

平成 26 年度低コスト・低負荷型土壤汚染調査対策技術検討調査結果

実証機関名：住友林業株式会社
技術名称：日本シバによる油汚染土壤のファイトレメディエーション
調査対策区分：対策
技術の区分：原位置浄化
対象物質：鉱油類
試験期間：平成 26 年 5 月～平成 26 年 11 月

1. 技術の原理及び特徴

本技術は、高濃度油汚染土壤にも生育する耐油性・耐乾燥性の強い日本シバ品種（名称：バーニングフィールド、以下シバとする。）を用いる油汚染土壤浄化工法（ファイトレメディエーション）であり、植物の根が土壤中にスパイク状に侵入し、根から分泌されるタンパク質や糖、アミノ酸、有機酸等の化合物を栄養分にして油分解能力を持つ根圏微生物が増殖することにより、土壤中の油分が分解され浄化される。

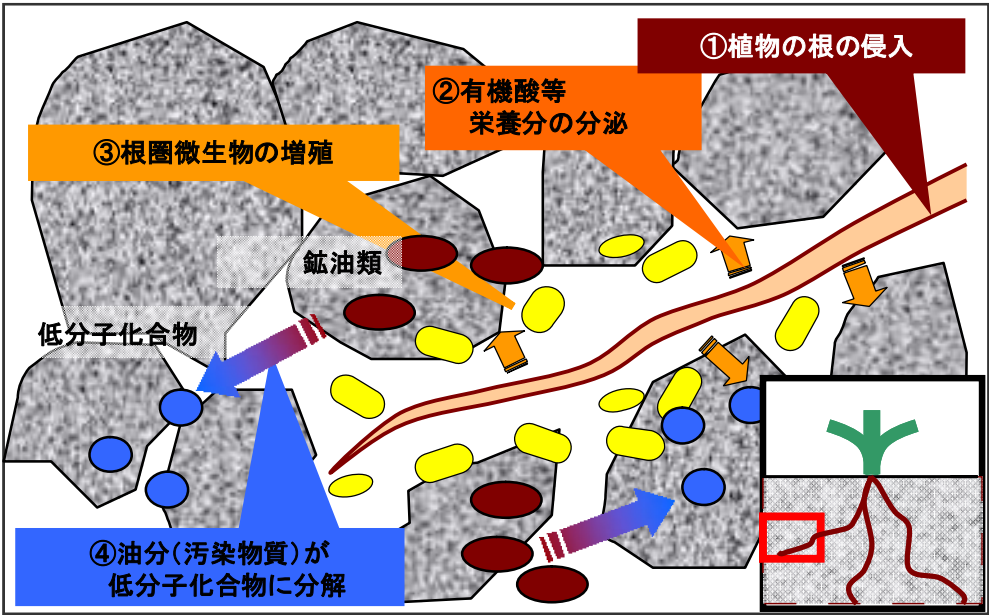


図-1 ファイトレメディエーションの概念図

2. 実証試験概要

2. 1 平成 25 年度の結果概要

平成 25 年度の実証試験では、油分解微生物と油分低減率の相関は検出できなかったが、シバによる一定の油分低減効果が期待される結果が得られた。

- ・ 高濃度条件下のサイトにおいて根の伸長が認められ、また、高濃度条件下において施肥が根の伸長に有効となる可能性が示唆された。
- ・ 土壤水分の低下対策を検討したサイトでは灌水が根の伸長を促進する可能性が示唆された。ただし、根が盛土底面に近接したことが結果に影響している可能性がある。

- ・根の存在と真正細菌数に関係があることが判明したが、油分低減が微生物による油の分解によるものであること及び根の伸長による微生物の活性化と油分低減率の関係の証明までは至らなかった。

2. 2 平成 26 年度実証試験の目的

平成 25 年度の実証試験において、数%の油分濃度条件下においても試験に用いたシバが生育しており、高濃度汚染土壌への適用についてさらなる検証が期待されたことから、平成 26 年度は、新たに植栽したシバを用いてオンサイトとオフサイトを対照し、高濃度域におけるシバの根と根圏微生物と油分低減の関係と施肥による有効深度の改善を実証することを目的として実施された。

2. 3 実証試験方法

2. 3. 1 実証試験条件

平成 26 年度の試験概要を表 1 に示す。高濃度の油含有土を対象として、シバ植栽の有無、施肥の有無などの条件を変えて、オンサイトとオフサイトを対照することにより検証を実施した。

