

研究論文

微生物を用いた油汚染土壌の浄化に関する基礎的研究

呉 方 芳,* 神 谷 修,** 藤 田 豊 久,*** 大 好 直**

Experimental Study on Bioremediation of Contaminated Soil

Fangfang WU,† Osamu KAMIYA,†† Toyohisa FUJITA††† and Tadashi OHYOSHI††

Abstracts

This research focuses on bioremediation method of oily contaminated soil. Three sets of bioremediation experiment were conducted using bioprocessing medicines and water with *Pseudomonas mendocina*. The best experimental condition for bioremediation of oily contaminated soil is well discussed. Oil concentration in the soil was measured using the gravimetric analysis method after extracting with normal hexane. Moreover, a qualitative analysis of the oily contaminated soil was investigated by means of mass spectroscopy method (GC-MS). The experimental results showed that an attack of bacteria on the oily contaminated soil caused a significant decrease of the TPH density less than 20% from its original value 5600ppm.

Key Words : Contaminated soil, Bioremediation, Bioprocessing medicine, Total Petroleum Hydrocarbon, Gravimetric analysis method, Mass spectroscopy method. Distilled water

1. 緒言

人類は古来より、微生物の代謝作用を様々な産業に活用してきた。鉱山においては坑廃水中の金属を回収するためのバイオリッチング (Bioleaching) 等の技術があげられる¹⁾。

このような技術の中で近年注目されているのが、微生物を用いて環境を修復するバイオレメディエーション (Bioremediation) と呼ばれる技術である。バイオレメディエーションとは、微生物の力で有害な有機物を無害な炭酸ガス、メタン、水、無機塩、バイオマスに変換してしまう技術である^{2) 3)}。この技術は、工場等の廃水に含まれる汚染物質の浄化や汚染土壌の浄化が行われ、また、生ゴミの減量化を目的とするフードリサイクルにも応用されている^{4) 5)}。

日本においてバイオレメディエーションの研究が注目され始めたのは、1997年1月日本海沖においてナホトカ号の重油流出事故が起きたことがきっかけである。それを契機に流出重油の新しい処理法として、環境負荷が少なく実用的な、微生物の代謝作用を利用した油分の分解、浄化についての研究がさかんになった^{6) 7)}。現在はバイオ製剤を用いて様々な汚染形態の土壌を浄化する技術が開発されつつある。欧米では10年程前から汚染土壌におけるバイオレメディエーション技術が実用化されており、ガソリンスタンドや石油備蓄基地等、主に油で汚染され

た土壌において数多くの成果が報告されている^{9) 10)}。従来からの汚染土壌の浄化方法として、薬品による化学的な処理、焼却処理、水流による土壌の洗浄等があるが、これらは専門のプラントを必要とし土壌をそのプラントに運搬しなくてはならないため高いコストを必要としていた。しかし、バイオレメディエーションによる浄化では、汚染現場での原位置処理が可能であるため、土壌を運搬するコストがかからず、さらに環境にやさしい土壌浄化を行うことができる。しかし、この技術を現場に適用するため、客観的科学的なデータが必要であり、基礎研究、応用研究による安全性と効果の確認は絶対条件である。

本研究においては既存の2種類のバイオ製剤と、余目油田の原油中で発見された石油分解菌である *Pseudomonas mendocina* を含む水溶液を組み合わせて、3種類の条件を設けて、油汚染土壌のバイオレメディエーション実験を行った。それぞれの条件において、油汚染土壌とバイオ製剤を混合し攪拌後、一週間毎に16週間にわたり土壌中の油を定量するとともに、GC-MSで定性分析し、油分解性を調べた。また、比較対照実験として土壌にもともと棲息している微生物のみによる分解実験を行い、その結果と対比してバイオ製剤の添加効果を検討した。

2. バイオ製剤

本実験においては市販の2種類の微生物製剤 (以下、バイオ処理剤 A ならびに B とする) と石油資源開発^株の余目油田油水分離槽中に生息しているグラム陰性好気性桿菌 *Pseudomonas mendocina* 水溶液を利用する。

2.1 バイオ製剤 A

バイオ処理剤 A (商品名はオイル・ゲータと呼ぶ、オイル・ゲータ社製) の主成分はセルロースからなる物質であり、親油性が高く、吸収した油は繊維内部に固定化され、再溶出しない。硫酸アンモニウムを3~8%含んだ粉末状のセルロースは生物学的に活性化した媒体となり、水分のあるところで優先的に炭化水素を吸着し、製剤中に含まれている炭化水素分解菌が自然

平成14年6月26日受付

* 秋田大学サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー
〒010-8502 秋田市手形学園町1-1

** 秋田大学工学資源学部 機械工学科

*** 秋田大学工学資源学部 環境物質工学科

† Akita University Satellite Venture Business Laboratory,
1-1 Tegatagakuen-cho, Akita-shi 010-8502, Japan

†† Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering and Resource, Akita University

††† Department of Materials-process Engineering & Applied Chemistry for Environments, Faculty of Engineering and Resource, Akita University

Table 1 Mixture ratio of Contaminated soil, Bioprocessing medicine and Water

| Run | Contaminated soil [Kg] | Bioprocessing medicine [g] | Distilled water [ml] |
|-----|------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 1 | 13 | (A) 123 | 2941 |
| 2 | 13 | (A) 123 amarumesui 1000[ml] | 1941 |
| 3 | 13 | (A) 123 (B) 39 | 2941 |

に活動を始め、成長するので、吸着した炭化水素が水、二酸化炭素及び無害の廃棄物に急速に分解されるという性質を有する。このバイオ製剤は無毒、乾燥した茶色粉末であり、含まれている菌の生育可能な環境温度は4-50°Cで、主に *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* *Bacillus thuringensis* などの好気性の *Bacillus* 属菌を含んでいる¹⁶⁾。

2.2 バイオ製剤 B

バイオ製剤 B (商品名はテラザイムと呼ぶ、オープンハイマー社製) は天然の好気性微生物を高密度に珪藻土に吸着させた物質である。珪藻土が油分を吸収し、珪藻土中の微生物がその油分を分解して無害化させるものである。このバイオ製剤に含まれる微生物はバイオ製剤 A と同様に *Bacillus* 属の微生物群であり、成長可能な環境温度は2-48°Cである。水の添加により活性化し、油を吸収、分解する。油は最終的には水と二酸化炭素にまで分解され、微生物は死滅する¹⁷⁾。

2.3 *Pseudomonas mendocina*

Pseudomonas mendocina は、石油開発資源開発(株)の余目油田の油水分離槽中に生息している微生物を分離し、同定したものである。この微生物はグラム陰性好気性桿菌であり、ダイオキシンの分解にも有効であることが報告されている¹⁸⁾。本実験では *Pseudomonas mendocina* を含む余目油田の油水分離槽中水溶液 (余目水と呼ぶ) をバイオ製剤 A と組み合わせ使用し、油汚染土壌への浄化効果を検討する。

3. 実験試料と方法

3.1 実験試料

実験に使用した試料土壌は秋田県海岸線の原油で汚染された地点から採取したもので、全石油系炭化水素類 (*Total Petroleum Hydrocarbon*, TPH と呼ぶ) の含有量が約5600ppm の土壌である。Table. 1 に示すように、この土壌に蒸留水を加えて、バクテリアの生育に適した35%~40%の水分になるように調整した。3種類の条件による TPH 分解能力を比較するために、Table. 1 の3供試料を調製した。

3.3 実験方法とサンプリング

本実験では、原位置でのバイオレメディエーションによる処理について基礎的検討をするため、はじめに Figure. 1 に示すようなカラムを用いた実験を5週間行った。カラムには市販の塩化ビニール製の内径100mm、長さ1000mm の管を使用し、管と部品は塩化ビニール樹脂類接着剤を用いて接着した。カラ

ムを用いることによりバイオ製剤の分解能力、ならびに中層と下層での分解速度の違いが検討できる。7週目からは後述のようにバケツを用いた実験に変えた。

実験開始から6週目までは、Table. 1 に示す割合で土壌とバイオ製剤、蒸留水をそれぞれ混合しよく攪拌した後、カラムに入れ、室内に室温で静置した。この混合、攪拌の時点を実験開始点の第1週目とした。エアレーションや攪拌は一切行わなかった。これは現場での処理を想定したものであり、原位置にバイオ製剤を散布し、そのまま放置したままでも処理が可能であることを確認するための措置である。しかしながら、本実験で使用したバイオ製剤ならびに *Pseudomonas mendocina* は好気性の微生物であるため、7週目あたりに、油分解速度が低くなったので、実験装置をカラムからバケツに変更した。すなわち、カラム内の土壌をバケツに移しよく攪拌して、空気に触れさせた後、そのまま静置した。この後、週一回の割合でよく攪拌して通気を行い、また、土壌表面の乾燥を防ぐため、適宜水を補給

