技術報告

石油系燃料油汚染土壌のバイオレメディエーション

ー特に環境微生物学的なアプローチー

北山 茂一*・原 宏哉*・岩城 美朝**・長里 千香子***
 本村 泰三***・遠山 忠****・張 俗喆*****・菊池 慎太郎*****

要 旨

近年、省エネルギー的な汚染浄化技術としてバイオレメディエーション法が注目されているが、この方法は微生物の汚染原因有機物代謝活性に依存するため処理完了までに長期間を要するのが一般的であり、あるいは実用のための微生物的安全性についての検討が不十分とも指摘されている。我々は、石油系燃料油と重金属類で重度に汚染された土壌から、灯油を唯一炭素源として良好に増殖する *Pseudomonas aeruginosa* の2株を分離し、マウスを用いる慢性毒性ならびに急性毒性試験からこれらの微生物を屋外で用いることの安全性を確認した。これらの菌を混合し、従来の石油系燃料油のバイオレメディエーション法に用いられた菌濃度 (10^{10} cfu/ml) よりもはるかに低い濃度 (10^2 cfu/ml) で地表あるいは地表近くに直接的に散布したところ、わずか1ヵ月の処理期間で約70%の汚染を浄化することが可能であった。

キーワード：バイオレメディエーション、石油系燃料油資化微生物、微生物的安全性

はじめに

ガソリンや灯油などの石油系燃料油は今日の経済活動と社会生活に不可欠なエネルギー源であり、その消費量も年々増加しつつあるが、同時にガソリンスタンドなどの小規模事業所跡地に残存するガソリンや、北海道のような寒冷地における一般家庭灯油備蓄設備からの灯油漏出に起因する土壌汚染も顕在化しつつある。

そのような観点から、微生物を利用して省エネルギー的に汚染土壌を浄化し得るバイオレメディエーション法（原位置微生物土壌浄化法）が注目されており、土壌内在微生物に栄養源を供給して汚染原因有機物を分解除去するバイオスティミュレーション法や、汚染原因有機物に特異的な分解能力を有する微生物（汚染原因物質資化微生物）を利用するバイオオーグ

メンテーション法などの改良法も開発されている^{1,2)}。

他方、バイオレメディエーション法による汚染浄化は微生物の汚染原因有機物代謝活性（分解能力）に依存することから、処理には数ヵ月から数年の長期間を要するのが一般的であり、期間の短縮（効率化）を目的として極めて高濃度の特定物質資化菌種を利用することも試みられている。たとえば久保らは、高密度培養法によって調製した 10^{10} cfu/mlの培養液を浄化対象土壌に投与して土壌微生物濃度を 10^8 cfu/g-土壌に保持することにより石油汚染土壌の浄化が効率化されたと報告している²⁾。

しかし特定の菌種を人為的に高濃度で用いることは土壌の菌叢を破壊して結果的に土壌活性を低下させる場合もあり、あるいは低濃度では人体に無害な菌種であっても高濃度では有害性の発現する危険性も懸念さ

Bioremediation of Soils Contaminated with Petroleum Oils

ー Environmental and Microbiological Approaches ー

* (株)アールアンドイー Shigekazu KITAYAMA, Hiroya HARA

** とりりおん北海道協同組合 Yoshitomo IWAKI

*** 北海道大学北方圏フィールド科学センター水圏ステーション Chikako NAGASATO, Taizo MOTOMURA

**** 室蘭工業大学大学院工学研究科 Tadashi TOYAMA, Young Cheol CHANG, Shintaro KIKUCHI

2008年11月10日受付

2009年2月10日受理

れることから^{3, 4)}、微生物疫学的には低濃度菌を用いるバイオレメディエーション法の実施が望まれる。

また浄化対象とする土壌には、重金属類に代表されるような微生物の有機物代謝活性に抑制的あるいは阻害的に作用する因子が高濃度で存在する場合もあり、実験室における試験成果をそのまま実地に適用しても浄化効果が発現しない場合も多い。

我々は、石油系燃料油と重金属で重度に汚染された土壌から石油系燃料油を唯一の炭素源として良好に増殖する2種類の細菌類を分離し、その微生物的安全性を確認した後、これらの菌をいずれも 10^2 cfu/mlで混合した菌懸濁液を石油系燃料油汚染土壌表面あるいは表面付近に直接的に散布することにより、最大で当初濃度の約70%に相当する汚染を1ヵ月間で浄化したので紹介する。

