

化学物質の微生物による分解特性と その要因解析

2024 年

高野 能成

目次

序論	1
第 1 章：化学物質の分解度試験における微生物叢の解析	3
第 2 章：試験液量と分解特性の関係	19
第 3 章：シクロデキストリンおよび乳化剤を用いた 難水溶性化学物質の分解特性の評価	40
第 4 章：シリカゲルを用いた 難水溶性化学物質の分解特性の評価	79
総括	93
引用文献	95
謝辞	106
本研究に関する原著論文	107
補遺	108

序論

人類の活動により様々な化学物質が環境中に放出されている。環境中に放出された化学物質は主に微生物の働きによって分解され、環境中から除去される¹⁾。分解のされ易さは物質によって異なり、難水溶性の物質は環境中に長期間残留することとなる^{2,3)}。これらの物質が生物蓄積性や毒性を有する場合、ヒトの健康や生態系に様々な悪影響を及ぼすおそれがある。そのため、世界各国で化学物質がどの程度速やかに分解されるかが評価されている⁴⁻⁷⁾。

化学物質の微生物による分解は、活性汚泥等を用いた下水処理のプロセスだけでなく、河川・湖沼や海などの環境水中および土壌等の様々な場所で生じている¹⁾。微生物による分解過程には、大きく分けて菌体外に酵素を放出する場合と、菌体内に化学物質を取り込んで分解する場合に分けられるが^{8,9)}、いずれの場合においても菌体付近に餌となる化学物質が存在し、供給されることが重要である。化学物質の分解速度に及ぼす要因としては、化学物質の微生物への移行性、微生物が生産する酵素との反応性、微生物の増殖速度等のさまざまな要因が複雑に関与する。さらに微生物への移行過程では、化学物質の溶解と微生物近傍への拡散、微生物細胞膜への透過を経て細胞内への取込が生じる。細胞内へ取り込まれた化学物質は代謝を受けて一部が炭素源として菌体の増殖に使用され、残りの一部が二酸化炭素にまで無機化される。この無機化の度合いを指標とした分解度試験は、各国で幅広く利用されている分解性評価手法の一つである⁴⁾。

化学物質の分解性に関するこれら複雑な要因をすべて解明することは困難であるが、本研究ではその一部分として、供試する活性汚泥の微生物叢や、化学物質を分解する菌

種の違い、および化学物質が微生物に取り込まれる際に被験物質の分散性を与える影響に着目した。これらの要素に関連する分解度試験の諸条件を検討し、その要因解析を実施した。これらの知見は適正な化学物質の分解性評価手法の確立に寄与すると期待される。

第1章では、分解度試験で用いる活性汚泥の微生物叢の違いに着目し、被験物質の分解活性の違いを調べるとともに、次世代シーケンスを用いた微生物叢解析を実施した。

第2章では、活性汚泥と被験物質の濃度は一定でも、試験液量を増加させると分解が促進する現象に着目し、被験物質の分解菌に着目して要因解析を実施した。

第3章では、難水溶性化学物質の適正な分解性評価を行うため、種々のシクロデキストリンと乳化剤の中で分解度試験に供試するのに適切なものを探索した。まず、それ自体の分解性および分解菌の解析を行い、このうち有用なものについて被験物質の分解促進効果を調べた。さらに、被験物質の分散状態と微生物集合体との反応モデルを考案し、分解促進機構の解明を試みた。

第4章では、シリカゲルを用いた難水溶性化学物質の評価手法について検討した。被験物質をシリカゲルに吸着させるためには、一度被験物質を溶媒に溶解させ、シリカゲルと混合し、被験物質の吸着後に完全に溶媒をシリカゲルから除去する必要がある。この用途に適した溶媒を探索するとともに、シリカゲル添加時の被験物質の分散状態と微生物集合体との接触状態を解析し、分解促進機構を考察した。

第 1 章 化学物質の分解度試験における微生物叢の解析

1.1 緒言

環境中に放出される化学物質の環境影響を把握し、適正に管理することを目的に、世界各国で OECD テストガイドライン 301 等に定められた分解度試験が実施されている^{4,7)}。分解度試験では活性汚泥に由来する微生物を被験物質に曝露し、通常 28 日間培養する過程での汚泥の酸素消費量から被験物質の分解性を評価する。日本では、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）に基づき 1976 年から 301C 試験が実施されてきた^{5,6)}。301C 試験では、全国 10 箇所の下水処理場などの活性汚泥および河川や土壌などの環境試料を混合し、1 か月以上グルコースとペプトンで培養した標準活性汚泥が用いられており^{4,5)}、本汚泥は化学物質評価研究機構（CERI）が調製、頒布している¹⁰⁾。一方、2019 年に化審法が改正され、301F 試験も選択できるようになった¹¹⁾。竹腰らはこれらの試験法を比較し、CERI から入手した活性汚泥（AS-CERI）を用いた 301C 試験よりも、下水処理場から採取し培養せずに供試した活性汚泥（AS-STP）を用いた 301F 試験の方が、汚泥の分解活性が高いことを報告した¹²⁾。また、AS-CERI をグルコースとペプトンで継続培養すると分解活性が低下することも報告されている¹³⁾。これらの汚泥の分解活性の違いについては、主に被験物質の分解度の違いによって議論されており、その分解活性のもととなる汚泥の微生物叢についてはブラックボックスのまま、分解度が異なる原因はほとんど解析されてこなかった。

活性汚泥の微生物叢がブラックボックス化していた要因の一つは、活性汚泥中に含まれる微生物の種を網羅的に明らかにすることが困難であったことにある。微生物叢の解

析手法としては、まず分離培養法が発展したが、自然界に存在する微生物のうち単離培養できる菌種は僅か 1 % 以下と言われており^{14, 15)}、単離培養法だけで環境中の複雑な微生物の挙動を調べることはほとんど不可能であった。その後ゲノム解析技術が発展する中で、1990 年代に入り、様々な微生物の間で保存されている 16S rRNA 遺伝子を指標とした系統解析が盛んに行われるようになり、培養が困難な微生物であってもその菌種の推定や環境中の分布を調べられるようになった¹⁶⁾。しかし、サンガー法等による（第一世代）DNA シーケンシングでは、1 回の測定で 1 種の DNA 断片しか解析できないため、複雑な微生物叢を有す活性汚泥中の DNA を網羅的に解析するのは多大なコストを要した^{17, 18)}。2000 年代から次世代シーケンス技術が急速に発展し、一度に膨大な数のシーケンス解析を短時間で実施することが可能となった¹⁹⁾。また、2001 年から 2014 年までに 1 リード当たりの解読コストは 300 万分の 1 に、スループットは 1000 倍に向上したことに表されるように²⁰⁾、次世代シーケンスの解析コストが大幅に低下したため、様々な分野にメタゲノム解析技術が普及し、活性汚泥の微生物叢解析に適用できるようになった²¹⁾。

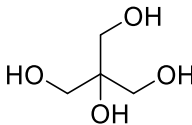
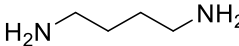
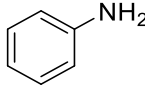
本研究では、次世代シーケンスを用いたメタゲノム解析を分解度試験に適用し、化学物質の分解活性と活性汚泥中の微生物叢の時間変化の関係を解明することを目的とした。具体的には、添加する活性汚泥である AS-CERI と AS-STP の違いとロット間での変動を確認し、AS-CERI および AS-STP をグルコースとペプトンで培養した際の微生物叢変化を調べた。

1.2 材料と方法

1.2.1 試薬

分解度試験の被験物質として *i*-erythritol、2,2-dimethyl-1,3-propanediol および putrescine を、また K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 NH_4Cl 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、0.5 %リン酸水溶液、 α -D-Glucose、1 M 水酸化ナトリウムをそれぞれ富士フィルム和光純薬から購入した。分解度試験の被験物質として aniline を関東化学から購入した。カゼイン由来のペプトンは昭和化学から購入した。

Table 1-1 被験物質の構造一覧.

Name	Structure
<i>i</i> -Erythritol	
2,2-Dimethyl-1,3-propanediol	
Putrescine	
Aniline	

1.2.2 分解度試験

分解度試験は OECD テストガイドライン 301C または 301F に従い、以下のように実施した。試験培地は K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 NH_4Cl 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、

CaCl₂ および FeCl₃·6H₂O の最終濃度が、301C 試験では 25.5、65.25、133.8、5.1、67.5、82.5 および 0.75 mg L⁻¹、301F 試験では 85、217.5、672.1、5、22.5、27.5 および 0.25 mg L⁻¹ となるように調製した。いずれの試験方法でも活性汚泥の濃度は 30 mg L⁻¹ とし、被験物質は 100 mg L⁻¹ となるように添加した。試験液は暗条件下でマグネティックスターラーを用いて攪拌しながら 301C では 25 ± 1°C、301F では 22 ± 1°C で培養し、閉鎖式酸素消費量測定装置 クーロメータ OM7000A（大倉電気）で連続的に BOD を測定した。

グルコースとペプトンで培養した AS-CERI と、下水処理場から採取した AS-STP の微生物叢の違い、および培養による微生物叢変化と分解活性への影響を調べるため、それぞれの活性汚泥を用いて 301C 試験と 301F 試験を実施した。301C 試験では、AS-CERI を CERI から 9 回購入した（2016 年 11 月 10 日、2017 年 9 月 12 日、2018 年 6 月 12 日および 11 月 28 日、2019 年 2 月 28 日および 8 月 29 日、2020 年 9 月 16 日および 12 月 18 日、2021 年 4 月 21 日、Fig. 1-3 の「A」から「I」）。AS-CERI は入手後に一部を後述の微生物叢解析に供試し、残りは試験に供すまで研究室内で 25 ± 2°C、pH 7.0 ± 1.0 に維持し、エアレーション（1 L min⁻¹、>5 mg O₂ L⁻¹）しながら 0.1 % (w/v) グルコースと 0.1 % (w/v) ペプトンで培養した。分解度試験では aniline を被験物質として用い AS-CERI の分解活性を調べた。AS-CERI の 4 サンプル（Fig. 1-3 の「A」、「B」、「C」および「D」）はそれぞれ 126、63、42 および 168 日間培養し、微生物叢解析および aniline を用いた分解度試験に供した。

301F 試験では、AS-STP は 30 回、国内の下水処理場（1 か所）の返送汚泥を採取し

た (2018 年 1 月 11 日、26 日、5 月 24 日、12 月 4 日、2019 年 1 月 8 日、2 月 12 日、26 日、3 月 13 日、8 月 1 日、9 月 11 日、13 日、10 月 17 日、2020 年 1 月 9 日、2 月 7 日、13 日、5 月 22 日、9 月 18 日、10 月 20 日、29 日、11 月 20 日、27 日、12 月 17 日、25 日、2021 年 2 月 2 日、3 月 9 日、4 月 27 日、6 月 22 日、8 月 31 日、2022 年 1 月 6 日、2 月 10 日)。採取した汚泥は試験に使用するまでエアレーションを行い、一部を下記の微生物叢解析に供し、一部を活性確認用の aniline を被験物質とした分解度試験に供した。AS-STP の 1 サンプル (Fig. 1-3 の「b」) は研究室内で $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH } 7.0 \pm 1.0$ に維持し、エアレーション (1 L min^{-1} 、 $>5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) しながら 0.1 % (w/v) グルコースと 0.1 % (w/v) ペプトンで培養した。AS-STP の 1 サンプル (Fig. 1-3 の「a」) はグルコースとペプトンを添加せずにエアレーションのみ 7 日間実施し、その間の汚泥を微生物叢解析するとともに、*D*-erythritol、2,2-dimethyl-1,3-propanediol および putrescine を被験物質として分解活性を調べた。

全ての AS-CERI と一連の AS-STP の「b」は分解活性を調べるために、aniline を被験物質として、300 mL の試験液量で 301C 試験に使用した。0、1、3、7 日間エアレーションされた一連の AS-STP 「a」は *D*-erythritol、2,2-dimethyl-1,3-propanediol および putrescine を被験物質として 900 mL の試験液量で 301F 試験に使用した。

1.2.3 微生物叢解析

微生物叢解析のための活性汚泥 (AS-CERI または AS-STP) は、汚泥液を遠心分離機 (Eppendorf Himac CF16RXII) にて 15,000 rpm で 20 分間遠心分離した後、上清を取

り除いて約 4.5 mg を採取した。得られた汚泥ペレットは -20°C で保管し、以降の DNA 抽出、PCR および次世代シーケンスは株式会社生物技研に委託した。得られた汚泥ペレットを凍結粉碎した後、Lysis Solution と MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Biomedicals) を用いて、DNA の抽出と精製を行った。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 可変領域のライブラリーの調製は 2-step tailed PCR 法を用いて行い、MiSeq システムおよび MiSeq Reagent Kit v 3 (Illumina) を用いて、 2×300 bp の条件でシーケンシングを行った。プライマー配列を取り除いた配列から品質値が 20 未満の配列を取り除き、40 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。結合後の配列長 410 塩基、リードの結合長 280 塩基、最低の重なりを 10 塩基の条件でリードを結合した。Qiime2 (ver.2020.8) の DADA2 プラグインでキメラ配列とノイズ配列を除去した後、97 % 以上相同な配列を ASV (amplicon sequence variant) とみなし、代表配列と ASV table を出力した^{22, 23)}。系統推定には EzBioCloud 16S database を用いた。得られたシーケンスデータは DDBJ に登録した (accession No. PRJDB14351)。シーケンスの品質として最低リード数は 1.5×10^4 (平均リード数 3.8×10^4)、最低の Q20 および Q30 スコアは 88.8 および 78.1 % (平均 94.3 および 87.1 %) であった。

アルファ多様性は R version 3.6.1 の環境下で vegan version 2.5-5 を用いて以下のよう
に解析した²⁴⁾。各汚泥サンプルに対し rarefaction curve をプロットして最大リード時の傾きを調べたところ、いずれも 10^{-7} 未満だったため、coverage は 100 % とみなし、それぞれの汚泥について 1 回以上観測された ASV を全てカウントした値を ASV 数とした。Simpson 指数 (D) は以下の式に従って算出した^{25, 26)}。

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i}{N} \right)^2 \quad (1-1)$$

ここで N は総リード数、 n_i は i 番目の ASV のリード数、 S は総 ASV 数を表す。季節ごとの AS-STP と AS-CERI の門レベルでの占有率およびアルファ多様性に有意な違いがあるかを調べるための統計解析は以下のように実施した。各手法および手順の概要を Fig. 1-1 に示す。Shapiro-Wilk 検定により正規分布に従わないことが確認された場合^{27,28)}、ノンパラメトリック法の Kruskal-Wallis 検定により群間の順位付けを行った後²⁹⁾、Steel-Dwass 法による多重検定を行い群間の有意差検定を実施した²⁹⁾。正規分布に従うことが確認できた場合には、one-way ANOVA（一元配置分散分析）により群間の順位付けを行った後、パラメトリック法の Tukey-Kramer 法による多重検定を行い、群間の有意差検定を実施した^{29,31,32)}。

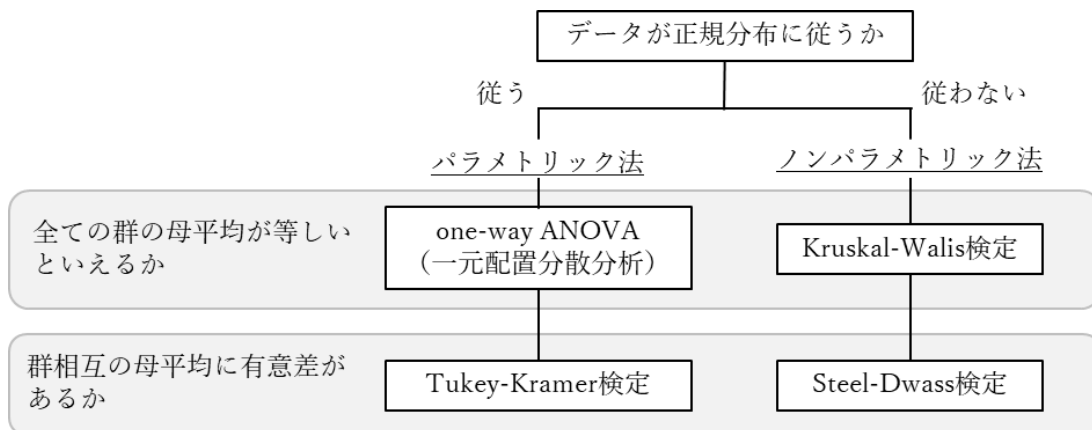


Fig. 1-1 3 群以上の比較検定の手順と概要.

ベータ多様性は、Qiime2 の diversity プラグインを用いて各汚泥サンプル中の ASV の配列類似性と占有率に基づいた weighted UniFrac 距離による非類似度を求め、取得

した distance matrix を vegan パッケージ内の非計量多次元尺度法 (NMDS) を用いて
序列化し 3 次元にプロットした。なお、seed 値は 1 から 100 のうち、stress 値が最小に
なったものを選択した。

1.3 結果と考察

1.3.1 標準活性汚泥と都市下水汚泥の比較

CERI または下水処理場 (STP) からそれぞれ入手した当日の AS-CERI 9 サンプルと
AS-STP 30 サンプルの微生物叢解析を実施した。Fig. 1-2 には AS-CERI および、AS-
STP を採取時期に応じて春 (SPR: 3~5 月、 $n = 5$)、夏 (SMR: 6~8 月、 $n = 3$)、秋
(AUT: 9~11 月、 $n = 8$)、冬 (WTR: 12~2 月、 $n = 14$) に分類したときの各細菌の門
レベルでの占有率を示す。AS-CERI は 2 つの門 (*Bacteroidetes* および *Proteobacteria*)
だけで全体の $80 \pm 20 \%$ を占有しており、AS-STP に比べて偏った門構成であった。
Bacteroidetes については、AS-CERI での占有率は $40 \pm 10 \%$ であり、AS-STP の各季節
での占有率 (SPR、SMR、AUT および WTR では 12 ± 3 、 15 ± 4 、 12 ± 1 および $13 \pm$
 2%) と比較して約 3 倍であった。また AS-STP では全ての季節で観察された *Chloroflexi*、
Chlorobi、*Chlamydiae*、*Firmicutes* および *Nitrospira* は、AS-CERI では占有率がいず
れも 1.5 %未満であった。AS-STP では Fig. 1-2 に示した 12 の門はいずれの季節でも
1 %を超えて存在しており、Steel-Dwass 検定において季節間での有意な差は認められ
なかった ($p = 0.05$)。すなわち、AS-STP は門レベルで各季節を通して比較的安定した
微生物叢を維持していたことが分かった。

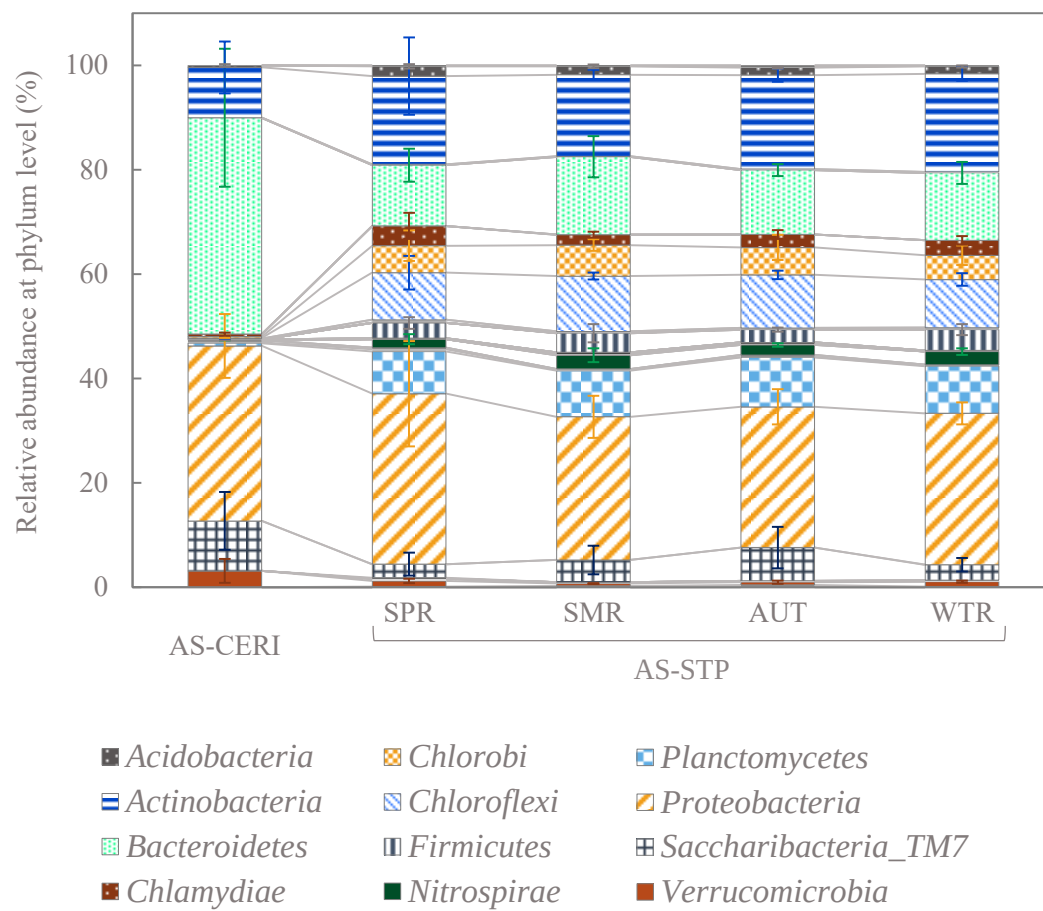


Fig. 1-2 AS-CERI と各季節の AS-STP の微生物叢の比較（門レベル）。

エラーバー：95 %信頼区間

ある汚泥サンプル中に 1 回以上観測された ASV の種類を ASV 数と定義すると、サンプル中の微生物種が多様であるほど ASV 数は大きくなる^{33, 34)}。AS-CERI の ASV 数は 180 ± 30 であったのに対し、AS-STP の SPR、AUT および WTR の ASV 数はそれぞれ 600 ± 100 、 620 ± 90 および 530 ± 40 であり、Steel-Dwass 検定により AS-CERI の多様性は有意に低かった ($p = 0.05$)。AS-STP の SMR の ASV 数は 600 ± 100 であり、AS-CERI と有意な差はみられなかった。AS-STP の各季節間で ASV 数に有意な違いは認められなかった (Steel-Dwass 検定または Tukey-Kramer 検定 ($p = 0.05$))。加えて、各年の AS-STP (2018 年 ($n = 4$)、2019 年 ($n = 8$)、2020 年 ($n = 11$)、2021 年 ($n = 5$)) の間でも ASV 数に有意な差は認められなかった。続いて Simpson index による多様性の比較を行った。Simpson index とは、各汚泥サンプルの ASV について、ランダムに選んだ 2 つが異なる確率を表す。従って、ASV が多様でかつ各 ASV の占有率に偏りが少ないほど Simpson index は 1 に近づく。AS-CERI の Simpson index は 0.92 ± 0.04 だったのに対し、AS-STP の Simpson index は 0.988 ± 0.001 (各季節では SPR、SMR、AUT および WTR : 0.988 ± 0.003 、 0.987 ± 0.004 、 0.989 ± 0.002 および 0.988 ± 0.002) であり、AS-CERI は AS-STP に比べて多様性が低かった。AS-STP の各季節間においては多様性に有意な差はなく (Steel-Dwass 検定 ($p = 0.05$))、通年で高い多様性が維持されていた。

AS-CERI と AS-STP の間でのロット間のばらつきを比較する目的で、AS-CERI および AS-STP の各門における占有率の標準偏差を (SD) を比較した。AS-CERI において SD が最大となった門は *Bacteroidetes* の 20 % であり、*Proteobacteria* (9.4 %)、

Saccharibacteria_TM7 (8.5 %)、*Actinobacteria* (7.6 %) と続いた。一方、AS-STP において SD が最大となった門は *Proteobacteria* (6.0 %) であった。このことから、AS-CERI は AS-STP よりもロット間のばらつきが大きいことが示された。AS-CERI が 10 か所の自然環境下から採取されているが、自然環境は変動性が大きいいため、グルコースとペプトンで培養したとしてもある程度のばらつきが依然として残り、それは AS-STP よりも大きかったと考えられる。

1.3.2 標準活性汚泥と都市下水汚泥の培養による微生物叢変化

OECD テストガイドライン 301 および化審法によると、AS-CERI はグルコースとペプトンで 1 か月以上培養され、さらに 301C 試験の開始まで各研究所で培養して使用することになっているのに対し、AS-STP はグルコースまたはペプトンのいずれも添加せず、採取後 7 日間はエアレーションして使用することができる。本節では AS-CERI および AS-STP をグルコースとペプトンで様々な期間培養し、培養中の微生物叢変化を調べる目的で微生物叢解析を行った。Fig. 1-3 には、AS-CERI と AS-STP の非類似度に基づく NMDS プロットを示す。NMDS の 3 次元のうち、各 2 次元のプロットおよび 3 次元プロットの各座標は補遺の Fig. S1 および Table S1 に示した。NMDS では各サンプルの非類似度をなるべく保ったまま次元を下げる手法であるため、各軸は固有の意味を持たない³²⁾。そこで軸の表す意味を調べるため、種々のパラメータとの相関性を調べた結果、NMDS の 3 次元のうち NMDS1 は ASV 数と高い相関を示した（相関係数 $r = -0.89$ ）。つまり、NMDS1 は多様性の違いをよく表していることが分かった。NMDS プ

ロットでは微生物叢が類似した汚泥同士はより近くにプロットされ、類似していない汚泥同士はより遠くにプロットされる。AS-CERI は CERI から 9 回購入し、Fig. 1-3 の「A」～「I」に示した。このうち「A」～「D」はグルコースとペプトンで培養し、培養日数をアルファベットの右側に付した。AS-STP は STP から 30 回入手したが、アルファベットは 26 までしかなく、30 サンプルは非常に近くにプロットされたため、26 サンプルを無作為に選抜し、代表して表示した (Fig. 1-3 の「a」～「z」)。このうち「a」サンプルはグルコースとペプトンを加えずにエアレーションのみ行い、エアレーション日数を a の右側に斜体の数字で付した。「b」サンプルについてはグルコースとペプトンで培養し、培養日数を b の右側に付した。汚泥の活性基準としては 301C 試験の有効基準を用い、aniline 分解度が 7 日で 40 %を超えかつ 14 日で 65 %を分解することとし、これを満たさないものにはアスタリスク (*) を付した。

前節で述べた通り、門レベルでの解析から AS-CERI は AS-STP と比較してロット間でのばらつきが大きかった。本節においても Fig. 1-3 に示される AS-CERI のプロット (黒色の「A」～「I」) は幅広く分布したのに対し、AS-STP のプロット (オレンジ色の「a」～「z」) は近い位置に分布した。AS-CERI の各プロット間の平均距離は 0.27 であり、AS-STP の平均距離は 0.073 と比べて 3.7 倍大きかった。AS-CERI の 4 つのサンプルをグルコースとペプトンで培養したところ、ASV 数は 215 から 88 (「A」から「A126」) に、111 から 81 (「B」から「B63*」) に、154 から 101 (「C」から「C42」) に、157 から 70 (「D」から「D168*」) にそれぞれ変化した。AS-CERI の各サンプルのうち、分解活性が十分でなかったものは「B63*」、「C14*」、「C28*」、「C42*」、「D49*」、「D70*」、

「D91*」および「D168*」であり、それらの ASV 数は 81、121、97、101、81、98、85 および 70 であり、概して 100 を下回った。これらの結果は、AS-CERI を継続してグルコースとペプトンで培養すると、その基質で生育しやすい微生物叢に更に変化したことにより、多様性と分解活性が減少したと考えられる。同様の現象として、AS-STP をグルコースとペプトンで 1 か月間培養すると分岐脂肪族アルコール(具体的には 2,2-dimethyl-1,3-propanediol) を分解しなくなったことが報告されている³⁵⁾。すなわち、単調な栄養源での培養により微生物叢が単純化し、様々な化学物質の分解に寄与する微生物を失ったと考えられる。

AS-STP について、「a」のサンプルをグルコースとペプトンの添加なしにエアレーションのみ 7 日間実施したところ、「a1」から「a7」(ピンク色)は極めて近くにプロットされた。エアレーション期間が 0、1、2、3、6 および 7 日間の汚泥の ASV 数はそれぞれ 566、497、535、608、578 および 579 であり、明確な変化はみられなかった。加えて、エアレーション期間が 0、1、3、7 日間の汚泥の活性を *D*-erythritol、2,2-dimethyl-1,3-propanediol および putrescine の分解性を指標として確認したところ、いずれの物質も完全に分解され、各物質が分解されるまでの lag 期間 (BOD 曲線が上昇し始め、分解が開始するまでの期間で、分解度が 2 %以上急激に上昇した時点分解の開始と定義) はエアレーション期間に関わらず約 2.5、4.5、8 日であった。一方で、AS-STP をグルコースとペプトンで培養した「b1」から「b56*」のサンプルについては、培養を継続するにつれて NMDS1 が負の方向にそのプロットがシフトし、培養 0 日の ASV 数は 625 だったのに対し、培養 56 日では 142 まで減少した。培養 21 日以降の汚泥は AS-

CERI のサンプルの分布と近い位置へとシフトした。それに続いて、分解活性が不十分であった「b42*」および「b56*」を含む培養 42 日以降の AS-STP は、「B63*」、「D91*」、「D168*」を含む長期間培養した AS-CERI の分布へと近づいた。これらの結果は、AS-STP の微生物叢はグルコースとペプトンで継続して培養することにより多様性が減少して「B63*」や「D168*」などの長期間培養した AS-CERI に近づき、継続培養により AS-STP と AS-CERI は互いに類似した微生物叢に変化した。したがって、グルコースとペプトンからなる単調な炭素源および窒素源で培養することにより、元の活性汚泥の多様性に関わらず微生物叢が単純化したものと考えられる。これは、キノシプロファイを調べた平石らや³⁶⁾、次世代シーケンスを用いた CERI の報告³⁵⁾と同様で、栄養源を利用し易く、増殖の速い微生物が優占化したためと考えられる。

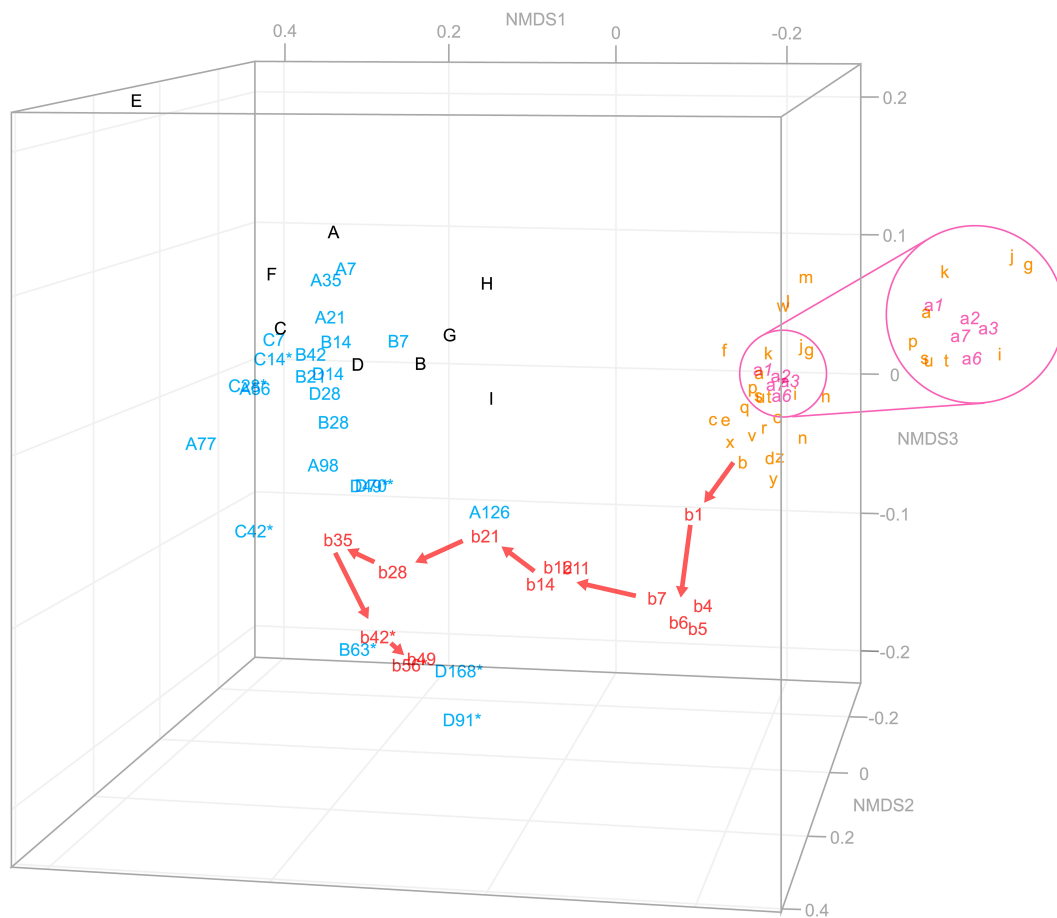


Fig. 1-3 AS-CERI (「A」から「I」) および AS-STP (「a」から「z」) の微生物叢解析に基づく NMDS の 3 次元プロット.

