

## 1-6 土壤汚染物質の地盤による無害化能力とその活用方策に関する研究

研究予算：運営費交付金（一般勘定）

研究期間：平14～平17

担当チーム：材料地盤研究グループ（土質）

研究担当者：小橋 秀俊、桑野 玲子、  
森 啓年

### 【要旨】

本研究は、汚染土壤の微生物浄化の実用化をめざした基礎データの取得を目的として、ダイオキシン類汚染土壤を対象として、有用微生物の探索やその活性条件の解明、微生物の土壤中の短期及び長期の挙動、微生物の活性と汚染物質の分解との関連等について、実験的に調べたものである。

その結果、汚染土壤を適切な条件下で管理することによって汚染物質の微生物分解が促進されること、及び微生物の遺伝子情報を用いた微生物浄化の事前評価及びモニタリングが可能であることがわかった。さらに、微生物の土壤内の移行性について、新たな知見が得られた。

キーワード：ダイオキシン類、汚染土壤、微生物、自然減衰、モニタリング

### 1. はじめに

汚染土壤対策として封じ込め工法を適用することにより対象地はリスク管理地として管理されることになるが、土壤の生物化学的变化による潜在的な浄化能力（汚染物質を吸着する効果や土壤微生物による分解など）を有効に活用することにより長期的には無害化に至る可能性がある。本研究は、このような力を活用した汚染土壤対策の実用化を目指して、生物化学的变化による土壤の無害化機能を解明するための基礎的研究を行うものである。汚染物質としてダイオキシン類に着目し、まず様々な土壤に対してダイオキシン類に対する無害化機能の検証を行った上で、リスク管理地として想定される封じ込められた環境中においてそのような無害化能力を最大限引き出すための諸条件について実験等で検証することとした。

有用微生物の探索、及びその分解メカニズムや活性条件の解明など、微生物の基本特性については、東京大学への委託研究にて検討した。また、高濃度及び低濃度のダイオキシン類汚染土壤を、嫌気及び好気条件下で長期モニタリングし、土壤に含まれるダイオキシン類分解微生物の能力を引き出すことによってどの程度ダイオキシン類分解が促進されるかを調査した。さらに、土壤中の微生物の移行特性について、X線CT撮影と浸透水中の微生物量の定量的組み合わせにより調べた。

### 2. 微生物の基本特性

#### 2.1 ダイオキシン類分解菌

低塩素化ダイオキシン類に対して、好気条件下で酸化的分解する菌が報告されている。しかし、土壤中では菌の残存性を維持できないなど土壤への適用性に課題がある。嫌気条件下では、高塩素化ダイオキシン類を還元的脱塩素化する菌が近年注目されている。これには、中間生成物の蓄積により毒性が高まる場合がある他、反応に時間がかかるなどの問題が指摘されている。また、キノコの仲間である白色腐朽菌はダイオキシン類を含む難分解物質を分解できるが、菌の育成に時間がかかる、土中での活性を維持できないなどの問題がある。すなわち、単一の微生物でダイオキシン類汚染土壤を浄化する事は困難で、複数の微生物、及びそれらに適した環境の組合せを検討する必要がある。本研究では、まず好気条件下において新たな分解菌の探索を試みた。

#### 2.2 ダイオキシン類分解菌の探索

##### 2.2.1 分解菌の単離

分離源として河川底泥、畑地土壤など50種以上の供試サンプルを用いた。ジベンゾダイオキシン(DD)を唯一の炭素源としてスクリーニングを実施したところ、DD分解菌が見出されなかった。そこで、ジベンゾフラン(DF)を炭素源として、約1ヶ月間集積培養した。その結果、DF資化性に優れ、増殖の良好な菌としてYA株を単離した。

YA株の16S rDNA塩基配列は、Janibacter属に近

縁で、Janibacter terrae と 98% 程度の相同性を有する Janibacter 属の新菌株と考えられた。Janibacter 属は放線菌の一種であり、これまでに類縁の Terrabacter 属においてダイオキシン分解菌の報告がある。YA 株の電子顕微鏡写真を図-1 に示す。

