

石油分解菌の活性化による バイオレメディエーションの促進技術の開発

佐々木静郎 * 門倉伸行 ** 村上順也 * 河村大樹 * 久保幹 ***

油汚染土壌の浄化技術として、低環境負荷かつ低コストという特徴があるバイオレメディエーション技術の適用事例が増えているが、浄化が期待されたほど進まない場合がある。その要因として土壌環境 (TC, TN, C/N 比) が密接に関与していることが推定された。そこで、これらの条件を適切に調整し、浄化実験を行った結果、石油分解菌が活性化され、浄化が促進されることが判明した。本稿では、その実験の概要について報告する。

キーワード：油汚染土壌、石油分解菌、バイオレメディエーション、TC, TN, C/N 比

1. はじめに

近年、ガソリンや灯油、重油などの燃料油をはじめ、機械油・潤滑油などの鉱物油の漏洩による土壌汚染がますます健在化している。これを背景として、平成 18 年 3 月に策定された油汚染対策ガイドラインでは、油汚染に関する包括的な規制が定められ、土地所有者などには生活環境保全の面から油膜や油臭に対して厳しい措置を行うことが求められている。さらに、平成 22 年 4 月に施行された改正土壌汚染対策法では、掘削除去・敷地外搬出に偏重した対策の見直しが大きな柱となっており、on-site 浄化技術へのニーズがますます高くなっている。

油汚染の対策としては、汚染土壌を掘削した後、非汚染土壌と置換する方法や石灰と混合する方法、微生物を利用したバイオレメディエーション¹⁾などがよく用いられている。油汚染はトリクロロエチレンなどの揮発性有機化合物に比べ、微生物による分解性が高く処理に適していると言われていたが、そのバイオレメディエーションに対しても、処理に要する時間が長い、高濃度汚染には適用が難しい、などの問題点が指摘されている。また、バイオレメディエーションでは、浄化を担う微生物が汚染環境で増殖し、分解活性を維持させるために硫酸などの無機資材を栄養源として投与しているが、土壌によっては分解がほとんど進まない場合がある。

この原因について検討した結果、土壌環境 (土壌中の総炭素量 (TC)、総窒素量 (TN)、C/N 比) が密接に関与していることが推定された。そこで、これらの要素を適切に調整し、室内規模の浄化実験を行ったところ、石油分解菌が活性化されることが判明し、高効率バイオレメ

ディエーション技術の実用化への道筋が得られたので、その概要について紹介する。

2. 土壌環境の把握

土壌中の微生物活性が高いと考えられる農地土壌を対象に、TC と TN を測定した結果²⁾を Fig. 1 に示す (n=334)。農地土壌の 80% 以上が C/N 比 8~20 の範囲に入っており、特に TC : 30,000 mg/kg 以上、TN : 3,000 mg/kg 以上の土壌は生産量が豊かであった。生産量を豊かにするためには土壌中の物質循環活性を高くする必要があり、そのためには一定量以上の土壌微生物数を維持する必要がある。すなわち、これと同様にバイオレメディエーション中の土壌でも、有機資材を用いて TC, TN を調整することにより所定量の石油分解菌数を維持させるとともに、浄化への促進に効果を発揮することが期待された。

