

# 油汚染土のバイオレメディエーションに関する研究（その3）

——クウェートにおける浄化処理土の性状と緑地への適用性——

千野 裕之 辻 博和 石川 洋二  
 四本 瑞世 松原 隆志  
 (エンジニアリング本部)

## Study on Bioremediation of Oil Contaminated Soil (Part 3)

—— Properties of Bioremediated Soil and Applicability for Greenary in Kuwait ——

Hiroyuki Chino Hirokazu Tsuji Yoji Isikawa  
 Mizuyo Yotsumoto Takashi Matsubara

### Abstract

Related to the remediation of oil-contaminated soil in Kuwait desert, 1 ha large-scale field bioremediation experiments were carried out. In this experiment, toxic PAHs in the oil-contaminated soil and treated soil were investigated. More than 80% of 3 ring PAHs and 50% of 4-5 ring PAHs were degraded after 12 months treatment. A-mes test were carried out for each 3 months of bioremediation treatment, then oil extracted from the bioremediated soil became non-mutagenic. Vegetation experiments were carried out using 15-months' bioremediated soil, then the yield was almost within the normal range so the treated soil had been sufficiently restored for vegetation use. From the plant analysis after vegetation, it was clear that the uptake of PAH, sulfur and heavy metals were negligibly small. This study was commissioned by the Petroleum Energy Center under the Ministry of International Trading and Industry.

### 概 要

先の湾岸戦争における流出原油による油汚染土の修復に関連して、クウェート現地において、1ha規模のバイオレメディエーション実証実験を行った。ここでは、汚染土の毒性評価の一環として土中の石油成分のうちEPAの定める有害多環芳香族化合物の動態について検討した。その結果、15カ月の処理で上記すべての化合物が検出限界以下にまで分解された。汚染の浄化の証明として、変異原性試験を実施したところ、バイオレメディエーション処理によって3カ月後には変異原性が陰性となることが認められた。また、15カ月間処理した土を用いて圃場を造成し、飼料作物等の植栽実験を実施した。その結果、刈り取り収量等は、砂漠自然土の植栽と比較してほぼ同等であり、バイオレメディエーションによって植栽可能な緑地に修復できることが示された。なお、植物による有害成分の吸収の程度を植物体の分析を行って検討した結果、EPAの定める有害多環芳香族成分、硫黄、重金属の植物体への移行は認められなかった。本研究は通産省の石油産業等産業基盤整備事業のもと(財)石油産業活性化センターから委託を受け、実施したものである。

#### 1. まえがき

先の湾岸戦争における流出原油による油汚染土の修復に関連して、クウェート科学研究所と共同で、クウェート現地において、1ha規模のバイオレメディエーション実証実験を行っている。

前報<sup>1)</sup>に述べたように、土中の油分濃度TPH(Total Petroleum Hydrocarbon)が約4%の中汚染土と約2%の軽汚染土を用い、所定の栄養、コンポスト、ウッドチップを加え、ランドファーミング(畑耕耘方式)、ウインドローパイル(高畝切返し方式)、スタティックパイル(高畝強制通気方式)の3方式で15カ月間浄化処理を実施した。その結果、ランドファーミング方式が処理期間、到達度合ともにもっとも良好で、ウインドローパイル方式でも15カ月処理すれば上記方式と同様に処理できることが明らか

となった。ここでは、汚染土中の石油成分のうち、発癌性等を疑われている多環芳香族化合物の動態について検討するとともに、変異原性試験によって、バイオレメディエーションによる浄化効果を検討した。さらに、処理土を用いた植栽試験で植物の発芽、生育、さらには植物体の有害成分の移行などについて検討を行った。なお、本研究は通産省の石油産業等産業基盤整備事業のもと(財)石油産業活性化センターから委託を受け、実施したものである。

#### 2. 多環芳香族化合物の定量

##### 2.1 試験内容と方法

前報<sup>2)</sup>に示したように、汚染土からのジクロロメタン抽出物について石油学会規格JPI-5S-22-83に従ってカラムクロマトグラフで分画し、芳香族画分を得た。この画

