

(S4-25) 栄養塩注入に伴う油汚染サイトの微生物分解容量の変化

○宋徳君・田村和嗣・打木弘一・原 学・西島正範

基礎地盤コンサルタンツ株式会社

1. はじめに

油汚染土壌・地下水のバイオレメディエーションには、低コスト・低リスク・実サイトに対する最小攪乱など、大きな利点を有し、地下水揚水などと組み合わせによって環境修復の有効な技術として注目されている。

一方、実汚染サイトでは、汚染の浄化速度に影響する環境要因として、分解微生物の種類、バイオマス量及びその活性があげられ、それらは複雑な地下環境条件、例えば、土壌含水比、温度、pH、栄養塩条件、酸素及び他電子受容体の条件に支配されるため、浄化期間・浄化速度の予測に困難な場合が多い。室内実験などでは、汚染サイトの環境条件をすべて再現することは不可能のため、リアルタイムの分解微生物の動態把握、そして実際の分解速度の評価が困難な場合がほとんどである。

この課題を解決するためには、本研究では、汚染サイトに棲息する汚染物質分解を担う特定微生物の動態を原位置の状態で定量的に把握する手法として、培養を介さない土壌微生物群集の解析手法であるキノンプロファイル法を適用した。この手法によって油汚染サイトの原位置微生物群集構造とバイオマス量を測定し、同一サイトにおける自然状態の微生物分解容量の差異とその原因分析、さらに栄養塩注入による微生物分解容量の変化を評価した。

2. キノンプロファイル法による油分解菌の解析

2.1 キノンプロファイル法の概要

キノンプロファイル法は、微生物の呼吸鎖における電子伝達物質の一つであるキノンをバイオマーカーとする手法である。キノン量が微生物バイオマス量と高い相関を持つため、この方法は微生物バイオマスの定量性に優れている。多くの微生物が一優先キノン種を持つので大まかな分類学的解析も可能である。ただし、複数の属の微生物種が同一キノン種を持つので、微生物種レベルでの解析は困難である。

キノンは、微生物の呼吸鎖における電子伝達物質の一つであり、ユビキノン(UQ)、メナキノン(MK)、プラストキノン(PQ)、ビタミンK1(VK1;フィロキノン)等がある。土壌微生物は主に

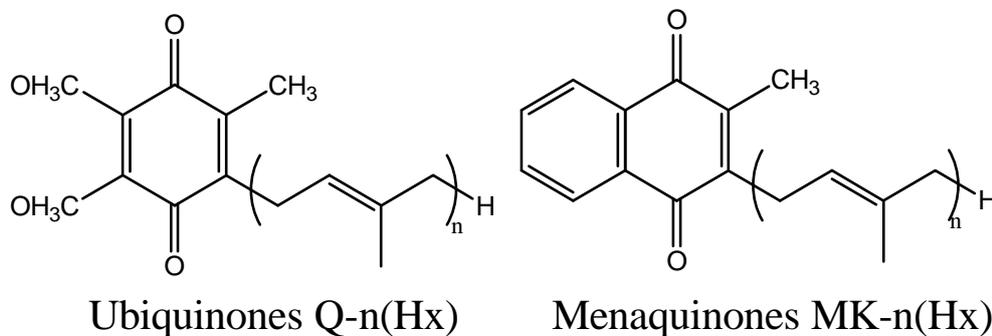


図-1 土壌微生物のイソプレノイドキノンの化学構造

UQとMKの2種類を保有し(図-1)、一般にUQは主に好気呼吸、MKは主に嫌気呼吸に用いられている¹²⁾。ただし、絶対好気性のActinobacteriaの多くはMKを有する。キノン分子の側鎖の数によりUQが4-5種類、MKが20数種類あり、混合微生物群集のキノンプロファイルを測定することによって、構成微生物種を20数グループ程度の分類群に分けて大まかに推測することが可能である。キノン種数は微生物群集構造の多様性、キノン量は微生物バイオマス量をそれぞれ反映する。キノン分析は脂質成分の化学分析であるため、再現性・定量性に優れ、キノン組成の変化は微生物群集構造の変化とみなせる¹²⁾。キノンプロファイルの特徴を表す指標には、(1)キノン種の種類数；(2)優先キノン種とその存在比；(3)キノン種の多様性指数；(4)キノン量等が挙げられる。汚染土壌中の微生物群集の解析では、キノン量、優先キノン種の変化は特に重要である。実サイトでの分解速度の定量評価に必要な分解微生物の増殖速度、微生物量の情報を提供することが可能である。

