

## (S3-25) 油分を対象としたバイオレメディエーションにおける

## 施工管理としての油分分解菌の計数

○小松大祐<sup>1</sup>・畔津聖<sup>1</sup>・宮城盛<sup>1</sup>・西村実<sup>1</sup><sup>1</sup>(株)アイ・エス・ソリューション

## 1. はじめに

油分の浄化対策としてのバイオレメディエーションは、原位置での処理が可能であること、また、同じ原位置での処理が可能な化学酸化<sup>1)</sup>と比較し、対応可能な油種の範囲が広く<sup>2)</sup>、コストが抑えられる、といったメリットがある。反面、他工法と比較し、浄化期間が長期になりやすいというデメリットがある。筆者らは、土壌や地下水の環境により左右されやすいバイオレメディエーションについて、適切なモニタリングにより管理していくことで、浄化期間の短縮を目指している。

現在、ランドファーム等の好気的な油分対策におけるバイオスティミュレーションの場合、モニタリング項目の一つに全菌数がある。全菌数とは、培養できる従属栄養微生物すべての数であり、油分を分解できない細菌や真菌が相当数含まれている。従って、全菌数が増加することは、油分の分解が進むことと必ずしも一致するとは限らない。すなわち、全菌数とは、土壌もしくは地下水が一般的な従属栄養微生物にとって増殖に適した環境であるか否かを示す、環境パラメータの一つにすぎない。

一方で、油分は油分分解菌によって分解される。油分分解菌とは、油分を栄養源やエネルギー源として分解し、増殖できる菌を示す。従って、全菌数と比較し、油分分解菌数はより油分の分解と密接に関係しているといえる。

しかし、油分分解菌数の測定は、油分という混合物の分解菌を正確に測定するのが技術的に難しいこと、コストを要することから、好気的な油分対策におけるバイオレメディエーションの管理としてはほとんど行われていない。油分の分解菌を、測定することができれば、油分を対象としたバイオレメディエーションのより詳細な施工管理が可能になり、デメリットである浄化期間の短縮にもつながると考えられる。

本報告では、好気的な油分対策におけるバイオスティミュレーションを想定し、油分分解菌数の測定を、簡便でコストがかからない方法で試みた。すなわち、実汚染サイトの土壌を用い、軽油を添加することで、模擬汚染土壌を作成した。模擬汚染土壌を培養し、油分濃度、全菌数、油分分解菌数の関係を調べた。

## 2. 材料と方法

## 2.1 培養系の作成

汚染サイトの土壌 300g に対して、市販の軽油を 1000mg/kg となるように添加した。軽油の添加後はよく攪拌し、土壌中で均一になるようにした。無菌区には殺菌剤として、アジ化ナトリウムを土量に対し、1.5%(w/w)添加した。無添加区には何も添加せず、栄養塩添加区には栄養塩(窒素源、リン源)を窒素換算、リン換算でそれぞれ 150mg/kg、30mg/kg となるように添加した。実験区の概要を図-1に示す。培養は室温(20℃~27℃)で行い、すべての実験区は2~3日に一度、空気を送り込むために藁さじで攪拌した。また、含水量は適宜調整しながら培養した。

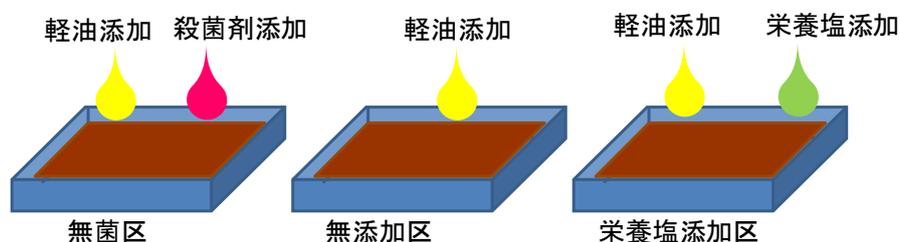


図-1 実験区の概要

Estimation of oil degrading microorganisms as a means of bioremediation monitoring

Daisuke Komatsu<sup>1</sup>, Sei Azetsu<sup>1</sup>, Sakari Miyagi<sup>1</sup> and Minoru Nishimura<sup>1</sup> (<sup>1</sup>In Situ Solutions Co., Ltd.)

