

生菌・死菌を区別した流れ場における微生物の動態

岐阜大学工学部	正会員	佐藤 健
岐阜大学工学部		○岡田 英也
岐阜大学大学院	学生会員	木村 由郎
岐阜大学大学院		中谷 勝美
岐阜大学農学部		高見澤 一裕
松下環境空調エンジニアリング		伊藤 善孝

1. 背景・目的

有機塩素系化合物であるトリクロロエチレン(TCE)やテトラクロロエチレン(PCE)により汚染されている土壌、地下水がわが国には 1000 か所以上ある¹⁾。土壌浄化方法の中で、圧倒的な低コストで行えるバイオレメディエーションが注目を集めている。バイオレメディエーション技術とは、微生物のもつ生物機能を活用して汚染された土壌・地下水を修復する技術である。しかし、この方法を実用化するには、地盤工学の技術が必要になる¹⁾。

本研究ではバイオレメディエーションをより有効な浄化工法として確立することを目的とし、嫌気性微生物である *Clostridium bifermentans* DPH-1 株を用いて、有機塩素化合物汚染土壌・地下水の原位置浄化の基礎的実験を行った。カラム試験による微生物の流れ場における動態と、さらには微生物の土中移動による生菌・死菌濃度の変化を室内実験結果にもとづいて考察した。

2. 流れ場における微生物の動態を知るためのカラム試験

2-1 実験条件

- 1) 試料: 豊浦砂 ($G_s=2.645$, $D_{50}=190\mu m$)
- 2) 流入液: *Clostridium bifermentans* DPH-1 株菌懸濁液 (以下、菌液と呼ぶ)
- 3) 流量: 0.1, 1.0, 3.5 (ml/min)
- 4) 菌液の原液濃度: 任意の濃度 (mg protein/l)
- 5) ガラスカラム: 内径 20 (mm), 長さ 100 (mm)

図-1 はカラム試験装置で、豊浦砂を所定の密度で充填し、定常流を作った。

2-2 実験方法

ガラスカラムに飽和状態で豊浦砂を充填した。定量ポンプで蒸留水をカラム下端より流し定常流になったら菌液に変える。フラクションコレクターを用いて一定時間ごとにガラスカラムから出てきた菌液を採液し、分光光度計を用いて濃度を測定する。流入前 (C_0) と流出後 (C) の濃度から相対濃度 (C/C_0) を求める。横軸にポアボリューム (PV), 縦軸に相対濃度 (C/C_0) をとり、Two-Region モデルの fitting によって、 ω , β , Pe , R の 4 つのパラメータを決定した。

2-3 実験結果

流量 0.1 ml/min, 初期濃度 9.60 mg/l の結果を図-2 に示したである。Two-Region モデルで菌液の流出濃度をよく表現できている。他の流量, 初期濃度においても Two-Region モデルで正確に表現できた。表-2

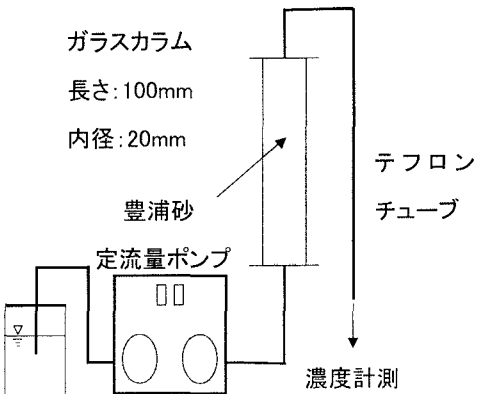


図-1 カラム試験装置

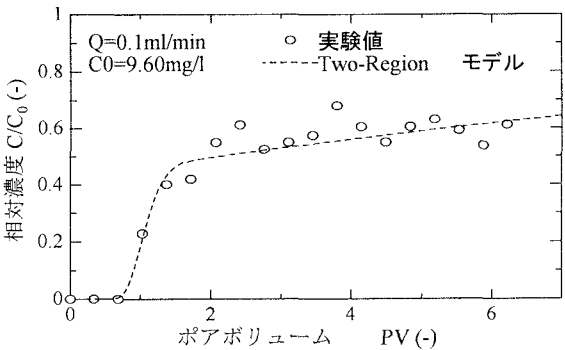


図-2 ポアボリュームと相対濃度の関係

は Two-Region モデルのパラメータ値である。 ω は初期濃度が高くなるにつれ緩やかに高くなる。 β は初期濃度 10mg/l までは急激に下がっていき、そこからはほぼ一定値となる。 Pe は初期濃度に関係なくほぼ一定である。 R は初期濃度 10mg/l までは上昇傾向を示し 10mg/l 以上の濃度になるとほぼ一定値となる。パラメータの流量による流量依存性は認められない。初期濃度 10mg/l が菌液が土中に詰まる限界の値のような結果になり、高濃度な菌液を土中輸送することは難しいことが予想された。

