

RHA1 株によるバイオオーグメンテーションに適した培地成分の検討

大成建設（株）技術センター 正会員 ○高畑 陽
 大成建設（株）技術センター 正会員 渡邊 亮哉
 大成建設（株）技術センター 正会員 伊藤 雅子

1. 目的

トリクロロエチレン（TCE）やシス-1,2-ジクロロエチレン（*cis*-DCE）で汚染された帯水層（地下水）に、好気性の塩素化エチレン分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 株¹⁾（以下、RHA1 株）を導入する浄化技術は、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の適合確認を受けているバイオオーグメンテーション技術である。塩素化エチレン自体で分解能が活性化されて TCE や *cis*-DCE を分解できるため、RHA1 株以外の浄化促進材等を導入する必要が無く、分解過程で有害な塩化ビニルモノマー（VCM）等の中間代謝産物が生成しない特長がある。

本浄化技術では、RHA1 株を大量に調達するため、浄化コストを下げするためには RHA1 株を安価で大量培養する技術の確立が不可欠である。RHA1 株は PCB 分解菌として約 20 年にわたって様々な研究に用いられてきたが、培養は W 培地²⁾（無機塩培地）にコハク酸ナトリウムを添加した培地（以下、標準培地、表-1）が使用されてきた。一方、本培地中には溶解できない塩類が析出しており、地盤注入時に目詰まりの原因になるため、培地の改良が必要と考えられた。

本報では、RHA1 株の大量培養に適した培地組成と菌体導入による浄化効果について、室内試験により検討した結果について報告する。

表-1 W培地の組成

試薬	濃度(/L)
リン酸二水素カリウム	1700 mg
リン酸水素二ナトリウム	9800 mg
硫酸アンモニウム	1000 mg
硫酸マグネシウム・7水和物	100 mg
酸化マグネシウム	11 mg
炭酸カルシウム	2.0 mg
硫酸鉄・7水和物	9.5 mg
硫酸亜鉛・7水和物	1.4 mg
硫酸マンガン・4水和物	1.1 mg
硫酸銅・5水和物	0.25 mg
硫酸コバルト・7水和物	0.28 mg
ホウ酸	0.06 mg
12N塩酸	51.3 μL

2. 試験方法

2. 1 改良培地における RHA1 株の培養特性

塩類の析出が生じない希釈率を検討した結果、W 培地を 4 倍まで希釈すれば析出していた塩類が完全に溶解できることを確認した。そこで、この W 培地を 4 倍希釈した無機塩培地（以下、1/4W 培地）をベースにして RHA1 株の培養試験を行った。

表-2 培地条件と培地材料のコスト試算

	無機塩培地	有機物	1kL作成時の 試薬コスト(円)
標準培地	W培地	コハク酸ナトリウム・6H ₂ O (20mM)	83,200
培地条件-1 (1/4W)	1/4W培地	コハク酸ナトリウム・6H ₂ O (20mM)	38,600
培地条件-2 (1/4+N)	1/4W培地 +硫酸アンモニウム (20mM)	コハク酸ナトリウム・6H ₂ O (20mM)	51,300
培地条件-3 (1/4+YE)	1/4W培地	コハク酸ナトリウム・6H ₂ O (20mM) +酵母エキス (1g/L, Difco製)	75,000

コストは試薬ベースの標準単価を用いて計算

1/4W 培地に、これまで RHA1 株の培養に有機物源として用いられてきた 20mM のコハク酸ナトリウム・6水和物（以下、コハク酸）を加えたものを培養条件-1 とした。一方、1/4W 培地は窒素源が不足する可能性が考えられたため、窒素源として 20mM 硫酸アンモニウムを加えた培地を培養条件-2、1mg/L の酵母エキスを加えた培地を培養条件-3 とし、それぞれ 500mL のバッフル付き三角フラスコに 200mL ずつ培養液を作成した。RHA1 株は 20mM のコハク酸を炭素源とする W 培地で 3 日間、30℃で培養した培養液（培養終了時の RHA1 株菌数：8.5×10⁸cells/mL）を、各条件の培養液に 0.3mL ずつ植菌し、30℃の恒温室内で振とう培養（100rpm）した。培養開始から定期的に培養液を採取し、全菌数を AODC 直接計数法、溶存性全有機炭素濃度（DOC）および全窒素濃度（T-N）を TOC 計により測定した。

キーワード RHA1 株, バイオオーグメンテーション, 塩素化エチレン類, 原位置浄化

連絡先 〒245-0051 横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設（株）技術センター TEL 045-814-7226

2. 2 RHA1 株培養液のシス-1, 2-ジクロロエチレンの分解能

培養が定常期に達した培養液を採取し、*cis*-DCE 汚染地下水に導入した際の分解量を把握するためにバッチ培養試験を実施した。120mL のガラスバイアル瓶に実汚染地下水 18.7mL、培養液を無機塩培地で洗浄して 20 倍濃縮した濃縮菌液 1mL、*cis*-DCE 濃縮液（終濃度で 1.5mg/L になるように調製）0.3mL を添加しすぐにテフロンコーティングを施したブチルゴム栓で密栓し、20℃の恒温室内で 7 日間静置培養した。培養終了後の地下水中の *cis*-DCE 濃度を GC-MS で測定し、異なる培養条件で得られた RHA1 株を導入した際の *cis*-DCE の分解率を、濃縮菌液の代わりに蒸留水 1mL を添加した条件（コントロール）との分解量の差から算出した。

