

油汚染土壌の浄化に及ぼすマット状シバの浄化効果の検証

Effects of Grass Mat-Planting on Cleanup of the Oil-Contaminated Soil

岩崎 一弘^{1*}, 坪井 隼¹, 大川 恵¹, 鶴小屋 晃^{1,2},
田島万穂路^{1,2}, 中島 敏明³, 内山 裕夫³

KAZUHIRO IWASAKI¹, SHUN TSUBOI¹, MEGUMI OKAWA¹, AKIRA TSURUKOYA^{1,2},
MAHORO TAJIMA^{1,2}, TOSHIAKI NAKAJIMA-KAMBE³ and HIROO UCHIYAMA³

¹ 独立行政法人国立環境研究所 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

² 筑波大学大学院生命環境科学研究科 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

³ 筑波大学生命環境系 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

* TEL & FAX: 029-850-2407

* E-mail: kiwasaki@nies.go.jp

¹ National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

² Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

³ Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: マット状シバ, 油汚染土壌, ファイトレメディエーション, 根圏細菌群集

Key words: Grass mat, Oil-contaminated soil, Phytoremediation, Rhizospheric bacterial communities

(原稿受付 2013年10月4日/原稿受理 2013年11月8日)

1. はじめに

油による土壌汚染は現在では世界中に広がっており、地球規模での環境問題として注目されている¹³⁾。我が国においても油汚染が顕在化してきており¹⁰⁾、その対策が求められている。油汚染土壌の対策技術は掘削土壌処理と原位置処理に大別されるが、前者では莫大な掘削及び運搬のコストが必要となり、また汚染土壌の処理を現場外で実施しなければならず根本的な浄化対策ではない。原位置処理の手法としては、揮発及び土壌洗浄などが挙げられるが⁷⁾、概して専用の設備導入等によるランニングコストが発生する。

上述のような、いわゆる物理化学的対策技術に対して、比較的低コスト、汚染油の分解除去が可能といった長所から、主に微生物の機能により油汚染土壌を浄化する技術(バイオレメディエーション)が注目されている¹⁴⁾。バイオレメディエーションにおいても、微生物の活性維持に必要な空気(酸素)の吹き込みや栄養を添加するための設備、土壌の切り返しなどが必要となり、やはりランニングコストが必要となる場合が多い。そのため近年では、より低コストでの浄化を目指して、油分解細菌を植物によって活性化させるファイトレメディエーションが注目されている(図1)。油汚染土壌に対するファイトレメディエーションに関しては、油に対して高い耐性を持つマメ科及びイネ科の植物を中心に研究が行われてきており、根圏中の細菌が油の分解に主要な役割をはたしていると考えられている^{1,4,5,8,11,12)}。本技術を用

いた油汚染土壌の浄化速度は植物根圏などに生息する土壌細菌による油分解活性に依存するため、物理化学的対策技術と比較して浄化完了まで長期間を要することが多く、また浄化期間の予測も難しいのが現状である。こうした理由などがファイトレメディエーションを油汚染土壌対策技術として採用する際の障壁の一つとなっている。長い工期や浄化期間の予測の難しさといったファイトレメディエーションの欠点を克服するためには、例えば、浄化時における油汚染土壌中の細菌群集構造及びそれらと油分解効果との関連性という、より詳細な浄化機構の解明が求められる。現在までに、いくつかの研究に

