

# 浄化微生物の検出と環境修復エンジニアリング

## 本日の報告内容

- 1 . *Methylocystis* sp. M を用いたTCE汚染土壌・地下水修復技術の開発  
微生物を活用する汚染土壌修復の基盤研究(平成8年12月～平成13年3月)
- 2 . 石油分解菌を用いた汚染土壌浄化法の検討
- 3 . 今後の課題

宮 晶子

# *Methylocystis* sp. Mを用いたTCE汚染土壌・地下水修復

---

## 微生物モニタリングの目的

### < 運転管理指標 >

#### 浄化微生物の迅速測定

- ・浄化能力を発揮できる濃度
- ・簡易、迅速、現場測定

### < 安全性評価 >

#### 浄化微生物の生残性

- ・高感度
- 土壌微生物生態系影響
- ・客観的評価

## Methylocystis sp. Mを用いたTCE汚染土壌・地下水修復

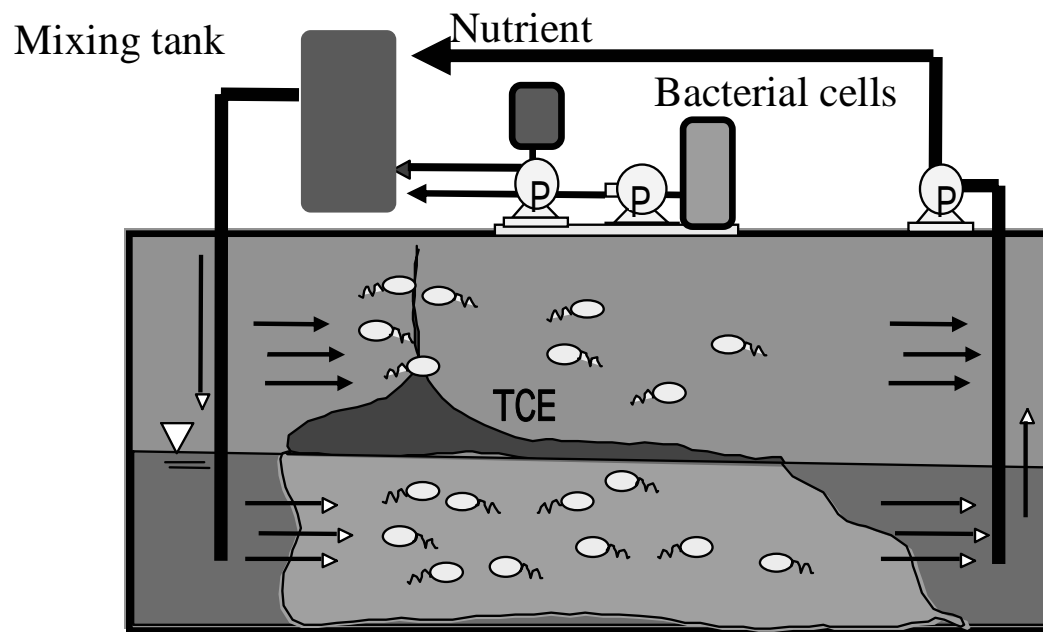
### M株検出法の特徴

分析手法	検出感度		特異性	多検体 処理	分析時間
	水系 (cells/ml)	土壌系 (cells/g)			
MPN	$1 \times 10^0$	$1 \times 10^2$	×	×	4 weeks
ELISA	$1 \times 10^5$	-			1 day
蛍光抗体法	$3 \times 10^3$	$4 \times 10^5$		×	1 day
PCR-サザン解析	-	$1 \times 10^4$			4-5 days
リアルタイムPCR *	( $3 \times 10^1$ )	$1 \times 10^5$			1 day
	-	$1 \times 10^4$			2-3 days