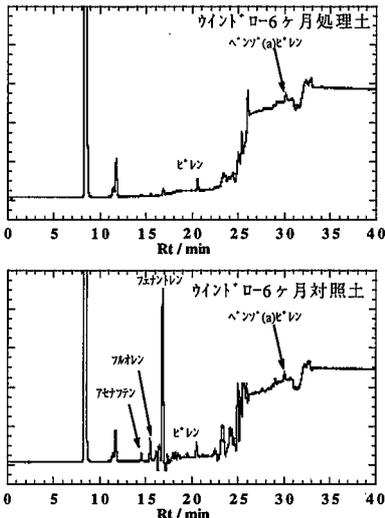


Fig. 1 高速液体クロマトグラフの分析例  
Examples of HPLC Chromatogram

分について、蛍光検出器を用いた逆相の高速液体クロマトグラフ(HPLC)で多環芳香族の定量を行った。

### 2.2 試験結果と考察

試料のクロマトグラフの一例を Fig. 1 に示した。ここで、各標準化合物の保持時間±0.3分以内に検出されたピークは同一化合物として同定した。ナフタレンおよびクリセンは、それぞれ溶出に用いたトルエンの不純物と考えられる成分の妨害とベースラインの変動が大きいことから、本報では定量できなかった。定量が可能であった6成分について対照区に対する処理区の定量値の比率を Fig. 2 に示した。

同図からわかるように、アセナフテンは6カ月で不検出の領域まで減少している。また、フルオレン、フェナントレン、フルオランテンは6カ月で未処理土の5~20%にまで減少している。これに対して、ピレン・ベンゾピレンについては、6カ月ではまったく減少しなかった。しかし12カ月経過した段階で、ランドファーム区について約50%が分解した。この両者を含め、上述のすべての項目については15カ月を経過した段階で、後掲の Table 2 に表示するように、検出限界以下となった。

処理区では、分解を促進させるために土壌の耕耘、切り返し等を行っていることから、対照区と比較して蒸発・揮散による減少が大きいことも考えられるが、ピレンやベンゾピレンのような比較的蒸発しにくい化合物においても減少がみられていることから、微生物による分解が生じていると考えられた。また、処理区では散水に伴う油の流出が考えられるが、流出によるロス割合は成分によらず一定と考えられるのに対して、Fig. 2から縮合度の小さい芳香族ほど、減少の割合が大きいことから、流出ではなく分解によって減少したと考えられる。

## 3. 変異原性試験

### 3.1 試験内容与方法

汚染土の変異原性(突然変異誘起性)がバイオレメディ

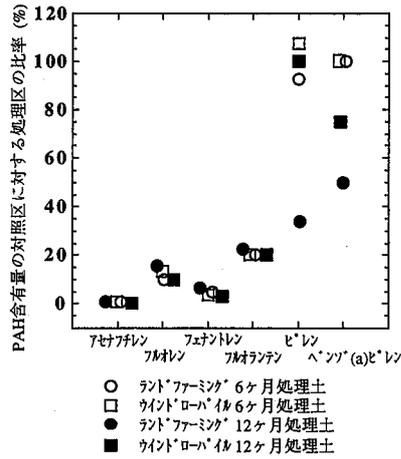


Fig. 2 多環芳香族化合物の対照区に対する処理区の比率  
The Ratio of each PAHs in treated soil against in control soil