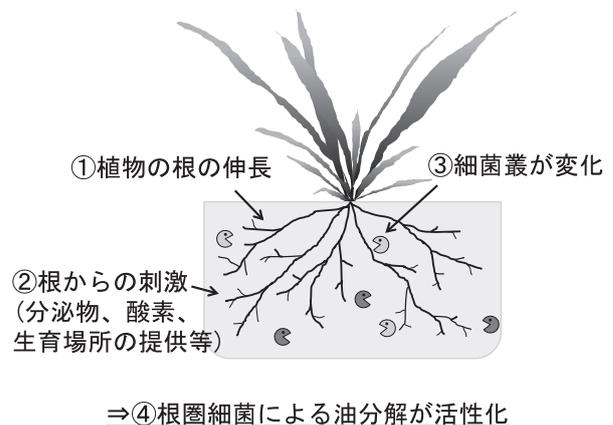


図1. 油汚染土壌のファイトレメディエーション模式図

において油汚染土壌中の根圏細菌群集について、門レベルでの解析が進められてきている。例えば、Kimら(2006)は土壌にディーゼル油を添加し、植物の有無による土壌および根圏細菌群集を比較した⁹⁾。その結果、彼らはディーゼル油汚染土壌の根圏では *Alphaproteobacteria* や *Epsilonproteobacteria* 等の特有の細菌群が優占したことを報告した⁹⁾。しかしながら、油汚染土壌中の植物根圏における細菌群集構造が明らかとなっても、それらと油分解効果との関係性は調べられてきておらず、優占する細菌群集の油分解に関する役割に関して未だ情報不足であると言える。また、植物を用いた浄化技術は油汚染土壌における植物の栽培が避けられず、発芽及び成長までの期間が必要である。そこで本研究では既に十分生育しており、迅速な浄化が期待される市販のマット状シバを用いた浄化効果の検証及び根圏細菌群集構造と油分解効果との関係性を調べることにした。

2. 材料と方法

2.1 栽培試験

油汚染土壌は、山口県下松の油汚染現場より採取した浸出油を市販の川砂と混合して作成した。乾燥土壌あたりの油分濃度 0 ppm, 5,000 ppm, 10,000 ppm に調整した3種類の土壌を園芸用大型ポット(直径 33 cm, 高さ 38.5 cm)にそれぞれ充填し(乾燥重量 33.8 kg), マット状のバーニングフィールド(約 30 cm×30 cm)を土壌表面に敷き詰め油分解試験を実施した。各ポットには試験開始時に市販の無機肥料としてマイクロパワー 8号(多木化学:保証成分 窒素 8%, リン酸 8%, カリウム 8%, マグネシウム 2%)を 50 g/m²(ポットあたり 4.28 g)になるように施肥した。さらに 818 日目, 1,015 日目にはそれぞれ 30 g/m²(ポットあたり 2.57 g)になるように無機肥料を与えた。栽培試験は、独立行政法人国立環境研究所構内の野外試験圃場(茨城県つくば市)のビニール屋根の付いた一角において、適宜散水しつつ実施した。なお、バーニングフィールドは、鹿児島県で収集したノシバ系統から選抜された市販の固定品種であり、秋の草勢が非常に良好で耐旱性が極強の芝生向きの品種とされている。

油分濃度測定及び細菌叢解析用土壌のサンプリングは以下の方法で実施した。ブルーシート上に栽培試験ポット内のシバ及び土壌を全て取り出した後、シバの根を必要以上に分断しないように注意して土壌をよく混合してから、土壌試料を 50 ml プラスチックチューブに採取し、一部を除いて以降の操作まで -20°C で保存した。取り出した土壌はシバとともに全て同じポットに戻して栽培試験を継続した。採取した土壌試料の一部を使用して、常法により油分濃度計 OCMA-350(堀場製作所)を用いた赤外吸収法により油分濃度測定を行った。また、土壌試料の土壌含水量の測定結果から、ポット全体の乾燥土壌あたりの油分濃度を求めた。

2.2 土壌細菌叢の解析

前述の土壌試料から全 DNA を抽出し細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした遺伝子増幅(Polymerase chain reaction: PCR法)及び DNA 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動

(Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE法)による解析を行った。また、取得した DGGE 画像に対して多次元尺度法(Multidimensional scaling: MDS法)による統計解析を行い、各土壌試料の細菌叢の類似度を評価した。さらに、84 日目及び 827 日目の土壌試料について、非汚染(0 ppm)及び油汚染(5,000 ppm 及び 10,000 ppm)の各条件での DGGE バンドパターンの比較を行い、特徴的なバンドの切り出しとその DNA 塩基配列の解析を実施した。非植栽の油汚染土壌(10,000 ppm)では 827 日目の土壌試料について DGGE 法による解析を実施し、細菌叢に及ぼすシバ植栽の影響を比較した。

土壌試料からの全 DNA の抽出には市販のキット、Fast DNA Spin Kit for Soil (BIO 101; Qbiogene), Extrap Soil DNA Kit Plus ver. 2(日鉄環境エンジニアリング), ISOIL for Beads Beating(和光純薬工業)のいずれかを使用した。抽出した DNA の PCR には Ampdirect[®] Plus 酵素セット(島津製作所)及び 16S rRNA 遺伝子上の V3 領域を含む約 570 bp を標的としたユニバーサルプライマー gc-16S350F(5'-gc-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'), 16S920R(5'-CCGTCAATTCTTTGAGTTT-3')を用い、60°C から 50°C までプライマーと標的 DNA との結合(アニーリング)温度を段階的に下げるタッチダウン条件での増幅を実施した。

