

## 特集 「土壌汚染と対策技術」

### 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6）

#### 分解微生物の有効性の評価方法と浄化処理期間の短縮化技術の開発



四本 瑞世



千野 裕之



石川 洋二  
(本社土木技術本部環境技術第二部)

### Study on Bioremediation of Oil Contaminated Soil (Part 6)

#### Availability of dehydrogenase activity as an indicator of the bioremediation process and development of a method to shorten it

Mizuyo Yotsumoto Hiroyuki Chino Yoji Ishikawa

#### Abstract

In bioremediation of oil contaminated soil, dehydrogenase activity is found to be a good indicator of the degradation process because (1) it correlates well to the reduction of oil content, (2) it indicates a nutrient shortage and an end of the degradation process, (3) it can be measured quickly, in only two days, and (4) the measurement procedure is simple. Thus, measurement of dehydrogenase activity is concluded to be an effective monitoring method for quality control of actual bioremediation work. In order to shorten the bioremediation process, the addition of 10% of soil enriched with degradable microorganisms as a soil additive enhances the decomposition rate at an earlier stage, and thus the total bioremediation period can be shortened by approximately one month. If bioremediation is applied in cold conditions, i.e. such as in winter, an easily degradable organic material such as cow manure is shown to be a good soil additive because it raises soil temperature and accelerates the decomposition process.

#### 概要

油汚染土のバイオレメディエーション（以下、微生物浄化）において、土壌酵素の一つであるデヒドロゲナーゼ活性は、油分減少に対して相関があり、養分不足や浄化終了の判断に適用できることがわかった。

また、本酵素の測定は、2日間と短く簡易であるので、浄化工事における分解微生物の有効性を評価するためのモニタリングの一つとして有効である。

浄化処理期間は、種菌保有土を約10%添加することにより、初期の分解が促進され、約1ヶ月短縮できる。

冬期施工対策として、牛糞などの易分解性有機物の添加は、地温の上昇及び分解促進という点からも有効である。

#### 1. はじめに

土壌汚染対策法が2003年に施行されたが、石油系炭化水素による土壌汚染対策に関して、ベンゼンを除き、特定有害物質として指定されなかった。しかし、石油特有の臭気は、比較的低濃度でも強く感じられ、また油膜の発生により周辺住民から汚染と認識されやすいために、浄化対策が実施されるようになってきている。

油汚染土の浄化技術には、短期間で確実な浄化が可能な加熱処理があるものの、環境負荷が少なく、処理コストが低いといった面から、微生物浄化のニーズが高いのが現状である。

実際に、各地で微生物浄化による対策がなされているが、日本国内で実施する際、油の種類や土質、気候条件

に適合した施工方法が必要とされる。特に、微生物浄化は、汚染物質の分解を微生物に依存するため、物理化学的処理よりも時間を要するだけでなく、気温が下がる冬期には、分解活性が低下するので、通常の処理では浄化できない。しかし、工期が限られている場合には、低温時期への対策として、工期短縮化技術の開発が必要である。

また、浄化工事において、浄化が順調に進んでいるか、浄化が終了したかを判断するのに定期的なモニタリングは必要であり、土壌内の情報を迅速にかつ正確に収集することが求められる。特に、微生物による効果的な浄化を行うためには、項目として、油分の測定だけでなく、微生物の分解活性を評価する必要がある。更に、その結果が直ぐに現場に反映されるためには、操作が簡易

で、かつ短期間で測定できる方法が求められる。

本報では、まず、分解微生物の有効性の評価法として、土壌酵素の一つであるデヒドロゲナーゼ活性の測定を試みた。

次に、温度条件の違いによる油分解速度を明らかにした後に、浄化処理期間の短縮化技術として、種菌保有土(分解微生物の活性が高い土)を添加することによる馴養期間の短縮化、更に、有機資材の堆肥化過程の熱を利用した加温効果について報告する。

