

油汚染土壌の原位置バイオレメディエーション

In-Situ Bioremediation Studies of Oil Contaminated Soil

田中 宏幸*1 藤長 愛一郎*2 清都 通生*2
Hiroyuki Tanaka Aiichiro Fujinaga Michio Kiyoto

浦上 秀男*3 笹本 譲*2
Hideo Uragami Yuzuru Sasamoto

要旨

原位置バイオレメディエーションは、微生物分解を促進させる物質を地盤中に供給し、汚染土壌を掘削することなく有害な化学物質を処理する方法である。本研究では、酸素徐放剤を使用した油汚染土壌に対する原位置バイオレメディエーションの室内実験および現場適用を実施して、次のような結論を得た。

- ① 関東ロームで構成された油汚染土壌を、透水係数が 10^{-3} cm/s となるように充填させた条件で室内実験を行った結果、微生物分解による油分除去効果が確認された。その分解速度は、酸素供給が限定されているために、スラリー処理の実験結果よりも低い結果となった。
- ② カラム実験と実施工の結果より、酸素徐放剤による酸素供給の影響距離は1m以内であると判断された。また、酸素供給により油分の低減促進が確認できた。

キーワード：油汚染土壌 バイオレメディエーション 原位置 関東ローム カラム 微生物群集解析

1. はじめに

近年、顕在化している汚染土壌の対策として、企業は、①周辺環境への配慮 ②資産価値の向上 ③従業員の健康影響の抑制などに積極的に取り組む姿勢を強めているうえ、ブラウンフィールド(化学物質などで汚染された土地、または汚染は浄化されたが活用されていない土地)の活用を促進させる社会機運も高まっている。そのような背景において原位置浄化のニーズが高まり、分解処理であり経済性に優れるという観点から微生物処理(バイオレメディエーション)が注目されている。

原位置でバイオレメディエーションを行うためには、酸素供給源や栄養塩などを注入し地盤中の微生物活性を促進化することが必要である。土壌中に生息する様々な微生物は、酸素や栄養塩を得ることで活性化し、油分を複合的な反応経路により最終的に二酸化炭素にまで分解していく。このように、現場由来の微生物を促進化させる手法は、バイオスティミュレーションとよばれている。本研究では、その分解効率のかぎを握る促進物質の供給法として、遅効性の酸素供給源を利用して、数年間という比較的長期間で低減化し、低コスト化を目指した。

これまでに実施した原位置浄化の知見から、バイオレメディエーションの浄化効率は、環境の条件に影響を受けや

すく、浄化期間の予測も困難であることが示されている。これには、環境中において汚染物質の存在にはばらつきがあること、微生物の分解速度について正しい把握がなされていないことがあげられる。そこで、地盤中の環境条件を想定した室内実験で微生物分解量を調査し、実サイトのデータと比較することにより、バイオレメディエーションの有効性を評価した。

また、2005年3月に環境省と経済産業省により「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」が策定された。これは主に、微生物製剤を注入して浄化する手法であるバイオオーグメンテーションを対象とした、その安全性の評価についての取りまとめである。このなかで、バイオスティミュレーションについても、このガイドラインに準じた手法で評価することが望ましいとされていることから、今回実施した処理により活性化する微生物の属性を調べ、病原性微生物の発生の有無を確認した。

2. 施工サイトの概要

施工を行ったサイトは、操業中の工場敷地である。燃料タンクから伸びる送油管から漏洩した重油による汚染が、地下水の流れの影響で拡散していた。汚染源付近の5,000~10,000 mg/kgという高濃度の汚染土壌は場外処分し、汚

*1 技術研究所 土木環境技術研究部門

*2 大阪本店 土木技術部

*3 東京本店 土木営業部

染源から地下水下流側 20m の敷地境界までの領域に対して原位置のバイオレメディエーションによる汚染の低減化の適用を行った (図 1、表 1)。

このサイトの地盤は、関東ローム層で構成されていた。関東ロームは細粒分が大部分を占める火山灰土であるため、低い透水性が物質供給能の制限要因になると懸念されたが、現場透水試験では、 10^{-3} cm/sec オーダーの良好な結果が得られた。

