

バイオオーグメンテーションによる油汚染土壌浄化工法の確立

－「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の適合確認を取得－

The Establishment of a Method for Purification of Oil-polluted Soil using a Bio-augmentation Technique

- Acquire the Conformity Confirmation of “the Bio-remediation Use Indicator by the Microbe” -

宮北憲治* 小西正郎* 今井亮介**

要旨

微生物による油汚染土壌浄化は、環境に優しく、コストも低い点から、幅広く採用されているが、工期が長くなるという課題も持ち合わせている。この課題を解消するために、近年、外部から浄化能力の高い微生物（以下、「菌」と記す）を導入する工法（バイオオーグメンテーション）が注目されている。そこで、著者らは、浄化を速く確実に行うことのできるバイオオーグメンテーションによる油汚染土壌浄化の確立を目的として、種々の油含有土壌より高い油分分解能力を持つ菌を複数単離し、これらの単離菌を用いて油汚染土壌を浄化する工法を開発した。なお、この工法は国が定める「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」への適合が確認されており、環境面への安全性も考慮した工法であることが国からも認められた。本報では、当該工法確立のために行った浄化能力の高い菌の単離法、特徴、安全性、および実油汚染土壌への適用性について述べる。

キーワード：バイオオーグメンテーション、単離菌、適合確認、安全性

1. まえがき

近年、人の健康に重大な影響を与えている油膜・油臭の大きな原因となっている油汚染土壌を浄化するために、様々な工法が適用されている。その中で、微生物による浄化工法の代表的なものであるバイオスティミュレーション工法は、環境に優しく、コストも低いことから、現在まで幅広く採用されている。しかし、この工法は土着菌の処理能力に依存する割合が高いため、工期が長くなるという短所も持ち合わせている。このような現状から、微生物分解においても、浄化を速く確実に行うことを目的として、高い油分分解能力を持つ菌を投入して、油汚染土壌の浄化を図るバイオオーグメンテーションによる浄化工法を確立した。また、この工法は、国が定める「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」への適合が確認されており、環境面への安全性も考慮した工法であることが国からも認められた。バイオオーグメンテーション工法による油汚染土壌浄化工法の主な特徴は以下の通りである。

- i. 従来の土着菌の処理能力に依存したバイオスティミュレーション工法より、効率的な浄化が可能であ

る

- ii. 複数の単離菌を導入することにより、分解可能な油種および地質条件等の適用範囲が広がり、飽和炭化水素系に高い分解効果を期待できる
 - iii. 導入する複数の単離菌は、微生物の基本特性試験、動物への影響試験より、安全性を確認している
- 本報では、利用する複数の単離菌の分離選定法、特徴、安全性、及び実油汚染土壌への適用性について述べる。

2. 油分解菌に優れた菌の単離、選定

2.1 油分解に優れた菌の単離

菌の単離、選定は以下の手順で行った。

- a. 種々の油含有土壌を微生物源とし、重油および栄養塩が入った液体培地で振とう培養し、約 200 株の菌を単離した。
- b. 単離した約 200 株の菌を重油および栄養塩が入った液体培地で再度振とう培養し、著しく増殖した 10 菌株を選抜した。
- c. 上記 10 菌株の 16SrRNA 遺伝子塩基配列を解析し、相同性検索により近縁種をリストアップした。また、

*東日本支社環境技術部 **東日本支社土木工事第 1 部

これら近縁種に病原性が報告されているか否かを文献・データベース等で調査し、さらにその中から安全性の高いと思われる 3 菌株を選抜した。

ここで 16SrRNA 遺伝子塩基配列を解析することは、リボソームの小サブユニットの RNA 塩基配列を基にして微生物の進化系統を明らかにすることである。写真-1 に菌の振とう培養状況、写真-2 に菌の増殖状況、写真-3 に菌の単離状況を示す。



