

ベンゼン汚染土壌・地下水の 嫌氣的生物浄化技術の開発

研究代表者： 栗栖 太

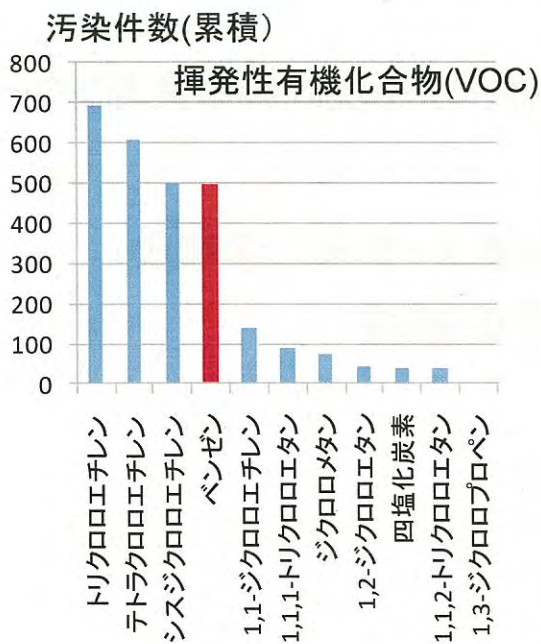
東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御研究センター

累積予算額： 20,286千円 (FY2011-FY2012)



背景

ベンゼン汚染と生物学的浄化



土壌汚染調査(環境省、2009)

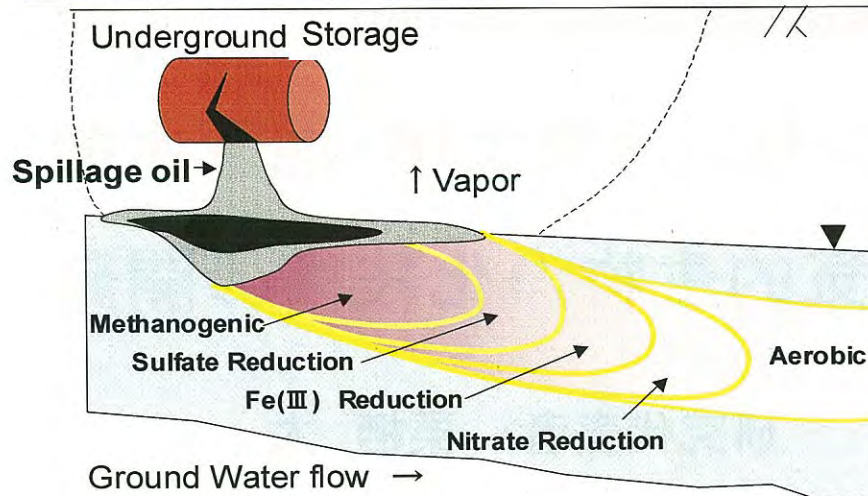
ベンゼンの地下水環境基準: 0.01mg/L

基準まで下げるには生物学的処理が有利

好気処理は実用化済

嫌気処理が可能ならより低コスト

【重点課題17】健全な水・大気の循環
「①安全、確実な、低コスト・低負荷型の
土壌汚染調査・対策技術の開発」
として開発したい



Based on P.D. Franzmann.etal *Biodegradation* 13: 65-78, 2002.

一硝酸還元条件におけるベンゼン分解の研究は進んでいる(たとえば Kasai et al., 2006) が、一般的に生息しない微生物であるなどの課題も
→より嫌気的条件である、メタン生成条件を対象とした研究

3

研究体制

- 研究代表者: 栗栖 太(東大・水環境制御研究センター)
– ベンゼン分解条件の検討
- 研究分担者: 春日 郁朗(東大・都市工学専攻)
– 分子生物学的微生物解析の補佐
- 研究費(間接経費込)
– 2011年度 11,270千円
– 2012年度 9,016千円

4

- ① 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 ①微生物
- ② 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 ②分解促進
- ③ 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 ③集積系添加

