sup>4</sup>
	204	ND	ND	ND	2.7×10 <sup>5</sup>
	-31	ND	ND	ND	NT
5.00	101	ND	ND	ND	NT
	204	ND	ND	ND	NT

**(C) M-2**

深度* (G.L.-m)	時間 (日)	TCE (mg/L)	12DCE (mg/L)	VC (mg/L)	DHC** (copies/g)
	-31	0.003	0.017	ND	NT
3.00	101	ND	ND	ND	NT
	204	0.013	0.017	ND	NT
-----					
	-31	ND	ND	ND	2.4×10 <sup>5</sup>
4.00	101	ND	ND	ND	3.8×10 <sup>5</sup>
	204	ND	ND	ND	1.5×10 <sup>5</sup>
-----					
	-31	ND	ND	ND	NT
5.00	101	ND	ND	ND	NT
	204	ND	ND	ND	NT

土壤と水を固液比 1:10 で振とうして得られた溶出液中の濃度

定量下限は TCE が 0.003 mg/L、12DCE が 0.004 mg/L、VC が 0.0005 mg/L

ND:定量下限値

NT:未測定

\*地表面からの深度

\*\* *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子数

## 第5章 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

### 5.1 はじめに

PCE や TCE のようなクロロエテン類は金属産業やドライクリーニングの溶剤など幅広く用いられているが(McCarty, 2010)、その発ガン性が指摘されており、土壌や地下水の汚染が顕在化している(Rajajayavel, Ghoshal, 2015)。汚染浄化技術としては、従来、地下水揚水技術や土壌ガス吸引といった物理化学的処理方法を中心に対処されてきたが、多くのコストやエネルギーを要することや、低濃度の汚染には効果が低いことが指摘されている(Park, 2016)。ここ数十年、低コストで低環境負荷な微生物のクロロエテン類の還元的脱塩素化反応を利用したバイオレメディエーションが実用化されている(Bradley, 2003)。クロロエテン類の分解能を有する嫌気性微生物は、有機酸などの水素供与体の分解によって生じる水素を電子供与体、PCE などを電子受容体として逐次的に脱塩素し、12DCE や VC を経由してエチレンやエタンへと無害化する(Dolinová et al., 2017)。多くの微生物が PCE を 12DCE に分解できることが知られているが、これまでの報告では PCE を VC まで分解できるのは *Dehalococcoides* 属細菌のみである(Maymó-Gatell et al., 1997)。クロロエテン類の脱塩素化は汚染地の自浄作用によっても起こっており、自然減衰(Natural Attenuation)と呼ばれている。現在、クロロエテン類の自然減衰が生じていることの確認方法と、それに基づく汚染状況のシミュレーション方法が提案されている(Wiedemeier et al., 1998b; 日野良太 et al., 2021)。

一方、嫌気性バイオレメディエーションをクロロエテン類の汚染地に適用するか否か判断するには、現地から採取した地下水を用いてクロロエテン類の脱塩素化反応の有無を確認する室内試験(以下、脱塩素化試験)を実施する必要がある。しかし、脱塩素化試験の結果を得るには時間と労力がかかるため簡便とは言えず、脱塩素化試験を実施せずに嫌気性バイオレメディエーションの適否を判断できることは非常に効率的である。

嫌気性バイオレメディエーションの適用可能性を簡便に判断する指標として、自然減衰が生じる環境条件の把握が重要と考えられる。筆者らはこれまで水素供与体としてワイン製造時に発生するブドウの搾りかすの抽出物(WPE)を活用した嫌気性バイオレメディエーションについて検討を行っており(Ohashi et al., 2023a)、いくつかの汚染地において脱塩素化試験を行う機会を得た。そこで本報告では、事前の汚染地の水質環境とその後実施した脱塩素化試験結果との関係を整理し、WPE を用いた嫌気性バイオレメディエーションの適用可能性を、脱塩素化試験を行うことなく判断するための指標について検討を行った結果を報告する。

## 5.2 方法

本報告で対象としたクロロエテン類汚染地は、A、D～F は機械部品製造工場、B はクリーニング工場跡地、C は油取扱い工場跡地であった。

汚染原因物質は、事前に土地所有者から示された情報では、A および C は TCE、B および D～F は PCE であった。クロロエテン類汚染地での採水は、A～D および F は、既存の観測井戸の有孔区間の中間深度からベラーを用いて行った。E では既設の揚水井戸から揚水ポンプでくみ上げた地下水を揚水配管に設けられたサンプリング配管から採取した。採取した試料は密閉ガラス瓶に入れて冷蔵し、室内に運搬した。

各地下水試料の採取時期は、A; 2022 年 3 月、B; 2019 年 1 月、C; 2019 年 10 月、D; 2019 年 6 月、E; 2019 年 7 月、F; 2019 年 11 月であった。C においては事前に土地所有者から示された情報では TCE の存在が示されていたが、脱塩素化試験前に採取した試料の TCE 濃度は定量下限値未満であった。

WPE は山梨県内のワイナリーより入手したワイン製造時に発生するブドウの搾りかすを用いて WPE を製造し、試験に供した(Ohashi et al., 2023a)。

クロロエテン類で土壌や地下水が汚染された 6 つの汚染地の地下水の水質測定および *Dehalococcoides* 属細菌数の定量は、既報の方法で実施した(Ohashi et al., 2023a) (Ohashi et al., 2023b)。12DCE、VC 濃度の分析はヘッドスペース-ガスクロマトグラフ法で行い、12DCE は *cis* 体と *trans* 体の合算とした。水温と酸化還元電位 (ORP) は、汚染地の観測井戸において ORP 計にて測定した。硝酸性窒素は、還元-ナフチルエチレンジアミン比色法、硫酸イオン濃度は、塩化バリウム比濁法またはクロム酸バリウム吸光光度法で行った。クロロエテン類分解微生物である *Dehalococcoides* 属細菌数は、同属菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子を標的にしたリアルタイム PCR 法にて行った。

脱塩素化試験は、WPE とクロロエテン類汚染地から採取した地下水を用いて既報に準じて実施した(Ohashi et al., 2023a)。

### 5.3 結果

Table 5 に 6 つのクロロエテン類汚染地において実施した地下水の水質測定結果、および各汚染地で採取した地下水と WPE を用いた脱塩素化試験における脱塩素化反応の有無を確認した結果を示す。本報告では、既報(Wiedemeier et al., 1998b; 日野良太 et al., 2021)を参考にクロロエテン類の生物学的な自然減衰が生じる環境条件を評価する上で重要な測定項目のうち、12DCE、VC の存在、水温、pH、ORP、硝酸性窒素、硫酸イオン、*Dehalococcoides* 属細菌数を測定することとした。土地所有者から得た情報では、汚染原因物質は A と C は TCE、その他は PCE であった。

汚染原因物質の分解生成物である 12DCE、VC は、汚染地の既設の観測井戸から採取した地下水での濃度を示した。土地所有者が複数の観測井戸を設置しており、それらから複数の試料が採取できた場合、その最大値と最小値を示した。12DCE および VC については、E の一部の井戸では定量下限値未満であったが、その他サイトではいずれの観測井戸においても 12DCE および VC は共に検出された。水温は B および C で測定した。季節変動を考慮する必要があるが、いずれの汚染地でも 10°C を下回ることにはなかった。pH は、いずれの汚染地でも pH 5~9 の間であったが、汚染地 E は pH 5.3~6 とやや低い値を示した。ORP は B および C で測定し、いずれの汚染地でも -50 mV 未満であり還元性雰囲気であった。硝酸性窒素は、F で 50 mg/L、その他は 1 mg/L を下回った。硫酸イオンは、A および C で 20 mg/L を超える地点があったが、100 mg/L を超えることはなかった。クロロエテン類分解微生物である *Dehalococcoides* 属細菌数は、E と F で定量下限値未満であった。その他の地点では A のように  $4.1 \times 10^4$  copies/mL と比較的高い地点もあったが、D のように  $1.7 \times 10^1$  copies/mL と低い地点もあった。