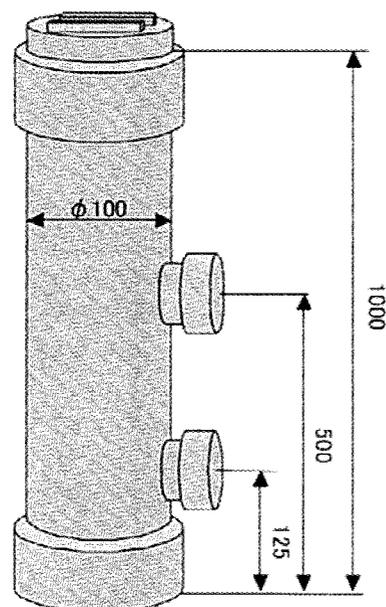


Figure. 1 Experimental device of bioremediation

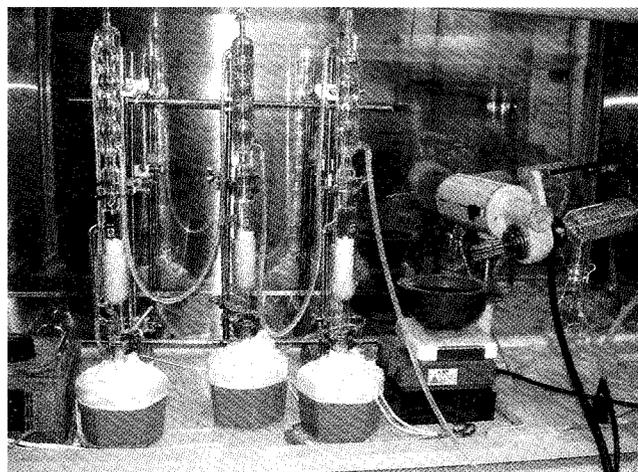


Figure. 2 Experimental device of Soxhlet TPH extraction by normal hexane

しながら更にバイオレメディエーション実験を行った。

サンプリングは、カラムを用いた実験では、下から125mm(下層)と500mm(中層)の位置から2日後、及び一週間経過する毎に分析用土壌を約25g採取した。土壌をバケツに移した後は、週一回攪拌してから、平均的な土壌をサンプリングした。

3.3 油分の定量

油分は、重量法(ノルマルヘキサン抽出物質法)により測定した。抽出装置をFigure. 2に示す。採取土壌を円筒濾紙(ADVANTEC製No.84)に入れ、ドラフトチャンバー内のソックスレー抽出器を用いてノルマルヘキサン(N-HEXと呼ぶ)溶剤による可溶成分の抽出を行った。抽出後、水分とN-HEXを蒸留除去し、油量を電子天秤で秤量した、TPH濃度は式(1)より求めた。

$$\text{TPH 濃度 [ppm]} = \frac{\text{N-HEX 抽出油重量}}{\text{サンプリングした土壌の重量}} \times 10^6 \quad (1)$$

3.4 油分の定性分析

TPHの成分物質について、Gcmate(日本電子ハイテック株式会社製)装置を用いて質量分析法(GC-MS)により同定した。ガスクロマトグラフ装置のオープンの初期温度は50℃に設定し、1分間保持した後、毎分10℃の速度で最終温度300℃まで上昇させ30分間保持した。供試量は1μlであり、3.3で抽出した油を分析可能な濃度までヘキサンで希釈したものを供した。

4. 実験結果と考察

4.1 土壌中 TPH 濃度の変化

Figure. 3~5に土壌中のTPH濃度の変化を示す。グラフの横軸は測定時間を示し、縦軸は土壌中のTPHの濃度を示している。Figure. 3~5より、ばらつきはあるものの、すべての条件において土壌の油分が時間とともに最初の5600ppmから半分以下にまで減少する傾向が認められた。測定値のばらつきは、油の抽出方法(時間等)、サンプリング時の水分量等の違いによって生じたものと考えられる。また、供試土壌は原油で汚染

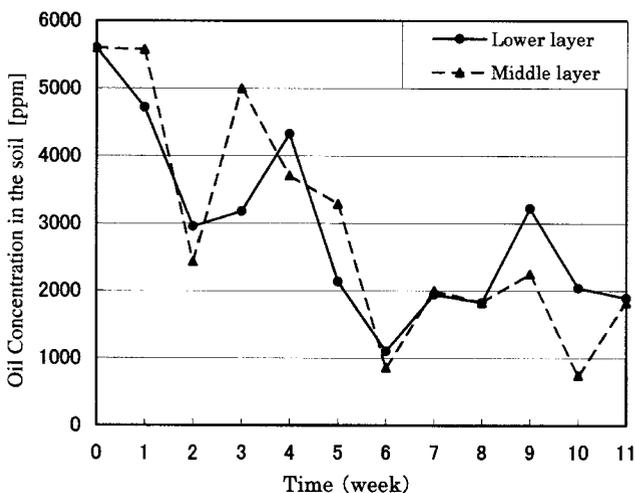


Figure. 3 Variation of the TPH concentration as a function of time (week) in run 1

