

油の微生物分解処理技術の一般化に関する研究

齊藤雅樹*・玉造公男*・長沼毅**・長谷川剛史**・小倉秀***・木本弘之***

*地域資源担当・**広島大学生物生産学部・*** (独)海上災害防止センター

Research and Development for Utilization/Generalization of Biodegradation Disposal of Recovered Oil

Masaki SAITO*, Kimio TAMATSUKURI*

Takeshi NAGANUMA**, Takashi Hasegawa**, Suguru OGURA***, Hiroyuki KIMOTO***

*Regional Resources Group

Hiroshima University, *Maritime Disaster Prevention Center

要 旨

油濁事故の対策資材である油吸着材の原料に杉樹皮を用いる「杉樹皮製油吸着材」は、平成10年度以降、日本財団などの支援により当センターと(独)海上災害防止センターと共同で実用化研究が行われ、ぶんご有機肥料株式会社(大分県竹田市)により製品化されている。平成13年度からは吸油後の杉樹皮製油吸着材を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の研究開発に着手し、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 $39,000 \pm 4,300$ ppmが約150日に $6,000 \sim 8,000$ ppm程度となる等の成果を得た。本研究では北海道、山口県のパーク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った。

1. はじめに

杉の製材で発生する樹皮を原料に用いる油吸着材は、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の基礎的な研究開発を端緒に、特許出願・登録や実施許諾を経て平成12年度にぶんご有機肥料株式会社(大分県竹田市)をメーカーとする「杉の油取り(すぎのゆとり)」の品名で全国に普及しつつある。

杉樹皮製油吸着材の特徴は、廃棄物バイオマスと位置付けられる杉の樹皮を原料に用い、従来のプラスチック製品並みの吸油性能、価格を実現していることである。生分解性の特徴を活かし、現在の唯一の処理方法である「焼却」より環境負荷の小さい方法、すなわち微生物を活用して油と油吸着材の双方を分解処理する手法を実現させることがここ数年の目標となっている。

平成13年度からこれまで一連の研究開発で目指しているのは、油濁発生現場から運搬された使用後の油吸着材を、「閉鎖された空間」において微生物、栄養源、および活動に適した環境を与えて、速やかに分解処理を行い、安全基準範囲内に達した残留物を環境(例えば土壌)に戻す、というものである。当グループでは、パーク堆肥製造工場における微生物活動ヤードをそのまま適用することを実用モデルとして捉えてきた。

このモデルを想定した 100m^3 パーク堆肥による18年度の実験では、実験開始時の油分濃度 $39,000 \pm 4,300$ ppmは約

150日に $6,000 \sim 8,000$ 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。

昨年度は、より低コストで無駄のないシステムを開発するべく、従来と逆の輸送の仕組み、すなわち、油など回収物を処理サイトまで運搬する替わりに、回収物を一旦陸揚げし、近辺に適切な場所を確保し、そこに微生物分解資材であるパーク堆肥の方を運搬し、分解処理を行う方式を検討した。これは、海洋油濁事故での回収物における油の占める割合が事故実測値で14~21%程度¹⁾、ナホトカ号事故では数%²⁾との報告があるように、“意外に”油分割が低いためである。

その結果、産廃用鉄製容器での 20.1m^3 パーク堆肥による実験においては、開始時の油分濃度 $39,000 \pm 4,300$ ppmは約128日時点で $5,000 \sim 8,000$ ppm程度となり、当初の1/2~1/4まで低下することが判明したが、データはバラつきが大きく明確に油分が減少すると判断するには至らなかった。

そこで、これまで実績のある 100m^3 パーク堆肥による分解処理拠点を適切な位置に配置することが本技術の早期普及に資する可能性が高いと考え、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に関する実験を行い、本技術の一般化・実装について検討を行った。以下、北海道、山口県の実験をそれぞれ実験1、実験2とする。

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 $63 \pm 3\%$ （相対誤差4%）、実験2で $58 \pm 3\%$ （相対誤差5%）とした。

