

課題名 RFb-1101 ベンゼン汚染土壌・地下水の嫌氣的生物浄化技術の開発

課題代表者名 栗栖 太（東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター 水環境制御研究室）

研究実施期間 平成23～24年度

累計予算額 20,286千円（うち24年度9,016千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード(5～10個以下程度) ベンゼン、バイオレメディエーション、土壌汚染、地下水汚染、嫌気、安定同位体プローブ法、次世代高速シーケンス解析、バイオスティミュレーション、バイオオーグメンテーション

研究体制

(1)ベンゼン汚染土壌・地下水の嫌氣的生物浄化技術の開発(東京大学)

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

ベンゼンによる地下水・土壌汚染は日本、そして世界において深刻である。現状でベンゼンの汚染は、揚水曝気法などの物理的処理を中心に行なわれている。しかしながら、ベンゼンの環境基準は地下水で0.01mg/Lと非常に厳しく、物理的な処理法では、環境基準の濃度まで低減させることは大変難しい。こうした低濃度広範囲の汚染には一般に、微生物を用いたバイオレメディエーションが有効である。

ベンゼンは、好氣的な環境下では生物分解が比較的容易に進むため、好氣的な浄化手法は実用化されている。反面嫌氣的な条件下では、ベンゼンは一般に安定であって分解が進みにくいことが知られており、浄化技術の開発は進んでいない。嫌氣的な条件下で分解が可能となれば、地中への酸素供給が必要となる好氣的な処理に比べ、低コスト・低エネルギーでの浄化が可能となる。また汚染現場は嫌氣的環境である場合が多い。嫌氣的条件下でのベンゼン分解機構が明らかになれば、現場における分解を予測することができ、自然減衰を利用した浄化対策を立てることも出来る。

嫌氣的条件のなかでも、比較的酸化還元電位の高い硝酸塩還元条件においては純粋分離株の報告もあり、比較的研究が進んでいる。しかしながら硝酸塩還元では環境基準のある硝酸塩を地中に加えることになるため、その制御が難しい。より還元的な条件下でのベンゼン分解の研究も必要となっている。鉄還元条件では近年になり純粋分離株の報告がなされたが、硫酸還元条件、およびメタン生成条件では純粋分離株もない。メタン生成条件や硫酸塩還元条件でも、ベンゼン分解の現象は確認されてきているものの、ベンゼン分解を起こす集積培養系であっても研究例が極めて乏しく、ベンゼン分解を起こさせるための因子についてはほとんどわかっていない。

これまでに研究代表者らは、茨城県土浦市の蓮田土壌より、メタン生成条件下でベンゼンを分解する集積培養系を確立することに成功している。集積培養系の微生物群集を解析し、ベンゼン分解微生物として *Desulfobacteriales* 目細菌 Hasda-A を推定している。さらに国内4か所の土壌からベンゼン分解集積培養系を獲得してきている。

2. 研究開発目的

本研究では、ベンゼン汚染土壌・地下水の低コスト低負荷型浄化技術として、嫌氣的バイオレメディエーション技術を開発することをめざし、硫酸塩や有機物を地中に導入することによりベンゼンを分解する技術を開発しようとするものである。これまでに研究代表者が開発した嫌気ベンゼン分解微生物集積培養系と、ベンゼン分解

細菌の情報を用い、ベンゼン分解の制御因子を詳細に調べる。さらに嫌気ベンゼン分解微生物の集積高度化をめざし、その過程においても、ベンゼン分解微生物の制御方法についての情報を得る。より具体的な目的として、以下の3つを掲げる:

メタン生成ベンゼン分解微生物として、モニタリングすべき微生物を特定する

嫌気ベンゼン分解の促進因子を探索し、バイオスティミュレーションによる浄化手法を検討する

ベンゼン分解微生物集積培養系を用いて、汚染地下水のバイオオーグメンテーションが可能かどうかを確かめる

本研究によりベンゼン汚染土壌において、硝酸塩還元条件以外の嫌気的条件下でベンゼン分解を起こす方法を見出すことができれば、ベンゼン汚染土壌の嫌気的バイオレメディエーションによる浄化の、より安心、安全な実用化技術として位置づけることができる。

3. 研究開発の方法

(1) ベンゼン分解微生物の解析

1) 次世代シーケンサを用いた集積系の微生物群集解析

土浦蓮田由来(別の時期に採取したもの2種類)および新芝川底泥由来、および山口県岩国市の蓮田由来の集積系、千葉県手賀沼底泥由来のベンゼン分解集積系について、微生物群集構造解析を行った。16S rRNA 遺伝子のV4領域を含む部分配列を、Univ519f-802rのプライマーセットを用いてPCR増幅を行い、次世代シーケンサRoche 454シリーズにて解析した。解析はPCR産物をマクロジェン(株)に送付し、委託解析にて実施した。

2) 安定同位体プローブ法を用いた微生物解析

70 mL褐色バイアルに20 mLの培養系を入れ、 $[^{12}\text{C}_6]$ -ベンゼン添加系(以下 $[^{12}\text{C}]$ 系)と $[^{13}\text{C}_6]$ -ベンゼン添加系(以下 $[^{13}\text{C}]$ 系)を各系3連用意した。また、非生物によるベンゼンの分解を考慮するため滅菌系(121°C, 20 min × 3)を1連で用意した。ベンゼンを約1.2 mM添加し、25°Cで静置培養を行った。培養初日、1/3分解後、2/3分解後、ほぼ完全分解後にサンプルを採取し、土壤用DNA抽出キット(ISOIL for Beads Beading (NIPPON GENE))を用い、DNAを抽出した。抽出したDNA500 ngについてCsCl密度勾配超遠心分離(45,000 rpm, 72 hrs)により分離し、分画したDNAは浮遊密度画分ごとに16S rRNA部分配列をPCR増幅(27f-FAMおよび907r)した。各画分のPCR産物量をHha Iで消化したのち、ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)によりT-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism)解析を行った。また、重画分のクローニングを行い、T-RFLP解析において $[^{13}\text{C}]$ 系の重画分のみによく存在するクローンについて、塩基配列を決定した。さらに、浮遊密度画分ごとに16S rRNA遺伝子配列のV4領域をターゲットとしたプライマーでPCR増幅をおこなったのち、次世代シーケンサーによる遺伝子配列ライブラリを構築した。

(2) ベンゼン分解条件の検討

1) 硫酸塩添加試験

嫌気ベンゼン分解微生物集積培養系を用い、硫酸塩、および安息香酸添加のベンゼン分解に与える影響を検討した。硫酸塩添加試験では、35 mL褐色バイアルに10 mLの培養系を入れ、気相を純窒素で置換後、硫酸塩を硫酸イオン濃度にして0,100,250,500mgSO₄/L添加した。それぞれの条件に対して $[^{13}\text{C}_6]$ -ベンゼンを100mg/L投与し、25°Cで静置培養を行った。

2) 有機酸の添加効果

ベンゼン分解培養系にクロトン酸、安息香酸、フマル酸を添加し、ベンゼンの分解速度の相違を観察した。クロトン酸、フマル酸は、それぞれ0.1molをmilliQ水に溶解し2~5M NaOHを加えpHを7付近に調整した後、100mLとした1M水溶液を作製・使用した。安息香酸、酢酸は、それぞれのNa塩0.1molをmilliQ水に溶解し安息香酸、酢酸を用いてpH7付近に調整しmilliQ水を加え100mlとした。それぞれの試薬の調整は嫌気グローブボックス内にて行った。

3) 汚染地下水を用いた検討

岩手・青森県境産業廃棄物不法投棄現場N地区d-1地点(2012年5月採水)にて採取した汚染地下水に対し、嫌気的ベンゼン分解の有無、および易分解性有機物の添加効果を検討する試験を行った。易分解性有機物として、採取した汚染現場でクロロエチレン類の脱塩素資材として実際に添加されている浄化剤、アクリーンBC (AGCエンジニアリング製)を用いた。分取したそれぞれの地下水に対し、アクリーンBCを0.42%となるよう添加したアクリーンBC添加系、アクリーンBCを添加しないアクリーンBC無添加系、及び地下水をオートクレーブ(121°C、

15分)にて滅菌した滅菌系の3系列を作成した。これらの系に対し、ベンゼンを初期濃度0.5mg/Lとなるように添加し、ベンゼン及びメタン濃度の経時的な変化を測定した。

(3) バイオオーグメンテーションによる汚染地下水浄化試験

1) 集積培養系混合比の検討

(2)3)で採取した実汚染地下水とメタン生成ベンゼン分解集積培養系をそれぞれ体積比にて1:1、5:1、10:1、50:1、100:1となるようそれぞれ混合し、培養系を作成した。初期ベンゼン濃度を0.5mg/L、30°Cにて暗所で静置培養した。L-システイン添加系、無添加系、滅菌系を各混合比ごとに作成した。L-システイン添加系ではすべての系の酸化還元電位(ORP)が集積培養系と一致するまで($ORP_{SHE}:-290mV$)還元剤としてL-システインを添加した。

2) 有機電子受容体添加試験

実汚染地下水T1地下水:石炭ガス製造跡地から採水(2012年8月)、T2地下水:揮発性有機塩素化合物との複合汚染サイトから採水(2012年8月)、N-d-1地下水:岩手・青森県境産業廃棄物不法投棄現場N地区d-1地点(2012年5月採水)を用いた。汚染地下水とメタン生成ベンゼン分解集積培養系をそれぞれ体積比にて5:1、10:1となるようそれぞれ混合し、培養系を作成した。さらに、クエン酸3000mg/L添加系、グリシン3000mg/L添加系、フマル酸3000mg/L添加系、無添加系、滅菌系を各混合比ごとに作成した。初期ベンゼン濃度を0.5mg/L、30°Cにて暗所で静置培養した。

4. 結果及び考察

(1) ベンゼン分解微生物の解析

1) 次世代シーケンサを用いた集積系の微生物群集解析

土浦蓮田土壌由来の2種類の集積培養系(土浦A,土浦B)、新芝川底泥由来(新芝川)、岩国蓮田土壌由来(岩国)、手賀沼底泥由来(手賀沼)5種類から抽出したDNAをPCR増幅したものを等量混合し、Roche 454高速シーケンサの1/8領域で解析したところ、合計101,149リード、26,330,516塩基対の配列を解析することができ、1リードあたりの平均の塩基配列長は260.314であった。それぞれの試料ごとのリード数は15,741-28,317リードであり、構造解析を行うに十分な数のリード数が得られた。

各リードごとにBLAST解析を行い、系統学的位置を解析し、整理したものをもとに、群集構造を解析した。3年以上にわたりベンゼンのみを有機物源として集積してきた培養系においても、依然多様な微生物群集構造をしていることがわかった。さらに、5種類の集積系に共通して存在する微生物種がきわめて多く、微生物群の構成要素が共通していた。それらの中でも特に存在量が多い*Anaerolineaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Syntrophaceae*, *Clostridiaceae*の群集における割合を示したものが図1である。上記5科の微生物群で、全体の43-60%を占めていた。

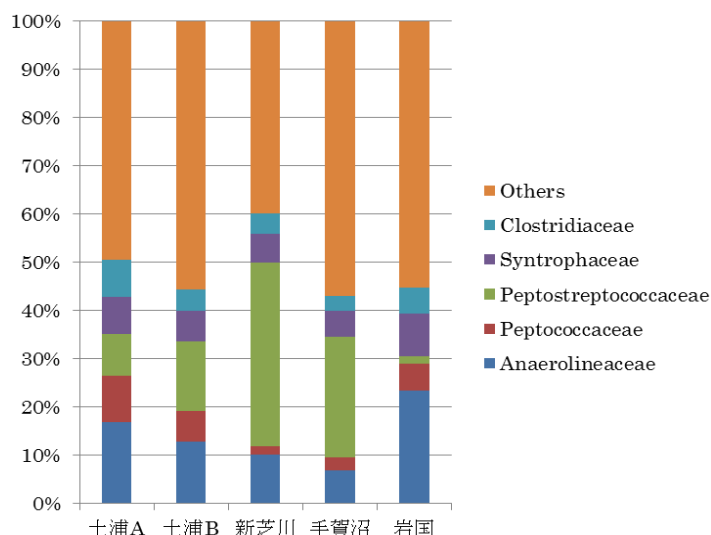


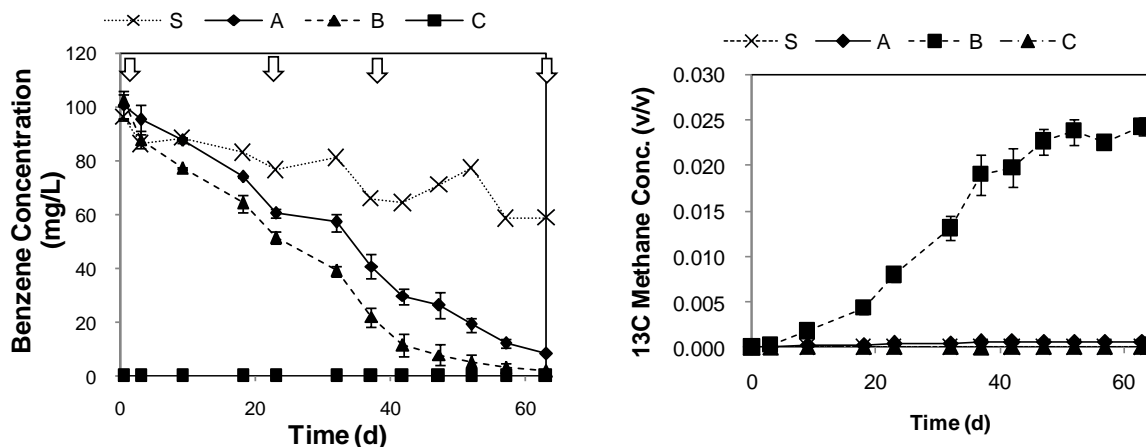
図1 各集積系の微生物群集構造

2) 安定同位体プローブ法を用いた微生物解析

a) 新芝川集積系

添加したベンゼンのうち、 $[^{12}C]$ -ベンゼン添加系では91.4%、 $[^{13}C]$ -ベンゼン添加系では97.6%が63日の培養で分解された(図2a)。培養系中のメタン濃度はベンゼン分解とともに増加し、メタン生成条件でベンゼン分解が起

こっていることが確認できた。 $[^{13}\text{C}]$ -ベンゼン添加による $[^{13}\text{C}]$ -メタンの発生も確認された(図2b)。



a) バイアル液相中のベンゼン濃度

b) バイアル気相中の $[^{13}\text{C}]$ -メタン濃度

図2. 安定同位体標識ベンゼンを投与した際のベンゼン分解とメタン生成。S: 滅菌系; A: $[^{12}\text{C}]$ -ベンゼン添加系; B: $[^{13}\text{C}]$ -ベンゼン添加系; C: ベンゼン無添加系。白抜き矢印は安定同位体プローブ法に用いるサンプルを採取した時を示す。

培養64日目のDNAを浮遊密度により分離し、各画分を用いてT-RFLP解析を行った。浮遊密度の低い画分では ^{12}C -系列と ^{13}C -系列でT-RFプロファイルは類似しており、89 bp、137 bp、175 bp、228 bp、369 bpなどのT-RFが上位の存在率を示した。一方、 1.732 g/cm^3 などの浮遊密度の高い画分においては明確な違いが見られた。そこで、 1.732 g/cm^3 の ^{13}C -系列中の画分において存在量が上位10位までの各T-RFの各画分中での強度を ^{12}C -系列と ^{13}C -系列で比較した。10画分のうち89、280 bpのT-RFの重画分へのシフトが見られ、 ^{13}C の取り込みが示された(図3)。このことより、新芝川系では89 bpと280 bpのT-RFを持つ菌がベンゼン分解に関与していることが示された。

89 bpのフラグメントの16S rRNAをクローニングとシーケンシングにより解析したところ、嫌氣的に安息香酸を分解する*Syntrophus gentianae*と最近縁ではあるものの相同性は88%と低く、Hasda-Aとの相同性が99%以上と極めて近縁であった。系統学的には、*Desulfobacteriales*目細菌と分類された。異なる環境から集積した系においてもHasda-A類縁の微生物が分解反応の一部を担っている可能性が示された。一方、280 bpのフラグメントに相当する菌の16S rDNA配列を解析した結果、*Coriobacteriaceae*科の菌*Olsenella uli*に最近縁であった。*Coriobacteriaceae*近縁種はメタン生成条件におけるベンゼン分解微生物としての報告はこれまでになく、280

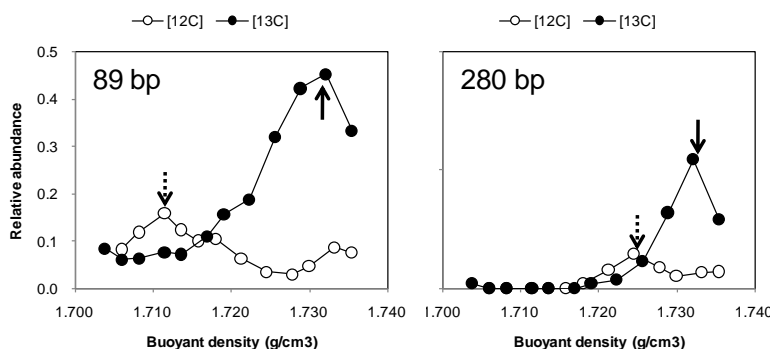


図3 各浮遊密度における89, 280 bpのフラグメントの存在割合 (矢印は存在割合が最も高い浮遊密度)

bpに相当する菌は新規のベンゼン分解関与菌である可能性が示された。さらに、 ^{12}C ベンゼン、 ^{13}C ベンゼン投与の両試料における重画分について、次世代シーケンサによる解析を行った。この解析においても、 ^{13}C ベンゼン投与の試料においては*Syntrophus* 属類縁のシーケンスが多く得られ、T-RFLPとクローニングを組み合わせた結果を裏付けるものであった。

b) 手賀沼集積系、土浦集積系

手賀沼集積系の各T-RFの相対強度を比較すると、 $1.704 \sim 1.729 \text{ g/cm}^3$ では ^{12}C -系列と ^{13}C -系列でT-RFプロファイルは類似していた。一方、 1.732 g/cm^3 の画分において ^{12}C -系と比較して ^{13}C -系列中で89 bpの存在率が大き

くなっていた。また土浦集積系のT-RFの相対強度を比較すると、 ^{12}C -系列では1.726~1.735 g/cm^3 の範囲では360 bpが優占していたが、 ^{13}C -系列では89 bp、373 bpが360 bpよりも多く存在していた。さらに、 ^{13}C -系列の重画分(1.734, 1.738 g/cm^3)において ^{12}C -系と比較して278 bpの存在率が大きくなっていた。

c)まとめ

新芝川、土浦、手賀沼すべての培養系において、89 bp と280 bpをもつ T-RFが ^{13}C 標識ベンゼン由来の ^{13}C を取り込んだことがわかった。これらの微生物は、*Syntrophus gentianae*を最近縁種とする*Desulfobacteriales*目細菌Hasda-Aと、*Coriobacteriaceae*科の細菌であることが明らかとなった。このように、全く由来の異なる3種類の土壌から集積された微生物系において、同一の微生物がベンゼン分解微生物の最有力候補として検出されたことから、これらの微生物の嫌気ベンゼン分解における役割はかなり普遍的で、極めて重要であることが明らかとなった。嫌気ベンゼン分解においては、これらの微生物を今後モニタリングしたり、解析対象としていけばよいことがわかった。

(2)ベンゼン分解条件の検討

1)硫酸塩添加試験

硫酸塩添加条件におけるベンゼンの濃度変化、及び硫酸塩濃度の変化を図4に示す。ベンゼンの濃度減少に硫酸塩添加が影響しているとは結論付けられない。したがっていずれのケースにおいても、硫酸塩無添加の条件に比べ、ベンゼン濃度の変化に大きな違いは見られず、硫酸塩がベンゼン分解を促進も阻害もしない、という結果となった。硫酸塩濃度の推移をみると、硫酸塩を添加したいずれの場合においてもほぼ一定で硫酸塩濃度の減少が見られていた。

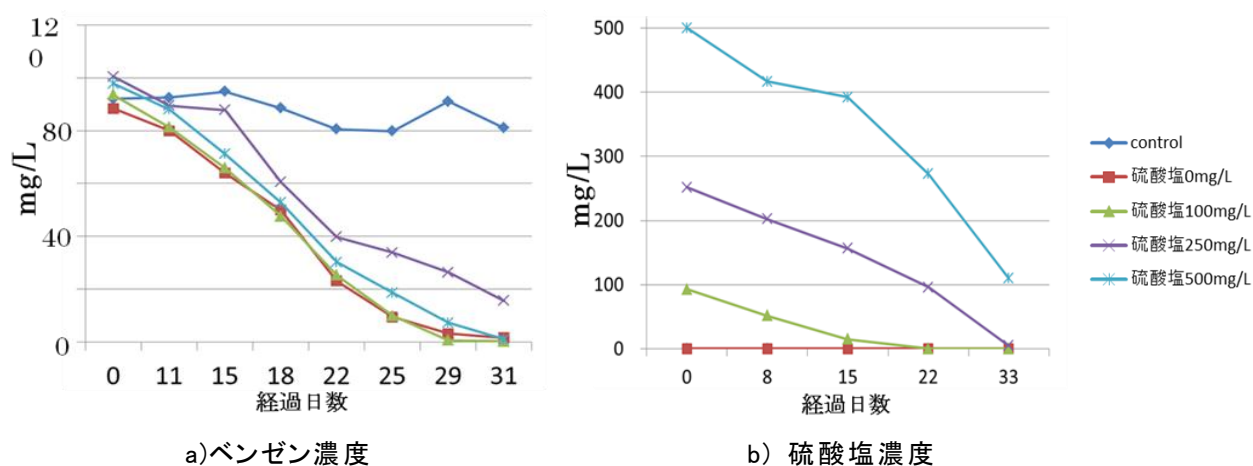


図4. 硫酸塩添加試験におけるa)ベンゼン、b)硫酸塩の濃度変化

メタン生成条件と硫酸還元条件におけるベンゼンの分解の化学量論と生成したメタンと二酸化炭素量より、各実験条件におけるベンゼン分解が、メタン生成もしくは硫酸塩還元のいずれによるものかを推定した。初期硫酸塩濃度250, 500mg/Lの場合には硫酸塩還元の寄与が示された。よって、メタン生成条件で集積したベンゼン分解集積培養系においても、硫酸塩を投与することで硫酸塩還元によるベンゼン分解が起こりうることを示された。

2)有機酸の添加効果

ベンゼン分解培養系に有機物、特にベンゼン分解経路に関わるような有機酸を添加し、ベンゼン分解活性への影響を観察することで、ベンゼン分解微生物の活性化、安定的な培養条件の検討を行った。有機酸として、ベンゼンの代謝経路に存在すると考えられる安息香酸に加え、クロトン酸、フマル酸を用いた。

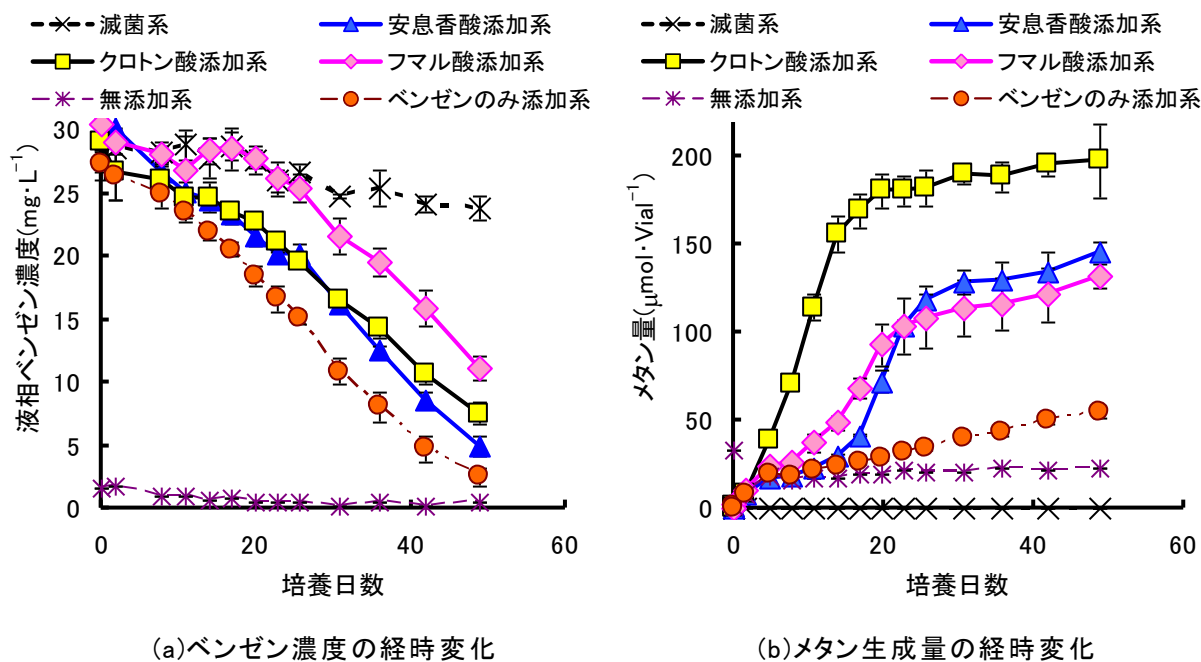


図5 ベンゼン濃度とメタン生成の経時変化

図5(a)から有機酸を添加していない系で最もベンゼン分解が進んでいた。この結果より、次のことが推察される。まず、投与した有機酸およびその代謝産物(酢酸などが考えられる)が存在することで、ベンゼン分解の開始が遅れる。有機酸等が分解された後、ベンゼン分解が開始する。安息香酸とクロトン酸、酢酸はベンゼンが経由すると考えられる Benzoyl-CoA の代謝産物であるため、これらが多量に存在することで、ベンゼン分解で得られる自由エネルギーが減少しベンゼン分解を阻害していたと考えられる。ベンゼン分解がはじまると、ベンゼン分解速度自体には大きな違いはない。このことから、本培養系で与えた有機酸を分解しているのはベンゼン分解菌ではない可能性が高い。これらの有機酸が、ベンゼン分解菌を直接増加させる基質としては働かない、もしくは、ベンゼン分解菌による摂取速度が遅い物質であると考えられる。

3) 汚染地下水を用いた検討

試験開始後50日後以降も、アクリンBC無添加系と滅菌系は引き続き全く差がなかったのに対し、アクリンBC添加系のベンゼン濃度は無添加系、滅菌系と比べてより大きく減少し始めた(図6)。その差は有意水準5%で統計的に有意であった。このことから、これらの地点の地下水において、アクリンBCを添加することでベンゼンの微生物分解が起こりうることを示された。一方で、アクリンBCを添加しない場合には微生物分解は確認されなかった。

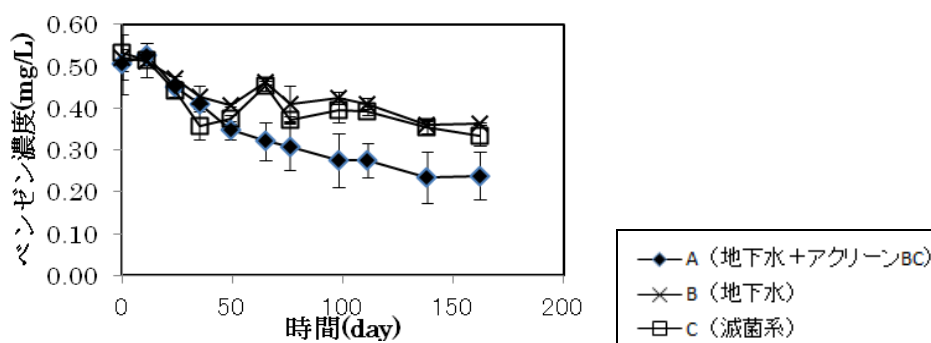


図6 各地点地下水におけるベンゼン濃度の変化(d-1地点)