表 1 平成 26 年度実証試験概要

項目	主な特徴	
サイト区分	オンサイト（実汚染サイト）	オフサイト（実汚染土壌使用）
汚染由来	操業中の製油所の油含有土 約 3 年前の震災により漏洩した油	製油所跡地の油含有土 約 70 年前の被災により漏洩した油
油分濃度	高濃度 27,000mg/kg（GC-FID 法）	高濃度 24,000mg/kg（GC-FID 法）
油種構成	同一ではないが、ガソリン、軽油、残油分の構成比がほぼ同様 （ガソリン（C6-C12）：0 軽油（C12-C28）：3 残油（C28-C40）：7）	
地盤	盛土（地下水の影響なし）	コンテナ容器（地下水の影響なし）
試験条件	シバ：新規植栽・2 年前植栽・なし 施肥：あり・なし	シバ：新規植栽・なし 施肥：あり・なし 底部流出水試験

2.3.2 試験区

オフサイト及びオンサイトのそれぞれの試験区を表-2、表-3に示す。

表-2 オフサイトの試験区

区名	名称	シバ植栽	施肥	初期設置本数
L0	シバ区	○	—	16
L1	シバ・施肥区	○	○	15
LC0	対照区	—	—	16
LC1	施肥区	—	○	15
L0w	シバ・底部流出水調査区	○	—	5
L1w	シバ・施肥・底部流出水調査区	○	○	5

表-3 オンサイトの試験区

区名	名称	シバ植栽	施肥	面積(m ²)
S0	新規シバ区	○	—	25
S1	新規シバ・施肥区	○	○	25
ST0	既存シバ区	○	—	25
ST1	既存シバ・施肥区	○	○	25
SC	対照区	—	—	10.5

2.3.3 サンプルング

オフサイトでは、内径10cmの半割円筒を結束バンドで締め、油含有土壌を十分突き固めながら充填した。サンプルングは図-2のとおり、深さ10cm, 20cm, 30cmを中心に10cm幅でサンプルングした。

オンサイトでは、調査トレンチを掘削して土壌をサンプルングした。

採取深さ及び分析項目は表-4、表-5に示す。サンプルングは、オフサイトでは年4回(6,7,9,11月)×3反復、オンサイトでは年3回(5,9,11月)×3反復で実施した。

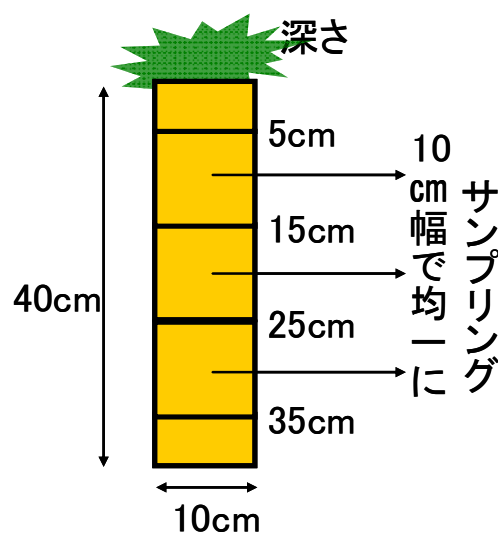


図-2 オフサイトで用いた試験円筒断面図

表－４ 試料採取深度と調査項目（オフサイト）

呼び 深さ (cm)	深さ (cm)	油分分析		微生物分析		根重	化学 分析	底部 流出水
		GC-FID法	重量法	リアルタイム PCR法	希釈 平板法			
10	5～15	○	○	○	○	○	○	(底部)
20	15～25	○	—	○	○	○	—	
30	25～35	○	—	○	○	○	—	

表－５ 試料採取深度と調査項目（オンサイト）

呼び 深さ (cm)	深さ (cm)	油分分析		微生物分析		化学 分析	深さ (cm)	根重
		GC-FID法	重量法	リアルタイム PCR法	希釈 平板法			
10	8.5～11.5	○	○	○	○	○	5～15	○
20	18.5～21.5	○	—	○	○	—	15～25	○
30	28.5～31.5	○	—	○	○	—	25～35	○