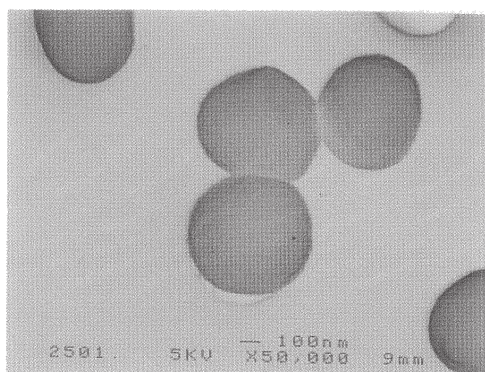


図-1 YA 株の電子顕微鏡(SEM)画像

### 2. 2. 2 YA 株の分解能力

YA 株について DF 分解試験を行なったところ、1000mg/L の DF を 100~120 時間でほぼ全て分解した。また、休止菌体反応により 1 塩素化ダイオキシン(1-CDD, 2-CDD)の分解試験を行なった。1-CDD, 2-CDD それぞれの分解時間変化を図-2 に示す。1-CDD については 9 時間で約 80% 分解した後 18 時間後までに 90% 以上が分解された。2-CDD については 9 時間で約 60% が分解され、18 時間後までに約 80% が分解された。

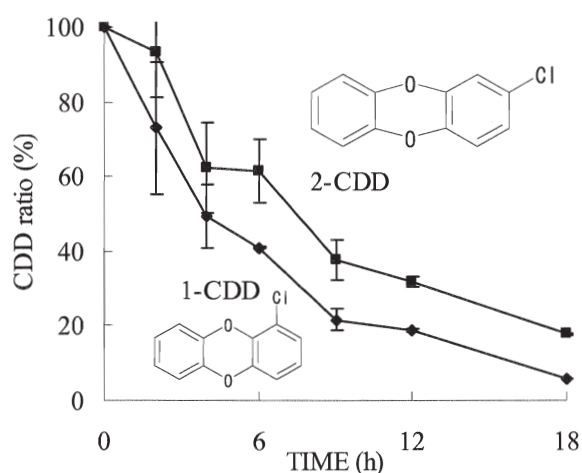


図-2 YA 株による 1-CDD, 2-CDD 分解 (◆),1-CDD の分解 ; (■),2-CDD の分解

なお、YA 株は DF 資化細菌であり、DD は共代謝により分解する。好気条件下で 4 塩素化ダイオキシンまでの分解能力を有する事が確認された。

### 2. 3 高塩素化ダイオキシン類の分解菌

クロロベンゼンの脱塩素化菌として知られていた Dehalococcoides 属 CBDB1 株が塩素化ダイオキシンを脱塩素できることが近年報告された。しかし、Dehalococcoides 属細菌は分離・培養が困難なことから諸性質については不明な点が多く、最近その性質が少しずつ解明され始めたところである。

Dehalococcoides 属の活性保持には水素の添加が有効である。しかし、水素の量が多すぎるとメタン生成菌が活性化し Dehalococcoides 属の障害となり、水素量が少なすぎると脱塩素反応できない事がわかった。すなわち、有用微生物が他の微生物と競合する場合には、水素量の制御が重要である。

### 3. ダイオキシン類汚染土壌の長期モニタリング

#### 3. 1 モニタリングの条件

海洋堆積物や河川底泥などの還元的自然条件下では、塩素化ダイオキシンが脱塩素化される現象が確認されている。このような土自体の無害化能力を把握するために、実汚染土壌を用いて様々な条件下で 1 年間モニタリングを行った<sup>1)</sup>。材料にはゴミ焼却場由来の高濃度汚染土 (28000pg-TEQ/g) と工場排水由来の低濃度汚染土 (250pg-TEQ/g) を使い、培養条件として、酸素条件 (好気、嫌気)、炭素源等を変化させた。モニタリング開始 1 ヶ月後、3 ヶ月後、6 ヶ月後、1 年後にダイオキシン類濃度 (毒性)、異性体分布、着目微生物の数を測定した。しかし、低濃度汚染土のダイオキシン類濃度推移は、低濃度ゆえに分析が困難で明確な傾向が得られなかった。以降の章では高濃度汚染土のモニタリング結果を報告する。表-1 にモニタリングの概要を示す。

表-1 モニタリングの概要

No.	酸素条件	添加物 (微生物、炭素源)	備考
1	好気	YA 株	モニタリング初期値 : 28000pg-TEQ/g
2		YA 株+DF	
3		なし	
4	嫌気	酢酸	供試体はバイアル瓶にて環境管理した。
5		乳酸	
6		糖蜜	
7		なし	