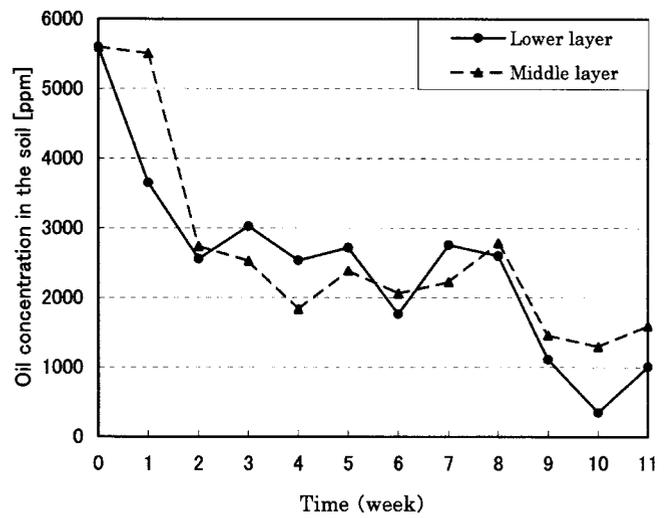


Figure. 4 Variation of the TPH concentration as a function of time (week) in run 2

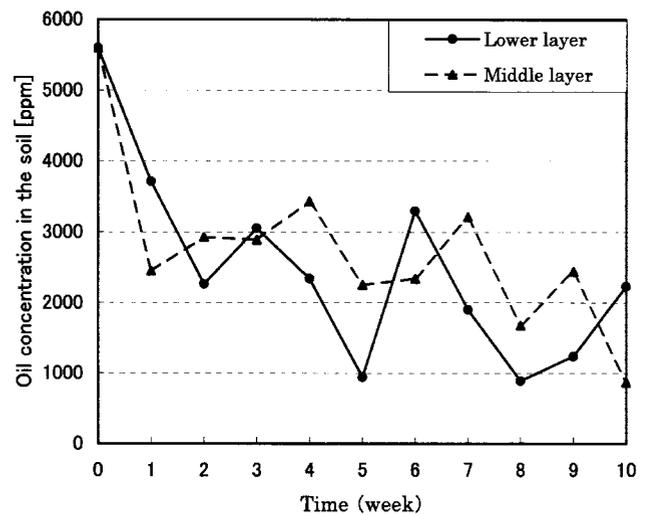


Figure. 5 Variation of the TPH concentration as a function of time (week) in run 3

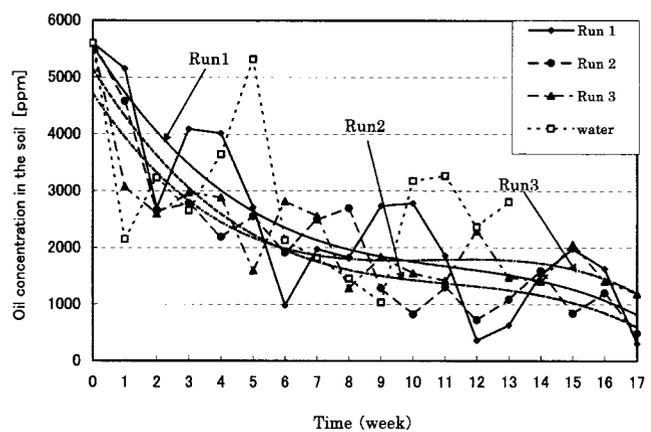


Figure. 6 Variation of the TPH concentration as a function of time (week) for the soils of three runs

された土壌であり、様々な分子量の油が混ざっており、コールタール、アスファルト等の分子量の高い油が存在する場合には、すぐには微生物が分解できないので土壌中に残留する。この時、微生物の分解能力が高ければ分子量の小さい油を速やかに分解するので、土壌中の油分は減少するが、分解能力が低い場合は油分は低下しない、このことも油分の測定値にばらつきが生ずる一因となっているものと考えられる。一方、図3~5の土壌の中層と下層の油分を比較すると、両方の油分に大きい差は見られなかった。初め5週間は、カラムを用いて実験を行っており、攪拌とエアレーションなどを一切行っていないので、中層と下層の土壌と酸素との接触は同程度となり、分解効率にも差が認められない。

次に、3種類の実験条件下でTPH分解性の比較をした結果をFigure. 6に示す。同図には、カラムの中層と下層から採取したサンプルの平均値をプロットしてある。Run1, Run2, Run3の測定値を3次関数で近似しそれぞれ実線、鎖線、一点鎖線で示す。この図から明白のように、土壌を攪拌して静置2日後、土壌中のTPH量は少し下がり始め、一週間後にはRun1で2696ppm, Run2で2649ppm, Run3で2594ppmまで低下した。7週目に、土壌をカラムからバケツに移し、攪拌通気を行うと、時間の経過に伴い、油分解がさらに進んだ。第17週目に土壌中のTPHの濃度はRun1で308ppm, Run2で485ppm, Run3で1186ppmになった。これらの結果より、実験開始時点で、土壌とバイオ製剤を攪拌して、バクテリアと土壌

