

石油分解菌安全性評価

- 「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に基づく大臣確認取得

立命館大学

株式会社熊谷組

日工株式会社

平成23年6月15日

1. 技術背景

石油汚染土壌浄化事業へ向けて

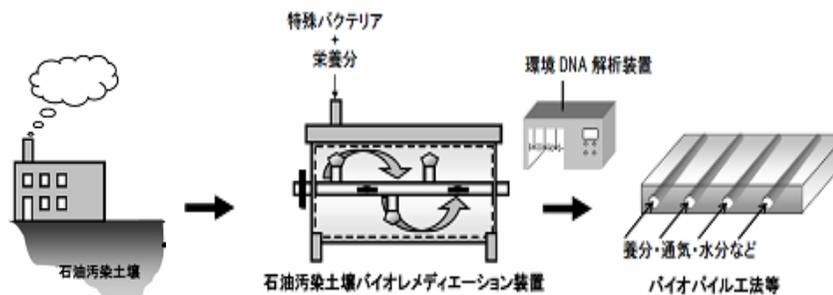
立命館大学

- ・石油分解菌(微生物ライブラリー、高密度培養技術)
- ・総土壌細菌数の定量(環境DNA解析法)
- ・石油分解菌数の定量(Real Time PCR法)
- ・微生物群集構造の解析(PCR-DGGE法)

応用

日工(株)

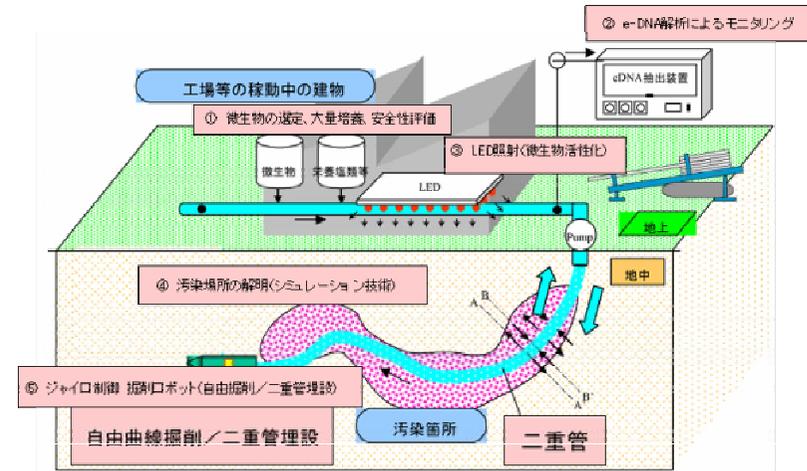
- ・土壌混練工法
- ・低温加熱処理の前処理として使用
- ・微生物製剤と栄養素の販売



経済産業省地域新生コンソーシアム研究
開発事業(H17~H18)

(株)熊谷組

- ・原位置注入工法
- ・ボーリング式
- ・LED照射



NEDO大学発事業創出実用化研究
開発事業(H18~H20)

2. 浄化技術の概要

土壌混練工法 工法の概要(日工株)

