

石油分解菌の安全性評価

榑熊谷組 正会員 ○門倉 伸行, 佐々木 静郎, 土路生 修三, 村上 順也
立命館大学 久保 幹, 松宮 芳樹

1. 目的

近年, 油による土壌汚染の件数は増加傾向をたどり, 社団法人土壌環境センターの平成 23 年度実態調査¹⁾によれば, 汚染対象物の種類別で油分は重金属汚染に次ぐ汚染対象としては 2 番目に多い種類に上がっている。油汚染の対策としては, 安価で環境負荷の少ない手法としてバイオレメディエーションの適用が増えてきているが, そこで使用される石油分解菌に対しては, 国の利用指針(微生物によるバイオレメディエーション)に基づく認証取得が推奨されている。本報では, バイオレメディエーションに使用する石油分解菌に対して, 指針に基づく適合確認を受け大臣確認を取得したので, その概要について報告する。

2. 石油分解菌

本システムで用いる石油分解菌は, *Rhodococcus* sp. NDKK6 株および *Gordonia* sp. NDKY76A 株である(図 1)。両菌株とも, 直鎖状炭化水素や長鎖環状アルカンを唯一の炭素源として生育する微生物であり, 自然環境中では普遍的に存在している菌である。これらの菌について, 経済産業省と環境省が共同で策定した「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」への適合確認を申請, 平成 23 年 5 月 6 日付で大臣確認を取得した。

3. 石油分解菌の安全性確認

分解菌の安全性評価は, 大きく分けて下記の調査により確認した。(図 2)

- ① 文献調査による菌に対する既知の情報収集
 - ② 動植物試験による安全性確認
 - ③ 他の微生物に対する影響検討, 分解菌挙動解析
- 使用する分解菌に関しては, まず *Rhodococcus* sp.

NDKK6 株については近縁種に寄生性・病原性は認められなかった。ただ, *Gordonia* sp. NDKY76A 株については近縁種の一部に日和見感染症(健康な人間では感染症起こさないような病原体(弱毒微生物・非病原微生物・平素無害菌など)が原因で発症する感染症)との類似性情報が確認されたが, 菌の使用方法や環境影響への防止策をとることの使用を認められたため, 使用現場でのリスク回避策を講じる計画とした。

動植物等に対する安全性確認は, 以下の試験を実施した。

- ・動物への投与試験: 供試哺乳動物に使用する 2 種の石油分解菌を各々投与し, 体重変化や異常行動等および死亡数を観察した。
- ・魚類を用いた水中暴露試験: 供試魚の入った水槽に 2 種の石油分解菌を添加し, 供試魚の状態変化や異常行

キーワード 土壌汚染, 油汚染, バイオレメディエーション, 石油分解菌, 安全性評価

連絡先: 〒300-2651 茨城県つくば市鬼ヶ窪 1043 TEL 029-847-7505 FAX 029-847-7480

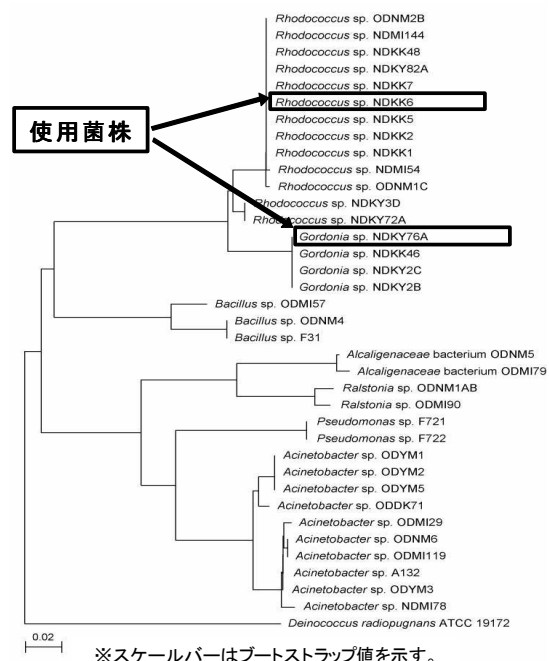


図 1 石油分解菌ライブラリー

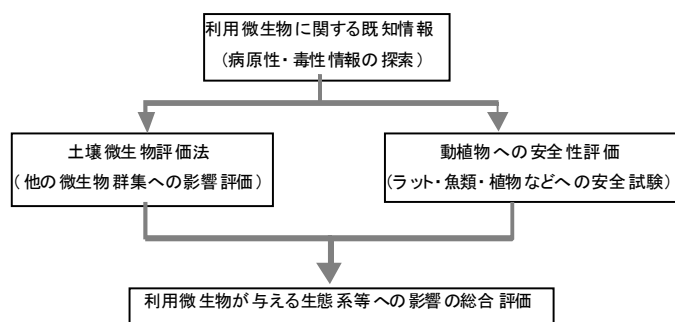


図 2 安全性評価の流れ

動等および死亡数を観察した。

- ・植物を用いた投与試験：供試植物に使用予定の2種の石油分解菌を投与し、重量変化を含めた生育状況の観察を行った。

・試験結果

紙面の関係で全データを示せないが、上記試験の結果、供試哺乳動物および供試魚、供試植物ともに、投与した石油分解菌の影響は観察されず、2種の石油分解菌の動植物に対する病原性、毒性は認められなかった。

