

ベンゼン汚染土の微生物処理における前培養効果の基礎的研究

室内実験と数値解析モデル化

三好 悟 大島 義徳
四本 瑞世 久保 博

Fundamental Study on Pre-culture Effect for Bioremediation of Benzene-contaminated Soil

— Laboratory Experiments and Numerical Modeling —

Satoru Miyoshi Yoshinori Oshima
Mizuyo Yotsumoto Hiroshi Kubo

Abstract

Pre-culture technology for bioremediation of benzene-contaminated soil was introduced and its effect was studied. In pre-culture technology, pumped-up water is cultured only with benzene as a carbon source and is injected in order to promote decontamination. The results of experimental studies show that this pre-culture technology is effective for degradation of benzene in the liquid phase but is not for benzene in the solid phase. In addition, the phenomena were successfully modeled in batch experiments.

概要

ベンゼン汚染土の原位置微生物浄化を促進する前培養方式の効果を室内試験によって検討した。前培養方式は、現地土や地下水を用いてベンゼンを唯一の炭素源として好気培養した液を地盤に再注入し、原位置浄化の効果を促進する工法である。バッチおよびカラム試験系を用いた室内試験によって検討した結果、土の少ないスラリー培養系や土壌カラムなどの液相に含まれるベンゼンは前培養液の効果によって分解されるが、土に含まれるベンゼンに対しては顕著な効果が得られないことがわかった。また、ベンゼンの吸着を非平衡吸着式で、微生物によるベンゼン分解挙動をMultiple Monod式でモデル化した連立方程式によって、バッチ試験系におけるベンゼン分解培養試験を数値解析モデル化することができた。

1. はじめに

ベンゼン汚染土壌を原位置微生物酸化によって浄化した事例が報告されている¹⁾。一般的にこのような原位置での浄化処理は、低コストという長所がある反面、掘削による処理に比べて確実性が低く処理時間が長いという短所を持っており、それらを克服することが望まれている。

ある汚染土を用いた検討の結果、栄養と酸素を十分に与えるだけではベンゼン分解微生物を活性化させるのが難しいことがわかった。このことを、2章で述べる。

以上のようなベンゼン汚染土の原位置微生物酸化処理工法の課題を克服する方法として、前培養方式が考案されている²⁾。前培養方式は、現場揚水に、ベンゼンのみを唯一の炭素源として培養する処理(前培養処理)を加えて地盤に再注入することにより、原位置微生物浄化の効果を促進する工法である。

地上設備で純粋培養に近い環境で増殖した微生物が地盤中に注入された場合、土壌のさまざまな阻害要因によって優位に活動できないことが考えられる。ここでは、室内試験によって、ベンゼン分解微生物による土中でのベンゼン分解の度合いを調べ、前培養方式の成立性を検証した。

土による阻害の程度を確認するために、添加土量の異なるいくつかのスラリー培養系に、前培養したベンゼン分解

微生物を添加して好気養生し、ベンゼン分解の程度を調べた。この試験の方法および結果について3章で述べる。

また、実際に現地盤に注入された微生物は、上記のスラリー試験系よりも、酸素や基質であるベンゼンに接触する頻度が少ないと考えられる。注入した微生物による土壌間隙でのベンゼン分解効率を確認するために、カラム試験系を用いてベンゼン分解試験を実施した。この試験の方法および結果について4章で述べる。

また、前培養方式による浄化効果を予測評価する数値解析手法を確立するための準備として、バッチ培養系におけるベンゼン分解挙動の数値解析モデル化を試み、スラリー培養試験のシミュレーションを試みた³⁾。この解析の手法および試験解析の結果について5章で述べる。

2. 微生物トリータビリティ試験

2.1 目的

ベンゼン汚染土壌の原位置微生物酸化による浄化処理では、酸素や栄養塩の供給で増殖した土中微生物によるベンゼン分解によって汚染濃度が低下することが期待されている。実際の汚染土試料に酸素や栄養塩を供給することによってベンゼンが分解され濃度減少するかどうかを確認することを目的として、微生物トリータビリティ試験を

