

# 油含有土壌の原位置バイオオーグメンテーション

## In-Situ Bioaugmentation of Oil-contained Soils

小河篤史\* 三吉純男\* 紀藤千佳\* 宮北憲治\*\*

### 要 旨

油含有土壌を低コスト、低環境負荷で浄化するために、当社と㈱アイアイビーは油分分解菌（3 菌株）を共同で見出して、油含有土壌の浄化工事に適用した。3 菌株は自然界より単離した油分分解能力に優れた 3 種類の微生物であり、これらを用いた油含有土壌の浄化事業計画書は油含有土壌の浄化としては我が国で初めて経産省・環境省が定めた「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」への適合確認を受けた。本稿では、3 菌株を初めて適用した現場において油含有土壌の浄化が完了したので報告する。

キーワード：油含有土壌、バイオオーグメンテーション、原位置浄化

### 1. まえがき

改正土壌汚染対策法が平成 22 年 4 月 1 日より施行されている。改正の趣旨の 1 つは、これまで土壌汚染対策措置の大部分を占めていた掘削除去を抑制しようというもので、今後は掘削除去以外の対策の比率が高くなると考えられる。また、昨今の社会を取り巻く経済事情と環境意識の高まりから、土壌汚染対策においても低コスト・低環境負荷の浄化技術が求められている。これらを背景に、微生物により汚染土壌を浄化する技術（以下、バイオレメディエーションと称す）が注目されている。バイオレメディエーションは、微生物等の働きを利用して汚染物質を分解することによって、土壌・地下水汚染の浄化を図るもので、植物の働きを利用するファイトレメディエーションを除くと図-1 のように大別される。

また、近年土地売買を目的とした汚染状況調査や開発行為の実施時に油含有土壌が発見される事例が増加している。土中の油分については環境基準が設定されていないが、油臭や油膜といった生活環境保全上の支障の除去を目的とした「油汚染対策ガイドライン」（平成 18 年

環境省）において考え方と対応が示されている。現在、油含有土壌の大部分は掘削除去されているが、一般に掘削除去による措置は費用が高額になることが多く、措置過程で発生する CO<sub>2</sub> の量も多いため昨今の低炭素社会実現に向けての動きと逆行するものである。また、搬出土壌が適正に管理されず不法投棄される事例もある。

このような背景から、㈱奥村組と㈱アイアイビーは、油含有土壌を低コスト・低環境負荷で浄化することを目的として油分分解能力に優れた微生物を共同で見出した。そして平成 21 年から平成 22 年にかけて、この微生物を用いて油含有土壌の原位置浄化工事を実施したので、その成果を報告する。

### 2. 利用微生物

油含有土壌のバイオオーグメンテーションに利用する微生物は、日本国内の油田や油含有土壌中に生息する微生物のうち油分分解の可能性のある約 200 種類の中から 3 種類の微生物を単離した。単離した微生物は、*Novosphingobium* sp.No.2 株、*Pseudomonas* sp.No.5 株、および *Rhodococcus* sp.No.10 株であり、これらを総称して 3 菌株と称す。3 菌株の電子顕微鏡写真を写真-1 に示す。3 菌株は、それぞれが優れた油分分解能力を有し、微生物毎に分解可能な炭素数の範囲が異なるため互いを補完することができ、3 菌株としては炭素数 C10~C35 のガソリン、灯油、軽油、A 重油等を好気環境で分解することができる。また、3 菌株の近縁種は、あらゆる環境に広く分布していることが知られており、それらのバイオセーフティレベル（日本細菌学会）は BSL1（疾病