\* 上段:簡易精製法、下段:スピンカラム精製法、水系上段は純粋培養菌体での値

# *Methylocystis* sp. Mを用いたTCE汚染土壌・地下水修復

## バイオオーグメンテーションの効果を決める条件

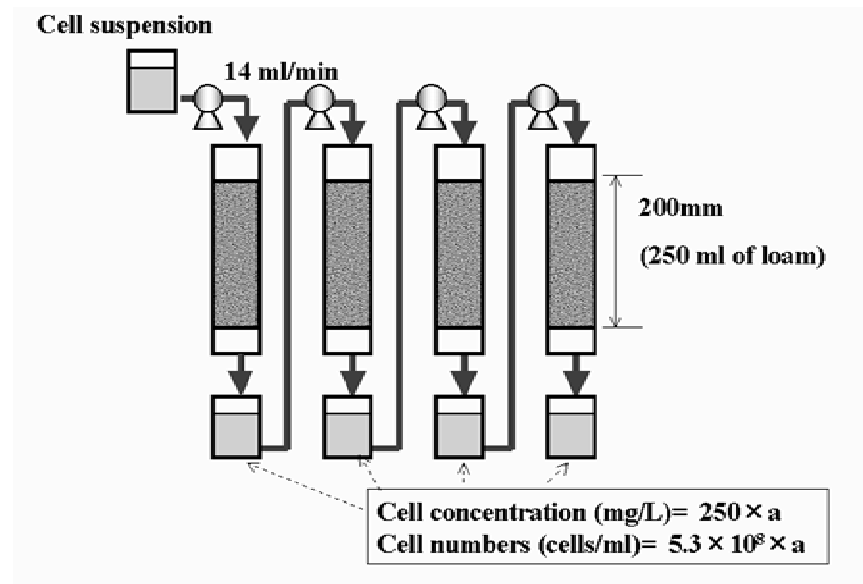


1. 微生物と汚染物の接触  
特に不飽和土壌
2. 微生物の活性維持
3. 土壌の化学組成

# Methylocystis sp. Mを用いたTCE汚染土壌・地下水修復

## バイオオーグメンテーション技術の適用性の評価

### カラム試験 (不飽和土壌への注入)



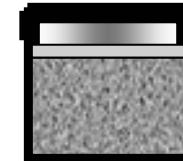
### コンテナ試験 (混練法)

Experimental conditions :Test 1

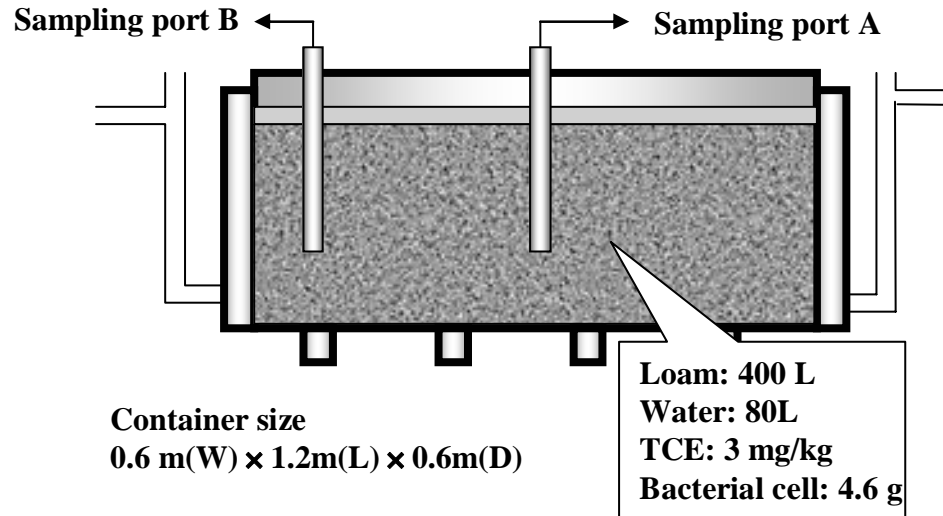
Soil	Machine oil addition (g/kg)	TCE (mg/kg)	Cell addition (mg/kg)
Ando soil	-	2.5	11 or 35
Fine sand with silt	-		
Loam	1		

Experimental conditions :Test 2

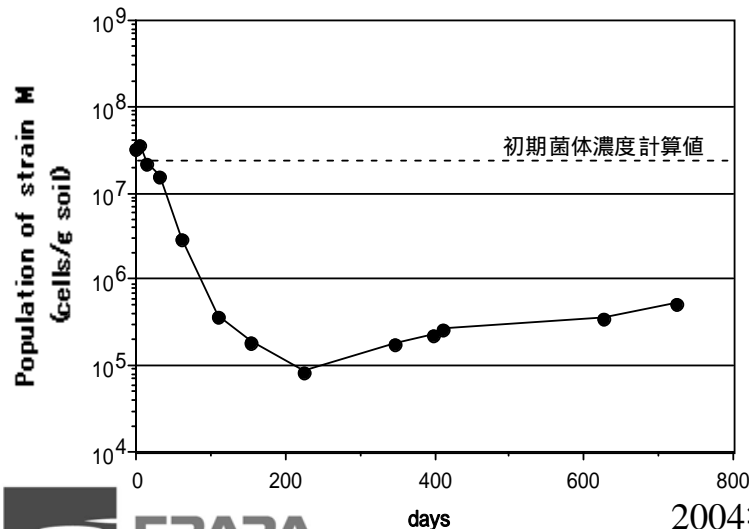
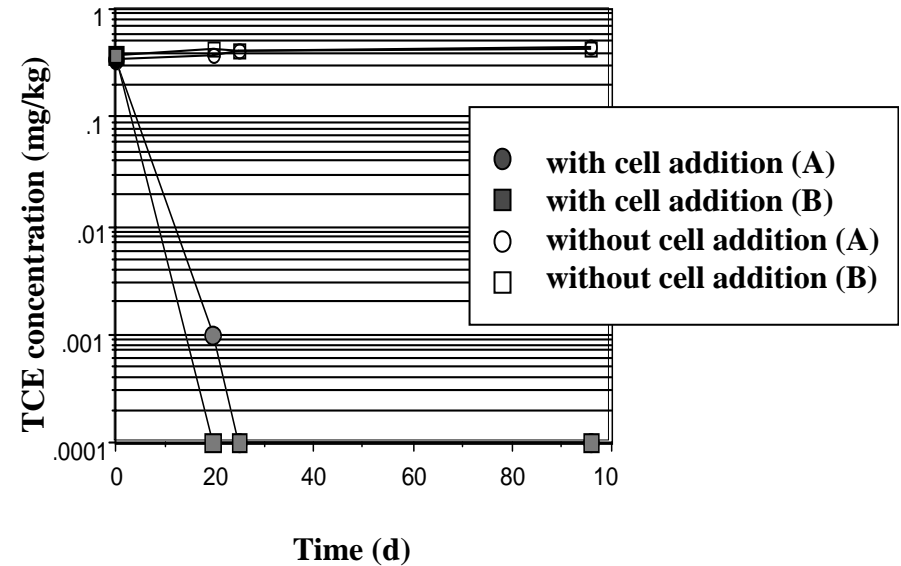
Soil	TCE (mg/kg)	Cell addition (mg/kg)
Loam	2.5	0 ~ 600
	20.0	



