

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580230

研究課題名(和文)石油分解菌を担持させた新規な浄化材を用いる高濃度石油汚染土壌浄化法の研究開発

研究課題名(英文) Research and development for purification of oil-contaminated soil using a newly fungal preparation with fungi capable for crude oil degradation

研究代表者

橘 燦郎 (TACHIBANA, Sanro)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：10112319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：天然から木材腐朽菌を含む数種の石油分解菌を単離するとともに、石油分解菌を担持した新規な浄化材による石油汚染土壌の浄化法について検討した。天然から選抜した石油分解菌により数種のPAHs(多環芳香族炭化水素)が分解できること、選抜菌により高濃度原油(アスファルト、C重油、A重油)汚染土壌を浄化できることを見出した。これらの結果を基に、分解菌を担持した新規な浄化材を用いる高濃度原油汚染土壌の浄化法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Method for purification of crude oil-contaminated soil was tried to develop using a newly fungal preparation with fungi capable for degradation of crude oil from nature. For the first time, several kinds of PAHs (polyaromatic hydrocarbons) could be found to degrade by the fungi. And the crude oil-contaminated soil at higher concentration could be purified by the fungi screened from nature. And furthermore, on the basis of the results obtained here, the method for purification of crude oil (asphalt, C heavy oil, A heavy oil)-contaminated soil at higher concentration using the newly fungal preparation with consortium of few fungi capable for degradation of crude oil was developed.

研究分野：森林資源利用化学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：原油汚染浄化 浄化技術 石油分解菌 多環芳香族炭化水素 分解酵素 アスファルト 担体 浄化材

## 1. 研究開始当初の背景

近年、石油精製施設や海上輸送時に事故などで漏出した原油による土壌汚染や植物の枯死が大きな社会問題となっている。原油汚染対策の必要性が指摘されている<sup>1)</sup>が、石油中の有害物質は対象外とされている。しかし、これらを分解除去しないかぎり、何時までも土壌中に残留し続け、植物の枯死や食物栽培等を通じての人体汚染や周辺住民の健康被害を発生させる。そのため、原油汚染土壌の効率的な浄化法の開発が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、天然から石油分解能の高い石油分解菌を選抜するとともに、選抜した分解菌を用いて、(1)原油中の難分解性で有毒な多環芳香族炭化水素(PAHs)の分解、(2)原油の分解及び、(3)分解菌から調製した新規な浄化材を用いる原油(アスファルト、C重油、A重油)汚染土壌の浄化法を研究開発することを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 石油分解菌の選抜

愛媛県松山市内及びその近郊の森林から採取した土壌及びキノコから、原油分解能の高い石油分解菌(NG007、S133、D7菌等6種の菌)を単離した。また、人工海水(pH8.3)でも成育できる菌も選抜した。

### (2) PAHsの液体分解

麦芽抽出物液体培地で3種のPAHs[フェナントレン、クリセン、ベンゾ[a]ピレン(BaP)]を分解した(10ppm、暗所下、25℃、0~15日)。所定期間培養後、培養液を溶媒(酢酸エチル)で抽出して得た抽出物をGC/MS(キャピラリーカラム: TC-1、分析温度:60~280℃まで10℃/分で昇温、同温度で10~20分保持)で分析・定量した。分解率は処理前後のPAHs量から算出した。また、分解生成物は標品のマススペクトルとの一致から同定した。さらに、培養時の酵素[マンガンペルオキシダーゼ(MnP)<sup>2)</sup>、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)<sup>3)</sup>、ラッカーゼ(Lac)<sup>4)</sup>、カテコール1,2-及び2,3-ジオキシゲナーゼ(1,2-Dioxy)<sup>5)</sup>、(2,3-Di-oxy)<sup>5)</sup>]活性の経時変化も調べた。

### (3) 原油(アスファルト、C重油、A重油)の液体分解

(2)と同様にして液体培養による原油(アスファルト、C重油、A重油)(1000ppm)の分解を行った(25℃、0~30日間)。所定期間培養後、培養液を溶媒(*n*-ヘキサン、ジクロロメタン、クロロホルム)で逐次抽出した抽出物を Mishra ら<sup>6)</sup>の方法により、脂肪族炭化水素部(アルカン部)、