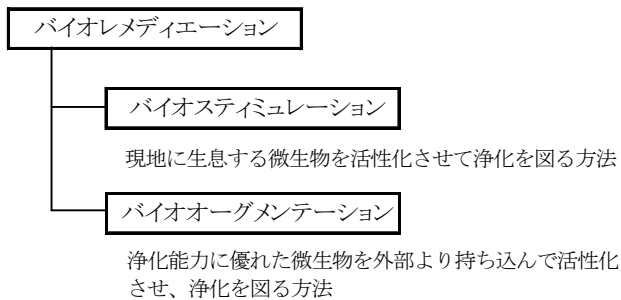


図-1 バイオレメディエーションの分類

\*西日本支社環境技術部 \*\*東日本支社環境技術部

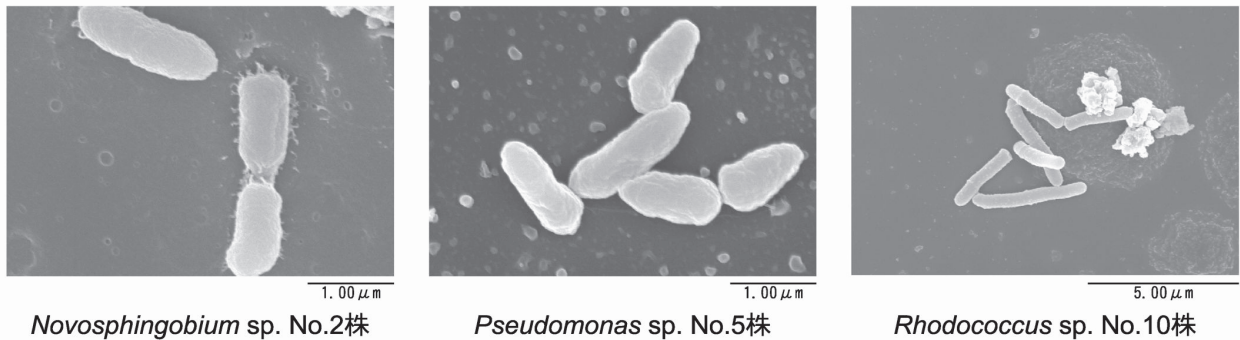


写真-1 3菌株の電子顕微鏡写真

を起こす可能性のないもの)に分類されている。マウスおよびヒメダカを用いた動物実験においても、両者ともに毒性、病原性は認められず安全であることを確認した。

バイオレメディエーションについては、安全性に万全を期す目的で「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」(平成17年経済産業省・環境省告示第4号)(以下、バイレメ指針と称す)が策定されており、3菌株を用いた浄化事業計画は、油含有土壌の浄化に関して我が国で初めて指針への適合確認を受けた(平成21年5月29日付)。

### 3. 現場概要と施工方法の検討

本稿で紹介する現場では、開発工事として既設杭撤去を実施中に油含有土壌の存在が明らかとなった。その後、油含有土壌の存在範囲を特定するために土壌汚染対策法および油汚染対策ガイドラインに準じた汚染状況調査を実施し、開発行為で掘削を実施する部分は掘削除去による対策を、それ以外の部分は微生物を利用した原位置浄化による対策を実施するものとした。本稿では、そのうちの原位置浄化について報告する。

まず、原位置浄化の方法を計画するために現場内の2地点で現場透水試験を実施した。原位置浄化区域の土壌の透水係数は  $1.36 \times 10^{-2} \sim 3.26 \times 10^{-2} \text{ cm/sec}$  であり、ボーリングコアの観察結果でも浄化対象地盤は透水性が良好な砂層であることが確認された。

浄化方法については、汚染の状況、地盤状況、他工事との関係を考慮した結果、注入工法(地下水循環方式)による原位置バイオレメディエーションを採用した。

原位置浄化範囲の諸元は以下に示すとおりである。その他の特徴として、供用中の建屋の直下に存在する油含有土壌を浄化対象範囲に含むことが挙げられる。

- ・浄化対象面積：1,115 m<sup>2</sup> (13区画)
- ・浄化対象土量：2,952 m<sup>3</sup>
- ・浄化対象深度：地表面～GL-5.0 m
- ・地下水位：GL-2.0 m
- ・浄化対象：土壌の油臭・油膜
- ・油種：A重油

- ・最大油分濃度：39,000 mg/kg (GC-FID法による)

### 4. トリータビリティ試験

現地で原位置バイオレメディエーションを適用するにあたりトリータビリティ(適用性確認)試験を実施した。このとき、試験はバイオスティミュレーションを想定した場合と3菌株を用いたバイオオーグメンテーションを想定した場合について実施し、両者の適用性を比較検討した。