# Methylocystis sp. Mを用いたTCE汚染土壌・地下水修復



Container size  
0.6 m(W) × 1.2m(L) × 0.6m(D)



**極めて優れた分解性能**

**M株の生残性調査結果**

定量PCR 左図

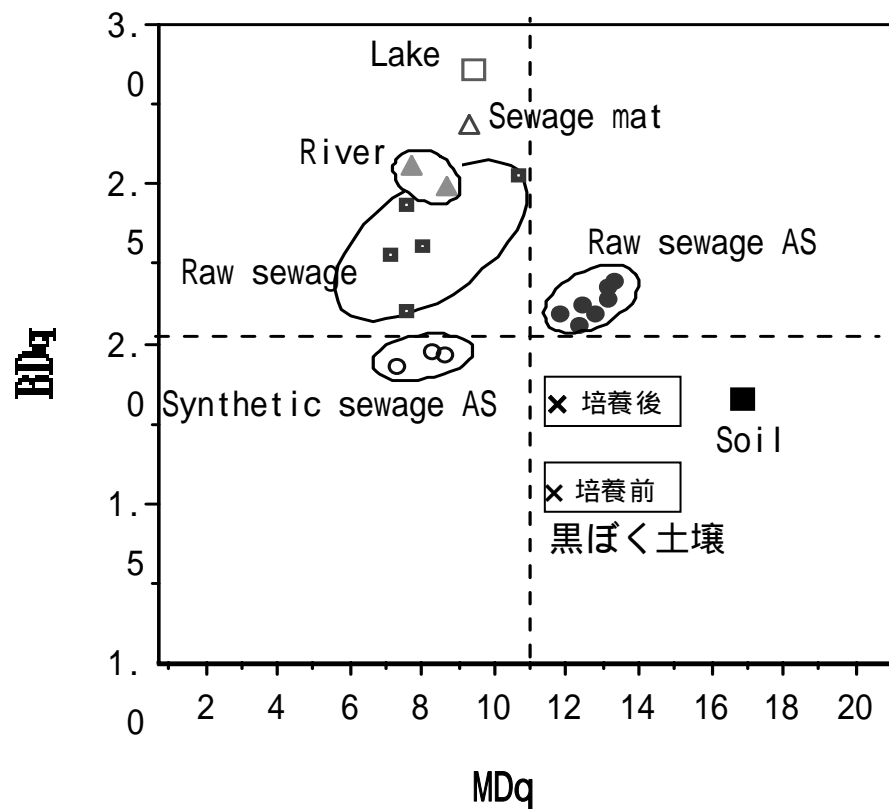
MPN 初期  $2.8 \times 10^8$  MPN/g  
140日以降  $1.1 \times 10^5$  MPN/g



