

# 油汚染土壌のバイオレメディエーションにおける微生物の挙動と油分分解特性

田崎 雅晴 岡村 和夫 黒岩 洋一  
(技術研究所) (技術研究所) (技術研究所)

## Behavior and the oil degradation characteristics of the microbe in the bioremediation of the oil pollution soils

by Masaharu Tasaki, Kazuo Okamura, and Youichi Kuroiwa

### Abstract

For the purification of soil polluted by oil, bioremediation methods, primarily land-farming, are used. The analysed characteristics of oil decomposition in the process of bioremediation indicate that the decomposition rate declines with oil with a large carbon number (higher molecular weight) and increases with oil with a small carbon number (lower molecular weight). The decomposition rate of A heavy oil with a peak at C20 is approximately 85% while the decomposition rate of C20 oil itself is approximately 65%.

The study results on the behaviour of microbes involved in the remediation of oil pollution confirmed that microbes which decompose oil are present in the low environment of the concentration of oil, and not only microbes which decompose oil but also those which are incapable of decomposing oil are present in abundance at sites with a high oil content.

### 概 要

油分汚染土壌の土壌浄化にはランドファーミングを中心としたバイオレメディエーションが用いられている。このバイオレメディエーションの過程での油分の分解特性を検討した結果、炭素数が大きくなる（分子量が大きくなる）程、その油分の分解率が低下し、炭素数の小さな油分（低分子の油分）ほど分解されやすいことを確認した。生物分解の指標となる炭素数20の油分は、そのもの自体の分解率が約65%であり、C20以下の油分は約85%の分解率であった。またそれより大きな油分になると急激に分解率が低下していた。

油分浄化に関与する微生物の挙動を検討した結果、油分が殆ど存在しない環境でも油分分解細菌が存在しており、油分濃度が高い個所には油分分解細菌だけではなく油分を分解できない細菌も多数存在していることが確認された。

### § 1. はじめに

バイオレメディエーションは低中濃度の油分汚染の浄化に有効な工法である。特にランドファーミングは石油系（A重油系）油分に汚染された土壌に対して、コスト的にも有効であるために、頻繁に適用されるようになってきた。バイオレメディエーション、特にランドファーミングでは、肥料添加や効果的な酸素の供給（耕転等）を行うことで、土着の微生物の活性を高めて油分浄化を行う。つまり油分分解（資化性）細菌がそのサイトに普遍的に存在していることを前提としている。

このようなバイオスティミュレーションでは、経験的にA重油程度の油種までは適用出来るとされてきた。しかし、油種ごとにその浄化効果を検討しデータを開

示してきた例は非常に少ない。

今回我々はランドファーミングを念頭に置き、ラボ試験にてバイオスティミュレーションによる各油種での油分分解状況を検討した。また実際の浄化工事での分解特性と比較し、同時に油分分解に関与する微生物が汚染サイトに普遍的に存在していることを確認した。

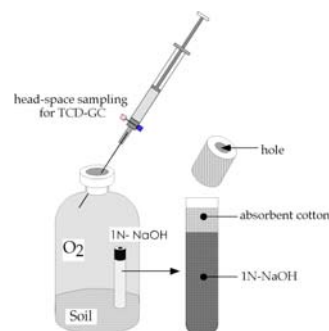


図-1 密閉瓶試験の概要図

## § 2. 試験方法

### 2.1 ラボ試験による各油種の分解特性の検討

各種の分解特性は、図-1に示したような密閉瓶を用いて行った。容器の中に油分汚染土壌と、同時に炭酸ガス吸収用チューブを入れて、気相を酸素置換後に30°Cにて培養した。

使用した汚染土壌は各油分4種（灯油、軽油、A重油、C重油）を市販の黒土に適量添加し調整した汚染土壌と、実サイトの汚染土壌2種（A重油汚染サイト土壌、石炭系油分汚染サイト土壌）を用いた。なお、石炭系汚染土壌系は密閉瓶に土壌と同量の水を添加したスラリー系として200rpm回転振蕩培養で実施した。