(3) バイオオーグメンテーションによる汚染地下水浄化試験

1) 集積培養系混合比の検討

ベンゼン濃度は、混合比1:1の滅菌系を除く全ての系、混合比5:1の無添加系で明らかに減少しており、これらの系で微生物によるベンゼン分解が起きた。それ以外の系では実験開始から100日間経過後もベンゼン分解はみられなかった。ベンゼン分解が開始されるまでに要した時間は、1:1混合系で約5日、無添加系で7日、L-システ

イン添加系で16日であり、5:1混合系の無添加系で18日であった。ベンゼン分解が進行した系についてベンゼン濃度が十分減少した後に再度ベンゼンを添加したところ、ラグタイムなしで分解されることが確認された。

2) 有機電子受容体添加試験

T2地点の地下水を用いた実験結果を図7に示す。試験した地下水全てにおいて、5:1、10:1混合系の無添加系のみでベンゼン濃度は滅菌系と比較して明確に減少しており、微生物による嫌氣的ベンゼン分解が進行したことが確認された。クエン酸、グリシン、フマル酸のそれぞれを添加した系では、いずれの有機物を添加した場合においてもベンゼン分解に対する阻害効果が見られた。

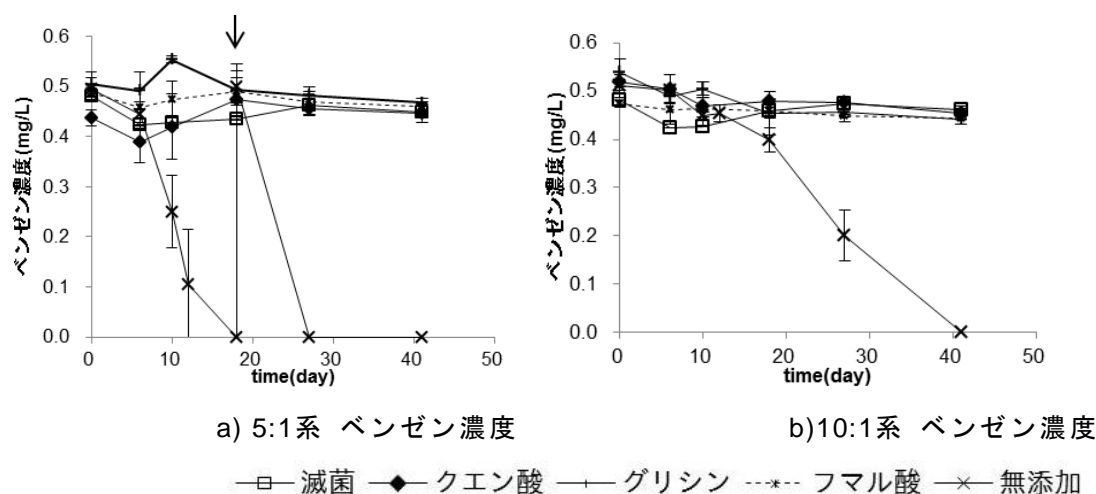


図7 T2地点集積培養系添加試験におけるベンゼン・メタン濃度の変化
(矢印はベンゼンの再添加を示す)

(4) ベンゼン分解を起こすための条件についての考察

表1に、有機物を添加した場合のベンゼン分解への影響と、メタン生成の関係についてまとめた。有機酸の添加効果はベンゼン分解に対して促進的に働く場合と、阻害的に働く場合両方があり、本研究で得られた結果のみでは有機酸の添加自体がベンゼン分解に与える影響は確定的ではない。しかし、ベンゼン分解に阻害的に働く場合には、有機酸を添加しない場合に比べてメタン生成量が増大する(=メタン生成が亢進する)結果が、逆にベンゼン分解に促進的に働く場合にはメタン生成が抑制される結果が得られている。この結果より、ベンゼン分解とメタン生成とに密接な関係があることが示唆された。

表1 有機物添加によるベンゼン分解への影響とメタン生成の関係

実験系 (汚染地下水採水年/月)	実験系名称	添加有機酸	ベンゼン分解	メタン生成
			促進 (+) / 阻害 (-)	亢進 (+) / 抑制 (-)
集積系		酢酸	-	+
集積系		クロトン酸	-	+
集積系		フマル酸	-	+
集積系		安息香酸	-	+
集積系 + 汚染地下水 (11/10)	5:1混合系	クエン酸	+	-
集積系 + 汚染地下水 (11/10)	5:1混合系	L-システイン	-	+
集積系 + 汚染地下水 (11/10)	10:1混合系	クエン酸	+	-
集積系 + 汚染地下水 (12/5)	5:1混合系	クエン酸	-	+
集積系 + 汚染地下水 (12/5)	10:1混合系	クエン酸	-	+

ベンゼンの安息香酸以降の分解では、分解過程で酢酸及び水素を生成する。反応における自由エネルギー変化の関係より、これらの生成物はなるべく除去されることが望ましい。クエン酸を有機物の1例にとると、クエン酸の嫌氣的分解では、2通りの分解経路がある。一方はフマル酸等の中間代謝産物(ここでは酸化型の中間代

謝産物と呼ぶ)が酸化還元反応により有機電子受容体として働き得る経路である。他方はピルビン酸から直接酢酸を生成する反応経路であり、酢酸は最終的にメタンへと分解される。この反応経路では酸化還元反応を伴わず、電子の授受は行われぬ。ここで、クエン酸分解が酸化還元反応を伴う場合、クエン酸からはプロピオン酸が生成する。プロピオン酸は嫌気条件では分解されにくく、メタン生成は起こりにくい。この反応の途中で生成する酸化型中間代謝産物はベンゼン分解反応によって生成する還元力の消費(=電子の受容)にも使われ、ベンゼン分解を担う微生物とクエン酸分解を担う微生物が共生関係を作り、ベンゼン分解を進行させることもあり得ると考えられる(図8)。この還元力の消費により、ベンゼン分解は促進される。よって、メタン生成が抑制された条件でベンゼン分解が促進する可能性がある。

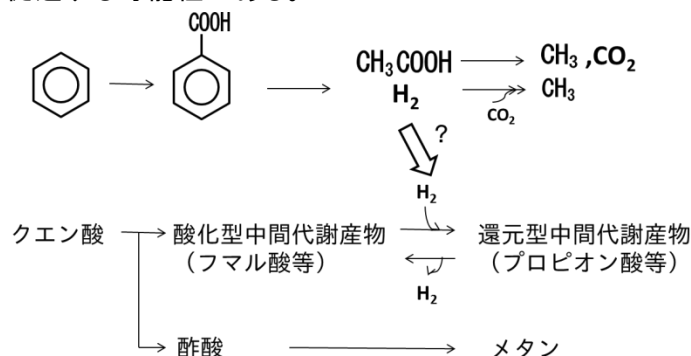


図8 推定される嫌氣的ベンゼン分解とクエン酸分解の関係の概念図

一方で、クエン酸から直接酢酸を生成する経路で分解が進行した際には、酸化還元反応は起こらないため、ベンゼン分解は促進されない。それだけでなく、酢酸からのメタン生成が何らかの理由で滞り、酢酸の蓄積が起こるような場合は、ベンゼンの分解産物の蓄積によるベンゼン分解の阻害が考えられる。Rakoczy et al. (2011) が示すように、酢酸や水素の蓄積が嫌氣的ベンゼン分解を阻害する。

このように、メタン生成が抑制された条件にできれば、ベンゼン分解を促進させることができる可能性がある。有機酸分解経路をメタン生成が抑制されるように制御することで、ベンゼン分解促進手法としての活用が期待される。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究では、以下の3つの結論が得られた。

- 1) ベンゼン分解微生物群集の群集構造には共通点が多く、いずれも *Syntrophus* 属類縁の *Desulfobacteriales* 目細菌 Hasda-A が主なベンゼン分解微生物として推定された。
- 2) ベンゼン分解微生物集積培養系を用いて、汚染地下水のバイオオーグメンテーションが可能であることが示された。
- 3) 嫌気ベンゼン分解の促進因子として、有機電子受容体が有効となる場合があり、なおかつメタン生成が抑制的である時に有効となる可能性が示唆された。

1) については、メタン生成条件でベンゼンを分解できる微生物群集は多様であるものの、その構造には共通点がきわめて大きく、*Anaerolineaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Syntrophaceae*, *Clostridiaceae* などを中心とした微生物群集構造となっていることが明らかとなった。また、ベンゼン分解微生物としては、これまでに我々が報告しているベンゼン分解微生物 Hasda-A が、全く異なる3地点由来の集積培養系においてもベンゼン分解微生物として推定された。このことより、Hasda-A のベンゼン分解微生物としての普遍性が示された。加えて、*Coriobacteriaceae* 近縁種も標識ベンゼン由来の炭素を同化していたことから、あらたなベンゼン分解微生物である可能性も示された。メタン生成条件におけるベンゼン分解微生物については、我々の知る限り現在までに明確な特定がなされていない。よって本研究により得られた成果は、世界的にみても新規性の高い成果である。

2) については、汚染地下水に対して約10%の集積培養系を加えることで、ベンゼン分解を起こすことが可能であることがわかった。今後、この割合を下げる如果能够できれば、実際にバイオオーグメンテーション法として汚染地下水の浄化手法として開発できる可能性がある。

3) については、塩素化エチレン類の脱塩素に用いられる有機物資材を汚染地下水に添加し嫌氣的に培養したところ、ベンゼンの嫌気分解が観察された。このことより、易分解性有機物の添加によりベンゼン汚染地下水の分解が起こりうることを示された。さらに、さまざまな条件で行った有機物の添加試験の結果を総合することで、

嫌気ベンゼン分解の促進因子として、有機電子受容体が有効となる場合があり、なおかつメタン生成が抑制的である時に有効となる可能性が示唆された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

ベンゼン汚染土壌・地下水の浄化手法として、既往の好氣的生物学的浄化（バイオレメディエーション）手法のみならず、嫌氣的バイオレメディエーション手法も今後開発対象として考慮すべきであることが示された。汚染土壌・地下水の浄化が進まないのは、浄化にかかるコストが高いことが原因の1つである。より低コスト、低エネルギー型の汚染土壌・地下水浄化技術として、嫌氣的バイオレメディエーションの開発を推進し、実用化していくことで、汚染土壌・地下水の浄化を促進し、安全な国土の保全と創出に寄与できると考えられる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) 舛本弘毅、栗栖太、春日郁朗、古米弘明（2012）メタン生成嫌気ベンゼン分解集積培養系に及ぼす有機酸と温度の影響。水環境学会誌, 197-204.

<査読付論文に準ずる成果発表>（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可）

特に記載すべき事項はない。

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 高橋惇太、栗栖太、古米弘明：第48回環境工学研究フォーラム(2011)「集積培養系によるメタン生成ベンゼン分解及びトリクロロエチレン脱塩素化の同時進行」
- 2) 野口愛、栗栖太、春日郁朗、古米弘明：第46回日本水環境学会(2011)「河川底泥由来メタン生成集積系におけるベンゼン分解微生物の安定同位体プローブ法による検出」
- 3) Noguchi, M., Kurisu, F., Kasuga, I. and Furumai, H. (2012) The Community Analysis of a Methanogenic Benzene-Degrading Enrichment Culture Using Stable Isotope Probing and Pyrosequencing, Water and Environment Technology Conference 2012, 18.
- 4) Noguchi, M., Kurisu, F., Kasuga, I. and Furumai, H. (2012) The Detection of Benzene-Assimilating Bacteria in Methanogenic Enrichment Culture Originated from River Sediment Using Stable Isotope Probing, International Symposium on Microbial Ecology (ISME-14), Copenhagen, Denmark.
- 5) 高橋惇太、栗栖太、永井宏征、岸正博、春日郁朗、古米弘明（2013）実汚染地下水における嫌氣的ベンゼン分解に対するメタン生成ベンゼン分解集積培養系の添加効果，第47回日本水環境学会年会講演集, 83.
- 6) 舛本弘毅、栗栖太、春日郁朗、古米弘明（2013）メタン生成嫌気ベンゼン集積培養系に及ぼす有機酸添加の影響，第47回日本水環境学会年会講演集, 85.

7. 研究者略歴

課題代表者：栗栖太

東京大学工学部卒業、博士(工学)、現在東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター准教授

研究参画者

- (1): 栗栖太（同上）
- (2): 春日郁朗

東京大学工学部卒業、博士(工学)、現在東京大学大学院工学系研究科都市工学専攻講師

RFb-1101 **ベンゼン汚染土壌・地下水の嫌氣的生物浄化技術の開発****(1) ベンゼン汚染土壌・地下水の嫌氣的生物浄化技術の開発**

東京大学大学院工学系研究科

栗栖 太・春日 郁朗

平成23～24年度累計予算額：20,286千円

(うち、平成24年度予算額：9,016千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

ベンゼンによる低濃度広範囲の地下水・土壌浄化には、揚水曝気法などの物理的処理のみでなく微生物を用いたバイオレメディエーションが有効である。好氣的な浄化手法は実用化されているものの、低コスト・低エネルギーでの浄化が可能な嫌氣的な条件下では、ベンゼンは分解が進みにくく、浄化技術の開発は進んでいない。本研究では、ベンゼン汚染土壌・地下水の低コスト低負荷型浄化技術として、嫌氣的バイオレメディエーション技術を開発することをめざし、ベンゼンを分解する技術の開発を行った。なかでも、ベンゼン分解を制御するための因子を見出すことを中心に行った。本研究の結果、ベンゼン分解微生物群集の群集構造には共通点が多く、いずれも*Syntrophus*属類縁で*Desulfobacterales*目細菌Hasda-A、および*Coriobacteriaceae*科の微生物が主なベンゼン分解微生物として推定された。次に、ベンゼン分解微生物集積培養系を用いて、汚染地下水のバイオオーグメンテーションが可能かどうかを確かめ、汚染地下水に対して約1/10量以上のベンゼン分解集積培養系を加えることで、汚染地下水のベンゼンを分解することが可能であることを示した。さらに、嫌氣ベンゼン分解の促進因子を探索し、バイオスティミュレーションによる浄化手法を検討したところ、嫌氣ベンゼン分解の促進因子として、有機電子受容体が有効となる場合があり、なおかつメタン生成が抑制的である時に有効となる可能性が示唆された。本研究により、ベンゼン汚染土壌において硝酸塩還元条件以外の嫌氣的条件下でベンゼン分解を起こす方法についての知見が得られた。硝酸塩を用いないベンゼン汚染浄化方法として、より安心、安全な技術の開発が可能であることを示すことができた。

[キーワード]

ベンゼン、バイオレメディエーション、土壌汚染、地下水汚染、嫌氣

1. はじめに

ベンゼンによる地下水・土壌汚染は日本、そして世界において深刻である。現状でベンゼンの汚染は、揚水曝気法などの物理的処理を中心に行なわれている。しかしながら、ベンゼンの環境基準は地下水で0.01mg/Lと非常に厳しく、物理的な処理法では、環境基準の濃度まで低減させる

ことは大変難しい。こうした低濃度広範囲の汚染には一般に、微生物を用いたバイオレメディエーションが有効である。

ベンゼンは、好気的な環境下では生物分解が比較的容易に進むため、好気的な浄化手法は実用化されている。反面嫌気的な条件下では、ベンゼンは一般に安定であって分解が進みにくいことが知られており、浄化技術の開発は進んでいない。嫌気的な条件下で分解が可能となれば、地中への酸素供給が必要となる好気的な処理に比べ、低コスト・低エネルギーでの浄化が可能となる。また汚染現場は嫌気的環境である場合が多い。嫌気条件でのベンゼン分解機構が明らかになれば、現場における分解を予測することができ、自然減衰を利用した浄化対策を立てることも出来る。

嫌気条件のなかでも、比較的酸化還元電位の高い硝酸塩還元条件においては純粋分離株の報告もあり、比較的研究が進んでいる。しかしながら硝酸塩還元では環境基準のある硝酸塩を地中に加えることになるため、その制御が難しい。より還元的な条件でのベンゼン分解の研究も必要となっている。鉄還元条件では近年になり純粋分離株の報告がなされたが、硫酸還元条件、およびメタン生成条件では純粋分離株もない。メタン生成条件や硫酸塩還元条件でも、ベンゼン分解の現象は確認されてきているものの、ベンゼン分解を起こす集積培養系であっても研究例が極めて乏しく、ベンゼン分解を起こさせるための因子についてはほとんどわかっていない。

これまでに研究代表者らは、茨城県土浦市の蓮田土壌より、メタン生成条件下でベンゼンを分解する集積培養系を確立することに成功している。集積培養系の微生物群集を解析し、ベンゼン分解微生物として*Desulfobacterales*目細菌 *Hasda-A*を推定している。さらに国内4か所の土壌からベンゼン分解集積培養系を獲得してきている。

2. 研究開発目的

本研究では、ベンゼン汚染土壌・地下水の低コスト低負荷型浄化技術として、嫌気的バイオレメディエーション技術を開発することをめざし、硫酸塩や有機物を地中に導入することによりベンゼンを分解する技術を開発しようとするものである。これまでに研究代表者が開発した嫌気ベンゼン分解微生物集積培養系と、ベンゼン分解細菌の情報を活用し、ベンゼン分解の制御因子を詳細に調べる。さらに嫌気ベンゼン分解微生物の集積高度化をめざし、その過程においても、ベンゼン分解微生物の制御方法についての情報を得る。より具体的な目的として、以下の3つを掲げる：

メタン生成ベンゼン分解微生物として、モニタリングすべき微生物を特定する

嫌気ベンゼン分解の促進因子を探索し、バイオスティミュレーションによる浄化手法を検討する

ベンゼン分解微生物集積培養系を用いて、汚染地下水のバイオオーグメンテーションが可能かどうかを確かめる

本研究によりベンゼン汚染土壌において、硝酸塩還元条件以外の嫌氣的条件下でベンゼン分解を起こす方法を見出すことができれば、ベンゼン汚染土壌の嫌氣的バイオレメディエーションによる浄化の、より安心、安全な実用化技術として位置づけることができる。

3. 研究開発方法

(1) ベンゼン分解微生物の解析

1) 次世代シーケンサを用いた集積系の微生物群集解析

土浦蓮田由来（別の時期に採取したもの2種類）および新芝川底泥由来、および山口県岩国市の蓮田由来の集積系、千葉県手賀沼底泥由来のベンゼン分解集積系について、微生物群集構造解析を行った。16S rRNA遺伝子のV4領域を含む部分配列を、Univ519f-802rのプライマーセットを用いてPCR増幅を行い、次世代シーケンサRoche 454シリーズにて解析した。解析はPCR産物をマクロジェン（株）に送付し、委託解析にて実施した。

2) 安定同位体プローブ法を用いた微生物解析

嫌気条件下で3年以上にわたりベンゼンのみを炭素源として与えて培養したメタン生成ベンゼン分解集積系(種源: 埼玉県川口市新芝川底泥、茨城県土浦市蓮田土壌、千葉県手賀沼底泥)を用いた。70 mL褐色バイアルに20 mLの培養系を入れ、 $[^{12}\text{C}_6]$ -ベンゼン添加系(以下 $[^{12}\text{C}]$ 系)と $[^{13}\text{C}_6]$ -ベンゼン添加系(以下 $[^{13}\text{C}]$ 系)を各系3連用意した。また、非生物によるベンゼンの分解を考慮するため滅菌系(121°C, 20 min×3)を1連で用意した。気相を純窒素で置換後、それぞれの条件に対してベンゼンを約1.2 mM添加し、25°Cで静置培養を行った。

サンプル採取日(培養初日, 1/3分解後, 2/3分解後, ほぼ完全分解後の4点)に各バイアルから1.5 mLずつディスポーザルシリンジによりサンプルを採取し、土壌用DNA抽出キット(ISOIL for Beads Beading (NIPPON GENE))を用い、DNAを抽出した。同一系のDNAサンプルは3連を1本に統合した。

抽出したDNAのうち500 ngを密度勾配遠心分離緩衝液およびCsCl溶液と混合し5 mLにし、CsCl密度勾配超遠心分離(45,000 rpm, 72 hrs)により浮遊密度ごとに分離した。新芝川系では1.700~1.764 g/cm³の範囲で22画分ずつ、手賀沼系では1.696~1.761 g/cm³の範囲で23画分ずつ、土浦A系では1.702~1.761 g/cm³範囲で21と23画分を回収した。密度ごとに22画分(200~250 μL)を回収した。分画したDNAは浮遊密度画分ごとにPCR増幅(27f-FAM: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, 907r: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT)をし、各画分のPCR産物量を150 ngに調整後*Hha* Iで酵素消化した。ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)によりT-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism)解析を行った。解析には20~600 bpのフラグメントを用いた。サンプル中でピークとして検出されたもののうち分析用のブランク(サイズスタンダードのみを同じランで測定したものでピークとして検出された面積を下回るものは解析対象から除外した。さらに、検出された画分が ^{12}C -あるいは ^{13}C -系列で1しかないT-RF(Terminal restriction fragment)は ^{12}C -系列と ^{13}C -系列での増減が評価できないため解析対象から除外した。

また、重画分のクローニングを行い、T-RFLP解析において $[^{13}\text{C}]$ 系の重画分のみによく存在するクローンについて、塩基配列を決定した。さらに、浮遊密度画分ごとに16S rRNA遺伝子配列のV4領域をターゲットとしたプライマーでPCR増幅をおこなったのち、次世代シーケンサーによる遺伝子配列ライブラリを構築した。PCR産物をマクロジェン（株）に送付し、委託解析にて実施した。

3) 汚染地下水のベンゼン分解微生物の定量

2011年6月9日に、図1に示す岩手・青森県境産業廃棄物不法投棄現場N地区の3地点の井戸(c-6、d-1、e-2)から採水を行った。地点の選定にあたっては、各地点の酸化還元電位(ORP)とベンゼン濃度の経時的な測定結果を参考とし、嫌気的な雰囲気下でベンゼン濃度の減少が起こっているとみられる地点を選定した。地下水の採水直後に、pH、ORP、溶存酸素(DO)濃度を測定した。ベンゼン分解試験に用いる地下水は、試験開始まで還元状態を保つため、現地で還元剤としてL-システインを0.3g/Lとなるように添加した。また、水質分析用の地下水として、L-システインを添加しない地下水を別途採水した。

地下水試料100mLを0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過し、土壌DNA抽出キットISOIL for Beads Beating(ニッポンジーン製)を用いた。抽出したDNA溶液は、使用するまでの間-20°Cで保存した。Sakai et al. (2008)¹⁾によってメタン生成条件ベンゼン分解微生物として推定された菌の16S rDNA, *Syntrophobacterales* 目細菌Hasda-Aを対象とした定量PCRは、QPrimer法を用いた。

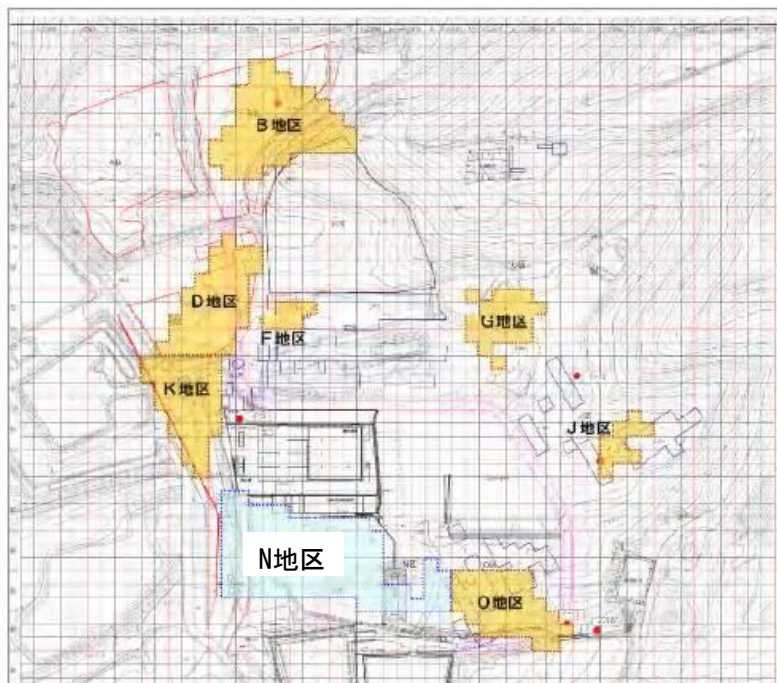


図1a 岩手側汚染現場の概要図

(青森・岩手県境不法投棄現場の原状回復対策協議会資料²⁾より一部改変)

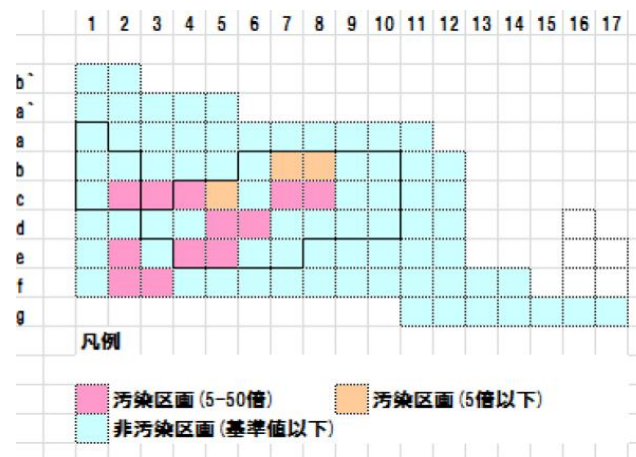


図1 b 岩手側汚染現場のうち、N地区のベンゼン濃度（2011年6月時点）と今回のサンプリ
ング地点

（青森・岩手県境不法投棄現場の原状回復対策協議会資料²⁾より一部改変）

（2）ベンゼン分解条件の検討

1) 硫酸塩・安息香酸添加試験

茨城県土浦市の蓮田土壌より集積された嫌気ベンゼン分解微生物集積培養系を用い、硫酸塩、および安息香酸添加がベンゼン分解に与える影響を検討した。硫酸塩添加試験では、硫酸塩をベンゼン集積培養系に添加することで、硫酸塩を電子受容体としたベンゼンの酸化反応が起こるかどうかを調べた。一方で、安息香酸の影響については、これまでに集積培養系に対し直接安息香酸を加えた場合ではベンゼン分解が促進も阻害もしなかった結果がある³⁾。したがって本研究では、集積培養系を希釈した場合に、安息香酸を投与することによりベンゼン分解微生物の集積が促進するかどうかを確認する試験を行った。

硫酸塩添加試験では、35 mL褐色バイアルに10 mLの培養系を入れ、気相を純窒素で置換後、硫酸塩を硫酸イオン濃度にして0,100,250,500mgSO₄/L添加した。それぞれの条件に対して[¹³C₆]-ベンゼンを100mg/L投与し、25°Cで静置培養を行った。

安息香酸添加試験では、ベンゼン集積培養系を4x10¹~4x10⁷まで10倍ずつ段階的に希釈したものを用いた。希釈には下水汚泥処理水からの嫌気的フタレート分解菌の分離にて用いられたWiddel培地を用いた。この希釈列を35 mL褐色バイアルに20 mL入れ、安息香酸を20, 200, 1000mg/Lとなるよう添加した。また比較対象として、安息香酸の代わりにベンゼンを40mg/L添加したものも用意した。気相を純窒素で置換後、25°Cで静置培養を行った。