汚染地から採取した地下水を用いて実施した脱塩素化試験において、汚染原因物質から VC が低減するまで逐次分解が進行したのは A~D であった。E および F では、12DCE で分解が停滞した (Fig. 5)。

A~D の地下水の水質は、C で硫酸イオンがやや高い地点があったものの概ね既報 (Wiedemeier et al., 1998b; 日野良太 et al., 2021) で示されている阻害範囲外であった。E は *Dehalococcoides* 属細菌数が定量下限値未満で、分解生成物である 12DCE や VC が確認できない地点があった。また、pH が 6 以下と他の汚染地に比べやや低い傾向であった。F は硝酸塩が 50 mg/L と阻害範囲の 1 mg/L を超えさらに、*Dehalococcoides* 属細菌数が定量下限値未満の地点があった。

#### 5.4 考察

既報においてPCEやTCEなどのクロロエテン類の生物学的な自然減衰を評価する上で重要な測定項目が列挙されている(Wiedemeier et al., 1998b; 日野良太 et al., 2021)。12DCEまたはVCの存在は、PCEやTCEの自然減衰が地下水中で起こっていることを示すものである。水温は20°C以上で微生物分解が加速されるが、20°C以下でも一定の分解が進むことから10°C以下が阻害条件として示されている。pHは自然減衰が阻害される範囲として、5以下、9以上が示されているが、pH 6.0未満に低下すると、脱塩素の速度と程度が大幅に低下し(Puentes Jácome et al., 2019)、*Dehalococcoides* 属細菌の成長が阻害されるとの報告がある(Ortiz-Medina et al., 2022)。嫌気性のクロロエテン類分解微生物の活動には高い還元性雰囲気が必要なため、地下水のORPは負の値であることが必要である(Wright, Cox, 2003)。還元性雰囲気になると、脱窒素細菌が硝酸塩を窒素に変える脱窒素反応が起こるので、硝酸塩濃度が低下していることは自然減衰の生じる強い裏付けとなっている。1 mg/Lを超える硝酸塩は脱窒反応、20 mg/Lを超える硫酸イオンは硫酸還元反応といった還元経路において、水素供与体を利用するため、同じく水素供与体を必要とする脱塩素化反応との競合阻害を引き起こす可能性があるとの報告がある(Wiedemeier et al., 1998b)。ただし、硝酸塩濃度が高いほど、脱塩素性能の阻害が大きくなるものの、完全には阻害しない報告もある(X.-Y. Zhang et al., 2022)。しかしながら、高い還元性雰囲気はクロロエテン類の生分解を担う微生物が実際に存在するという明確な証拠にはなり得ないため、クロロエテン類分解微生物を直接確認することが重要との報告がある(Wiedemeier et al., 1998b)。

EおよびFでは、*Dehalococcoides* 属細菌数が定量下限値未満か $8.8 \times 10^1$  copies/mLと低値で、EではpHが5.3~6、Fでは硝酸イオン濃度が50 mg/Lと自然減衰の阻害が懸念された。一方で、この2地点では脱塩素化反応が進んでいることを示唆する12DCEやVCが存在しており、バイオレメディエーション適用可否の判断が難しい条件であった。この2地点に対して実施した脱塩素化試験では、VCの生成・低減が確認できなかった。

また、BやDでは自然減衰の阻害要因は確認されなかったが、Bでは12DCEが0.004 mg/L、VCが0.002 mg/Lと低値で、Dでは*Dehalococcoides* 属細菌数が $1.7 \times 10^1$  copies/mLと少なく、これらの2地点もバイオレメディエーション適用可否の判断がやや難しい条件であった。ただし、この2地点の脱塩素化試験では、VCの生成・低減が確認できた。

以上より、バイオレメディエーション適用判断に関し、*Dehalococcoides* 属細菌が存在しない、pHが6未満、硝酸イオン濃度や硫酸イオン濃度が高いものの、現地では分解生成物の存在が確認される場合や、自然減衰の阻害要因には該当しないものの、現地の12DCEやVCの濃度が低い、*Dehalococcoides* 属細菌が少ないといった場合は、自然減衰の阻害要因との比較だけではバイオレメディエーションの適用可否判断が難しい。このような条件の場合には、脱塩素化試験の実施が必要と考える。

今回、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WPE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。土地所有者の所有する観測井戸を借用したため制限もあり、水温や水質分析の測定データが欠測しているものの、得られた結果からは、自然減衰の阻害要因に概ね該当しない場合、ワイン搾りかすを用いた嫌気性バイオレメディエーションを適用できると判断可能であり、このような場合に絞り脱塩素化試験を省略することが省力化に繋がるものと考えられる。一方で、自然減衰の阻害要因との比較だけでは判断が難しい場合、脱塩素化試験の実施をして判断することが必要であると考ええる。

今後の課題として、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。

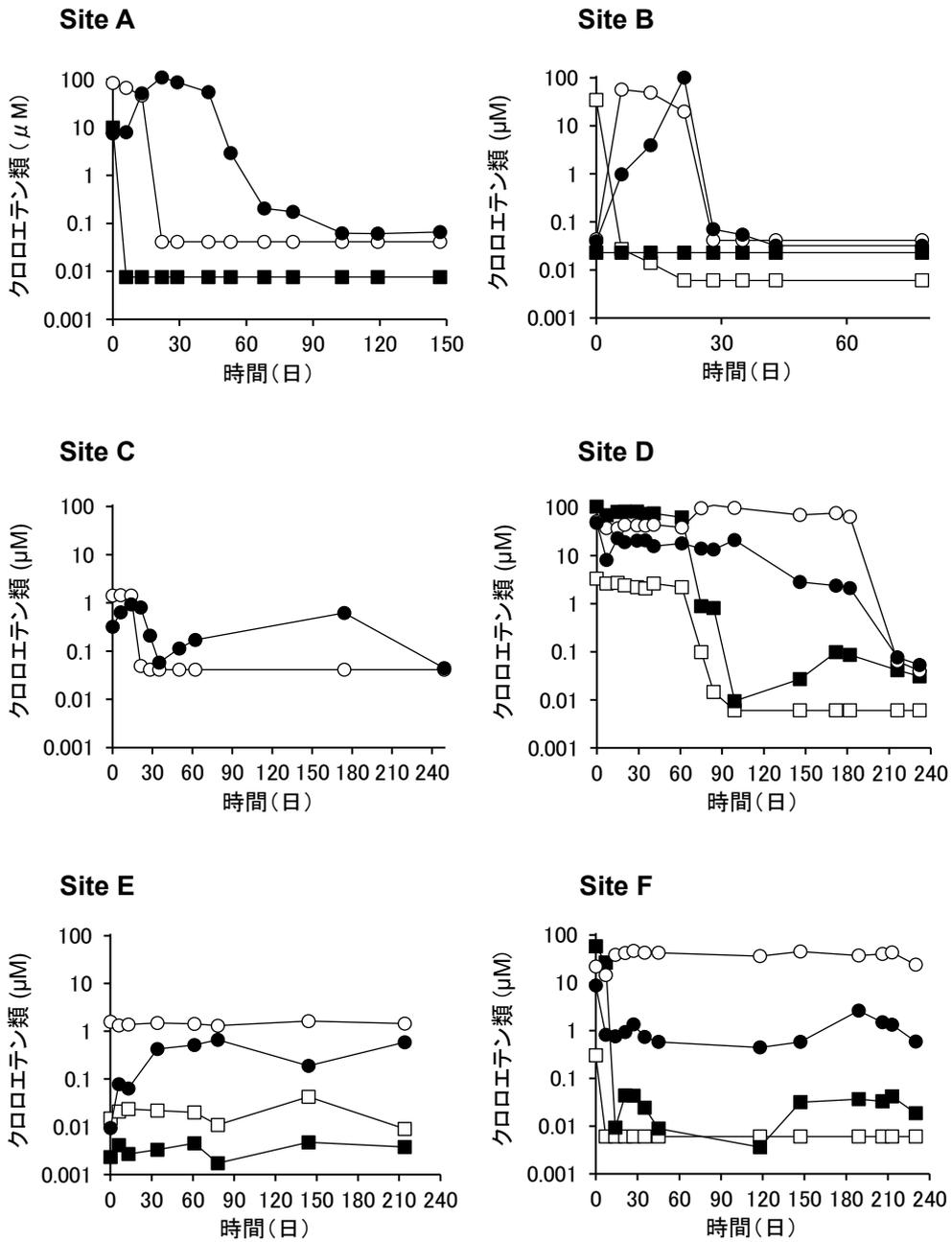


Fig. 5 A~F 地点の地下水サンプルにおける WPE を用いた脱塩素化反応

PCE(□)、TCE(■)、1,2DCE(○)、VC(●)