を十分に接触させると、TPHは減少し始めるが、7週目付近でほとんど変化しなくなる。ここで、土壌を攪拌して通気すると、微生物の活性化が促進され、再び油分の分解が進むことが分かる。また、Figure. 6中の3曲線から最初の3週間ではRun3の油分解が比較的速く、3週間以後ではRun2の油分解が速かった。Run1の場合はデータの変動が大きいことが分かる。この結果から、*Pseudomonas mendocina*はもともと原油中で発見された微生物であるため、原油の成分を効率的に分解するのに適していることが考えられる。一方、土壌中にもともと棲息している微生物のみによる油分解効果を確認するため、汚染土壌10kgを精製水1000mlと混合し、よく攪拌しバケツに入れて静置した。13週間経過し、その実験結果をFigure. 6に点線で示している。これらの結果より、油汚染土壌では実験室の装置内に持ち込んだ場合、相当量の油分解が生じたことを確認した。ただし、バイオ製剤を添加しない場合より、データ変動が大きく、油分解の効果が低くなることが確認された。なお、本研究ではバイオ製剤を再添加することによる油分解効果を調べるため、13週目に、それぞれのRunに応じて、バイオ製剤A, Bと余目水を再添加した。添加量はTable. 1に示すバイオ製剤の量の半分である。しかしながら、3週間経過しても油分解速度の改善は認められなかった。以上のことから、バイオ製剤の再添加は油分分解の速度にあまり影響を及ぼさないが、攪拌に伴う通気の影響は大きいことが分かる。

