

大成建設(株) 技術研究所 正会員 高畑 陽 正会員 大場美保 正会員 帆秋利洋 鈴木朝香
 大成建設(株) エンジニアリング本部 正会員 岡田和夫 牧野秀和

1. はじめに

石油汚染土壌のバイオレメディエーションによる浄化工事では、石油成分以外にも様々な項目に関してモニタリングを行い、工程管理を行う必要がある。また、栄養塩や菌体の投与による浄化工事を実施する場合は、工事終了後にこれらの物質が環境に悪影響を及ぼさないようにモニタリングすることが要求される。

栄養塩の汚染土壌への投与は石油分解菌の活性を高めるために有効であるが、過度の投与は周辺地下水の水質汚濁を引き起こすだけでなく、微生物の増殖阻害を引き起こすことも知られている¹⁾。そこで、本石油汚染土壌のバイオレメディエーションでは、投与する最適栄養塩量を事前に決定し、投与後の窒素・リンの挙動について調べた。

一方、石油分解菌のモニタリングは、浄化期間中の分解菌の活性を維持し、増殖阻害による活性低下などに対して迅速に対応するために重要である。しかしながら、培養法による石油分解菌のモニタリングは用いる培地により検出される菌が選択される問題がある。したがって、石油分解菌を培養法によりモニタリングするためには、実汚染土壌中で優占して油分の分解を行う微生物を検出できる培地を用いることが重要である。本報では、多種多様な微生物群(コンソーシア)の微生物相について解析可能な遺伝子解析手法(PCR-DGGE法)を用いて、実汚染土壌で分解に寄与する石油分解菌の検出に適した培地について検討した。

2. 実験方法および浄化工事のモニタリング方法

2.1 窒素・リンの最適投入量の決定

施工対象土壌に投与する、最適窒素・リン量を決定するため、実汚染土壌1gに図-1で示した所定量の窒素(NH_4NO_3)およびリン(K_2HPO_4 , KH_2PO_4)を投与し、滅菌蒸留水を用いて10倍量に希釈した後、ブチルゴム栓付きの試験管で5日間培養後、気相部の酸素濃度をガスクロマトグラフィーにより測定し、微生物による酸素消費量を算出した。

2.2 呼吸商、窒素・リン、および菌体のモニタリング

土壌中の分解菌の活性を把握する手法として、汚染サイトでの呼吸商の測定が迅速かつ簡単に行える方法を採用した。呼吸商は、ブローを停止した12時間後に土中50cm地点での酸素消費量および二酸化炭素生成量を検知管を用いて測定することにより求めた。窒素・リンの土壌からの水溶出量および土壌中の菌数は、汚染土壌を採取し、滅菌蒸留水により10倍量に希釈して強振とう後の上澄み液を測定対象試料とした。DTN(溶存性全窒素)およびDTP(溶存性全リン)の測定は、上澄み液を0.2 μm のフィルターを用いて濾過後、同量の分解液(2%ペルオキシ2硫酸カリウム+0.3%水酸化ナトリウム溶液)を用いて分解後、イオンクロマトグラフ法およびモリブデン酸青吸光度法により測定した。