経時的に気相部の酸素濃度をTCD/GCにて測定し、必要に応じて酸素の追加添加を行った。酸素消費が見られなくなった時点で終了として、土壌の油分分析を実施した。A重油およびC重油については、試験途中での土壌油分分析も行った。

土壌の油分濃度はH997抽出FTIR法により含有濃度を求めた。油分の分解特性はガスクロ蒸留法<sup>1)</sup>により各サンプルの炭素数組成を求めることにより検討を行った。

### 2.2 実サイト土壌の油分濃度、全細菌数および油分分解細菌数の測定

A重油を主とする油種による汚染サイトの一部（150m×50m）を10mメッシュに区切り、各ポイントの「GL-0.5m」「GL-1.0m」「GL-1.5m」「地下水位」における土壌を採取した。各土壌について油分濃度、総細菌数および油分分解細菌数について以下のように検討した。

#### 【油分濃度】

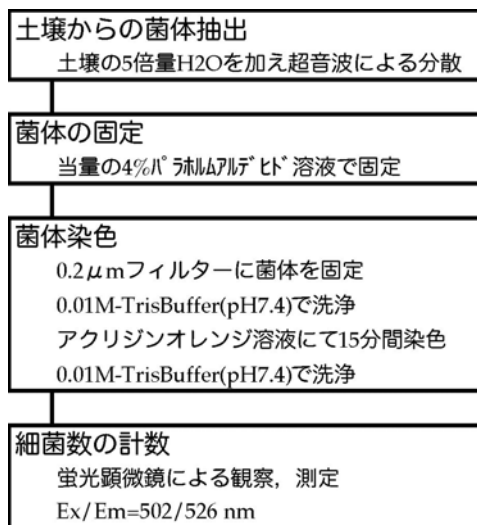


図-2 全細菌数測定のプロロー

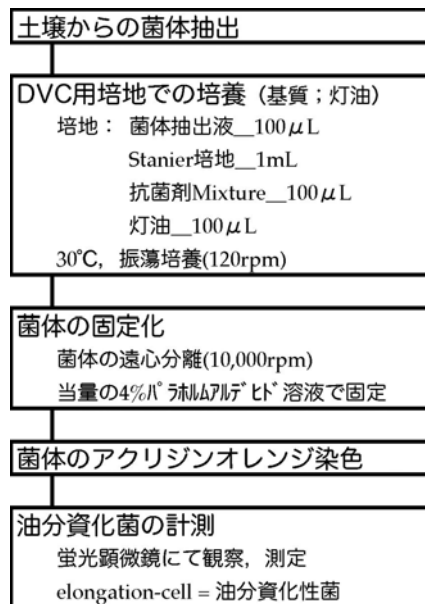


図-3 油分分解細菌数測定のプロロー<sup>4)</sup>

「2.1」と同様にH997抽出FTIR分析により測定を行った。

#### 【総細菌数】

アクリジンオレンジ染色法<sup>2)</sup>を用いて、土壌に存在する全細菌数を測定した。図-2に示したように土壌から菌体を抽出後、アクリジンオレンジで染色し、蛍光顕微鏡を用いて計測した。

#### 【油分分解細菌数】

油分分解細菌数測定はC. BakermansらのDVC (Direct Visuable Count) 法<sup>3)</sup>を参考に図-3に示したフローに従い測定した。

DVC法は細菌の分裂を阻害する抗菌剤を試料に加えて、その基質条件で増殖能を有する細菌を伸張させる。伸張した細菌を計数することにより増殖能を持つ細菌数を求めることができるが、環境中に存在する細菌は大きさが多様のため計数が難しい。そのため、事前に試験を行い、培養の最適条件や伸長の判断を検討した。使用した抗菌剤はNalidixic acid (200mg/L)、Piromidic acid, Pipemidic acid, Cephalexin (各100mg/L)である。