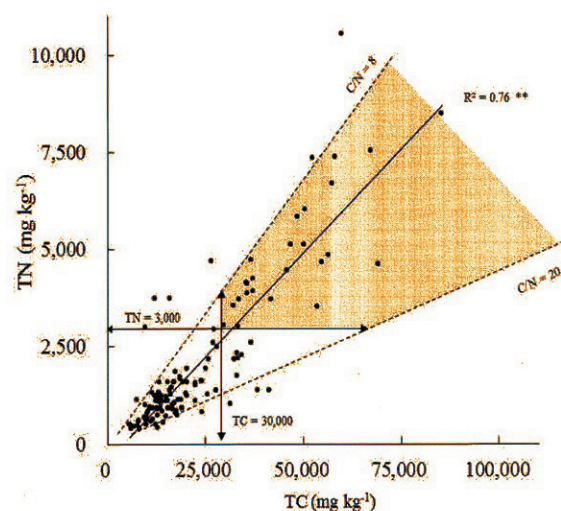


Fig. 1 生産量が豊かな農地土壌における TC と TN の関係

* 技術研究所 地球環境研究グループ
** 技術研究所
*** 立命館大学 生命科学部生物工学科

3. 実験材料および方法

3. 1 供試菌株

使用菌株は、*Rhodococcus erythropolis*. NDKK6 であり、長鎖シクロアルカンを炭素源として生育し、土壤中、河川・湖沼、家畜糞などの自然界に普遍的に存在している微生物である。菌の大きさは 1-3 μm 程度の好気性グラム陽性菌であり、桿状・球状の両形態をとる (Photo. 1)³⁾。また、この菌株は、経済産業省と環境省が策定した「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に基づく大臣確認を取得 (平成 23 年 5 月 6 日) しており¹⁾、当該菌株が環境や人体に与える影響などの安全性に対しては十分な評価が得られている。

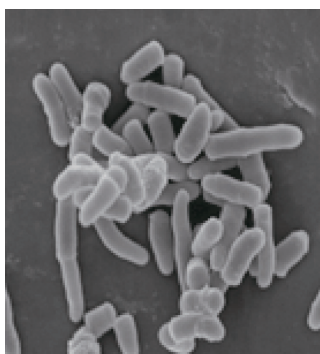


Photo. 1 使用菌株の SEM 写真

3. 2 模擬汚染土壌の調整

本実験では、農地土壌に真砂土と有機資材 (水草粉末) を加え、Fig. 1 に示した C/N 比の範囲においてほぼ中間に該当する C/N 比=15 でそれぞれ TC, TN が異なる実験土壌 A, B を作製した (Table1)。これにベースオイル (スーパーオイル T10, JX 日鉱日石製) を 5,000 mg/kg となるように添加し、模擬汚染土壌とした。

Table 1 実験土壌の TC, TN

土壌	TC (mg/kg)	TN (mg/kg)	C/N比
A	15,000	1,000	15
B	20,000	1,300	15

3. 3 試験方法と分析方法

上述の方法で作製した模擬汚染土壌中に、土壌細菌数が 5×10^6 cells/g-soil 以上となるように *Rhodococcus erythropolis*. NDKK6 を投与した後、各土壌 200g をマヨネーズ瓶に分取し、25°C に保たれた室内に静置した。実験期間中は、土壌の含水率を一定に保つために蒸留水を補填した。開始後は、1 週間ごとに土壌をサンプリングした。

分析はサンプリングした土壌の総炭素量 (TC)、総窒

素量 (TN)、総細菌数、石油分解菌数、NDKK6 株数、及び油分濃度について行った。総炭素量 (TC) は、全有機炭素計と固体試料燃焼装置を用いて測定した。総窒素量 (TN) は、ケルダール法により測定した。総細菌数は、環境 DNA 解析法 (eDNA 解析法)⁴⁾ により、土壌中の油分については、クロロホルム-メタノール法による油分抽出を行った後、GC-FID 分析によりそれぞれ定量した。また、土壌中の石油分解菌数については、前述の環境 DNA 解析法で得られた DNA 抽出サンプルをテンプレートとし、*alkB* 遺伝子の特異的に増幅するプライマーを、NDKK6 株数については、*alkB R2* 遺伝子を標的にしたプライマーをそれぞれ作製し、Real-time PCR 法により定量した。

alkB 遺伝子とは、多くの石油分解菌が保有している遺伝子であり、アルカンヒドロキシラーゼという酵素をコードしており、炭化水素を脂肪酸に分解する機能を有している。さらに、NDKK6 株数は、*alkB R2* 遺伝子を有している。

4. 実験結果と考察

4. 1 油分分解評価

実験開始 0 週間目と 4 週間目における土壌油分抽出液のガスクロマトグラフを Fig. 2, Fig. 3 に示す。4 週間後の土壌 A と土壌 B を比較すると、土壌 A のベースオイルのピーク面積は 0 週目と比較して約 5% しか減少していないのに対して、土壌 B では約 25% の減少が認められた。

また、Fig. 4 に、ベースオイル残存率の経時変化を示す。土壌 A ではベースオイルの分解率は約 20% に留まっていたが、土壌 B では 4 週間後にはベースオイルが約 30% 程度分解されていた。

