

## 低負荷な塩素化エチレン汚染土壌のバイオオーグメンテーションにおける栄養剤の適用検討

名古屋工業大学 学生会員 吉田智揮 正会員 吉田奈央子

## 1. 諸言

世界人口の増加に伴う水需要の増加が予測される中、重要な水源である地下水および土壌の塩素化エチレン (CEs) 汚染の浄化が求められる。

バイオオーグメンテーションは、分解菌を栄養剤 (電子供与体および炭素源) と共に汚染環境に補填することで、バイオスティミュレーションに比べて短期間で汚染物質を浄化できる浄化法である。Dehalococcoides 属細菌 (*Dhc.*) は最も代表的な CEs 分解菌であり、水素および酢酸を唯一の電子供与体および炭素源として用い、トリクロロエチレン (TCE) などの CEs を無害なエチレンまで脱塩素化する (図 1)。

バイオオーグメンテーションが様々な土壌で実施され始めている一方、*Dhc.* のバイオオーグメンテーションを適用可能な土壌の特性 (物理的な性状、土壌の微生物菌叢) は明らかになっていない。具体的には、どのような土壌にどのような有機物を補填すれば *Dhc.* に発酵を通じて水素と酢酸を供せるか不明である。本研究では、*Dhc.* を接種した 4 種類の CEs 汚染土壌に 7 種の電子供与体および TCE を添加し、土壌の特性と電子供与体が TCE 脱塩素化に与える影響を検討した。

## 2. 実験方法

## 2.1 土壌マイクロゾムの調製

4 種類の汚染土壌 (土壌 A-D) に無機塩培地を添加した混合物を、嫌気混合ガス ( $N_2:CO_2, 4:1, v/v$ ) で曝気後、50 mL バイアル瓶に分注した。メタノール (MeOH)、ギ酸 (FOR)、酢酸 (ACE)、エタノール (EtOH)、乳酸 (LAC)、クエン酸 (CIT)、安息香酸 (BEN) をそれぞれ 10 mM で添加した。培養物を密閉し、還元状態になるまで 28°C で静置培養後に 1 mM TCE を加え、*D. mccartyi* NIT01 を最終細胞密度  $10^6$  cells/mL で接種した。培養物は 3 連で作成したほか、無機塩培地を含み電子供与体を添加しない培養物 (NC) も並行して作成した。

## 2.2 土壌分析・微生物群集構造解析

実験に用いた 4 種の土壌について、pH、電気伝導度 (EC)、含水率および有機物 (OM) を測定した。塩素化エチレン、エチレンおよび水素は GC を用いて、有機酸は HPLC を用いて測定した。土壌 A-D および、脱塩素化が終了した 3 つの培養物 (A/EtOH, B/FOR, B/LAC) の微生物群集構造について、16SrRNA 遺伝子のアンプリコン解析ならびにアンプリコン解析データに基づき PICRUST2 v2.5.1 を用いて構築された仮想ゲノムから潜在的な代謝機能を予測した。

## 2.3 Biolog® EcoPlates™

土壌細菌多様性の代謝的フィンガープリントを評価するために、Biolog® EcoPlate™ を用いて完全な脱塩素化が確認された土壌 A, B の群集レベルの生理学的なプロファイリングを調べた。具体的には、土壌試料を EcoPlate ウェルに細胞密度を  $10^5$  cells/mL になるように 100  $\mu$ L 土壌細菌懸濁液を添加した。嫌気チャンバー内で気相を窒素で置換した後、28°C で静置培養した。経時的に吸光度 (波長 590 nm) 測定を行い、平均ウェル吸光度 (AWCD) を算出し評価を行った。

## 3. 結果・考察

## 3.1 土壌特性が TCE 脱塩素化に与える影響

土壌の物理的な性状と 7 種類の栄養剤による脱塩素化活性を示す遊離塩素濃度を表 1 に示す。土壌 A, B の電気伝導率 (EC) と有機物含量 (OM) が土壌 C, D に比べ顕著に高かった (表 1)。さらに、土壌微生物菌体量を示すタンパク質量も、土壌 C, D (検出下限以下) に比べ A, B の方が 1000 倍以上濃かった。以上を踏まえ、微生物の増殖に不可欠なミネラルと有機物栄養を示す土壌 EC と OM が土壌微生物菌体量に強く影響したのではないかと考えた。一方、180 日の培養期間で TCE からエチレンまでの完全な脱塩素化が土壌 A, B の A/EtOH, B/FOR, BLAC のみにおいて達成した。土

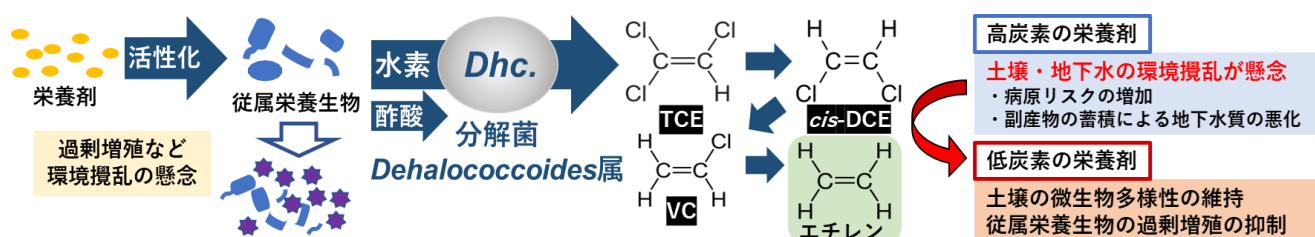


図-1 バイオオーグメンテーション概要図

壤 C, D では脱塩素化が進行されたが、いずれの培養条件において完全な脱塩素化が達成できなかった。異なる土壌における脱塩素化活性の違いに関して *Dhc.* の脱塩素化が水素を唯一の電子供与体、酢酸を炭素源として不可欠であり、ミネラルや有機物が乏しい土壌 C, D においては微生物による補填された栄養剤を分解し、水素および酢酸の供給能が土壌 A, B より低いため、脱塩素化活性に大きく影響されたのではないかと考えた。