行った。言い替えば、この試験の目的は、原位置ベンゼン処理サイトにおいて、酸素や栄養塩の供給によって微生物分解を期待できるかどうかを知ることである。

2.2 方法

試料土の基本的性状をTable1に示す。この章で述べる微生物トリータビリティ試験には供試土Aを用いた。

微生物トリータビリティ試験の概要をFig.1に示す。

前処理として、試料土を2mmふるいに通して混合し均一化した。また、試料水として、汚染土を採取したボーリング孔から採取した地下水を用いた。培養容器には、内容積約170mlの褐色耐圧ビンを用いた。

試験ケースをTable2に示す。現地地下水を用いて、栄養塩添加の有無のケースを基本とし、イオン交換水を用いるケース、および、対照ケースとして、滅菌土を用いるケースを設定した。また、基本ケースと対照ケースでは、培養期間を2ヶ月とするケースも設定した。

2.3 結果と考察

一般的な知見では、微生物の成育に不利な条件として、次のようなことが考えられる。1)試料土と地下水のpHが高いこと、2)塩化物イオンを含む塩濃度が高いこと、3)ベンゼンと競合する炭素源を含有すること、4)ベンゼン分解微生物が非常に少ないこと、および、5)微生物の成育を阻害する有害物質が含まれること。

本章で実施したバイオトリータビリティ試験の目的は、ベンゼン分解微生物の生育阻害の有無を判断することであり、この試験の結果によって上記のような具体的な阻害要因を特定することはできない。

試験結果をFig. 2に示す。図中、横軸は経過日数、縦軸は系内の液相ベンゼン濃度である。

対照のために滅菌したケース3およびケース7と同様に他のケースでもベンゼン濃度が低下しない。若干の濃度低下は、シリンジによる試料採取時に揮発性に富むベンゼンが系外に漏洩したためと考えられる。参考のために、微生物分解性良好な土壌試料で行った試験の結果をFig.2の上図に記入している。

2ヶ月間の培養期間を経ても、栄養添加の有無によらず微生物によるベンゼン濃度の減少が観測されなかったことから、試料土に含まれるベンゼン分解微生物が何らかの原因により増殖できないことが考えられる。

例えば、当該試料土のpHは11程度とかなり高い値を示し、塩濃度や有機物含有量も多いことがわかっている。これらの原因を特定するためには詳細な分析と多数のケースの試験を行うことが必要となる。

ここでは、上記の要因を特定するための詳細な試験を実施するよりも、微生物によるベンゼン分解性を高めるための具体的方策を検討することとした。

別途実施した室内試験において、ベンゼンを唯一の炭素源として増殖することができる微生物群を得ることに成功していることから、この土壌におけるベンゼン分解微生物

Table 1 供試土の性状
Nature of the Tested Soil

物性	単位	供試土A	供試土B
含水比	%	41	32
全炭素量	乾土%	11	1.4
ベンゼン溶出量	mg/L	0.36	0.14
ベンゼン含有量	mg/kg乾土	8.5	1.2

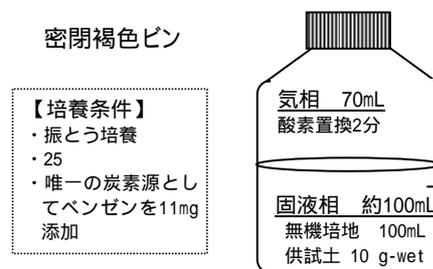


Fig. 1 微生物分解トリータビリティ試験の概要
Outline of Bio-treatability Experiment

Table 2 微生物トリータビリティ試験ケース
Cases of Bio-treatability Experiments

ケース No.	栄養 ¹ 添加	供試土の 滅菌 ²	培養 期間	培地
1	有		8日間	現地採取地下水
2	無		8日間	現地採取地下水
3	無	滅菌	8日間	同上、ろ過
4	有		8日間	イオン交換水
5	有		2ヶ月	現地採取地下水
6	無		2ヶ月	現地採取地下水
7	無	滅菌	2ヶ月	同上、ろ過