アルファベットは CERI または STP から入手したそれぞれの活性汚泥を表し、アルファベット右側の数字は研究室内でグルコースとペプトンで培養した日数を表す。アルファベット右側の斜体の数字はグルコースとペプトンを添加せず、エアレーションのみ行った日数を表す。アスタリスクは十分な分解活性がなかった汚泥を示す。

1.4 結論

本章では、AS-CERI と AS-STP の違いについて、被験物質の分解活性と微生物叢に基づいて解析を行った。入手直後の AS-CERI と AS-STP の微生物叢を比較することにより、AS-CERI は AS-STP よりも偏った門構成で、微生物の多様性が低く、ロット間でのばらつきが大きい傾向があることが明らかになった。AS-STP を 7 日間エアレーションした場合に微生物叢および分解活性に大きな変化はみられなかったが、AS-STP をグルコースとペプトンで長期間培養することにより微生物の多様性が減少し、AS-CERI の微生物叢に類似していくことが分かった。

第2章 試験液量と分解特性の関係

2.1 緒言

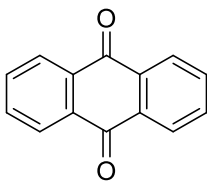
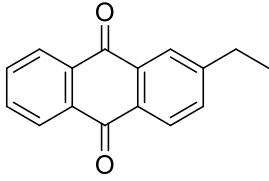
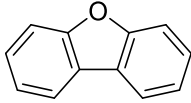
化学物質の微生物による分解では、被験物質の存在形態だけでなく、微生物の存在状態およびその種類と量によっても大きく変化すると考えられる。第1章では、分解度試験に添加する活性汚泥の微生物叢の違いについて、次世代シーケンスによる微生物叢解析を行うとともに、aniline等の分解度を指標として分解活性との関係を解析した。入手直後には高い微生物多様性を有していた都市下水汚泥(AS-STP)であっても、グルコースとペプトンという単調な栄養源での培養を継続すると微生物叢が単純化し、活性も低下することを明らかにした。一方、竹腰らは、AS-STPを用いた301F試験において、被験物質と活性汚泥の初期濃度は一定でも、試験液量を増やすと被験物質の分解を促進することを報告している¹²⁾。この要因として添加する微生物叢の多様性が関係していると予想されるが、なぜ被験物質の分解性に違いが生じるのか、活性汚泥の微生物叢に着目した直接的な要因説明はなされていない。本章では、まず分解度試験の過程で微生物がどのような分布変化を起こしているかに着目し、被験物質が分解される過程での微生物叢を複数回調べた。さらに、ここで得た知見をもとに分解に寄与した微生物を的確に判別するのに適した汚泥解析時期を見極め、試験液を増量することで分解が促進される要因を、微生物叢に基づいて検討した。

2.2 材料と方法

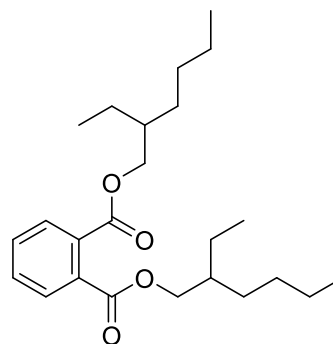
2.2.1 試薬

分解度試験の被験物質として anthraquinone (AQ)、2-ethylantraquinone (2-EA)、dibenzofuran (DF) および di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) を東京化成工業から購入した。アセトニトリルおよび蒸留水（それぞれ HPLC グレード）、テトラヒドロフラン（安定剤不含、特級）、 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 NH_4Cl 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、0.5 % リン酸水溶液、 α -D-glucose、1 M 水酸化ナトリウムはそれぞれ富士フィルム和光純薬から購入した。アセトンは関東化学から購入した。シリカゲル（粒子径：5～25 μm 、薄層クロマトグラフィー用）は Sigma-Aldrich から購入した。亜硫酸ナトリウムはナカライテスクから購入した。

Table 2-1 被験物質の構造一覧.

Name	Structure
Anthraquinone (AQ)	
2-Ethylantraquinone (2-EA)	
Dibenzofuran (DF)	

Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)



2.2.2 分解度試験

分解度試験は OECD テストガイドライン 301C または 301F に準拠して実施した。

DEHP を被験物質とした 301C 試験では閉鎖式酸素消費量測定装置としてクーロメータ OM7000A の他に Oxitop[®]も併用した。それ以外はクーロメータ OM7000A を用いて連続的に BOD を測定した。なお Oxitop[®]はクーロメータと同様に BOD を測定できることが明らかになっている³⁷⁾。被験物質の分解度 (Biodegradation rate) は、被験物質と活性汚泥を 301C または 301F 試験の試験培地汚泥に添加した「試験区」の BOD (測定値、mg) を被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論酸素要求量 (計算値、mg) で除し、100 を乗ずることで算出した。

分解過程での微生物叢の変遷を調べる目的で、DF または AQ を被験物質とした 301F 試験を各 3 連で実施した。被験物質はシリカゲルに吸着させることなく、直接 900 mL の試験培地 (1.2.2 分解度試験を参照) に添加した。BOD 曲線をモニタリングし、分解開始後からプラトーに到達するまでに 5 回試験液を採取し、微生物叢解析と後述の HPLC 分析を実施した。

試験液量の増加による分解性の変化を調べる目的で、採取直後の AS-STP を用いた

301F 試験と、標準活性汚泥（AS-CERI）を用いた 301C 試験を各 3 連で実施した。活性汚泥と被験物質の初期濃度は一定とした条件下で、それぞれ試験液量を 300、900 および 3900 mL に設定した。301F 試験の被験物質としては、DF を直接、2-EA をシリカゲル吸着させて試験培地に添加した。シリカゲル吸着では、2-EA をアセトンに溶解させた溶液にシリカゲルを添加してマグネティックスターラーで攪拌した後、ロータリーエバポレータ R-300（Buchi）と真空オーブン AVO-250NB（アズワン）を用いて溶媒を除去した。具体的な攪拌、乾燥の方法は既報¹²⁾に従い、被験物質を溶解させる溶媒をクロロホルムからアセトンに、真空オーブンでの乾燥期間を 28 日から 14 日間に変更した。アセトンの方がクロロホルムよりも毒性が弱く、14 日と 28 日間とで溶媒の残留量に大きな変化がなかったためである。いずれの被験物質を用いた場合も、試験中に BOD をモニタリングしながら、分解度が 30 %を超えて上昇している最中に試験液を採取し、微生物叢解析に供した。301C 試験の被験物質としては、AQ または DEHP を直接試験培地に添加した。DEHP を被験物質とした試験の 900 mL および 3900 mL の試験は Oxitop[®]を用いて評価した。Oxitop[®]を併用した理由はクーロメータと Oxitop[®]の BOD 値にほとんど差が見られなかったためである³⁷⁾。

試験容器内の局所的な環境の違いが分解性に及ぼす影響を調べる目的で、300、900 および 3900 mL の各試験溶液中での酸化還元電位(oxidation-reduction potential: ORP)の変化を調べた。測定は試験液の表層（液面から 2 cm の地点）、中層（液面と試験容器の底の間）、低層（試験容器の底から 2 cm の地点）において実施した。ORP は活性汚泥を加えずに、還元剤である亜硫酸ナトリウム添加による経時変化を pH/ORP メー

タ F72L（堀場アドバンスドテクノ）により測定した。加えて、分解度試験中に試験液の表層と中層における pH 変化および DO（溶存酸素）濃度の変化が生じるかについても pH/ORP メータおよび DO メータ B-100BTi（飯島電子工業）を用いて調べた。

2.2.3 微生物叢解析

第 1 章と同様の手法で、301F 試験に供試した AS-STP 約 4.5 mg について微生物叢解析を行った。得られたシーケンスデータは DDBJ に登録した（accession No. PRJDB14351）。シーケンスの品質として最低リード数は 1.5×10^4 （平均リード数 3.8×10^4 ）、最低の Q20 および Q30 スコアは 88.8 および 78.1 %（平均 94.3 および 87.1 %）であった。

2.2.4 HPLC 分析

被験物質の分解性は概して BOD に基づき評価したが、分解過程での微生物叢の経時変化を調べると同時に、HPLC を用いて被験物質の残留量を評価した。培養中の試験液をホールピペットで 3 mL 分取し、5 mL メスフラスコに添加後、DF はアセトニトリルを、AQ はテトラヒドロフランを添加して被験物質を完全に溶解させた。各段階での被験物質の残留量は HPLC 分析における各被験物質標準液のピーク面積値との比から求めた。HPLC 分析は島津 LC-10ADvp と LabSolutions（島津製作所）を用いて、Table 2-2 に示す条件で実施した。

Table 2-2 被験物質の HPLC 分析条件.

カラム	L-column2 ODS (150 mm × 2.1 mm、5 μ m、CERI)
カラム温度	40 °C
移動相	B conc.: 50 % $\rightarrow$ (3.1 % min ⁻¹) $\rightarrow$ 100 % A: 0.1 %ギ酸含有蒸留水、B: 0.1 %ギ酸含有アセトニトリル
流速	0.2 mL min ⁻¹
定量波長	254 nm
注入量	10 μ L

2.3 結果と考察

2.3.1 分解過程における微生物叢の変遷

被験物質が分解される過程における微生物叢変化を調べる目的で、DF と AQ の分解度試験を各 3 連で実施した。Fig. 2-1A には BOD 測定に基づく DF と AQ の典型的な分解度曲線（それぞれ replicate 1）と、活性汚泥の採取時点（菱形：◆）、HPLC で測定した各被験物質の残留率を示す。残りの 2 連（replicate 2 および 3）については被験物質ごとに Fig. 2-2 および 2-3 にまとめて示した。Fig. 2-1A、2-2A および 2-3A にて汚泥の採取時点（◆）の直後に分解度が 2～3 % 上昇しているのは、採取の度に試験容器を開放したことで容器内の定常状態を保つために酸素が追加で供給されたためである。培養開始後、DF では 3 日後から、AQ では 8 日後から分解度が大幅に上昇し、それぞれが生分解され始めた。その後、分解度曲線はプラトーに達した。Fig. 2-1B および 2-1C

には DF と AQ それぞれについて、試験開始時および各採取時点における分類学上の科 (family) レベルでの細菌の占有率を示す。グラフにはいずれかの採取時点で占有率が 0.001 %を超えて存在した科すべてを表示した。Fig. 2-1B および 2-1C の Day 0 の微生物叢は同じデータである。Fig. 2-1B に示した DF については、*Sphingomonadaceae* の占有率が 2.4 % (Day 0) から 81.1 % (Day 7.3) に増大した後、17.8 % (Day 21.5) に減少した。*Sphingomonadaceae* は *S. phenoxybenzoativorans* や *S. aromaticiconvertens* (former RW16^T) など DF を分解すると報告されている細菌を含む科であり^{38, 39)}、本研究の知見と一致した。Day 21.5 における HPLC に基づく DF の残留率は 0 %であったことから、*Sphingomonadaceae* は炭素源となる DF の枯渇によりその占有率を維持できなかったと考えられる。DF が分解される過程における多様性の変化として、Day 0、6、6.6、7.3、8 および 21.5 における ASV 数は 714、478、315、230、246 および 288 であり、概して DF が分解されるにつれて減少した。DF の分解がほとんど完了した時点で ASV 数はわずかに上昇した。AQ の場合、*Sphingomonadaceae* に加えて *Sphingobacteriales_f*、*Parachlamydiaceae*、*Myxococcales_f* および *Comamonadaceae* が優占化しており、各科の最大の占有率はそれぞれ 43 % (Day 10)、19.6 % (Day 14)、8.7 % (Day 11)、11.3 % (Day 14) および 5.7 % (Day 11) であった (Fig. 2-1C)。実際に、*Sphingomonas* sp. strain MM-1 や *Terrimonas* 属の細菌、*Comamonadaceae*; *Hydrogenophaga* 属の細菌は AQ を分解することが知られている⁴⁰⁻⁴²⁾。これらの知見は AQ を分解する細菌が試験液中に複数存在し、分解が進行する中で優占化したことを示している。AQ の分解過程での ASV 数の推移については Day 0、8、10、11、14 および

28 でそれぞれ 714、466、326、297、237 および 344 であった。DF と類似の傾向を示し、AQ が分解される過程で多様性が減少し、AQ の分解後には多様性が増加した。これは炭素源である AQ の存在量に依存して微生物叢が変化したことを意味する。DF および AQ の他の 2 連についても同様の傾向を示した (Fig. 2-1、2-2 および 2-3)。これらの知見は被験物質の分解菌を特定するための重要な示唆を含んでいる。分解度試験は一般的に 28 日の試験期間で実施されるが、被験物質によっては 28 日以前に分解が完了し、試験終了時に BOD 曲線がプラトーに達している場合もある。そのような場合、分解菌が占有率を維持するための炭素源が枯渇し、分解中の微生物叢から変化する可能性があるので、28 日の時点で分解菌を調べるのは不適切である。したがって、被験物質の分解菌を調べるにあたっては、被験物質の分解が盛んな時期での微生物叢を調べることが妥当と考えられる。

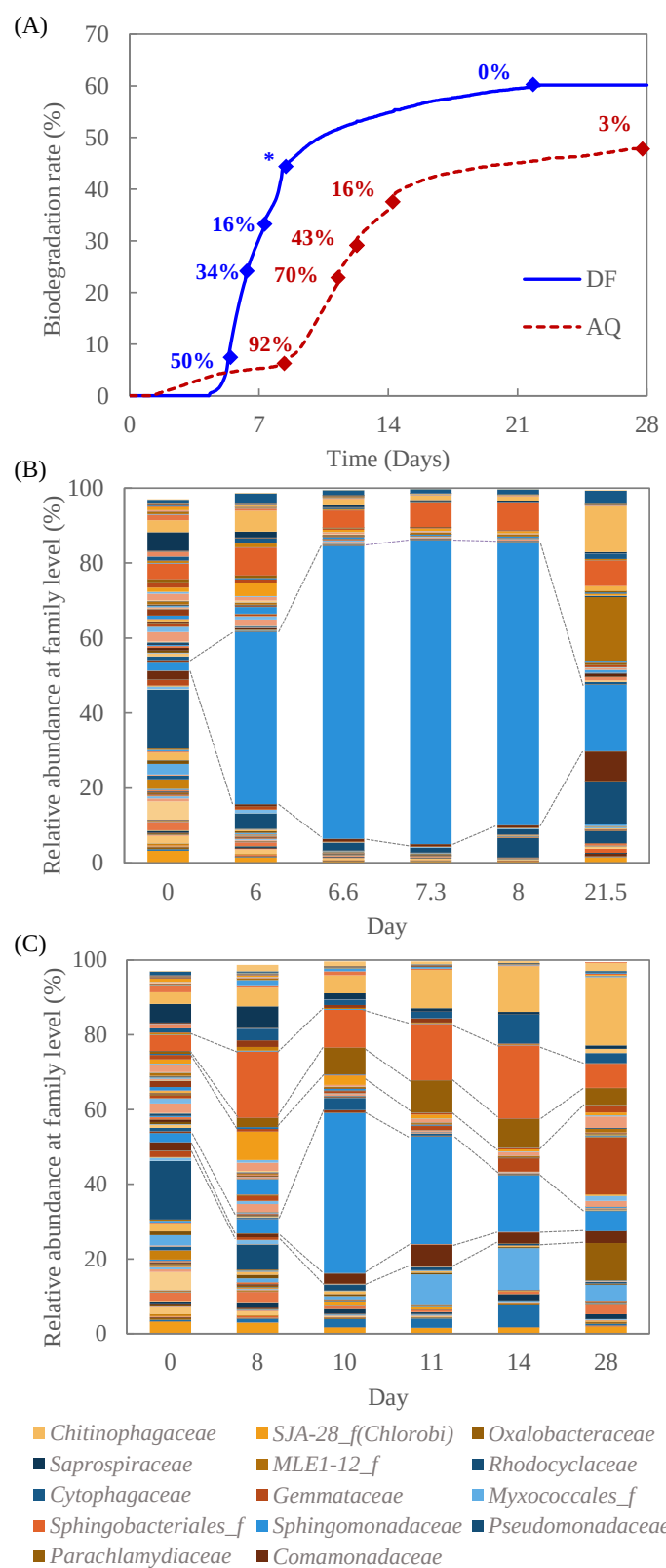


Fig. 2-1 DF および AQ の分解度曲線 (A)、DF および AQ の分解過程における科レベルでの微生物叢変化 (B および C) .

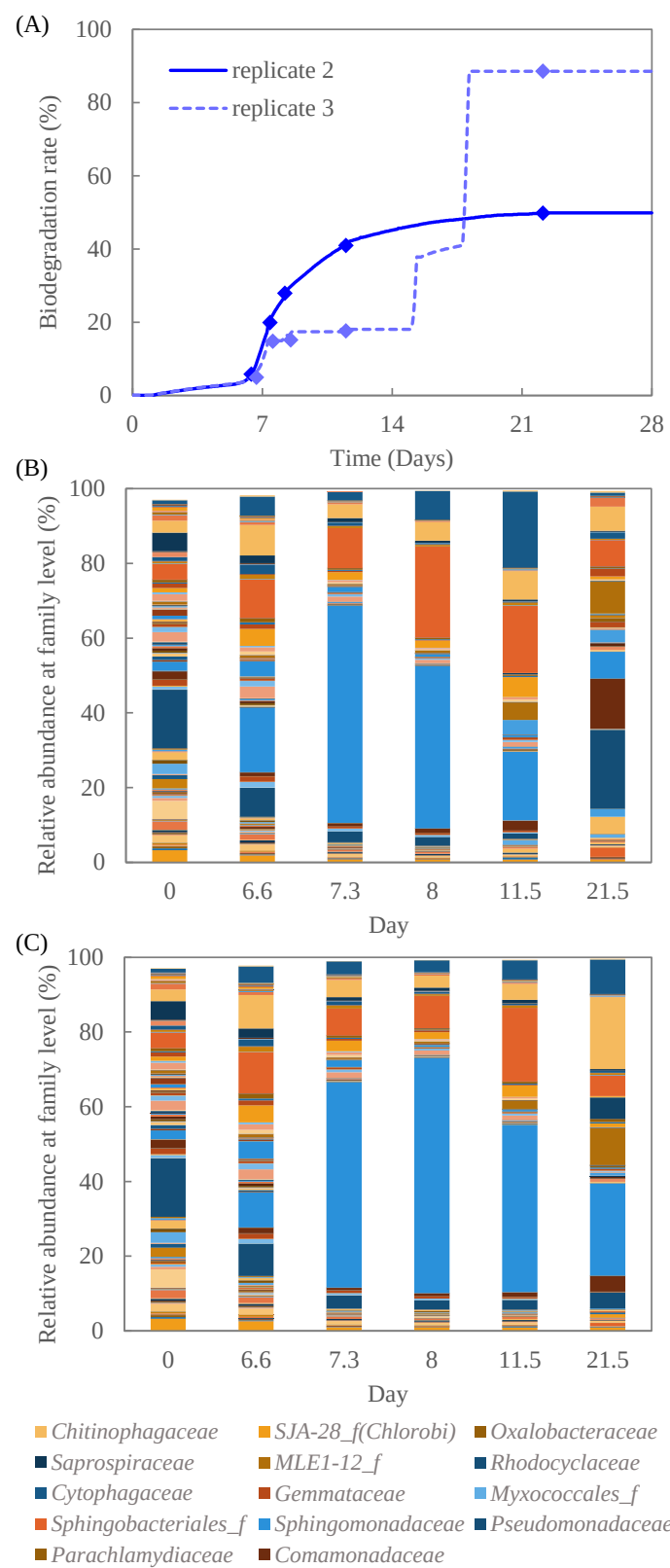


Fig.2-2 DF の分解度曲線 (A)、DF の分解過程における科レベルでの微生物叢変化 (B および C) .

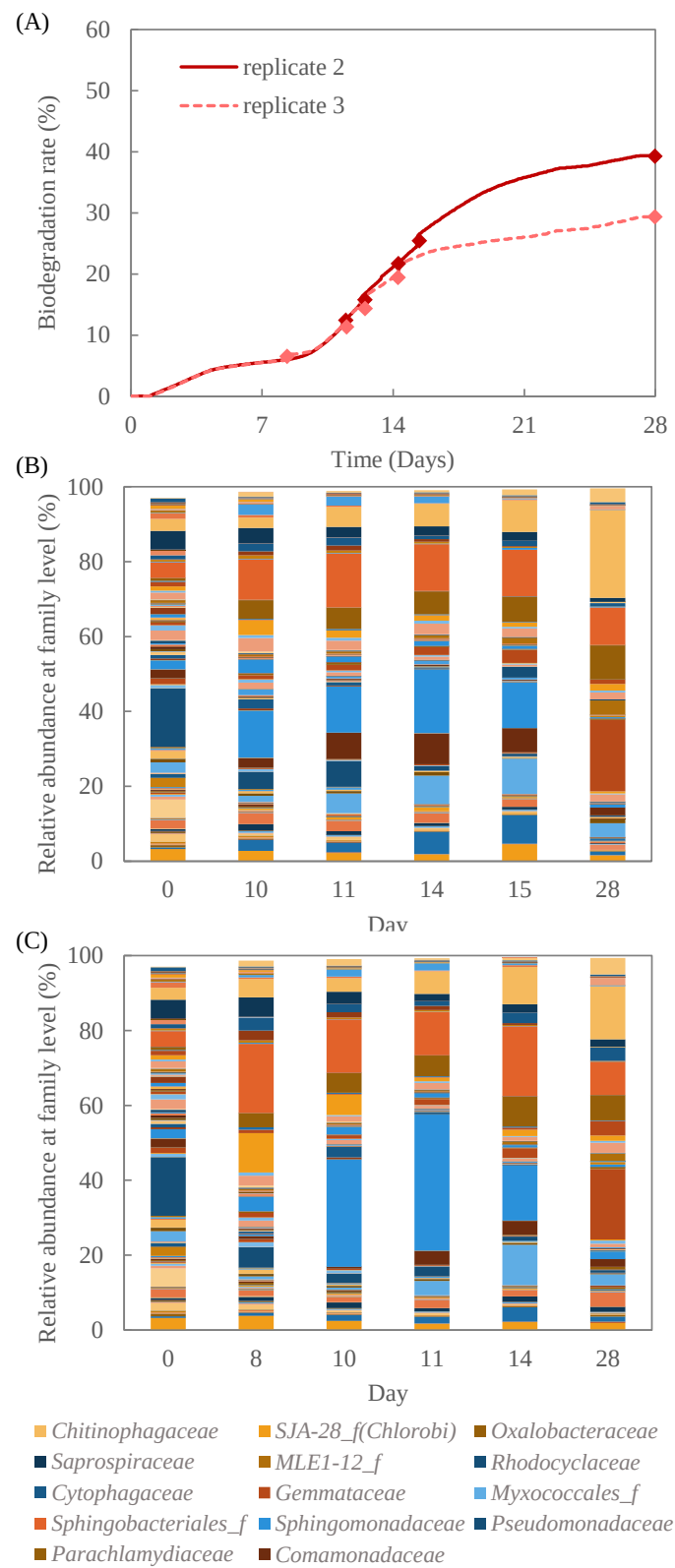


Fig. 2-3 AQ の分解度曲線 (A)、AQ の分解過程における科レベルでの微生物叢変化 (B および C) .

