

(0172) 沖縄県内土壌由来の油分解菌による土壌浄化技術の開発

○比嘉一葉¹・田邊俊朗²・古家克彦³・吉川大介³・山入端豊⁴・照屋正悟⁵

¹株式会社アイ・エス・ソリューション・²国立沖縄工業高等専門学校・

³一般財団法人沖縄県環境科学センター・⁴大鏡建設株式会社・⁵株式会社照屋土建

1. 序論

沖縄県内の米軍基地ではこれまでに航空機の燃料漏洩等が多数報告されている。沖縄県の米軍基地の総面積は229,921 km²(平成27年3月末現在)であり、県土面積に占める割合は10.1%である。これらの米軍基地が返還されれば、燃料系油分による土壌汚染が顕在化することが考えられる。燃料が環境中に流出すると、多環芳香族炭化水素の生物濃縮による人体へ影響が懸念され、特にヒトへの健康リスクとして、燃料に含まれるベンゼンには発がん性があることが報告されている。

油による土壌汚染の浄化・修復技術は多々存在しているが、掘削除去工法による汚染土の処分先の問題や各地方で異なる土壌の性状にあった原位置浄化工法の確立が困難等、沖縄県独自の問題により明確な浄化・修復技術が確立されていないのが現状である。

そこで本研究では、用いる微生物を沖縄独自のもので構成したバイオオーグメンテーションによる油汚染土壌の浄化技術の開発を目指し、安全で効率的な土壌浄化技術の開発を試みたので報告する。

2. 実験材料

2.1 土壌試料採取

沖縄県本島及び沖縄県内各離島より1,755の土壌試料を得ることができた。土壌試料を採取する際にはGPSを用いて各島偏りなく採取した。採取した島は、粟国島、久米島、伊是名島、伊平屋島、北大東島、南大東島、渡嘉敷島、渡名喜島、阿嘉島、座間味島、宮古島、伊良部島、多良間島、黒島、与那国島、石垣島、小浜島、竹富島、鳩間島、西表島、波照間島、伊江島、沖縄島の計23島である。

土壌試料を沖縄本島及び離島から各島内偏りなく採取した。採取した土壌試料は氷冷保存しながら持ち帰り、その後も4℃で保存した。

2.2 集積培養

土壌微生物の中からアルカン類資化性細菌及び芳香族化合物分解細菌のみが生き残るようSWY培地¹⁾を参考にベンゼン最小液体培地を作成した。このベンゼン最小液体培地中に各土壌試料を入れて3日間振盪培養した。菌体が増殖した上清をとり、新しいベンゼン最小液体培地へ継代した。この操作を3回繰り返して集積培養とした。

集積培養により、ベンゼンを分解・資化することができる1,705の土壌菌叢を得ることができた。

2.3 分離と単離

試験研究用として入手した原油を40℃で一晩、ドラフト内でインキュベートし揮発成分を蒸発させた残留原油を使用し、プレート培地に原油を薄く塗布した原油プレート培地を作成した。この原油プレート培地上に集積培養後の菌体懸濁液を薄く広げせ、3日間静置培養を行った。原油分解班を形成したコロニーをひとつずつ採取し、新しい原油プレート培地に再植菌した。24時間静置培養を行い、原油分解班の直径を測定して菌株の絞込を行った。

原油分解班の測定結果から486菌株に絞り込んだ。

In Situ bioremediation by Oil-degrading bacteria in Okinawa

Kazuha higa¹, Tanabe Toshiaki², Furuie Katsuhiko³, Yoshikawa Daisuke³, Yamaniha Yutaka⁴, Teruya Syougo⁵

(¹In Situ solutions Co., Ltd., ²NIT, Okinawa College, ³OPESC, ⁴Daikyo Construction Co., Ltd.

⁵TERUYA DOKEN Co., Ltd.)

連絡先：〒101-0044 東京都千代田区鍛冶町2-2-2 (株)アイ・エス・ソリューション

TEL 03-5297-7288 FAX 03-5297-0242 E-mail k_higa@is-solution.com

3. 実験内容

3.1 ベンゼン分離能の測定

絞り込んだ 486 の菌株を用いて、HS-GC を用いてベンゼン分解能が高い順に、上位の菌株を選抜した。ベンゼン最小液体培地に単離した各菌株を植菌したものと、コントロールとしてベンゼン最小液体培地だけのものをそれぞれ 24 時間培養し、HS-GC により培地中に残ったベンゼン濃度の測定を行った。コントロールのベンゼン最小液体培地のベンゼン濃度を 1mg/mL とし、24 時間後の各サンプルのベンゼン残存濃度(mg/mL)からベンゼン分解量(mg)を算出した。培地中に残るベンゼンが少ないほどベンゼン分解速度が速いと評価し、菌株の選抜を行った。

3.2 安全性試験

選抜した菌株の安全性を確認するため、16SrRNA 遺伝子の塩基配列解析を行い分類される属や種が判明した時点で、類縁種に有害なものがないか既知の情報から判断した。さらに OECD420 テストガイドラインを利用してマウスを用いた哺乳類に対する急性経口毒性試験を行った。

