

# 油汚染土のバイオレメディエーション技術の高度化（その1）

- 堆肥の添加による多環芳香族炭化水素の分解 -

石川 洋二 千野 裕之  
辻 博和

## Advanced Technologies for Bioremediation of Oil Contaminated Soil (Part 1) Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Addition of Some Composts

Yoji Ishikawa Hiroyuki Chino  
Hirokazu Tsuji

### Abstract

The compost "Kiyoto #1" has been selected as a potential soil-additive that greatly degrades recalcitrant Polycyclic Aromatic Hydrocarbon compounds (PAHs). The addition of only 0.14 % (w/w) of the compost to the soil was found sufficient to degrade PAHs in an experiment using model contaminated soil with five of 3- or 4-rings PAHs. PAHs in the case coexisted with aliphatic oil, maintained its concentration somewhat unchanged at the beginning. However, it degraded quickly after 4 weeks, suggesting stimulation of PAHs degrading microorganisms by aliphatic oil and thus induction of enzymes. Other experimental results using one of the other inactive composts, indicate the excellent ability of "Kiyoto #1" to degrade PAHs due to the fermentation of organic matter (some types of animal feces) with woody material during its manufacturing process.

### 概要

難分解性物質である多環芳香族炭化水素 (PAHs) を分解する優れた能力を持つ堆肥「清戸1号」を選抜した。3環から4環に及び5種類のPAHsのモデル汚染土を用いた分解試験において、土に対しわずか重量比0.14%の堆肥の添加によってもPAHsの分解が確認された。PAHsと易分解性の飽和脂肪族油分が共存する系で見られたPAHs分解の初期の停滞と4週目以降の大きな加速は、脂肪族油分の存在によるPAHs分解酵素の誘導が一定の期間行われたことを示唆する。「清戸1号」が高いPAHs分解能力を発現したのは、堆肥製造過程における木材系材料と有機質材料（動物糞）の発酵によりPAHs分解微生物群が馴養されたからであるということが、堆肥加工品を用いた追加試験によって示唆された。

### 1. はじめに

油類で汚染された土の浄化の必要性が高いとの認識のもとに、これまで、油類汚染土の生物的修復（バイオレメディエーション）技術の開発を行ってきた。そのなかでは、バイオレメディエーションのための微生物環境条件の調査と最適制御法の確立、処理による分解達成度の見極め、処理土の安全性確認などを行ない、バイオレメディエーション適用のための基本的知見をすでに得ている。また、原油・重油・軽油・灯油などの油種、砂質土・粘性土などの土質、掘削の可否・周辺環境への配慮などの現場施工条件、などに応じて最適な修復方法が適用できるよう、種々の物理化学的手法とともに、バイオレメディエーション処理法についてもいくつかの方式を確立してきた<sup>1)</sup>。

一方で、国内における油汚染土浄化ニーズの顕在化と潜在的な市場規模の明確化に伴い、国内各社は浄化処理技術を競い合うようになり、必然的にバイオレメディエーション技術のより一層の高度化が望まれるようになってきた。すなわち、浄化処理期間の短縮、コスト低

減、難分解性物質の選択的分解などである。そこで、これらの高度化技術の確立を目指した研究開発を開始した。本報告では、ある種の堆肥の添加による難分解性物質の選択的分解効果について報告する。

汚染物質である油の構成成分のなかで有害性のほぼ確定しているものにBTEX（ベンゼン、トルエン、キシレン、および、エチルベンゼン）とPAHs（Poly-Aromatic Hydrocarbons、多環芳香族炭化水素）がある。前者は比較的揮発し易く除去しやすいのに対し、後者は生分解しにくい化合物が多く含まれる。PAHsが含まれる油汚染土は、広く原油や重油やタール系油などによる汚染の場合にも見られる。日本では、油の構成成分について土壌環境基準の定まっているのはベンゼン溶出量（0.01mg/L）のみであるが、オランダやカナダなどの環境汚染に敏感に対応する国では、PAHsのいくつかの化合物について含有量基準値が定められている。米国では、2環化合物から6環化合物にまでわたる16種類の多環芳香族炭化水素化合物が、環境保護局(EPA)により有害物質として指定されている。

