

光照射が炭化水素分解菌に及ぼす影響解析

株式会社熊谷組 正会員 ○佐々木 静郎 正会員 村上 順也
同 上 正会員 土路生修三 正会員 門倉 伸行
立命館大学 松宮 芳樹 久保 幹

1. 目的

近年、油汚染土壌の浄化対策として適用事例が増えているバイオレメディエーション技術は、低環境負荷・低コストという特徴を有しているが、浄化時間が長い、投与微生物の挙動を把握しておく必要がある^{1), 2)}などの問題点が指摘されており、実用化のためには更なる効率化が求められている。筆者らは、炭化水素分解菌に発光ダイオード(LED)を照射し、模擬汚染土壌を対象とした処理実験を行った結果、油分分解が促進されることを確認している³⁾。本報では、炭化水素分解に適した光照射条件について検討した結果を報告する。

2. 実験概要

2.1 供試菌株

試験に用いた炭化水素分解菌 *Rhodococcus* sp. NDKK6 株は、大きさが 1-3 μ m 程度の好気性グラム陽性菌であり、桿状・球状の両形態をとる。長鎖環状アルカンを炭素源として生育し、土壌中、河川・湖沼、家畜糞などの自然界に普遍的に存在している微生物である。

2.2 実験方法

実験は、菌体当たりの炭化水素分解活性が向上する光照射条件の定量的な把握を行うために、まず、培養中に光照射した場合の炭化水素濃度を解析し、光の照射時間及び強度の比較検討を行った(実験Ⅰ)。次に、培養後に光照射した場合にも同様の炭化水素分解の促進効果が認められるかを解析した(実験Ⅱ)。

炭化水素の分解は、休止菌体反応により評価を行った。すなわち、培養中もしくは培養後に光照射した菌体について菌数が $0.5 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^8$ cells/ml となるように調整し、これに基質としてテトラデカン 2%(V/V)を加えて 30℃、2 時間、ボルテックスで強撹拌した。反応終了後、クロロホルム・メタノール混合溶液を用いて抽出した後、残存油分濃度(残存炭化水素濃度)について GC-FID で分析・定量した。

3. 結果及び考察

3.1 光の照射時間と炭化水素分解の関係

表 1 に培養中に光照射したときの照射時間と炭化水素分解との関係を示す。ここで、照射する光の波長は 400nm, 770nm, 940nm の 3 種類とし、照射時間を 12h, 24h, 36h の 3 段階に変化させた。

菌体当たりの炭化水素分解量は、光なしの場合における菌体当たりの分解量を 100 としたときの相対値で比較した。表 1 から、照射時間が 12h 及び 24h では同程度もしくは低い結果であったが、照射時間が 36h では、いずれの波長においても分解量は増加し、特に、940nm の光を 36 時間照射する条件が、最も炭化水素分解を促進させることが判明した。

【評価方法】

休止菌体反応

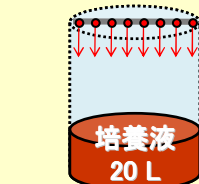
菌数: $0.5 \times 10^8 \sim 1.2 \times 10^8$ cells/ml
基質: テトラデカン
反応: 強撹拌、30℃、2 h

GC-FIDによる分解解析

図 1 実験Ⅰの概要

ジャーファメンター
で培養

培養液 20 L を 50 L 容
大型撹拌槽に移して
光照射 ($87,000 \mu\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2$)



休止菌体反応により
炭化水素分解を評価

図 2 実験Ⅱの概要係

キーワード 炭化水素, *Rhodococcus*, バイオレメディエーション, LED, 汚染土壌

連絡先 〒300-2651 茨城県つくば市鬼ヶ窪 1043 株式会社熊谷組 技術研究所 TEL 029-847-7505

3.2 光の強度と炭化水素分解の関係

次に、炭化水素分解に適した光の照射強度の検討を行った。照射波長及び照射時間は上述の実験で良好な結果が得られた、940nm、36時間とし、光強度を0.67、6.24、57.80 $\mu\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2/\text{s}$ の3段階に変化させた。

図3に光強度と炭化水素分解との関係を示す。光強度が0.67 $\mu\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2/\text{s}$ のときに、テトラデカン残存率は最も低い値を示した。すなわち、本菌株では積算照射量が0.09 $\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2$ となるように波長940nmの光を照射する条件が、最も分解促進に効果があると考えられる。