さらに、事前調査としてボーリングを行い、深度ごとの汚染を調査した。汚染物質は、全石油系炭化水素 (TPH) としてガスクロマトグラフ (GC) による分析 (TPH-GC) を行い、その分析チャートから軽油または A 重油であると判断した (図 2)。油分は、深度方向において、地下水面付近が最も高い分布を示しており概ね 1,000~3,000 mg/kg の TPH が検出され、敷地境界近傍でも油膜と油臭の発生が認められた。また、原位置浄化エリアにおいては、不飽和層の汚染は確認されなかった。

3. 実験および施工の方法

3.1 室内実験

3.1.1 試料

試験土は、市販の赤玉土 (栃木県産) を粉砕して粒径 150~850 μ m を分取し、A 重油を混合した模擬汚染土壌を使用した。

土壌をカラム (図 4) に充填した条件を表 2 に示す。このとき、透水係数は 10^{-3} cm/sec オーダーであった。

3.1.2 実験装置

(1)スラリー試験

模擬汚染土壌中の A 重油に対する、実サイトの地盤中に生育する微生物の生分解能を把握するために、容量 200ml の三角フラスコ内に 10g の土壌を、無機塩と A 重油を添加した培

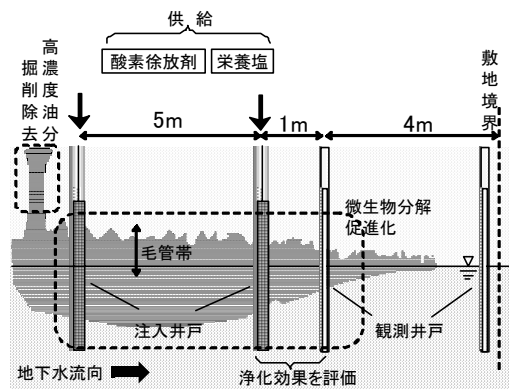


図 1 原位置バイオレメディエーションの装置

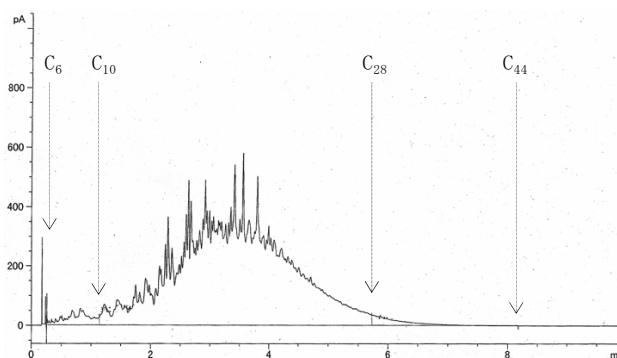


図 2 油汚染土壌の TPH チャート

地 50ml に懸濁させ、スラリー試験を行った (図 3)。全量分析を行うため、分析回数分の培養を設置し、室温 20°C、100rpm で好氣的に振とう培養し、定期的に TPH-GC を分析した。

(2)カラム試験

カラム実験装置を図 4 に示す。内径 3cm のアクリルパイプに模擬汚染土壌を約 10cm の長さ に充填したものを 4 本直列に連結し合計長さ 40cm の土壌カラムに、空気の曝気により 7~8 mg/L にした溶存酸素 (DO) と栄養塩からなる培養液を上向流で連続通水した。このときの実流速は、実サイト

表 1 原位置バイオレメディエーション施工概要

処理概念	原位置好気性バイオスティミュレーション
期間	2003 / 5 ~ 2006 / 3
浄化対象物質	軽油あるいは A 重油 汚染源は場外処分 開始時の油分含有量 : TPH 1,000~3,000 mg/kg、油膜・油臭あり (本報文中で取り扱う領域)
地盤条件	関東ローム、現場透水試験値 ; 3.9×10^{-3} cm/sec、動水勾配 ; 0.01、推定実流速 ; 0.003 cm/min
供給物質	酸素 : 酸素徐放剤を孔内に吊り下げ定期的に交換 栄養塩 : 定期的に注入井戸から投入
施工結果	敷地境界では排水基準 (<i>n</i> -HEX 5 mg/L) を満足 境界手前 5m 域に油分が残留 (本報文中で取り扱う領域)