Changes in the microbial degradation capacities of oil-contaminated site during nutrient injection

Dejun Song, Kazutsugu Tamura, Kouichi Utsugi, Manabu Hara, Masanori Nishijima (Kiso-jiban Consultants Co.,Ltd.)

連絡先：〒135-0016 東京都江東区東陽 3-22-6 基礎地盤コンサルタンツ株式会社

TEL 03-5632-6827 FAX 03-5632-6816 E-mail song.dejun@kiso.co.jp

2.2 油分解微生物のキノンプロファイル

キノンプロファイル法は、最近に石油系汚染土壌地下水の微生物バイオマーカーとしての研究が報告され、その有効性が実証された⁴⁾⁵⁾。これらの研究によると、油分解微生物の保有キノン種は、表-1 に示す。また、キノンプロファイル法は、定量性に優れる化学分析手法であるため、実際の応用に際しては、操作性・低コスト・迅速さの面においても工学的に優位性を有すると考えられる。油汚染サイトでの微生物群集解析の目的は、分解速度・浄化期間を予測して浄化システムの設計を行うことである。そのため、汚染物質の分解に関わる微生物量と活性を把握できれば、十分に工学的な意義がある。

表-1 油分解菌とそれらの保有キノン種一覧表

Microorganisms that degrading	Genus & Species	Possessed quinone species
Both saturate and aromatic HCs	<i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , yeast, <i>Rhodococcus sp.</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>	Q-8,Q-9,Q-10(H2), MK8-(H2),MK-9(H2)
Saturates HCs only	<i>Arthrobacter</i>	MK-9
Aromatics HCs only	<i>Sphingomonas spp.</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Nocardia</i>	Q-10,MK-7,MK-8(H4)

3. 自然状態の微生物分解容量

対象汚染サイトは、シルト質砂、粘性土及び細砂の互層の地質で、地下水深は 1.0～1.5m 程度である。ガソリン漏洩事故による土壌地下水の油汚染が発生し、その浄化が課題であった。現場は給油所として引き続き営業すること、地下水流れ（1A は最下流側）によって給油所敷地の半分以上の範囲（図-2）に汚染が広がったことから、原位置微生物修復対策の可能性を検討することになった。汚染領域のボーリング調査で土試料を採取し、それを用いて土壌中のキノンプロファイル分析を実施し、現状の油分解微生物の存在と定量化を行った。現時点では、不飽和帯～飽和帯にかけ油分が検出され、特に地下水変動範囲内（1.0m 前後）において油分濃度が数百～3000 mg/kg と高い。自然状態の微生物分解容量については、キノンプロファイル法によって測定した結果、総キノン量は、未汚染土では 0.009～0.023 μmol/kg に対して、汚染土壌では 0.101～4.639 μmol/kg であった。そのうち、油分解菌のキノン量(0.06～3.48 μmol/kg) から推定される微生物分解容量⁶⁾⁷⁾は、3.0～180mg/kg と推定されている。したがって、当サ