3.3 模擬汚染土壌を用いた実証試験

3.3.1 実証試験①

実証試験①では、ラボスケールでの実証実験を行った。模擬汚染土壌には、国頭マーグ 500g に軽油を加えた実証試験土 2 組と、実際に沖縄県内で採取した油汚染土壌 500g を用意した。模擬汚染土壌と選抜した 22 菌株全てを混合して培養した菌体培養液を作成し、模擬汚染土壌に対して 1%(v/w)及び 10%(v/w)の菌体培養液を 1 日 1 回投入し、その都度よく攪拌をして好氣的条件下で試験を行った。評価については、油汚染対策ガイドラインに従い、油臭及び全石油系炭化水素濃度を測定した。

3.3.2 実証試験②

実証試験②では、実証試験①よりもスケールアップして行った。模擬汚染土壌には、国頭マーグ 2.9 トンにベンゼン及び軽油を加えたものを作成し、図-1 及び図-2 に示した実証試験場を建て、試験場内に縦 1.7m×横 1.7m×深さ 0.5m のコンクリートマスを作成した。そこに模擬汚染土壌と菌体培養液 1%(v/w)を 0 日目及び 7 日目に投入し、1 日 1 回、小型のパワーショベルで土壌を攪拌し好氣的条件で行った。

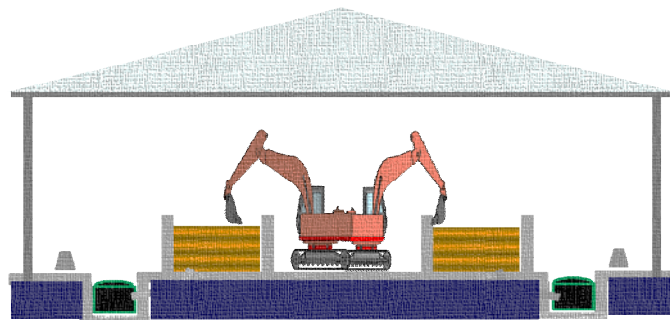


図-1 実証試験②概要図



図-2 実証試験場

4. 実験結果・考察

4.1 ベンゼン分離能の測定

原油プレート培地により単離した 486 菌株全てをヘッドスペース法用いてベンゼン分解能を測定した。分解能が高い順に、上位 22 菌株を有望株として、渡嘉敷島 5 株、伊是名島 5 株、沖縄島 4 株、南大東島 4 株、佐手 1 株、鳩間島 1 株、多良間島 1 株、伊江島 1 株を選抜し、その中でもベンゼン分解速度が高かった菌株は沖縄島より発見された。上位 22 菌株中で最も分解量が低かった菌株でも、8 割近くのベンゼンを分解することができた。また、渡嘉敷島、伊是名島、沖縄島、南大東島の土壌の共通点として主に国頭マージであることが挙げられる。国頭マージのような酸性で有機物に乏しい特性のある土壌への浄化が期待できる。しかし、通気性や浸透性が悪いという課題があるため、実証試験を行う際には、汚染土壌全体の酸素濃度を保つ工夫をしなければならない。

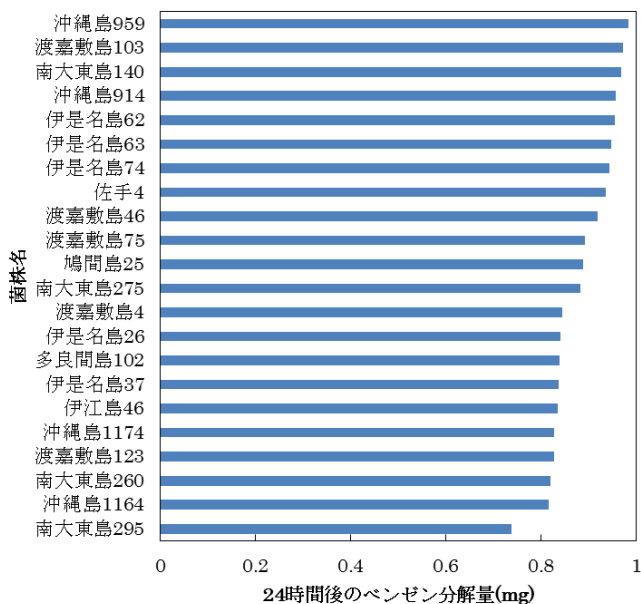


図-3 上位 22 菌株のベンゼン分解量

4.2 安全性試験

安全性試験については、16SrRNA 遺伝子の塩基配列解析および急性経口毒性試験の結果から選抜した菌株の安全性を確認した。この結果を踏まえ、有望株に関しては自然界での利用に問題はないと判断した。

