

油汚染土の微生物処理

- バイオオーギュメンテーションの適用性について -

田中 裕一* 久保井 高史*
高橋 祐一*

要 旨

近年、土地売却・土地改変等の際に油汚染が発覚し、対策が求められるケースが増加してきている。油汚染土の処理方法としては、焼却等の熱処理が一般的である。しかし、熱処理は投入エネルギーが大きく処理費用が高価であることから、比較的安価な微生物処理工法（バイオレメディエーション）に着目した。

実際の油汚染土を用いて、実験室にてバイオスティミュレーション（土着微生物の活性化）とバイオオーギュメンテーション（有用微生物の導入）の比較実験を行った。この結果、オーギュメンテーションが有効であることを確認した。そして、実際の油汚染サイトにおいてオーギュメンテーションの実規模処理実験を行い、油分濃度・土壌酸素濃度・栄養塩濃度・分解菌数・一般細菌数等のモニタリングを実施した。

この結果 浄化目標とした「油分濃度（n-ヘキサン抽出物質）1000mg/kg-dry 以下」「油膜・油臭無し」を達成し、微生物処理が可能であることを確認した。また、微生物処理の好適環境条件を確認することができた。

1. はじめに

土地改変や土地売却の際に重金属・揮発性有機化合物等の土壌汚染が発覚し、浄化対策が求められるケースが増加してきている。こうした汚染に対しては、土壌環境基準が設定され、「土壌・地下水汚染に係る調査・対策指針運用基準」（環境庁 1999）により対策の進め方が示されている。

また、東京都の「都民の検討と安全を確保する環境に関する条例（環境確保条例）」における「土壌汚染対策指針」の整備など自治体の関心も急速に高まっている。そして、本年5月「土壌汚染対策法」が成立し、2003年1月施行予定である。

こうした、土壌・地下水の汚染対策は鉛・カドミウム等の重金属類やトリクロロエチレン・テトラクロロエチレンに代表される揮発性有機化合物（VOC）等の環境基準物質が中心である¹⁾。

これに対し、油槽所・ガソリンスタンド・各種工場跡地では、油による土壌・地下水汚染が明らかとなるケースが増加している。土壌に漏出した油は、土壌粒子に吸着する一方地下に浸透し、地下水面上で広域に拡散する。そして、土地改変の際あるいは地下水面上の油が井戸や公共水面に到達した場合に、油膜・油臭の発生として人に認識される。このため、油は土壌・地下水環境基準に定められていない物質であるものの、浄化対策が求めら

れることが多い。

油汚染土の処理方法としては、焼却等の熱処理や洗浄処理が一般的である。しかし、熱処理は投入エネルギーが大きく処理費用が高価であり、洗浄処理は単独では効果に限界があるため他工法を併用する必要がある。そこで、投入エネルギーが少なく、安価かつ効率的な処理が可能でバイオレメディエーションに着目しその有効性の確認実験を行った。

2. 微生物処理について

2.1 利用微生物

バイオレメディエーションには、地盤中の微生物を活性化する「バイオスティミュレーション」と、油分解能力の高い微生物を導入する「バイオオーギュメンテーション」がある（図-1）。それぞれの特徴を以下に示す。

バイオスティミュレーション

・原理

汚染土壌に酸素や栄養塩を供給することにより、土着の微生物を活性化し、油分の分解を促進する。

・特徴

現在の微生物処理の主流である。事前に地盤中に油分の分解に適した微生物が存在することを確認する必要がある。油の種類によっては分解が困難となる。また、低温条件下では処理効率が大きく低下する。