## 2. 土壌酵素測定による分解微生物有効性の評価

### 2.1 試験内容

これまで、我々は、分解微生物の有効性を評価するモニタリング法として、石油成分(例えばC16)を唯一の炭素源として資化できる菌を培養し、生育したコロニー数を計数する培養法を実施してきた。この方法は、油分解との相関は必ずしも良好でなく、培養期間が2週間と長期にわたるといった問題があった。一方、我々は、既報<sup>1)</sup>で、土壌酵素の一つであるデヒドロゲナーゼ活性が油分解とよい相関があることを見いだした。

そこで、本報では、浄化工事における施工モニタリングとしての上記酵素測定の適用性について検討した。具体的には、微生物浄化処理の有無によるデヒドロゲナーゼ活性を測定し、試験法としての妥当性を評価した上で、実証試験を実施し、その適用性について他の微生物のモニタリング法と比較した。

### 2.2 微生物浄化処理の有無と酵素活性

2.2.1 方法 デヒドロゲナーゼは、AH(基質)+B(電子受容体) A+BHの反応を触媒する酵素であり、その活性は、反応によって生じたBHを抽出して還元型色素に由来する吸光度を測光して測定する。

方法<sup>2)</sup>について、中型試験管に土サンプル(生土の状態)で2mm篩を通したもの)1.0gを秤取し、0.25Mトリス緩衝液(pH7.6)0.7mlを加えたものを土壌懸濁液とした。電子受容体として、既報では、トリフェニルテトラゾリウムクロライド(TTC)を用いたが、Trevors(1984)<sup>3)</sup>によって、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウムクロライド(INT)が、TTCよりもデヒドロゲナーゼの電子受容体として優れていることが示されていたため、本報ではINTを使用した。次に、土壌懸濁液に、INT1%溶液を0.3ml添加しミキサーで攪拌後、遮光条件下30℃で最大24時間反応させた。反応によって生成した赤紫色フォルマザンについて、メタノール約9mlを加え、1分攪拌後濾過することにより抽出し、分光光度計によりA<sub>485nm</sub>を測光した。土サンプルとして、浄化処理土及び無処理土の油汚染土の2種類について、酵素活性を比較した。

2.2.2 結果及び考察 Fig. 1に、浄化処理土及び無

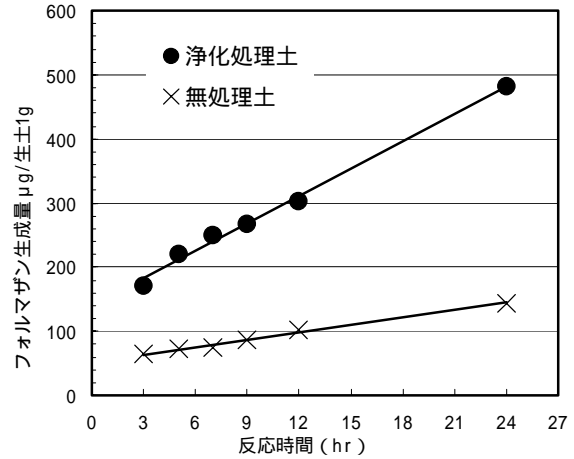


Fig. 1 浄化処理土及び無処理土のデヒドロゲナーゼ活性  
Dehydrogenase Activity of Treated and Untreated Soil

処理土の2種類の土について、反応時間の違いによるデヒドロゲナーゼ活性を示した。これより、浄化処理土のデヒドロゲナーゼ活性は、無処理土に比べて、3倍以上高く、また、反応時間24時間まで直線性があることが示された。

以上より、INTを電子受容体としたデヒドロゲナーゼ活性の測定は、浄化処理土の評価に有効であるとわかった。

### 2.3 現場実証試験

2.3.1 試験概要 微生物浄化処理について、油分濃度として9200mg/kg乾土(n-ヘキサン抽出油分)のC重油汚染土に、所定量の栄養及び資材を加え、1~3回/週の頻度で攪拌を行い、水分の蒸発を防ぐためシート養生を施した。浄化処理期間は、5月末より約7ヶ月間とし、その間定期的にモニタリングを実施した。

モニタリング項目は、油分として、迅速溶媒抽出装置(ソクステック)によるn-ヘキサン抽出重量法による油分含有量と、薄層クロマトとFID分析による石油画分(脂肪族、芳香族、レジン、アスファルテン)の分析、それ以外に、油臭及び油膜について実施した。養分として、硝酸態窒素を測定した。

