

# 難透気性油汚染土壌の生物処理に関する実験

土路生修三\* 門倉伸行\* 竹田三恵\*

難透気性である粘性土を対象に生物処理を行う場合には、通水性や通気性が悪いために、空気や栄養分が土壌中に均一に浸透せず、微生物の活性化が進まずに効率的な処理が行えない。本研究では、油で汚染された粘性土を用い、通水・通気性を高める目的で別途洗浄処理した砂質土を混合し、室内での生物処理実験を実施した。実験の結果、粘性土のみの実験ケースではほとんど処理が進まなかったのに対し、砂質土を混合した場合には21週で65～75%程度の処理が確認された。また、生物分解に寄与する微生物の遺伝子解析を行った結果、本手法による解析が生物処理時の評価に活用できることがわかった。

キーワード：油汚染土壌、生物処理、通気性、遺伝子解析、電気泳動

## 1. はじめに

日本国内における潜在的な土壌・地下水汚染は、30万～44万サイトに達すると予測されている。工場移転や土地の転売・再開発に伴い、重油や石油製品等の油による土壌汚染問題も顕在化している。現在、油による土壌・地下水汚染に対する国内の法規制は、漏洩事故時の措置が規定されているのみで、油という項目は定められていない。土壌環境基準では、油中の一成分であるベンゼンが唯一取り上げられているが、油臭・油膜といった生活環境リスクの面からの対応が不可欠となりつつある。

石油製品等の油分に汚染された土壌の処理（修復）方法としては、土壌置換法や焼却処理、土壌洗浄処理、微生物による分解処理法（バイオレメディエーション）等、様々な処理法が実施されているが、最終処分地の確保やコスト面、処理の品質、土質による適用性の問題点等が指摘されている。

生物処理は、対象土壌中に存在する微生物を活性化させ浄化する方式（Bio-stimulation）と微生物製剤や分解に有利な微生物を利用する処理方式（Bio-augmentation）があり、欧米を中心に比較的安価な処理方法として実用化されており、国内でも実績が増加しつつある。しかし、生物処理は、安価な反面、①処理期間が長い、②敷地を広く使う、③高濃度含有土壌には向かない、④土壌や気候等環境条件の影響を受けやすく、特に通気性の悪い粘性土には不向き、との指摘がある<sup>1),2),3)</sup>。

筆者らは、生物処理には不向きとされる高濃度の油を含有している粘性土を対象として、通気性の改善を行うために洗浄砂質土壌を添加し、生物処理の適用可能性を把握することを目的に実験を行った。また、生物分解に寄与する

微生物の遺伝子解析を行い、生物処理時における菌相の評価を行った。実験により興味深い結果が得られたので以下に報告する。

## 2. 生物処理実験

油分を分解する微生物は、一般的に好気性微生物（酸素存在下で活性化する微生物）であるため、通気性の低い油含有粘性土に対し、砂質土壌（実験では洗浄処理土壌を用いた。）を添加し通気性の改善を行い、生物処理の実験を実施した。また、A重油（ボイラー等で一般に使用される重油）を基質として馴養した土壌を一部添加し、生物分解の促進実験を行った。さらに、生物処理実験のモニタリング方法として、遺伝子解析手法の一つであるPCR-DGGE法を用い、油分分解に関与する微生物群の菌相解析を行った。

### 2.1 実験供試土壌

実験に使用した土壌を以下に示す。

- ①粘性土：高濃度油含有粘性土
- ②洗浄砂質土壌：粘性土近傍の汚染砂質土を磨砕洗浄処理装置<sup>2),5)</sup>（SRS豊川実証プラント）で処理した土壌
- ③分解菌馴養土壌：A重油で馴養している畑土（技術研究所）

実験に用いた土壌は、潤滑油を主体とした油を高濃度に含有する粘性土と、その周辺の原地盤である砂質土壌の洗浄処理を施した土壌を対象とした。砂質土壌の洗浄処理は、磨砕洗浄処理装置を用いて行った。磨砕処理による土壌洗浄法は、油汚染土壌に水を適量加え揉み擦り洗いをすることで、砂粒子の表面に付着している油分を物理的に剥離させた後、スクリーンや分級機等で洗浄・回収する方法である<sup>2),5)</sup>。

また、分解菌馴養土壌は、A重油を畑土に添加し、技術

\* 技術研究所 環境修復研究グループ

研究所で作成した模擬汚染土壌で、馴養により油分の分解が確認されている土壌である。馴養は、Fig.1 に示すように初期のA重油添加後、5～6ヶ月おきに2回油分を添加して行った。実験には、3回目のA重油添加後の土壌を使用した。

### 2.1.1 供試土壌の油分性状

Table 1 に実験に使用した各土壌の油分含有量を示し、Table 2 に油分組成を示す。

粘性土及び砂質土壌から抽出した油分のガスクロ蒸留によるクロマトグラムを Fig. 2 に示す。クロマトグラムの形状として、針状の鋭いピークが少ないことから、風化等により変性を受けているものと考えられた。平均沸点は、双方とも約 400℃であった。