事前試験の結果も踏まえて、灯油基質で3μm以上の菌体を油分分解能力がある細菌と判断した。

## § 3. 結果および考察

### 3.1 汚染源油種とその特徴

油分汚染土壌のバイオレメディエーションは文字通り生物により油分を分解させて浄化を図るため、その浄化効率には生分解性に依存する。一概に油分と言って

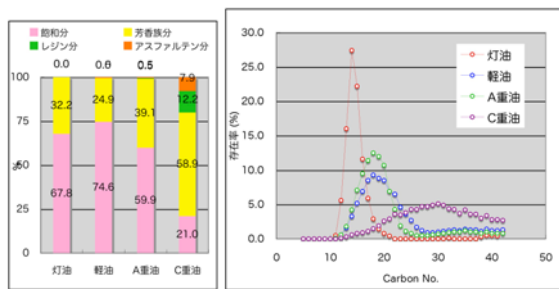


図-4 各油種別の分析結果  
(左図：イイトロスカン、右図：炭素数組成)

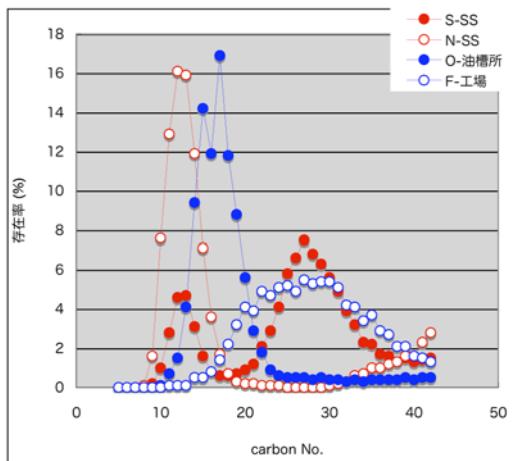


図-5 事業形態別の汚染油種の違い

(S-SS, N-SS; ガソリンスタンドの汚染土壌、O-油槽所; 油槽所跡地 A 重油タンク付近の汚染土壌、F-工場; 潤滑油生成工場跡地の汚染土壌)

も通常の燃料油でも揮発性の高いガソリンからアスファルト成分の多い C 重油まで多様である。図-4 に灯油、軽油、A 重油および C 重油のイイトロスカン結果とガスクロ蒸留法による炭素数組成の測定結果を示した (製造会社や製品により多少の違いは生じる)。この図からもわかるように、油種により含まれる油分の分子量の大きさが異なっている。なおガソリンは C10 までで 90% を超えていた。

また汚染サイトも、扱われていた油種 (汚染源油種) によりその状況も様々である (図-5 参照)。ガソリンスタンドの土壌汚染では、比較的軽い油分を多く扱っているために軽油や A 重油に似た C15 前後にピークを持つ油種が主となる。しかし、併設された整備工場からの潤滑油の汚染を受けると図-5 の S ガソリンスタンドのように潤滑油由来の分子量の大きなピークも共存する場合がある。また、通常工場跡地ではそこで多量に使用/製造していた特徴的な油分のピークを示す。例えば A 重油を中心に貯蔵していたタンクの周辺は、図中の O-油槽所の結果のように A 重油由来のピークが大きく、潤滑油を使用していた工場跡地では F-工場のように比較的高分子の油分が検出される。

### 3.2 各油種の分解特性の検討

各油種で土壌を調整して試験を行い、その試験前後の土壌に含まれていた油分の炭素数別の存在を図-6-9 に示した。各図左側は各炭素数別油分の存在比を、右側はその比率から算出した各炭素数別の油分濃度を示している。

灯油では、C10-12 の油分がその存在の中心であったが、試験後のピークは C15 程度の油分となったことがわかった。炭素数が小さな油分で構成されている灯油は、右の図でわかるように 90% 程度は分解されていた (試験前油分濃度 7,400mg/kg)。

軽油と A 重油はその炭素数組成が比較的似ており、試験前の油分の炭素数ピークは C15-16 にあることが

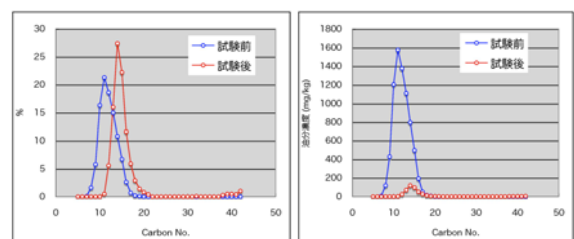


図-6 灯油における試験前後の炭素数組成  
[左:存在比,右:濃度]

