

## <論文>

# 界面活性剤添加による多環芳香族炭化水素類の分解促進と微生物群集への影響

熊田裕佳子<sup>1</sup>, 木佐拓郎<sup>1</sup>, 大隈 建<sup>1</sup>, 桑野雄介<sup>1</sup>, 田中宏明<sup>1</sup>, 清水芳久<sup>1</sup>

京都大学大学院工学研究科附属 流域圏総合環境質研究センター

(〒520-0811 滋賀県大津市由美浜 1-2 E-mail: yukakokumada@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp)<sup>1</sup>

### 概要

室内リアクターを用いた油汚染土壌浄化実験において、生物由来界面活性剤マンノシルエリスリトールリピッド (MEL: Mannosyl Erythritol Lipid) と合成界面活性剤ショ糖脂肪酸エステル (SFAE: Sugar Fatty Acid Ester) を添加した系を設置し、多環芳香族炭化水素類 (PAHs) を指標としてその効果を比較した。その結果、生物由来界面活性剤 MEL を添加した系において、PAHs のより速やかな分解が観察されたが、最終到達濃度には系による明確な違いは観察されなかった。これより、MEL には PAHs 分解の促進効果があるものの、難分解性 PAHs の分解性を向上させるような効果はないことがわかった。また、クローンライブラリー法を用いた微生物群集解析により、実験の進行に伴い全ての系のクローンライブラリーにおいて *Pseudomonas* 属近縁クローンが占める割合が増加していたことがわかった。

キーワード: バイオレメディエーション, 多環芳香族炭化水素類, 界面活性剤, 微生物群集解析

## 1. はじめに

産業構造の変化による土地利用の流動化と環境に対する意識の高まりから、土壌汚染への関心も年々高まる傾向にある。2006年3月8日に開催された中央環境審議会土壌農薬部会土壌汚染技術基準等専門委員会にて、「油汚染対策ガイドライン—鉱油類を含む土壌に起因する油臭・油膜問題への土地所有者等による対応の考え方—」が報告書として取りまとめられ、環境省は2006年3月22日付けで、このガイドラインを都道府県・土壌汚染対策法政令市に通知した。油汚染に対する環境基準は今のところベンゼンのみであるが、このガイドラインの策定を受けて、油汚染土壌対策技術への需要は今後ますます高まるものと考えられる。

油汚染対策技術として、最近では微生物の浄化能力を利用するバイオレメディエーションが注目され、多数の技術開発が試みられている。

バイオレメディエーションは、理論的にエネルギーをあまり必要とせず、安価であり原位置での浄化が可能である。原位置処理が可能で、土壌を処理施設に運搬せずに浄化できる。さらに、大がかりな土木工事の必要がないため、コスト削減につながるだけでなく環境への負荷も比較的小さく済む。一方で、浄化に時間がかかってしまうこと、高濃度の汚染には適さないという短所も併せ持っている。

油汚染物質の浄化効率に影響を与える因子として、汚染物質の土壌への吸着や水相への溶出、微生物の取り込みやすさや分解性、毒性、気相への揮発、他にも土壌の透水性や水相中の栄養塩濃度など数多く挙げられる。本研究では、油構成成分のうち有害で難分解性の多環芳香族炭化水

素類 (PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) に注目し、その微生物浄化の効率化を試みた。

汚染物質の微生物分解は、基本的に細胞内への汚染物質の取り込みによって始まることから、水に難溶の炭化水素の利用性 (bioavailability) を向上させるため、界面活性剤を添加することが試みられている。界面活性剤の種類によっては必ずしも分解促進効果は得られず、むしろ阻害的な影響が認められることもある<sup>2)</sup>ため、生物由来の界面活性剤が望ましいと考えられる。当研究グループでは、生物由来界面活性剤であるマンノシルエリスリトールリピッド (MEL: Mannosyl Erythritol Lipid) に着目しており、土壌浄化における MEL の作用について研究を行ってきた<sup>3), 4)</sup>。本研究においては、土壌浄化実験に添加する MEL 濃度の影響を調べるために、2段階の濃度を設定してその効果を評価した。また、これまでに観察された MEL の効果が MEL に特異的なものであることを確認するために、MEL と類似の構造を有する合成界面活性剤、ショ糖脂肪酸エステル (SFAE: Sugar Fatty Acid Ester) との比較も合わせて行った。

バイオレメディエーションは微生物を用いる技術であるため、効果的な処理を行うためには、開放系にて微生物の挙動を意のままに制御するという必要がある。したがって、バイオレメディエーション処理中における微生物の挙動を把握し、効率的な浄化プロセス構築や生態系管理にフィードバックすることは非常に重要である。そこで、本研究では土壌浄化実験中の微生物の知見を得るため、リアクター内土壌から微生物 DNA を抽出し、16S rDNA クローンライブラリーの構築を行った。

## 2. 土壌カラムリアクターを用いた土壌浄化実験

### 2.1 リアクター概要

#### (1) リアクター仕様

本研究では、循環式・下向流のバイオレメディエーションを想定して設計された室内リアクター (Fig.1) を用い、油汚染土壌の浄化実験を行った。リアクターの基本設計は、上部に土壌カラム、下部に培地タンクを設置し、ポンプを用いて培地を循環させる仕組みとなっている。上部のガラス製ファンネルには、土壌の目詰まり軽減のために 2 mm 径のガラスビーズを敷き詰め、その上に 2 mm の篩を通した実汚染土壌を湿重量で 350 g (含水率 20wt%) 詰めた。なお、本研究で用いた汚染土壌は、石炭から都市ガスを抽出する工場跡地より採取したものであり、40 年以上前に石炭系炭化水素で汚染された土壌である。培地滴下によって土壌に穴が穿たれないよう、また、培地が土壌に均一に滴下されるよう、土壌の上にはガラスフィルター板 (φ 65 mm、孔径 φ 100~120 μm) を乗せた。