これらのことから、土壌 B の方が土壌 A よりもベースオイルの分解が進んでいることが明らかであり、土壌 B の条件が石油分解菌の活性向上に効果があることが示唆された。

4. 2 総細菌数の挙動解析

実験土壌中の eDNA 量から算出した総細菌数の経時変化を Fig. 5 に示す。土壌 A では、総細菌数は 0 から 1 週目に増加したものの、その後は緩やかな減少傾向を示した。一方、土壌 B では、総細菌数は 0 から 4 週目にかけて徐々に増加していた。

土壌 A と土壌 B の総細菌数を比較すると、土壌 B の方が 4 週目に多くなったことから、TC, TN が高い土壌の方が総細菌数の増加・活性化に有効であると考えられた。

4. 3 石油分解菌数の挙動解析

実験土壌中の石油分解菌数の経時変化を Fig. 6 に示す。土壌 A と土壌 B における石油分解菌数を比較すると、TC, TN が小さい土壌 A では、0 から 2 週目までは有機資材の分解速度が速いため、石油分解菌数の増加する速度は顕

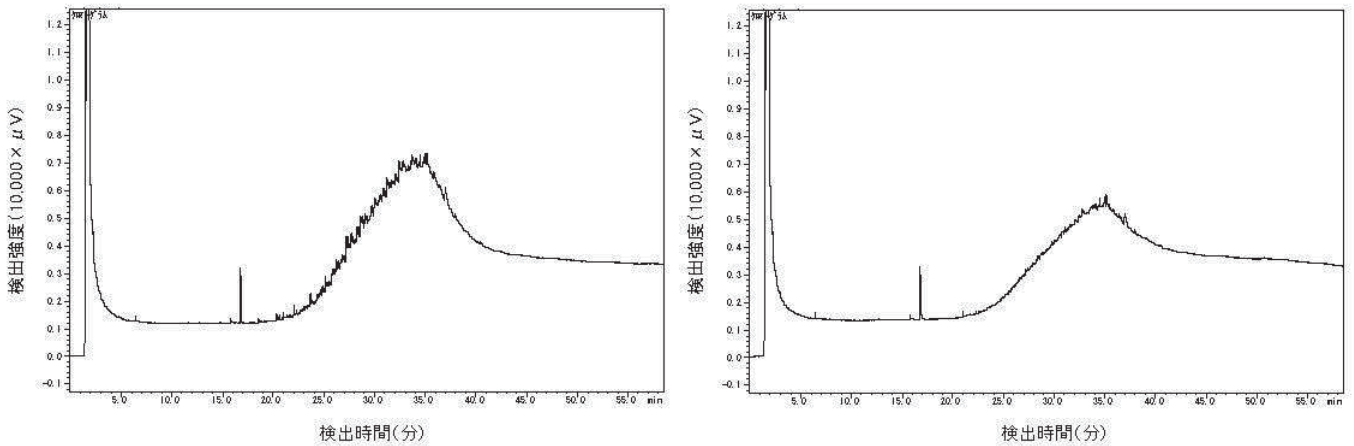


Fig.2 実験土壌Aの0週目(左)と4週目(右)の油分抽出後のガスクロマトグラム

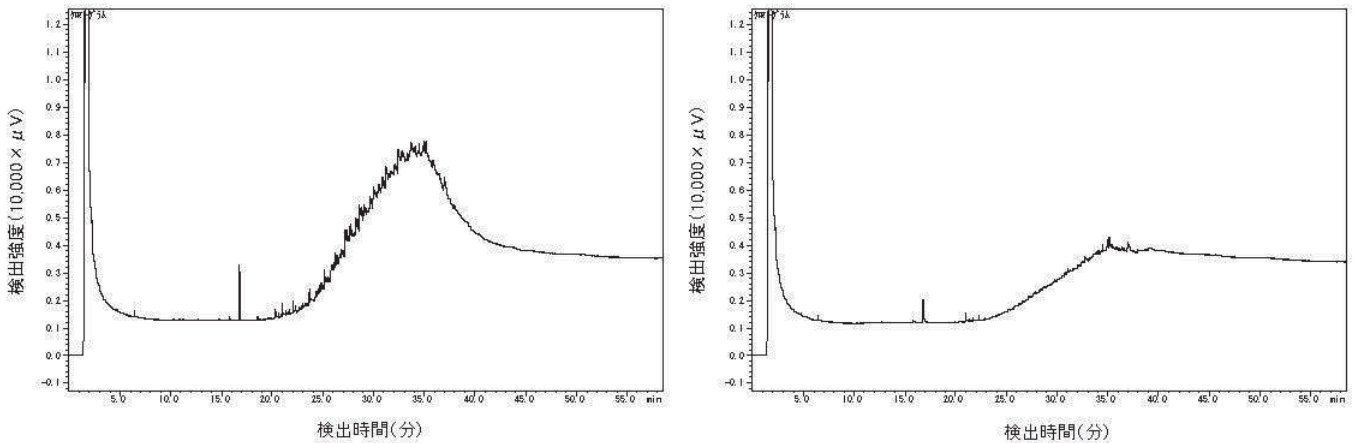


Fig.3 実験土壌Bの0週目(左)と4週目(右)の油分抽出後のガスクロマトグラム

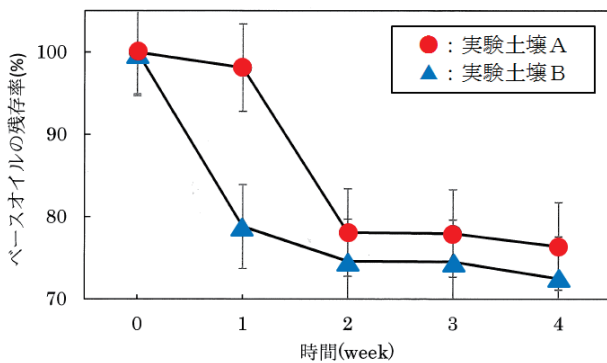