### 3.2 微生物群集の脱塩素化に関する代謝経路予測

完全な脱塩素化に達成した培養物の微生物菌叢では、A/EtOH において *Ruminiclostridium* (4.1%) *Desulfosporosinus* (14%), *Desulfosporosinus* (3.7%) が優占し、B/FOR において *Desulfitobacterium* (3.7%), *Desulfosporosinus* (3.5%) が優占し、B/LAC : *Dendrosporobacter* (17%) が優占していた。培養中の水素および酢酸濃度を追跡した結果、各添加栄養剤から脱塩素化に必要な水素および酢酸を生成することが確認され、各条件下における脱塩素化が図3に示す脱塩素化の代謝経路で達成された(図3)。

### 3.3 土壌が持つ炭素代謝の傾向

EcoPlate による炭素代謝機能の評価において、土壌 A, B および脱塩素化後の A/EtOH, B/FOR, B/LAC に共通して、炭水化物の代謝割合が最も高く、土壌 A と A/EtOH でポリマー、炭水化物およびフェノール類の代謝割合が有意に変化した(図4)。の炭素代謝に有意差が生じた要因として、土壌 A は絶対好気性細菌の *Alicyclobacillus* が菌叢全体の 24% を占め、嫌気培養によって菌叢が大きく変化した示唆される。PICRUST2 による遺伝子情報をもとにした代謝予測において、土壌間で添加栄養剤の代謝割合に有意な差は見られなかった。死滅したバイオマス由来の DNA や他の代謝遺伝子の影響を受けたことが考えられる。

## 4. 結論

異なる CEs 汚染土壌を用い異なる栄養剤を補填したバイオオーグメンテーションで脱塩素化活性を検討した結果、土壌 EC および OM の値が大きいほど、効率的な脱塩素化が起こる傾向が示唆された。CEs 汚染土壌のバイオオーグメンテーションを行う際に土壌の栄養状態を反映できる EC 及び OM を調べることで効率的な脱塩素化に達成するために相応しい栄養剤を選択することが期待できる。

## 参考文献

- (1) Tomita et al., 2022. *Chemosphere.*, 307, 4.
- (2) Yoshida et al., 2016. *C.*, 2, 15.

表-1 土壌の性状と脱塩素化活性

土壌		A	B	C	D
土壌性状	pH	3.81	4.61	5.85	5.60
	EC (μS/m)	209	62.0	3.89	2.28
	OM (%)	2.50	2.60	1.70	2.00
	タンパク質量* (μg/mL)	12.2	2.52	-	-
	含水率 (%)	21.9	24.6	20.1	23.6
		①	0.010	0.003	N.
メタノール	②	0.009	0.007	N.	N.
	③	0.004	0.006	N.	N.
	①	0.947	2.931	0.050	N.
ギ酸	②	0.930	3.017	0.086	N.
	③	0.427	3.138	0.117	N.
	①	1.821	0.156	0.059	0.003
エタノール	②	0.009	0.333	0.063	0.000
	③	0.008	0.256	0.045	2.370
	①	0.000	0.008	0.009	N.
酢酸	②	0.003	0.012	0.007	N.
	③	0.001	0.010	0.147	N.
	①	0.000	2.705	0.019	0.946
乳酸	②	0.094	2.187	0.014	0.013
	③	0.087	2.631	0.805	0.040
	①	N.	1.055	N.	N.
クエン酸	②	N.	0.010	N.	N.
	③	N.	0.010	N.	N.
	①	N.	N.	N.	N.
安息香酸	②	N.	N.	N.	N.
	③	N.	N.	N.	N.

\*タンパク質の検出限界10ng/mL以下; N.: 未培養(還元状態に遷移しなかった)

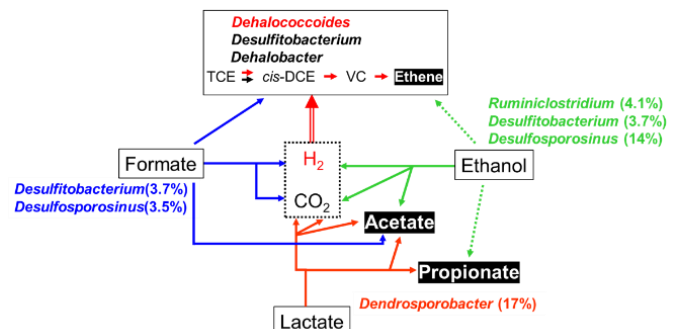


図-3 脱塩素化に関する代謝経路予測 (緑:A/EtOH; 青:B/FOR; 赤::B/LAC)

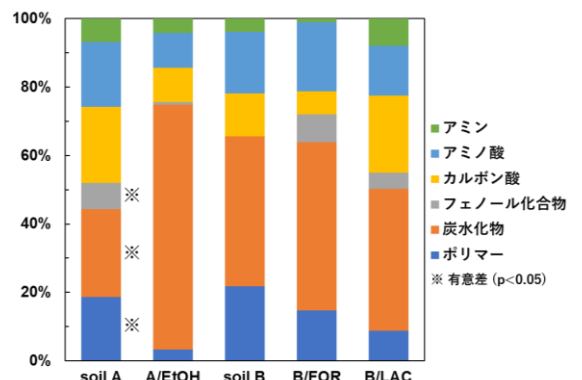


図-4 炭素代謝の傾向 (EcoPlate)