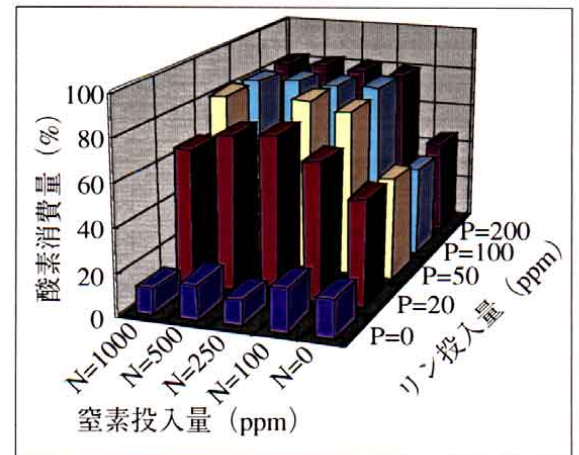


図-1 窒素・リンの投入量による酸素消費量

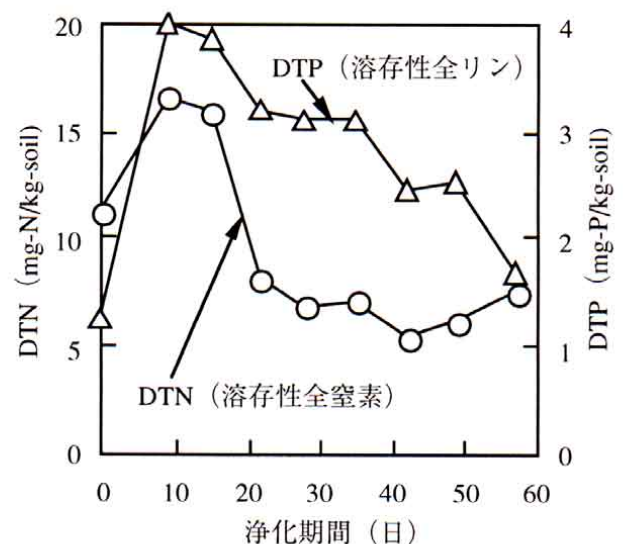


図-2 窒素・リンの土壌からの水溶出量の経時変化

上澄み液中の全菌数はAODC法²⁾、軽油分解菌数およびA重油分解菌数は最確値3本法(MPN法)によって求めた³⁾。

2.3 PCR-DGGE法による微生物コンソーシアの菌相解析
 ガソリン、灯油、軽油、A重油、原油、および汚染土壌よりクロロホルムで抽出した実汚染油を単一の炭素源とした培地に土壌からの上澄み液を植菌し、7日間培養を行った。培養後、増殖した微生物コンソーシアからゲノムDNAを抽出し、16S rDNA遺伝子のV3 regionのDNA断片をPCRにより増幅し、増幅産物をDGGE法によって解析した²⁾。

キーワード：石油汚染土壌、バイオレメディエーション、栄養塩投与、石油分解菌、PCR-DGGE

連絡先：〒275-0024 習志野市茜浜3-6-2 大成建設(株)技術研究所 自然環境部 生物学研究室

TEL: 047-453-3901 FAX: 047-453-3910 e-mail: yoh.takahata@sakura.taisei.co.jp

3. 結果および考察

3.1 窒素・リンの最適投入量の決定と投与後のモニタリング

窒素・リンの投入量による酸素消費量を図-1に示す。これより汚染土壌中の微生物の増殖制限物質はリンであると考えられた。また、窒素250ppm、リン50ppmが、これ以上に投与しても微生物活性に変化が見られない最適投入量と決定した。土壌からの窒素・リンの溶出量は、初期汚染土壌に対して投与直後は大きく上昇したが、浄化工事期間中に初期濃度前後まで減少し、浄化工事終了後に地下水汚染等を引き起こす可能性は少ないと判断された(図-2)。

3.2 浄化工事期間における微生物モニタリング

呼吸商の測定結果から、土壌中の酸素消費量は浄化開始から徐々に増加し、工事開始から35、42日目では12時間では土中の酸素が消費され、微生物の高い増殖活性が確認された(図-3)。また、二酸化炭素の発生量も酸素の消費量と相関が見られた(図-3)。

直接計数法および培養法による微生物のモニタリング結果を図-4に示す。石油分解菌を検出用の培地として、実汚染土壌がガソリン、軽油、A重油による汚染履歴があることより、揮発性の高いガソリンを除いた軽油およびA重油を単一の炭素源として生菌数を測定した。全菌数は浄化期間を通じてわずかに増加しているが大きな変動は見られなかった。A重油分解菌は浄化工事30日以降に急激な増加が確認され、浄化工事前と比較して菌数は終了時に約30倍に増加した。一方、軽油分解菌はA重油分解菌と比較して約1/100以下の検出量にとどまり、浄化期間中の有為な変動も確認されなかった。

3.3 PCR-DGGE法による微生物コンソーシアの菌相解析

異なる石油製品を単一の炭素源に持つ培地で増殖した石油分解菌コンソーシアをPCR-DGGE法により解析した結果を図-5に示す。この結果、AやDで示されるDNA断片は各石油製品に共通して増殖した石油分解菌由来のものと推察される。一方、実汚染油で増殖した石油分解菌コンソーシアから得られたDNA断片は6本確認されたが、Hで示されるDNA断片を除いた5本のDNA断片は、A重油を炭素源とする培地で増殖したコンソーシアと同様の位置に出現することが確認された。一方、軽油を炭素源として増殖したコンソーシアからはA重油では確認されたB、C、Fで示されるDNA断片が確認されなかった。したがって、図-4の結果と併せて、A重油を単一の炭素源とした培地が、本浄化工事で増殖に寄与する石油分解菌を最も的確に検出できると考えられた。