*1 尿素107mg/L+リン酸2水素ナトリウム・2水和物24.4mg/L

*2 オートクレーブで、121℃で15分間の高温高圧処理

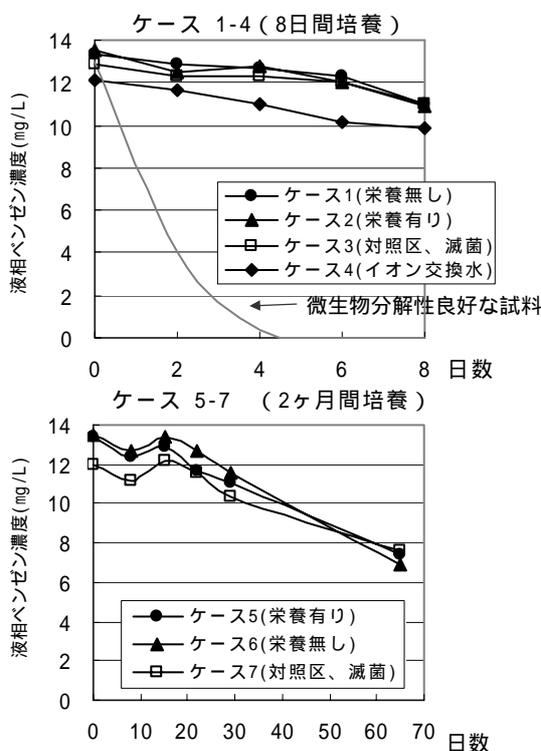


Fig. 2 微生物分解トリータビリティ試験の結果
Results of Bio-treatability Experiments

物を増殖する方策として、現場発生土や地下水を用いてベンゼンを唯一の炭素源として培養した液を地盤に注入するという前培養方式を考案し、その効果について室内試験による検討を行った。その試験の方法や結果について次章以降に述べる。

3. 前培養効果の検討（バッチ試験）

3.1 概要

前培養方式による土中ベンゼン分解効果を検討することを目的として、バッチ培養試験を実施した。

前培養方式による原位置浄化処理工法の例をFig.3に示す。元になる原位置浄化処理工法として、原位置洗浄併用バイオパファー工法を考え、その地上設備に、ベンゼン分解微生物を選択的に増殖する設備を加え、ベンゼン分解微生物を含む懸濁液を注入するという浄化工法を、ここで前培養方式と呼ぶこととする。

3.2 方法

最初に予備的検討として、Fig.1に示す試験容器と内容物に加え、予めベンゼン分解微生物を選択的に培養した液（以下、前培養液）を2mL添加して培養する試験を行った。

前培養液は、以下のように作成した。まず、供試土Aを充填したカラムに無機栄養培地を1ヶ月間透過し、ベンゼン分解活性を高めた。その後、Fig.1と同じ培養系に、このカラムの土を1g加え、ベンゼンが検出限界未満（0.25mg/L）になるまで培養した。

次に、上記の予備試験よりも土の比率の高い試験系での効果を調べるために、Table3に示すケースでバッチ試験系における培養試験を行った。ケース1は、土のかわりにガラスビーズを用いて（ガラスビーズの使用量は、ケース2および5の添加土と同程度の体積）、前培養液を添加しない対照ケースである。ケース2から4は土/液の質量比を0.11から0.71まで変化させ前培養液を添加しないケース、5から7は同じ比率で前培養液を添加するケースである。

内容積約160mLの褐色メジウム瓶に、気相の体積が90mLになるように試料土と純水を加え、ケース5-7には前培養液を2mL添加する。気相を酸素ガスで2分間置換してから、液相ベンゼン濃度が約50mg/Lとなるようにベンゼン飽和液を添加した。これらの試験体を25℃で振とう培養した。

3.3 結果と考察

予備試験の結果をFig.4に示す。前培養液を添加したケースではベンゼンが分解されて検出限界（0.25mg/L）未満まで低下した。この結果から、添加土量の少ないスラリー系では前培養液添加によるベンゼン分解効果があると言える。

