

コンポストを使用した石油汚染土壌の バイオレメディエーション

高畑 陽・瀧 寛則・帆秋利洋

Keywords : petroleum-contaminated soil, bioremediation, compost, polyaromatic hydrocarbons, safety assessment

石油汚染土壌, バイオレメディエーション, コンポスト, 多環芳香族炭化水素類, 安全性評価

1. はじめに

石油製品による土壌汚染は、精油所や油槽所等の石油関連施設のみならず、ボイラー燃料や機械油を扱う工場等、さまざまな業種で数多くの事例が顕在化している。石油汚染土壌を浄化する方法として、バイオレメディエーションが注目されている¹⁾。本浄化法は、土壌に栄養塩と空気を供給することにより石油分解菌を活性化させ、炭化水素化合物を最終的に水と二酸化炭素に分解する浄化方法である。バイオレメディエーションは加熱分離法や洗浄法等と比較して浄化コストが小さく、環境に対する二次汚染も生じないため、近年急速に普及しつつある。

石油は多種多様な炭化水素化合物の集合体であるため、微生物による分解特性も個々の炭化水素化合物の種類により異なる。日本で環境規制物質となっている炭化水素化合物はベンゼンのみであるが、欧米では多環芳香族炭化水素類（以下PAHs: Polyaromatic Hydrocarbons）も規制対象物質となっており²⁾、種類によっては微生物により分解されにくいことが知られている³⁾。日本でもこれらの有害物質は今後規制される可能性もあり、このような物質を対象としたバイオレメディエーションによる早期浄化技術のニーズは高まると予測される。

多くの石油汚染土壌の浄化サイトで現在適用されているバイオレメディエーションは、土壌中に元来存在する石油分解菌を活性化させることにより浄化を促進させるバイオスティミュレーションが主流である。バイオスティミュレーションでは土壌中に存在する石油分解菌の種類や棲息環境によって浄化は大きく左右されると考えられ、特にPAHsのような難分解性油分を分解可能な微生物の存在が、浄化の成否を左右するといえる。このように特定の汚染物質の浄化に対しては、分解能力の高い微

生物を投与するバイオオーギュメンテーションが有効と考えられる。しかしながら、特定の微生物を投与することに対しては安全性評価が必要なだけでなく、国内では周辺住民のパブリックアクセプタンスを得にくい実状があり、本技術の本格導入には投与微生物の安全性評価や生態系への影響といった点に関して今後の更なる研究開発が必要になると考えられる。

一方、下水汚泥や生ゴミといった処理方法が課題となっている有機性廃棄物を有効利用するためのコンポスト化処理が盛んに行われており、それらは植栽土壌等として再利用されている。これらのコンポスト中には通常の土壌の10～100倍の微生物が存在し、その中にはPAHs等の分解能力を有すると考えられている放線菌も多く存在していることが報告されている⁴⁾。しかしながら、コンポスト中の微生物がPAHs等の難分解性油分の分解に寄与しているかについて詳しく調べた事例は少ない。

本研究では、PAHsの分解能力を高めた馴養コンポストの石油汚染土壌に対する浄化促進効果を把握するため、室内培養試験および屋外実証試験を実施した。また、バイオレメディエーション後の汚染土壌の安全性を評価するために浄化前後の土壌の植生試験を実施した。

2. PAHs馴養コンポストの作成

2.1 目的

PAHsを効率よく分解可能なコンポストを作成し、そのPAHs分解能力と微生物群集構造について解析した。

2.2 試験方法

PAHs分解能力を高めた馴養コンポストは、コミュニティプラントの余剰汚泥を主原料として作成した完熟堆肥20m³に対してPAHs試薬を投与し、定期的に攪拌作業を行うことで作成した（写真-1）。馴養に使用したPAHs試



写真-1 PAHs分解コンポストの馴養状況
Pre-cultivation of PAHs Degrading Bacteria in the Compost

薬はフェナントレン、フルオレン、アントラセン、フルオランテンを各100mg/kg、ピレン50mg/kgである。これらの試薬は初期と35日目の2度にわたって供給した。試薬投与後のコンポストは約100日間連続して重機による定期的な切り返しを行うことにより、呼吸熱による温度上昇を抑制しながら、土壤温度を25～35℃に保った。