連絡先: 〒101-0041 東京都千代田区神田須田町 2-5-2 須田町佐志田ビル 9F (株)アイ・エス・ソリューション

小松 大祐 TEL 03-5297-7288 FAX 03-5297-0242 E-mail d\_komatsu@is-solution.com

## 2.2 油分の測定

油分は1週間～10日に一度、模擬汚染土壌から土壌をサンプリングし、測定に供した。なお、測定はGC-FID法を用いた。

## 2.3 菌数の測定

全菌数はTSB寒天培地を用いた、プレートカウント法(CFU法)にて、油分分解菌数の測定は、油分(本実験では軽油を用いた)のみを炭素源、エネルギー源として添加した無機塩寒天培地を用いたCFU法にて行った。表-1、表-2に寒天培地の組成を示す。なお、CFU法とは、寒天培地に生やしたコロニーの数を数えることで、菌の数を測定する方法である。土壌や地下水等の試料を液体培地で希釈し、寒天培地に塗布する。培養後、生えてきたコロニーの数に希釈倍率をかけることで、元の試料中の菌数とする。ここで、コロニーとは、その一つが一つの菌体由来であり、増殖することで目に見える大きさになったものである。概念図を図-2に示す。培地はオートクレーブで滅菌処理後、クリーンベンチ内にて植菌を行った。なお、軽油は孔径0.2 $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターによって、ろ過滅菌をした。寒天培地の培養は室温(20～27 $^{\circ}\text{C}$ )で行い、1週間～10日後に生えてきたコロニーを計数した。

表-1 TSB寒天培地の組成

組成	(%)	$\text{g L}^{-1}$
Trypticase Soy Broth	3	30
酵母エキス	0.05	0.5
細菌用寒天	1.5	15

表-2 軽油を添加した寒天培地の組成

組成	(%)	$\text{g L}^{-1}$
$\text{MgCl}_2$	0.05	0.5
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.03	0.3
KCl	0.03	0.3
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.045	0.45
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.09	0.9
軽油	0.2	2
細菌用寒天	1.5	15

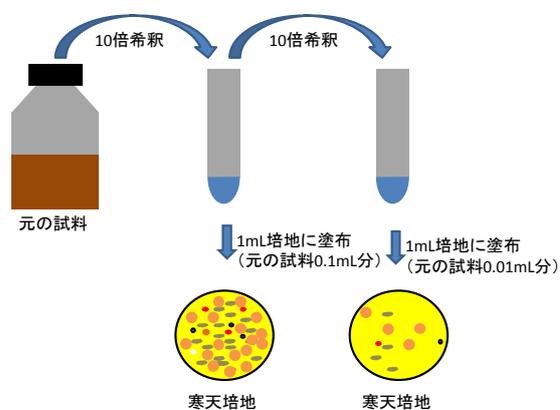


図-2 CFU法の概略

## 3. 結果と考察

### 3.1 油分濃度の変化

結果を図-3に示す。

栄養塩添加区において、培養32日間でTPHが約91%減少した。一方、無菌区、無添加区では、TPHの減少は約30～7%にとどまった。また、栄養塩を添加した区において、油臭・油膜は培養17日目において消失したが、栄養塩を添加しなかった区においては、30日間以上油臭・油膜が確認された。なお、無菌区においては、TPHの減少は見られなかった。

油分の減少は、無菌区においてほとんど見られなかったことから、栄養塩添加区における油分の減少は細菌もしくは真菌等の微生物による分解と考えられた。また、無添加区と比較し、栄養塩添加区において油分の分解が顕著にみられたことから、今回使用した土壌においては、栄養塩が不足しているために、無添加区における油分の分解が進まないことが考えられた。

### 3.2 菌数の変化

結果を図-3、4に示す。

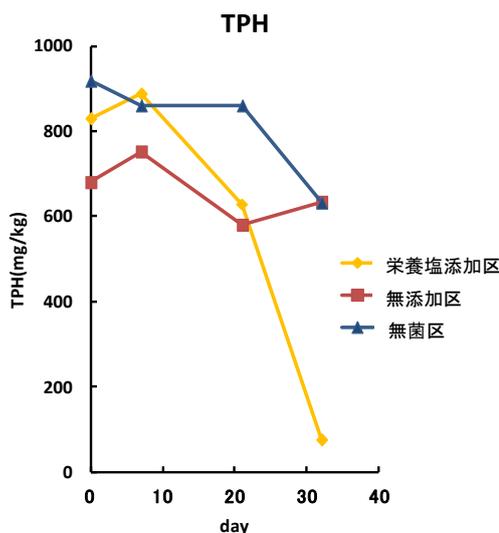


図-3 TPHの経時変化

油分のみを炭素源、エネルギー源として添加した無機塩寒天培地に生えてきたコロニーは、油分を分解することで炭素源、エネルギー源として増殖し、コロニーを形成した細菌、もしくは真菌であることを意味する。すなわち、油分分解菌であるといえる。

