

石油系物質汚染土壌の微生物及び植物利用浄化技術の開発

[バイオ・グリーンレメディエーション]

ICETT - 印西研究室 (株)竹中工務店)

主任研究者 矢部 誠一

研究員 奥田 信康、広瀬 朗

古川 靖英、川人 尚美

開発期間： 2000～2002 年度

要約

本研究では、重油、多環芳香族炭化水素化合物 (PAH) によって汚染された工場跡地や石油関連製造業等の事業所の土壌環境修復への貢献を目的として、微生物 (土着バクテリア、白色腐朽菌微生物資材) と植物が有する分解浄化機能をトータルに利用した A 重油、PAH 汚染土壌の浄化工法の開発を行っている。平成 14 年度は、最終年度として浄化用資材の活性化の検討、油汚染土のバイオレメディエーション工法のまとめ、微生物処理された重油汚染土における木本類、草本類植物育成試験を実施し、バイオ・グリーンレメディエーション工法の成立性の検討を行った。

1. 技術開発の目標

(1) 白色腐朽菌の浄化微生物用資材化研究

市販の栽培用きこ菌床を用いた浄化用微生物資材の活用方法の検討。粗酵素抽出液の適用性検討。

白色腐朽菌の実用レベルでの活性評価方法の検討。

(2) 浄化用微生物資材を利用したバイオレメディエーション研究

バイオレメディエーションパイロット試験を実施し、浄化工法として確立する。さらに、微生物処理後に残留する成分の毒性評価によって浄化目標値の設定方法の検討を行なう。

(3) 植物による浄化技術

模擬油汚染土で育成した植物根圏部分の微生物の多様性及び消長を PCR 法によりモニタリングし、油汚染による植物への影響を把握する。

さらに、草本類の油汚染土に対する耐性の向上、及び微生物処理済土壌を用いた木本類育成試験を実施し、バイオ処理の「仕上げ工法」としてのグリーンレメディエーションの成立性を評価する。

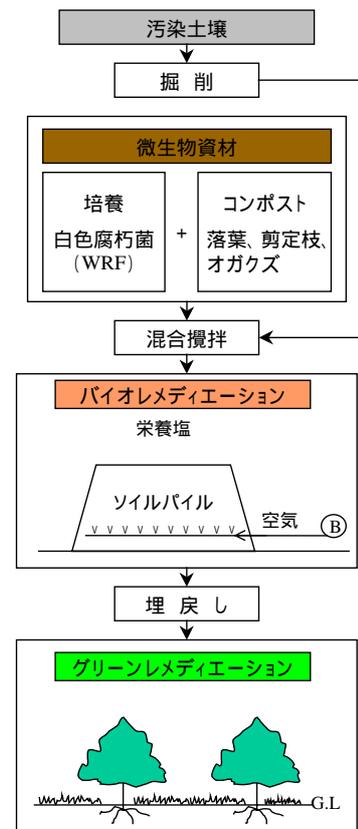


図1 バイオ・グリーンレメディエーション工法イメージ

2. 平成 14 年度実施内容および結果

(1) 白色腐朽菌の浄化用微生物資材化研究

1) 白色腐朽菌の種菌の選定

白色腐朽菌の種菌の条件として、下記条件のに適合する表 1 に示す 5 種の菌種を選定した。

サンプル菌体の酵素活性および PAH 分解活性の高いもの (結果: 図 2, 3)

開放系で使用した場合に、安全性の高いもの

検討の結果、実際の生産量や安全性を考慮し、実際の使用する白色腐朽菌としては *Pleurotus ostreatus* (シイタケ) または *Coriolus versicolor* (ヒラタケ) が適当であると判断した。基本的には、工事の実施時期の事前に必要量の種菌を専用施設で栽培し、工事の進行状況に応じて必要量を出荷する方式を採用することとした。また、時期を選択すれば、生産終了後の廃菌床を用いることも可能である。

表 1 本研究で検討を行った白色腐朽菌 種菌

名称	種類	状態	種菌利用候補
シイタケ 606 号 (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	食用栽培グレード	3.5L 袋入	
ヒラタケ H1 号 (<i>Coriolus versicolor</i>)	昆虫試料グレード	3.5L 袋入	
アワビタケ	昆虫試料グレード	3.5L 袋入	
カワラタケ <i>Lentinula edodes</i>	種菌	1.5L ボトル	
<i>Phanerchaete chrysosporium</i> ME	種菌 (特注)	1.5L ボトル	