*環境研究所

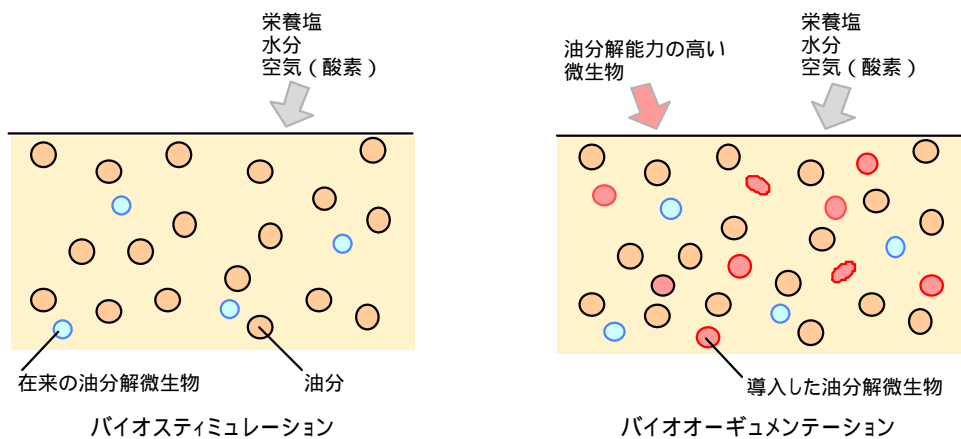


図 - 1 微生物処理模式図

バイオオーギュメンテーション

・原理

油分解能力が高い微生物を土壤中に導入・酸素や栄養塩を供給し、導入微生物を活性化することにより油分を分解する。

・特徴

油の種類・濃度等の汚染条件、土壌・温度・pH等の環境条件に対して幅広い適用性がある。一般にスティミュレーションと比較して処理期間が短い。

2.2 施工方法

バイオレメディエーションは、酸素や栄養塩等の供給方法により、いくつかの工法に分類することができる。代表的な工法として、汚染地点で浄化する『原位置処理』と土壌を掘削後浄化する『掘削後処理(ソイルパイル・ランドファーマーミング等)』をあげることができる(図-2)。

原位置処理

・原理

地盤中に酸素・栄養塩・微生物等を供給する。

・特徴

原位置で処理するため、上部構造の影響を受けない。分解の制御が難しい。処理に長期間必要となる。

ソイルパイル

・原理

汚染土を積み上げ、吸排気パイプを敷設し土壌中に酸素を供給する。また、必要に応じて栄養塩や水を供給する。

・特徴

土壌の積み上げ高さ・配管を調整することにより大量の汚染土に対応可能。通気が不均一となり分解状況にバラツキが生じる。浄化期間はランドファーマーミングよりも長くなる。

ランドファーマーミング

・原理

汚染土壌を畑のように耕すことにより、土壌中に酸素を供給するとともに微生物と汚染物質との接触を促進する。また、必要に応じて栄養塩や水を供給する。

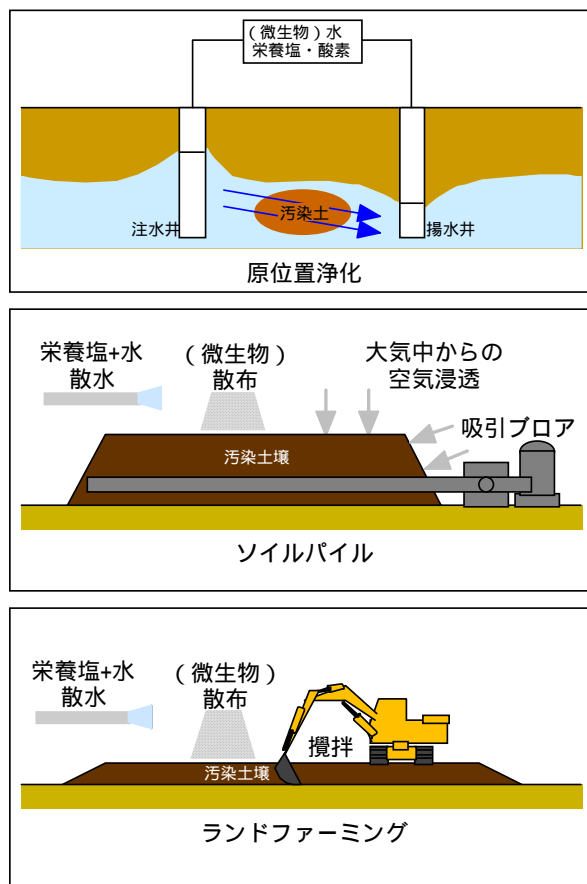


図 - 2 施工方法模式図

・特徴

三工法の中では最も処理期間が短い。一般的な処理土壌厚は50cm程度。大量の汚染土処理には広大なスペースが必要。

3. 実験概要

微生物処理方法のうち、短期間で処理可能な「バイオオーギュメンテーション」と「ランドファームング」を組み合わせることにより、効率的な処理が可能になると考えられる。これを確認するために、以下に示すフラスコ実験およびフィールド実験を行った(図-3)。

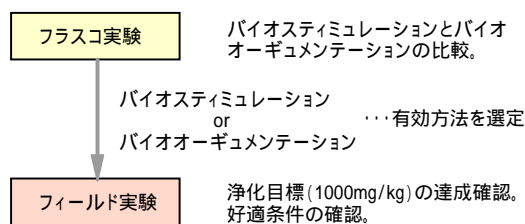


図-3 実験の目的及び流れ

フラスコ実験 (利用微生物の検討)

