

## 油の微生物分解処理技術の一般化に関する研究(その2)

斉藤雅樹\*・北嶋俊朗\*・関正明\*\*・長沼毅\*\*\*・長谷川剛史\*\*\*

\*地域資源担当・\*\*客員研究員・\*\*\*広島大学生物生産学部

### Research and Development for Utilization/Generalization of Biodegradation Disposal of Recovered Oil (2nd Report)

Masaki SAITO\*, Toshiro KITAJIMA\*, Masaaki SEKI\*\*, Takeshi NAGANUMA\*\*\*, Takashi HASEGAWA\*\*\*

\*Regional Resources Group, \*\*Visiting Researcher, \*\*\*Hiroshima University

#### 要 旨

当センターの研究成果である杉樹皮製油吸着材を、使用後に処理する際の環境負荷低減を目的とする微生物分解処理技術については、平成13年度より研究開発に着手し、大分県内のパーク堆肥による実験では開始時の油分濃度  $39,000 \pm 4,300\text{ppm}$  が約150日に  $6,000 \sim 8,000\text{ppm}$  程度となる等の成果を得ており、特許出願が行われている。19年度からは社会実装にフェイズを移し、北海道、山口県のパーク(樹皮)堆肥による実験を行い、油分推移と微生物相変化について検討を行い、大分県同様の傾向が見られた。本研究では、岩手県および栃木県のパーク堆肥による実験を行うとともに、流出油をバイオ処理する技術の実装活動としてシンポジウム等を開催した。

#### 1. はじめに

杉の樹皮を原料とする油吸着材は、平成9年のナホトカ号事故を契機に開始した当センターで研究開発を開始し、平成12年度にぶんご有機肥料株式会社(大分県竹田市)と特許実施許諾を行い、全国に普及しつつある。

杉樹皮製油吸着材の特徴は、廃棄物バイオマス(杉樹皮)を原料に用い、従来のプラスチック製品同等の吸油性、価格を実現したことにある。ここ数年は、回収油の現在の処理方法である「焼却」より環境負荷の小さい微生物分解により油と油吸着材の双方を処理するシステムを社会実装することを目標としている。

これまで、油濁発生現場からの回収油を閉鎖されたサイトにおいて微生物にて分解処理を行い、油分濃度の低下した残留物を環境に戻す、というシナリオを目指し、パーク堆肥製造工場における発酵工程をそのまま適用するモデルにつき実証研究を行ってきた。このモデルを想定した  $100\text{m}^3$  パーク堆肥による大分県での実験では、開始時の油分濃度  $39,000 \pm 4,300\text{ppm}$  は約150日後に  $6,000 \sim 8,000\text{ppm}$  程度となり、安定して油が減少するデータが得られている。

ところで、油濁事故においては回収物における油の占める割合が事故実測値で  $14 \sim 21\%$  程度<sup>1)</sup>、ナホトカ号事故では数%<sup>2)</sup>との報告があり、イメージするよりも油分割合は低いことが指摘されている。

そこで、本システムの社会実装には、分解処理拠点を全国に分散して配置することが効果的であると考え、昨19年度には北海道、山口県のパーク堆肥による実験をそれぞれ

行い、油分推移と微生物相変化を評価し、本技術の一般化・社会実装について検討を行った。

その結果、北海道の実験においては、実験開始時の油分濃度  $19,000 \pm 2,100\text{ppm}$  は、徐々に減少し、127日以降では  $1,800 \sim 4,700\text{ppm}$  とバックグラウンド周辺の値になった。また、山口県の実験においては、実験開始時の油分濃度  $15,000 \pm 1,700\text{ppm}$  は、徐々に減少し、150日以降では  $1,000 \sim 1,500\text{ppm}$  とバックグラウンド周辺の値になり、いずれの実験ともデータ上は投入油分のかなりの部分が分解されたと考えられる値を示す大分県での実験と同様の傾向が見られた<sup>3)</sup>。

