

油汚染土壌浄化における石油分解菌の維持・保存資材の検討

株式会社熊谷組 正会員 ○佐々木 静郎 正会員 門倉 伸行
 正会員 土路生修三 正会員 村上 順也
 立命館大学 向真樹 Adhikari Dinesh 久保 幹

1. 目的

油汚染土壌の浄化には、低環境負荷・低コストが特徴のバイオレメディエーションの適用事例が増えてきている^{1), 2)}が、そのうち、バイオオーグメンテーションについては期待する浄化性能を達成するためには、培養直後の活性が高い菌を投与することが重要となる。しかし、現場の作業工程によっては菌の投与が遅れる場合も考えられるため、菌の活性が低下する可能性がある。本報では、石油分解菌の活性を維持し、保存する資材として土壌中に普遍的に存在する二酸化ケイ素に着目し、その適用性について検討した結果を報告する。

2. 実験概要

(1) 使用材料

微生物保持資材には、もみ殻や土壌中に多く含まれること、*Bacillus* 属の孢子等を長期間保存することが可能とされていることなどから、二酸化ケイ素(SiO_2)を選定した。

表 1 に、使用菌株を示す。すなわち、枯草菌の一種である納豆菌 (*Bacillus.subtilis* (natto) Takahashi) と、自然界に普遍的に存在し、安全性が証明済みの長鎖シクロアルカン分解菌³⁾ *Gordonia.terrae* NDKY76A, *Rhodococcus.erythropolis* NDKK6 の3種類である。図 1～図 3 に、各菌体の顕微鏡写真を示す。いずれも大きさは数 μm ～10 μm 程度のグラム陽性桿菌である。

(2) 実験方法

図 4 に実験手順を示す。まず各菌種を LB 液体培地 (100 mL) にて振盪培養 (30℃) を行った。菌体数が飽和に達したと判断 (約 10^8 個/mL～ 10^9 個/mL) されるまで培養を行い、その液体培地を遠心分離 (5,000 rpm, 4℃, 5 分間) し、菌体を洗浄した後、蒸留水で懸濁して得られたものを供試用の菌液とした。この菌液 (5 mL) をあらかじめ二酸化ケイ素 (5 g) を敷き詰めたシャーレに滴下し、攪拌しながら約 1～3 時間自然乾燥させた。菌体を吸着させた二酸化ケイ素 (5 g) は、コニカルチューブに移し替え、静置 (30℃) した。次に、吸着後の二酸化ケイ素を滅菌水にて希釈混合し、平板培地に塗抹後、所定期間経過後の出現コロニー数 (生菌数) を計

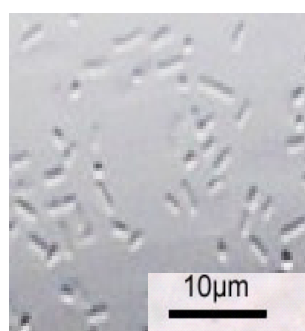


図 1 *B.subtilis* (natto) Takahashi

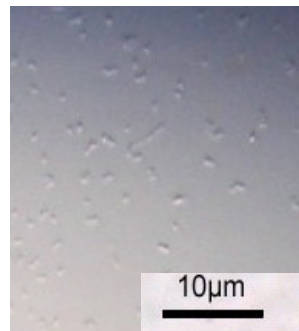


図 2 *G.terrae* NDKY76A

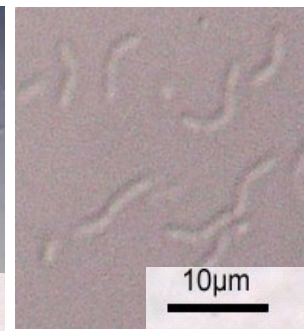


図 3 *R.erythropolis* NDKK6

表 1 使用菌株

使用菌株	芽胞
<i>Bacillus.subtilis</i> (natto) Takahashi	○
<i>Gordonia.terrae</i> NDKY76A	×
<i>Rhodococcus.erythropolis</i> NDKK6	×

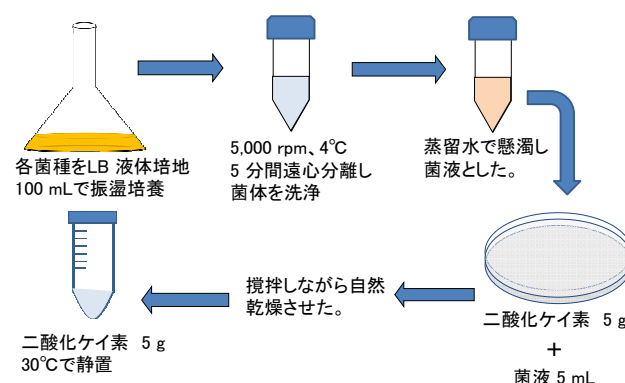


図 4 二酸化ケイ素への菌体の吸着

キーワード 石油分解菌, バイオレメディエーション, バイオオーグメンテーション, 二酸化ケイ素

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

数した。結果の解析は、計数したコロニー数を、二酸化ケイ素に吸着させ乾燥させた後、直ちに二酸化ケイ素を滅菌水で懸濁し、プレートで確認したコロニー数で除した数値を生存率と定義し、相対評価で比較することにより行った。

3. 結果

(1) コロニーの出現状況

図5に、各菌体を吸着した二酸化ケイ素の培養後のコロニー出現状況を示す。*B.subtilis* (natto) Takahashi は比較的早く生育し、1日でコロニーの目視確認ができたが、*G.terrae* NDKY76A および *R.erythropolis* NDKK6 については、コロニーの生育には2日以上を要することが確認された。