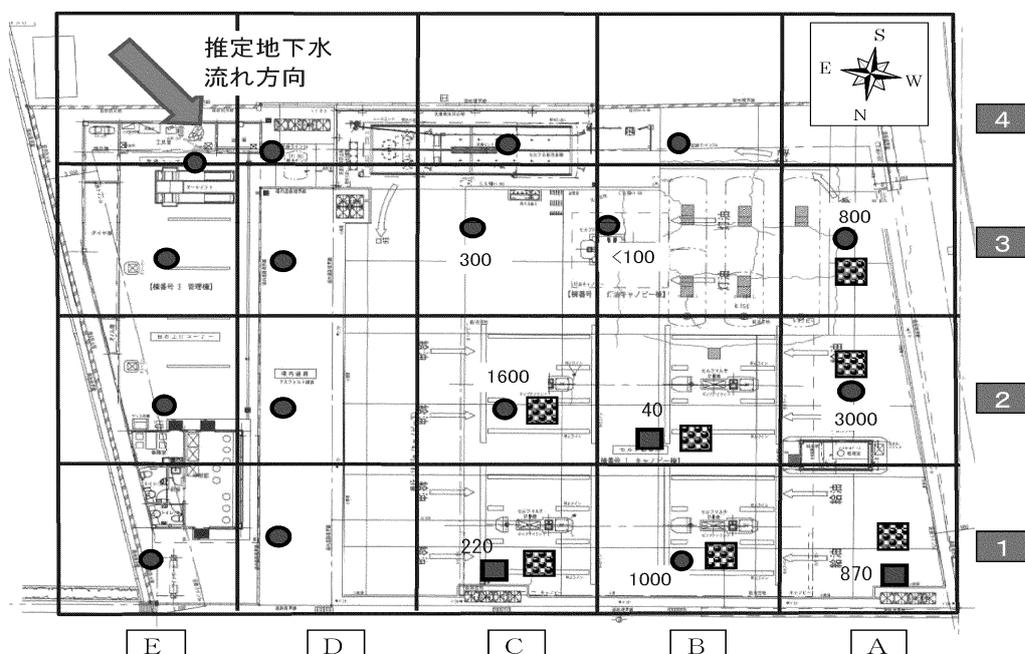


図-2 サイトの汚染状況調査地点と調査結果（数値はTPH測定結果；大き目の四角記号は注入マス）

表-2 代表地点の汚染濃度、微生物量と栄養条件

地点	土壌中油分濃度 (mg/kg)	地下水中ベンゼン濃度 (mg/L)	キノン量 (umol/kg)		優勢キノン種	栄養成分等 (mg/)			
			総量	油分解菌保有		N	P	K	Fe ²⁺
3E	< 10	<0.001	0.023	0.012	MK-8	---	---	---	---
1A	870	4.10	0.172	0.120	MK-7	---	---	---	---
1B	1,000	<0.001	0.293	0.146	MK-8	3.1	0.26	3	10
2A	3,000	0.44	4.639	3.480	Q-8	0.92	0.08	2.2	0.29

現状の油分解微生物の存在と定量化を行った。現時点では、不飽和帯～飽和帯にかけ油分が検出され、特に地下水変動範囲内（1.0m 前後）において油分濃度が数百～3000 mg/kg と高い。自然状態の微生物分解容量については、キノンプロファイル法によって測定した結果、総キノン量は、未汚染土では 0.009～0.023 μmol/kg に対して、汚染土壌では 0.101～4.639 μmol/kg であった。そのうち、油分解菌のキノン量(0.06～3.48 μmol/kg) から推定される微生物分解容量⁶⁾⁷⁾は、3.0～180mg/kg と推定されている。したがって、当サ