3.3 培養後に光照射した場合の影響解析

図4に、培養後に光を照射した場合において炭化水素分解が促進されるかを検討した結果を示す。実験は、NDKK6株の培養液20Lを大型攪拌槽に移し、槽上部から光を照射しながら(940nm, 0.09 $\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2$) 攪拌した後、休止菌体反応により炭化水素分解能を評価した。基質にはノルマルアルカンとしてテトラデカン、シクロアルカンとしてヘキサシクロヘキサンを使用した。図から、培養後の菌体においても光を照射することにより、炭化水素の分解が促進された。また、ノルマルアルカンだけでなくシクロアルカンに対しても分解の促進が見られた。

4. まとめ

石油分解菌による炭化水素分解に適した光照射条件を明らかにするために、休止菌体反応による評価を行った。その結果、培養中・培養後のいずれにおいても特定波長の光を照射することにより、炭化水素分解活性は変化すること、使用した菌株に対しては波長940nm、光強度0.67 $\mu\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2/\text{s}$ の光を36時間照射した場合に炭化水素分解が約8%促進されたこと、炭化水素分解を促進させるために、積算照射量のコントロールが重要であることが示唆された。今後は実汚染土壌に対しての適用性について検証していく予定である。

謝辞：本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構「大学発事業創出実用化研究開発事業」の補助を受けて実施された一部をとりまとめたものである。

参考文献

- 1) 佐々木静郎，久保幹，他：石油分解菌 *Gordonia* sp. NDKY76A 株が土壤微生物に及ぼす影響評価試験，土木学会第65回年次学術講演会講演概要集，VII-187，373-354，2010
- 2) 佐々木静郎，久保幹，他：石油汚染土壌のバイオレメディエーションにおける利用微生物の挙動特性，第16回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集，524-527，2010
- 3) 佐々木静郎，久保幹，他：光照射によるバイオレメディエーション効率の向上に関する検討，土木学会第66回年次学術講演会講演概要集，VII-178，355-356，2011

表1 照射時間と炭化水素分解との関係

波長 (nm)	光強度 ($\mu\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2/\text{s}$)	照射時間 (h)	積算照射量 ($\mu\text{W}/\text{nm}/\text{cm}^2$)	菌体あたりの 分解量の相対値
光なし	—	—	—	100
400	7.4	12	320,000	98.9
		24	640,000	96.8
		36	960,000	101.9
770	1.5	12	65,000	99.6
		24	130,000	96.2
		36	195,000	104.6
940	0.67	12	29,000	101.1
		24	58,000	98.8
		36	87,000	108.5

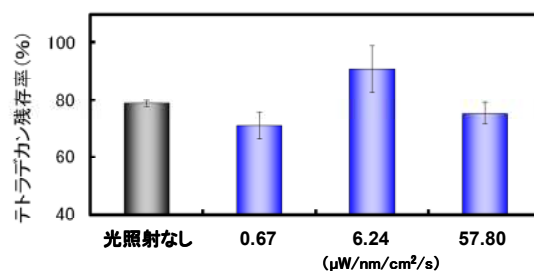


図3 光強度と炭化水素分解との関係

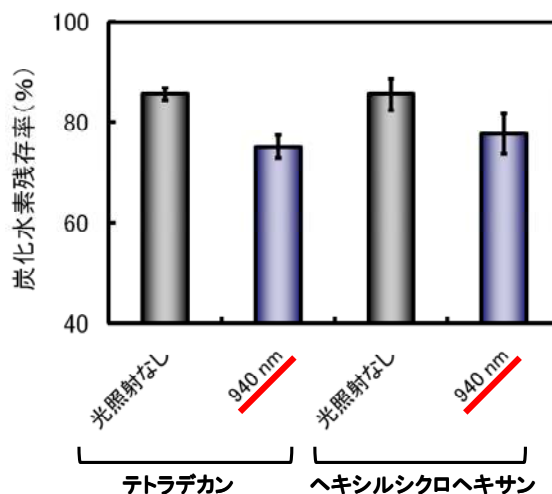


図4 培養後の光照射における炭化水素分解