研究成果の概要

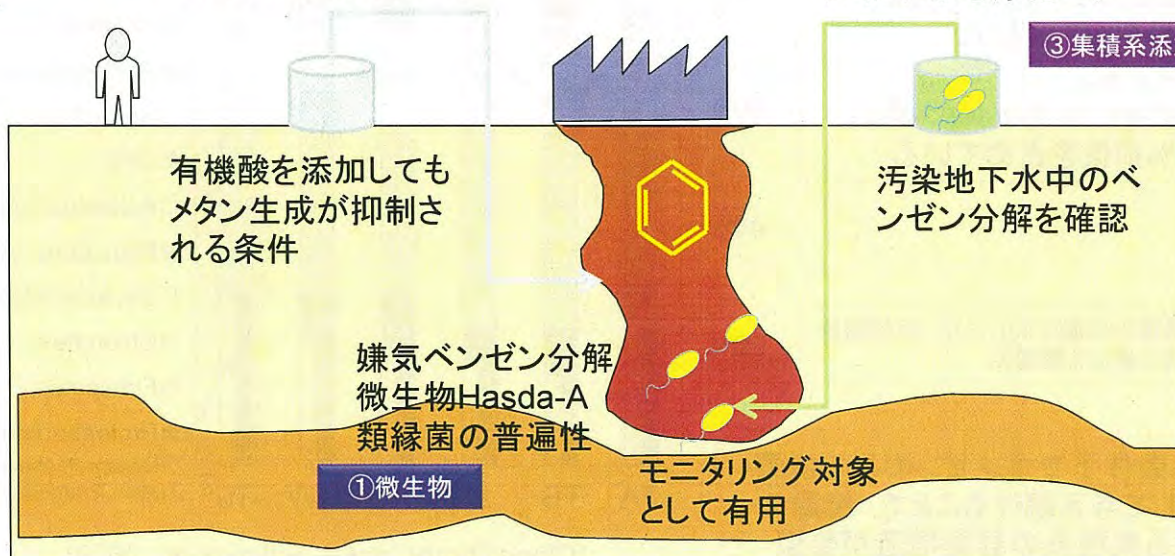
実験室における分解試験 + 微生物分析により、  ... 以下の知見を得た

②分解促進

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)

③集積系添加



次世代シーケンサによる群集構造解析

解析した試料

Name	Symbol	Location	Source	Initial date of incubation
土浦A	TA	茨城県土浦市	蓮田土壌	2007/11/24
土浦B	TB	茨城県土浦市	蓮田土壌	2008/07/22
新芝川	SN	埼玉県川口市	河川底泥(新芝川)	2007/11/24
手賀沼	TE	千葉県我孫子市	沼底泥(手賀沼)	2008/07/22
岩国	IW	山口県岩国市	蓮田土壌	2007/10/21

解析領域: 16S rRNA遺伝子 V4領域
プライマー (519F- 802R, universal)

次世代高速シーケンス法 (Pyrosequence法) により解析



シーケンス解析ツールQIIMEにてデータ解析



454 GS FLX+ System (Roche)

ベンゼン分解集積系の微生物群集構造

◆ pyrosequence解析結果

Noguchi et al. (in prep.)

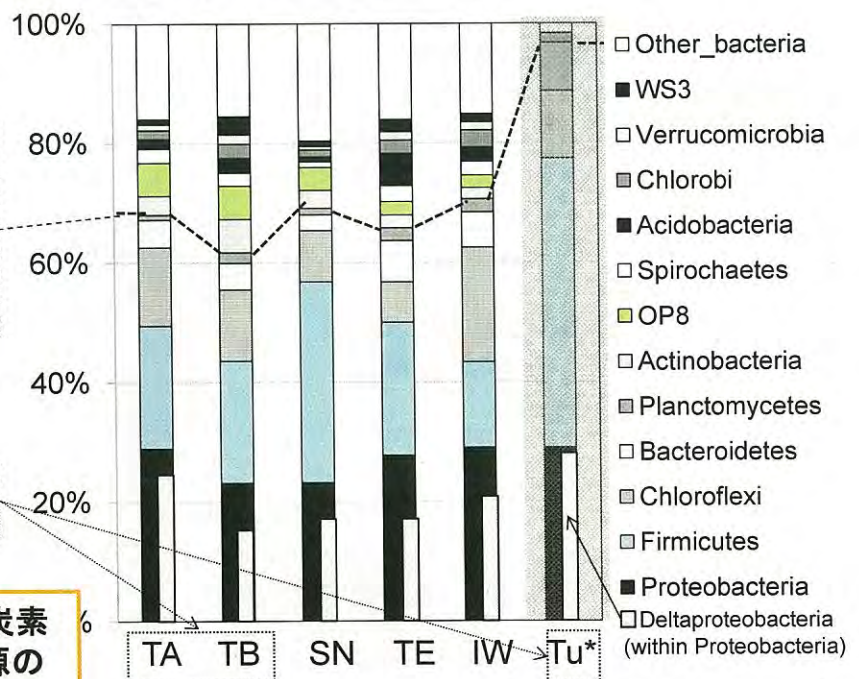
- 5サンプルの平均リード数は約19,500 (SD: 4,600)