### 3. 2 好気条件下の自然減衰

図-3に、好気条件下で1年間モニタリングした高濃度汚染土のダイオキシン類濃度を示す。YA 株を添加したサンプル、YA 株と DF を添加したサンプルと、何も添加していないサンプル（対照区、Cont と記載）を比較した。YA 株を添加した場合にダイオキシン類濃度の低下が見られる。図-4には、モニタリング開始後6ヶ月までの微生物量（YA 株）の推移を示す。YA 株のみの添加では、1ヶ月後には微生物量が急速に低下しているのに対して、YA 株と DF を共に添加した場合には微生物量3ヶ月程度までは保たれている事から、DF を添加すると微生物量の維持に有効であることがわかる。ただし、ダイオキシン類濃度の低下はYA+DFにおいて顕著でないことから、DD よりも DF の分解が優先されたとも考えられる。

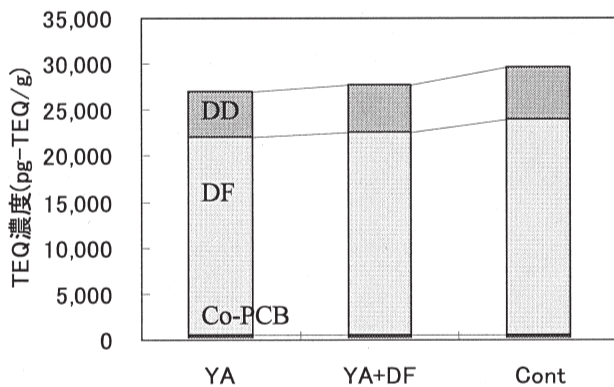


図-3 高濃度汚染土のダイオキシン類濃度（モニタリング開始から1年後、好気条件）

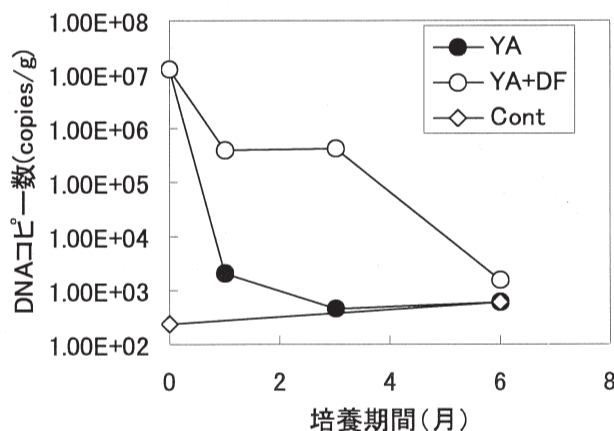


図-4 モニタリング中の微生物量の推移

### 3. 3 嫌気条件下の自然減衰

図-5に、嫌気条件下で1年間モニタリングした高濃度汚染土のダイオキシン類濃度を示す。炭素源として、酢酸、乳酸、糖蜜をそれぞれ添加した。何も添加しないサンプルを対照区(Cont)として示す。炭素源を添加した3試験区では全てダイオキシン類濃度の低下が見られる。特に糖蜜を添加した場合に低下の度合いが大きかった。

嫌気条件下でダイオキシン類の脱塩素作用を有する微生物として Dehalococcoides 属が報告されていることから、それぞれの試験区の Dehalococcoides 属に着目し微生物量の推移を測定したものを図-6に示す。酢酸を添加することにより Dehalococcoides の活性を維持できることがわかる。しかしながら図-5では糖蜜添加の試験区の方が TEQ の低下が顕著であることから、Dehalococcoides 以外の他の微生物の関与の可能性も考えられる。