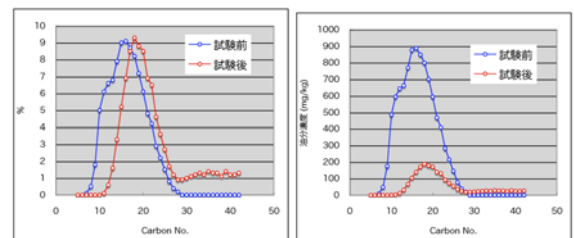


図-7 軽油における試験前後の炭素数組成  
[左:存在比,右:濃度]

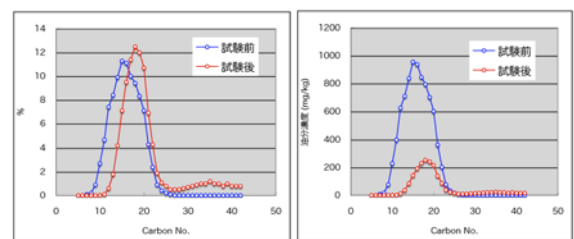


図-8 A 重油における試験前後の炭素数組成  
[左:存在比,右:濃度]

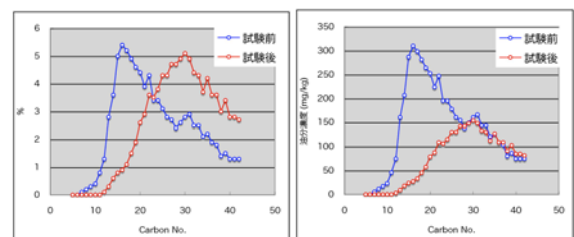


図-9 C 重油における試験前後の炭素数組成  
[左:存在比,右:濃度]

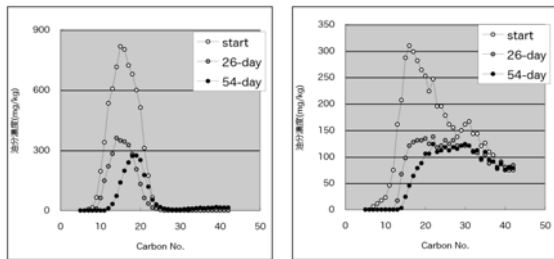


図-10 A重油(左)およびC重油(右)における炭素数組成の経時変化

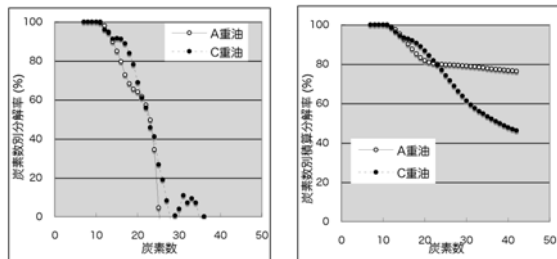


図-11 炭素数別の油分解率(左)と積算分解率(右)

わかる。試験後はどちらもピークがC18程度にシフトした。分解性は左図でわかるように灯油より悪く80%弱であった(試験前油分濃度はそれぞれ、9,700mg/kg、8,500mg/kg)。

C重油においてはかなり顕著にピークのシフトが確認された。試験前のC16-17のピークは試験後にはC30に移行していた。分解率は試験前油分5,700mg/kgの約50%程度であった。

図-10にA重油とC重油の試験中の炭素数組成の推移を示した。この図から徐々に炭素数のピークが炭素数の大きい油分にシフトして行っていることが確認される。

A重油とC重について炭素数とその油分解性の検討を図-11(左図)に示した。この図は、各炭素数別油分の分解率をそれぞれ計算してグラフ化したものである。この図から、どちらの油種も炭素数が大きくなる(分子量が大きくなる)程、その油分の分解率が低下してくることが確認された。C15では分解率が85-90%であるが、C20では65%程度、C23以上の油分は50%以下の分解率であった。これらの結果からも改めて、炭素数の小さな油分(低分子の油分)ほど分解されやすいことが確認された。