土壤中のPAHsは定期的に測定し、コンポストの馴養過程を把握した。馴養前後における従属栄養細菌、フェナントレン分解細菌、ピレン分解細菌、および芳香族炭化水素分解菌の生菌数は平板培地法により測定した。また、優占微生物を把握するため、PCR-DGGE法を用いて微生物群集構造解析を行った⁶⁾。コンポストからゲノムDNAを抽出し、ユニバーサルプライマー⁶⁾を用いて16S rDNAにおける可変領域 (Variable region 3) を増幅した。PCR増幅断片は、変性剤として尿素を用いた濃度勾配ゲル (濃度勾配40-60%) を用いて電気泳動を行った。

2.3 試験結果

馴養期間におけるコンポスト中の各PAHs濃度の経時変化を図-1に示す。PAHsを投与後5日目でフルオレン、フェナントレンに関しては約50%、ピレンに関しては約35%、フルオランテンに関しては約25%分解されており、馴養が順調に進行していることが確認された。また、馴養35日目に再投与したPAHs試薬は、全て減少傾向が確認され、PAHsを分解する有効微生物群が形成されていると推測された。また、ピレンは投与した他のPAHsより分解速度が小さく、四環芳香族炭化水素は三環芳香族炭化水素と比較して分解しにくいことも確認された。

馴養前後における生菌数の変化を表-1に示す。従属栄養細菌数と比較して、フェナントレンおよびピレン分解細菌数は、増加率が高くなっていることが明らかとなった。したがって、本コンポストは50日間の馴養作業により、PAHs分解菌を多く含む有用微生物群が形成され、

PAHsの分解能力が向上したと考えられた。

PCR-DGGE解析の結果、馴養後におけるDNA断片の泳動パターンは大きく異なることが確認され、馴養操作によって優占種が大きく変動することが明らかとなった (図-2)。また、優占種と考えられるDNA断片の遺伝子配列を決定した結果、馴養後に優占したB-1株およびB-6株はPAHsを分解可能と考えられている放線菌と相同性が高い微生物であることが確認された (表-2)。

以上の結果より、コンポストに特定のPAHs試薬を混入して馴養を行うことにより、馴養後のコンポストは馴養前と比較して菌数だけでなく優占種も大きく変動することが明らかとなった。また、馴養後のコンポストにはPAHsの分解に有用な微生物が優占種菌として存在していることが確認され、PAHsに対する分解促進効果が期待できることが明らかとなった。

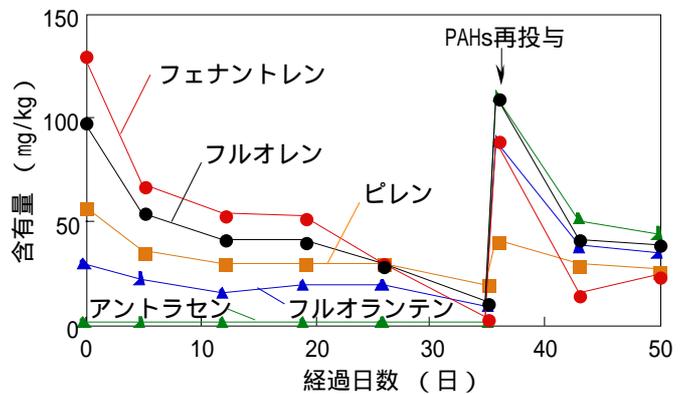


図-1 馴養期間における投与PAHs濃度の経時変化
PAHs Concentrations in the Compost During Pre-cultivation

表-1 馴養前後における生菌数の変化 (CFU/g)
Culturable Cell Density of PAHs Degrading Bacteria

	未馴養コンポスト	馴養コンポスト
従属栄養細菌	9.1×10^7	6.8×10^{10}
フェナントレン分解菌	2.2×10^5	3.4×10^{10}
ピレン分解菌	1.0×10^5	3.9×10^9
芳香族画分分解菌	4.2×10^4	3.0×10^6

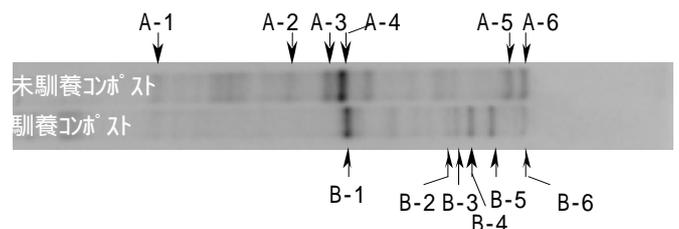


図-2 馴養前後におけるコンポストの菌相変化
Change of Microbial Communities in the Compost During Pre-cultivation