#### 4.1 トリータビリティ試験方法

トリータビリティ試験は、現地での地下水循環方式による浄化を想定して、図-2のような装置で実施した。試験は、現地で採取した土壌 10 kg (湿潤重量)を湿潤密度 1.8 t/m<sup>3</sup>となるよう円筒形の容器に詰め供試体とした。次に、円筒形の容器を現地で採取した地下水(不足分は脱イオン水)で満たして供試体を飽和させた。そして、この供試体に浄化溶液を連続的に循環させて土壌の油分濃度の経時変化を確認した。このとき、1日あたりの浄化溶液注入量は実施工を勘案して1週間で浄化溶液が循環するように設定した。浄化溶液は、Case.1をバイオオーグメンテーション(3菌株+栄養塩+水)、Case.2をバイオスティミュレーション(栄養塩+水)とし、供試体を通過した浄化溶液は、エアレーションを実施して溶存酸素濃度を飽和状態まで高めた後、供試体に再注入した。なお、3菌株および栄養塩の投入は試験開始時のみとし、栄養塩はC/N値(C:炭素、N:窒素)が3菌株の生育に適切になるように投入量を決めた。

#### 4.2 トリータビリティ試験結果

##### a. 浄化効果の確認

試験期間中の油分濃度の推移を図-3に示す。試験

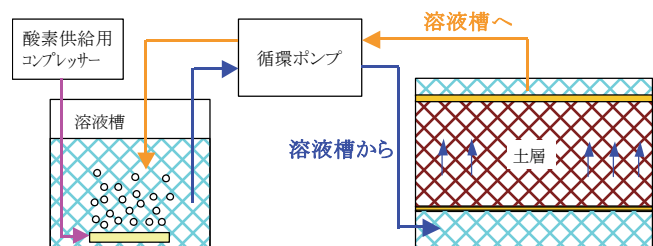


図-2 トリータビリティ試験装置概要

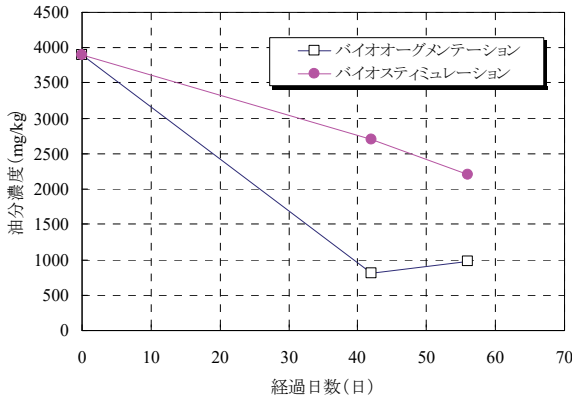


図-3 油分濃度の経時変化

開始前に 3,900 mg/kg であった土壌油分濃度が、42 日目の測定において Case.1 では 800 mg/kg へと減少しているのに対し、Case.2 では 2,700 mg/kg となった。この期間の油分濃度の低下量は Case.1 が 3,100 mg/kg、Case.2 が 1,200 mg/kg であり、バイオオーグメンテーションがバイオスティミュレーションの約 2.5 倍であった。42 日目を以降の油分濃度が Case.1 で若干増加したが、これはサンプリング毎に試料採取する部分が同一ではないため、供試体内部の浄化度合いのバラツキが油分濃度に反映されたものと考えられる。油分濃度の推移から、当該油含有土壌の浄化には 3 菌株を用いたバイオオーグメンテーションが有効であることがわかった。

b. 微生物の安全性確認

試験初期と終了時に土壌の一部を採取して土中の 3 菌株数を特殊プライマーを用いた PCR 分析で測定した結果を表-1 に示す。浄化開始時の 3 菌株の投入量は各菌株ともに  $1.0 \times 10^6$  cells/g 乾土とした。3 日後の測定結果が初期値よりも減少しているのは溶液層に投入した 3 菌株がまだ土壌をサンプリングした地点まで到達していないためと考えられる。浄化開始 7 日後の 3 菌株数は投入時の菌数と比較して 2.4~4.6 倍に増殖しているため 3 菌株が順調に土壌に定着したものと考えられる。浄化開始から 71 日後 (試験終了時) の 3 菌株数は投入時の数千分の 1 にまで減少した。これは、3 菌株の基質となる油分が減少したためと考えられる。この結果、現地に適用した際にも、浄化が完了し基質となる油分が減少すれば 3 菌株も減少するものと推定できる。