Table 5 汚染サイトの地下水質、汚染地下水試料を用いた適用性評価試験結果および、  
還元的脱塩素化反応の阻害条件

分析項目	脱塩素化反応の 阻害条件	Site					
		A	B	C	D	E	F
初発クロロエテン		TCE	PCE	TCE	PCE	PCE	PCE
観測井戸数		1	2	3	1	2	3
12DCE (mg/L)	ND <sup>a, b)</sup>	13	0.004- 0.20	0.011- 0.19	5.0	ND-0.15	0.14-4.6
VC (mg/L)	ND <sup>a, b)</sup>	0.51	0.002- 2.3	0.006- 0.16	3.0	ND- 0.003	0.001- 1.5
地下水温 (°C)	<10 <sup>a)</sup> <20 <sup>b)</sup>	NT	17-18	18-22	NT	NT	NT
pH	<5, >9 <sup>a, b)</sup> <6 <sup>c, d)</sup>	6.0	7.7-8.2	6.3-6.9	7.7	5.3-6.0	5.9-6.4
ORP (mV)	> -50 <sup>7, 8)</sup>	NT	-96- -160	-151- -166	NT	NT	NT
硝酸イオン (mg/L)	>1 <sup>a)</sup>	<0.2	NT	<0.2	NT	NT	50
硫酸イオン (mg/L)	>100 <sup>a)</sup> >20 <sup>b)</sup>	<10	6.9-8.3	1.0-62	<10	<10	14
<i>Dehalococcoides</i> spp. (copies/mL)	ND <sup>a, b)</sup>	4.1×10 <sup>4</sup>	4.2×10 <sup>3</sup> - 2.7×10 <sup>3</sup>	3.9×10 <sup>4</sup> - 6.5×10 <sup>4</sup>	1.7×10 <sup>1</sup>	ND	ND- 8.8×10 <sup>1</sup>
室内試験における 脱塩素化反応の有無	VC の生成および 濃度低減無し <sup>a, b)</sup>	+	+	+	+	-	-

ND: 定量下限値, NT: 測定せず, +: VC 生成後の濃度低減あり -: VC 生成なし

- a) Wiedemeier et al., 1998b
- b) 日野良太 et al., 2021
- c) Puentes Jácome et al., 2019
- d) Ortiz-Medina et al., 2022

## 総論

本研究では、ワイン搾りかすを用いて作成したワイン搾りかす抽出物 (Wine Pomace Extract, WPE) が、クロロエテン類で汚染された土壌のバイオレメディエーションに有効であることを室内試験や野外実証試験にて確認した。

土壌汚染は、ヒトの経済活動の拡大とともにこれまでは問題とされていなかった化学物質の有害性が判明し対応を迫られる社会的に重要な課題である。

また、ワイン醸造時に発生するワイン搾りかすを埋め立てや焼却で処理することは、環境に悪影響を及ぼしている。そのため、この副産物の持続可能な利用方法を提案することは重要である。従来、ワインの搾りかすは、グラッパ、グレープシードオイル、肥料、飼料として利用されてきた(Bordiga et al. 2015)ものの、質の不均一性、供給量の不安定性、集約の困難さから大部分が有効利用されていない。

クロロエテン類は、適切な取り扱いや処分が行われなかった工場の跡地の土壌や地下水から検出される環境汚染物質の一つである。クロロエテン類で汚染された地下水や土壌を浄化するために、嫌気性バイオレメディエーションが広く普及してきている。嫌気性バイオレメディエーションを実施するには、水素供与体が不可欠である。本研究では、ワイン製造時に発生する食品副産物であるワイン搾りかすを原料とした水素供与体「WPE」を開発した。これまでの水素供与は室内試験で効果を確認されたものは多いが、実際のフィールドで実証または適用されたものは限られる。ましてや食品副産物を利用したものは知見が少ない。

このようなことから、本研究の目的を以下のようにした。

- ① WPE のクロロエテン類の微生物分解への影響 (第 2 章、第 3 章)
- ② 実汚染地での実証試験による有効性の評価 (第 4 章、第 5 章)

①WPE のクロロエテン類の微生物分解への影響では、WPE に含まれる成分として、カルボン酸、糖類、アミノ酸について分析した。カルボン酸は、L-乳酸、L-酒石酸、コハク酸、*p*-クマル酸、シリング酸、L-リンゴ酸、没食子酸の 7 種類が含まれていた。このうち、L-乳酸、L-酒石酸がクロロエテン類の分解に有効であった。フェノール酸であるシリング酸は効果を確認できなかった。これは、L-乳酸やL-酒石酸が脂肪族骨格であるのに対し、シリング酸は芳香族骨格であるため、嫌気性微生物によって分解されにくく、結果的に水素の供給量が少なくなるためと思われる。

② 実汚染地での実証試験による有効性の評価では、実際の汚染サイトにおいて、自然浸透法により WPE を土壌に注入した。その結果、地下水および土壌中のクロロエテン類濃度の低下することを確認でき、さらには注入後の TOC や pH などの地下水特性の変化から WPE の土壌への浸透を推定し、70 日で 5 m 程度に浸透したことを確認した。これは、現地での透水係数などから試算した値とも近似していた。さらに、地下水および土壌中の脱塩素化 *Dehalococcoides* 属細菌数および微生物叢への影響を調べた。WPE を土壌に注入すると、クロロエテン類を明確に分解し、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* 綱の硫酸還元菌および硫黄還元菌、*Dehalococcoides* 属の *Dehalococcoides* 属による還元脱塩素化に利用され、さらに WPE に含まれるアンモニアや分解生成物 (メタン)、クロロエテン類の分解物であるエチレンなどが *Betaproteobacteria* 綱の *Aquabacterium* 属や *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。このようなことから、WPE は実際の汚染地でもクロロエテンの嫌気性バイオレメディ

ーションを促進できたものとする。

実際に WPE を用いた嫌気性バイオレメディエーションをクロロエテン類の汚染地に適用するか否か判断するには、現地の地下水を用いてクロロエテン類の脱塩素化反応の有無を確認する脱塩素化試験を実施する必要があるが簡便ではない。脱塩素化試験を実施せずに嫌気性バイオレメディエーションの適否を判断できることは非常に効率的である。

今回、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 WPE 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、WPE 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ことが明らかになった。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。

WPE はこれまで約 5 t を製造し、12 件の汚染サイトへ適用している。今後は、WPE からの水素発生状況や関与する微生物の変化などのデータを蓄積し、分解メカニズムを明らかにすることで適用可能性を高め、WPE をさらに普及展開したい。

## 論文内容の要旨

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

氏 名 大橋 貴志

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。

第1章では、土壌汚染の概要や、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、本研究の目的を明確化した。