A重油およびC重油それぞれで、各炭素数の油分を積算して行き、その時の分解率を図に示したのが図-11(右図)である(例えばC15の値はC15以下の油分(C6-15)の分解率を、C30の値はC30以下の油分(C6-30)の分解率を示している)。この結果からC重油でもそこに含まれる油分のうちC23までの油分であればそ

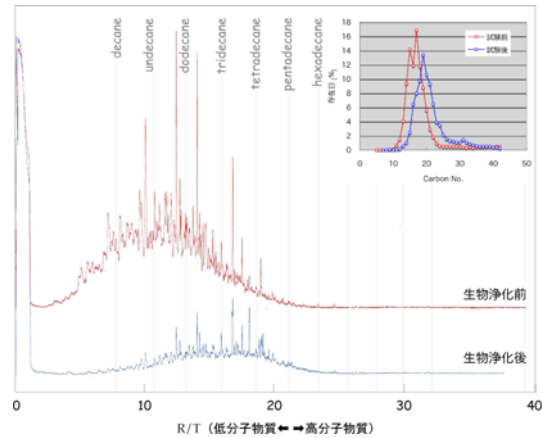


図-12 燃料油系油分汚染サイトでの生物浄化前後の油種(GC/MSおよび炭素数組成分析の結果)

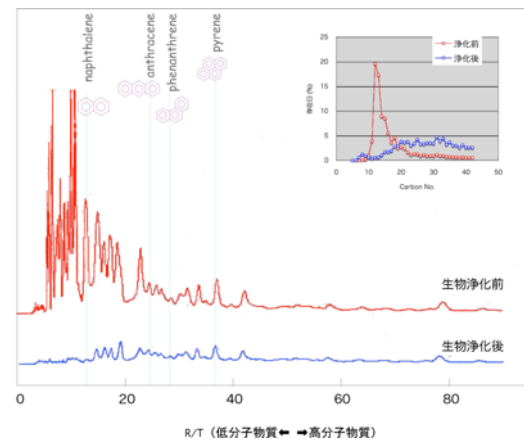


図-13 芳香族系油分汚染サイトでの生物浄化前後の油種(HPLCおよび炭素数組成分析の結果)

の80%以上が分解されることが示された。

この油分解特性を実汚染土壌を用いて検討を行った。実汚染土壌においては炭素数組成の変化に、その油成分の同定を行った結果(GC/MSおよびHPLC分析結果)とともに示した。

燃料油(A重油が主たる汚染源油種)で汚染されたサイトでの、バイオレメディエーション前後の土壌に含まれる油種の検討結果を図-12に示した。生物浄化後に残る油分はラボ試験での結果と同様に、浄化前に比べて分子量が大きい油種となっていることが確認できた。また通常のランドファーミングとは異なるが、多環芳香族系油分のバイオレメディエーション(スラリーリアクター処理)による油種の変化を図-13に示した。多環芳香族油分でもバイオレメディエーションによる浄化が進み、アントラセン程度までの物質は消失していることが確認された。しかしリテンションタイム30分以降のピークに殆ど変化がなく、分子量の大きな芳香族系油分の分解は難しいことが示唆された。

