

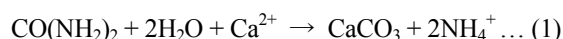
第Ⅲ部門

地盤改良に資する好気性脱窒菌の分離培養

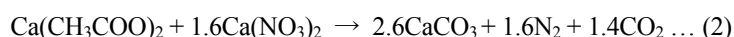
和歌山工業高等専門学校専攻科 エコシステム工学専攻 学生員 ○野間 拓也
 和歌山工業高等専門学校 環境都市工学科 非会員 青木 仁孝
 和歌山工業高等専門学校 環境都市工学科 正会員 林 和幸
 長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 正会員 荒木 信夫
 長岡技術科学大学 技術科学イノベーション専攻 正会員 山口 隆司

1. 研究背景

我が国は、世界でも有数の地震大国である。このような状況下で、様々な地盤改良技術の研究・開発が行われており、その 1 つに微生物のバイオミネラリゼーション作用を活用した Microbially Induced Carbonate Precipitation (MICP) 法がある。ここで、最も研究が活発に行われている尿素の加水分解作用を利用した MICP 法に関わる反応を式 (1) に示す。



尿素の加水分解反応を利用した MICP 法は、地盤間隙中において尿素の加水分解反応を引き起こすことで、炭酸カルシウム (CaCO_3) を析出させる。これにより、土粒子同士を固結させ、地盤の改良効果を得る方法である。一方反応の副産物として発生するアンモニア化学種による地下水源汚染の可能性は、本手法の問題点として挙げられる¹⁾。そこで本研究では、反応過程でアンモニア化学種が発生しない脱窒反応を利用した MICP 法に着目した。脱窒反応は、硝酸イオン (NO_3^-) や亜硝酸イオン (NO_2^-) などの窒素化合物を最終的に窒素ガス (N_2) にまで還元する反応である。脱窒反応に基づいたバイオミネラリゼーションに関わる反応を式 (2) に示す。



一方、脱窒反応は無酸素条件下で効率的に進行する。このため、表層土のような酸化的な環境にも適用可能な脱窒反応を利用した MICP 法を構築するためには、バイオミネラリゼーションが可能な好気性脱窒菌を取得する必要がある。本発表では、バイオミネラリゼーション能力を有する好気性脱窒菌の分離培養を行い、そのバイオミネラリゼーション能力の評価を行った結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 脱窒菌の分離培養

培養の植種源として用いた土試料は、和歌山工業高等専門学校の敷地内 (5 地点) から採取した。まず、それらを等量混合した土試料 25 g を 37 mM 酢酸ナトリウム、20 mM 硝酸カリウムなどを含む液体培地に添加し、25℃、暗所、90 rpm で振とう培養を行った。振とう培養開始 2 日目および 4 日目には、同じ組成の液体培地に培養液の植え継ぎを行った。そして、培養開始 6 日目に、前述の液体培地に pH 指示薬のプロモチモールブルーと寒天を加えた寒天培地に培養液を塗布し、25℃、暗所にて培養した。その後、脱窒反応による pH 上昇のために緑色から青色に変色した領域に形成されたコロニーを回収した。最後に、回収したコロニーを同組成の寒天培地を用いた画線培養に供し、出現したコロニーを分離して分離株とした。

2.2 分離株の 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた同定

分離株の微生物種を同定するため、16S rRNA 遺伝子配列の決定を行った。16S rRNA 遺伝子の Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による増幅は、B27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') と U1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') のプライマーセットを用いて行った。PCR 増幅産物の塩基配列の決定は、(株) MacroGen Japan の塩基配列解析受託サービスを利用して行った。得られた 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた分離株の同定は、近隣結合法による系統樹を作成することで行った。