芳香族炭化水素部(芳香族部)、NSO部、ASP部に分画して、TPH(Total petroleum hydrocarbon)を算出し、処理前後のTPHから分解率を算出した。さらに、アルカン部と芳香族部の成分変化をGLC及びGC/MS[キャピラリーカラム:TC-5、分析温度は(2)と同様]により調べた。

なお、アスファルト、C重油、A重油はいずれも4成分(アルカン部、芳香族部、NSO部、ASP部)から成るが、アスファルトはC重油及びA重油に比べ、NSO部及びASP部の割合が約1.5倍高い。

### (4) 新規な浄化材の調製

選抜菌(単独または数種混合)培養時に担体(石油吸収能の高い合成高分子物質、天然繊維または木粉)を加えて培養し担体に選抜菌を担持させた浄化材を調製した。また、浄化材を一種のゲル包括剤で包括固定した固定化浄化材も作製した。

### (5) 原油(アスファルト、C重油、A重油)汚染土壌の浄化

(4)と同様に作製した浄化材を原油(アスファルト、C重油、A重油)汚染土壌(濃度1000~30,000ppm)に加えて処理した(0~120日間)。所定期間培養後、汚染土壌を(3)と同様にして溶媒で逐次抽出して得た抽出物を(3)と同様にして各部に分画して分解率を算出した。また、アルカン部と芳香族部は(3)と同様にして成分変化を調べた。さらに、栄養源の添加における浄化への影響についても検討した。

また、塩基性土壌での浄化についても(3)と同様にして、選抜菌および固定化選抜菌を用いて原油(C重油)(1000ppm)汚染海岸土壌を処理(25℃、0~60日間)した。所定期間培養後、(3)と同様にして分解率を算出した。

## 4. 研究成果

### 4.1 石油分解菌の選抜およびPAHsの分解

#### 4.1.1 石油分解菌の選抜

天然からの原油(アスファルト)分解菌選抜結果の一例を表1に示す。アスファルト寒天培地の

表1 天然から石油分解菌の選抜結果

Strains	Mycelia growth rate (cm/day)			Mean Mycelia growth rate (cm/day)
	No asphalt	1000 mg/l	15000 mg/l	
NG007	1.59	1.50	1.25	1.45
D413	1.40	1.41	1.13	1.31
D17	1.38	1.39	0.84	1.20
IG03	1.22	0.84	0.11	0.72
IG05	0.99	0.74	0.39	0.71
D36	0.71	0.63	0.49	0.61
D07	0.63	0.41	0.25	0.43
D412	0.31	0.21	0.19	0.24

上で生育の早い菌を選抜した。その結果、NG007 菌を原油(アスファルト)分解菌として単離した(表1)。同様の方法で石油分解菌(D7 菌、F092 菌、U97 菌、RT10 菌、AS03 菌、U80 菌、S133 菌)も天然から単離した

#### 4.1.2 石油分解菌による PAHs の液体分解

F092 菌は液体培地(pH4.5)でクリゼンを各々55%、75%分解(1mM、15、30日間培養)した。また、AS03 菌はフェナントレン、クリゼン、ベンゾ[a]ピレンを各々54%、18%、96%(10ppm、15日間培養)を分解した。さらに、F092 菌によるクリゼンの分解経路を明らかにした(図1)。また、PAHs 分解に関与する酵素は、ジオキシゲナーゼとリグニナーゼであることを見出した。

バクテリアによる PAHs 分解にはジオキシゲナーゼが関与しているといわれている<sup>7)</sup>。本研究で見出した石油分解菌はジオキシゲナーゼ及びリグニナーゼの両方の酵素を産出するので、PAHs や原油分解力はバクテリアのそれよりも強いものと考えられた。