供試土壌に生息する油分解菌を MPN 法（最確計数法）により計測したところ、粘性土は、 $1.4 \times 10^6$  個/g を示し、洗浄処理砂質土壌及び分解菌馴養土壌はそれぞれ、 $2.2 \times 10^5$  個/g 及び  $3.7 \times 10^6$  個/g を確認した。

### 2.1.2 供試土壌の土壌性状

供試土壌の土壌性状として、粘性土は  $5 \mu\text{m}$  以下の粘土粒子を約 20% 含み、シルト分以下が約 56% の微細粒子を多く含む土壌 ( $D_{50}=0.048\text{mm}$ ) である。砂質土壌及びその洗浄土壌の平均粒径はそれぞれ、 $0.237\text{mm}$ 、 $0.247\text{mm}$  であり、洗浄土壌は 97% 以上が砂分である。Fig. 3 にこれらの粒径加積曲線を示し、Table 3 に粒度組成を示す。図中の点線は、粘性土と洗浄砂質土壌を重量比で 2 : 1 に混合した場合の推定曲線である。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 実験条件

生物処理実験は、Table 4 に示す条件で行った。混合土壌は、粘性土 2.5kg を採取し、Table 4 の混合割合となるように洗浄砂質土壌や分解菌馴養土壌を添加することにより作成した。なお、栄養塩類としては、窒素源として硝酸アンモニウムを  $1,200\text{mg-N/kg}$  となるように添加し、リン源としてリン酸カリウムとリン酸 2 カリウムで  $240\text{mg-P/kg}$  となるように添加した。

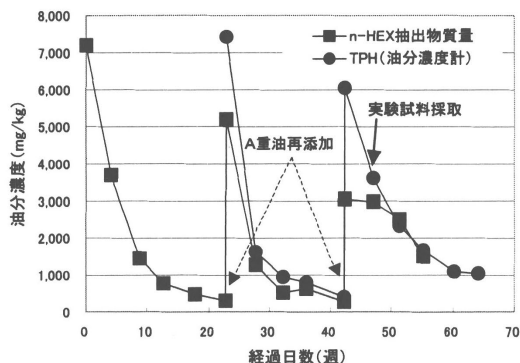


Fig. 1 分解菌馴養土壌の馴養状況

Table 1 供試土壌の油分濃度

油分濃度 (mg/kg)	粘性土	砂質土壌	洗浄処理砂質土壌	分解菌馴養土壌
油分濃度計	97,000	28,200	130	3,600
GC-FID法	130,100	13,370	30	—
C6~C10	1,900	260	10	
C10~C28	64,100	8,720	10	
C28~C44	64,100	4,390	10	
n-ヘキサン抽出物質量	77,000	17,000	400	3,000

Table 2 供試土壌の油分組成

組成割合 (%)	粘性土	砂質土壌	洗浄処理砂質土壌	分解菌馴養土壌
飽和分	64.5	63.1	59.0	37.4
芳香族分	25.1	26.9	14.8	45.7
レジン分	9.0	9.0	20.4	12.9
アスファルテン分	1.4	1.0	5.8	4.0