得られた PCR 産物の DGGE 法による解析には、16 cm×16 cm, ゲル厚 1.00 mm, 変性剤濃度勾配 35%~55%のポリアクリルアミドゲルを用いた。電気泳動(60°C, 70 V, 17 時間)後、ゲルを SYBR safe DNA Gel Stain (Invitrogen) で染色し、Typhoon 9400 (Amersham Biosciences) を用いて DGGE バンドの検出を行った。さらに Image Quant (Amersham Biosciences) により各バンドの相対強度を求め、SPSS 12.0 (SPSS) を用いた MDS 法による統計処理により各試料間の類似性を解析した。

DGGE 法により得られる各バンドには、しばしば複数の細菌由来の PCR 産物が含まれるため、標的バンドから抽出した DNA を PCR 及び Mighty TA-cloning Kit (タカラバイオ)を用いたクローニングを実施することにより DNA 塩基配列の決定を試みた。なお、PCR-DGGE 解析を再度実施して、クローニングによって得られた DNA 断片が目的の DGGE バンド由来であることを確認している。DNA 塩基配列の解析には、ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用い、塩基配列決定後は BLAST を用いた相同性検索を実施した。

3. 結果及び考察

3.1 油汚染浄化効果

ファイトレメディエーションによる土壌油濃度の変化を図 2 に示す。シバを植えていない非植栽の対照系(試験開始時油濃度: 10,000 ppm)と比較して、ファイトレメディエーションを実施したポットでは顕著な油濃度の減少が認められた。試験 1,189 日後には、開始時 5,000 ppm 及び 10,000 ppm の土壌油濃度はそれぞれ 675 ppm 及び 1,792 ppm まで低下し、マット状シバを用

