栄養塩浸透域制御による バイオレメディエーションの効率化

藤原 篤志¹・森 也寸志²・松本 祐子¹

¹島根大学大学院 生物資源科学研究科 (〒690-8504 島根県松江市西川津町1060)

E-mail: a069507@matsu.shimane-u.ac.jp

²島根大学生物資源科学部 (〒690-8504 島根県松江市西川津町1060)

E-mail: yasushim@life.shimane-u.ac.jp

汚染土壌における微生物浄化では、土壌の微細間隙にまで栄養塩を送り届ける技術が重要である。また、浄化に使用されない栄養塩は二次的に地下水を汚染するため、粗大間隙を通じたバイパス流を防ぎながら浄化することが求められる。本研究では粗大間隙の有無の違いを持つ汚染土壌カラムに対して飽和・不飽和で栄養塩を浸透させ、移流・分散が微生物活性にどのように影響を与えるかを精査した。結果的に、粗大間隙を有し不飽和浸透をさせた試料が最も微生物活性が高くなった。不飽和浸透がバイパス流を防ぎながら分散を卓越させ、微生物活性に有利な水分量を維持し、かつ粗大間隙が目詰まり防止の役割をしている様子が観察された。飽和に比べて栄養塩の利用効率が約10倍で、地下水汚染の可能性も最小であった。

Key Words : bioremediation, oil contamination, convection, dispersion, macropore

1. はじめに

バイオレメディエーションとは、有機汚染物質を、制御された条件下で、無害な状態または法律などに定められた濃度以下に、生物学的に分解するプロセスとして定義されている¹⁾。掘削や地下水揚水を伴う物理的・化学的修復技術と比較して、安価で、現場を乱さない、処理に伴う二次廃棄物の発生が少ないなどの利点がある²⁾。ところが、浄化を担う微生物の活性は、地質や温度、汚染物質濃度等の外部的要因に大きく影響を受けることから、微生物の利用に伴う環境影響に関しては、適用前に十分評価を行う必要がある³⁾。

近年、日本でも土壌汚染対策法が制定され、様々な環境負荷物質による汚染の浄化が義務づけられている。ところが汚染物質のうち、ベンゼン以外の油分は、油臭、着臭、油膜の形成、植物の生育阻害などの影響が考えられるにもかかわらず、環境基準物質に含まれておらず、油汚染対策については規制が遅れている。油は一般に水より軽いため、その汚染は土壌不飽和帯を含む地下水より上の部位で観察される。また、汚染の初期は多くの場合土壌不飽和帯を通じて発生することを考えると、油汚染土壌の浄化についてはこの土壌不飽和帯における浄化工法を考えることが極めて重要であることが分かる。油汚染土壌の浄化の場合、好気性微生物による分解が期待

され、これまでの研究から浄化に影響する因子として、温度、酸素供給、栄養塩供給などが挙げられている⁴⁾。これらのうち、水移動によって実現される環境条件についてはその浸透現象が精査される必要がある。

現在実施されている汚染土壌を対象としたバイオレメディエーションは、微生物を活性化させるために窒素・リン酸成分を含んだ栄養塩を供給するのが主流である。ところが、多くの地盤は大小様々な間隙で構成されており、例えば、乾燥による土の収縮や植物根の枯死・腐敗に伴い、マクロポアと呼ばれる粗大間隙（微小亀裂）が形成される⁵⁾。このような土壌環境では浸透水が粗大間隙を選択的に流れるバイパス流が発生し^{6) 7)}、溶質移動をコントロールすることは極めて難しい。例えば、マクロポアがある場合、その間隙周辺に栄養塩の供給が成されるという報告がある⁸⁾。この場合、その他の部位に栄養塩が行き渡らないために十分な浄化効率が期待できない可能性が否定できない。つまり、栄養塩を汚染土壌の微細間隙の隅々まで浸透させることは浄化効率を上げるために必須である。