2.3.2 試験液増量時の分解菌の解析と分解促進の要因解析

竹腰らは、活性汚泥として AS-STP を用いて、被験物質および汚泥の初期濃度を一定とした条件下で試験液量を増加させると、被験物質の分解が促進され、連間のばらつきが低減したと報告している¹²⁾。この要因については、竹腰らは分解に寄与した微生物の存在確率が増加したためと推論しているが、直接的な証拠はこれまで示されてこなかった。本節ではこの仮説を検証するために、DF または 2-EA を 300、900 および 3900 mL で試験し、分解菌の特定を行った。

Fig. 2-4 には DF (A) または 2-EA (B) を被験物質として、各液量 3 連で実施した分解度試験における分解度の経時変化を示す。分解度曲線上の菱形 (◆) は微生物叢を解析した時点を示す。なお、この解析時点は 2.3.1 で適切と考えられたタイミングで実施した。DF については、300 mL と 900 mL 試験区において 40 日間の培養期間中に 3 連中 1 連で分解がみられなかったのに対し、3900 mL 試験区では 3 連ともに分解が認められた (Fig. 2-4A)。試験開始から生分解が開始するまでの lag 期間を調べると、300 mL では 14 日および 38 日、900 mL では 9 日および 14 日であったのに対し、3900 mL では 8 日ないし 9 日であった。すなわち、試験液量を増加するほど、lag 期間が短くなるとともに連間でのばらつきも小さくなることが確かめられた。2-EA については、いずれの試験液量でも 3 連ともに分解が確認された (Fig. 2-4B)。各試験区において試験開始直後に分解度曲線の上昇が認められ、1 日以内に分解度が 10 %を超えた。この上昇は、被験物質を含めずシリカゲルのみをアセトンに浸漬し、真空乾燥させた場合にも生じたため、2-EA をシリカゲルに吸着させた際に吸着溶媒として使用したアセトンが、

14 日間の真空乾燥後にも微量に残留し、分解されたものと考えられる。加えて、300 mL 試験区の 1 連 (replicate 2) において 0 から 21 日間の分解度曲線が一定となったが、これは装置の一時的な測定不良で、酸素消費量が測定できていなかったものと思われる。各試験液量での 2-EA の分解開始時期を比較すると、300 mL 試験区では 23 日ないし 40 日、900 mL 試験区では 20 日ないし 27 日に分解が開始した。最大容量である 3900 mL において最も早く分解が開始したのは replicate 1 の 13 日であり、試験区全体を通して最も短い日数であった。しかし 3900 mL 試験区の 3 連全体で見ると lag 期間のばらつきが十分低減したとは言い難い。したがって、3900 mL でもばらつき十分低減できる試験液量ではなく、再現性を向上させるためには試験液量をさらに増やす必要性が示唆された。

竹腰らの報告の通り¹²⁾、試験液量を増やすことにより分解が促進することが本研究においても確認できたため、この要因を調べるため分解度が 30 %を超えて上昇し続けている時点 (Fig. 2-4 の◆) での微生物叢を解析した。Table 2-3 および 2-4 には 300、900 および 3900 mL いずれかの容量の各試験区において、微生物叢全体に占める存在割合が 5 %を超えた ASV を示す。Table 2-3 および 2-4 中の replicate 1、2 および 3 は Fig. 2-4 に一致し、ダッシュ (–) はその試験区における占有率が 0.1 %未満であったことを表す。Fig. 2-4A において 300 mL と 900 mL の replicate 3 では分解が認められなかったため、微生物叢解析は実施しなかった。Table 2-3 に示した DF の場合、300 mL 試験区では *Terrimonas* が 0.6 から 7.0 % (replicate1) に、*S. phenoxybenzoativorans* が 0.1 %未満から 41.1 % (replicate 2) に、*Sphingobium* (ASV No.7) が 0.1 %未満から

42.1 % (replicate 1) に増加したが、これらの細菌は他の試験区では顕著に増加しなかった。一方、*DQ413108* は 6.6 から 2.7 % (replicate 1) または 3.5 % (replicate 2) に減少した。これらの結果から *Terrimonas*、*S. phenoxybenzoativorans* および *Sphingobium* (ASV No.7) は DF の生分解に寄与したと考えられるが、これらの細菌は連間でばらついて存在していた。900 mL 試験区では、*Terrimonas* と *S. phenoxybenzoaticorans* だけでなく、*Sphingobium* (ASV No.2) と *JN609364*⁴³⁾ の占有率も増加した。3900 mL 試験区では、*Sphingomonadaceae* (ASV No.1) の増加も認められた。DF を添加しないコントロール区では、*Terrimonas* の占有率は 1.4 % であり、その他の種は検出されなかった (0.1 % 未満)。したがって、試験液量を増やすことにより DF の分解菌としてより多くの菌種が産出されたことが分かった。Table 2-4 に示した 2-EA の場合、300 mL 試験区では *GU454926*、*AF358012*、*Hydrogenophaga*、*Comamonadaceae* (ASV No.16)、*Azonexaceae* (ASV No.19) および *Mycobacterium* (ASV No.19) が試験開始時 (Day 0) に比べて 20 % 程度増加した。*Mycobacterium* (ASV No.11) は 900 mL 試験区で、*Pseudomonas*、*Nocardioides* および *G. didemni* は 3900 mL 試験区でさらに増加した。2-EA そのものを分解する細菌についての報告はほとんどなされていないが、2-EA と構造が類似する AQ を分解する細菌、あるいは酸化されることで AQ を生じる anthracene を分解する細菌については多くの報告がなされており⁴⁴⁾、*Terrimonas* 属や、上述の *Comamonadaceae*、*Hydrogenophaga*、*Pseudomonas* sp.、*Gordonia*-like strain BP9、*Mycobacterium gilvum* VF1 および *Nocardioides* 等が知られている⁴⁵⁻⁴⁸⁾。2-EA、AQ または anthracene は類似の代謝経路

で生分解されると考えられ^{44, 49-51)}、これらの細菌は 2-EA を分解すると予想される。また、2-EA を添加しないコントロール区では、*GU454926* および *AF358012* の占有率はそれぞれ 1.7 および 1.0 %に過ぎず、その他の細菌は検出されなかった (0.1 %未満)。このことから、これらの細菌は 2-EA の生分解に寄与しており、2-EA の分解菌であると考えられる。900 mL または 3900 mL 試験区においてのみ検出された細菌種は、各液量での 3 連の試験区すべてにおいて認められたわけではなかった。これは、活性汚泥を各試験容器に添加する際の菌体量の変動により、添加する微生物の総量が少ない場合にはこれらの細菌は残存できない可能性があったが、汚泥の添加量を増やすことによって安定的に増殖することができたためと考えられる。ここで、3900 mL 試験区での 2-EA の生分解開始時期のばらつきは、900 mL 試験区でのそれよりも大きかったため、汚泥の添加量の他に液量増加に伴う培養条件の物理的な違いによる影響について確認した。各試験溶液中での亜硫酸ナトリウムの酸化速度を ORP に基づき試験容器の各位置 (表層、中層、低層) で調べたところ、測定した範囲内で液量および位置による酸化速度の差異はほとんどみられなかった。また、生分解中における局所的な DO や pH の変化の差異はみられなかった (data not shown)。竹腰らは、tris(2-ethylhexyl)trimellitate を被験物質とし、試験液量を 300 mL から 3900 mL または 9000 mL に増加した実験において、9000 mL での生分解開始時期が 3 連ともに 300 mL または 3900 mL における分解開始時期とほぼ一致すると報告した³⁷⁾。一方、本研究では、3900 mL 試験区で最も早く生分解が開始した replicate 1 は、300 mL および 900 mL のそれ (いずれも replicate 1) よりも早く、互いに一致しなかった。このことは、分解菌が安定的に増殖できる条

件下において、その分解開始時期はより早い時期（ここでは 3900 mL の replicate 1 で観察された時間）に収束する可能性を示唆している。すなわち、試験液量を 3900 mL とした場合でも、培養開始時の分解菌の存在量の変動を抑制するには不十分であり、試験液量をさらに増やして微生物の総量を増加させることで、生分解の開始時期のばらつきを抑制できる可能性がある。また、*G. didemni* は replicate 1（3900 mL）のみで認められたことから、この分解菌が 2-EA の生分解に重要な役割を果たしている可能性がある。以上をまとめると、試験液量が増加するにつれて生分解が促進された理由は、試験容器に添加した分解菌種の総量の違いに起因すると考えられる。すなわち、試験液量を増やすことにより、より多くの分解菌種が生存し、増加する可能性が高まることが初めて実験的に明らかになった。

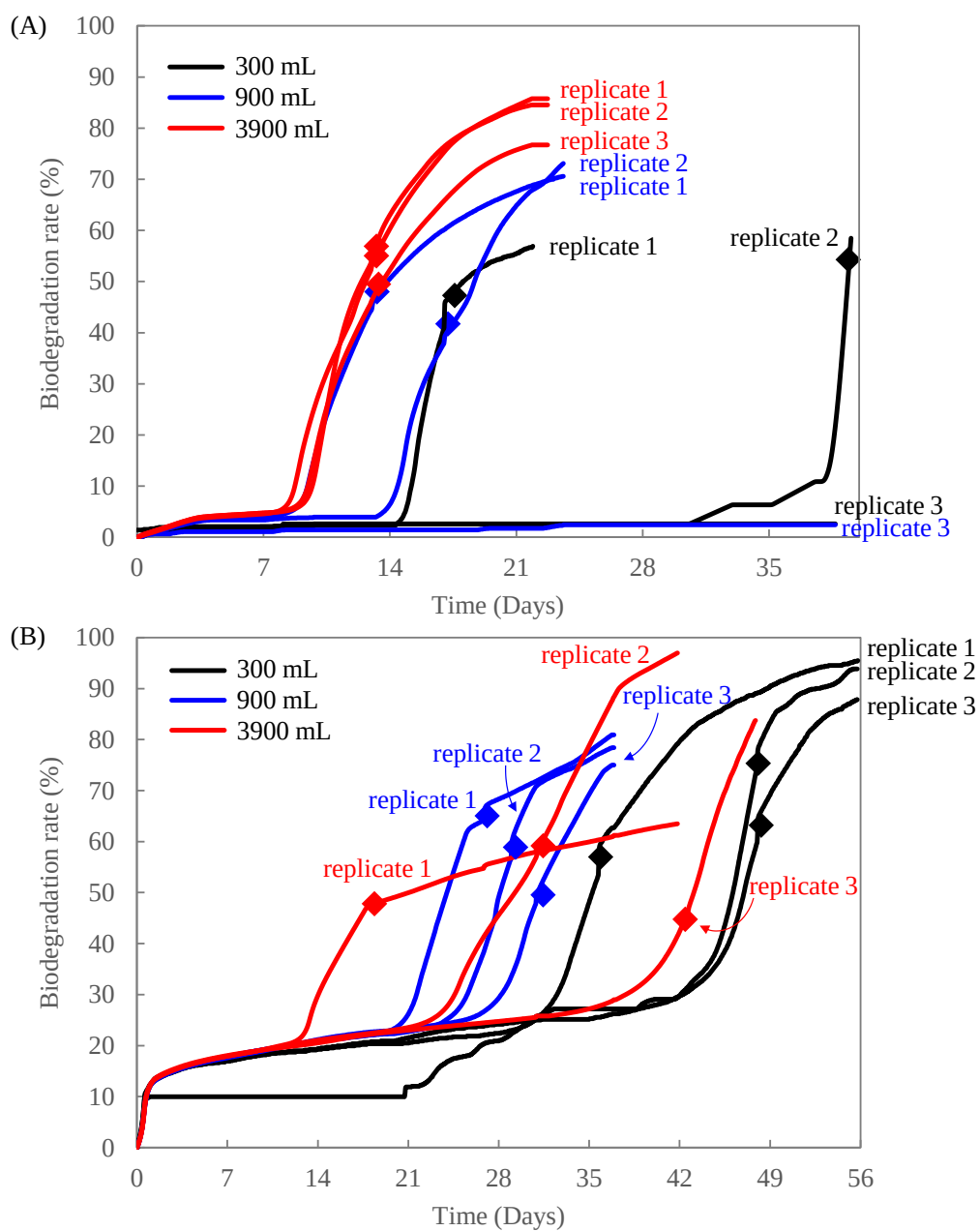


Fig. 2-4 試験液量 300、900 および 3900 mL での DF (A) および 2-EA (B) の分解度曲線.

Table 2-3 試験液量 300、900 および 3900 mL での DF の分解度試験における各容器中の細菌の占有率.

ASV No.	Taxonomy						Relative abundance (%)											
	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	(Day 0)			300 mL			900 mL			3900 mL		
							rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 1	rep. 2	rep. 3
1	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae			-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.0	-	-
2	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium		-	-	-	-	-	-	7.4	0.2	0.3	-	-	-
3	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	NVQB	NVQB	NVQB	JN609364	-	-	-	-	-	-	1.7	0.7	6.6	1.6	1.6	1.6
4	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Terrimonas		0.6	7.0	0.7	0.9	0.9	0.9	0.5	0.5	0.7	0.6	0.6	0.6
5	Chlorobi	HQ014634	HQ014634	HQ014634	HQ014634	DQ413108	6.6	2.7	3.5	4.3	8.7	8.7	5.2	4.4	4.9	4.9	4.9	4.9
6	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	<i>S. phenoxylbenzoativorans</i>	-	-	41.1	40.8	-	40.8	-	5.6	40.7	42.2	42.2	42.2
7	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium		-	42.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 2-4 試験液量 300、900 および 3900 mL での 2-EA の分解度試験における各容器中の細菌の占有率.

ASV No.	Taxonomy						Relative abundance (%)											
	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	(Day 0)	300 mL			900 mL			3900 mL				
								rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 1	rep. 2	rep. 3	rep. 1	rep. 2	rep. 3		
8	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.0	
9	Actinobacteria	Actinomycetia	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	Nocardioides		—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.7	12.6	
10	Actinobacteria	Actinomycetia	Corynebacteriales	Nocardiaceae	Gordonia	G. didemni	—	—	—	—	—	—	—	—	33.0	—	—	
11	Actinobacteria	Actinomycetia	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium		—	—	—	—	20.2	—	—	—	—	0.2	—	
12	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Terrimonas	GU454926	1.1	3.0	13.1	7.2	4.8	3.4	5.6	10.7	7.7	4.6	—	
13	Chlorobi	HQ014634	HQ014634	HQ014634	HQ014634	DQ413108	7.8	2.6	0.1	0.3	1.7	1.1	0.2	1.2	0.6	0.3	—	
14	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126	PAC002126	AF358012	0.7	5.5	6.7	2.6	6.3	5.5	12.4	4.3	7.8	3.0	—	
15	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Hydrogenophaga		—	—	28.5	3.9	—	—	0.2	0.5	0.1	15.2	—	
16	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonadaceae		—	3.9	0.3	26.7	0.7	2.4	3.2	0.1	0.1	0.3	—	
17	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Azonexaceae	Azonexaceae		—	2.1	0.2	5.5	6.1	3.2	6.2	1.5	2.7	3.1	—	
18	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	LKHV	GQ340280	—	0.5	—	—	1.0	1.3	—	1.0	5.2	—	—	
19	Actinobacteria	Actinomycetia	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium		—	19.4	24.0	14.9	0.3	21.9	17.0	—	—	—	—	

rep.: replicate

占有率 (Relative abundance, %) は 300、900 および 3900 mL の各試験区のうち、微生物叢解析時 (Fig. 2-4 の ◆) にいずれかの容器中で 5 % を超えて存在した ASV に対して表示した。占有率が 0.1 % 未満のものはダッシュ「-」を表示した。

続いて、活性汚泥として CERI から入手した直後の AS-CERI を用いて、AQ および DEHP を被験物質とした 301C 試験を、試験液量を 300、900 および 3900 mL として各 3 連で実施した。Fig. 2-5 には、各試験液量における AQ (A) および DEHP (B) の分解度の時間変化を示す。被験物質として AQ および DEHP を選んだ理由の一つは、AS-CERI の分解活性が低く、DF や 2-EA が生分解されなかったためである。二つ目は、竹腰らが、試験液量 300 mL の 301C 試験において、AQ および DEHP の分解度がそれぞれ 0 および 21 %であったと報告しているためである¹²⁾。これらの分解度は、AQ および DEHP が「良分解性 (readily biodegradable)」と判定されている事実と矛盾することから^{52, 53)}、両物質とも 301C 試験における再現性が低く、試験液増量の効果を検討するのに適していると考えられる。その結果、いずれの試験液量においても AQ は培養 10～12 日目に生分解が開始し、DEHP は培養 7～10 日目に生分解が開始され、試験液量によらず lag 期間に大きな差は見られなかった。本結果は、先述の AS-STP を用いた 301F 試験の結果とは対照的であり、AS-CERI 中の微生物の多様性は AS-STP 中の微生物よりもはるかに低いため、試験液量を増やしても、試験液中の微生物種がほとんど変化しなかったと考えられる。

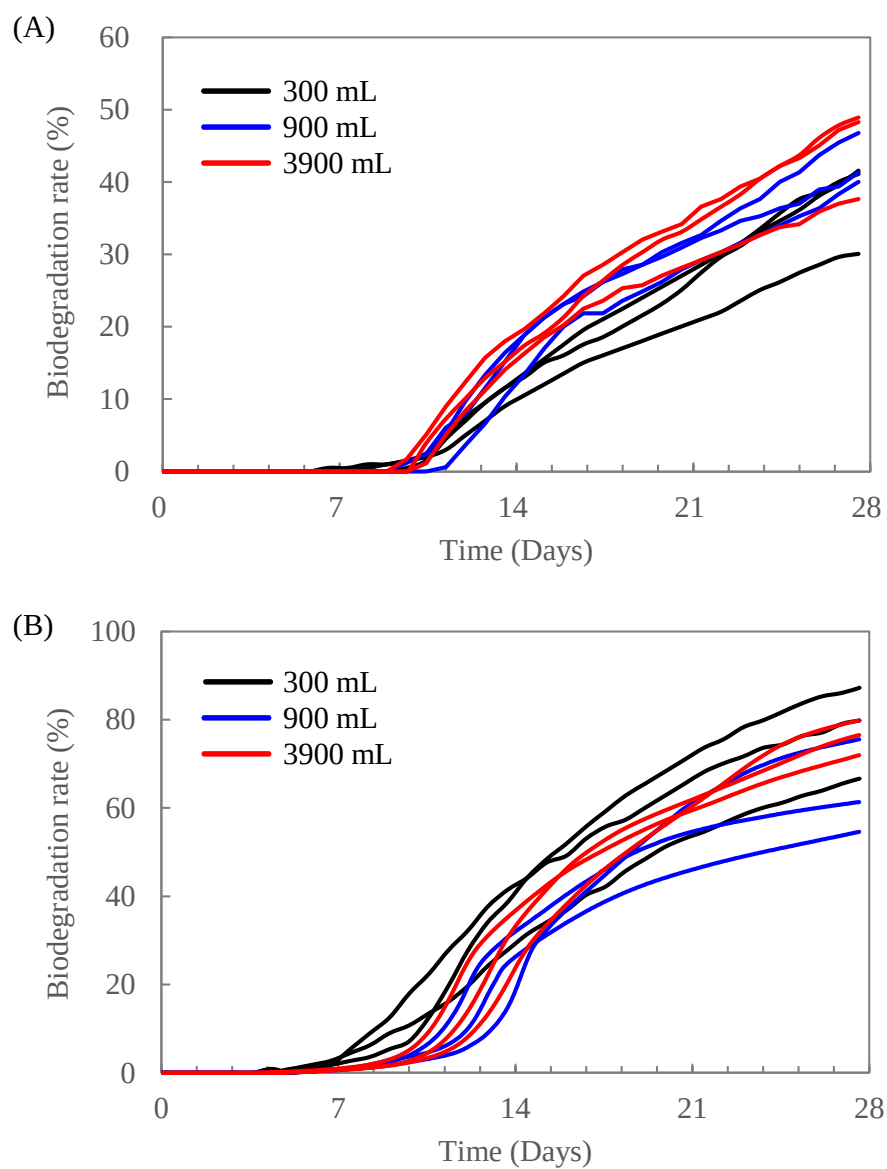


Fig. 2-5 試験液量 300、900 および 3900 mL での AQ (A) および DEHP (B) の分解度曲線.

2.4 結論

本章では被験物質の生分解過程における微生物叢の変化と、試験液増量による被験物質の分解促進の要因を、微生物叢に基づいて解析した。被験物質の分解が開始されてから、完全に分解されるまでの過程での微生物叢変化を複数回調べたところ、生分解の途中には少数の分解菌の占有率が増加し、生分解が終了した後は分解菌の占有率が減少することがわかった。この知見をもとに、AS-STP を用いて被験物質と活性汚泥の初期濃度を一定に保ったまま試験液量を増加させた試験を実施した結果、試験液量を増やすほど、より多くの種類の分解菌が生存し、増加する可能性が高まることが実験的に初めて明らかになった。試験液量を増加させることにより、分解菌の存在比に起因する不確実性を抑えた評価が可能になると考えられる。

第 3 章 シクロデキストリンおよび乳化剤を用いた難水溶性化学物質の分解特性の評価

3.1 緒言

微生物による発酵や腐敗、酸化分解などによる物質の分解過程においては、微生物の周囲に餌となる物質が供給されることが重要である。第 2 章で明らかになったように、分解度試験において化学物質が分解される過程では、餌となる被験物質の分解と、微生物の増殖が繰り返されて分解が進行する。一方で、難水溶性物質については被験物質の溶解が律速段階となり得るため、微生物への物質供給を高めて、その本来の分解性を評価するために被験物質を分散させることが重要である。

化審法施行以来、分解性評価に用いられてきた OECD テストガイドライン 301C では被験物質の濃度が一律に 100 mg L^{-1} に規定されているため^{4, 5)}、被験物質が難水溶性物質の場合、不溶状態で分解性を評価せざるを得ない状況であった。2019 年に導入された OECD テストガイドライン 301F では⁴⁾、被験物質が難水溶性物質の場合、試験液中の微生物との接触を改善する目的で補助物質（溶媒、乳化剤又は担体）を追加して良いことになった¹¹⁾。補助物質の基準として、OECD テストガイドラインや化審法で定める試験方法では、補助物質は生分解性や微生物への阻害性がないこと（理想的な基準と定義）と記載されているが、補助物質の具体的な例示はない^{4, 5, 11)}。これに対して、OECD テストガイドラインが引用している International Organization for Standardization (ISO) 10634 standard では、補助物質は非生分解性であるべきとしつつも、補助物質の生分解は被験物質の生分解量に対し 10 %を超えないこと（現実的な基準と定義）と記載されており、補助物質が例示されている^{54, 55)}。

ISO 10634 で例示されている補助物質には、乳化剤の一つとして polyethylene sorbitan trioleate (Tween®)がある⁵⁴⁾。我々の研究グループでは Tween® 80 (1 分子中にオレイン酸エステルを 1 個有し、ethylene oxide (EO) の繰り返し数の合計が 20 のもの) を添加することで、難水溶性の 2-ethylanthraquinone や octabenzene (OB) の分解が促進されることを明らかにした¹²⁾。ただし、被験物質だけでなく Tween® 80 自体も生分解されており、その分解度合いは ISO 10634 の現実的な基準を超えていた⁵⁶⁾。ISO 10634 には他の乳化剤として、Pluronic® (構造を Table 3-1 に掲載) のうち、hydrophilic-lipophilic balance value (HLB) が 9 のもの (Pluronic P10300® 別名 Pluronic® P-103) と 13.5 のもの (Pluronic P9400® 別名 Pluronic® P-94) が例示されている^{54,55)}。しかし、これらの乳化剤は主骨格をなすポリエーテル構造が生分解されやすく⁵⁷⁾、OECD および化審法の理想的な基準、あるいは ISO 10634 の現実的な基準を満たす乳化剤の探索は容易でない。さらに、ISO 10634 の現実的な基準を満たす場合でも、補助物質の生分解により増殖した微生物が被験物質の生分解を加速化すれば、被験物質の生分解性を正しく評価したとは言えない。このような場合は、補助物質と被験物質の分解菌が同じかどうかを確認する必要がある。

本章では、難水溶性の被検物質を分散させて生分解性を適切に評価できる補助物質を探索した。そこで、適切な補助物質としての条件を次の 1) ~3) と規定した。1) 生分解されない、あるいは生分解されたとしても ISO 10634 の基準を満たすこと、2) 生分解される場合は、補助物質と被験物質を分解する菌が同じでないこと、3) 微生物への阻害がないこと、である。難水溶性物質としては分散剤の添加によって分解が促進され

た OB および anthraquinone (AQ) を用い¹²⁾、補助物質としては以下の a) ~d) のものについて検討した。a) ISO materials: ISO 10634 に乳化剤として例示された Tween[®] 85 および Pluronic[®]、このうち Pluronic[®]としては幅広い HLB をカバーする 15 種類、b) Nonylphenols: IGEPAL[®] CO-520、CO-630 および 4-nonylphenyl-polyethylene glycol (4-NP)、c) PFAS: 試験中に生分解され難く界面活性を有すると考えられる PFAS として perfluoropentanoic acid (PFPA)、perfluorohexanoic acid と perfluoroheptanoic acid、d) Modified CD: 修飾されたシクロデキストリン (CD) である。各補助剤の構造は下記の Table 3-1 に示した。CD はグルコースが α -1,4 結合した環状オリゴ糖であり、外側が親水的で内側が疎水的なため、疎水性物質を内側の空洞に包接し安定に分散させるという独特の性状を有す⁵⁸⁾。CD は医薬品や化粧品分野では有効成分の安定化、環境汚染に対するバイオレメディエーションの分野では、汚染物質の生物利用性を高める等、多方面での利用が報告されている⁵⁹⁻⁶¹⁾。しかし、CD そのものは構成するグルコースの分子数 (6、7、8 個) に関わらず易分解性と報告されているため⁶²⁻⁶⁴⁾、分解度試験への適用例はこれまで報告されていない。本章では、ヒドロキシ基が修飾された数種の CD が適切な補助物質になり得るかについて検討した。

これらの補助物質について、まずは補助物質自体の生分解性を調べるとともに、次世代シーケンスを用いて補助物質の添加による微生物叢変化を観察した。次に、適切な補助物質を選定するため、1) 補助物質の添加による被験物質の分解促進効果と微生物への阻害の有無、2) 微生物叢解析によって補助物質と被験物質の分解菌が同一かどうかを確認した。さらに、modified CD が被験物質と微生物の接触機会をどのように高める

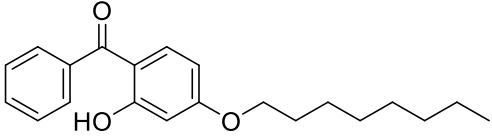
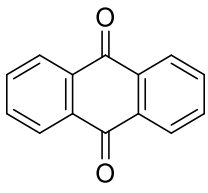
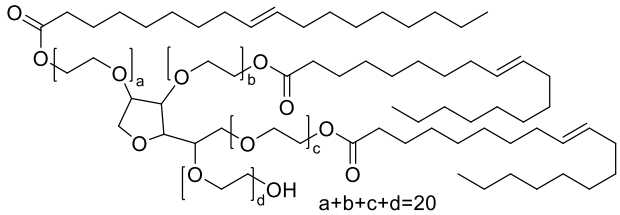
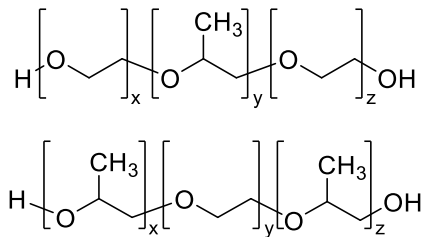
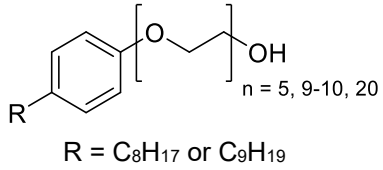
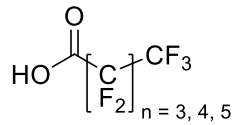
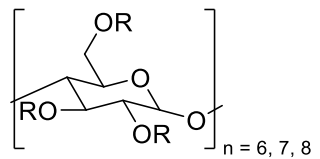
かが不明であるため、modified CD と被験物質の試験液中での分散状態を調べるとともに、被験物質の分散と微生物集合体との反応モデルを考案し、modified CD による反応促進機構の解明を試みた。

3.2 材料と方法

3.2.1 試薬

OB、AQ、Tween® 85 は東京化成工業から、Pluronic® P-105、P-123、P-124、F-68、F-108、F-127、L-31、L-35、L-61、10R5、17R4 および 31R1、IGEPAL® CO-520 および CO-630(これらの物性は 3.2.4 に後述)、4-nonylphenyl-polyethylene glycol、PFPA、perfluoroheptanoic acid、perfluoroheptanoic acid、trimethylated β -CD (構成するグルコース分子が 7 個でヒドロキシが完全メチル化されたもの)、methylated β -CD (ヒドロキシ基の置換度が 53~66 %のもの、以降は partially methylated β -CD と表記する)、(2-hydroxypropyl)- β -CD (ヒドロキシ基の置換度が 60 %のもの)、 β -CD sulfated sodium salt (ヒドロキシ基の置換度が 57~71 %のもの)、anthracene は Sigma-Aldrich から購入した。Trimethylated α および γ -CD の合成は三友化学研究所に委託し、 α -および γ -CD (それぞれ 6 および 8 個のグルコース分子により構成) のヒドロキシ基を過剰量のメチル化剤により完全メチル化することで得た。Trimethylated α および γ -CD の純度は LCMS-2020 (島津製作所) で測定し、それぞれ 99.7 および 99.8 %であった。その他の試薬については第 1 章および第 2 章と同様である。

Table 3-1 被験物質および分散剤の構造一覧.

Test substance	Structure
Octabenzone (OB)	
Anthraquinone (AQ)	
Additive	Structure
Tween® 85	
Pluronic®	
Nonylphenols	
PFAS	
Modified CD	
	R = CH ₃ CH(OH)CH ₃ , SO ₃ Na, CH ₃

3.2.2 分解度試験

第2章と同様に分解度試験は OECD テストガイドライン 301F に準拠して実施した。

都市下水処理場の活性汚泥は 2021 年 4 月 17 日（乳化剤を用いた試験）および、2022 年 5 月 30 日（trimethylated または partially methylated β -CD を用いた試験）および 8 月 2 日（trimethylated α 、 β または γ -CD を用いた試験）に採取した。試験液量はいずれの場合も 900 mL とした。分散剤を加えない OB または AQ の分解度（Biodegradation rate_{test}）は Eq. 3-1 に基づいて算出し、分散剤を加えた場合の分解度（Biodegradation rate_{test+additive}）は Eq. 3-2 に基づいて算出した。

$$\text{Biodegradation rate}_{\text{test}} (\%) = \frac{\text{BOD}_{\text{test}} - \text{BOD}_{\text{control}}}{\text{ThOD}_{\text{test}}} \times 100 \quad (3-1)$$

ここで、 BOD_{test} は被験物質と活性汚泥を 301F 試験の試験培地（1.2.2 分解度試験を参照）に添加した「試験区」の BOD（測定値、mg）、 $\text{BOD}_{\text{control}}$ は活性汚泥を試験培地に添加した「コントロール区」の BOD（測定値、mg）、 $\text{ThOD}_{\text{test}}$ は被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論酸素要求量（計算値、mg）である。

$$\text{Biodegradation rate}_{\text{test+additive}} (\%) = \frac{\text{BOD}_{\text{test+additive}} - \text{BOD}_{\text{control}}}{\text{ThOD}_{\text{test}}} \times 100 \quad (3-2)$$

ここで $\text{BOD}_{\text{test+additive}}$ は「試験区＋補助物質」の BOD（測定値、mg）である。この補助物質について、化審法では生分解性がないことを示すことという制限がある。同様に、OECD テストガイドライン 301 の難水溶性物質の評価（Annex III）においては「乳化剤は生分解されてはならない」と記載されている。したがって、Eq. 3-3 のように補助物質と活性汚泥を基礎培養基に添加した「コントロール区＋補助物質」の酸素消費量 $\text{BOD}_{\text{control+additive}}$ から $\text{BOD}_{\text{control}}$ を差し引いた $\text{BOD}_{\text{additive}}$ が実質ゼロであることが求めら

れる。一方 ISO 10634 では「補助物質の分解は被験物質の生分解量の 10 %を超えないこと」と記載されているため、 BOD_{additive} はゼロでなくとも、Eq. 3-3 で示した補助物質の分解度が 10 %を超えなければ良いこととなる。

$$\text{Biodegradation rate}_{\text{additive}} (\%) = \frac{BOD_{\text{additive}} - BOD_{\text{control}}}{ThOD_{\text{test}}} \times 100 \quad (3-3)$$

OB および AQ の $ThOD_{\text{test}}$ は Table 3-2 に示した。

Table 3-2 OB および AQ の理論酸素要求量 (ThOD) .