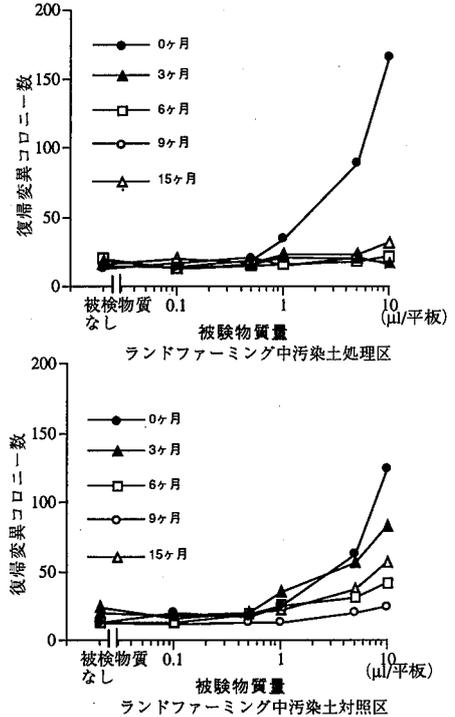


Fig. 3 変異原性試験の例  
Results of Ames Test

エーションでどのように変化したか検討した。供試試料はランドファーム区、ウインドローパイル、スタティックパイルでそれぞれ維持管理を行い、実験開始時から15カ月後まで3カ月おきにサンプリングした土壌サンプルから、ジクロロメタンで抽出した油分を供試試料とした。試験は *Salmonella typhimurium* TA98株を用い、労働省告示第77号に準じて行った。

### 3.2 試験結果と考察

代謝活性化法によらない場合の試験結果の一部を Fig. 3 に例示する。供試汚染土は実験開始時には変異原性を示していたが、3カ月後には復帰変異コロニー数は、被検物質無しの場合と同等程度まで低下し、強い変異原は比較的初期のうちに分解されたと考えられた。一方、バイオレメディエーションの処理を行わなかった対照区ではいずれの時期でも変異原性は陽性と判定され、変異原性物質が残留していると考えられた。なお、代謝活性化法(化合物が生体内で代謝されて変異原となる場合を想定した方法)による場合も、処理土ではまったく変異原性は認められなかった。

以上のことから、バイオレメディエーションの処理によって汚染土の変異原性を低下させることができると判定された。

## 4. 植栽による浄化効果の確認

### 4.1 室内試験

4.1.1 試験内容与方法 バイオレメディエーションにより11カ月間処理した土、無処理区(処理区と同じ土で、灌水、攪拌等のバイオレメディエーションの維

Table 1 発芽試験供試土の性状  
Soil Characteristics for Germination  
Experiment

	PH	EC (1:2) ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	塩素イオン ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	TPH (%)
中汚染土処理区	8.1	662	162	0.74
軽汚染土処理区	8.2	481	109	0.34
中汚染土対照区	8.2	12865	6773	3.29
軽汚染土対照区	8.0	4700	2182	1.41
砂漠自然土	8.7	184	62	0.03

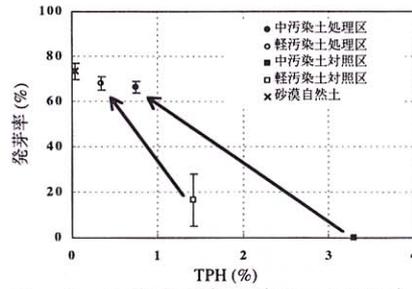


Fig. 4 発芽試験結果 (ハミューダグラス)  
Result of Germination Test (Bermuda grass)

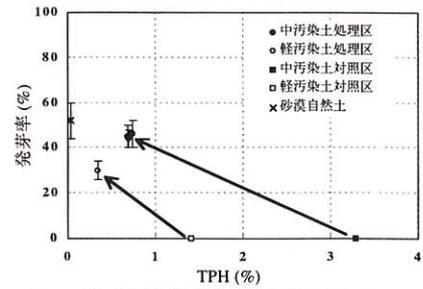


Fig. 5 発芽試験結果 (アルファルファ)  
Result of Germination Test (Alfalfa)

持管理を行わない) の土, 砂漠自然土を供試土として, 発芽試験を行った。使用した処理土の性状は Table 1 の通りである。供試土は 200cc のカップ (8cm 径) に約 200g ずつ採取した。カップの底には穴を空け, 排水を確保した。植物にはバミューダグラスとアルファルファを用い, それぞれ 50 粒および 100 粒播種した。約 2 週間後に発芽率を調査した。

4.2.2 試験結果と考察 Fig. 4 および Fig. 5 に TPH (=EPA 418.1 に従って定量) とバミューダグラスとアルファルファのそれぞれの発芽率との関係を示す。バミューダグラスは, 中汚染土の対照区で発芽せず, 軽汚染土の対照区で砂漠自然土区の 25% 以下であったが, いずれも処理区で 90% 以上に回復した。アルファルファは, 対照区で発芽せず, 中汚染土の処理区では砂漠自然土区の 85% 以上の発芽率に回復し, 軽汚染土の処理区で 60% 弱に回復した。