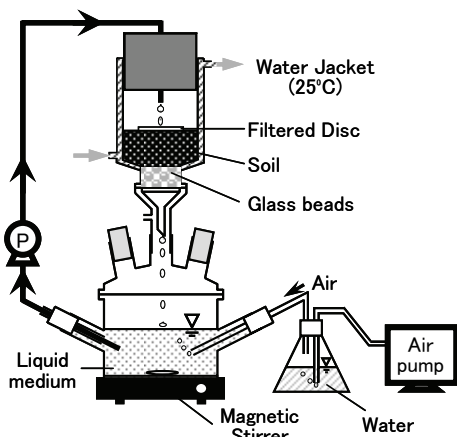


Fig.1 Schematic diagram of the bench-scale bioreactor.

室内リアクター下部セパラルフラスコには、窒素、リン、微量元素を含む液体培地 1 L を入れ、カラム内土壌に連続的に添加した。具体的な培地組成は Table 1 に示した。

Table 1 Composition of liquid medium.

Chemicals	Concentration (g/L)
Ammonium Nitrate	1.00
Ammonium Sulfate	0.50
Ammonium Chloride	0.20
Disodium Hydrogenphosphate	0.60
Potassium Dihydrogenphosphate	0.60
Magnesium Sulfate Heptahydrate	0.20
Iron(II) Sulfate Heptahydrate	0.03
Manganese(II) Chloride Tetrahydrate	0.02
Zinc Sulfate	0.02
Calcium Chloride Dihydrate	0.03
Ammonium Molybdate Tetrahydrate	0.01
Yeast Extract	1.00

好気性条件を保つために、培地にはエアポンプによる曝気を行った。曝気による培地の乾燥を防ぐため、エアポンプからの空気は一度純水を通過させるようにした。また、PAHs の光分解を考慮し、土壌カラムと培地タンクはアルミホイルで遮光した。

#### (2) 界面活性剤の選定

MEL とは、炭化水素、油脂などを原料として、酵母によって生産される糖脂質型非イオン性バイオサーファクタントである。マンノシルエリスリトールが親水基、マンノースの水酸基にエステル結合した脂肪酸 (基質の構造に依存した長さ、C8~C12 を有する) が疎水基となり、界面活性効果を有する。本研究で用いた MEL は、酵母 *Kurtzmanomyces* sp. I-11 を大豆油 20 g/L を含む培養液中で培養した際に、培養液内に蓄積されたもの<sup>5), 6)</sup>であり、株式会社丸善製薬から提供を頂いた。

対照のために用いる合成界面活性剤として、ショ糖とステアリン酸のエステルであるリョートー®シュガーエステル S-370 (三菱化学フーズ) を選定した。この物質の選定理由は、リョートー®シュガーエステルが、糖を親水基、脂肪酸を疎水基に持ち、MEL と類似した構造であること、広く食品用の乳化剤として利用されており無害であること、安価で手に入れやすいこと、である。

リョートー®シュガーエステルは、その脂肪酸の構造により HLB 値 (Hydrophile-Lipophile Balance: 界面活性剤の水と油への親和性を表す値。0~20 の値をとり、0 に近いほど親油性) を調整できる。MEL の HLB 値をグリフィン法 (HLB 値 =  $20 \times \frac{\text{親水部の式量の総和}}{\text{分子量}}$ ) により計算したところ、2.9 となった。そこで本研究では、MEL と同等の HLB=3 である S-370 を使用することとした。

#### (3) 運転条件

リアクターは、界面活性剤を加えない系 (Ctrl)、合成界面活性剤リョートー®シュガーエステル S-370 を液体培地に 22 μL/L 添加した系 (SFAE)、生物由来界面活性剤 MEL を 22 μL/L 添加した系 (MEL22)、MEL を 50 μL/L 添加した系 (MEL50) の 4 基を設置した。なお、リョートー®シュガーエステル S-370 は水への溶解性が低いため、培地中に均質に分散させた状態で使用した。

温度や pH、その他の栄養塩類濃度などの、界面活性剤添加濃度以外の条件は同一に設定した。土壌ファンネルの温度は、ウォータージャケットにて 25°C で一定に保った。液体培地の pH は、実験期間を通して概ね 7.4~8.0 で一定に保たれていた。

また、液体培地の栄養塩類濃度、界面活性剤濃度をなるべく一定に保つため、週に一度、後述する試料の採取と同日に培地の半量交換を行った。リアクター下部の培地タンクから 500 mL を引き抜き、新しく調製した液体培地を 500 mL 投入した。

#### (4) 試料の採取

土壌試料の採取は週に一度行った。採取の際は、葉さじにて室内リアクター内の土壌を攪拌し、油分分析用に湿重量で 30 g 程度の土壌を採取した。採取土壌はドラフト内にて数日間風乾後、粉碎器 (Wonder Blender, WB-1) にて粉碎し、褐色サンプル瓶中に入れてデシケーター内に保管した。