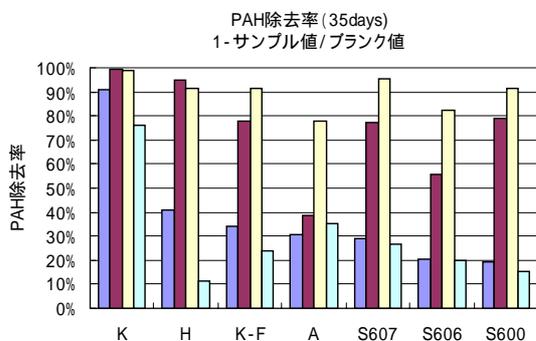


図 2 白色腐朽菌による PAH 除去率

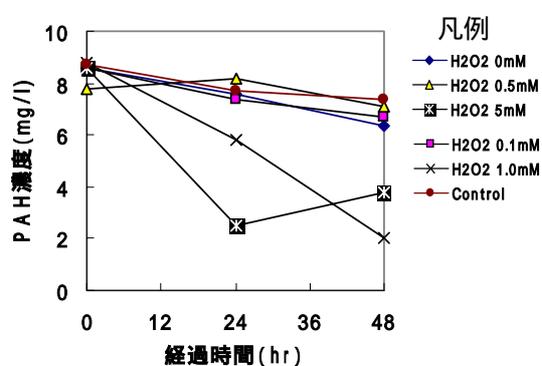


図 3 粗酵素抽出液によるフェナントレンの分解試験 (過酸化水素添加により分解向上)

2) 増殖用担体の選定

白色腐朽菌を汚染土壌に大量に増殖させるために適切な増殖用担体として土壌と混合すると分解し、土壌となじみやすい樹木コンポストを選定した。これは、2次破碎の過程で加熱されるので、その後、有害物の分解に有利な菌体を優先種とすることが容易となる特徴がある。

さらに、汚染土壌に対し、種菌 (栽培用きのこ菌床)、増殖用担体と栄養塩類を混合するための最適条件を実験的に検討し、適切な方法を見出した。

3) 混合方法

混合用の材料およびその添加料の目安を表 2 に示す。白色腐朽菌・種菌は、こぶし大以上

の大きさを有した状態で、樹木コンポストとよく混合し、対象土壌に混ぜ込まれる。混合直後には、白色腐朽菌の活性が向上し土壌中が酸欠状態になりやすいため、混合後の土壌を定期的に切り返すことで土壌中に空気を供給してやる必要がある。

表 2 混合用材料および添加量

材料名	目的	添加量目安
白色腐朽菌・種菌	難分解物質の分解促進	樹木コンポストの 10～20%
樹木コンポスト	油分の分解微生物担体・水分調製	土壌の 5～20%
肥料（窒素・リン）	分解微生物活性化のための栄養素	必要量、過剰とならぬように

空気の供給方法としては、重機で直接切り返す（ランドファーミング型）が最も安価で、浄化効率が高い。送気プロアなどで空気を圧入する方法も効果的ではあるが、土壌の透気性が悪いときには卓越した空気道ができやすく、浄化が不均一となる可能性が高いことに注意する。

4) 白色腐朽菌利用浄化材の利用の効果と限界

白色腐朽菌を難分解物質の分解促進材として活用する場合の、効果と留意点を示す。

【効果】

フェナントレン、アントラセン、ピレン等の PAH 類の濃度の低減する効果がある。栽培用きのこ菌床またはその廃菌床を白色腐朽菌利用の種菌として使用する場合には、菌床にはある程度の肥料成分（窒素分など）が残存しており、施肥量を削減することができる。

分解性向上には、1mM の過酸化水素を添加するのが有効である。しかし、抽出液の活性は短時間で失活する可能性が高い。

【留意点】

白色腐朽菌の生育阻害物質が含まれていないことをトレタピリティ試験で確認する。

高濃度油分（含有率 2% 以上）汚染土は、白色腐朽菌を適用する前に樹木コンポスト・肥料を添加し、1% 以下まで濃度を低減させる。

白色腐朽菌の増殖には、空気の供給が必要となるため、ランドファーミング方式などで十分に空気を供給する。

白色腐朽菌は、一般的に土壌中に存在する細菌類に比べ増殖速度が遅いため、比較的低濃度の汚染を長期間に渡って無害化するために用いることに適している。

(2) 浄化用微生物資材を利用したバイオレメディエーション研究

1) A 重油および PAH 類の処理

A 重油および PAH 類の処理を行う重油分解菌を活性化するためには、空気と栄養塩の供給が必要である。特に、本研究で対象としている通気性の悪いローム質土壌では、十分な空気を供給することが非常に重要であり、ランド

