

# 石油汚染土壌のバイオレメディエーションにおける 微生物群集の動態解析

横堀 加奈里・鴻野 雅一(株式会社バイオレンジャーズ)・内海 真生(筑波大学農林工学系)

## 1. はじめに

近年、有害物質で汚染された土壌や地下水を浄化する技術として、微生物を利用した修復技術であるバイオレメディエーションが注目されている。バイオレメディエーションには、土着の分解菌を活性化して分解を促進するバイオスティミュレーションと、新たに強力な分解菌を導入するバイオオーギュメンテーションがある。我々はバイオオーギュメンテーション(米国 Oppenheimer Biotechnology 社製の微生物製剤を使用)を適用し、国内において既に数十件の実績がある。しかしながら環境や生態系への影響を懸念し、添加した微生物の挙動を明らかにすることを求められることがある。ところが生態系への影響評価すなわちバイオレメディエーションの安全性に対する評価方法についてはまだ十分な議論には至っておらず、そのために適用を躊躇しバイオレメディエーションの普及を妨げる一因となっている。特に、バイオオーギュメンテーションの適用に当たっては、導入微生物の挙動に関してより厳しい評価を求められる傾向にある。ちなみに導入する微生物は 遺伝子組換え体でないこと 病原菌が含まれていないことが前提であり、当然我々の用いる微生物製剤はこれをクリアするものである。

本研究では、バイオレメディエーション(バイオスティミュレーション及びバイオオーギュメンテーション)の実施に伴う微生物群集構造変化を追跡することにより、適用時の微生物生態系への影響を把握することを目的とする。実汚染土を用いて作成したモデル系において、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法により、微生物群集構造を定性的に解析する。さらに、直接検鏡法(蛍光染色法)を用い、全細菌数(EB法)、石油分解菌数(石油DVC法)を測定し、微生物群集の動態を定量的に追跡する。これらを組み合わせることによって微生物群集の動態変化を定性的・定量的に解析し、微生物生態系に与える影響を評価する。

## 2. 実験方法

### (1) 供試土壌

昭和シェル石油株式会社中央研究所より供与いただいた汚染土壌を用いた。汚染土壌のGCクロマトグラムを図1に示す。土壌は砂質土であり、2mmのふるいに通し、実験に供した。

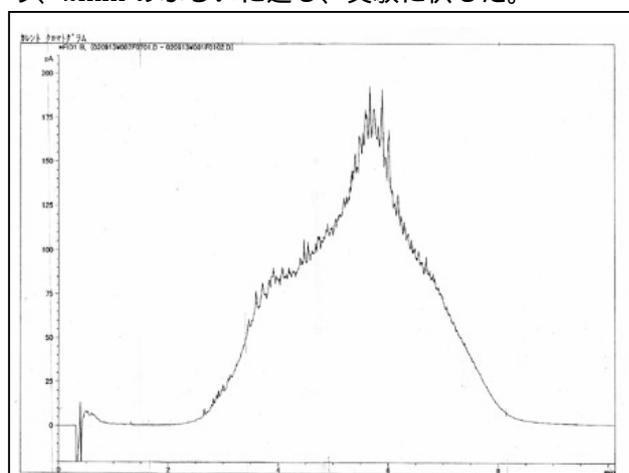


図1 汚染油のGCクロマトグラム

### (2) 実験系

バイオレメディエーションのモデル系として以下の4つの系を設けた。それぞれの系につき2連で作成した。

- ・ 無添加区(コントロール区)(C)
- ・ 栄養剤添加区(スティミュレーション区)(N)
- ・ 栄養剤+微生物製剤担体(珪藻土)添加区(オーギュメンテーション・コントロール区)(NC)
- ・ 栄養剤+微生物製剤添加区(オーギュメンテーション区)(NT)

栄養剤として、BioNutrients(株)バイオレンジャーズ社製)を、微生物製剤として、Terrazyme(Oppenheimer Biotechnology 社製)をそれぞれ添加した。土壌各2kgを滅菌したステンレス製深型バットにいれ、栄養剤は水溶液で、微生物製剤は粉末で各バットに一定量入れ、よく攪拌した後、穴を開けたアルミホイルで蓋をした。

### (3) 養生

実験系土壌を室温で2ヶ月間(56日間)養生した。養生期間は適宜除菌水を添加し含水率を一定に保つようにした。14日毎に、土壌サンプリングを行い、同時に葉さじによる各試料の撈拌を行った。なお撈拌については週に1回の頻度で行った。