表-2 PCR-DGGE法で得られたDNA断片の遺伝子配列から決定した優占種の同定
Identification of Dominant DNA Fragments Profiled by PCR-DGGE Analysis

未馴養菌相			馴養菌相		
Band	BLAST search	Identity	Band	BLAST search	Identity
A-1	Uncultured compost bacterium (clone:4-11)	100%	B-1	<i>Ornithinimicrobium humiphilum</i>	99%
A-2	Uncultured bacterium (clone Hb3-C)	95%	B-2	Uncultured bacterium (clone Hb1-K22)	94%
A-3	Unidentified alpha proteobacterium (strain:JTB131)	94%	B-3	Uncultured bacterium (clone:NK196)	88%
A-4	<i>Streptomyces</i> sp. 11AG8	100%	B-4	Uncultured bacterium (clone:ARFS-2)	97%
A-5	Uncultured bacterium (clone:NK196)	90%	B-5	Uncultured bacterium (clone:NK196)	89%
A-6	Uncultured Chloroflexaceae bacterium (clone:HS2-1)	91%	B-6	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	90%

3. 室内試験による馴養コンポストのPAHs分解促進効果の検討

3.1 目的

馴養コンポストのPAHs分解促進効果を把握するため、重質油汚染土壤に馴養コンポストを投与した際の分解特性を室内試験により検討した。

3.2 試験方法

馴養コンポストを用いた浄化促進効果を詳細に把握するため、呼吸活性自動測定装置 (Micro-Oxymax ; Columbus Instruments、写真-2) を用いて分解活性評価試験を実施した。本装置では、培養容器中の酸素濃度および二酸化炭素濃度の増減を自動計測し、容器中の酸素濃度が一定濃度以下になると自動的に新鮮な空気に置換を行うため、常に最適条件で汚染土壤中の微生物活性を測定することが可能である。予めA重油1%およびフェナントレン100mg/kgを補給した重質油汚染土壤 (表-3) に栄養塩 (窒素500mg/kg、リン100mg/kg) を投与した土壤、および栄養塩と馴養コンポスト (重量比5%) を投与した土壤をそれぞれ30 で28日間培養し、酸素消費量、全菌数、油分濃度、フェナントレン濃度を測定した。



恒温槽内部の状況



装置全景

写真-2 呼吸活性自動測定装置

Automatic Analyzer of Microbial Respiration

3.3 試験結果

分解活性評価試験における試験土壤の呼吸活性 (酸素消費積算量) および全菌数の経時変化を図-3に、油分濃度およびフェナントレン濃度の経時変化を図-4に示す。馴養コンポストを投与した培養瓶中の呼吸活性および全菌数は、いずれも栄養塩のみを投与した培養瓶と比較して高くなっており、微生物活性が向上していることが確認された。また、浄化開始から5~10日の間の油分分解能力が馴養コンポストを投与することにより大きく向上した。さらに、油分分解性の向上が確認された培養初期に、コンポストを投与した土壤中のフェナントレンが速やかに分解されていることが確認された。したがって、馴養コンポストを投与することにより分解に時間を要するPAHsが速やかに分解され、油分濃度の浄化速度の向上に寄与するものと推測された。

4. 馴養コンポスト投与実証試験と安全性評価

4.1 目的

室内試験で効果が確認された馴養コンポストを用いて、重質油汚染土壤のフルスケールでの浄化促進効果を検討した。また、浄化後の埋め戻し土壤の性状と植生状況を調べ、浄化後土壤の安全性評価を行った。

表-3 分解活性評価試験に用いた汚染土壤の油分濃度
Concentration of Total Petroleum Hydrocarbons and Oil Fraction Rate of the Contaminated Soil Using Bottle Test

分析項目		単位	汚染土壤
油分 (IR法)	油分含有量	mg/kg	12,400
	飽和分	%	39.4
油成分	芳香族分	%	33.3
	レジソ・アスファルテン	%	27.3