本研究では、全国的な実装活動すなわち油のバイオ処理拠点を分散的に配置することを目指し、前年度に引き続き、岩手県および栃木県のパーク堆肥による実験をそれぞれの堆肥製造工場の発酵工程ヤードにて実施した。以下、岩手県、栃木県の実験をそれぞれ実験1、実験2とする。

あわせて、すでに実験を実施した北海道および山口県の二つの地域については、流出油をバイオ処理する技術の実装活動の一つとして関係者や市民に向けての普及啓発シンポジウムを開催するとともに、産廃行政や海上防災行政の担当者などと面会・相談を行い、本システムの実現に至るまでの社会的な課題を検討した。

## 2. 微生物分解処理実験

### 2.1 誤差評価

#### 2.1.1 各測定値の誤差評価

各測定値における誤差評価を行った。

バーク堆肥の水分率は実測により実験 1 で  $72 \pm 1\%$  (相対誤差 2%), 実験 2 で  $60 \pm 8\%$  (相対誤差 13%) とした。採取したバーク堆肥を  $105^\circ\text{C}$  の乾燥機に入れて絶対乾燥状態とし乾燥重量を測定して当初の水分量を推算し、水分量/当初重量により算出した。

バーク堆肥の嵩比重は実測により実験 1, 2 とも、 $0.50 \pm 0.03\text{g}/\text{cm}^3$  (相対誤差 6%) とした。採取したバーク堆肥を 2L 容器に入れ重量を測定し、算出した。

使用重機のバケット容積は、実験 1, 2 とも、 $2 \pm 0.2 \text{ m}^3$  (相対誤差 = 10%) とした。

C重油および吸着マット浸漬用の大型容器の計量は十分精度の高い機材を用いたため、誤差は無視できるものとした。また、サンプリングに起因する誤差については過去に実施した実験により相対誤差 68% とした<sup>4)</sup>。

#### 2.1.2 油分濃度の誤差評価

これまで述べた各誤差要因を総合する。独立な複数要因が重なるときは誤差を二乗和で算出している。

初期にC重油を投入したことにより付加された油分は、使用重機のバケット(相対誤差 = 10%)での作業回数(100 m<sup>3</sup>の場合 50 回とした)により求めたバーク堆肥パイル容積、バーク堆肥の嵩比重(相対誤差 = 6%)、投入C重油の重量(相対誤差 = 0)から求めているため、実験 1, 2 とも相対誤差 = 12% と考えられる。

また、実験期間における油分測定には n-ヘキサン抽出重量法を用いるが、バーク堆肥そのものが含んでいる n-ヘキサン可溶物も同時に「油分」として検出されるため、C重油投入前のバーク堆肥についても「油分濃度」を測定しておく必要がある(これをバックグラウンドと呼ぶ)。今回の測定値は、実験 1 で 270ppm-dry, 100ppm-wet(相対誤差 0%)、実験 2 で 890ppm-dry, 330ppm-wet(相対誤差 17%)の数値を示している。

以上より、実験開始段階すなわち初期の油分濃度は、投入C重油によるものとバックグラウンドを合計した値と考えることが出来るが、この相対誤差は二乗平均により、実験 1, 2 とも 12% と算出される。

各測定時点における推定油分濃度は、n-ヘキサン抽出重量法により得られた実測値から、バーク堆肥からのC重油回収率で除し(実験 1, 2 とも 77%)、水分率(実験 1 で相対誤差 2%, 実験 2 で相対誤差 17%)から dry 換算することによって求めるため、実験 1 で相対誤差 = 2%, 実験 2 で相対誤差 = 13% と考えられる。また、サンプリングにおける誤差を算入すると、各測定時点における推定油分濃度は実験 1, 2 と

も相対誤差 = 68% となる。また、バーク堆肥自身の持つ溶媒溶出分(バックグラウンド)も誤差を考慮し、グラフ上で帯表示とした。油分濃度の低い測定値では影響が大きいので、結果の評価において注意が必要である。