培地試料の採取も土壌試料の採取と同時に行った。培地交換の際に引き抜いた 500 mL を培地試料とし、一部は培地採取直後に 1  $\mu\text{m}$  ガラスファイバーろ紙 (GA-100、 $\phi$  47 mm, Advantec) で吸引ろ過した後、ろ液を約  $-30^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。残りの培地試料は、分析に供するまで約  $4^{\circ}\text{C}$  で冷蔵保存した。

## 2.2 試料分析

### (1) 土壌分析

土壌中 PAHs 濃度の評価は、ジクロロメタンを用いた超音波抽出法にて土壌から PAHs 抽出をした後、ガスクロマトグラフ質量分析計による定量分析にて行った。

まず、遠沈管に粉末土壌をとり、ジクロロメタンを 25 mL 添加して超音波洗浄機 (Vs-N300L, VELVO) にて超音波を照射した。1,000 rpm で 10 分間の遠心後、上澄み液を分液ろ紙 (No.2S、 $\phi$  110 mm, Advantec) にてろ過し、ろ液を容量 50 mL のメスフラスコに回収した。この一連の操作をもう一度行い、50 mL の土壌抽出液を得た。

土壌抽出液は、シリカゲルカラム (Supelclean™ Lc-Si, Supelco) を用いて精製操作を行ったのちガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-17A & QP-5000, Shimadzu) での分析に供した。PAHs の定量は、内部標準法にて行った。内部標準物質には、半揮発性内部標準物質 Mix (6 成分、各成分濃度 2,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  塩化メチレン溶液、Supelco) をヘキサンで 100 倍希釈して用いた。定量を行ったのは、EPA の定める 16 種類の PAHs であるナフタレン、アセナフチレン、アセナフテン、フルオレン、フェナントレン、アントラセン、フルオランテン、ピレン、ベンゾ[a]アントラセン、クリセン、ベンゾ[b]フルオランテン、ベンゾ[k]フルオランテン、ベンゾ[a]ピレン、インデノ[1,2,3-cd]ピレン、ジベンゾ[a,h]アントラセン、ベンゾ[g,h,i]ペリレンである。カラムには Fused Silica Capillary Column, SPB-5 (Supelco) を用いた。

なお、ガスクロマトグラフ質量分析計での分析の際には、原則として 2 回以上の測定を行い、その平均値を測定値として採用した。C18 以下の PAHs では測定値の変動係数は  $\pm 3.4\%$  以内であったが、C20 の PAHs では変動係数  $\pm 10.3\%$  ~  $16.2\%$  となっていた。

### (2) 培地分析

吸引ろ過にて SS 分を除去した分に対しては、溶存有機炭素 (DOC: Dissolved Organic Carbon) 濃度の測定を行った (全有機炭素計、TOC-5000A, Shimadzu)。

また、土壌から培地への PAHs 溶出量を評価するため、MEL50 についてのみ培地中 PAHs の抽出および定量分析を行った。逆相カラム (Supelclean™ LC-18, Supelco) による固相抽出にて、未ろ過の培地試料からの PAHs 抽出を行い、土壌分析の際と同様にシリカゲルカラム (Supelclean™ Lc-Si, Supelco) を用いて精製を行った後、ガスクロマトグラフ質量分析計で分析した。

## 2.3 土壌・培地分析結果

### (1) 初期土壌の性質

リアクター運転開始直前にそれぞれのリアクターから採取した土壌の PAHs 濃度定量結果を Table 2 に示す。なお、表中のベンゾ[x]フルオランテンは、ベンゾ[b]フルオランテンとベンゾ[k]フルオランテンを合わせたものであり、ベンゾ[x]ピレンはベンゾ[a]ピレンとベンゾ[e]ピレンを合わせたものである。ともにピークの分離が困難であったため、合わせて示した。

なお、試料採取の都合上、Ctrl と SFAE には同じ土壌を用いたため、Ctrl と SFAE の初期土壌中 PAHs 濃度の値は同じものとなっている。MEL22、MEL50 には異なる土壌を用いたため、それぞれ異なる値となっている。

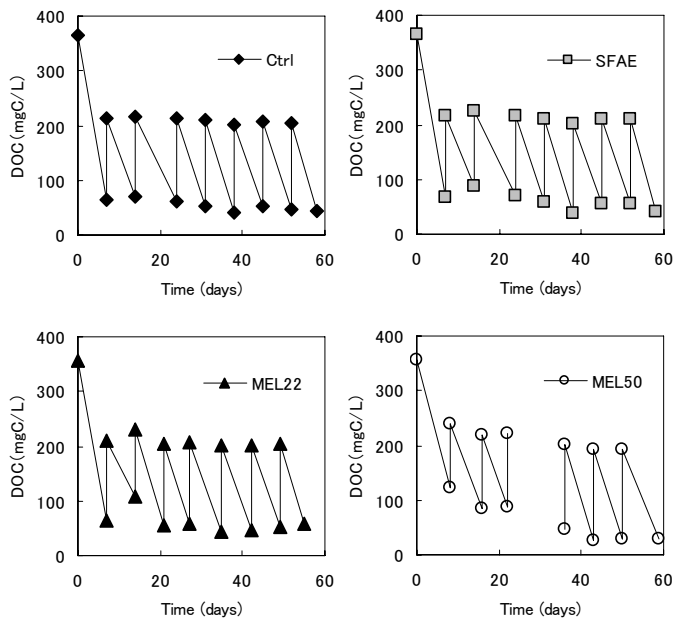
Table 2 Initial PAHs concentration in soil (unit:  $\mu\text{g}/\text{g}$ -dry soil).