油汚染土のバイオレメディエーションを行なう場合、これらの難分解性の多環芳香族炭化水素化合物が分解されず有害性が残る場合がある。無害化を目的とする修復の短期化、高効率化、高度化を図るためには、これらの物質を選択的に分解除去できる方法が開発されることが望まれている。

キノコ類を含む白色腐朽菌のなかには、その発する酵素の作用により、PAHsや、構造の類縁なPCB、ダイオキシン類を選択的に分解する能力を持つものが存在することが明らかになりつつあり、これらの特定の菌を汚染土浄化に適用する検討を著者のグループでも始めている<sup>2)</sup>。しかしながら、単一菌ゆえに常在微生物との競合が避けられないなどの課題も残る。

自然界の微生物は共存・共生・協同して活動するという視点から、近年複合微生物系の果たす役割が注目されている。そこで、農地への施用実績から安全性も確認されている各種堆肥の持つ豊かな微生物相に着目し、その汚染土への添加資材としてのPAHs分解能を調査したところ、「清戸1号」と名づけた堆肥が際立って優れた能力を示すことが明らかになった。

本報告では、「清戸1号」等の堆肥の汚染土浄化への適用に向けて、モデル汚染土を用いた実験を行ない、次の課題を検討、考察した。

- (1) PAHs分解能の高い堆肥の選抜 各種堆肥から、PAHs分解能の高い堆肥を選抜する。
- (2) 堆肥「清戸1号」の添加効果 最高分解能力の発揮条件を探る。
- (3) 脂肪族油分も共存する系でのPAHsの分解状況 実際の油汚染土には、PAHsばかりでなく他の構成成分が共存する。生物的修復の過程においては、易分解性成分の存在が、難分解性のPAHsの分解を遅延させる可能性もあり、一方、微生物相の馴養を促しPAHsの分解を促進する可能性もある。そこで、易分解性成分をPAHsと共存させた系での分解試験を行ない、共存系での分解過程を解析する。
- (4) 「清戸1号」の添加効果に関する考察 「清戸1号」の持つPAHs分解能力の発現した理由について追加試験に基づき考察する。

## 2. 実験概要

### 2.1 供試材料

実験は、多環芳香族炭化水素を含ませた砂に、供試堆肥を混合、養生することにより、多環芳香族炭化水素の減少を調べた。追加の実験条件として、多環芳香族炭化水素とともに脂肪族油分も加えた系を、脂肪族油分も共存する系とした。

砂としては、海砂(pH: 6.75, EC: 1200 $\mu$ S/cm)を用いた。多環芳香族炭化水素として、phenanthrene(PHE), anthracene(ANT), fluoranthene(FLU), pyrene(PYR), chrysene(CHR)(1級, 特級, あるいはlaboratory use)を、それぞれ砂に対し重量比で100ppmとなるように混合した。脂肪族油分としては、精製白色スピンドル油を、

上記砂に、濃度が重量比で1%となるように添加した。供試脂肪族油分の薄層クロマトグラフィーによる画分の分析結果は飽和分92%, 芳香族分7%, レジン分0%, アスファルテン分1%であった。

PAHs分解能の高い資材として選抜した堆肥は「清戸1号」と名づけたものであり、敷料としてパーク, おがくずを用い動物糞を発酵したものである。「清戸1号」の微生物相としては、細菌6.8E+8 cfu/g, 放線菌5.0E+7 cfu/g, 全菌数7.3E+8 cfu/gだった。滅菌堆肥は、当該堆肥を120 $\text{^\circ}$ で20分間オートクレーブ滅菌したものである。