採取したバーク堆肥を 105°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。

ホイールローダのバケット容積は、バケット形状から実験1, 2とも、 $2 \pm 0.2 \text{ m}^3$ （相対誤差=10%）とした。数値はメーカーカタログによる。

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³⁾。

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、ホイールローダのバケット（相対誤差=10%）での作業回数（ 100 m^3 の場合50回）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 $3,000\text{ppm-dry}$ 、 $1,100\text{ppm-wet}$ （相対誤差36%）、実験2で 700ppm-dry 、 200ppm-wet （相対誤差22%）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和平均により、実験1, 2とも11%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で75%、実験2で77%）、水分率（実験1, 2とも相対誤差4%）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=4%、実験2で相対

誤差=5%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ため、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では森産業株（北海道士幌町）敷地内、実験2では山陽チップ工業株（山口県下関市）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

実験1, 2とも用いた油はC重油300kgで、製品版の「杉の油取り」マット型（ $45\text{cm} \times 45\text{cm}$ ）合計500枚に吸着させて実験に供した。バーク堆肥はホイールローダのバケットで容積を計量した約 100 m^3 （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 $19 \pm 2\text{t-dry}$ 、実験2で $21\text{t} \pm 2\text{t-dry}$ に相当）であると推定される。

パイルの形状は実験1, 2とも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。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 $19,000 \pm 2,100\text{ppm}$ 、実験2で約 $15,000 \pm 1,700\text{ppm}$ と推算される。

なお、実験1で使用するバーク堆肥は「国産広葉樹とオガクズ混合物+牛糞」、実験2で使用するバーク堆肥は「国産広葉樹+鶏糞」を原料とする。



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においては約2週間に1回、実験2については約4～5週間に1回の頻度で攪拌を行った。パワーショベルなどの重機を用い、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は約2週間毎、実験2は約4～5週間毎

②微生物相の調査 (DGGE)

開始時、2ヵ月後、4ヵ月後の計3回

③目視観察など (油の臭気、手指への油分付着など)

④パイル内の温度 (実験1、攪拌時毎)

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㈱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。④の温度測定は、4箇所の測定点におけるパイル表面から70cmの深さ地点にて行った。

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 $19,000 \pm 2,100$ ppm 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、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=6%で表記)、Fig. 3 (同68%) に示す。

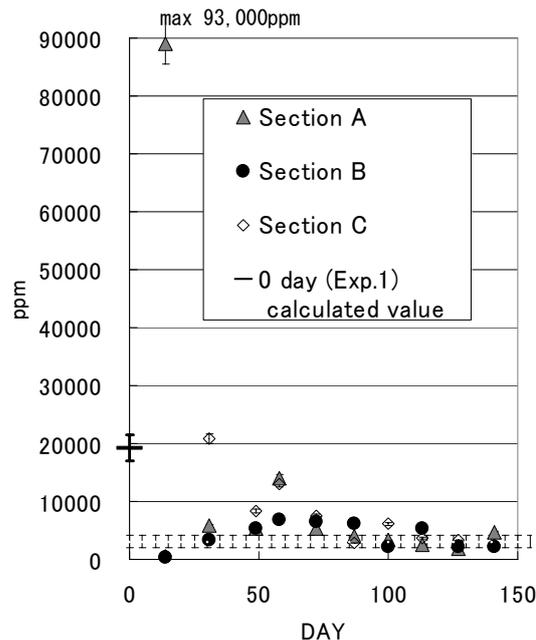


Fig. 2 油分濃度の変化 (実験1, 相対誤差6%)

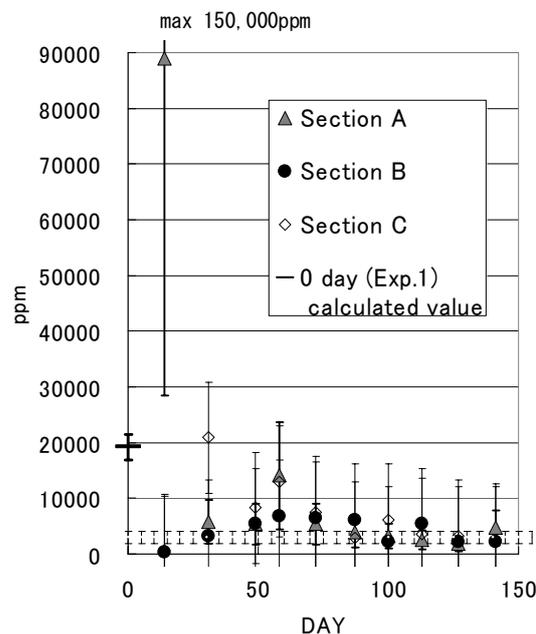


Fig. 3 油分濃度の変化 (実験1, 相対誤差68%)