土壌中の溶質移動は、ダルシー則に従ってマスとしてそのまま移動する「移流」と、間隙構造のネットワークに影響される速度ムラと、間隙内における速度のムラが原因で生み出される水力学的「分散」に大きく影響される⁹⁾。微細間隙に栄養塩を送り込み、微生物活性を上げ

るためには分散が卓越する条件を整える必要がある。しかしながら、間隙構造に上述の粗密の違いがあるときには、粗大間隙に流れが集中するため移流が卓越し、分散が制限されるために微細間隙に栄養塩は到達しない¹⁰⁾。また、砂壤土でも分散の水飽和度依存性が報告されており^{11,12)}、微細間隙中に潜む汚染物質を対象とするバイオレメディエーションにおいてはこの微細間隙に栄養塩を到達させることが必須となる。

一方で、現場では浄化効率を上げる目的で、どちらかといえば早く・大量に栄養塩または浄化物質を送り込んでいる。その場合、余分な栄養塩は微生物に有効利用されないまま間隙を通じて系外へ流出してしまう。加えて、間隙を通じて栄養塩そのものが流出することによる二次汚染が懸念される。そのため、土中における栄養塩の移流・分散を適切に制御し、微生物活性の向上を図るのはもちろんのこと、同時に、栄養塩のリークによる二次的汚染についても注意を払い、効率的なバイオレメディエーションを示すことが求められる。さらに、微生物浄化の過程を高度な遺伝子情報を使って評価する報告などがあるが、簡易にこれを評価することが出来れば非常に有効である。

筆者らのこれまでの研究から、粗大間隙がある自然の土壌では水分によって全く異なる溶質移動経路が存在することが明らかになった¹³⁾。図-1はその例で、左右は全く同じ土壌であるが含水率が異なると全く違う移動経路が造影される様子が分かる。透水試験とX線造影の結果から、カラム下端で-3kPa、また、飽和透水時の1/10の浸透速度で溶液浸透実験を行うと、粗大間隙を持ち、バイパス流のリスクのある土壌でも分散が卓越する様子が観察された¹⁰⁾。そこで本実験では、生態系への影響が少ないとされる土着の微生物を利用したバイオスティミュレーションを想定した実験を行った。すなわち本研究の目的は、油汚染土壌に対して、土壌間隙構造と浸透条件を変えて栄養塩を浸透させ、汚染浄化のために微生物活性が最大となる条件を探ることである。栄養塩の供給量と漏出量、土壌の間隙構造、窒素・リン酸成分の動態に着目し、これらを総合的に評価することでより効率的なバイオレメディエーションを検討した。

2. 実験方法

(1) 油汚染土壌を用いた栄養塩浸透実験

本実験は、油汚染土壌における栄養塩の浸透を制御し、微生物活性の程度や窒素・リン酸成分の動態を見るものである。今回の実験では日本で多くの面積を占める火山灰性黒ぼく土を使用した。

図-2のように100ccサンプラーを3つ繋げて円筒状のカ

θ=0.554 Macropore Flow θ=0.374 Matrix Flow

図-1 X線撮影した土壌中の物質移動¹³⁾ (Mori et al. 2001 より一部改変) ポジ表示で黒い部分が造影剤の浸入部位。θは体積含水率(m³m⁻³)。

図-2 浸透実験装置模式図および間隙配置図

表-1 実験に使用した栄養塩成分

成分名	濃度 (mg/L)	成分名	濃度 (mg/L)
NO ₃ ⁻	99.43	NH ₄ ⁺	134.28
NO ₂ ⁻	0.00	K ⁺	117.56
PO ₄ ³⁻	344.25	Mg ²⁺	0.81
SO ₄ ²⁻	0.61	Ca ²⁺	0.77
CL ⁻	4.21	Na ⁺	3.50
F ⁻	0.00	Li ⁺	0.00