◆ 門レベルでの細菌の群集構造

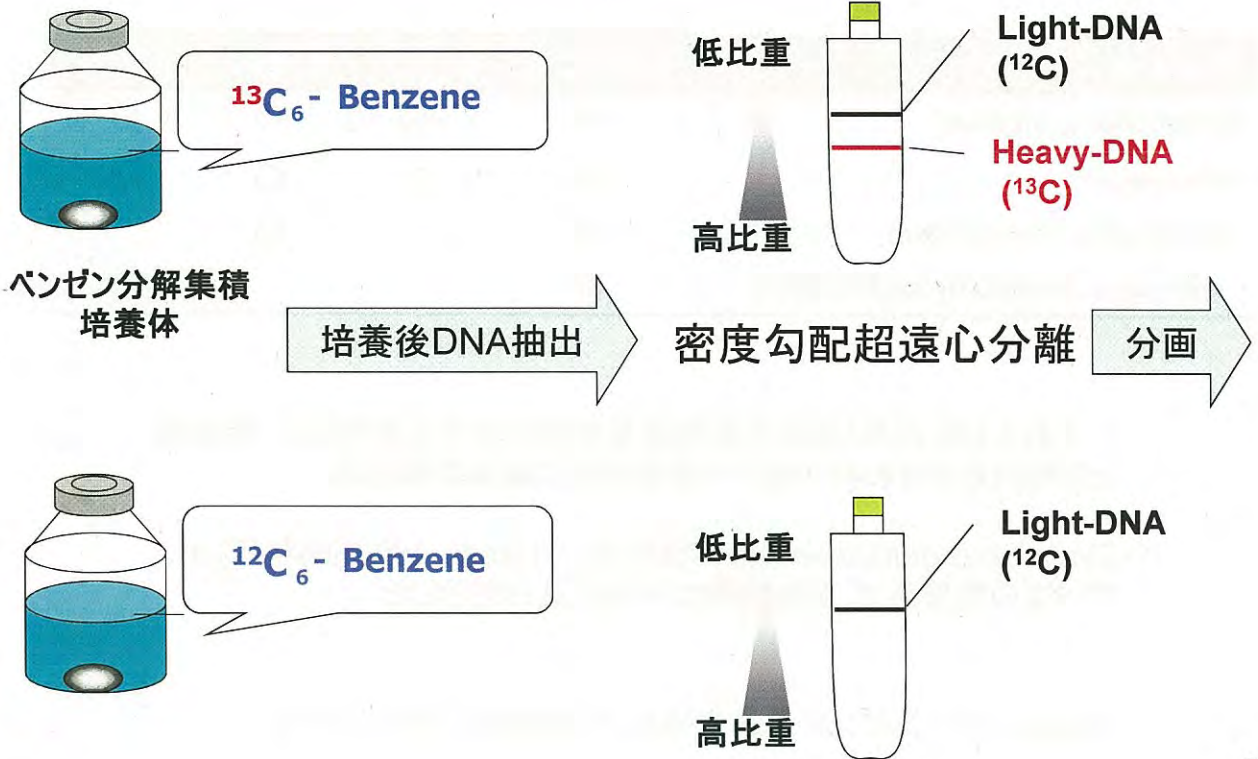
- 優占していた5門で62-71%を占めていた
- 中でも、Deltaproteobacteria綱が20%前後を占めている