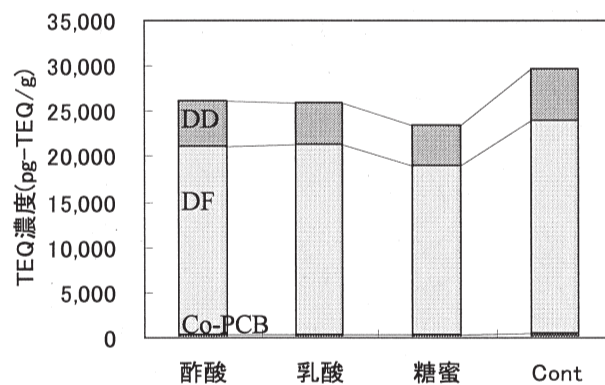


図-5 高濃度汚染土のダイオキシン類濃度（モニタリング開始から1年後、嫌気条件）

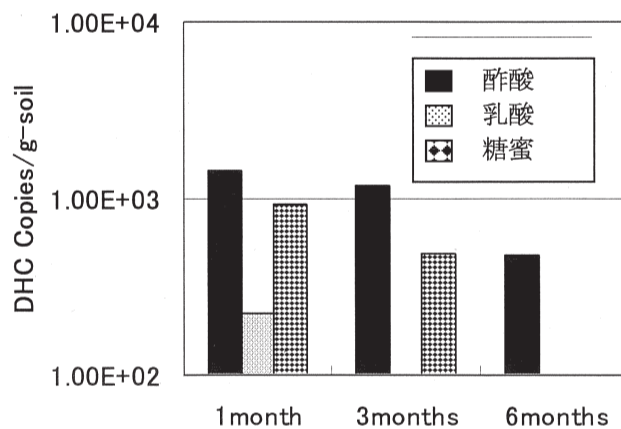


図-6 微生物量の推移（嫌気条件）

次に、酢酸添加試験区について、目的微生物 (Dehalococoides) の増殖とダイオキシン類の分解の関連を比較したものを図-7に示す。モニタリング開始から1ヶ月の間にダイオキシン類濃度の著しい低下が見られると同時に Dehalococoides の増殖が確認されることから、Dehalococoides がダイオキシン類の分解に寄与していると考えられる。図-8には、Dehalococoides 属の量とダイオキシン類の毒性低下の相関を示す。

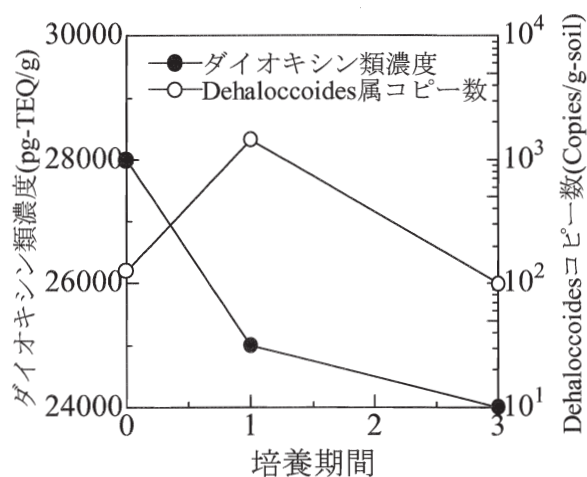


図-7 微生物の増殖と分解の関係

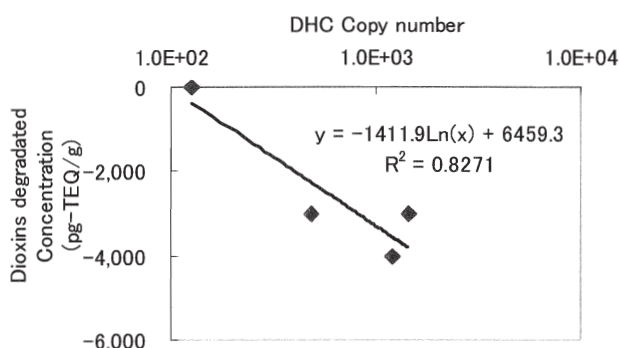


図-8 Dehalococoides 量と毒性低下

### 3. 4 汚染土壌モニタリングによって得られた知見

1年間の培養試験で以下の知見が得られた。

- ・ 微生物の生育環境を整えることで、ダイオキシン類の微生物分解を促進することができる。
- ・ 好気条件では、YA 株及び DF の添加が有効である。(ただし、YA 株の維持に有効な DF の添加は添加濃度によってはダイオキシン類

の分解を阻害する可能性がある。)

- ・ 嫌気条件では Dehalococoides 属がダイオキシン類の分解に寄与している。しかし、それ以外の微生物の関与の可能性もある。

また、図-7、8で示したように有用微生物の増殖と有害物質の分解状況に関連が強いことは、汚染土壌の微生物浄化を試みる際に、微生物の活性状況が汚染物質の分解状況を測定する代替指標となりうる可能性につながる。特にダイオキシン類分析は高価で時間も要するため、微生物量測定を簡易な指標として用いる事ができれば実務的に有効に機能すると考えられる。