このように, 処理土での発芽は砂漠自然土に比較して若干劣ってはいるものの, 処理によって発芽率の回復してくることが確認できた。TPH としてはほぼ 1% を下回ると, 正常な発芽が可能な範囲に回復してくると言える。

## 4.2 圃場試験

4.2.1 試験内容と方法 上記およびポット試験による汚染土の修復確認を受けて, Table 2 で示したバイオレメディエーションで 15 カ月間処理された 4 種の処理土と無処理土および砂漠自然土を供試土とし, 植物にバミューダグラス, アルファルファを用いた植栽試験を現地で行った。それぞれ 5m × 5m × 0.3m の区を設けた。Photo 1 に実験状況を示す。肥料は化成肥料を使用し, 元肥として  $\text{N } 4\text{g}/\text{m}^2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ } 3\text{g}/\text{m}^2$ ,  $\text{K}_2\text{O } 2\text{g}/\text{m}^2$  を加え, 追肥は 1 カ月に 1 回同量を加えた。上記の実験区には, バミューダグラスは  $5\text{g}/\text{m}^2$ , アルファルファは  $22\text{g}/\text{m}^2$  の密度で播種した。灌水は, スプリンクラーを各区に 4 個ずつ設置し, 流量計で灌水量を管理した。飼料作物の管理法に準じて 1 カ月に 1 回程度の頻度で刈り込みを行った。

実験は 97 年 2 月中旬から 3 カ月間一作目を実施した。次に, バミューダグラスはほぼふく茎で生長するので一作目を継続し, アルファルファは同年 10 月からは同じ土に同条件で二作目を行った。この間植物体の生長解析 (植物体の長さ, 地上部質量測定等) を行った。

4.2.2 試験結果と考察 一作目では無処理土区を除いて砂漠自然土区とほぼ同様に発芽し, バイオレメディ

Table 2 現地植栽試験供試土の性状  
Soil Characteristics for Field Vegetation Experiment

供試土	TPH (%)	pH	EC (1:2) ( $\text{mS}/\text{cm}$ )	塩素イオン ( $\text{mg}/\text{kg}$ )	硫酸イオン ( $\text{mg}/\text{kg}$ )
<b>バミューダグラス 1回目植栽</b>					
ランドファミンク 中汚染土区	0.80	7.5	0.90	170	3500
ランドファミンク 軽汚染土区	0.29	7.7	0.67	105	1900
ウインドロー 中汚染土区	0.81	7.7	1.05	210	3875
スチック軽汚染土区	0.30	7.6	0.68	110	1700
無処理土区	3.26	7.5	11.65	5510	1600
砂漠自然土区	0.02	8.4	0.25	40	200
<b>バミューダグラス 2回目植栽</b>					
ランドファミンク 中汚染土区	0.58	8.4	0.30	70	3030
ランドファミンク 軽汚染土区	0.23	8.3	0.36	80	1770
ウインドロー 中汚染土区	0.79	8.4	0.25	80	3270
スチック軽汚染土区	0.22	8.6	0.21	60	1500
無処理土区	2.99	7.9	8.76	5150	2500
砂漠自然土区	0.03	8.9	0.31	60	320
<b>アルファルファ 1回目植栽</b>					
ランドファミンク 中汚染土区	0.71	7.8	1.06	190	3600
ランドファミンク 軽汚染土区	0.29	7.9	0.60	80	1950
ウインドロー 中汚染土区	0.98	7.8	1.23	260	3750
スチック軽汚染土区	0.34	7.7	0.71	85	1700
無処理土区	3.33	7.5	12.37	7190	1550
砂漠自然土区	0.02	8.0	0.27	80	170
<b>アルファルファ 2回目植栽</b>					
ランドファミンク 中汚染土区	0.54	8.4	0.40	80	2860
ランドファミンク 軽汚染土区	0.22	8.1	0.53	120	1830
ウインドロー 中汚染土区	0.79	8.2	0.37	80	3250
スチック軽汚染土区	0.20	8.3	0.67	120	1530
無処理土区	3.18	7.8	11.16	6320	2070
砂漠自然土区	0.03	8.6	0.22	60	410