植種源の位置は同じだが、集積開始時期の異なる集積系

嫌気条件下でベンゼンのみを炭素源として与え続けることで、起源の異なる集積系の群集構造が類似



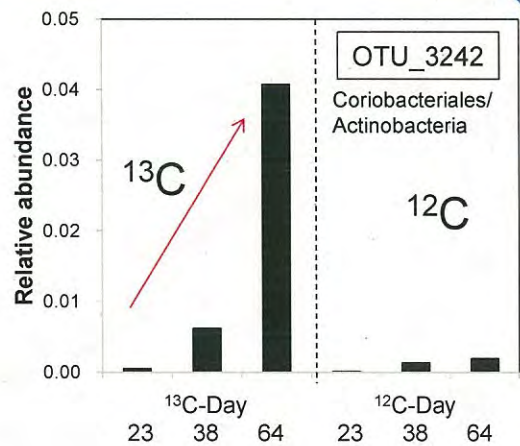
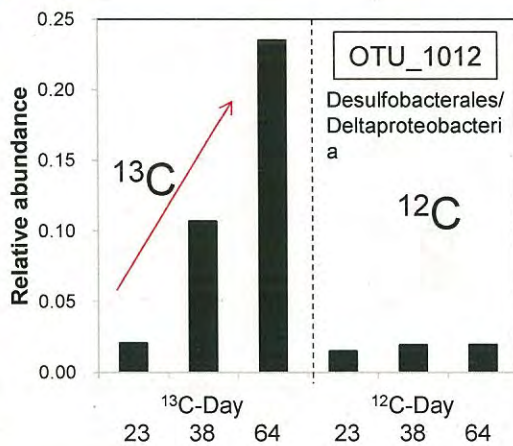
安定同位体プローブ法によるベンゼン分解微生物の解析



安定同位体標識ベンゼンを取り込んだ微生物



重画分のpyrosequence解析



^{13}C ベンゼン投与実験系でのみ存在割合の増加

^{13}C を取り込んで増殖した微生物

クローン解析による最近縁種 (相同性%)

Syntrophus gentianae (86%)

Olsenella uli (89%)

clone Hasda-A (Sakai et al., 2009)
との相同性は>99%

安定同位体プローブ法による解析のまとめ

最近縁種(存在割合の順)	相同性(%)	新芝川	土浦A	手賀沼
<i>Syntrophus gentianae</i>	86	○	○	○
<i>Olsenella uli</i>	90	○	○	
<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	86		○	
<i>Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus</i>	87			○