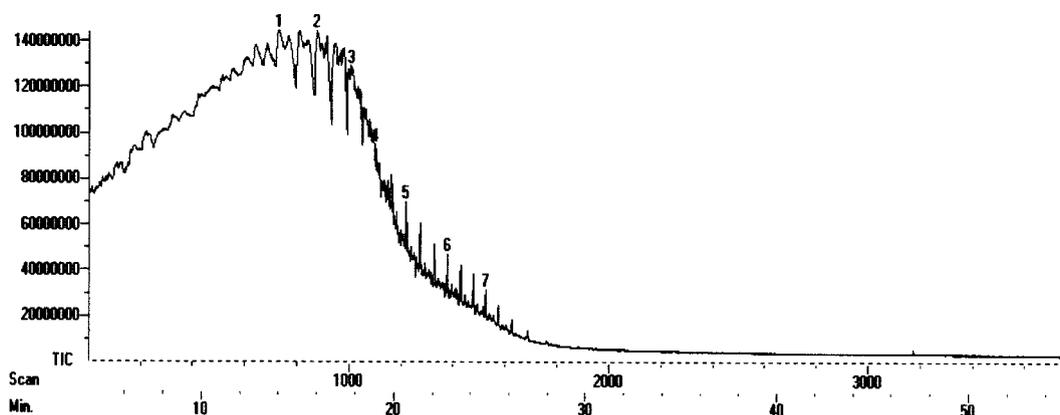


Figure. 7 Result of crude oil by GC-MS analysis

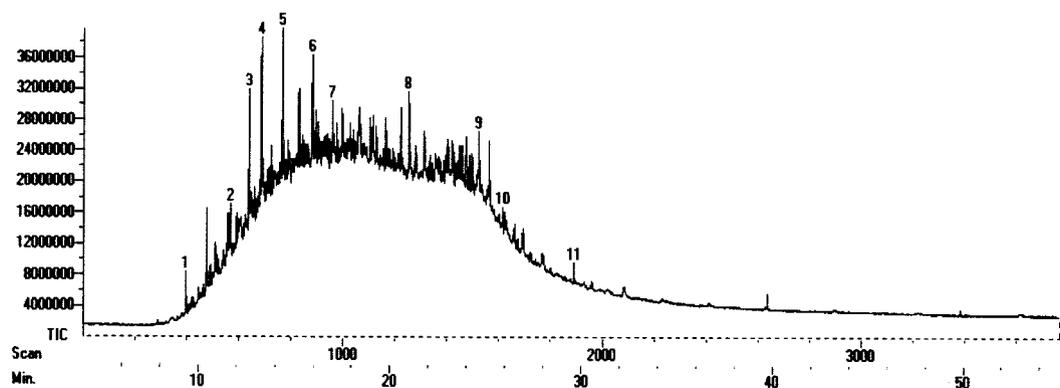


Figure. 8 Results of oil in original soil by GC-MS analysis

4. 2 TPH 成分の分析

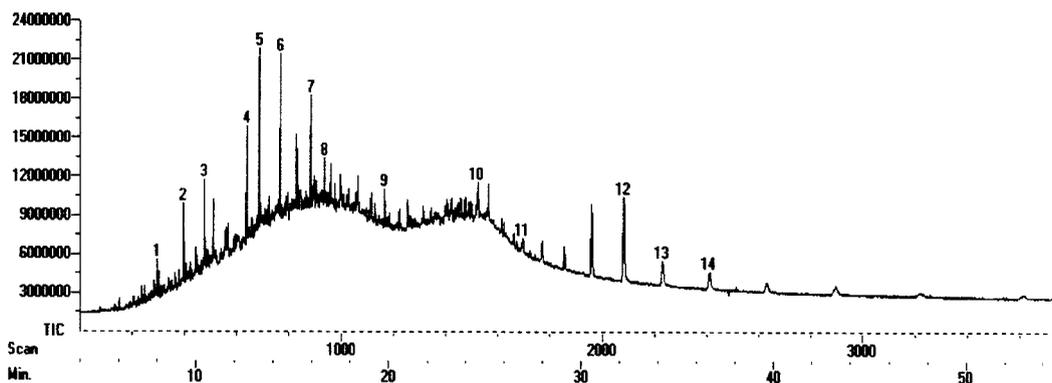
Figure. 7~11はGC-MSによる分析結果である。横軸に測定のためのスキャン回数と測定時間を示す、縦軸にイオン化室でイオン化されたイオンの数を示す。Figure. 7は原土壌中の油の成分を同定するため、参照試料として、原油を分析した結果である。原土壌中のTPHの分析結果をFigure. 8に示す。2つのグラフを比較すると、原油より原土壌は沸点の低い(50°C~140°C)成分の含有率が少ないことが分かった。これは日照により土壌にある沸点の低い成分が蒸発したためと考えられる。また、Run1、2及び3において、実験開始から第7週目、17週目に土壌中に残存している油成分の分析結果をFigure. 9(a), (b)~11(a), (b)に示す。これらの結果より、Figure. 8に比較して、時間とともにピークの数と高さが減少し、油分が分解されていることが分かる。Figure. 8より原土壌中には沸点の低い成分(約190°C~230°C)と沸点の高い成分(約260°C~300°C)のピークがほぼ同じ高さであるが、Figure. 9~11より時間の経過にしたがって、沸点の高い成分がやや優先的に分解される傾向が認められる。Run1(Figure. 9)では、7週目の油成分と17週目の油成分を比べると、17週目には沸点の高い成分のピークが減少し、沸点の高い油が分解されることが確認できた。また、Run2(Figure. 10)の場合でも、Figure. 8(初期値)に比べて、沸点の高い成分と沸点の低い成分のピークが大幅に減少した。沸点の高い油量が下がるに伴い、沸点の低い油

も減少していることが分かった。前節で述べたが、余目水との組み合わせ使用により、油がより効率的に分解されたことがさらに確認された。また、Run3の場合には沸点の高い成分が優先的に分解し、油の量も減少することが確認できた。以上の結果より、本実験ではバイオ製剤Aをベースにして、余目水、バイオ製剤Bそれぞれと組み合わせ使用することにより、油汚染土壌はより効率的浄化が可能であることが確認できた。

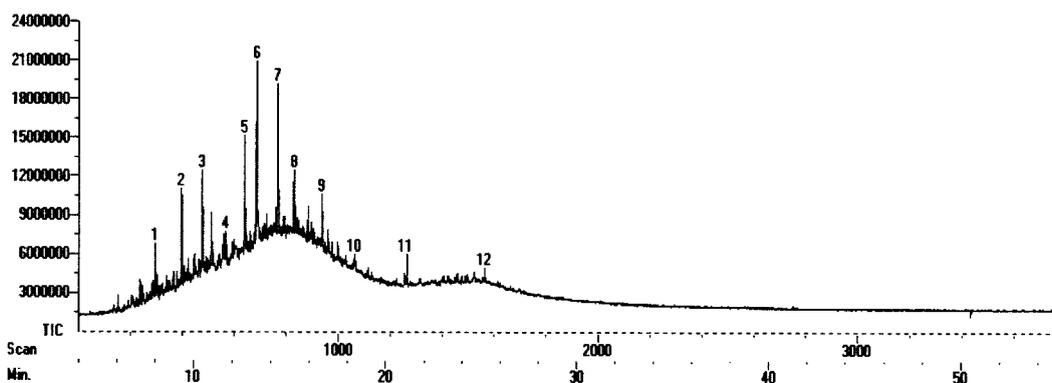
5. 結言

本実験では2種類のバイオ製剤余目油田からの石油解菌を組み合わせた3条件下で、油汚染土壌の浄化実験を行った。得られた結果は次のとおりである。

- (1) いずれの条件においても16週間のバイオレメディエーションによる汚染土壌のTPH濃度は、約5600ppmから5分の1以下まで減少することが確認できた。バイオレメディエーションにより炭化水素に汚染された土壌の修復が可能である。
- (2) 土壌にもともと棲息している微生物のみに比較して、バイオ製剤を添加した場合のほうが、油汚染土壌はより効率的に浄化されることが確認できた。
- (3) 12週間経過後のバイオ製剤の再添加は、油分解の速度にあまり影響を及ぼさなかったが6週間経過後に、攪拌通気を行うと、油の分解はさらに進んだ。