土壌中の微生物 (土着菌) 数を測定し、浄化開始前と浄化終了時にこれらが正常な範囲内 ( $10^6 \sim 10^9$  cells/g 乾土) <sup>1)</sup>にあるかどうかを確認した。本試験の結果、土着菌数は表-2 に示すように、概ね正常な範囲内にあることが確認できた。また、試験の前後で増殖した DNA を調べ、それがどの微生物に該当するかを特定して、その微生物の安全性を確認した。表-3 に示すように、増殖した微生物は全てバイオセーフティレベルが BSL1 に分類されるものであり、病原性・毒性はなかった。

表-1 3 菌株数の測定結果

菌株名	菌数 (cells/g 乾土)			
	初期投入量	3 日後	7 日後	71 日後
<i>Novosphingobium</i> sp.No.2株	$1.0 \times 10^6$	$4.6 \times 10^4$	$2.4 \times 10^6$	$2.4 \times 10^2$
<i>Pseudomonas</i> sp.No.5株	$1.0 \times 10^6$	$7.5 \times 10^4$	$4.6 \times 10^6$	$3.0 \times 10^2$
<i>Rhodococcus</i> sp.No.10株	$1.0 \times 10^6$	$2.8 \times 10^7$	$2.8 \times 10^6$	$2.0 \times 10^3$

表-2 土着菌数の測定結果

項目	菌数 (cells/g 乾土)	
	試験前	71 日後
一般細菌	$1.7 \times 10^7$	$7.3 \times 10^6$
嫌気性菌	$1.3 \times 10^6$	$3.0 \times 10^7$
放線菌	$7.0 \times 10^6$	$8.0 \times 10^5$
真菌	$9.3 \times 10^5$	$3.1 \times 10^3$

表-3 増加 DNA の測定結果

増加した DNA	DNA の同定結果 (最近縁微生物名)	バイオセーフティレベル (BSL)
1	<i>Georgfuchsia toliolica</i>	BSL1
2	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	BSL1
3	<i>Chitinimonas taiwanensis</i>	BSL1
4	<i>Sterolibacterium denitrificans</i>	BSL1

c. 地下水環境への影響確認

地下水環境への影響については、栄養塩が微生物活動で消費されると硝酸態窒素に変化するため、浄化溶液中の硝酸態窒素濃度を測定した。試験期間を通してこれらの数値は環境基準値 10 mg/L 以下であり、地下水環境への影響はないと判断できる。

d. 試験結果のまとめ

以上より、当該油含有土壌の浄化方法として、3 菌株を用いたバイオオーグメンテーションは有効かつ安全であると判断した。

5. 現場施工事例の紹介

3 菌株を用いた油含有土壌の原位置バイオオーグメンテーションの施工事例を紹介する。本工事の施工期間は平成 21 年 12 月中旬~平成 22 年 11 月中旬の 11 ヶ月間 (浄化設備設置 2 ヶ月、浄化運転 8 ヶ月、浄化設備撤去 1 ヶ月) であった。

5.1 浄化目標の設定と評価方法

本工事における油含有土壌の浄化目標は、油汚染対策ガイドラインの対策完了時の確認事項である「油臭や油膜による不快感や違和感がなくなっていることを (目や鼻で) 確認し、対策工事を完了する」とした。具体的には、油臭による不快感や違和感がないレベルとして段階 2「何のにおいであるかが分かる弱いにおい (認知閾値限界)」以下、油膜による不快感や違和感がないレベルとして段階 (±)「小さなスポット状の油膜が確認される」以下とした<sup>2)</sup>。また、油臭・油膜の段階にはそれぞれ度数を与え、最終評価はこの度数の平均値が浄化目標度数を達成できたかどうかで判断した。油臭、油膜の評価基準については表-4 および表-5 に示す。

浄化状況の確認は所定の浄化期間毎に各単位区画でボーリングによる試料採取を実施し、汚染状況調査で油含有土壌の存在が確認された地点について油臭と油膜を測定した。油臭は、土壌をガラス瓶に入れて静置した後