微生物処理の一般的な手法である「バイオスティミュレーション」と高濃度汚染の効率的な浄化が可能な「バイオオーギュメンテーション」の比較検討を行った。

フィールド実験 (工法の有効性確認)

フラスコ実験で効果が確認された工法を用い、実規模

レベルでの有効性を確認した。また、設定条件を変化させ浄化の最適条件を確認した。なお、油については環境基準が無いものの、関係各社の自社基準設定状況や過去の浄化事例をもとに、浄化目標を「油分濃度(n-ヘキサン抽出物質)1000mg/kg-dry」「油膜・油臭無し」とした。

実際の事業所の浄化を想定し、フィールド実験は汚染が確認されている事業所内で実施した。なお、事前に実施したフラスコ実験は、フィールド実験との整合をとるため同一の事業所にて採取した汚染土を使用した。

4. フラスコ実験

4.1 実験方法

微生物・栄養塩添加を添加した「バイオオーギュメンテーション」、栄養塩のみを添加した「バイオスティミュレーション」および微生物・栄養塩とも無添加の「対照区」の3ケースを設定した。

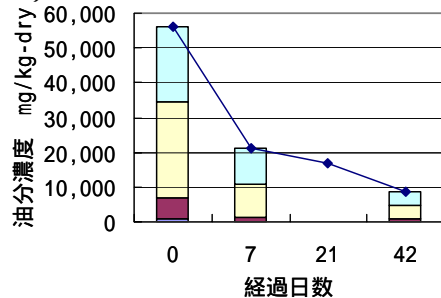
実験に用いた油汚染土は、砂質土であり、油分濃度はn-ヘキサン抽出物質で32,000mg/kg-dry、テトラクロロエチレン抽出-赤外定量法で56,000mg/kg-dryであった。バイオオーギュメンテーションに利用する微生物としては、市販の微生物製剤(O社製)を用いた。また、栄養塩としては硝酸アンモニウム・硫酸アンモニウム・硝酸カルシウム・リン酸2水素カリウムおよび各種微量元素を使用した。

300ml三角フラスコに汚染土50mgを入れ、これに純水を添加しスラリー状とした。これに栄養塩・微生物等を添加し、室温にて振とう培養した。培養期間中蒸発により失われる水分は純水を適宜添加した。油分濃度は、0・7・21・42日後に全量抽出し、テトラクロロエチレン抽出-赤外定量法により測定した。また、石油成分の分析にはTLC/FID(ヤトロン製 イヤトロスキャン)を用いた。

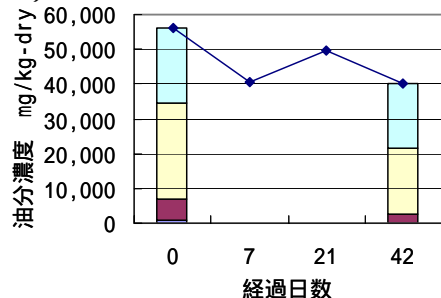
4.2 結果および考察

培養の結果、「バイオオーギュメンテーション」では、顕著な油分濃度の低下が見られた。これに対し、微生物

a) バイオオーギュメンテーション



b) バイオスティミュレーション



c) 対照区

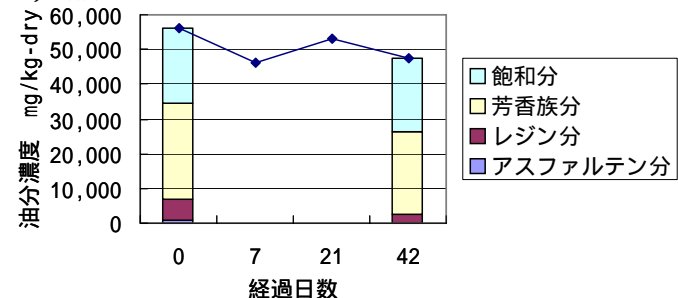


図-4 油分濃度および組成の変化

を添加しない「対照区」および栄養塩のみ添加した「バイオスティミュレーション」では、油分濃度の変化は小さかった（図 - 4）。また、「バイオオーギュメンテーション」では、飽和分・芳香族分が減少するとともに、レジジン・アスファルテン分の分解も確認された。