デヒドロゲナーゼ活性の測定は、2.2.1に従い、反応時間は、土をサンプリングし、試料調整から吸光度測定まで2日間完了するように18時間とした。また、フォルマザン生成量をnmol/hr/g乾土で表示した。それ以外に、従来の測定法である培養法、及び呼吸活性について測定した。培養法は、ヘキサデカンを唯一の炭素源とした培地を用いて、25℃条件下で2週間培養して生育したコロニーを計数し、呼吸活性<sup>2)</sup>は、25℃で7日間培養後の炭酸ガス発生量を測定した。

2.3.2 結果及び考察 Fig. 2に浄化処理による油分の減少とデヒドロゲナーゼ活性及び養分の変化を示した。

これより、浄化処理開始後、デヒドロゲナーゼ活性は上昇したが、処理2ヶ月後に大きく低下した。硝酸態窒

素が1.5ヶ月後の測定の際、検出限界値であった為、栄養の追添加を行い浄化処理を継続したところ、再びデヒドロゲナーゼ活性は上昇し、油分が減少した。

浄化処理7ヶ月後の測定では、油分の低減は認められず、デヒドロゲナーゼ活性も低下したため、低温時による微生物活性の停滞も考えられたが、脂肪族成分及び芳香族成分の減少量より、油分解はほぼ終了したと判断された。

次に、Fig. 3に浄化処理3ヶ月までの各微生物のモニタリング結果の比較を示した。これより、呼吸活性やヘキサデカン分解菌数が、デヒドロゲナーゼ活性と同様な変化を示すことがわかった。

以上より、デヒドロゲナーゼ活性は、油分の減少に対応しているだけでなく、養分不足や浄化終了の判断に適用できることがわかった。また、他の微生物モニタリングと比較して、測定が短期間であり、分光光度計以外は特別な装置が不用であること、操作も簡易であることから、浄化工事におけるモニタリングの一つとして有効であることがわかった。今後、浄化工事現場で広く活用していくためには、測定頻度や、測定結果における具体的な対応や判断基準について、マニュアル化していくことが課題である。

### 3. 温度条件の違いによる分解速度について

#### 3.1 試験内容

微生物の分解活性は、気候条件、気温によって大きく影響するため、浄化処理期間を算出するためには、温度条件の違いによる分解速度を明らかにしておく必要がある。そこで、本章では、温度条件の違いによる微生物浄化試験を実施した。

#### 3.2 方法

まず、300ml容三角フラスコに、油分濃度として約50,000mg/kg乾土(n-ヘキサン抽出油分)の汚染土10gと栄養及び水を添加し、温度条件として、5・15・20・25・35の5条件で養生した。フラスコ内にアルカリ溶液を入れた小瓶をセットし、1週間に1度これを取り替え、吸収した二酸化炭素を定量した。

次に、1/5000 aのポットを用いて、油分濃度として約5,000mg/kg乾土(n-ヘキサン抽出油分)のC重油汚染土に栄養等資材を加え、4、15、25の温度条件で養生し、定期的に油分含有量を測定した。

#### 3.3 結果及び考察

フラスコ試験の結果について、試験開始1ヶ月後までに発生した二酸化炭素の総量から、汚染土に含まれる全炭素の二酸化炭素変換率を求めたところ、温度と二酸化炭素変換率との間に、Fig. 4に示すような相関が認められた。これより、15における分解速度は25の約1/2に、10では25の約1/3になることがわかった。

次に、ポット試験の結果について、Fig. 5に、各温度

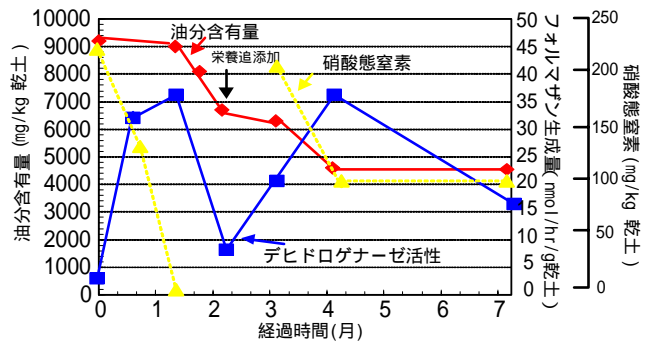


Fig. 2 油分の減少とデヒドロゲナーゼ活性の変化  
Reduction of Oil Contents and Variation of Dehydrogenase Activity