いずれも16S rRNA遺伝子配列全長で90%以下の相同性と、既知種との相同性がきわめて低い⇒系統学的に新規の微生物

*Syntrophus gentianae*類縁の微生物(=Hasda-Aと>99%相同)が、すべての培養系で、最も明確な¹³C取り込みを示した

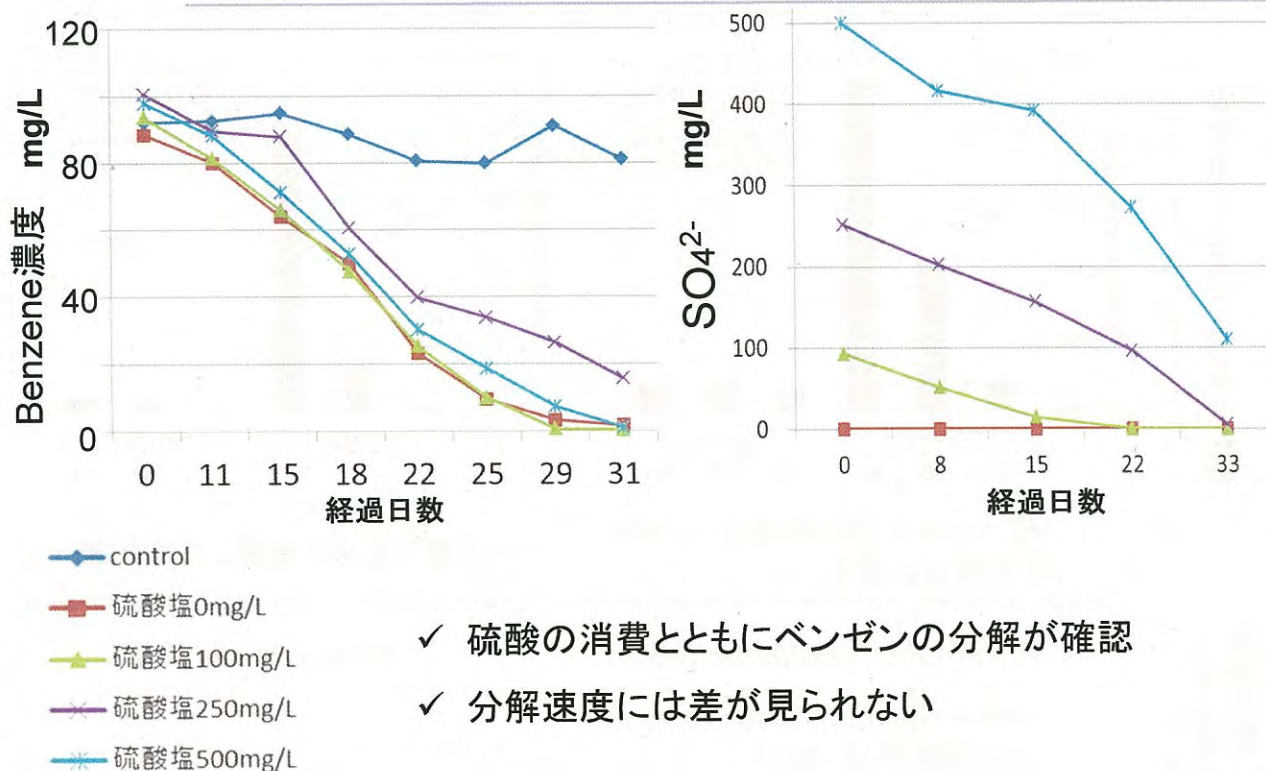


Hasda-Aがベンゼン分解微生物として普遍的に存在している

11

②分解促進

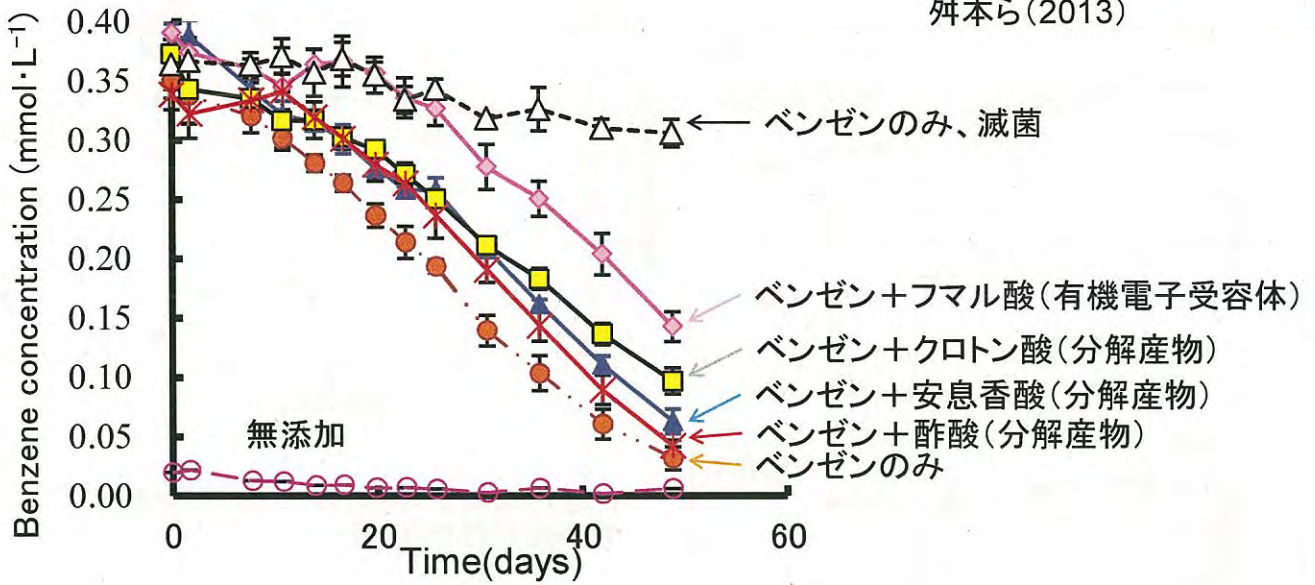
硫酸塩添加の効果



12

有機酸添加の影響

舛本ら(2013)



✓ 有機酸の存在がBz分解を阻害、有機酸消費後は影響なし

汚染地下水+集積培養系 (バイオオーグメンテーション試験)

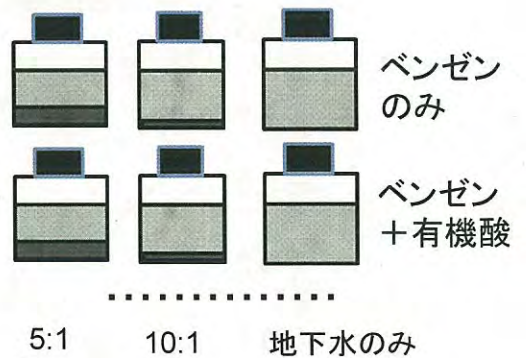
Takahashi et al. (in prep.)

