

(研究計画ないし研究手法の概略)

はじめに

クロム (Cr) は有用な重金属の 1 つであり、合金製造、メッキ加工、皮革製品の化学処理など、様々な用途に使用されている。一方、Cr 化合物のうち、六価クロム Cr(VI) は、高い毒性・発がん性、さらには高い水溶性を有する。このため、排水中に含まれる Cr(VI) は、低毒性かつ水溶性の低い三価クロム Cr(III) へと還元処理する必要がある。Cr(VI) 含有排水の処理方法としては物理化学的な処理法が主流である。これと比較し、Cr(VI) 還元能力を持つ Cr(VI) 還元微生物を利用する生物還元処理法は、低コスト、維持管理が容易、かつ環境調和型の処理法として期待されている (Xia et al., 2019)。ただし、この生物還元処理法では、水溶性有機栄養源の供給が必要であり、その供給が不足する場合には残存 Cr(VI) による汚染、過剰供給した場合には二次汚染 (有機汚濁) を引き起こしてしまう問題が生じる。

このような状況で研究代表者は、水溶性低分子有機物を持続的に徐放する性質を持つ生分解性ポリマーを利用することで、持続的な Cr(VI) 還元処理が可能かつ二次汚染の発生リスクの低い Cr(VI) 生物還元処理法が開発できるのではないかと考えた。一方、生分解性ポリマーを利用する Cr(VI) 生物還元処理法の報告は無く、生分解性ポリマーを用いて Cr(VI) 還元微生物群が集積培養できるかどうか不明な状況にあった。そこで本研究課題では、生分解性ポリマーの中でも安価かつ環境中での生物分解が比較的に行進しやすいポリカプロラクトン (polycaprolactone : PCL) が Cr(VI) 還元微生物群を集積培養するための個体基質として利用可能かどうかについて調査した。

実験方法

PCL を用いた Cr(VI) 還元微生物群の集積培養

本研究では、乾燥重量で約 121 g の PCL が充填されたガラスカラムリアクター (内径 : 4.56 cm、長さ : 13 cm) (図 1) を用いた集積培養により、PCL が Cr(VI) 還元微生物群を集積培養するための個体基質として利用可能かどうかを調査した。本研究で使用した PCL (Sigma-Aldrich 製) は、数平均分子量 80,000、直径約 3mm のペレット状である。培養の植種源には、和歌山工業高等専門学校の排水処理装置から採取した活性汚