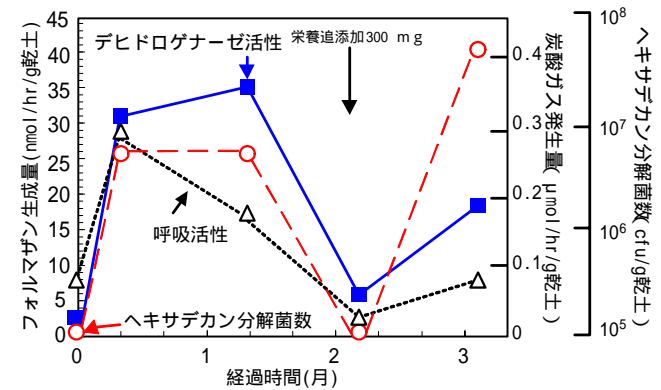


Fig. 3 各微生物モニタリングの比較  
Comparison of Bioactivity measuring Methods

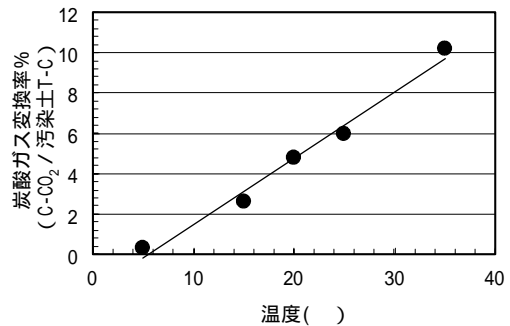


Fig. 4 温度条件の違いによる炭酸ガス発生量  
Effect of Temperature on Carbon Dioxide Emission

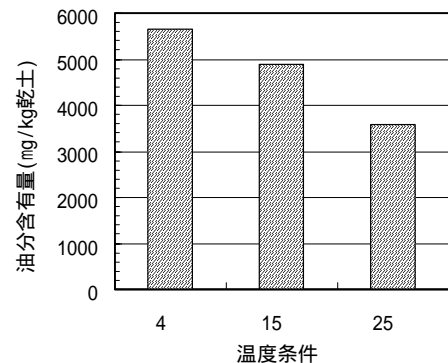


Fig. 5 ポット試験2週間後における各試験区の油分量  
Effect of Temperature on Oil Contents Reduction

条件における試験開始 2週間後の油分含有量を示した。  
 これより、4 の温度条件では、油分の減少が認められなかった。一方、25 条件下では、4 と比較して油分が37%減少したのに対し、15 では14%の減少量であった。  
 すなわち、15 における分解速度は25 の1/2.5と、フラスコ試験とほぼ同様な傾向を示しており、油分濃度や試験方法に影響されないことがわかった。

#### 4. 種菌保有土添加による浄化処理期間の短縮化

##### 4.1 試験内容

種菌保有土とは、分解微生物が増殖し、分解活性が高い土をいう。1章でも述べたが、微生物浄化に時間がかかる原因として、汚染土中に存在する分解微生物を増殖させ、活性化させる必要があり、その立ち上がり期間(馴養期間)が必要となる為と考えられる。そこで、本章では、種菌保有土の添加による馴養期間の短縮化について、室内試験、及び実証試験を行った。

