

トルエンガス処理 DHS リアクター内の微生物群集構造解析

長岡技術科学大学 ○(学) 山口 剛士, 中村 将一郎, (正) 幡本 将史, (正) 山口 隆司
 阿南工業高等専門学校 川上 周司, 呉工業高等専門学校 谷川 大輔
 三機工業株式会社 田村 英輔, 加藤 薫, 長野 晃弘

1. はじめに

トルエンは揮発性有機化合物の一種であり、塗料や印刷等の溶剤として化学工業において重要な原料として広く利用されている。その一方で、人体に悪影響を及ぼす浮遊粒子状物質や光化学オキシダントの原因の一つである。現在、主なトルエン等の揮発性有機化合物の除去には燃焼法が用いられている。燃焼法は、揮発性有機化合物に対して高い分解能を示すが、高額な維持コストや広大な敷地面積の確保が必要であり、中小規模の排出事務所への適応が困難である。そこで、我々の研究室では中小規模の排出事務所に対して適応可能な新規の生物学的処理の開発を行った¹⁾。処理装置は充填担体にスポンジを用いる down-flow hanging sponge (DHS) リアクターを選定し、トルエンガス処理を試みた。その結果、DHS リアクターによるトルエンガス除去率は 80%を達成し、DHS リアクターがガス処理リアクターとして適応可能であることが明らかとなった¹⁾。本報告では、DHS リアクター内におけるトルエン分解に関与する微生物群集を明らかにすることを目的とし、DHS リアクター内のスポンジに保有されている汚泥の微生物群集構造解析を 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析及びトルエン分解に関与する機能遺伝子を標的としたクローン解析を行った。さらにトルエン分解に関与する機能遺伝子を標的とした定量 real-time PCR 法をスポンジ担体の異なる 3 カ所 (ケーシングの外, スポンジの外部及び内部) で行い、DHS リアクター内で優先するトルエン分解経路の特定を行った。

2. 実験方法

2.1 実験装置

本研究で用いた DHS リアクターの概略図を図-1 に示す。DHS リアクターは、活性汚泥を植種し、トルエンガスとして 1000 ppmC (v/v) を連続供給した。また、栄養塩水は流入トルエンガスの炭素量に対して C:N:P=300:5:1 になるように連続供給した。クローン解析及び定量 real-time PCR 法に用いた汚泥は、トルエンガスの除去率が 80%を達成した際の汚泥を採取し、解析を行った。クローン解析に用いたサンプルは、DHS リアクターの上部、中部及び下部の 3 カ所からスポンジを採取した。定量 real-time PCR 法に用いたサンプルは、DHS リアクター下部のスポンジ担体からケーシングの外、スポンジの外部及び内部の 3 カ所から汚泥を採取した。

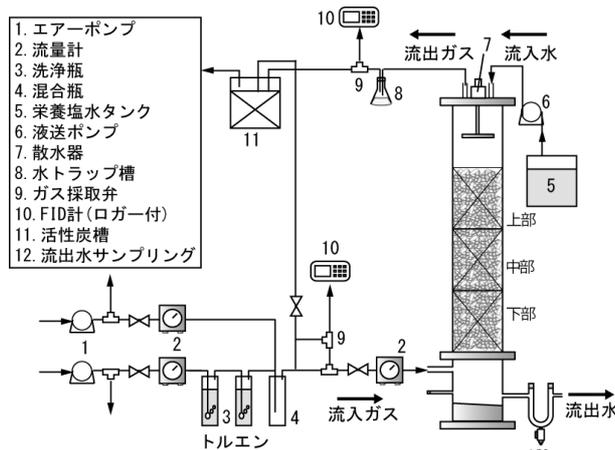


図-1 トルエン除去 DHS リアクターの概略図

2.2 16S rRNA 遺伝子及びトルエン分解に関与する微生物のクローン解析

表-1 に本研究で用いたプライマーを示す。本研究では、バクテリアの 16S rRNA を標的としたクローン解析を EUB338f/U1500r を用いて行った。得られた塩基配列は、Ribosomal Database Project の Classifier 機能を用いて細菌群の推定を行った。トルエン分解に関与する機能遺伝子のクローン解析には、好気環境下でトルエン分解を行う分解経路の機能遺伝子を標的としてクローン解析を行った。得られた塩基配列は、NCBI の BLAST 相同性検索ツールを用いて近縁種の推定を行った。