ラムを作成し、その下端には栄養塩を排水させるためのチューブを設けた。試料は5000mg/kgの油汚染土壌を想定し、黒ぼく土180gに汚染物質として切削油0.90gを混ぜ合わせた。そしてこの試料を10cmの高さで円筒カラムに乾燥密度0.90g/cm³となるように充填し、それを4つ準備した。そのうち2つには鉛直方向に貫く直径1mmの粗

大間隙7本をステンレス棒で作った。これは浄化現場の地中に存在する粗大間隙を想定したものであり、土壌の間隙構造の違いが微生物活性や溶質移動にどう影響するかを調べるためのものである。

栄養塩の供給には微量定量ポンプを使用し、洗掘防止のために試料表面を濾紙で覆った。栄養塩の詳しい成分は表-1のとおりである。比較のために二種類の浸透速度(10^5cm/s 及び 10^4cm/s)で30日間連続供給した。それぞれの浸透速度を実現するために、 10^5cm/s では栄養塩の供給量を 1.0ml/hr として下部に 3.2kPa ($32\text{cmH}_2\text{O}$) のサクションをかけ、フラックス 10^4cm/s では栄養塩の供給量を 10.0ml/hr として下部に 1.6kPa ($16\text{cmH}_2\text{O}$) のサクションをかけた。サクションを与えるときに、ポンプを使った自動圧力調節を行うと、一般に、設定した値の上下で圧力の変動を繰り返す。本実験で与える圧力は非常に微弱であるため、このような変動は望ましくない。そこで図-2にあるように、排水チューブをカラム下に垂らすことで重力によって所定の圧力を得るようにした。このとき、前者は実験終了時までカラム内が不飽和に維持され、後者は飽和に維持された。

したがって、不飽和系・微細間隙 (Unsaturation・Micropore: UMi), 飽和系・微細間隙 (Saturation・Micropore: SMi), 不飽和系・粗大間隙 (Unsaturation・Macropore: UMa), 飽和系・粗大間隙 (Saturation・Macropore: SMa) の4種類の異なる条件下でカラム実験をして比較検討を行った。そして24時間ごとに得られる排水液について微生物活性及び陰イオン濃度を分析した。陰イオン濃度の分析には、イオンクロマトグラフィー (Shimadzu, PIA-1000) を使用した。なお、実験期間中は室温を 25°C に保った。

(2) 微生物活性の測定

微生物活性の測定は、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を用いたATPの測定¹⁴や遺伝情報を用いたFISH法¹⁵などがあるが、継続的に迅速に計測できる手法が望ましく、ここではFDA加水分解活性計測法を適用した¹⁶。これまでに例えば針葉樹における微生物バイオマス¹⁷、菌バイオマス¹⁸、土壌の微生物活性¹⁶等の計測に利用されており、ここでは排水液での微生物活性計測を試みた。

まず排水液 2.0ml とリン酸緩衝液 20.0ml とを混合させたものにFDA原液を 0.1ml 滴下し、 25°C の恒温槽で静置培養する。FDA原液を加えることにより、FDAと微生物酵素であるカルボキシルエステラーゼとが反応し、時間の経過とともにフルオレセインが生成され、黄緑色の蛍光を発するようになる (図-3)。この発色の程度を波長 490nm における吸光度として測定する。さらに、排水液中のフルオレセイン量を定量化するために、排水液 1.0ml あたり、培養1時間あたりに生成されたフルオレセ

図-3 FDA加水分解過程

図-4 排水量の推移

イン量 ($\mu\text{mol/ml/hr}$) を算出し定量化した。なお、培養時間については、FDAと微生物酵素との反応が充分行われ、吸光度の違いが良く現れるまで培養した。