この結果より、本油汚染土の微生物処理を効率的に進めるためには、「バイオオーギュメンテーション」が適している」と判断した。

5. フィールド実験

5.1 実験方法

(1) 実験条件

汚染が確認されている事業所の一角（約 80m × 50m）において、2001 年 2 月から 6 月末までバイオオーギュメンテーションによる微生物処理実験を行った。そして実際の汚染土を掘削し、微生物および栄養塩を混入し、埋め戻した後にランドファームを行った（写真 1 ~ 4）。ひとつの試験区の大きさは 6.5m × 4.5m × 深さ 1.5m の約 30m³ としこれを 10カ所設置した。攪拌作業には、スケルトンパッケージを取り付けたバックホーを使用した。

一般にランドファームでは、地表面からの酸素供給と攪拌効率を考慮して、汚染土を薄く広げ土壌厚

50cm 以下で行うことが多い。しかし、大量の汚染土を浄化する場合、汚染土を薄く広げるための広大な処理ヤードが必要となる。逆に限られた敷地でこれを処理する場合には、処理土厚が厚くなる。そして、敷地全体に汚染が広がり、限られた敷地内で処理する場合には、図 - 2 のように地上に積み上げることが困難となり、地盤面から掘り下げて攪拌を行うこととなる。

実験ではこうした状況を想定し、土壌厚を 1.5m とし、地盤面から掘り下げた状態でのランドファームを行った（図 - 5）。そして、今回の微生物処理では、「土壌厚 1.5m」「原地盤面以下」といった不利な条件において、「バイオオーギュメンテーション」「ランドファーム」および攪拌頻度・設定条件等により浄化目標を達成することを目的とした。

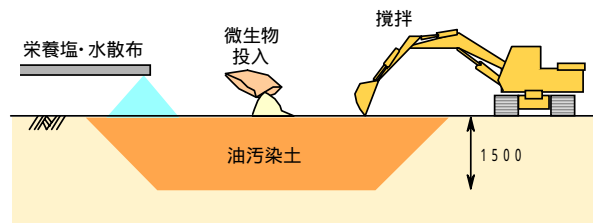


図 - 5 浄化作業イメージ図



写真 - 3 微生物混入土の埋戻し



写真 - 2 微生物・栄養塩の混入



写真 - 4 攪拌

表 - 1 試験区別設定条件

名称	初期濃度 n-ヘキサン mg/kg-dry	微生物 製剤 kg/m3	栄養塩		攪拌 回/週	月				
			初期 kg/m3	追加 kg/m3		2	3	4	5	6
No.1 覆土区	7,852	4	2	-	1	覆土2週間(施工時の作業を想定)				
No.2 高頻度攪拌区	7,080	4	2	-	1 2	週2回攪拌に変更				
No.3 標準区	3,837	2.5	2	-	1					
No.4 保温区	4,011	2.5	2	-	1	シート敷設				
No.5 保温+栄養塩分割区	4,215	4	1	1	1	シート敷設 栄養塩追加				
No.6-1 高濃度区	10,392	4	2	1	1	栄養塩追加				
No.6-2 " 高頻度攪拌	-	4	2	1+1	1 2	栄養塩追加 週2回攪拌				
No.6"	-	4	2	-	1	栄養塩追加なし				
No.7 栄養塩分割区	3,468	4	1	1	1 2	栄養塩追加 週2回攪拌				
No.7" 栄養塩1/2	-	4	2	-	1	栄養塩追加なし				
No.8 対照区	7,332	-	-	-	-	無攪拌				
No.9 高濃度対照区	12,760	-	-	-	-	無攪拌				
No.10 夏季ランドファーム	6,506	2	1	1	2	栄養塩追加				

また、ランドファームの好適条件を確認することを目的として、試験区毎に微生物や栄養塩添加量・攪拌頻度・実験開始時期等を変化させた(表-1)。先に述べたように、今回の実験条件は、地表面からの酸素供給の点で大きなマイナスである。そこで、酸素供給での不利を補うため、通常よりも攪拌頻度を多く設定した。また、土壌中の酸素濃度等のモニタリングを実施し、嫌気条件の形成が懸念された場合には、さらに攪拌頻度を増やしている(No.2・6-2・7)。なお、モニタリングを通じて各試験区とも含水比が10~20%となることを確認し、必要に応じて散水するものとした。

(2) 分析項目

油分の測定は、n-ヘキサン抽出物質(ソックスレー抽出-重量法)と油分濃度計(S-316抽出-赤外定量:掘場製作所 OCMA-350)との2通りで実施した。この他、土壌中の環境条件を確認するために酸素・二酸化炭素(ドレーゲル製 ドレーゲルマルチバーン) 土壌pH、含水比、土壌温度、硝酸態窒素・アンモニア態窒素、油膜・油臭、ORP、電気伝導度等を測定した。