2.3 定量 real-time PCR 法

定量 real-time PCR 法は好気環境下のトルエン分解経路に関与する機能遺伝子 (TmoA, TbmD, TodC, XylA 遺伝子) を標的にしたプライマー (表-1) を用いたインターカレーター法により各機能遺伝子の定量を行った。

表-1 クローン解析及び定量 real-time PCR 法に用いたプライマーセット

プライマーセット	標的	塩基配列 (5'-3')	参考文献
TmoA-F	Subfamily 2 of α-subunits of hydroxylase component of multi-component mono-oxygenase	CGAAACCGGCTT(C/T)ACCAA(C/T)ATG	2
TmoA-R		ACCGGATATTT(C/T)TCTTC(C/G)AGCCA	
TbmD-F	Subfamily 1 of α-subunits of hydroxylase component of multi-component mono-oxygenase	GCCTGACCATGGATGC(C/G)TACTGG	2
TbmD-r		CGCCAGAACCCTTGTC(A/G)(A/G)TCCA	
TodC-F	Subfamilies D.1.B+D.1.C+D.2.A+D.2.B+D.2.C of α-subunits of Type D iron-sulfur multi-component	CAGTGCCGCCA(C/T)CGTGG(C/T)ATG	2
TodC-R		GCCACTTCCATG(C/T)CC(A/G)CCCCA	
XylA-F	Electron transfer component of two-component side chain mono-oxygenase	CCAGGTGGAATTTTCAGTGGTTGG	2
XylA-R		AATTAACCTCGAAGCGCCACCCCA	
EUB338f U1500r	Most bacteria	ACTCTACGGGAGGCAGCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	3

キーワード：トルエンガス, DHS リアクター, クローン解析, 定量 real-time PCR 法

連絡先：〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 水圏土壌環境制御工学研究室 0258-47-1611 (6646)

3. 実験結果

3.1 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析

これまでに DHS リアクターをトルエンガス処理に用いた報告はされているが¹⁾, トルエンガスを処理する DHS リアクター内の微生物群集構造解析はこれまで報告されていない。そこで, 本研究では DHS リアクター内の上部, 中部及び下部の 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析の解析を行い, トルエン分解に関与する微生物の特定を行った (表-2)。その結果, DHS リアクターのすべてのサンプル採取場所において *Proteobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Verrucomicrobia* 門, *Firmicutes* 門, *Planctomycetes* 門に属する微生物が存在していた。特に多種多様のトルエン分解菌が存在する *Proteobacteria* 門に属する微生物はすべての場所で優占していた。また, トルエン分解菌として知られている *Pseudomonas* sp., *Acidovorax* sp., はすべてのサンプル採取場所で検出されたが, 他のトルエン分解菌はリアクター高さで異なる微生物が存在していた。特に, DHS リアクター下部では他のサンプル採取場所よりも多種のトルエン分解菌が存在しており, 優占していたほとんどの微生物がトルエン分解菌であった。これらの結果より DHS リアクター内は, 多種多様のトルエン分解菌によりトルエンが分解され, さらにトルエンガスは様々な分解経路を介して分解されていたと考えられる。

3.2 トルエン分解に関与する機能遺伝子のクローン解析及び定量 real-time PCR 法

次に, DHS リアクター内でトルエンがどの分解経路を介して分解されているのか把握するために, トルエン分解菌が優占していたリアクター下部の汚泥を用いて各機能遺伝子のクローン解析を行った。まず, PCR 法による遺伝子増幅を行ったが, XylA 遺伝子の増幅ができなかった。PCR 法による遺伝子増幅が確認できた TmoA, TbmD, TodC 遺伝子のクローン解析を行った結果, TmoA 遺伝子では *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 に近縁な微生物が, TbmD 遺伝子では *Azotobacter vinelandii* DJ に近縁な微生物が, TodC 遺伝子では *Pseudomonas putida* DOT-T1E に近縁な微生物が優占種であった。しかし, これら各機能遺伝子の優占種は 16S rRNA を標的としたクローン解析とは異なる微生物であった。