3. 結果と考察

(1) 栄養塩浸透実験の結果

各カラムからの排水量の推移を図-4に示した。SMiについては、実験開始後既に6日目でカラム内で目詰まり

が起き、湛水が確認されたため、7日目にポンプ流量を10.0ml/hrから6.0ml/hrに減少させた。しかし湛水は解消されなかった。飽和浸透では土壌微細粒子が流出しやすく、いったん目詰まりすると自然には解消しないため、人工充填など粗大間隙がないところへ飽和浸透を続けることは、溶液を土壌に送り込む目的において得策ではない。しかしながら、飽和流でも粗大間隙のあるSMAについては、透水性を維持することが出来た。これは粗大間隙が通水性を維持したためで、いわばバイパス流の発生によって長期間の実験を可能にしている格好であると判断した。不飽和浸透を維持したUMi,UMaはいずれも30日間安定して排水が行われたことが確認できる。

(2) FDA加水分解活性計測法の評価

排水液とリン酸緩衝液の中にFDAを投入し、その吸光度の変化を時系列で追ったものが図-5である。微生物活性は最終的に時間当たりで換算するため、反応初期の傾きと線形性が保証される限りにおいては、その差がはつきりと現れる方が測定誤差を小さくできる。

FDA原液滴下後、数時間おきに吸光度を測定したところ、50時間以内であればどの試料もフルオレセイン量の生成量に関係なく培養時間に比例して吸光度が高くなるのがわかり、高い相関を得ることができた(図-5)。実際には、試料整理のサイクルから、また安全側で計測する意味から培養24時間の測定値を採用した。このようにして算出されるフルオレセイン量が多いほど微生物活性の高い試料であり、逆に少なければ微生物活性の低い試料であると判断される。

(3) 排水液中の微生物活性の評価

24時間毎に得られる排水液についてフルオレセイン量を測定したところ、図-6に示す結果となった。前半15日間は条件間でそれほどの違いはないが、UMa>UMi>SMA>SMiという大小関係は観察された。これは先の図-5でも端的に表れている。一般に不飽和浸透を促す方が飽和浸透より微生物活性度が高いと判断できる。

本実験における不飽和浸透では浸透が飽和時の1/10の量で推移することから10日までは滞留の影響があると考えたとしても、実験を開始して16日が経過したあたりから、特にUMaでは、急激な微生物活性の上昇が確認されている。これまでの成果から粗大間隙を有する土壌であっても不飽和状態ではバイパス流を防止して、栄養塩の分散が卓越することが溶質移動実験で分かっている¹⁰⁾。今回はこれを汚染物質の分解に適用したところ、栄養塩が微細間隙へ到達した結果としてそれが再現できた推察できる。微生物活性を上げるために飽和浸透の1/10の浸透量で十分であることはその効率が10倍近いことを指し、栄養塩に枯渇資源であるリンを使用している限りにおい

図-5 FDA加水分解反応における吸光度の変化
(7日目排水液)

図-6 排水液におけるフルオレセイン量の推移

図-7 実験終了後の試料の体積含水率

図-8 系外へ流出した NO_3^- 及び PO_4^{3-} 濃度の推移
(実線は流入濃度)

図-9 系外へ流出した NO_3^- 及び PO_4^{3-} 絶対量の推移
(実線は飽和浸透の、点線は不飽和浸透の流入量)

ては不飽和浸透の方が効率がよい。

しかし、UMaの全体傾向として活性が急上昇しているとはいえ、部分的に急降下しているところがある。微生物群落は振動現象を繰り返しながら増減することがあるが、今回のその理由について明らかにならなかった。

ここで、浸透実験終了後に各試料における体積含水率を測定し、図-7に示した。一般的には、土壌における飽和含水率の60-80%の水分量で微生物活性は最高となることが知られている¹⁹⁾。実験に使用した黒ぼく土の飽和含水率は65.4%で、その60%と80%に相当する体積含水率はそれぞれ39.2%と52.3%である。浸透実験終了後の試料の各部位の体積含水率が全てこの範囲にあるのはUMaだけである。本実験は水分と酸素供給のうち、水分については不足するものはないが、逆に飽和浸透は目詰まりも重なって酸素供給に不利で、微生物活性を効率的に上げることができない。微細間隙しかない土壌 (UMi) は境界条件制御の上では不飽和であるが試料上方の水分が高い。これは微生物コロニーによる目詰まりと考えられる。微生物活性が高まると微生物はコロニーを作るため、目詰まりの原因になり²⁰⁾、同時に酸素供給には障害となる。