対照材料として、堆肥Aは尿尿を材料としたもの、堆肥Bは下水汚泥を材料としたもの、堆肥Cは敷料として草, 栽培植物を用い動物糞を発酵したものである。堆肥Cの微生物相としては、細菌1.0E+7 cfu/g, 糸状菌2.4E+6 cfu/g, 全菌数1.2E+7 cfu/gであり、「清戸1号」の約60分の1の微生物数である。

堆肥加工品としては、堆肥Cにおがくずと米ぬかを入れて二次発酵させたものを用いた。これは、PAHs分解微生物群の賦活化を狙って二次発酵したもので、おがくずと米ぬかを添加後、35 $\text{^\circ}$ で切返しを行いながら2週間固体培養したものである。発酵後の菌数は4.3E+8 cfu/gだった。

### 2.2 実験方法

実験手順としては、まず、50gあるいは100gの砂を乾熱滅菌し、PAHs5種を、また場合により飽和族油分も加えて混合し、汚染土とした。これに、供試堆肥あるいは堆肥加工品を混合し、堆肥量に応じた培地を加え、綿栓で固めに栓をした三角フラスコ内で、すなわち、開放系で一定期間養生した。含水比は初期に同量となるように調整し、週に1回蒸発量を補給し、初期含水比を維持した。期間中は、30 $\text{^\circ}$ で静置し、1日に1回攪拌した。経時的にサンプリングし、定量分析を行った。

分析方法としては、PAHs濃度は、液体クロマトグラフィー(HPLC)による定量分析を行った。試料に無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して脱水した後、DMSOとジクロロメタンの混合液でPAHsを抽出して、HPLC(島津LC6A)にて分析した。pHとECは通常法で、微生物コロニー数cfuはYM2培地を用いる平板希釈法により好気性微生物数を求めた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 PAHs分解能の高い堆肥

各種堆肥をモデル汚染土に加え、一定期間養生後のPAHs分解能を調べた。モデル汚染土50gに対し13gの堆肥を加え、45日養生した後の結果をFig.1に示す。ここで示した堆肥A, 堆肥B, 「清戸1号」はいずれもPAHs濃度を減少させているが、「清戸1号」が、phenanthrene(PHE), anthracene(ANT), fluoranthene(FLU)の濃度を大きく減らしており、かつ、PAHsの合計濃度が130ppm以下と最も優れた浄化能を示した。同じくFig.1に示したように、滅菌した「清戸1号」の添加によるPAHs残存量が約280ppm

と高いことから、「清戸1号」によるPAHsの減少は、物理的な効果ではなく、堆肥中の微生物による分解効果によるものであることが示唆された。「清戸1号」の原材料は、堆肥Aや堆肥Bと異なり、動物糞と木材系物質であることから、PAHs分解能はこれらの材料に由来するものであると考えられる。

3.2 堆肥「清戸1号」の添加効果

「清戸1号」の添加量の多寡による分解量の違いを調べた。添加量として、土に対して重量比で26%から0.14%まで6水準の堆肥を添加したが、そのうち、1.4%(w/w)と0.14%(w/w)添加の結果をFig.2,3に示す。それぞれ、基質としてPAHsのみの汚染土 (Fig.2(A),3(A)), PAHsと飽和族油分を加えた汚染土 (Fig.2(B),3(B)) を示した。PAHs単独基質では、やや1.4%(w/w)添加系の方がPAHs分解速度が高い。しかし、PAHs + 脂肪族油分混合基質ではいずれも前半14日までのPAHs分解速度は低いが、その後急速に分解速度を高めて、56日目の成績ではむしろ0.14%添加区の方が、PAHsの全般に対して高分解率を示した。この場合、残存濃度は、難分解性のchrysene(CHR)でも25ppmと比較的低い値を示した。