Table3に、試験ケースごとのベンゼン量の変化を示す。ここでは、液相ベンゼン濃度と液の体積の積を液中ベンゼン量、土のベンゼン含有率と乾土質量の積を土中ベンゼン量とし、それらの和をベンゼン量とした。ケース1では、

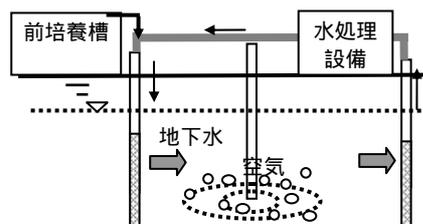


Fig. 3 前培養方式による浄化の概要
Outline of Bioremediation with Pre-culture

Table 3 試験ケースと系内のベンゼン量の変化
Change of Benzene Mass in the Experiment System

試験ケース	条件			結果			
	前培養液添加	供試土種類	土/液質量比	気相/固液相体積比	液中ベンゼン質量(mg)		
					土中ベンゼン質量(mg)		
					初期	6日	13日
1	なし	なし (ガラスビーズ)	9:7	9:7	4.8	4.0	3.0
-					-	-	
5.0					4.8	3.0	
0.067					0.15	0.31	
2	なし	なし	0.11	9:7	3.8	3.3	2.3
0.29					0.39	0.45	
3	なし	なし	0.23	9:7	3.4	2.1	1.5
0.86					1.4	1.6	
4	なし	なし	0.71	9:7	4.4	0.88	0.88
0.028					0.085	0.085	
5	あり	供試土B	0.11	9:7	4.2	1.9	1.9
0.3					0.3	0.3	
3.1					1.6	1.6	
6	あり	供試土B	0.23	9:7	1.4	1.5	1.5
3.1					1.6	1.6	
7	あり	供試土B	0.71	9:7	1.4	1.5	1.5

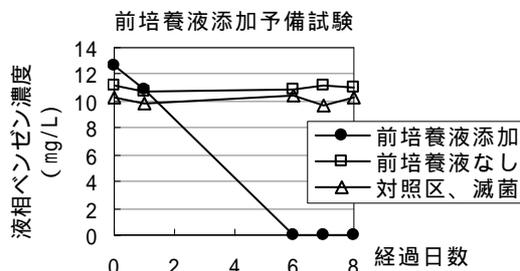


Fig. 4 前培養液を添加したバッチ培養試験の結果
Results of Batch Culture Experiments with Pre-cultured Liquid

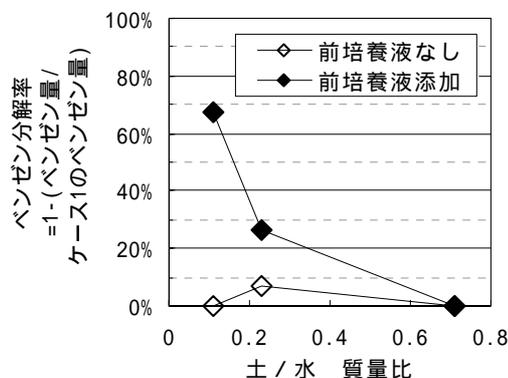


Fig. 5 土/水の質量比に対する13日後ベンゼン分解率
Water/soil Ratio in the Experiment System vs. Degraded Benzene Ratio after 13 Days

微生物によるベンゼンの分解は起こらないがベンゼン量が減少するのは、系外への漏洩によると推定される。また、土中ベンゼン量が時間経過とともに増加するのは、液相からの吸着が生じているためと考えられる。