\*組成分析は、TLC-FIDにより測定

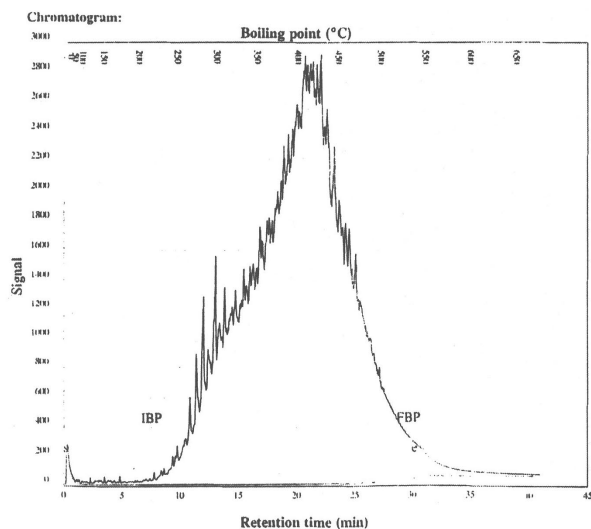


Fig. 2(1) 粘性土抽出油のガスクロ蒸留結果

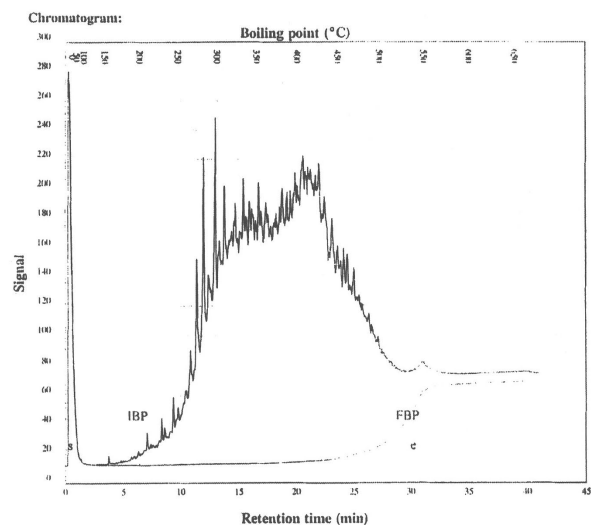


Fig. 2(2) 砂質土壌抽出油のガスクロ蒸留結果

試料は、実験開始から2ヶ月間は概ね毎週サンプリングし分析を行った。それ以降は、2~3週間に1回の割合で試料を採取し分析を行った。モニタリングの主な分析項目は、油分濃度と油分組成および、分解菌の菌相変化をPCR-DGGE法で行った。また、攪拌と散水は基本的には1回/週の頻度で行った。攪拌は、試料採取前に行い試料を均一化し、散水は試料採取後に行った。

## 2.2.2 分析方法

供試土壌及び生物処理実験土壌の油分分析や生物試験は、下記に示す方法で行った。

### (1)油分濃度

土壌中の油分濃度は、試料の数gを試験管に採り、溶媒S-316(クロトリフルオロエチレンの二量体)で抽出後、油分濃度計(HORIBA社OCMA-350)で測定した。なお、油分濃度としては、含水率の測定結果とあわせて、単位乾燥土壌重量あたりの油分重量(mg/kg-乾燥土壌:本報告書内では、mg/kgとして表示)として算出した。

### (2)n-ヘキサン抽出物質量

試料土壌の適量を秤量しn-ヘキサンにより油分を抽出し、重量法により測定した。なお、油分の抽出にあたっては、ソックスレー抽出器を用いて4~5時間抽出を行った。

### (3)GC-FID法

試料土壌10gを秤量し二硫化炭素により油分を抽出し、GC-FID法(ガスクロマトグラフ-水素炎イオン化検出法)により分析を行った。同一分析条件でC6~C44までのn-パラフィン測定し、リテンションタイムを求めた後、それぞれの区分毎のピーク面積から定量を行った。

### (4)油分組成

油分の組成は、試料の数gを試験管に採り、二硫化炭素を溶媒として抽出後、TLC-FID法(薄層クロマトグラフ-水素炎イオン化検出法:ヤマト社イトロキヤンMK-5)により測定した。TLCの展開溶媒としては、n-ヘキサン、トルエン、ジクロロメタン:エタノール(95:5)を用いて順次展開した。なお、順に分画される成分をそれぞれ、飽和分、芳香族分、レジン分とし残渣分をアスファルテン分とした。

### (5)ガスクロ蒸留

「ガスクロ蒸留試験」(ASTM D2887)を準拠した。

### (6)MPN法(最確計数法)

対象土壌5gを滅菌水45mlに懸濁させた後、その懸濁水を順に10倍希釈を行った。それらを滅菌培地9mlが入った試験管に1mlずつ入れ(各濃度5本)、採取油を基質として振とう培養を行った。各希釈濃度における微生物増殖本数から分解菌濃度を求めた。

### (7)PCR-DGGE(Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresisの意)<sup>4)</sup>

各実験区土壌中の菌相の変化を比較するために、PCR-DGGEに供した。本法では、土壌サンプルなどから直接微生物のDNAを抽出し、PCR反応(微量なDNAを短時間で大量に増やす技術)により増幅した後、濃度勾配

をつけたゲル上で電気泳動することにより細菌の種または属毎にDNAを分離させる。これにより、サンプル毎の微生物相を比較したり、さらなる解析により属~種レベルでの同定も可能となる。

試験は、対象土壌を数百mg採取し、ビーズ入りのチューブの中で攪拌することにより、サンプル中に含まれる全DNAを抽出し、次に、この中から細菌の同定に用いられる16S rDNAの部分PCRにより増幅した。得られたPCR産物中には、様々な細菌のDNAが混在しているが、これを濃度勾配のついたゲル上で電気泳動(DGGE)を行い、細菌の種または属毎にDNAを分離した。電気泳動の結果をバンドパターンとして表し、サンプル毎の微生物相の比較を行った。さらに、この泳動パターンを画像解析システムに取り込み、バンドの輝度からLane間のユークリッド距離(類似性を表す指標)を算出し、樹形図を作成した。