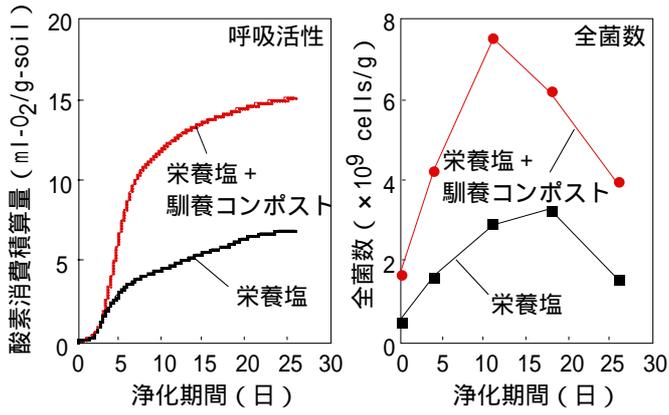


図-3 分解試験における土壌中の呼吸活性および全菌数
Respiration Activity and Total Cell Density in the Soil During Bottle Test

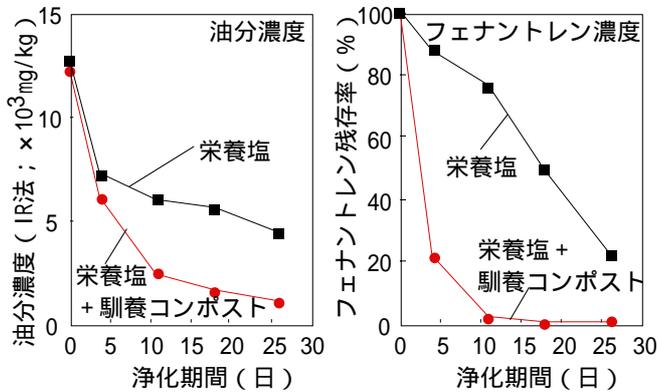


図-4 分解試験における土壌中の油分濃度およびフェナントレン濃度
Concentration of Total Petroleum Hydrocarbons and Phenanthrene in the Soil During Bottle Test

4.2 試験方法

約200m³の重質油汚染土壌を通気管上に盛土し、栄養塩（窒素；500mg/kg、リン；100mg/kg）を投与後、油分濃度が均一になるように十分攪拌した。次に盛土を5つの試験区に区分し、それぞれの試験区にコンポストの投与量を変えて投与し、再び十分攪拌した後、盛土を成形して空気供給による浄化運転を開始した（図-5）。盛土は、一週間に一度の割合で土壌の切り返しを行い、平成13年7月16日から130日間、浄化試験を実施した。

浄化後の埋戻し土壌は、修復土壌の環境への影響評価の一環として、油分濃度および油成分比率の測定を定期的に実施した。また、汚染土壌、汚染域周辺の非汚染土壌、コンポスト未投与の修復土壌、およびコンポストを10%投与した修復土壌の4種の土壌を用いてコマツナの種子を播種し、それぞれの植物の成長量を指標とした植生試験を実施した。