### (4) サンプリング項目と測定方法

#### 4.1 油分のモニタリング

試験開始時(0日)、14日後、28日後、56日後において試料土壌の油分測定を行った。四塩化炭素(油分測定用;Wako)で共洗いしたバイヤルピンに土壌5.0gをとり、四塩化炭素10mlを加え表面をテフロン加工したブチルゴム栓とアルミニウムキャップで密栓して、2時間以上振とうすることで抽出液を得た。これをそのままFT-IRに供したものを総油分、フロリジルカラムによる前処理を施した後、FT-IRに供したものを鉱物油分とした。

前処理として、抽出は筑波大学で、カラム処理は(株)SVC東京に委託した。FT-IR分析については、筑波大学および外部分析機関に委託した。FT-IRの検量線はOCB標準溶液にて作成したものをを用いた。

#### 4.2 微生物動態解析

##### 全細菌数および石油資化性菌数

全細菌数：土壌5gを除菌水45mlに懸濁し(10倍希釈)、超音波をかけて分散処理をした。これをさらに10倍に希釈し試料とした。

この土壌希釈液を0.2μmブラックタイプヌクレポアフィルターに捕集しエチジウムブロミド溶液(100μg/ml)で染色した。染色したフィルターはスライドガラスに移し、カバーガラスとイマージョンオイルで封入した。B励起の蛍光顕微鏡で観察し、10×10の方眼接眼マイクロメーター視野内の細菌数をカウントした。1試料につき2枚のプレパラートを作成し、それぞれについて10視野の計測値の平均を求めた。細菌数は次式により求めた。

$$N = n \cdot A / a \cdot v \cdot d \cdot w \quad \dots (1)$$

N: 試料単位体積あたりの細菌数

(cells/g dry soil)

n: 視野あたりの平均値

A: フィルターの有効濾過面積(mm<sup>2</sup>)

a: 視野面積(mm<sup>2</sup>)

v: 染色液量(ml)

d: 土壌希釈率

w: 乾燥重量比(乾土重/湿土重)

石油資化性菌数(石油DVC): 上記で作成した土壌希釈液をマイクロチューブにとり、10% DMSO溶液、除菌水で遠心洗浄して内在性の有機物を除去した。これに核酸合成阻害剤(ナリジクス酸(20μg/ml)、ピペミド酸(10μg/ml)、ピロミド酸(10μg/ml)、セファレキシン(10μg/ml)、シプオロフルオサキシン(0.5μg/ml))および基質として軽油1,000(mg/L超音波にてエマルジョン化したもの)、栄養剤(BioNutrients)を添加し、室温で一昼夜インキュベートした。この試料を全細菌数と同様に染色し、蛍光顕微鏡下で伸長、肥大した細菌を与えた基質(軽油)を資化して菌体合成を行うことの出来る細菌(石油資化性菌)として計数した。

##### 遺伝子解析(PCR-DGGE法)

各試料土壌中の全ての細菌から均等に全DNAを抽出するためビーズによる物理破砕法 First DNA Kit for Soil (Bio 101 Inc.)を用いた。各土壌試料0.5gを相互のコンタミンに注意しながらマニュアルに従い全DNA抽出し、エタノール沈殿処理により抽出DNAを精製した。抽出した各DNAサンプルについて357F-GC(E. coliの16S rDNA塩基配列番号341-357)と518R(同518-534)のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。PCR反応条件として、アニーリング温度を高め温度から徐々に下げていくことで非特異的増幅を減少させる“Touch down”反応を用いた。各DNAサンプルのPCR産物の精製を行った後、全てのサンプルのPCR産物のDNA濃度がほぼ一定になるように濃度調整を行い、DGGE用試料とした。

DGGEはD Code System(BIO-RAD)を用い行った。各PCR産物200ngをアプライし、両サイドに既知菌株の16S rDNAより作成したDGGE用マーカをアプライした後電気泳動を行った。電気泳動終了後、染色したゲルについてポラロイドカメラを用いて泳動像を撮影した。DGGE電気泳動は、サンプル番号の奇数と偶数のそれぞれについて行った。

DGGEのバンドパターンから得られた情報を

基に、微生物群集構造変化の潜在的特徴を把握するため主成分分析（PCA）を行った。

#### 4.3 環境測定

土壤環境把握のため pH、含水率を測定した。pH は土壌 5g を秤量し、12.5ml の水を加え 10 分間振とう後、30 分静置した上澄みの pH を pH メーターで測定した。含水率は土壌 5g を秤量し、105 度のオーブンで一晩乾燥し、得られた乾燥重量と湿重量から算出した。