Fig.5に、培養開始13日後のベンゼン分解率と土/水の質量比の関係を示す。ベンゼン分解率は、図中に示すように、微生物による分解がなかったと考えられるケース1のベンゼン量に対する減少量の比として定義した。この定義のもとで、前培養液を添加しないケースでは、ベンゼン分解率は土/水比率にかかわらずほぼ0%であることがわかる。また、前培養液を添加したケースでは、土/水の質量比が0.11のケースで68%のベンゼン分解が確認されたが、質量比0.28で26%、質量比0.71でほぼ0%であった。これらの試験ケースに加え、予備試験は土/水の質量比が約0.07のケースと言えるが、ほぼ100%のベンゼン分解を示している。以上の結果から、土の比率が高くなるほどベンゼン分解率が小さいことがわかる。これは、土の比率が高くなれば微生物とベンゼンの接触効率が悪くなることや、土に含まれる他の有機物がベンゼンとの競合基質として働くためにベンゼンの分解効率が低下したことなどが原因と考えられる。

4. 前培養効果の検討（カラム試験）

4.1 目的

前章で、バッチ培養系における前培養液添加の効果は、土の比率が高いほど小さいことがわかった。

ここでは、前培養液を地盤に注入した場合の環境を模擬していると考えられるカラム試験系での前培養効果を検討することにする。

4.2 方法

供試土の性状をTable4に示す。ベンゼン溶出量が小さいことがわかる。採取後長期間保管していたためベンゼンの揮発が進んだためである。試験結果の評価精度を高めるために、次のようにベンゼンを添加した。供試土を充填したカラムに、10mg/Lのベンゼン溶液を3PV(Pore Volume)程度透過してから密栓し、低温の恒温槽に保管する。

カラム試験の概要をFig.6に示す。カラムは直径5cm、長さ5cmのものをを用い、湿潤密度が1.6g/cm³になるように試料土を充填した。このカラムに、低流量ポンプを用いて流量0.5cm³/minで試料液を透過させ、カラム上端部の採取口から透過液を適宜採取した。

試験ケースをTable5に示す。イオン交換水を窒素曝気によって脱気したものと、前培養液を希釈して加えたものの2種類のケースを設定し、それぞれ2連で試験した。

4.3 結果と考察

ケースAからDについて、横軸を透過液量/カラム内土体積比率、縦軸を透過液のベンゼン濃度としてプロットしたグラフをFig.7に示す。ケースAとBにおける濃度推移は、間隙水の交換によってベンゼン溶出を促すという原位置

Table 4 供試土の性状

Nature of the Tested Soil		
物性	単位	値
ベンゼン溶出量	mg/L	0.058
ベンゼン含有量	mg/kg	14.2
含水比	%	28.7

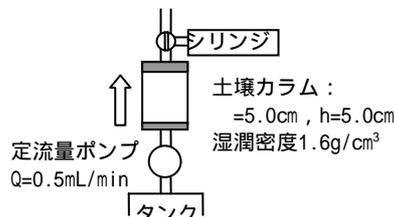


Fig. 6 カラム実験の概要
Outline of Column Experiments

Table 5 カラム試験ケース
Cases for Column Experiments

ケース番号	分類	試料液
A	嫌気区	窒素曝気による窒素置換水
B		
C	微生物区	別途作成した前培養液を10倍希釈したもの
D		

* 3.2を参照のこと

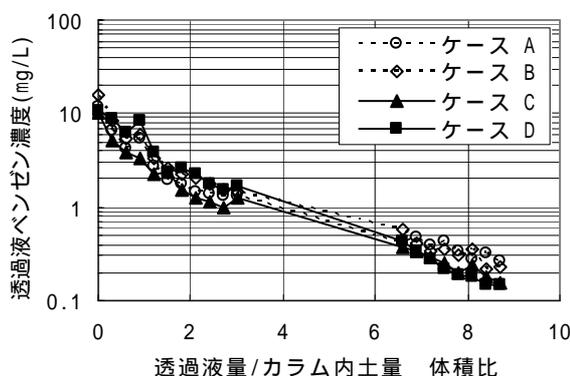


Fig. 7 透過液ベンゼン濃度の変化
Change of Benzene Concentration of Outlet Liquid

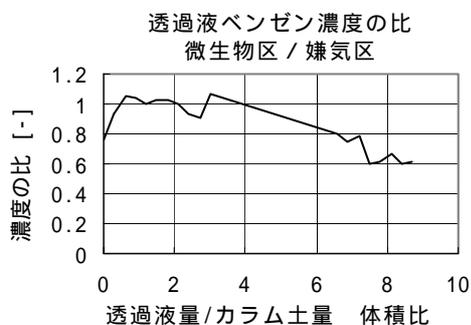


Fig. 8 両区の濃度平均値の比
Ratio of the Average Conc. for Both Cases

洗浄の効果を表しており、ケースCとDではこの原位置洗浄の效果に前培養液添加の効果を合わせたものを表していると考えられる。図から、ケースCとDのほうが、AとBよりベンゼン濃度の低下がやや速いことがわかる。