相対誤差6%で表記した Fig. 2 ではバラつきが大きく各地点の値のエラーバーが重ならない部分がある。測定値から真の値を推測する上では、サンプリング要因を加味して相対誤差68%で表記した Fig. 3 を採用した方が妥当と思われる。概して測定値のバラつきが大きいが、Fig. 3 では初回測定の日時点以外では油分の減少傾

向をエラーバーの範囲内で読み取ることができ、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14日時点ではSection Aのみ高い油分濃度を示し、Section BおよびCでは極端に低い値を示しているが、開始時のオペレーションでバーク堆肥パイルの下部に重点的に油を投入したことによる影響と考えられる。

72日時点以降では測定値のバラつきが概ね小さくなっている。原因として、微生物分解が進んで油塊が小さくなることや攪拌回数が増えてバーク堆肥内の油分濃度がより均一になることなどが考えられる。

開始直後の各地点における油分濃度はバラつきが大きいものの、徐々に減少し、87日付近で3,000~6,000ppmを中心とする範囲に移行する。また、127日以降においては1,800~4,700ppmとバックグラウンド周辺の値になっており、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している。

油の臭気については、実験開始直後に比べ、漸減する傾向が見られた。また、周囲の水溜りには開始直後から終了時に至るまで油膜は観察されなかった。

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15,000±1,700ppm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5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. 4(相対誤差=6%で表記)、Fig. 5(同68%)に示す。

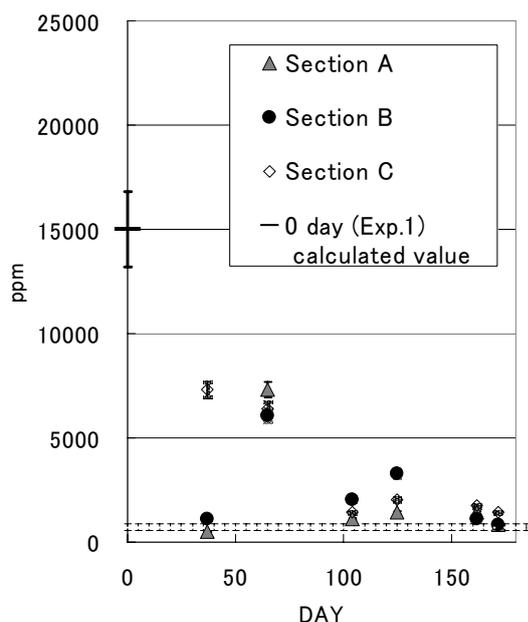


Fig. 4 油分濃度の変化 (実験2, 相対誤差6%)

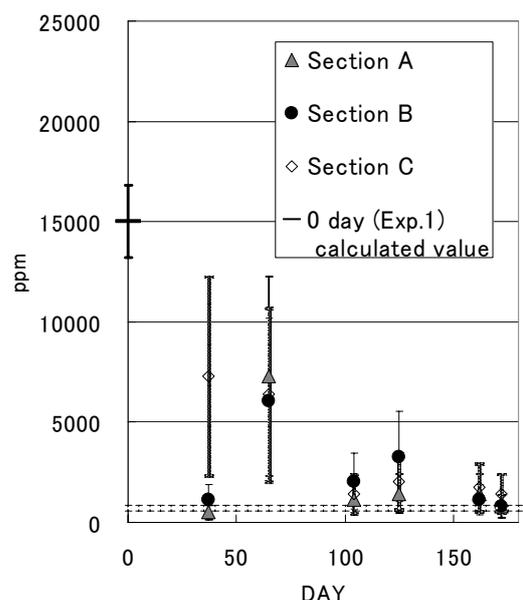


Fig. 5 油分濃度の変化 (実験2, 相対誤差68%)