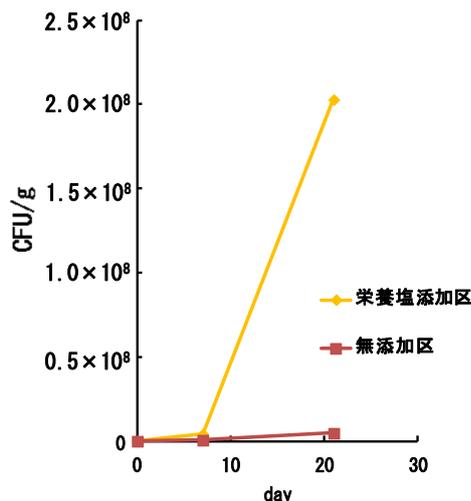


図-4 全菌数の経時変化

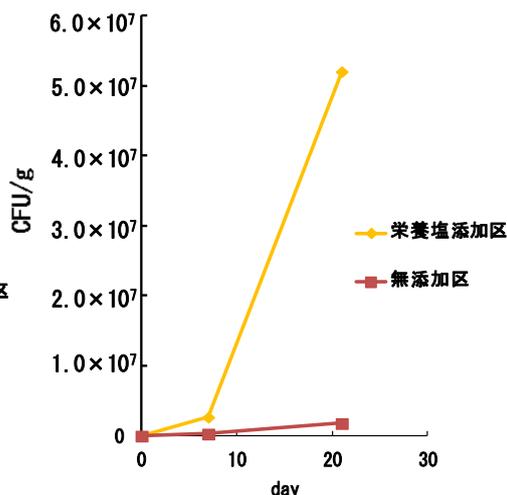


図-5 油分分解菌数の経時変化

培養 0 日目の値

と比較し、培養 21 日目において、無添加区、栄養塩添加区ともに全菌数、油分分解菌数が増加した。なお、無添加区と比較し、栄養塩添加区の方が全菌数、油分分解菌数ともに多かった。このことから、栄養塩添加区では、細菌もしくは真菌等の微生物が油分を栄養源として分解し、増殖したことが考えられた。なお、無添加区においては、油分のほとんどが残留していたのは、栄養塩の不足から油分分解菌が、十分に増殖できなかったからと考えられた。

また、栄養塩添加区における 21 日目の油分分解菌数は初期値の 5200 倍であった。一方、栄養塩添加区における 21 日目の全菌数は初期値の 507 倍であり、全菌数と比較し、油分分解菌数の方が増殖率が高いことが分かった。なお、今回用いた土壌においては、油分分解菌が初めから土着菌として 10000 CFU/g 存在していたことも明らかとなった。

#### 4. おわりに

今回の実験によって、油分分解菌の計数をすることができた。今回の方法は、きわめて単純な手法であり、測定にかかるコストも低い。このような単純で、コストがかからない手法は、現場における施工管理として重要な要件となる。今後は、さらに手法の簡便化を図ることも検討したい。

また、今回用いた実汚染サイトの土壌において、油分が分解された栄養塩添加区では、油分分解菌数が全菌数よりも高い増殖率を示した。このことは、油分分解菌数が全菌数よりも油分の分解により即したパラメータである可能性を示す。

今後は他の土壌でも同じ傾向を示すのか等を調べていく必要がある。データを蓄積することで、油分の分解に最低限必要な油分分解菌数の把握、油分分解菌数の増殖と油分の分解速度の関係、また、土壌に存在する初期の油分分解菌数と油分の分解速度の関係等を調べることで、バイオレメディエーションの浄化期間の予測、コントロール、そして浄化期間の短縮につなげていきたいと考えている。

#### 5. 参考文献等

1) 大澤武彦、中間哲志、杉田和俊 (2007) : 含油土壌のフェントン浄化における石油系炭化水素分解難易性, 第 13 回地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会, S6-13, 2007

2) Jonathan D. Van Hamme, Ajay Singh, and Owen P. Ward (2003) : Recent Advances in Petroleum, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, p. 503-549