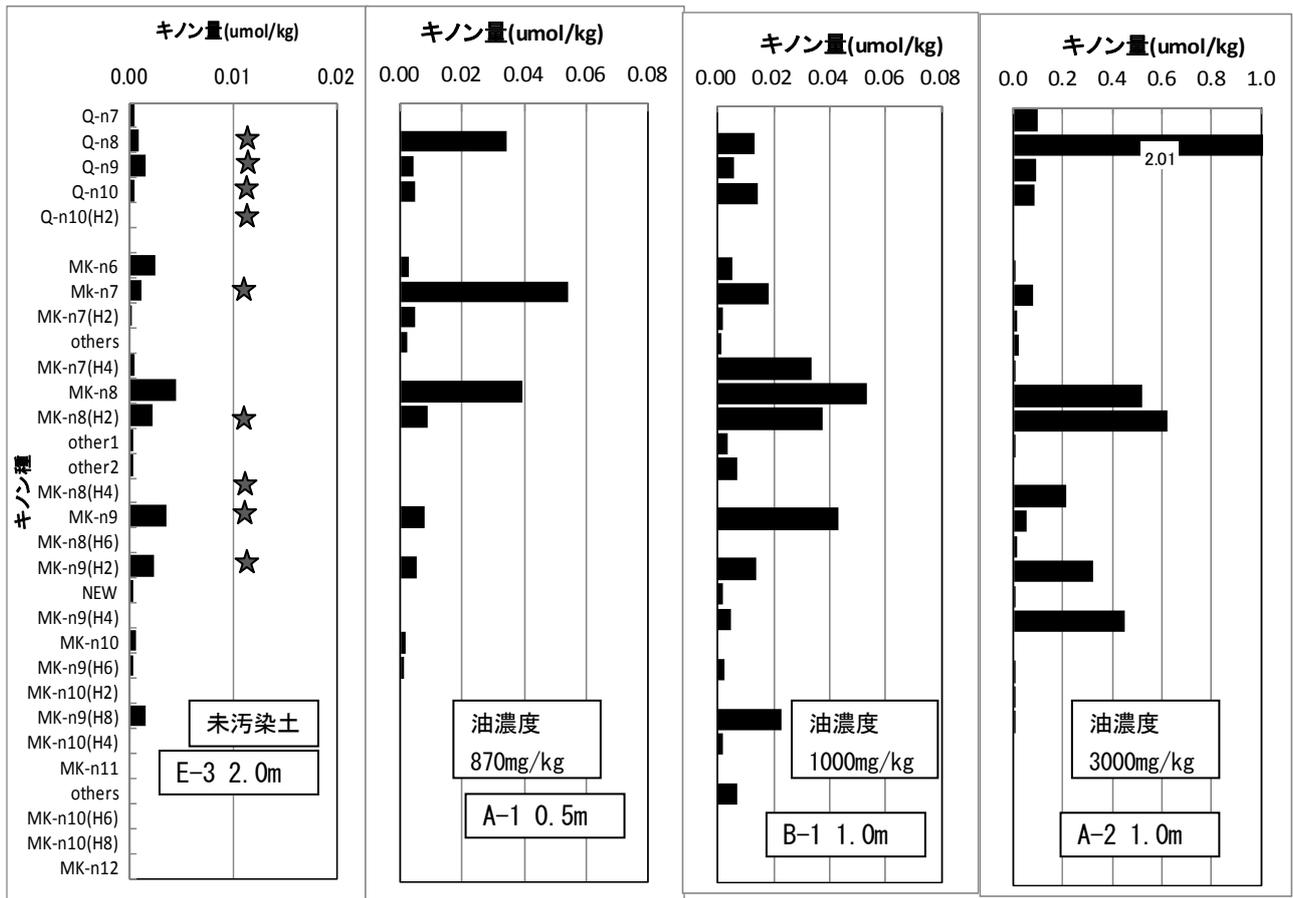


図-3 代表地点のキノプロファイル分析結果 (★は油分解菌保有キノン種)

イトでは、油汚染によって油分解菌の増殖が確認され、その増加量は未汚染土の5倍～350倍と推定される。汚染土中の分解菌のバイオマス量は、油濃度の影響を受けることが報告されている⁴⁾⁵⁾⁷⁾。一般に阻害濃度以下の類似環境条件下では、分解菌のバイオマス量が油濃度に正比例する。今回の調査では、2A地点の不飽和土試料の総キノン量が最も大きく、4.639 $\mu\text{mol/kg}$ にも達している。その他の地点では、総キノン量が0.2～0.3 $\mu\text{mol/kg}$ 程度であった(図-3)この差異については、土壌の栄養条件と酸素供給条件の面から検討するために、土壌中の栄養塩成分、N、P、K及び2価鉄を調査した。その結果、1B地点では栄養塩成分が十分であったが、2価鉄の濃度が高く、嫌気状態にある。これに対して、2A地点は栄養塩状態が1Bより劣るものの、タンク周辺の透水性良好な埋め戻し砂で好気状態にあるため、キノン量が最も高く、その内好気性分解菌(Q-8保有)が優勢である(表-2)。このサイト微生物測定結果から、酸素条件と栄養塩条件の改善が油分解速度促進に効果的と判断した。