< 工法の概要 >

1. バイオレメディエーション装置
2. 微生物(一種類) + 栄養物質
3. バイオパイル工法



省エネ型バイオレメディエーション装置

< 特徴 >

- ・土壌中に微生物と栄養物質を均等かつ定量的に混ぜ込むことが可能
- ・混練時に土壌中に十分な空気を供給することが可能



最初の混練時に微生物にとって石油分解の最適な環境を整えてやる



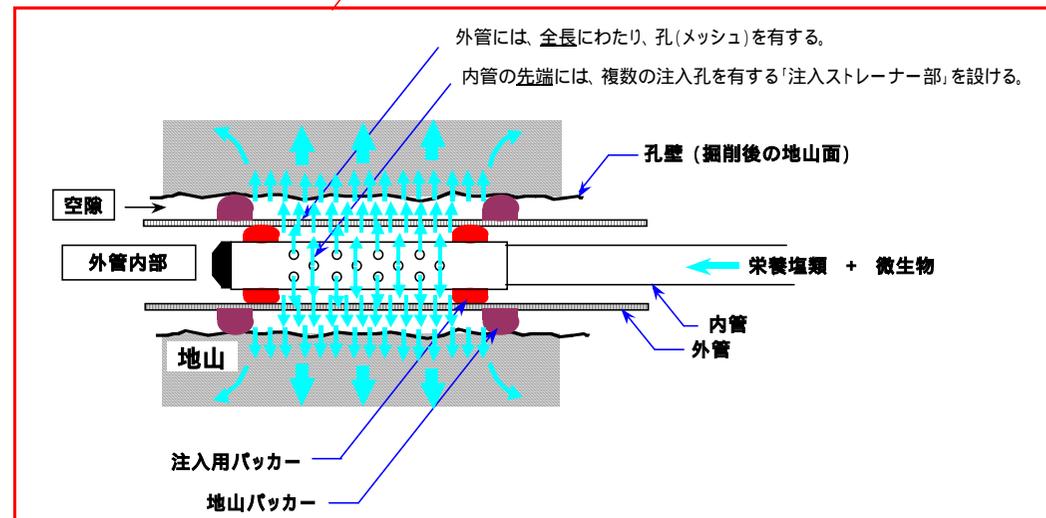
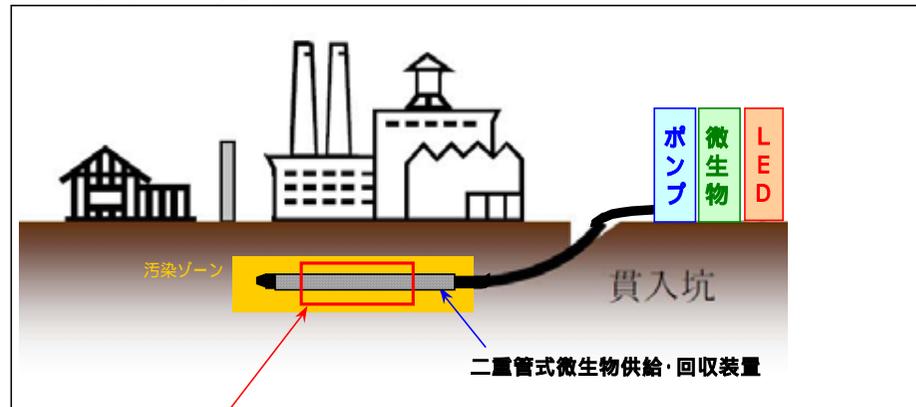
浄化期間の短縮

1.5ヶ月に短縮(想定)

2. 浄化技術の概要

原位置注入工法 工法の概要 (株熊谷組)

