

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11692

研究課題名（和文）汚染物質分解走性細菌を援用した新規バイオオーグメンテーション技術の創成

研究課題名（英文）Construction of novel bio-augmentation technology using pollutants degrading chemotactic bacteria

研究代表者

荷方 稔之（NIKATA, TOSHIYUKI）

宇都宮大学・工学部・助教

研究者番号：30272222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生物学的汚染土壌の処理方法の一つであるバイオオーグメンテーションにおける汚染物質分解細菌の濃縮と効率的な新規濃縮技術の開発を目指し、生物学的に難分解性である1,4-ジオキサンをモデル汚染物質とした活性汚泥の馴養を磁気分離を用いた磁化活性汚泥法で培養した。約800日間の馴養の結果、炭素源として添加した1,4-ジオキサン及びテトラヒドロフランがCOD除去率として90%以上を示した。この馴化汚泥から1,4-ジオキサン存在下で増殖する細菌種の単離に成功したことから、磁化活性汚泥法を用いた分解細菌の濃縮と単離が可能である事が示唆され、より効率的なバイオオーグメンテーション技術の開発の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオオーグメンテーションに代表される汚染土壌のより効率的な生物学的浄化法を目指し、環境基準にも指定されている1,4-ジオキサンをモデル汚染物質として、活性汚泥を磁気による固液分離を行う磁化活性汚泥法を用いて馴養することで本物質を分解する細菌群集を含む汚泥を構築した。さらにこの汚泥から1,4-ジオキサンを分解する細菌を単離することに成功したことから、本法を用いることでより効率的な汚染物質分解細菌の濃縮と分離が可能となることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We aimed to enrich contaminant-degrading bacteria in bioaugmentation, one of the methods for treating biologically contaminated soil, and to develop an efficient new enrichment technique. Activated sludge acclimation using biologically persistent 1,4-dioxane as a model contaminant was cultured using the magnetized activated sludge method with magnetic separation. After about 800 days of acclimation, 1,4-dioxane and tetrahydrofuran added as carbon sources showed COD removal rates of over 90%. The successful isolation of bacterial species that grow in the presence of 1,4-dioxane from the acclimated sludge suggests the possibility of using the magnetized activated sludge method to concentrate and isolate degrading bacteria, and thus the possibility of developing more efficient bioaugmentation technology.

研究分野：環境生物化学

キーワード：1,4-ジオキサン 活性汚泥 菌叢解析 バイオオーグメンテーション

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物学的環境浄化技術(バイオレメディエーション)は、微生物の難分解性化学物質の分解能力を利用した浄化技術であり、中でもバイオオーグメンテーションは既知の汚染物質分解細菌を外部から汚染土壌に対して導入することで汚染物質の浄化を行う技術である。物理化学的な除去法と比べて処理に時間がかかるが、比較的低コストでかつ環境への負担を抑えるといった利点がある。国内では *Desulfitobacterium* sp.KBC1 株によるテトラクロロエチレン汚染土壌の浄化を含め、ベンゼンや重金属等の汚染に対する浄化方法として実施例がある。

一方で、運動性を有する細菌は化学物質の濃度勾配を感知・応答して集積・忌避するといった走化性と呼ばれる性質を有する。この化学物質の感知に関与する走化性センサータンパク質によるセンシングは選択性を持ち、さらに迅速かつ高感度な検出系であるが、それは自然界で枯渇しがちな糖やアミノ酸などの栄養物質に対する応答について詳細に研究されてきた。

そこで申請者らは栄養物質ではなく、環境汚染物質を分解する運動性細菌の中には、汚染物質に対して走性を示す細菌が存在するかもしれない、そのような細菌を積極的に利用すれば単に周囲の汚染物質だけでなく、自ら汚染物質に向かって行動的に応答し、離れた場所に局在している汚染物質まで到達して分解することが可能になると考えた。この着想にもとづいて、汚染現場から分解と走化性を合わせ持つ細菌を単離し、効率的なバイオオーグメンテーションの実現につながる基礎研究として本研究を提案した。

2. 研究の目的

本研究では、モデル環境汚染物質として1,4-ジオキサンに着目した。本物質は平成21年から環境基準項目に追加され、さらに平成24年からは水質汚濁防止法に基づいた排水基準が定められている。その化学的性質から地下水等に浸透しやすく、生物学的に難分解性とされている化学物質である。本研究ではこの1,4-ジオキサンを主な炭素源とする人工排水を用いて活性汚泥を馴養し、その汚泥を分離源として1,4-ジオキサンを分解する細菌を単離することを目的とした。活性汚泥の培養には磁化活性汚泥(MAS)法を用いた。本法は磁気ドラムを用いた固液分離により効率的に汚泥と処理水を分離できるため、高濃度の汚泥を維持した培養が可能であり、かつ運転の安定化が期待できる培養法である。活性汚泥を馴養する過程においては、汚泥内菌叢を解析することで汚泥構成細菌の挙動について調査した。さらに単離した細菌において、1,4-ジオキサンに対する分解特性と同時に本物質に対する走化性についても調査した。