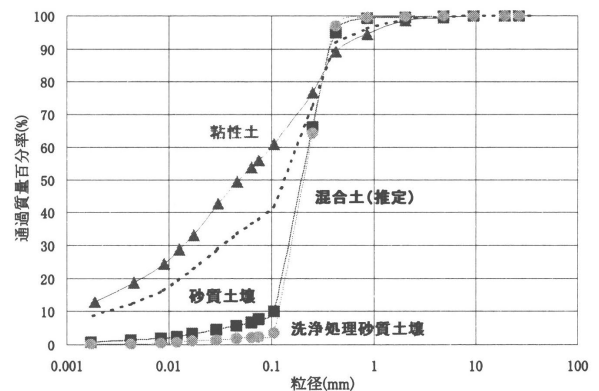


Fig.3 供試土壌の粒径加積曲線

Table 3 供試土壌の粒度組成

	粘性土	砂質土壌	砂質土洗浄処理土壌
粗礫分 %	0.0	0.0	0.0
中礫分 %	0.5	0.0	0.0
細礫分 %	1.0	0.5	0.2
粗砂分 %	4.1	0.2	0.2
中砂分 %	17.6	33.0	35.3
細砂分 %	21.0	58.7	62.0
シルト分 %	36.6	6.2	2.1
粘土分 %	19.2	1.4	0.2

Table 4 実験条件一覧

		Case1	Case2	Case3	Case4
粘性土	混合	1	1	1	1
	洗浄処理砂質土壌	0.5	0.45	—	—
	分解菌馴養土壌	—	0.05	—	0.05
栄養塩類		○	←	←	←
温度		30°C	←	←	←
攪拌		1回/1週	←	←	←
散水		1回/1週(適量)	←	←	←

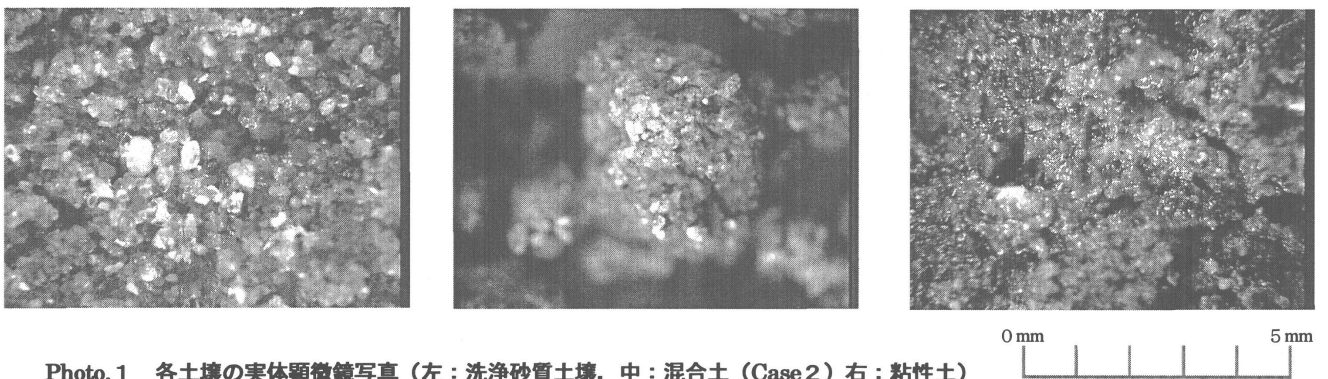


Photo. 1 各土壌の実体顕微鏡写真 (左: 洗浄砂質土壌, 中: 混合土 (Case2) 右: 粘性土)