写真-1 菌の振とう培養状況

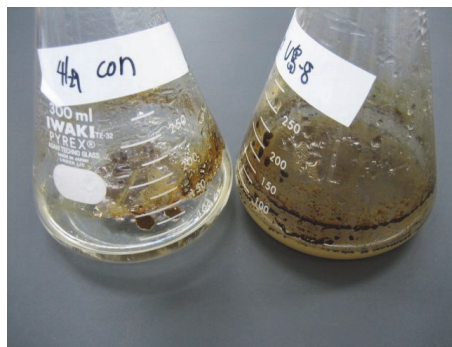


写真-2 菌の増殖状況

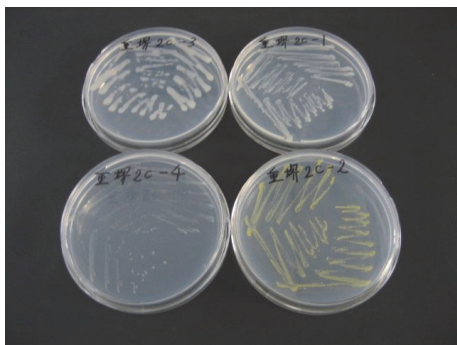


写真-3 菌の単離状況

2.2 単離した菌の特性

2.1 の方法で選抜された 3 菌株は 16SrRNA 遺伝子塩基配列から、それぞれ、*Novosphingobium* 属細菌、*Pseudomonas* 属細菌、*Rhodococcus* 属細菌に分類されることがわかった。そこで、この選抜された 3 菌株をそれぞれ、*Novosphingobium* sp. No.2 株、*Pseudomonas* sp. No.5 株、*Rhodococcus* sp. No.10 株と命名した。

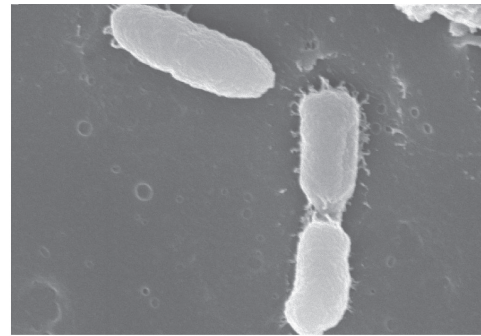
また、資化性試験等の各種試験及び各種文献から、選

抜した 3 菌株及びその属の細菌、は以下のような特性を持っていることがわかった。

a. *Novosphingobium* sp. No.2 株¹⁾ (写真-4 参照)

Novosphingobium 属の細菌は通性好気性、グラム陰性の桿菌であり、様々な環境から分離されていることから、地球上に広範囲に生息する微生物であると考えられている。No.2 株自身は、グルコースやピルビン酸等の代表的な糖、有機酸を資化できるほか、C₁₈、C₁₉ あるいは C₂₇ 以上の長鎖アルカンを分解・資化することができる。

なお、グラム陰性菌とは、菌を選別的に染め出す染色法（赤色に染まる、染まらないで細胞壁構造が異なることが把握できる菌の分類指標の一つ）において赤色に染まる菌を指す。桿菌とは、菌を形状分類した際に、円筒状の細長い形をしたものをいう。また、グルコースとはブドウ糖のことで、ピルビン酸とは、生体内でブドウ糖が分解される経路の重要な中間体のことである。アルカンとは、脂肪族飽和炭化水素のことであり、C_x と記述することが多い。

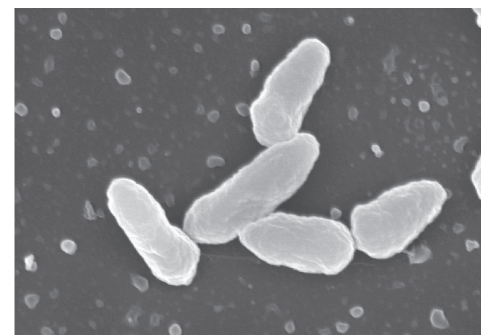


1.00 μm

写真-4 *Novosphingobium* sp. No.2 株

b. *Pseudomonas* sp. No.5 株¹⁾ (写真-5 参照)