	Ctrl & SFAE	MEL22	MEL50
Naphthalene	106	52	61
Acenaphthene	283	179	76
Fluorene	357	102	46
Phenanthrene	1452	583	228
Anthracene	462	396	275
Fluoranthene	1227	1406	1020
Pyrene	1109	1297	916
Benz[a]anthracene	297	255	257
Chrysene	497	537	405
Benzo[x]fluoranthene	404	339	378
Benzo[x]pyrene	385	327	375
Total PAHs concentration	6578	5473	4035

本研究では実油汚染土壌を使用しているため、均質な土壌サンプルを得ることが困難であり、実験系によって初期の PAHs 濃度に違いがあったことがわかる。どの系においても、フルオランテンとピレンが比較的高濃度に含まれており、Ctrl と SFAE の系では PAHs であるフェナントレンも高濃度に含まれていた。

### (2) 液体培地中溶存有機炭素濃度変化

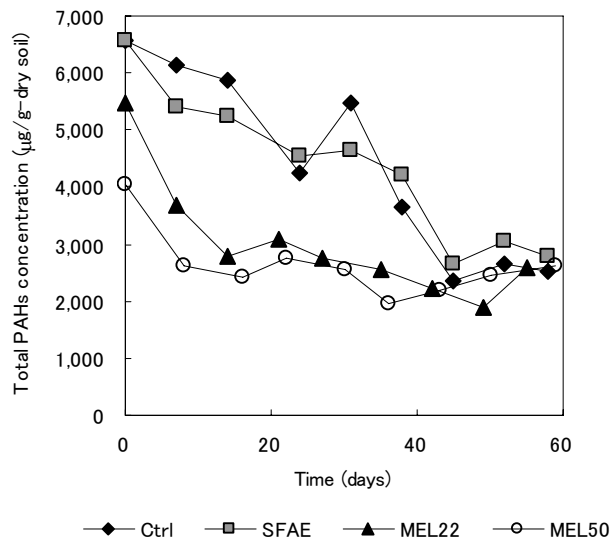
培地中溶存有機炭素濃度の経日変化を Fig.2 に示す。図中における、溶存有機炭素濃度の鉛直方向への上昇は、週に一度の培地の半量交換によるものである。いずれの系においても、培地の半量交換後 1 週間で、100  $\text{mgC}/\text{L}$  以上の濃度減少が見られ、恒常的に溶存有機炭素が消費されていたことがわかる。



**Fig.2** Variation of dissolved organic carbon in liquid medium (the value on day 30 of MEL50 was not measured).

### (3) 土壤中 PAHs の定量結果

定量された土壤中各 PAHs 濃度を総和した値(これを土壤中総 PAHs 濃度とする)の経日変化を Fig.3 に示す。なお、Fig.3 中の 0 日目の値は、Table 2 で示した初期土壤中 PAHs 濃度の総量を採用している。0 日目の Ctrl と SFAE の値が等しく、それらと MEL22、MEL50 の値が異なるのはその理由による。



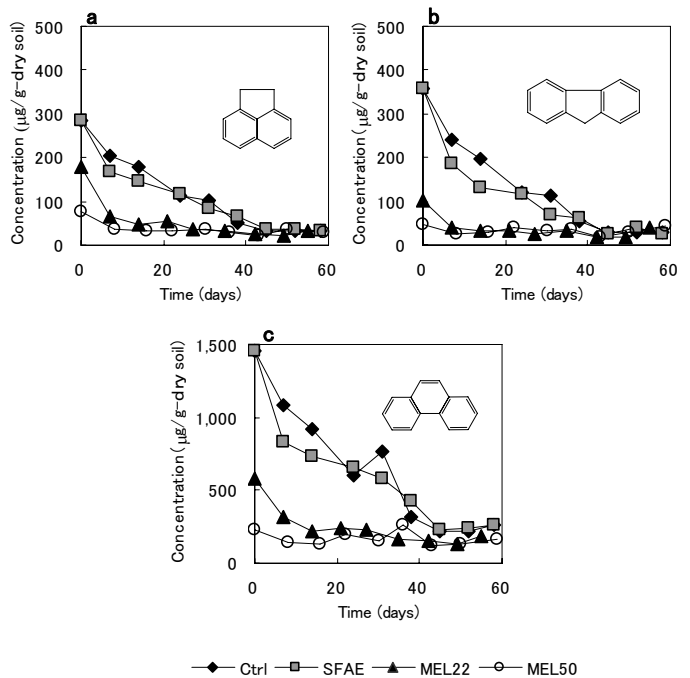
**Fig.3** Variation of total PAHs (sum of 16 PAHs concentrations in soil).

Ctrl 条件と SFAE 条件の濃度変化はほぼ同様の挙動を示し、31 日目まではなだらかに減少し、31 日目～45 日目にかけて大きく減少した。これに対し、MEL 添加条件では

MEL22、MEL50 ともに実験初期に大きく総 PAHs 濃度が減少し、それ以降大きな変化は見られなかった。MEL22 と MEL50 では初期 PAHs 濃度が異なったため、MEL の添加濃度による違いを評価することは困難であった。

最終的な PAHs 濃度は、Ctrl: 2677  $\mu\text{g/g-dry soil}$ 、SFAE: 2799  $\mu\text{g/g-dry soil}$ 、MEL22: 2578  $\mu\text{g/g-dry soil}$ 、MEL50: 2621  $\mu\text{g/g-dry soil}$  であり、実験開始時の PAHs 濃度の差異にもかかわらず、最終到達濃度には系ごとの差異は認められなかった。