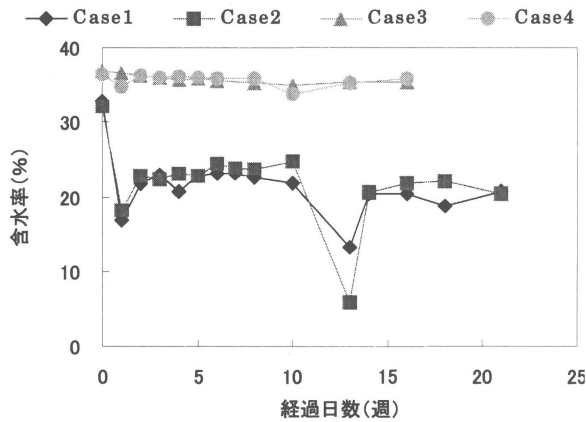


Fig. 4 含水率の経時変化

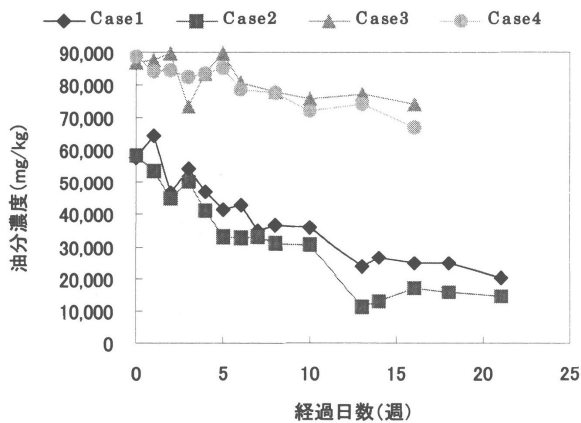


Fig. 5 油分濃度の経時変化

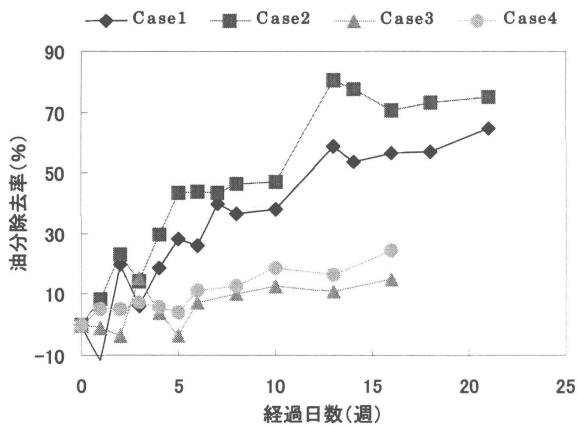


Fig. 6 油分濃度除去率の経時変化

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 砂質土壌添加による土質の変化

粘性土及び洗浄砂質土壌, 混合土 (Case2) の顕微鏡写真を Photo. 1 に示す。

混合土は, 粘性土に洗浄砂質土壌を加えたものであるが, 写真に示すように団粒化した。この結果, 粘性土よりも通気性が確保できたものと推察された。通気性が上がると保水性が低下すること等指摘があるが, 適度な散水を行っていることや団粒の内部に水分がある程度保持されていることから, 本実験においては, 混合土の含水率は, ほぼ 20% 以上を示していた。Fig. 4 に実験期間中における試料の含水率の推移を示す。

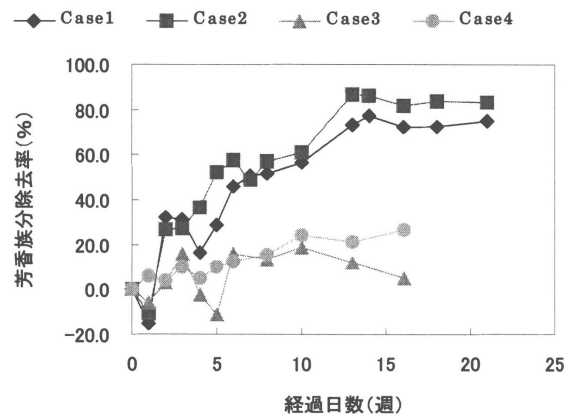
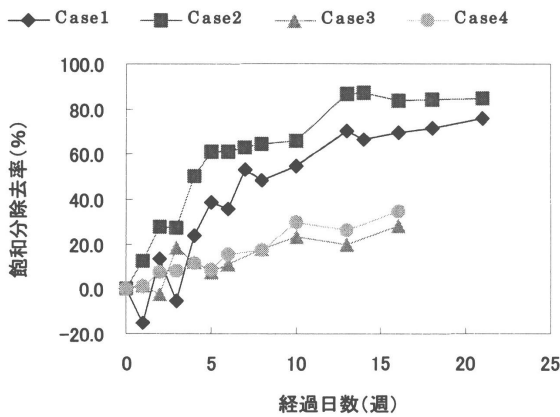
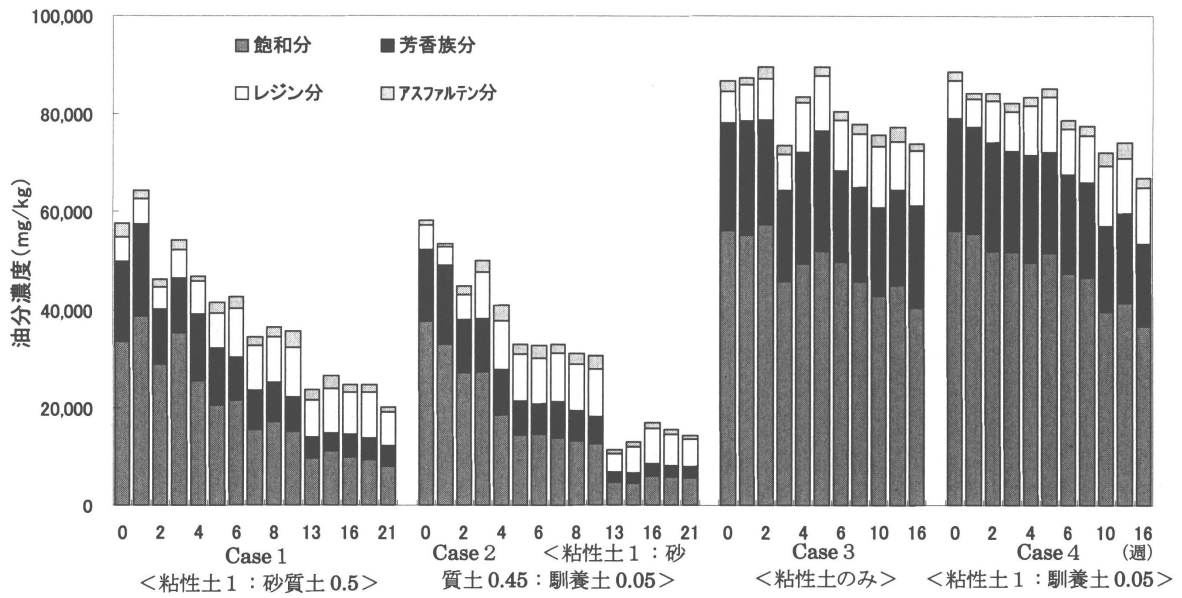
#### 3.2 生物処理における油分の変化