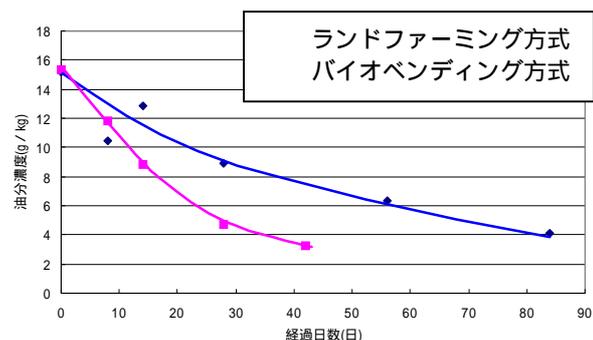


図 4 空気供給方式の違いによる油分の分解

ファーミング方式およびバイオベンディング方式の空気の供給方法の比較を行った。その結果、図 4 に示す様に空気供給能力の点では、ランドファーミング方式の方が、バイオベンディング方式に勝るため、特に初期油分濃度が 2 ~ 3 % もの高濃度の場合にはランドファーミング方式を採用する必要がある。一方、油分濃度が 1% 以下であれば、バイオベンディング方式でも対応は可能である。しかし、送風ブローのみでの空気供給では、土槽内に卓越した空気道を作成してしまう可能性が高い。このような場合、本年度の実証実験からは灌水と併用することが効果的であると考えられる。

2) 油分汚染土のバイオレメディエーションのまとめと留意点

高濃度の油汚染土壌の分解浄化には、ランドファーミング方法が有効であると考えられる。

重油分解菌は、PAH であるフェナントレン、ピレンおよびベンツ (a) ピレンを分解する能力を有する。

重油分解菌は、重油成分のうち飽和分・芳香族分を主に分解し、より高分子物質の分解速度は小さい。

白色腐朽菌増殖用担体として用いた樹木コンポストは、重油汚染土処理用の補助添加材として有用である。

微生物製剤は、液体培養した重油分解菌とほぼ同等の浄化性能がある。

油を吸着する性質を有する微生物製剤の添加は、浄化初期の分解活性増加向上に寄与する可能性が高い。

3) 処理済み土壌の安全性評価

油汚染土壌の浄化完了には、環境基準値のような具体的な目標値は設定されておらず、「処理後に油膜・油臭が無いこと」と生活環境の保全に関する項目とサイトごとに設定する油分成分の機器分析の結果で判断されることが多い。油は多種多様な混合物であり、特定の物質の検出を目的とする機器分析だけでは、処理後土壌が十分に安全なレベルまで処理されているか判断することはできない。そこで、本研究では、処理土の安全性を核酸診断法による微生物の多様性評価とバイオアッセイによる毒性評価を行った。

その成果として、

核酸診断法による土壌中の微生物の多様性評価

油、および PCR 阻害物質を含む土壌から、目的とする DNA を抽出・精製し、PCR 増幅させる手法を確立することができた。対象土中の主要なバクテリアのプロパティを明らかにする手法として、今後、データの蓄積をはかることで有用性を向上させる。

バイオアッセイによる毒性評価

本年度は、ミジンコを用いた急性毒性試験を油汚染土壌に適用し、バイオアッセイによる浄化処理土の安全性評価が可能であるかの検討を行った。

その結果、A 重油や原油の急性毒性はそれほど高くなく、さらに微生物処理により測定できないレベルまで毒性が低減することが確認できた。しかし、油成分以外の添加剤を含む潤滑油では、重油に比べ高い毒性となり、微生物処理により油分濃度が低下しても、毒性は変化しない結果が得られた。

(3) グリーン・レメディエーション研究

1) 油汚染土に強い植物の選定

模擬油汚染土を用いた植物育成試験を実施し、重油汚染土に対し耐性が強い植物としては、ポプラ、ユーカリ、ヤナギ、ウバメガシ、スズカケノキ、クスノキが適しているとの結果を得た。草本類の中では、アルファルファが最も油分耐性が高かったが、木本類よりも土壌中の油分濃度が生育に及ぼす影響が大きいことがわかった。