アセナフテン、フルオレン、フェナントレンは、Ctrl と SFAE の初期土壤中多く含まれていた PAHs であるが、これら 3 物質は速やかに減少し、最終的な濃度も低くなっていた (Fig.4)。Fig.3 における Ctrl、SFAE の系での実験初期 (31 日目) までのなだらかな総 PAHs 濃度の減少は、主にこれらの成分の減少によるものである。対して、MEL22、MEL50 では初期土壤中濃度が低く、すぐに最終濃度 (減少傾向が見られなくなった時の濃度とする) にまで達したため、減少速度について Ctrl、SFAE の系と比較することはできなかった。



**Fig.4** Variation of PAHs, (a) acenaphthene, (b) fluorene, (c) phenanthrene.

フルオランテンとピレンは MEL 添加による影響を大きく受けた (Fig.5)。MEL を添加した系 (MEL22、MEL50) では実験開始後 2 週間まで大きく濃度が減少したのに対し、それ以外の系 (Ctrl、SFAE) では 31～45 日目にかけて大きく濃度が減少した。MEL を添加した系の方がそれ以外の系と比較して速やかに最終濃度に至った。MEL の添加濃度による差は見られなかった。フルオランテン、ピレンは初期土壤中含有量が多かったため、これら 2 物質の濃度変化のパターンが総 PAHs の濃度変化に反映される形となった。

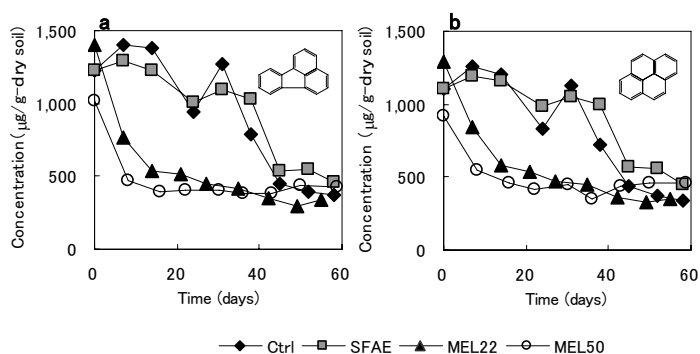


Fig.5 Variation of PAHs, (a) fluoranthene, (b) pyrene.

炭素数 20 の PAHs であるベンゾ[x]フルオランテンとベンゾ[x]ピレンの測定結果は、2.2 (1) で述べた通り、変動係数が ±10.3~16.2%であった。ベンゾ[x]フルオランテンとベンゾ[x]ピレンの濃度変化を Fig.6 に示したが、8 週間ほどの実験期間における濃度変化は誤差範囲に含まれる程度で、どの系でも明確な減少が観察されなかった。

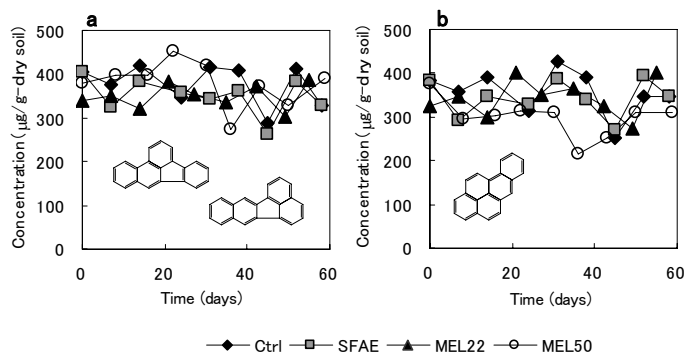


Fig.6 Variation of PAHs, (a) benzo[x]fluoranthene, (b) benzo[x]pyrene.

Fig.4、5 から、PAHs はある程度の濃度に達すると、それ以上濃度が減少しなくなることがわかる。Fig.6 のベンゾ[x]フルオランテンとベンゾ[x]ピレンで濃度減少が見られなかったのも、もともと初期土壤中に含まれていた量が、既にそれ以上は分解されない濃度であったのだとも考えられる。つまり、初期 PAHs 濃度、界面活性剤の添加有無にかかわらず、8 週間の運転期間後の濃度は同程度の値に収束することがわかった。

すなわち、難分解性と言われている PAHs は、ある程度は分解されるものの、あるレベルに達するとそれ以上は分解されなくなり、MEL は分解速度を速める効果はあるものの、PAHs の分解性それ自体を改善する効果はないことがわかった。

このことから、MEL の添加は最終的な浄化レベルを向上させることはできないが、油汚染バイオレメディエーションの浄化期間の短縮には有効であるといえる。そしてこの効果は SFAE ではなく、MEL 特有の特徴であるといえる。

#### (4) 土壤中 PAHs 量と培地中 PAHs 量の比較

MEL50 において、培地中 PAHs 量と土壤中 PAHs 量とを比較した結果を Table 3 に示す。土壤中 PAHs 量は、カラム内土壌湿重量×土壌中総 PAHs 濃度で計算した。

Table 3 Total PAHs concentration variation in soil and liquid medium of the MEL50 reactor (unit: mg).