各実験 Case における油分濃度の変化を Fig. 5 に示す。Case1,2 と Case3,4 は初期濃度が大きく違うことから, 油分濃度の除去率で整理したものを Fig. 6 に示す。ここで示す油分濃度は, S-316 で抽出後に油分濃度計で測定した結果である。また, Fig. 7 に油分組成の変化を示す。

Fig. 5 に示すように, Case1 と Case2 の初期の油分濃度は, 洗浄土壌を重量比で 5 割添加したことで粘性土のみ (Case3) の約 2/3 の濃度となった。これは, 初期濃度を低減させることにより, 微生物への負荷が低下し, 初期段階の活性が上がった結果と思われる。

Fig. 6 に示すように, 10 週目における油分除去率としては, 洗浄土壌を混合した条件 (Case1,2) の方が, 通気性の改善により粘性土 (Case3,4) と比べ 2~3 倍除去率が向上した。

Case 1,2 については, 7~10 週目において油分濃度の低下が停滞していた。原因として, 団粒が大きくなり内部への通気が不十分になってきたと考えられたため, 10~13 週目において恒温槽内 (30℃) で乾燥させた後, 団粒を粉碎・散水し実験を継続した。Case2 の含水率は, 3 週間の乾燥操作により 24% から 6% に低下した。乾燥操作後の 13 週目以降の結果を見ると, 除去率は乾燥前の 35%~45% から 55%~80% にまで向上した。これは, 乾燥操作により



団粒が粉砕され、内部にまで通気が確保された結果と考えられる。

馴養土壌はA重油を基質として馴養しているため、分解菌馴養土壌の添加による効果は、対象土壌中の油種に対して不確実であった。しかし、Case 2とCase 4の5%馴養土の混合区は、Case 1とCase 3と比べ2~3割除去率が高くなっていた。A重油の組成分析結果によると、添加直後の馴養土壌中の飽和分と芳香族分に分類される割合が、それぞれ44.2%及び45.5%（計：約90%）と、対象土壌中の油分組成と近い割合にあり比較的適合しやすかったと推察された。

Fig. 7に油分組成の変化を示す。また、飽和分と芳香族成分についての除去率をFig. 8およびFig. 9にそれぞれ示す。飽和分に分類される成分に着目すると、10週後において、洗浄土壌を混合したCase 1とCase 2の除去量が55~66%に対し、Case 3とCase 4では24~30%を示し

た。同様に芳香族分に分類される成分では、57~61%に対し19~24%を示した。また、土壌乾燥後の16週目の成分に着目すると、飽和分に分類される成分は、同様にCase 1とCase 2の除去量が70~84%に対し、Case 3とCase 4では28~35%を示した。

以上の結果から、洗浄砂質土壌を粘性土に添加することによって、通気性の改善を図れたこと及び、初期濃度の低下による負荷低減等により、微生物の活性が向上し、油分濃度が低減したと考えられた。また、馴養土壌の添加により、油分除去率向上につながったことから、本馴養土壌中の菌は、対象の油種に適合していると推察された。