2. 3. 4 分析項目

(1) 油分含有量・全石油系炭化水素（TPH）

- ・水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（GC-FID）法で測定。
- ・チャートの面積及び高さにより細分化した炭素鎖での定量も実施。
- ・一部は重量法でも測定。油汚染対策ガイドラインに準拠。

(2) 油膜・油臭

- ・油膜の有無はシャーレ法、油臭は官能6段階法で測定。
- ・シバの上部大気中での油臭は、地表30cmの高さにおいて官能6段階法で測定。

(3) 根系の調査

- ・水との比重差により土壌粒子と根を分離し、根の乾燥重量を測定。
(root g/soil kg)。

(4) 土壌微生物活性

- ・リアルタイムPCR法で油分分解遺伝子（アルカンモノオキシゲナーゼ）量を定量。
プローブは、alkB-1、alkB-2、alkB-3（分解範囲はそれぞれC6-C12、C8-C16、C16以上）を用い、インターカレータ法も併用。
- ・補助的に希釈平板法により細菌数及び糸状菌数を計数。

(5) 窒素・リン酸等の土壌化学性の調査

- ・硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素、窒素含有量、リン含有量、pH、EC、ノルマルヘキサン抽出物質含有量を測定。

(6) 地中温度及び水分の調査

- ・センサーの連続モニタリングによる測定を実施。

2. 3. 5 試験区毎の分析項目と分析数量

試験区毎の分析項目と分析数量を表-6に示す。

表-6 試験区毎の分析項目と分析数量

試験区		地表からの調査深さ(cm)	オフサイト						オンサイト					合計数/回
試験区名	記号		シバ区	シバ・施肥区	対照区	施肥区	シバ・底部流出水調査区	シバ・施肥・底部流出水調査区	新規シバ区	新規シバ・施肥区	対照区	既存シバ区	既存シバ・施肥区	
			L0	L1	LC0	LC1	L0w	L1w	S0	S1	SC	ST0	ST1	
管理条件	植物(シバ)		+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	
	施肥		-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	
採取条件	採取深度		3深度(10,20,30cm)						3深度(10,20,30cm)					
	採取回数		4回(6,7,9,11月)						3回(5,9,11月)					
油分	TPH(GC-FID法) n=3	10, 20, 30	30	30	30	30			27	27	27	27	27	255
	TPH(重量法) n=3	10	12			12			9		9			42
	追加オブション(細分化解析、ピーク高さ解析) n=1	10	4			4			3		3			14
	油臭 n=3	10, 20, 30	30	30	30	30			27	27	27	27	27	255
	油膜 n=3	10, 20, 30	30	30	30	30			27	27	27	27	27	255
	根系	根量 n=3	10, 20, 30	27	27				18	18		27	27	144
土壤微生物	リアルタイムPCR	10, 20, 30	10	10	10	10			9	9	9	9	9	85
	希釈平板法	10, 20, 30	10	10	10	10			9	9	9	9	9	85
土壤化学性	pH	10	4	4	4	4			3	3	3	3	3	31
	EC	10	4	4	4	4			3	3	3	3	3	31
	全窒素	10	4	4	4	4			3	3	3	3	3	31
	全炭素	10	4	4	4	4			3	3	3	3	3	31
	アンモニア態窒素	10	4	4	4	4			3	3	3	3	3	31
	硝酸態窒素	10	4	4	4	4			3	3	3	3	3	31
流出水中の油分・窒素・磷	有効態リン酸	10	4	4	4	4			3	3	3	3	3	31
	ノルマルヘキサン抽出物質含有量	-				4	4							8
	硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素	-				4	4							8
	窒素含有量	-				4	4							8
	磷含有量	-				4	4							8
	pH	-				4	4							8
温度・水分	EC	-				4	4							8
	地中温度	10, 20, 30	3		3			3		3				12
	土中水分	10, 20, 30	3		3			3		3				12

2. 4 実証試験結果

2. 4. 1 油分測定結果

オフサイト及びオンサイトで油分測定の10cm深さでの経時推移を図-3及び図-4に示す。オフサイトでは、以下のことが明らかになった。

- ・ 対照区 (LC0 区) を除き、深さ 10cm~30cm で油分低減傾向あり。
- ・ シバ区 (L0 区)、シバ施肥区 (L1 区) の初期値からの油分低減率はそれぞれ 14%、16%となり、シバによる油分低減目標 20%は未達となった。
- ・ 施肥区 (LC1 区) の初期値からの油分低減率は 24%で、目標を達成した。