また、浄化過程における微生物の挙動にも着目し、全菌数および石油資化性菌数の測定を行った。さらに、栄養塩散布が地下水汚染を引き起こさないことを確認するために、地下水の硝酸性窒素および亜硝酸性窒素のモニタリングを行った。

5.2 結果および考察

(1) 油分濃度

油分濃度の経時変化

代表例として試験区 No.2 における油分濃度の変化を図-6に示す。土壌中の油分は、分布が不均一であり測

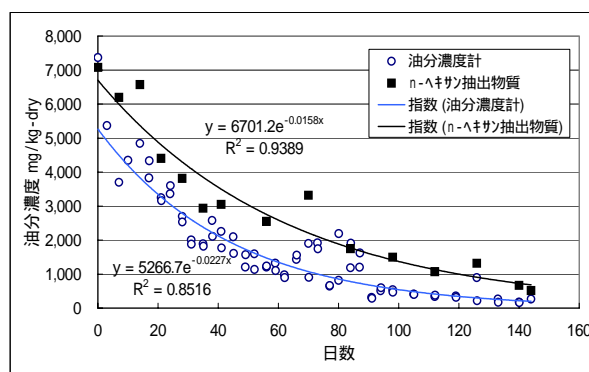


図 - 6 油分濃度の変化 (試験区 No.2)

定値のバラツキが大きい。しかし、微生物と栄養塩を添加し定期的に攪拌することにより油分濃度は低下した。また、油分の測定方法に関わらず n-ヘキサン抽出物質と油分濃度計の測定結果は、同様の減少傾向を示した。そして、微生物投入 140 日目に n-ヘキサン抽出物質濃度が浄化目標である 1000mg/kg-dry 以下に到達した。

図-6に示すように、油の微生物分解は、油分濃度に比例する一次反応式に近似することができる。近似式を以下に示す。

$$C(t) = C_0 e^{-kt}$$

C(t) : t 日後の油分濃度 (mg/kg-dry)

C₀ : 初期油分濃度 (mg/kg-dry)

k : 速度定数

t : 微生物導入後の経過日数 (day)

各試験区の速度定数 k を表-2に示す(対照区の No.8、No.9 を除く)。なお、表中の時期は、2月スタートを冬季、5月スタートを夏季として記載した。

表 - 2 速度定数

試験区	油分測定方法		実施時期
	n-ヘキサン抽出物質	油分濃度計	
No.1	0.015	0.023	冬季
No.2	0.016	0.023	"
No.3	0.010	0.019	"
No.4	0.011	0.021	"
No.5	0.016	0.025	"
No.6-1	0.015	0.026	"
No.6-2	0.018	0.029	"
No.7	0.015	0.022	"
No.10	0.025	0.033	夏季

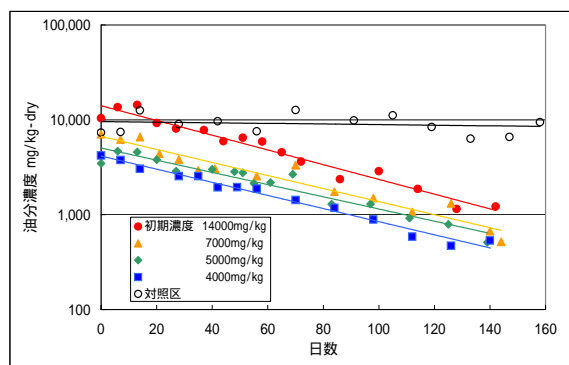


図 - 7 初期濃度別分解状況 (n-ヘキサン抽出物質)

なお、油分濃度計による測定では、80 日前後に値が上昇した。この原因は、油分解の中間産物である有機酸(分析の結果酢酸が検出されている)が一時的に蓄積したことによるものと推測される。

初期濃度別の分解状況

冬季にスタートした試験区 (No.1~9) のうち、好適条件を設定した試験区のデータを初期濃度別に整理したものを図 - 7 に示す。どの試験区も n-ヘキサン抽出物質の値を近似した時の速度定数 k が 0.15~0.18 であるため、油分濃度を対数表示にすると直線の傾きはほぼ一定となった。これより、油分の分解は初期濃度に依存し、一定割合で分解が進行することがわかる。