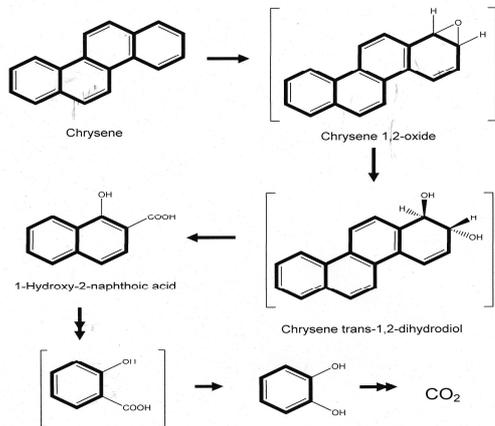


図1 F092 菌によるクリゼンの分解経路

#### 4.2 原油(アスファルト、C 重油、A 重油) の液体分解

結果の一部を図2示す。NG007 菌は液体培地中で原油[A 重油(COA)、C 重油(COC)、アスファルト(Asphalt)](1000ppm)を各々92%、72%、48%

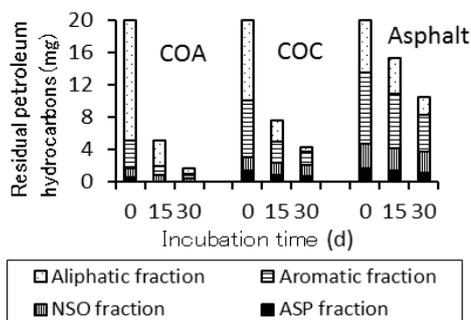


図2 NG007 菌による原油(アスファルト、C 重油、A 重油)の液体分解

分解(30日処理)した。NG007 菌は、原油中のアルカン部や芳香族部を高度に分解する。一方、NSO 部や ASP 部の分解率は低かったが、原油を分解できることを見出した。この菌による原油分解時には、ジオキシゲナーゼとリグニナーゼが作用していることを見出した。

#### 4.2.1 原油(アスファルト)分解における酵素活性剤の影響

NG007 菌による原油(アスファルト)分解時に、数種の酵素活性剤を添加して分解率を高めることを試みた。その結果、原油分解時に、リグニナーゼを活性化する過酸化水素、硫酸マンガ、界面活性剤(Tween 80)を添加すると、分解率は約1.5~2倍向上することを見出した。

#### 4.3 原油(アスファルト)汚染土壌の浄化法

結果の一部を図3に示す。NG007 菌は高濃度の原油(アスファルト)汚染土壌(15000ppm、30000ppm)を60日処理で各々約65%、50%分解した。そこで、60日浄化後に分解菌を活性化させる栄養源を添加すると、浄化率を約10%程度高め得るものの添加時期が大切であることを見出した。定期的な栄養源添加は浄化率向上に有効であることを見出した。

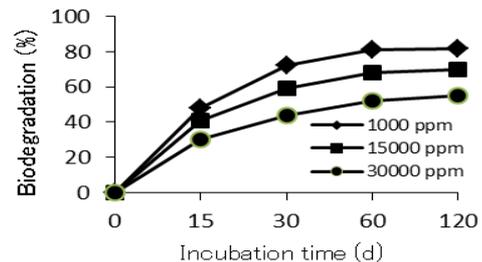


図3 NG007 菌による原油(アスファルト)汚染土壌の浄化

なお、原油(C 重油)(1000ppm)汚染海岸土壌[弱塩基性砂質土壌]も浄化(F092 菌、約35~60%、60日処理)できることを見出した。

#### 4.4 汚染土壌浄化における土壌の種類及び浄化材の影響

4.3の結果から、水田土壌(弱酸性)及び弱塩基性砂質土壌でも石油汚染を浄化できることを見出した。

石油分解菌を形状(シート状、小球状等)の異なる担体に担持させた浄化材を作製して検討した結果、担体マトリックス中で菌が生育できるスペースが少ない場合、菌の生育が遅かった。新たに見出した一種の担体(天然繊維)は油吸収能が高く、担持した分解菌の酵素活性を無担体のそれよりも約10%高めた。

以上から、酸性でも塩基性でも汚染浄化には土壌の種類に影響を受けず、石油分解菌が生育できる条件を設定できれば、浄化材を用いて原

油汚染土壌は浄化できるものと考えられた。

#### 4.5 石油分解菌を混合使用する原油汚染土壌の浄化法の開発

4.5.1 石油分解菌の混合使用による汚染浄化  
2種の分解菌(NG007, S133)及び3種の分解菌(NG007, S133, D7)を混合使用した場合、各々の菌の相乗効果が発揮されたためか、単独菌使用の場合よりも分解率が向上した。その結果の一部を図4に示す。この場合、混合比(1:1)の場合がもっとも良い結果であった。しかし、分解菌の混合割合が分解率に大きな影響を及ぼすことも見出した。選抜した他の石油分解菌についても混合使用を検討したが、単独菌使用よりも分解率が低下した場合が殆どであった。これは菌の種類や特徴によるものと考えられた。