Fig.4 土壌中のベースオイル残存率の経時変化

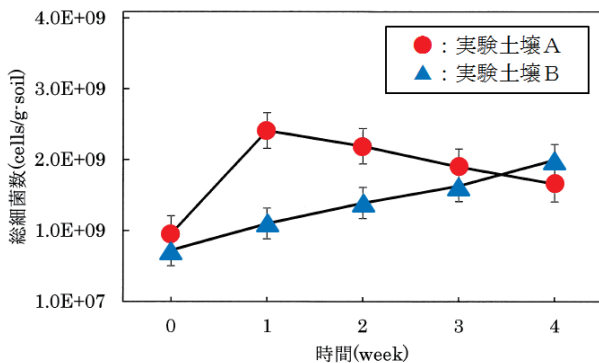


Fig.5 土壌中の総細菌数の経時変化

著に大きいですが、2週目以降は減少傾向を示していた。

一方、TC、TNが大きい土壌Bでは、0から4週目にかけて石油分解菌数は増加傾向を示し、4週目には土壌Aとほぼ同程度の菌数になることが認められた。このことから、TC、TNが大きい土壌Bの方が石油分解菌の活性化に適した条件であると考えられた。

4.4 R. erythropolis. NDKK6 株の挙動解析

土壌バイオマス量の違いでベースオイルの残存率が変化することにより、R. erythropolis. NDKK6 株の活性に対して大きな相違があるものと考えられる。そこで、R. erythropolis. NDKK6 の経時変化を測定した結果を Fig. 7 に示す。

土壌Aでは、R. erythropolis. NDKK6 の菌数は、実験期間中の変化はほとんど見られず、ほぼ一定の菌数が保持されているものと考えられた。一方、土壌Bでは、R. erythropolis. NDKK6 の菌数は、0から2週目にかけて増加したが、その後は減少傾向を示していた。

土壌Aと土壌BのR. erythropolis. NDKK6 の菌数を比較すると、土壌Bの菌数の方がすべての週において上回っていたことから、TC、TNの値が大きい土壌の方がR. erythropolis. NDKK6 の菌数の高濃度維持や活性化に適していると考えられた。