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。

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、シリンジ酸、*p*-クマル酸、没食子酸の7種が存在した。WPEのTOC濃度からカルボン酸以外の有機物の存在が示唆され水素供与体としてこれらが機能する可能性が考えられた。

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。

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、シリンジ酸の試験液を用いた別の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示唆された。

第4章では、実現場での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。

フィールド実証試験は、TCEが土壌に漏出してから少なくとも20年経過している工場跡地で実施した。T-1井戸からWPEを注入し、T-1、M-1、M-2井戸の3か所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12DCE、VCが検出されていた。これらのことから、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*属細菌の数が増加する傾向が見られた。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。

WPEの浸透は、地下水の全有機炭素(TOC)濃度や電気伝導率(EC)を測定し確認した。その結果、TOCやECは地下水流向の下流にあるM-1、M-2で70日目頃に明確な増加した。

さらに、地下水と土壌の微生物群集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、この時期、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、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。

第 5 章では、WPE 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に関し検証した。

実際に WPE を用いた嫌気性バイオレメディエーションをクロロエテン類の汚染地に適用するか否か判断するには、現地の地下水を用いてクロロエテン類の脱塩素化反応の有無を確認する室内試験（以下、脱塩素化試験）を実施する必要があるが簡便ではない。脱塩素化試験を実施せずに嫌気性バイオレメディエーションの適否を判断できることは非常に効率的である。

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 WPE 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、WPE 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ことが明らかになった。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 を土壌に注入すると、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酸還元菌、*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。

## SUMMARY OF DISSERTATION

**TITLE: Effects of Bioremediation on Chloroethene-Contaminated Soils Using Wine Pomace**

**NAME: Takashi Ohashi**

Chloroethenes are widely used as solvent in the metal industry and the dry cleaning industry, but their spillage into soil and groundwater due to improper handling has negatively impacted human health. Bioremediation using microorganisms is one of the technologies to clean up soil and groundwater contaminated with chloroethenes. In this study, we examined the bioremediation of chloroethene-contaminated soil using wine pomace extract (WPE) and found that this technology realized environmental remediation through the effective use of food by-products.

Section 1 contains an overview of soil contamination and the status of anaerobic bioremediation of chloroethenes and WPE utilization to clarify the purpose of this study.

In Section 2, we discuss a WPE production method and the properties of WPE. Regarding the WPE production method, not grinding but alkali soaking for four weeks of wine pomace was the optimal pre-treatment method. LC-MS/MS analysis of WPE revealed the presence of seven carboxylic acids: L-tartaric acid, L-lactic acid, succinic acid, L-malic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, and gallic acid, all of which are capable of acting as hydrogen donors.

In Section 3, we show that WPE promoted the anaerobic bioremediation of chloroethenes. A tetrachloroethene (PCE) degradation test that used fractions derived from WPE demonstrated that the water-eluted fraction containing L-lactic acid, L-tartaric acid, and other compounds promoted the dechlorination of PCE, whereas the methanol-eluted fraction containing mainly syringic acid did not. Another PCE degradation test that used L-lactic acid, L-tartaric acid, and syringic acid test solutions showed that L-lactic acid and L-tartaric acid, but not syringic acid, enhanced the dechlorination of PCE. The results suggest that L-lactic acid and L-tartaric acid in WPE function as hydrogen donors in the anaerobic bioremediation of chloroethenes.

In Section 4, we discuss a pilot study conducted in a trichloroethene (TCE)-contaminated field (hereinafter, test site) to evaluate the effectiveness of WPE as a hydrogen donor in the anaerobic bioremediation of chloroethenes. The test site had a history of TCE and mineral oil use, and at least 20 years had passed since TCE leaked into the soil. Before the test, groundwater pH was near neutral and *Dehalococcoides* spp. were present at  $1.0 \times 10^2$  copies/mL. TCE and its degradation products, 1,2-dichloroethylene (12DCE) and chloroethylene (VC), were also detected. From these findings, we inferred that bioremediation by natural attenuation occurred at the test site. In particular, we supposed that *Dehalococcoides* spp. are involved in reductive dechlorination by utilizing hydrogen supplied by hydrogen donors present at the site.

The results of soil investigation conducted at the time of well installation at the test site indicated that groundwater level was  $-2.77$  m below ground level. The saturated layer was mainly composed of sand mixed with silt. The strata were generally composed of gravelly sand from 0 to  $-3.0$  m below ground level and sandy loam from  $-3.0$  to  $-9.7$  m below ground level, which was interspersed with

clay from -7.4 to -7.9 m. The -9.7 to -10.2 m layer was composed of clayey soil. The hydraulic conductivity of the sandy loam in the test site was estimated to be  $1.75 \times 10^{-5}$  m/s using the Creager method at 20% grain size. The hydraulic gradient of the test site was approximately 0.008 m/m in the T-1 to M-2 direction. The Darcy velocity, which was calculated by multiplying the hydraulic conductivity by the hydraulic gradient, was  $1.4 \times 10^{-7}$  m/s. Because groundwater flowed through pore spaces, the actual velocity was  $5.6 \times 10^{-7}$  m/s, which was calculated by dividing the Darcy velocity by the estimated pore ratio of 0.25 (sandy loam).

Chloroethenes in groundwater consisted of mainly 12DCE and VC with low concentrations of TCE. Examination of the test site showed that the concentrations of 12DCE and VC increased and then decreased in all wells after WPE injection, and the number of *Dehalococcoides* spp. tended to increase, suggesting that the WPE injection had some effect on chloroethene degradation. After WPE injection into T-1, the concentrations of degradation products 12DCE and VC showed a sharp decline but recovered thereafter, and started to decrease around days 70 and 120, respectively. The concentration of TCE, the parent substance, tended to increase during the first month after WPE injection but remained below the lower limit of quantification (0.003 mg/L) thereafter. After WPE injection into M-1 and M-2, 12DCE and VC concentrations slightly increased but tended to decrease around day 70. Reductive dechlorination is one of the main degradation pathways for TCE. It is characterized by a continuous electron transfer process in which hydrogen produced by hydrogen donors under anaerobic conditions is replaced by chlorine atoms of chloroethene. In this process, TCE is degraded via DCE isomers into VC and finally into harmless substances such as ethylene (ETH). Although many microorganisms can degrade TCE into DCE, only *Dehalococcoides* spp. can degrade TCE into VC. We consider that a similar degradation mechanism is operative in the degradation of TCE using WPE as the hydrogen donor. Because *Dehalococcoides* spp. were able to completely convert TCE into ETH, the proliferation of *Dehalococcoides* spp. was likely to be a result of the increase in the amounts of TCE and its degradation products 1,2DCE and VC. The proliferation of *Dehalococcoides* spp. is evidence that these microorganisms promote the degradation of TCE and its degradation products. TCE is sequentially degraded via DCE isomers into VC and finally into ETH. We are aware of the importance of rapidly converting these degradation products into harmless ETH to prevent their accumulation. However, because this test was conducted in one part of the contaminated site and contaminants such as TCE were present in areas other than the test site, the influx of TCE from the surrounding areas was observed, namely, TCE concentration increased up to around day 35 in T-1 and after around day 105 in M-2. The influx of TCE from the surrounding areas might have affected the chloroethene concentration changes observed in this study and prevented us from confirming a clear sequential degradation, such as the generation of degradation products from the parent substance TCE and their eventual reduction, as seen in the laboratory tests.

The average number of *Dehalococcoides* spp. in the test site was approximately  $5.0 \times 10^4$  copies/mL in the three wells before WPE injection. After WPE injection, the number of *Dehalococcoides* spp. in T-1 decreased temporarily but increased later with increasing pH. In M-1, the number increased slightly after around day 55 and remained almost unchanged throughout the test period. In M-2, the number increased after day 55 and was five times higher than that before the WPE injection after around day 140. After day 140, all wells showed a slightly decreasing trend.