(2) 各菌体の生存率

図6～図8に、*B.subtilis* (natto)、*G.terrae* NDKY76A および *R.erythropolis* NDKK6 の生存率の経時変化を示す。図6から、*B.subtilis* (natto) の生存率は、7日目に約28%に減少したがその後はやや回復し、4週間後には約48%の結果が得られた。次に石油分解菌に関しては、比較としてゼオライトについても同様の試験を行った。しかし、*G.terrae* NDKY76A に関しては二酸化ケイ素では3日目で生存率は0となり、ゼオライトでは14日目で約16%に低下し、その後も減少する傾向にあることが推測されたため、二酸化ケイ素やゼオライトではこの菌体を長期間維持することは難しいものと判断された。

次に *R.erythropolis* NDKK6 の生存率を見ると、3日目～7日目に落ち込みが認められたが、それ以降では回復傾向を示していた。特に、二酸化ケイ素の場合には14日目では初期値と同程度にまで保持されるようになっていたことが示された。

4. まとめ

石油分解菌の活性維持・保存資材として二酸化ケイ素の適用性について検討した結果、*G.terrae* NDKY76A は難しいと判断されたが、*R.erythropolis* NDKK6 は2週間以上保持されることが分かった。今後は、他の資材について検討する予定である。

参考文献

- 1) 村上, 門倉, 佐々木, 土路生, 金城, 仲村, 久保, 松宮: 沖縄県内土壌を用いた模擬汚染土壌のバイオ浄化処理実験, 土木学会第68回年次学術講演会, VII-079, 157-158, 平成25年9月
- 2) 佐々木, 門倉, 村上, 土路生, 久保, 松宮: 石油汚染土壌浄化における添加副資材の効果, 土木学会第68回年次学術講演会, VI-283, 565-566, 平成25年9月
- 3) 門倉, 佐々木, 土路生, 村上, 久保, 松宮: バイオレメディエーション利用指針に基づく石油分解菌の安全性評価, 第18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, 26-31, 2012

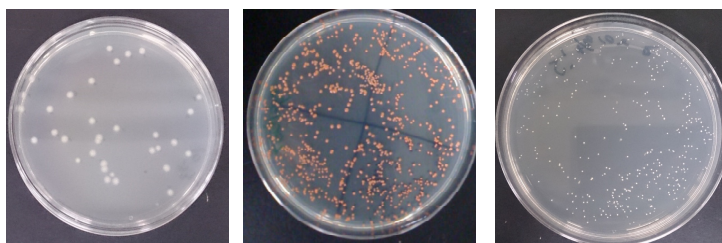


図5 *B.subtilis* (natto) Takahashi, *G.terrae* NDKY76A, *R.erythropolis* NDKK6 のコロニー (左から)

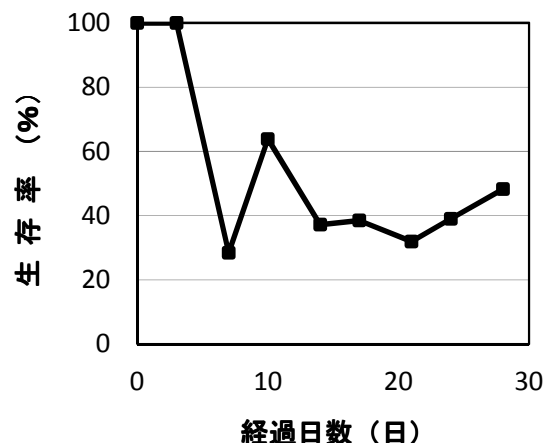


図6 *B.Subtilis* (natto) Takahashi の生存率の経時変化

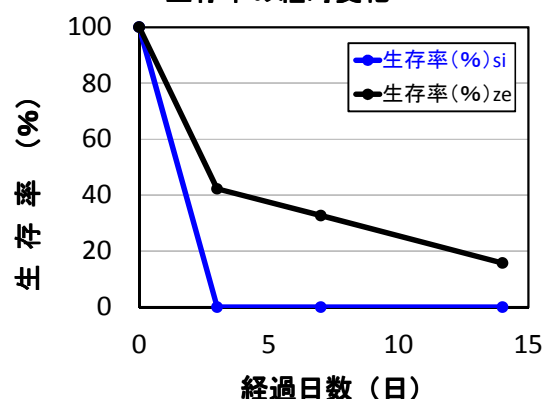


図7 *G.terrae* NDKY76A の生存率の経時変化

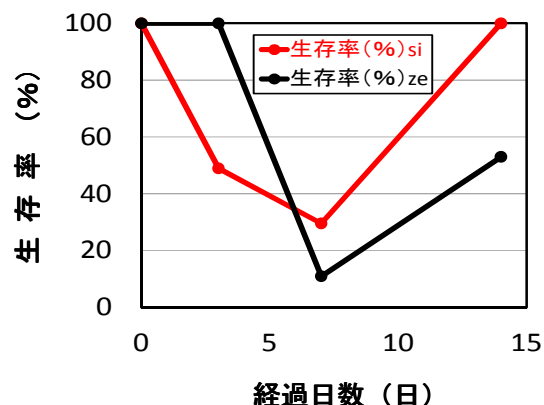


図8 *R.erythropolis* NDKK6 の生存率の経時変化