Time (days)	8	16	22	29	36	43	50	59
Total PAHs in soil	865	750	780	670	470	484	464	403
Total PAHs in medium	0.802	0.412	0.463	-	0.595	0.251	0.604	0.587

培地中に存在した PAHs 量は土壤中 PAHs 量に比べ 1/1000 ほどであったことがわかる。そのため、Fig.3~5 にて観察された土壤中 PAHs 濃度の減少は、土壤から培地への溶出によるものではなく、土壤中での微生物分解によるものと考えられる。

PAHs 分解に寄与した微生物種を明らかにするため、初期土壤、1 週目 (Ctrl、SFAE、MEL22 では 7 日目、MEL50 では 8 日目)、7 週目 (Ctrl、SFAE では 52 日目、MEL22 では 49 日目、MEL50 では 50 日目) の土壤サンプルについて、クローンライブラリー法による微生物群集解析を行った。

### 3. クローンライブラリー法を用いた群集解析

#### 3.1 土壤サンプリング

微生物群集解析用の土壤サンプリングは、油分分析用土壤サンプリングと同時にを行った。湿重量 2 g 程度の土壤を容量 50 mL のコニカルチューブ (BD Falcon™ チューブ、ポリプロピレン製) に採取し、分析に供するまで -30°C で凍結保存した。

#### 3.2 クローンライブラリーの作製

土壤 1 g から UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MO BIO) を用いて DNA 抽出を行った。ユニバーサルプライマーである UNI 519F (5'-CAG CMG CCG CGG TAA TWC-3', M = A/C, W = A/T) と、UNI 1406R (5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3', R = A/G) を用いて、*E. coli* の 16S rRNA の 518 番目から 1405 番目までに相当する領域の PCR 増幅を行い、全微生物の DNA の増幅を行った。PCR 反応液 50 µL の組成は、FastStart Taq DNA ポリメラーゼ (Roche) 0.4 µL、酵素添付の PCR Buffer 5.0 µL、MgCl<sub>2</sub> 3.0 mM、dNTPs 200 µM、プライマーそれぞれ 0.5 µM ずつ、鋳型 DNA 5 ng であった。反応サイクルは、95°C で 6 分間インキュベーションした後、95°C (30 秒)、64°C (30 秒)、72°C (1 分) のサイクルを 25 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 7 分間のインキュベーションを行った後 4°C に冷却した (DNA Engine PTC-200, MJ Research)。得られた

PCR 増幅産物は、2.0 (w/v) % アガロースゲル (Seakem GTG Agarose, Cambrex) での電気泳動後、UV 照射下でゲルの切り出しを行い、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。その後 TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen) を用いて LB 培地上にクローンライブラリーを作製した。これをシーケンス用材料とし、タカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターにて塩基配列解析を依頼した。それぞれの系のクローンライブラリーから無作為に得られた 96 個の塩基配列が返却され、これらの配列をもとに Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) にて最近縁種の検索を行った。解析したクローンの中で、塩基配列データが同じだと判断できたものに関してはそれらを同一のクローンとしてまとめた。

### 3.3 結果

初期土壌から得られたクローンライブラリーでは、それぞれ Ctrl & SFAE: 22 種類、MEL22: 25 種類、MEL50: 31 種類の異なるクローンに分類された。1 週目のサンプルでは Ctrl、SFAE、MEL22、MEL50 の順に 37、37、32、33 種類、7 週目のサンプルでは 36、34、28、28 種類となった。クローンの種類の多さ=多様性とすれば、多様性の面では条件、サンプリング時期による違いはあまり見られなかったが、その内容は大きく変化した。

得られたクローンライブラリーにおけるクローンの分布を Fig.7 に示した。これらは、相同性検索の結果における最近縁種をもとにしてまとめたものである。簡単のため、ごく一部のクローンライブラリーでしか検出されなかったクローンは other bacteria として示した。*Pseudomonas* 属近縁クローン、*Sphingomonas* 属近縁クローンは、ともにクローンライブラリーにおいて頻繁に検出されたために別に示した。

初期土壌では、“Uncultured bacterium”として登録されたものを最近縁種とするクローンが多く検出されたが (Ctrl & SFAE: 34.7%、MEL22: 71.6%、MEL50: 76.6%)、7 週目のサンプルではクローンライブラリーに占める割合は減少した (Ctrl: 20.8%、SFAE: 17.7%、MEL22: 11.6%、MEL50: 7.4%)。これは、炭素源としては難利用性の PAHs が多く含まれた、貧栄養の土壌に対して、培地を加え循環させるという作業を加えたことにより、急激に土壌中の栄養条件が変わり、本培地や条件に適した微生物が選択的に増加した結果であると考えられる。それにより、“Cultured”の微生物が増加し、“Uncultured bacterium”近縁クローンの割合が減少したのだと推察される。

検出されたクローン分布の変化が最も特徴的であったのは *Pseudomonas* 属近縁クローンであった。Fig.7 の MEL22 において、*Pseudomonas* 属近縁クローンは 0 日目: 10.5%、7 日目: 5.4%、49 日目: 57.0%という変化を示しているが、初期と 7 日目と 49 日目での *Pseudomonas* 属近縁クローンの分布は、種 (species) 以下のレベルでは全く違うものであった。