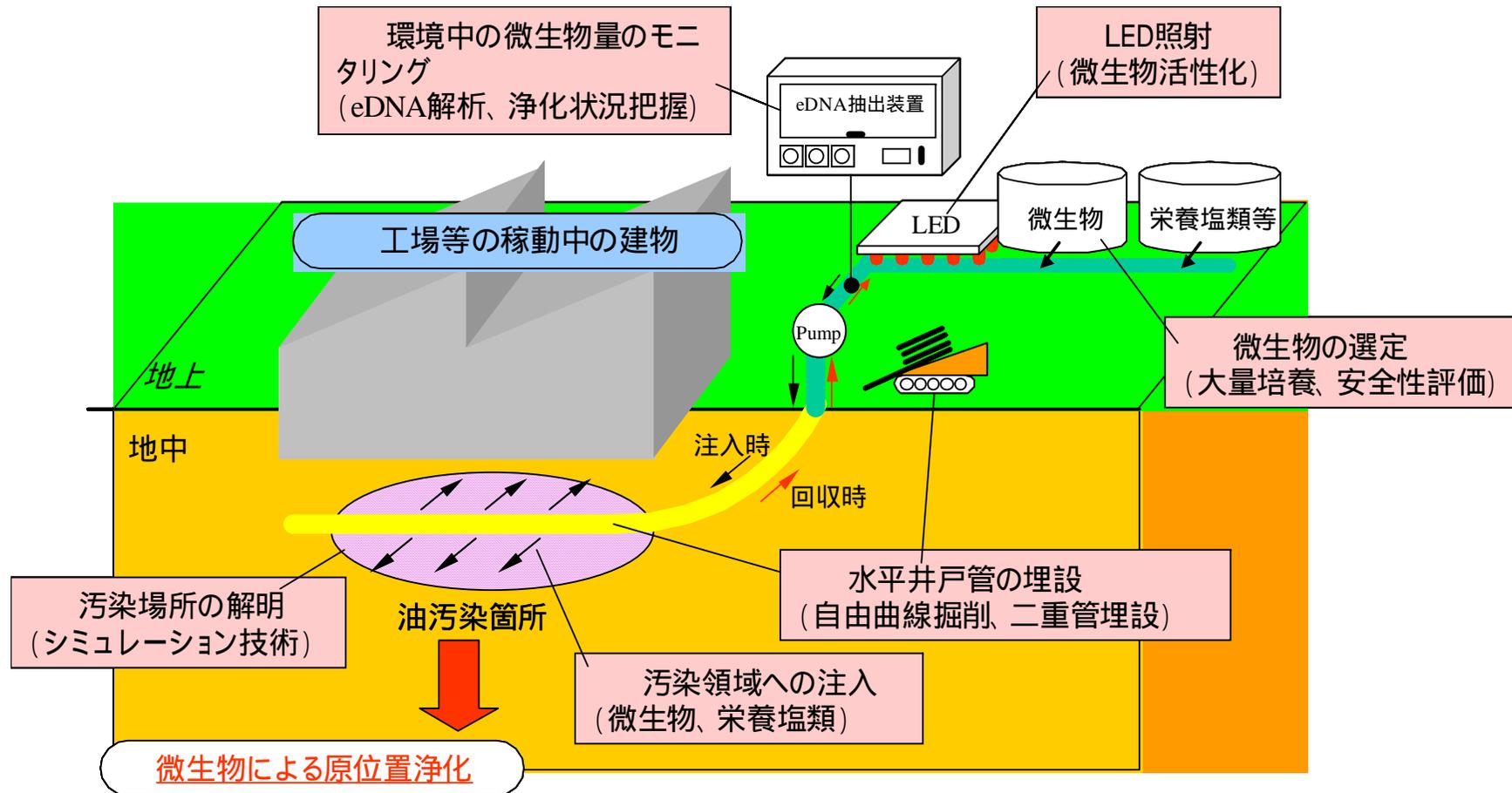
本工法は、稼動中の工場建屋下などの**原位置土壌汚染対策**であり、地上部から**水平ボーリング**を行い、井戸管を敷設後、油汚染箇所**に石油分解菌や栄養物質を注入することで地盤中で浄化**を行う工法である。