Pseudomonas 属の細菌は通性好気性、グラム陰性の桿菌であり、種類が多く、幅広い特徴を持ち、様々な環境から分離されていることから、地球上に広範囲に生息する微生物であると考えられている。No.5 株自身は、グルコースやピルビン酸等の代表的な糖、有機酸を資化できるほか、C₁₉ 以上の長鎖アルカンを分解・資化することができる。



1.00 μm

写真-5 *Pseudomonas* sp. No.5 株

c. *Rhodococcus* sp. No.10 株¹⁾ (写真-6 参照)

Rhodococcus 属の細菌は通性好気性、グラム陽性の球菌または桿菌であり、様々な環境から分離されていることから、地球上に広範囲に生息する微生物であると考えられている。No.10 株自身は、グルコースやピルビン酸等の代表的な糖、有機酸を資化できるほか、C₁₀ 以上の長鎖アルカンを非常によく分解・資化することができる。

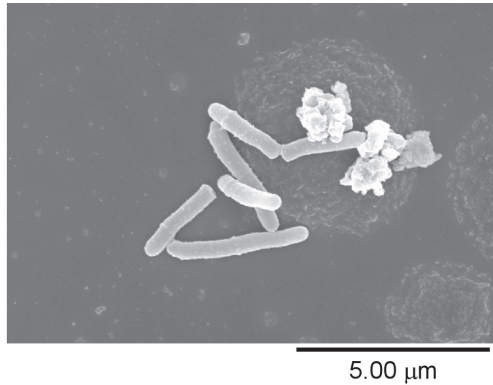


図-3 *Rhodococcus* sp. No. 10 株

3. 選抜した3菌株の安全性確認

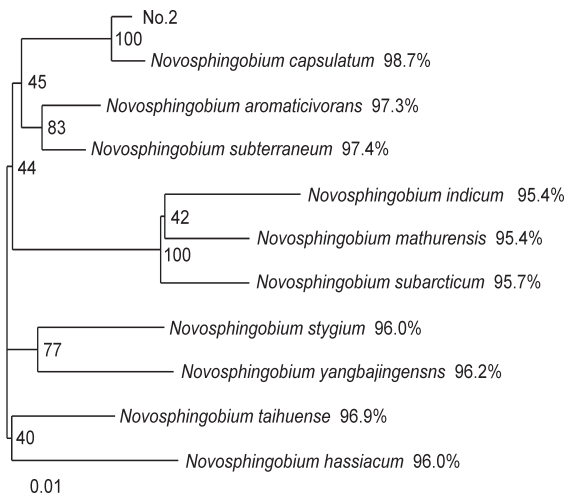
3.1 文献調査による安全性の確認

16SrRNA 塩基配列比較により、当該3菌株と相同性の高い近縁種細菌を調べ、これら近縁種のバイオセーフティレベル(日本細菌学会)を調査した。バイオセーフティレベルとは、病原性微生物等をヒトへの病原性から分類した基準のことである。

