

微生物機能を用いた地盤性状の制御法に関する基礎的検討

長野工業高等専門学校 非会員 山本 洋輔
 非会員 荒井 里佳子
 正会員 畠 俊郎

1. はじめに

従来市街地の工場跡地などに限られていた地下水の汚染が農地などに対象を拡大し、大きな社会的問題となっている。汚染された地下水が飲用井戸に流入した場合、地下水を利用する住民の健康に重大な影響を与える。本研究では、この有害化学物質に汚染された地下水の拡散防止を微生物機能により安価に得る技術について検討している。本文では、農業廃水を用いた培養試験を実施して微生物機能によりカルシウム系鉱物を析出させた実験結果について報告する。

2. 試験の概要

微生物機能によるカルシウム系鉱物析出促進を目的とし、グルコースと塩化カルシウムの有効性検証を目的とした液体培養試験を実施した。培養試験サンプルの作成手順は以下のとおりである。まず最初に用水路にて採取した農業廃水に Tris 0.606 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.74 g, グルコースを 0.9 g を添加した。次に、HCl で pH=8 に調整した後所定量までメスアップした。最後に 125mL 容量のバイアル瓶に 50mL 入れてブチルゴム栓で密栓した。Tris による pH 調整を行わない試験区も同様の手順で作成した。培養条件は 37°C の浸透培養とし、初日および 1, 3, 6 日後にサンプリングを行った。サンプリングでは、一般細菌数の計測用に 1mL 計り取り残りを孔径 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した。なお、乾燥前のろ過物から一部を採取し、遺伝子解析に用いた。残りは 105°C で一晩乾燥させた後に結晶同定に用いた。あわせて、ろ液について pH およびカルシウムイオン濃度の測定に用いた。

3. 分析結果

3. 1 溶液の分析結果

図-1 に一般細菌数の推移、図-2 に pH の推移および図-3 にカルシウムイオン濃度の推移をそれぞれ示す。図-1 および図-2 より pH の調整を行ったサンプルにおいて一般細菌数の安定した増加が認められる。

この原因としては、pH バッファの添加による中性域の維持が一般細菌数に大きな影響を与えていることが考えられる。また、図-3 の測定結果から pH バッファの添加がカルシウムイオン濃度の変化に大きな影響を与えていることがわかる。以上のことから、pH バッファの添加が微生物による炭酸カルシウムの生成促進に大きく関与していることを確認した。

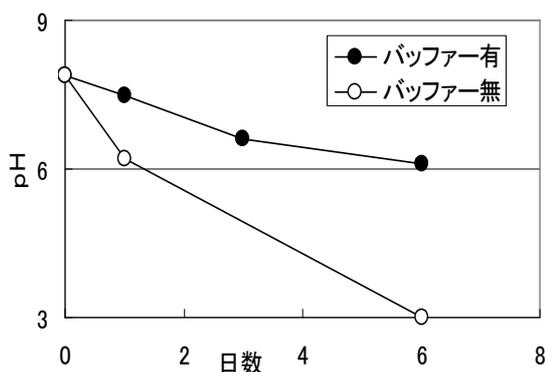


図-1 一般細菌数の推移

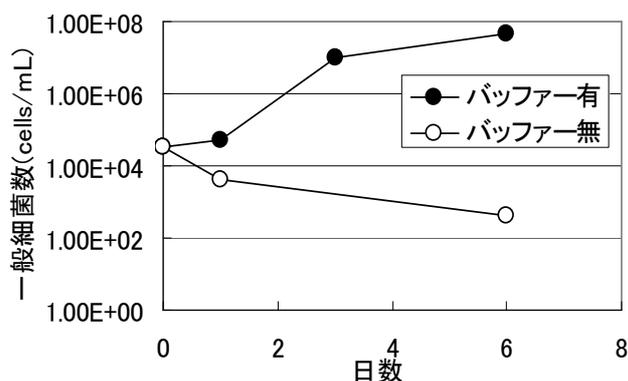


図-2 pH の推移

3. 2 X線回折による析出物の同定

溶液の分析結果から、農業廃水にカルシウム源および炭素源を添加して微生物機能を促進することで結晶物が生成される効果を確認した。結晶の同定を目的とし、X線回折による結晶構造解析を行った。解析条件はX線: Cu/30KV/15mA、スキャン速度 $4^\circ/\text{min}$ 、スキャン範囲 $4\sim 60^\circ$ とし、Miniflex(株式会社理学製)による分析を行った。なお、サンプルの固定は試料ホルダーに結晶物をろ過したメンブレンフィルターを添付する方法を用いた。結果を図-4に示す。X線回折の結果から炭酸カルシウムの析出を確認することができた。