2.3 分離株の NO_3^- -N 除去能力及びバイオミネラリゼーション能力の評価

分離株の NO_3^- -N 除去能力とバイオミネラリゼーション能力の評価は、 150 mg NO_3^- -N/L に対し、炭素窒素 (C/N) 比が 2、4、6、8、10 となるように酢酸カルシウムを加えた培地を用いて行った。実験では、Nutrient Broth (Bacto) にて前培養した分離株の培養液 ($\text{OD}_{600} = 0.3$) を終濃度で 1% となるように C/N 比が異なる前述の培地に添加し、 25°C 、暗所、90 rpm で 7 日間の振とう培養を行った。そして、培養開始直後と培養開始 7 日後の試料について、ブルシン法による NO_3^- -N 濃度の定量とコンパクトカルシウムイオンメータ (堀場製作所) による Ca^{2+} 濃度の定量を行い、 NO_3^- -N 除去量ならびに Ca^{2+} 沈殿量を調査した。 NO_3^- -N 除去量および Ca^{2+} 沈殿量が多かった C/N 比 = 6 の培地については、 NO_3^- -N 濃度、 Ca^{2+} 沈殿量、ならびに NO_2^- -N 濃度の経時変化を調査した。 NO_2^- -N 濃度の定量は、ナフチルエチレンジアミン法により行った。

3. 実験結果と考察

分離株の 16S rRNA 遺伝子配列情報に基づいた分子系統解析の結果より、分離株が *Acinetobacter* sp. であることが同定された。最も近縁な細菌種は、*Acinetobacter tandoii* DSM 14970 株 (遺伝子配列相同性: 99.2%) であった。培地中の NO_3^- -N 濃度と Ca^{2+} 濃度の変化からは、分離株が NO_3^- -N 除去能力ならびにバイオミネラリゼーション能力を持つことが示された。加えて、培地の C/N 比の違いによって NO_3^- -N 除去率及び Ca^{2+} 沈殿量に差が見られた (図 1)。この結果から、培地の C/N 比が NO_3^- -N 除去率ならびに Ca^{2+} 沈殿量に影響を及ぼす可能性が示された。続いて、C/N 比 = 6 の培地における NO_3^- -N、 NO_2^- -N 濃度、 Ca^{2+} 沈殿量の経時変化について調査した。 NO_3^- -N ならびに NO_2^- -N は、水質汚濁を引き起こすのみで無く、健康影響が認められていることから、脱窒反応が進行する過程で間隙水中に蓄積することは望ましく無い。経時変化の調査結果からは、 NO_2^- -N の蓄積を伴わずに NO_3^- -N をガス態の窒素化合物にまで還元できている可能性が示された (図 2)。これらの結果から本分離株を用いることで、環境負荷の低い MICP 法の構築が可能であると判断した。

参考文献

- 1) Leon A. van Paassen, *et al.* (2010) Potential soil reinforcement by biological denitrification., *Ecol. Eng.* 36: 168-175

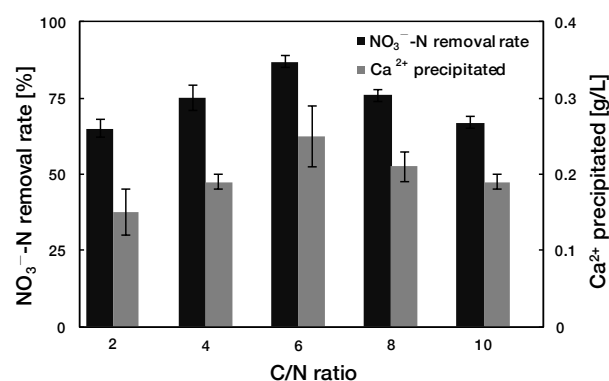


図 1 培地の C/N 比による NO_3^- -N 除去率と Ca^{2+} 沈殿量の違い。図中のエラーバーは、標準偏差を表す。

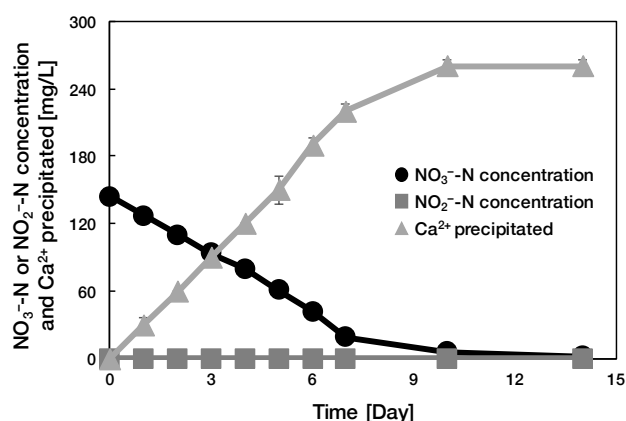


図 2 NO_3^- -N、 NO_2^- -N 濃度、 Ca^{2+} 沈殿量の経時変化 (C/N 比 = 6)