## 4. 微生物の土壌内移行性

### 4. 1 X線 CT 撮影の適用

汚染土壌の原位置微生物浄化を実施する場合、目的箇所にも有用微生物を効果的に供給する必要があり、そのために微生物の土壌内の移動特性を把握しなければならない。土壌内の物質移動を測定する一般的な方法は、カラム透水試験により浸透 (流出) 水中の物質量を測定し、土壌内の挙動を推定する方法である。本研究でもこの方法により予備試験を行ったところ、浸透水の溶解成分と微生物は異なる挙動を示す場合があることがわかった。そこで、カラム透水試験に供試体の X線 CT 撮影を組合せ、土壌内を通過あるいは捕捉される微生物の挙動のより詳細な把握を試みた。通常のカラム試験供試体ではカラム側壁と供試体土壌の境界が水みちになる可能性があったため、供試体をラバーメンブレンで拘束し三軸セル内で透水試験を行った。図-9に三軸棟透水試験装置の全容を示す。供試体土壌の間隙体積を 1 PV (Pore Volume) とし、微生物含有水を 1 PV 通水するごとに流出水中の微生物量測定と供試体の X線 CT 撮影を行った。X線 CT 撮影は、港湾空港技術研究所所有のマイクロフォーカス X線 CT 装置を用い、三軸セルごと撮影室内に入れて行った。X線 CT 撮影では供試体内部の CT 値分布が非破壊で得られる。CT 値は物質の密度に対応するため、水で満たされた土壌内の間隙 (密度 1.0g/cm<sup>3</sup>) に微生物 (密度 1.1 ~ 1.2 g/cm<sup>3</sup>) が充填された場合に間隙部の密度変化として測定することができる。なお、微生物の大きさは一般に数 μm で、本研究で使用したマイクロ CT 装置の解像度では微生物の個々の姿を捉えることはできない。

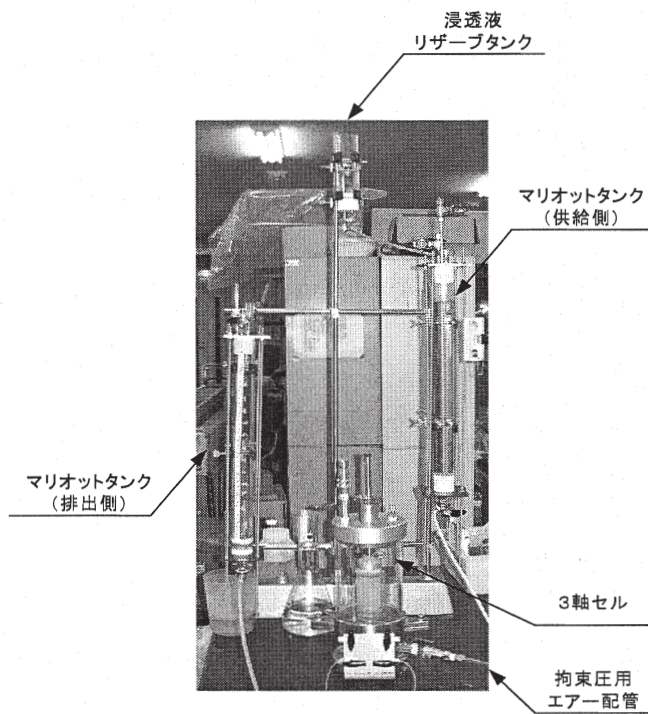


図-9 三軸透水試験装置

#### 4.2 微生物含有水の浸透試験

直径 50mm、高さ 80mm の豊浦砂供試体を用い、微生物含有水（培養が容易な大腸菌を使用）を浸透させた時の供試体の透水係数の変化、及び流出水の色調の変化を図-10に示す。微生物が土壌内の間隙に捕捉され、供試体の透水係数がわずかに低下する。また、浸透水量が多くなると微生物が供試体を通して流出するため流出水が着色する。

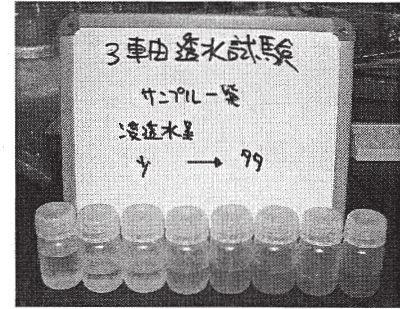
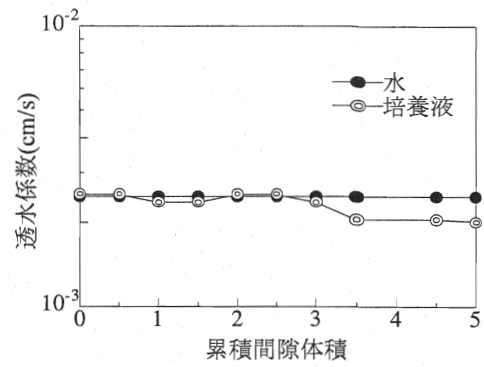