一方、オンサイトでは、通年で全区とも油分低減が認められず、浄化効果は不明である。ただし、対照区 (SC 区) においても油分は増加傾向にあった。本結果の推定原因は、①現場サイトの油分濃度の不均一さ、②重量法での油分の高値 (後述)、③オフサイトと比較して大幅に少ない根量 (後述)、が考えられた。

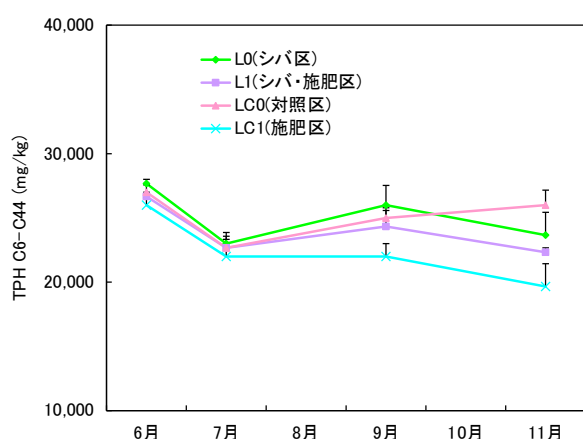


図-3 オフサイト 10cm 深さにおける油分推移 (GC-FID 法 C6~C44)

Bar: 標準誤差

※初期値 (6 月) を除くデータで L0 と LC1、LC0 と LC1 間で $P < 0.05$ の有意差有り (Tukey-Kramer 法)

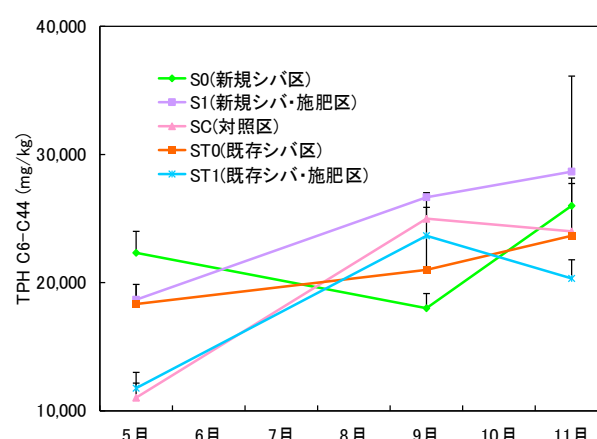


図-4 オンサイト 10cm 深さにおける油分推移 (GC-FID 法 C6~C44)

Bar: 標準誤差

※全区間で有意差があるとは言えない (Tukey-Kramer 法)

2. 4. 2 土壌油膜・土壌油臭

両サイトともに、高濃度の油を含有するため土壌油膜・土壌油臭の低減は認められなかった。

2. 4. 3 シバ上部の大気中の油臭

両サイトともにシバ植栽した区ではシバ上部の大気中の油臭段階が 2~3 から無臭 (0) となり、シバ植栽による油臭のキャッピング効果が認められた。

2. 4. 4 シバの生育と根量

オンサイト、オフサイトともシバの生育が認められた。

オフサイト各区及びオンサイト新規シバ区の根量を図-5、図-6に示す。

- ・ 根量は、10cm 深さ > 20cm 深さ > 30cm 深さ（両サイト）
- ・ オフサイトでは 25cm 以上の深さまで根量増加が認められた
- ・ オンサイト 10cm 深さの根の重量は、オフサイト 20cm 深さ相当しかなく、一桁少ない。
- ・ オンサイト 20cm 深さの根の重量は非常に小さく、30cm 深さでは根は無い。新規シバ区の根は 10cm 深さでとどまっていた。

目視による根の最大深度は、オフサイトのシバ区（L0 区）、シバ施肥区（L1 区）ともに 21cm、オンサイトの新規シバ区（S0 区）10cm、新規シバ施肥区（S1 区）10cm、既存シバ区（ST0 区）20cm、既存シバ施肥区（ST1 区）22cm である。