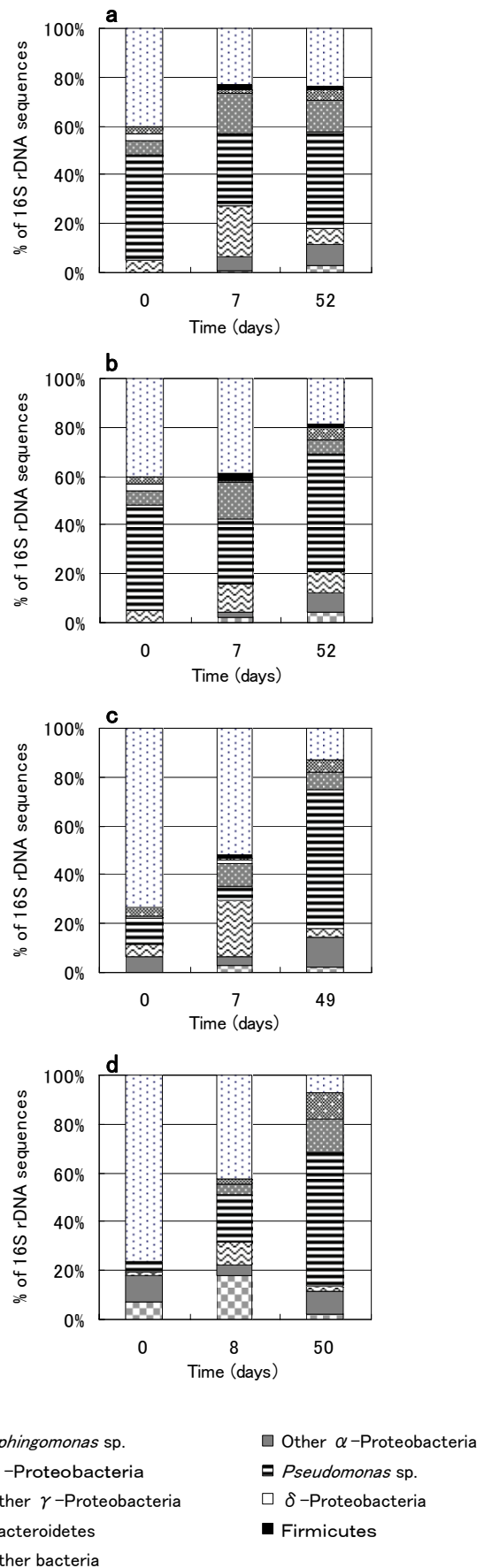


Fig.7 Relative proportions of organisms in clone libraries from each condition, (a) Ctrl, (b) SFAE, (c) MEL22, (d) MEL50.

**Table 4** Variation of genus *Pseudomonas*.

Closest relatives	Ctrl			SFAE			MEL22			MEL50		
	0	7	52	0	7	52	0	7	49	0	8	50
<i>Pseudomonas</i> sp. SN1	20.0	7.4		20.0	8.3		4.2			1.1	1.1	
<i>Pseudomonas</i> sp. E4-1	23.2	8.4		23.2	10.4		4.2			2.1	1.1	
<i>Pseudomonas</i> sp. JQR2-5							2.1			1.1		
<i>Pseudomonas putida</i> KCTC1639		2.1			1.0							
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain XJU-12		1.1			1.0							
<i>Pseudomonas</i> sp. strain KIE171-B		1.1			1.0							
<i>Pseudomonas putida</i> BCNU 106		2.1			3.1			1.1				
<i>Pseudomonas stutzeri</i> isolate PTDE		3.2						1.1			1.1	
<i>Pseudomonas</i> sp. BCNU171		2.1						3.2			1.1	
Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone 21		1.1										
Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone MH9_Pitesti		1.1										
<i>Pseudomonas</i> sp. BWDY-26					1.0						1.1	
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain ChG5-3					1.0							
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain 24a75											7.4	
<i>Pseudomonas putida</i> strain ASK-1			1.0			1.0						
<i>Pseudomonas putida</i> strain KF715			16.7			13.5			23.2			18.1
<i>Pseudomonas</i> sp. ND24			18.8			16.7			20.0			33.0
<i>Pseudomonas</i> sp. VKM B-2265			1.0			1.0			1.1			
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> strain S8			2.1			13.5			9.5			1.1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain 19smn4						1.0			1.1		6.4	2.1
<i>Pseudomonas mosselii</i> strain R10									2.1			
<i>Pseudomonas</i> sp. B-3032						1.0						
Total	43.2	29.7	39.6	43.2	26.8	47.7	10.5	5.4	57.0	4.3	19.3	54.3

Table 4 に、クローンの最近縁種として挙げられたものうち、*Pseudomonas* 属に関するものだけをまとめた。時間の経過に伴い、検出されるクローンの種類が変化していったことがわかる。

この変化は MEL22 に特有のものではなく、全サンプルのクローンライブラリーの中にて、*Pseudomonas* 属近縁クローンの最近縁種が種以下のレベルにて変化していった。しかも、その変遷の傾向は、全条件で類似していた。つまり、初期土壌に存在した菌群と、培養条件に適用し PAHs 分解に寄与した菌群、PAHs 分解が完了した時点で繁栄した菌群は異なるものであったことがわかる。1 週目サンプルで検出されたクローンが、PAHs 分解に最も積極的に寄与していた微生物群を反映していると言える。しかし、Fig.7 からわかる通り、1 週目サンプルにおいて *Pseudomonas* 属近縁クローンは Ctrl、SFAE ではそれぞれ 29.7%、26.8% を占めていたのに対し MEL 両条件では 5.4% (MEL22)、19.3% (MEL50) しか占めておらず、この違いが PAHs の減少傾向の違い (Fig.3, Fig.5) に反映されているものだと考えられる。

一方で、*Sphingomonas* 属近縁クローンは、MEL50 では初期、1 週目、7 週目で検出されたが、1 週目サンプルでは全クローンのうち 18.1% を占めていた。その他の条件では 1.1% ~ 3.2% しか占めていないことから、MEL50 では *Sphingomonas* 属近縁種も PAHs 分解に積極的に関わ