汚染地下水:

- T1: 石炭ガス製造跡地
- T2: クロロエチレン類との複合汚染サイト
- N-d-1: 岩手・青森県境産業廃棄物不法投棄サイト

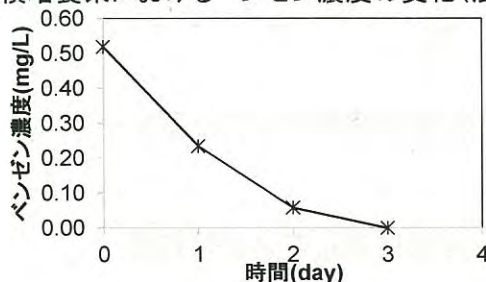


ベンゼン初期濃度: 0.5mg/L

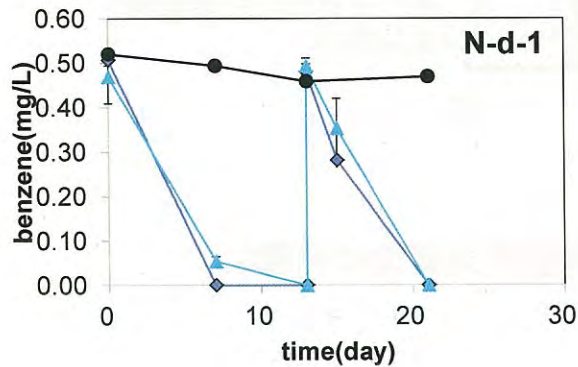
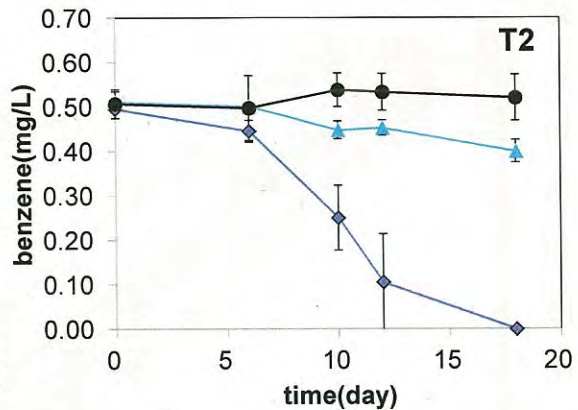
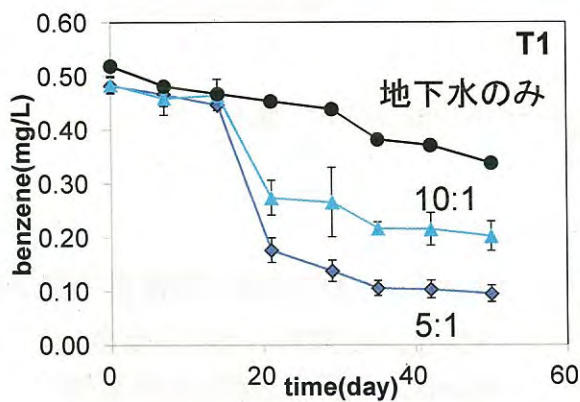


ベンゼン、メタン濃度の測定
(ヘッドスペースガス、GC-FID)

集積培養系におけるベンゼン濃度の変化(混合前)