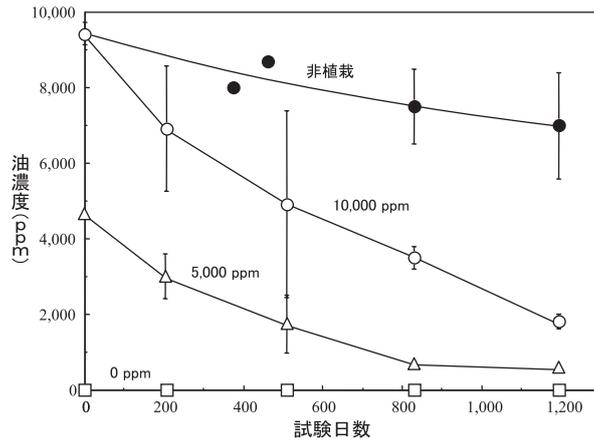


図2. ファイトレメディエーションによる油汚染土壌の浄化

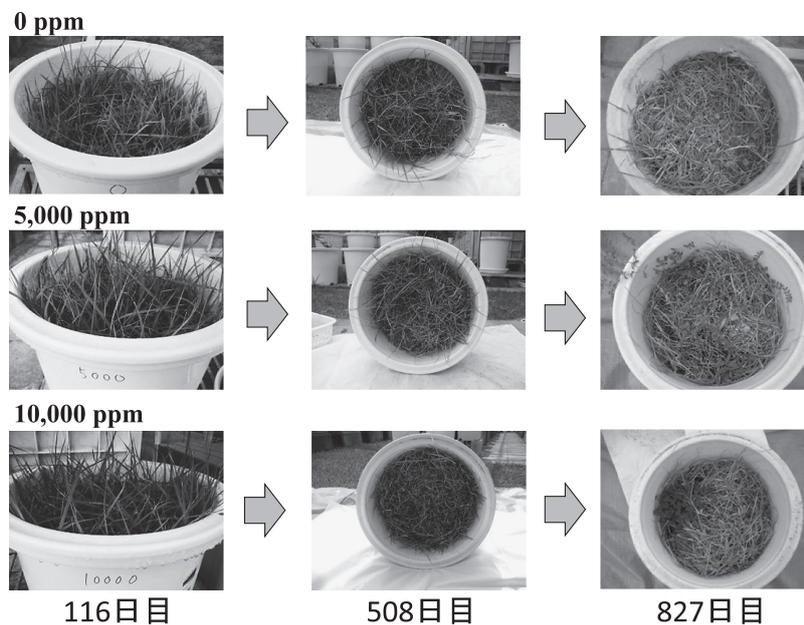


図3. ファイトレメディエーション試験期間のシバ地上部生育状況

いたファイトレメディエーションによって実汚染現場から回収した汚染油による模擬汚染土壌での浄化効果が確認された。

シバの地上部生育状況の写真を図3に示す。栽培試験の経過とともに、シバ地上部の生育状況は不良（葉の減少、褐変等）となることが認められたが、油の有無による明確な地上部生育の違いは観察されなかった。一方、生育が不良となった827日目において、非汚染及び油汚染いずれのポットでも土壌試料サンプリング時に大量の根が観察された。地上部の生育状況が不良の時期においても、シバの根が残存して主に根圏の細菌群による油分解活性が維持されていたのではないかと推察された。

3.2 土壌細菌叢の解析

試験期間中のポット土壌のDGGE画像を図4に、そのMDS法による解析結果を図5に示す。非汚染土壌と油汚染土壌の各試料でのDGGEバンドパターンは大きく異なっていたが、油汚染土壌における油濃度の違い

(5,000 ppm と 10,000 ppm) はバンドパターンに大きな影響を与えないことが示された (図4)。

DGGEで得られた画像を統計処理した結果 (図5)、実験開始時の0日目では非汚染土壌 (0 ppm) と油汚染土壌 (10,000 ppm) では比較的近くにプロットされ、これらの土壌細菌群集がよく類似していることが示された。非汚染土壌では、本研究での試験期間中においてその土壌細菌叢はほとんど変化していなかったことが示された。一方、油汚染土壌ではいずれの油濃度でも84日目までに細菌群集が大きく変化し、84日目以降は比較的安定している、すなわち汚染油の存在によって変化した細菌叢が長期間維持されていることが認められた。次いで、こうした根圏等の土壌細菌の油分解に及ぼす役割を詳細に解析するために、DGGEで得られた特徴的なバンドのDNA塩基配列の決定を試みた。

827日目のマット状シバ植栽系と非植栽系の10,000 ppmのDGGEバンドパターンを比較すると、両者に大きな違いが確認され、植栽によって細菌群集構造が変動した

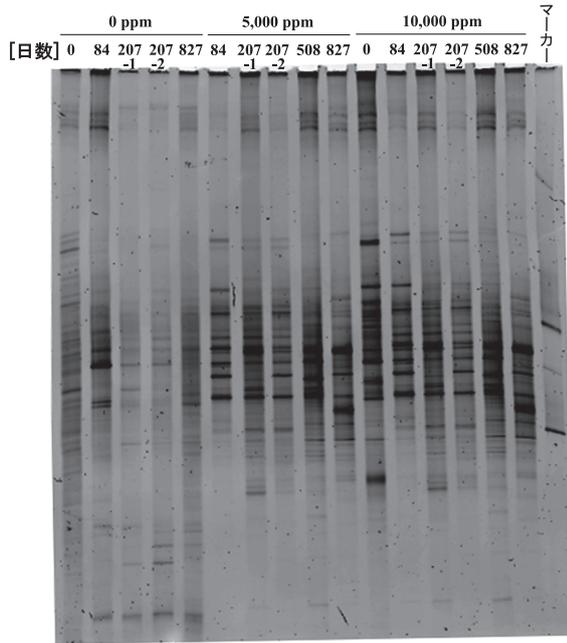


図4. ファイトレメディエーション土壌の DGGE 法による解析
207-1 と 207-2 は 207 日目のサンプリングにおける、それぞれポット上部、下部のサンプルを表す。

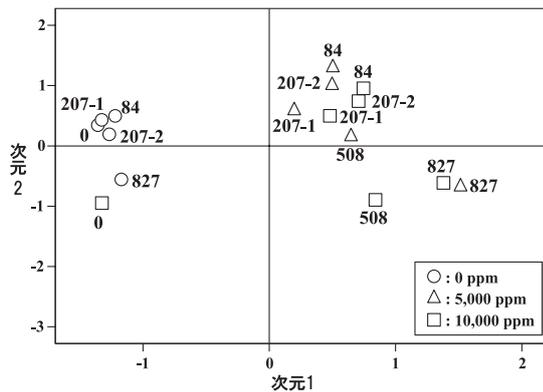


図5. DGGE 画像の多次元尺度法による細菌群集類似度の評価
図中の各数字 (0d, 84d など) は試験日数を表す。207-1 と 207-2 は 207 日目のサンプリングにおける、それぞれポット上部、下部のサンプルを表す。