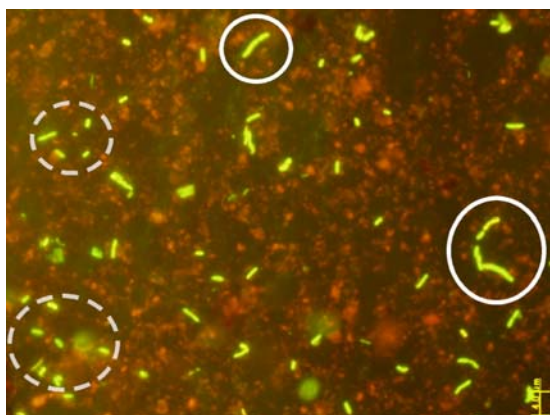


図-14 DVC法による菌体の写真  
 実線○内の細菌：増殖した細菌  
 破線○内の細菌：増殖していない細菌

今回の調査からも明らかなように、A重油はC20付近に油種のピークを持っている。C20の油分はそのもの自体の分解率が約65%、C20以下の油分としては約85%の分解率であり、それより大きな油分になると急激に分解率が下がっていた。この結果は、これまで経験的に「バイオレメディエーションで浄化が可能な油種はA重油程度」と言われていたことを裏付ける知見と考えられた。また、油分汚染土壌を浄化する際には、事前に対象となる汚染油種の検討を充分に行うことが、生物浄化を含めた工法の検討や浄化効率の向上等に重要なステップになることを示唆していると考えられた。

### 3.3 浄化サイトの微生物の挙動

調査を実施したサイトは、A重油を主体とする油分により汚染されたサイトで、地下水位が約2m程度である。そのサイトの一部(150m x 50m)をメッシュで

区切り、各ポイント4深度の分析を行って、各深度毎の油分濃度、総細菌数、油分分解細菌数の分布を検討した。

細菌数測定はアクリジンオレンジ(AO)染色法で行った。AOは、二重鎖DNA(dsDNA)に結合して526nmの緑色の蛍光(励起波長502nm)を発する挿入剤である。つまり試料中に微生物が存在すると、適切な処理を行いAOを添加することにより、その微生物中のdsDNAに結合する。その後、余分なAOを洗浄するとdsDNAに結合したAOのみが残る。この試料を502nmで励起して蛍光顕微鏡で観察すると、dsDNAに結合しているAOが蛍光を発し、試料中に存在した微生物が確認される。今回の試験では土壌から抽出された試料をAOにより染色し、蛍光顕微鏡により確認された(蛍光を発した)細菌をカウントして総細菌とした。

油分分解(資化性)細菌はDVC(Direct Visuable Count)法を用いて測定した。DVC法は抗生物質等の抗菌剤を使用して、環境中微生物の菌数を変化させることなく菌数を測定する方法である。添加した薬剤の作用により生物活性をもつ細菌は、基質を取り込みタンパク合成を行うが、DNAの合成が阻害されているため分裂できず、結果的に菌体が著しく伸張する。これにAO染色法を施して蛍光顕微鏡下で伸張した菌体を区別、計測すれば、全菌のうちタンパク合成能をもつ菌数が明らかとなる。今回の試験では基質を灯油として実施した。この条件で伸張した菌体(タンパク質合成を行えた菌体)を灯油を資化できる油分分解細菌として計測した。