両ケースの差を定量するために次のような評価を試みた。Fig.7の濃度変化から、嫌気ケースおよび微生物ケースそれぞれの平均値を求め、嫌気ケースの平均濃度に対する微生物ケースの平均濃度の比を求めた。この比を縦軸に、透過液量/カラム内土体積比率を横軸としてプロットしたグラフをFig.8に示す。この図で、液を透過し始めてから透過液量/カラム内土量体積比が4程度までは、両ケースの平均濃度の比はほぼ1であったが、以降、微生物ケースの濃度が小さくなり始め、試験終了時には、嫌気ケースの約60%程度まで低下したことがわかる。

一方、試験後の試料土の性状を分析した結果をTable6に示す。Table4とTable6を比較することにより、微生物ケースと嫌気ケースにおいて、土壌ベンゼン濃度減少には顕著な差が生じなかったことがわかる。

地盤中では、間隙水中のベンゼンの濃度が減少すれば、土粒子 - 間隙水間のベンゼン濃度平衡が間隙水への溶出の方向に移動し、そこでベンゼン分解微生物と接触することによって分解されるという、一連の反応が生じると推定される。このとき、ベンゼンのような疎水性の物質は間隙水に対する溶出速度が非常に小さいので、この溶出速度のほうが、前培養方式におけるベンゼン分解速度に対する支配的要因となる。このことが、土壌のベンゼン濃度低下に対する顕著な効果が観測されなかった原因の1つと考えられる。

5. バッチ試験の数値解析モデル化

5.1 目的

前培養方式による浄化を合理的に設計、計画するために、注入する培養液に含まれる微生物の地盤中での挙動と、それに伴うベンゼンの挙動を定量的に予測評価する方法を得ることが必要である。ここでは、この予測評価手法を得るための準備として、バッチ反応系での添加微生物やベンゼンの挙動をモデル化し、3章で検討したバッチ試験を模した試解析を実施してモデルの適用性を検討する。

5.2 数値モデルの構築

バッチ試験で生じと考えられる現象の概要をFig.9に示す。この図に表されている現象は、1)土粒子 - 間隙間のベンゼンおよび微生物の吸脱着、および、2)液相での微生物によるベンゼン分解と酸素消費である。

ベンゼンの吸脱着は非平衡吸着式で表される⁴⁾。微生物の吸脱着は吸着方向の反応が支配的であるので、分配係数モデルで表す。液相での微生物によるベンゼン分解反応は、液相ベンゼン濃度および溶存酸素濃度に制限されるとして、Multiple Monod式を用いて表す³⁾。ここでは、好気分

Table 6 カラム試験後の試料土の性状
Sample Soil Nature after the Column Experiments

ケース番号	略称	ベンゼン溶出量 (mg/L)	ベンゼン含有量 (mg/kg)	含水比 (%)
A	嫌気区	0.044	0.33	30.2
B		0.035	0.46	34.4
C	微生物区	0.043	0.55	40.2
D		0.015	0.50	38.2