In Section 5, we discuss the results of an in situ bioremediation of a chloroethene-contaminated site using WPE. To determine whether or not to apply anaerobic bioremediation using WPE to a chloroethene-contaminated site, it is necessary to conduct a laboratory test to confirm whether or not chloroethenes are dechlorinated using local groundwater, which is not easy to do. Efficiency would be

enhanced if anaerobic bioremediation could be performed without having to do dechlorination tests. We assessed the water quality and conducted dechlorination tests at six contaminated sites to verify whether or not anaerobic bioremediation using WPE could be applied by confirming the indicators of natural attenuation. On the basis of the various indicators of natural attenuation, we judged that anaerobic bioremediation using WPE is difficult to apply when *Dehalococcoides* spp. are not present, pH is lower than 6.0, and nitrate concentration is high. Because data on contaminated-site bacterial populations are scarce, it is necessary to collect more data to establish a more reliable assessment method.

In conclusion, organic acids such as lactic acid and tartaric acid contained in WPE are able to dechlorinate chloroethenes by acting as hydrogen donors. When WPE is injected into the soil, lactic acid contained in WPE is decomposed by *Pseudomonas* spp. of class *Gammaproteobacteria*, and hydrogen is produced. The hydrogen produced is considered to be used for reductively dechlorinated by sulfate-reducing and sulfur-reducing bacteria of the class *Deltaproteobacteria*, *Dehalococcoides* spp. of the class *Dehalococcoidetes*. In addition, ammonia, degradation products (methane), and ethylene, a degradation product of chloroethenes, contained in WPE are thought to have been used for co-metabolically degraded by *Hydrogenophaga* spp and *Aquabacterium* spp. of the class *Betaproteobacteria*.

## 引用文献

- Abelson, Philip H. 1990. Inefficient remediation of ground-water pollution. *Science*, 250, 733–733. <https://doi.org/10.1126/science.2237418>.
- Antonić, Bojan, Jančíková, Simona, Dordević, Dani, Tremlová, Bohuslava. 2020. Grape pomace valorization: A systematic review and meta-analysis. *Foods*, 9, 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>.
- Antoniou, Kornilia, Mamais, Daniel, Pantazidou, Marina. 2019. Reductive dechlorination of trichloroethene under different sulfate-reducing and electron donor conditions. *Journal of Contaminant Hydrology*, 226, 103519. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2019.103519>.
- Arvanitoyannis, Ioannis S, Ladas, Demetrios, Mavromatis, Athanasios. 2006. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 475–487. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01111.x>.
- Atlas, Ronald M, Philp, Jim. 2005. *Bioremediation. Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*. ASM press, Washington, DC.
- Beres, Carolina, Costa, Gislaïne NS, Cabezudo, Ignacio, da Silva-James, Nina K, Teles, Aline SC, Cruz, Ana PG, Mellinger-Silva, Caroline, Tonon, Renata V, Cabral, Lourdes MC, Freitas, Suely P. 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management*, 68, 581–594. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>.
- Bertolini, Martina, Zecchin, Sarah, Cavalca, Lucia. 2023. Sequential Anaerobic/Aerobic Microbial Transformation of Chlorinated Ethenes: Use of Sustainable Approaches for Aquifer Decontamination. *Water*, 15, 1406.
- Bonazountas, M, Wagner, JM. 1981. *SESOIL: A seasonal soil compartment model: first version*. USEPA, Washington, DC.
- Bordiga, Matteo, Travaglia, Fabiano, Locatelli, Monica, Arlorio, Marco, Coisson, Jean Daniel. 2015. Spent grape pomace as a still potential by-product. *International Journal of Food science & Technology*, 50, 2022–2031. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12853>.
- Bradley, Paul M. 2003. History and ecology of chloroethene biodegradation: A Review. *Bioremediation Journal*, 7, 81–109. <https://doi.org/10.1080/713607980>.
- Bravo, Laura, Saura-Calixto, F. 1998. Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 135–141.
- Cai, Lin, Ye, Lin, Tong, Amy Hin Yan, Lok, Si, Zhang, Tong. 2013. Biased diversity metrics revealed by bacterial 16S pyrotags derived from different primer sets. *PLoS ONE*, 8, e53649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053649>.
- Chang, Young-Cheol, Ikeutsu, Kaori, Toyama, Tadashi, Choi, DuBok, Kikuchi, Shintaro. 2011. Isolation and characterization of tetrachloroethylene- and cis-1,2-dichloroethylene-dechlorinating propionibacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1667–1667. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0956-1>.
- De Bruin, Wil P, Kotterman, MJ, Posthumus, MI A, Schraa, Gosse, Zehnder, AJ. 1992. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. *Applied and Environmental*

- Microbiology, 58, 1996–2000. <https://doi.org/10.1128/aem.58.6.1996-2000.1992>.
- DiStefano, Thomas D, Baral, Rishi, Duran, Metin, Speece, Richard E. 2001. A Comparison of complex electron donors for anaerobic dechlorination of PCE. *Bioremediation Journal*, 5, 131–143. <https://doi.org/10.1080/20018891079249>.
- do Nascimento Silva, Flamys Lena, Schmidt, Eduardo Morgado, Messias, Cláudio Luiz, Eberlin, Marcos Nogueira, Sawaya, Alexandra Christine Helena Frankland. 2015. Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Methods*, 7, 53-62. <https://doi.org/10.1039/C4AY00114A>.
- Dolinová, Iva, Štrojsová, Martina, Černík, Miroslav, Němeček, Jan, Macháčková, Jiřina, Ševců, Alena. 2017. Microbial degradation of chloroethenes: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 13262–13283. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8867-y>.
- DuBois, Michel, Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, Fred. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Dutta, Nalok, Usman, Muhammad, Ashraf, Muhammad Awais, Luo, Gang, Zhang, Shicheng. 2022. A critical review of recent advances in the bio-remediation of chlorinated substances by microbial dechlorinators. *Chemical Engineering Journal Advances*, 12, 100359. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2022.100359>.
- El Achkar, Jean H., Lendormi, Thomas, Salameh, Dominique, Louka, Nicolas, Maroun, Richard G., Lanoisellé, Jean-Louis, Hobaika, Zeina. 2018. Influence of pretreatment conditions on lignocellulosic fractions and methane production from grape pomace. *Bioresource Technology*, 247, 881–889. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.182>.
- Filippi, Katiana, Georgaka, Nefeli, Alexandri, Maria, Papapostolou, Harris, Koutinas, Apostolis. 2021. Valorisation of grape stalks and pomace for the production of bio-based succinic acid by *Actinobacillus succinogenes*. *Industrial Crops and Products*, 168, 113578. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113578>.
- Finneran, Kevin T, Forbush, Heather M, VanPraagh, Catherine V Gaw, Lovley, Derek R. 2002. *Desulfitobacterium metallireducens* sp. nov., an anaerobic bacterium that couples growth to the reduction of metals and humic acids as well as chlorinated compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1929–1935. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-1929>.
- Forester, Sarah C., Waterhouse, Andrew L. 2008. Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9299–9304. <https://doi.org/10.1021/jf801309n>.
- Freedman, David L, Gossett, James M. 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2144–2151. <https://doi.org/10.1128/aem.55.9.2144-2151.1989>.
- Gibson, Susan A, Sewell, Guy W. 1992. Stimulation of reductive dechlorination of tetrachloroethene in anaerobic aquifer microcosms by addition of short-chain organic acids or alcohols. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1392–1393. <https://doi.org/10.1128/aem.58.4.1392-1393.1992>.