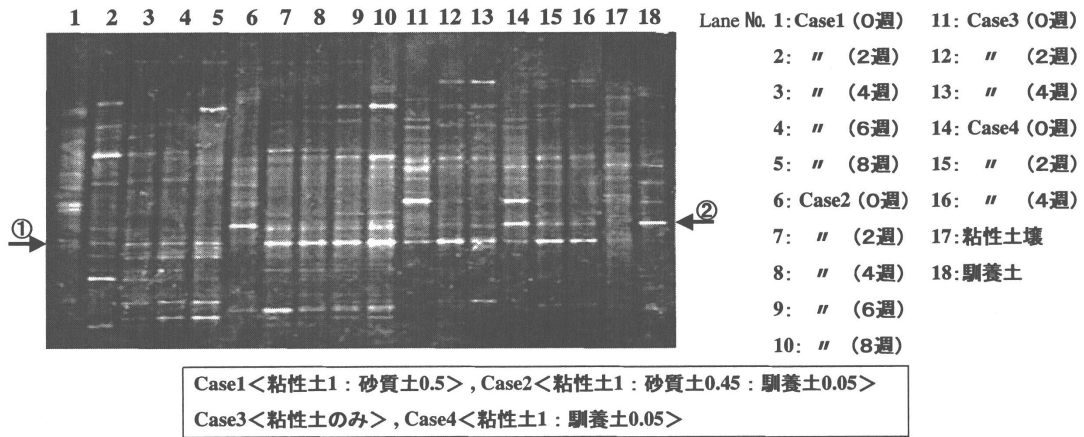


Fig.10 DGGEの泳動パターン

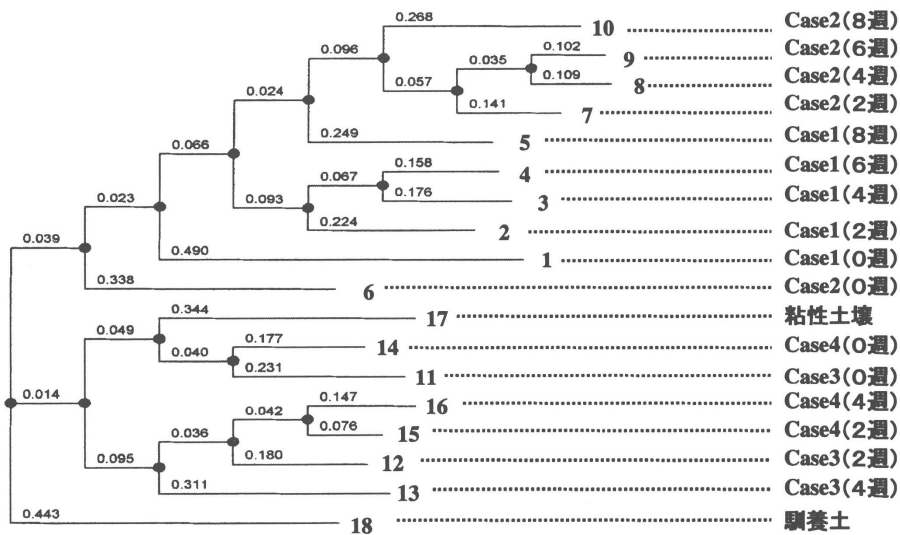


Fig.11 DGGE泳動パターンの類似性に基づく樹形図(デンドログラム)

### 3.3 PCR-DGGE法による分解菌の菌相の変化

Fig.10に各実験区のDGGE泳動パターンを示す。解析に用いた試料は、Case1,2は0~8週目、Case3,4は0~4週目の試料とした。また、比較として、粘性土及び馴養土壌も解析に用いた。

馴養土壌(Lane18)を除くすべてのLaneに共通して見られるバンド(矢印:①)は、培養開始後約2週間で優占種となっており、その後も安定して出現していることから、油分解に主要な役割を果たしている菌と推察された。また、馴養土壌を添加したCase2(Lane6-10)とCase4(Lane14-16)において特徴的に見られるバンド(矢印:②)は、馴養土壌(Lane18)においても確認されたことから、投入した馴養土壌に由来した菌であると思われる。一方、Fig.5に示した油分濃度の経時変化をみると、6~8週目においてCase1,2ともに油分濃度の大きな変化が見られなかった。すなわち分解が最も活発なのは、6週目くらいまでと推察される。そこで油分の濃度変化と菌相変化を合わせてみると、分解が活発な時期(0~6週)では

出現する菌の種類がある程度限られた中で、菌相のバランスを保持しており、分解が停滞気味(6~8週)になると多様なバンドが現れている(菌の種類が増加)。これらのことから、分解を効率良く進めるためには、適度な菌相のバランスを保持しつつ、分解菌の優占化を促進させることが重要であると考えられる。

Fig.11にDGGEで得られた泳動パターンの樹形図(デンドログラム)を示す。樹形図中の数値は、ユークリッド距離(類似性を表す指標)を示し、バンドの輝度及び位置から算出したものである。例えば、あるLaneから別のLaneまでの間の枝の長さが短い(距離が小さい)ほど、それらのLane同士の類似性が高いことを表している。

すべてのケースにおいて、処理開始後0週目と2週目のLane間の距離を算出したところ、0.5~0.9という大きな値をとることが示された。このことは、これらのLane同士は、類似性が低い(サンプル間の菌相変化が著しい)ことを表している。一方、処理開始後2週間目以降は、菌相の変化がほぼ0.5以下におさまっており、菌相の変化が小

さくなっている。以上のことから、処理開始直後から菌相は大きく変化し、2週間以内に油分解菌相に移行している。また、それ以降の菌相は、大きな変化はなくほぼ安定すると推察される。