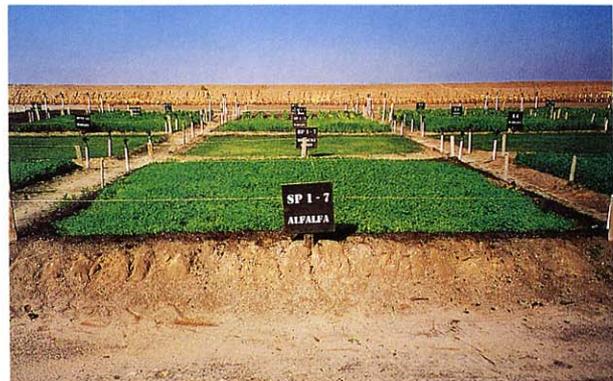


Photo 1 植栽試験区  
Test Plots for Field Vegetation Experiment

エーションの効果が明らかとなった。

一作目の地上部刈り取り収量調査の結果を Fig. 6 に例示する。試験区は 4 分割して調査し, その平均値およびばらつきを同図に示した。バミューダグラスは同図から分かるように, 無処理土区を除いて収量も砂漠自然土区とほぼ同等であった。軽汚染土処理区では中汚染土処理区よりまさる傾向が認められ, 土の修復の程度によって, 収量に差のあることをうかがわせた。一方, アルファル

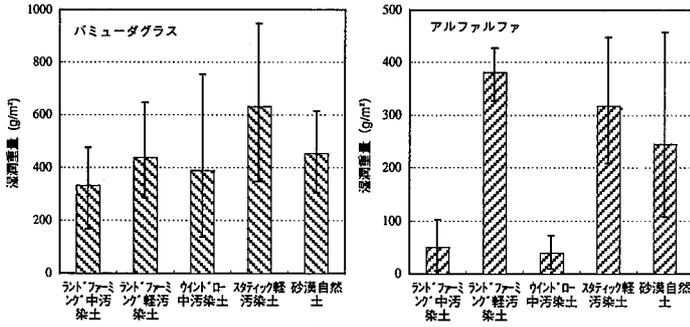


Fig. 6 刈り取り収量の例 (1作目)  
Amount of Harvest (First Cultivation)

ファは砂漠自然土区に比較し軽汚染土処理区で収量が上回ったものの、中汚染土処理区では大きく劣っていた。これは後述するように、処理土に含まれる塩分が関係して、植率を低下させたことによる可能性が考えられた。

二作目のバミューダグラス、アルファルファの地上部刈り取り収量調査の結果は図示しないが、両者とも処理土区のすべてで砂漠自然土区の収量を上回り、植率も回復した。一、二作目を通じて無処理土区の植物すべてが発芽せず、生育しなかった。

一作目と二作目の処理土の性状を比較すると、油分濃度の低下に比較し、塩分濃度の低下が著しい。このことから、一作目の植率に塩分濃度がより大きく関係していたと考えられる。

以上のことから、バイオレメディエーションによって、油汚染土を一作目によって十分に植生が生育できるまでに処理できると判断した。

#### 4.3 植物体への有害成分の集積

圃場実験一作目の供試土壌および栽培植物の成分検査を行い、処理土を緑化基盤材として利用した場合の安全性の評価を行った。石油成分についてはEPAの定めた有害多環芳香族炭化水素(PAH)16項目を検査項目に、重金属はクウェート原油に含まれているバナジウム、ニッケル、鉛、銅を、さらに硫黄も検査項目に加えた。

その結果、Table 3に示すように、多くのPAHは植物体から全く検出されなかった。検出されたPAHも検出下限値を下回っているものが多かった。フルオランテン、ベンゾ(a)アントラセン、インデノ(1,2,3-cd)ピレンに関しては、植物体から定常的に検出されたが、処理土区と砂漠自然土区の植物間に含有量の違いは見いだされなかった。土壌中のPAHと比較すると、すべてにおいて植物の方が低く、植物への集積はないことがわかった。植物の種類による違いも認められなかった。バナジウム、ニッケルに関しては、処理土で育った植物体内の濃度が、処理土の濃度より格段に低く、砂漠自然土で育った植物体内の濃度と同等であった。このことから、植物による集積は少ないか、もしくは無いことが分かった。植物体の鉛の濃度は全般に0.5mg/kgよりは低かったが、砂漠自然土で育った植物を含むすべての植物体内から検出された。土壌および植物体内から検出された銅濃度から特に集積する傾向は見いだされなかった。硫黄に関しては、すべての植物体内

Table 3 土壌および植物体中の多環芳香族、重金属および硫黄含有量

The Concentration of PAHs, Heavy Metals and Sulfur in the Soil and the Test Plants.