Test substance	Complete oxidation reaction	A ^{a)}	B ^{b)}	C ^{c)}	ThOD ^{d)}
Octabenzene	$C_{21}H_{26}O_3 + 26O_2 \rightarrow 21CO_2 + 13H_2O$	26	326	100	230
Anthraquinone	$C_{14}H_8O_2 + 15O_2 \rightarrow 14CO_2 + 4H_2O$	15	208	100	208

^{a)} Number of oxygen molecules, ^{b)} molar mass ($g \text{ mol}^{-1}$), ^{c)} concentration ($mg \text{ L}^{-1}$), ^{d)} $ThOD (mg) = MM_{O_2} \times A \times C \times V_{\text{test volume}} / B = 32.0 (g \text{ mol}^{-1}) \times A \times C (mg \text{ L}^{-1}) \times 0.9 (L) / B (g \text{ mol}^{-1})$

乳化剤および CD 自体の分解度は Eq. 3-4 で算出した。

$$\text{Biodegradation rate}_{\text{additive itself}} (\%) = \frac{BOD_{\text{additive}} - BOD_{\text{control}}}{ThOD_{\text{additive}}} \times 100 \quad (3-4)$$

ここで、 $ThOD_{\text{additive}}$ は乳化剤または CD が完全に酸化された場合に必要とされる理論酸素要求量 (計算値、mg)であり、Table S3-1 に示す。また、Table 3-3 に示す各乳化剤および CD の分解度は Eq. 3-4 に基づいて算出した。

3.2.3 乳化剤またはシクロデキストリンによる分散

乳化剤は Tween[®] 85、Pluronic[®] P-123 または PFPA とし、OB を分散化できる最低限の濃度を添加することにした。具体的には OB の終濃度は 100 mg L^{-1} 、Tween[®] 85、

Pluronic® P-123 または PFPA の終濃度はそれぞれ 40、100 または 500 mg L⁻¹となるように試験容器に添加し、ホットスターラーHS-5BH（アズワン）で約 40 °C に加温しながら攪拌し、懸濁状態にした。ここに 301F 試験の試験培地を徐々に加えながら乳化させ、超音波洗浄機（エスエヌディ）で 38 kHz の超音波を 5 分間照射し、均一化した。Trimethylated α、βまたはγ-CD もしくは partially methylated β-CD については、1 mol 等量の OB もしくは AQ および、各 CD と等体積の蒸留水とともにガラスバイアル中でホモジナイザーTH115（OMNI international）を用いて 30 分間 12,000 rpm で攪拌し、均一化した。CD による分解促進効果を調べるための分解度試験は「試験区」および「試験区+補助物質」を各 3 連、「コントロール区+補助物質」と「コントロール区」を各 2 連とし 42 日間培養した。

その他の分散剤（Pluronic® L-31、L-35、L-61、L-81、L-121、F-68、F-108、F-127、P-105、P-124、10R5、17R4、and 31R1、IGEPAL® CO-520 および CO-630、NP、perflurohexanoic acid、perfluoroheptanoic acid、(2-hydroxypropyl)-β-CD、β-CD sulfated sodium salt）については、それ自体の分解性を各 1 連で調べた。各乳化剤の濃度は OB を分散化できる最低限の濃度とし、CD は OB と 1 mol 等量添加した。各分散剤の添加濃度は Table 3-3 に示す通りである。

Table 3-3 各分散剤の物性と添加濃度、分散剤自体の分解度、分解菌（科）.

Additives	Molecular weight ^{a)}	%EO ^{b)}	HLB	Concentration (mg L ⁻¹)	Biodegradation rate ^{c)}	additive itself (%) ^{d)}	Families with increased abundance ^{d)}
Tween® 85	1,895	-	11	40	73	-	
	4,400	10	1	188	31	Sphingomonadaceae	Verrucomicrobiaceae Xanthomonadaceae
	2,800	10	2	953	9.5	Sphingomonadaceae	Verrucomicrobiaceae
	2,000	10	3	458	24	Sphingomonadaceae	Verrucomicrobiaceae Cytophagaceae
	1,100	10	4	1,164	11	Sphingomonadaceae	
	5,800	30	8	100	12	Sphingomonadaceae	
	2,000	40	12-18	164	19	Sphingomonadaceae	Chitinophagaceae
	2,900	40	15	1,693	5.1	Sphingomonadaceae	Verrucomicrobiaceae
	10,000	50	15	111	91	Sphingomonadaceae	Verrucomicrobiaceae
	1,900	50	18.5	1,166	10	Sphingomonadaceae	
ISO materials	12,000	70	18-23	167	14	Sphingomonadaceae	Parachlamydiaceae
	14,600	80	27	360	11	Sphingomonadaceae	
	8,400	80	29	769	4.2	Sphingomonadaceae	
	3,300	10	2.0-7.0	196	70	Sphingomonadaceae	Verrucomicrobiaceae
	2,700	40	7.0-12.0	833	14	Sphingomonadaceae	Verrucomicrobiaceae
	2,000	50	15	1,169	12	-	Cytophagaceae
Nonylphenols	441	-	10	100	54	Sphingomonadaceae	Chitinophagaceae Fimbrimonadaceae
	617	-	13	83	63	Sphingomonadaceae	Xanthomonadaceae Parachlamydiaceae
	1,101	-	20	102	56	Sphingomonadaceae	Xanthomonadaceae Parachlamydiaceae
PFAS	264	-	-	500	-3.8	-	
	314	-	-	500	-0.42	-	
	364	-	-	500	0.88	-	
Modified CD	1,225	-	-	375	-0.83	-	
	1,430	-	-	438	0.079	-	
	1,310	-	-	401	0	-	
γ-cyclodextrin	1,380	-	-	380	19	Calditellaceae	Devosia_f
	2,519	-	-	693	9.1	HQ014634_f	
	1,634	-	-	501	0.28	-	

% EO, % ethylene oxide; HLB, hydrophilic-lipophilic balance values; ISO, International Organization for Standardization; PFAS, Per- and polyfluoroalkyl substances; CD, cyclodextrin

a) Average b) ratio of ethylene oxide (wt%) in a molecule, c) calculated with Eq. 4, d) family abundance has increased more than 5% compared to that in the control of each test

3.2.4 CD-被験物質包接体の分散状態の解析

Modified CD の添加による試験液中の被験物質の分散性向上を確認するため、以下の試験を実施した。被験物質は AQ とし、補助物質は trimethylated β -CD を用いた。200 mL 容ビーカー（直径 65 mm、高さ 90 mm）に 301F 試験の試験培地 200 mL を満たし、ビーカーの中央に透析膜デバイス Spectra/Por® Micro Float-A-Lyzer®を設置した。スターラーでビーカー内の試験培地を 1 時間攪拌した。その後ビーカー内の試験培地中の被験物質濃度が 100 mg L^{-1} となるように AQ を直接添加した。あるいは、AQ を 1 mol 当量の trimethylated β -CD で分散化したものを添加した。温度 $22 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ の条件下でスターラー攪拌し、1、3、6、18、24 hr 後に透析膜内の液をマイクロシリンジで 100 μL 採取し、アセトニトリル 100 μL を添加して被験物質の濃度を LC-MS/MS により測定した。マイクロシリンジで透析膜内の液を採取する時は、吸引、排出を 3 回繰り返して内液を均一化させた。一連の実験を 3 回実施し、それぞれ濃度を測定した。濃度測定は TSQ Quantis (Thermo Fisher Scientific) を用い、Table 3-4 に示す分析条件で測定した。

Table 3-4 LC-MS/MS 分析条件.

カラム	Accucore™ Vanquish C18+ (50 × 2.1 mm, particle size 1.5 μm , Thermo Fisher Scientific)
カラム温度	40 $^{\circ}\text{C}$
移動相	B conc. 70 % $\rightarrow$ 80 % (3 min)

	A: 0.1 %ギ酸含有蒸留水、B: 0.1 %ギ酸含有アセトニトリル
流速	0.2 mL min ⁻¹
注入量	10 µL
検出条件	Heated ESI: 4554.55 V, Sheath Gas flow (Arb): 16.1, Aux Gas flow (Arb): 22.8, Sweep Gas flow (Arb) 0.4, Ion transfer tube temperature: 350 °C, Vaporizer temperature: 300 °C, Precursor ion (m/z): 210.14, Product ion (m/z): 181.04, Collision energy: 30 V

OB と AQ は trimethylated CDs と包接体を形成していると考えられたため、安定度定数 (stability constant, $K_{m:n}$) を測定した。Trimethylated CD (CD)、被験物質 (TS)、包接体 ($CD_m \cdot TS_n$) の関係は Eq. 3-5 に従い、そのときの安定度定数は Eq. 3-6 で表される^{65, 66)}。



$$K_{m:n} = \frac{(x)}{(a-mx)^m \cdot (b-nx)^n} \quad (3-6)$$

ここで、 m および n は CD および TS の mol 数、 a および b はそれぞれ CD および TS の初期濃度、 x は $CD_m \cdot TS_n$ の濃度を表す。安定度定数を調べる方法は複数報告されているが、本検討では HPLC 法を選択した⁶⁶⁾。HPLC 法では、CD を移動相に添加することによって、カラム内で CD と被験物質が包接体を形成し、保持時間が短くなることが報告されている⁶⁶⁾。被験物質の保持時間 (T_{obs}) と安定度定数の関係は Eq. 3-7 の通りである⁶⁶⁾。

$$T_{\text{obs}} = \frac{T_0 + T_c K_{m:n} [\text{CD}]}{1 + K_{m:n} [\text{CD}]} \quad (3-7)$$

ここで、 T_0 は CD を添加していない場合の TS の保持時間（測定値、min）、 $[\text{CD}]$ は移動相中での CD の濃度、 T_c は $[\text{CD}]$ を増加した場合に T_0 が漸近する $\text{CD}_m \cdot \text{TS}_n$ の保持時間である。 $[\text{CD}]$ は trimethylated α -、 β -または γ -CD が 0、0.02、0.1、0.2 および 0.4 mM となるように設定し、 T_{obs} を各 3 連で測定した。得られた T_{obs} を $[\text{CD}]$ に対してプロットし、非線形最小二乗法でフィッティングすることで $K_{m:n}$ を求めた。HPLC は Vanquish Core HPLC（Thermo Fisher Scientific）を用い、Table 3-5 に示す分析条件で測定した。

Table 3-5 HPLC 条件.

カラム	L-column3 ODS（150 mm×2.1 mm、5 μm 、CERI）
カラム温度	22 °C
移動相	B conc.: 70 % A, C conc.: (30 %, 0 %), (29 %, 1 %), (25 %, 5 %), (20 %, 10 %), (10 %, 20 %) A: 蒸留水、B: アセトニトリル、C: 2 mM trimethylated α 、 β または γ -CD 含有蒸留水
流速	0.2 mL min ⁻¹
定量波長	254 nm
注入量	1 μL

被験物質に modified CD を加え 3.2.4 の方法で調製したところ、試験液は懸濁状態になった。被験物質と modified CD の包接体は、一部が凝集体を形成したと推察される。そこで、Zetasizer Ultra RED (Malvern Panalytical) を用いて動的光散乱法 (dynamic light scattering; DLS) により試験培地中での凝集体の粒子径を測定した。測定は 22.0 °C で実施し、温度平衡に到達するまでの時間は 120 s とした。各 3 回測定した。

Modified CD と被験物質の包接体あるいはその凝集体と活性汚泥の存在状態を、蛍光顕微鏡 (Axio Observer 3, Zeiss) を用いて観察した。被験物質は AQ に構造や分子量が近く蛍光を発する anthracene とし、3.2.4 と同様の手法で trimethylated α -、 β -または γ -CD に包接させた。得られた包接体を活性汚泥に添加し、301F 試験条件下で培養した。培養 5 日および 41 日後の試験液を 1 mL 採取し、終濃度の 2 倍濃度の SYTO™ 9 溶液を 1 mL 添加して混合した後、室温で 15 分間インキュベートし、活性汚泥中の細菌の DNA を染色した⁶⁸⁾。染色後の液を軽く分散させた後、その一部をスライドガラスに塗布し顕微鏡観察した。SYTO™ 9 で染色した活性汚泥および anthracene の励起波長はそれぞれ 475 nm、385 nm、観察波長はそれぞれ 450~488 nm、370~400 nm とした。

3.2.5 微生物叢解析

第 2 章と同様の手法で⁶⁷⁾、301F 試験に供試した AS-STP 約 4.5 mg について微生物叢解析を行った。得られたシーケンスデータは DDBJ に登録した (accession No. PRJDB16891)。シーケンスの品質として最低リード数は 3.2×10^4 (平均リード数 $4.8 \times$

10⁴)、最低の Q20 および Q30 スコアは 83.1 および 70.4 % (平均 89.6 および 79.7 %) であった。第 2 章の結果から、分解菌を特定するためには被験物質が活発に分解されている時期の汚泥採取が適切であったため、活性汚泥は Fig. S3-1 から S3-4 および S3-9 に菱形 (◆) で示した時点で採取した。コントロール区はいずれも「コントロール+補助物質」と同日に採取した。

補助物質自体の生分解に伴い増加した菌を調べるために、培養 28 日後の「コントロール区+補助物質」および「コントロール区」の活性汚泥を採取した。それぞれ科レベルでの占有率を調べ、コントロールに対し 5 %を超えて増加した科を全てピックアップした。

被験物質および/または分散剤を分解して優占化した微生物を調べるため、以下の 1) および 2) の手順で優占的な 10 科をリスト化した。1) それぞれの科について、各試験における「試験区」「試験区+補助物質」「コントロール区+補助物質」の占有率からそれぞれの「コントロール」での占有率を差し引いた。2) 分解度試験において、コントロール差引後の「試験区」「試験区+補助物質」「コントロール区+補助物質」のいずれかでの占有率が大きい科を順に並べ、それぞれ上位 10 科を抽出した。

3.3 結果と考察

3.3.1 補助物質自体の分解性

Table 3-3 に示す 22 種類の補助物質について、それ自体の分解性を調べた。補助物質の分子量、添加濃度、28 日後の各補助物質の ThOD に基づき Eq. 3-4 で算出した分解度、およびコントロール区と比較して 5 %以上増加した菌種を Table 3-3 に示す。Pluronic®については、分子中の EO 割合、および HLB も併記した。ISO 10634 で例示されている Tween® 85 は分解度が 73 %となり、ほぼ完全に生分解されたと考えられる。ただし、Tween® 85 の分解により構成菌の比率が 5 %を超えて増加した科は存在しなかった。

Pluronic®については、ISO 10634 では HLB が 9 と 13.5 が例示されている。いずれも EO-PO-EO 骨格であり分解が予想されたため、幅広い HLB を持つ Pluronic®の分解性を調べた。具体的には、常温液体の L-31、L-35、L-61、L-64、L-81、L-121、常温フレーク状の F-68、F-108、F-127、常温でペースト状の P-105、P-123、P-124 の計 12 種類に加え、PO-EO-PO 骨格である 10R5、17R4、31R1 の 3 種類を調べた。これらの分解度は 4.2 から 91%と幅広い値をとったが、非分解性のものはなかった。親水基として EO の繰り返し構造を有す IGEPAL® CO-520、CO-630 および 4-NP の 28 日後の分解度は 54、63、56 %であり、いずれも半数以上が生分解された。また、Pluronic® 10R5 を除く全ての Pluronic®、IGEPAL® および 4-NP の添加によって、*Sphingomonadaceae* がコントロール区と比較して 5 %以上増加していた (Pluronic® 10R5 は 3 %の増加)。*Sphingomonadaceae* は polyethylene glycol を分解することが報告されており⁶⁹⁾、検討

した乳化剤にも EO の繰り返し構造が含まれていたため、これらの分解に寄与したと考えられる。IGEPAL や NP には疎水基として nonylphenyl 構造が含まれるが、*Sphingomonadaceae* の中には多環芳香族の分解菌が報告されているため^{8,38,39)}、これらの分解にも寄与したと考えられる。また、Pluronic® P-124 および IGEPAL® CO-520 の添加により *Chitinophagaceae* が増加し、Pluronic® L-121、IGEPAL® CO-630 および NP の添加により *Xanthomonadaceae* が増加した。なお、これらの菌は polyoxyethylene (4) lauryl ether の添加によって増殖したことが報告されている⁷⁰⁾。したがって、同じく EO の繰り返し構造を有する Pluronic®, IGEPAL®, NP の分解にこれらの菌が寄与したものと考えられる。

PFAS のうち炭素数が 5～7 の PFPA、perfluorohexanoic acid および perfluoroheptanoic acid について分解度を調べたところ-3.8 から 0.88 %であり、28 日間で全く生分解されなかった。微生物叢解析の結果からも、5 %を超えて増加した科は認められず、微生物叢への影響もみられなかった。

ヒドロキシ基が修飾されていない CD そのものは、グルコースの分子数 (6、7、8 個) に関わらず易分解性と報告されている⁶²⁻⁶⁴⁾。そこでまず、ヒドロキシ基が修飾され、市販品として入手できた trimethylated β -CD、partially methylated β -CD、2-hydroxypropylated β -CD、 β -CD sulfated sodium salt 自体の分解性を調べた。次に、trimethylated α -CD および trimethylated γ -CD を合成して分解性を調べた。Trimethylated α -、 β -、 γ -CD および partially methylated β -CD の分解度はほとんど 0 %で、微生物叢解析の結果からも顕著に増加した科は存在しなかった。2-

Hydroxypropylated β -CD および β -CD sulfated sodium salt の分解度はそれぞれ 19 および 9 %であった。その際、hydroxypropylated β -CD は *Caldilineaceae*、*Devosia_f* がそれぞれ 16、13 %まで増加し、 β -CD sulfated sodium salt では *HQ014634_f* が 6 %まで増加し、これらの科がそれぞれの CD の分解に寄与したと考えられる。

3.3.2 シクロデキストリンを用いた分解度試験

Trimethylated α -, β -, γ -CD および partially methylated β -CD は試験期間中にそれ自体は生分解されず、微生物の占有率にも影響を及ぼさなかったため、これらを用いて難水溶性物質の分解促進効果を調べることにした。さらに、modified CD 添加時における被験物質の分散状態を調べ、被験物質の分散と微生物集合体との反応モデルを考案し、modified CD による反応促進機構の解明を試みた。

3.3.2.1 完全メチル化 CD を用いた場合の分解度試験

CD は構成されるグルコース分子の数によって環状分子の内径が変化し、化学物質の包接による安定度・定位数等の物性が変化することが知られている⁵⁸⁾。この違いが CD 自体の分解性や被験物質の分解促進効果、分解菌叢に及ぼす影響を調べた。Trimethylated α -, β -または γ -CD を用いた OB および AQ の 42 日間の分解度を Eq. 3-1、3-2、3-3 に基づき算出した結果を Fig. 3-1A および 1B に示す。各試験区を平均する前の結果は Fig. S3-1 および S3-2 に示す。OB の「試験区」はほとんど生分解されなかった (Fig. 3-1A の 1)。Trimethylated α -, β -または γ -CD を添加した場合の OB の「試験区+補助物質」

の分解度は、約 16 日以降に急激に上昇し、42 日後にはそれぞれ 40.3、42.5 および 60.5 % (Fig. 3-1A の 2 α 、2 β 、2 γ) であった。いずれの CD も OB の分解を促進した。被験物質が AQ の場合、「試験区」の 42 日後の AQ の分解度は 57.5 % (Fig. 3-1B の 1) であった。Trimethylated α -、 β -あるいは γ -CD を添加した AQ の「試験区+補助物質」の分解度は 42 日後でそれぞれ 77.9、79.6 および 85.1 % (Fig. 3-1B の 2 α 、2 β および 2 γ) であり、いずれの CD も AQ の分解を促進した。いずれの被験物質においても trimethylated α -あるいは β -CD の分解度は同程度であり、 γ -CD が最も分解を促進した。

Eq. 3 に基づく trimethylated α -、 β -および γ -CD の「コントロール区+補助物質」の分解度は、OB でそれぞれ-2.0、0.2 および 0.88 %であり (Fig. 3-1A の 3 α 、3 β および 3 γ)、AQ でそれぞれ-2.0、0.2 および 0.88 % (Fig. 3-1B の 3 α 、3 β および 3 γ) であった。また、HPLC-CAD (charged aerosol detector: Corona Veo, Thermo Fisher Scientific) で定量した 42 日後の trimethylated α -、 β -および γ -CD の残留率は 101、99.4 および 105 %であった。したがって、いずれの CD もそれ自体は生分解されず、ISO 10634 の現実的な基準と共に OECD および化審法の理想的な基準も満たした。加えて、これらの CD はいずれもコントロールから BOD 曲線は変化しておらず (分解度の曲線がほぼプラトー)、微生物に対する阻害は認められなかった。

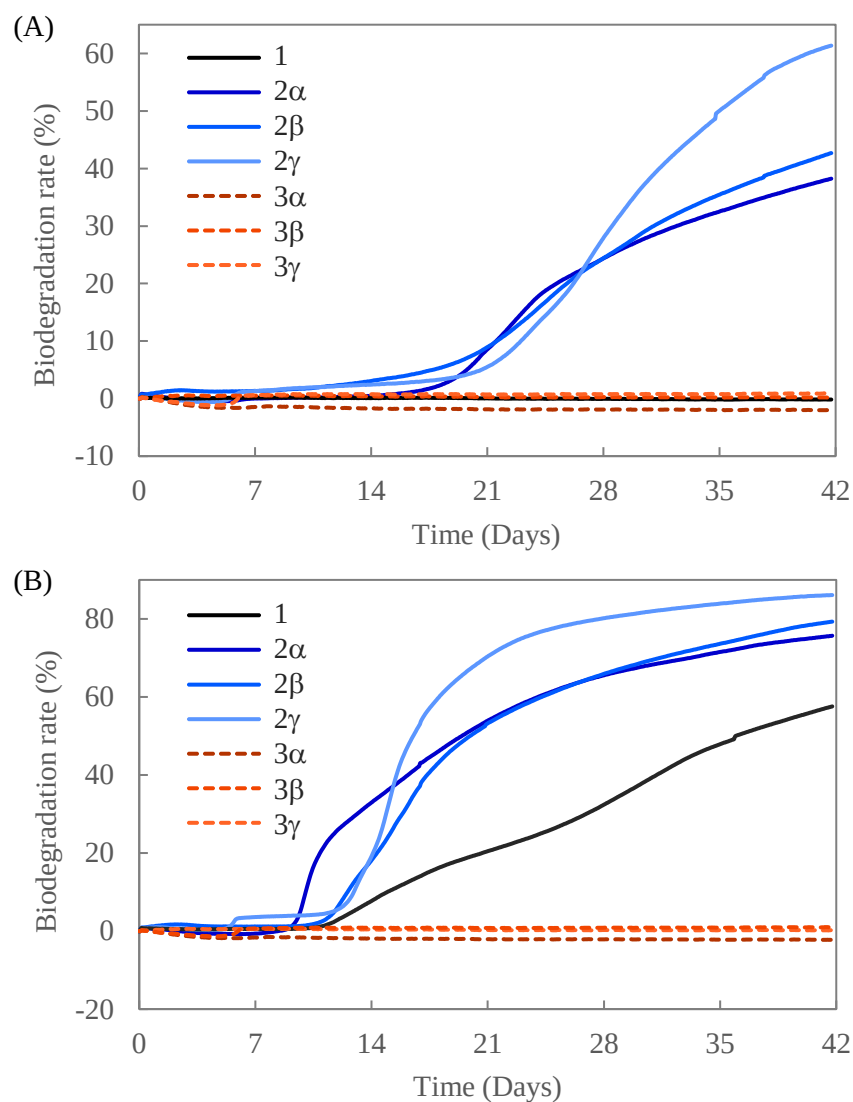


Fig. 3-1 Trimethylated α -, β -または γ -CD を用いたときの OB (A) および AQ (B) の分解度曲線.

(1) 試験区、(2 α) 試験区+補助物質 (trimethylated α -CD)、(2 β) 試験区+補助物質 (trimethylated β -CD)、(2 γ) 試験区+補助物質 (trimethylated γ -CD)、(3 α) コントロール区+補助物質 (trimethylated α -CD)、(3 β) コントロール区+補助物質 (trimethylated β -CD)、(3 γ) コントロール区+補助物質 (trimethylated γ -CD)

Trimethylated α -, β -あるいは γ -CD を用いて OB または AQ 分解時の汚泥を微生物叢解析し上位 10 位までの科の相対比率を Table 3-6 および 3-7 に示す。OB について、元の「試験区+補助物質」、「コントロール区+補助物質」、「コントロール区」および Day 0 の汚泥の占有率は Table S3-2 に、AQ についての「試験区」、「試験区+補助物質」、「コントロール区+補助物質」、「コントロール区」および Day 0 の汚泥の占有率は Table S3-3 にそれぞれ示した。OB 分解時の優占科はいずれの CD でも *Mycobacteriaceae* であり、 γ -CD ではこのほかに *Nocardiaceae*、*Sphingomonadaceae* も 5 %を超えて増加した (Table 3-5 の 2 α 、2 β および 2 γ)。AQ の分解では CD の種類によって多少の変動はあるものの、*Mycobacteriaceae*、*Sphingomonadaceae*、*Comamonadaceae* が共通して分解に寄与したと考えられる (Table 3-7 の 2 α 、2 β および 2 γ)。一方「コントロール区+補助物質」の (Table 3-6 および 3-7 の 3 α 、3 β および 3 γ) ではいずれの科も大きな変動はなく (< 2 %の変動)、trimethylated α -, β -あるいは γ -CD それ自体の微生物叢への影響は認められなかった。結果として、OB、AQ のいずれに対しても CD それ自体は特定の菌の分布に影響を及ぼさず、被験物質を分散させることによって分解促進効果をもたらしたことが明らかになった。

Table 3-6 OB 分解後の上位 10 科の相対比率.

Phylum	Taxonomy			Relative abundance* (%)						
	Class	Order	Family	+ Trimethylated CD						
				2 α	(3 α)	2 β	(3 β)	2 γ	(3 γ)	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	57.6	(1.2)	38.0	(0.0)	18.6	(1.2)	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.4	(0.0)	0.9	(-0.0)	6.9	(0.4)	
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.0	(-0.0)	0.0	(-0.0)	0.0	(-0.0)	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacteriales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	1.3	(-0.5)	1.7	(-0.2)	4.2	(-0.3)	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	1.5	(0.8)	2.2	(0.5)	3.1	(0.4)	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	-1.3	(-1.1)	-1.4	(-0.3)	-1.3	(-1.1)	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	0.0	(-0.0)	2.1	(-0.1)	8.6	(0.0)	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	0.5	(-0.4)	0.2	(-0.2)	1.6	(0.7)	
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	-0.7	(0.5)	-0.6	(0.7)	-0.7	(0.5)	
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)	

CD, cyclodextrin

*Relative abundance on average after subtracting the abundance in the control of each test.

Table 3-7 AQ 分解後の上位 10 科の相対比率.

Phylum	Taxonomy			Relative abundance* (%)						
	Class	Order	Family	AQ	+ Trimethylated CD					
					1	2 α	(3 α)	2 β	(3 β)	2 γ (3 γ)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	28.5	7.8	(1.2)	16.2	(0.0)	3.5	(1.2)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.0	0.1	(0.0)	0.0	(-0.0)	0.0	(0.4)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardioidaceae</i>	4.7	1.7	(-0.2)	0.2	(0.2)	1.1	(0.4)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.1	0.1	(-0.0)	0.3	(-0.0)	0.1	(-0.0)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiacaceae</i>	0.4	0.0	(0.0)	4.3	(0.0)	0.1	(0.0)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	2.8	-0.4	(-1.1)	0.6	(-0.3)	-0.8	(-1.1)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	4.4	0.2	(-0.0)	7.8	(-0.1)	5.7	(0.0)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	0.0	1.7	(-0.4)	5.5	(-0.2)	5.8	(0.7)
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	-0.8	-0.2	(0.5)	-0.5	(0.7)	0.1	(0.5)
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.0	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)

AQ, anthraquinone; CD, cyclodextrin

*Relative abundance on average subtracting the control of each test.

3.3.2.2 部分メチル化 CD を用いた場合の分解度試験

CD のメチル化の度合いに応じて分解促進効果に変化するかを調べるため、OB または AQ を被験物質として、完全メチル化された trimethylated β -CD とヒドロキシ基が約 60 %メチル化された partially methylated β -CD を比較する分解度試験を実施した。結果は Fig. 3-2A および 3-2B にそれぞれ示す。各試験区を平均する前の結果は Fig. S3-3 および S3-4 に示す。OB の「試験区」は Fig. 3-1 と同様、ほとんど生分解されなかった (Fig. 3-2A)。Trimethylated および partially methylated β -CD を添加した場合の OB の「試験区+補助物質」の分解度は、7 日以降徐々に上昇し、42 日後にはそれぞれ 58.7 および 55.5 % (Fig. 3-2A の 2 β および 2 β') であった。いずれの CD も OB の分解を促進した。同様に、AQ の「試験区」の 28 日後の分解度は 44.3 %であった (Fig. 3-2B の 1)。一方、trimethylated および partially methylated β -CD を添加した AQ の「試験区+補助物質」の分解度はそれぞれ 70.1 および 66.3 % (Fig. 3-2B の 2 β および 2 β') であり、いずれの CD も AQ の分解を促進した。以上のことから、完全メチル化された trimethylated β -CD と 60 %メチル化された partially methylated β -CD は被験物質の促進効果は同程度であった。

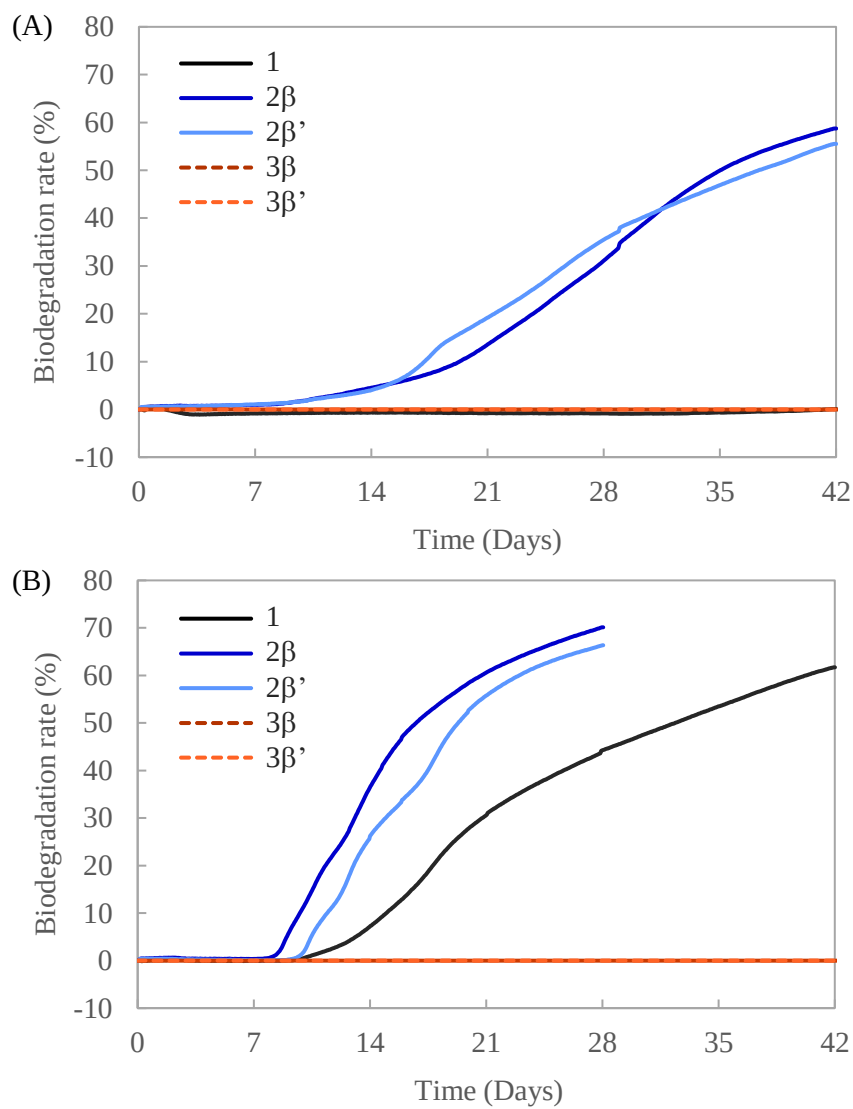


Fig. 3-2 Trimethylated または partiallymethalated β -CD を用いたときの OB (A) および AQ (B) の分解度曲線.