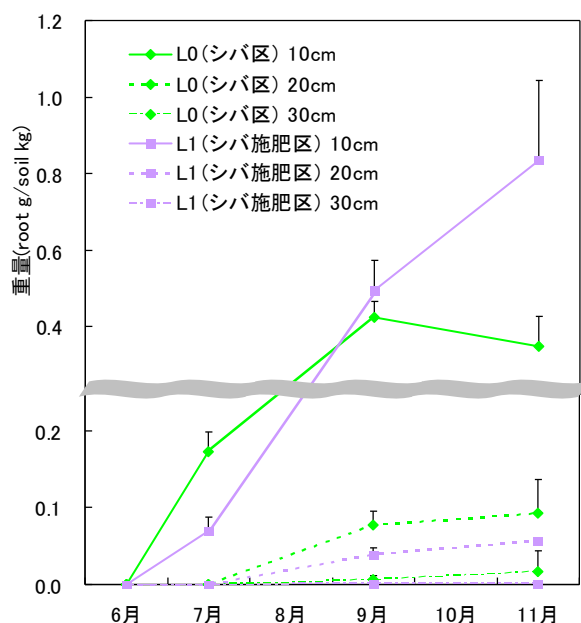


図-5 オフサイト各深さにおける根量の経時的推移

Bar: 標準誤差

※11月データにおいて、L1区10cmとそれ以外の区の間で有意差あり
 $P < 0.05$ (Tukey-Kramer 法)

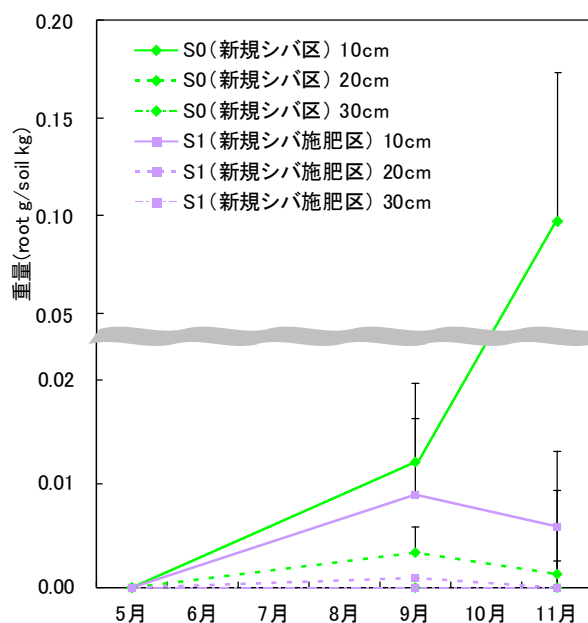


図-6 オンサイト新規シバ区各深さにおける根量の経時的推移

Bar: 標準誤差

※11月データでは全区間で有意差があるとは言えない
(Tukey-Kramer 法)

2. 4. 5 油分分解遺伝子量の根量・油分低減との関連

オフサイト及びオンサイトの 10cm 深さにおける、油分分解遺伝子 (alkB-3) のコピー数を図-7、図-8に示す。alkB-1の分解範囲に相当する油分はほとんど存在せず、alkB-2はオフサイトでは検出されなかった為、alkB-3のみで評価した。

