

石油汚染土壌浄化における添加副資材の効果

株式会社熊谷組 正会員 ○佐々木 静郎 正会員 村上 順也
 同 上 正会員 土路生 修三 正会員 門倉 伸行
 立命館大学 松宮 芳樹 久保 幹

1. 目的

石油汚染土壌の浄化対策として、低環境負荷・低コストという特徴を有しているバイオレメディエーション技術が適していると言われ、その適用事例も増えているが分解がほとんど進まない場合もある。筆者らは、生物分解が進まない要因について様々な土壌の解析を行った結果、土壌環境（総細菌数、全炭素量）が関与していることが判明した。本報では、その解析結果ならびに生物分解の促進対策について報告する。

2. 土壌環境の把握

2.1 土壌中の総細菌数

対象土壌は、農地土壌・農地以外の土壌・石油汚染土壌など様々な土壌とした。図1に、環境DNA解析法（細菌由来のDNA抽出による総細菌数への換算）¹⁾により解析した土壌中の総細菌数の一例を示す。

農地土壌の総細菌数が $1.2 \times 10^9 \sim 1.8 \times 10^{10}$ cells/g-sample の範囲であったのに対して、石油汚染土壌では 1.0×10^9 cells/g-sample 以下であった。すなわち、総細菌数が少ない石油汚染土壌ではスティミュレーションよりもオーグメンテーションの方が望ましいと考えられる。

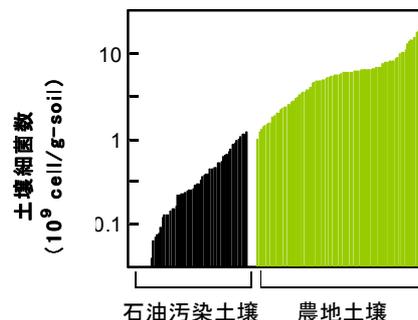


図1 各種土壌の総細菌数

2.2 土壌中の全炭素量 (TC)

対象土壌の全炭素量（全有機炭素計，TOC-V，SHIMAZU）は、5,600 mg/kg～85,600 mg/kg（平均 24,000 mg/kg）であった。総細菌数が農地土壌の平均総細菌数 6.4×10^8 cells/g-soil 以上の土壌は、すべて全炭素量が 10,000 mg/kg 以上であった。つまり、全炭素量が 10,000 mg/kg 以上であることは、総細菌数の維持にとって必要であると考えられ、全炭素量を増加させることにより生物分解が促進されることが期待できる。

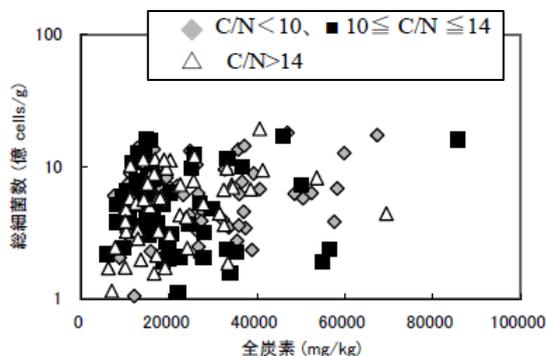


図2 全炭素量と総細菌数の関係

3. 生物分解促進対策

3.1 バイオスティミュレーションにおける検討

炭素を添加することにより、土着微生物の油分分解の向上に寄与するかを把握するために、低肥沃土壌（TC 2,000mg/kg、総細菌数 10^7 cells/g-soil 以下）に、油分濃度が 5,000 mg/kg となるようにベースオイルを添加して模擬汚染土壌を作成した。この土壌に全炭素量が 7,000～30,000 mg/kg となるように副資材（鶏糞堆肥）を加えて、バイオスティミュレーションを行い、油分濃度の経時変化を測定した。図3に、4週後の油分分解率の結果を示す。図から、TCが増加するのに伴い油分分解率は向上する傾向が認められ、TC：20,000 mg/kg（鶏糞堆肥：8.9%添加）のときに最も高い油分分解率を示した。

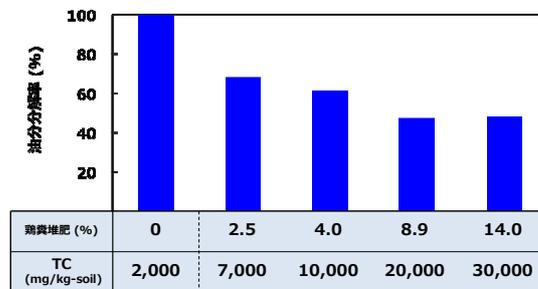


図3 全炭素量と油分分解との関係

キーワード 石油汚染, 土壌総細菌数, バイオレメディエーション, 全炭素, *alkB* 遺伝子

連絡先 〒300-2651 茨城県つくば市鬼ヶ窪 1043 株式会社熊谷組 技術研究所 TEL029-847-7505

3.2 バイオオーグメンテーションにおける検討

前述の実験で用いた模擬汚染土壌を用いて、石油分解菌を投与した場合の全炭素量が油分分解への影響を解析した。実験は、全炭素量が 7,000, 20,000 mg/kg となるように副資材を加えて調整した土壌に、長鎖シクロアルカン分解菌である *R.erythropolis* NDKK6 株^{2), 3)} を 1.0×10^8 cells/g-soil になるように投与して、定期的に油分濃度の分析及び菌の挙動解析を行った。菌の挙動は、総細菌数、土着の石油分解菌数、投与した NDKK6 株数の変化を評価することとし、それぞれ環境 DNA 解析法、アルカンヒドロキシラーゼ遺伝子 (*alkB*) に特異的なプライマーを用いた Real-time PCR 法、*alkB* R2 遺伝子に特異的なプライマーを用いた Real-time PCR 法により定量した。