と考えられる (図6)。また、試験開始後 84 日目及び 827 日目の各土壌試料の DGGE 解析結果から特徴的に検出されたバンドを特定して (図6)、その DNA 塩基配列を解析した (表1)。84 日目の土壌試料での解析結果からバンド D はバンド H と、バンド E はバンド I と、またバンド G はバンド K とそれぞれほとんど同じ塩基配列であり、すなわち同じ細菌種由来であると考えられた (表1)。油汚染土壌で特徴的に検出されたバンド D (H) は、軽油をエマルジョン化させる菌体外多糖を生産することが報告⁶⁾されている細菌種と高い相同性を示した。一方、827 日目の結果 (表1) からはバンド L とバンド O が同じ細菌種由来であると推測された。バンド M はヘキサン分解細菌と高い相同性を示し²⁾、バンド N は油汚染土壌における存在や石油分解が多数報告されている *Paenibacillus* 属細菌と高い相同性を示し

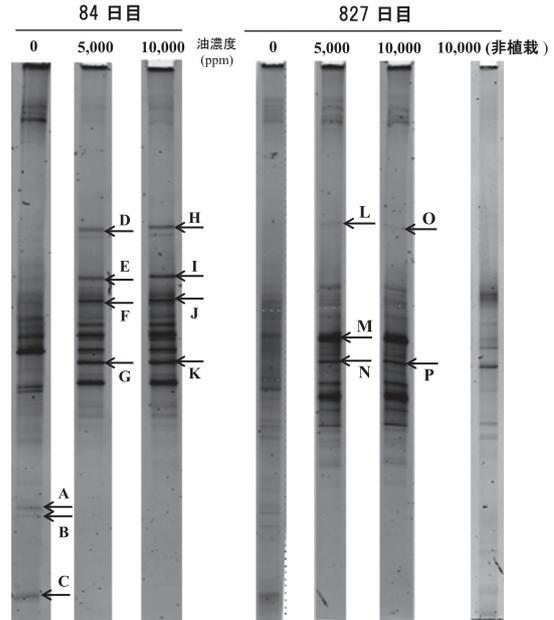


図6. DGGE 解析で得られた特徴的なバンドの特定

た^{3,15)}。本研究のシバによるファイトレメディエーションにおいても、詳細な遺伝子解析で検出されたこれらの根圏土壌中の細菌が油汚染の分解に関与しているものと考えられる。今回の一連の解析により DGGE の DNA 塩基配列を決定できたのは全細菌叢の一部の細菌由来のものであるが、各土壌試料の細菌叢解析の結果 (図5) から油汚染土壌においては 84 日目以降では類似した細菌叢を示すことが認められている。従って、マット状シバを植栽した実験系でのみ見られ、本研究で検出できた油分解に直接関与すると考えられる細菌種が、ファイトレメディエーション試験期間を通じて優占化しているのではないかと推察される。以上の結果は、マット状シバを植栽することによって、土中の油が効果的に分解された大きな理由であろう。こうした油汚染土壌での細菌群集の変化は、508 日目以降にシバ地上部の生育が不良となった (図3) 後も土壌中の油濃度が減少し続けたこと (図1) と一致した結果となった。また、827 日目というシバ地上部の生育が不良の状態でも油分解に関与していると推察される細菌が検出された (表1) ことから、土壌中にシバの根が残っていたことにより油分解細菌が生息可能となり、油分解効果が持続していたのではないかと考えられる。

4. ま と め

長期間にわたって実際の油汚染現場から回収した汚染油を用いた汚染土壌に対してファイトレメディエーション試験を実施した結果、マット状シバの植栽は油汚染土壌中の細菌群集構造に大きな影響を与えることによって、油汚染土壌の浄化に高い効果を発揮したと考えられた。また、マット状シバは張替えを行わなくとも長期間その根圏土壌での油分解活性を維持し、10,000 ppm といった高濃度の油汚染土壌の浄化が可能であることを確認した。また、根圏土壌からは油分解に直接関与してい