##### 4.2 室内試験による種菌保有土添加効果

4.2.1 方法 これまでの油汚染土における微生物浄化試験より、油分分解に伴い、デヒドロゲナーゼ活性は最大約60nmol/hr/g乾土まで上昇することがわかっており、その時点で、微生物の分解活性は最大になっていると考えられる。そこで、今回 C重油汚染土(油分濃度: 5100mg/kg乾土、脂肪酸成分60%、芳香族成分20%)に養分及び資材を添加後、2回/週の頻度で攪拌し、デヒドロゲナーゼ活性が最大値付近まで上昇した土を種菌保有土とした。次に、同じ汚染土で浄化未処理土に、種菌保有土を混合し、1/5000 aポットに詰め、25 の恒温室内で養生した。種菌保有土の添加量は、実用性を考慮し、0%、4%、8%とした。攪拌及び水分の添加は、1回/週の頻度で行い、定期的に土をサンプリングし、油分含有量の測定及び石油画分の分析を行った。

4.2.2 結果及び考察 Fig. 6に種菌保有土無添加区、Fig. 7に8%添加区における画分成分の経時変化を示した。これより、種菌保有土無添加区における0.5ヶ月(2週間)後の脂肪酸成分及び芳香族成分量は、開始時の10%程度の減少であったのに対し、8%添加区ではそれぞれ30~35%の減少と、種菌保有土添加による分解促進が認められた。当該汚染土の微生物浄化到達度は、脂肪酸成分、芳香族成分ともに約50%の分解率と推定しているが、種菌保有土無添加区では2ヶ月経過後で芳香族成分が残存しているのに対して、8%添加区では脂肪酸成分及び芳香族成分ともに、分解がほぼ終了していることがわかった。

次に、種菌保有土の添加量について、試験開始0.5ヶ月後における種菌保有土0%、4%、8%添加区の画分分析結果をFig. 8に示した。これより、種菌保有土無添加

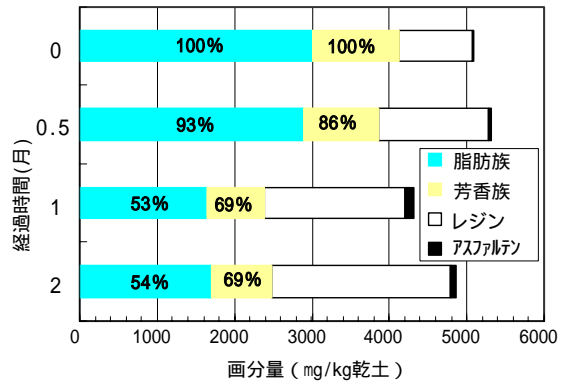


Fig. 6 種菌保有土無添加区の画分成分の経時変化  
Oil Fraction of Control Soil vs. Time

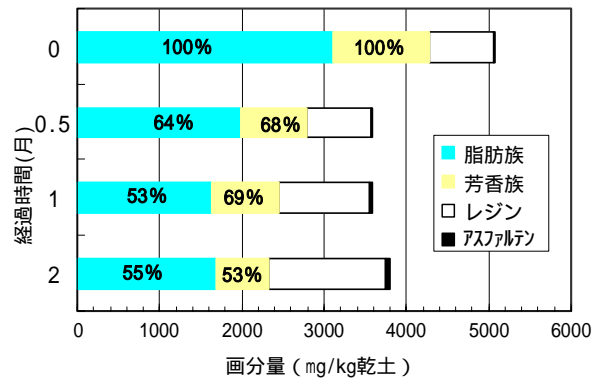


Fig. 7 種菌保有土8%添加区の画分成分の経時変化  
Fraction Analysis with 8% Addition of soil enriched with Degradable micro-organisms vs. Time

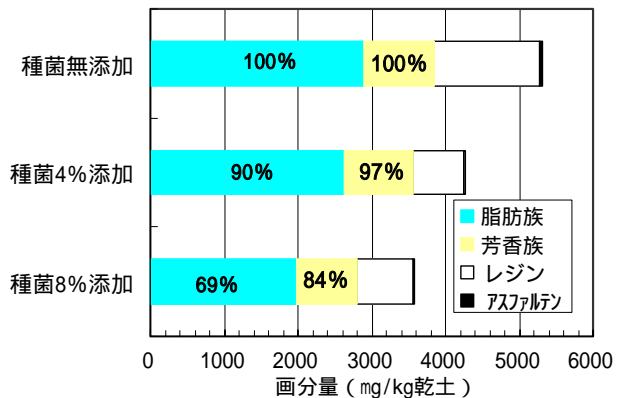


Fig. 8 種菌保有土添加量の違いによる画分分析結果  
Effect of Added Level of Soil Enriched with Degradable micro-organisms on Oil Fraction