結果を以下に記載する。

a. *Novosphingobium* sp. No.2 株

Novosphingobium sp. No.2 株の系統樹を図-1に示す。



注) 菌名の後の数字は No.2 株との相同性を示す。

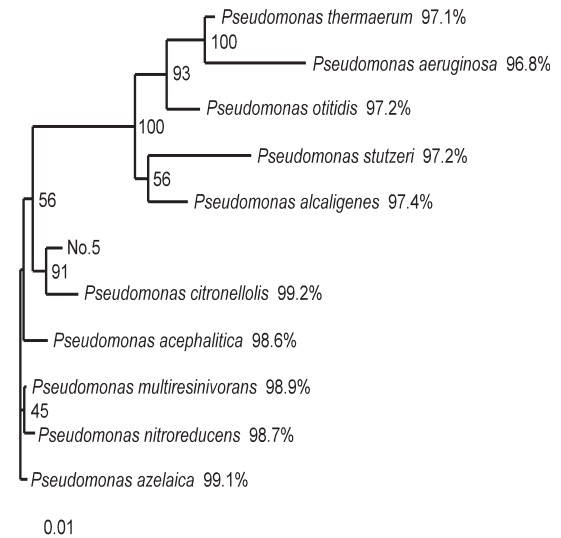
図-1 *Novosphingobium* sp. No. 2株の系統樹

この系統樹に示された No.2 株と相同性の高い菌全てについて、バイオセーフティレベル(日本細菌学会)を

調査した。いずれも安全性に問題の無いバイオセーフティレベル1であった。また、その他の文献・データベース等においても、最近縁種に病原性等の問題は無かった。

b. *Pseudomonas* sp. No.5 株

Pseudomonas sp. No.5 株の系統樹を図-2に示す。



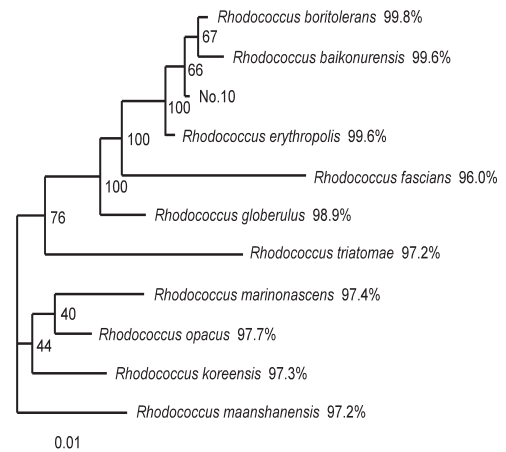
注) 菌名の後の数字は No.5 株との相同性を示す。

図-2 *Pseudomonas* sp. No. 5株の系統樹

この系統樹に示された No.5 株と相同性の高い菌全てについて、バイオセーフティレベルを調査した。*Novosphingobium* sp. No.2 株と同様、いずれも安全性に問題の無いバイオセーフティレベル1であった。また、その他の文献・データベース等においても、最近縁種に病原性等の問題は無かった。

c. *Rhodococcus* sp. No.10 株

Rhodococcus sp. No.10 株の系統樹を図-3に示す。



注) 菌名の後の数字は No.10 株との相同性を示す。

図-3 *Rhodococcus* sp. No. 10株の系統樹

この系統樹に示された No.10 株と相同性の高い菌全てについて、バイオセーフティレベルを調査した。

Novosphingobium sp. No.2 株、*Pseudomonas* sp. No.5 株と同様、いずれも安全性に問題の無いバイオセーフティレベル1であった。また、その他の文献・データベース等においても、最近縁種に病原性等の問題はなかった。

3.2 動物実験による安全性の確認

a. 哺乳動物を対象とした動物実験

哺乳動物を対象として、当該3菌株等量混合物を経口投与して、体重変化、内臓等の所見を行ったが、異常は見られなかった。

b. 魚類を対象とした水中暴露試験

魚類が生息する水槽に当該3菌株等量混合物を導入したが、毒性症状、沈殿、浮遊物等に異常は見られなかった。

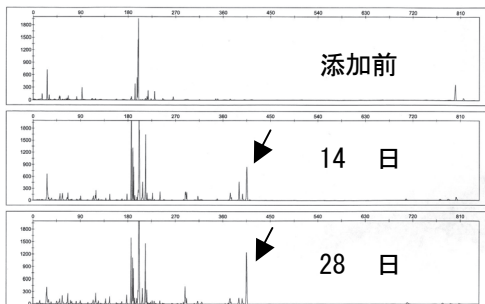
以上の結果より、当該3菌株の動物に対する病原性、毒性等の影響は無いものと考えられる。