- Guan, Xiangyu, Liu, Fei, Xie, Yuxuan, Zhu, Lingling, Han, Bin. 2013. Microbiota associated with the migration and transformation of chlorinated aliphatic hydrocarbons in groundwater. *Environmental Geochemistry and Health*, 35, 535–549. <https://doi.org/10.1007/s10653-013-9513-3>.
- Hang, YD. 1988. Recovery of food ingredients from grape pomace. *Process Biochemistry*, 23, 2–4.
- He, Jianzhong, Ritalahti, Kirsti M, Aiello, Michael R, Löffler, Frank E. 2003. Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 996–1003. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.996-1003.2003>.
- Hellal, Jennifer, Joulian, Catherine, Urien, Charlotte, Ferreira, Stéphanie, Denonfoux, Jérémie, Hermon, Louis, Vuilleumier, Stéphane, Imfeld, Gwenaël. 2021. Chlorinated ethene biodegradation and associated bacterial taxa in multi-polluted groundwater: Insights from biomolecular markers and stable isotope analysis. *Science of The Total Environment*, 763, 142950. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142950>.
- Holliger, Christof, Hahn, Dittmar, Harmsen, Hermie, Ludwig, Wolfgang, Schumacher, Wolfram, Tindall, Brian, Vazquez, Francisco, Weiss, Norbert, Zehnder, Alexander JB. 1998. *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. *Archives of Microbiology*, 169, 313–321. <https://doi.org/10.1007/s002030050577>.
- IARC. (2014). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Geneva. <https://publications.iarc.fr/130>
- Jin, Hehua, Nakajima-Kambe, Toshiaki, Akutsu-Shigeno, Yukie, Nakashima, Makoto, Shigeno, Toshiya, Nomura, Nobuhiko, Uchiyama, Hiroo. (2005). Isolation and characterization of bacteria that degrade poly (lactic acid-glycerol ester)-type time-release electron donors for accelerated biological reductive dechlorination *Macromolecular Symposia* (Vol. 224, pp. 155–166): Wiley Online Library.
- Justin, JD, Hinds, Julian, Creager, WP. 1945. Engineering for Dams Vol. III Earth, rock-fill, steele and timber dams. John Wiley and Sons, New York.
- Kalbus, E, Reinstorf, F, Schirmer, M. 2006. Measuring methods for groundwater–surface water interactions: a review. *Hydrology and Earth System Sciences*, 10, 873–887. <https://doi.org/10.5194/hess-10-873-2006>.
- Kalli, Efstathia, Lappa, Iliada, Bouchagier, Pavlos, Tarantilis, Petros A., Skotti, Efstathia. 2018. Novel application and industrial exploitation of winery by-products. *Bioresources and Bioprocessing*, 5. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0232-6>.
- Kengen, Servé WM, Breidenbach, Caroline G, Felske, Andreas, Stams, Alfons JM, Schraa, Gosse, de Vos, Willem M. 1999. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to *cis*-1, 2-dichloroethene by a thermophilic anaerobic enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2312–2316. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2312-2316.1999>.
- Kotik, Michael, Davidová, Anna, Voříšková, Jana, Baldrian, Petr. 2013. Bacterial communities in

- tetrachloroethene-polluted groundwaters: A case study. *Science of The Total Environment*, 454-455, 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.082>.
- Krumholz, Lee R, Sharp, Richard, Fishbain, Susan S. 1996. A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4108–4113. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4108-4113.1996>.
- Kurata, Shinya, Kanagawa, Takahiro, Yamada, Kazutaka, Torimura, Masaki, Yokomaku, Toyokazu, Kamagata, Yoichi, Kurane, Ryuichiro. 2001. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY® FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Research*, 29, e34–e34. <https://doi.org/10.1093/nar/29.6.e34>.
- Löffler, Frank E, Yan, Jun, Ritalahti, Kirsti M, Adrian, Lorenz, Edwards, Elizabeth A, Konstantinidis, Konstantinos T, Müller, Jochen A, Fullerton, Heather, Zinder, Stephen H, Spormann, Alfred M. 2013. *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia classis* nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 625–635. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.034926-0>.
- Li, Jiangwei, Hu, Anyi, Bai, Shijie, Yang, Xiaoyong, Sun, Qian, Liao, Xu, Yu, Chang-Ping. 2021. Characterization and Performance of Lactate-Feeding Consortia for Reductive Dechlorination of Trichloroethene. *Microorganisms*, 9, 751. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040751>.
- Löffler, Frank E, Sun, Qing, Li, Jieran, Tiedje, James M. 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene-dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1369–1374.
- Ma, Jie, McHugh, Thomas, Beckley, Lila, Lahvis, Matthew, DeVaul, George, Jiang, Lin. 2020. Vapor Intrusion Investigations and Decision-Making: A Critical Review. *Environmental Science & Technology*, 54, 7050-7069. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c00225>.
- Macbeth, Tamzen W, Nelson, Lee, Rothermel, Joe S, Wymore, Ryan A, Sorenson Jr, Kent S. 2006. Evaluation of whey for bioremediation of trichloroethene source zones. *Bioremediation Journal*, 10, 115–128. <https://doi.org/10.1080/10889860600952339>.
- Maymó-Gatell, Xavier, Chien, Yueh-tyng, Gossett, James M., Zinder, Stephen H. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*, 276, 1568–1571. <https://doi.org/doi:10.1126/science.276.5318.1568>.
- Maymo-Gatell, Xavier, Anguish, Timothy, Zinder, Stephen H. 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1, 2-dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3108–3113. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.3108-3113.1999>.
- McCarty, Perry L. (2010). Groundwater contamination by chlorinated solvents: history, remediation technologies and strategies *In Situ Remediation of Chlorinated Solvent Plumes* (pp. 1–28): Springer.
- Men, Yujie, Feil, Helene, VerBerkmoes, Nathan C, Shah, Manesh B, Johnson, David R, Lee, Patrick KH, West, Kimberlee A, Zinder, Stephen H, Andersen, Gary L, Alvarez-Cohen, Lisa. 2012.

- Sustainable syntrophic growth of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 with *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and *Methanobacterium congolense*: global transcriptomic and proteomic analyses. *The ISME Journal*, 6, 410–421. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.111>.
- Miller, Todd R., Franklin, Mark P., Halden, Rolf U. 2007. Bacterial community analysis of shallow groundwater undergoing sequential anaerobic and aerobic chloroethene biotransformation. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 299–311. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00290.x>.
- Moran, Michael J, Zogorski, John S, Squillace, Paul J. 2007. Chlorinated solvents in groundwater of the United States. *Environmental Science & Technology*, 41, 74–81. <https://doi.org/10.1021/es061553y>.
- Nayak, A, Bhushan, Brij, Gupta, V, Rodriguez-Turienzo, L. 2016. Development of a green and sustainable clean up system from grape pomace for heavy metal remediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4, 4342–4353. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.10.001>.
- Newman, William A, Pelle, Ronald C. 2006. Enhanced anaerobic bioremediation of chlorinated solvents utilizing vegetable oil emulsions. *Remediation Journal*, 16, 109–122. <https://doi.org/10.1002/rem.20095>.
- Nurgel, C, Canbas, A. 1998. Production of tartaric acid from pomace of some Anatolian grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 95–99.
- Ohashi, Takashi, Sugimoto, Kenji, Sasaki, Yoshikatsu, Hisamoto, Masashi. 2023a. Effect of wine pomace extract on dechlorination of chloroethenes in soil suspension. *Bioresour. Bioprocess.*, 10, 22. 10.1186/s40643-023-00643-6.
- Ohashi, Takashi, Sugimoto, Kenji, Sasaki, Yoshikatsu, Hisamoto, Masashi. 2023b. Field demonstration of biostimulation with wine pomace extract at a chloroethene contaminated site. *Bioresour. Technol. Rep.*, 21, 101322. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101322>.
- Ortiz-Medina, Juan Fausto, Yuncu, Bilgen, Ross, Lydia, Elkins, Brad. (2022). The importance of proper pH adjustment and control to achieve complete in situ enhanced reductive dechlorination *Integrated Environmental Assessment and Management*. Hoboken, NJ, U.S.: John Wiley & Sons, Ltd.
- Park, Yu-Chul. 2016. Cost-effective optimal design of a pump-and-treat system for remediating groundwater contaminant at an industrial complex. *Geosciences Journal*, 20, 891–901. <https://doi.org/10.1007/s12303-016-0030-0>.
- Pavlostathis, Spyros G, Zhuang, Ping. 1993. Reductive dechlorination of chloroalkenes in microcosms developed with a field contaminated soil. *Chemosphere*, 27, 585–595. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90094-L](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90094-L).
- Puentes Jácome, Luz A., Wang, Po-Hsiang, Molenda, Olivia, Li, Yi Xuan, Islam, M. Ahsanul, Edwards, Elizabeth A. 2019. Sustained Dechlorination of Vinyl Chloride to Ethene in *Dehalococcoides*-Enriched Cultures Grown without Addition of Exogenous Vitamins and at Low pH. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 11364–11374. 10.1021/acs.est.9b02339.
- Rajajayavel, Sai Rajasekar C, Ghoshal, Subhasis. 2015. Enhanced reductive dechlorination of trichloroethylene by sulfidated nanoscale zerovalent iron. *Water Research*, 78, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.009>.