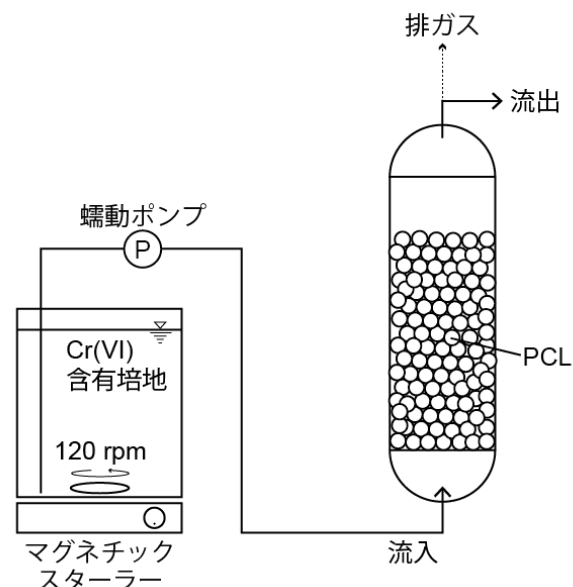


図 1. ガラスカラムリアクターの概略図

泥を用いた。蠕動ポンプによる培地の送液速度は 0.253 L h^{-1} に設定し、0.25h の送液と 5.75h 送液停止のサイクルを繰り返すことで Cr(VI)含有培地をガラスカラムリアクターへ断続的に供給した。本研究で使用した Cr(VI)含有培地の組成は、0.1 g/L KNO_3 、0.05 g/L KH_2PO_4 、0.01 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 g/L NaHCO_3 、 K_2CrO_4 （濃度は条件に応じて変更）、ならびに 1 mL/L 微量元素溶液である（pH：約 8.1）。ガラスカラムリアクターは、室温約 25°Cの部屋に設置し、暗所条件で 148 日間連続運転した。集積培養の状況は、ジフェニルカルバジド吸光光度法で溶存 Cr(VI) 濃度を測定することで確認した。PCL の分解状況は、実験前後の重量変化の測定ならびに流出水に含まれる溶存有機炭素（dissolved organic carbon: DOC）を測定することで把握した。

16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析

どのような微生物群がガラスカラムリアクター内で集積化されているのかを明らかにするため、原核生物が共通して保有する 16S rRNA 遺伝子の超可変領域（V4 領域）を対象としたアンプリコンシーケンス解析を実施した。アンプリコンシーケンス解析のための polymerase chain reaction (PCR) 増幅は、515F と 806R のプライマーペア（Caporaso et al., 2012）を用いて行った。MiSeq システム（Illumina 社）によるシーケンシングで得られた 16S rRNA 遺伝子アンプリコン配列は、mothur（Schloss et al., 2009）により解析した。97%の配列相同性でグループ化した operational taxonomic unit (OTU) の系統分類は、SILVA v138.1 リファレンスデータベース（Quast et al., 2013）を利用して行った。

（実験調査によって得られた新しい知見）

図 2 にガラスカラムリアクター流入培地と流出培地の溶存 Cr(VI)濃度とその除去率の経時変化を示す。本研究では、流入溶存 Cr(VI)濃度の異なる 3 つの条件下での Cr(VI)還元微生物群の集積培養を行った。まず、Run 1（Day 1 – Day 72）では、流入溶存 Cr(VI)濃度（平均値）が 4.8 mg/L の条件で集積培養を行った。ガラスカラムリアクター運転開始直後の Cr(VI) 除去率は 50%程度であったが、運転開始 10 日目以降は高い Cr(VI) 除去率(>80%)を継続的に確認できるようになった。これは、ガラスカラムリアクター内での Cr(VI)還元微生物群の集積化によるものと考えられる。しかし、Run 1 後半においては、Cr(VI)除去率の低下傾向が確認された。このため、Run 1 前半に確認された溶存 Cr(VI)の効率的な除去は、汚泥植種の際に持ち込まれた固形有機物やガラスカラムリアクター内で死滅した菌体に由来する有機物を主に利用して生じたものと推察される。Run 2（Day 73 – Day 114）では、Run 1 よりも高い流入溶存 Cr(VI) 濃度条件（平均値：9.7 mg/L）で集積培養を継続した。Run 2 においても溶存 Cr(VI)の除去は継続的に確認されたものの、平均 Cr(VI)除去率は約 20%と低く、除去率の向上は確認することはできなかった。このため、Run 3（Day 115 – Day 148）では、流入溶存 Cr(VI)濃度（平均値）を 2.4 mg/L まで低下させて集積培養を継続した。低い流入溶存 Cr(VI)濃度条件で集積培養を継続した Run 3 の平均 Cr(VI)除去率は 62%であり、Run 2 よりも高い Cr(VI)除去率を達成した。平均 Cr(VI)除去速度 (mg/L/h) は、Run 1 では 0.18 mg/L/h、Run 2 では 0.10 mg/L/h、Run 3 では 0.07 mg/L/h であり、水溶性有機物等を利用した既存の生物還元処理法の多くと比較して低い除去速度であった（Michailides et al., 2015）。