4.3 試験結果

実証試験の結果、馴養コンポストの投与量が多いほど、浄化開始初期の土壌中の呼吸活性が向上することが

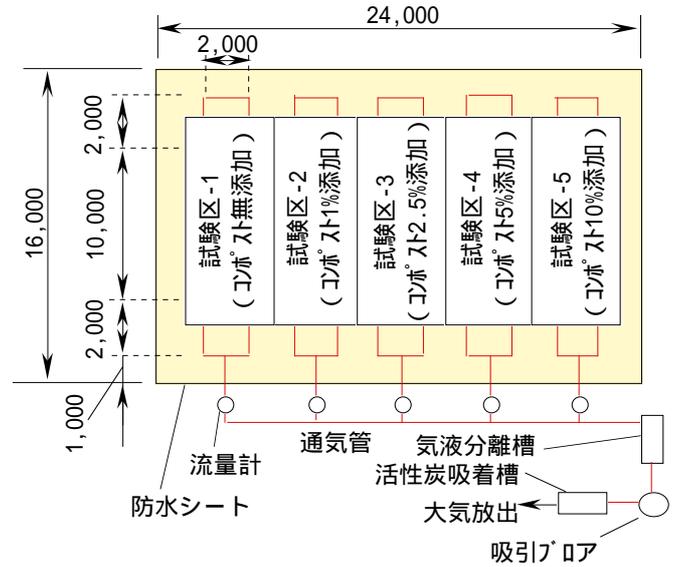


図-5 実証試験設備の概略図
A Schematic View of the Full-scale Test Plant

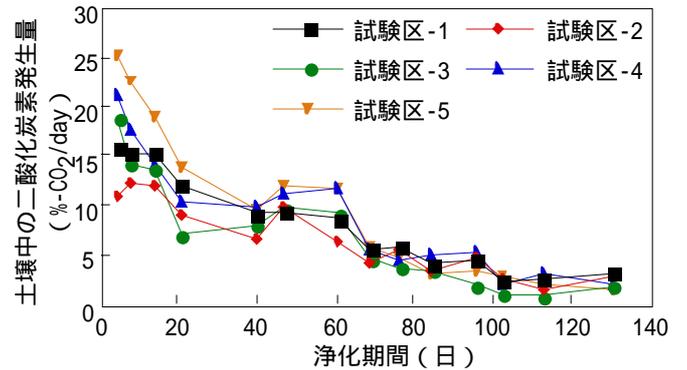


図-6 実証試験における土壌中の呼吸活性の推移
Respiration Activity in the Soil During Full-scale Test

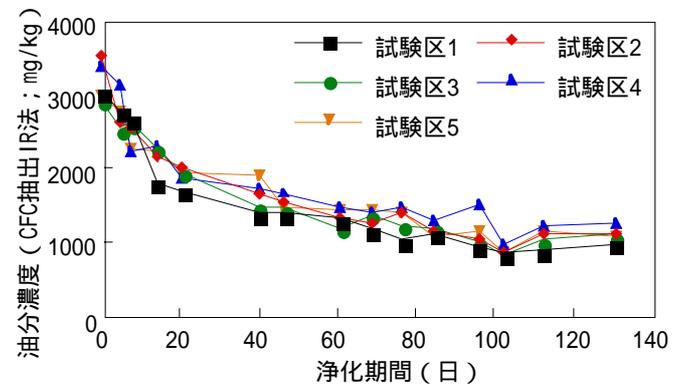


図-7 実証試験における土壌中の油分濃度の推移
Concentration of Total Petroleum Hydrocarbons in the Soil During Full-scale Test

示された(図-6)。一方、土壤中の油分濃度の減少傾向は、各試験区で有為差が確認されなかった(図-7)。この原因として、PAHs濃度が低いことから(フェナントレン2.4mg/kg、フルオレン1.0mg/kg、他1mg/kg未満)、馴養コンポストの添加により分解が促進されるような油分の含有量が小さいことが原因の一つであると考えられた。浄化後100日目で土壤中の油膜はいずれの試験区においても確認されなかった。また、コンポストを投与しない土壤には浄化100日後に若干の油臭が確認されたが、コンポストを5%以上投与した土壤では油臭が確認されず、コンポストが消臭効果を有していることも示された。

浄化終了後、埋め戻された修復土壤はコンポストの投与の有無に関わらず、埋め戻し直後と比較して油分が約10%減少し、その減少の大部分は芳香族分であった(図-8)。したがって、浄化により少量の分解されにくい芳香族分が残存しても、埋め戻し後に長期間かけて分解されることが明らかとなった。また、植生試験の結果、汚染土壤では非汚染土壤に比べて成長量が小さく、油分の存在により成長が阻害されることが示された(図-9、写真-3)。一方、修復土壤はコンポストの投与にかかわらず、両者とも約1,000mg/kgの油分が残存していたが、植物の生長量は原地盤(非汚染土壤)より増大し、修復土壤は植物の生育に悪影響を及ぼさないことが確認された。さらに、コンポストを投与した修復土壤は植物の成長量が大きかったことから、土壤中への栄養補給や土質性状の改良効果が促進された。

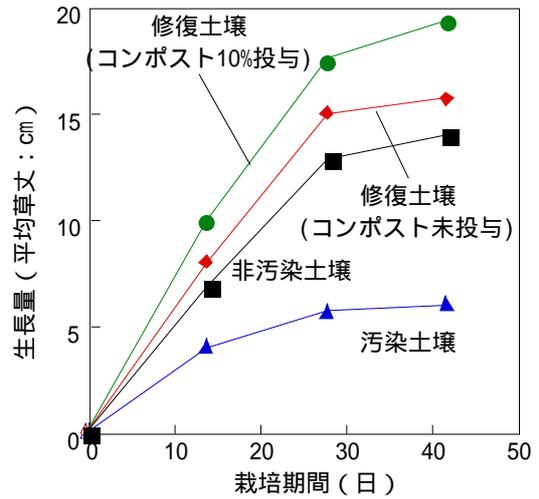


図-9 浄化前後の土壤におけるコマツナの生長量
Growth of Komatsu-na cultivated in the Soil Before and After Remediation