2004年6月11日

# Methylocystis sp. Mを用いたTCE汚染土壌・地下水修復

## キノプロファイル法による土壌微生物群集構造の評価



土壌微生物生態系への  
影響が評価可能か？

・微生物群の分布状況  
(変化)の把握が可能

・汚染 = 非定常  
浄化処理の影響は？

# 石油分解菌を用いた汚染土壌浄化法の検討

---

## 背景

石油汚染バイオスティミュレーション効果の判定に数ヶ月要する



石油汚染土壌の微生物群集構造と石油分解特性調査



ある種のアルカン分解菌が存在すると分解性が良い



**単離した分解菌を利用したバイオオーグメンテーション試験**

アルカン分解菌 *Rhodococcus erythropolis* M-13株  
直鎖アルカンと分岐鎖アルカンの高い分解能



# 石油分解菌を用いた汚染土壌浄化法の検討

アルカン分解菌 *Rhodococcus erythropolis* M-13株

PAHs分解菌 *Sphingomonas* sp. P-2株

実験1：模擬石油汚染土

実験2：石油汚染土壌

	汚染履歴	土着細菌	砂質
実験1	なし	少	珪砂
実験2	あり	多	砂礫土

28 2週間、120 rpmで振とう培養

土 3g  
水 10 mL  
栄養塩(N, P)  
リン酸バッファー (pH 7.0)

+

W.oil 8 mg + 芳香族画分 1.5 mg

アルカン分解菌  $10^8$  cells / g – soil

PAHs分解菌  $10^8$  cells / g – soil

分解菌を添加しないバイオスティミュレーションと比較

# 石油分解菌を用いた汚染土壌浄化法の検討

## オーグメンテーション効果

	アルカン分解	PAHs分解
実験1 模擬石油汚染土		
実験2 石油汚染土壌	?	

## 微生物モニタリング結果

実験1、2ともオーグメンテーション条件では添加菌が優占化

### 実験1

- ・分解菌がいなかった

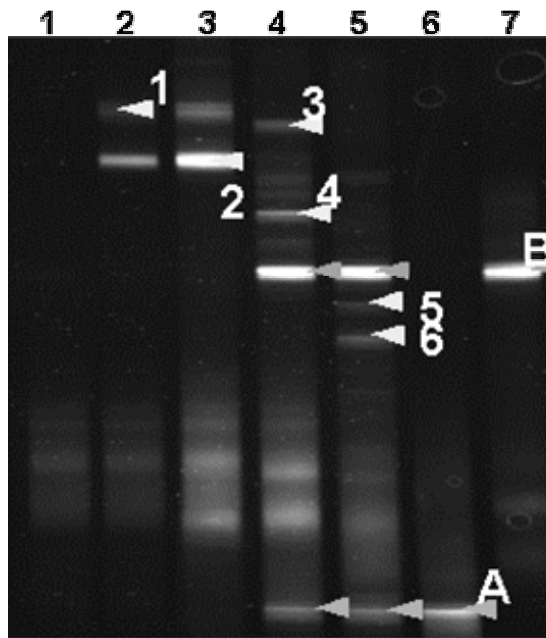
### 実験2

- ・PAHsは分解菌がいなかった
- ・M-13株が土壌中に存在(ただし検出限界以下)  
N、P添加だけで増殖( $10^9$ copies/g-soil)

# 石油分解菌を用いた汚染土壌浄化法の検討

## 実験1の菌相解析

(PCR-DGGE, 16S rDNA V3 region)



レーンNo. サンプル

1. 珪砂(Day0)
2. 珪砂+N,P(Day14)
3. 珪砂+ 石油+N,P(Day14)
4. 珪砂+ 石油+N,P + 分解菌(Day0)
5. 珪砂+ 石油+N,P + 分解菌(Day14)
6. *Rhodococcus erythropolis* M-13
7. *Spingomonas* sp. P-2

Band	Closest sequence	Homology (%)
1.	<i>Acinetobacter</i> sp. W-17 (AF390089)	195/195 (100%)
2.	<i>Acinetobacter</i> sp. W-17 (AF390089)	195/195 (100%)
3.	<i>Bacillus</i> sp. 2(2003) (AY269865)	194/194 (100%)
4.	<i>Bacillus</i> sp. 2(2003) (AY269865)	194/194 (100%)
5.	<i>Cytophaga</i> sp. SA1 (AH414444)	185/189 (97%)
6.	Uncultured bacterium clone 23-6 (AJ608999)	164/166 (98%)
A.	<i>Rhodococcus</i> sp. 67-BEN001 (AY044096)	174/174 (100%)
B.	<i>Spingomonas</i> sp. Ant17 (AF184222)	169/169 (100%)

## まとめと今後の課題

### 微生物モニタリングの目的に対して

#### < 運転管理指標 >

##### 浄化微生物の迅速測定

- ・浄化能力を発揮できる濃度
- ・簡易、迅速、現場測定

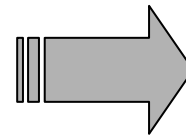


バイオオーガメンテーション  
効果判定、現場管理  
に十分適用可能

#### < 安全性評価 >

##### 浄化微生物の生残性

- ・高感度
- ・土壤微生物生態系影響
- ・客観的評価



安全性の判定基準は？