3.3 他の微生物への影響

砂質系、粘土質系の2種類の油汚染土壤に3菌株をそれぞれ 1×10^6 cell/g (乾土) 添加し、実際の浄化作業に即した給気・攪拌、栄養物質の添加を施した際(写真-7参照)の土着の他の微生物への影響を T-RFLP 解析により評価した(図-4参照)。ここで T-RFLP 解析とは細菌の集団構成パターンの比較や変化の追跡を簡易的に調べる手法をいう。3菌株の添加前と添加から約1ヶ月後の土壤中微生物の遺伝子を比較解析した結果、増加した一般細菌の中で、病原菌に相当する有害微生物は認められなかった。



写真-7 試験状況

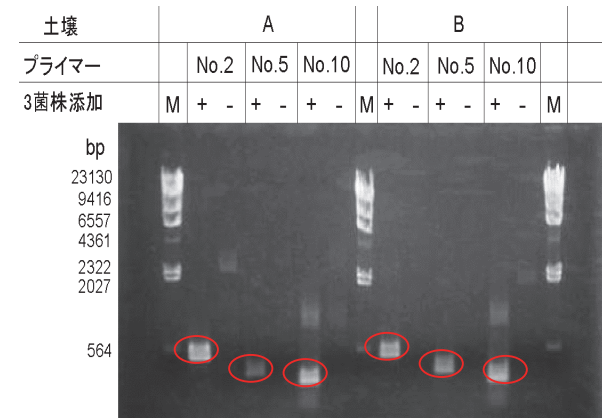


矢印; 増殖した微生物由来のピーク

図-4 T-RFLP 解析

3.4 選抜した単離菌の挙動把握

選抜した3菌株はいずれも単離された菌であり、著者らは 16S-23SrRNA 遺伝子間領域に由来する特異的プライマーを用いた PCR 法による検出法を確立し、No.2 株 No.5 株、No.10 株を容易に検出可能である。(図-5参照)。この方法を利用して、導入3菌株の増減等の挙動が把握できる。



※3菌株添加欄 M; マーカー

+; 利用微生物添加、-; 利用微生物非添加

図-5 利用微生物の検出

4. 3菌株混合投入による実油汚染土壤浄化実験

4.1 実験方法

実油汚染土壤を用いて、選抜した3菌株等量混合物を投入した油分解試験を行った。下記に具体的試験方法、菌の投入量、および栄養塩の添加量を示す。

a. 試験方法

実油汚染土壤 ($C_{12} \sim C_{18}$ の軽質油分を主体とし、油分濃度が $4,700 \text{ mg/kg}$ (乾土) 程度) を2ヶのアルミバットに 0.7 kg ずつ入れ、1つには3菌株等量混合物と栄養塩(バイオオーグメンテーション)、もう1つには栄養塩のみを投入(バイオスティミュレーション)し、油分の分解状況を確認した。また、両試験区とも水分確保と好気性状況を保つために、適宜加水し、攪拌を行った。

b. 菌の投入量

菌を投入する試験区に対して、3菌株等量混合物を $2 \times 10^6 \text{ cell/g}$ (乾土) の割合で投入した。

c. 栄養塩の添加量

両試験区とも、乾土 1 g に対して、濃度 250 ppm の窒素と濃度 50 ppm のリンを有する栄養塩を添加した。

4.2 実験結果

油分解試験は1ヶ月間行い、適宜、赤外分光分析法により油分濃度を測定した。油分濃度測定結果を図-6に示す。このグラフからも明らかであるが、3菌株等量混合物を投入したバイオオーグメンテーション工法の方が、投入しないバイオスティミュレーション工法より、効率よく油分が分解されていることが確認された。