1. 石油系燃料油分解菌の分離と培養

石油系燃料油を大量に使用する工場構内の土壌から、石油系燃料油を唯一炭素源として増殖する微生物の分離を試みた。なお一般に、土壌1kg当りに数十mg程度の重金属が存在しても、微生物はメタロチオネインに代表される重金属結合タンパク質を誘導合成して細胞内重金属濃度の恒常性を保ち、増殖と有機物代謝が可能であるが、過剰な重金属の存在下では呼吸系などの酸化還元系が阻害され、あるいは細胞外殻構造に小孔が形成されて細胞内容物が漏出するため死滅する⁵⁻⁷⁾。他方、表1に示すように、微生物分離に用いた土壌には高濃度の重金属が含有されていたことから、この土壌中に存在する微生物は重金属に対して耐性をもつことが期待される。

具体的には、工場内の数ヵ所から採取した土壌の約1gを表2に示す灯油-最少塩類液体培地(oil-minimum salts liquid medium: oil-MS液体培地)に分散して好氣的に培養した後、その培養液を寒天で固

表2 灯油-最少塩類液体培地
1ℓ当たりの組成*

物 質	1 ℓ 当たりの 重量など
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
NaH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	0.05 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	0.05mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	8.3 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.4 mg
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	1.17mg
ZnCl ₂	1.0 mg
市販灯油**	10 ml

* 固形培地の場合は、1 ℓ 当たり20 gの寒天末を加えた。

** 液体培地あるいは固形培地のいずれにおいても、灯油以外の組成物質を溶解してpHを7に調整し、オートクレーブ滅菌した後、所定量の灯油を添加した。

化したoil-MS液体培地(oil-MS固形培地)表面に塗布接種した。その結果、固形培地においても灯油を唯一炭素源として良好に増殖し、コロニーを形成する微生物2株を分離した(写真1)。なお写真1(a)に示すように、分離菌株の1株のコロニーは滑面で光沢があつてコロニー周囲は明瞭であり、他の1株のそれは粗面で光沢がなくコロニー周囲は不明瞭であつたことから、両者を明瞭に区別することが可能であつた。

これら分離菌それぞれのrRNAを微生物科学的常法にしたがつて抽出してPCR法で増幅した後、日本DNAデータバンク(DBDJ: DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)に登録されている微生物のrRNAとの相同性を比較し、これらの分離菌株のいずれも*Pseudomonas aeruginosa*の菌株と同定した。以下においては、これらをそれぞれ*P. aeruginosa* TW-1株あるいは*P. aeruginosa* TW-2株と呼ぶ。

P. aeruginosa TW-1株およびTW-2株のいずれも、ペプトン、酵母エキスおよび塩化ナトリウムを主成分とするLB(Luria-Bertani)培地などの調製が容易な一般的培地や、ジャガイモ澱粉搾滓などの農産廃棄物を利用する安価な培地^{8, 9)}でも良好に増殖し、さらにこれらの培地から石油系燃料油を唯一炭素源とするoil-MS培地に移しても遅滞期なくただちに増殖することが特徴である。炭素源や窒素源が異なる培地に微

表1 石油系燃料油汚染土壌中の重金属*

採取点	鉄	マンガン	銅	鉛	亜鉛
	(mg/kg・土壌)				
A	300	150	123	29.1	0.91
B	546	98	42	10.8	0.55
C	911	54	66	7.2	13
D	1,010	27	97	30.2	5.12

* 重金属の測定はICP発光分析法によって行った。

写真1 石油系資化細菌の形態

(a) oil-MS 固形培地の TW-1 株および TW-2 株のコロニー。 (b) TW-1 株の電子顕微鏡写真（倍率10,000倍）。なお TW-1 株および TW-2 株はいずれも、長軸1.3~1.5 μm 、短軸0.5~0.7 μm の桿菌で鞭毛を有する。

生物を移植して培養すると、新たな栄養源に適應する酵素系の誘導などの現象がもたらされるために見かけの生菌数が変化しない遅滞期が觀察される場合も多い。他方、微生物が広い栄養要求性と新たな栄養源に対する高い資化性を有する場合には構成タンパク質系（構成酵素系）による物質代謝が可能であるので適應現象が不要であり、遅滞期は觀察されない¹⁰⁻¹²⁾。したがって TW-1 株および TW-2 株を、天然有機物を栄養源とする培地から石油系燃料油を唯一炭素源とする培地に移して培養しても遅滞期が觀察されない事実は、これらの菌が高い石油系燃料油資化性を有することを示唆するものである。