(1) 試験区、(2 β) 試験区+補助物質(trimethylated β -CD)、(2 β') 試験区+補助物質(partially methylated β -CD)、(3 β) コントロール区+補助物質(trimethylated β -CD)、(3 β') コントロール区+補助物質(partially methylated β -CD)

3.3.2.3 Modified CD による被験物質の分解促進メカニズムの解析

CD を添加することにより、試験液中の被験物質の分散性の向上を確認するため、試験液に透析膜の袋を導入した。被験物質である AQ のみを加えて試験液を攪拌し透析膜を通過した AQ の濃度を測定した結果、18 hr 以降頭打ちとなり、 $90 \mu\text{g L}^{-1}$ を超えることはなかった (Fig.3-3)。一方、AQ を trimethylated β -CD で包接させた場合、透析膜を通過した AQ の濃度は時間とともに増大し、24 hr 後には約 $200 \mu\text{g L}^{-1}$ に達した。透析膜は MWCO が 8~10 kDa であり、1 分子の trimethylated β -CD の質量は 1.4 kDa であるため、透析膜を通過した AQ は、試験液に溶解した AQ の他に AQ-CD 包接体が含まれていたと考えられる。これらのことから、CD の添加によって AQ が単独で存在するよりも高い濃度で可溶化して分散性が向上することが分かった。

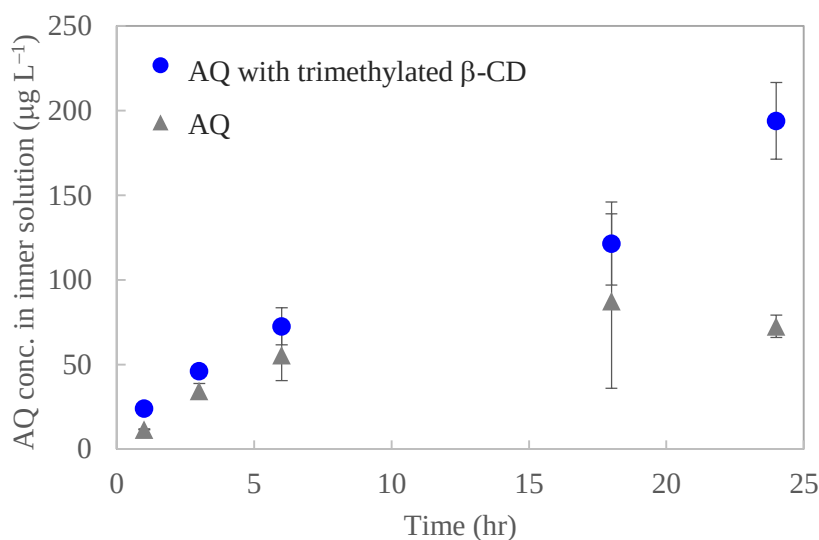


Fig. 3-3 Trimethylated β -CD の有無での透析膜透過濃度の変化.

エラーバー：標準偏差

被験物質は CD と包接体を形成していると考えられるため、Eq. 3-4 に基づく安定度定数 ($K_{m,n}$) を評価した。Fig. 3-4 に示した T_{obs} と [CD] の関係から、OB と trimethylated α -, β -および γ -CD の $K_{m,n}$ ($\pm$ 標準誤差) はそれぞれ 1.6 ± 0.2 、 1.0 ± 0.2 および 1.5 ± 0.1 ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)、AQ では 1.5 ± 0.2 、 0.9 ± 0.1 および 1.16 ± 0.07 ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$) であった。安定度定数が非常に大きいため、Eq. 3-5 で示した平衡状態は右側に大きく傾くと考えられ、溶存状態の OB または AQ は、その大半が CD との包接体を形成したと考えられる。

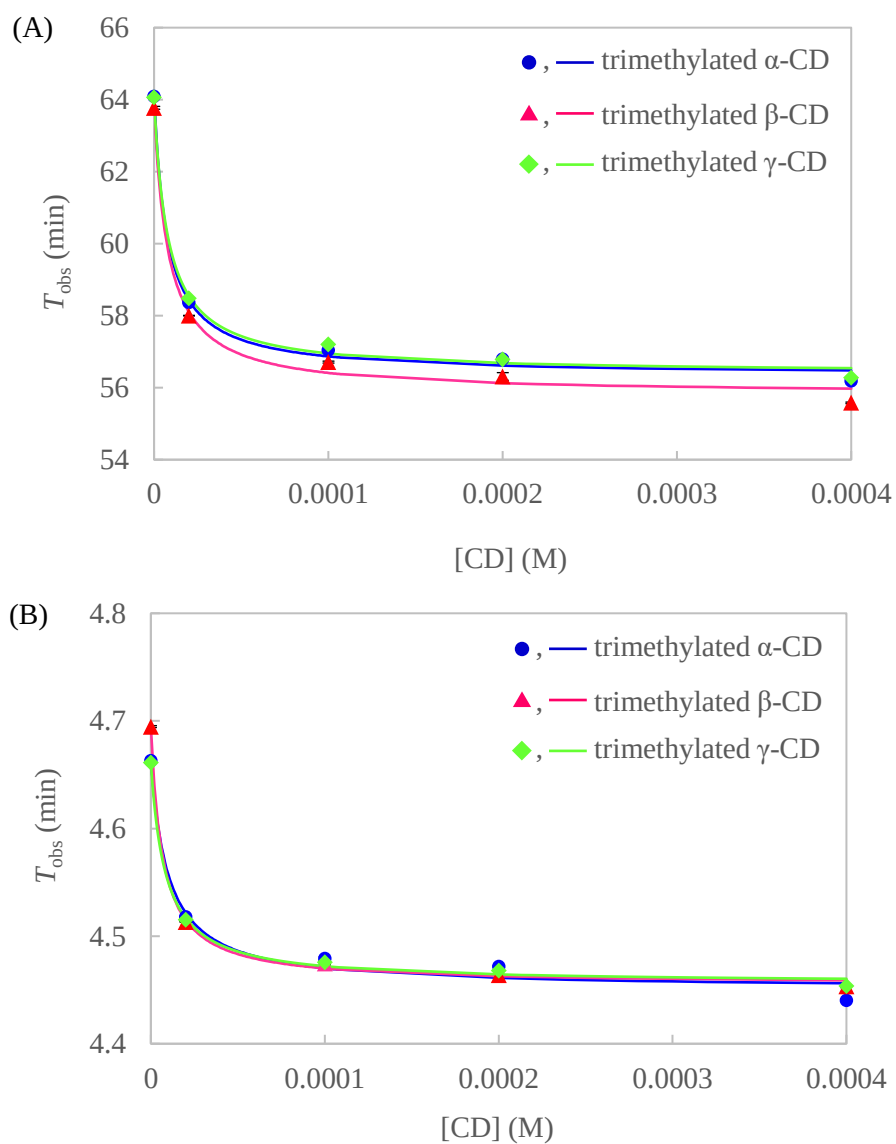


Fig. 3-4 Trimethylated α -, β -または γ -CD を各濃度で添加したときの OB (A) および AQ (B) の T_{obs} 変化 (丸、三角、菱形) とフィッティング結果 (青、赤、緑線) .
エラーバー：標準偏差

OB または AQ と各 CD の包接体を含む試験液は白濁しており、包接体の一部は凝集していたと考えられるため、各凝集体の粒子径を DLS で測定した。OB と trimethylated α -、 β -および γ -CD 包接体の Z-average ($\pm$ 標準偏差) はそれぞれ 4.7 ± 0.2 、 2.7 ± 0.4 および $1.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ であり、AQ では 5 ± 1 、 1.4 ± 0.2 および $1.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ であった。メチル化されていない α 、 β および γ -CD の外径はそれぞれ 1.37、1.53 および 1.69 nm と報告されており⁷¹⁾、メチル化された α -、 β -および γ -CD の外径はメチル化されていない CD より数ナノメートル大きい程度と考えられる。したがって、各 CD と OB または AQ の包接体は、巨大な凝集体を形成していると判明した。

Trimethylated α -、 β -または γ -CD と被験物質の凝集体と活性汚泥の存在状態を蛍光顕微鏡で観察するため、被験物質は AQ に構造や分子量が近く 410 nm 付近の青色蛍光を示す anthracene を選択した。Trimethylated β -CD を用いた顕微鏡画像は Fig. 3-5 の通りである。汚泥非存在下では anthracene は青色に光っており、trimethylated β -CD と anthracene の凝集体が試験液中に満遍なく存在することが確認できた (Fig. 3-5A)。その試験液に汚泥を加え 5 日培養すると、trimethylated β -CD と anthracene の凝集体が試験液中で偏在した (Fig. 3-5B)。当該画像中の細菌を緑色に染色したところ、その凝集体は汚泥のフロック(すなわち、微生物の集合体)と位置が良く一致した (Fig. 3-5C)。その後培養を 41 日間実施したところ、緑色の汚泥のフロック上に青色を発光する anthracene はほとんど観察されなかった (Fig. 3-5D)。41 日後は anthracene の分解度が 40 %を超え、分解が終盤に差し掛かった時点であり、凝集体として存在していた anthracene が微生物によって分解されたものと考えられる。一方、trimethylated β -CD

を添加していない場合は、活性汚泥のフロック上に anthracene がほとんど確認できなかった (Fig. S3-7)。また、trimethylated α -および γ -CD についても、trimethylated β -CD と同様に試験液中に分散し、汚泥フロックを取り囲むように anthracene の凝集体の偏在を確認した (Fig. S3-8)。したがって、被験物質と CD が凝集体となって試験液中に分散状態で存在することで、汚泥に接触する機会が高まり、被験物質の分解が促進されたと考えられる。なお、汚泥フロックについては水中で負に帯電していると言われており⁷²⁾、各 CD と被験物質の包接体の凝集体との付着性については、両者のゼータ電位を比較することで、より理解が深まると期待される。

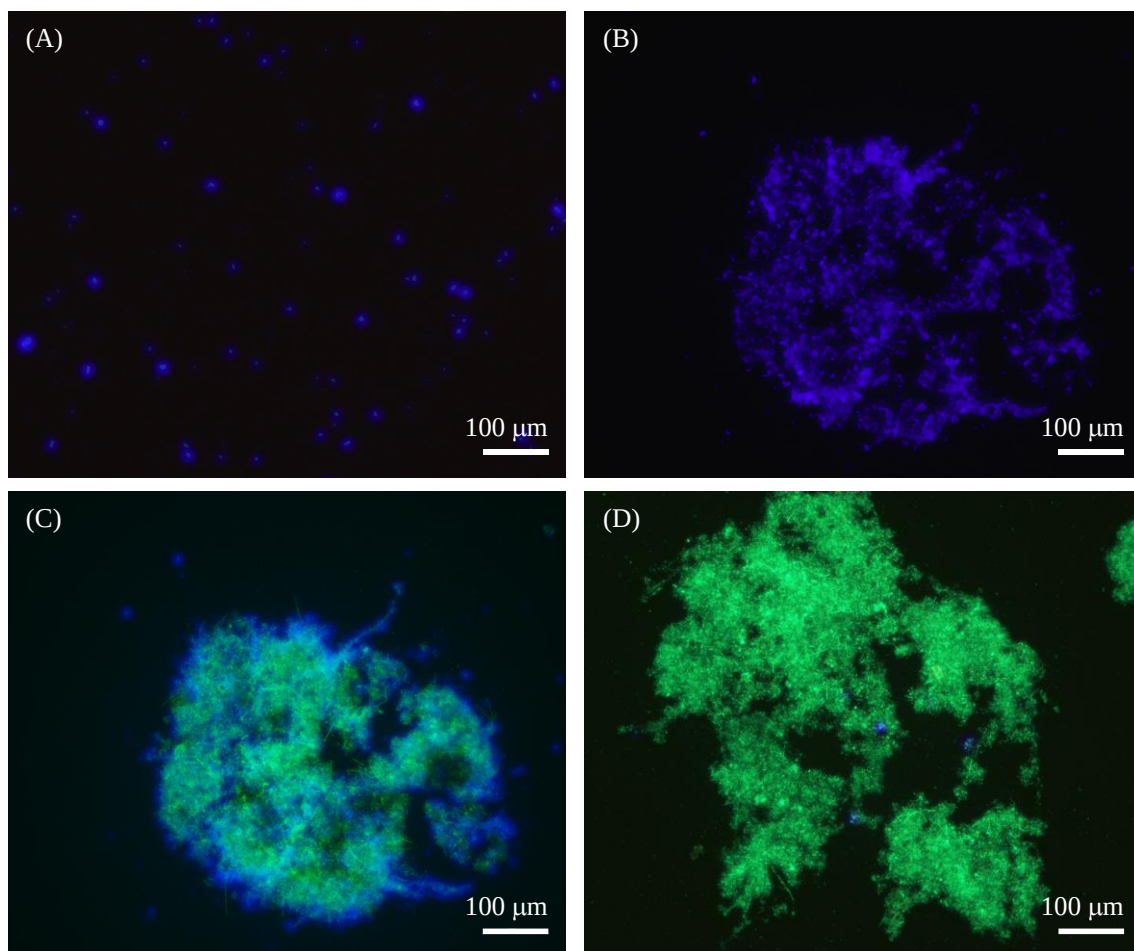


Fig. 3-5 Trimethylated β -CD で分散された anthracene (青) および活性汚泥 (緑) .
 活性汚泥非存在下での CD-anthracene 複合体 (A)、活性汚泥存在下での CD-anthracene 複合体 (B)、培養 5 日目 (C) および 41 日目 (D) の活性汚泥と CD-anthracene 複合体

つぎに、CD と被験物質の凝集体は微生物に付着して存在していたため、被験物質と微生物の存在距離に応じて、どの程度物質供給が向上するかを検討する。Fig. 3-6A には微生物の位置を $x=0$ 、被験物質の位置を $x=20$ とした場合の一次元の濃度プロファイルの時間変化を示す。拡散モデルは、位置 $x=i$ 、時間 $t=n$ における濃度 C_i^n とした場合、Eq. 3-8 で表現した。 $t=0$ では被験物質が飽和濃度(C_{sat})で、 $t>0$ では、 $x=0$ すなわち菌体表面では被験物質濃度が 0、被験物質存在地点では飽和濃度を維持してい

ると仮定し、初期条件および境界条件は Eq. 3-9 および 3-10 のように設定した。

$$C_i^{n+1} = C_i^n + \frac{D\Delta t}{\Delta x^2} (C_{i-1}^n - 2C_i^n + C_{i+1}^n) \quad (3-8)$$

$$C_i^0 = C_{\text{sat}} \quad (3-9)$$

$$C_0^n = 0 \ (n \neq 0), \ C_{20}^n = C_{\text{sat}} \quad (3-10)$$

なお、計算条件として Eq. 3-11 に示す値を使用した。

$$\Delta t = 0.1, \ \Delta x = 1, \ D = 0.45 \quad (3-11)$$

ここで、 D は拡散係数であり、例として 0.45 を与えた。Fig. 3-6A に示す通り、十分時間が経つと、被験物質の位置から菌体表面までの濃度プロファイルは線形に減衰する。

ここで、一次元拡散のフラックスは Eq. 3-12 に示す Fick の第一法則にしたがう。

$$J = -D \frac{dc}{dx} \quad (3-12)$$

ここで、 J はフラックスである。つまり、菌体表面でのフラックスは Fig. 3-6A における $x=0$ の傾きに他ならない。Eq. 3-12 において、Eq. 3-8 で $t = \infty$ とした場合のフラックスは Eq. 3-13 に従う。

$$J = -D \frac{\frac{c}{c_{\text{sat}}}}{x_{\text{max}}} \quad (3-13)$$

ここで、実在系と比較してみる。代表例として anthracene の 25 °C の拡散係数 $4.18 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ を用い⁷³⁾、微生物と被験物質の距離の最大値 (x_{max}) は 900 mL の試験容器の水深として 17,000 μm とした。 $x = 1 \mu\text{m}$ におけるフラックスを J_{max} とし、距離に応じたフラックス比 J/J_{max} をプロットしたものが Fig. 3-6B および 3-6C (1~100 μm の拡大図) である。Fig. 3-6B から分かる通り、微生物と被験物質の距離が短くなるにつれて、フラックスは上昇する。Fig. 3-5C によると被験物質とフロック中の微生物の距離

は数から数十 μm の範囲であったため、浮遊している被験物質からの物質供給に比べ、フロックに付着している場合にはフラックスが大幅に上昇することが分かる。本モデルは 1 次元であるが、実際の 3 次元空間ではこの変化は 3 乗に比例する。微生物と被験物質が近接して存在することで接触機会が上昇し、分解が促進されたと考えられる。

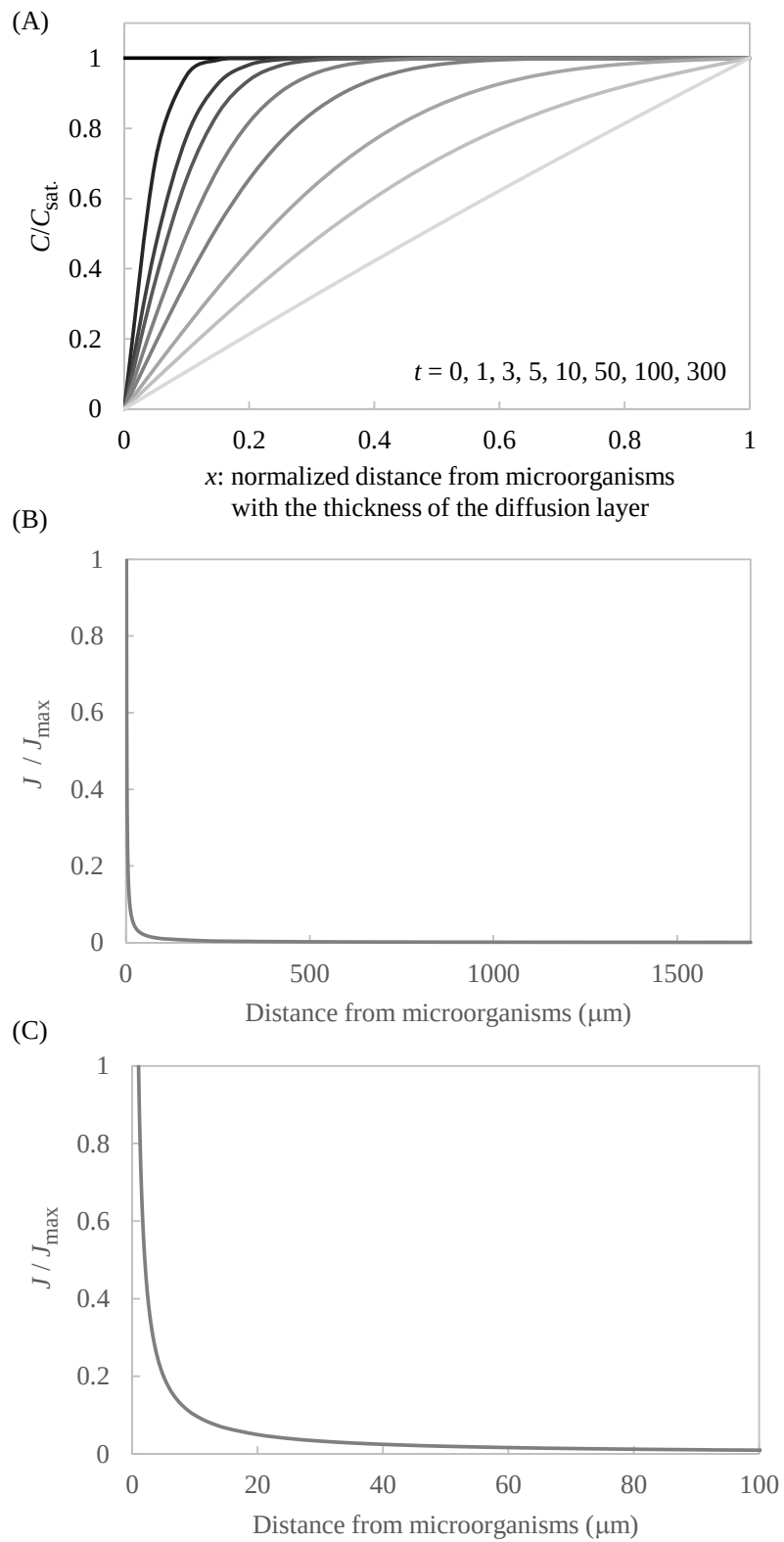


Fig. 3-6 一次元拡散モデルによる微生物との距離に応じた模式的なフラックス変化.

(A) 濃度プロファイルの時間変化、(B)、(C) フラックス変化

以上をまとめると、CD による被験物質の分解促進は次のように考えられる。被験物質は CD に包接されることで試験液中での分散性が向上した。被験物質は大部分が CD に包接されており、被験物質と CD の包接体はさらに凝集化して試験液中に懸濁状態で存在した。これらの凝集体は活性汚泥のフロックに付着して存在し、微生物への物質供給が高まることで、被験物質の分解が進行したと考えられる。なお、活性汚泥への有機物の吸着は実環境中でも起こっていることであり⁷⁴⁾、本現象は、より実環境に近い条件での分解性評価を可能とすることを示唆している。

3.3.3 乳化剤を用いた分解度試験

乳化剤として Tween[®] 85、Pluronic[®] P-123、PFPA を用いて OB の易分解性を検討した。複数の連数があるものは平均値を示し、42 日間の OB の分解度を算出した結果を Fig. 3-7 に示す。平均する前の各試験区の結果は Fig. S3-9 に示す。「試験区」の OB (Fig. 3-7 の 1) は 42 日間で分解が認められなかった。一方、Tween[®] 85、Pluronic[®] P-123、あるいは PFPA を添加した「試験区+補助物質」の 42 日後の分解度はそれぞれ 83.5、46.1 および 34.3 % (Fig. 3-7 の 2t、2p および 2pf) であり、いずれの乳化剤においても OB の分解を促進した。

Tween[®] 85、Pluronic[®] P-123、PFPA の「コントロール区+補助物質」の 42 日後の分解度はそれぞれ 25.8、9.3 および -3.9 % (Fig. 3-7 の 3t、3p および 3pf) であった。Tween[®] 85 は ISO の現実的な基準を満たさず、Pluronic[®] P-123 と PFPA は ISO の現実的な基準を満たした。さらに、PFPA は OECD および化審法の理想的な基準も満た

した。なお、Tween® 85、Pluronic® P-123、PFPA の $BOD_{\text{control+additive}}$ から BOD_{control} を差し引いた BOD_{additive} はそれぞれ 59.8、23.0 および -8.8 mg であった。Tween® 85 の ThOD は 82 mg (Table S3-1) あることを考慮すると「良分解性(readily biodegradable)」の基準である 60 % を大きく超えて分解しており、Tween® 85 はほぼ全量が分解したと考えられる。Pluronic® P-123 は ThOD (188 mg) の 12 % が分解されており、PFPA は全く分解されなかった。なお、PFAS の分解性については BOD だけでなく LC-MS/MS (TSQ Quantis, Thermo Fisher Scientific) によっても定量し、42 日間の培養後に平均で 98 % 残留した。したがって、乳化剤 PFPA 自体は分解されず、OB の分解を促進することが分かった。

Tween® 85、Pluronic® P-123、PFPA の試験サンプルを 3.2.6 で述べた時期に採取して微生物叢解析を実施し、上位 10 種の占有率の結果を Table 3-8 に示した。平均してコントロール区を差し引く前の結果は Table S3-5 に示した。「試験区+補助物質」(Table 2 の 2t、2p および 2pf) のいずれかの区で 5 % を超えて優占化した科は、*Mycobacteriaceae*、*Nocardiaceae*、*Sphingomonadaceae*、*Comamonadaceae* であり、後述の第 4 章での結果 4.3.1 でも OB の分解によって増加した菌であったことから、OB の分解に寄与したと考えられる。Tween® 85 の「コントロール区+補助物質」(Table 3-8 の 3t) については、ほぼ全量が分解されたものの、占有率の上位の科には顕著に増加したものは見られなかった。したがって、ISO の現実的な基準を満たしていないものの、OB の分解に寄与する菌を増殖させた事実は認められなかった。PFPA は、OECD および化審法の理想的な基準を満たし、特定の菌を増加させることもなかった (Table 3-8

の 3pf)。一方、Pluronic® P-123 は分解時に *Sphingomonadaceae* の占有率が 22.3 %と大きく増加した (Table 3-8 の 3p)。この時の細菌は OB 分解時にも増殖しているため、ISO の現実的な基準を満たしているものの、Pluronic® P-123 の分解に伴い増加した細菌が OB の分解を促進した可能性があり、OB の分散剤としては適切ではないと考えられる。

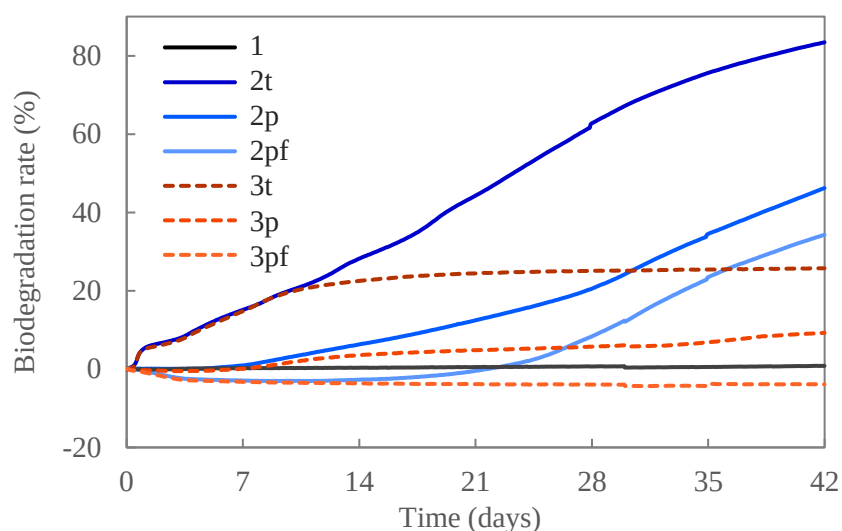


Fig. 3-7 各乳化剤を用いたときの OB の分解度曲線.

(1) 試験区、(2t) 試験区+補助物質 (Tween® 85)、(2p) 試験区+補助物質 (Pluronic® P-123)、(2pf) 試験区+補助物質 (PFPA)、(3t) コントロール区+補助物質 (Tween® 85)、(3p) コントロール区+補助物質 (Pluronic® P-123)、(3pf) コントロール区+補助物質 (PFPA)

Table 3-8 OB 分解後の上位 10 科の相対比率.

Phylum	Taxonomy			Relative abundance* (%)				
	Class	Order	Family	+ Emulsifier				
				2t	(3t)	2p	(3p)	2pf (3pf)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	10.5	(0.1)	20.2	(-0.7)	16.2 (-0.2)
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.0	(0.0)	0.0	(-0.0)	11.7 (-0.0)
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	-1.8	(-0.4)	-3.0	(-1.6)	-2.9 (1.5)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	1.4	(-0.5)	1.3	(-1.2)	0.1 (-0.6)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	2.5	(0.3)	1.0	(0.3)	-0.1 (-0.1)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	-0.1	(0.2)	1.0	(-0.1)	0.9 (0.1)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	3.5	(0.2)	21.4	(22.3)	1.9 (-0.0)
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	0.4	(-1.0)	0.0	(-0.1)	6.4 (-0.9)
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	0.3	(0.4)	0.4	(0.9)	0.0 (0.1)
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.0	(0.0)	0.0	(0.0)	1.8 (0.0)

*Relative abundance on average after subtracting the abundance in the control of each test.