4. まとめ

窒素・リンの最適な投入量を浄化工事以前に決定することにより、窒素・リンの必要最小限の投入によるコストダウンに貢献するだけでなく、周辺の環境への汚染防止にも有効であることが示された。また、石油分解菌の培養法によるモニタリングでは、実汚染土壌中で分解に寄与するコンソーシアを評価できる培地を使用することが重要であり、その検出法としてPCR-DGGE法が有効であることが示された。土壌中の栄養塩の存在量や汚染石油成分の分解に寄与する分解菌の種類は、個々の石油汚染土壌中で異なると考えられる。したがって、バイオレメディエーションによる浄化工事を行うためには、対象とする汚染土壌に適した栄養塩の投入量や石油分解菌のモニタリング手法を検討することが重要であると考えられた。

5. 参考文献

- 1) 谷口ら、第51回土木学会年次講演会要旨、p.138-139(1996)
- 2) 高畑ら、第34回日本水環境学会年会講演集、p.412(2000)
- 3) 鈴木ら、大成建設技術研究所報、第28号、p.387-392(1995)

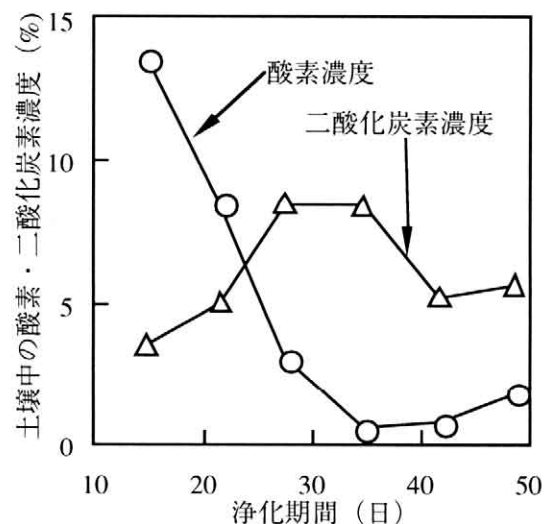


図-3 ブロア停止後の土壌中のO₂・CO₂の経時変化

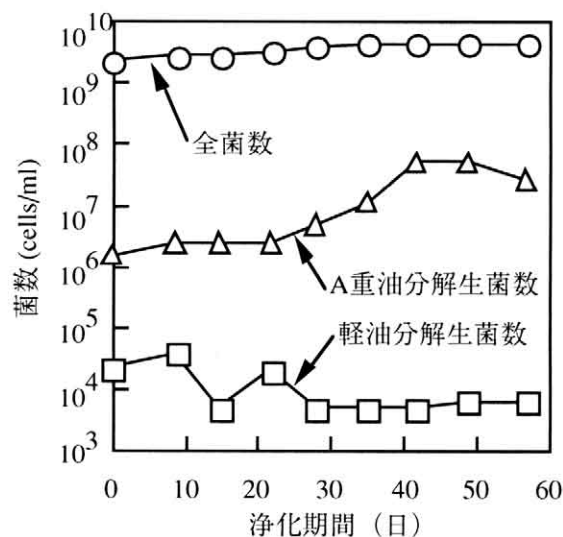


図-4 全菌数および生菌数の経時変化

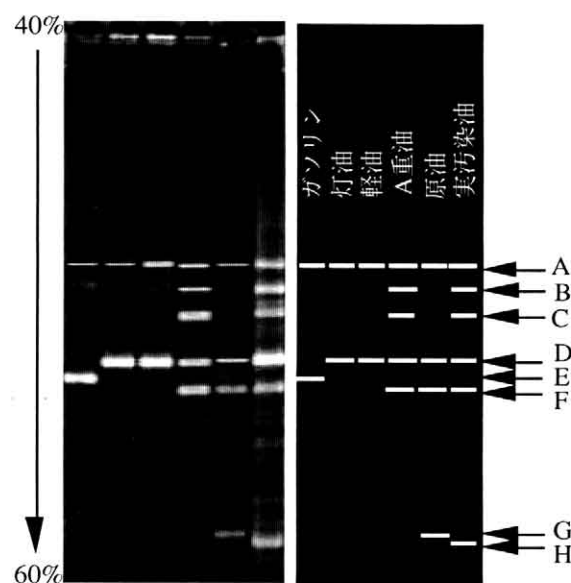


図-5 PCR-DGGE法による石油製品および土壌から抽出された実汚染油を単一の炭素源とする培地で増殖した微生物コンソーシアの菌相解析