なお、微生物と栄養塩を添加せず無攪拌の対照区では、顕著な油分の減少は生じなかった。

設定条件別の分解状況

表 - 1 に示すように、各試験では栄養塩添加方法、攪拌頻度、実施時期、シート敷設等の条件を変化させている。こうした設定条件の影響を確認するために、初期濃度別に整理し分解状況の比較を行った (図 - 8 ~ 10) 。なお、図中の栄養塩 × 2 は、途中で栄養塩を追加添加したことを表す。

図 - 8 から、栄養塩が不足した段階でこれを追加添加することにより、油分の分解は促進された。また、攪拌頻度を週 1 回から週 2 回に増すことにより、分解はさら

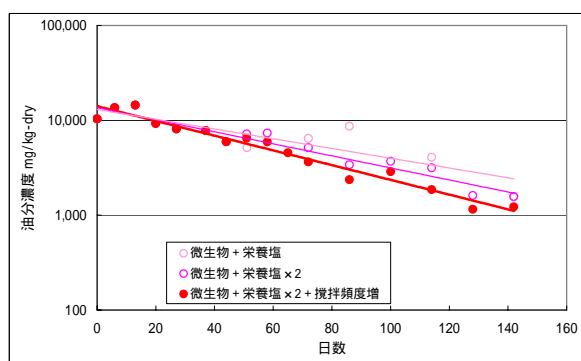


図 - 8 栄養塩添加・攪拌頻度による影響

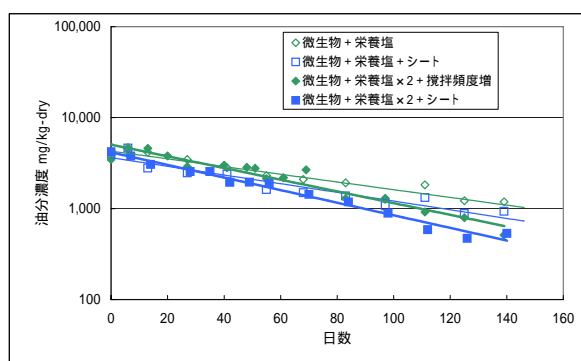


図 - 9 栄養塩添加・攪拌頻度・シートによる影響

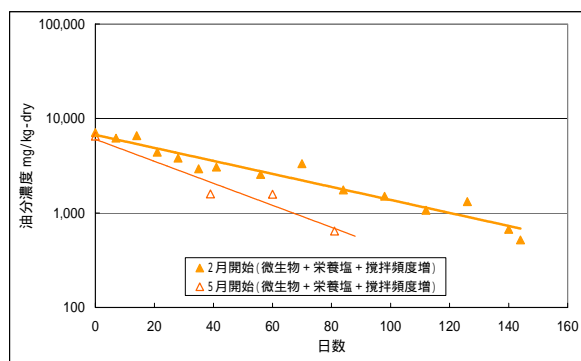


図 - 10 実施時期による影響

に進行し、速度定数 k の値は大きくなった。汚染が高濃度の場合には、油分の微生物分解により土壌中の酸素が急速に減少するため、攪拌頻度増加による分解促進効果は大きいものと考えられる。

栄養塩の適宜添加と攪拌頻度に加え、シートを敷設した試験区 (No.4, 5) では分解の促進が見られた (図 - 9) 。なお、ここで敷設したシートは、冬場の保温を目的としたものである。

一方、実施時期の違いによる分解への影響を比較すると、気温が高い 5 月開始試験区 No.10 の分解が 2 月開始

試験区 No.2 の分解よりも早いことがわかる(図 - 10)。No.1~9 と No.10 では、開始時の気温で約 14℃、実験期間平均では約 7℃ の差があり(表 - 3)これが微生物活性に影響を与えているものと推測された。

このように、栄養塩の添加方法等による速度定数 k の値の差よりも、実施時期の違いによる差の方が大きくなった(図 - 10、表 - 2)。このため、温度条件は微生物分解に対して非常に大きな要因であることが示唆された。

表 - 3 月別平均気温

	2月	3月	4月	5月	6月	実験期間平均
試験区	6.9	9.8	15.4	20.5	23.7	
No.1~9						15.3
No.10						22.1

図中の矢印は実験期間を表す

油膜・油臭消失時の濃度

油膜・油臭消失時の油分濃度を表 - 4 に示す。この汚染土では、n-ヘキサン抽出物質濃度が 1000mg/kg-dry 以下、油分濃度計では 400mg/kg-dry となった時に油膜・油臭が消失した。