(a) After 7 weeks



(b) After 17 weeks

Figure. 9 Results of run1 by GC-MS analysis

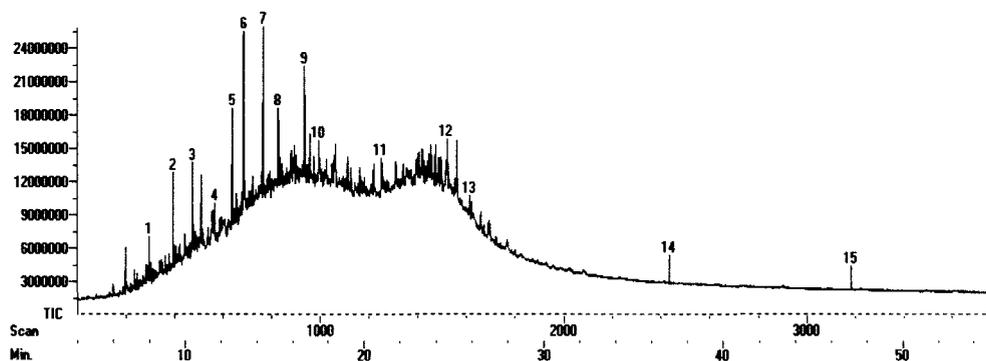
(4) GC-MS の分析によって、各実験条件下での油分解の特徴を明らかにした。いずれの条件下でも、沸点の高い成分が分解された。また、Run2 では高沸点、低沸点の成分がともにすみやかに分解された。

謝辞

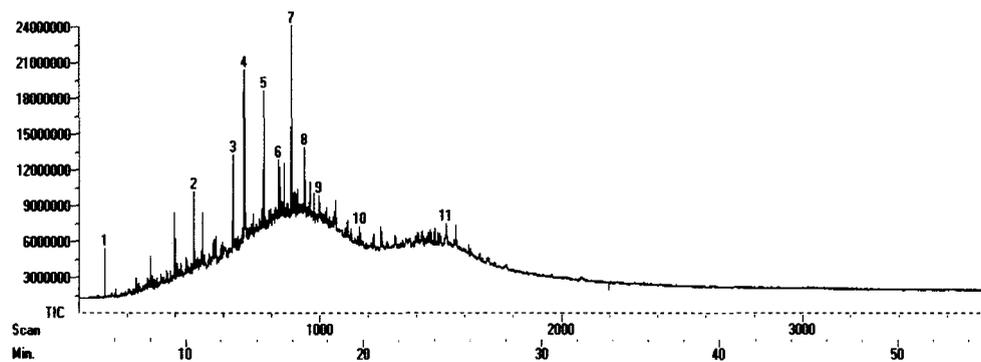
本研究の動機を与えて下さり、ご協力をしていただいた阿部善産業株式会社阿部善氏に感謝の意を表す。また、本研究の遂行にあたり、実験補助をして頂いた元秋田大学学生五十嵐大輔氏、寺島剛資氏及び貴重な助言を頂いた元秋田大学 SVBL 研究員滝守孝氏に感謝する。

参考文献

- 1) 千田 信 (1996): 微生物資源工学, コロナ社, p.55-160.
- 2) ジョン・T・クックソン Jr. 著者, 藤田正憲, 矢木修身, 監訳 (1997): バイオレメディエーションエンジニアリング~設計と応用~, エヌ・ティー・エス, P.229-284.
- 3) ウィリアム C. アンダーソン 著, 軽部征夫 監修, 池上雄二/角田英男 訳 (1995): バイオレメディエーション (環境修復技術の実際), Springer, p.22-167.
- 4) 西村 実 (2001): 環境規制対応から見た廃水処理分野のバイオ技術の動向, 化学工業, Vol.65, No.9, p.504-505.
- 5) 将積一夫 (2000): 土壌浄化と家電リサイクル事業への取り組み, 資源と素材, Vol.116, No.4, p.302-303.
- 6) 財団法人・未来工学研究所 (1997): 生物学的環境修復手法の社会的コンセンサス形成の調査研究報告書.
- 7) 中川由香, 木下睦, 洪承燮, 榎本兵治 (2001): 原油により汚染された沿岸環境のバイオレメディエーションに関する研究, 資源・素材学会 春季大会講演集(II) 素材編, p.241-242.
- 8) 高橋一也 (2000): SS 跡「環境改善」システムを開発, JETI, Vol.48, No.2, p.26-28.
- 9) Dupont, R.R (1992a): Application of bioremediation fundamentals to the design and evaluation of in situ soil bioventing systems. Paper presented at 85th Annual Meeting & Exhibition of the Air & Waste Management Association. Paper 92-30.03. Kansas City, Mo.
- 10) Dupont, R.R (1992b): Nitrogen fixation potential in petroleum contaminated soils. Paper presented at 85th Annual Meeting & Exhibition of the Air & Waste Management Association. Paper 92.13.06. Kansas City, Mo.
- 11) Ward, C.H., J.M. Thomas, S. Fionrenza, H. S. Rifai, P. B. Bedient, J. T. Wilson and R. L. Raymond (1989): In situ bioremediation of subsurface material and groundwater contaminated with avaitin fuel: Traverse City, Michigan. *In Proc. 1989 Air and Waste management/*