4.3 模擬汚染土壌を用いた実証試験

4.3.1 実証試験①

表-1 に 0 日目の石油系炭化水素濃度、表-2 に 7 日目の石油系炭化水素濃度を示す。実証試験においては、7 日間続けたところ、菌体培養液を毎日 10%(v/w)投入すると、土壌中の石油系炭化水素の残存率が 0 日目と比べて半減し、油臭においては 7 日目の段階で 1%(v/w)投入区と 10%(v/w)投入区で、共に無くなっていた。短期的で油汚染土壌を浄化するには 10%(v/w)投入が有効と判断されるが、実用化に向けてさらなる浄化条件の検討を行う必要がある。

表-2 7 日目の全石油系炭化水素濃度 (mg/kg)

表-1 0 日目の全石油系炭化水素濃度 (mg/kg)

試料名	全石油系炭化水素濃度(mg/kg)			
	C6~C12	C12~C28	C28~C44	C6~C44
県内の油汚染土壌 10%(v/w)	410	3,600	<100	4,000
実証試験土	<100	2,700	<100	2,700
定量下限値	100	100	100	100

試料名	全石油系炭化水素濃度(mg/kg)			
	C6~C12	C12~C28	C28~C44	C6~C44
県内の油汚染土壌 10%(v/w)	<100	2,000	<100	2,000
実証試験 10%(v/w)	<100	1,400	<100	<1,400
実証試験 1%(v/w)	<100	1,800	<100	1,800
定量下限値	100	100	100	100

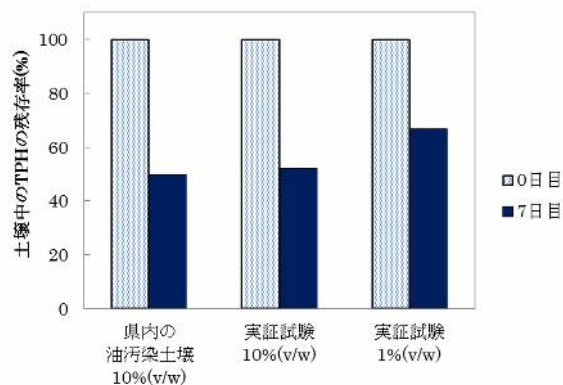


図-4 土壤中の全石油系炭化水素の残存率

4.3.2 実証試験②

実証試験②結果を図-5に示す。コントロールである対照区と比較して1%(v/w)投入区は軽油残存率が進んでいるが、菌体を投入していない攪拌のみの試験区とはあまり差はなかった。この結果から、0日目に菌体投入後、菌体がすぐに死滅していると仮定し、今後は、水分・pH・酸素濃度・栄養塩等の管理を行いながら菌体の増殖速度を一定に保ち続けるための工夫が必要である。

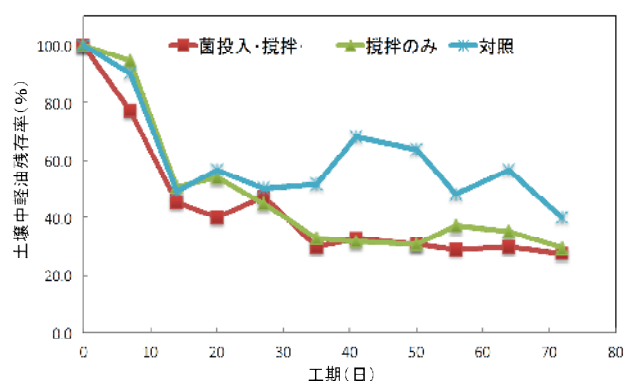


図-5 実証試験②結果

5. まとめ

本研究では、沖縄に自生する油分解菌の中から油分解能の高い菌体を探索し、浄化技術を開発することを目的とした。しかし、実証試験①及び実証試験②で著しい減少傾向は認められなかった。今回の結果から、以下の原因と改善点が挙げられる。

- ・模擬汚染土壌として利用した国頭マージの通気性や浸透性が悪いという特性から、土壌に十分な酸素が行き渡らず、菌体の増殖スピードが落ちたのではないかと。今後はパワーショベルによる攪拌ではなく、土壌に効率よく空気を送る工法を検討していく。
- ・ベンゼン分解能の最も高い22菌株を混合して菌体培養液を作成したが、混合することにより菌体どうしの競争が行われたのではないかと。実証試験においては国頭マージを使用したため、次回使用する菌体も国頭マージが分布する場所で採取した土壌から単離した菌体のみで菌体培養液を作成する等の検討を行う。

上記のことを踏まえ、今後も沖縄独自のバイオオーグメンテーションによる油汚染土壌の浄化技術の開発を行っていく。

謝辞

本研究は沖縄県の「微生物等を活用した汚染土壌の浄化処理技術開発事業」により実施されたものである。

参考文献

- 1) Hiroaki Tsutsumi, Yasushi Hirota, Akikazu Hirashima(2000) : Bioremediation on the Shore after an Oil Spill from the Nakhodka in the Sea of Japan. II. Toxicity of a Bioremediation Agent with Microbiological Cultures in Aquatic Organisms, Mar. Pollut. Bull., Vol.40, p.315-319