3.4 結論

本章では主に CD を用いた場合の難水溶性の分解促進について検討した。分解度試験において難水溶性物質の分解性を適切に評価するのに適した分散剤を複数見出した。Trimethylated α 、 β 、 γ -CD および partiallymethylated β -CD はそれ自体分解されず、OB および AQ の分解を促進し、OECD および化審法の理想的な基準を満たすものであった。また trimethylated α 、 β 、 γ -CD 微生物叢もほぼ同様の傾向を示した。さらに、CD による分解促進の要因を物理化学的、分析化学的手法を用いて検討した。溶存状態の難水溶性物質はそのほとんどが CD と包接体を形成し、さらに包接体同士が凝集体を形成していた。凝集体は試験液中に分散し、活性フロックに付着して存在していた。被験物質の供給源が分解反応場の近傍に存在することで、CD を加えない状態よりも微生物周囲の可溶化状態の被験物質濃度を高めていると予想され、これらの作用により分解が促進されたと考えられる。

乳化剤としては Tween[®] 85、Pluronic[®] P-123 および PFPA が OB の分解を促進し、これらの乳化剤も CD と同様の機構で被験物質の分解を促進したと考えられる。Pluronic[®] P-123 は ISO 10634 の現実的な基準を満たしたものの、Pluronic[®] P-123 の分解によって増加した *Sphingomonadaceae* が OB の分解時にも増加したことから、本乳化剤は OB の分散剤には適していなかった。PFPA についてはそれ自体分解されず、OB の分解を促進したことから、理想的な基準を満たした。ただし、PFPA は一度環境中に放出されると長期間残留すると考えらえるため、trimethylated α 、 β 、 γ -CD および partiallymethylated β -CD がより有用な分散剤と考えられる。これらの分散剤は、難水

溶性物質の分解性を、より実環境に近い条件で適正に評価するのに資するものと言える。

第4章 シリカゲルを用いた難水溶性物質の分解性評価

4.1 緒言

本章では補助物質としてシリカゲルを用いた場合の結果について検討する。ISO 10634 には補助物質としてシリカゲルに被験物質を吸着させる試験方法が記載されている^{54,55)}。固体の被験物質をシリカゲルにある程度均一に吸着させるためには、一度被験物質を溶媒に溶解させる必要があり、その溶媒としてクロロホルムやアセトンが例示されている。我々の研究グループでは、これまで被験物質として octabenzene (OB)、anthraquinone、2-ethylanthraquinone、di(2-ethylhexyl)phthalate および tris(2-ethylhexyl)trimellitate をクロロホルムに溶解し、クロロホルム溶液にシリカゲルを浸漬することで、シリカゲルに吸着した被験物質の分解が促進されることを見出した¹²⁾。しかし、この方法は第3章で述べた OECD および化審法の理想的な基準や ISO 10634 の現実的な基準に抵触する懸念がある。具体的には、上述の試験方法は ISO 10634 に従い、被験物質をクロロホルムに溶解してシリカゲルと混和後、クロロホルムを揮発させ、被験物質が吸着したシリカゲルを用いた分解度試験を行った。比較のために、被験物質を含まないクロロホルムとシリカゲルを混和後に、クロロホルムを揮発させたシリカゲルでも分解度試験を行ったところ、BOD が上昇した。これは、シリカゲル上に僅かに残留したクロロホルムが生分解したためと考えられる。この手法は理想的な基準を満たしておらず、さらに以下の2つの問題が生じる。1つめは、残留するクロロホルム量の制御が不可能なことである。そのため、測定した BOD において、被験物質あるいはクロロホルムの分解に由来する割合が判断できない。2つめは、クロロホルムの分解過程

で一部の微生物が増殖することである。この増殖した微生物が被験物質の分解に影響を与える可能性があるためである。したがって、被験物質の生分解性を正しく評価できないことが分かる。

本章では前述の理想的な基準あるいは現実的な基準を満たすシリカゲルへの吸着溶媒の検討を行った。溶媒としては、ISO 10634 に例示のクロロホルムおよびアセトン、例示されていない *n*-ヘキサンを選定した。被験物質にはシリカゲルの添加によって分解が促進された octabenzene (OB)を選んだ¹²⁾。次世代シーケンスを用いて補助物質の添加による微生物叢変化を観察し、残留溶媒の分解によって増加した菌が OB の分解を促進していないか確認した。さらに、シリカゲルの添加によって難水溶性物質の分解が促進する機構として次の 3 つの仮説を検証した。1) シリカゲルの添加によって被験物質と水溶液の接触表面積が増大し、溶解速度が上昇する 2) シリカゲルが微生物の足場となり、生育を促進する 3) 被験物質が吸着したシリカゲルに菌体が付着することでシリカゲル上の被験物質を直接利用できる可能性についてである。

4.2 材料と方法

4.2.1 試薬

被験物質をシリカゲルに吸着させるための溶媒として、*n*-ヘキサン(HPLC グレード)は富士フィルム和光純薬から、アセトン(特級)およびクロロホルム(一級)はナカライテスクから購入した。その他の試薬については第 1~3 章と同様である。

4.2.2 分解度試験

第 2、3 章と同様に、分解度試験は OECD テストガイドライン 301F に準拠して実施した。都市下水処理場の活性汚泥は 2020 年 4 月 14 日（アセトンシリカゲルへの吸着溶媒に用いた試験）、6 月 22 日（クロロホルムまたは *n*-ヘキサンシリカゲルへの吸着溶媒に用いた試験）に採取した。OB の分解度（補助物質存在下、非存在下いずれも）および補助物質の分解度は第 3 章の Eq. 3-1~3-3 に基づいて算出した。

4.2.3 シリカゲルへ被験物質の吸着

シリカゲルに被験物質を吸着させる方法は既報に準じて行った⁶⁷⁾。被験物質を溶解させる溶媒はクロロホルムの他にアセトンあるいは *n*-ヘキサンを用いた。なお、被験物質を上述溶媒で溶解しシリカゲルに吸着させた後、溶媒をエバポレータおよび真空オーブンで除去する作業は溶媒毎に行った。乾燥終了後はバイアル中に密閉して、冷蔵庫 EP-570（日本フリーザー）にて $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で保管した。

シリカゲルを用いた分解度試験は以下のように実施した。アセトンについては、直接 OB を添加した「試験区」を 2 連、OB をシリカゲルに吸着させて添加した「試験区+補助物質」を 2 連、OB を添加せずにシリカゲルを溶媒のみで処理して添加した「コントロール区+補助物質」を 1 連、被験物質もシリカゲルも添加しない「コントロール区」を 1 連とし 38 日間培養した。クロロホルムおよび *n*-ヘキサンについては、「試験区」および「試験区+補助物質」を 3 連、「コントロール区+補助物質」および「コントロール区」を 2 連として 42 日間培養した。

4.2.4 微生物叢解析

微生物叢解析は第3章と同様の手法で被験物質および/または補助物質を分解して優占化した微生物を調べた。得られたシーケンスデータは第3章のデータとともに DDBJ に登録した (accession No. PRJDB16891)。活性汚泥は Fig. S4-1 および S4-2 に菱形(◆)で示した時点で採取した。コントロール区はいずれも「コントロール+補助物質」と同日に採取した。

4.3 結果と考察

4.3.1 シリカゲルを用いた分解度試験

4.3.1.1 吸着溶媒をアセトンとした場合の影響

アセトンを溶解溶媒としてシリカゲルに吸着させた場合の OB の易分解性を調べた。38 日間の OB の分解度を、複数の連数があるものは平均してまとめた結果を Fig. 4-1 に示す。平均化していない元の試験結果は Fig. S4-1 に示す。「試験区」の分解度 (Fig. 4-1 の 1) から、OB の分解は 29 日後から開始し、38 日後の分解度は 19 %であった。一方、「試験区+補助物質」の分解度 (Fig. 4-1 の 2a) から、シリカゲルに吸着された OB は培養数日後から徐々に分解が継続し、16 日以降顕著に分解し、38 日後の分解度は 54 %に達した。この結果は、既報通りシリカゲルに OB を吸着させることで OB の分解が促進されたことを示している。一方で、「コントロール+補助物質」の分解度 (Fig. 4-1 の 3a) は、3 日後に上昇し 38 日後には 8 %に達した。この値は、ISO の基準である 10 %を下回っているため、アセトンとシリカゲルを用いたこの手法は難水溶性物質

の分解性評価に適用可能と言える。しかしながら、この手法には以下の問題がある。

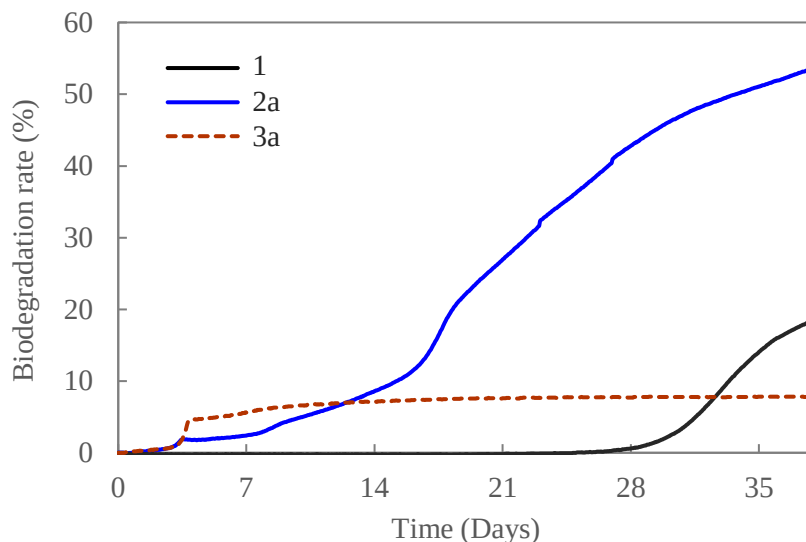


Fig. 4-1 アセトンを用いたときの OB の分解度曲線.

(1) 試験区、(2a) 試験区+補助物質 (アセトン)、(3a)コントロール区+補助物質 (アセトン)

「試験区+補助物質」と「コントロール区+補助物質」の分解度の上昇時期はともに3日後とほぼ一致した。アセトンを加えず単にシリカゲルを添加した区ではこの上昇は認められず、「コントロール区」の分解度曲線と良好な一致を示した (data not shown)。

したがって、「試験区+補助物質」と「コントロール区+補助物質」の分解度には残留したアセトンの影が含まれていることが明らかであり、「試験区+補助物質」の分解度から OB 単独の分解性を評価できない。「試験区+補助物質」の分解度から「コントロール区+補助物質」の分解度を差し引けば、OB のみの分解度が理論上評価できるように見える。しかし、実際は残留するアセトン量を正確に制御できないため、「試験区+補助物質」と「コントロール区+補助物質」中のアセトン量が同じであると保証ができず、

差し引くことができない。したがって、シリカゲルに吸着させるための溶媒としてアセトンを使用した場合、被験物質の厳密な分解度の算出は不可能である。もう一つの問題は、残留するアセトンを分解する菌が OB の分解を加速した可能性があることである。

4.3.1.2 吸着溶媒をクロロホルムまたは *n*-ヘキサンとした場合の影響

溶解溶媒としてクロロホルムまたは *n*-ヘキサンを用い、シリカゲルに吸着させた場合の OB の易分解性を調べた。複数の連数があるものは平均し、42 日間の OB の分解度を算出した結果を Fig. 4-2 に示す。平均化する前の試験結果は Fig. S4-2 に示す。「試験区」の分解度曲線 (Fig. 4-2 の 1) から、Fig. 3-1 と同様に OB の分解は 30 日後から始まり、42 日後の分解度は 8 % になった。一方、「試験区+補助物質」の分解度は、Fig. 4-1 と同様に 16 日以降顕著に上昇し、42 日後でクロロホルムを用いた場合は 72 % (Fig. 4-2 の 2c) で *n*-ヘキサンを用いた場合は 66 % (Fig. 4-2 の 2h) に達した。このことから、シリカゲルに吸着させる溶媒は、アセトン、クロロホルム、*n*-ヘキサンのいずれであっても OB の分解を同程度に促進することが示された。クロロホルムを用いた「コントロール+補助物質」の分解度は 2 日後に 4 % に上昇し、その後プラトーになっている (Fig. 4-2 の 3c) ことから、残留クロロホルムの分解が 2 日間で分解したと考えられる。一方、*n*-ヘキサン を用いた「コントロール+補助物質」の分解度は 1 % 未満 (0.6 %) であった (Fig. 4-2 の 3h) ことから、*n*-ヘキサンは残留していなかったと考えられる。クロロホルムも *n*-ヘキサンも ISO の基準である 10 % を下回っているが、特に *n*-ヘキサンは OECD および化審法の理想的な基準も満たしていた。シリカゲルへの吸着溶媒

を *n*-ヘキサンに変更したことで残留溶媒が低減した理由として、シリカゲル表面はシラノール基が露出しているため、極性分子であるアセトンおよびクロロホルムはシラノール基との間に双極子-双極子相互作用を生じ、水素結合の形成により完全には揮発しなかったと考えられる。一方、無極性分子であるヘキサンは水素結合を形成しないため、アセトン、クロロホルムに比べて揮発性は低いものの、残留し難かったと考えられる。以上をまとめると、*n*-ヘキサンを溶媒として用いてシリカゲルに難水溶性物質を吸着させた場合、「試験区+補助物質」の分解度は、被験物質のみに起因していること、および補助物質の分解菌が被験物質の分解を加速させる恐れがないことが明らかになった。

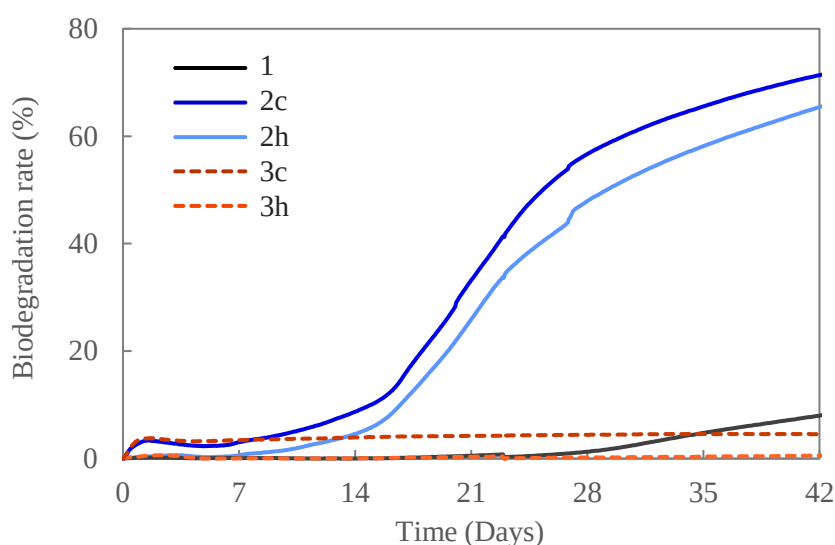


Fig. 4-2 クロロホルムまたは *n*-ヘキサンを用いたときの OB の分解度曲線.

(1) 試験区、(2c) 試験区+補助物質 (クロロホルム)、(2h) 試験区+補助物質 (*n*-ヘキサン)、(3c) コントロール区+補助物質 (クロロホルム)、(3h) コントロール区+補助物質 (*n*-ヘキサン)

4.3.1.3 微生物叢の解析

4.3.1.1 および 4.3.1.2 の試料を微生物叢解析し、上位 10 種の科の占有率を Tables S4-1 (アセトン)、S4-2 (クロロホルム)、S4-3 (*n*-ヘキサン) に示した。複数の連数があるものは平均化し、「コントロール区」を差し引いた結果は Table 4-1 に示す。OB が分解されている途中に「試験区」(Table 4-1 の 1) もしくは「試験区+補助物質」(Table 4-1 の 2a、2c、2h) のいずれかの区で 5 %を超えて優占化した科は、*Mycobacteriaceae*、*Nocardiaceae*、*PAC002126_f*、*Sphingomonadaceae*、*Comamonadaceae*、*PAC000016_f*、*Saccharimonas_f*であり、これらの細菌が OB の分解に寄与したと考えられる。吸着溶媒としてアセトンを用いてシリカゲルに吸着させた場合、「コントロール区+補助物質」(Table 4-1 の 3a) では占有率が特異的に増加した細菌は見当たらなかった。この理由としては、アセトンは容易に生分解されることが知られており⁷⁵⁻⁷⁹⁾、特定の細菌が突出して増加することなく微生物叢の大きな変化には至らなかったためと考えられる。クロロホルムを用いた場合、「コントロール区+補助物質」(Table 4-1 の 3c) では *Flavobacteriaceae* が 14 %まで増加したため、この科がクロロホルムを分解して増加した可能性が示唆される。一方、この科は OB を添加した「試験区」または「試験区+補助物質」では顕著に増加しなかったことから、OB の分解促進は確認されなかった。また、吸着溶媒として *n*-ヘキサンを使用した (Table 4-1 の 3h) では特異的に増加した科は認められず、分解度および微生物叢解析の結果からも *n*-ヘキサンはほとんど残留せず特定の菌種への影響を与えなかったと考えられる。以上をまとめると、アセトンは特定の菌の増殖に寄与した。クロロホルムは残留して一部の菌を増殖させたが、OB の分

解に寄与した菌とは異なっていた。したがって、OB の分解は、使用した溶媒に関わらずシリカゲルによる分散効果で促進したと考えられる。さらに、*n*-ヘキサンはほとんど残留せず、OB の分解に影響せずにシリカゲルによる分散効果で促進したと考えられるため、最も適した溶媒と言える。

Table 4-1 OB 分解後の上位 10 科の相対比率.

Taxonomy				Relative abundance* (%)						
Phylum	Class	Order	Family	OB	+ Silica gel					
				1	2a	(3a)	2c	(3c)	2h	(3h)
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	7.3	5.6	(-4.4)	25.2	(-1.8)	7.4	(-0.8)
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Nocardiaceae	0.9	0.0	(0.0)	-0.1	(0.1)	6.0	(-0.1)
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	1.0	0.2	(1.9)	-4.3	(13.4)	-4.4	(-3.2)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	1.2	1.6	(1.5)	0.0	(1.4)	-0.5	(0.7)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	-0.4	-0.6	(-0.5)	1.4	(0.1)	4.6	(-0.1)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126_f	0.7	1.5	(0.0)	7.6	(1.0)	5.8	(0.3)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	2.8	10.9	(0.3)	5.0	(0.2)	5.3	(0.6)
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	0.1	9.4	(0.2)	1.4	(3.5)	1.8	(0.5)
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	PAC000016_f	-0.8	-0.7	(-0.5)	1.7	(0.1)	7.4	(0.9)
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	Saccharimonas_f	12.7	16.9	(0.0)	0.6	(0.0)	16.8	(0.0)

*Relative abundance on average subtracting the control of each test.

4.3.2 シリカゲルによる分解促進メカニズムの解析

Fig. 4-3 には anthracene をシリカゲルに吸着させて汚泥と共に 5 日間培養したときの顕微鏡画像を示す。Fig. 4-3A に見られるように、anthracene に由来する青色蛍光を示す部分は、粒径が 10~20 μm の凝集体として存在していた。ここで蛍光染色した微生物も一緒に励起すると、汚泥フロックは緑色蛍光を発したが、シリカゲルに吸着した anthracene の凝集体の分布とよく一致した (Fig. 4-3B)。つまり、anthracene が吸着したシリカゲルは汚泥フロックに付着して存在していたと考えられる。さらに透過光も重ねて観察しても、シリカゲル上に青色蛍光がみられ、それが汚泥のフロック上に分布することが観察された (Fig. 4-3C)。

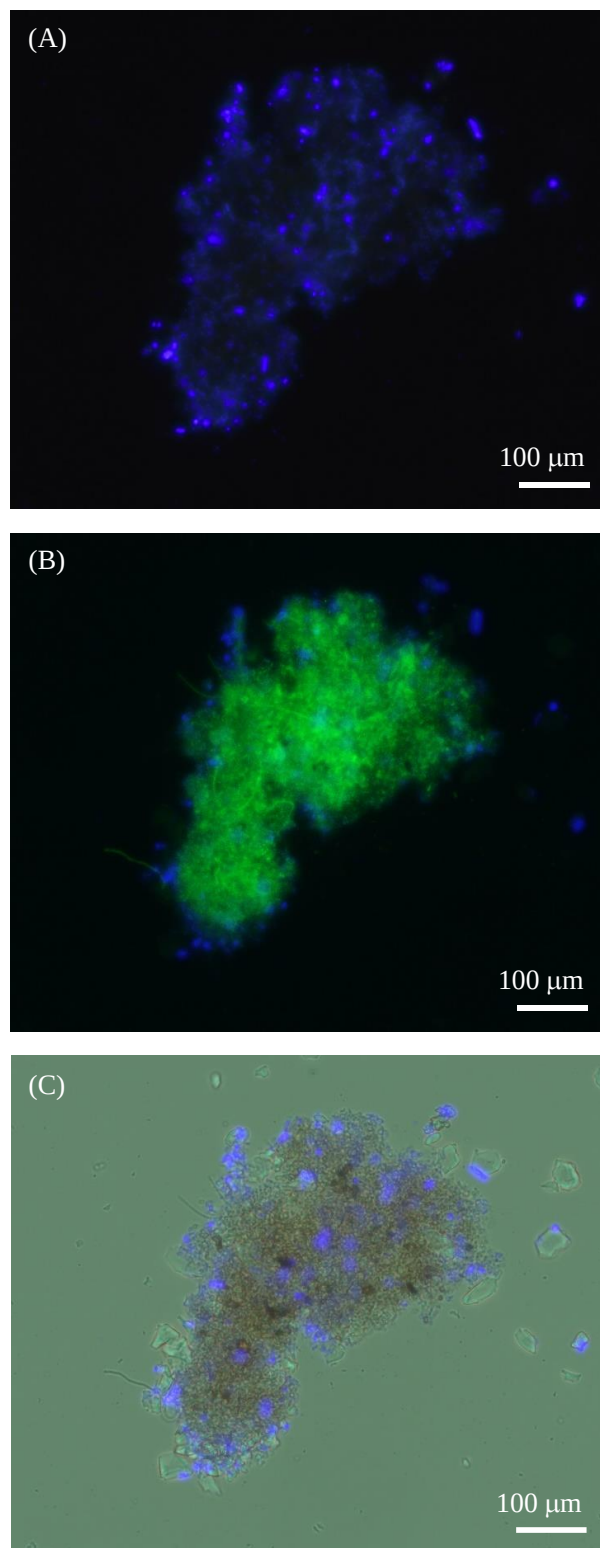


Fig. 4-3 シリカゲルに吸着した anthracene (青) および活性汚泥 (緑) (5 日間培養) .

(A) anthracene のみ励起 (B) anthracene と汚泥を両方励起 (C) anthracene と汚泥を両方励起し、透過光と共に観察した画像

これらの結果を踏まえ、シリカゲルの添加による難水溶性物質の分解促進機構について以下の 1) ～3) の観点から考察を行った。1) シリカゲルの添加によって被験物質がシリカゲル表面に固定化され、被験物質の凝集体のみかけの接触表面積が増大し、微生物周辺における被験物質の溶解量が上昇する。2) シリカゲルが微生物の足場となり、微生物の生育を促進する。3) 被験物質が吸着したシリカゲルに菌体が付着することで菌体と被験物質凝集体の距離が近くなり、微生物への被験物質の供給速度を促進する。

1) について、被験物質のみかけの接触表面積の増加については次のように見積もることができる。まず、シリカゲルを添加しなかった場合の OB 表面積について、被験物質の体積と密度から計算した。OB の結晶の大きさは、使用した試薬中の OB の結晶を顕微鏡観察し、 $1 \times 0.2 \times 0.2 \text{ mm}$ と見積もった。OB の密度は ACD/Labs (ver. 11.02, Advanced Chemistry Development) を用いて $1.07 \pm 0.06 \text{ g cm}^{-3}$ と推定された。したがって、 1 mg あたりの表面積は $0.2 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1} [= 0.0088 / (0.00004 \times 1.07 \times 1,000)]$ と算出された。シリカゲルの表面積には BET 比表面積 (約 $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) を用い、被験物質が均一に吸着していると仮定すると、被験物質 1 mg あたり $7 \times 10^4 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1} [= 1,333 \times (500 \times 10) / 100]$ と見積もられる。したがって、シリカゲルに吸着させることで接触表面積は 10^5 オーダーで増加することになる。ただし、Fig. 4-3C に見られるように、現実には被験物質はシリカゲルに不均一に吸着していると考えられ、これほど大きな差は生じない可能性が高い。2) については、もし微生物の生育が促進されていれば、BOD の変化や占有率の変化が生じると考えられるが、いずれも認められなかった (Fig. 4-2 および Table 4-1 の 3h)。3) については、Fig. 4-3 に示した通り、微生物がシリカゲル

に付着して存在したことから起こり得ると考えられる。いずれにしても、シリカゲルが微生物への被験物質の供給速度を大幅に増大させることが確認された。

4.4 結論

本章ではシリカゲルに難水溶性物質を吸着させるのに適した溶媒の検討および、シリカゲルによる被験物質の分解促進メカニズムの解明を試みた。被験物質を *n*-ヘキサンに溶解後シリカゲルに吸着させ、その後乾燥させて試験を行ったところ、*n*-ヘキサンはシリカゲル表面に残存せず、OB の分解を促進したことから、*n*-ヘキサンが OECD および化審法の理想的な基準を満たす溶媒であることが分かった。クロロホルムとアセトンについては、シリカゲル表面に微量に残留し、生分解されたものの、現実的な基準を満たした。一方で、微生物叢解析の結果から、アセトンについては特定の科を増加させることはなかったものの、クロロホルムについては *Flavobacteriaceae* の占有率を増加させたため、本科が被験物質の分解に寄与する場合には溶媒として適さないと考えられる。さらに、シリカゲルに吸着した被験物質は汚泥フロックに付着して存在していることを明らかにした。シリカゲルへの吸着によって被験物質の接触表面積が増大することと同時に、微生物と被験物質が近接し、物質供給が促進されたために分解も促進されたと考えられる。

総括

第1章では分解度試験に用いる活性汚泥の違いを調べるため、次世代シーケンスを用いた微生物叢解析を実施し、標準活性汚泥が都市下水汚泥に比べて偏った微生物叢で多様性も低いことを明らかにした。また、標準活性汚泥も都市下水汚泥もグルコースとペプトンで培養すると、類似の微生物叢に変化することが分かった。

第2章では分解度試験中の微生物叢の変遷を調べ、分解菌を調べるための適切な手法を確立した。この手法を用い、試験液量を増やすことで被験物質の分解が促進される要因について、液量を増やすほどより多くの分解菌種が生存し、増加する可能性が高まるためであると実験的に初めて明らかにした。

第3章、第4章では難水溶性物質の適正な分解性評価手法を検討した。第3章では、主にシクロデキストリンによる分解促進効果について検討した。Trimethylated α -、 β -、 γ -CD および partially methylated β -CD はそれ自体が分解されず、被験物質の分解を促進することを見出した。さらに CD による分解促進メカニズムの一部を明らかにした。すなわち、溶存状態の被験物質はほとんどが CD 包接体を形成し、さらに包接体が凝集化し、汚泥フロックに付着して存在した。微生物の近傍に被験物質の供給源があることで、物質供給が高まり、分解が促進されたと考えられる。

第4章では難水溶性物質をシリカゲルに吸着させるのに適した溶媒を検討し、*n*-ヘキサンがシリカゲル吸着後にシリカゲルに残留せず、被験物質の分解を促進することを見出した。さらに、シリカゲルに吸着した被験物質が汚泥フロックに付着して存在したことを明らかにし、シリカゲル添加によって被験物質の溶解表面積が増大するだけでなく、

本現象によって物質供給が高まり、分解が促進したことを明らかにした。

これらの検討から、微生物による化学物質の分解特性をより適切に、かつ再現性良く評価するためには、試験液を増量し、添加する微生物量を増加させることが有効で、その実態としては被験物質固有の分解菌が生存し、増加する可能性が高まることが要因であることが明らかとなった。難水溶性化学物質の評価においては、担体や乳化剤、シクロデキストリンといった分散剤を用いて被験物質を分散させることが有効であり、その実態としては、被験物質と分解微生物との距離が近くなることで物質供給が大幅に高まることが要因であることが明らかとなった。これらは、環境中での化学物質の分解挙動とも共通しており、化学物質の利用と環境への影響を評価する上で重要な指標になると期待される。

引用文献

- 1) H. Kobayashi and B Rittmann: Microbial removal of hazardous organic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 170A–183A (1982).
- 2) K.C. Jones and P Voogt: Persistent organic pollutants (POPs): state of the science, *Environ. Pollut.*, **100**, 209–221 (1999).
- 3) M. Matthies, K. Solomon, M. Vighi, A. Gilmand and J. V. Tarazona: The origin and evolution of assessment criteria for persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) chemicals and persistent organic pollutants (POPs). *Environ. Sci. Processes Impacts*, **18**, 1114–1128 (2016).
- 4) OECD Guidance for Testing Chemicals: Ready Biodegradability (1992).
- 5) Japan METI: “Act on the Regulation of Manufacture and Evaluation of Chemical Substances (Chemical Substance Control Law).” Ministry of Economy, Trade and Industry, Tokyo, Japan.
- 6) <https://www.japaneselawtranslation.go.jp/en/laws/view/3350> (Accessed 18 March, 2022).
- 7) <https://osha.europa.eu/en/legislation/directives/regulation-ec-no-1907-2006-of-the-european-parliament-and-of-the-council> (Accessed 18 March, 2024).
- 8) B. M. Coppotelli, A. Ibarrolaza, R. L. Dias, M. T. Del Panno. L. Berthe-Corti and Irma S. Morelli: Study of the Degradation Activity and the Strategies to Promote the

- Bioavailability of Phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006FA. *Microb. Ecol.*, **59**, 266–276 (2010).
- 9) R. Peng, A. Xiong, Y. Xue, X. Fu, F. Gao, W. Zhao, Y. Tian and Q. Yao: Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 927–955 (2008).
- 10) https://www.cerij.or.jp/service/01_safety_studies/biodegradability_01.html (Accessed 20 May, 2022).
- 11) Guideline of Chemical Substances Control Law: Biodegradability Test of Chemical Substances by Microorganisms (2018) (in Japanese).
- 12) S. Takekoshi, K. Takano, Y. Matoba, M. Sato and A. Tachibana: Investigation of OECD 301F ready biodegradability test to evaluate chemical fate in a realistic environment. *J. Pestic. Sci.*, **46**, 143–151 (2021).
- 13) M. Suzuki, H. Yamane, N. Nishiyama, H. Suzuki and M. Nasu: Microbial community structure analysis of activated sludge for the ready biodegradability test. (in Japanese) *Jpn. Soc. Microb. Ecol.* Abstract book, **19**, 132 (2003).
- 14) P. Hugenholtz, B. M. Goebel and N. R. Pace: Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *J. Bacteriol.*, **180**, 4765–4774 (1998).
- 15) M. S. Rappé and S. J. Giovannoni: The Uncultured Microbial Majority. *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 369–394 (2003).