表2 カラムに充填した土壌の性状

土壌性状	
土壌の種類	赤玉土(栃木県産)
粒度(μm)	150~850
強熱減量(g/kg) ¹⁾	103
アロエン量(g/kg) ¹⁾	243
充填条件	
固相率(%) ²⁾	25.2
仮比重	0.74
透水係数(cm/sec)	1.1×10^{-3}
混合物質(40cmカラム)	A重油 1,000mg/kg
(10cmカラム)	A重油 300mg/kg

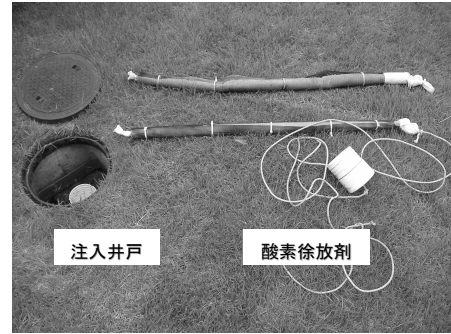


写真1 酸素徐放剤

表3 カラム実験の通水条件

	10cmカラム		40cmカラム
	促進系	コントロール系	
DO(mg/L)	2	0	7~8
添加物質	無機塩培地 H_2O_2 4mg/L	NaN_3	無機塩培地
流量(ml/min)	0.5	0.5	0.05~0.3

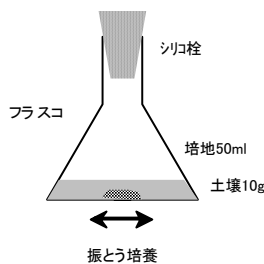


図3 スラリー実験装置

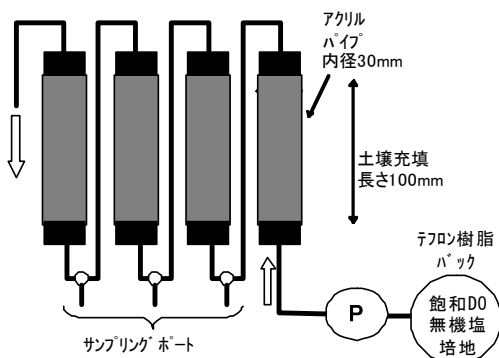


図4 カラム実験装置

の実流速を想定した条件に設定した(表3)。実流速の算出では、有効間隙率を0.1³⁾とした。

さらに、油分の低減効果における微生物分解の寄与度を把握するため、上記と同様の装置で10cmのカラム1本を用いて、微生物分解促進系と分解活性を抑制させたコントロール系を設置した実験(表3)を行った。

模擬汚染土への微生物の添加は、生分解実験開始前に1

回、カラムに実サイトの地下水を浸漬させて行った。

(3) 分析方法

通水中の土壌間隙中を移動する液相の状態を把握するために、各サンプリングポートから採水し、DOとA重油資化性菌を測定した。

土壌の分析用試料は、実験終了後にカラム内の土壌を取り出し通水方向に分割して採取した。こうして得られた試料に対して、TPH-GCまたは赤外分光分析法による炭化水素(TPH-IR)と、A重油資化性菌を測定した。

3.2 実施工

実サイトにおける施工には、図1に示す処理システムを使用した。注入井戸に布製の袋に充填した酸素徐放剤を設置(写真1)し、モニタリング井戸を地下水下流側1mと5mに設置した。酸素徐放剤は定期的に交換し、浄化を3年間実施した(表1)。

注入井戸とモニタリング井戸内の地下水について、TPH-GC、地下水位、DO、酸化還元電位(ORP)、A重油資化性菌を定期的に分析して、地盤中の環境の変化とバイオレメディエーションの促進状態を把握した。

3.3 微生物群集解析

バイオレメディエーションの促進化により出現する微生物を把握し、また病原性微生物の存在を検討するために、実験終了後のカラム内の土壌から16S rRNA遺伝子を抽出して、ランダムクローニング法により増幅させたDNA配列を解析した。さらに、それぞれの配列をGenBankで検索し、近縁の微生物種を同定した⁴⁾。