3. 試験結果

3. 1 改良培地による RHA1 株の培養特性

培地条件による RHA1 株菌数、DOC、T-N の経時変化を図-1～図-3 に示す。培地条件-1 では他の条件と比較して増殖速度が小さく、培養終了時の RHA1 株菌数は 6.1×10^8 cells/mL であり、前培養（標準培地）での終菌数（ 8.5×10^8 cells/mL）と比較して小さくなった。この原因は、窒素分が不足したためと考えられた。窒素分を供給した培地条件-2 では、培養終了時の RHA1 株菌数は 9.9×10^8 cells/mL となり、標準培地とほぼ同様の RHA1 株の収量を得た。酵母エキスを供給した培地条件-3 では、初期濃度の DOC が約 470mg/L、T-N が 190mg/L 増加し、酵母エキスを加えない条件より培養期間が 1～2 日短縮されると共に、RHA1 株の収量も約 2 倍増加した。培養終了時に全窒素濃度は約 53mg/L まで低下したが、有機物濃度は約 410mg/L 残存した。この結果から、酵母エキス 0.8g/L、コハク酸 10mM 程度を 1/4W 培地に加えて培養すれば、培養終了時に培養液中の有機物濃度と窒素濃度を概ね 100mg/L 以下の低い濃度に抑えて RHA1 株を培養できると考えられた。

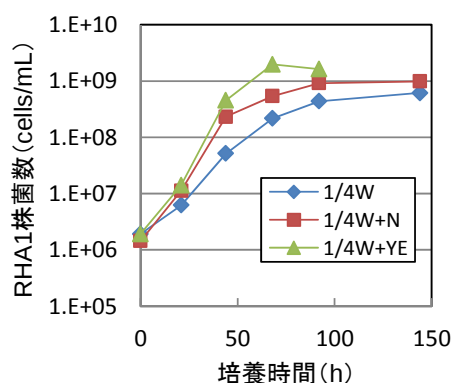


図-1 RHA1株菌数の経時変化

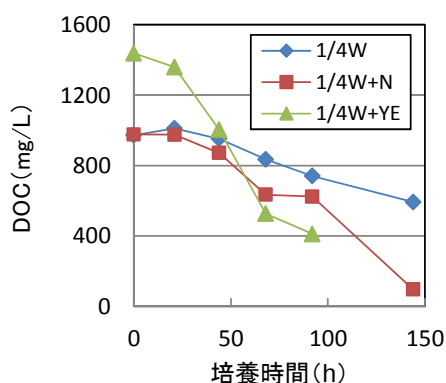


図-2 溶存性有機炭素濃度の経時変化

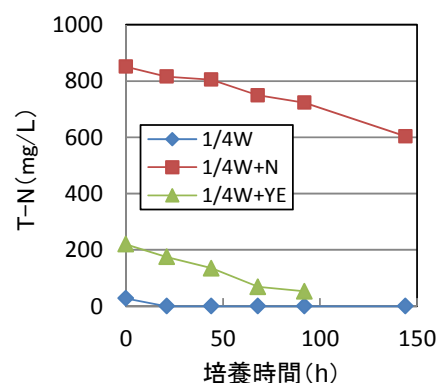


図-3 全窒素濃度の経時変化

3. 2 RHA1 株培養液のシス-1, 2-ジクロロエチレンの分解能

RHA1 株培養液導入による *cis*-DCE の分解能を表-3 に示す。この結果、培養液の組成にかかわらず、RHA1 株の分解率は概ね RHA1 株の導入量に比例する結果となった。したがって、RHA1 株の導入時の *cis*-DCE 分解効果に、前培養における培地組成が影響を与えている可能性は低いと考えられた。

表-3 シス-1,2-ジクロロエチレンの分解率(7日間)

導入培養液	RHA1株菌数 (cells/mL)	<i>cis</i> -DCE 分解率(%)
蒸留水	0	-
1/4W	6.1×10^8	47.5
1/4W+N	9.9×10^8	46.4
1/4W+YE	1.6×10^9	84.1

RHA1株菌数は地下水導入後の終濃度

4. まとめ

本試験の結果から、標準培地の無機塩濃度を減らして酵母エキスを加えることにより、RHA1 株の培養期間を 1～2 日短縮でき、約 2 倍の菌収量を得られることが示された。また、培養後の菌体培養液から培地成分を除去すれば、培養液中の培養組成にかかわらず RHA1 株の分解活性は保たれることが示された。今後は、培養後の有機物量や窒素量が限りなく小さくできる培地組成について更に検討していく予定である。

参考文献

- 1) Masai E. et al, Applied and Environmental Microbiology, 61: 2079-2085, 1995.
- 2) Kimbara K. et al, Journal of Bacteriology, 171:2740-2747, 1989.