2) 有機酸の添加効果

ベンゼン分解培養系にクロトン酸、安息香酸、フマル酸を添加し、ベンゼンの分解速度の相違を観察した。クロトン酸、フマル酸は、それぞれ0.1molを超純水に溶解し2~5M NaOHを加えpH

を7付近に調整した後、100mLとした1M水溶液を作製・使用した。安息香酸、酢酸は、それぞれのNa塩0.1molを超純水に溶解し安息香酸、酢酸を用いてpH7付近に調整し超純水を加え100mlとした。それぞれの試薬の調整は嫌気グローブボックス内にて行った。それぞれの有機酸の添加量や実験連数等は表1にまとめた。

表 1 有機酸添加効果試験の実験系設定

	連数	反応式	物質質量比	モル濃度 (mM,mmol・L ⁻¹)
滅菌系	3			0.3(Bz)
無添加系	1			
ベンゼンのみ	5			0.3(Bz)
ベンゼン+安息香酸(Ba)	3	$C_7H_7O_2^- + 3C_4H_5O_2^- + 6H_2O \rightarrow C_7H_{11}O_2^- + 6C_2H_3O_2^- + HCO_3^- + 3H^+$	Bz(Ba) : Cr = 1:3	0.3(Bz)+1.5(Ba)
ベンゼン+クロトン酸(Cr)	3			0.3(Bz)+4.5(Cr)
ベンゼン+フマル酸(Fa)	3	$C_7H_8 + C_4H_2O_4^{2-} \rightarrow C_{11}H_{10}O_4^{2-}$	1:1	0.3(Bz)+1.5(Fa)

3) 汚染地下水を用いた検討

1) にて採取した汚染地下水に対し、嫌氣的ベンゼン分解の有無、および易分解性有機物の添加効果を検討する試験を行った。易分解性有機物には様々なものが考えられるが、採取した汚染現場でクロロエチレン類の脱塩素資材として実際に添加されているバイオ浄化剤、アクリーンBC (AGCエンジニアリング製) を試みた。この理由として、汚染現場のモニタリング結果より、ベンゼンの減少傾向が見られていることなどから、本バイオ浄化剤の中の有機物成分がベンゼン分解に寄与する影響が考えられたためである。

嫌気グローブボックス内で、滅菌済み72mLバイアル瓶に各地点の地下水を40mLずつ分取した。ヘッドスペースを窒素ガスで置換し、ブチルゴム栓とアルミシールで蓋をした。分取したそれぞれの地下水に対し、アクリーンBCを0.42%となるよう添加したアクリーンBC添加系、アクリーンBCを添加しないアクリーンBC無添加系、及び地下水をオートクレーブ (121℃、15分) にて滅菌した滅菌系の3系列を作成した。これらの系に対し、ベンゼンを初期濃度0.5mg/Lとなるように添加し、ベンゼン及びメタン濃度の経時的な変化を測定した。実験は全て3連で行った。

(3) バイオオーグメンテーションによる汚染地下水浄化試験

1) 集積培養系混合比の検討

嫌気グローブボックス内にて、実汚染地下水 (岩手・青森県境産業廃棄物不法投棄現場 岩手側N地区より2011年10月に採水) とメタン生成ベンゼン分解集積培養系 (茨城県土浦市蓮田の非汚染土壌より培養) をそれぞれ体積比にて1:1、 5:1、 10:1、 50:1、 100:1となるようそれぞれ混合し、培養系を作成した。培養容積は27mLバイアル瓶 (液相10mL、気相17mL) とし、初期ベンゼン濃度を0.5mg/L、30℃にて暗所で静置培養した。

アクリンBC0.42%添加系、L-システイン添加系、無添加系、滅菌（オートクレーブにて121°C,15min）系を各混合比ごとに作成した。L-システイン添加系ではすべての系のORPが集積培養系と一致するまで（ $ORP_{SHE}:-290mV$ ）還元剤としてL-システインを添加した。

2) 有機電子受容体添加試験

嫌気グローブボックス内にて、下記の実験条件に示す実汚染地下水とメタン生成ベンゼン分解集積培養系（茨城県土浦市蓮田の非汚染土壌より培養）をそれぞれ体積比にて5:1、10:1となるようそれぞれ混合し、培養系を作成した。さらに、クエン酸3000mg/L添加系、グリシン3000mg/L添加系、フマル酸3000mg/L添加系、無添加系、滅菌（オートクレーブにて121°C,15min）系を各混合比ごとに作成した。また、それぞれについてWiddel培地添加系を3連、Widdel培地無添加系を1連で作成した。

実験に用いた汚染地下水は、T1地下水：石炭ガス製造跡地から採水（2012年8月）、T2地下水：揮発性有機塩素化合物との複合汚染サイトから採水（2012年8月）、N-d-1地下水：岩手・青森県境産業廃棄物不法投棄現場N地区d-1地点（2012年5月採水）である。培養容積は27mLバイアル瓶（液相10mL、気相17mL）とし、初期ベンゼン濃度を0.5mg/L、30°Cにて暗所で静置培養した。

(4) 化学分析

ベンゼン及びメタンは、バイアル瓶のヘッドスペースガスを100 μ Lサンプリングし、GC-FID(島津製作所GC-2010、カラム：GL science InertCap-624)を用いて測定した。ヘッドスペースガスの濃度からベンゼンのヘンリー定数を用いて液相濃度を求め、さらに総物質量を計算した。メタンは水への溶解度が無視できるため、全量が気相に存在するとして計算した。また、¹³C標識化合物から生成する¹³Cメタン及び¹³C二酸化炭素は、40 μ LのヘッドスペースガスをGC-MS（島津製QP-2010、カラムAgilent technology HP-PLOT/Q）を用いて測定した。

ORPはORP計（TOA-DKK ORP METER RM-20P）、pH、DOはpH/DO計（HORIBA pH/DO METER D-55）を用いてそれぞれ測定した。全有機炭素(TOC)、各種陰イオンは地下水を0.45 μ mのPTFEフィルター（DISMIC）でろ過した後、TOCはTOC-V CSA（島津製作所）、硫酸塩を含む各種陰イオンはイオンクロマトグラフ（Metrohm 761 Compact IC、カラム：SHODEX SI-90 4E）にてそれぞれ測定を行った。

4. 結果及び考察

(1) ベンゼン分解微生物の解析

1) 次世代シーケンサを用いた集積系の微生物群集解析

土浦蓮田土壌由来の2種類の集積培養系（土浦A, 土浦B）、新芝川底泥由来（新芝川）、岩国蓮田土壌由来（岩国）、手賀沼底泥由来（手賀沼）5種類から抽出したDNAをPCR増幅したものを等量混合し、Roche 454高速シーケンサの1/8領域で解析したところ、合計114,504リード、30,075,049塩基対の配列を得ることができた。これから、各試料を判別するためにつけたタグ配列を持たないものを除き、101,149リード、26,330,516塩基対の配列を解析することができた。

したがって、1リードあたりの平均の塩基配列長は260.314であった。それぞれの試料ごとのリード数は15,741-28,317リードであり、構造解析を行うに十分な数のリード数が得られた。

各リードごとにBLAST解析を行い、系統学的位置を解析し、整理したものをもとに、群集構造を解析した。各集積系ごとに、科レベルで微生物種をまとめ、表に示したものが表2～6である。この結果を見ると、3年以上にわたりベンゼンのみを有機物源として集積してきた培養系においても、依然多様な微生物群集構造をしていることがわかる。ほかの嫌氣的有機物分解の例にみられるように、嫌氣的ベンゼン分解においても、多様な種による共生によって行われていることが分かった。さらに、5種類の集積系に共通して存在する微生物種がきわめて多く、微生物群の構成要素が共通していることが見て取れる。それらの中でも特に存在量が多い*Anaerolineaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Syntrophaceae*, *Clostridiaceae*の群集における割合を示したものが図2である。上記5科の微生物群で、全体の43-60%を占めていた。

以上の結果より、メタン生成条件でベンゼンを分解できる微生物群集は多様であるものの、その構造には共通点がきわめて大きく、*Anaerolineaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Syntrophaceae*, *Clostridiaceae*などを中心とした微生物群集構造となっていることが明らかとなった。

表2 集積系の群集構造（土浦A）

科名	リード数	%
Anaerolineaceae	1,997	17%
Peptococcaceae	1,134	10%
Peptostreptococcaceae	1,040	9%
Syntrophaceae	919	8%
Clostridiaceae	893	8%
Spirochaetaceae	883	7%
Caldilineaceae	845	7%
Bacillaceae	628	5%
Geobacteraceae	449	4%
Syntrophobacteraceae	418	4%
Helicobacteraceae	196	2%
Syntrophorhabdaceae	182	2%
Thermaceae	164	1%
Desulfarculaceae	154	1%
Others	1,959	17%

表3 集積系の群集構造（土浦B）

科名	リード数	%
Peptostreptococcaceae	2,394	15%
Anaerolineaceae	2,091	13%
Coriobacteriaceae	1,051	6%
Peptococcaceae	1,048	6%
Syntrophaceae	1,022	6%
Spirochaetaceae	964	6%
Caldilineaceae	873	5%
Pseudomonadaceae	865	5%
Clostridiaceae	737	4%
Geobacteraceae	435	3%
Syntrophobacteraceae	419	3%
Bacillaceae	413	3%
Syntrophorhabdaceae	380	2%
Planctomycetaceae	245	1%
Others	3,500	21%

表4 集積系の群集構造 (新芝川)

科名	リード数	%
Peptostreptococcaceae	3,922	38%
Anaerolineaceae	1,038	10%
Chlorobiaceae	664	6%
Syntrophaceae	634	6%
Helicobacteraceae	545	5%
Spirochaetaceae	489	5%
Clostridiaceae	428	4%
Geobacteraceae	388	4%
Desulfarculaceae	207	2%
Caldilineaceae	203	2%
Syntrophorhabdaceae	194	2%
Peptococcaceae	185	2%
Bacillaceae	181	2%
Syntrophobacteraceae	160	2%
Others	1,080	10%

表5 集積系の群集構造 (手賀沼)

科名	リード数	%
Peptostreptococcaceae	2,029	25%
Anaerolineaceae	554	7%
Spirochaetaceae	532	7%
Syntrophaceae	450	6%
Geobacteraceae	405	5%
Veillonellaceae	350	4%
Gemmatimonadaceae	307	4%
Nitrosomonadaceae	306	4%
Clostridiaceae	255	3%
Peptococcaceae	231	3%
Planctomycetaceae	190	2%
Caldilineaceae	163	2%
Bacillaceae	161	2%
Desulfarculaceae	156	2%
Others	2,074	25%

表6 集積系の群集構造 (岩国)

科名	リード数	%
Anaerolineaceae	2,242	23%
Syntrophaceae	849	9%
Caldilineaceae	723	8%
Peptococcaceae	534	6%
Pseudomonadaceae	525	5%
Clostridiaceae	515	5%
Spirochaetaceae	465	5%
Bacillaceae	360	4%
Syntrophorhabdaceae	357	4%
Geobacteraceae	350	4%
Syntrophobacteraceae	232	2%
Planctomycetaceae	196	2%
Desulfarculaceae	186	2%
Methanobacteriaceae	158	2%
Others	1,860	19%

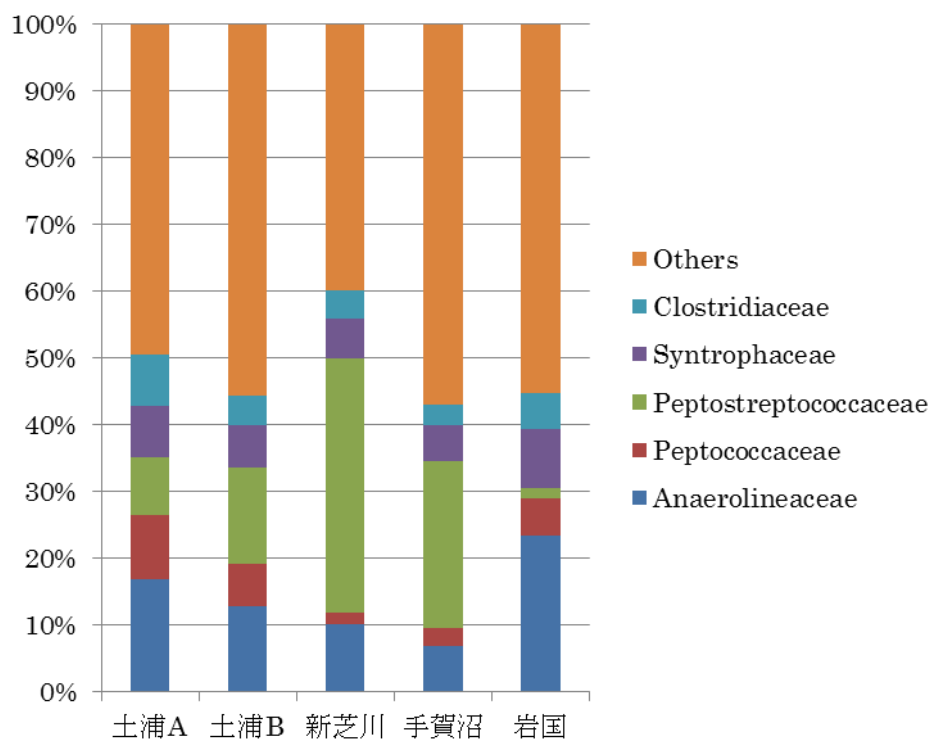


図2 各集積系の微生物群集構造

2) 安定同位体プローブ法を用いた微生物解析

①各集積系のベンゼン分解とメタン生成

a) 新芝川集積系

2011年5月30日に試験を開始し、同年8月2日に試験が終了した(64日)。添加したベンゼンのうち、 ^{12}C -系列では91.4%、 ^{13}C -系列では97.6%が分解された(図3 a)。図3 b)に気相中の ^{13}C -メタン濃度を示す。分解されたベンゼンはほぼ1:1の割合でメタンと二酸化炭素に分解された。

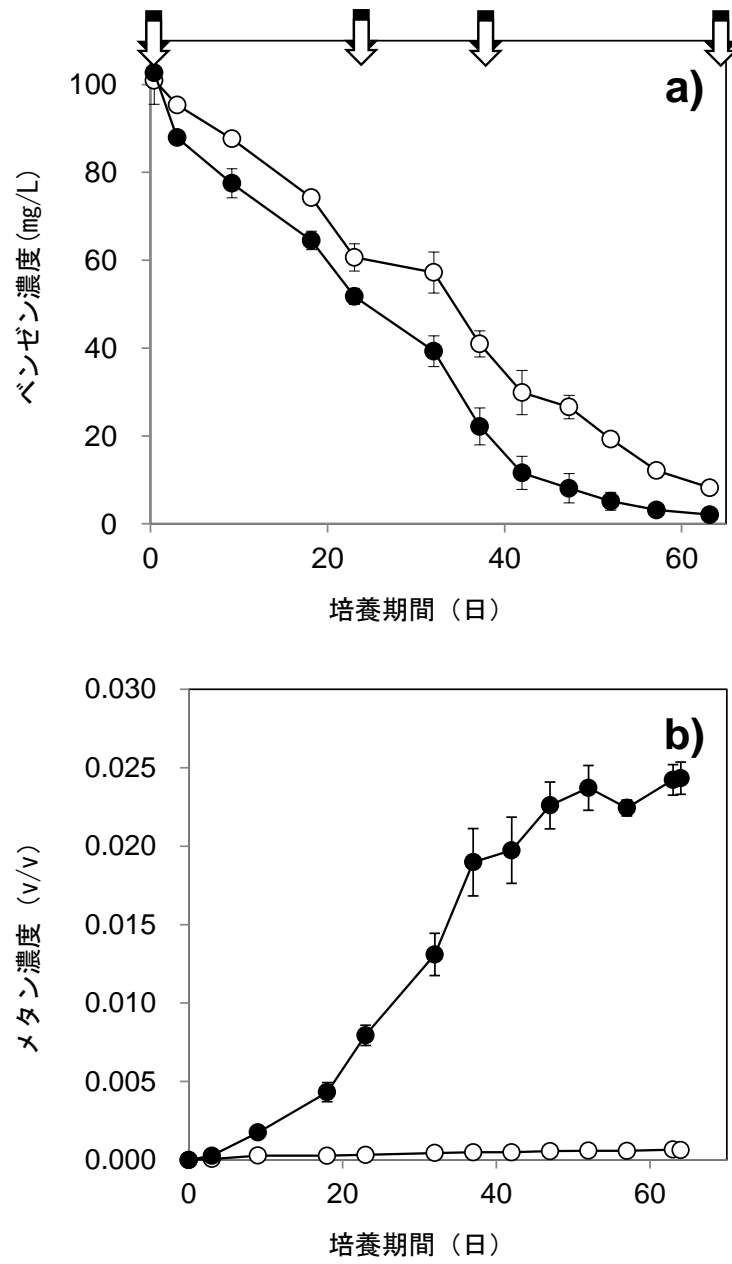


図3 新芝川集積系における培養期間中のa) ベンゼン濃度とb) ^{13}C -メタン濃度。●: ^{13}C -系列, ○: ^{12}C -系列。エラーバーは3連の系における標準誤差。

b) 手賀沼集積系

2011年8月26日に試験を開始し、同年9月18日に試験が終了した(24日)。添加したベンゼンのうち、 ^{12}C -系列では18日目で92.5%、 ^{13}C -系列では95.8%が分解された(図4a)。図4b)に気相中の ^{13}C -メタン濃度を示す。

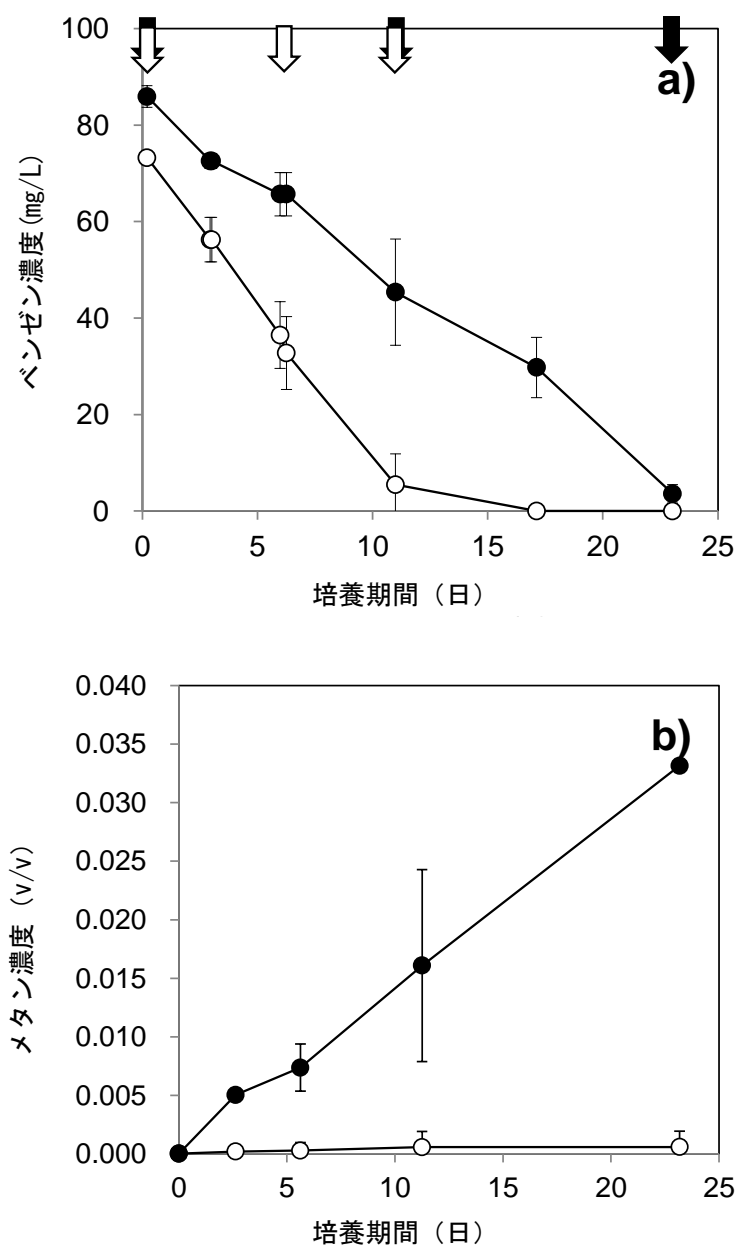


図4 手賀沼集積系の培養試験中におけるa) ベンゼン濃度とb) ^{13}C -メタン濃度。●: ^{13}C -系列, ○: ^{12}C -系列。エラーバーは3連の系における標準誤差。

c) 土浦 A 集積系

ベンゼンは53日目まではほぼ一定の速度で分解(^{12}C -系、 ^{13}C -系ともに 1.2 mg/L/d)で分解されており、 ^{13}C -メタンの生成も確認されている(図5)。しかし、53日目で分解速度が低下し、132日目で添加したベンゼンの分解がほぼ完了した(^{12}C -系で 0.3 mg/L/d 、 ^{13}C -系で 0.4 mg/L/d)。ベンゼンの分解量とメタンの発生量は新芝川系と同オーダーである。

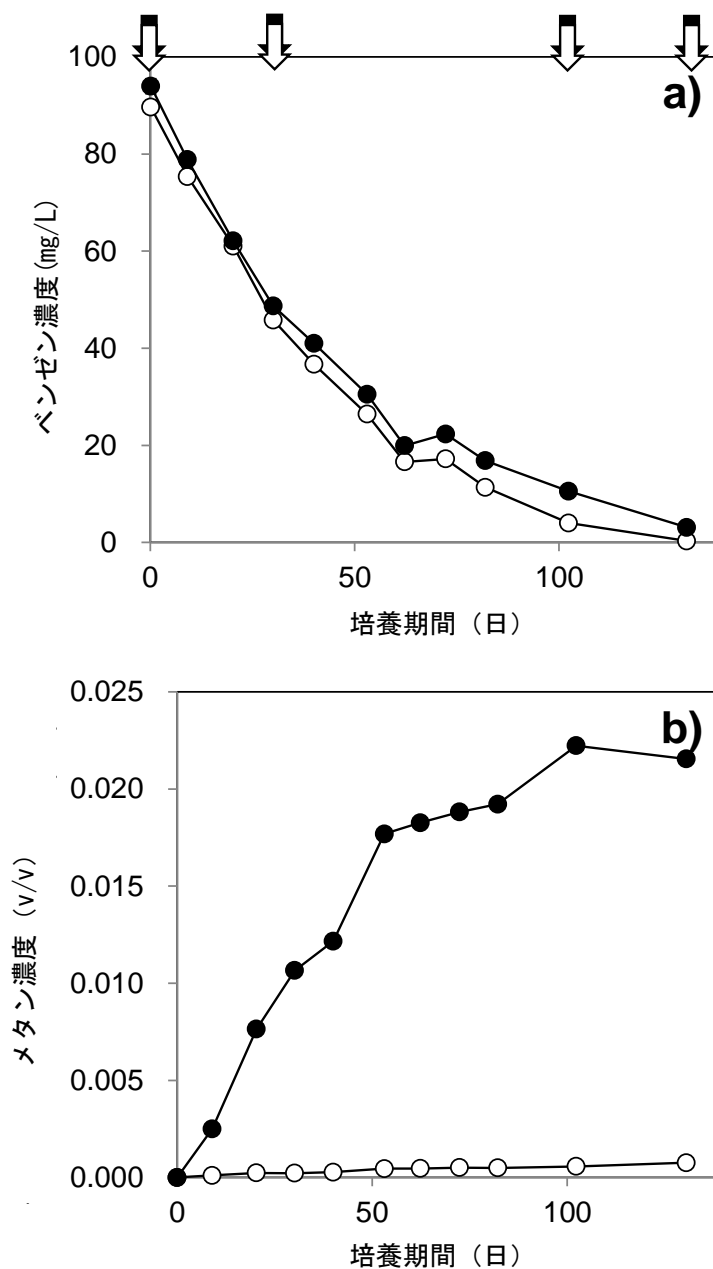


図5 土浦A集積系の培養試験中におけるa) ベンゼン濃度とb) ^{13}C -メタン濃度。●: ^{13}C -系列, ○: ^{12}C -系列。エラーバーは3連の系における標準誤差。

②ベンゼン分解菌の検出

各画分のT-RFプロファイル比較を行い、また、プロファイルの比較ではDNA量の少ない菌の検出が難しいため、解析対象とした各T-RFの各画分中での強度を ^{12}C -系列と ^{13}C -系列で比較した。

a) 新芝川集積系

培養64日目のDNAを浮遊密度により分離し、PEGによるDNA析出・精製後 $1.704\sim 1.735\text{ g/cm}^3$ の範囲でT-RFLPによる解析を行った。各画分のT-RFをプロファイルを図6に示した。1.714 g/cm^3 などの軽画分では ^{12}C -系列と ^{13}C -系列でT-RFプロファイルは類似しており、89 bp, 137 bp, 175 bp, 228 bp, 369 bpなどのT-RFが上位の存在率を示した。一方、1.732 g/cm^3 などの重画分において89 bp, 280 bpが ^{13}C -系列でのみ優占した。

また、T-RFプロファイルにおいて ^{12}C -系列と ^{13}C -系列の間で差が大きかった1.732 g/cm^3 の ^{13}C -系列中の画分において存在量が上位10だった各T-RFの各画分中での強度を ^{12}C -系列と ^{13}C -系列で比較した。10画分のうち89, 280 bpのT-RFの重画分へのシフトが見られ、 ^{13}C の取り込みが示された(図7)。このことより、新芝川系では89 bpと280 bpのT-RFを持つ菌がベンゼン分解に関与していることが示された。