汚染地下水のベンゼン分解



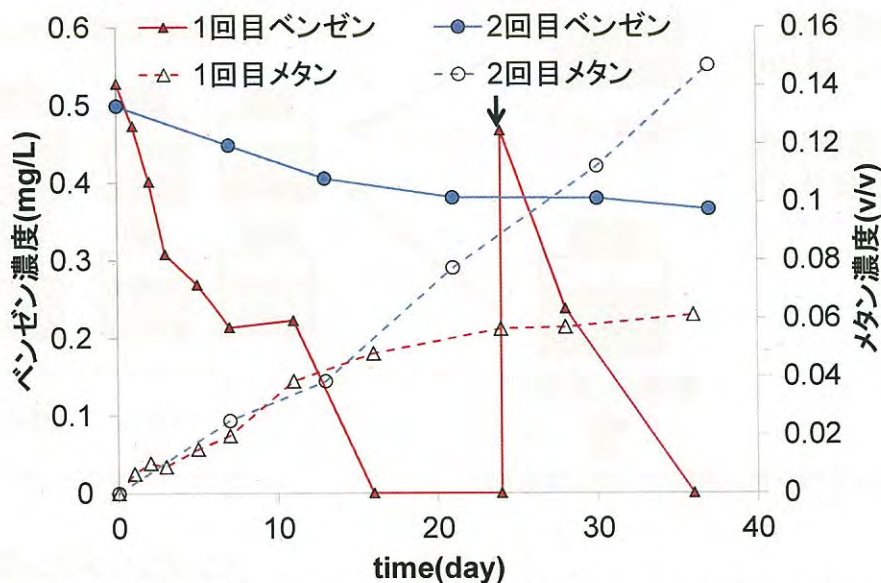
各種汚染地下水においても、ベンゼンの分解が確認された。

地下水5:集積系1のほうが地下水10:集積系1よりベンゼン分解は顕著

有機酸添加におけるベンゼン分解とメタン生成



ベンゼン+クエン酸(汚染地下水:集積培養系=5:1)

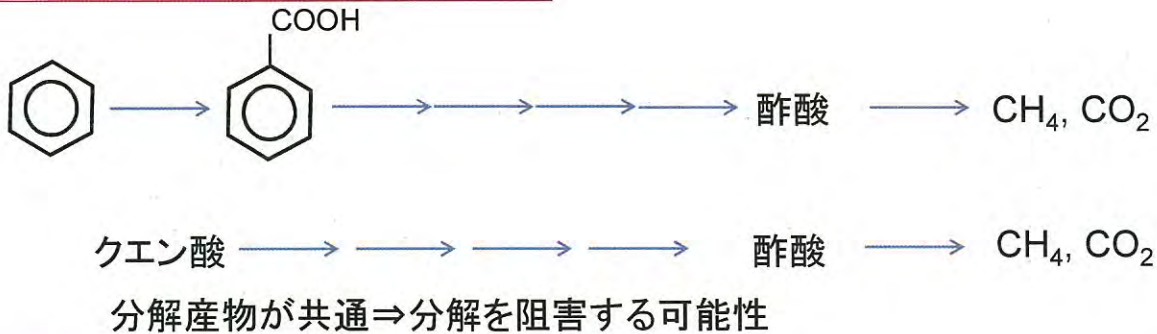


・ベンゼン分解が起きているケースでは、メタン生成が抑制されているケースが複数、亢進しているケースはない

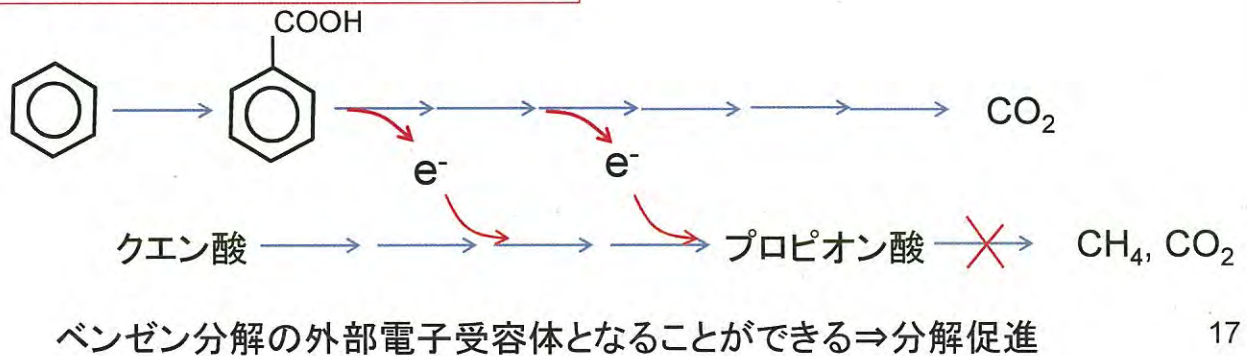
メタン生成が抑制されるような条件がベンゼン分解に適している可能性

有機酸添加がベンゼン分解に与える影響 RFC WET

クエン酸からメタンが生成する場合



クエン酸からメタンが生成しない場合



17

本研究により得られた主な成果 RFC WET

- 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* 属類縁の微生物 Hasda-A が主なベンゼン分解微生物として推定された。
⇒ベンゼン分解微生物としてモニタリング
- 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。
⇒浄化手法開発への展開(添加量を減らす必要あり)
- 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。
⇒浄化促進物質探索の手がかり

18