4. 結果と考察

4.1 スラリー試験

汚染濃度の異なる3系列の土壌をスラリーで培養を行い、図5に示す結果を得た。油分供給量を高めても微生物分解の著しい遅延は生じることなく、同じような分解挙動を示

した。これにより、酸素が豊富に供給される条件では、4週間で1,000 mg/kg以上の分解能があることがわかった。

4.2 カラム試験

(1) 40cm カラム

40 cmのカラム装置に2ヶ月にわたり培地を連続通水させたときの、DO、TPH-GC、A重油資化性菌の変化を図6に示す。実流速を0.5 cm/minと0.07 cm/minの2段階に設定し、各サンプリングポートにおけるDOを測定した。実流速が0.5 cm/minのときよりも0.07 cm/minの場合に酸素消費量は大きく、さらに0.07 cm/minの条件では、通過距離とDOの相関性が低下する結果となった(図6左)。

さて、地下水流により飽和透水層を移動するDOは、化学的または生物学的消費の影響を受け、その消費量は経過時間と距離間でのDO変化量との擬一次反応に従うと仮定できる^{5,6)}が、2つの流速条件におけるDO到達の試算結果を、図6左のグラフにおいて点線で示す。これによると、通過距離に伴いDOは低下していく傾向が確認でき、初期値7.8 mg/Lが0.5 cm/minのときには100 cmの移動で0.3 mg/Lに、0.07 cm/minのときには50 cmでほとんどDOは消費されることになり、実測値よりもDOの消費は大きいことになる。この原因には、実験の採水時には流速を上昇させるた

めに、カラム上流側から流入した相対的に高いDOがみずみちを通過してしまうことや、大気から透過してくる酸素の影響が考えられる。以上より、7~8 mg/LのDOを供給した場合、0.07 cm/minよりも低い流速では、その影響距離は100cmに満たないことが示唆された。

さらに、図6中央のグラフに実験開始前と終了後の土壌の油分濃度を示す。開始前に830 mg/kgであった油汚染土壌は、2ヶ月の通水により油分が低減化され、10cmから40cmの距離の変化に伴いTPHは560 mg/kgから730 mg/kgになった。これは、DOの消費量の挙動と一致していることからうかがえる微生物分解と、土粒子からの物理的な脱着作用によるものと考えられる。ただし、これまでの実験で得られた結果から、土壌の油分分析値はばらつきが大きく、距離と油分変化量の相関性は明らかではない。

液相のA重油資化性菌は、 $10^4 \sim 10^5$ cfu/mlで推移し、また土壌中の菌数は、液相よりも1~2オーダー多いことがうかがえ、油を分解する微生物が実験中、十分に維持されていたことがわかった(図6右)。

(2) 10cm カラム

40cmのカラム実験で確認された油分の低減効果について、微生物分解量と物理的除去量の内訳を把握するために、さらに低濃度の汚染土壌を充填した10cmのカラムを使用して、8週にわたり通水する実験を行った。そのときの土壌中のTPH-IRとA重油資化性菌の変化を図7に示す。

TPHは、8週間で280 mg/kgから140 mg/kgまで低下し、除去効率、促進系が52%で、コントロール系より15%高かった。またA重油資化性菌は、促進系では植種直後の 10^2 cfu/gオーダーから8週後には 10^6 cfu/gオーダーに増加していた。コントロール系では増殖が確認されなかった。したがって、微生物分解は促進されていると判断できる。

なお、この実験では物理的除去量が大きい結果となったが、通水開始後の短期間に油分が系外に出している可能性がある。また、自然状態の地下水流を利用した静的な浄化の場合、原位置浄化の作用で土壌から脱離し移行する油分は、この実験の結果ほどは見込めないと推測される。