表-4 油臭の評価基準

段階	度数	内容
0	1	無臭
1	2	やっと感知できるにおい(検知閾値濃度)
2	3	何のにおいであるかが分かる弱いにおい(認知閾値濃度)
3	4	らくに感知できるにおい
4	5	強いにおい
5	6	強烈なにおい

表-5 油膜の評価基準

強度表示	度数	評価基準
-	1	油膜が確認されない
±	2	小さなスポット状の油膜が確認される
+	3	水面に銀色 and/or 虹色のすじ状油膜が確認される
++	4	水面に銀色 and/or 虹色の油膜が広がる
+++	5	水面全体に銀色 and/or 虹色の油膜が広がる

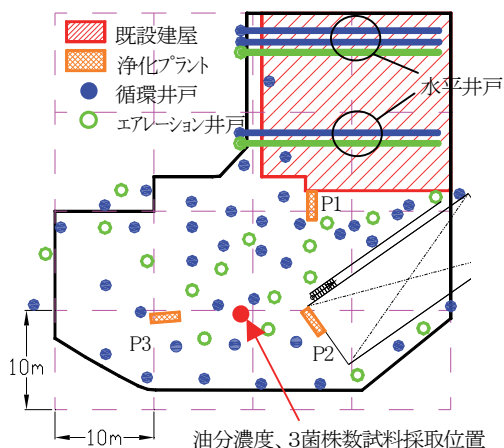


図-4 浄化設備配置平面図

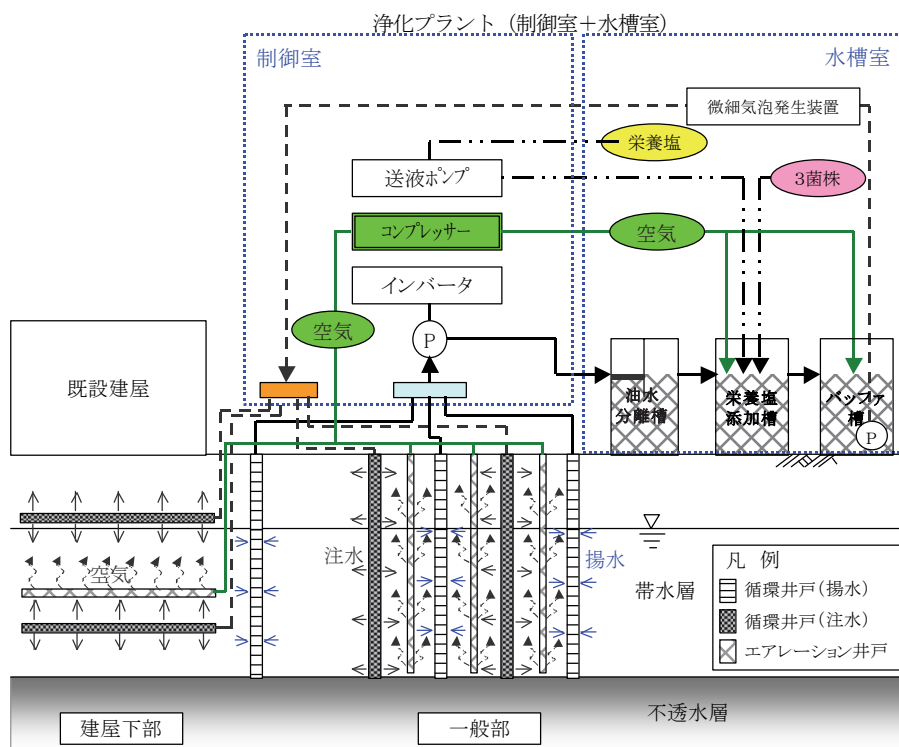


図-5 地下水循環方式の概要

に蓋を開けて臭気の程度を判定した。油膜はシャーレ法により程度を判定した。なお、判定者は当社を除く発注者監督員、工事監理者および第三者機関として調査分析会社から各1名とし、3者で測定結果を評価した。

5.2 浄化設備の配置

浄化設備の配置を図-4に、地下水循環方式の概要を図-5に示す。地下水循環方式は、循環井戸より揚水した地下水に3菌株と栄養塩を添加して浄化溶液とし、これをパツファ槽で曝気して溶存酸素を高めた後に地中に注入して循環させる方法である。循環井戸は1つの井戸で揚水機能と注水機能を任意に切り替えることが可能で、現場の状況に適した循環パターンにすることで、効率的に浄化が図れるように計画した。