- Ribéreau-Gayon, Pascal, Glories, Yves, Maujean, Alain, Dubourdieu, Denis. 2021. Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. John Wiley & Sons,
- Saiyari, Donamel M, Chuang, Hui-Ping, Senoro, Delia B, Lin, Tsair-Fuh, Whang, Liang-Ming, Chiu, Yi-Ting, Chen, Yi-Hsuan. 2018. A review in the current developments of genus *Dehalococcoides*, its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater. Sustainable Environment Research, 28, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.01.006>.
- Sandefur, Craig A., Koenigsberg, Stephen S. 1999. The Use of hydrogen release compound for the accelerated bioremediation of anaerobically degradable contaminants: The Advent of time-release electron donors. Remediation Journal, 10, 31–53. <https://doi.org/10.1002/rem.3440100104>.
- Santharam, Sathishkumar, Ibbini, Jwan, Davis, Lawrence C, Erickson, Larry E. 2011. Field study of biostimulation and bioaugmentation for remediation of tetrachloroethene in groundwater. Remediation Journal, 21, 51–68. <https://doi.org/10.1002/rem.20281>.
- Scholz-Muramatsu, Heidrun, Neumann, Anke, Meßmer, Michael, Moore, Edward, Diekert, Gabriele. 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. Archives of Microbiology, 163, 48–56. <https://doi.org/10.1007/BF00262203>.
- Sharma, Pramod K, McCarty, Perry L. 1996. Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to cis-1, 2-dichloroethene. Applied and Environmental Microbiology, 62, 761–765. <https://doi.org/10.1128/aem.62.3.761-765.1996>.
- Sirohi, Ranjna, Tarafdar, Ayon, Singh, Shikhangi, Negi, Taru, Gaur, Vivek Kumar, Gnansounou, Edgard, Bhartiraja, B. 2020. Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. Bioresource Technology 123771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>.
- Speight, James G. (2020). 8 - Remediation technologies. In J. G. Speight (Ed.), *Natural Water Remediation* (pp. 263-303): Butterworth-Heinemann.
- USEPA. (2012). A Citizen's guide to soil vapor extraction and air sparging (EPA 542-F-12-018). from U.S. Environmental Protection Agency: Washington [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-04/documents/a\\_citizens\\_guide\\_to\\_soil\\_vapor\\_extraction\\_and\\_air\\_sparging.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-04/documents/a_citizens_guide_to_soil_vapor_extraction_and_air_sparging.pdf)
- USEPA. (2021). Climate Smart Brownfields Manual. from The, US Environmental Protection Agency (EPA): Washington, DC, USA [https://www.epa.gov/sites/default/files/2021-06/documents/final\\_climate\\_smart\\_brownfields\\_manual\\_6-10-21\\_508\\_complaint.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2021-06/documents/final_climate_smart_brownfields_manual_6-10-21_508_complaint.pdf)
- Wiedemeier, TH, Swanson, MA, Moutoux, DE, Gordon, EK, Wilson, JT. (1998a). Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water (EPA/600/R-98/128). from U.S. Environmental Protection Agency <https://nepis.epa.gov/Exec/ZyPDF.cgi/30003ONO.PDF?Dockey=30003ONO.PDF>
- Wiedemeier, TH, Swanson, MA, Moutoux, DE, Gordon, EK, Wilson, JT. 1998b. Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water (EPA/600/R-98/128). <https://nepis.epa.gov/Exec/ZyPDF.cgi/30003ONO.PDF?Dockey=30003ONO.PDF>

- Wright, W Warren, Cox, Craig A. (2003). In-situ biological technologies for degradation of chlorinated VOCs under varying geochemical conditions *ORT3 Conference Paper, Columbus* (pp. 1–11).
- Wu, Yingxin, Wu, Jiahui, Wu, Zhuohao, Zhou, Jingyan, Zhou, Lingli, Lu, Yang, Liu, Xiaowen, Wu, Wencheng. 2021. Groundwater contaminated with short-chain chlorinated paraffins and microbial responses. *Water Research*, 204, 117605.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117605>.
- Yang, Yi, Higgins, Steven A, Yan, Jun, Şimşir, Burcu, Chourey, Karuna, Iyer, Ramsunder, Hettich, Robert L, Baldwin, Brett, Ogles, Dora M, Löffler, Frank E. 2017. Grape pomace compost harbors organohalide-respiring Dehalogenimonas species with novel reductive dehalogenase genes. *The ISME Journal*, 11, 2767–2780. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.127>.
- Zhang, Xiaodong, Luo, Moye, Deng, Shaopo, Long, Tao, Sun, Liwei, Yu, Ran. 2022. Field study of microbial community structure and dechlorination activity in a multi-solvents co-contaminated site undergoing natural attenuation. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127010.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127010>.
- Zhang, Xin-Yue, Li, Zhi-Ling, Chen, Fan, Wang, Si-Pei, Nan, Jun, Huang, Cong, Chen, Xue-Qi, Cao, Di, Bai, Cai-Hua, Wang, Hong-Cheng, Han, Jing-Long, Liang, Bin, Wang, Ai-Jie. 2022. Influence of nitrate concentration on trichloroethylene reductive dechlorination in weak electric stimulation system. *Chemosphere*, 295, 133935. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133935>.
- Zhuang, Wei-Qin, Yi, Shan, Feng, Xueyang, Zinder, Stephen H, Tang, Yinjie J, Alvarez-Cohen, Lisa. 2011. Selective utilization of exogenous amino acids by Dehalococcoides ethenogenes strain 195 and its effects on growth and dechlorination activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7797–7803. <https://doi.org/10.1128/AEM.05676-11>.
- 阿南修司, 柴田光博, 品川俊介, 佐々木靖人. 2007. 岩石による環境汚染リスクマップ. *応用地質*, 47, 354-359. <https://doi.org/10.5110/jjseg.47.354>.
- 一般財団法人日本バルブ工業会. (2004). 環境基本法の体系.  
<https://j-valve.or.jp/environment/env-info/g040330-1.html>
- 一般社団法人セメント協会. (2019). 廃棄物のセメント資源化について.  
[https://www.jcassoc.or.jp/cement/4pdf/190125\\_01.pdf](https://www.jcassoc.or.jp/cement/4pdf/190125_01.pdf)
- 一般社団法人土壌環境センター. 2021. 「土壌汚染状況調査・対策」に関する実態調査結果 (令和3年度) .
- 花嶋正孝, 高月紘, 中杉修身. 1996. 廃棄物の不法投棄による環境汚染—豊島の事例—. *廃棄物学会誌*, 7, 208-219. <https://doi.org/10.3985/wmr.7.208>.
- 環境省. (2017). Soil Contamination Countermeasures Act.  
<https://www.env.go.jp/content/900452902.pdf>
- 環境省. 2022. 土壌汚染対策法に基づく調査及び措置に関するガイドライン (改訂第3.1版) .
- 環境省. (2021). カーボンニュートラルとは.  
[https://ondankataisaku.env.go.jp/carbon\\_neutral/about/](https://ondankataisaku.env.go.jp/carbon_neutral/about/)
- 環境省. (2022). 土壌汚染対策法制定20周年記念誌.  
<https://www.env.go.jp/content/000043833.pdf>
- 環境省. (2023). 令和3年度土壌汚染対策法の施行状況及び土壌汚染調査・対策事例等に関する

