

バイオレメディエーション中の炭化水素分解菌の活性維持に関する検討

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 河村 大樹
立命館大学 荒木希和子 久保 幹

1. 目的

油汚染土壌の浄化対策として、微生物機能を活用したバイオレメディエーションの適用事例が増加しているが、炭化水素分解菌を投与する場合には培養コストが高価になること、菌の増殖に必要な無機塩類や有機資材を菌と別々に供給する必要があること等の課題がある。そこで、本研究では低コストな油汚染土壌浄化技術の開発を目的として、あらかじめバイオマス資材の中で炭化水素分解菌を培養・増殖させ、活性を維持した状態で油汚染土壌に投入する手法について検討を行っている¹⁾。本報では、炭化水素分解菌の保持に適したバイオマスの探索結果について報告する。

2. 実験概要

(1) 使用菌株

実験に用いた菌株は、環境中から単離した難分解性長鎖シクロアルカンを唯一の炭素源として生育し、人や環境への安全性が証明されている炭化水素分解菌 *Rhodococcus erythropolis* NDKK6 である(図1)。

(2) 使用バイオマス

バイオマスは、発酵資材として牛糞堆肥(C豊富)、鶏糞堆肥(N豊富)、未発酵資材として大豆かす(N豊富)、ピートモス(C豊富)を用いた。表1にこれらの全炭素量(TC)、全窒素量(TN)及びC/N比を示す。

(3) 実験方法

実験は、実験①：発酵資材同士を混合したバイオマス、発酵資材と未発酵資材を混合したバイオマス(表2)と、実験②：未発酵資材同士を組み合わせたバイオマス、を対象に行った。次に、実験①では、C/N比を2種類に、実験②では、C/N比を4種類(表3)に分けてバイオマスを調整した。調整したバイオマス混合資材はオートクレーブ滅菌した後、図2に示すように、広口ペットボトル(300mL容)に充填するとともに、NDKK6株が 10^6 cells/g-biomassになるように菌液と滅菌水を添加した(含水率45%)。調整したNDKK6株含有バイオマスは、30℃のインキュベータ内で静置し、1週間ごとにサンプリングを行った。分析は、総細菌数と炭化水素分解菌数を測定した。総細菌数はeDNA法²⁾、炭化水素分解菌数は *R. erythropolis* が保有するアルカンヒドロキシラーゼ遺伝子(*alkB R2*)をターゲットとしたReal-Time PCR法によりそれぞれ定量した。

3. 実験結果

実験①におけるバイオマス中の総細菌数及びNDKK6株数の経時変化を図3に示す。発酵資材同士を組み合わせたバイオマスより



図1 *R.erythropolis* NDKK6

表1 バイオマスのC,N,C/N比

バイオマス	TC(mg/kg)	TN(mg/kg)	C/N比
牛糞堆肥	424,300	15,110	28
鶏糞堆肥	233,800	12,910	18
大豆かす	503,200	85,550	6
ピートモス	504,200	5,020	100

表2 発酵・未発酵バイオマスの種類

バイオマス	比率	C/N比
牛糞・鶏糞	8.3:1.7	低(19)
	6:4	高(21)
牛糞・大豆かす	8:2	低(13)
	9:1	高(16)

表3 未発酵バイオマスの種類

バイオマス	TC(mg/kg)	TN(mg/kg)	C/N比
大豆かす・ピートモス	279,700	28,000	10
	276,600	13,700	20
	276,600	9,140	30
	276,600	6,860	40