重量比で0.14%と非常に少量の添加量であっても「清戸1号」の添加によるPAHsの分解効果はあったということになる。今回は滅菌した砂質土のモデル汚染土について

ではあるが、今後、実汚染土での添加効果を確認する。なお、データには示さないが、対照区(滅菌堆肥添加区あるいは無添加区)ではPAHsの減少は見られなかった。

3.3 脂肪族油分も共存する系でのPAHsの分解状況

Fig.1,2のPAHsのみの分解系(A), PAHsと飽和分の共存分解系(B), との比較から明らかなように、PAHsの分解過程は脂肪族油分の添加によって、反応開始後少なくとも14日までのPAHs分解速度は脂肪族油分%の添加によって低く抑制される。しかし、28日目に至って単独系、共

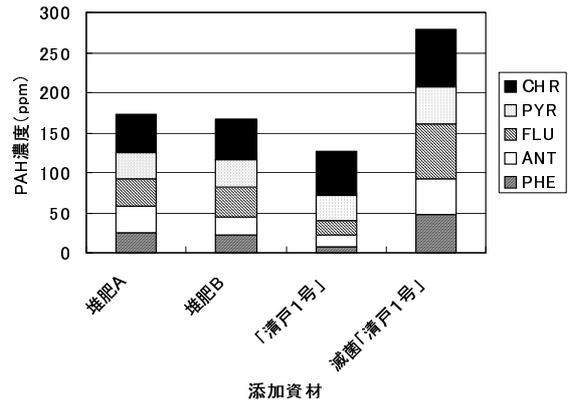


Fig.1 各種堆肥添加によるPAH分解能の比較 PAH Degradability of Composts

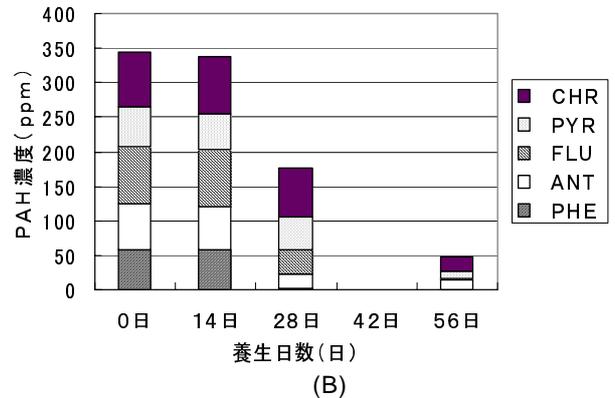
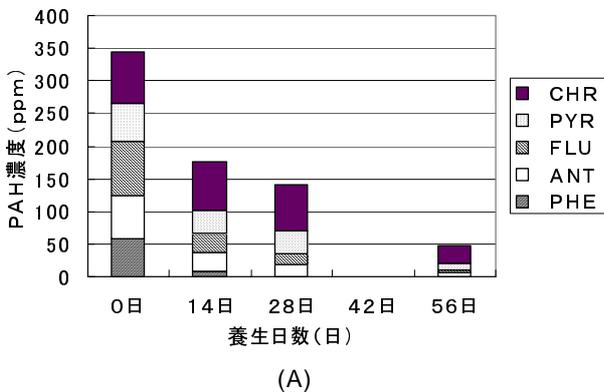


Fig.2 「清戸1号」添加によるPAHの分解 (堆肥1.4%添加) (A)PAHsのみの分解系 (B)PAHsと飽和分の共存分解系 Degradation of PAHs with 1.4% Addition of "Kiyoto #1" (A) only PAHs as degradable components(B) PAHs and aliphatic oil as degradable components