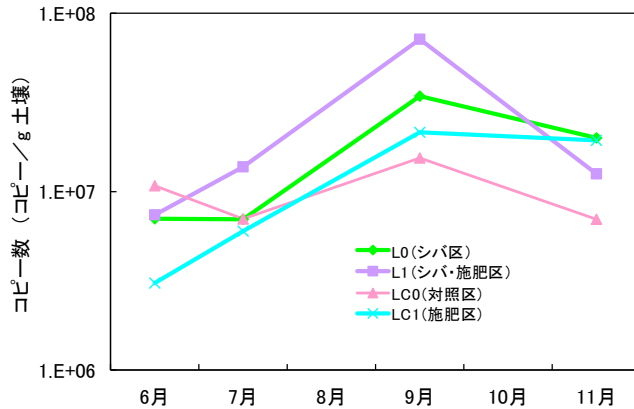


図-7 オフサイト 10cm 深さにおける alkB-3 遺伝子のコピー数の経時的推移

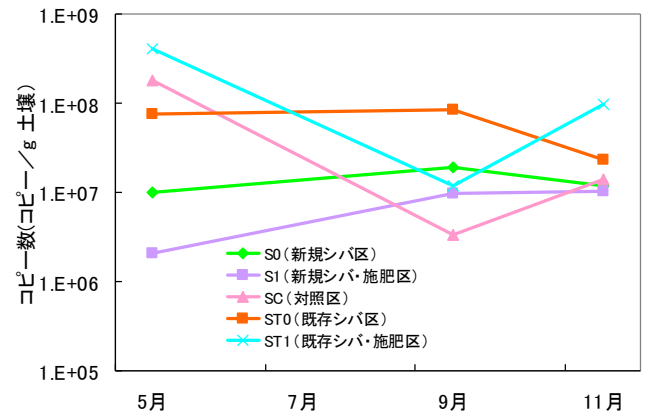


図-8 オンサイト 10cm 深さにおける alkB-3 遺伝子のコピー数の経時的推移

○オフサイトの油分分解遺伝子量

- ・油分分解遺伝子 (alkB-3) 量は、対照区以外の全区で増加傾向を示した。また、油分分解遺伝子量は、シバ植栽区が対照区より多かった。従って、油分分解遺伝子量が油分低減と関連したことが推察された。

○オンサイトの油分分解遺伝子量

- ・9月時点で油分分解遺伝子量が増加しておらず、油分低減が認められなかった要因になったと推察された。
- ・施肥による油分分解遺伝子量の増加は認められなかった。オンサイトの高濃度の油分により根量が増加せず分解微生物の増殖が抑制されたためと推察された。

○根の伸長と油分分解遺伝子との関係

- ・オフサイトでは、根量の増加に伴い油分分解遺伝子量が増加しており、根の存在が分解微生物を活性化し、油分低減した可能性がある
- ・オフサイトでは、根の最大深度は 25cm を超え、油分分解遺伝子への影響も 25cm 以上に及ぶ可能性がある。

○油分分解遺伝子と油分低減との関係

- ・オフサイトの対照区を除く区で、分解遺伝子量増加と油分低減が認められ、油分分解遺伝子量が油分低減と関連している可能性がある。

○根と油分低減との関連

- ・オフサイトの施肥区 (LC0 区) で油分低減が認められたため、根量増加による直接的な油分低減の関係は認められなかった。

○施肥の影響

- ・オフサイトでは、油分低減率、根量、油分分解遺伝子量すべての項目について、シバ・施肥区（L1区） > シバ区（L0区）の関係があり、微生物の活性化と油分低減は関連する可能性がある。
- ・オフサイトでは、深さ10cm程度までではあるが、施肥による油分分解遺伝子量の増加があり、根量も増加している。
- ・施肥の効果は表層部（10cm、20cm）に限られ、施肥による有効深度の改善はなかった。
- ・一方、施肥区（LC1区）において油分低減が確認されたため、根量の増加による直接的な油分低減までの証明に至らなかった。ただし、施肥区（LC1区）は、油分低減量は最も大きいですが、油分分解遺伝子は多くない。微生物分解以外の要因による油分低減の可能性が考えられる。例えば、肥料分による油分移動の促進等が挙げられる。なお、オフサイト底部流出水調査区の分析結果により、系外への油分の流出は殆どないことが確認された。

2. 4. 6 GC-FID法による細分化解析

オフサイト及びオンサイトのサンプリング土壌（10cm深さ）の一部について細分化した炭素範囲による定量結果を表-7、表-8に示す。また、オフサイト10cm深さでのシバ区（L0区）、対照区（LC0区）での細分化画分の油分濃度の推移を図-9に示す。結果は以下の通り。

- ・細分化した油種構成比の変化はほとんどない。
- ・重量法の値の対GC法倍率は1.1~1.4（オフサイト）、2.3~5.1（オンサイト）とオンサイトで非常に高い。オンサイトの油分には、GC-FID法で検出できない成分が多量に含まれていることが推察される。
- ・上記の重量法でのみ検出される油分の影響により、オンサイトで油分低減が認められなかった可能性もある。
- ・炭素数C14-C36の範囲で、対照区（LC0区）に比べシバ区（L0区）で低減率が大きかった。分解の範囲はC14-C36、分解の中心はC14-C24と考えられ、シバによりalkB-3を持つ油分分解微生物が活性化し油分低減した可能性がある。