(a) After 7 weeks

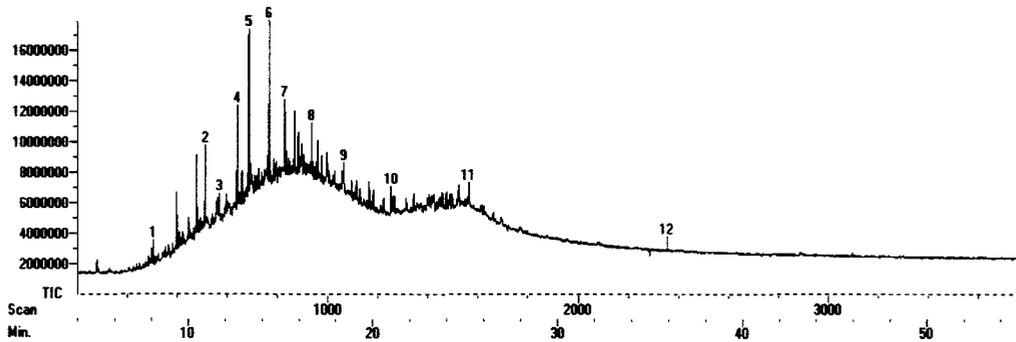


(b) After 17 weeks

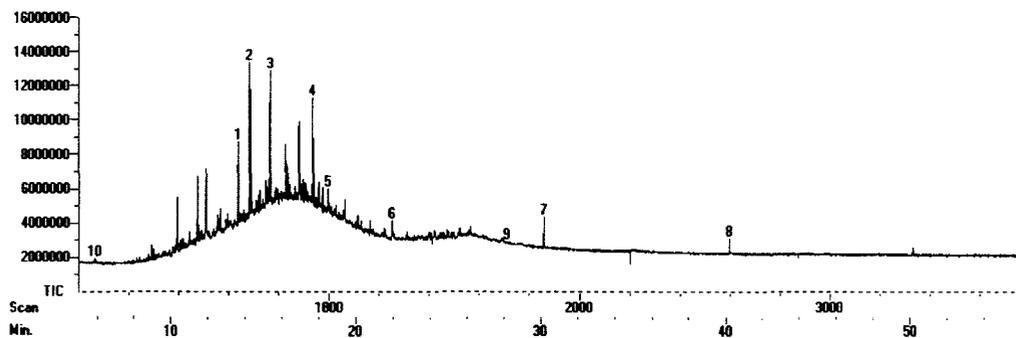
Figure. 10 Results of run 2 by GC-MS analysis

Environmental Protection Agency International Symposium, 83-96. Cincinnati.

- 12) David J. Glass (1993): Hazardous Waste Bioremediation, PaHI: U. S. market Spectrum Environmental Management Industry.
- 13) D.J. Glsass, T. Raphael, R. Valo and J.Van Eyk (1993): International Activities in Bioremediation, Growing Markets and Opportunities BATTRLLE PRESS.
- 14) J. Wilck (1996): To bioremediation or Not is the question, BIOTECHNOLOGY 251:SR14.
- 15) Carl H. Oppenheimer (1998): Bioremediation of Water, Prepared for clean water "98" Exhibition and seminar the commercial service, Tokyo.
- 16) Gemtek products 社 (1997): 炭化水素に因る汚染土壌のバイオレメディエーションのための方法と素材, 米国特許 5609667.
- 17) Carl H Oppenheimer (1996): OPPENHEIMER FORMULA, TECHNICAL PRODUCT BULLETIN #B-36, USEPA, OIL PROGRAM CENTER.
- 18) 藤田豊久, 佐藤葉奈, 武藤一, 柴山敦, 宮崎敏夫, 井上千弘 (2001): 原油中に生息するバクテリアを用いた水中のダイオキシン類などの有機塩素化合物の分解, 資源と素材, Vol.117, p.43-48.



(a) After 7 weeks



(b) After 17 weeks

Figure. 11 Results of run3 by GC-MS analysis