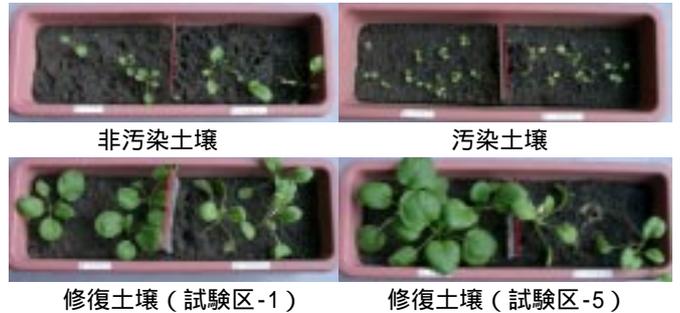


写真-3 42日目のコマツナ(左)およびワカゲ(右)の生育状況
Growth of Komatsu-na (Left side) and Radish (Right Side)

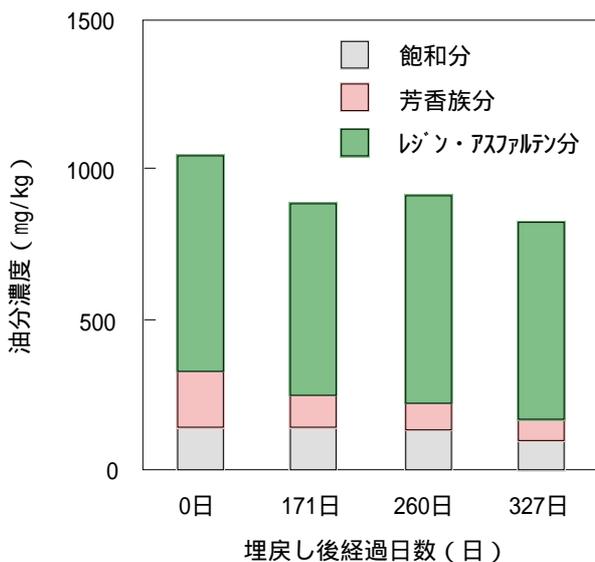


図-8 修復後の埋戻し土壤における油分の推移(試験区5)
Concentration of Petroleum Carbons in the Soil After Remediation (Test Area 5)

5. 汚染土壤別のコンポスト添加効果

5.1 目的

重質油汚染土壤を用いたフルスケールの浄化試験を行った結果、馴養コンポストを添加することによる油分濃度の低減促進効果が明確にみられなかった。そこで、幾つかの重質油汚染土壤を用いて馴養コンポストの添加効果を調べ、有用性を検証した。

5.2 試験方法

本試験では、前節で実証試験を実施した汚染土壤(サイトA)、重油汚染土壤(サイトB)、コールタールで汚染されPAHsを多く含む汚染土壤(サイトC)の3種類の土壤を使用した。サイトA、サイトB、およびサイトCの汚染履歴は、それぞれ50年以上、3年以内、30年以上と考えられている。サイトAおよびBにおける土壤にはフルオレン、フェナントレン、ピレンをそれぞれ約500mg/kg添加し、よく混合した。サイトCの土壤には当初からフルオレン、フェナントレン、ピレンがそれぞれ、123mg/

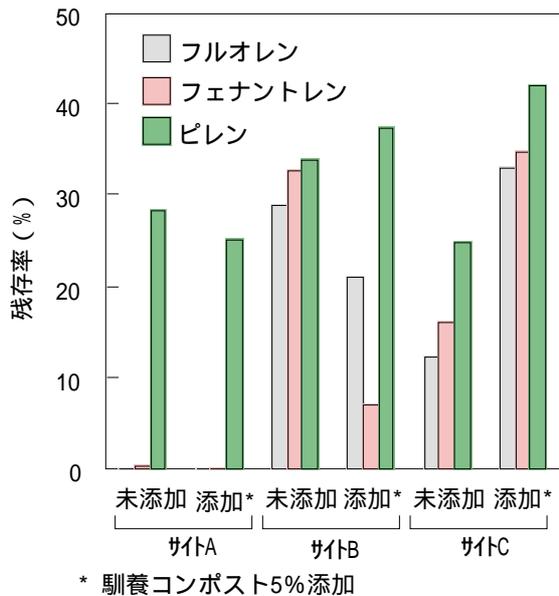


図-10 異なる汚染土壌に対するコンポストの添加効果
Effect of Mixing Compost into the Petroleum-contaminated Soil Collected from Different Sites