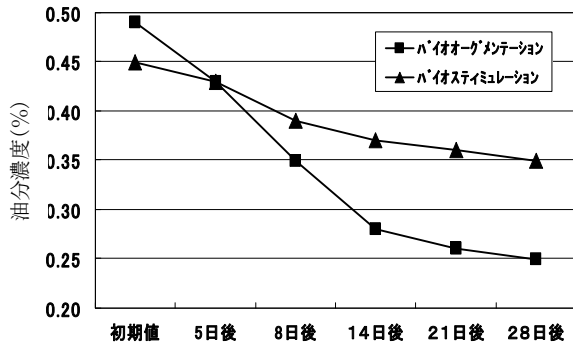


図-6 油分濃度測定結果

5. 実油汚染土壌浄化への適用法

5.1 施工フロー

実油汚染土壌浄化工事に適用する場合の施工フローは図-7を想定している。また、各項目についての詳細を下記に示す。

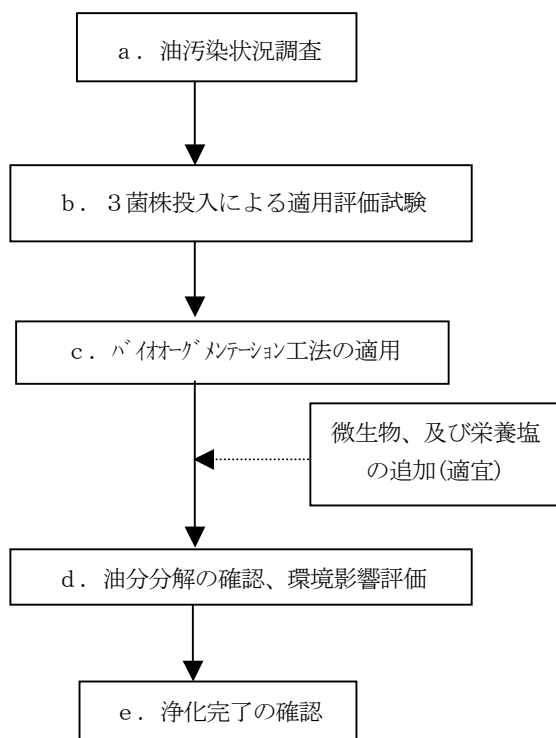


図-7 施工フロー

a. 油汚染状況調査

対象とする油汚染土壌の油分濃度、油の種類を調査し、3菌株投入による浄化が、効率的かどうかを判断する。

b. 3菌株投入による適用評価試験

aで浄化可能と判断された場合は、当該油汚染土壌に3菌株を導入して室内レベルでの浄化実験を行う。ただし、この実験の際には以下のことも調査し、総合的に3菌株導入による浄化が適しているか否かを判断する。

i. 油分濃度の低減状況

3菌株を導入しても、油分濃度の低減があまり認められない場合は適用しない

ii. 利用微生物数の増減状況

利用微生物数が異常に増殖し、低減の傾向が認められない場合には、適用しない

iii. 環境微生物の増加の有無

環境微生物の増加が著しい場合には、適用しない

c. バイオオーグメンテーション工法の適用

a, bの調査より3菌株導入による浄化が、総合的に適していると判断された場合に、適用する。

d. 油分分解の確認、環境影響評価

浄化時は、油分濃度の測定を行い、油分分解の効率が悪い時は適宜3菌株、栄養塩を追添加する。また、導入3菌株の増減状況、油臭の発生状況等の調査を適宜行い、周辺環境に影響を及ぼさないよう監視する。

e. 浄化完了の確認

油分濃度が浄化目標に達し、油臭・油膜も発生していないこと、利用微生物数が減少傾向で、かつ土着の微生物数の5分の1を下回ることで、土着菌中の病原菌が増殖していないことの3項目全てが確認できた段階をもって浄化作業終了とする。

5.2 適用時の概要

適用工法は、以下の2通りの工法を想定している。

a. ランドファーマーミング工法

掘削した油含有土壌を地上に盛土し、3菌株と栄養塩を導入する工法で、一般的に敷地が広く、汚染土壌が掘削可能な場合に適用する。盛土後、定期的に重機で土壌を攪拌して土壌中を好气的条件に保ち、微生物の活性を促し、油分の分解を図る工法である。図-8に施工図を示す。