### 2.2 実験の方法

バーク堆肥原料の中に吸油後の油吸着材を埋め込み、円錐形パイル状に被覆した後、定期的に攪拌(切り返し)を行って、油分濃度の変化を調査した。実験のフィールドは、実験 1 ではトア木材(株)(岩手県岩泉町)敷地内、実験 2 では(有)日光有機(栃木県日光市)敷地内に設けた。

実験 1, 2 とも以下の手順に従って、吸着マットをバーク堆肥パイルに埋め込んだ。

- 大型容器(ドラム缶)を計量する
- 大型容器(ドラム缶)に吸着マットを入れる
- 大型容器(ドラム缶)に計量したC重油を注ぎ、吸着マットに吸着させる
- 吸油後の吸着マットを大型容器(ドラム缶)から取り出し各パイル断面に規定枚数並べる(Fig. 1: 実験 1)
- 大型容器(ドラム缶)の減量分を計量する

パイル断面に吸着マットを並べ終わるとバーク堆肥で規定の間隔(高さ)だけ被覆し、順次上のパイル断面に移り、同様の作業を行う

用いた油はC重油で、実験 1 で 300kg、実験 2 で 1,100kg を、製品版の「杉の油取り」マット型(45cm x 45cm)に実験 1 で 500 枚、実験 2 で 1,500 枚に吸着させて実験に供した。バーク堆肥は重機のバケットで容積を計量した約 100 m<sup>3</sup> (相対誤差 = 10%) ほどを用いた。嵩比重が約 0.50 (相対誤差 = 6%) であることから約  $50 \pm 5\text{t}$  (実験 1 で  $14 \pm 0.3\text{t-dry}$ 、実験 2 で  $30\text{t} \pm 5\text{t-dry}$  に相当) であると推定される。

パイルの形状は実験 1 でやや膨らんだ円錐台状で、上面  $\phi 4\text{m}$ 、底面  $\phi 8\text{m}$ 、高さ 3.5m 程度となった。実験 2 ではコンクリート敷、屋根つき三方囲いの堆肥ヤード(幅 4.5m、奥行き 12m 程度)を用いた。バーク堆肥原料は発酵開始から数ヶ月経過した微生物活動の活発なものと、昨年度までの油分解実験に供した分解残留物を混合したものを実験に使用した。パイル全体の実験開始時の油分濃度の平均値は実験 1 で約  $22,000 \pm 2,500\text{ppm}$ 、実験 2 で約  $55,000 \pm 6,400\text{ppm}$  と推算される。

また、実験 1 で使用するバーク堆肥は「カラマツおよびアカマツ + 牛糞および鶏糞」、実験 2 で使用するバーク堆肥は「杉樹皮および木くず + 食品残渣および汚泥」を原料とする。

なお、従来の油分解実験においては初期油分濃度の計算値は 39,000ppm が最高であり、実験 2 はそれに比してさらに高濃度になるよう多量のC重油を投入しているが、バーク堆肥による油分解処理方式の限界を見極める試みでもある。



Fig.1 吸着マットを並べる様子(実験 1)

バーク堆肥は製造工程において、好気発酵に要する酸素供給のために定期的に攪拌(切り返し)を行っている。活発な微生物活動に資するため、実験 1, 2とも約 2 週間に 1 回の頻度で、重機を用いてバーク堆肥パイルの上側からすくい取ったものを隣接する場所に順次移動させる方法で行った。なお、バーク堆肥と埋め込まれた吸着マットは同様に扱って攪拌した。また、攪拌の際に油分測定のためのサンプリングも同時に行った。

測定項目は以下のとおりとした。

① 油分濃度(n-ヘキサン抽出重量法)：

実験 1, 2とも約 2 週間毎

② 微生物相の調査(DGGE)

開始時, 2 ヶ月後, 4 ヶ月後の計 3 回

③ 目視観察など(油の臭気, 手指への油分付着など)

油分, 油種の測定とも n-ヘキサンによるソックスレー抽出を用いた。①の分析作業は(株)住化分析センターが、③および④はサイト企業がそれぞれ行った。①の油分濃度については先に述べた誤差評価に照らした数値で検討した。

