

原位置微生物機能を活用した有害金属の固定化方法の検討(その1) ウレアーゼ活性試験

(株) 竹中工務店 技術研究所 正会員 ○奥田 信康
 (株) 竹中土木 技術・生産本部 正会員 田邊 康太
 富山県立大学 正会員 畠 俊郎

1. はじめに

2011年3月11日の東北地方太平洋沖地震で発生した津波により、約1000万tの津波堆積物が発生した。これらは、処理後に沈下地盤の埋立や堤防修復等における地盤材料として有効利用される計画である。しかし、津波堆積物の一部には砒素等の有害金属が含まれるため、再利用時には処理が必要となる。

そこで、ウレアーゼ産出能を持つ微生物を活用した有害金属の固定化方法に着目し、最終的には原位置に生息する微生物の中からウレアーゼ産出能を持つ微生物群を活性化させ、そこに必要最小限の尿素やカルシウム塩等を添加することで、有害金属の固定化(地下水への溶出抑制)の達成を目標として検討を行った。

本報では、ウレアーゼ産出能微生物のウレアーゼ活性の発現状況を把握するために、室内試験にて尿素分解試験およびカルシウム消費率試験を実施し、培養開始後のウレアーゼ活性の変化を確認した結果を示す。

なお、本研究は、独立行政法人科学技術振興機構の復興促進プログラム(マッチング促進)「原位置微生物機能を活用した有害津波堆積物の地盤構造物への有効活用」の一部として実施したものである。

2. 試験方法

2.1 用いた材料

ウレアーゼ産出能微生物：*Bacillus pasteurii* (最適pH9, ATCC11859)、尿素・塩化カルシウム・培地用試薬、和光純薬等の研究用試薬、市販ウレアーゼ(ナタ豆製)：純正化学株式会社を使用

2.2 培養方法

培養にはATCCの1376 *Bacillus pasteurii* NH₄-YE培地(Yeast Extract 20g, (NH₄)₂SO₄ 10g, 0.13M Tris buffer (pH=9.0) 1L)を用いた。滅菌した500ml容量ガラス瓶に蒸気圧滅菌後のNH₄-YE培地300mlを入れ、継体培養したマスタープレートから白金耳で菌体をすくい取

って添加し、30℃恒温・静置条件で培養した。その中から、所定時間ごとに培養液の一部を採取し、尿素分解試験およびカルシウム消費率試験に用いた。

2.3 尿素分解試験

ウレアーゼは、尿素をアンモニアと炭酸イオンに加水分解し、電気伝導度を上昇させる。微生物によるウレアーゼ活性を評価するために、加水分解による電気伝導度の上昇速度を計測した。試験の手順は、尿素1.5 mol/L水溶液40 mlに菌体培養液10 mlを加え、スターラーにて120 rpmで攪拌し、電気伝導度計(Milwaukee製,C66型)にて2分ごとの電気伝導度を測定し、培養時間ごとのEC変化率(mS/cm/min)を求めた¹⁾。また、菌体培養液の代わりに、市販のウレアーゼを添加し、微生物由来のウレアーゼと市販のウレアーゼの比較を行った。

2.4 カルシウム消費率試験

尿素およびCaCl₂の濃度を0.15 mol/L、0.30 mol/Lの固化溶液(培地組成：尿素およびCaCl₂ 0.15 or 0.30 mol/L, Nutrient Broth 3.0g/L, NH₄Cl 10g/L, NaHCO₃ 2.12g/L)に培養開始7日後の菌体培養液を容量比20%, 2%, 0.2%, 0% (菌体なし)の4条件で添加し、カルシウム消費率の評価を行った。20℃恒温・静置条件にて24, 48, 144時間経過後に採水し、0.45 μmメンブレンフィルターでろ過後の溶存したカルシウム濃度を測定し、初期濃度からの減少比率を求め、これを反応によるカルシウム消費率とみなした。

3. 試験結果

3.1 尿素分解速度

市販のウレアーゼ酵素の濃度とEC変化率との関係を図1に示す。ウレアーゼ濃度とEC変化率の良好な関係式が得られ、EC変化率の結果からウレアーゼ活性を定量的に求められることが確認できた。

培養時間(72から480時間)におけるEC変化率の

キーワード ウレアーゼ産出能微生物, ウレアーゼ活性評価方法, カルシウム消費率

連絡先 〒270-1395 千葉県印西市大塚1-5-1 (株)竹中工務店 技術研究所 TEL 0476-77-1265

測定結果を図2に示す。3回の実験結果、実験期間中のEC変化率は240時間頃にやや低い値を示す場合もあるが概ね一定の範囲にあり、平均 0.014 mS/cm/min (CV値 33%) であった。図1から、平均値は市販のウレアーゼ濃度 490 mg/L に相当すると推定される。この結果を踏まえ、各種試験に用いる場合は培養時間 168~336時間(7~14日)であれば、ウレアーゼ活性に大きな変化はないとして、試験に供した。