表 1. 栽培試験において見られた特徴的な DGGE バンドの DNA 塩基配列の解析

栽培日数	油濃度 (ppm)	バンド	最も相同性の高かった菌株	アクセッション No.	相同性 (%)
84	0	A	<i>Leifsonia</i> sp. SAP711.6	JX067673	99.8
		B	<i>Kouleothrix aurantiaca</i>	AB079640	92.6
		C	<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>	FJ887954	99.2
	5,000	D(H)	<i>Burkholderia seminalis</i>	JN896363	99.6
		E(I)	<i>Duganella</i> sp. Sac-36	FJ423638	98.8
		F	<i>Mitsuaria</i> sp. PhRB004	AB560607	99.2
		G(K)	<i>Dyella ginsengisoli</i>	GU809978	95.7
	10,000	H(D)	<i>Burkholderia seminalis</i>	JN896363	99.4
		I(E)	<i>Duganella</i> sp. Sac-36	FJ423638	98.8
		J	<i>Burkholderia</i> sp. AR22	HM027906	99.4
K(G)		<i>Dyella ginsengisoli</i>	GU809978	95.9	
827	5,000	L(O)	<i>beta proteobacterium Schreyahn</i> AOB SSU Aster 2	AY795686	94.3
		M	<i>Singularimonas variicoloris</i>	AJ555478	97.5
		N	<i>Paenibacillus</i> sp. 27-9	EU571199	86.9
	10,000	O(L)	<i>beta proteobacterium Schreyahn</i> AOB SSU Aster 2	AY795686	94.1
		P	<i>Acidobacteriaceae bacterium 307</i>	HQ995660	98.6

ると思われる細菌種を特定することができた。例えば、マット状シバに付着しているシバ畑土壌は油分解に関与する細菌のソースになると考えられ、今後さらに浄化期間の短縮を目指して、根圏細菌叢の解析を進めるとともにシバの供給源となる畑土壌と油浄化効果との関係についても検討していきたい。

文 献

- Bento, R.A., O.J. Saggin Jr., R.M. Pitard, R. Stralio, E.M.R. da Silva, S.R.d.L. Tavares, F.H.T.G. de Landa, L.F. Martins, and A.G.T. Volpon. 2012. Selection of leguminous trees associated with symbiotic microorganisms for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 223: 5659–5671.
- Friedrich, M.M. and A. Lipski. 2008. *Alkanibacter difficilis* gen. nov., sp. nov. and *Singularimonas variicoloris* gen. nov., sp. nov., hexane-degrading bacteria isolated from a hexane-treated biofilter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2324–2329.
- Ganesh, A. and J. Lin. 2009. Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 5847–5854.
- Günther, T., U. Dornberger, and W. Fritsche. 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere.* 33: 203–215.
- Hernández-Ortega, H.A., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, H.A. Zavaleta-Mancera, H.A. López-Delgado, and R. Mendoza-López. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *J. Environ. Manage.* 95: S319–S324.
- Huang, K.H., B.Y. Chen, F.T. Shen, and C.C. Young. 2012.

Optimization of exopolysaccharide production and diesel oil emulsifying properties in root nodulating bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1367–1373.

- 石川洋二. 2007. 油汚染土のバイオレメディエーション. *環境科学会誌.* 20: 381–388.
- Kaimi, E., T. Mukaidani, S. Miyoshi, and M. Tamaki. 2006. Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. *Environ. Exp. Bot.* 55: 110–119.
- Kim J., S-H. Kang, K-A. Min, K-S. Chao, and I-S Lee. 2006. Rhizosphere microbial activity during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 41: 2503–2516.
- 川辺能成, 西脇淳子, 坂本靖英, 原 淳子, 竹内美緒, 駒井武. 2008. 地圏環境リスク評価システムによる油汚染土壌の暴露・リスク評価—芳香族 TPH の懸念レベルの推定—. *土木学会論文集 G.* 64: 144–150.
- Merkel, N., R. Schultze-Kraft, and C. Infante. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 165: 195–209.
- Merkel, N., R. Schultze-Kraft, and C. Infante. 2005. Phytoremediation in the tropics — influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environ. Pollut.* 138: 86–91.
- Rayner, J.L., I. Snape, J.L. Walworth, P.M. Harvey, and S.H. Ferguson. 2007. Petroleum-hydrocarbon contamination and remediation by microbioventing at sub-Antarctic Macquarie Island. *Cold Regions Sci. Technol.* 48: 139–153.
- 高松邦明, 山津敦史, 宮北憲治, 今中忠行. 2012. 油分解細菌の分離とバイオオーグメンテーションへの利用. *環境バイオテクノロジー学会誌.* 12: 47–57.
- Wang, J., G. Yan, M. An, J. Liu, H. Zhang, and Y. Chen. 2008. Study of a plugging microbial consortium using crude oil as sole carbon source. *Pet. Sci.* 5: 367–374.