3菌株の初期投入量は、「油含有土壌浄化事業計画

書」に基づき浄化対象土量 2,952 m<sup>3</sup> に対して1株あたりの菌数が 1.0×10<sup>5</sup> cells/g 乾土となるように決定した。なお、3菌株の投入は浄化開始時のみとし追加投入を施していない。

栄養塩については、所定の頻度でモニタリングを実施して浄化状況を確認しながら3菌株の生育に必要な量の窒素とリンを適宜投入した。

また、地下水中の溶存酸素濃度を高めて好気環境を維持するためにエアレーション井戸を配置して地中に空気を供給するとともに、揚水した地下水は微細気泡発生装置を通して過飽和溶存酸素水として地中に再注入した。浄化対象区画内には、地下水循環用の井戸を41本(水平井戸3本)、エアレーション井戸を19本(水平井戸2本)、浄化プラントを3基設置した。



5.3 浄化結果

a. 油臭、油膜について

浄化対象範囲内で油臭・油膜の段階が浄化目標を満足しない13区画21地点において、所定の浄化期間経過毎に油臭・油膜を測定し浄化状況を確認した。その結果を表-6および表-7に示す。油臭については浄化の経過に伴って段階の低下が顕著であった。浄化開始前には浄化目標を満足しない地点が18地点、平均度数が4.24であったのに対し、8ヵ月後にはそれらが6地点、平均度数2.71にまで減少している。油臭の浄化目標は度数で表すと3.0であるため、平均度数がこれを下回ったことで全体として目標を達成したことが確認された。

油膜についても油臭と同様の傾向を示しており、浄化開始前に浄化目標を満足しない地点が19地点、平均度数が3.48であったのに対し、8ヵ月後にはそれらが5地点、平均度数2.05にまで減少した。油膜の浄化目標値である土を度数で表すと2.0となるため、油膜についても全体的には目標を達成したことが確認された。

b. 土壌、地下水の油分濃度について

浄化の判定基準となる油臭、油膜は人間の感覚であるため、それを定量的に補完する目的で油分濃度の測定を実施した。油分濃度は各单位区画で実施したボーリングコアから油臭・油膜が顕著な部分をサンプリングしGC-FID法で測定した。サンプリングは原則として単位区画で1検体以上とし、同一ボーリング地点で油臭・油膜の顕著な地点が複数ある場合は、それぞれの地点からサンプリングを実施した。油分濃度の推移を油臭・油膜の推移とともに図-6に示す。浄化開始前の平均油分濃度は10,700 mg/kgであったが、8ヵ月後には3,700 mg/kgにまで低減した。油分濃度についても油臭・油膜と同様の浄化傾向を示しており、相関関係にあることがわかる。

本工事で確認された油含有土壌の大部分はGL-2.0 m以深の地下水面以下に存在していることから、油臭、油膜および油分濃度の低減に揮発が寄与したことは考えにくく、この低減効果は3菌株の油分分解によるものと判断できる。3菌株が油分を分解することで油分濃度が低減され、それに伴って油臭および油膜の段階も低下して浄化目標が達成できた。

表-8に地下水中の油分濃度の推移を示す。分析試料は各プラントで揚水した地下水を採取し、ノルマルヘキサン抽出法で分析を行った。なお、初回の測定のみ各プラントで揚水する範囲内の循環井戸から採水した。浄化開始直後はP1で240mg/Lと非常に高い数値が確認されたが、その後は概ね一律排水基準5mg/L以下であった。最終的には浄化終了前の3ヵ月間は全ての観測地点で一律排水基準値以下であった。3菌株による油分分解と、各プラントに油水分離槽を設けて油分を回収することで、地下水中の油分濃度を低減できた。

表-6 油臭測定結果

測定時期	油臭の程度						合計度数	平均度数
	段階0 (1)	段階1 (2)	段階2 (3)	段階3 (4)	段階4 (5)	段階5 (6)		
浄化開始前	0	0	3	10	8	0	89	4.24
3ヵ月後	1	4	3	12	1	0	71	3.38
5ヵ月後	4	7	6	4	0	0	52	2.48
8ヵ月後	4	4	7	6	0	0	57	2.71