3.2 カルシウム消費率

初期の塩化カルシウム濃度に対するカルシウム消費率の時間変化を図3、図4に示す。培養液添加率20%では24時間後には全量が消費され、2%では48時間後に83%(0.15 mol/L)、61%(0.30 mol/L)が、0.2%では48時間後に42%(0.15 mol/L, 0.30 mol/Lとも)が消費され、菌体培養液濃度とカルシウム消費量が正比例する関係にあることがわかった。0%(菌体なし)での20%、30%の減少は、固化溶液に含まれる炭酸水素カルシウムの

影響であると推定される。以上の結果より、菌体培養液濃度0.2%の条件でも144時間で0.3 mol/Lのカルシウムイオンの75%を消費されることから、尿素とカルシウムイオンの反応促進にはごく少量の菌体を添加することで十分であるという可能性が見出された。

4. おわりに

本報では、ウレアーゼ産出能を有する *Bacillus pasteurii* を対象に、菌体培養液のウレアーゼ活性の確認方法と活性発現期間を確認し、カルシウムとの反応促進に必要な菌体培養液濃度の検討を行った。本成果により、今後の有害金属固定化試験において、微生物活性を一定範囲に揃えることが可能となり、実験の再現性を向上しうることが期待される。また、操作の簡単な電気伝導度計によりウレアーゼ活性を評価する方法を整備したことから、今後、他の微生物や適用現場においてもウレアーゼ活性の評価が容易に実現できると思われる。

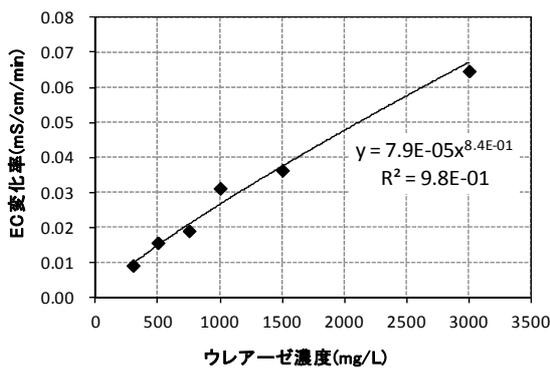


図1 市販ウレアーゼのEC変化率

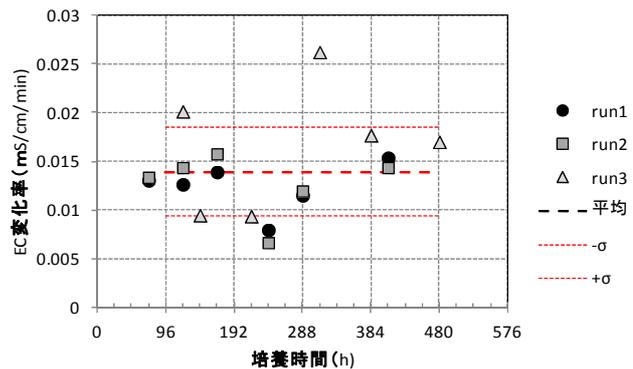


図2 菌体培養時間とEC変化率

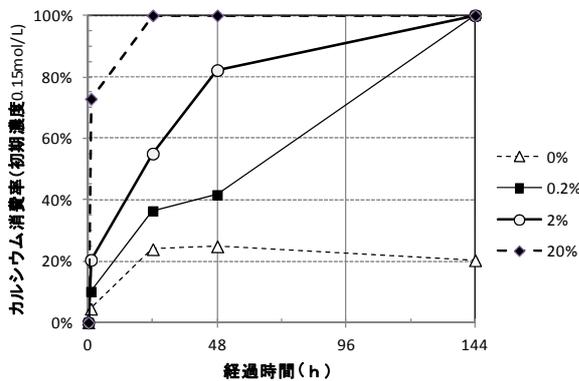


図3 カルシウム消費率(初期濃度 0.15 mol/L)

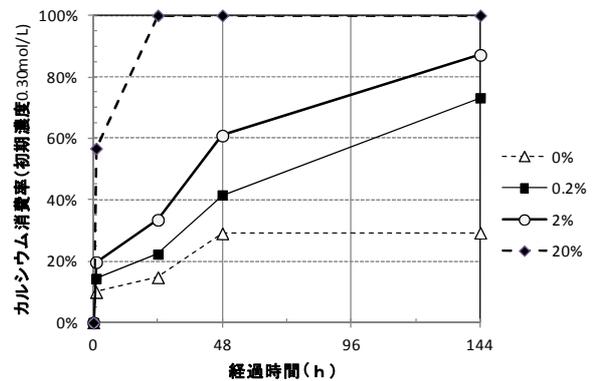


図4 カルシウム消費率(初期濃度 0.30 mol/L)

参考文献

- 1) 横山珠美・畠俊郎(2012):ウレアーゼ産出能を持つ微生物によるビーチロック形成促進効果に関する検証, 土木学会第67回年次学術講演会梗概集, III-064, pp. 127-128