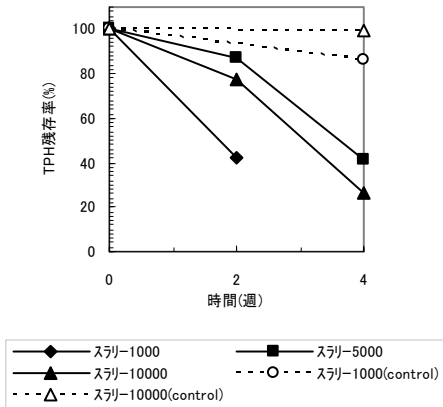


図5 スラリー試験におけるTPH

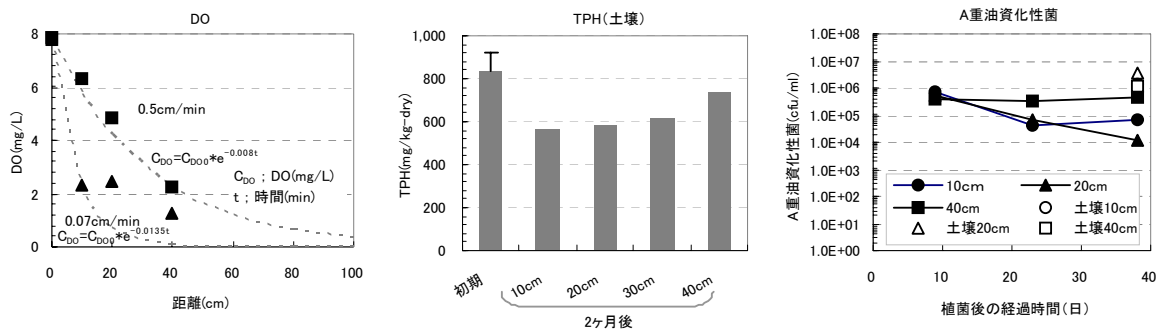


図6 40cmカラムのDO、TPHおよびA重油資化性菌

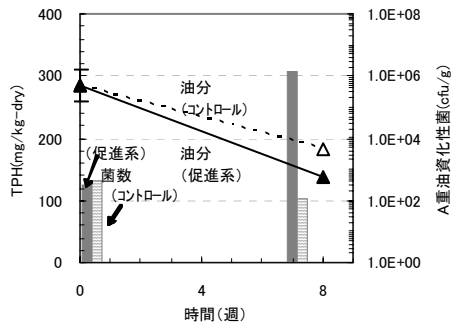


図7 10cm カラムのTPHとA重油資化性菌

4.3 実施工

実施工の注入井戸とモニタリング井戸における地下水の分析結果を図8に示す。

TPH-GCは、注入井戸では開始時に70 mg/Lであったが、30日後には定量下限値以下になった。注入井戸から距離が1mのモニタリング井戸では、数百~1,000 mg/Lであったが、2年目以降には数十 mg/Lに低下し、5m地点では、100 mg/Lから1年弱で定量下限値以下に抑えられた。

地下水位は、年間を通じてGL-2 mから-3.5 mの間で変化し、一部の期間を除いて注入井戸での水位がモニタリング井戸よりも高く、地下水の流れにより酸素がモニタリング井戸側に供給される条件になっていた。注入井戸から下流側5mに向かう地下水の動水勾配は概ね0.01であり、現場透水試験値とカラム充填時の間隙率から導かれる推定流速は0.02 cm/minとなる。

DOは、注入井戸では8~10 mg/Lに維持されていた。1m地点では、0.1 mg/L以下である場合が多かったが、5m地点では0.1~1.0 mg/Lに推移していた。浄化の影響範囲外の油分汚染が確認されなかった井戸のDO(コントロール)は1 mg/L前後であった。油分濃度の低い5m地点の酸素消費量が1mよりも少なかったのは、TPHの減少量と合致する。

また、ORPは浄化開始後から徐々に上昇し、5m地点の井戸まで還元状態を脱している。これは降雨等の一時的な流動促進により好氣的領域は拡大し、5m地点においても油分の低減が促進されたと考えられる。

A重油資化性菌は、 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mlで推移しており、カラム実験における液相の菌数と同程度ないし1オーダー低い結果であった。また、注入井戸では、酸素徐放剤の作用で地下水のpHが上昇したが、懸念された微生物の増殖への悪影響は確認できなかった。