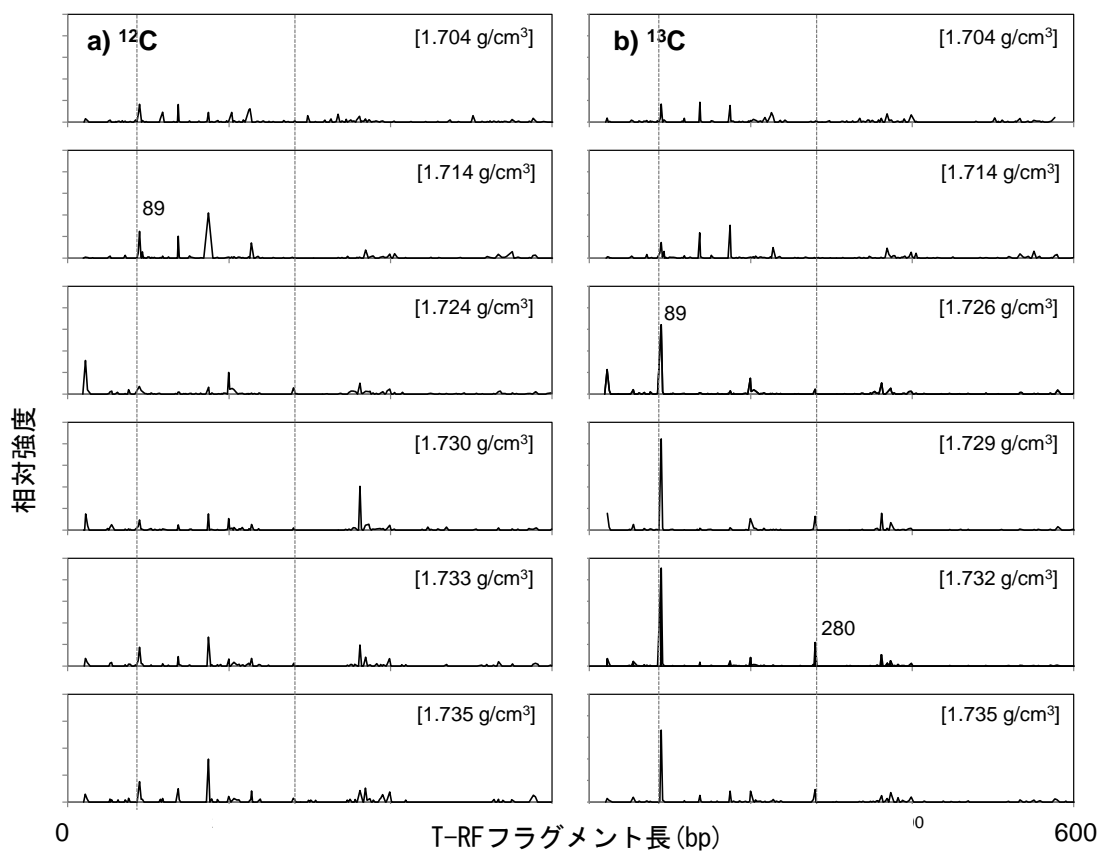


図6 新芝川集積系をa) ^{12}C -とb) ^{13}C -ベンゼンで64日培養後のT-RFプロファイル

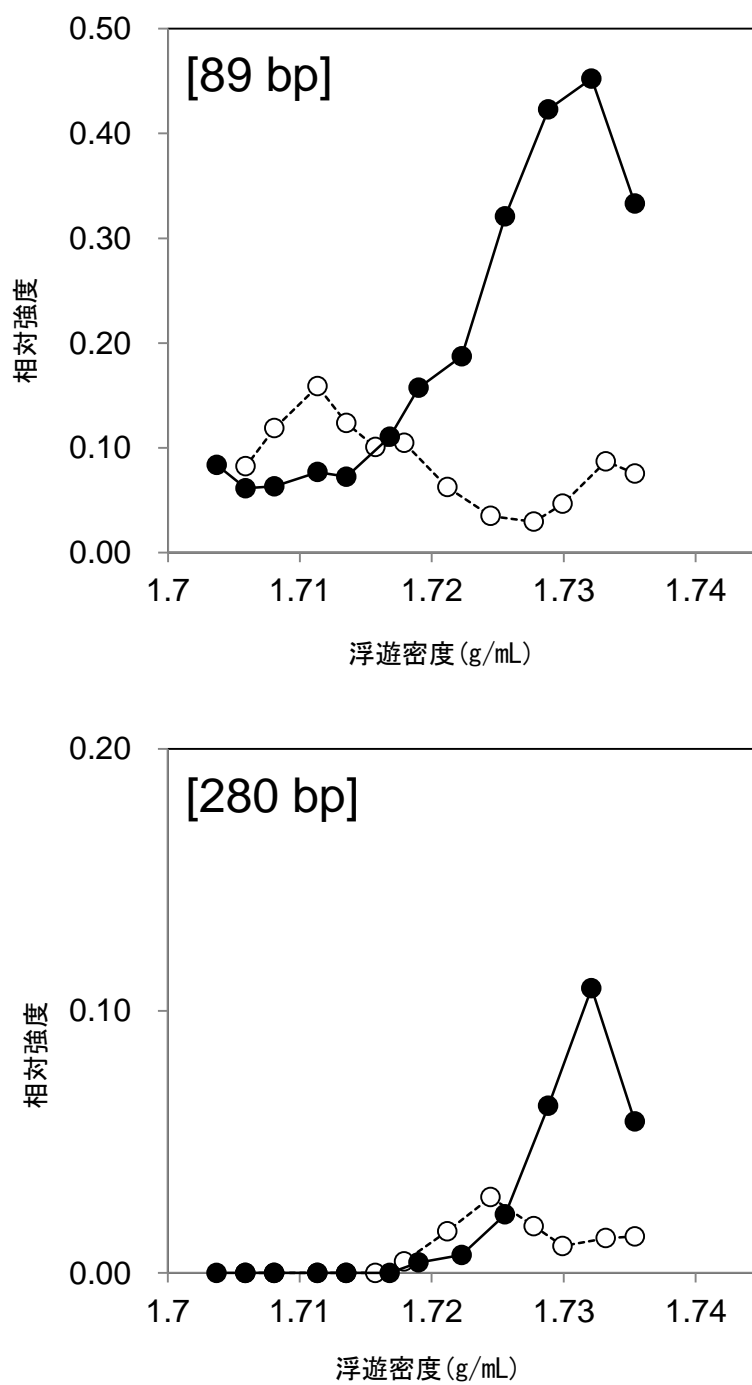


図7 新芝川集積系を ^{12}C -ベンゼンと ^{13}C -ベンゼンで64日培養後の89 bp, 280 bpの断片長を持つT-RFの各画分中の存在率(○: ^{12}C -系列, ●: ^{13}C -系列)

b) 手賀沼集積系

^{12}C -系列と ^{13}C -系列において約1 mmolのベンゼンを分解した、それぞれ培養11日目と23日目に培養系より3 mLずつ土壌スラリーを採取し、抽出したDNAを密度勾配超遠心にかけて、浮遊密度1.700~1.743 g/cm³の範囲でT-RFLPによる解析を行った。各画分のT-RFプロファイルを図8に示した。

プロファイルを比較すると、1.704~1.729 g/cm³では ^{12}C -系列と ^{13}C 系列でT-RFプロファイルは類似していた(図8)。1.704~1.714 g/cm³の画分で ^{12}C -系列と ^{13}C -系列共通で見られるT-RFとしては213(214), 89 bpがあり、1.726~1.729 g/cm³では361 bp、1.735 g/cm³では26 bpが共通していた。一方、1.732 g/cm³の画分において ^{12}C -系と比較して ^{13}C -系列中で89 bpの存在率が大きくなっていた。また、1.742(1.743) g/cm³では ^{13}C -系列でのピーク数が ^{12}C -系列のピーク数を上回っていた。

プロファイルの比較ではDNA量の少ない菌の検出が難しいため、解析対象とした各T-RFに対して ^{12}C -系列と ^{13}C -系列の各画分中での強度比較を行った。解析対象となった100のT-RFのうち、89, 396, 572 bpの断片長を持つT-RFのみが ^{13}C -系列の重画分において存在率を増していた(図9)。このことより、手賀沼集積系においては89, 396, 572 bpのT-RFを持つ菌が嫌氣的ベンゼン分解に関与していることが示された。

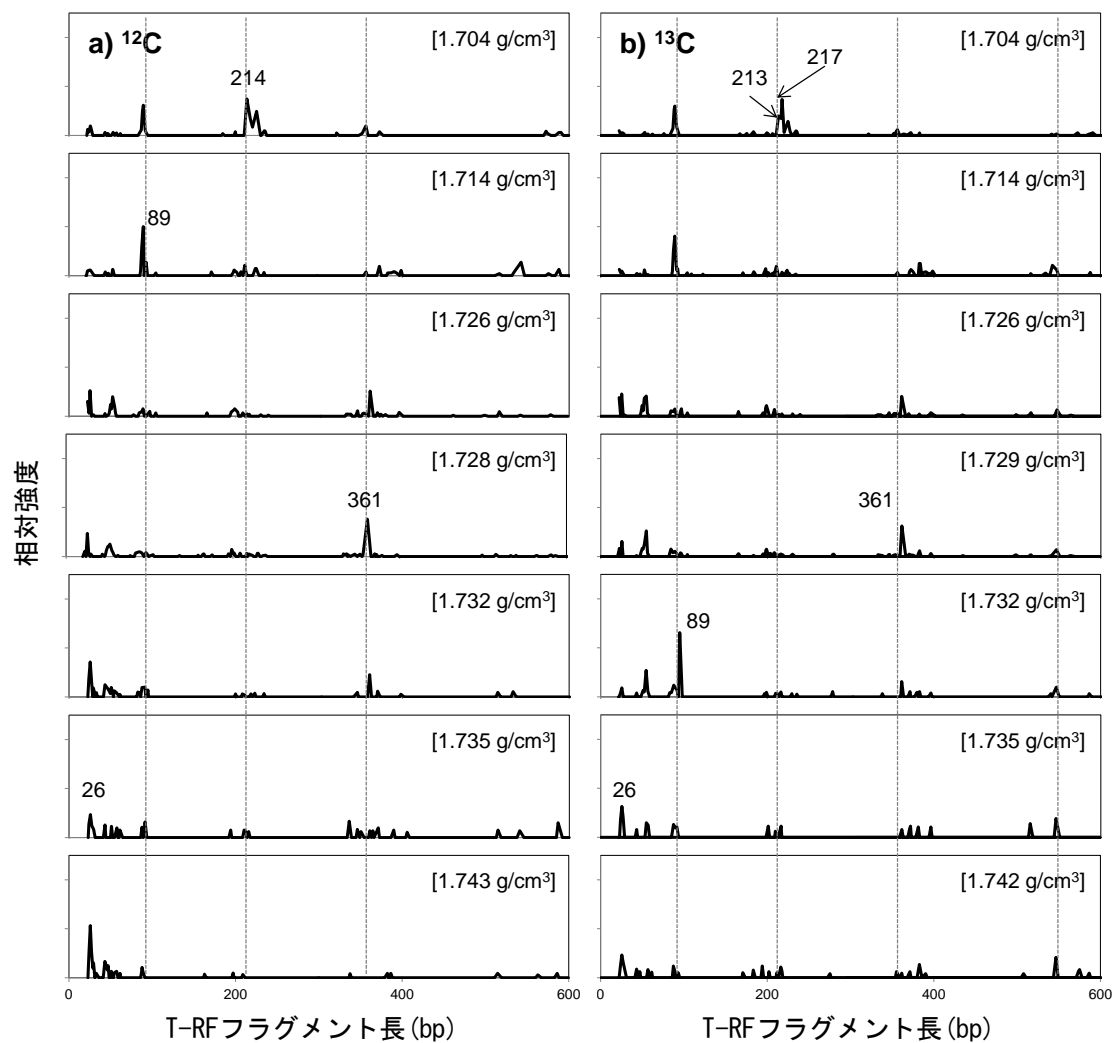


図8 手賀沼集積系をa) ^{12}C -ベンゼンで11日、b) ^{13}C -ベンゼンで23日培養後のT-RFプロファイル

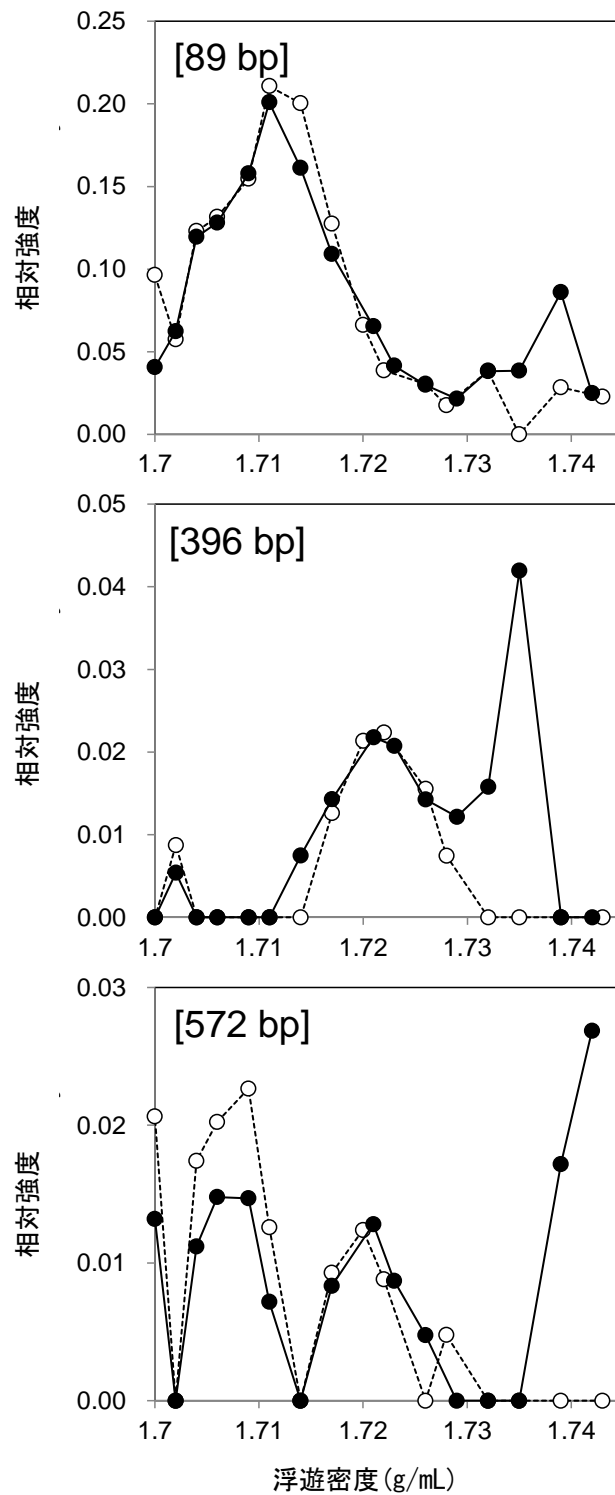


図9 手賀沼集積系を ^{12}C -ベンゼンで11日、 ^{13}C -ベンゼンで23日培養後の89 bp, 396 bp, 572 bpの断片長を持つT-RFの各画分中の存在率(○: ^{12}C -系列, ●: ^{13}C -系列)

c) 土浦 A 集積系

^{12}C -系列と ^{13}C -系列において、132 日目に培養系より抽出した DNA を密度勾配超遠心により分離し、そのうち DNA の分布が見られた $1.702\sim 1.741\text{ g/cm}^3$ の範囲で T-RFLP による解析を行った。T-RF プロファイルを図 1 0 に示す。

^{12}C -系列と ^{13}C -系列の T-RF プロファイルを比較すると、89 bp の断片長を持つ T-RF が ^{12}C -系列では 1.715 g/cm^3 の画分において最も存在率が大きいのにに対し、 ^{13}C -系列中では 1.728 g/cm^3 の画分において最も存在率が大きくなっていった。また、 ^{12}C -系列では $1.726\sim 1.735\text{ g/cm}^3$ の範囲では 360 bp が優占していたが、 ^{13}C -系列では 89 bp, 373 bp が 360 bp よりも多く存在していた。さらに、 ^{13}C -系列の重画分 ($1.734, 1.738\text{ g/cm}^3$) において ^{12}C -系と比較して 278 bp の存在率が大きくなっていった。

土浦 A 集積系の DNA に関しても、解析対象とした 67 の T-RF に対し各 T-RF の各画分中での存在率を ^{12}C -系列と ^{13}C -系列で比較した。89 bp, 279 bp, 372 bp の断片長を持つ T-RF が ^{13}C -系列の重画分において存在率を増していた (図 1 1)。このことより、土浦 A 集積系においてはこれらの断片長さをとる細菌が嫌氣的ベンゼン分解に関与している可能性が示された。

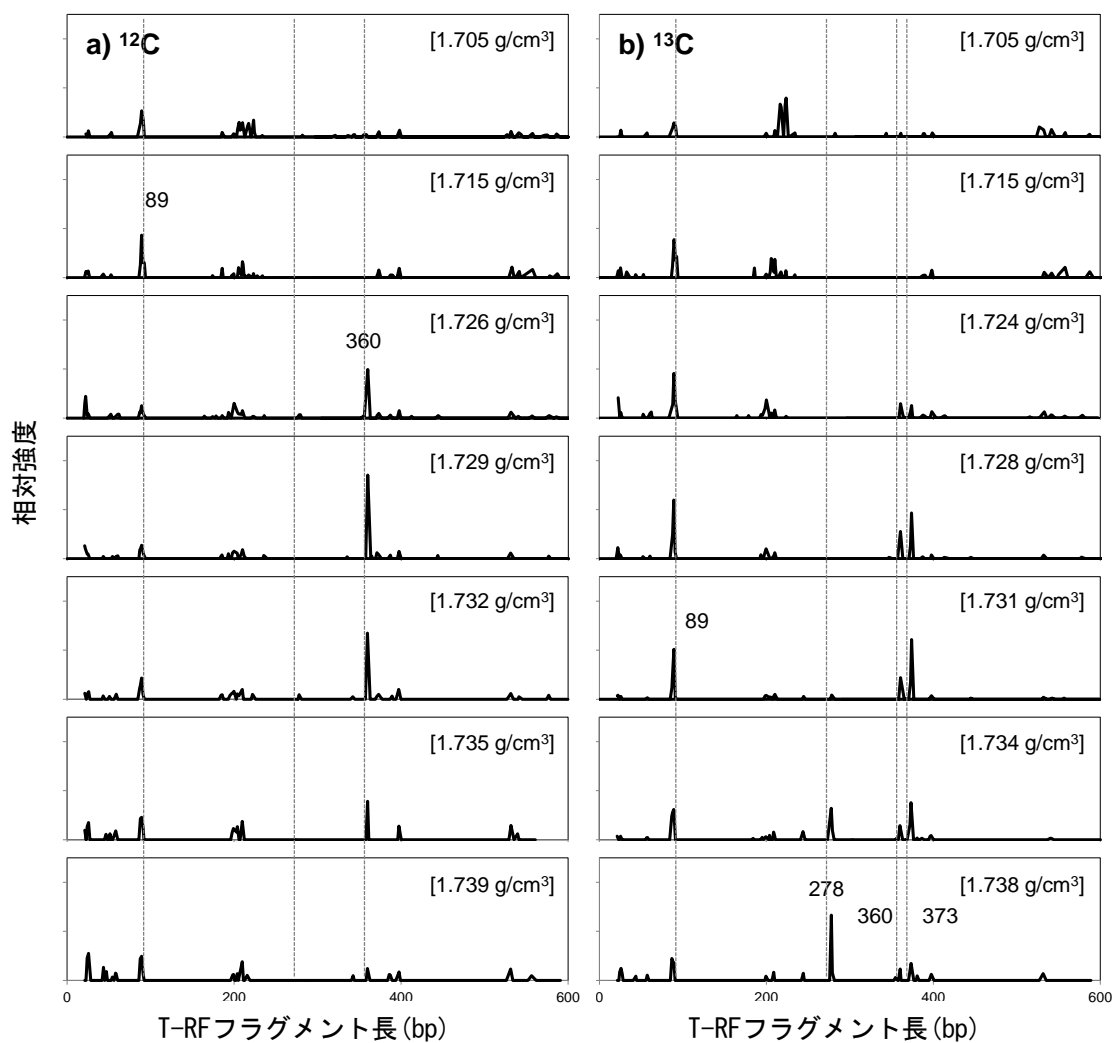


図 10 土浦A集積系をa) ^{12}C -ベンゼンとb) ^{13}C -ベンゼンで132日培養後のT-RFプロファイル

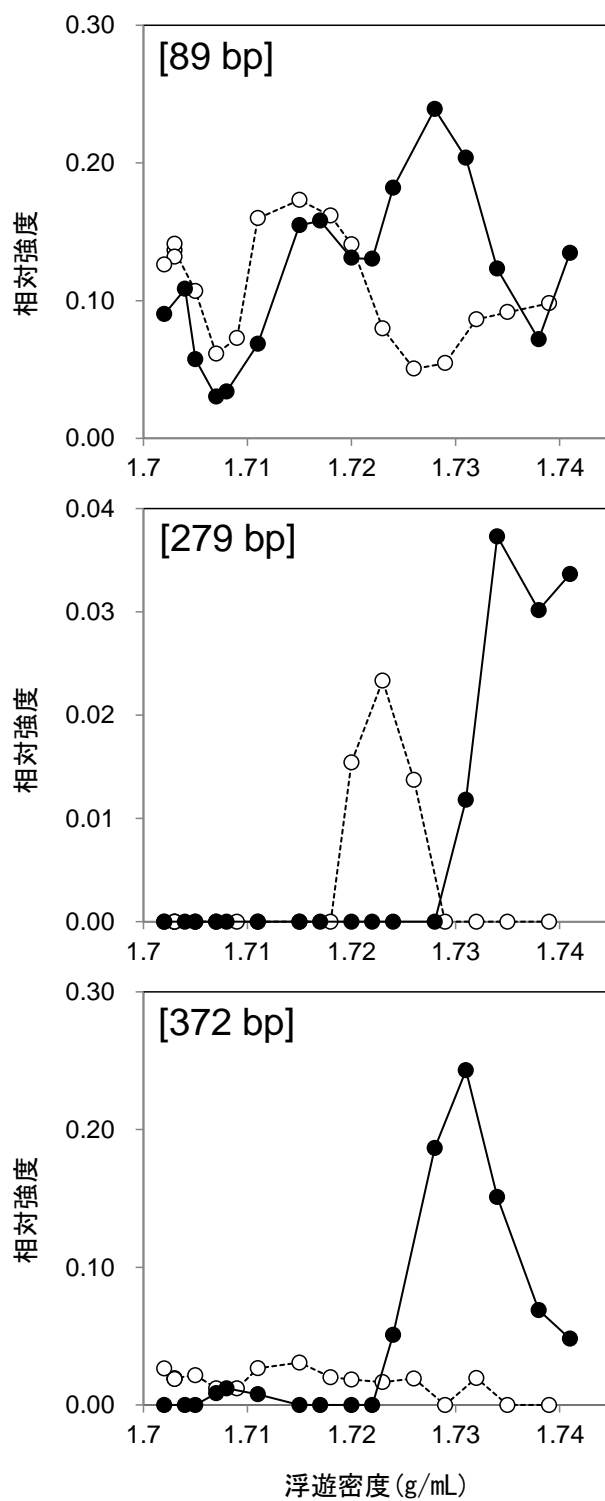


図1-1 土浦A集積系を ^{12}C -ベンゼンと ^{13}C -ベンゼンで132日培養後の89 bp, 279 bp, 372 bpの断片長を持つT-RFの各画分中の存在率(○: ^{12}C -系列, ●: ^{13}C -系列)

③¹³C-資化菌の同定

a) 新芝川集積系

検出されたベンゼン分解菌の候補であるT-RF 89 bpと280 bpの菌の同定を行うため、それらのT-RFの存在割合が高い¹³C-系列の浮遊密度1.729 g/cm³の画分中の16S rRNAを対象としてクローニングを行った。76クローンでベクターへの16S rRNA遺伝子の導入が確認された。得られたクローンに対しT-RFLPによるスクリーニングを行ったところ、76のうち36クローンはT-RF 89 bp、3クローンはT-RF 280 bpの値を取った。

T-RF 89 bpの16S rRNA遺伝子を解析したところ、34クローンが嫌氣的に安息香酸を分解する*Syntrophus gentianae*と最近縁ではあるものの相同性は85-86%と低く、Hasda-Aとの相同性が99%以上と極めて近縁であった¹⁾(図1 2)。系統学的には、*Desulfobacterales*目細菌と分類された。異なる環境から集積した系においてもHasda-A類縁の微生物が分解反応の一部を担っている可能性が示された。残り2クローン(SHRa-h17 and SHRa-h36)は嫌気プロピオン酸分解菌*Smithella propionica*と93%と99%の相同性を示した。一方、280 bpのフラグメントに相当する菌の16S rDNA配列を解析した結果、*Coriobacteriaceae*科の菌*Olsenella uli*に最近縁であったが、相同性は89%と低かった(図1 3)。

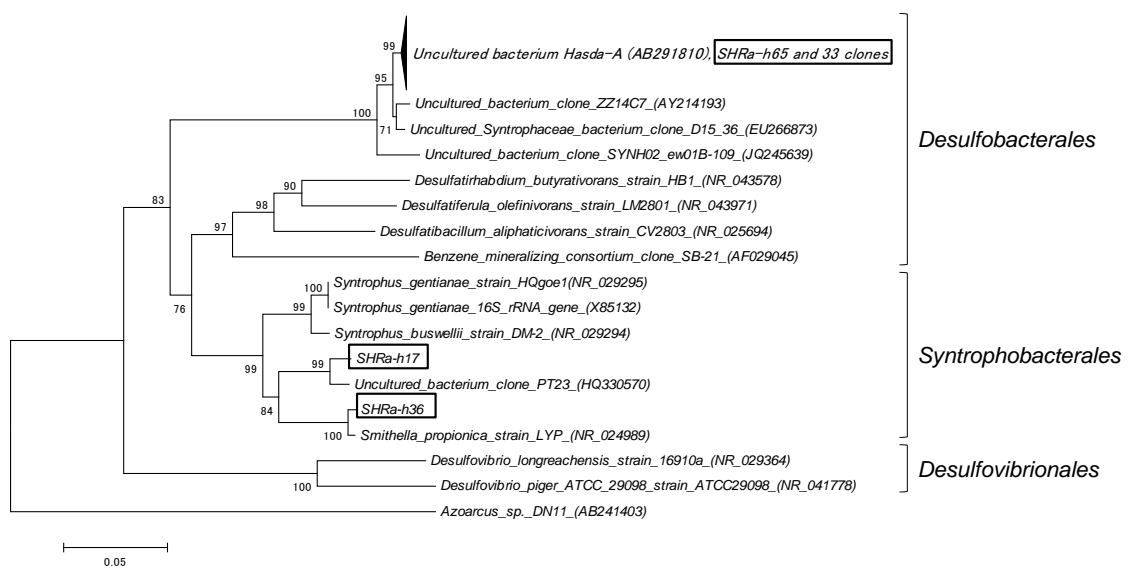


図1 2 新芝川集積系を¹³C-ベンゼンで64日培養した浮遊密度1.729 g/cm³の画分から得られたクローンのうち、T-RFLPで89 bpを持つクローンの系統樹。SHRa-h**はクローン名であり、***は今回得られたクローンの番号。