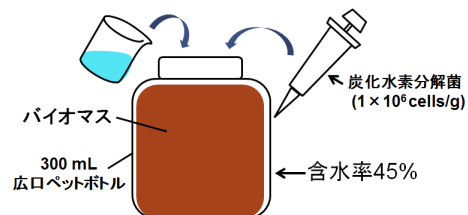


図2 NDKK6株含有バイオマスの作製

キーワード バイオレメディエーション, 炭化水素分解菌, バイオマス資材, eDNA, Real-Time PCR

連絡先 〒300-2651 茨城県つくば市鬼ヶ窪 1043 株式会社熊谷組 技術本部 技術研究所 TEL 0298-47-7505

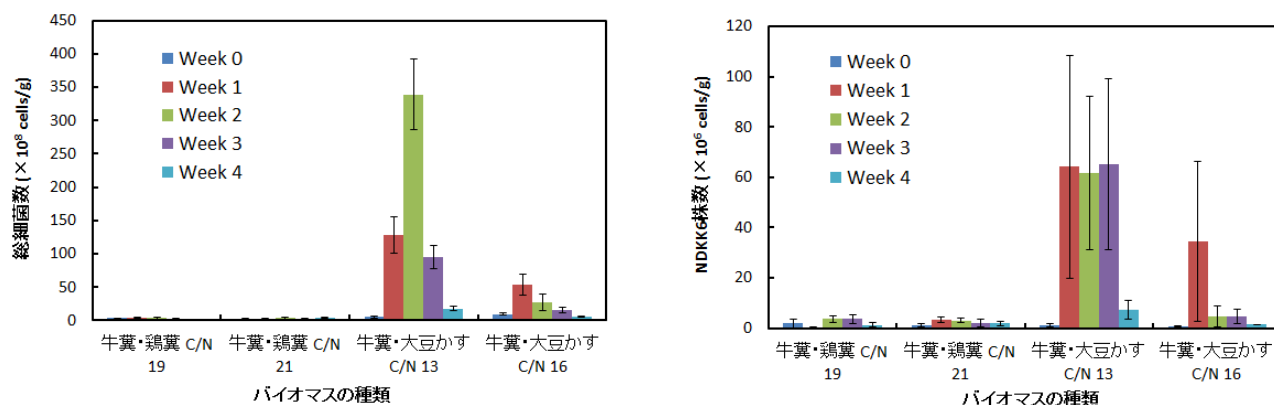


図3 実験①におけるバイオマス中の総細菌数(左)及びNDKK6株数

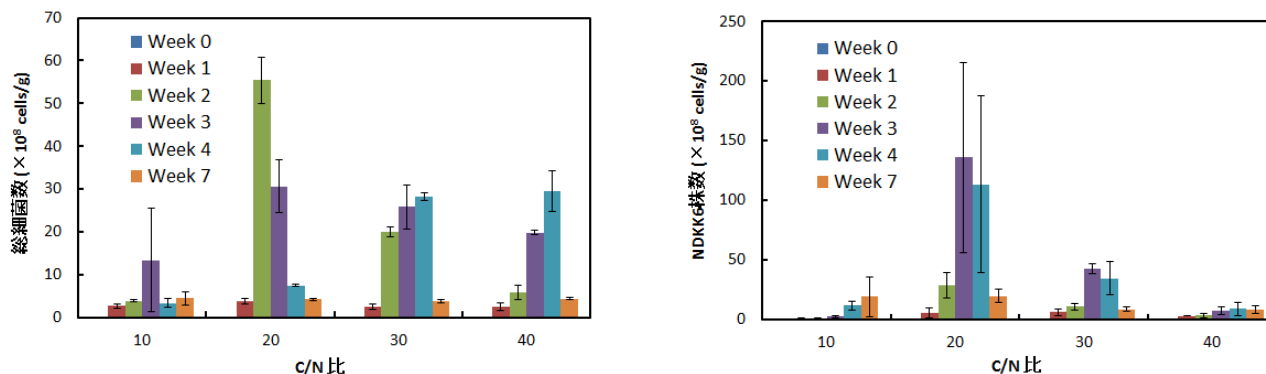
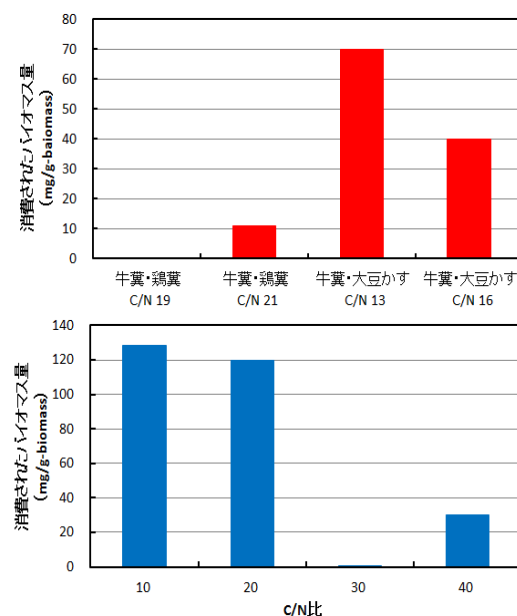


図4 実験②におけるC/N比の異なる未発酵資材中の総細菌数(左)及びNDKK6株数(右)

も未発酵資材を加えたバイオマスの方が総細菌及びNDKK6株の維持・増加に顕著な効果を発揮することが分かった。また、未発酵資材を加えたバイオマスでは、窒素源の多いバイオマス(C/N比:13)の方が総細菌及びNDKK6株の生育に適していると考えられた。実験②における総細菌数及びNDKK6株数の経時変化を図4に示す。C/N比の違いによってNDKK6株の生挙動は大きく異なる傾向が認められた。C/N比が20のときに最も総細菌数及びNDKK6株数が増加したことから、このC/N比が総細菌及びNDKK6株菌の生育に適していると考えられる。図5は、実験中に消費されたバイオマス量を示したものである。未発酵資材を加えたバイオマスの方が多くの炭素と窒素が消費されていることから、発酵資材のみのバイオマスよりも微生物が活性化されたことが示唆される。また、実験②の結果から窒素源の多いバイオマス(C/N比:10, 20)の方がバイオマスの消費量が多いことから、総細菌及びNDKK6株の生育に対してはC/N比:10~20が最も望ましいと考えられる。

図5 消費されたバイオマス量
(上:実験①, 下:実験②)

4. まとめ

今回の実験結果から、①炭化水素分解菌の維持・活性化には、未発酵資材の方が発酵資材よりも適している、②炭化水素分解菌の生育に適したバイオマスを作製する上で、C/N比が重要な指標となる、こと等が分かった。

参考文献

- 1)佐々木, 門倉, 土路生, 村上, 向, Dinesh, 久保: 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, 土木学会第69回年次学術講演会, VI-304, 607-608, 平成26年9月
- 2)H.Aoshima,A.Kimura,A.Shibutani,C.Okada,Y.Matsumiya,M.Kubo:Evaluation of soil bacterial biomass using environmental DNA extracted by slow-stirring method, Appl.Microbial.Biotechnol.71, 2006