- 16) M. Drancourt, C. Bollet, A. Carlouz, R. Martelin, J. Gayral and D. Raoult: 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 3623–3630 (2000).
- 17) C. Yang, W. Zhang, R. Liu, Q. Li, B. Li, S. Wang, C. Song, C. Qiao and A. Mulchandani: Phylogenetic Diversity and Metabolic Potential of Activated Sludge Microbial Communities in Full-Scale Wastewater Treatment Plants. *Environ. Sci. Technol.*, **45**, 7408–7415 (2011).
- 18) A. Hiraishi, M. Iwasaki and H. Shinjo: Terminal Restriction Pattern Analysis of 16s rRNA Genes for the Characterization of Bacterial Communities of Activated Sludge. *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 148–156 (2000).
- 19) S. Goodwin, J. D. McPherson and W. R. McCombie: Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 333–351 (2016).
- 20) E. L. van Dijk, H. Auger, Y. Jaszczyszyn and C. Thermes: Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.*, **30**, 418–426 (2014).
- 21) T. Zhang, M. Shao and L. Ye: 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J.*, **6**, 1137–1147 (2012).
- 22) M. Hall and R. G. Beiko: 16S rRNA Gene Analysis with QIIME2 In “Microbiome Analysis Methods and Protocols” ed. by R. G. Beiko, W. Hsiao and J. Parkinson, Humana Press, New York, pp.113–130, 2018.

- 23) B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson and S. Holmes: DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods*, **13**, 581–583 (2016).
- 24) J. Oksanen, G. L. Simpson, F. Guillaume Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, P. Solymos, M. Henry H. Stevens, E. Szoecs, H. Wagner, M. Barbour, M. Bedward, B. Bolker, D. Borcard, G. Carvalho, M. Chirico, M. De Caceres, S. Durand, H. B. A. Evangelista, R. FitzJohn, M. Friendly, B. Furneaux, G. Hannigan, M. O. Hill, L. Lahti, D. McGlinn, M. Helene Ouellette, E. Ribeiro Cunha, T. Smith, A. Stier, C. J. F. T. Braak and J. Weedon: *Package 'vegan'*, CRAN (2022).
- 25) E. H. Simpson: Measurement of Diversity. *Nature*, **163**, 688 (1949).
- 26) R. P. McIntosh: An Index of Diversity and the Relation of Certain Concepts to Diversity. *Ecology*, **48**, 392–404 (1967).
- 27) D. Biesgen, K. Frindte, S. Maarastawi, and C. Knief: Clay content modulates differences in bacterial community structure in soil aggregates of different size. *Geoderma*, **376**, 114544 (2020).
- 28) A. Ghasemi and S. Zahediasl: Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *Int. J. Endocrinol. Metab.*, **10**, 486–489 (2012).
- 29) C. E. Douglas and F. A. Michael: On distribution-free multiple comparisons in the one-way analysis of variance. *Commun. Stat. - Theory Methods*, **20**, 127–139 (1991).

- 30) J. Ludbrook: Multiple comparison procedures updated. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, 1032–1037 (1998).
- 31) V. Bewick, L. Cheek, and J. Ball: Statistics review 9: One-way analysis of variance. *Critical Care*, **8**, 130–136 (2004).
- 32) J. B. Kruskal: Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*, **29**, 115–129 (1964).
- 33) A. E. Magurran, Measuring biological diversity. *Curr. Biol.*, **31**, R1174–R1177 (2021).
- 34) G. Chesneau, G. Torres-Cortes, M. Briand, A. Darrasse, A. Preveaux, C. Marais, M. Jacques, A. Shade and M. Barret: Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **96** (2020).
- 35) Chemicals Evaluation and Research Institute: Japan: Ministry of Economy, Trade and Industry Commissioned Business Chemical Safety Measures (Investigation and Examination Methods for Chemical Substances) (2015).
- 36) A. Hiraishi and Y. Ueda: Evaluation of microbial population structures of synthetic-wastewater activated sludge and plant-scale sewage sludge on the basis of respiratory quinone profiles. *J. Jpn. Soc. Water Treat. Biol.*, **33**, 137–149 (1997).
- 37) S. Takekoshi, K. Takano, Y. Matoba, M. Mukumoto and A. Tachibana: Establishing a ready biodegradability test system using OxiTop® to evaluate chemical fate in a realistic environment. *J. Pestic. Sci.*, **47**, 35–42 (2022).

- 38) S. Cai, C. Shi, J. Zhao, Q. Cao, J. He and L. Chen: *Sphingobium phenoxybenzoativorans* sp. nov., a 2-phenoxybenzoic-acid-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **65**, 1986–1991 (2015).
- 39) R. Wittich, H. Busse, P. Kämpfer, M. Tirola, M. Wieser, A. J. Macedo and W. Abraham: *Sphingobium aromaticiconvertens* sp. nov., a xenobiotic-compound-degrading bacterium from polluted river sediment. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **57**, 306–310 (2007).
- 40) E. A. Rodgers-Vieira, Z. Zhang, A. C. Adrion, A. Gold and M. D. Aitken: Identification of Anthraquinone-Degrading Bacteria in Soil Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Env. Microbiol.*, **81**, 3775–3781 (2015).
- 41) A. C. Adrion, D. R. Singleton, J. Nakamura, D. Shea and M. D. Aitken: Improving Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation in Contaminated Soil Through Low-Level Surfactant Addition after Conventional Bioremediation. *Environ. Eng. Sci.*, **33**, 659–670 (2016).
- 42) Y. Li, P. Cao, S. Wang and X. Xu: Research on the treatment mechanism of anthraquinone dye wastewater by algal-bacterial symbiotic system. *Bioresource Technol.*, **347**, 126691 (2022).
- 43) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN609364> (Accessed 19 Jan. 2023).
- 44) S. N. Jiménez-Volkerink, J. Vila, M. Jordán, C. Minguillón, H. Smidt and M. Grifoll: Multi-Omic Profiling of a Newly Isolated Oxy-PAH Degrading Specialist from PAH-

- Contaminated Soil Reveals Bacterial Mechanisms to Mitigate the Risk Posed by Polar Transformation Products. *Environ. Sci. Technol.*, **57**, 139–149 (2023).
- 45) R. J. S. Jacques, E. C. Santos, F. M. Bento, M C. R. Peralba, P. A. Selbach, E. L. S. Sá and F. A. O. Camargo: Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **56**, 143–150 (2005).
- 46) S. Mutnuri, N. Vasudevan and M. Kaestner: Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 569–576 (2005).
- 47) M. Kästner, M. Breuer-Jammali and B. Mahro: Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 267–273 (1994).
- 48) C. Castro-Silva, V. M. Ruíz-Valdiviezo, C. Valenzuela-Encinas, R. J. Alcántara-Hernández, Y. E. Navarro-Noya, E. Vázquez-Núñez, M. Luna-Guido, R. Marsch and L. Dendooven: The bacterial community structure in an alkaline saline soil spiked with anthracene. *Electron. J. Biotechnol.*, **16** (2013).
- 49) EAWAG-BBD pathway prediction results:
http://eawag-bbd.ethz.ch/tree_graphs/images/2023.01.26-04.44.11-25/1.html?1674704654471 (Accessed 26 Jan. 2023).

50) EAWAG-BBD pathway prediction results:

http://eawag-bbd.ethz.ch/tree_graphs/images/2023.01.26-04.43.25-14/1.html?1674704608316 (Accessed 26 Jan. 2023).

51) EAWAG-BBD pathway prediction results:

http://eawag-bbd.ethz.ch/tree_graphs/images/2023.01.26-04.41.53-62/1.html?1674704518050 (Accessed 26 Jan. 2023).

52) [https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/detail.action?cno=84-65-1&mno=4-](https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/detail.action?cno=84-65-1&mno=4-0686&request_locale=en)

[0686&request_locale=en](https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/detail.action?cno=84-65-1&mno=4-0686&request_locale=en) (Accessed 26 Jan. 2023).

53) [https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/detail.action?cno=117-81-7&mno=3-](https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/detail.action?cno=117-81-7&mno=3-1307&request_locale=en)

[1307&request_locale=en](https://www.nite.go.jp/chem/jcheck/detail.action?cno=117-81-7&mno=3-1307&request_locale=en) (Accessed 26 Jan. 2023).

54) ISO10634: Water quality–Guidance for the Preparation and Treatment of Poorly Water-Soluble Organic Compounds for the Subsequent Evaluation of Their Biodegradability in an Aqueous Medium (1995).

55) ISO10634: Water quality–Guidance for the Preparation and Treatment of Poorly Water-Soluble Organic Compounds for the Subsequent Evaluation of Their Biodegradability in an Aqueous Medium, 2nd ed. (2018).

56) N. Nyholm: Biodegradability testing of poorly soluble compounds by means of manometric respirometry. *Chemosphere*, **21**, 1477–1487 (1990).

57) F. Kawai: Microbial degradation of polyethers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 30–38 (2002).

- 58) R. V. Stick, S. J. Williams: Carbohydrates: The Essential Molecules of Life, 2nd ed. (2009).
- 59) G. Crini: Review: A history of cyclodextrins. *Chem. Rev.*, **114**, 10940–10975 (2014).
- 60) H-J. Buschmann and E. Schollmeyer: Application of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *J. Cosmet. Sci.*, **53**, 1185–191 (2002).
- 61) E. Morillo, F. Madrid, A. Lara-Moreno and J. Villaverde: Soil bioremediation by cyclodextrins. A review. *Int. J. Pharm.*, **591**, 119943 (2020).
- 62) <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/10199/5/3/2>
(Accessed 5 Jan., 2023).
- 63) <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/1942/5/3/2>
(Accessed 5 Jan., 2023).
- 64) <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/10815/5/3/2>
(Accessed 5 Jan., 2023).
- 65) K. Uekama, F. Hirayama and T. Irie: The new method for determination of the stability constants of cyclodextrin-prostaglandin inclusion complexes by liquid chromatography. *Chem. Lett.*, **7**, 661–664 (1978).
- 66) K. Uekama: Pharmaceutical Applications of Cyclodextrin Complexations. *Yakugaku zasshi*, **101**, 857–873 (1981).
- 67) Y. Takano, S. Takekoshi, K. Takano, Y. Matoba, M. Mukumoto and O. Shirai: Metagenomic analysis of ready biodegradability tests to ascertain the relationship

- between microbiota and the biodegradability of test chemicals. *J. Pestic. Sci.*, **48**, 35–46 (2023).
- 68) S.M. Stocks: Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight, *Cytometry, Part A*, **61**, 189–195 (2004).
- 69) X. Hu, A. Fukutani, X. Liu, K. Kimbara and F. Kawai: Isolation of bacteria able to grow on both polyethylene glycol (PEG) and polypropylene glycol (PPG) and their PEG/PPG dehydrogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 1407–1413 (2007).
- 70) D. R. Singleton, A. C. Adrion and M. D. Aitken: Surfactant-induced bacterial community changes correlated with increased polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 10165–10177 (2016).
- 71) V. Bonnet, C. Gervaise, F. Djedaïni-Pilard, A. Furlan and C. Sarazin: Cyclodextrin nanoassemblies: a promising tool for drug delivery. *Drug Discovery Today*, **20**, 1120–1126 (2015).
- 72) B. M. Wilen, B. Jin and P. Lant: The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Res.*, **37**, 2127–2139 (2003).
- 73) K. E. Gustafson: Molecular Diffusion Coefficients for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air and Water, *Dissertations, Theses, and Masters Projects. William & Mary*, Paper 1539617664 (1993).

- 74) E. M. Golet, I. Xifra, H. Siegrist, A. C. Alder and W. Giger: Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 3243–3249 (2003).
- 75) International Programme on Chemical Safety: Environmental Health Criteria 207, Acetone.
- 76) T. Kotani, H. Yurimoto, N. Kato and Y. Sakai: Novel Acetone Metabolism in a Propane-Utilizing Bacterium, *Gordonia* sp. Strain TY-5. *J. Bacteriol.*, **189**, 886–893 (2007).
- 77) C. Rosier, N. Leys, C. Henoumont, M. Mergeay and R. Wattieza: Purification and Characterization of the Acetone Carboxylase of *Cupriavidus metallidurans* Strain CH34. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 4516–4518 (2012).
- 78) KEGG Enzyme: 1.14.13.226 <https://www.genome.jp/entry/1.14.13.226> (Accessed 18 Oct., 2023).
- 79) KEGG Enzyme: 6.4.1.6 <https://www.genome.jp/entry/6.4.1.6> (Accessed 18 Oct., 2023).

謝辞

本研究を学位論文にまとめるにあたり多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました京都大学大学院 農学研究科 応用生命科学専攻 生体機能化学分野 白井 理 教授に心より御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり多くのご助言、ご指導を賜った北隅 優希 准教授、宋和 慶盛 助教に厚く御礼申し上げます。

個々の研究を進めるにあたり多大なるご配慮を賜ると共に、様々なご指導、ご助言をくださいました住友化学株式会社 生物環境科学研究所フェロー 的場 好英 博士ならびに化学品評価グループ元グループマネージャー 棕本 麻記子 氏、高野 光太郎 氏に厚く御礼申し上げます。竹腰 沙紀 博士には第2章の実験にご協力いただき感謝申し上げます。第1章、第2章の微生物叢解析に関してご助言いただいた株式会社住化分析センター 佐藤 雅之 博士にも厚く御礼申し上げます。

以上、全ての関係の皆さまのご協力、ご支援に謹んで御礼申し上げます。

本研究に関する原著論文

- 1) Y. Takano, S. Takekoshi, K. Takano, Y. Matoba, M. Mukumoto, O. Shirai:

Metagenomic analysis of ready biodegradability tests to ascertain the relationship

between microbiota and the biodegradability of test chemicals

Journal of Pesticide Science **48**, 35–46 (2023).

- 2) Y. Takano, S. Takekoshi, K. Takano, Y. Matoba, M. Mukumoto, K. Sowa, Y. Kitazumi,

O. Shirai:

Modified cyclodextrins as a dispersing agent for poorly water-soluble substances in

the ready biodegradability test (submitted)

- 3) Y. Takano, S. Takekoshi, K. Takano, Y. Matoba, M. Mukumoto, K. Sowa, Y. Kitazumi,

O. Shirai:

Suitable solvents for adsorption of poorly water-soluble substances onto silica gel in

the ready biodegradability test (accepted)

第 1 章



(Fig. S1-1 続き)

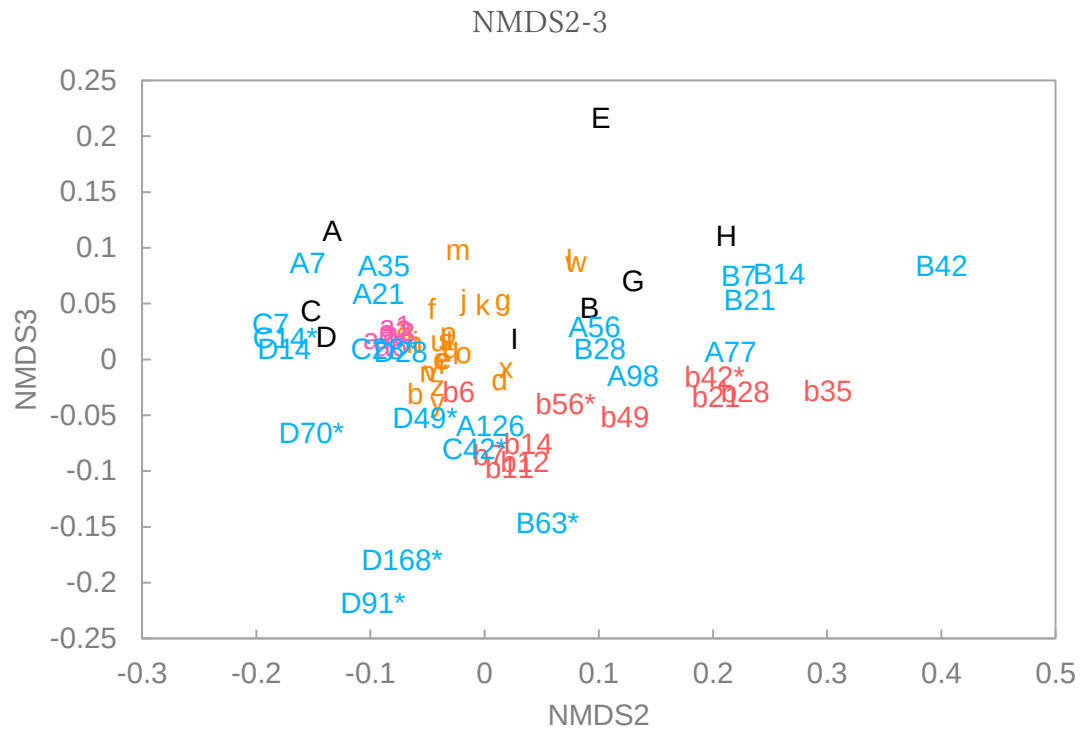


Fig. S1-1 AS-CERI および AS-STP の非類似度に基づく NMDS (3 次元解析) の異なる 2 次元のプロット.

Table S1-1 AS-CERI と AS-STP の非類似度に基づく NMDS3 次元座標.

AS samples	NMDS Scores		
	NMDS1	NMDS2	NMDS3
a	-0.20	-0.070	0.029
b	-0.19	-0.061	-0.030
c	-0.16	-0.039	0.0015
d	-0.22	0.013	-0.017
e	-0.17	-0.036	0.001
f	-0.17	-0.046	0.046
g	-0.27	0.016	0.054
h	-0.28	-0.061	0.016
i	-0.24	-0.060	0.017
j	-0.25	-0.018	0.054
k	-0.22	-0.0014	0.049
l	-0.25	0.074	0.090
m	-0.26	-0.023	0.098
n	-0.25	-0.050	-0.011
o	-0.23	-0.018	0.0065
p	-0.20	-0.032	0.024
q	-0.19	-0.029	0.011
r	-0.21	-0.036	-0.003
s	-0.21	-0.034	0.019
t	-0.22	-0.031	0.018
u	-0.21	-0.040	0.017
v	-0.20	-0.047	-0.010
w	-0.25	0.080	0.088
x	-0.18	0.019	-0.0067
y	-0.22	-0.041	-0.037
z	-0.23	-0.041	-0.023
a1	-0.21	-0.078	0.031
a2	-0.23	-0.078	0.026
a3	-0.23	-0.075	0.024
a6	-0.23	-0.082	0.013
a7	-0.22	-0.092	0.019

(Table S1-1 続き)

AS samples	NMDS Scores		
	NMDS1	NMDS2	NMDS3
b1	-0.14	-0.023	-0.061
b4	-0.15	0.0038	-0.12
b5	-0.15	0.022	-0.13
b6	-0.13	0.035	-0.12
b7	-0.11	0.038	-0.11
b11	-0.059	0.20	-0.064
b12	-0.046	0.23	-0.060
b14	-0.044	0.30	-0.059
b21	0.031	0.20	-0.047
b28	0.15	0.12	-0.083
b35	0.22	0.071	-0.071
b42*	0.18	0.034	-0.14
b49	0.15	-0.027	-0.16
b56*	0.16	-0.016	-0.17
A	0.28	-0.13	0.12
B	0.12	0.092	0.047
C	0.35	-0.15	0.044
D	0.26	-0.14	0.021
E	0.43	0.10	0.22
F	0.41	-0.32	0.067
G	0.087	0.13	0.071
H	0.028	0.21	0.11
I	0.067	0.026	0.019
A7	0.28	-0.15	0.087
A21	0.28	-0.093	0.059
A35	0.28	-0.088	0.085
A56	0.30	0.096	0.030
A77	0.32	0.22	0.0077
A98	0.22	0.13	-0.014
A126	0.074	0.0050	-0.059

(Table S1-1 続き)

AS samples	NMDS Scores		
	NMDS1	NMDS2	NMDS3
B7	0.12	0.22	0.076
B14	0.17	0.26	0.078
B21	0.20	0.23	0.054
B28	0.22	0.10	0.010
B42	0.15	0.40	0.084
B63*	0.20	0.055	-0.15
C7	0.37	-0.19	0.033
C14*	0.37	-0.17	0.020
C28*	0.37	-0.089	0.010
C42*	0.34	-0.0087	-0.079
D14	0.30	-0.18	0.010
D28	0.28	-0.073	0.0076
D49*	0.22	-0.052	-0.052
D70*	0.24	-0.15	-0.066
D91*	0.13	-0.10	-0.22
D168*	0.13	-0.072	-0.18

第 3 章

Table S3-1 補助物質の ThOD 算出方法.

Additives	Complete oxidation reaction	A ^{a)}	B ^{b)}	C ^{c)}	V ^{d)}	ThOD ^{e)}
Tween® 85	$C_{102.7}H_{190.4}O_{29.4} + 271.3O_2 \rightarrow 102.7CO_2 + 95.2H_2O$	271.3	1895	40	900	82
Pluronic® L-31	$C_{60.1}H_{1037}O_{373.8} + 74.8O_2 \rightarrow 60.1CO_2 + 518.5H_2O$	74.8	1100	1164	300	760
Pluronic® L-35	$C_{130.2}H_{1599.6}O_{604.5} + 120.9O_2 \rightarrow 130.2CO_2 + 799.8H_2O$	120.9	1900	1166	300	712
Pluronic® L-61	$C_{109.4}H_{1885.8}O_{679.8} + 136O_2 \rightarrow 109.4CO_2 + 942.9H_2O$	136.0	2000	458	300	299
Pluronic® L-64	$C_{187.7}H_{2516.6}O_{938.3} + 187.7O_2 \rightarrow 187.7CO_2 + 1258.3H_2O$	187.7	2900	1693	300	1052
Pluronic® L-81	$C_{153.1}H_{2639}O_{951.3} + 190.3O_2 \rightarrow 153.1CO_2 + 1319.5H_2O$	190.3	2800	953	300	622
Pluronic® L-121	$C_{269.3}H_{3932.6}O_{1448.3} + 289.7O_2 \rightarrow 269.3CO_2 + 1966.3H_2O$	289.7	4400	188	300	119
Pluronic® F-68	$C_{680.6}H_{6303.8}O_{2507.3} + 501.5O_2 \rightarrow 680.6CO_2 + 3151.9H_2O$	501.5	8400	769	300	441
Pluronic® F-108	$C_{1201.4}H_{10853}O_{4338.8} + 867.8O_2 \rightarrow 1201.4CO_2 + 5426.5H_2O$	867.8	14600	360	300	205
Pluronic® F-127	$C_{919.1}H_{9389}O_{3663.8} + 732.8O_2 \rightarrow 919.1CO_2 + 4694.5H_2O$	732.8	12000	167	300	98
Pluronic® P-105	$C_{685.3}H_{8419.4}O_{3181.8} + 636.4O_2 \rightarrow 685.3CO_2 + 4209.7H_2O$	636.4	10000	111	300	68
Pluronic® P-123	$C_{355.1}H_{5185.8}O_{1909.8} + 382O_2 \rightarrow 355.1CO_2 + 2592.9H_2O$	382.0	5800	100	900	188
Pluronic® P-124	$C_{144.7}H_{1624.6}O_{623.3} + 124.7O_2 \rightarrow 144.7CO_2 + 812.3H_2O$	124.7	2000	164	300	98
Pluronic® 10R5	$C_{137.2}H_{1685.6}O_{637} + 127.4O_2 \rightarrow 137.2CO_2 + 842.8H_2O$	127.4	2000	1169	300	715
Pluronic® 17R4	$C_{195.5}H_{2193.2}O_{841.5} + 168.3O_2 \rightarrow 195.5CO_2 + 1096.6H_2O$	168.3	2700	833	300	499
Pluronic® 31R1	$C_{283.1}H_{2367.8}O_{962.3} + 192.5O_2 \rightarrow 283.1CO_2 + 1183.9H_2O$	192.5	3300	196	300	110
IGEPAL® CO-520	$C_{25}H_{44}O_6 + 33O_2 \rightarrow 25CO_2 + 22H_2O$	33	441	100	300	72
IGEPAL® CO-630	$C_{33}H_{60}O_{10} + 43O_2 \rightarrow 33CO_2 + 30H_2O$	43	617	82.7	300	55
4-nonylphenyl-polyethylene glycol	$C_{55}H_{104}O_{21} + 70.5O_2 \rightarrow 55CO_2 + 52H_2O$	70.5	1101.4	102	300	63
Perfluoropentanoic acid	$C_5HF_9O_2 + 4.25O_2 \rightarrow 5CO_2 + 0.5H_2O + 9F$	4.25	264	500	900	232
Perfluorohexanoic acid	$C_6HF_{11}O_2 + 5.25O_2 \rightarrow 6CO_2 + 0.5H_2O + 11F$	5.25	314	500	300	80
Perfluoroheptanoic acid	$C_7HF_{13}O_2 + 6.25O_2 \rightarrow 7CO_2 + 0.5H_2O + 13F$	6.25	364	500	300	82
Trimethylated α -cyclodextrin	$C_{54}H_{96}O_{30} + 63O_2 \rightarrow 54CO_2 + 48H_2O$	63	1225	375	900	557
Trimethylated β -cyclodextrin	$C_{63}H_{112}O_{35} + 73.5O_2 \rightarrow 63CO_2 + 56H_2O$	73.5	1430	438	900	650
Partially methylated β -cyclodextrin	$C_{54.5}H_{95.0}O_{35} + 60.7O_2 \rightarrow 54.5CO_2 + 47.5H_2O$	60.7	1310	401	900	535
(2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin	$C_{54.7}H_{95.3}O_{39.2} + 58.9O_2 \rightarrow 54.7CO_2 + 47.7H_2O$	58.9	1380	380	900	520
β -cyclodextrin sulfated sodium salt	$C_{42}H_{62.5}O_{75.5}S_{13.5}Na_{13.5} + 36.8O_2 \rightarrow 42CO_2 + 31.3H_2O + 13.5SO_2 + 6.75Na_2O$	36.8	2519	693	900	326
Trimethylated γ -cyclodextrin	$C_{72}H_{128}O_{40} + 84O_2 \rightarrow 72CO_2 + 64H_2O$	84	1634	501	900	743

^{a)} Number of oxygen molecules, ^{b)} average molar mass (g mol⁻¹), ^{c)} concentration (mg L⁻¹), ^{d)} test volume (mL), ^{e)} ThOD (mg) = $MM_{O_2} \times A \times C \times (V_{\text{test volume}} / 1000) / B = 32.0 \text{ (g mol}^{-1}) \times A \times C \text{ (mg L}^{-1}) \times [V \text{ (mL)} / 1000] / B \text{ (g mol}^{-1})$

Table S3-2 OB 分解後の上位 10 科の相対比率 (A) trimethylated α -CD、(B) trimethylated β -CD、(C) trimethylated γ -CD.

(A)									
Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2 α			3 α	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	4.1	49.9	61.9	71.1	4.6	3.4
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Nocardiaceae	0.0	0.0	0.5	0.7	0.1	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Propionibacteriales	Nocardiodiaceae	1.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126_f	0.3	0.9	1.0	0.0	0.8	1.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	2.3	1.7	0.9	1.4	0.5	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	PAC000016_f	2.9	0.2	0.3	0.2	1.4	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	Saccharimonas_f	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(B)									
Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2 β			3 β	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	4.1	35.7	48.3	40.3	3.4	3.4
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Nocardiaceae	0.0	2.5	0.0	0.1	0.0	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Propionibacteriales	Nocardiodiaceae	1.1	0.1	0.0	0.1	0.4	0.3
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126_f	0.3	0.3	0.4	0.8	1.6	1.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0.7	5.3	0.0	1.0	0.0	0.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	2.3	1.4	1.0	0.8	0.6	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	PAC000016_f	2.9	0.3	0.4	0.1	1.6	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	Saccharimonas_f	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(C)									
Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2 γ			3 γ	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	4.1	37.3	3.0	25.6	4.5	3.4
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Nocardiaceae	0.0	0.7	12.0	7.9	0.4	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Propionibacteriales	Nocardiodiaceae	1.1	0.1	0.1	0.1	0.7	0.3
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126_f	0.3	0.5	1.0	0.1	0.8	1.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0.7	0.1	25.1	0.7	0.1	0.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	2.3	3.7	2.1	1.6	1.5	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	PAC000016_f	2.9	0.3	0.1	0.3	1.4	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	Saccharimonas_f	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0

rep.: replicate

Table S3-3 AQ 分解後の上位 10 科の相対比率 (A) AQ のみ、 (B) trimethylated α -CD、 (C) trimethylated β -CD、 (D) trimethylated γ -CD.