### 3. 結果と考察

#### (1) 油分の変化

油分の初期値の平均は、総油分 2,661 mg/kg、鉱物油分 733 mg/kg であった。それぞれの油分変化率の推移を図 2 と図 3 に示す。

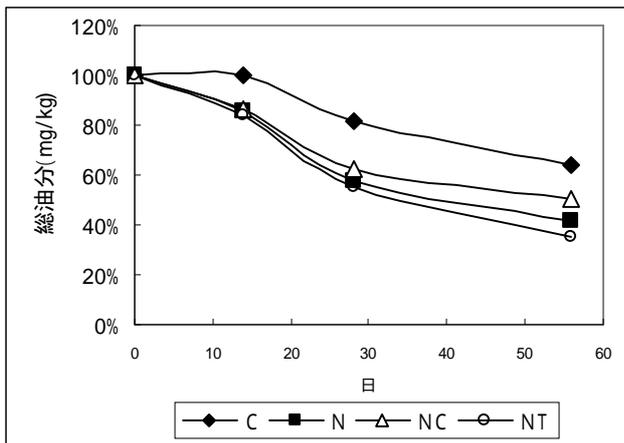


図 2 総油分濃度の変化率

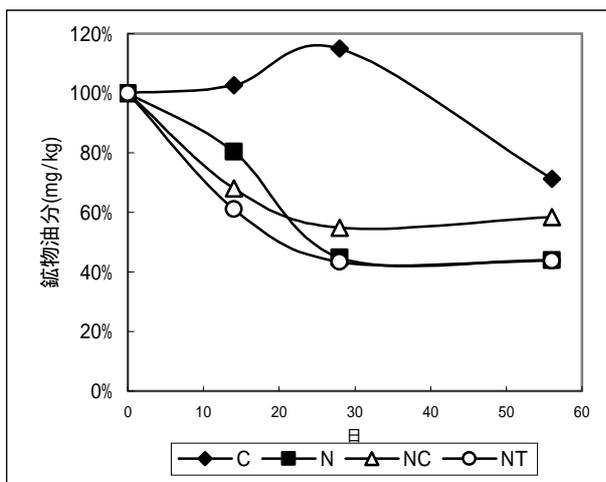


図 3 鉱物油分の変化率

当初、総油分ではスティミュレーション区(以下N区)・オーギュメンテーションコントロール

区(以下NC区)・オーギュメンテーション区(以下NT区)の系間で差は見られなかったが、最終的にはNT区が最も減少した(消失率65%)。

一方鉱物油分では、最初の14日後には、NT区において最も早い減少が認められ、添加28日で分解は終了している。

また製剤の担体(微生物なし)を添加したNC区においては、添加した製剤担体(珪藻土)に油が吸着されたために、微生物との接触が阻害され、他の栄養剤添加の系よりも低い減少率が観察されたと思われる。NT区で添加している微生物製剤は担体に分解微生物が予め吸着しているため、担体に取り込まれた油もこれらの微生物によって速やかに分解される。

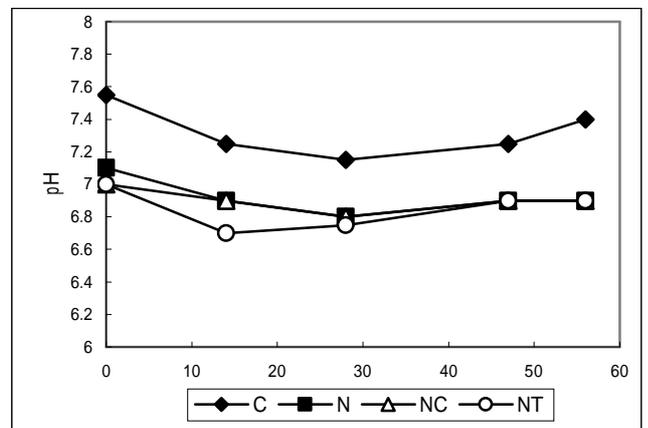


図 4 pH の変化

また、pH の変化を図 4 に示した。14 日後に NT 区において最も pH が下がる傾向が見られ、その後他の N、NC 区と同程度になった。これは、微生物製剤添加直後において鉱物油が分解し、脂肪酸などへ変換されたため一時的な pH 低下が引き起こされたものと推察される。なお添加直後にコントロール区(C)に比べ栄養剤添加の区(N)(NC)(NT)において低い pH が測定されたが、これは添加栄養剤の影響によるものと思われる。

以上の結果より、NT 区では初期段階で鉱物油分の分解が進み、その後総油分としての減少が進んだものと推察された。これは、比較的難分解性分である鉱物油を添加した分解菌の働きにより急速に分解された後、これらの微生物によって変換された易分解性の分解生成物の消費が進んだものと解釈できる。