蛍光顕微鏡で観察した一例を図-14に示した。こ

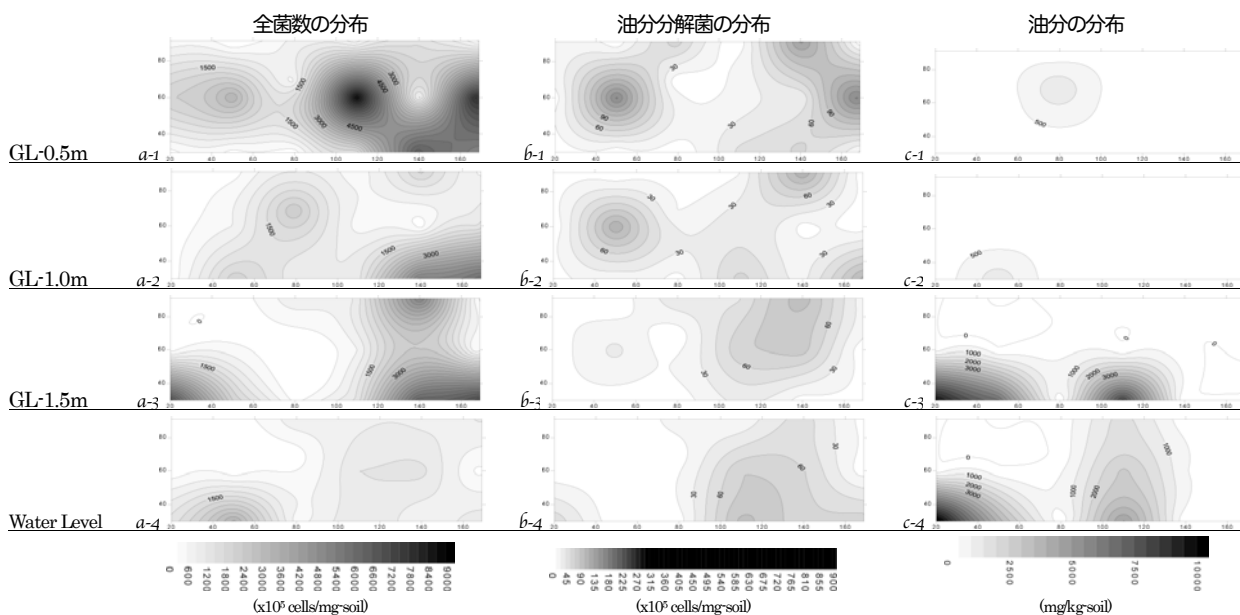


図-15

の図の中で実線○で囲われた細菌は、波線○の中の細菌よりも明らかに菌体が伸張していることがわかる。事前の試験により  $3\mu\text{m}$  を越える菌体は、タンパク質合成能力が明らかであったと判断して、これ以上伸張した細菌を油分分解細菌と判断して計測した。なお、培養時間が長くなると、油分分解菌により代謝された物質を利用する細菌にも伸張が認められるために、事前に時間ごとの観察を行い、適切な培養時間を設定した。

図-15に各深度別の「全菌」、「油分分解菌」および「油分」の分布を示した。本サイトの油分は「c-1~4」が示すように、GL-1.5m から地下水位（図中の Water Level）において高濃度に分布しており、GL-1.0m より上部は汚染が低かった。

この油分汚染土壌における総細菌数および油分分解細菌の分布が上図の「a-1~4」および「b-1~4」の図になる。GL-0.5m は表土の影響および大気からの空気の供給が豊富なため、他の深度よりも全体的に比較的菌体数が多く検出された。GL-1.0m より上部は油分汚染が低いいためか、汚染の分布と総細菌数および油分分解細菌数に顕著な関係は見られなかった。また b-1,-2 の結果からわかるように、この深度は油分が殆ど存在しない環境であるが、油分分解細菌が存在していることが明らかになった。

GL-1.5m 以深では、油分濃度の高い個所では一般細菌も油分分解細菌もその数が多く、その分布が油分汚染の分布と似ていることが示された。存在数的には油分分解細菌は総細菌よりワンオーダー低い。この現象は、油分を直接資化できない細菌も油分の存在する環境では、油分のない環境よりもその増殖が旺盛であることを示唆している。油分分解菌が油分を代謝して生成された物質を利用して生育している細菌が存在しているものと推測される。

#### § 4. おわりに

油分汚染土壌のバイオレメディエーションは、土着に存在する微生物の能力を上手く引き出して行う技術である。本調査からも明らかのように、油分浄化に関与する微生物群は、浄化対象土壌に普遍的に存在する。しかし油種や濃度により浄化効率が異なってくる。そのため浄化工事を効率的に進めるためには、事前の油種分析やトリータピリティテストによる浄化条件の設定等が非常に重要になる。

#### 謝辞

なお、本研究の一部は(財)石油産業活性化センターの技術開発事業の一環として行った研究である。

#### <参考文献>

- 1) Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series Volume 3 "Selection of Representative TPH Fractions Based on Fate and Transport Considerations", 1997
- 2) 土壤微生物研究会(1975) 新編 土壤微生物学実験法。(株)養賢堂.
- 3) C.Bakermans,E.L.Madsen.2000. Use of substrate responsive-direct viable counts to visualize naphthalene degrading bacteria in a coal tar-contaminated groundwater microbial community.J.Microbiol.Methods 43.81-90.
- 4) FABIEN JOUX,PHILIPPE LEBARON.1997.Ecological Implications of an Improved Direct Viable Count Method for Aquatic Bacteria. Appl.Environ.Microbiol.63.3643-3647.