区における画分量を100%とした際、4%添加区の脂肪酸成分及び芳香族成分の減少量は3~10%となり、8%添加区と比較すると、分解促進効果は低く、添加量としては8%程度必要であることがわかった。

##### 4.3 現場実証試験

4.3.1 試験の概要 油分濃度として5400mg/kg乾土(脂肪酸成分50%、芳香族成分27%、デヒドロゲナーゼ活性: 2.2nmol/hr/g乾土)のC重油汚染土に、肥料及び種菌保有土(デヒドロゲナーゼ活性: 55.4nmol/hr/g乾土)を10%添加し、5月末~9月初旬まで浄化処理を実施

した。モニタリングは2.3.1と同様に行った。

4.3.2 結果及び考察 Fig. 9に油分の減少とデヒドロゲナーゼ活性の経時変化, Fig. 10に画分成分の経時変化を示した。

これより、浄化処理0.5ヶ月後のデヒドロゲナーゼ活性の値は30nmol/hr/g乾土まで上昇し、それに伴い油分も減少した。試験開始2.5ヶ月目以降、8月~9月と高温期にも関わらず、デヒドロゲナーゼ活性は低下した。

一方、Fig. 10の2.5ヶ月後の画分分析の結果より、脂肪酸成分及び芳香族成分の残存率は約50%と油分分解がほぼ終了しており、微生物活性の低下はこれによるものと考えられた。なお、油臭・油膜についても、2.5ヶ月後にはほぼ消失した。

以上の結果より、夏期施工の場合、浄化処理期間を3.5ヶ月としていたが、種菌保有土の添加により、2.5ヶ月に短縮可能であることがわかった。

## 5. 有機資材の堆肥化過程熱を利用した冬期施工について

### 5.1 試験内容

3章の結果より、15における油分分解速度は25の1/2であり、処理期間は2倍になると算出される。工期によっては、12月~3月といった平均気温が10を下回る時期においても浄化処理の検討が必要となる場合があり、冬期施工対策は必須である。

これまでに、我々は、室内試験において、牛糞等易分解性有機物を3~6%(W/W)添加することにより、外気温が4に対して、地温が7~20に上昇し、油分が分解促進されることを確認している。そこで、有機資材添加による冬期施工の可能性について現場実証試験を行った。

### 5.2 方法

C重油汚染土(油分濃度:2000~2600mg/kg乾土)について、2重のシート養生等を施した畝(保温対策区)、保温対策に加えて浄化処理開始3週間後に牛糞(水分67%,全炭素42%,全窒素2%)を5%(W/W)添加した畝(加温対策区)、保温対策をしない畝(対照区)の3種類を造成した。11月中旬~4月中旬まで、1~2回/週の頻度で攪拌を行い、浄化処理を行った。なお、畝の高さは1.2mとし、肥料及び種菌保有土の添加はこれまでと同様に、モニタリングは地温測定を追加して実施した。また、加温区では経時サンプルの一部について強熱減量を測定した。

### 5.3 結果及び考察

Fig. 11に各処理区の1.5ヶ月後(加温区は牛糞添加10日後)における攪拌直後から3日後までの平均気温、畝の天端より0.3m, 0.6m深の平均地温を示した。