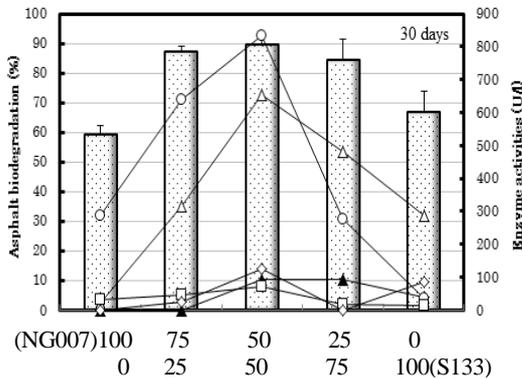


図4 2種の菌(NG007, S133)の組合せが原油(アスファルト)汚染土壌浄化及び酵素活性に及ぼす影響

#### 4.5.2 分解菌を担持させた新規な浄化材を用いる 高濃度原油汚染土壌の浄化

石油分解菌(NG007, S133, D7菌)を数種組合せて担持した新規な浄化材による高濃度(1000、15000、30000ppm)原油(アスファルト)汚染土壌の浄化結果の一部を図5に示す。この図には3種の菌の混合使用による原油(アスファルト)汚

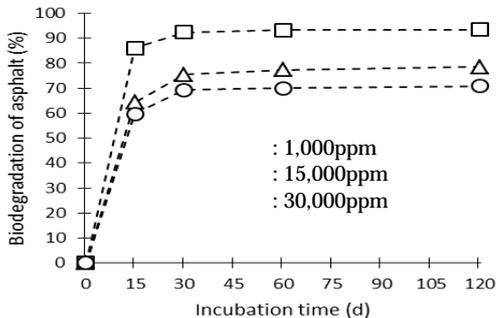


図5 3種の菌(NG007, S133, D7)使用による原油(アスファルト)汚染土壌の浄化

染土壌(1000, 15000, 30000ppm)の浄化結果[各々91、72、66% 浄化、30日処理]を示した。120日処理後の浄化率は各々93、74、68%であった。なお、2種の分解菌の混合使用の場合も3種のそれとほぼ同じ浄化率であった。

また、高濃度原油(C重油、A重油)汚染土壌(1000~30000ppm)の浄化もこの方法で浄化できることも見出した(30日間処理、各々89~63%、95~68%)。

#### 4.5.3 高濃度原油汚染土壌浄化におよぼす栄養源添加効果

浄化時に数種の栄養源を添加して浄化に及ぼす影響について調べた。結果の一部を図6に示す。炭素源(グルコースを使用)添加の場合は殆ど効果がなかった。しかし、一種の栄養源(ヘミセルロース、窒素源等を含む複合体)を添加した場合には菌の生育状況が改善され、浄化率も向上し

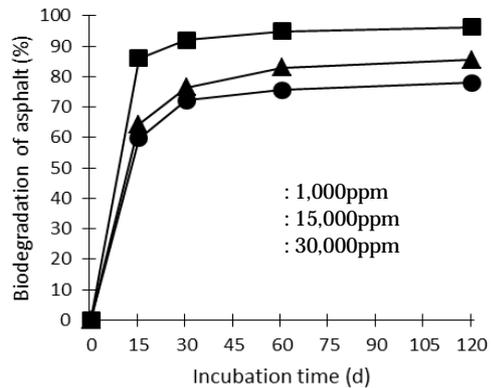


図6 3種の菌(NG007, S133, D7)使用による原油(アスファルト)汚染土壌浄化への栄養源添加の影響

た。図6に示すように、アスファルト汚染土壌の浄化率は、汚染濃度(1000~30000ppm)で各々浄化率92~70%(30日処理)であったが、120日処理後の浄化率は栄養源無添加(図5)に比べ、約10~30%増加した。この増加は、栄養源添加により石油分解菌が活性化するため、一例として表2に示すように、酵素産出量が増加したためと考えられた(表2中の括弧の数字は栄養源添加後の酵素活性を示す)。