利用する石油分解菌は、石油汚染がある場合にのみ土壤中増殖・維持し、石油の浄化（汚染濃度の減少）と共にその微生物数は減少するが、それを証明するためバイオレメディエーション浄化中における投与分解菌や総土壌細菌数などを独自に開発した環境DNA解析法²⁾や分子生物学的手法（Real Time PCR法²⁾によりモニタリングした。試験は非汚染土壌と汚染土壌（模擬および実汚染土壌）を用いて行ったが、ここでは一例として、A重油を用いた模擬汚染土壌に*Rhodococcus* sp. NDKK6株を投与した試験結果を以下に示す。

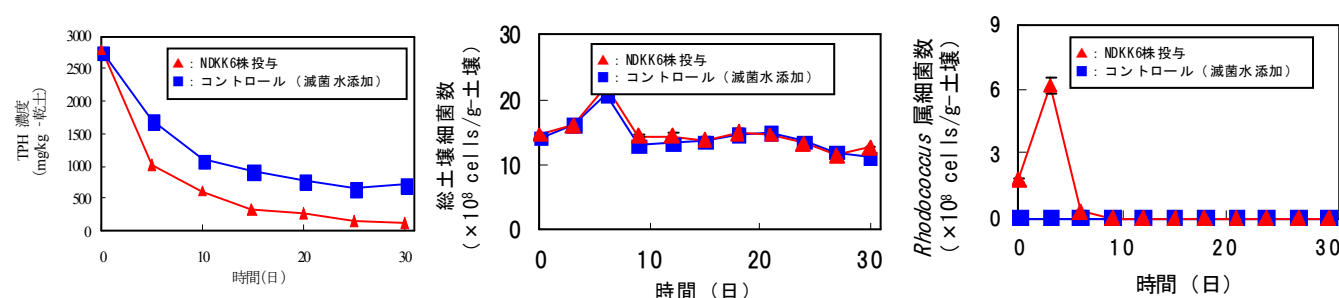


図3 油分濃度および総土壌細菌数、*Rhodococcus* 属細菌数の経時変化（模擬汚染土壌）

総土壌細菌数、*Rhodococcus* 属細菌数、および油分濃度（TPH 濃度）の経時変化を図3に示す。*Rhodococcus* sp. NDKK6 株の投与の有無にかかわらず、総土壌細菌数に大きな差異は見られなかったことから、分解菌の添加に関係なく土壌中の総細菌数の変化には大きな影響を与えないと考えられた。

Real time PCR 法による *Rhodococcus* 属細菌数の結果により、模擬汚染土壌に *Rhodococcus* sp. NDKK6 株を投与すると、*Rhodococcus* 属は初期に一度増加し、その後減少する傾向が得られた。栄養塩類を添加したことによって、菌数の増加は著しく向上したが、*Rhodococcus* 属細菌の維持には大きな影響は見られず、約10日後には検出限界（ 1×10^6 cells/g-土壌）以下にまで減少した。これより、*Rhodococcus* sp. NDKK6 株は油分を資化している間は残存し、油分の減少とともに減少していくと考えられた。

また、別途実施した模擬汚染土壌に *Rhodococcus* sp. NDKK6 株および栄養塩類を投与した際の DGGE 解析とクラスター解析結果では、*Rhodococcus* sp. NDKK6 株による土壌群集構造の変化は少ないと判断された。

なお、模擬汚染土壌以外にも、非汚染土壌ならびに実汚染土壌を用いて他の微生物に対する影響検討を行った結果、前述と同様の結果を得て、今回使用する *Rhodococcus* sp. NDKK6 株および *Gordonia* sp. NDKY76A 株については、他の土壌細菌への影響はないことが判明した。

以上、紙面の関係ですべての結果を示せないが、我々が使用する石油分解菌に関しては、既知の情報収集および動植物試験による安全性確認、さらには他の微生物に対する影響検討等の結果、「バイオレメディエーション利用指針」に基づく菌の安全性に関して適合確認を受けるに至った。

なお、本研究は新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の助成を受け、立命館大学と㈱星和電機との共同研究の成果である。

参考文献

- 1) 社団法人土壌環境センターホームページ： <http://www.gepc.or.jp/>
- 2) 立命館大学・株式会社熊谷組・星和電機株式会社：原位置オプト・バイオ土壌浄化システム、2006-2008年度 NEDO 大学発事業創生実用化開発事業性報告書、2009.12