2. 分離菌の安全性評価

本菌は、ガソリンスタンド跡地のような小規模事業所跡地などの石油系燃料油汚染土壌の微生物的浄化への利用を目的とすることから、最終的には屋外開放系での使用態様が想定され、微生物的安全性が保証されなければならない。

このためマウスを被検動物として本菌の長期毒性および急性毒性について検討した。長期毒性は、TW-1 株および TW-2 株を混入した餌（約10cfu/g-餌）をマウスに投与し、また急性毒性は、これらの菌株を懸濁した生理食塩水0.2ml（約5×10cfuに相当）をマウス腹腔に注入して調べた（写真2）。前者においては1ヵ月間にわたる試験においても対象群（TW-1株および TW-2株を投与していない群）との間に有意な体重変化や脱毛などの病態は觀察されず、また被検マウスを解剖して血液や肝臓、胃などの臓器の生化学検査

写真2 分離菌の急性毒性試験

を行ったが¹³⁾、対象群に比較して炎症発生や酵素活性変化は認められなかった。さらに後者においては菌懸濁液注入による被検マウスの死亡はなかった。以上から、本菌株を屋外などの開放系において用いることの安全性が確認された。

3. 実験室における石油系燃料油の浄化試験

ついで、園芸黒土（主成分：北海道十勝産天然土、pH 中性：森産業(株)(北海道士幌町))を人為的に灯油で汚染して実験室規模の汚染モデル系を作成し、本菌による浄化試験を試みた。

すなわち、あらかじめオートクレーブで内在性微生物を滅菌した約10kgの園芸黒土に約0.2% (v/w) の市販灯油、ならびにいずれも重金属濃度として300mg/kg-土壌に相当する塩化亜鉛(ZnCl_2)、塩化鉄($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、および硫酸銅($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)の水溶液を添加して攪拌し、モデル汚染土壌（被検土）とした。これに LB 培地で一夜培養した TW-1 株および TW-2 株

図1 ヘッドスペース-FID ガスクロマトグラム

処理期間：(a) 0日間, (b) 14日間. B, TあるいはXはそれぞれ、ベンゼン（保持時間1.2分）、トルエン（2.4分）、あるいはキシレン（4.8分）のピークを示す. GC：Shimadzu GC2014, 樹脂：shincrom F51+ bentone 34, インジェクター温度およびディテクター温度：140℃, カラム温度：60℃.

の混合懸濁液を 10^3 cfu/kg-被検土となるように散布して攪拌し、アルミホイルで覆って28℃に保持した。所定の期間後に約10gの被検土を採取して公定法¹⁴⁾にしたがってヘッドスペース法-FID ガスクロマトグラフィ法で分析し、クロマトグラムにおけるピーク総面積の減少から残存灯油量を測定した。

図1にクロマトグラムの例を示した。クロマトグラムのピーク面積の総和は処理日数の経過にともなって減少し、また保持時間3.2分に検出される未同定物質のピーク面積、およびトルエン（保持時間2.4分）のピーク面積の減少が顕著であった。

また図2に経日的測定結果をまとめたが、試験開始後2週間で残存灯油濃度は速やかに減少し、その後2週間は初期濃度の約50%（対照系における揮発などの自然減少を差し引いた実質減少は約60%）にまで緩やかに減少して4週以降は定常状態となった。以上の結果は、低濃度のTW-1株およびTW-2株が重金属を含有する土壤中においても高い灯油資化活性、すなわち浄化活性を発現することを示すものである。

なおデータは示さないが、土壤に存在する総菌数を寒天平板法で調べたところ、コロニー数から推定される菌数は試験開始直後から緩やかに減少しはじめ、試験開始4週後には 10^3 cfu/10g-被検土以下であった。この結果は石油系燃料油汚染土壤において微生物総数は急激に減少するという報告²⁾と一致するものであり、またその理由は不明であるものの、灯油分解菌であるTW-1株およびTW-2株の菌数も石油系燃料油汚