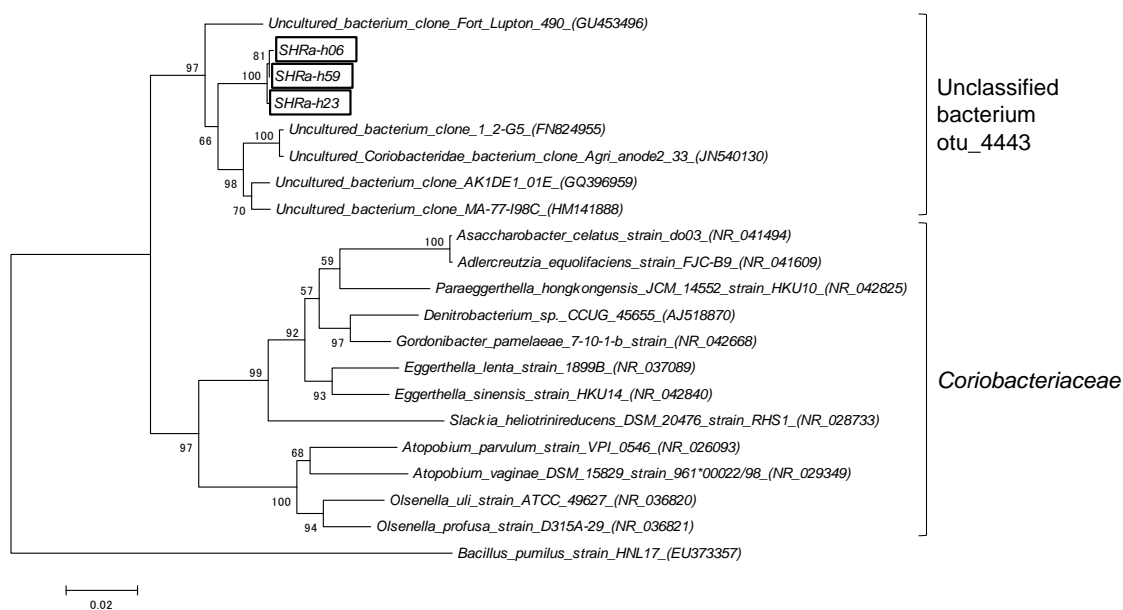


図 1 3 新芝川集積系を ^{13}C -ベンゼンで64日培養した浮遊密度 1.729 g/cm^3 の画分から得られたクローンのうち、T-RFLPで280 bpを持つクローンの系統樹。SHRa-h**はクローン名であり、***は今回得られたクローンの番号。

b) 手賀沼集積系

T-RF 89 bpをとるクローンを6つ、396 bpを1つ、572 bpを2つ対象として16S rRNA遺伝子配列を解析した。BLASTによる最近縁種は、89 bpを取るクローンの最近縁種は3クローンで *Desulfobacterium anilini* (相同性87-88%)、2クローンで *Ignavibacterium album* (85-86%)、1クローンで *Pelobacter acetylenicus* (87%)であった (図 1 4)。396 bpを取るクローンTEPa-h091の最近縁種は *Thermodesulfovibrio yellowstonii* (相同性87%)、572 bpを取るクローンのうち1つは *Atopostipes suicloacalis* (98%)、もう1クローンは *Sporotalea propionica* (相同性97%)であった (図 1 5)。

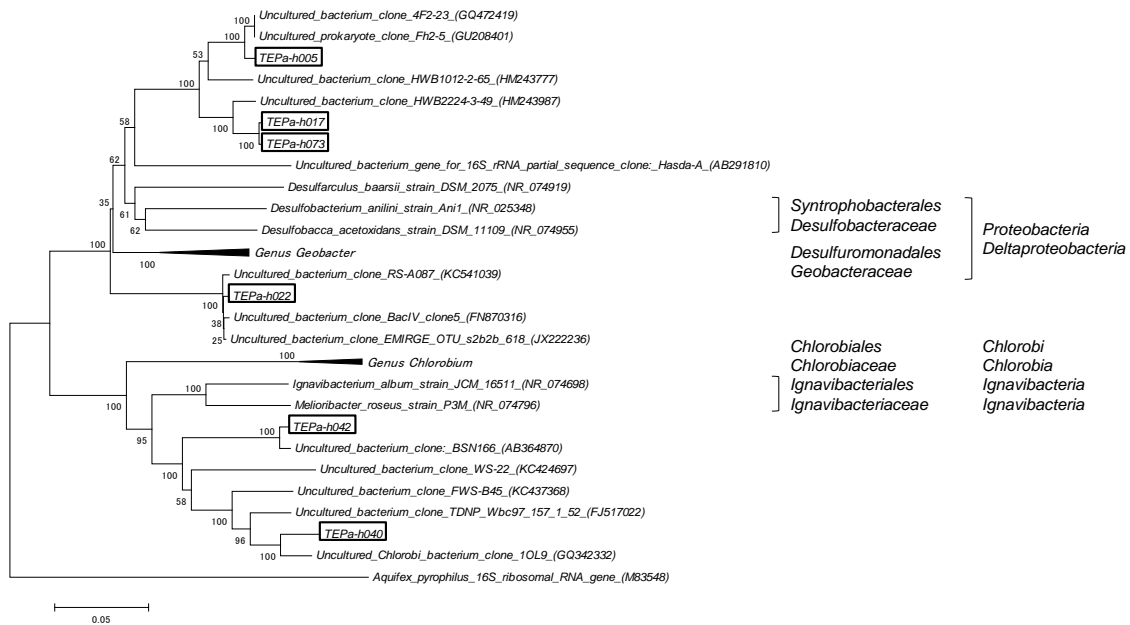


図 1 4 手賀沼集積系の¹³C-系列重画分より得られたT-RF 89 bpに該当する菌のクローンライブラリ

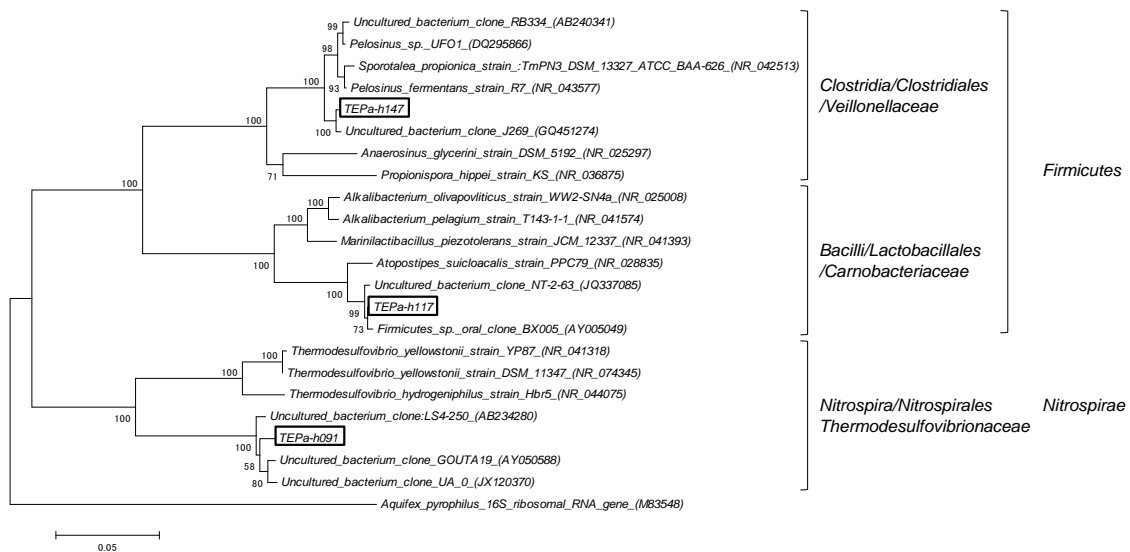


図 1 5 手賀沼集積系の¹³C-系列重画分より得られたT-RF 396 bp, 572 bpに該当する菌のクローンライブラリ

c) 土浦 A 集積系

得られたクローンのうち、T-RF 89 bpを取るものを34クローン、280 bpを取るものを1クローン、372 bpを取るものを3クローン対象とし、16S rRNA遺伝子配列を解析した。

T-RF 89 bpを取る34クローンは、大きく4つのグループとその他に分けられた(図 1 6)。それぞ

れのクローンをBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) による相同性解析を行い、国立遺伝学研究所DNAデータベース(DDBJ)のデータベースに登録されている近縁な単離株やクローンとともに系統樹を作成すると、4グループのうち2グループは*Deltaproteobacteria*下の異なる目に、他の2つは*Actinobacteria*に属した。グループに含まれなかったTSHa-h013, 016, 067, 090, 091もまた*Deltaproteobacteria*下に属した。TSHa-h014のみは単独で*Chlorobi*に近縁であった。34クローン中32クローンは最近縁種との相同性が85%~92%と低かった、既報の単離菌と相同性の高いものでは、TSHa-h016が*Geobacter lovleyi* SZ株と、TSHa-h067は*Pelobacter propionicus* DSM 2379株と*Geobacter*属の分離株とそれぞれ99%の相同性を持った。

T-RF 280 bpを取るクローンは、新芝川系でみられたものとほとんど同じであった(図17)。

T-RF 372 bpを取る2クローン(TSHa-h020, 024)の最近縁種は*Actinobacteria*綱*Actinobacteria*目に属しており、*Frankia alni* (相同性86%)と *Sporichthya polymorpha* (相同性85%)であった。残りの1クローン(TSHa-h042)は*Proteobacteria*綱*Deltaproteobacteria*目の*Desulfobacterium aniline* (相同性92%)が最近縁種となっている(図18)。

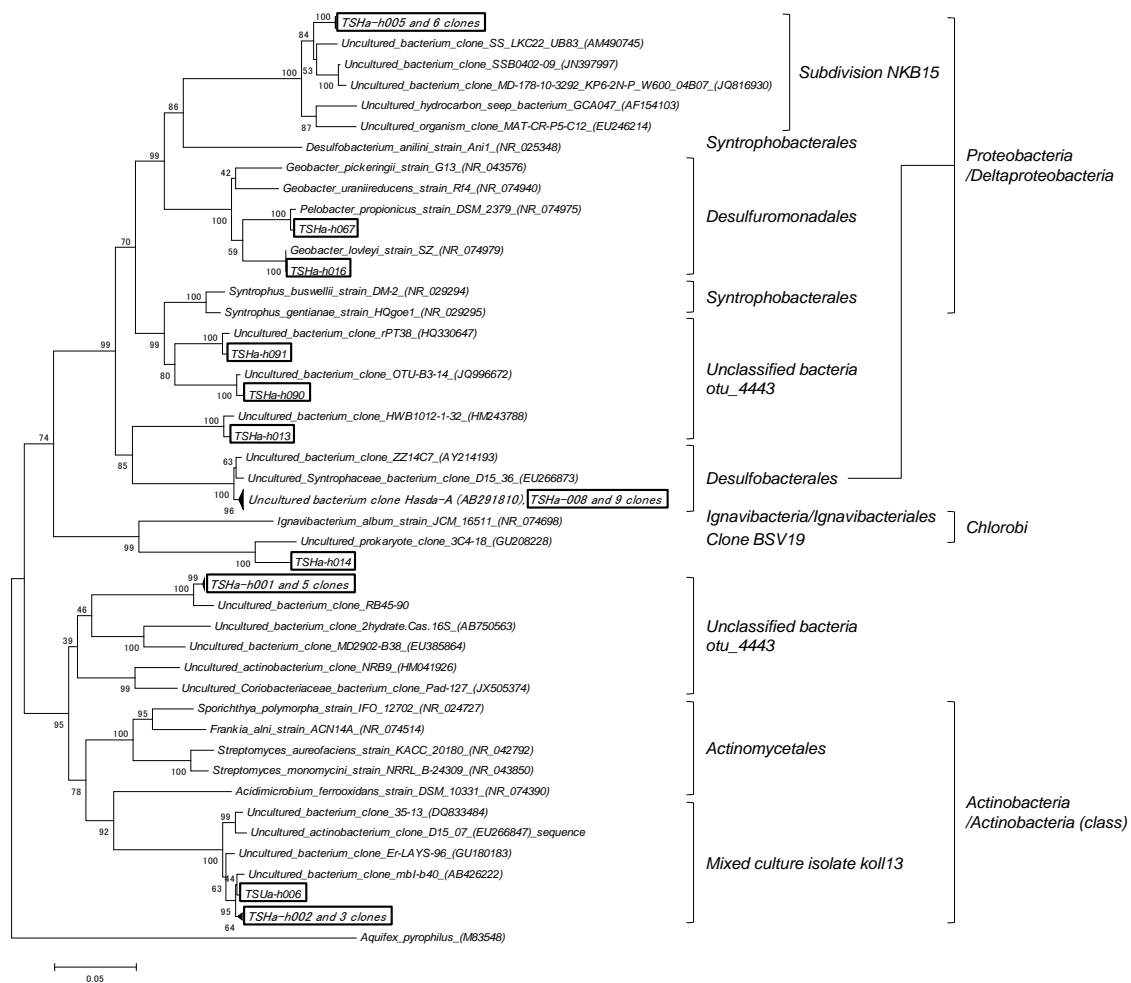


図16 土浦A集積系の¹³C-系列重画分より得られたT-RF 89 bpに該当する菌のクローンライブラリ

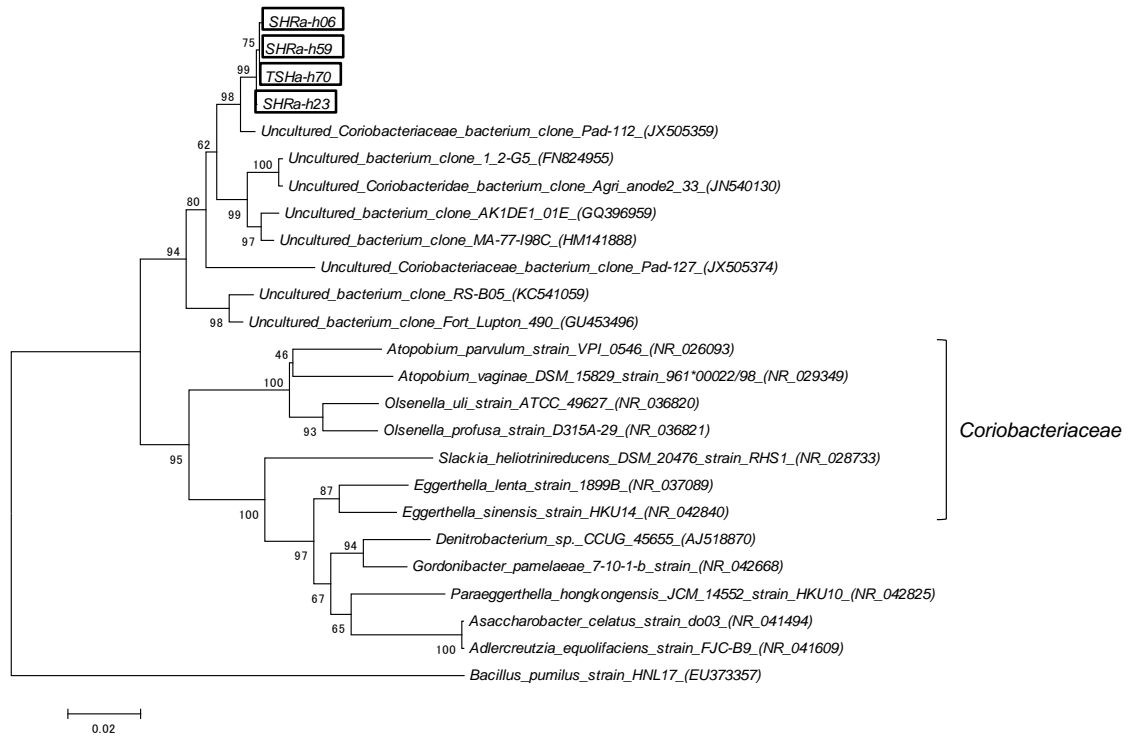


図17 土浦A集積系の ^{13}C -系列重画分より得られたT-RF 280 bpに該当する菌のクローンライブラリ。新芝川集積系のクローンも合わせて示してある。

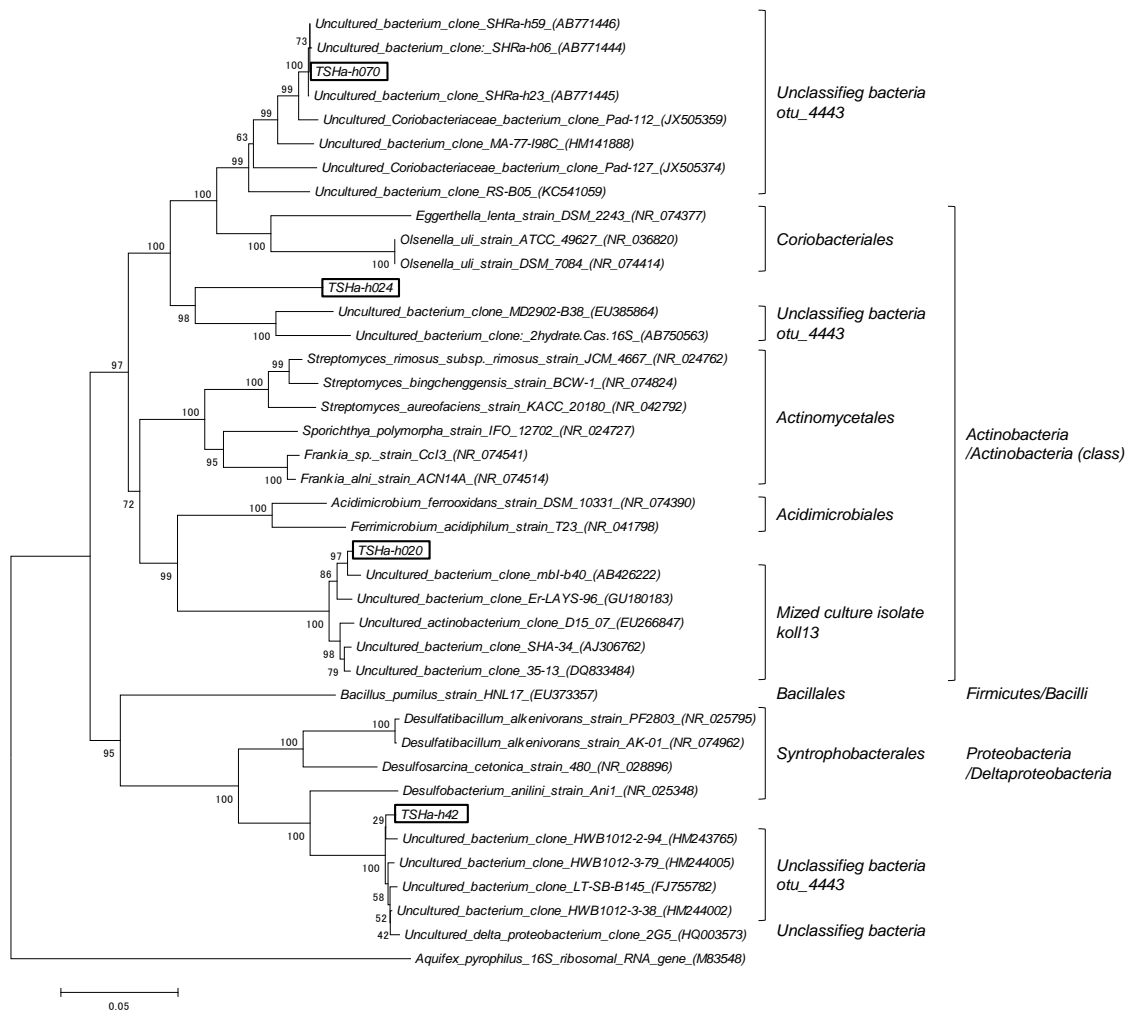


図 1 8 土浦A集積系の ^{13}C -系列重画分より得られたT-RF 372 bpに該当する菌のクローンライブラリ

④ 経時的解析

本実験では収率が低く増殖まで時間のかかる嫌気ベンゼン分解菌を目的としているため、確実に ^{13}C の取り込みが見込まれる長い培養時間を選択した。しかし、培養時間が長いと系内にいる微生物がベンゼンそのものではなくその代謝産物やベンゼンを用いて増殖した菌体由来の有機物を摂取する可能性が高くなる。そのため、初発反応を担っている菌以外が本手法で検出される事態が懸念される。そこで、一番初めにベンゼン由来の ^{13}C を取り込んでいる菌を同定するため、ベンゼンの分解度に応じて複数回サンプルを採取し、解析を行った。

a) 新芝川集積系

培養64日目に解析対象とした10のT-RFに関して、培養23日目、38日目、64日目における各画分中での強度を ^{12}C -系列と ^{13}C -系列で比較した(図 1 9)。T-RF 89 bp, 280 bpともに培養23日目では ^{12}C -系列と ^{13}C -系列間の重画分における存在率に差はない。そしてT-RF 89 bp, 280 bpともに培養

38日目で ^{13}C -系列での重画分で存在率が増加している。このことより、T-RF 89 bp, 280 bp の菌は23日~38日で検出できる量の ^{13}C を取り込んでいることが分かるが、今回の結果ではそのどちらがより早い段階で ^{13}C を資化しているかは示されなかった。しかし、T-RF 89 bp, 280 bpが本系において一番初めに ^{13}C の取り込みが見られること、さらにT-RF 89 bp, 280 bp以外に ^{13}C の取り込みが見られないことより、これら2つのT-RFを持つ菌がベンゼン分解経路のうち上流部分に参与している可能性が高い。

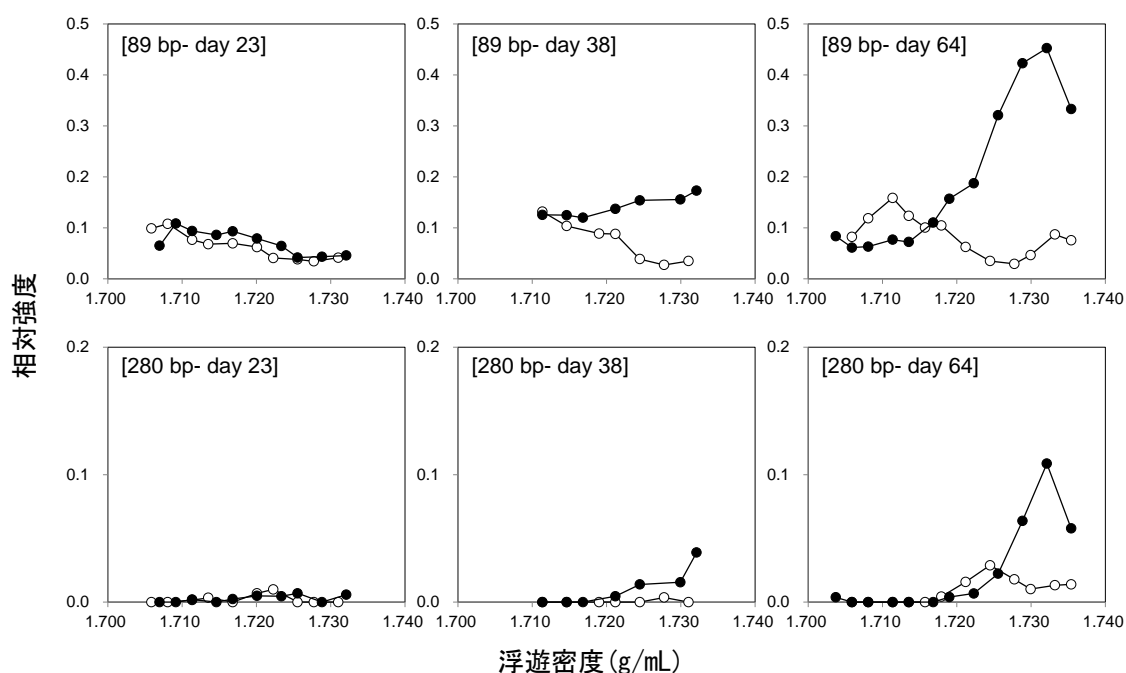


図19 新芝川集積系の培養23日目、38日目、64日目におけるT-RF 89 bp (上段), 280 bp (下段)の断片長を持つT-RFの各画分中の存在率(○: ^{12}C -系列, ●: ^{13}C -系列)

さらに、 ^{12}C -系列と ^{13}C -系列における重画分の菌叢をより詳細に比較するため、培養23、38、64日目の対応する画分に対し細菌・古細菌の16S rRNA遺伝子のV4領域を対象としたパイロシーケンス解析を行った。解析に用いた画分は、培養64日目において ^{12}C - ^{13}C 間でT-RFプロファイルの差が大きかったもの(^{12}C では 1.733 g/cm^3 、 ^{13}C では 1.732 g/cm^3)と、その他の日程においてはその浮遊密度が一番近いものである。

平均で7307リード(最小1904、最大17723)の配列を得られた。配列はお互いに97%以上の相同性を持つものを1つのoperational taxonomic unit (OTU)にまとめ、OTUごとに各日程における割合を比較した。 ^{13}C -系列の23、38、あるいは64日目において、重画分での存在率が0.5%以上のOTUを対象として、各日程における存在率を比較した。

T-RFLP解析において、 ^{13}C 取り込みの確認されたT-RFを、パイロシーケンス解析において検出された配列と比較したところ、89 bpのうちHasda-Aと近縁のクローンの配列とOTU_5466の代表

配列が同じクラスターに属した。同様に、280 bpのクローン配列とOTU_14329が同じクラスターに属していた。いずれも、時系列でみたときに¹³C添加系の重画分における存在割合が上昇しており、パイロシーケンス解析においても、これらの株の¹³C取り込みを確認することができた(図20)。よって、Hasda-A近縁種と*Coriobacteriaceae*科近縁種の菌がベンゼン分解集積系において重要な菌であることが強く示された。一方で、Hasda-A近縁種以外のクローンと近縁のOTUについては¹³C添加系の重画分における存在割合の増加はみられず、T-RFが89bpを持つクローンの中でも、Hasda-A近縁種以外のものについては¹³C基質の取り込みを行っていない可能性が高い。

b) 手賀沼集積系

手賀沼集積系において、¹³Cの取り込みが示されたT-RFのクローンとパイロシーケンス解析の結果を比較した。その結果、重画分のパイロシーケンス解析では¹³Cの取り込みが示されたT-RFのクローンと同一のものを見つけることができなかった。これは、手賀沼集積系においては重画分へのシフトが小さく、よって重画分においても当該シーケンスの存在割合が小さいことが原因と考えられた。

c) 土浦 A 集積系

31日目あるいは82日目において、¹³C-系列の重画分においてリード数が0.5%以上OTUを対象として、¹³C-系列と¹²C-系列の各日程(0, 31, 82)の重画分における存在率を比較した。T-RFLP解析において、¹³C取り込みの確認されたT-RFを、パイロシーケンス解析において検出された配列と比較したところ、新芝川集積系と同じく89 bpのクローンの一部とOTU_5466の代表配列同じクラスターに属し、同様に、280 bpのクローン配列とOTU_14329が同じクラスターに属した。それぞれ、時系列で比較すると明確に¹³Cの取り込みが見られており、パイロシーケンス解析においても、これらの株の¹³C取り込みを確認することができた(図21)。新芝川集積系同様、Hasda-A近縁種以外のクローンと近縁のOTUについては¹³C添加系の重画分における存在割合の増加はみられず、T-RFが89bpを持つクローンの中でも、Hasda-A近縁種以外のものについては¹³C基質の取り込みを行っていない可能性が高い。

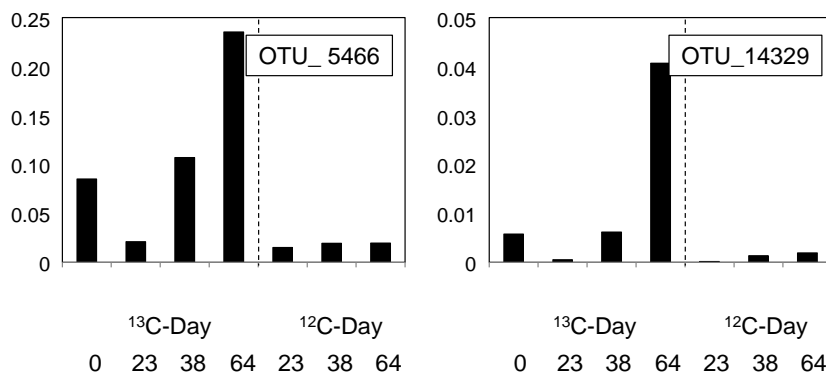


図 20 新芝川集積系のT-RF 89bpおよび280bpに対応する塩基配列を持つOTUの、¹²C-系列中と¹³C-系列中の培養23, 38, あるいは64日目における重画分中での相対存在量