表-7 細分化解析（面積）による油分割合の推移（オフサイト）

		重量法		GC-FID法*							
		(mg/kg)	対GC法倍率	C6-C44 (mg/kg)	C6-C12	C12-C20	C20-C24	C24-C28	C28-C32	C32-C36	C36-C44
L0(シバ区)	6月	35,000	1.3	28,000	1%	8%	6%	16%	26%	27%	17%
	7月	32,000	1.4	23,000	0%	8%	6%	16%	26%	27%	17%
	9月	31,000	1.2	25,000	1%	8%	6%	15%	26%	26%	17%
	11月	30,000	1.4	21,000	1%	8%	7%	16%	26%	25%	16%
LC0(対照区)	6月	35,000	1.3	28,000	0%	8%	6%	16%	26%	27%	17%
	7月	31,000	1.4	22,000	1%	14%	8%	19%	25%	23%	10%
	9月	33,000	1.3	25,000	1%	9%	7%	16%	25%	25%	18%
	11月	31,000	1.1	28,000	1%	9%	7%	17%	26%	25%	16%

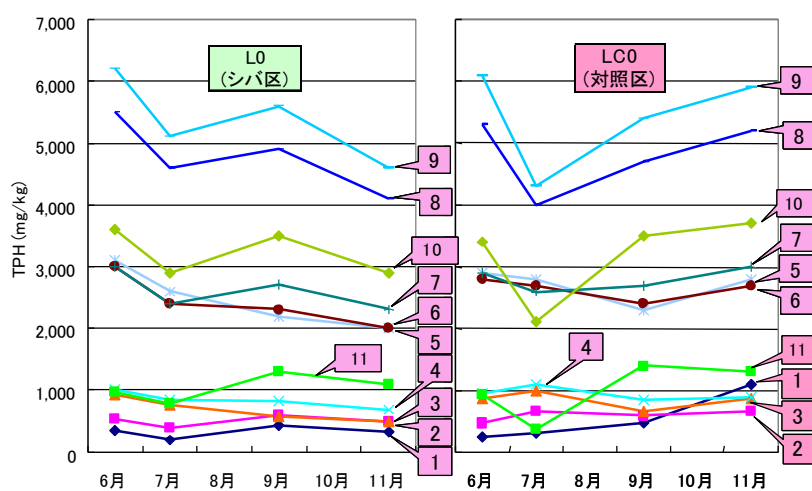
※細分化解析により各油種の全体量に占める割合を百分率で示した。

表－8 細分化解析（面積）による油分割合の推移（オンサイト）

		重量法		GC-FID法*							
		(mg/kg)	対GC法 倍率	C6-C44 (mg/kg)	C6-C12	C12-C20	C20-C24	C24-C28	C28-C32	C32-C36	C36-C44
S0(新規シバ区)	5月	72,000	3.0	24,000	0%	4%	5%	19%	24%	26%	22%
	9月	59,000	3.3	18,000	2%	4%	5%	13%	18%	22%	36%
	11月	61,000	2.3	26,000	1%	4%	5%	15%	20%	22%	34%
SC(対照区)	5月	56,000	5.1	11,000	0%	0%	0%	7%	19%	34%	39%
	9月	69,000	2.8	25,000	2%	6%	5%	14%	18%	20%	36%
	11月	69,000	2.7	26,000	1%	4%	5%	16%	20%	21%	34%

※細分化解析により各油種の全体量に占める割合を百分率で示した。

		L0 (シバ区)	LC0 (対照区)
1	C6-C12	9%	-340%
2	C12-C14	9%	-41%
3	C14-C16	48%	0%
4	C16-C18	31%	6%
5	C18-C20	35%	3%
6	C20-C24	33%	4%
7	C24-C28	23%	-3%
8	C28-C32	25%	2%
9	C32-C36	26%	3%
10	C36-C40	19%	-9%
11	C40-C44	-13%	-40%
C6-C44		14%	4%