っていたのだと推測される。

$\beta$ -Proteobacteria は、全条件において 1 週目での全クローンに占める割合が最も高く、初期土壌では Ctrl & SFAE: 5.3%、MEL22: 5.3%、MEL50: 1.1% だったのに対し、1 週目サンプルでは、Ctrl: 21.1%、SFAE: 11.5%、MEL22: 23.4%、MEL50: 9.6% となっていた。この  $\beta$ -Proteobacteria クローンは、PAHs 分解に寄与していた可能性が考えられる。実際、検出されたクローンの最近縁種である *Achromobacter* 属や *Alcaligenes* 属は、PAHs 分解能を持つと報告されている<sup>7)</sup>。

7 週目サンプルは、初期、1 週目サンプルに比べて全条件に共通して検出されたクローンが多かった。例えば *Pseudomonas* 属近縁クローンは、4 種類のクローンが 4 条件に共通であった。PAHs 濃度が条件に関係なく一定の濃度に収束したのと同様、微生物群集もある一定の菌群に到達していくものと考えられる。

実験系内に初期に存在していた PAHs は、(湿重量 350 g) × (含水率 20%) × (PAHs 濃度 4.0 mg ~ 6.6 mg) で概算すると、概ね 1.1 ~ 1.8 g 程度だと推測される。それに対し、毎週新たに添加した培地 0.5 L に含まれていた酵母エキスが 500 mg、また、界面活性剤の添加量は、仮に比重を 1 とすると、11 ~ 25 mg となる。したがって、7 週間が経過した後では、初期に存在した PAHs の量や添加した界面活性剤よ

りも、むしろ培地として供給した成分、特に酵母エキスの影響が強くてたものと考えられる。その結果、微生物群集も、ある一定の菌群に収束していったのだと考えられる。

しかし、7 週目サンプルでは、各条件で特異的に検出されたクローンも数多くあったことから、SFAE 添加や MEL 添加という異なる条件での生育に、それぞれ適した微生物群も育っていたのだと考えられる。

#### 4. まとめ

SFAE を添加した系では、PAHs の減少に Ctrl との差異がそれほど見られなかったことから、PAHs 分解の促進は MEL の添加のみにより引き起こされることがわかった。しかし、最終到達濃度が全条件でほぼ同じであったことから、PAHs の分解性を向上させるような効果はないことが分かった。最終的な浄化レベルを向上させることはできないが、油汚染バイオレメディエーションの浄化期間の短縮には有効であるといえる。

微生物群集解析により、界面活性剤の添加が分解微生物に影響を及ぼすことがわかったが、運転期間が長くなるにつれ、培地として供給した成分に強く影響されるようになり、ある一定の菌群に収束していく可能性が示唆された。

本研究で用いた方法は定量性などの点で改善が必要ではある。菌の存在だけでなく、その分解機能を検証する実験も必要である。それでもなお、油汚染土壌という特殊な環境

下での、微生物の生態に関するデータの蓄積には寄与できた。引き続き土壌浄化実験に取り組み、微生物群集に関するデータの蓄積を行っていく予定である。

#### [参考文献]

- 1) 環境省水・大気環境局, 油汚染対策ガイドライン—鉱油類を含む土壌に起因する油臭・油膜問題への土地所有者等による対応の考え方— (2006).
- 2) 藤田正憲, 池道彦, “バイオ環境工学”, シーエムシー出版 (2006) pp.39-40.
- 3) 木佐拓郎, 桑野雄介, 越川博元, 清水芳久, 田中宏明, 玉井正弘, 田村幸吉, *環境衛生工学研究*, **18**, 198-201 (2004).
- 4) 熊田裕佳子, 木佐拓郎, 桑野雄介, 越川博元, 田代榮一, 清水芳久, 第 11 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集, 712-715 (2005).
- 5) Kakugawa, K., Tamai, M., Imamura, K., Miyamoto, K., Miyoshi, S., Morinaga, Y., Suzuki, O. and Miyakawa, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 188-191 (2002).
- 6) Kakugawa, K., Shobayashi, M., Suzuki, O. and Miyakawa, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 978-985 (2002).
- 7) Bodour, A. A., Wang, J. M., Brusseau, M. L. and Maier R. M., *Environmental Microbiology*, **5**, 888-895 (2003).

(受付 2007. 4.29)

(受理 2007. 6.18)

## Effects of Surfactant Addition on PAHs Degradation and Microbial Community

Yukako Kumada, Takuro Kisa, Takeru Ohkuma, Hiroaki Tanaka, Yoshihisa Shimizu

Kyoto University

#### Abstract

In order to elucidate the effect of surfactants {mannosyl erythritol lipid (MEL, biosurfactant) and sugar fatty acid ester (SFAE, synthetic surfactant)} addition on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), oil-polluted soil purification experiment was conducted with bench-scale bioreactors. PAHs degradation was enhanced greater with addition of mannosyl erythritol lipid (MEL), while PAHs concentrations were more or less similar in all four bioreactors at the end of experimental period. These results indicated that MEL was able to enhance PAHs degradation although MEL was unable to improve degradability of persistent PAHs. The microbial community analysis with 16S rDNA revealed that ratio of genus *Pseudomonas* related clones in clone libraries increased with time in all the four reactors.

#### KeyWords:

bioremediation, polycyclic aromatic hydrocarbons, surfactant, microbial community analysis