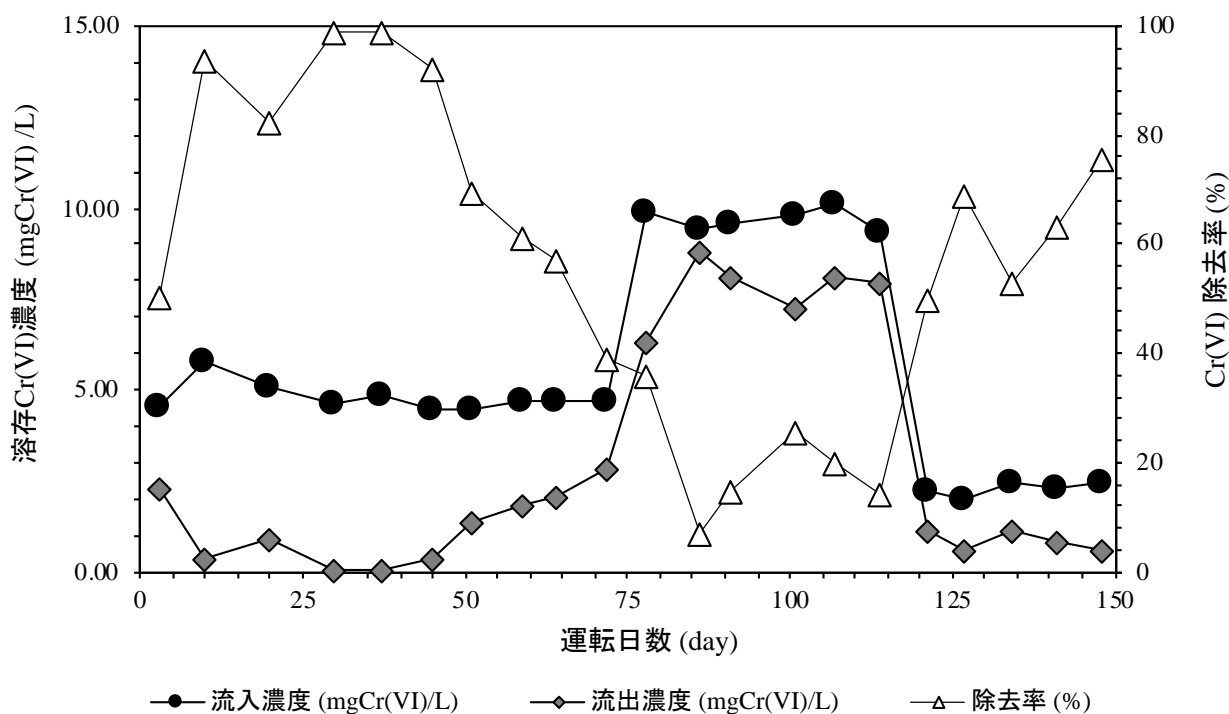


図 2. ガラスカラムリアクター流入および流出培地の溶存 Cr(VI)濃度ならびに Cr(VI)除去率の経時変化

ガラスカラムリアクター内における PCL の分解状況を把握するため、運転開始前後の PCL の重量を測定したところ、148 日間の分解量は約 1.6%であり、極めて限定的であった。Run 3において流出水の DOC濃度を測定したところ、その平均値±標準偏差は 6.6 ± 2.1 mg/L であり比較的 low 濃度で推移していた。また、アスペン材を個体基質、同一の活性汚泥を植種源として Cr(VI)還元微生物群の集積培養を行ったところ、条件によっては 0.75 mg/L/h の平均 Cr(VI)除去速度が得られることが判明している (Aoki et al., unpublished data)。これらのデータから、本研究で得られた集積培養物によって効率的な溶存 Cr(VI)除去が達成できなかった原因の 1つとして、Cr(VI)の生物還元に必要な水溶性低分子有機物が PCL から十分に供給されていないことが考えられた。以上のことから、PCL を個体基質として用いることで Cr(VI)還元微生物群の集積培養は可能であるが、Cr(VI)除去速度の向上には、Cr(VI)の存在下で高効率に PCL 分解が可能な微生物を獲得する必要があると考えられた。

