

高吸水性樹脂（SAP）改質土の再生利用を目的とした SAP の生分解性評価（その2）

鹿島建設(株) 正会員 ○河合達司 河野麻衣子 田中真弓

1. 目的

中間貯蔵事業において、高含水状態の除去土壌からの草木・礫の分離効率を高めるため、除去土壌に高吸水性樹脂（以下、SAP）を含む選別補助材を添加し改質する。放射能濃度が基準を満たす土壌は管理された状態での再生利用が計画され、再生利用先での長期安定性の観点から土壌に含まれる SAP の生分解性を評価することは重要である。既報¹⁾では、生分解性プラスチックの評価に用いられる生分解度試験（JIS K 6955:2017）により SAP の生分解性を評価し、120 日後に 80 %近い生分解度が得られた。そこで、この土壌試料を用いて、次世代アンプリコンシーケンス解析による菌叢解析を行い、SAP の分解に関与する菌の推定を試みた。

2. 方法

製法の異なる二種類の SAP（C および M）¹⁾を用いた生分解度試験で得られた土壌試料を用い、次世代アンプリコンシーケンス解析により、菌叢解析を行った。

土壌試料からの DNA 抽出には、FastPrep-24 5G (MP-Biomedicals)を用いて細胞破碎し、ISOIL for Beads Beating kit (Nippon Gene)の標準プロトコルにより DNA を抽出した。

生分解度試験での SAP の分解速度が遅く、真菌による分解の可能性も考えられるため、定量 PCR 法により細菌と真菌の標的遺伝子のコピー数を比較し、両者の優占度を推定した。定量 PCR 法は、試薬 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(Takara Bio)を用い、サーマルサイクラーRotor-Gene Q (QIAGEN)により行った。使用したプライマーの標的遺伝子領域と DNA コピー数の定量に用いた標準菌を表-1 に示す。

抽出した DNA を用い 16SrRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンス解析を行い、得られた遺伝子情報から Ribosomal Database Project (RDP) および微生物同定データベースを用いて、菌叢解析を行った。RDP により属レベルまでの相同性検索を行い、相同性 80%以上の帰属分類群を抽出した。また、微生物同定データベースの相同性検索により、相同性 97%以上の最上位を近縁種として同定した（表-2）。

表-1 プライマーの標的遺伝子領域および DNA コピー数の定量に用いた標準菌

対象菌	プライマーの標的遺伝子領域	DNA コピー数の定量に用いた標準菌
細菌	16S rDNA 341f - 534r	<i>Escherichia coli</i> JCM 1649T
真菌	ITS 1f - 5.8S	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JCM 7255T

表-2 アンプリコンシーケンス解析の主な解析条件

解析工程	解析条件
1) PCR	・使用したプライマー；細菌 16SrDNA 341f-R806 (約 430 bp)
2) アンプリコンシーケンス解析	・シーケンサー；MiSeq (Illumina) ・シーケンシング Kit； MiSeq Reagent Kit v3 (600 サイクル) (Illumina)
3) 相同性検索	1)Ribosomal Database Project (RDP) による検索 ・ソフトウェア；Metagenome@KIN (World Fusion) ・データベース；RDP MultiClassifier ver.2.11 2)微生物同定データベースによる検索 ・ソフトウェア；Metagenome@KIN (World Fusion) ・データベース；微生物同定データベース DB-BA13.0 (TechnoSuruga Laboratory)

3. 結果

(1) 定量 PCR 法

定量 PCR 法の結果、試料 C および M 共に、増幅した遺伝子コピー数は、細菌が真菌を 2 桁上回った（表-3）。また、一般的に

表-3 定量 PCR 法での遺伝子コピー数

試料名	細菌 16S rRNA	真菌 ITS
C	1.27E+09	1.22E+07
M	1.29E+09	1.18E+07

キーワード ポリアクリル酸ナトリウム, 好気性微生物分解, 菌叢解析, アンプリコンシーケンス解析
連絡先 〒182-0036 東京都調布市飛田給 2-19-1 鹿島建設(株)技術研究所 TEL042-489-6651

菌体あたりの標的遺伝子の保有数は細菌よりも真菌が多いことから、個体数は細菌が真菌を大幅に上回るこ
ととなり、細菌が優占化した菌叢であると推測される。

(2) アンプリコンシーケンス解析

1) RDP による菌叢解析結果

RDP により属レベルで帰属分類群を抽出した結果を図-1 に示す。製法の違いに関わらず両試料の結果はほ
ぼ一致し、上位の存在比を示した帰属分類群は、分離培養が困難な系統群である *Acidobacter* 門 の Gp6, Gp16,
放線菌の *Gaiella* 属, *Nocardioides* 属, 芽胞形成グラム陽性桿菌の *Bacillus* 属, 非芽胞形成好気性桿菌
Sphingomonas 属であった。