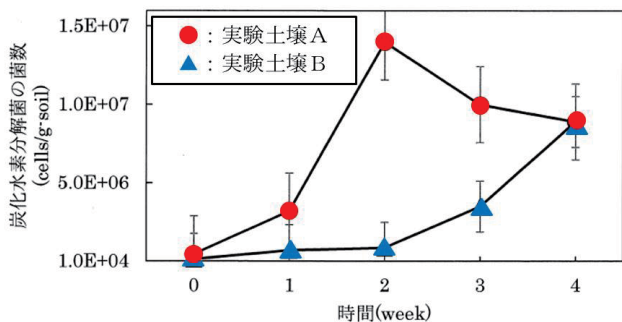


Fig. 6 土壌中の石油分解菌数の経時変化

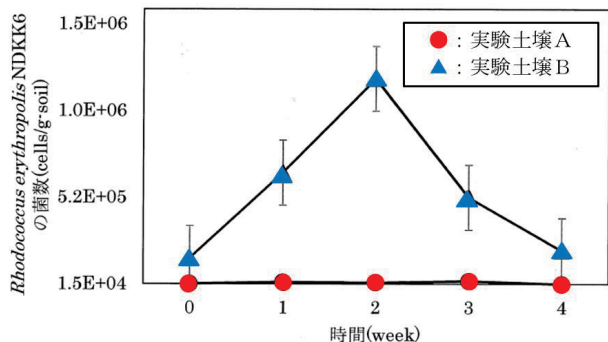


Fig. 7 土壌中の *R. erythropolis*. NDKK 菌数の経時変化

5. おわりに

バイオレメディエーション技術の課題である処理時間の短縮や処理速度の向上を目的に、石油分解菌の活性化に適した土壌条件、主に TC, TN, C/N 比について検討した結果、以下のようなことが判明した。

- ①ベースオイル濃度 5,000mg/kg に調整した汚染土壌に対して、*R. erythropolis*. NDKK6 株を用いたバイオオーグメンテーションにおいては、TC : 20,000 mg/kg, TN :

1,300 mg/kg, C/N 比 : 15 の土壌条件が適していることが明らかとなった。

- ②TC : 15,000 mg/kg, TN : 1,000 mg/kg, C/N 比 : 15 の土壌条件では、*R. erythropolis*. NDKK6 の生育には適していなかったが、土着の石油分解菌は早期に活性化され、菌数も高い値で維持することができた。ただし、ベースオイルの分解にはあまり寄与しなかった。

- ③C/N 比が同じ条件でも、TC 濃度, TN 濃度の違いにより、石油分解菌の活性化に適・不適があることが判明した。

今後は、様々な TC, TN 条件土壌での検証, NDKK6 株が活性化する C/N 比の下限値, TC, TN の調整に用いる低コストで効果的な有機資材の探索, などについて検討を行い、油汚染土壌の高効率バイオレメディエーション技術を確立したいと考えている。

謝辞

本実験を実施するに当たり、立命館大学生命科学部生物工学科久保研究室の皆様には多大なご尽力を頂きました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 門倉伸行, 佐々木静郎 : 原位置バイオ土壌浄化システム, 環境浄化技術, pp.18-24, 2011.9・10
- 2) 松野敏英, 津田治敏, 久保田謙三, 松宮芳樹, 久保幹 : 農地土壌診断—有機農法のための農地物質循環の評価—, 立命館大学理工学研究所概要, 第 68 号, pp.85-90, 2010
- 3) <http://www.bio.nite.go.jp/dogan/project/view/pr4>
- 4) H. Aoshima, A. Kimura, A. Shibutani, C. Okada, Y. Matsumiya and M. Kubo : Evaluation of soil bacterial biomass using environmental DNA extracted by slow-stirring method, Applied Microbiology and Biotechnology, 71, pp. 875-880, 2006

Development of the promotion technology for bio-remediation on oil contaminated soil by activation of oil resolution bacterium

Shizuo SASAKI, Nobuyuki KADOKURA, Junya MURAKAMI, Daiki KAWAMURA and Motoki KUBO

Abstract

As a purification technology of the oil contaminated soil, the application examples of the bio-remediation technique increase, but purification may not advance as originally planned. It was estimated that TC, TN of the soil and the C/N ratio were related to as the cause closely. Therefore, as a result of having tested by adjusting these conditions, it was recognized that oil resolution bacteria were activated and the oil content resolution was promoted. This report introduces the outline about these results.

Keywords: Oil contaminated soil, Oil resolution bacteria, Bio-remediation, TC, TN, C/N ratio