図-10 微生物含有水の浸透に伴う

供試体透水係数および流出水の色調の変化

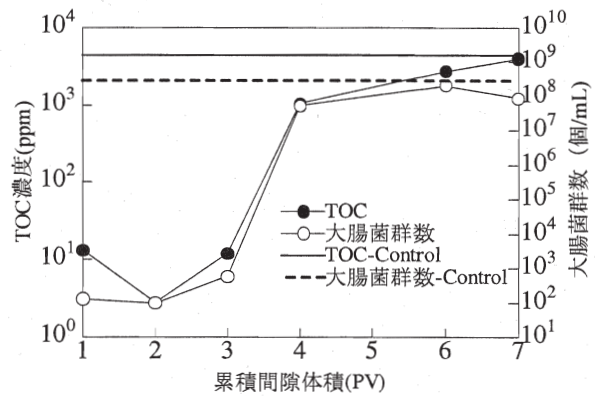


図-11 豊浦砂供試体の三軸透水試験における流出水中の微生物量と TOC

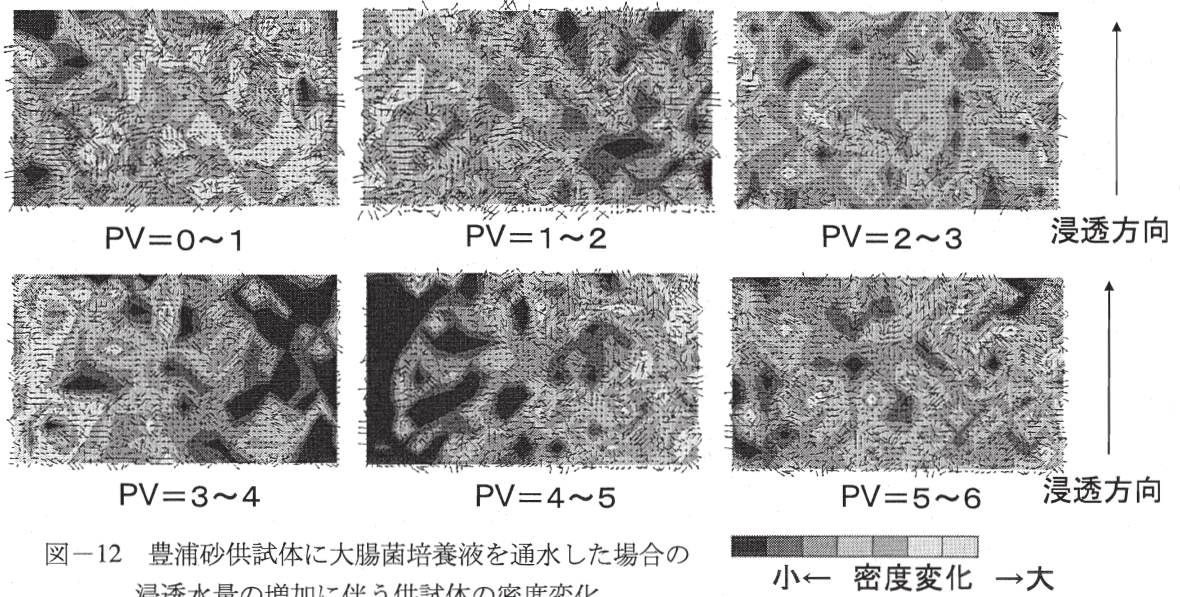


図-12 豊浦砂供試体到大腸菌培養液を通水した場合の浸透水量の増加に伴う供試体の密度変化

図 11 には、三軸透水試験において浸透水量に対して流出水の微生物量と溶解成分である全有機炭素 (TOC) をプロットしたものを示す。累積間隙体積が 3~4 PV となるあたりで大腸菌の土壌内の間隙への充填が進み土壌の間隙水が微生物含有水に置換された状態となると推測され、PV=4 以降では流出水中の微生物量及び TOC がほぼ定常となる。