2) 微生物同定データベースによる相同性検索結果

微生物同定データベースにより、97%以上の相同性を示し菌種が同定できたものは、両試料共に全体の約
27%であり、得られた 16SrDNA の多くは既知の遺伝子情報に一致しなかった。上位の存在比を示した菌種は
両試料共に一致し、*Bacillus aryabhattai* や *Sphingomonas lutea*, *Nocardioides aestuarii* などの好気性菌であった
(表-4)。微生物の危険度を判断する指標の一つとしてバイオセーフティレベルが設定されているが、得られ
た同定結果の中で存在比 0.1%以上の 33 の菌種を、(独)製品評価技術基盤機構の微生物有害情報リスト (2021
年 3 月時点) ²⁾ に登録されている有害性を有する 3228 の菌種と照合した結果、該当するものはなかった。

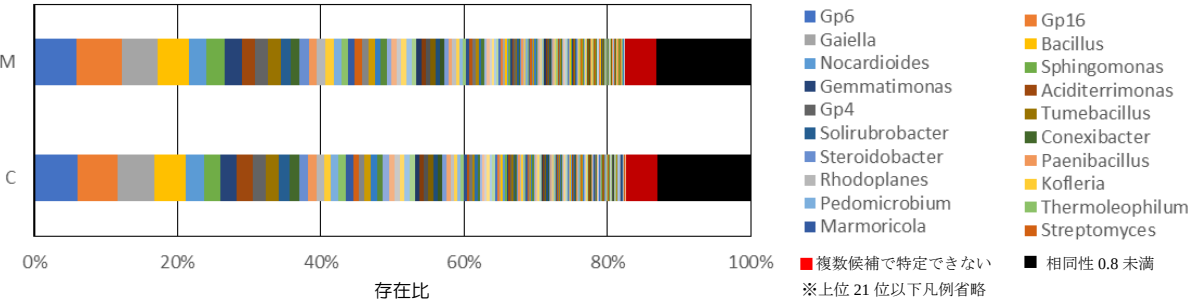


図-1 RDP の相同性検索による菌叢解析結果

表-4 微生物同定データベースの相同性検索により同定された菌種 (存在比上位 10 位)

種名	<i>Bacillus aryabhattai</i> , <i>Sphingomonas lutea</i> , <i>Nocardioides aestuarii</i> , <i>Lysobacter dokdonensis</i> , <i>Sphingomonas daechungensis</i> , <i>Gaiella occulta</i> , <i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> , <i>Bacillus luciferensis</i> , <i>Solirubrobacter ginsenosidimutans</i> , <i>Nocardioides iriomotensis</i>
----	---

4. 考察

SAP は、ポリアクリル酸ナトリウムの分子間を架橋し、水に不溶な固体化したものである。今回明らかとな
った SAP の生分解度試験後の菌叢の中には、既知の水溶性ポリアクリル酸ナトリウムの分解菌 (*Microbacterium*
sp. II-7-12, *Xanthomonas maltophila* W1, *Acinetobacter* genosp. 11 W2.) ³⁾ と一致するものはなかった。この理由
として、培地成分の違いや土の存在の有無が考えられるが、SAP の 80%が分解した試料を用いたことから、こ
の時点では分子量が小さく分解が容易な水溶性ポリアクリル酸ナトリウムよりも、分子量が大きく分解速度
が遅い架橋された固体状の SAP が主として残存していると考えられ、基質に対する分解の選択性が影響する
可能性が示唆される。今回同定した放線菌や *Sphingomonas* 属などはバイオレメディエーションにおいて分解
に寄与するとされる菌種を含む分類群であり、SAP の分解に関与しているかは不明である。今後、それらを対
象にして、培養初期からの経時的な菌叢の変化や単離菌による分解評価など SAP の分解に関与する微生物の
特定に向けての検討を行っていく。

参考文献

1) 河野麻衣子, 河合達司, 田中真弓: 高吸水性樹脂 (SAP) 改質土の再生利用を目的とした SAP の生分解性評
価 (その 1), 土木学会第 76 回年次学術講演集, 投稿中, 2021
2) (独) 製品評価技術基盤機構: 微生物有害情報リスト <https://www.nite.go.jp/nbrc/mrinda/list/risk/bacteria/ALL>
3) Fusako Kawai: Biodegradation of polyethers and polyacrylate, *Studies in Polymer Science*, Vol.12, pp 24-38, 1994