図2 実験室規模における石油系燃料油の浄化

初期石油系燃料油濃度（約2%, v/w）を100%とし、処理後に残存する濃度の相対量を示した。いずれの系も5回の測定における平均値を、○（対照系：分離菌を投与していない系）あるいは●（実験系：分離菌を投与した系）として示し、またエラーバーは95%信頼区間を示す。

染土壤中で減少することを示すものである。したがってTW-1株およびTW-2株の生菌数が減少した時点でこれらの菌を追加投与するなら、さらに浄化反応が進行することも示唆される。

4. 屋外における試験

ついで屋外に試験槽（強化プラスチック製、横：3.6m×縦：1.5m×高さ：1.5m）を設置し、約1mの厚さに土（被検土）を入れた後、被検土の約0.2%（v/w）

となるように市販灯油を表面に散布し、50cmの厚さに覆土した(図3, および写真3)。なお被検土および覆土は、試験槽を設置した箇所(十数年間にわたって使用していない空地)の表土をオートクレーブ滅菌せずに用いたが、73mg-亜鉛/kg-表土、187mg-鉄/kg、および88mg-銅/kgを含有していた。試験は平成18年6月末から7月末まで行い、この間の平均外気温は26.7℃、深さ40cmならびに90cmにおける槽内土壌平均温度はそれぞれ28.1℃ならびに29.6℃であった。また降雨の影響を除外するため、試験槽をシートで覆った。

また予備試験の結果、2週間には散布灯油の沈下は停止して深度90cmにおける被検土の灯油濃度が定常となった。この結果から、試験槽に灯油を散布した後の2週は放置し、その後、覆土表面にTW-1株とTW-2株の混合培養液(約 10^3 cfu/kg-土壌に相当)を散布した。

所定の期間後、簡易ボーリングして深度90cmの土壌を採取し、前述のヘッドスペース法とFIDガスクロマトグラフィ法で分析した。その結果を図4に示したが、TW-1株とTW-2株の混合培養液を散布した後3週間

図3 屋外実証試験槽の概要

図4 屋外における石油系燃料油の浄化

初期石油系燃料油濃度(約2%, v/w)を100%とし、処理後に残存する濃度の相対量を示した。いずれの系も5回の測定における平均値を○(対照系)あるいは●(実験系)として示し、またエラーバーは95%信頼区間を示す。

で残存灯油量は初期灯油量の約40%(対照系の自然減少を差し引いた実質減少は約60%)にまで減少した。

5. 実地試験

前記の試験結果からすれば、分離した2菌株を汚染が存在する個所の表土あるいは表土近くに直接的に散布することによって短期間に汚染を浄化することが期待される。

以上から、本法による汚染浄化の実地試験を行った。すなわち深度1m~3mの土中に2~7㎡にわたる石油系燃料油(ガソリンと灯油)汚染が複数のポイントとして存在する北海道内小規模事業所跡地を実地試験地として選択した(図5)。それぞれの汚染ポイントの表土約50cmを重機で機械的に除き、TW-1株および

(a)

(b)

写真3 屋外実証試験槽の構築

(a) 試験槽への被検土の搬入、(b) 灯油散布による人為的汚染土の作成。

図5 実地試験地の概略

実地試験地は石油系燃料油を大量に使用していた北海道内の小規模事業所跡地（斜線部，約750m²）で，隣接する民家などとの間はコンクリート塀で仕切られている．図中のアルファベットの箇所は予備調査で石油系燃料油汚染が明らかになったことから，TW-1株およびTW-2株を散布した箇所を示す．

TW-2株の混合培養液（10²cfu/ml-MS 培地）を500ml/m²で散布した後，先に取り除いた表土で覆土した（写真4）．なお試験期間中（平成19年7月1日から8月2日）の合計降水量は24mmであり，また平均気温は28.1℃，深さ50cmの平均土温は26.9℃であった．またいずれのポイントにおいても，深度50cmの土壤に平均150mg/kgの鉄が存在した．

試験結果を表3に示したが，菌液散布33日後には最大で約70%の浄化が可能であった．なお，この試験においては対照区（菌を投与していない区）の設置が

表3 実地試験結果

ポイント	試料採取の深さ (cm)	相対的石油系燃料油濃度*		浄化率** (%)
		処理前	処理後	
A	50	1,200	890	25.8
B	50	620	520	16.1
C	50	1,010	810	19.8
D	50	1,100	870	20.9
E	50	750	710	5.3
E	100	630	350	44.4
E	150	1,800	990	45.0
E	200	2,100	1,700	19.0
E	250	3,700	1,100	70.2