相対誤差6%で表記したFig. 4ではバラつきが大きく各地点の値のエラーバーが重ならない部分があるのは実験1と共通の傾向である。測定値から真の値を推測する上では、この実験2においてもサンプリング要因を加味して相対誤差68%で表記したFig. 5を採用した方が妥当と思われる。測定値のバラつきは実験1よりも大きく解釈が難しいものの、Fig. 5では初回測定以外の37日時点以外では油分が減少傾向にあると見ることも可能である。150日時点以降では測定値のバラつきが概ね小さく、油分の範囲も1,000~1,500ppmとバックグラウンドに近い値となっており、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している。

2.3.3 温度変化 (実験1)

実験1のバーク堆肥パイル内の温度の変化をFig. 6に示す。

実験当初からバーク堆肥の活性な状態とされる60~70℃を示し、その後、徐々に温度が低下する傾向が見られるが、これまで数回実施した同規模の実験に比してその低下具合は少なく、127日時点までは期間を通じて概ね50℃以上と比較的高温を維持しており、活発な微生物活動を示すものと考えられる。一方、最終測定の日時点では40℃前後まで温度が低下しており、微生物活動が低下傾向にあると考えられる。

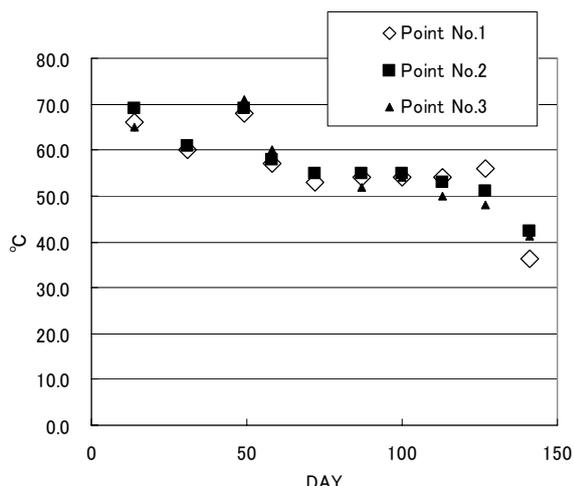


Fig. 6 バーク堆肥パイル内の温度変化 (実験 1)

2.3.4 微生物相の変化

微生物相の変化について 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、2 カ月後、4 ヶ月後の 3 サンプルの相違を比較した (Fig. 7) 。 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。

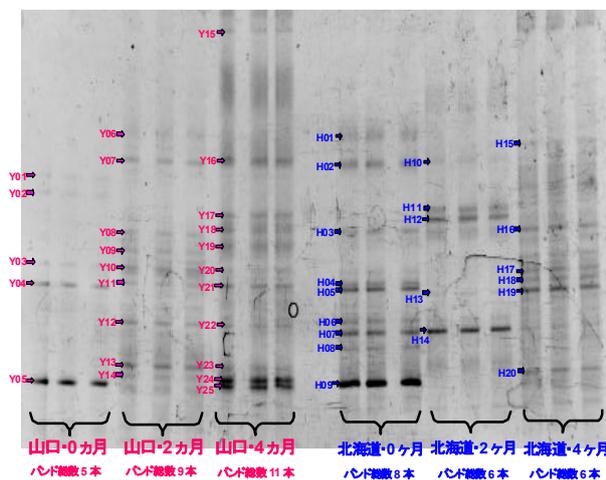


Fig. 7 DGGE パターン比較

実験 1 (北海道) については、実験開始時にのみ存在したと考えられる細菌は、Bacteroidetes bacterium (バンド # H02), Paenibacillus 属 (バンド # H04, H05) と Bacillus 属 (バンド # H07) に最も近縁であった。また、2 ヶ月後と 4 ヶ月後の堆肥にのみ出現したと考えられる細菌は、Unidentified eubacterium (バンド # H14, H16) と Lewinella nigricans* (バンド # H13, H19) に最も近縁であった。