(A)									
Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	1				Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	4.1	35.0	29.1	31.4		3.4
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Nocardiaceae	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	1.1	0.4	14.1	0.4		0.3
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	0.1	0.0	0.1	0.2		0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	0.0	0.2	0.1	0.9		0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126_f	0.3	6.0	2.9	5.0		1.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0.7	3.4	0.8	9.1		0.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	2.3	1.0	0.8	0.8		0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	PAC000016_f	2.9	0.0	0.1	0.1		0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	Saccharimonas_f	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0

(B)									
Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2 α			3 α	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	4.1	4.4	24.3	4.6	4.6	3.4
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Nocardiaceae	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	1.1	1.0	0.4	4.5	0.1	0.3
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	0.1	0.1	0.2	0.2	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126_f	0.3	1.4	1.6	1.4	0.8	1.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0.7	0.2	0.3	0.3	0.0	0.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	2.3	3.0	2.7	2.0	0.5	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	PAC000016_f	2.9	1.0	0.6	0.7	1.4	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	Saccharimonas_f	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(C)									
Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2 β			3 β	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	4.1	5.7	4.7	48.3	3.4	3.4
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Nocardiaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	1.1	0.2	0.8	0.3	0.4	0.3
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	0.1	0.3	0.6	0.1	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	0.0	1.6	0.5	10.9	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126_f	0.3	2.0	4.1	1.4	1.6	1.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0.7	20.8	2.7	0.0	0.0	0.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	2.3	7.6	10.3	1.3	0.6	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	PAC000016_f	2.9	0.4	0.6	0.2	1.6	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	Saccharimonas_f	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(D)									
Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2 γ			3 γ	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	4.1	11.2	6.5	3.0	4.5	3.4
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Corynebacteriales	Nocardiaceae	0.0	0.0	0.1	0.0	0.4	0.0
Actinobacteria	Actinobacteria_c	Propionibacteriales	Nocardioidaceae	1.1	0.8	3.1	0.3	0.7	0.3
Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	PAC002126_f	0.3	0.7	1.6	0.9	0.8	1.9
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	0.7	2.8	3.8	10.8	0.1	0.1
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	2.3	4.2	2.5	13.4	1.5	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	PAC000016_f	2.9	0.8	1.6	0.7	1.4	0.9
Saccharibacteria_TM7	Saccharimonas_c	Saccharimonas_o	Saccharimonas_f	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

rep.: replicate

Table S3-5 OB 分解後の上位 10 科の相対比率 (A) Tween® 85、(B) Pluronic® P-123、(C) PFPA.

(A)

Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2t			3t	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	4.7	13.3	11.7	16.5	3.5	3.4
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardioidaceae</i>	1.1	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.2	0.7	2.6	0.8	2.8	3.2
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	0.1	0.1	0.0	0.2	0.4	0.2
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	2.8	9.8	1.1	0.0	0.3	0.1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	2.6	1.9	0.9	4.4	1.0	2.0
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	0.3	0.4	0.3	0.4	0.5	0.1
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(B)

Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2p			3p	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	4.7	33.5	36.5	0.9	2.7	3.4
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardioidaceae</i>	1.1	0.0	0.0	0.0	0.4	0.1
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.2	0.0	0.1	0.3	1.5	3.2
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	0.1	1.4	1.2	0.8	0.1	0.2
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	2.8	11.6	9.9	43.0	22.5	0.1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	2.6	2.6	2.0	1.2	1.9	2.0
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	0.3	1.0	0.3	0.2	1.0	0.1
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(C)

Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2pf			3pf	Control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	4.7	8.5	28.7	21.7	3.2	3.4
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.0	34.6	0.3	0.3	0.0	0.0
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardioidaceae</i>	1.1	0.0	0.0	0.1	0.4	0.1
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.2	0.1	0.4	0.1	4.7	3.2
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	0.1	0.4	2.2	0.6	0.3	0.2
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	2.8	0.4	1.1	4.5	0.1	0.1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	2.6	9.4	8.3	7.5	1.1	2.0
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	0.3	0.1	0.3	0.1	0.2	0.1
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.0	0.0	0.0	5.5	0.0	0.0

rep.: replicate

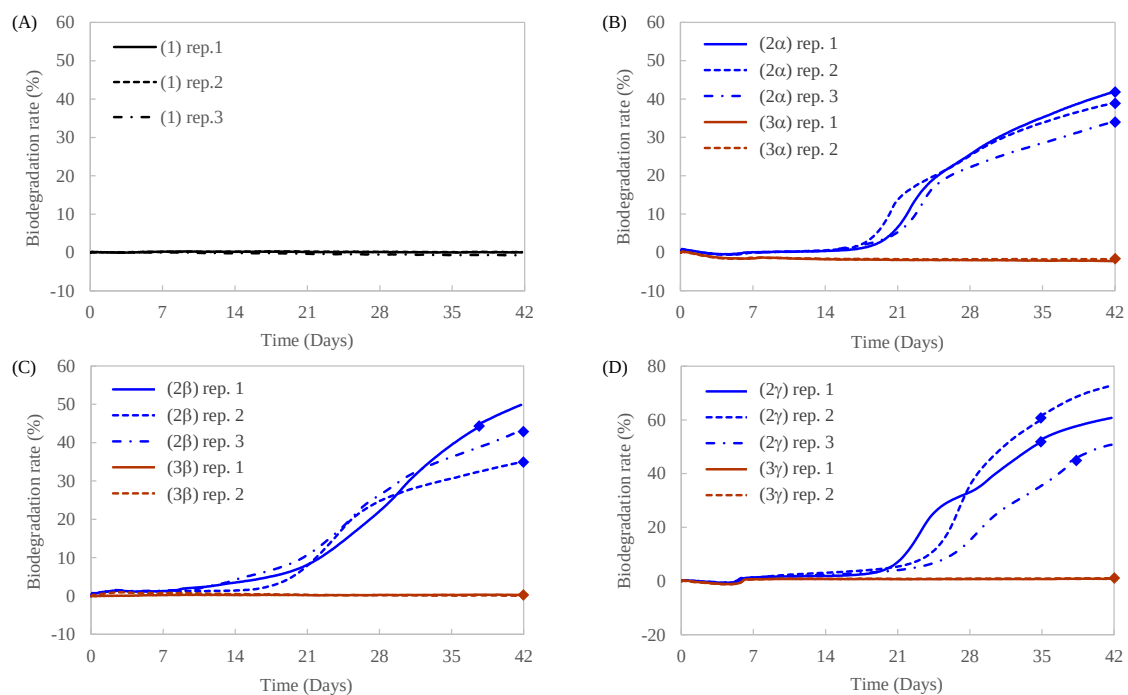


Fig. S3-1 OB および trimethylated α 、 β 、 γ -CD を用いたときの OB の分解度曲線と汚泥の採取時点 (◆) .

(A) 試験区、(B) 試験区 + trimethylated α -CD、(C) 試験区 + trimethylated β -CD、(D) 試験区 + trimethylated γ -CD

rep.: replicate

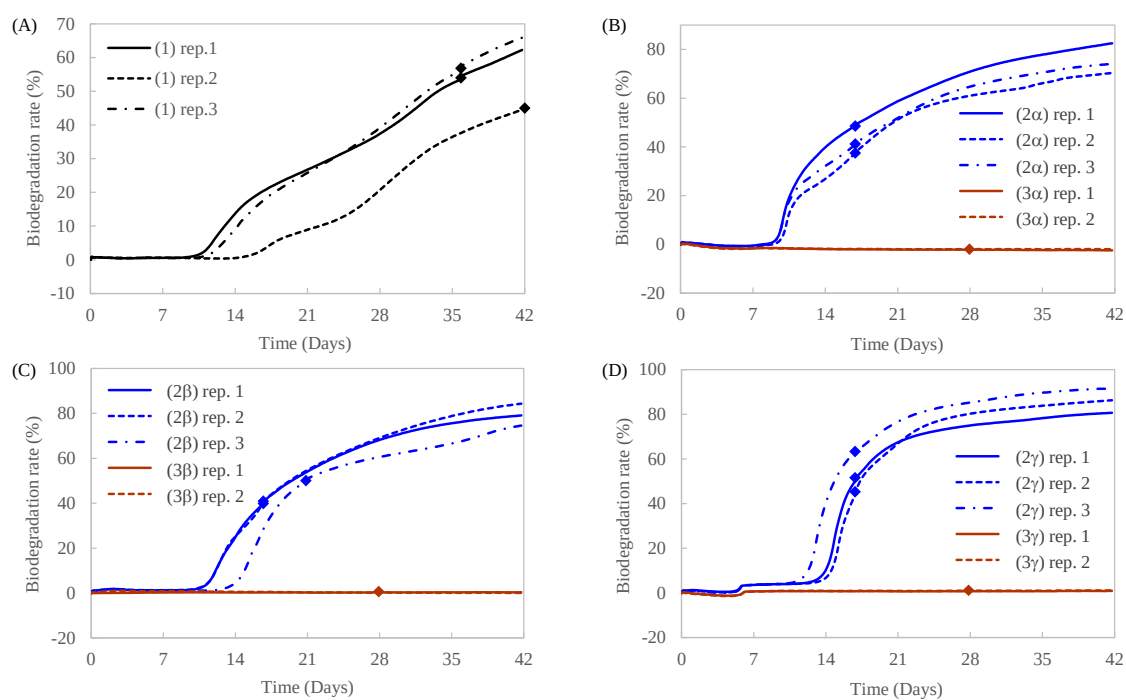


Fig. S3-2 AQ および trimethylated α 、 β 、 γ -CD を用いたときの AQ の分解度曲線と汚泥の採取時点 (◆)。

(A) 試験区、(B) 試験区 + trimethylated α -CD、(C) 試験区 + trimethylated β -CD、(D) 試験区 + trimethylated γ -CD

rep.: replicate

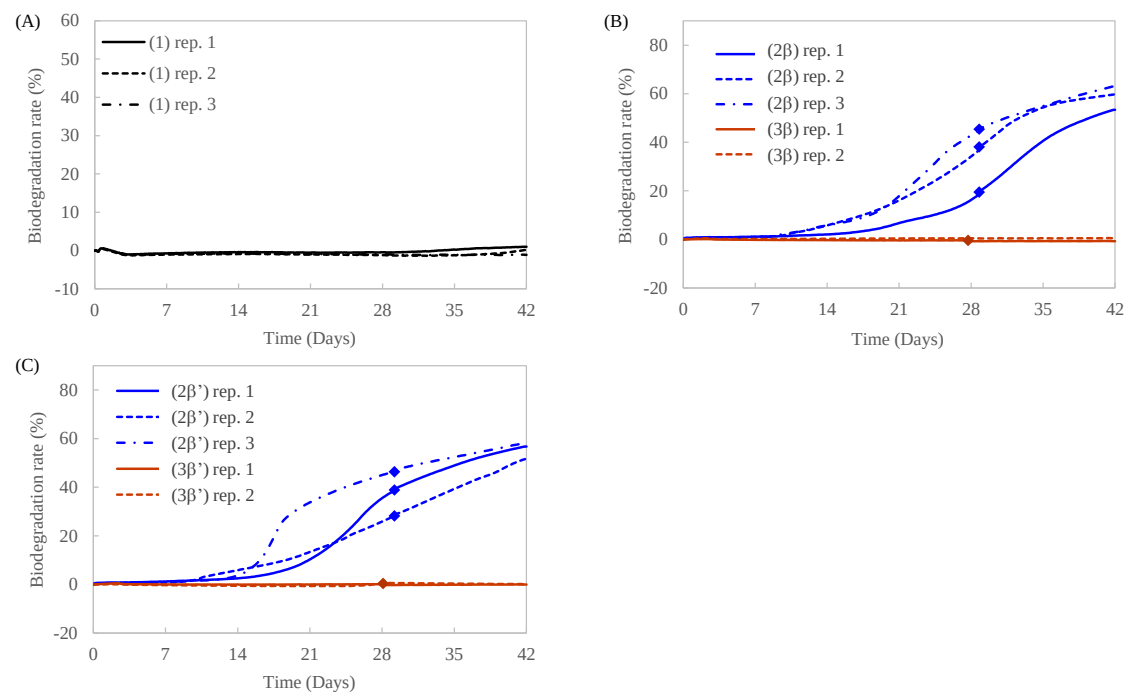


Fig S3-3 OB および trimethylated β -、partially methylated β -CD を用いたときの OB の分解度曲線と汚泥の採取時点 (◆) .

(A) 試験区、(B) 試験区 + trimethylated β -CD、(C) 試験区 + partially methylated β -CD
rep.: replicate

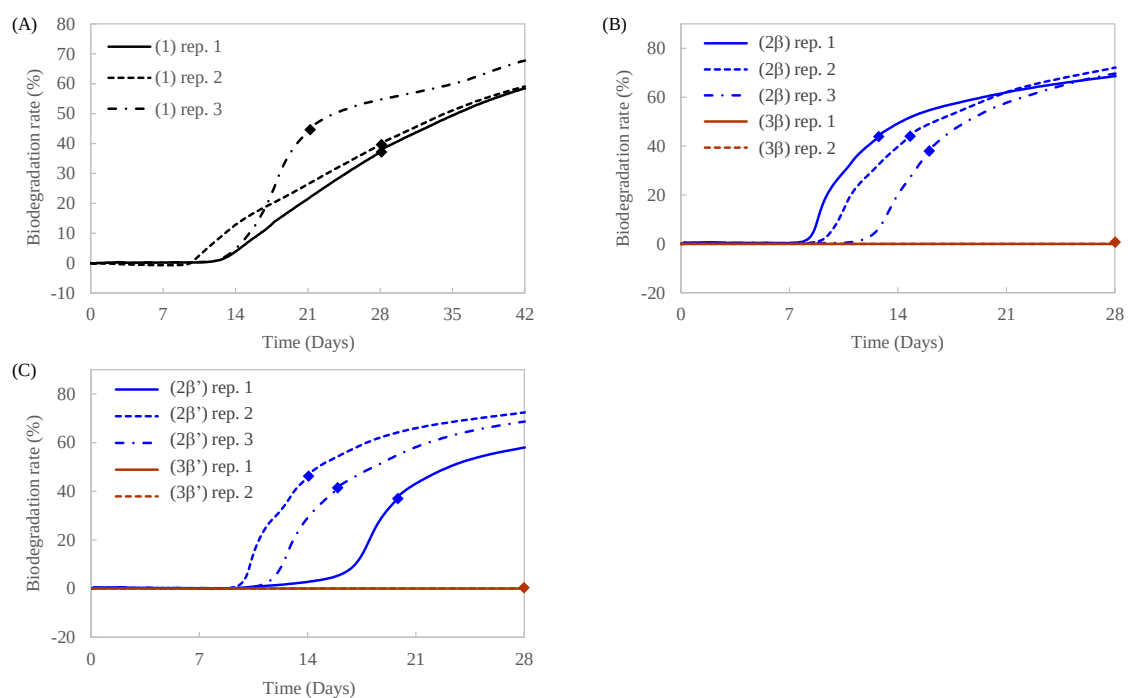


Fig S3-4 AQ および trimethylated β -、partially methylated β -CD を用いたときの AQ の分解度曲線と汚泥の採取時点 (◆) .

(A) 試験区、(B) 試験区 + trimethylated β -CD、(C) 試験区 + partially methylated β -CD
rep.: replicate

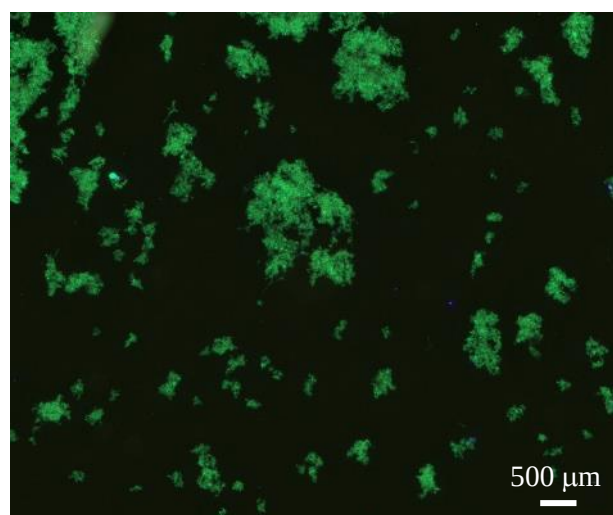


Fig. S3-5 Fig. 3-5D と同じ画角で低倍率の画像.

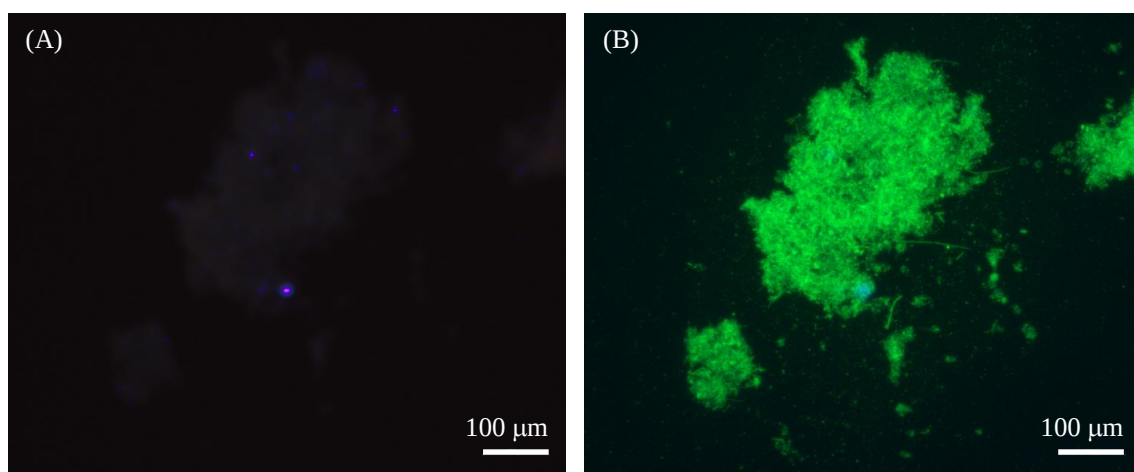


Fig. S3-6 CD を添加しなかった場合の anthracene (青) および活性汚泥 (緑) .

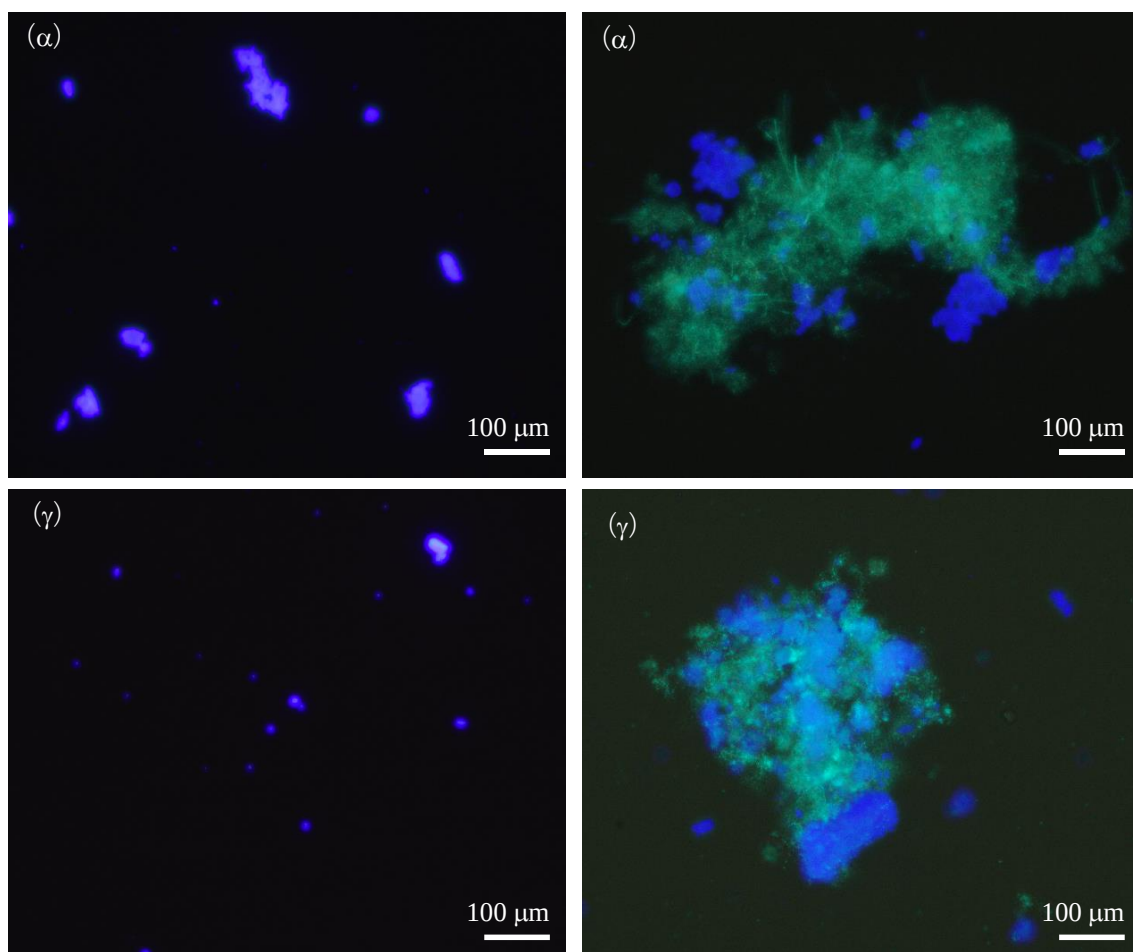


Fig. S3-7 Trimethylated α -および γ -CD で分散された anthracene(青)および活性汚泥(緑).
 左側：各 CD と anthracene のみ、右側：各 CD と anthracene と活性汚泥 5 日間培養

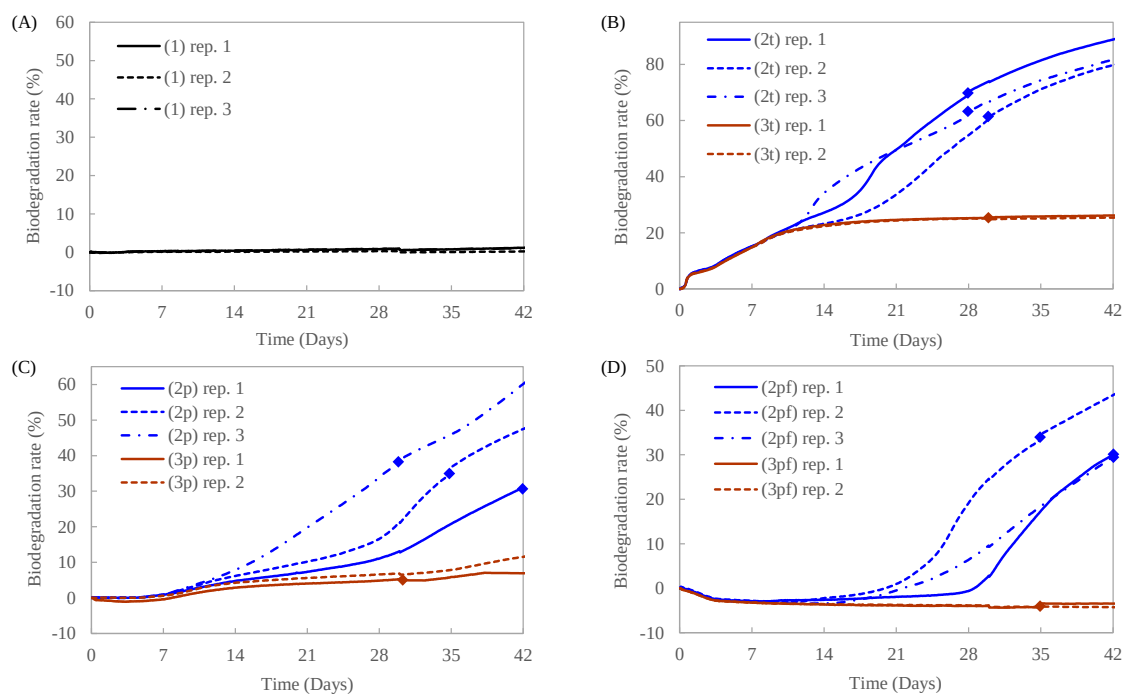


Fig. S3-9 OB および OB を Tween® 85、Pluronic® P-123、PFPA で分散させたときの分解度曲線と汚泥の採取時点 (◆) .

(A) 試験区、(B) 試験区 + trimethylated β -CD、(C) 試験区 + partially methylated β -CD
rep.: replicate

第 4 章

Table S4-1 OB 分解後の上位 10 科の相対比率（「試験区」および「試験区」+ アセトン）.

Taxonomy				Relative abundance (%)						
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	1		2a		3a	control
					rep. 1	rep. 2	rep. 1	rep. 2		
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	5.0	2.8	25.7	13.6	11.4	2.6	6.9
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.0	1.9	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardiodiaceae</i>	0.2	1.6	0.8	0.3	0.4	2.1	0.2
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.3	3.5	0.2	0.7	3.8	2.2	0.7
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	1.8	1.6	0.6	1.3	0.7	1.0	1.5
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	0.1	0.3	1.0	2.8	0.1	0.0	0.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	2.5	0.4	5.3	3.0	18.9	0.3	0.1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	2.1	1.9	1.0	3.3	18.2	1.5	1.3
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	0.3	0.8	0.0	0.5	0.5	0.7	1.2
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.0	0.0	25.5	33.8	0.0	0.0	0.0

rep.: replicate

Table S4-2 OB 分解後の上位 10 科の相対比率（「試験区」+ クロロホルム）.

Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2c			3c	control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	2.5	17.5	37.9	28.0	0.9	2.7
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardiodiaceae</i>	0.1	0.3	0.2	0.2	17.9	4.5
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.2	0.8	1.9	0.6	2.4	1.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	2.2	4.0	1.0	1.8	1.0	0.9
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	0.2	11.3	0.6	11.8	1.3	0.3
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	2.8	8.4	4.9	2.1	0.4	0.1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	2.4	5.3	1.4	1.1	4.7	1.1
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	1.9	1.2	2.2	2.9	0.5	0.4
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.1	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0

rep.: replicate

Table S4-3 OB 分解後の上位 10 科の相対比率（「試験区」+ *n*-ヘキサン）.

Taxonomy				Relative abundance (%)					
Phylum	Class	Order	Family	Day 0	2h			3h	control
					rep. 1	rep. 2	rep. 3		
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Mycobacteriaceae</i>	2.5	3.0	8.2	18.8	1.8	2.7
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	0.0	14.4	4.0	0.0	0.0	0.1
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria_c</i>	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Nocardiodiaceae</i>	0.1	0.1	0.2	0.1	1.3	4.5
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.2	0.3	0.5	0.9	1.7	1.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Beijerinckiaceae</i>	2.2	10.6	4.8	1.1	0.8	0.9
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>PAC002126_f</i>	0.2	4.7	5.1	8.2	0.5	0.3
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	2.8	5.5	4.4	6.2	0.7	0.1
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Comamonadaceae</i>	2.4	3.4	3.9	1.6	1.7	1.1
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>PAC000016_f</i>	1.9	6.2	4.5	12.8	1.3	0.4
<i>Saccharibacteria_TM7</i>	<i>Saccharimonas_c</i>	<i>Saccharimonas_o</i>	<i>Saccharimonas_f</i>	0.1	16.7	33.4	0.1	0.0	0.0

rep.: replicate

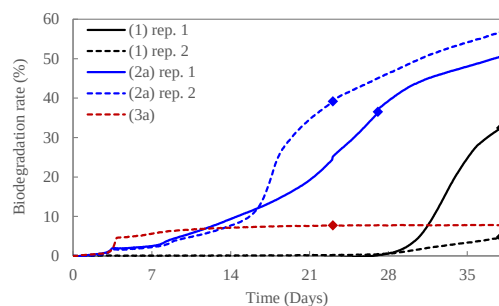


Fig. S4-1 OB およびアセトンを吸着溶媒としてシリカゲルに吸着させたときの OB の分解度曲線と汚泥の採取時点 (◆) .

rep.: replicate

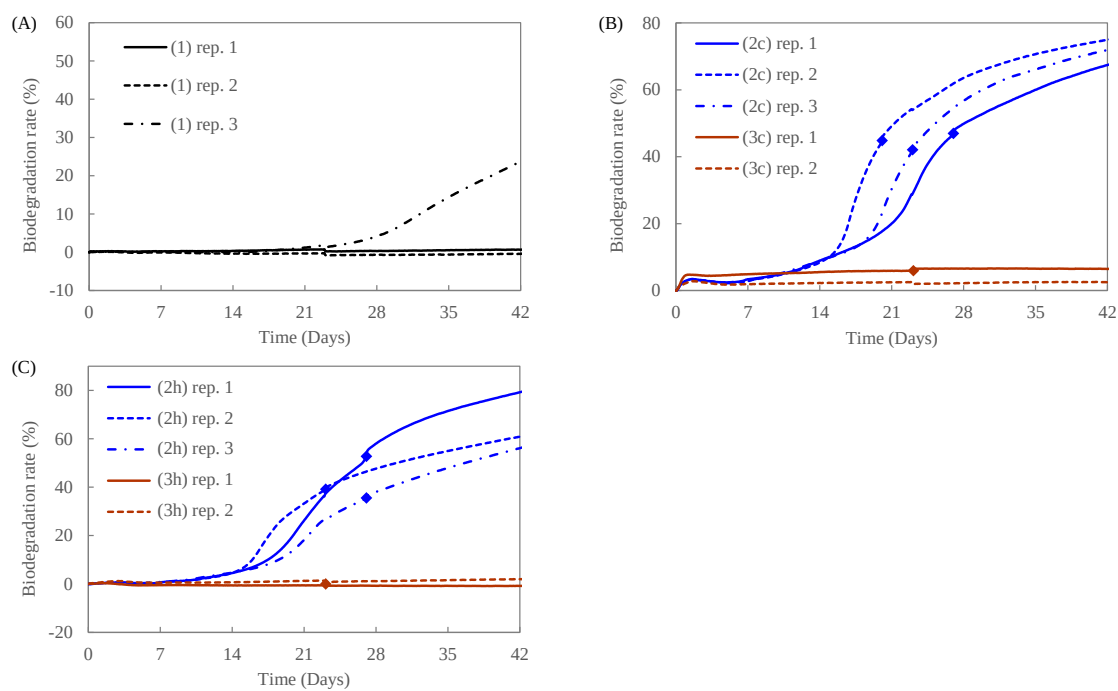


Fig. S4-2 OB (A) およびクロロホルム(B)または n-ヘキサン(C)を吸着溶媒としてシリカゲルに吸着させたときの OB の分解度曲線と汚泥の採取時点 (◆) .

rep.: replicate