* ヘッドスペース法とFID- ガスクロマトグラフィによって出現するピーク面積の総和．

** 100 - [(菌処理後のガスクロマトグラムピーク面積総和 / 菌処理前のガスクロマトグラムピーク面積総和) × 100] ．

困難であったので揮発などによる自然減少量が不明であり，したがって投与菌による実質的浄化率は表3に示す浄化率よりも低値になると推定されるが，図4に示した実証試験槽における成果を考慮するなら TW-1株および TW-2株の有意性が強く示唆される．

おわりに

本稿で紹介した *Pseudomonas* TW-1株および TW-2株は培養が極めて容易であり，また高濃度の重金属を含有する土壤であっても汚染箇所表土あるいは表土付近に散布する簡便な作業によって1ヵ月程度の処理期間で有意な石油系燃料油浄化効果を挙げられることが特徴である．

もとより本法は石油系燃料油で汚染された小規模事業所跡地の浄化を目的に開発された技術であるので大

(a)

(b)

写真4 実地試験の様子

(a) 予備試験で明らかとなった汚染箇所の表土を除いた後，(b) TW-1株と TW-2株の混合懸濁液を散布し，さらに除いた土を戻して覆土した．

規模汚染個所に適用できるものではなく、また当該菌株による石油系燃料油分解機構の生化学的詳細についても今後の研究を待たなければならないが、新たなバイオレメディエーション法の一例として興味深い。

本研究の一部は、平成16年度(財)北海道科学技術総合支援センター「微生物を利用する石油系燃料油汚染土壌の浄化」および平成17年度(独)科学技術振興機構「シーズ育成試験：特異的鉱物油分解菌の探索と土壌浄化への応用」に対する研究助成金によって実施した。

文 献

- 1) 菊池慎太郎編著：微生物工学，91-102，三共出版(株)，2004。
- 2) 久保幹：微生物量調整・維持による石油系汚染土壌の高効率浄化技術，「土壌・地下水汚染の浄化および修復技術」，193-205，(株)エヌ・ティーエス，2008。
- 3) 矢木修身：生物化学的浄化法による浄化技術，「土壌・地下水汚染の浄化および修復技術」，47-58，(株)エヌ・ティーエス，2008。
- 4) 青木正和：非定型抗酸菌症の疫学，臨床医，7，(7)，1650-1652，1981。
- 5) 菊池慎太郎編著：微生物工学，23-24，三共出版(株)，2004。
- 6) 水谷敦司，相馬英明，田中壽晃，島津昌光，遠山忠，張裕喆，菊池慎太郎：レーザー照射による抗菌性酸化チタン材の作成と海洋汚損生物付着防除への応用，環境技術，35，(10)，756-762，2004。
- 7) S. Kikuchi, M. Fukumoto, H. Takahashi : Iron Storage in *Mycobacterium smegmatis* under Iron-sufficient and Iron-overload Conditions, Bioscience, Biotechnology & Biochemistry, 58, (5), 885-888, 1994.
- 8) 水谷敦司，北山茂一，原宏哉，張裕喆，遠山忠，長谷川靖，菊池慎太郎：光合成細菌による農産廃棄物からの生理活性物質生産と農業への応用可能性，水処理技術，48，(2)，49-54，2007。
- 9) 水谷敦司，海野健一，高橋紀行，成田均，永原利雄，武者一宏，藤井克彦，菊池慎太郎：微生物を利用する水産廃棄物の資源化，水処理技術，45，(12)，551-555，2004。
- 10) 菊池慎太郎編著：微生物工学，29-35，三共出版(株)，2004。
- 11) S. Kikuchi and M. Ishimoto : A D-Serine Dehydratase Acting also on L-Serine from *Klebsiella pneumonia*, Journal of Biochemistry, 84, (5), 1133-1138, 1978.
- 12) S. Kikuchi and M. Ishimoto : Nitrate respiration of *Klebsiella pneumonia* on amino acids, especially on serine, Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie, 20, (6), 405-413, 1980.
- 13) 山村雄一：病理生化学，449-520，岩波書店，1971。
- 14) 土壌環境センター編：環境省油汚染対策ガイドライン，99-115，化学日報社，2006。