これより、0.3m深の地温において、各処理区の効果

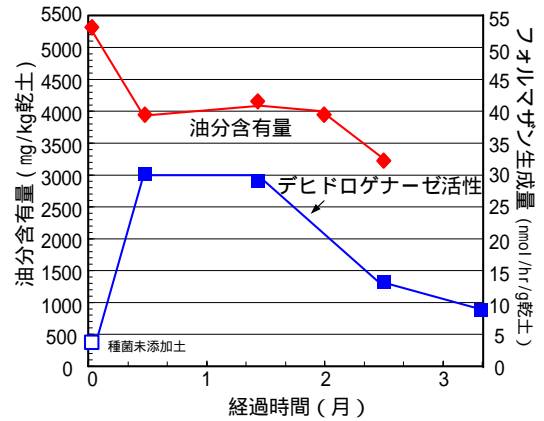


Fig. 9 油分の減少とデヒドロゲナーゼ活性の変化  
Oil Contents and Dehydrogenase Activity vs. Time

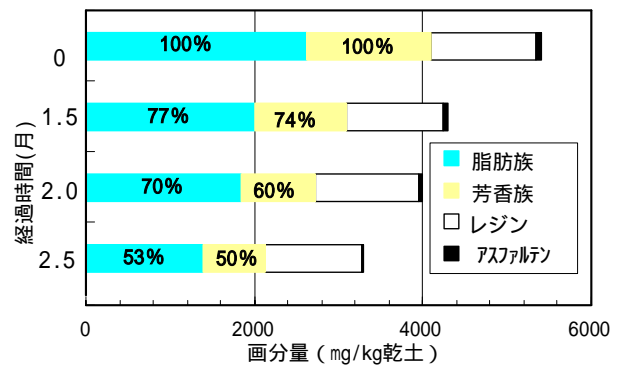


Fig. 10 画分成分の経時変化  
Oil Fraction vs. Time

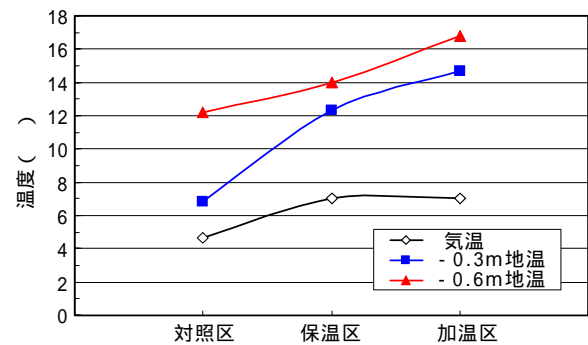


Fig. 11 各処理区の気温及び地温  
Ambient & Soil Temperature vs. Time

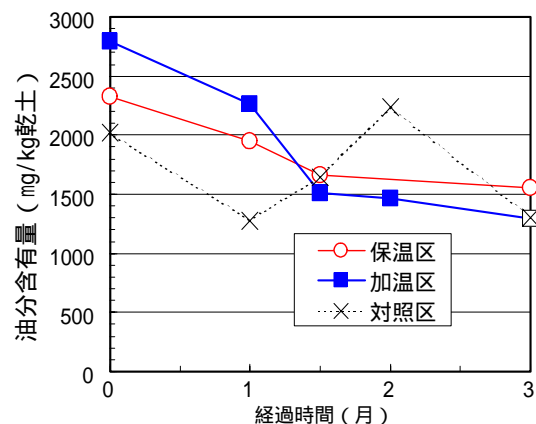


Fig. 12 各処理区の油分含有量の変化  
Amount of Oil Contents vs. Time

が認められ、気温に対して保温区で5、加温区で8の温度上昇が認められた。次に、Fig. 12に各処理区の油分含有量の経時変化を示した。これより、保温区及び加温区では、油分の経時的な減少が認められ、減少程度は、保温区よりも加温区の方が優れていた。

次に、Fig. 13及びFig. 14に、それぞれ保温区及び加温区の画分成分の経時変化を示した。これより、保温区において、浄化処理3ヶ月後の脂肪族成分・芳香族成分の残存量は、それぞれ64%、78%と、まだ油分分解が終了していなかった。Fig. 4の温度と分解速度の関係と、保温区の地温(12~14)から、浄化処理期間は夏期(2.5ヶ月)の約2倍と推定された。

一方、加温区では、浄化処理1.5ヶ月後(牛糞添加3週間後)に脂肪族成分及び芳香族成分が急激に減少した。その後の分析結果より、3ヶ月間の処理で油分分解は終了したと判断し、維持管理を終えた。以上より、牛糞等の有機資材の添加は、温度上昇以外に分解促進効果が期待できることがわかった。