今回の試料は油分濃度が比較的低かったため、試料間の減少量に顕著な差が現れにくかったものの、微生物製剤を添加した系で効果が認められた。また、総油分と鉱物油分との間での減少パターンにタイムラグが見られた。初期に鉱物油の分解が起きれば、その後の総油分の分解は進行する。バイオレメディエーションでモニタリングする油の種類・濃度についても熟考が必要であろう。

## (2) 微生物の動態変化

### 2.1 細菌数の変化

2ヶ月間の細菌数の変化を図5と図6に示す。コントロール区では全細菌数、石油資化性菌ともに変化は見られなかった。

当初、オーギュメンテーション区（NT区）では最も高い菌数を計測したが、47日後には他の栄養剤添加区（N区およびNC区）のピークと同程度になり、試験終了時（56日後）にはこれらの3つの区的全細菌数では、ほぼ同じ数に集束した。

石油資化性菌数については、N、NC、NT区とも14日後にピークを迎え、微生物製剤を添加したNT区で最も高い菌数を得、当初の約7倍となった。

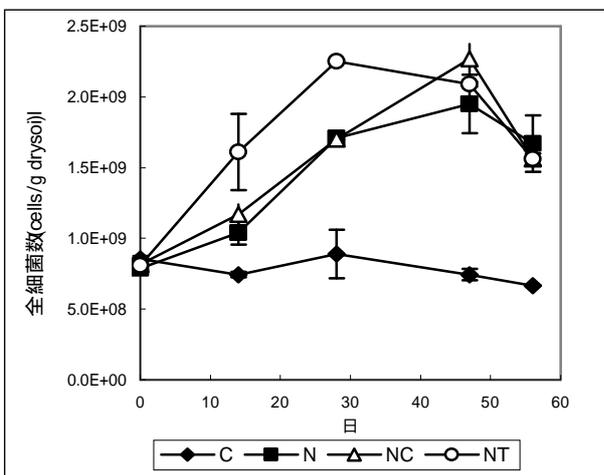


図5 全細菌数の変化

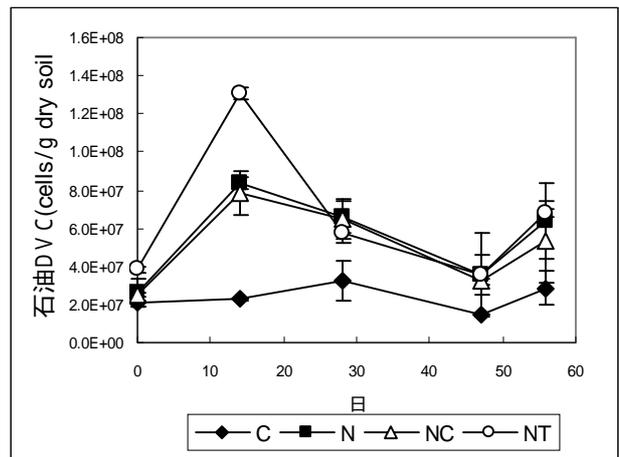


図6 石油資化性菌数の変化

オーギュメンテーション区では、最初の14日間で、添加微生物が増殖し、これと同時に鉱物油分の分解も起きている。28日以降鉱物油の分解が停止しているのに伴い、全細菌数も減少している。このことから、添加微生物が鉱物油分を資化し油が菌体に変換された結果、一旦全細菌数が増加し、鉱物油分の分解が終了すると、添加微生物の数も減少することが分かった。

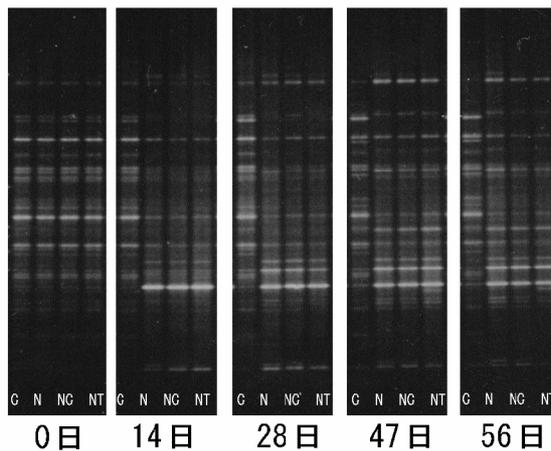
同時に石油DVC法が添加微生物の検出法として有効な手段であることが示唆された。

### (3) DGGEによる微生物群集解析

DGGEによって得られた電気泳動写真を基に主成分分析を行った結果、実験期間中の各処理区の微生物群集構造変化について以下のことが明らかとなった。(図7、図8参照)