## 2.3 実験の結果

### 2.3.1 油分濃度(実験 1)

実験開始時(0 日, 油投入直後)における計算上の油分濃度は、約 22,000±2,500ppm である。1 回目のサンプリングは最初の攪拌が行われた開始後 2 週間時点に行った。この後、2 週間ごとに行う攪拌時にサンプルを採取した後、それぞれの油分濃度を測定した。油分濃度の変化を Fig.2(相対誤差=68%で表記)に示す。

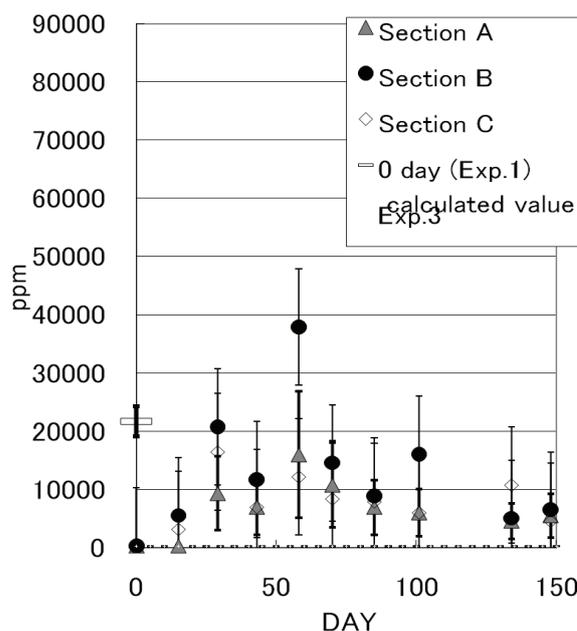


Fig.2 油分濃度の変化(実験 1, 相対誤差 68%)

概して測定値のバラつきが大きく、開始後 50 日以前は計算上の初期油分濃度を下回るが、50 日時点以降ではいくつかの特異な値を除いて油分の減少傾向をエラーバーの範囲内で読み取ることができる。サンプリング要因によるバラつきと解釈することが可能である。なお、初回 20 日時点では低い油分濃度を示しているが、攪拌時のオペレーションやサンプリング時の偏りなどの影響と考えられる。

148 日時点における油分は 4,500~6,500ppm 程度と、開始時の計算上の油分濃度の 1/4~1/5 程度に減少している。一方で、いまだバックグラウンド周辺の値と開きがあるため、さらに観察を継続する必要がある。

周囲の水溜りには開始直後に油膜が観察されたものの、それ以降には観察されなかった。

なお、120 日時点前後の攪拌およびサンプリングは積雪のため実施しなかった。

### 2.3.2 油分濃度(実験 2)

実験開始時(0 日, 油投入直後)における計算上の油分濃度は、約 55,000±6,400ppm である。1 回目のサンプリングは最初の攪拌が行われた開始後 2 週間時点に行った。この後、約 4 週間ごとに行う攪拌時にサンプルを採取し、それぞれの油分濃度を測定した。油分濃度の変化を Fig.3(相対誤差=68%で表記)に示す。

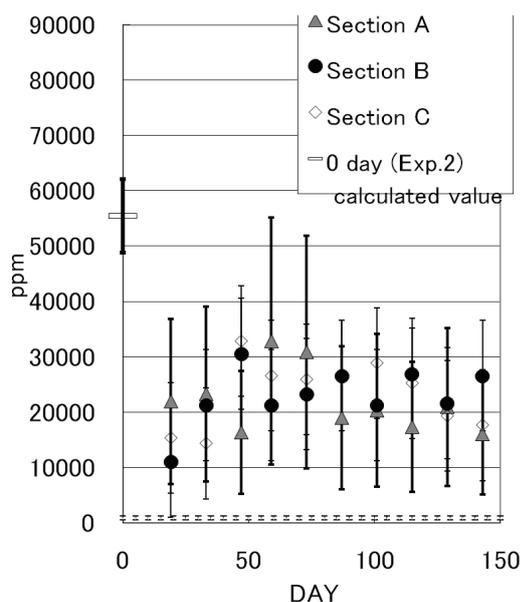


Fig.3 油分濃度の変化(実験 2, 相対誤差 68%)