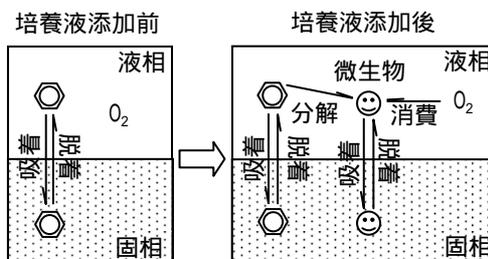


Fig. 9 数値モデル化する反応系の概要
Outline of the Reaction System to Be Modeled

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{\rho_B}{n} \frac{\partial S}{\partial t} - \mu_m X \left(\frac{C}{K_{Bz} + C} \right) \left\{ \frac{O - O_{min}}{K_{O_2} + (O - O_{min})} \right\} \quad (1)$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \frac{n}{\rho_B} \beta \left(C - \frac{S}{Kd} \right) \quad (2)$$

$$\frac{\partial O}{\partial t} = -Y_{O_2/Bz} \mu_m X \left(\frac{C}{K_{Bz} + C} \right) \left\{ \frac{O - O_{min}}{K_{O_2} + (O - O_{min})} \right\} \quad (3)$$

$$R_s \frac{\partial X}{\partial t} = Y_{X/Bz} \mu_m X \left(\frac{C}{K_{Bz} + C} \right) \left\{ \frac{O - O_{min}}{K_{O_2} + (O - O_{min})} \right\} - K_d X \quad (4)$$

解における溶存酸素濃度閾値を設定できるように一般的なMultiple Monod式⁵⁾を改良している。

これらの定式化によって式(1)-(4)からなる連立常微分方程式が得られる。ある初期条件の下で、この方程式の解を求めることで、バッチ反応系のベンゼン濃度、溶存酸素濃度、および微生物数の時間変化を求めることができる。

ただし、諸定数および変数を次のように定義する。

- C: 液相ベンゼン濃度 (mg/L)
- S: 固相ベンゼン濃度 (mg/kg)
- X: 微生物濃度 (mg/L), O: 溶存酸素濃度 (mg/L)
- μ_m : 最大基質利用速度定数 (1/sec)
- K_{Bz} : ベンゼンに関する半減定数 (mg/L)
- K_{O_2} : 酸素に関する半減定数 (mg/L)
- O_{min} : 最低溶存酸素濃度 (mg/L)
- β : ベンゼンの物質移動定数 (1/sec)
- Kd: ベンゼンの平衡分配係数 (L/kg)
- $Y_{O_2/Bz}$: 消費ベンゼンと酸素の質量比 (-)
- $Y_{X/Bz}$: 消費ベンゼンと再生微生物の質量比 (-)
- K_d : 微生物の死滅速度定数 (1/sec)

5.3 試解析

3章のバッチ試験のうち、ケース5,6を模した試解析を実施した。Table7にこれらの試験条件を再掲する。

Table 7 試解析する試験ケースと試験条件
Conditions of Experiment Cases to Be Simulated

ケース番号	系内の土/水 質量比	気相/固液相 体積比	前培養液 添加
5	0.11	9:7	あり
6	0.23	9:7	あり

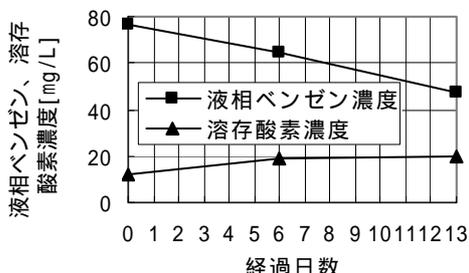


Fig. 10 試験ケース1の液相ベンゼン濃度および溶存酸素濃度の変化
Time Change of Concentration of Benzene and Dissolved Oxygen for Case 1

前節で構築した数値モデルに気相は含まれないが、3章のバッチ試験系には気相がある。気体の系外への漏洩などを試解析で再現するために、ここでは、ベンゼンの気相濃度などを未知数として、気液相間の挙動もモデル化する。

3章のバッチ試験ケース1で生じていたと考えられる現象は、酸素およびベンゼンの気液相間移動と試験系外への漏洩のみである。ケース1の試験結果をFig.10に示す。ケース1の解析を行い、ベンゼンと酸素の液相濃度変化がこの試験結果と同等に生じるように、モデルの諸定数値を定め、それらの値をケース5,6の試解析にも適用する。

ケース5,6の試解析の結果をFig.11およびFig.12に示す(諸定数の入力値は文献3を参照)。これらから、試解析の結果は、バッチ試験における諸計測値の変化の傾向をよく再現していることがわかる。