3. 研究の方法

(1) 宇都宮市水再生センターから採取した標準活性汚泥に汚泥と同濃度の磁性粉を添加し、5L容器のアクリル製MAS装置で運転した。培養開始時の種汚泥のMLVSSは2784 mg/Lであった。人工排水の炭素源には1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、グルコースを使用し、運転の状況に応じて添加割合を変化させた。水理学的滞留時間は24時間とし常時曝気を行った。運転中はMLSS、MLVSS、COD_{Cr}、pHを定期的に測定した

(2) 汚泥内菌叢解析のためにMASから全DNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型にPCRを行い、16S rRNA 遺伝子のV3-V4領域、及び1,4-ジオキサンとTHFの初期の酸化分解に関与する可溶性鉄二モノオキシゲナーゼ(SDIMO) 遺伝子をそれぞれ増幅した。増幅産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)で塩基配列の差異により分離、検出した。また次世代シーケンサー(NGS)を用いた16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析も行った。

(3) MASからの細菌の単離には1,4-ジオキサンを唯一の炭素源とした人工排水寒天培地および同炭素源を含む基礎ミネラル寒天培地を用いた。また単離した細菌の資化性を確認するため、1,4-ジオキサン及びTHFのみを炭素源とする人工排水液体培地または基礎ミネラル液体培地で振盪培養を行った。細菌の走化性測定は、LB培地で培養し洗浄した懸濁液を倒立位相差顕微鏡のステージに滴下し、1,4-ジオキサン寒天溶液を吸引したキャピラリーを細菌懸濁液に挿入し、キャピラリー開口付近に集積する菌体の様子を観察することにより行った。

4. 研究成果

(1) 培養開始50日目まではMLVSSが減少したためTHFを新たに添加した。その後汚泥量の増加が確認されたため、以降の培養では徐々にグルコースの添加量を減らし1,4-ジオキサンとTHFの添加割合を増加させた。培養752日目以降ではグルコースは添加せず、1,4-ジオキサンとTHFのみを炭素源とする培養を行った。その期間中のMLVSSは9000~10000mg/Lで推移した。また培養開始時50日までのCOD除去率は約75%以下と低く、1,4-ジオキサンにより死滅する細菌とグルコース等を資化する細菌が増減することで有機物除去が不安定になったと考えられた(Fig. 1)。その後COD除去率は徐々に増加し、およそ90%以上を維持した(Fig. 2)。さらにグルコース添加を停止した751日目以降におけるCOD除去率は95~97%であり、THF

が完全に除去されたと仮定した場合の推定 1,4-ジオキサン除去率は 87%であった。以上の結果から活性汚泥を種汚泥とする磁化活性汚泥法による 1,4-ジオキサンの馴養に成功した。

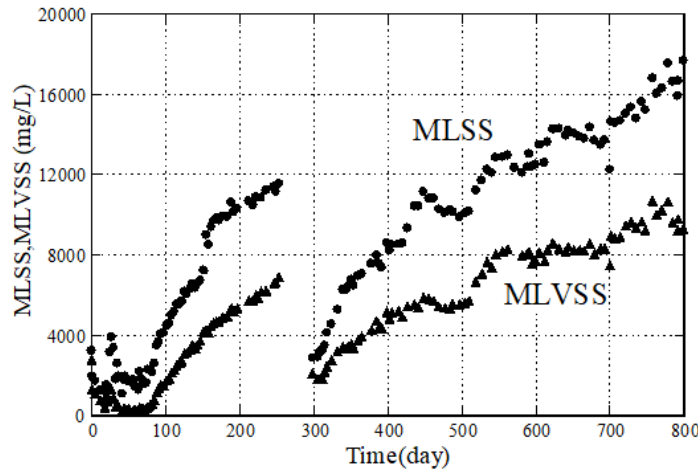


Fig. 1 MLSS, MLVSSの推移

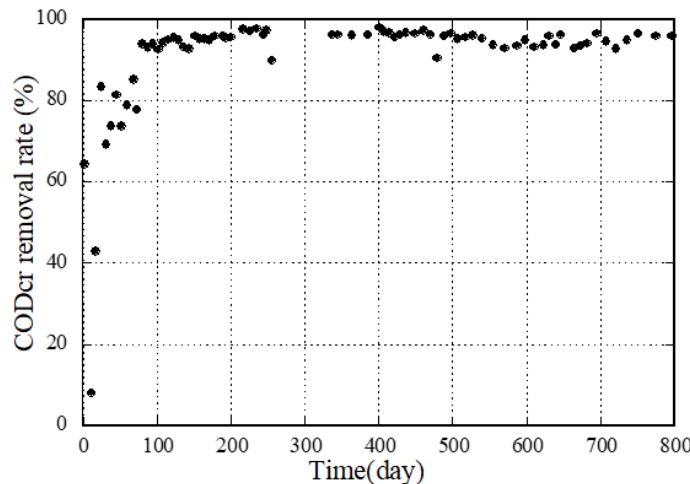


Fig. 2 COD 除去率の推移

(2) 馴養の過程において、16S rRNA 遺伝子に基づいた DGGE による全細菌種の解析により、培養初期から中期では優占種を示す DNA の大きな変化が認められ、培養中期以降では優占 DNA が長期間にわたり存在したことから、主要な細菌種が長期間存在し続け、馴養が安定化したことが示唆された。SDIMO 遺伝子を標的とした DGGE でも長期的に存在する DNA が検出され、その DNA 断片を精製し決定した塩基配列をもとに推定したところ、既に 1,4-ジオキサン分解が報告されている *Pseudonocardia* sp. D17 株と一致した。