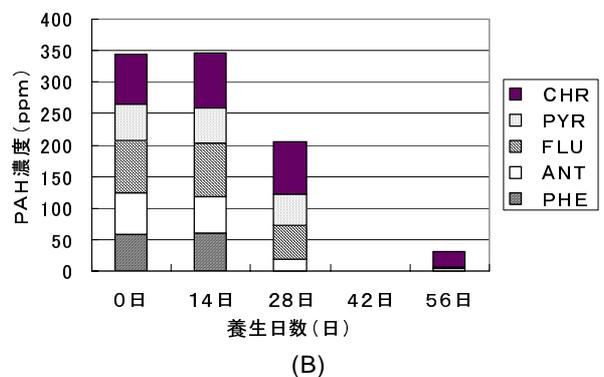
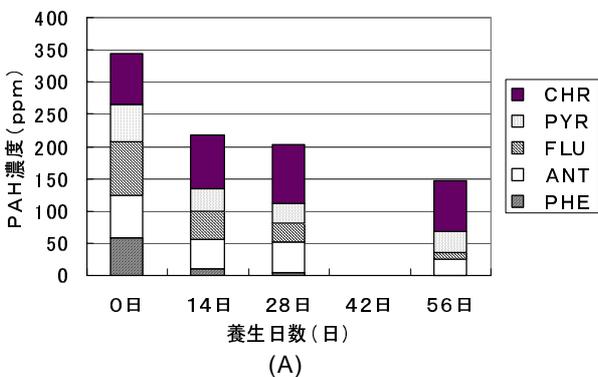


Fig.3 「清戸1号」添加によるPAHの分解 (堆肥0.14%添加) (A)PAHsのみの分解系 (B)PAHsと飽和分の共存分解系 Degradation of PAHs with 0.14% Addition of "Kiyoto #1" (A) only PAHs as degradable components(B) PAHs and aliphatic oil as degradable components

存系ともほぼ同じレベルになり、56日目にはむしろ逆転し、飽和族油分共存系の方がPAHs濃度が低くなる。実験終了時におけるpH、EC、微生物コロニー数を各場合ごとにTable 1に示す。pH、ECなどの物理的性質はどの場合もほぼ同様だが、微生物コロニー数は、PAHs単独系よりも飽和族油分単独系、さらに、それよりもPAHs+飽和族油分混合系の方で多くなる傾向がある。これは、易分解性の飽和族油分が存在することにより微生物数が増加していることを示す。共存系での28日目以降のPAHs濃度がやや急に減少していることは、この微生物数の増加が本来「清戸1号」が持っているPAHs分解能力を加速している可能性を示唆している。

### 3.4 「清戸1号」の添加効果に関する考察

「清戸1号」の特殊性として、敷料(材料)であるパークやおがくずなどの木材起源の物質に、PAHsと構造相関があるリグニンや脂肪族油分と構造類似の樹脂が含まれていたことが挙げられる。堆肥作製の過程で、これら木材起源物質に有機質材料(動物糞)を混合、発酵させた。この過程で、材料に本来含まれていたPAHsなどを資化分解する微生物群が馴養された可能性がある。

そこで、PAHs分解能力をそれほど持たない「堆肥C」と、これを木材起源物質を加え堆肥化した「堆肥C」加工品の添加効果についての追加試験を行なった。Fig.4に、資材0.14%添加後56日目のPAHs分解試験結果を示す。「堆肥C」自体は、PAHs単独系(A)でも150ppmまで、共存系(B)でも400ppmまでと、「清戸1号」の結果と比較して特に共存系においてPAHs分解性能が劣っている。共存系では、Table 1に示すように単独系に比べ微生物数が増加しているにもかかわらずPAHsの分解は進んでいない。一方、「堆肥C」加工品は、Fig.4に示すように単独系で約110ppm、共存系で約70ppmと、「堆肥C」自体と比べて高いPAHs分解能を示した。この結果は、馴養という加工過程が「堆肥C」にPAHs分解能力を賦与したことを意味している。以上の結果は、「清戸1号」の持つPAHs分解能力の由来の可能性を示唆する傍証に過ぎないが、今後、微生物群の動態を解析することにより「清戸1号」に代表される堆肥の持つPAHs分解能力の発現機構の解明に努める予定である。