図 4 に、菌数の挙動を解析した結果を示す。有機資材を添加したことにより総細菌数は増加し、TC 20,000 mg/kg の場合には 21 日目に最大で 2.4×10^{10} cells/g-soil と菌投与前に比べて 200 倍以上の増加を示した。土壌中の石油分解菌数 (土着+投与株) は、投与初期に大幅に増加した後、漸減傾向を示した。その内 NDKK6 株については、TC 添加の効果が顕著に認められ 28 日後でも検出されていた。特に、TC 20,000 mg/kg の場合では菌数は 2 週間程度まで 8×10^8 cells/g-soil と高レベルが維持されていた。また、表 1 に 28 日後の石油分解率の結果を示したように、TC 20,000 mg/kg の場合で 72.1% と良好な結果が得られた。これらのことから、副資材の投入により石油分解菌が増加し、油分分解が促進していると考えられ、オーグメンテーションに対しても有効であることが示唆された。

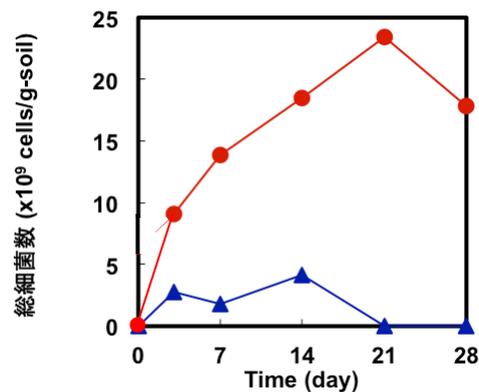
4. まとめ

油汚染土壌に対して、バイオレメディエーションの効率が十分に進まない原因について検討した結果、土壌中の総細菌数や全炭素量が少ないことが要因の一つとして考えられた。その改善対策として有機資材を添加し、TC 20,000 mg/kg 前後に制御することにより、石油分解の促進が確認された。今後は、油種や土質の違いに応じた最適な炭素量の検討や菌相解析による詳細な分解菌の挙動解析を行い、実汚染土壌に対しての適用性について検証していく予定である。

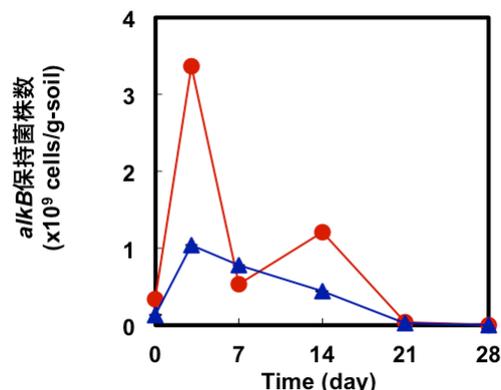
参考文献

- 1) H.Aoshima, A.Kimura, A.Shibutani, C.Okada, Y.Matsumiya, M.Kubo : Evaluation of soil bacterial biomass using environmental DNA extracted by slow-stirring method , Appl.Microbial.Biotechnol.71, 875-880, 2006
- 2) 門倉伸行, 佐々木静郎, 土路生修三, 村上順也, 久保幹, 松宮芳樹 : バイオレメディエーション利用指針に基づく石油分解菌の安全性評価, 第 18 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会講演集, 26-31, 2012
- 3) 崎濱由梨, 吉田智紀, 今田三紀子, 久保田謙三, 松宮芳樹, 久保幹 : シクロアルカン分解微生物を用いた石油汚染土壌のバイオレメディエーション, 立命館大学理工学研究所紀要, 第 65 号, 109-116, 2006

A: 総細菌数



B: 土着の石油分解菌数 (*alkB*)



C: *R. erythropolis* NDKK6株数 (*alkB* R2)

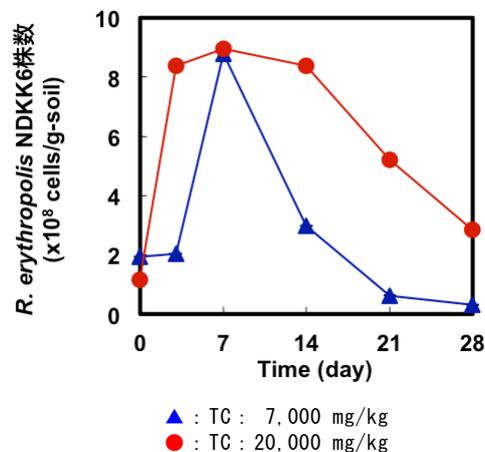


図 4 総土壌細菌数, *alkB* 保持石油分解菌数, NDKK6 株数の経時変化

表 1 石油分解率の比較

投与菌株	分解率(%)	
	鶏糞堆肥添加 (TC: 7,000 mg/kg)	鶏糞堆肥添加 (TC: 20,000 mg/kg)
<i>R. erythropolis</i> NDKK6	43.0	72.1