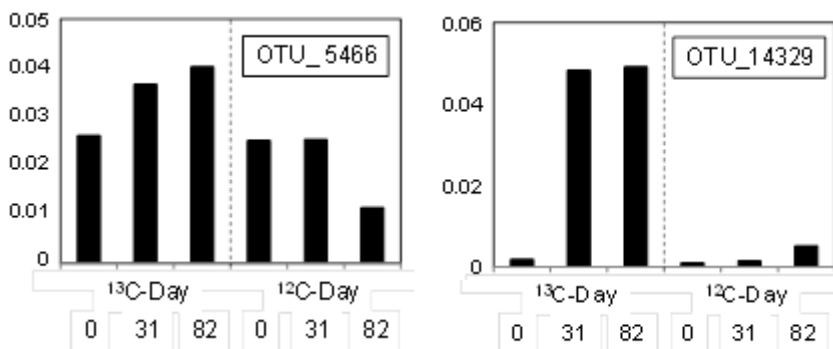


図 21 土浦A集積系のT-RF 89bpおよび280bpに対応する塩基配列を持つOTUの、¹²C-系列中と¹³C-系列中の培養23, 38, あるいは64日目における重画分中での相対存在量

⑤ ベンゼン分解微生物の同定

新芝川系、手賀沼系、土浦A系を安定同位体プローブ法・T-RFLP法で解析した結果、89 bpのT-RFを持つ菌が3つの集積系すべてで、280 bpを持つ菌が新芝川系と土浦A系で共通して検出された。89 bpのT-RFを持つ菌は各系でそれぞれ多様性を見せたが、手賀沼系の1クローン以外はすべて *Deltaproteobacteria* 綱に属し、新芝川系のクローン34個と土浦Aの1クローンは16S rRNA遺伝子配列がHasda-Aと99%以上一致していた。それらは、*Desulfobacteriales* 目細菌と分類された。280 bpのT-RFを持つ菌はすべて *Coriobacteriaceae* 科の菌 *Olsenella uli* を最近縁種にとり、同じクラスターに属した。さらに、④の解析により、重画分の時系列でのパイロシーケンス解析によっても、新芝川と土浦A集積系においては、これら2種の微生物が安定同位体プローブ解析により検出されていることを裏付ける結果が得られた。このことより、本研究で使用された3系のうち、すくなくとも新芝川系と土浦A系で *Desulfobacteriales* 目細菌Hasda-A類縁菌と *Coriobacteriaceae* 科類縁菌がベンゼン分解に寄与している可能性が示された。

Desulfobacteriales 目細菌のHasda-A類縁菌は過去に嫌氣的ベンゼン分解系で見られたクローンが見られている。たとえばクローンSHRa-h11の16S rRNA配列はメタン生成ベンゼン分解集積系で主

なクローンであるOR-M2の16S rRNA部分配列とほぼ一致していた⁴⁾。Ulrich and Edwards はOR-M2は嫌氣的にアニリンやフェノールを分解する*Desulfobacterium anilini*と近縁であるため、報告された系においてベンゼン分解菌である可能性があるとしている。また、OR-M2は硫酸塩還元条件下のベンゼン分解集積系で報告されているSB-21とも近縁である。

一方、*Olsenella uli*はグルコースの発酵を担うが、水素生成菌ではない。*Coriobacteriaceae*近縁種はメタン生成条件におけるベンゼン分解微生物としての報告はこれまでにないが、同科の多くの菌は糖を発酵し有機酸を生成し、硝酸塩還元菌や水素生成菌も含まれる。

いずれのクローンにおいても、最近縁種との相同性は90%以下と低く、新規の未分離微生物であるといえる。したがって、分離株の性質とは異なる性質を持つ可能性も十分に考えられる。

3) 汚染地下水のベンゼン分解微生物の定量

各地点のHasda-Aコピー数は、e-2地点で 2.8×10^1 copies/mL、c-6地点では 1.9×10^2 copies/mLと定量された。しかし、いずれの場合においてもネガティブコントロールよりは大きな値であるものの、定量下限を下回っていた。d-1地点の試料はネガティブコントロールと全く変わらないものであり、不検出であった。いずれにしても汚染現場の地下水中では、Hasda-A数はきわめて少ないことが明らかとなった。

(2) ベンゼン分解条件の検討

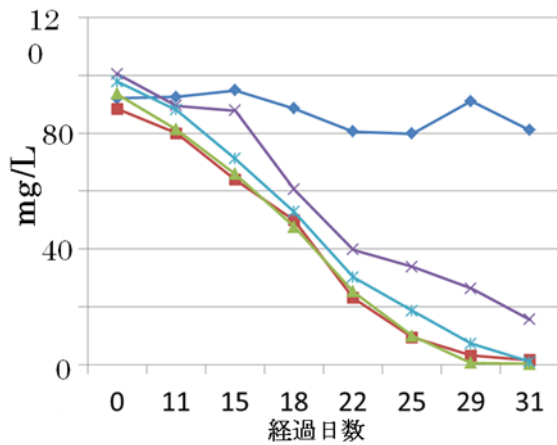
1) 硫酸塩・安息香酸添加試験

a) 硫酸塩添加の影響

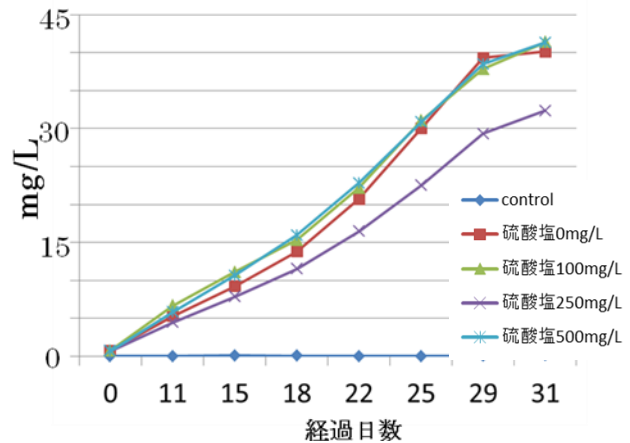
硫酸塩添加条件におけるベンゼンの濃度変化、二酸化炭素とメタンの生成、及び硫酸塩濃度の変化を図22に示す。まずベンゼン濃度の変化(図22a)に着目すると、実験開始後31日後で初期硫酸塩濃度250mg/Lの場合を除き、投与したベンゼンはすべて消費されていた。これ以前の分解の経緯をみると、初期硫酸塩濃度100mg/Lにおいては硫酸塩無添加の場合とまったく同一の挙動を示し、硫酸塩添加による影響は確認されなかった。初期硫酸塩濃度250mg/L、500mg/Lの場合には、硫酸塩無添加の場合に比べ常に高いベンゼン濃度を示したが、実験開始時の初期ベンゼン濃度もわずかに高く、ベンゼンの濃度減少に硫酸塩添加が影響しているとは結論付けられない。したがっていずれのケースにおいても、硫酸塩無添加の条件に比べ、ベンゼン濃度の変化に大きな違いは見られず、硫酸塩がベンゼン分解を促進も阻害もしない、という結果となった。

次に、各条件におけるベンゼン分解の最終生成物であるメタンと二酸化炭素の変化(図22b, c)をについて述べる。二酸化炭素の生成量は、初期硫酸塩濃度250mg/Lの場合にのみ硫酸塩無添加の条件に比べて少なかったほかは、まったく同じ挙動を示した。メタンの生成量については、硫酸塩無添加の条件にくらべ、初期硫酸塩濃度100mg/Lでわずかに少なく、初期硫酸塩濃度250、500mg/Lでおよそ1/3の生成量であった。

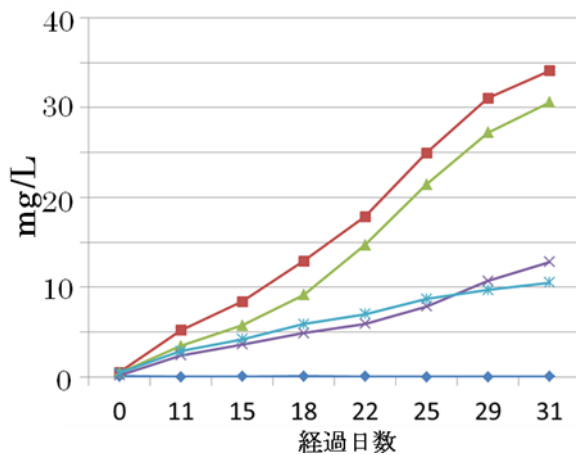
硫酸塩濃度の推移をみると、硫酸塩を添加したいずれの場合においてもほぼ一定で硫酸塩濃度の減少が見られていた。初期硫酸塩濃度100、250 mg/Lでそれぞれ15日後、22日後までは少なくとも硫酸塩は残存しており、初期硫酸塩濃度500mg/Lでは実験期間を通じて硫酸塩が残存している条件であったことが分かる。



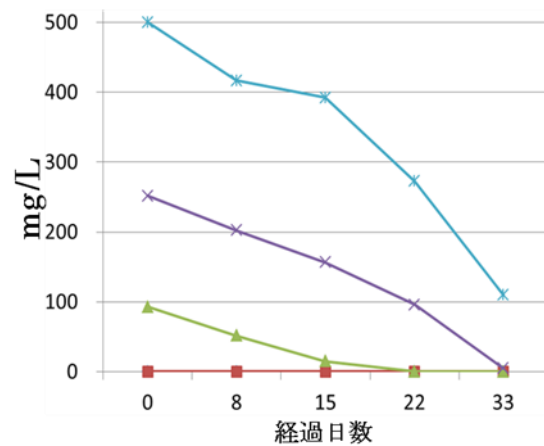
a)ベンゼン濃度



b)二酸化炭素濃度



c)メタン濃度



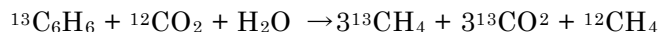
d)硫酸塩濃度

図 2 2 硫酸塩添加試験におけるa)ベンゼン、b)二酸化炭素、c)メタン、d)硫酸塩の濃度変化

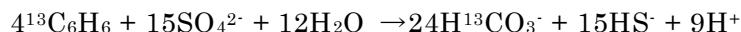
実験終了時におけるベンゼン分解量とメタン、二酸化炭素生成量の収支を取ったものを図 2 3 a に示す。硫酸塩無添加、初期硫酸塩濃度100mg/Lの場合には、消費されたベンゼンのうち7割強がメタンもしくは二酸化炭素に分解されているのに対し、初期硫酸塩濃度250、500mg/Lの場合には4割程度にとどまっている。残りはベンゼン分解の中間産物として残存しているか、測定時等に実験装置から消失したり、装置壁面への不可逆的吸着によるもの損失と考えられる。装置からの消失や吸着はすべての実験条件で同一であると考えられることから、初期硫酸塩濃度の多寡による違いはベンゼン分解の中間産物の差であると考えることが妥当である。

メタン生成条件と硫酸還元条件におけるベンゼンの分解は、以下の式に従うと考えられる。

メタン生成条件：

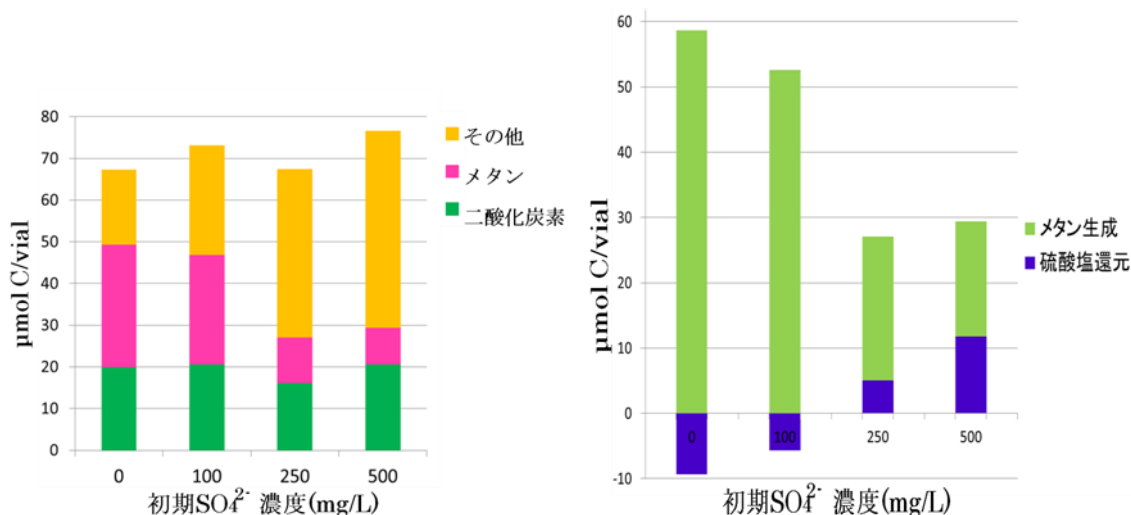


硫酸還元条件：



この仮定をもとに、生成したメタンと二酸化炭素量より、各実験条件におけるベンゼン分解が、メタン生成もしくは硫酸塩還元いずれによるものかを推定したものが図23bである。硫酸塩無添加、初期硫酸塩濃度100mg/Lにおいて硫酸塩還元の寄与が負となっているのは、メタン生成量より二酸化炭素生成量が大きくなっていることに起因する。これは分析誤差以外に、集積培養系内に残っているベンゼン以外の電子供与体からの電子が、二酸化炭素還元に使われている可能性がある。一方初期硫酸塩濃度250、500mg/Lの場合には硫酸塩還元の寄与が示され、特に初期硫酸塩濃度500mg/Lの場合には4割程度が硫酸還元によってベンゼンが分解されていることが分かる。

以上の結果より、メタン生成条件で集積したベンゼン分解集積培養系においても、硫酸塩を投与することで硫酸塩還元によるベンゼン分解が起こりうる事が示された。ただし、硫酸塩還元がおこるものの、ベンゼン分解に対する促進効果を認めることができなかった。



a)メタン、二酸化炭素の発存量

b)推定されるメタン生成と硫酸塩還元の割合

図23 各硫酸塩濃度段階におけるa)ベンゼン分解量に対するメタン、二酸化炭素の発存量、b)推定されるメタン生成と硫酸塩還元の割合。

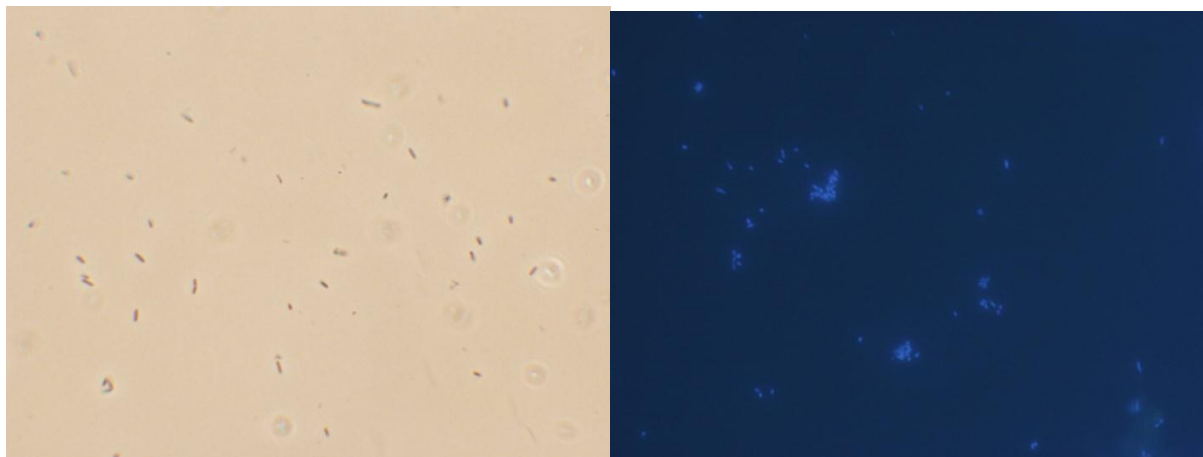
b) 安息香酸添加の影響

ベンゼン分解集積培養系において、安息香酸の添加がベンゼン分解微生物の集積に及ぼす効果を調べた。まず、ベンゼン分解微生物の増殖効果があるかどうかをみるため、集積培養系を用いて希釈列を作成した。希釈列の様子を図24に示す。



図 2 4 希釈列の様子（ベンゼン 40 mg/L 添加系）

培養開始より 100 日経過した頃より、ベンゼンを炭素源とする系の 4×10^4 、 4×10^6 系においてバイアル内に白色のもやが観察された。しかし、遠心分離 (15,000 rpm、3 min) し上澄みを可能な限り除去したが、顕微鏡下では土壌粒子以外のものは観察できなかった。培養開始より 170 日目に 4×10^3 、 4×10^4 、 4×10^6 の系に関して同様の処置を行ったところ、視野下において一様に粒状物質を観察することができた（図 2 5 は 4×10^4 のサンプル）。



a) 位相差顕微鏡による観察視野 ($\times 1500$)

b) DAPI 染色を行った培養サンプル ($\times 1000$)

図 2 5 40mg/L ベンゼン添加後 170 日目における培養系の顕微鏡写真

粒状物質が菌であるかどうかを確認するため、*Syntrophus* 属類縁菌に特異的にハイブリダイズするプローブ BD437 (Cy3) を用いた FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) を適用した後、DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) でカウンター染色を行った¹⁾。DAPI 染色により、多数存在している粒状物質が菌である (DNA を持っている) ことは確認できたが、BD437 による蛍光と重ならず、*Syntrophus* 属類縁菌の存在は確認できなかった。

一方で、安息香酸を添加した系では目視において懸濁物は見られず、顕微鏡下においても土壌

粒子以外のものは確認できなかった。炭素源として安息香酸を200 mg/Lになるよう添加した系では 4×10^3 から 4×10^7 の系において培地がわずかに黄色に呈色していた。このことより、安息香酸の環構造の開裂が示唆され、安息香酸の分解が起こっていた可能性が示された。しかしながら、懸濁が見られなかったことから、安息香酸の分解による明確な菌の増殖があったとは結論できなかった。

ベンゼン添加系において培養液中に何らかの菌の増殖が観察されたので、培養液中ベンゼンの分解の有無をGC-FIDによる測定で確認した。この結果を図26に示す。希釈倍率が 4×10^1 の系（この系のみベンゼン濃度が20 mg/L、40 mg/Lの2段階設定）においては培養後半においてベンゼンの減少が見られている。しかし、培養開始時と比べると減少分は小さく、ベンゼン分解があったかどうかは結論できなかった。

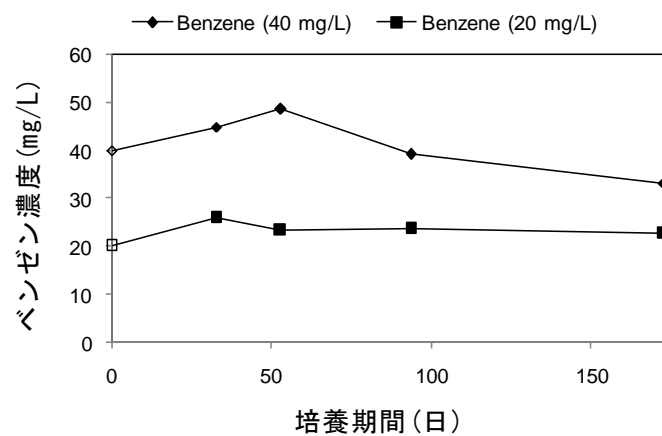
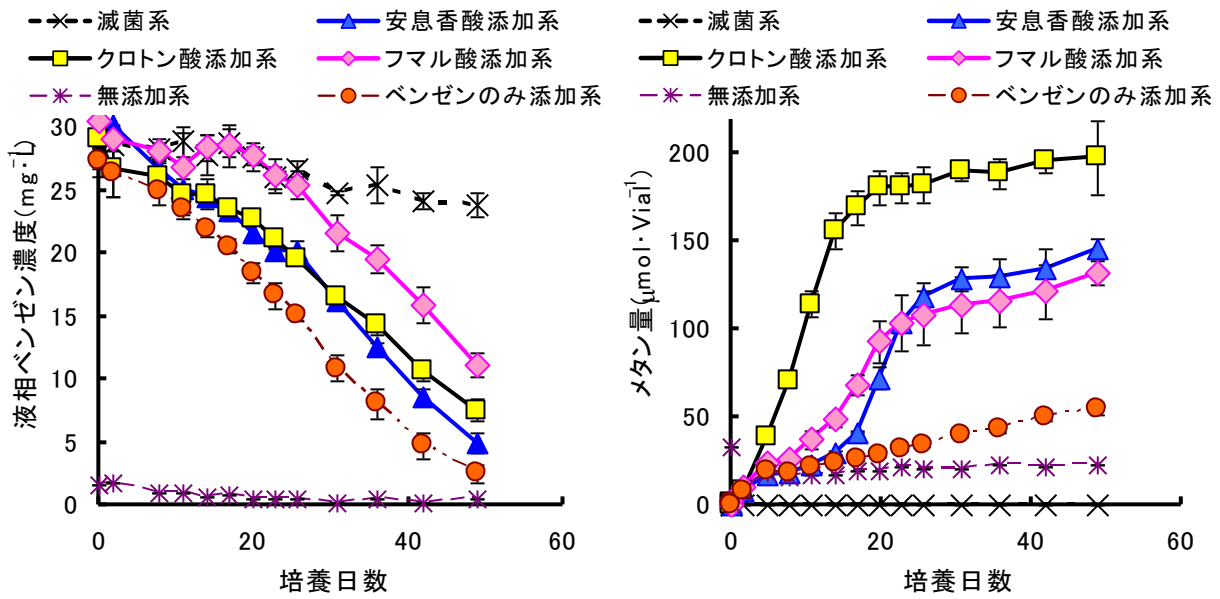


図26 培養系中のベンゼン濃度

2) 有機酸の添加効果

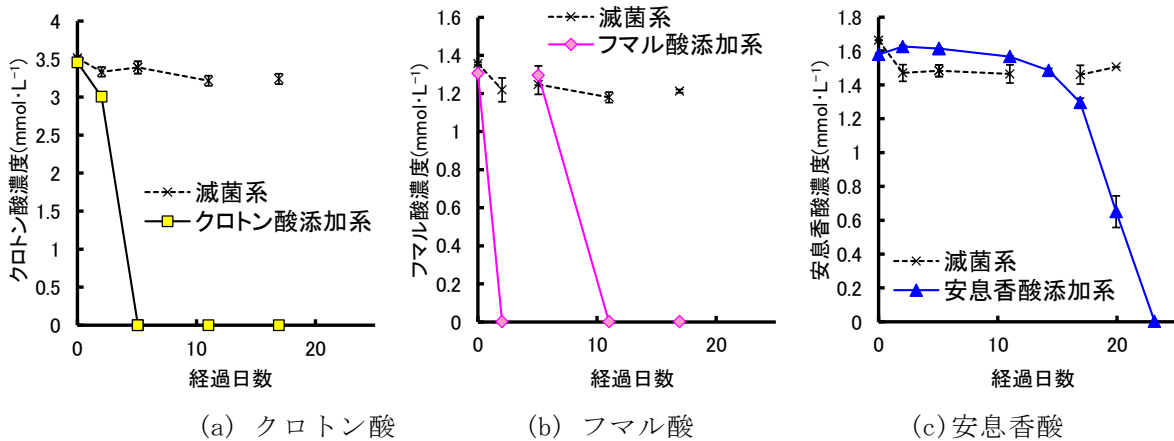
有機物がベンゼン分解を促進する際に考えられる役割として、次の二点が挙げられる。まず、ベンゼン分解微生物がベンゼン以外の有機物を生育基質として利用し増殖できる可能性である。ベンゼンの代謝産物である安息香酸、クロトン酸などが有力な候補として考えられる。次に、ベンゼン分解反応において利用される物質である。ベンゼン分解の推定代謝産物であるトルエンを分解する際、メチル基にフマル酸が付加する反応が知られ、同様に安息香酸の分解にもクロトン酸が用いられる反応が知られている。

これらのことから、ベンゼン分解培養系に有機物、特にベンゼン分解経路に関わるような有機酸を添加し、ベンゼン分解活性への影響を観察することで、ベンゼン分解微生物の活性化、安定的な培養条件の検討を行った。有機酸として、ベンゼンの代謝経路に存在すると考えられる安息香酸に加え、クロトン酸、フマル酸を用いた。



(a) ベンゼン濃度の経時変化 (b) メタン生成量の経時変化

図 2 7 ベンゼン濃度とメタン生成の経時変化



(a) クロトン酸 (b) フマル酸 (c) 安息香酸

図 2 8 有機酸濃度の経時変化

表 7 添加有機酸のメタン生成分解反応式と生成メタン量

メタン生成分解反応式	投与化合物あたり発生メタン量 (mol/mol)	投与量 (μmol)	想定メタン発生量 (μmol)	実測メタン発生量 (31日目) (μmol)
安息香酸 $4C_6H_5COOH + 31H_2O \rightarrow 15CH_4 + 13HCO_3^- + 13H^+$	3.75	22.5	84.375	88.2
クロトン酸 $C_4H_5O_2^- + 4H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^- + H_2 + H^+$	2	67.5	135	149.5
フマル酸 $2C_4H_2O_4^{2-} + 7H_2O \rightarrow 3CH_4 + 5HCO_3^- + 3H^+$	1.5	45	67.5	73.4
酢酸 $C_2H_3O_2^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	1	50.625	50.625	61.9

図 2 7 (a) から有機酸を添加していない系で最もベンゼン分解が進んでいることが観察される。それぞれ添加した有機酸の分解とベンゼン分解、メタン生成の関連について以下でまとめ、考察

を与える。安息香酸、クロトン酸、フマル酸がメタンへと分解されるメタン生成反応式と投与した有機酸の量から想定されるメタン生成量と、実際に測定したメタン生成量を表7に示した。

酢酸は表7に示した反応式のように、酢酸資化性メタン生成細菌により、メタンと二酸化炭素へ分解される。酢酸を添加した系において、メタンは0日目から直線的に生成し、10日目以降はメタン生成速度が鈍化した(図27(b))。このことから、11日目には全てがメタンへと分解されていると考えられる。ベンゼンの濃度は、酢酸が残存していると考えられる11日目まではほぼ横ばいであり、11日目以降で、ベンゼン分解速度が向上していることが観察される。これにより、ベンゼン分解は酢酸の存在によって阻害を受ける可能性が示唆された。

クロトン酸は2~5日の間に不検出となった(図28(a))。クロトン酸を投与した量から想定されるメタン生成量と、メタン生成量の実測値のバランス、メタンの生成速度を観察すると、17~20日目にはメタンへと完全に分解されていると考えられる。メタンの生成速度は酢酸添加系とほぼ同じであり、クロトン酸2~5日の間に速やかに酢酸まで分解され、その後酢酸として蓄積し、メタン生成に用いられていた可能性が考えられる。

フマル酸は、実験開始後、2日目までには不検出(図28(b))であり、8日目に再添加したのちも、次の測定を行った11日目にはすでに不検出となった。クロトン酸を投与した量から想定されるメタン生成量と、メタン生成量の実測値のバランス(表7)、メタンの生成速度(図27(b))を観察すると、フマル酸は19~22日にはメタンへと変換されていると考えられる。ベンゼン濃度は、フマル酸の全てがメタンへと分解された22日前後までほぼ横ばいであり、ベンゼン分解に大幅な遅延が見られた。これは、Coatesら⁵⁾が硝酸還元条件での純粋分離株 *Dechloromonas strain RCB* に対してフマル酸を添加したところ、ベンゼン分解にはなんらの影響も見られなかったことに反する結果であり、本研究で得られたベンゼン分解が *Dechloromonas strain RCB* の行うベンゼン分解とは異なる機構によっていることを示唆している。