つまり酸素と栄養塩供給を行うバイオスティミュレーションにおいては微生物の活性化が逆に目詰まりと酸素遮断の元になるという矛盾を抱えていると言える。今回、粗大間隙はバイパス流を発生させる原因としてそれを防止し、栄養塩の微細間隙への浸透を目指した。しかし逆に、粗大間隙のある試料は酸素供給の面で有利で、不飽和浸透を維持してバイパス流の発生を制限しながら分散を高めたところ、飽和の60-80%という水分量も同時に維持でき、相乗効果的に微生物活性を高めることができたと考えられた。またかつ、粗大間隙の存在が過剰な水分上昇を防いでいると考えられた。

(4) 陰イオンの動態評価

排水液中の硝酸・リン酸イオン濃度を分析した結果が図-8, 9である。実験開始後目詰まりを起こして湛水したSMiを除いて、他の試料では排水液中の硝酸イオン濃度が上昇した。カラムへ供給した栄養塩の硝酸イオン濃度は99 mg/Lであったが、それよりも圧倒的に高い値を示している。バイオスティミュレーションでは有機物の好氣的分解を促進するため、同時に硝化作用が起こり、排

水中の硝酸態窒素濃度が高くなりがちであることが分かった。一方、SMiについては終始還元状態におかれ、脱窒が起きたために硝酸イオン濃度が上昇しなかったと考えられる。

リン酸イオンについては、SMi、SMaともに9日目以降に検出されるようになった。これは、黒ぼく土が本来有しているリン吸着能を上回る栄養塩が供給され続けたからと考えられた。一方、UMi、UMaでは30日間全くリン酸イオンは検出されなかった。これは本実験における不飽和浸透では溶液供給量が飽和時の1/10になることが大きく影響していると考えられた。なお、カラムへ供給した栄養塩のリン酸イオン濃度は344 mg/Lであった。

さらに24時間ごとの排水液量と陰イオン濃度のデータから、系外へ流出した硝酸イオン及びリン酸イオンの絶対量を算出し、図-9に示した。すなわちこの値がバイオレメディエーションに使われずに環境中へ漏出する栄養塩量と捉えられる。粗大間隙があり、飽和状態を維持した物がもっとも漏出量が多い結果となり、現場ではこれに近いことが起こっていると推測された。微生物活性が最大であったUMaは栄養塩の漏出は少なく、注入に対する活性増進効果が最大になっていると判断できる。

ここで図-8や9について、不飽和浸透を行った試料に注目すると、粗大間隙のあるなしにかかわらず、排水液の濃度変化は互いに似通っている。つまり不飽和浸透ならば間隙構造の違いを受けない一定の浸透が行われたことがわかる。粗大間隙のないものは人工充填なので当該の浸透ペースならば分散が卓越する。それと同じ破過曲線と言うことは粗大間隙がありながら十分な分散が得られていることを示している。不飽和度が高まれば粗大間隙の影響が無視できるであろう事は想像に難くないが、わずか-3kPa程度という小さな吸引圧による境界条件制御で実現可能であることは特筆すべき事と考えた。また、分散が卓越する条件を探索した溶質移動の成果¹⁰⁾を少ない薬液浸透による微生物活性の最大化という成果によって、バイオレメディエーションでも確認することが出来た。他方、飽和状態で大量の栄養塩を流している場合、構造の影響を受けてバイパス流が発生し、大量の栄養塩が効果的に使用されずに漏出する。さらに微生物活性の影響や粘土粒子の分散によって土壌が目詰まりを起こす可能性が高い。本実験における油の分解は好気的微生物の活性を期待しているので条件としては不利になる。