- 調査結果. <https://www.env.go.jp/content/000130733.pdf>
- 環境庁. (1973). 昭和 48 年版 環境白書. <https://www.env.go.jp/policy/hakusyo/s48/index.html>
- 郷茂夫. (2016). 公害の歴史と環境基本法：環境と公害の基礎知識 1.  
<https://technote.ipros.jp/entry/basic-environment1/>
- 松浦健一. 2010. 原位置バイオレメディエーションに用いる低価格の薬剤 「バイオエンゼル」  
について. 産業と環境, 39, 57-59.
- 新潟県. (2020). 序章 水俣病の概要.  
<https://www.pref.niigata.lg.jp/sec/seikatueisei/1195661749709.html>
- 須藤孝一, 米田剛, 小川泰正, 山田亮一, 井上千弘, 土屋範芳. 2010. 竜の口層の堆積岩における  
重金属類の溶出挙動および形態変化に及ぼす風化の影響. 応用地質, 51, 181-190.  
<https://doi.org/10.5110/jjseg.51.181>.
- 浅川翔太, 田村和広, 田中宏幸, 桂敦也, 佐藤匠, 芦田茂. 2018. 揮発性有機塩素化合物を対象と  
する大豆ホエーを用いたバイオレメディエーション技術. 廃棄物資源循環学会研究発表  
会講演集 第 29 回廃棄物資源循環学会研究発表会 469.
- 打木弘一, 宮口新治, 門倉伸行. 2014. 自然由来重金属等含有土壌等の調査・対策に係る現状の  
問題点及び技術的な課題. 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集,  
20, 602-607.
- 大阪港湾局. (2021). 北港テクノポート線建設事業に係る土壌等の調査結果について.  
[https://www.city.osaka.lg.jp/kensetsu/cmsfiles/contents/0000506/506669/210323\\_12\\_siryou6.pdf](https://www.city.osaka.lg.jp/kensetsu/cmsfiles/contents/0000506/506669/210323_12_siryou6.pdf)
- 張銘. 2019. 土壌・地下水汚染問題の解決に挑む-学際融合研究-. Synthesiology, 12, 39-47.  
[https://doi.org/10.5571/synth.12.1\\_39](https://doi.org/10.5571/synth.12.1_39).
- 東京都環境局. (2022). 持続可能な土壌汚染対策の促進.  
<https://www.kankyo.metro.tokyo.lg.jp/chemical/soil/information/grsr.html>
- 日野良太, 古屋光啓, 佐藤徹朗, 高畑陽. 2021. VOCs 汚染地下水の自然減衰の確認と濃度変化の  
予測に関する基礎的検討. 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集,  
26, 126-131.
- 平田健正. 2002. 地下水・土壌汚染 2.地下水・土壌汚染の現状と展望. 地下水学会誌, 44, 317-  
323. <https://doi.org/10.5917/jagh1987.44.317>.
- 平田健正. 2003. わが国の土壌汚染と対策技術. 廃棄物学会誌, 14, 85-92.  
<https://doi.org/10.3985/wmr.14.85>.
- 平田健正. 2008. 地下水の汚染と対策. 空気調和・衛生工学, 82, 839-845.
- 北川隆司. 2006. 足尾の土壌汚染とウラルにおける足尾. 資源地質, 56, 101-109.  
<https://doi.org/10.11456/shigenchishitsu1992.56.101>.
- 鈴木茂. 1989. 先端技術産業とハイテク汚染. 産業学会研究年報, 1989, 90-110,116.

## 公表論文

1. Effect of wine pomace extract on dechlorination of chloroethenes in soil suspension  
**Takashi Ohashi**, Kenji Sugimoto, Yoshikatsu Sasaki, Masashi Hisamoto  
*Bioresources and Bioprocessing* 10, 22, 2023.  
(本文の第2章の一部と第3章に対応)
2. Field demonstration of biostimulation with wine pomace extract at a chloroethene contaminated site  
**Takashi Ohashi**, Kenji Sugimoto, Yoshikatsu Sasaki, Masashi Hisamoto  
*Bioresource Technology Reports* 21, 2023, 101322.  
(本文の第4章に対応)
3. 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に関する研究  
**大橋 貴志**, 佐々木 由勝, 杉本 憲治, 久本 雅嗣  
環境バイオテクノロジー学会誌, 2024年掲載予定 (2023年7月 受理済)  
(本文の第5章に対応)

## 謝辞

本研究は当初予定の3年間を大幅に越えて4年間を要することになった。このような長い期間、研究を継続できたのはひとえに、山梨大学ワイン科学研究センター 久本雅嗣 准教授より高い目標に向かって進むよう常に励ましをいただけたためです。ここに心より感謝申し上げます。また、久本先生には週末の貴重なお時間をいただきご指導いただくことも多々ありましたが、いつも快諾いただきました。先生のご尽力なくしては本研究がまとまることはなかったと存じます。

学位論文審査において示唆に富んだ大変貴重なご意見をいただいた山梨大学 奥田 徹 理事、山梨大学大学院生命環境学域 舟根和美 教授、新森英之 准教授、大槻隆司 准教授、乙黒美彩 准教授には深謝申し上げます。

また、微生物菌相解析において初歩的なところからご指導いただいた大槻隆司 准教授および、ワイン搾りかすの利活用の現状について教えていただいた山梨大学ワイン科学研究センター 横森洋一 教授には感謝に堪えません。

研究に関して有益な結果を提供いただいた山梨大学ワイン機能成分学研究部門卒業生の石塚友也氏、大垣康太氏や同研究室の皆様にも心より感謝いたします。

論文内容のご相談をさせていただいた、国立環境研究所 岩崎一弘氏に大変感謝いたします。

また、このような貴重な機会や適格な助言を与えていただいた、株式会社 NIPPO の荒井明夫氏（当時、常務取締役）、中田尚行常務、総合技術部 山岸宏部長、中部支店・樋口理事、さらには期間延長についてご尽力いただいた環境事業室 武石英人室長、に厚く御礼申し上げます。

本研究を行ううえで WPE の開発や、その効果確認試験において議論や助言また、実際の試験実施など、あらゆる面でご協力いただいた、株式会社 ENEOS 三橋秀一氏（当時）、高橋季之氏、牧田智祐氏、株式会社 NIPPO 環境事業室 杉本憲治課長、佐々木由勝氏、関野英男氏、中村麻理氏、日建商事株式会社 大保義秋氏、西原聡氏、橋詰克幸氏、株式会社シナプテック 戸田達昭氏、井上潤一氏、アバンス 山口和昭氏には誠に感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ご協力をいただきながらここにお名前を記すことが出来なかった株式会社 NIPPO 技術研究所、環境事業室、関係部署の皆様および、その他の皆様にも心より感謝いたします。

最後に、研究に専念できるよう常に支え、時には分子生物学的実験手法の手ほどきもしてくれた妻に心より感謝いたします。

2023年9月  
大橋 貴志