表-7 油膜測定結果

測定時期	油膜の程度					合計度数	平均度数
	-(1)	±(2)	+(3)	++(4)	+++ (5)		
浄化開始前	0	2	9	8	2	73	3.48
3ヵ月後	5	0	10	6	0	59	2.81
5ヵ月後	2	3	16	0	0	56	2.67
8ヵ月後	4	12	5	0	0	43	2.05

( )内の数値は度数

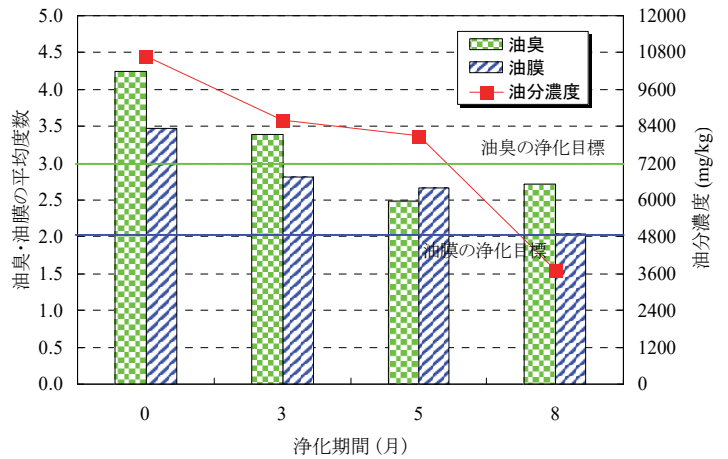


図-6 油分濃度と油臭、油膜の経時変化

表-8 地下水中の油分濃度測定結果

採水日	油分濃度 (mg/L)			備考
	P1	P2	P3	
平成22年2月11日	240	1.2	0.6	浄化開始前
平成22年3月16日	1.6	0.7	1.9	1ヵ月後
平成22年4月13日	0.7	<0.5	38.0	2ヵ月後
平成22年5月11日	1.2	1.3	<0.5	3ヵ月後
平成22年6月14日	18.0	0.6	<0.5	4ヵ月後
平成22年7月14日	0.6	<0.5	5.1	5ヵ月後
平成22年8月17日	<0.5	<0.5	<0.5	6ヵ月後
平成22年9月14日	0.6	<0.5	<0.5	7ヵ月後
平成22年10月7日	<0.5	<0.5	1.1	8ヵ月後

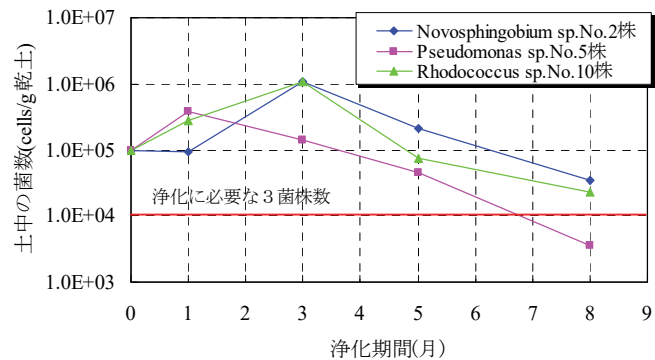


図-7 土中の3菌株数の経時変化

c. 微生物数について

浄化対象範囲内の代表的な地点で土中の 3 菌株数のモニタリングを実施した。3 菌株数の測定方法は特殊プライマーを用いた PCR 分析とした。その結果を図-7 に示す。3 菌株の初期投入量は 1 株あたり  $1.0 \times 10^5$  cells/g 乾土 (3 菌株合計で  $3.0 \times 10^5$  cells/g 乾土) であったが、3 ヶ月目までは 3 菌株数が増加した。3 ヶ月後の 3 菌株合計の菌数は初期投入量の約 7.5 倍であり、順調に 3 菌株が土壤に定着したことがわかる。3 ヶ月以降は緩やかに減少傾向が見られたが、これはトリータビリティ試験と同様に油分濃度の低減に伴って 3 菌株の基質が減ったためと考えられる。浄化事業計画書ではバイオオーグメンテーションを実施する場合に必要な 3 菌株数を  $1.0 \times 10^4$  cells/kg 乾土以上としており、今回工事では施工期間を通してこの状態を維持することができた。これは、溶存酸素の供給、栄養塩の供給が概ね適正であった結果と判断できる。