1. 無添加区の微生物群集構造は実験期間中を通じてあまり変化しなかった。
2. その他の処理区の微生物群集構造は、実験開始後14日でコントロール区と明確に異なる群集構造が認められ、栄養塩等の添加処理によってある特定の微生物群集の活性が高まったことが示唆された。またこのバンドパターンの違いは実験期間中ずっと認められ、今回実施した56日間の実験期間ではコントロール区のバンドパターンに戻ることは無かった。
3. 主成分分析の結果、14日以降の各処理区の微生物群集構造は、処理の違いによる構造の差はあまり認められず、どちらかという処理時間の違い(14日、28日、47日、56日)によってグループ化できることが判明した。

4. 時間経過とともに各処理区の微生物群集構造の変動が小さくなることが判明した。
5. 今回の実験では、オーギュメンテーション区の微生物群集構造が他の処理区の微生物群集構造とほとんど差が認められなかった。すなわち、添加した微生物群が検出されなかったことが示唆される。このことは、今回の DGGE 解析に使用したプライマーセットが真正細菌群集用のもので、製造元の Dr. Oppenheimer 氏が指摘している、当該微生物製剤が主に古細菌により構成されている点で古細菌群集の DNA 増幅ができていないためだと考えられる。今回の試験では一般細菌（真正細菌）である土着菌をターゲットにしていたため、菌種の異なる双方を一度に検出することが困難であったものと推測された。今後、両細菌群集を同時に把握できるような実験方法の改良が必要であろう。



(各日とも、左から C 区、N 区、NC 区、NT 区の泳動パターン)

図 7 PCR-DGGE 法によるバンドパターン

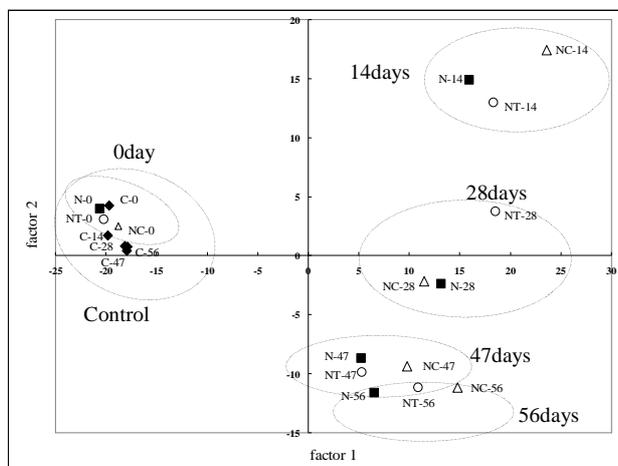


図 8 主成分分析 (PCA) の結果  
(図 7、図 8 とともに偶数サンプルのもの)

#### 4. まとめ

バイオレメディエーションの生態影響評価手法はまだ確立されてはいない。本研究では、量的・質的観点から微生物群集の動態を解析し、添加微生物の消長および微生物群集の変化を追うことで、バイオレメディエーション適用の微生物生態系に与える影響を評価した。

今回適用した微生物製剤は油分解菌の複合体であり、そのもの自体を追跡することは難しい。しかしながら今回の研究では、石油資化性菌・全細菌数が増加したと同時に鉱物油の分解が促進された様子が認められ、このことにより添加微生物の定着とその添加効果を確認することができた。さらに PCR-DGGE 法による微生物群集構造解析の結果、スティミュレーションとオーギュメンテーションでの土着の真正細菌群の微生物群集構造変化に差が見られなかったことから、オーギュメンテーションにおける土着の微生物群集構造に与える影響はスティミュレーションと同程度であると言える。さらに、微生物を添加しても土着菌を凌駕するわけではなく、土着菌も含めた微生物コンソーシアで油分解を進行させる可能性が示唆された。添加した微生物は油の分解が終了すると速やかに減少していることから、オーギュメンテーションにおける添加微生物の生態系に与える影響は認められなかった。

今回の結果は、バイオレメディエーションにおける微生物生態評価の一説となりえるだろう。とくにオーギュメンテーションが危険だという一方的な発想は根拠が薄いことが明らかとなったといえる。生態系への影響評価はリスクの対象・評価の目的を明確にしなければならない。バイオレメディエーションにおける微生物生態影響評価の考え方についても見直していく必要があるのではないだろうか。

#### 5. 謝辞

本研究は、2001 年度昭和シェル石油環境研究助成の助成を受けて行われたものである。記して感謝の意を表す。