二重管式微生物供給・回収装置詳細

2. 浄化技術の概要

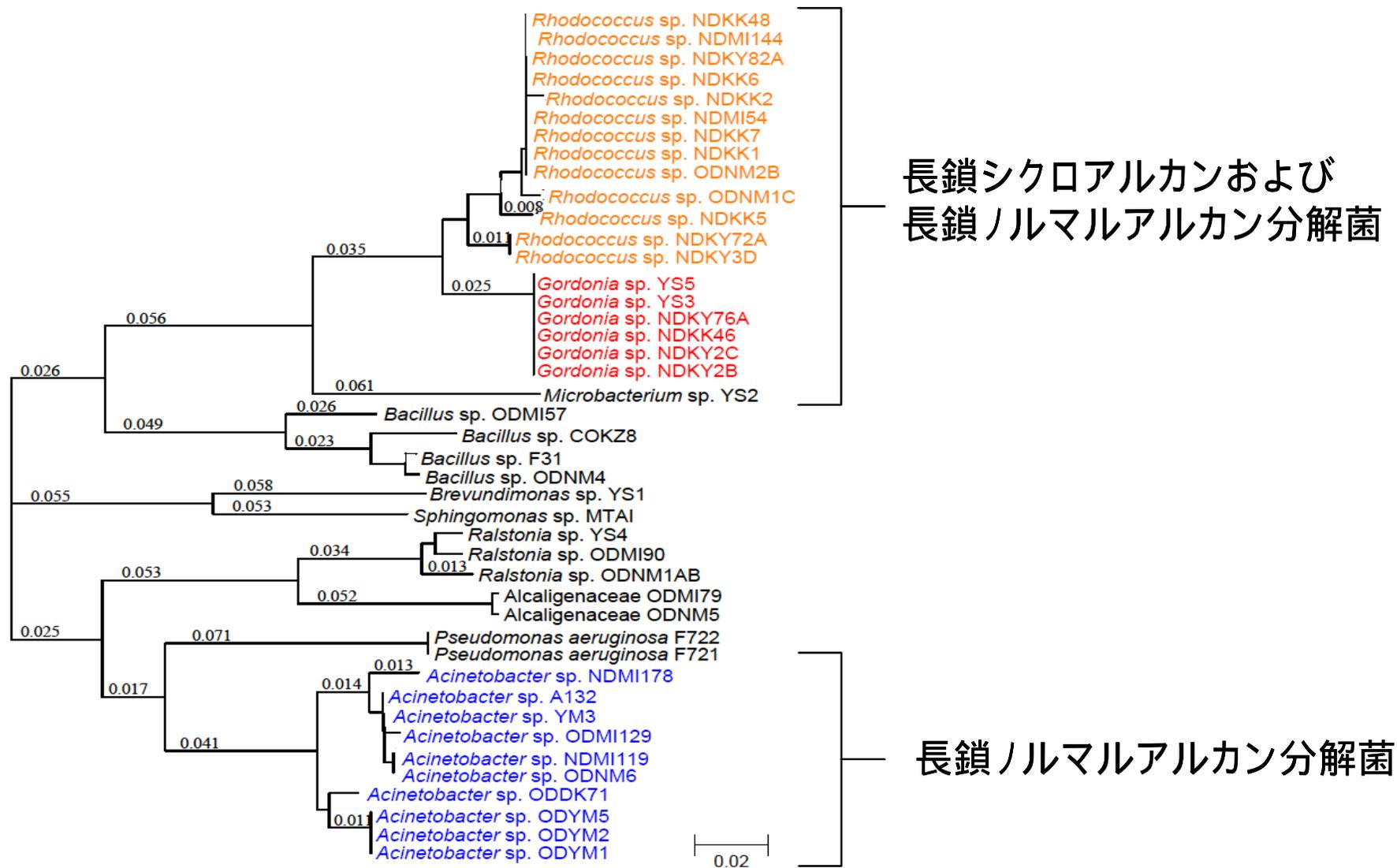
原位置土壌浄化システム 最終成果イメージ



全体システムイメージ図

浄化技術の概要

石油分解菌の取得とライブラリー構築



浄化技術の概要

総土壌細菌数の定量

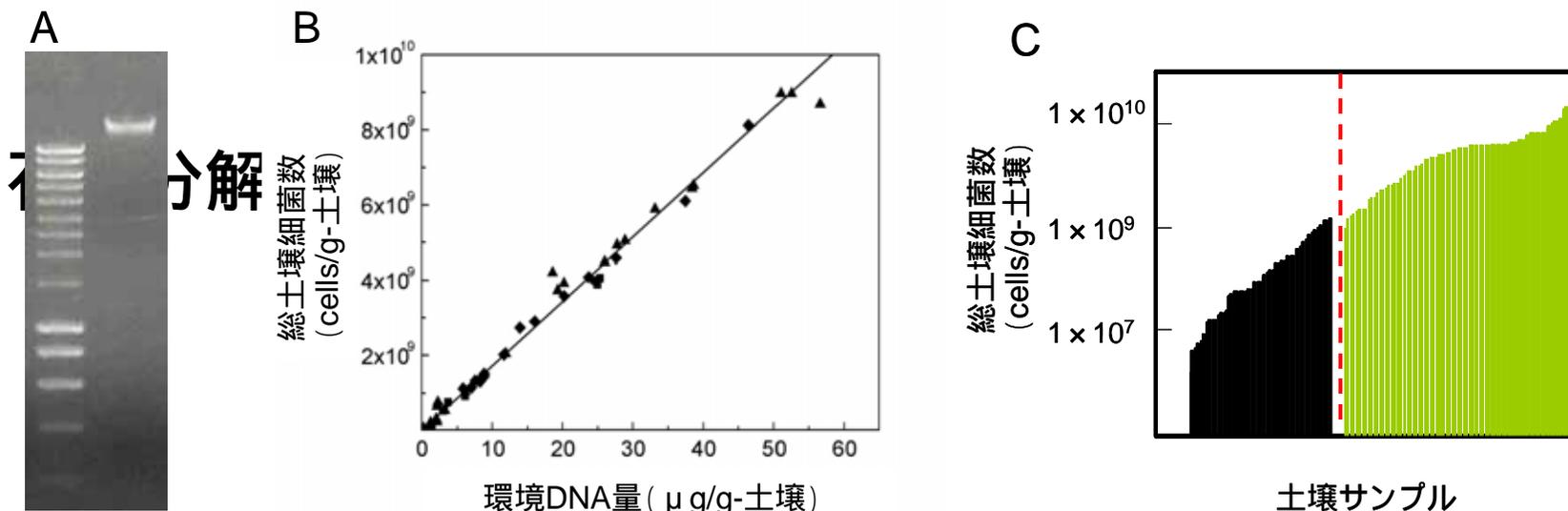


図 環境DNA解析法による総土壌細菌数の定量技術

A: 土壌細菌から抽出したDNA、B: DNA量と微生物数の検量線、C: 農地(緑)及び石油汚染土壌(黒)の総土壌細菌数

石油分解菌数の定量