概して測定値のバラつきは実験 1 よりも大きく解釈が難しい。50 日時点以降では油分が減少傾向にあると見ることが可能であるが、その傾向は明確であるとは言えない。最終サンプリング時点においてバックグラウンド値と開きが大きいいため、継続して観察する必要があると考えられる。

従来よりも分解に時間を要している原因として、従来の油分解実験にない高濃度の初期油分値を設定したことや、バーク堆肥提供者によると水分率が低めになっており、必ずしも発酵状態がよくなかったのではないかと、との指摘もある。

### 2.3.3 微生物相の変化

バーク堆肥パイルの微生物相の変化について PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)の手法を用いて特定を試みた。

サンプルから抽出した DNA につき DGGE を行い、油分解前(T000, N000), 2 ヶ月後(T063, N059), 4 ヶ月後(T134, N129)のサンプルの相違を比較した。Fig.4 にバクテリアを、Fig.5 にアーキアのバンドパターンを示す。アーキアとは生物分類上では独立したドメインを持つ古細菌と呼ばれる生物群である。これらについて、分解前に特異的なもの、分解後に特異的なもの、分解前後で共通のものにつき、16SrDNA のシーケンス解析を行って微生物種を推定した。

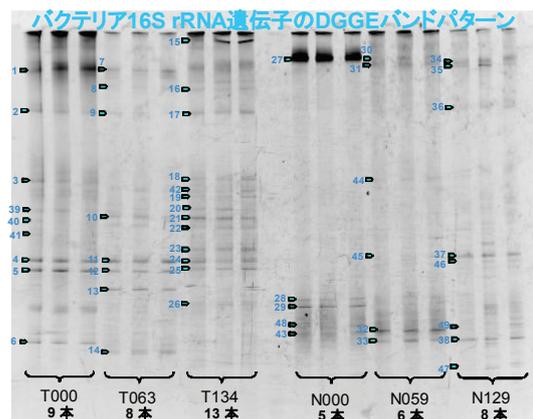


Fig.4 DGGE バンドパターン比較(バクテリア)

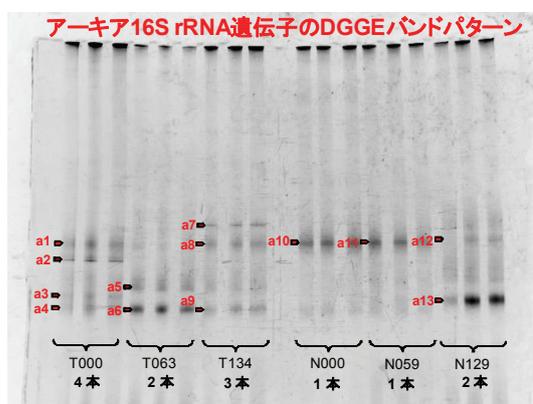


Fig.5 DGGE バンドパターン比較(アーキア)

多種の難分解性物質を分解し、油流出事故のバイオレメディエーションにおいて増え、いわゆる石油分解菌であるとの報告がある<sup>5)</sup>CFB (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes)グループのバクテリアが、これまでの一連の研究においてバーク堆肥から発見されている。

今回の実験では CFB グループが最も近縁であるバンドの本数は、T グループ(実験 1)の堆肥では T000(7 本) → T063(5 本) → T134(8 本), N グループの堆肥では N000(1 本) → N059(0 本) → N129(3 本)と推移していた。また、以前に確認されたものに最も近縁なバンドが T グループの堆肥では期間を通じて、一方、N グループの堆肥においては 4 ヶ月後の N129 のみに出現した。これらは油分解が進行することで出現した可能性が考えられる。