kg、527mg/kg、478mg/kg存在した。それぞれの土壌に窒素500mg/kg、リン100mg/kgを添加してよく混合後、300mlのネジ口付きバイアル瓶に100gずつ分注した。各汚染土壌に実証試験で用いた馴養コンポストを重量比で5%添加後、30 で2週間培養し、培養後のフルオレン、フェナントレン、ピレン濃度の残存率を求めた。比較対照として、コンポストを添加していない汚染土壌も同様の条件で試験を実施した。培養期間中は一日一回蓋を開けて、バイアル瓶中の土壌を攪拌した。

5.3 試験結果

培養前後におけるフルオレン、フェナントレン、ピレンの残存率を図-10に示す。この結果、サイトAにおける汚染土壌ではコンポストの添加の有無に関係なく、PAHsは高い分解率を示した。サイトBにおける汚染土壌は、コンポストを添加することによりフルオレン、フェナントレンの分解率が向上した。一方、サイトCにおける汚染土壌は、無添加時には高い分解率を示したが、コンポストを添加することにより分解率は大きく減少した。

サイトAおよびCにおける汚染土壌がコンポストを添加しなくても十分な分解能力を有していたのは、汚染履歴が長く、土壌環境中に汚染物質を分解可能な有用微生物群が既に構成されていたためと考えられた。一方、サイトBや分解活性評価試験でA重油を添加した模擬汚染土壌は、汚染状況の変化に対して有用な分解微生物群が形成

される時間が短く、栄養塩の添加だけでは速やかに浄化が促進されないと推測された。したがって、馴養コンポストのような有用細菌群を含む浄化促進材料の土壌への添加は、予め浄化を行う土壌中に存在する微生物群の分解特性を把握し、事前適合性試験等によりその効果を確認してから実施する必要があることが明らかとなった。

6. まとめ

石油汚染土壌中にコンポストを添加する浄化方法に関する室内および実証試験を行い、以下の知見を得た。

- 1) コンポスト中にはPAHsなどの難分解性油分を分解する微生物群が潜在的に存在し、それらを有効利用することにより重質油分の浄化促進効果が得られることが示された。しかしながら、コンポストの投与効果は汚染土壌により大きく異なるため、予め事前適合性試験で確認することが重要である。
- 2) コンポストの土壌への添加は、土壌温度の増加や保湿性の向上、消臭効果などの土質性状を改良させる効果も有していることが確認された。
- 3) 浄化後の修復土壌は植物の成長を阻害せず、バイオレメディエーションで浄化された土壌の生態系への安全性が確認された。

謝辞

本研究は経済産業省、新エネルギー・産業技術総合開発機構の実用化開発助成事業の一環として実施したものである。

参考文献

- 1) 帆秋利洋：バイオレメディエーションの事例 - 油汚染の修復，バイオレメディエーション実用化への手引き：藤田正憲，リアライズ社，pp.203-229，2000。
- 2) 各国油分評価基準データ，油の暫定処理目標と対策技術調査研究部会報告書，土壌環境センター，pp.133-137，1999。
- 3) Cerniglia, C. E. : Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, Curr. Opin. Biotechnol. vol.4, pp.331-338, 1993。
- 4) 羽賀清典：廃棄物の緑農地還元とコンポスト化，土の環境圏：岩田進午、喜田大三，フジ・テクノシステム，pp895-944，1997。
- 5) 鈴木朝香，高畑陽，大場美保，帆秋利洋：土壌中の石油系炭化水素と微生物の調査技術，日本工業出版「検査技術」，vol.5, pp.34-39，2000。
- 6) Muyzer, G. E., de Waal, C., and Uitterlinden, A. G. : Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, Appl. Environ. Microbiol., vol.59, pp.695-700, 1993。