4.4 微生物群集解析

図9は、土壌中の微生物群集解析により作成した系統樹である。微生物分解を促進化させることによって、優占し

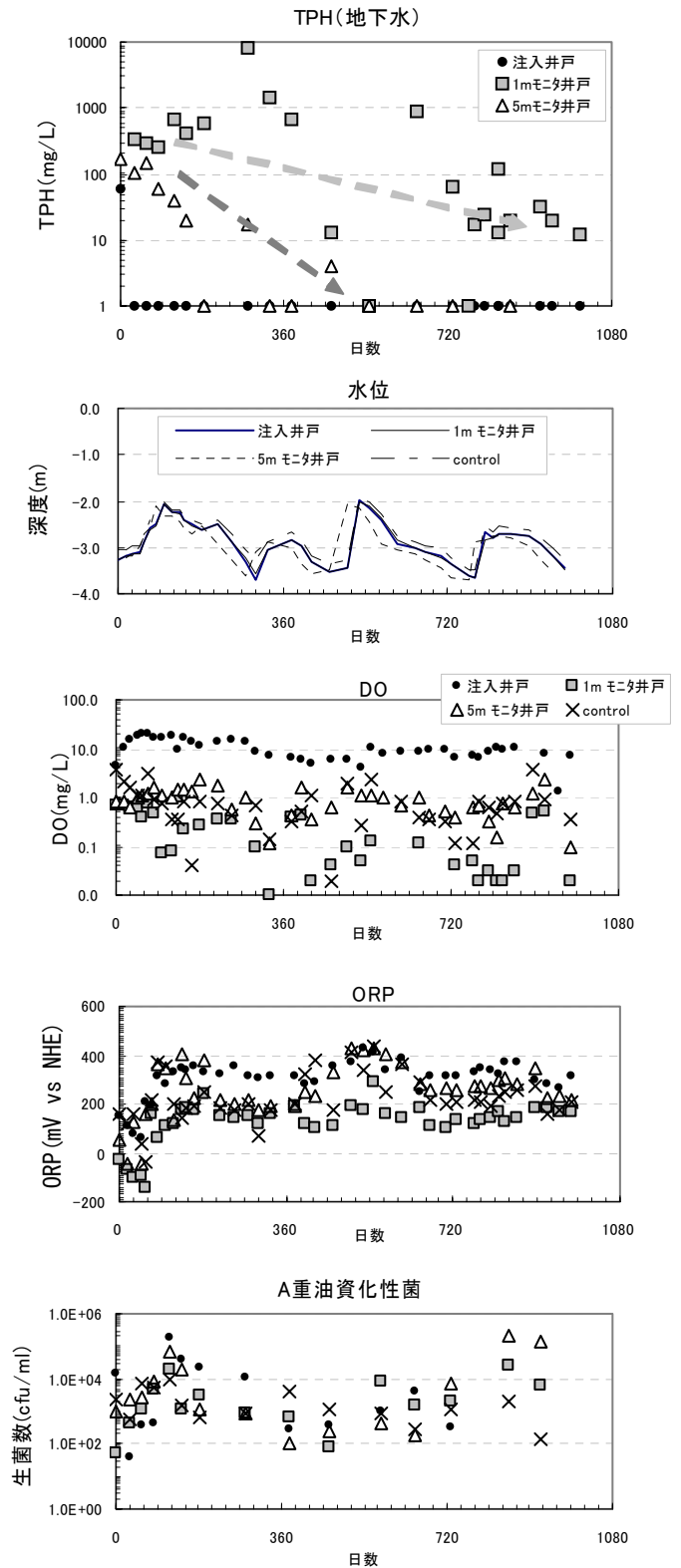


図8 実施工における分析結果

ている微生物群に変化が生じ、それらは近縁のクラスターに属している様子がうかがえる。表4には、検出された微生物の出現率を示しているが、促進条件下では群集を構成している微生物が大きく変化していた。また、これらの微

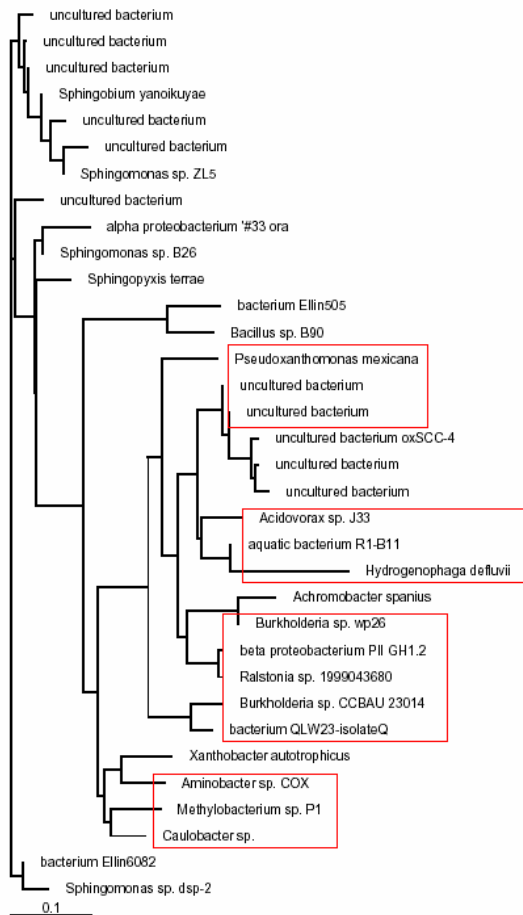


図9 土壌 16S rRNA のクローン解析による系統樹 (□: 促進化での出現微生物)