また、これらの試解析で、ケースごとに μ_m と μ_n だけを変化させることによって、試験結果によくフィットする解析結果が得られたことから、ベンゼンの溶出反応の物質移動定数 k_{12} と微生物によるベンゼン分解反応の最大基質利用速度定数 μ_m は、地盤環境などの諸条件によって変化することが示唆される。

6. まとめ

以上の検討成果を次のようにまとめることができる。

- 1) 栄養を加えて好気環境で長時間養生しても、ベンゼン分解微生物を活性化し難い土壌が存在する。
- 2) 前培養液を添加したバッチ試験において、土の比率が高いほどベンゼン分解率が低下した。これは、土の比率が高いほど、微生物とベンゼンの接触効率が悪くなることや、ベンゼンとの競合基質として働く他の土中有機物が多くベンゼンの分解効率が低下したことなどが原因と推定される。

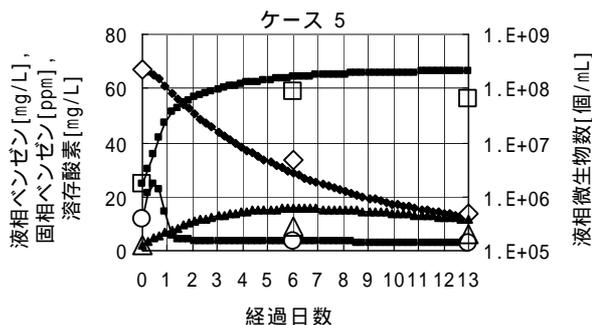


Fig. 11 ケース5の実験と解析の結果(凡例はFig.12)
Results of Experiment and Simulation of Case 5

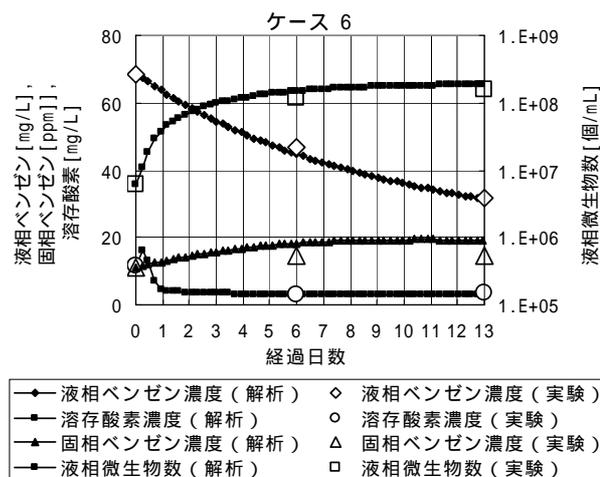


Fig. 12 ケース6の実験と解析の結果
Results of Experiment and Simulation of Case 6

- 3) カラム系のベンゼン分解試験では、間隙水中のベンゼンには前培養効果による濃度低下を観測したが、土中のベンゼンには顕著な効果を観測できなかった。
- 4) バッチ試験系におけるベンゼン分解培養試験を数値解析モデル化することができた。

参考文献

- 1) 石川ら：難透水性ベンゼン汚染土壌を対象とした原位置浄化技術，土環センター技術ニュースNO.9，2004年
- 2) 大島ら：ベンゼン汚染土の微生物処理における前培養効果の検討(その1) - 室内バッチ試験 - ，土木学会第60回年次学術講演会講演概要集，2005年
- 3) 三好ら：ベンゼン汚染土の微生物処理における前培養効果の検討(その2) - バッチ反応系の数値解析モデル化 - ，土木学会第60回年次学術講演会講演概要集，2005年
- 4) 三好ら：非平衡吸着式によるVOC洗浄の数値解析，土木学会第59回年次学術講演会講演概要集，2004年
- 5) Clement, T. P. et. al.: Modeling multi-species reactive transport in groundwater, Groundwater Monitoring & Remediation Journal, 18(2), pp79-92, 1998