表 - 4 油膜・油臭消失時の濃度

試験区	油分濃度計	n-ヘキサン抽出物質 (mg/kg-dry)
No.1	315	779
No.2	222	770
No.3	308	802
No.4	312	1,022
No.5	195	512
No.6	375	675
No.7	400	758
No.10	224	958

(2) 土壌ガス濃度

一般に土壌中の酸素濃度は、深度の増加とともに減少する。これは、表層では大気とのガス交換により酸素供給が消費を上回るのに対し、深い地点ではガス交換が生じにくいことに起因する。そして、地表から 1m 以深では外気の影響はほとんどなくなる²⁾。

攪拌後の土壌酸素濃度の測定例を深度別に図 - 11 に示す。攪拌により、土壌に酸素が供給され(図 - 11 の攪拌直後)、地表から深さ 1.5m の地点まで、酸素濃度は大気中と同等の 20% までに上昇した。その後、土中微生物の活動により酸素は消費され、時間の経過とともに土中濃度は減少した。こうした酸素濃度の低下は、深い地点ほど顕著となった。

このような土壌酸素濃度の低下は、微生物処理の制限

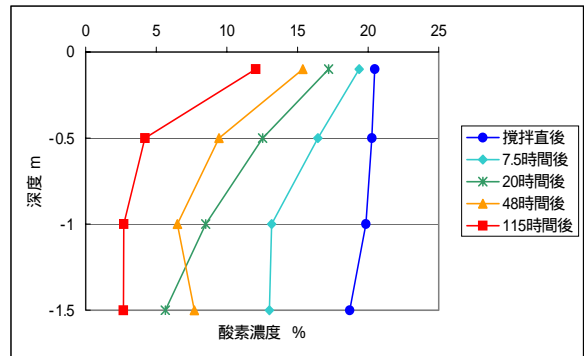


図 - 11 攪拌後の酸素濃度の変化(試験区 No.1 3/13)

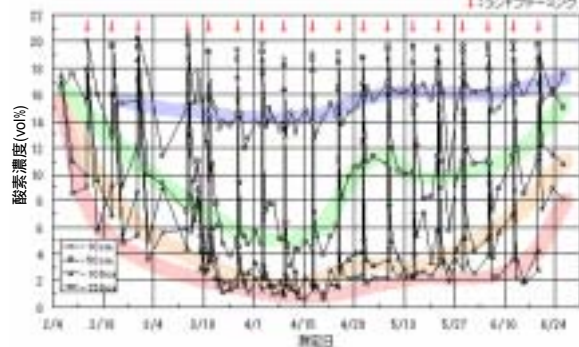


図 - 12 酸素濃度の変化(試験区 NO.1)

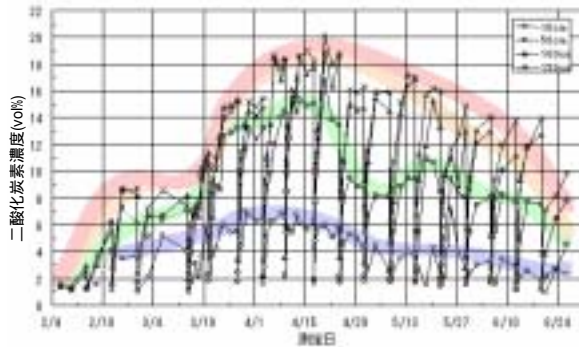


図 - 13 二酸化炭素濃度の変化(試験区 NO.1)

要因となることが予測される。このため、攪拌頻度を増やし土壌に酸素を供給することにより、図 - 8、9 に示した分解速度の差が生じたものと思われる。

実験期間中の酸素および二酸化炭素濃度の変化をそれぞれ図 - 12、13 に示す。1週間程度の短期的な傾向を見ると、微生物活動により土中の酸素が消費され二酸化炭素が放出された。そして、土壌の攪拌作業(ランドファーミング)により、酸素が供給されるとともに二酸化炭素は大気に放出されていることがわかる。

長期的な傾向を見ると、2~4月にかけて酸素消費量および二酸化炭素発生量が増大した。これは、油分解の進行や地中温度の上昇により、油分解菌および油分解の

代謝産物を利用する一般細菌の活動が活発化したことが原因であると考えられる。一方、4～6月の期間は酸素消費量・二酸化炭素発生量とも減少した。この原因は、微生物分解が進行により、基質となる残留油分が減少したことによると推測される。