また、高濃度の原油(C重油、A重油)汚染土壌(1000~30000ppm)の浄化もアスファルト汚染土壌と同様に浄化(30日間処理、各々95~65%、97~67%)できることも明らかにした。

なお、3種の菌を混合使用した場合も2種のそれと同様の浄化率、栄養源添加効果を示した。

表2 3種の菌 (NG007, S133, D7) 使用による原油 (アスファルト) 汚染土壌浄化時の栄養源添加による酵素活性の変化

Enzymes	Incubation time (d)		
	15	30	60
C120	801	569 (615)	325 (578)
C230	24	7 (34)	5 (29)
Lac	46994	46164 (90414)	24993 (145337)
MnP	2592	2404 (11002)	1439 (12003)
LiP	3	2 (39)	2 (22)

#### 4.6 汚染土壌浄化における石油成分の動態

石油分解菌による原油(アスファルト)汚染土壌の浄化期間中の石油成分の動態を調べた。その結果、アスファルトの各成分、アルカン部、芳香族部、NSO部、ASP部の分解率は培養期間が長くなる程低下する傾向が見られた。各成分の中では、アルカン部、芳香族部が分解され易く、NSO部、ASP部は分解され難かった。また、定期的に栄養源を添加すると、分解菌が活性化され酵素産出量が増加するため、原油(アスファルト、C重油、A重油)各成分の分解率も高まることが認められた。

#### 結論

天然から選抜した数種の石油分解菌を担持させた新規な浄化材を用いる高濃度原油汚染土壌の浄化法を開発した。単独の石油分解菌での浄化処理よりも、数種の石油分解菌を組合せた方がより効率良く原油汚染土壌を浄化できることを見出した。また、定期的に栄養源を添加することにより、分解菌の成育を活性化し、それが産出する原油分解酵素量が増加することにより、浄化率が向上することも明らかにした。本浄化法は、弱酸性土壌の原油汚染土壌の浄化法であるが、弱塩基性土壌の原油汚染の浄化については今後の検討課題と考えられる。

#### 参考文献

- 1)油汚染対策ガイドライン(油含有土壌による油臭・油膜問題への対応)[環境省2006年(平成18年)3月]から公表;生活環境の保全を目的とし、油汚染に対する調査・対策の基本的な考え方。
- 2)M. Tien and T. K. Kirk : Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Requiring Oxygenase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81,

2280-2284(1984).

- 3)D.S.Arora, P.K.Gill: Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase, Enzyme Microb. Technol., 28, 602-605(2001).
- 4)A. Leonowicz and K. Grzywics : Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate, Enzyme Microb Technol, 3, 55-58(1981).
- 5)T. Nakazawa and A. Nakazawa: Pyrocatechase (*Pseudomonas*). Methods in Enzymology, 17, 518-522(1970).
- 6)S. Mishra, J. Jyot, R.C. Kuhad, B. Lal: In situ bioremediation potential of an oily sludge-degrading bacterial consortium., Curr. Microbiol., 43, 328-335(2001).
- 7)R.-H. Peng, A.-S. Xiong, Y. Xue, X.-Y. Fu, F. Gao, W. Zhao, Y.-S. Tian, Q.-H. Yao: Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, FEMS Microbil. Rev., 32, 927-955(2008).

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

- Dede Heri Yuli Yanto, 橋 燦郎, Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of tween surfactants, Mn<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by *Pestalotiopsis* sp. in liquid medium and soil, 査読有, Chemosphere, Vol.103, 105-113, 2014.
- Dede Heri Yuli yanto, 橋 燦郎, Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007, 査読有, Int. Biodeterio. Biodegra., Vol.85,438-450,2013.
- Asep hidayat, 橋 燦郎, Crude oil and n-octadecane degradation under saline conditions by *Fusarium* sp. F092, 査読有, J. Environm.Sci.Technol., Vol. 6, 29-40, 2013.
- Dede Heri Yuli Yanto, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Aliphatic biotransformation and crude oil biodegradation by *Pestalotiopsis* sp., 第58回リグニン討論会講演集, 査読無, 2013, 96-99, 2013.
- Ade Andriani, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Biodegradation of petroleum crude oil by *Microphorus* sp. SM04., 第58回リグニン討論会講演集, 査読無, 2013, 132-135.
- Asep Hidayat, 橋 燦郎, Biodegradation of aliphatic hydrocarbon in three types of crude oil by *Fusarium* sp. F092 under stress with artificial sea water, 査読有, J. Environm. Sci. Technol., Vol. 5, 64-73, 2012.
- Asep Hidayat, 橋 燦郎, 伊藤和貴, Determination of chrysene degradation under Saline conditions by *Fusarium* sp. F092, a Fungus screened from nature, 査読有, Fungal Biology, Vol. 116, 706-714, 2012.
- Dede Heri Yuli Yanto, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Biodegradation behavior of petroleum hydro-