図－9 オフサイト 10cm 深さでのシバ区(L0区)、対照区(LC0区)細分化画分の濃度推移

2. 5 評価項目と結果概要

評価項目及び結果概要を表－9に示す。

表－9 評価項目と結果概要

評価項目		結果概要
技術の有効性	根の伸長と根圏微生物の関係把握	オフサイト：根量増加と分解遺伝子量増加の関係あり。 オンサイト：根量増加が抑制され、分解遺伝子増加は、認められず。
	根圏微生物と油分低減との関係把握	オフサイト：分解遺伝子量と油分低減の関係あり。 (C14～C36の範囲で油分低減) オンサイト：分解遺伝子量が増加せず、油分低減も認められず。
	シバの生育、根量	オフサイト：シバは生育し、根は25cm以上に侵入、根量は最大0.8g/soil kgであった。 オンサイト：シバは生育したが、新規の根の伸長は、10cmにとどまり、根量はオフサイトより少なく最大0.1g/soil kgであった。
技術の実用性	油分低減率	オフサイト：シバ区16%、シバ施肥区14%、施肥区24%の油分低減あり、シバでのみでの目標低減率20%は未達であった。 オンサイト：すべての試験区で油分低減せず。
	土壌油膜	両サイトにおいて、油膜の低減は認められず。
	土壌油臭	両サイトにおいて、油臭の低減は認められず。
	現場油臭	両サイトにおいてシバの被覆効果により上部大気中の油臭低減があり、生活環境影響がなくなった。
	施肥による改善	オフサイト：施肥による根量増加あり、分解遺伝子量増加あり、油分低減傾向あり。 オンサイト：施肥による根量増加なし、分解遺伝子量増加なし、油分低減傾向なし
環境負荷	当該技術適用による環境負荷の把握 オフサイト：コンテナ外への油分（nヘキサン抽出物質）溶出量は検出限界値未満であった。 硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素は地下水環境基準の10分の1以下であった。 窒素及びリン酸の溶出は排水基準未満であった。 両サイトにおいて、シバの植栽により、地中温度及び土壌水分の変動を安定させている。なお、二酸化炭素排出量は平成25年度に評価済みである。	

2. 6 検討会による評価

本実証試験は、ガソリンスタンド跡地および工場跡地の油汚染土壌を浄化する際に、本ファイトレメディエーション工法の適用範囲を明らかにし、工法としての技術の成熟と普及促進のための実証データを得ることを目的として実施された。平成 25 年度の実証試験において、総じて根の有効深さ内において油分低減が達成され、他工法と比較しコスト面及び環境負荷面での優位性が認められるとともに、高濃度汚染土壌への適用について更なる検証が求められた。そのため平成 26 年度の実証試験では、高濃度域における当技術の適用性と施肥による改善を実証することを目的として実施された。

オンサイトとオフサイトの 2 サイトにおいて実証試験を実施し、両サイトともシバが良好に生育した。オフサイトにおいては 30cm 深度まで分解遺伝子量の増加と油分低減との関係が推定された。しかし、シバなし施肥区でも分解遺伝子量が増加しており、根の量と分解遺伝子量の明確な関係は得られなかった。初期値からの油分低減率は、オフサイトにおいてシバ区、シバ施肥区、シバなし施肥区でそれぞれ 14%、16%、24%であった。しかし、シバなし施肥区で最も減少しているため、シバの効果で目標値 20% 低減を達成したとは認められない。施肥により 10cm 深度では根量が増加し、分解遺伝子量、油の分解は増大している。オンサイトでは、対照区を含むすべての試験区で油分低減が認められず、根の量はオフサイトと比較し、著しく少なかった。また、サンプリングした土壌の油膜及び油臭の低減は認められなかったが、シバによる被覆効果により上部大気中の油臭低減が確認された。油膜及び油臭については、油含有が高濃度のため、短期間での低減は困難で本試験結果では評価できない。

環境負荷面について、シバ区、シバ施肥区ともに硝酸性窒素及び亜硝酸性窒素は地下水環境基準の 10 分の 1 以下の流出であり、窒素含有量及び磷含有量は排水基準を超える環境負荷はないことが、オフサイトの流出水分析によって確認された。一方、油分の地点ごとのバラツキを踏まえ、本年度実証試験では油分サンプリングの検体数と採取回数を増やしたが、本技術の優位性について統計的な証明には至らなかった。油の由来が異なった試験であったため、オンサイト・オフサイトの比較ができず評価が難しくなった。

本実証試験では高濃度域において、シバの根の伸長が制限されているものの、地上部では十分な生育が認められ、オフサイトでは油分分解遺伝子と油分低減との関係が推定された。しかし、オンサイトで油分低減が認められず、実用性までは評価できない結果となった。実汚染サイトへの適用性については、長期間に亘る検証により証明する必要がある。