分析項目	植栽土			ラット・ファームینگ 中汚染土			ラット・ファームینگ 軽汚染土			砂漠自然土		
	土	Bg	Aa	土	Bg	Aa	土	Bg	Aa	土	Bg	Aa
多環芳香族炭化水素(μg/kg)												
ナフレン	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.
7メチルナフレン	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.
7メチルベンゼン	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.
フルオレン	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.
フルアントロン	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.
アントラセン	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.
フルオランテン	<10	17	14	<10	17	<5.2	<10	10	7.7	<10	7.7	17
ピレン	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.
ベンゾ(a)アントラセン	<10	12	11	<10	10	4.5	<10	10	4.9	<10	4.9	7.6
クリセン	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.	<100	n.d.	n.d.
ベンゾ(b)フルオランテン	<10	2.3	5.6	<10	4.2	<1.5	<10	4.2	<1.5	<10	1.6	2.2
ベンゾ(k)フルオランテン	<10	0.9	1.4	<10	1.1	1.3	<10	1.1	1.3	<10	<0.8	2
ベンゾ(a)ピレン	<10	1.1	1	<10	0.2	<0.7	<10	0.2	<0.7	<10	<0.7	<0.7
インデノ(1,2,3-cd)ピレン	40	1.5	<1.0	20	1	<1.0	<10	1	<1.0	<10	<1.0	<1.2
ジベンゾ(a,h)アントラセン	<10	<0.6	<0.6	<10	<0.7	<0.1	<10	<0.7	<0.1	<10	2.6	<0.9
ベンゾ(ghi)ペリレン	130	3	<2.2	60	2.6	<2.2	<10	<2.2	<2.5	<10	<2.2	<2.5
重金属(mg/kg)												
バナジウム	21	0.49	1.2	18.4	0.83	0.88	20.2	0.65	0.91			
ニッケル	22	0.98	1.9	20.2	1.3	1.7	22	1.8	3.2			
鉛	<20	0.1	0.35	<20	0.2	0.35	<20	0.2	0.25			
銅	6.1	5.5	7	8.6	7.5	7.5	4	4	7			
硫黄(%)	0.23	0.41	0.4	0.14	0.48	0.43	0.21	0.4	0.31			

Bg, バミューダグラス, Aa, 7メチル7メチル  
n.d. 不検出

の濃度が土壌内の濃度を約30%上回ったが、砂漠自然土も同じ傾向であった。以上のことからバイオレメディエーション処理後の土に植栽を行っても、植物体内には有害成分は移行せず、また集積することもないと判断された。

#### 5. あとがき

現在、ソイルパイルを効率的に混合する機械を導入するなどして、さらにコスト低減を目指した現地試験を検討をしている。また、クウェートの石油汚染土あるいは海浜等から難分解成分を分解可能な有用微生物を数株選抜できている。これらを用いた現地へのバイオオーグメンテーション(微生物の接種)を検討中である。一方、植栽試験では、クウェートの気候に適した草本類・木本類で大規模緑化を実現しており、長期にわたり生育のモニタリングを続けている。

#### 謝辞

本研究を進めるにあたって、東京大学農学部農学生命科学研究科の松本教授、小柳津教授、東京大学生物生産工学研究センターの大森教授に多大なる指導を受けた。また、分析作業において、(株)ジャパンエナジー分析センターの牧島主任研究員、(財)日本食品分析センターの佐藤課長にお世話になりました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 千野, 喜田, 辻: 大林組技術研究所報, No.52 (1996)
- 2) 千野, 辻, 石川, 四本: 大林組技術研究所報, No.54 (1997)