

ベンゼン分解菌 DN11 株の培養条件によるベンゼン分解能の影響

大成建設株式会社 正会員 ○伊藤 雅子
大成建設株式会社 正会員 高畑 陽
中央大学 理工学部 笠井 由紀

1. はじめに

ベンゼン分解菌 DN11 株¹⁾は、嫌気条件下でベンゼンを分解することが可能であり、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の適合菌株である²⁾。DN11 株を用いてベンゼン汚染地下水のバイオオーグメンテーションを行うには、DN11 株を現地で培養し、そのまま注入水に希釈して供給する方法が安価でかつ効率的である。しかしながら、DN11 株の培養条件による浄化効果については知見が得られていない。本報では、DN11 株を高濃度で培養でき、その培養液を直接希釈して汚染地下水に供給した場合にベンゼンの高い浄化効果が得られる培養条件について、室内試験により検討した。

2. 実汚染地下水に DN11 株を添加したバッチ試験

2.1 試験方法

試験には、ガソリンスタンドの実汚染地下水（表-1）をポンプで汲み上げて直接採取・密閉したバイアル瓶（120mL）を用いた。バイアル瓶は試験室に輸送後、嫌気グローブボックス内で開栓し、ベンゼン濃縮液（300mg/L）を各バイアル瓶に 1.0ml 添加して再び密栓した。DN11 株は、表-2 に示す 4 種類の培地を用いて 30℃の恒温装置内で 5 日間、静置培養を行った。各培地で培養した後の DN11 株の培養液（Bioaugmentation 1：AU1 条件）、培養液を 0.85%の生理食塩水を用いて DN11 株を濃縮・洗浄した菌液（Bioaugmentation 2：AU2 条件）、培養液の濾過液（Biostimulation：ST 条件）をベンゼン分注済みのバイアル瓶に各 1.0ml ずつ添加した。各条件にバイアル瓶を 3 本作成し、1 本は培養開始時に、2 本は 30℃で 7 日間培養後にベンゼン濃度（GC-MS）、および全菌数（アクリジンオレンジ染色法）を測定した。

表-1 汚染サイト地下水の性状

測定項目	単位	測定値
pH	—	6.8
酸化還元電位 (ORP)	mV	-86
溶存酸素 (DO)	mg/L	1.7
全有機炭素濃度 (TOC)	mg/L	2.4
全無機炭素濃度 (IC)	mg/L	32.8
塩化物イオン濃度	mg/L	13.4
硫酸イオン濃度	mg/L	27.7
硝酸性窒素濃度	mg/L	<0.1
亜硝酸性窒素濃度	mg/L	<0.1
アンモニア性窒素濃度	mg/L	0.4
オルトリン酸濃度	mg/L	0.02
二価鉄濃度	mg/L	5.0
全鉄濃度	mg/L	16.3
全菌数	cells/ml	6.0 × 10 ⁴
ベンゼン	mg/L	0.011

表-2 DN11 株の増殖培地と培養後の全菌

培地	培地組成	全菌数 (cells/ml)
CGY	カントン:1g/L、グリセリン:1g/L、酵母エキス:0.2g/L	4.9 × 10 ⁷
Benzo	ホルヘプトン:2g/L、安息香酸Na:0.6g/L、硝酸ナトリウム:1g/L、ミネラル等	1.9 × 10 ⁸
TMB ³⁾	酵母エキス自己消化物:0.2g/L	1.4 × 10 ⁸
NB	Nutrient broth:8g/L	1.2 × 10 ⁸

2.2 試験結果

無添加条件ではベンゼンの分解が殆ど見られなかったのに対して、ST 条件では 5%～30%のベンゼン分解が確認された（図 1）。全菌数も約 2 オーダー増加していたことから、本地下水にはベンゼンを分解できる在来菌が存在していたものと推測された。一方、DN11 株を添加した AU1 条件では、CGY 培地で 75%、TMB 培地で 90%のベンゼンが分解し、ST 条件より浄化効果が高まることが確認されたが、Benzo 培地および NB 培地のベンゼンの分解率は ST 条件とほぼ同等であり、DN11 株の導入効果がみられなかった。AU2 条件では、各培地とも ST 条件と比較してベンゼンの分解効果がほぼ同様に高まったことから、DN11 株と共に導入される培地成分によって DN11 株のベンゼン分解効果が促進したり阻害したりする可能性があることが明らかとなった。

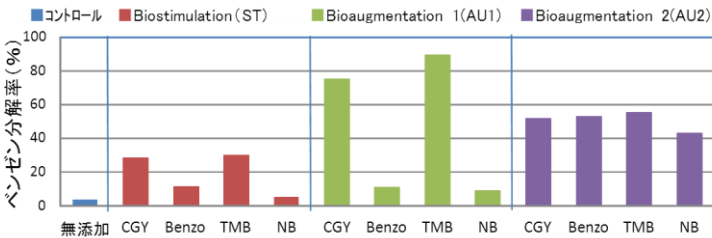


図-1 ベンゼン分解率（培養 7 日後）の比較

DN11 株 (ST 条件は濾過液) を各培地に導入した際の培地成分に由来する有機物量 (TOC) の増加量を図-2 に示す。この結果, AU1 条件でベンゼン分解率が低かった NB 培地においては DN11 株導入時に有機物増加量が多くなっており, ベンゼン分解率が高かった TMB 培地においては有機物増加量が少ない傾向を示した。そのため, DN11 株の導入により培地中の有機物濃度が増加するとベンゼン分解を阻害する可能性があると考えられたが, 有機物増加量がほぼ同等である Benzo 培地と CGY 培地では AU1 条件でベンゼン分解率に大きな差が認められ, 培地成分に起因する阻害の可能性も示唆された。

