

アンモニアの生成を伴わない新規微生物固化技術に関する基礎的検討

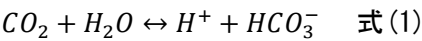
広島大学 正会員 ○ 畠 俊郎

1. 目的

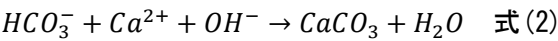
地盤内にすでに生息している微生物の代謝機能を地盤改良分野に応用する技術について検討が進められている。現状、尿素の加水分解酵素であるウレアーゼ産出能に着目したものが主流とされるが、1)着目している酵素産出能を持つ微生物が地盤内にすでに生息していること、2)尿素の加水分解に伴い発生するアンモニア対策（原位置フラッシング等）が必要となること、など実用化に向けて解決すべき課題が指摘されている。このような背景のもと、対象となる地盤内に普遍的に生息している多種多様な微生物が利用であるとともに、アンモニア等の副生成物への対応が不要となる新たな微生物機能について検討することとした。本文では、着目した新たな結晶鉱物析出メカニズムの概要と室内試験による検証結果について報告する。

2. 新たに着目した微生物固化技術の概要

アンモニアの生成を伴わない新たな微生物固化メカニズムとして、動物、植物、藻類、細菌など環境中に存在するあらゆる生物から広く発見されている炭酸脱水酵素（Carbonic Anhydrase :CA）に着目した。炭酸脱水酵素は式(1)に示す通り二酸化炭素と水から炭酸、水素イオン、重炭酸イオンへの変換、またその逆方向への変換を触媒する酵素として知られている。



土壌間隙内に存在する二酸化炭素と水を用い、上記反応によって生成された重炭酸イオンは同じく土壌間隙内に存在するカルシウムイオンと結合することにより炭酸カルシウムの結晶として析出する。



環境中で式(1)、(2)に示した反応により炭酸カルシウムが析出する例として、サンゴの外殻形成を例にとり説明する。海水中に溶け込んだ二酸化炭素はサンゴポリープ由来の炭酸脱水酵素で重炭酸イオンとなる。この重炭酸イオンと海水中に含まれるカルシウムが反応し炭酸カルシウムとして析出・堆積していくこととなる。

提案技術では、析出した炭酸カルシウムが土壌間隙内に析出、もしくは土粒子間の架橋による地盤強度の増進や透水性の低下といった地盤改良効果を期待している。

3. 室内試験による提案手法の有効性評価

新たな微生物固化技術の有効性評価を目的とし、炭酸脱水酵素活性を有する土壌微生物を用いた室内試験を実施した。培養試験条件を表-1に示す。微生物種としては自然界に広く分布するとともに、事前に行った酵素活性試験で陽性と判断された土壌由来の *Bacillus* 属を選定した。培養には単離に用いた TSB 寒天培地(25mL)に 2mol/L の塩化カルシウム（無水）溶液 2mL を添加したプレートと、未添加のプレートを用い結晶析出状況の比較を行うこととした。CO₂は二酸化炭素（気体）として供給することとし、アネロパック・微好気を用いて密閉容器中で初期のCO₂濃度が後述するCO₂センサーの検出限界である5%となるよう調整した。培養装置の構成を写真-1に示す。

表-1 培養条件一覧

項目	名称	備考
微生物種	<i>Bacillus</i> sp.	
培地	TSB	25mL/プレート
カルシウム源	塩化カルシウム	2mol/Lを2mL添加
CO ₂ 源	二酸化炭素（気体）	アネロパック・微好気
培養温度		室温



写真-1 培養装置の構成

キーワード 微生物固化, 室内試験, 二酸化炭素, 結晶鉱物, 酵素反応

連絡先 〒739-8527 広島県東広島市鏡山 1-4-1 広島大学 社会基盤環境工学プログラム 082-424-7784

培養期間を通じて容器内の CO_2 , O_2 濃度を CD-2IR (FUSO) で、培養温度を KT-175F (藤田電機製作所) でそれぞれ 5 分間隔で計測することとした。およそ 1 か月間の培養後に密閉容器からプレートを取り出し、目視および光学顕微鏡を用いて析出状況の確認を行った。

4. 培養期間中の各種計測値の推移

試験期間中の密閉容器内の温度は最大 22°C 、最小 12°C 、平均 18°C であり、添加した微生物の至適温度である 30°C より低い値での推移となった。培養期間中における密閉容器中の酸素濃度および二酸化炭素濃度の推移を図-1, 2 にそれぞれ示す。酸素濃度は若干の変動はあるものの培養期間を通じてほぼ一定の値で推移した。試験に用いた微生物は好気条件で単離したものであるため、生育に適した環境が維持されたと考えている。二酸化炭素濃度は培養開始初期に目標とする 5% 程度まで一気に上昇した後低下し、約 2 週間後に再度若干上昇した後は緩やかに低下する傾向が認められた。培養開始から約 8 日後から二酸化炭素濃度が上昇した理由については微生物の呼吸等による生成が考えられるが、詳細については今後検討を進めていく計画である。