3. 3 遺伝子解析による微生物機能との関連性評価

カルシウムイオン濃度の推移および結晶の同定から微生物機能により炭酸カルシウムを生成する効果を確認することができた。カルシウム系鉱物生成に関与している微生物を明らかにすることを目的とし、PCR-DGGE法による微生物群集構造解析を実施した。プライマーはGC-341fおよび534rとし、ゲルの濃度は30~60%とした。培養開始、3日後および6日後サンプルについて比較した結果を図-5に示す。

図-5では同じ位置のバンドは同じ種類の微生物が存在していることをあらわしている。開始時には不検出であったバンドが3日目と6日目には現れており、カルシウム源およびグルコースの添加により活発化する微生物の存在が明らかとなった。

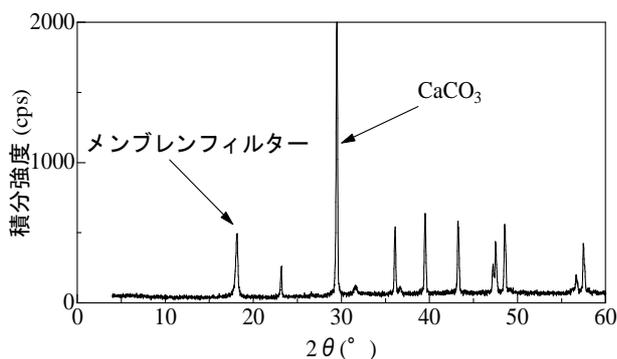


図-4 X線回折の結果

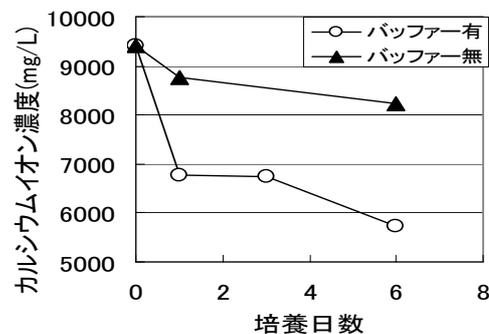


図-3 カルシウムイオン濃度の推移

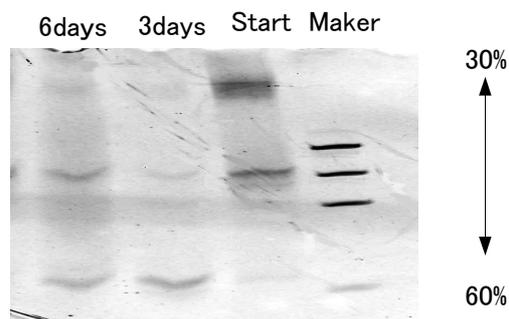


図-5 PCR-DGGEの結果

4. まとめ

今回の実験で微生物機能を用いた炭酸カルシウムの生成促進にpHバッファの添加が有効であることが確認された。この原因としては、糖類(グルコース)の分解により生成される有機酸の影響を緩和し、pHを中性域に保つ効果が考えられる。X線回折の結果から、主要な結晶物である炭酸カルシウム以外の結晶も生成されていることが明らかとなった。他の結晶物については今後同定作業を進める計画である。最後に、PCR-DGGE法の結果から塩化カルシウムおよびグルコースの添加により、農業廃水に生息している微生物の群集構造が大きく変化する傾向を確認することができた。

5. 今後の予定

現時点で炭酸カルシウムの生成に特定の微生物が関与している可能性は確認された。しかしながら、その微生物の同定には至っていない。技術の効率化を図るため、塩基配列の決定などによる微生物の同定を行っていきたい。

あわせて、実際の土壌内では地下水流速の影響などにより溶液および微生物が拡散することが考えられる。そのため、透水試験と組み合わせるなどして実現場を再現したより詳細な検討を行う計画である。