NGS を用いた 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析により、門レベルにおいてはすべての培養期間を通して *Proteobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門が優占していた。属レベルにおいては 1,4-ジオキサン分解の関与が明らかにされている *Pseudonocardia* sp., *Mycobacterium* sp., *Flavobacterium* sp. などの細菌種が確認された。

(3) 馴化した汚泥から 1,4-ジオキサン単独及び 1,4-ジオキサンと THF を含む寒天培地で増殖するコロニーを複数確認することができた。その中から基礎ミネラル寒天培地にて増殖したコロニーを同液体培地にて培養したところ、1,4-ジオキサン単独及び 1,4-ジオキサンと THF を含む液体培地にて増殖が確認できた。その分離株は *Pseudonocardia carboxyvorans* と高い相同性を示した。なお、本実験で分離した計 4 株の細菌種において、走化性を測定したが 1,4-ジオキサン及び THF の両化学物質に対して走性は示さなかった。

以上の結果より、MAS 法を用いることで効率的な 1,4-ジオキサン分解汚泥の馴養と分解細菌の分離が可能であることが明らかとなった。本手法を用いてより迅速な汚染物質分解細菌の濃縮と分離ができれば、より効率的なバイオオーグメンテーションを実現する新規技術が開発できる可能性が示唆された。また本研究では、1,4-ジオキサンに走化性を示す細菌は分離されなかったが、より高度に馴化した汚泥を分離源として 1,4-ジオキサン分解細菌を分離し走化性を測定することにより目的とする汚染物質分解走化細菌を得ることも可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 荻原 隼人, 荷方 稔之, 酒井 保藏
2. 発表標題 環境汚染物質分解性汚泥の馴化に伴う16S rRNA アンプリコン解析による菌叢変化
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荻原 隼人, 金澤 彩, 荷方 稔之, 酒井保藏
2. 発表標題 環境汚染物質で馴化した磁化活性汚泥からの分解細菌の単離と分解特性
3. 学会等名 第20 回 2020 年度 磁気力制御・磁場応用夏の学校
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田芳樹, 酒井保藏, 荷方 稔之, 六本木美紀
2. 発表標題 余剰汚泥の熱処理を併用する高負荷条件に対応できる磁化活性汚泥法の試み
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀華絵, 酒井保藏, 荷方 稔之, 六本木美紀
2. 発表標題 高容積負荷対応のための高MLVSS 濃度での磁化活性汚泥法の可能性
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 海賀俊人, 酒井保藏, 荷方 稔之, 六本木美紀
2. 発表標題 磁化活性汚泥法(MAS法)における余剰汚泥の高温処理による磁性粉の再利用性の検討
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徐 毅, 酒井保藏, 荷方 稔之, 六本木美紀
2. 発表標題 低濃度BOD 排水処理への磁気分離を用いた磁化メタン発酵法適用の試み
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩原 隼人, 荷方 稔之, 酒井 保藏
2. 発表標題 磁化活性汚泥法を用いた1,4-ジオキサン分解汚泥の馴養と汚泥内菌叢解析
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 萩原 隼人, 星 臣來, 荷方 稔之, 酒井 保藏
2. 発表標題 ビスフェノールF で馴養した磁化活性汚泥の処理特性と汚泥内菌叢の解析
3. 学会等名 第18回 2019年度 磁気力制御・磁場応用夏の学校
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Nikata, M. Hoshi, Y. Sakai
2. 発表標題 Screening of Bisphenol A Degrading Bacteria from Acclimatized Magnetic Activated Sludge
3. 学会等名 The 10th International Forum on Magnetic Force Control in Nara (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加賀 経元, 望月 学, 荷方 稔之, 酒井 保藏
2. 発表標題 日和見感染細菌のビスフェノールA 耐性に及ぼす膜損傷及び排出 機構の影響
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荷方 稔之, 星 臣來, 酒井 保藏
2. 発表標題 磁化活性汚泥法を用いたビスフェノールA資化性走性細菌の分離の試み
3. 学会等名 2018年度磁気力制御・磁場応用 夏の学校
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星 臣來, 荷方 稔之, 酒井 保藏
2. 発表標題 磁気分離を用いた磁化汚泥によるビスフェノールA 資化性細菌の濃縮と分離
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加賀経元, 荷方稔之, 酒井保藏
2. 発表標題 大腸菌のビスフェノールA 耐性に及ぼす薬剤排出ポンプ の影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------