2) 生物処理土を用いた樹木育成試験

4m³規模の微生物処理土を用いた樹木育成試験を実施し、1)で選定した植物の重油汚染土に対し耐性およびバイオレメディエーションから植物育成用土壌として切り替えるタイミングの適性を評価した(図5、写真1)。

その結果、油分濃度として1%程度まで低減していれば、問題なく生長する樹木を選定することができた。本年度の実験では、樹木を育成させれば、1~1.5%油分濃度を半年程度で0.7%まで低減することが確認できた。原理としては、土壌中の重油分解微生物が活性化することにより起因していると考えており、重油分解菌と樹木の活性向上が同時に成立し得る事が確認できた。

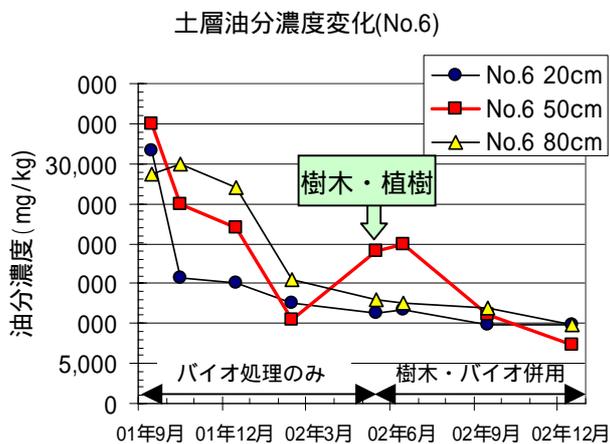


図5 微生物処理土での樹木育成試験 (油分濃度変化)

写真1 微生物処理土での樹木育成試験の状況

ただし、木本類の育成には、苗木の植樹時期(春先または初冬)および生長期(春から秋まで)の制約条件があり、浄化に適用する場合には、当初からの計画に見込んでおく必要がある。また、バイオ処理後に過剰に残存する肥料により、植物の育成阻害を引き起こさないよう注意が必要である。

3) 生物処理土を用いた草本類育成試験

油汚染土に耐性がある草本類として、アルファルファ、トールフェスクを選定し、微生物処理土を用いた草本類育成試験を行った。油分濃度1%では、成育が阻害された。これは、種子の発芽と根からの吸水を阻害することに起因していると考えられ、この問題の解決策として、

油分濃度を微生物処理により低減させる

VA菌根菌を共生させ、根の吸収能力を向上させる

種子の周囲を清浄な土で覆土し発芽時の油の害を防ぐ

等の方法を実験的に検討し、いずれも効果があることが確認できた。また、アルファルファ、トールフェスクは発芽したのちある程度生長すれば、1%弱の油分汚染土でも問題なく生長し、同時に油分濃度を低減しうることが確認できた(写真2)。これにより、油汚染度における草本類育成方法を確立することができた。

草本類育成試験に用いた土の内容	VA菌混菌 添加	VA菌混菌 添加せず
A重油汚染土 微生物処理なし 【清浄な土で油分濃度0.8%に希釈して利用】		
A重油汚染土の 微生物処理後 【油分濃度0.8%】		

写真2 草本類育成試験結果

4) グリーン・レメディエーション成立性の評価

以上より、油分を対象としたバイオレメディエーションとその処理土を用いた植物(樹木・草本)の育成および油分濃度の更なる低減が可能であることが示された。本研究で、提案するグリーンレメディエーションとは、油汚染土壌またはその微生物処理土での緑化のみならず、重油分解菌を活性化することが可能な工法であると考えられる。

以上の結果より、A重油およびPAHで汚染された土壌の修復技術として、バイオ・グリーンレメディエーションの成立すると判断できる。

3.まとめと今後の課題

(1) まとめ

本研究では、微生物(土着バクテリア、白色腐朽菌微生物資材)と植物が有する分解浄化機能をトータルに利用したA重油、PAH汚染土壌の浄化工法(バイオ・グリーンレメディエーション工法)の開発を実施し、パイロット試験により工法成立性の検証を行った。本方式は、焼却や場外搬出に比べ、消費エネルギーの少ない浄化工法となりうると考えられる。今後は、本研究で得た知見を実際の浄化工事に活用して行く予定である。

(2) 残された課題

- ・ 白色腐朽菌利用微生物資材の開放系使用での、浄化効果の継続時間の延長を図る。
- ・ バイオアッセイによる浄化処理土の安全性評価について、今後実データを蓄積する。
- ・ 残存する微量成分が樹木の根圏で微生物と植物の相互作用により無害化が進行するかについて経年的にデータの蓄積する。