carbons by *Pestalotiopsis* sp. NG007, 第57回リグニン討論会講演集, 査読無, 2012, 58-61.

Asep Hidayat, 伊藤和貴, 橋 燦郎,

Degradation of aliphatic hydrocarbons in three types of crude oil by *Fusarium* sp. F092 in sea water liquid medium, 第56回リグニン討論会講演集, 査読無, 2011, 86-89.

[学会発表](計9件)

Dede Heri Yuli Yanto, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Simultaneous biodegradation of aliphatic, aromatic, resin and asphaltene fractions in petroleum hydrocarbons by a fungal co-culture, 第64回日本木材学会大会, 2014年3月13-15日, 愛媛大学(松山)

Ade Andrian, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Biotransformation of benzo[a]pyrene by fungus SM04 in various saline condition, 第64回日本木材学会大会, 2014年3月13-15日, 愛媛大学(松山)

Dede Heri Yuli Yanto, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Periodical biostimulation and bioaugmentation of fungal co-culture for complete biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil, 日本材学会中国四国支部第25回研究発表会, 2013年9月25-26日, 鳥取大学農学部(鳥取)

Dede Heri Yuli Yanto, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Biodegradation of asphalt in soil by combination of two fungi, 第63回日本木材学会大会, 2013年3月27-29日, 岩手大学(盛岡)

Dede Heri Yuli Yanto, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Biodegradation of asphalt in soil by combination of two fungi, 第63回日本木材学会大会, 2013年3月16-18日, 北海道大学(札幌)

Asep Hidayat, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Isolation and characterization of phenanthrene degradation by *Trametes* sp. RT10, 日本木材学中国・四国支部第24回研究発表会, 2012年9月18-19日, 徳島大学(徳島)

Dede Heri Yuli Yanto, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Bioremediation of asphalt in artificially contaminated soil by newly isolated *Pestalotiopsis* sp., 第62回日本木材学会大会, 2012年3月16-18日, 北海道大学(札幌)

Asep Hidayat, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Degradation of C heavy oil-contaminated soil and sea sand by *Fusarium* sp. F092, 第62回日本木材学会大会, 2012年3月16-18日, 北海道大学(札幌)

Dede Heri Yuli Yanto, 伊藤和貴, 橋 燦郎, Enhanced biodegradation of asphalt in liquid medium by *Pestalotiopsis* sp., 日本木材学会中国・四国支部第23回研究発表会, 2011年9月26-27日, 広島大学学士会館(東広島市).

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 石油汚染土壌の浄化剤

発明者: 橋 燦郎, Dede Heri Yuli Yanto

権利者: 橋 燦郎, Dede Heri Yuli Yanto

種類: 特許

番号: 特願 2012-223505

出願年月日: 平成 24 年 10 月 5 日

国内外の別: 国内

名称: 石油汚染土壌の浄化剤

発明者: 橋 燦郎, Dede Heri Yuli Yanto

権利者: 橋 燦郎, Dede Heri Yuli Yanto

種類: 特許

番号: 特願2013-197581

出願年月日: 平成 25 年 9 月 24 日

国内外の別: 国内

名称:

発明者:

権利者:

種類: 特許

番号: 特願

出願年月日: 平成 年 月 日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類: 特許

番号:

取得年月日: 平成 年 月 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋 燦郎 (TACHIBANA SANRO)

愛媛大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 1 0 1 1 2 3 1 9

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

伊藤 和貴 (ITOH KAZUTAKA)

愛媛大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 5 0 2 5 3 3 2 3