16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析の結果からは、集積培養によって原核生物群集構造が変化していることが明らかとなった。門レベルの分類では、*Proteobacteria* 門 (相対存在量: 44.8%) ならびに *Bacteroidetota* 門 (相対存在量: 17.1%) に属する細菌群が集積培養物中で最も優占的に存在し、それらの相対存在量は、集積培養前 (植種汚泥) と比較して増加していた (図 3)。 *Proteobacteria* 門に Cr(VI)還元能力を持つ複数種の細菌が確認されていることを踏まえると (Pradhan et al., 2017)、これらの門に属する細菌群は、Cr(VI)の存在によって集積化されたものと考えられる。OTU レベルでは、unclassified *Xanthobacteraceae* (相対存在量: 16.7%)、*Terrimonas* (相対存在量: 10.9%)、ならびに unclassified *Comamonadaceae* (相対存在量: 9.6%) に分類される *Proteobacteria* 門の OTU が特に高頻度集積培養物から検出され (存在比: > 5%)、これらの OTU がガラスカラムリアクターで確認された Cr(VI)除去に大きく貢献している可能性が示された。

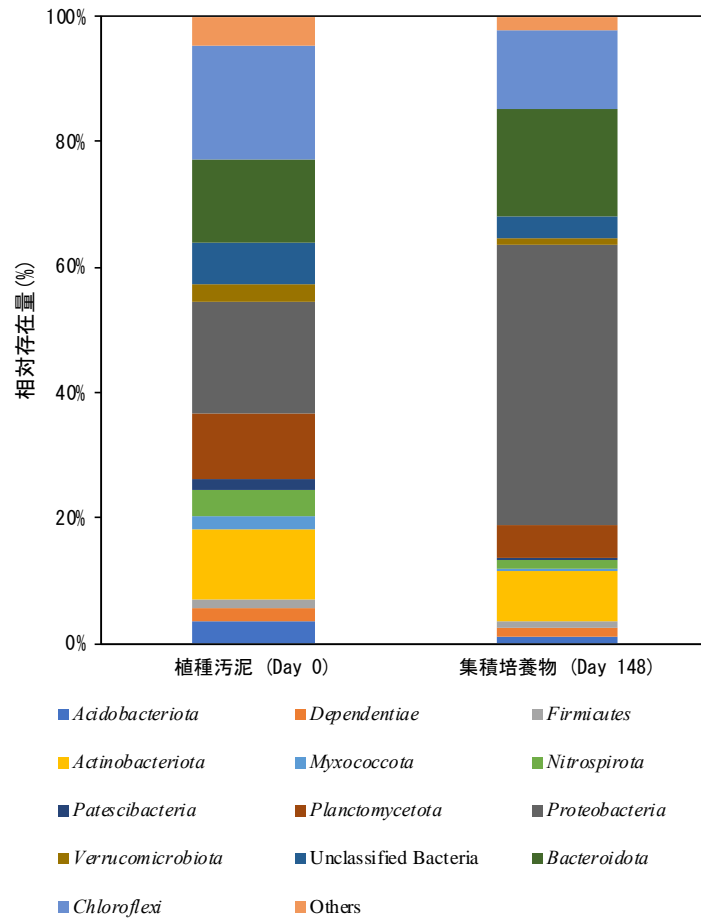


図 3. 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析の結果

参考文献

- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A. et al. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6:1621–1624.
- Michailides, M.K., Tekerlekopoulou, A.G., Akratos, C.S., et al. (2015) Molasses as an efficient low-cost carbon source for biological Cr(VI) removal. *J. Hazard. Mater.* 281:95–105.
- Pradhan, D., Sukla, L.B., Sawyer, M., Rahman, P.K.S.M. (2017) Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. *J. Ind. Eng. Chem.* 55:1–20.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41:D590–D596.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7537–7541.
- Xia, S., Song, Z., Jeyakumar, P., et al. (2019) A critical review on bioremediation technologies for Cr(VI)-contaminated soils and wastewater. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 49:1027–1078.

(発表論文)

該当無し