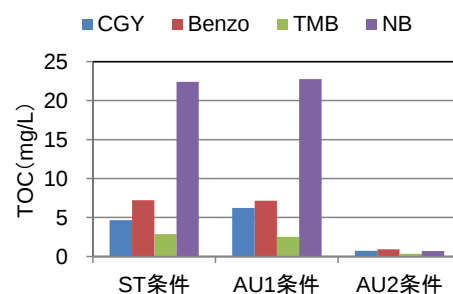


図-2 DN11 株導入時の TOC 増加量

3. 培地成分による DN11 株のベンゼン分解の影響

3.1 試験方法

CGY 培地および Benzo 培地で培養した DN11 株のバイオオーグメンテーション効果を詳細に検討するため, 人工嫌気培地を用いたバッチ培養試験を実施した。ミネラル培地 50ml (バイアル瓶 70ml: 気相は純酸素置換) にベンゼン 3mg/L と各培地で使用した有機物を 5mg/L, 又は 50mg/L 添加し, ベンゼン分解速度を比較した。DN11 株は, Benzo 培地と CGY 培地で前培養し, 0.85% の生理食塩水を用いて洗浄・濃縮した菌液として添加した。本試験では, バイアル瓶のヘッドスペースガスを 0.4ml 採取し, GC-FID を用いて経時的にベンゼン濃度を測定した。

3.2 試験結果

試験の結果を図-3 に示す。有機物を添加しない条件の半減期は CGY 培地及び Benzo 培地共にほぼ同様であり, DN11 株を培養後に洗浄・濃縮して有機物を除去すれば前培養する培地の種類によって DN11 株の分解効果に差が生じないことが示された。前節の AU1 条件でベンゼン分解率が高かった CGY 培地および TMB 培地は, 有機物の導入量が増加してもベンゼンの分解速度に大きな変化はみられなかった。一方, NB 培地は有機物濃度が 5mg/L から 50mg/L に増加すると半減期が 2 倍以上大きくなり, 分解速度が明確に低下することが確認された。更に, 安息香酸ナトリウムを添加した条件では, 有機物濃度が 5mg/L と低い条件においても, 他の培地成分と比較して分解速度が著しく低下することが明らかとなった。

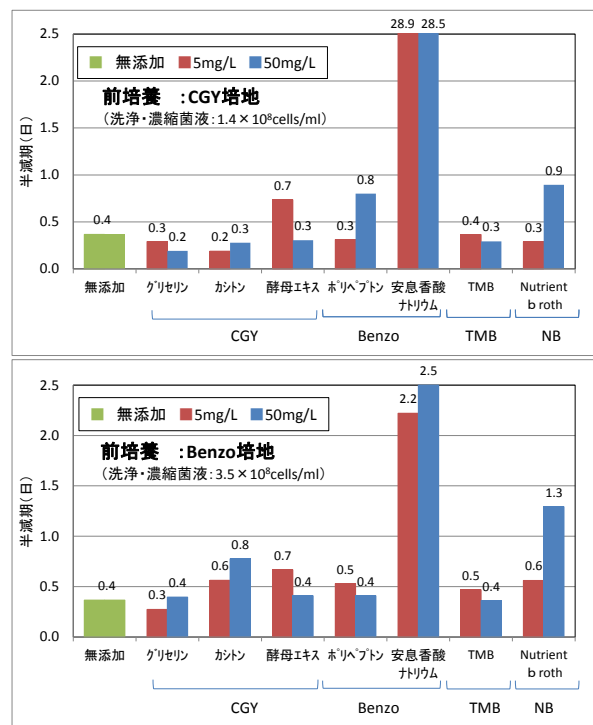


図-3 有機物によるベンゼン分解の影響
(上: 前培養 CGY 培地) 下: 前培養 Benzo 培地)

4. まとめ

- ・ 培養後に培地成分を除去した DN11 株をベンゼン汚染地下水に導入すれば, 地下水中のベンゼンを安定して浄化できることが示された。
- ・ 培養後に培地成分を含む DN11 株をベンゼン汚染地下水に導入する場合は, ベンゼン分解の阻害要因となる培地成分 (安息香酸) を使用しないことや, 使用する培地に応じて DN11 株導入時の地下水中の有機物濃度を管理することが重要であると考えられた。

参考文献

- 1) Yuki Kasai, et. al., (2006) Appl. Environ. Microbiol. 72:3586-3592.
- 2) <http://www.env.go.jp/air/tech/bio/05.html>
- 3) 伊藤雅子ら (2011) 第 66 回土木学会年次学術講演会, VII部門, pp351-352.