次に、牛糞添加による処理土中の有機物含有量について、加温区における強熱減量の測定結果をTable 1に示した。これより、牛糞添加によって強熱減量は4.7%から9.4%に上昇し、浄化処理終了土では8.9%であった。

浄化処理土を地盤材料として考えた場合、強熱減量はなるべく少ない方が望ましい。これについては、牛糞以外の有機資材も含め、5%より更に低濃度での添加効果を現在検討中であり、今後報告していきたいと考えている。

## 6. まとめ

油汚染土の微生物浄化に関して、浄化工事におけるモニタリングとしての土壤酵素測定の有効性、及び浄化処理期間の短縮化技術について、室内及び実証試験を行い、以下のことを明らかにした。

- 1) 土壤酵素の一つであるデヒドロゲナーゼ活性は、油分減少に対して相関があり、養分不足や浄化終了の判断に適用できることがわかった。また、本酵素の測定は、2日間と短く簡易であるため、浄化工事における分解微生物の有効性を評価するためのモニタリングの一つとして有効である。
- 2) 温度の違いによる油分分解速度について、15条件下では25の約1/2、10条件下では25の約1/3に低下する。
- 3) 種菌保有土を添加することにより、初期の分解速度は促進され、浄化処理期間を約1ヶ月程度短縮可能である。添加量は10%程度が望ましい。
- 4) 冬期施工対策として、牛糞などの易分解性有機物の添加は、地温の上昇及び分解促進という点からも有効で

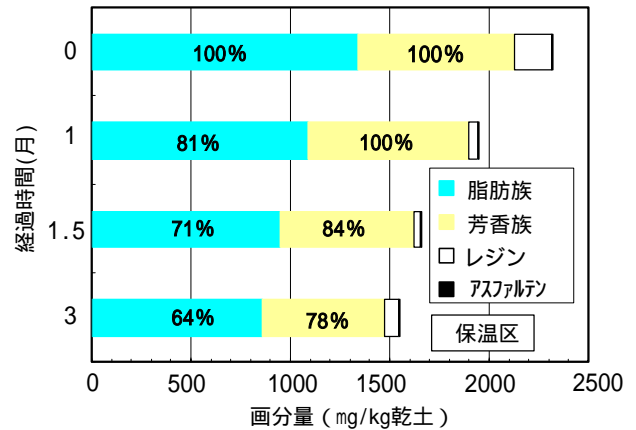


Fig. 13 保温区の画分成分の変化  
Oil Fraction in Warm Soil vs. Time

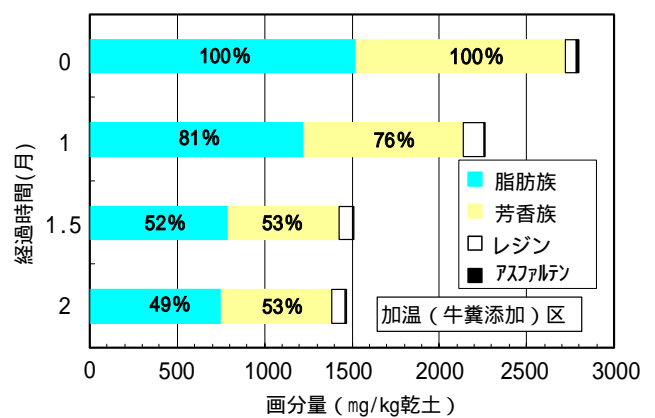


Fig. 14 加温区の画分成分の変化  
Oil Fraction in Soil with Cow Manure vs. Time

Table 1 加温区における強熱減量の変化  
Ignition loss in Soil with Cow Manure

時期	強熱減量(%乾土)
浄化処理開始直後 (牛糞未添加)	4.7
浄化処理1ヶ月後 (牛糞添加直後)	9.4
浄化処理3ヶ月後	8.9

あり、浄化処理期間をかなり短縮できる。

## 参考文献

- 1) 千野, 他: 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) 土壤微生物実験法, 土壤微生物研究会編, 養賢堂(1992)
- 3) Trevors J.T.: Dehydrogenase Activity in Soil: A Comparison Between the INT and TTC Assay, *Soil Biol. Biochem.*, Vol.16, pp673-674, (1984)