## 4. おわりに

バイオレメディエーション技術の高度化のために、PAHsなどの難分解性物質の選択的分解を目指した研究の一環として以下の事柄が明らかになった。

複合微生物系資材としての堆肥に着目し、ある種の堆肥が高いPAHs分解能力を持つことが明らかになった。滅菌対照系との比較から、微生物群による分解であることが示唆された。重量比0.14%という少量の添加量でもPAHs分解が起こることが分かった。

PAHsと易分解性の飽和族油分とが共存する系において、養生約14日後まではPAHsの分解は起こりにくいが、その後、PAHs分解が促進される傾向が見られた。このとき飽和族油分の存在で微生物の数が増加していた。

Table 1 実験終了時におけるpH,EC,および微生物コロニー数 pH, EC, and cfu at the End of the Experiments

堆肥種類 堆肥添加量(重量比)	基質	pH	EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	cfu (/g)
「清戸1号」 1.4%	PAH	7.60	460	6.3 E+6
	油	9.22	270	3.1 E+7
	PAH+油	9.23	290	4.1 E+7
「清戸1号」 0.14%	PAH	8.36	140	1.2 E+7
	油	8.40	100	1.5 E+8
	PAH+油	7.93	80	5.2 E+7
「堆肥C」 7%	PAH	8.31	480	3.6 E+7
	油	7.46	330	1.2 E+8
	PAH+油	7.91	310	1.9 E+8
「堆肥C」 1.4%	PAH	8.12	180	2.9 E+7
	油	7.88	160	1.2 E+8
	PAH+油	7.86	170	2.3 E+8
「堆肥C」 0.14%	PAH	8.13	90	5.8 E+6
	油	7.88	100	1.1 E+8
	PAH+油	7.89	110	1.2 E+8

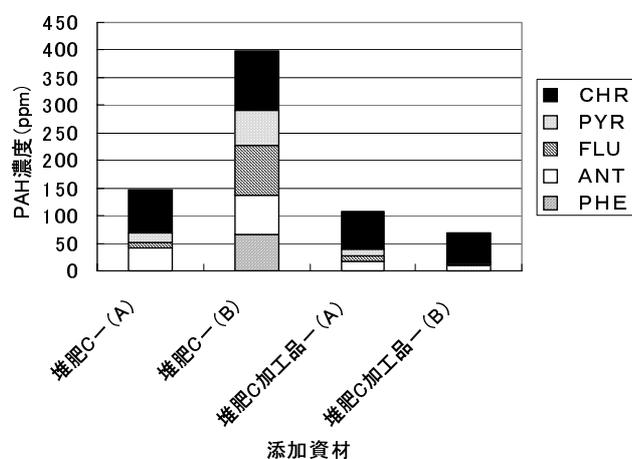


Fig.4 養生56日目における堆肥Cおよび堆肥C加工品によるPAHs分解効果  
(A)PAHsのみの分解系 (B)PAHsと飽和分の共存分解系  
Degradation of PAHs at 56 days after Addition of Compost-C and Modified Compost-C  
(A) only PAHs as degradable components  
(B) PAHs and aliphatic oil as degradable components

PAHs分解能力をそれほど持たない堆肥が、木材起源の材料も加えて馴養することにより、PAHs分解能力を獲得した。

今後、微生物学的な解析を行なうことにより、「清戸1号」の分解能力機構を解明するとともに、実汚染土での試験を通して他の微生物の競合・共存する系での分解条件を明確にすることにより、堆肥添加によるバイオレメディエーションの高度化の実用化を実現していきたい。

### 参考文献

- 1) 千野, 辻, 石川, 松原「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4)」, 大林組技術研究所報, No.62, (2001)。
- 2) 岡田, 大出, 大島, 辻「キノコ菌床のリグニン分解酵素活性と多環芳香族炭化水素の分解能」, 日本農芸化学会誌, 74巻臨時増刊号, p385, 2000年3月。