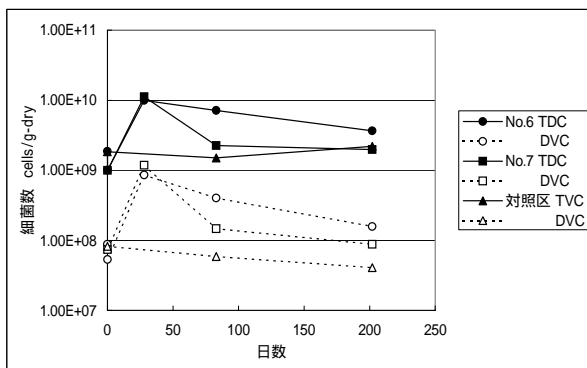
土壌中の酸素濃度が、大気濃度の1%以下(大気の酸素濃度を20%とすると0.2%)になると微生物の嫌気代謝が始まる³⁾。このため、図-12に示した撈拌頻度の少ないケースでは、深度1.5mの地点で酸素濃度が1%を下回っているものの好気代謝が維持されていたことがわかる。

(3) 土壌微生物

DVC(Direct Viable Count)法による土壌中の微生物の変化を測定した(図-14)。DVC法は、基質に細胞分裂阻害剤を加えて培養し、分裂を抑制され肥大・伸長した細胞をカウントする直接検鏡法である。この手法では、基質として石油を用いることにより、石油を資化して増殖する"石油資化性菌(分解菌)"を特異的に検出することができる。

微生物を導入したNo.6(初期濃度14000mg/kg-dry)・No.7(初期濃度4000mg/kg-dry)とも、30日目に全細菌数・分解菌数が1オーダー上昇した。この時期は、油分濃度が顕著に低下する期間と一致している。その後、油分濃度が低下すると全細菌数・分解菌数とも減少し、最終的に微生物処理前と同等の値となった。なおこの間、微生物を投入しない対照区では、全細菌数・分解菌数とも大きな変化は見られなかった。このように、微生物処理により一時的に細菌数が増加するものの、処理終了後には初期と同等の微生物数に戻ることが確認できた。

なお、微生物投入直後は、分解菌の増加は見られなかった。これは、分解菌10億cells/gを4kg/m³添加した場合、細菌数は2×10⁷cells/gとなり対照区のバックグ



* TDC (Total Direct Count): 全細菌数

* DVC (Direct Viable Count): 石油資化性菌数

図-14 土壌中の微生物の変化

ラウンド値と同等となり、増加分の検出が困難であることが原因であると思われる。

6. おわりに

バイオオーギュメンテーション+ランドファーム処理を併用することにより、浄化目標(n-ヘキサン抽出物質1000mg/kg-dry以下、油膜・油臭消失)を達成することができた。また、土壌厚1.5mおよび気温が低い冬季の処理が可能であることが確認できた。なお、こうした処理による、地下水の硝酸性窒素および亜硝酸性窒素による地下水汚染が生じていないことを確認している。

そして、今回の汚染土における微生物処理の好適条件は、バイオオーギュメンテーション、夏季処理、週2回撈拌、栄養塩の分割添加、シート敷設となった。また、微生物処理における油分の分解は、一次反応速度式に近似できることを確認した。このため、速度定数と初期濃度が決定すれば、浄化期間を推定することが可能となった。

今回適用性を検討したバイオオーギュメンテーションでは、安全性の確保が問題となる。微生物の導入については、「組換えDNA技術工業化指針」(通商産業省)、「微生物を用いた環境浄化の実施に伴う環境影響防止のための指針」(環境庁)、「微生物農薬の安全性評価に関する基準」等(農林水産省)があるものの、汚染土壌および複合系の微生物を対象とした基準は存在しない。そこでこれらの指針を参考として、ラットを用いた経口単回投与試験、アユ・ミジンコ・デバズメダイ等を用いた水生生物影響試験、病原性細菌を含まないことの確認試験等を行い、導入微生物が安全であることを確認している。

参考文献

- 1) 環境省環境管理局水環境部:平成12年度土壌汚染調査・対策事例及び対応状況に関する調査結果の概要、2002.
- 2) 吉川清志・高橋誠:土壌ガスの時間変動と垂直分布 - 茨城県下での観測 -, 地震予知連絡会会報、Vol.30、pp.108-111、1983.
- 3) 木村真人:土壌中の微生物とその働き(その2) - 微生物にとっての土壌環境 -, 農業土木学会誌、第59巻、第5号、pp.79-83、1991.
- 4) 越田純:土壌中のVBNC細菌に関する基礎的研究、佐賀大学大学院農学研究科立地土壌学研究室1998年度修士論文、1999.