一方、アーキアについては、好熱古細菌に該当し、高温土壌・深海の石油貯蔵庫などに生息することが知られる Crenarchaeota が、相同性検索で最も数多く該当した。

## 3. 社会実装活動

本研究は「油流出事故回収物の微生物分解処理の普及」実装活動の一環と位置付けられており、普及啓発を図る目

的で、環境シンポジウム「流出油をバイオで処理する」を、平成20年10月27日(月)に北海道札幌市にて、同12月1日(月)に山口県下関市にて開催した。

シンポジウムではまず東海大学・山田吉彦氏による基調講演「日本の海上安全と油流出事故」にて、海洋国・我が国の現状と海上安全における課題が俯瞰的に紹介され、油流出事故を含めた各論につき提言を頂いた。続いて「油流出事故への対応」と題して(独)海上災害防止センターの小倉秀氏に講演を頂き、油流出事故の概要が実例をもとに一般来場者にもわかりやすく紹介された。

その後、本実装活動の紹介として、「流出油のバイオ処理～バーク堆肥を使う新技術」と題し、グループ代表者の大分県産業科学技術センターの齊藤雅樹より活動趣旨と具体的構想につき説明を行い、北海道では帯広地区の森産業(株)様でのデモ試験の結果を、山口県では下関地区の山陽チップ工業(株)様でのデモ試験の結果を紹介し、本実装活動への賛同者(企業)が募られた。

当日は油流出事故など海上防災に従事する方をはじめ、一般の環境業務・学習に取り組む市民の方まで幅広い参加者があった。



Fig.6 会場の様子(H21.10.27 札幌市, 参加 86名)

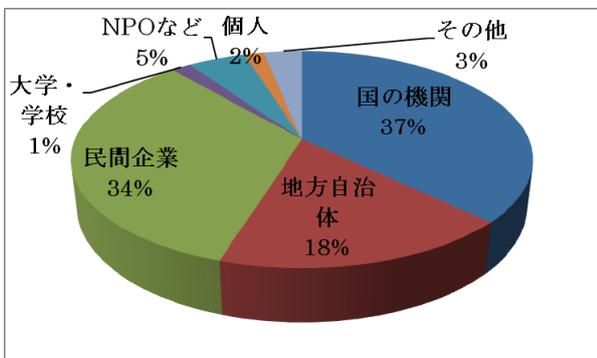


Fig.7 機関別内訳(H21.10.27 札幌市, 参加 86名)

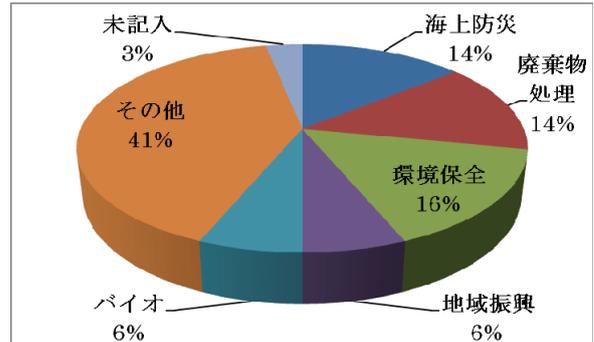


Fig.8 分野別内訳(H21.10.27 札幌市, 参加 86名)



Fig.9 会場の様子(H21.12.1 下関市, 参加 91名)

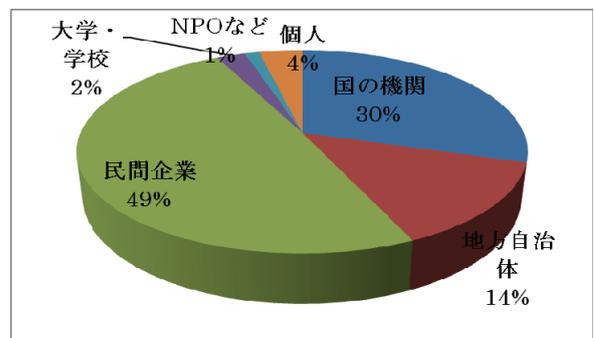


Fig.10 機関別内訳(H21.12.1 下関市, 参加 91名)

