

VII-68

土壤微生物による石油製品の分解特性

大成建設（株）技術研究所 正会員 大場美保・鈴木朝香
同 上 川又 睦・帆秋利洋

1. はじめに

石油汚染土壌の浄化方法には、物理的方法と生物学的的方法（バイオリメディエーション）がある。前者は揮発性の高い成分の除去に、後者は不揮発性成分ならびに土粒子に吸着した成分の除去にそれぞれ有効である。

本研究では、有効なバイオリメディエーション技術を開発する一環として、微生物による石油成分の分解性能を液体培養試験で検討した。石油汚染土壌から石油分解能を有する微生物を分離し、この混合菌を用いて石油製品の生分解特性を把握した。また、土壤微生物群の石油分解の限界を知るために、培養法の改良による分解促進効果について検討した。

表1 標準培地組成

NH_4NO_3	2.5g
KH_2PO_4	1.0g
K_2HPO_4	0.5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g
$\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2g
NaCl	2.0g
$\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01g
CaCl_2	0.01g
ZnCl_2	0.01g
D.W.	1000ml
pH	7.0

2. 方法

2-1. 石油製品別生分解能の比較

ある石油汚染土壌から分離した混合菌は、表1に示す培地を用いて3日周期で約6ヶ月集積培養したものである。混合菌の前培養は、炭素源として原油（濃度1%）を用い、28℃、280rpmで3日間振とう培養した。本培養時には炭素源として6種類の石油製品（A重油、C重油、灯油、軽油、ガソリン、ジェットエンジンオイル）を使用し、各製品の分解特性を比較した。なお、植菌量はすべて1%とした。

培養試験では、図1に示すようにpHおよび生菌数測定用サンプルと、残存する石油製品量測定用サンプルを用意した。また、コントロールとして石油製品の揮発量を求めるために植菌なしの無生物試験管を石油製品ごとに用意した。

2-2. イアトロスキャン法による石油成分の分析

Goto¹⁾の方法に準拠してイアトロスキャン法を用いた。この方法は原油成分を飽和分、芳香族分、レジン・アスファルテン分の3画分に分離して定性分析することができる。すなわち、分解実験終了後、試験管に内部標準物質（1-オクタデカノール 3.75mg/ml）の入ったクロロホルムを1ml添加し、低速遠心処理（2500rpm×10min）後クロロホルムにより残留石油分を沈殿させて回収した。これを測定用サンプルとし、TLCに添加した後、ヘキサン及びトルエン・ヘキサン（80:20）で順次展開してイアトロスキャン（ヤマトロン社製）で検出した。本法によるC重油のクロマトグラムを図2に示す。

2-3. 土壤微生物による石油分解の限界

混合菌を用いた石油製品分解培養試験で生分解能の限界について調べた。最も分解率の低いC重油を単一炭素源として、2週間単位の回分培養により検討した。この際、1回の培養で残留した石油成分の生分解性限界を以下の方法で検討した。2週間培養後の残留石油分

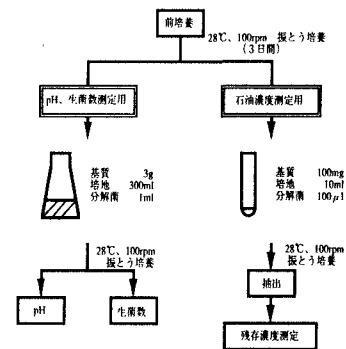


図1 石油製品別生分解能の比較実験

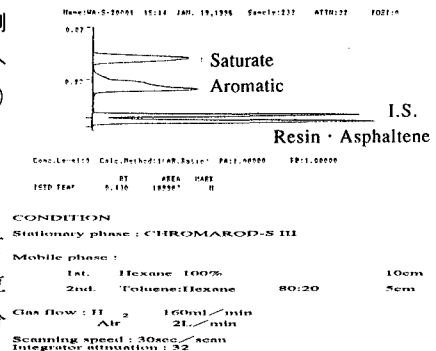


図2 イアトロスキャン測定条件

を抽出後、表1に示した新鮮な標準培地に交換（リフレッシュ）して混合菌を植菌後、再培養を行い、水溶性成分のみを除去するリフレッシュ培養により、残留石油成分の分解促進効果を検討した。実験フローを図3に示す。ここでイアトロスキャン測定時の内部標準物質として使用した1-オクタデカノールはサンプル調製過程で加熱すると、分解してイアトロスキャン測定時に数本の成分として出現するため、一度測定したサンプルを再び培養に使用せず、測定用サンプルと培養用サンプルに分けて行った。