嫌気環境下でのフマル酸の反応には、トルエンへの付加反応だけではなく、自身が分解される反応も存在する。特に、電子受容体として働き、コハク酸(Succinate)に還元されるフマル酸呼吸が起こることが知られている。コハク酸は、プロピオン酸生成細菌のコハク酸—プロピオン酸経路によって、嫌氣的にプロピオン酸へと変化する。プロピオン酸は嫌気環境下で難分解性であるが、最終的には酢酸へと代謝される(図29)。そして、酢酸がメタン生成に用いられることになる。

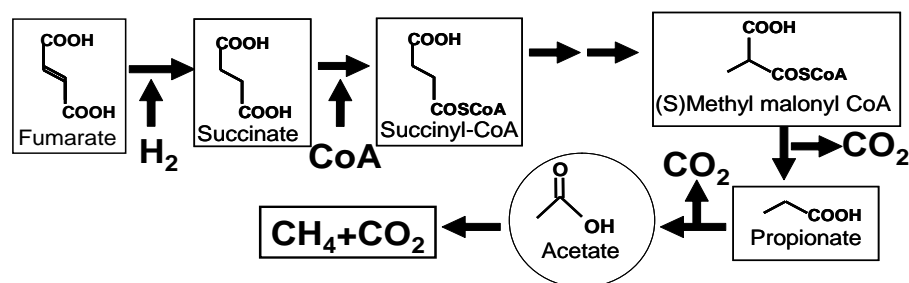


図29 フマル酸嫌気代謝経路

フマル酸が実験開始直後に不検出となったにもかかわらず、メタンがゆっくりとしか生成しなかったこと(図27(b))から、コハク酸、プロピオン酸といったフマル酸分解の中間代謝産物が

蓄積し、メタン生成が遅延していたと考えられる。また、メタン生成条件でプロピオン酸がベンゼン分解を阻害するという報告⁶⁾もあり、これらの中間代謝産物の存在がベンゼン分解を阻害していた可能性が示唆される。

安息香酸は、実験開始後 11 日目から分解が始まり、23 日目には検出限界と同程度の値であった (図 28 (c))。安息香酸はメタンの増加分 (図 27 (b)) から、25 日目にはメタンへと変換されていることが推測される。ベンゼン濃度は、クロトン酸と同じような推移を示し、ベンゼン分解に若干の遅延が認められた。

これらのことから、安息香酸のメタンへの分解は、安息香酸自身の変換が律速段階となり、メタン生成が緩やかに生じたと考えられる。クロトン酸と酢酸では、酢酸からのメタン生成段階が律速段階、フマル酸ではフマル酸の中間代謝産物 (プロピオン酸などが候補として考えられる) の分解、安息香酸は安息香酸自身の分解が律速段階となっていたと考えられる。

ベンゼン分解とメタン生成、投与有機酸の分解を見ると次のことが推察される。まず、投与した有機酸およびその代謝産物 (酢酸などが考えられる) が存在することで、ベンゼン分解の開始が遅れる。有機酸等が分解された後、ベンゼン分解が開始する。安息香酸とクロトン酸、酢酸はベンゼンが経由すると考えられる **Benzoyl-CoA** の代謝産物であるため、これらが多量に存在することで、ベンゼン分解で得られる自由エネルギーが減少しベンゼン分解を阻害していたと考えられる。ベンゼン分解がはじまると、ベンゼン分解速度自体には大きな違いはない。このことから、本培養系で与えた有機酸を分解しているのはベンゼン分解菌ではない可能性が高い。これらの有機酸が、ベンゼン分解菌を直接増加させる基質としては働かない、もしくは、ベンゼン分解菌による摂取速度が遅い物質であると考えられる。

3) 汚染地下水を用いた検討

表 8 に、採水した各地点における地下水の水質分析結果を示す。ORP_{SHE}、DO から各地点の地下水の嫌気度をみると、ORP_{SHE} は c-6 地点で最も低く約 4.5mV であるが、d-1 地点では約 120mV、e-2 地点では約 67mV になっており、DO も全ての地点において 0.7 mgO/L 以上であった。ORP_{SHE}、DO の測定は、地下水井から採水した直後に行ったが、採水操作中に酸素の混入が生じた可能性が考えられる。本研究では、採水後に L-システインを還元剤として添加しているため、分解試験に用いた地下水については実験開始時の DO は全ての地点において約 0.1mgO/L であった。

また、TOC 濃度は c-6 地点では約 20mgC/L、d-1、e-2 地点では約 10mgC/L と、高い値を示している。バイオレメディエーションのために投入された有機物資材がこの高い有機物濃度に影響を与えているものと考えられる。各地点のイオン濃度をみると、c-6 地点では Cl が、d-1 地点では SO₄ が多く、同じ N 地区であっても地点によって地下水の水質は大きく異なっていることがわかる。

表 8 地下水の水質分析結果

地点名	ORP _{SHE} (mV)	DO (mgO/L)	TOC (mgC/L)	Cl (mg/L)	Br (mg/L)	NO ₂ (mg/L)	NO ₃ (mg/L)	SO ₄ (mg/L)
c-6	4.5	1.07	22.5	120	1.87	<0.01	<0.01	<0.01
d-1	120	0.71	13.5	<0.01	1.13	0.53	0.91	68
e-2	67	0.84	11.7	<0.01	1.33	<0.01	<0.01	1.18

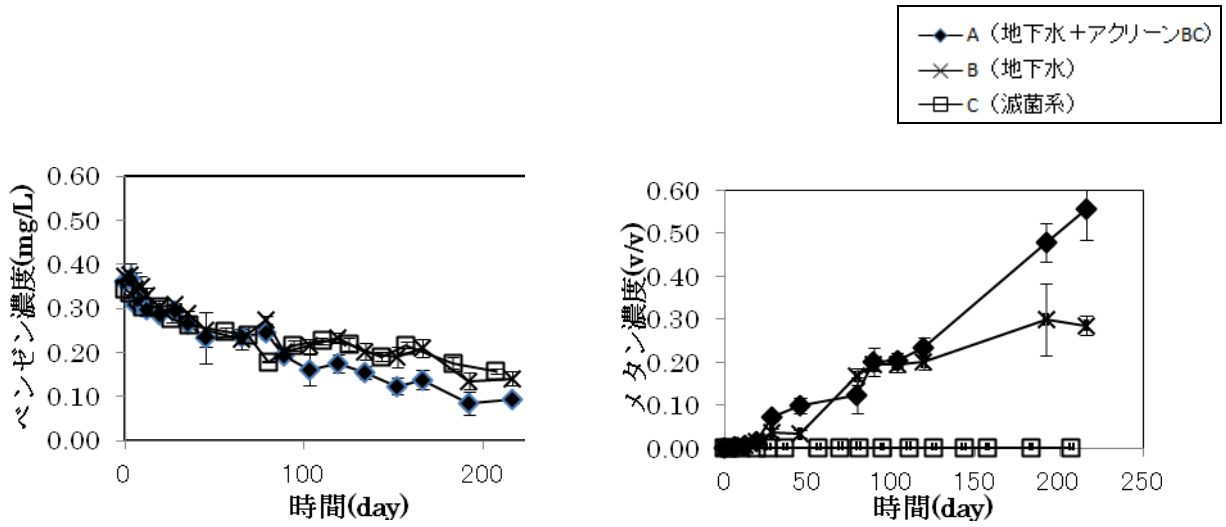
次に、図 30 にベンゼン分解試験における各地点の地下水中のベンゼン・メタン濃度の経時変

化を示す。試験開始直後からアクリンBC添加系、無添加系ともにベンゼン濃度は減少したが、滅菌系と比べて全く差は見られなかった。よってこの期間におけるベンゼンの減少は微生物分解によるものではなく、ベンゼン濃度測定時における損失などであると考えられた。滅菌系を除くいずれの試験系においても、試験開始直後からメタンの生成は確認されていることから、試験系がすべて嫌気的な環境にあることが確認された。

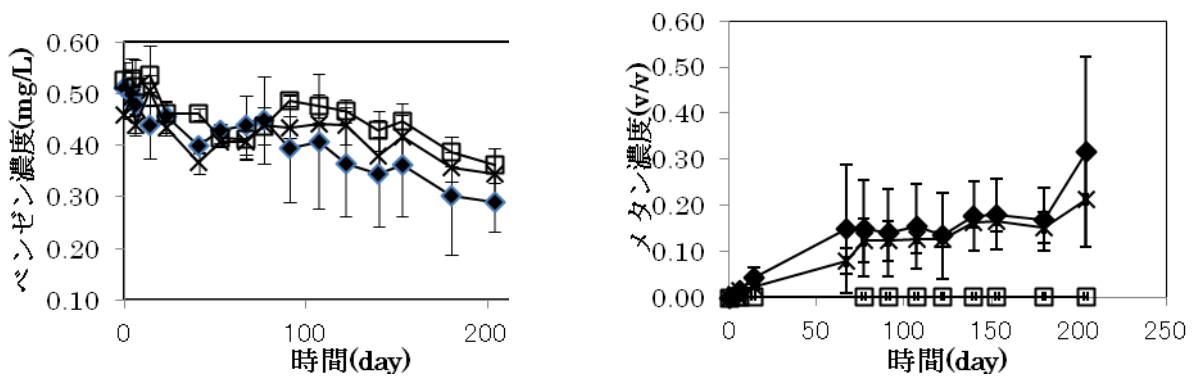
更に観察を続けたところ、e-2地点の地下水では試験開始後80日後、d-1地点の地下水では試験開始後50日後以降も、アクリンBC無添加系と滅菌系は引き続き全く差がなかったのに対し、アクリンBC添加系のベンゼン濃度は無添加系、滅菌系と比べてより大きく減少し始めた。e-2地点、d-1地点いずれの地下水の場合においてもその差は有意水準5%で統計的に有意であった。このことから、これらの地点の地下水において、アクリンBCを添加することでベンゼンの微生物分解が起こりうることが示された。c-6地点でもアクリンBC添加系のベンゼン濃度が80日後ごろから他と比べて若干低く推移したが、有意差は見られなかった。

一方で、アクリンBCを添加しない場合には全ての地点の地下水において微生物分解は確認されず、汚染現場でベンゼン濃度の減少が観測されているという知見や現場試料を持ち帰っての回分分解試験の結果を裏付けるものとはならなかった。本研究では地下水に対し還元剤であるL-システインを添加することで完全に嫌気的な条件とし、またそのことがメタンの生成から確認できている。一方、今回採水した地下水の現地でのDOは約1mgO/Lであり、ベンゼンの好氣的分解に十分な量である。このため、汚染現場やトリータビリティテストにおいては、好氣的な分解が起こっていた可能性もある。また汚染現場においては、ベンゼン濃度は微生物分解以外にも地下水の移流による影響も受けている。

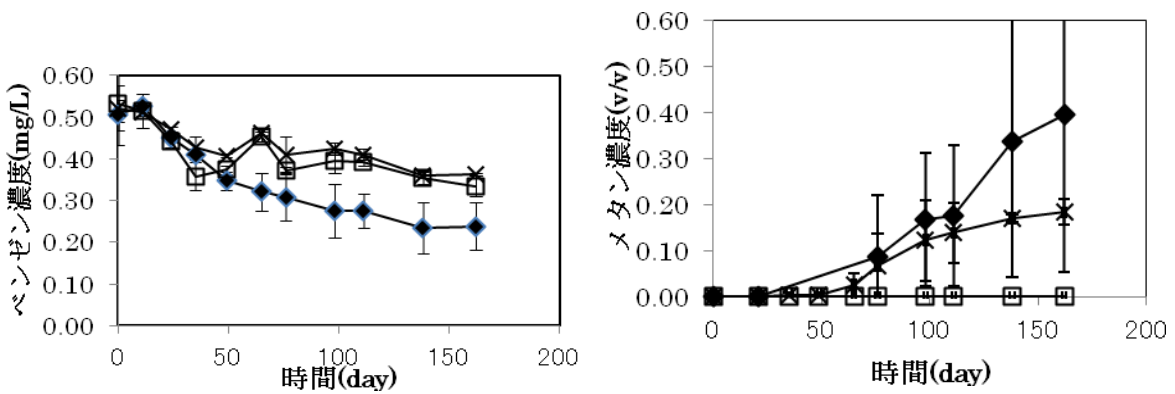
また、メタン濃度に着目すると、今回の実験では全ての地点の地下水において、メタン濃度はアクリンBC添加系で最も高い値を示している。アクリンBCの主成分は有機酸であり、この有機酸は嫌気的条件下において酢酸、二酸化炭素、水素へと分解され、最終的にメタンにまで分解されると考えられている。このことから、地下水中に添加したアクリンBC中に含まれる有機酸がメタンまで分解を受けていることが明らかになった。



a) e-2地点



b) c-6地点



c) d-2地点

図30 各地点地下水におけるベンゼン濃度の変化

アクリンBCによるベンゼン分解への影響には主に2つの可能性が考えられる。一つは、ベンゼン分解を担う微生物がアクリンBC中に含まれる有機酸等の有機物を分解して増殖できる可能性である。もう一つは、有機酸がベンゼン分解微生物とは異なる微生物により分解されることで、培養系がより還元的な状態となり、ベンゼン分解が進行しやすい環境が作られる、というものである。いずれの場合でも、有機酸の分解が多く見られた地点の地下水においてベンゼン分解が進行したことから、今回のベンゼン濃度の減少にはこの有機酸が関わっている可能性が示唆された。このほか、アクリンBCに含まれる炭酸水素ナトリウムによる炭酸の供給やpH緩衝能なども影響する可能性は否定できない。今後いずれかの物質を加えて試験を行うなど、さらに検討が必要である。

(3) バイオオーグメンテーションによる汚染地下水浄化試験

1) 集積培養系混合比の検討

ベンゼン濃度の変化を図3-1に示す。ベンゼン濃度は、混合比1:1の滅菌系を除く全ての系、混合比5:1のアクリンBC添加系及び無添加系、混合比10:1のアクリンBC添加系で明らかに減少しており、これらの系で微生物によるベンゼン分解が起きたことが確認された。それ以外の系では実験開始から100日間経過後もベンゼン分解はみられなかった。

ベンゼン分解が開始されるまでに要した時間は、1:1混合系のアクリンBC添加系で約5日、無添加系で7日、L-システイン添加系で16日であり、5:1混合系のアクリンBC添加系で12日、無添加系で18日であり、10:1混合系のアクリンBC添加系で25日であった。ベンゼン分解が進行した系についてベンゼン濃度が十分減少した後に再度ベンゼンを添加したところ、遅滞なく分解されることが確認された。また、5:1, 10:1, 50:1, 100:1混合系では、明らかなベンゼン減少がみられなかった系においても、滅菌系と比較したときにベンゼン濃度が低くなるということが確認された。

混合比1:1の滅菌系を除く全ての系、混合比5:1のアクリンBC添加系及び無添加系、混合比10:1のアクリンBC添加系で微生物による嫌氣的分解が進行することが確認された。また、この時に系内はメタン生成条件であったこと(図3-2)から、この嫌氣的ベンゼン分解がメタン生成条件下で進行したことが明らかになった。集積培養系の混合比率を下げるほど、ベンゼン分解は進行しにくくなり、ベンゼン分解進行のためには集積培養系に含まれる微生物群集、または有機物や無機物等が一定割合以上必要であることが示唆された。また、微生物の解析結果から考えると、集積培養系の添加量を上げることで、Hasda-Aの存在比率を一定以上に保ちやすくなり、ベンゼン分解が進行しやすくなるのではないかと考えられる。

集積培養系を添加した系では、ベンゼン分解が明らかでない系においても滅菌系と比べ他の系でベンゼン濃度が減少しており、培養初期には集積培養系による嫌氣的ベンゼン分解が進行し、その後何らかの理由でベンゼン分解が停止したと考えられる。分解が進行しなくなる理由としては、系内の微生物がベンゼン以外の有機物を利用することで、Hasda-A等のベンゼン分解微生物の存在比率が低下するということが考えられる。

1:1混合系、5:1混合系、10:1混合系ではアクリンBC添加系においてベンゼン分解開始までのラグタイムは最も短くなった。このことより、アクリンBCがベンゼン分解を促進した可能性が示唆された。アクリンBCがベンゼン分解を促進した可能性としては、アクリンBCに含まれる

クエン酸が嫌氣的に分解され有機電子受容体を生成し、ベンゼン分解における電子受容体として働いた可能性と、クエン酸及びその分解産物自体がHasda-A等のベンゼン分解微生物によって基質として利用されたという可能性の2つが考えられる。

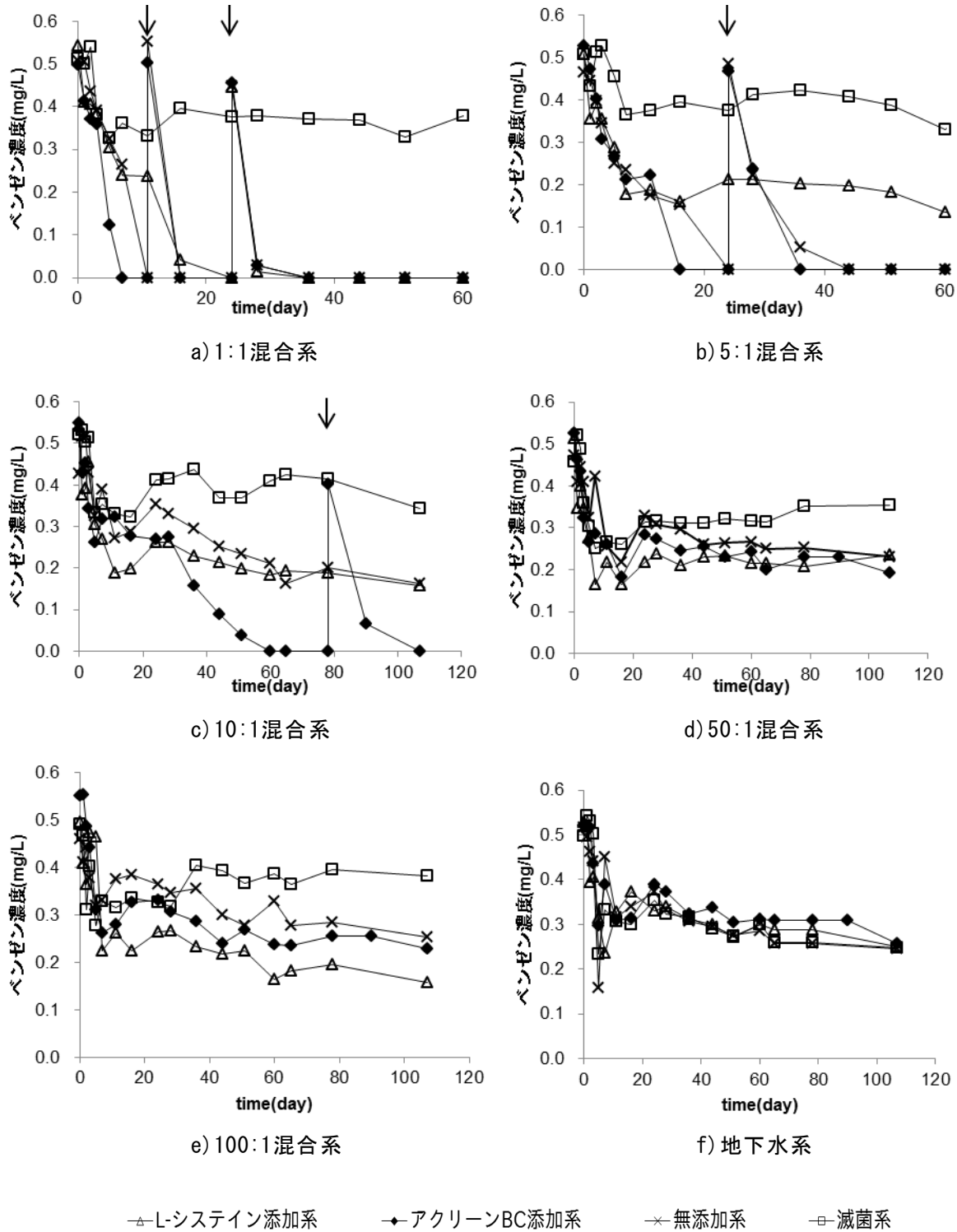


図 3 1 各混合比におけるベンゼン濃度の経時変化。

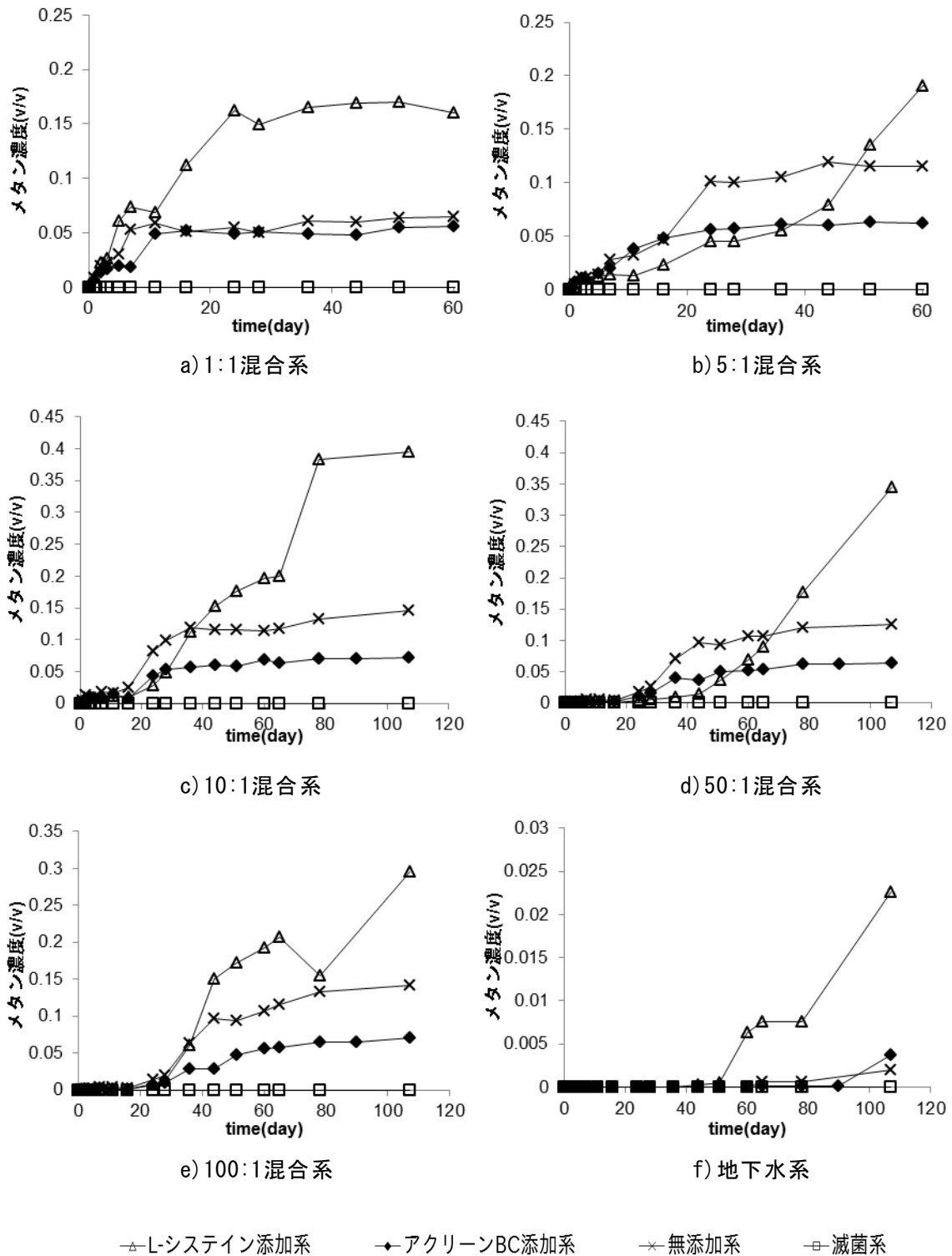


図 3 2 各混合比におけるメタン濃度の経時変化。

2) 有機電子受容体添加試験

表 9 に汚染地下水の水質を示す。本試験で用いた地下水は、全地点において ORP_{SHE} が 100mV 以上、

DOが0.3mgO/L以上と高い値を示している。これは、今回の試験に用いたT1、T2地点の地下水は、前節の結果を踏まえて還元剤L-システインを添加してないことに起因していると考えられる。また、陰イオンの測定結果をみると、硫酸イオン濃度がT1地点では166mg/L、T2地点では986mg/Lであり、ともに高い値を示している。このことから、T1、T2地下水を用いた試験では系内が硫酸還元的雰囲気になる可能性がある。

表 9 実験直前の地下水の水質

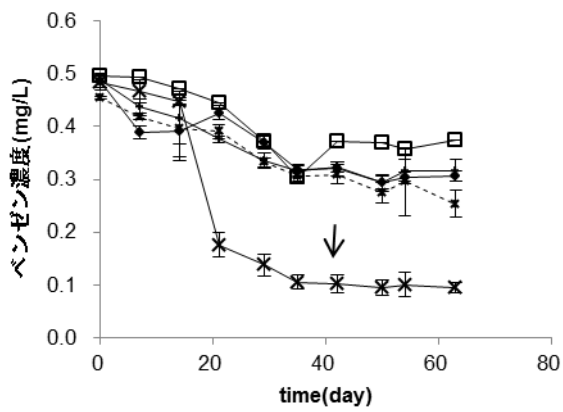
地点名	ORP _{SHE} (mV)	DO (mgO/L)	TOC (mgC/L)	Cl (mg/L)	Br (mg/L)	NO ₂ (mg/L)	NO ₃ (mg/L)	PO ₄ (mg/L)	SO ₄ (mg/L)	ベンゼン (mg/L)
T1	324	0.72	11	937	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	166	0.3
T2	340	0.54	7	1392	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	968	<0.05
N-d-1	131	0.36	50	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.05

T1、T2、N-d-1地点それぞれの地下水を用いた実験結果を図 3 3 - 3 5 に示す。試験した地下水全てにおいて、5:1、10:1混合系の無添加系のみでベンゼン濃度は滅菌系と比較して明確に減少しており、微生物による嫌氣的ベンゼン分解が進行したことが確認された。分解開始までに要した時間は、T1地点では5:1、10:1系ともに約20日、T2地点では5:1系では約10日、10:1系では約20日、N-d-1地点では実験開始直後からであった。

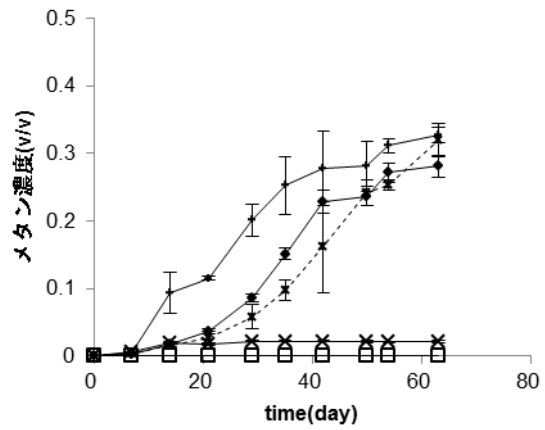
ただし、T1地点では、一旦ベンゼン分解の進行がみられたものの、その後ベンゼン分解の停止がみられた。T1地点では実験開始時に系内に硫酸塩が残存していたため、集積培養系が硫酸還元条件でベンゼン分解を行い、その後硫酸塩の枯渇によりベンゼン分解が停止したという可能性が考えられた。ベンゼン分解が止まった時点の硫酸濃度を測定したところ、検出下限値（5mg/L）以下であったため、硫酸塩の添加（Na₂SO₄ 40mg/L、ベンゼン分解の必要量の約10倍）を行ったが、ベンゼン分解は進行しなかった。一方でT2、N-d-1地点では、ベンゼンは検出下限値以下まで下がり、その後ベンゼンを再添加した後もラグタイムなしでベンゼン分解は進行したことが確認された。