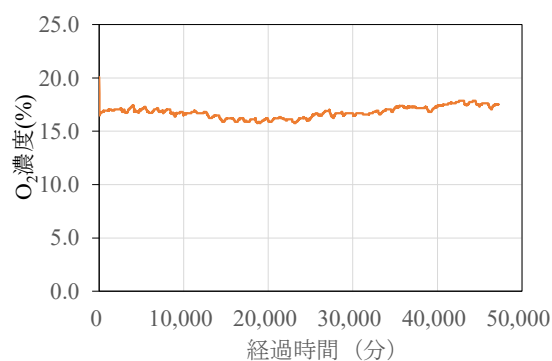


図-1 酸素濃度の推移 (培養容器中)

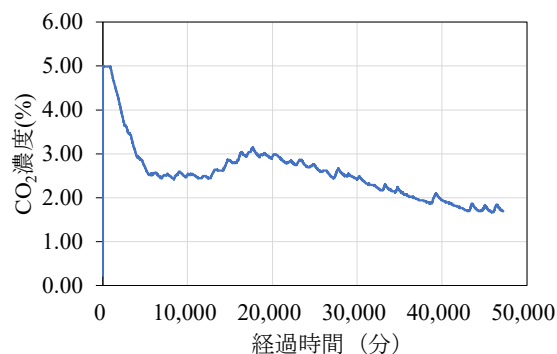


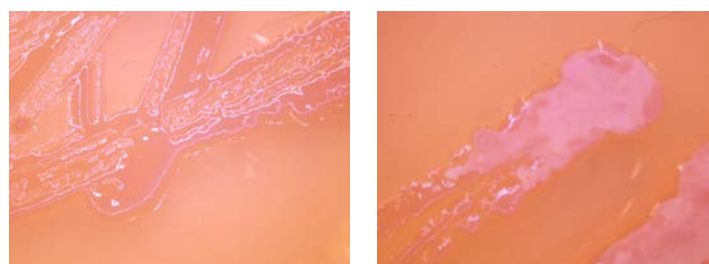
図-2 二酸化炭素濃度の推移 (培養容器中)

5. 培養終了時の表面観察結果

約 1 か月の培養期間終了後に実体顕微鏡 (SZ61) および、倒立 (培養) 顕微鏡 (CKX53) を用いて結晶析出状況の確認を行った。結果を写真-2, 3 にそれぞれ示す。写真-2 より培地へカルシウム源を添加することにより菌体表面に白色結晶を析出させる効果が確認された。より詳細な析出状況確認を目的として行った倒立 (培養) 顕微鏡による観察結果 (写真-3 参照) から、カルシウム源の添加により増殖した菌体 (生物膜) 内部に結晶鉱物が析出していることが明らかとなった。顕微鏡観察後に寒天培地を乾燥・粉末化後して行った XRD 解析からこの析出物が炭酸カルシウムであることが確認できた。以上より、新たに着目した微生物機能により菌体表面および菌体が形成した生物膜内部に炭酸カルシウムの結晶を析出させる効果を明らかにすることができた。

6. まとめ

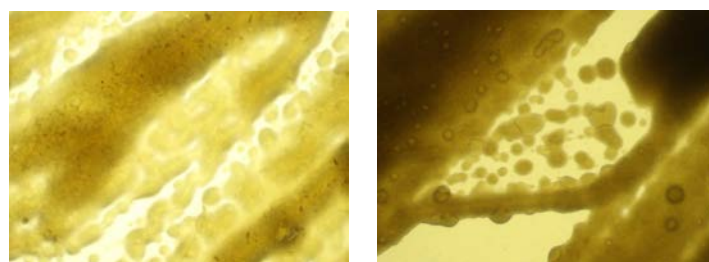
環境中に存在するあらゆる生物から広く発見されている炭酸脱水酵素に着目し、大気中の二酸化炭素を利用して生物膜表面・内部に炭酸カルシウムを析出させる新たな微生物固化技術の可能性を明らかにすることができた。今後は結晶析出までまでに要する期間の短縮に向けた検討とあわせ、土壌を用いた固化試験等を通じて環境負荷の小さい新技術としての実用化を目指していきたい。



Ca 添加無

Ca 添加有

写真-2 実体顕微鏡による菌体表面観察結果



Ca 添加無

Ca 添加有

写真-3 倒立顕微鏡による菌体内部観察結果