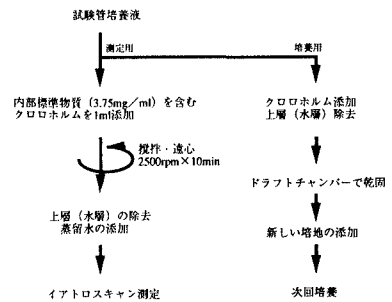


図3 リフレッシュ培養実験

3. 結果と考察

(1) 混合菌による分解培養試験での30日目における生菌数、pH値、および各種石油製品の除去率を表2に示した。A重油、C重油、軽油、灯油、ジェットエンジンの生菌数は 10^7 (cell/ml) から 10^8 まで増加したが、ガソリンは 10^5 (cells/ml) に減少した。揮発成分が多い灯油、ガソリン、ジェットエンジンオイルの除去は、大部分が揮発によるものであった。A重油の30日目における除去率は35.1%でそのうち13.5%が生分解、21.6%が揮発による除去であった。C重油は生分解も揮発もしにくく、除去率は9.1%にとどまった。以上のことから、生分解による石油製品の減少は、微生物の増殖と対応していることが明らかになった。また、石油成分の分析結果から、各石油製品とも飽和分が分解しやすく、芳香族分は生分解性がきわめて低いことがわかった。このことから、残留した芳香族分の分解能を向上させることが、バイオリメディエーション技術にとって重要であると考えられる。

表2 混合菌による各種石油製品の除去率

petroleum product	pH	cell number (cells./ml)	removal (%)		total (%)
			biodegradation (a)	volatilization (b)	
A-heavy oil	6.72	1.6×10^8	13.5	21.6	35.1
C-heavy oil	6.90	1.7×10^8	3.3	5.8	9.1
light oil	6.68	3.5×10^8	24.2	16.0	40.2
paraffin oil	6.78	1.6×10^8	5.5	86.2	91.7
gasoline	6.95	7.0×10^5	0.0	98.0	98.0
jet engine	6.78	1.6×10^8	0.0	94.8	94.8

(2) 表2に示したようにC重油は30日間の連続培養試験でも生分解による除去率は低かった。しかし、リフレッシュ培養法を用いて分解実験を行うと、図4に示すように飽和分・芳香族分ともに顕著に分解が促進されることが明らかとなった。ここで、14日目、28日目、42日目、56日目、及び70日目のプロットは各々、水溶性成分を交換（リフレッシュ）したことを意味する。またコントロールは無生物試験を意味する。すなわち、1度目の培養では、飽和分が30.3%、芳香族分10.6%の分解率でとどまるが、水溶性成分をリフレッシュしていくことで、残留石油成分は減少していく。4回リフレッシュした70日目では、飽和分は75.4%、芳香族分は55.2%にまで分解が促進された。これは、分解培養試験中に微生物の増殖にともなって生産された2次代謝産物を取り除くことによって、飽和分、芳香族分ともに分解が促進されたためと推察される。

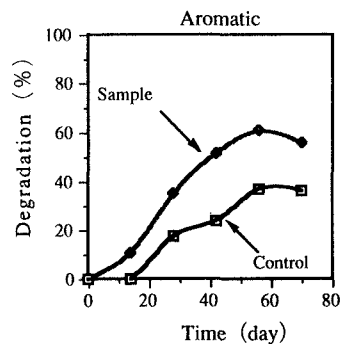
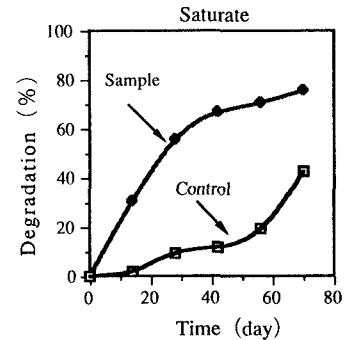


図4 リフレッシュ培養によるC重油の生分解

引用文献

- 1) Goto *et al* : *Mar Biotechnol*, 2, 45-50, 1994.