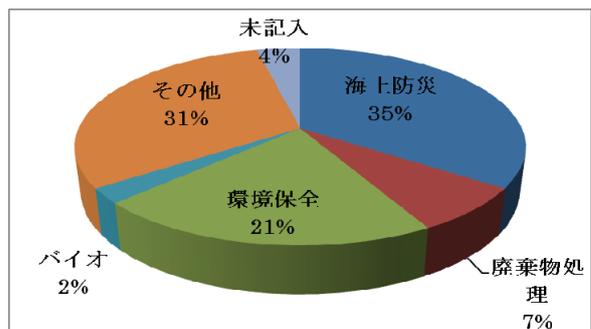


Fig.11 分野別内訳(H21.12.1 下関市, 参加 91名)

#### 4. まとめ

本研究により得られた知見は以下のとおりである。

- C 重油を吸着させた杉樹皮製油吸着材の微生物分解実験により、実験 1(岩手県)においては、最終サンプリングの 148 日時点における油分は 4,500~6,500ppm 程度と、開始時の計算上の油分濃度の 1/4~1/5 程度に減少した。一方で、いまだバックグラウンド周辺の値と開きがあるため、さらに観察を継続する必要がある。
- 実験 2(栃木県)においては、50 日時点以降では油分が減少傾向にあると見ることも可能であるが、その傾向は明確であるとは言えず、観察を継続する必要がある。原因として、従来の油分解実験にない高濃度の初期油分値を設定したことなどが考えられる。
- 微生物相の変化については、石油分解菌として働くと報告がある CFB グループに分類され、以前の一連の実験で確認されたものと同種のもので、実験 1 では期間を通じて、実験 2 では 4 ヶ月後の堆肥に出現し、本実験において、油分解に関与している可能性が示された。
- 研究成果および本構想の普及啓発を図る目的で、環境シンポジウム「流出油をバイオで処理する」を、平成 20 年 10 月 27 日に北海道札幌市にて、同 12 月 1 日に山口県下関市にて開催した。

微生物分解処理技術は、製造、使用、処分時における熱処理が原則として不要な環境負荷の低い油回収・処理システムとして期待されており、引き続き本技術の一般化と社会への実装活動が求められることになると考えられる。

#### 謝辞

本研究に多大なる支援を頂いた(独)科学技術振興機構、実装活動にご協力頂いた貴重な助言を頂いた東京大学・山口一教授、東海大学・山田吉彦准教授、(独)海上災害防止センター・小倉秀氏および木本弘之氏、実験資材と場所を提供頂いた森産業(株)、山陽チップ工業(株)、トーア木材(株)、(有)日光有機の皆様、実験に協力頂いた NPO 法人日本パーク堆肥協会、ぶんご有機肥料(株)の皆様に御礼申し上げます。

#### 参考文献

- (1) (独)海上災害防止センター: 杉樹皮製油吸着材の有効利用及び微生物分解処理技術に関する調査研究報告書Ⅱ, 第 4 章, 2005
- (2) 内藤林 他: ナホトカ号の事故に関する調査研究報告書(ナホトカ号の事故に関する調査研究会編), 1998
- (3) 斉藤雅樹, 他: 油の微生物分解処理技術の一般化に関する研究, 大分県産業科学技術センター平成 19 年

度研究報告, 2008

- (4) 斉藤雅樹, 小倉秀 他: 杉樹皮製油吸着材の微生物分解処理技術に関する研究, 日本船舶海洋工学会論文集, 第 2 号, pp.9-18, 2005
- (5) S. J. Macnaughton, etc.: Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill, Applied and Environmental Microbiology, Aug. 1999
- (6) Yoshihiro Nishikawa, Masaki Saito, and Takeshi Naganuma: Succession of Bacterial Communities during Petroleum Degradation in Bark Compost as Detected by Small Subunit Ribosomal RNA Gene Profiles, Aquatic Ecosystem Health & Management, 9(4):457-462, 2006