浄化終了時には、周辺環境への悪影響の有無を調べるために土着菌数の測定および浄化の前後で増加した微生物の同定を実施した。浄化終了時の土着菌数を測定した結果を表-9 に示す。浄化開始前と浄化終了時の菌数に大きな変化は認められなかった。また、浄化の前後で増加した DNA を同定し (写真-2)、その微生物が病原性を有するかどうかを確認した。表-10 に示すように、増殖した微生物の最近縁種は全てバイオセーフティレベルが BSL1 分類され病原性等はなかった。したがって、浄化の前後で微生物による周辺環境への悪影響は確認されなかった。

以上より、当該現場の原位置バイオオーグメンテーションの施工管理は適切であり 3 菌株の生育、油分解ともに順調に推移した。また、土着菌の異常増殖や病原菌の増殖も認められず、周辺環境に対しても安全であったことを確認した。

今回の施工においては、浄化完了の最終評価は前述のように汚染状況調査で油臭および油膜が浄化目標を満足しない地点全ての平均度数で評価したため、局所的には浄化目標を満足していない部分がある。しかし、前述の浄化結果に加え、地上部において油臭、油膜がないこと、敷地外のモニタリング井戸でも油分が確認されなかったことから、油臭や油膜による不快感や違和感は除去されたと判断し、3 菌株によるバイオオーグメンテーションを終了した。

6. あとがき

本稿で紹介した 3 菌株を用いた油含有土壌のバイオオーグメンテーションは、バイオスティミュレーションよりも早期に浄化を達成できることが室内実験で確認できた。また、実施工においても浄化開始から浄化終了ま

表-9 土着菌数測定結果

項目	菌数 (cells/g 乾土)	
	浄化開始前	浄化終了時
一般細菌	$5.5 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$
嫌気性菌	$4.4 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$
放線菌	$5.0 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$
真菌	$3.4 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$

表-10 増加 DNA とバイオセーフティレベル

増加した DNA	DNA の同定結果 (最近縁種微生物名)	バイオセーフティレベル (BSL)
1	<i>Bacillus licheniformis</i>	BSL 1
2	<i>Pleomorphomonas Koreensis</i>	BSL 1
3	<i>Phenylobacterium Lituiforme</i>	BSL 1

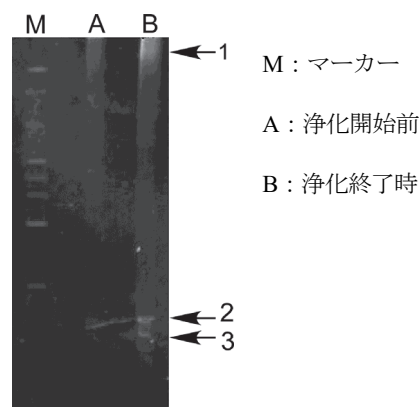


写真-2 土壌由来 DNA の比較

での 8 ヶ月間、現地の油臭・油膜は一貫して低下傾向にあり浄化経過は順調で、最終的には設定した浄化目標を達成することができた。一般に、好気性菌を利用した原位置浄化はランドファーマーミングと比較すると浄化管理が難しいため、原位置浄化の成功は、今後、本技術のさらなる展開が期待される。

バイオレメディエーションは、汚染物質を完全に除去する浄化方法ではなく、一定の浄化目標を早期に達成するためにバイオスティミュレーションあるいはバイオオーグメンテーションを利用するもので、この目標達成以降は土着菌による自然浄化に期待するという特徴がある。したがって、油含有土壌のような環境基準値が設定されていない物質を対象にバイオレメディエーションを実施する場合は、行政、発注者、近隣住民等の関係者とバイオレメディエーションの特性について共通した理解を深めたうえで浄化目標や浄化期間を設定することが極めて重要である。

【参考文献】

- 1) 柳田友道、「微生物科学第 4 巻」、学会出版センター、1984.6
- 2) (社) 土壤環境センター、「環境省の油汚染対策ガイドライン」、化学工業日報社、p.14、p.117、2006.5