表—2 Two-Region モデルによる fitting 結果

流量 Q	菌液の初期 濃度 C_0	スタントン数 ω	可動水存在 割合 β	ペクレ数 Pe	遅延係数 R
ml/min	mg protein/l	—	—	—	—
0.1	3.55	0.698	0.577	57.0	2.0
	9.60	0.759	0.128	50.1	8.5
	35.74	1.590	0.140	61.0	9.5
	40.86	1.350	0.210	60.0	11.5
1.0	1.74	0.749	0.980	50.1	2.0
	8.80	2.123	0.017	72.0	13.0
	10.60	2.788	0.097	70.8	13.0
	14.20	3.864	0.066	70.6	13.0
	28.40	2.400	0.072	70.5	13.0
3.5	4.98	0.241	0.449	52.0	2.7
	9.60	0.603	0.106	50.8	12.5
	28.81	1.412	0.143	51.0	8.3

3. 生菌・死菌を区別したカラム試験の解析

3-1 実験条件

2-1 と同様の実験を行い、生菌・死菌を識別して、カラム試験の結果を考察した。

3-2 実験方法

カラム試験の流出水採液の際、フラクションコレクターを使わずに流出水の全量をビーカーで採る。ここでも分光光度計を用いて濃度を測定する。図—3は菌を簡単に描いたものである。この図にあるように菌は死ぬとタンパク質は残るが DNA は消滅してしまう。よってカラム流入前(すべて生菌とする)とカラム流出後の菌液、さらにカラム内の土中を等分割し、それぞれの土中に含まれる DNA 濃度を測定することによって生菌・死菌の割合を求める。抽出した DNA はリアルタイム PCR 測定器によって濃度計測する。

3-3 実験結果

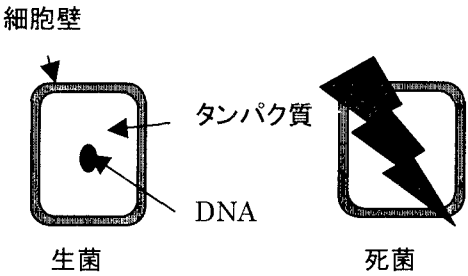
表—3 はカラム流入前と流出後の菌液の濃度と DNA 濃度である。流量は 1.0ml/min である。割合をみると菌自体はカラムから約 11% でてくるのに対し、DNA 濃度の生菌の割合は 0.006% とかなり低い値になっている。このことからカラム流出後の菌液はほとんどが死菌であることがわかった。表—4 はカラム内土中の DNA 濃度である。流入口に近い方から流出口に向かって DNA 濃度は低くなっている。よってカラム内に流入された菌はただ流されるのではなく、豊浦砂に吸着していることがわかる。生菌は土に吸着し、死菌は流され、カラムの外に流出してくることがわかった。

4. 結論

- 1)カラム流出後の菌液は大部分が死菌で生菌がカラムを流出する割合は低い。
- 2)カラム内土中の生菌の濃度分布には場所的違いが認められ、流入口で一番高く、流出口に向かって徐々に減少することがわかった。

参考文献

1)矢木修身：自然界の微生物や組み換え技術を使い、汚染土壌・地下水の修復に取り組む，土木学会誌，vol.86，pp.23-27，2001 年



図—3 菌の構造

表—3 菌液の濃度と DNA 濃度

	タンパク質濃度 (mg Protein/l)	DNA 量濃度 (ng/μl)
流入菌液	31.968	1685.185
流出菌液	3.555	0.105
割合(%)	11.119	0.006

表—4 土中の DNA 濃度

カラム内 の土中	DNA濃度 (ng/μL)
流入口 1	1.0347
2	0.6257
3	0.1984
4	0.0798
流出口 5	0.0217