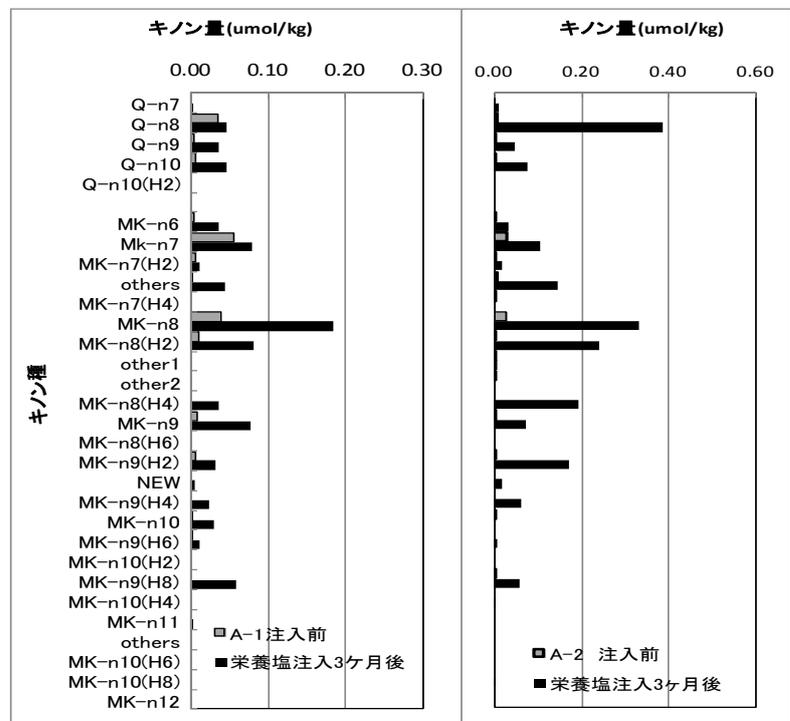


図-4 栄養塩注入前後のキノン種と量の変化

4. 栄養塩注入による微生物分解容量の変化

N、P、Kを含む栄養塩水を観測井戸と注入マスから定期的に注入した(1～2回/月)。微生物群集構造の変

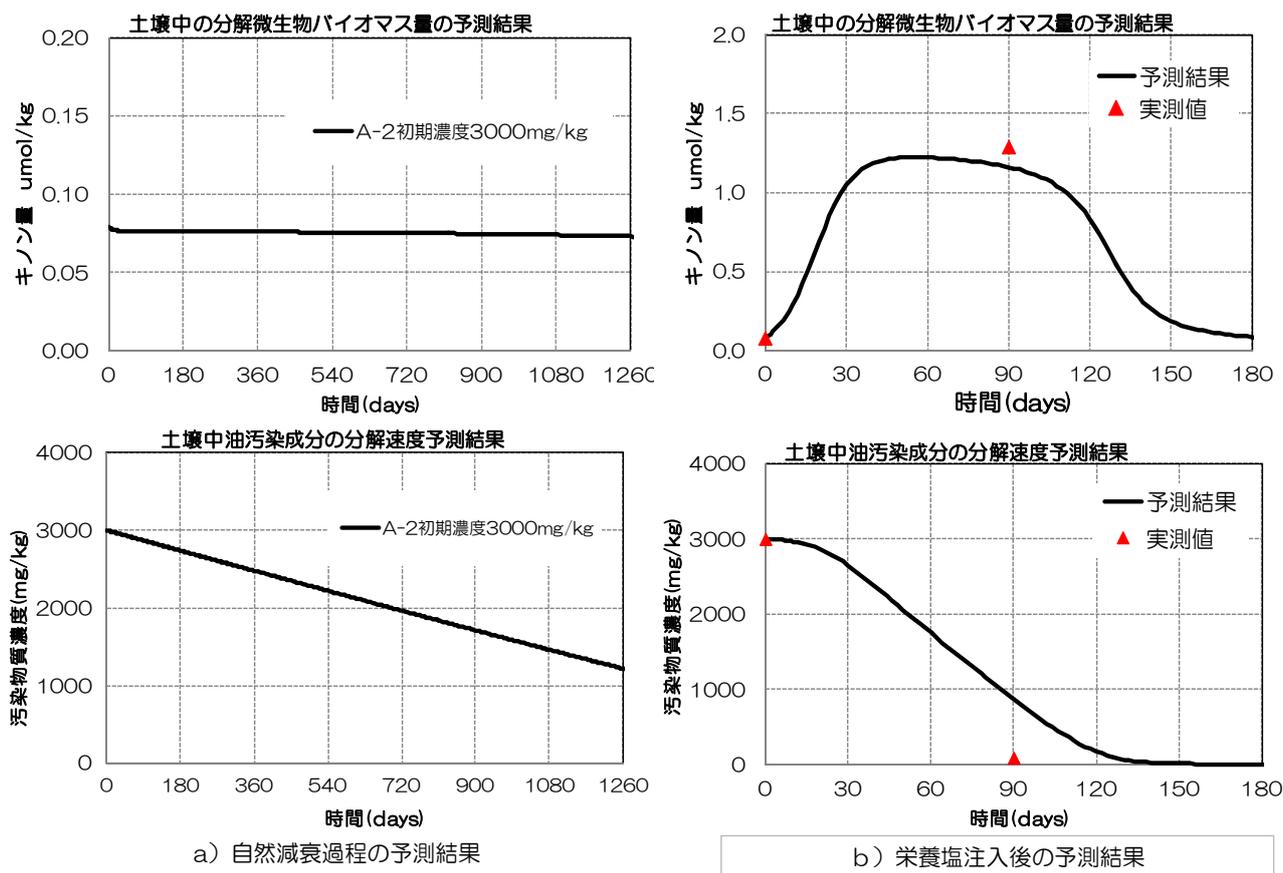


図-5 A-2 地点の栄養塩注入による微生物量と油分解速度の予測結果の比較

化を観察するため、A-1 と A-2 にある注入マスを対象に、注入前と注入開始3カ月後の土を採取して、キノン分析を行った。その結果を図-4 に示す。栄養塩注入により、キノン量が全体的に増加し、特に油分解菌の保有キノン量が A-1 地点で約 4 倍、A-2 地点では約 16 倍が増加した。いずれの地点でも、油分濃度が 100 mg/kg 以下となった。

5. 栄養塩注入効果の評価

土壌微生物のほとんどは土粒子に付着し、そのバイオマスの経時変化は汚染物質に対する応答であるため、特異的微生物のバイオマス量の増加は、その場所の土壌中汚染物質の分解に伴う分解微生物増殖の確固たる証拠となる。キノンプロファイルの変化に基づく分解速度予測モデル⁶⁾により、油分解速度を予測した。栄養塩注入により、浄化速度が大幅に向上することが明らかになった。

参考文献

1. Katayama A, Fujie K(2000), Characterization of soil microbiota with quinone profile. In: Bollag JM, Stotzky G (eds) Soil Biochemistry. Vol. 10. Marcel Dekker, New York, 303-347.
2. 片山新太(2000), 土壌中の農薬分解に関与する微生物群の構造と挙動, 日本農薬学会誌, 25, 300-309.
3. Saitou, K, Nagasaki, K, Yamakawa, H, Hu, H-Y, Fujie, K, Katayama, A(1999), Linear relation between the amount of respiratory quinones and the microbial biomass in soil, *Soil Sci Plant Nutr.*, 45, 775-778.
4. 宋徳君, 安田剛, 片山新太(2003), キノン組成法による石油系炭化水素汚染土の微生物群集構造の解析, 第38回地盤工学研究発表会講演概要集, 2382-2383.
5. Song, D., and Katayama, A.(2005), Monitoring microbial community in a subsurface soil contaminated with hydrocarbons by quinone profile. *Chemosphere*, 59, 305-314.
6. Song, D., and Katayama, A.(2010), Approach for Estimating Microbial Growth and the Biodegradation of Hydrocarbon Contaminants in Subsoil Based on Field Measurements: 1. Model Development and Verification, *Environ. Sci. Technol.* 44, 767-773.
7. Song, D., Kitamura, M. and Katayama, A.(2010), Approach for Estimating Microbial Growth and the Biodegradation of Hydrocarbon Contaminants in Subsoil Based on Field Measurements: 2. Application in a Field Lysimeter Experiment, *Environ. Sci. Technol.* 44, 6795-6801.