さらに、相同性は 97% 以下であったものの、4 ヶ月後のサンプルには Ruminofilibacter xylanolyticum* (バンド # H15) に近縁な細菌が特異的に存在していた。

実験 2 (山口県) については、実験開始時にのみ存在したと考えられる細菌は、Adhaeribacter aquaticus* (バンド # Y01, Y02) と Sporocytophaga* 属 (バンド # Y03) に最も近縁であった。また、2 ヶ月後と 4 ヶ月後の堆肥にのみ出現したと考えられる細菌は、Flavobacterium* 属 (バンド # Y06, Y15), Sphingobacteriales bacterium* (バンド # Y10, Y11, Y20, Y21) と Bacillus 属 (Y13, Y14, Y23) に最も近縁であった。そして、開始時・2 ヶ月・4 ヶ月のサンプル全てにおいて存在したと考えられる細菌は、Paenibacillus 属 (バンド # Y04, Y05, Y12, Y22) に最も近縁であった。

さらに、4 ヶ月後のサンプルからは、Flavobacterium johnsoniae* (バンド # Y16), Sphingobacteriales bacterium (バンド # Y17), Bacterium 7A7 (バンド # Y18), Cytophaga hutchinsonii* (バンド # Y19), Cohnella soli (バンド # Y24) との相同性が 97% 以上である細菌が存在していた。

また、ここまでに挙げた菌の内、*印を付けた細菌は、Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) グループに分類されるものであった。このグループの細菌の多くは、多種類の難分解性物質を分解できることが知られている。実験 1 の 2 ヶ月後と 4 ヶ月後の堆肥に出現したと考えられる細菌 CFB は油流出事故のバイオレメディエーションにおいて増え、石油分解菌として働く微生物であるという報告がなされており⁴⁾、この微生物が今回実施したバーク堆肥パイルでの実験において、油分解に関与している可能性が示された。

また、ここまでに挙げた菌の内、*印を付けた細菌は、Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) グループに分類されるものであった。このグループの細菌の多くは、多種類の難分解性物質を分解できることが知られている。実験 1 の 2 ヶ月後と 4 ヶ月後の堆肥に出現したと考えられる細菌 CFB は油流出事故のバイオレメディエーションにおいて増え、石油分解菌として働く微生物であるという報告がなされており⁴⁾、この微生物が今回実施したバーク堆肥パイルでの実験において、油分解に関与している可能性が示された。

3. 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 (北海道) においては、実験開始時の油分濃度 19,000±2,100ppm は、徐々に減少し、87 日付近で 3,000~6,000ppm を中心とする範囲に移行し、127 日以降では 1,800~4,700ppm とバックグラウンド周辺の値になった。また、実験 2 (山口県) においては、実験開始時の油分濃度 15,000±1,700ppm は、徐々に減少し、150 日以降では 1,000~1,500ppm とバックグラウンド周辺の値になり、いずれの実験で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した。

- ・ バーク堆肥パイル内の温度については、実験1においては当初はバーク堆肥の活性な状態とされる60～70℃を示し、その後、徐々に温度が低下するが、127時点までは概ね50℃以上と比較的高温を維持した。
- ・ 微生物相の変化については、石油分解菌として働くことが報告があるCytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) グループに分類されるものが実験1の2ヶ月後と4ヵ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。

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、今後は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。

引き続き、生分解性材料から成る環境負荷の低い油吸着材および微生物分解処理技術のさらなる研究開発を進め、社会還元を目指すこととしたい。

謝 辞

本研究に支援を頂いた内藤泰春科学技術振興財団、貴重な助言を頂いた東京大学・山口一教授および東海大学・山田吉彦准教授、実験資材と場所を提供頂いた森産業(株)および山陽チップ工業(株)、実験に協力頂いたNPO法人日本バーク堆肥協会、ぶんご有機肥料(株)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，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
- 4) S. J. Macnaughton, etc. : Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill, Applied and Environmental Microbiology, Aug. 1999