生物について、日本細菌学会バイオセーフティ指針におけるレベル3および2⁷⁾に該当する病原性微生物は、確認できなかった。

5. まとめ

油汚染土壌の原位置バイオレメディエーションを想定した室内実験、さらには現場適用を実施して、次のような結論を得た。

- ① 関東ロームからなるA重油汚染土壌を対象にして、透水係数 10^{-3} cm/secの充填条件でカラム実験を行った結果、微生物分解による油分の低減効果が確認された。その物理的除去を含んだ低減速度(40cmカラムの0~10cmにおいて8週間で830 mg/kgから270 mg/kgを低減)は酸素供給が律速となっており、スラリー処理(4週間で10,000mg/kgから7,000 mg/kgを生分解)の場合よりも低い結果となった。
- ② カラム実験と実施工の結果より、酸素徐放剤による酸素供給の影響距離は1m以内であると判断された。また、

表4 出現した微生物群集の構成

	微生物	出現率
初期	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	67.9%
	uncultured bacterium	12.3%
	uncultured bacterium oxSCC-4	3.7%
	<i>Achromobacter spanius</i>	4.9%
	<i>Sphingopyxis terrae</i>	2.5%
	bacterium Ellin6082	1.2%
	bacterium Ellin505	1.2%
	<i>Bacillus</i> sp. B90	1.2%
	<i>Sphingomonas</i> sp. B26	1.2%
	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	1.2%
促進化	<i>Sphingomonas</i> sp. ZL5	1.2%
	<i>Ralstonia</i> sp. 1999043680	41.7%
	<i>Caulobacter</i> sp.	14.3%
	aquatic bacterium R1-B11	9.5%
	<i>Sphingomonas</i> sp. dsp-2	6.0%
	<i>Aminobacter</i> sp. COX	4.8%
	uncultured bacterium	7.2%
	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	3.6%
	beta proteobacterium PII GH1.2.A10	3.6%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCBAU 23014	2.4%
未分類	bacterium QLW23-isolateQ	2.4%
	<i>Burkholderia</i> sp. wp26	1.2%
	<i>Methylobacterium</i> sp. P1	1.2%
	<i>Acidovorax</i> sp. J33	1.2%
	<i>Hydrogenophaga defluvii</i>	1.2%
	<i>Achromobacter spanius</i>	1.2%
	<i>Burkholderia</i> sp. CCBAU 23014	1.2%

地下水中の油分について、酸素供給による低減促進が確認できた。

現在、室内実験は継続中であり、さらに、反応時間、物質供給量等の条件を検討して取り組んでいく予定である。

謝辞

室内実験および微生物群集解析に関して、筑波大学大学院生命環境科学研究科・内山裕夫教授には貴重な助言を戴いた。記して謝意を表する。

参考文献

- 1) (社)地盤工学会：土質試験の方法と解説、丸善、2000.3
- 2) 中野政詩、宮崎毅、塩沢昌：土壌物理環境測定法、東京大学出版会、1995.3
- 3) 安原正也、丸井敦尚、田中正、石井武政：筑波台地浅層部の土壌物理性と地下水鉛直流動、地質調査所月報、vol.41、No.9、pp.507-516、1990.9
- 4) 杉山純多、渡辺信、大和田紘一、黒岩常祥、高橋秀夫、徳田元：新版微生物学実験法、講談社、1999.3
- 5) K.R.Reddy、P.S.C.Rao and W.H.Patrick Jr.：Factors Influencing Oxygen Consumption Rates in Flooded Soils、Soil Sci.Soc.Am.J.、vol.44、pp.741-744、1980.4
- 6) 宮林哲司、北沢照啓、田中宏幸、笹本謙：原位置バイオレメディエーションによる重油汚染地下水の浄化、土壌環境センサー技術ニュース、No.11、pp.15-20、2006.3
- 7) 日本細菌学会 WEB サイト