多種のトルエン分解菌が存在していた DHS リアクター下部のスポンジ担体を用いてスポンジ担体のケーシングの外, スポンジの外部及び内部の汚泥を用いて機能遺伝子の定量を行い, 優先している分解経路の推測を行った。その結果を図-2 に示す。まず, TbmD 遺伝子の数はスポンジ担体のすべての場所において同程度であった ($6.3 \pm 0.4 \times 10^6$ copies/ng-DNA)。一方, TmoA 遺伝子はケーシングの外で一番多く存在し (1.2×10^6 copies/ng-DNA), TodC 遺伝子はスポンジの内部で一番多く存在していた (8.6×10^6 copies/ng-DNA)。これらの結果からトルエンはスポンジの内部とケーシングの外で異なる分解経路を介して分解されていることが考えられた。この要因として, スポンジ担体内の酸素濃度, トルエン濃度が影響しているのではないかと考えられる。

4. まとめ

本研究では, トルエンガスを除去することが可能であった DHS リアクター内の微生物群集構造解析を行った。その結果, DHS リアクター内には既知のトルエン分解菌が存在し, 多種多様のトルエン分解菌によってトルエンガスが分解されていることが明らかとなった。また, 定量 real-time PCR 法によりトルエンガスはスポンジの内部とケーシングの外で異なる分解経路を介して分解されていることが示された。すなわち, ケーシングの外とスポンジの内部では異なる微生物がトルエンを分解していることが示された。また, 各機能遺伝子の解析結果から推定した優占種は 16S rRNA を標的としたクローン解析とは異なる微生物であった。今後は, 高感度 FISH 法を用いて mRNA 及び 16S rRNA の同時検出を行い, トルエン分解に関与する微生物の機能と系統を結びつけ, DHS リアクター内のトルエン分解に関与する微生物の特定を行う予定である。

5. 参考文献

- 1) 中村ら., 土木学会論文集 G (環境) **68**, 7, 2012. 2) Hendrickx et al., *Journal of microbiological methods* **64**, 2006. 3) 鈴木ら., 土木学会論文集 G (環境) **64**, 4, 2008.

表-2 DHS リアクター内の微生物群集構造解析

Classification	Number of clones (% of total clones)		
	上部	中部	下部
Proteobacteria			
Alphaproteobacteria	6 (9)	9 (14)	6 (8)
Betaproteobacteria	10 (14)	17 (26)	14 (18)
Deltaproteobacteria	6 (9)	3 (5)	5 (6)
Gammaproteobacteria	23 (33)	11 (17)	16 (20)
Bacteroidetes			
Sphingobacteriia	4 (6)	7 (11)	15 (19)
Flavobacteriia	7 (10)	1 (2)	4 (5)
Cytophagia	2 (3)	2 (3)	
Verrucomicrobia			
Verrucomicrobiae	3 (4)	4 (6)	8 (10)
Firmicutes			
Clostridia	5 (7)	5 (8)	7 (9)
Planctomycetes			
Planctomycetia	1 (1)	1 (2)	1 (1)
Actidobacteria			
Acidobacteriales	2 (3)	2 (3)	
Chlamydiae			
Chlamydiales		1 (2)	1 (1)
Other		2 (3)	2 (3)
Total (%)	69 (100)	65 (100)	79 (100)

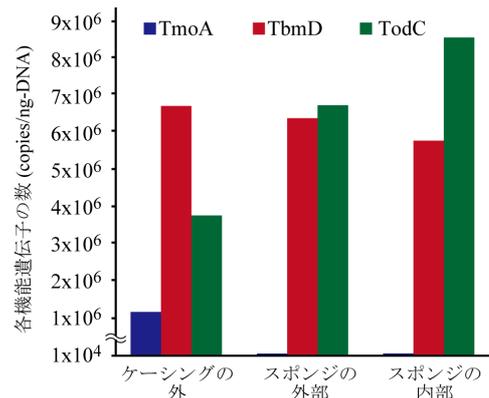


図-2 スポンジ担体における各機能遺伝子の数の変遷