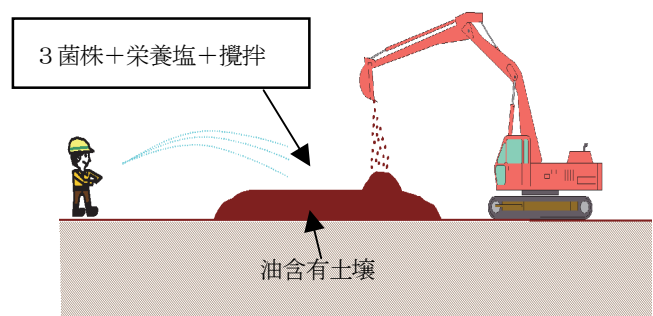


図-8 施工図(ランドファーマーミング工法)

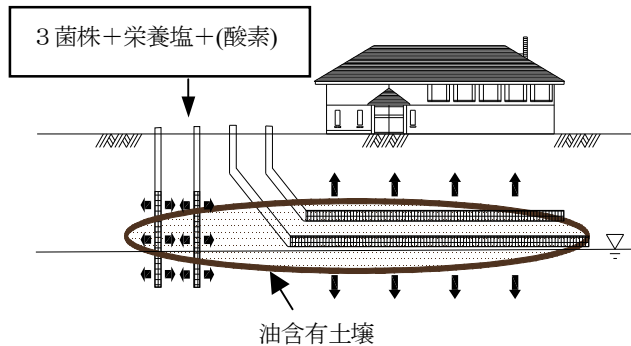
浄化が確認された土壌は、掘削場所に埋め戻すことを原則とする。浄化期間は油分濃度、油種によって多少相違があるが、1～3ヶ月が目安である。写真-8にランドファーマーミング工法による施工状況を示す。本工法適用時も、ほぼ同様の浄化状況を想定している。



写真－8 想定施工状況（ラッドフォーミング工法）

b. 注入工法

垂直又は水平ボーリングを用いて、複数の注入孔を設けた注入井戸を設置し、3菌株と栄養塩を導入する工法である。図－9に施工図を示す。



図－9 施工図（注入工法）

この工法は、一般に敷地が狭い場合、掘削が不可能な場合に適用する。なお、可能な限り、井戸は垂直ボーリング孔による垂直井戸とするが、既存建物等の存在で不可能な場合は、水平ボーリング孔により水平井戸を設置する。また、注入工法の場合は、注入孔より空気等を供給して常に好氣的条件が保たれるようにする。写真－9に垂直井戸を設置した注入工法による施工状況を示す。本工法適用時も、ほぼ同様の浄化状況を想定している。



写真－9 想定施工状況（注入工法）

6. あとがき

3菌 (*Novosphingobium* sp. No.2 株、*Pseudomonas* sp. No.5 株、*Rhodococcus* sp. No.10 株) の等量混合物を導入することによる、油汚染土壌浄化への有効性を実験的に確認した。また、この工法については、国が定める「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」への適合が確認された。すなわち、確認が得られた方法に基づいて浄化工事を実施すれば、生態系への影響、及び人への健康影響に配慮した適性な安全性評価手法及び管理手法のための基本的要件を満たすことを、国より認められることになる²⁾。

今後、当該技術の共同開発企業である㈱アイアイビー（CEO は京都大学名誉教授で、現在は立命館大学生命科学部教授の今中忠行氏）とともに、ガソリン、軽油、重油等が存在する可能性が高い油槽所跡地、ガソリンスタンド、自動車関連業、電気機器製造業、化学工場等が立地する敷地等の油汚染土壌の浄化工事において、本技術の適用実績を積み重ねてゆく所存である。

【参考文献】

- 1) George M.Garrity 他、Bergy's Manual of Systematic Bacteriology
- 2) 経済産業省、環境省告示第四号、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」、2005