本実験は、微生物活性をより高めるための条件として浸透現象に着目し、フラックスを変えて実験したが、溶質が流入する総量を同じにした場合でも、飽和浸透については土壌内部での溶質濃度が上昇しないこと、不飽和浸透では粗大間隙が存在しても、その影響をキャンセルし、土壌内部で分散が発達し、溶質が微細間隙に到達する様子が報告されている¹⁰⁾。バイオレメディエーション

とは浄化するだけでなく、その後の水環境についても配慮すべきであり、加えて栄養塩に含まれるリンは枯渇資源であることを考えると、少量で最大の効果を上げる工法が望まれる。早く大量に薬液を送り込みたいとする一般に想像される概念とは逆説的に、むしろ不飽和で浸透速度を落とした方が得策と考えられた。

4. まとめと課題

本研究では、微生物活性を高めることができ、尚且つ環境への負荷を低く抑えたバイオレメディエーションを実現するための条件として次のことがわかった。

- (a) 栄養塩を微細間隙にまで効果的に浸透させるために、分散を卓越させる浸透速度を維持すると、土壌の含水量が最大容水量の60-80%に保たれていた。栄養塩浸透だけでなく、水分量も微生物活性にとって最適な範囲に保たれる結果が得られた。
- (b) バイパス流の発生を招くものとして捉えられていた粗大間隙は、不飽和状態を維持する限りにおいては、逆に土壌中への酸素供給の面で有効に働く可能性があり、目詰まりがしにくいこともあり、より高い微生物活性が期待できる。
- (c) 不飽和浸透を維持するために栄養塩の供給を飽和浸透に比べて1/10にしたため、流出する窒素・リン酸成分の絶対量を低減させることができた。このことから、栄養塩の供給量が適当であれば粗大間隙の存在下であってもバイパス流の発生を防ぎながら微生物活性を上げられると分かった。

すなわち、本研究で用いた系では粗大間隙の影響をキャンセルしながら分散を卓越させることができたため、二次汚染を防止しながら効果的に微生物活性を上げることが可能になったと考えられた。

今回の実験は、微生物活性と陰イオンの動態に着目して実施したため、30日間という短いスパンで評価を行った。しかし、汚染物質の分解を確認し、浄化率を把握するためにはさらに実験期間を延ばし、長期にわたり観察し評価することが必要であり、研究の次の課題である。

謝辞：本研究の一部は日本学術振興会科学研究費 基盤研究(C)(18510074)の支援を受けて行われた。またFDA加水分解活性については島根大学生物資源科学部 巢山弘介先生にご指導頂いた。種々の支援・ご助言に対し深謝いたします。

参考文献

- 1) Mueller, J. G., Cerniglia, C. E. and Pritchard, P. H.: Bioremediation of Environments Contaminated by

- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, In *Bioremediation: Principles and Applications*, pp.125-194, Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- 2) Balba, M. T., Al-Awadhi, N. and Al-Daher, R.: Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation, *Journal of Microbiological Methods*, Vol.32, No.2, pp.155-164, 1998.
 - 3) CDR 研究会：有害廃棄物による土壌・地下水汚染の診断, pp.136-142, 環境産業新聞社, 2002.
 - 4) Romantschuk, M., Sarand, I., Petänen, T., Peltola, R., Jonsson-Vihanne, M., Koivula, T., Yrjälä, K. and Haahtela, K.: Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches, *Environmental Pollution*, Vol.107, pp.179-185, 2000.
 - 5) Beven, K. J. and Germann, P. F.: Macropores and water flow in soils, *Water Resour. Res.*, Vol.18, pp.1311-1325, 1982.
 - 6) Mori, Y., Iwama, K., Maruyama, T. and Mitsuno, T.: Discriminating the influence of soil texture and management-induced changes in macropore flow using soft X-rays, *Soil Science*, Vol.164, pp.467-482, 1999.
 - 7) Mori, Y., Maruyama, T. and Mitsuno, T.: Soft X-ray radiography of drainage patterns of structured soils, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Vol.63, No.4, pp.733-740, 1999.
 - 8) Natsch, A., Keel, C., Troxler, J., Zala, M., Von Albertini, N. and Defago, G.: Importance of Preferential Flow and Soil Management in Vertical Transport of a Biocontrol Strain of *Pseudomonas fluorescens* in Structured Field Soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.62, No.1, pp.33-40, 1996.
 - 9) Nielsen, D. R. and Biggar, J. W.: Miscible displacement in soils: I. Experimental information, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, Vol.25, pp.1-5, 1961.
 - 10) Mori, Y. and Higashi, N.: Controlling solute transport processes in soils by using dual-porosity characteristics of natural soils, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol.347, Issue 1-3, pp.121-127, 2009.
 - 11) Nuttmann, G., Maciejewski, S. and Joswig, K.: Estimation of water saturation dependence of dispersion in unsaturated porous media: experiments and modeling analysis, *Adv. Water Resour.*, Vol.25, pp.565-576, 2002.
 - 12) Toride, N., Inoue, M. and Leij, F. J.: Hydrodynamic dispersion in an unsaturated dune sand, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Vol.67, pp.703-712, 2003.
 - 13) Mori, Y., Takeda, I. and Fukushima, A.: Soft X-ray radiography of structure-induced macropore flow in clayey soils, *Clay Science for Engineering*, Balkema, Rotterdam, pp.297-302, 2001.
 - 14) McElroy, W. D. and DeLuca, M. A.: Firefly and bacterial luminescence: Basic science and applications, *Appl. Biochem.*, Vol.5, pp.197-209, 1983.
 - 15) Aulenta, F., Rossetti, S., Majone, M. and Tandoi, V.: Detection and quantitative estimation of *Dehalococcoides* spp. in a dechlorinating bioreactor by a combination of fluorescent in situ hybridisation (FISH) and kinetic analysis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.64, pp.206-212, 2004.
 - 16) Schnurer, J. and Rosswall, T.: Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.43, No.6, pp.1256-1261, 1982.
 - 17) Swisher, R. and Carrol, G. C.: Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces, *Microbiol. Ecol.*, Vol.6, pp.217-226, 1980.
 - 18) Gasper, M. L., Cabello, M. N., Pollero, R. and Aon, M. A.: Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil, *Curr. Microbiol.*, Vol.42, pp.339-344, 2001.
 - 19) 西尾道徳：土壌微生物の基礎知識, pp.166-185, 農文協, 1989.
 - 20) Seki, K., Miyazaki, T. and Nakano, M.: Effects of microorganisms on hydraulic conductivity decrease in infiltration, *European Journal of Soil Science*, Vol.49, pp.231-236, 1998.

(2009. 6. 18 受付)

ENHANCING BIOLOGICAL ACTIVITY FOR BIOREMEDIATION BY CONTROLLING NUTRIENT INFILTRATION ZONE

Atsushi FUJIHARA, Yasushi MORI and Yuko MATSUMOTO

Soil structure is heterogeneous with cracks or macropores where bypass flow would waste applied decontamination chemicals without interaction with soil matrix. We investigated the efficiency of bioremediation for oil contaminated soils by changing infiltration rate, i.e., saturated and unsaturated flow, for two types of soils, one had macropores inside and the other did not. Resultant biological activities in effluent increased dramatically for the experiment with an unsaturated flow with macropores. Unsaturated condition prevented bypass flow, allowed dispersion of nutrient in soils, and achieved appropriate water content for biological activity, while macropores prevented clogging during the infiltration experiment.