供試体の軸方向中央部の高さ 50mm の範囲を X 線 CT 撮影し、内部の密度変化を浸透水量ごとに示したものが図-1 2 である。X 線 CT 撮影では密度分布の 3 次元情報が得られるが、ここでは中央断面について可視化した。各浸透段階の対象領域内の密度分布は、以下の通りである。

- ・ PV=0~1 : 全体的に密度増加
- ・ PV=1~2 : 部分的 (左側) に密度増加
- ・ PV=2~3 : 全体的にわずかに密度増加
- ・ PV=3~4 : 部分的 (左側) に顕著な密度増加
- ・ PV=4~5 : 部分的 (右側) に顕著な密度増加
- ・ PV=5~6 : 全体的にわずかに密度増加

PV=3 までに微生物の間隙への充填と共に徐々に全体の密度増加が進み、PV=3~4 にかけて対象領域内に保持しきれなくなった微生物が領域外に流出していく過程が定性的ではあるが捉えられ、図-1 1 で得られた傾向と一致している。密度増加が部分的に発生し、また顕著な密度増加の発生領域は同じ範囲に留まらないという事は、微生物の充填・移動過程は供試体内で均一に起こるわけではなく、微生物が土壌に捕捉されることにより間隙を狭め透水能を下げ、つまり目詰まりして持続的な微生物含有水の通過を妨げるという事を反映している。

#### 4. 3 微生物の土壌内移行性

土質や浸透水特性をパラメータとし、前述のような三軸透水試験及び X 線 CT 撮影を行った。得られた主要な知見は以下の通りである。

- ・ X 線 CT 撮影と透水試験の流出水中の微生物の定量の組み合わせは、微生物の土壌内移行性を把握に有効な手段である。水や溶解成分と微生物の挙動は必ずしも一致しない。
- ・ 砂供試体では、土壌への微生物の供給は容易であるが、離脱、流出も起こりやすい。
- ・ 細粒土では粘性土の比率に応じて浸透特性が変化すると共に、均質な供給が困難となる可能性がある。一旦供給された微生物はその後洗浄過程を経ても容易には離脱しない。

汚染土壌の原位置浄化では、汚染箇所周辺に有用

微生物を効率的に供給する必要がある。また、目的箇所到達したとしても、汚染物質の分解に必要な時間、活性を保ちながら留まる必要がある。土の浸透特性、間隙特性、微生物の大きさや粘性等、様々な条件を考慮して今後検討する必要がある。

#### 5. まとめ

本研究では、ダイオキシン類汚染土壌の無害化促進を目指した基礎データを取得するために、(i) ダイオキシン類の分解に寄与する土壌微生物の探索とその活性化条件の検討、(ii) 実際の汚染土壌を使用した微生物浄化 (自然減衰) モニタリング、(iii) 微生物の土壌内移行性に関する検討を実施し、以下のような知見が得られた。

- ・ 嫌気状態では、脱塩素反応により高塩素化ダイオキシン類を低塩素化する *Dehalococcoides* 属が、好気条件では *Janivacter* 属の YA 株が、ダイオキシン類を分解する。様々な異性体を含むダイオキシン類汚染土壌の無害化には両者の組合せが有効である。
- ・ 有効な微生物の活性状況が、ダイオキシン類汚染土壌の微生物浄化において分解状況を把握する代替指標となりうる。
- ・ 適切な環境を維持することにより、微生物の活性を保持しダイオキシン類の分解を促進することができる。
- ・ X 線 CT スキャンと透水試験流出水の微生物の定量の組み合わせにより、土壌内の微生物移行特性をより有効に把握することが可能である。微生物の挙動と水や溶解成分の挙動は必ずしも一致しないので、別途考慮する必要がある。

従来微生物浄化は困難と考えられていたダイオキシン類汚染土壌に対して、適切な環境を整え有用微生物の活性を維持すれば無害化を促進できることがわかった。一方で、そのような土壌内環境を、必要な箇所に、均質に、効果的に、また持続的に構築することはそれほど容易ではない。今後は、有用微生物の活性を維持するための土壌内環境の構築方法についてさらに検討を進める必要がある。

#### 参考文献

- 1) 畠俊郎、栗栖太、桑野玲子、矢木修身：「ダイオキシン類汚染土壌の嫌気性微生物を利用した分解処理技術の開発」土と基礎、Vol.52, No.10, pp.15-17, 2004 年 10 月