メタンは、集積培養系及び易分解性有機物を添加した全ての系において生成が確認された。図では確認しづらいものの、無添加系においてもT1地点の5:1、10:1系、T2地点の5:1系、N-d-1地点の5:1系においてもメタンは生成しており、これらの系でメタン生成条件が作られたことが確認された。

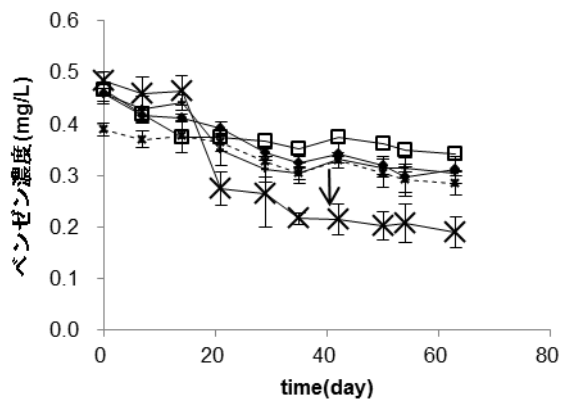
クエン酸、グリシン、フマル酸のそれぞれを添加した系では、グリシンが最も早くメタンへと分解され、次いでクエン酸、フマル酸の順にメタンへの分解を受けやすいことが確認された。しかしながら、いずれの有機物を添加した場合においてもベンゼン分解に対する阻害効果が見られなかった。



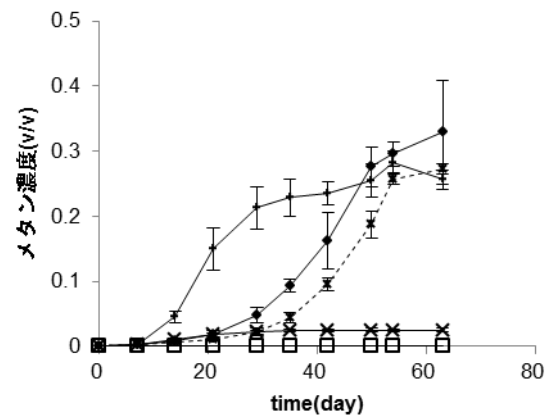
a) 5:1系 ベンゼン濃度



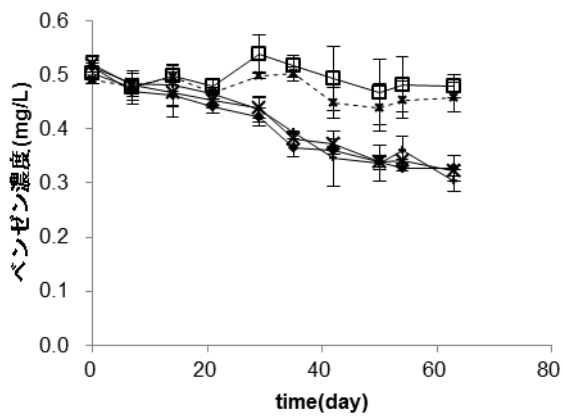
b) 5:1系 メタン濃度



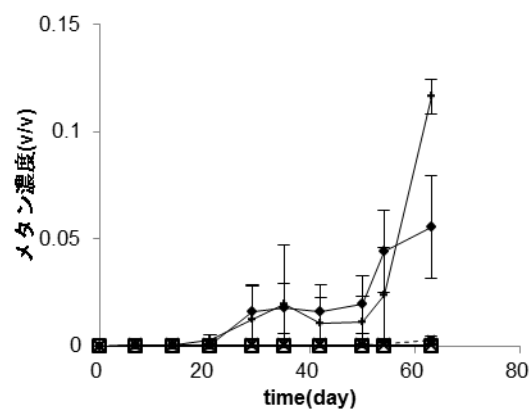
c) 10:1系 ベンゼン濃度



d) 10:1系 メタン濃度



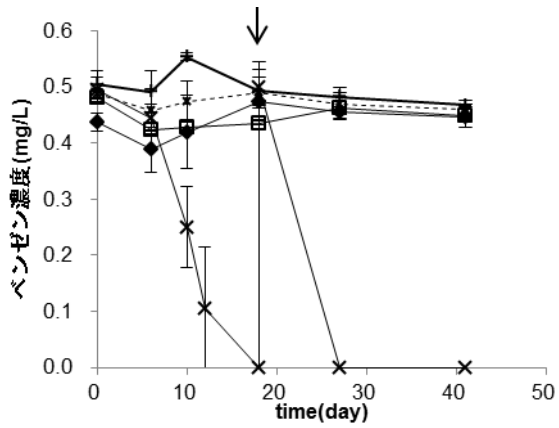
e) 地下水系 ベンゼン濃度



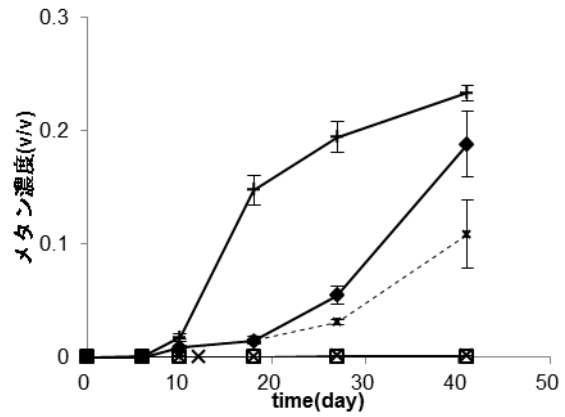
f) 地下水系 メタン濃度

—□— 滅菌 —●— クエン酸 —▲— グリシン —×— フマル酸 —*— 無添加

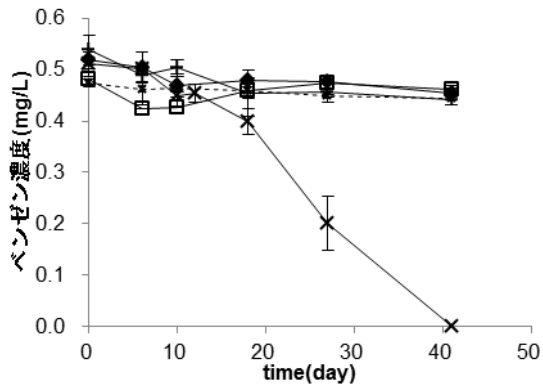
図 3 3 T1地点集積培養系添加試験におけるベンゼン・メタン濃度の変化
(矢印は硫酸塩の添加を示す)



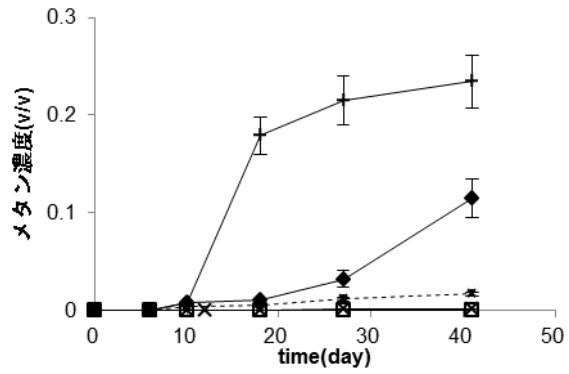
a) 5:1系 ベンゼン濃度



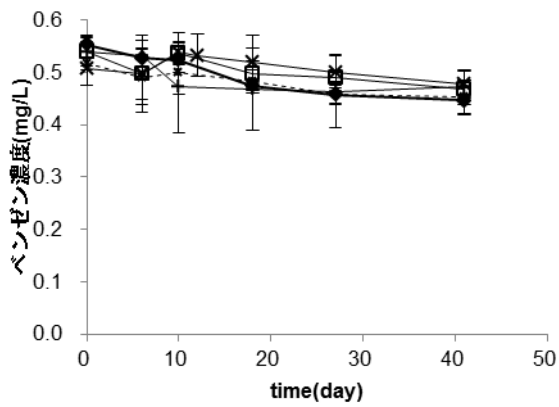
b) 5:1系 メタン濃度



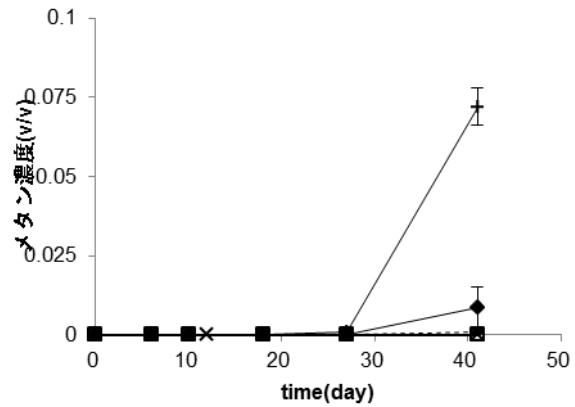
c) 10:1系 ベンゼン濃度



d) 10:1系 メタン濃度



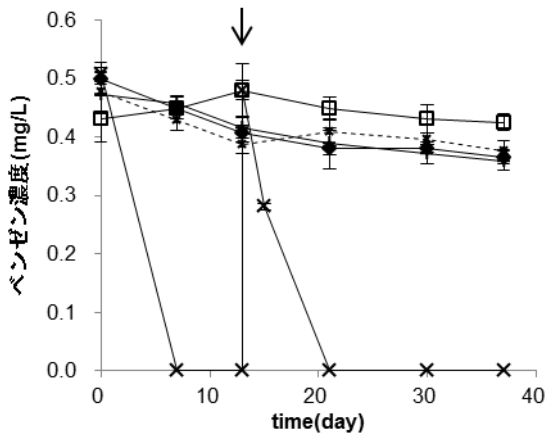
e) 地下水系 ベンゼン濃度



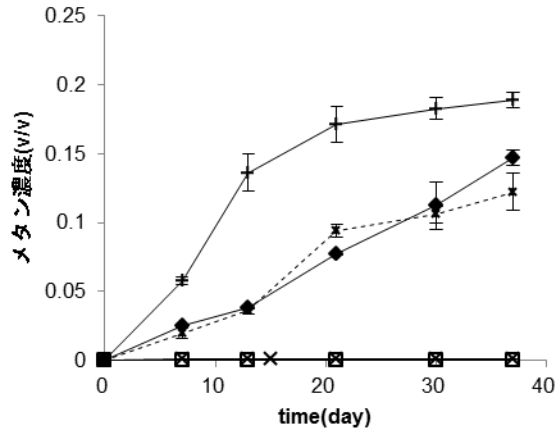
f) 地下水系 メタン濃度

□ 滅菌 ◆ クエン酸 ○ グリシン △ フマル酸 × 無添加

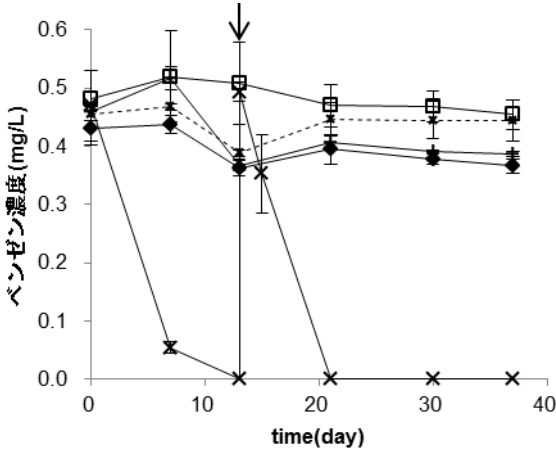
図3-4 T2地点集積培養系添加試験におけるベンゼン・メタン濃度の変化
(矢印はベンゼンの再添加を示す)



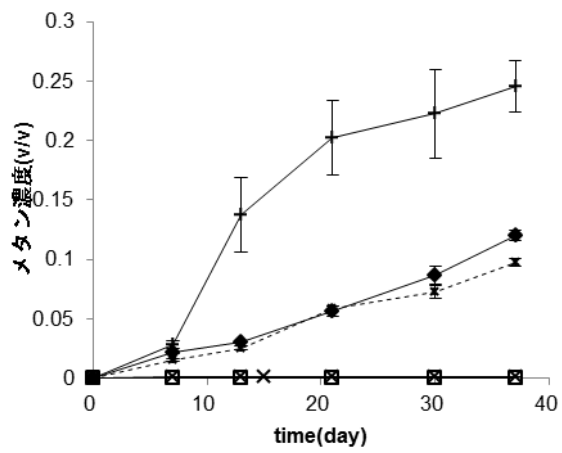
a) 5:1系 ベンゼン濃度



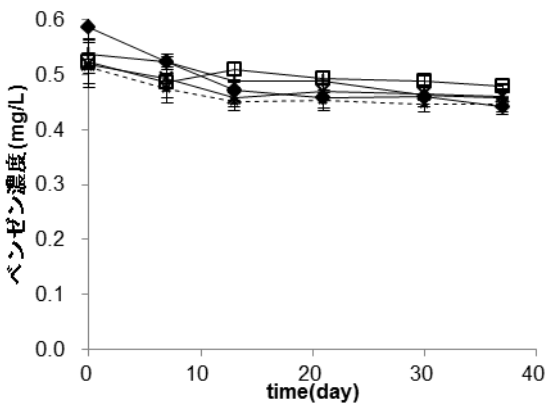
b) 5:1系 メタン濃度



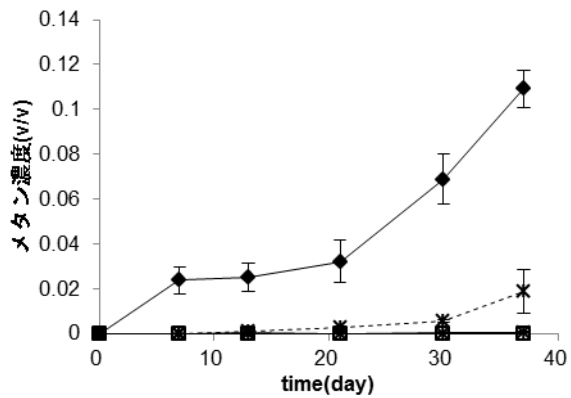
c) 10:1系 ベンゼン濃度



d) 10:1系 メタン濃度



e) 地下水系 ベンゼン濃度



f) 地下水系 メタン濃度

—□— 滅菌 —◆— クエン酸 —○— グリシン - - * - - フマル酸 —×— 無添加

図 3 5 N-d-1地点集積培養系添加試験におけるベンゼン・メタン濃度の変化
(矢印はベンゼンの再添加を示す)

(4) ベンゼン分解を起こすための条件についての考察

表10に、本研究で実施したすべての試験結果において、有機物を添加した場合のベンゼン分解への影響と、メタン生成の関係についてまとめた。なお、アクリーンBC添加系については、アクリーンBCの主成分がクエン酸であることから、クエン酸としてまとめてある。有機酸の添加効果はベンゼン分解に対して促進的に働く場合と、阻害的に働く場合両方があり、本研究で得られた結果のみでは有機酸の添加自体がベンゼン分解に与える影響は確定的ではない。しかし、ベンゼン分解に阻害的に働く場合には、有機酸を添加しない場合に比べてメタン生成量が増大する(=メタン生成が亢進する)結果が、逆にベンゼン分解に促進的に働く場合にはメタン生成が抑制される結果が得られている。この結果より、ベンゼン分解とメタン生成とに密接な関係があることが示唆された。

表10 有機物添加によるベンゼン分解への影響とメタン生成の関係

実験系 (汚染地下水採水年/月)	実験系名称	添加有機酸	ベンゼン分解		メタン生成	
			促進(+)/阻害(-)	亢進(+)/抑制(-)		
集積系		酢酸	-	+		
集積系		クロトン酸	-	+		
集積系		フマル酸	-	+		
集積系		安息香酸	-	+		
集積系+汚染地下水(11/10)	5:1混合系	クエン酸	+	-		
集積系+汚染地下水(11/10)	5:1混合系	L-システイン	-	+		
集積系+汚染地下水(11/10)	10:1混合系	クエン酸	+	-		
集積系+汚染地下水(12/5)	5:1混合系	クエン酸	-	+		
集積系+汚染地下水(12/5)	10:1混合系	クエン酸	-	+		

この結果を踏まえ、クエン酸を例にとって、ベンゼンの分解とメタン生成の関係について考察する。ベンゼンの安息香酸以降の分解では、分解過程で酢酸及び水素を生成する。反応における自由エネルギー変化の関係より、これらの生成物はなるべく除去されることが望ましい。対して、クエン酸の嫌氣的分解では、2通りの分解経路がある。一方はフマル酸等の中間代謝産物(ここでは酸化型の中間代謝産物と呼ぶ)が酸化還元反応により有機電子受容体として働き得る経路である。他方はピルビン酸から直接酢酸を生成する反応経路であり、酢酸は最終的にメタンへと分解される。この反応経路では酸化還元反応を伴わず、電子の授受は行われない。ここで、クエン酸分解が酸化還元反応を伴う場合、クエン酸からはプロピオン酸が生成する。プロピオン酸は嫌気条件では分解されにくく、メタン生成は起こりにくい。この反応の途中で生成する酸化型の中間代謝産物はベンゼン分解反応によって生成する還元力の消費(=電子の受容)にも使われ、ベンゼン分解を担う微生物とクエン酸分解を担う微生物が共生関係を作り、ベンゼン分解を進行させることもあり得ると考えられる(図36)。この還元力の消費により、ベンゼン分解は促進される。よって、メタン生成が抑制された条件でベンゼン分解が促進する可能性がある。

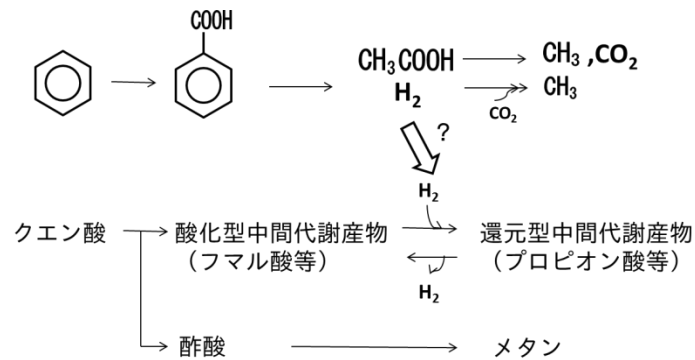


図 3 6 推定される嫌氣的ベンゼン分解とクエン酸分解の概念図

一方で、クエン酸から直接酢酸を生成する経路で分解が進行した際には、酸化還元反応は起こらないため、ベンゼン分解は促進されない。それだけでなく、酢酸からのメタン生成が何らかの理由で滞り、酢酸の蓄積が起こるような場合は、ベンゼンの分解産物の蓄積によるベンゼン分解の阻害が考えられる。酢酸や水素の蓄積が嫌氣的ベンゼン分解を阻害することは、硫酸還元条件下において示されている⁷⁾。

このように、メタン生成が抑制された条件にできれば、ベンゼン分解を促進させることができる可能性がある。有機酸分解経路をメタン生成が抑制されるように制御することで、ベンゼン分解促進手法としての活用が期待される。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究では、以下の3つの結論が得られた。

- 1) ベンゼン分解微生物群集の群集構造には共通点が多く、いずれも *Syntrophus* 属類縁の *Desulfobacterales* 目細菌 *Hasda-A* が主なベンゼン分解微生物として推定された。
- 2) ベンゼン分解微生物集積培養系を用いて、汚染地下水のバイオオーグメンテーションが可能であることが示された。
- 3) 嫌気ベンゼン分解の促進因子として、有機電子受容体が有効となる場合があり、なおかつメタン生成が抑制的である時に有効となる可能性が示唆された。

1) については、メタン生成条件でベンゼンを分解できる微生物群集は多様であるものの、その構造には共通点がきわめて大きく、*Anaerolineaceae*, *Peptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Syntrophaceae*, *Clostridiaceae* などを中心とした微生物群集構造となっていることが明らかとなった。また、ベンゼン分解微生物としては、これまでに我々が報告しているベンゼン分解微生物 *Hasda-A* が、全く異なる3地点由来の集積培養系においてもベンゼン分解微生物として推定された。このことより、*Hasda-A* のベンゼン分解微生物としての普遍性が示されたと思われる。加えて、*Coriobacteriaceae* 近縁種も標識ベンゼン由来の炭素を同化していたことから、あらたなベンゼン分解微生物である可能性も示された。メタン生成条件におけるベンゼン分解微生物については、我々の知る限り現在までに明確な特定がなされていない。よって本研究により得られた成果は、世界的にみても新規性の高い成果である。

2) については、汚染地下水に対して約10%の集積培養系を加えることで、ベンゼン分解を起こすことが可能であることがわかった。今後、この割合を下げることであれば、実際にバイオオーグメンテーション法として汚染地下水の浄化手法として開発できる可能性がある。

3) については、塩素化エチレン類の脱塩素に用いられる有機物資材を汚染地下水に添加し嫌氣的に培養したところ、ベンゼンの嫌気分解が観察された。このことより、易分解性有機物の添加によりベンゼン汚染地下水の分解が起こりうることが示された。さらに、さまざまな条件で行った有機物の添加試験の結果を総合することで、嫌気ベンゼン分解の促進因子として、有機電子受容体が有効となる場合があり、なおかつメタン生成が抑制的である時に有効となる可能性が示唆された。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

ベンゼン汚染土壌・地下水の浄化手法として、既往の好氣的生物学的浄化（バイオレメディエーション）手法のみならず、嫌氣的バイオレメディエーション手法も今後開発対象として考慮すべきであることが示された。汚染土壌・地下水の浄化が進まないのは、浄化にかかるコストが高いことが原因の1つである。より低コスト、低エネルギー型の汚染土壌・地下水浄化技術として、嫌氣的バイオレメディエーションの開発を推進し、実用化していくことで、汚染土壌・地下水の浄化を促進し、安全な国土の保全と創出に寄与できると考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 舛本弘毅、栗栖太、春日郁朗、古米弘明（2012）メタン生成嫌気ベンゼン分解集積培養系に及ぼす有機酸と温度の影響. 水環境学会誌, 197-204.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 高橋惇太、栗栖太、古米弘明：第48回環境工学研究フォーラム（2011）「集積培養系に

よるメタン生成ベンゼン分解及びトリクロロエチレン脱塩素化の同時進行」

- 2) 野口 愛, 栗栖 太, 春日 郁朗, 古米 弘明 : 第46回日本水環境学会 (2011) 「河川底泥由来メタン生成集積系におけるベンゼン分解微生物の安定同位体プローブ法による検出」
- 3) Noguchi, M., Kurisu, F., Kasuga, I. and Furumai, H. (2012) The Community Analysis of a Methanogenic Benzene-Degrading Enrichment Culture Using Stable Isotope Probing and Pyrosequencing, Water and Environment Technology Conference 2012, 18.
- 4) Noguchi, M., Kurisu, F., Kasuga, I. and Furumai, H. (2012) The Detection of Benzene-Assimilating Bacteria in Methanogenic Enrichment Culture Originated from River Sediment Using Stable Isotope Probing, International Symposium on Microbial Ecology (ISME-14), Copenhagen, Denmark.
- 5) 高橋惇太, 栗栖太, 永井宏征, 岸正博, 春日郁朗, 古米弘明 (2013) 実汚染地下水における嫌氣的ベンゼン分解に対するメタン生成ベンゼン分解集積培養系の添加効果, 第47回日本水環境学会年会講演集, 83.
- 6) 舛本弘毅, 栗栖太, 春日郁朗, 古米弘明 (2013) メタン生成嫌気ベンゼン集積培養系に及ぼす有機酸添加の影響, 第47回日本水環境学会年会講演集, 85.

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Sakai, N., et al., Identification of putative benzene-degrading bacteria in methanogenic enrichment cultures. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009. **108**(6): p. 501-507.
- 2) 青森・岩手県境不法投棄現場の原状回復対策協議会資料.
- 3) 舛本ら, 未発表.
- 4) Ulrich, A.C. and E.A. Edwards, Physiological and molecular characterization of anaerobic benzene-degrading mixed cultures. Environ Microbiol, 2003. **5**(2): p. 92-102.

- 5) Coates, J.D., R. Chakraborty, and M. J. McInerney, Anaerobic benzene biodegradation - a new era. *Research in Microbiology*, 2002. **153**(10): p. 621-628.
- 6) Weiner, J.M. and D.R. Lovley, Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. **64**(5): p. 1937-1939.
- 7) Rakoczy, J., et al., Effects of hydrogen and acetate on benzene mineralisation under sulphate-reducing conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011. **77**(2): p. 238-247.

Development of Anaerobic Bioremediation Technology for Benzene-contaminated Soil and Groundwater

Principal Investigator: Futoshi KURISU

Institution: Research Center for Water Environment Technology, Graduate
School of Engineering, The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656 JAPAN
Tel: +81-3-5841-7445 / Fax: +81-3-5841-8528
E-mail: kurisu@env.t.u-tokyo.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Benzene, Bioremediation, Soil pollution, Groundwater pollution, Anaerobic treatment, Stable isotope probing, Next generation sequencing, Biostimulation, Bioaugmentation

Biological cleanup of contaminated soil and groundwater, namely bioremediation, can be the best technique for benzene-contaminated sites especially for the contamination in wide area and at low concentration. While aerobic treatment techniques have already been in practical use, anaerobic processes, which require less cost and energy, have not yet been developed well due to the slower degradation. Among different anaerobic conditions, degradation under nitrate reducing condition has been studied most and the degradation mechanisms in the other conditions such as methanogenic conditions are less known. Methanogenic condition has advantage over nitrate reducing condition because it does not require addition of nitrate, which is also a regulated compound in groundwater. This project aimed to develop techniques for anaerobic benzene bioremediation as low cost and low energy option for cleanup of benzene-contaminated soil and groundwater, particularly under methanogenic condition. Specifically, we extracted factors to control benzene degradation from experimental results under various conditions of benzene degradation.

Monitoring benzene-degrading microorganisms is important to estimate and to control benzene degradation. We found that microbial communities which are capable of degrading benzene were quite similar each other by analyzing five enrichment benzene degrading cultures. Bacteria closely related to *Desulfobacterales* clone Hasda-A and *Coriobacteriaceae* bacteria were found commonly as benzene degrading bacteria in the enriched cultures tested. We determined that these bacteria are the most important bacteria to monitor benzene degradation. The benzene degrading enrichment cultures were used to test benzene degradation by bioaugmentation of contaminated groundwater. Benzene was degraded in the contaminated groundwater samples by adding 10% of enrichment cultures or more. This result indicated that bioaugmentation is possible option

for anaerobic benzene degradation, though it is necessary in future to reduce the proportion of the culture to be added. Moreover, factors to enhance benzene degradation were discussed with results from various experiments conducted in this study to find clues to develop biostimulation methods. We found that organic electron acceptors can be effective to enhance benzene degradation, in particular when methanogenesis was suppressed.

実験室における分解試験
+ 微生物分析により、

以下の知見を得た



分解促進条件
(バイオスティミュレーションによる浄化へ)

集積培養系の添加効果
(バイオオーグメンテーションによる浄化へ)

②分解促進

③集積系添加

有機酸を添加しても
メタン生成が抑制さ
れる条件

汚染地下水
中のベンゼン分
解を確認

嫌気ベンゼン分解
微生物Hasda-A類
縁菌の普遍性

モニタリング対象
として有用

①微生物