## 4. まとめ

粘性土と洗浄砂質土壌の混合による、微生物処理実験の結果、以下のことが確認された。

- ①洗浄砂質土壌を高濃度油含有粘性土に添加することにより、初期濃度が低減し、微生物への負荷を低下させることができた。このことから、初期段階における活性向上の一助になったと考えられた。
- ②洗浄砂質土壌の粘性土への添加によって、粘性土と比べて通気性が向上したとともに、微生物の活性も向上し、油分の分解が促進された。
- ③A 重油による馴養土壌を添加（粘性土に対して5%添加）した結果、馴養土壌を添加していない実験区と比較して、2～3割の除去率向上（10週目）が図れた。また、馴養土壌の添加実験区は、DGGEによる泳動パターンにおいて、馴養土壌固有のバンドが検出されたことから、油分分解に関与していることが示唆された。
- ④DGGE 泳動パターンの結果から、生物処理開始時と2週目では、菌相が大きく変化することが示された。また、この期間は、油分濃度の低下が比較的大きい時期でもあった。これらのことは、初期段階から油分分解に関与する菌の活性が大きくなっていることを示唆するものである。

## 5. 今後の課題

本実験では、難透気性の粘性土の生物分解を促進させるため洗浄した砂質土を混合した結果、通気性や通水性を改善することにより除去率の向上が図られた。ただ、油分濃度としては、21週経過後において15,000～20,000mg/kgの残存が見られる。今後、処理実験を継続することで、さらなる油分の分解や油臭の除去が期待される。

しかし、一方ではアスファルテン分やレジジン分に分画さ

れる難分解性の成分については、処理期間を延長してもこれ以上の分解は期待できないことも予想される。また、油分評価手法（分析方法）についても、最適な方法は確立されていないのが現状であり、今後の動向とあわせて引き続き検討が必要である。

なお、本生物処理法は、堆肥などの資材を使うことなく比較的安価な修復方法であり、実汚染現場への適用可能性は充分にあると考えている。ただ、適用にあたっては、敷地や処理期間の確保の他、栄養剤の量、攪拌方法、温度条件等、詳細な条件設定の検討が重要である。

## 謝辞

遺伝子学的解析手法について、元筑波大学中原教授殿、野村講師殿、研究室の学生の方々に多大なるご指導およびご協力をいただきました。ここに厚く御礼を申し上げます。

## 参考文献

- 1) 堀田, 富田, 小塚, 大塚, 宮地, 野邑, 木村, 高木: 石油汚染土壌の処理システムの研究開発, (財)石油産業活性化センター第14回技術開発研究成果発表会講演要旨集, vol.1, pp.431~440, 2000
- 2) 土路生修三, 門倉伸行, 竹田三恵, 伊藤洋: 高濃度重油汚染土壌の生物処理実験, 熊谷組技術研究報告, No.60, pp.33~38, 2001
- 3) 土路生修三, 門倉伸行, 竹田三恵, 伊藤洋: 油汚染土壌の洗浄処理と生物処理実験例, アーバンインフラ・テクノロジー推進会議, 第13回技術研究発表論文集, pp.5~8, 2002
- 4) G Muyzer, EC de Waal and AG Uitterlinden: 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, No.3, pp.695-700, 1993.3
- 5) 伊藤洋, 川口謙治, 柴田浩彦, 渡辺輝文, 門倉伸行, 土路生修三: 重油汚染土の磨砕による固液分離と分級・生物処理について, 土壤環境センター技術ニュース, No.2, pp.40~45, 2001.4
- 6) 土路生修三, 門倉伸行, 竹田三恵: 高濃度油含有粘性土の生物処理の実験検討, 地下水・土壤汚染とその防止対策に関する研究集会, 第8回講演集, pp.335~336, 2002.6
- 7) 竹田三恵, 門倉伸行, 土路生修三, 中原忠篤, 野村暢彦, 中島(神戸)敏明: 油汚染土壌のバイオレメディエーションにおける微生物群集の構造解析, 地下水・土壤汚染とその防止対策に関する研究集会, 第8回講演集, pp.413~416, 2002.6

---

## **Bioremediation Test on High-Concentration Petroleum-Hydrocarbon Contaminated Poor Air Permeability Silty Cray Soil**

Shuzo TOROBU, Nobuyuki KADOKURA, and Mie TAKEDA

### **Abstract**

It is impossible to perform efficient bioremediation of clay featuring poor air permeability; poor air permeability and poor water permeability prevent the uniform distribution of air and nutrients in the soil, restricting the activation of microorganisms. This study consisted of a laboratory test of bioremediation using material made by mixing previously washed sandy soil with clay contaminated with petroleum-hydrocarbon; this mix was designed to improve the permeability of the clay to water and air. The results of the test confirmed that while there were almost no bioremediation effects in a test case involving pure clay, in the case of clay containing sand, a bioremediation effect of between 65% and 75% occurred in 21 weeks. The results of gene analysis of the microorganisms that contributed to biological decomposition revealed that such analysis can be used to determine bioremediation.

**Keywords:** Petroleum-hydrocarbon contaminated soil, bioremediation, air permeability, gene analysis, electrophoresis

---