利用微生物は石油分解に関与する酵素の遺伝子を有している (*Rhodococcus*属; *alkB*, *Gordonia*属; *alkG*)。

↓

alkB, *alkG*の配列を基に、*Rhodococcus*属、*Gordonia*属を特異的に認識するプライマーを設計。

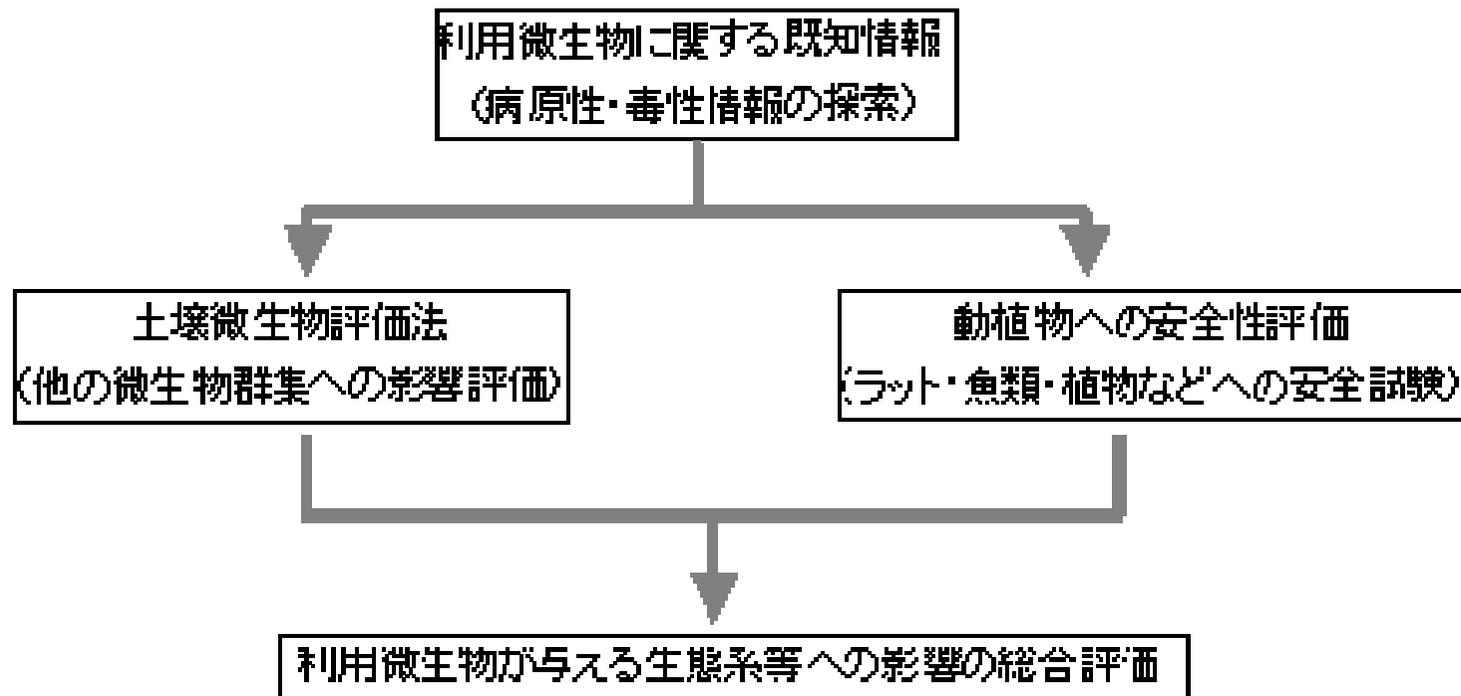
↓

Real Time PCR法により、石油分解菌数を定量解析する技術を構築(検出限界 1×10^6 cells/g-土壌)

安全性評価

ー環境省、経産省：微生物によるバイオレメディエーション
利用指針への対応ー

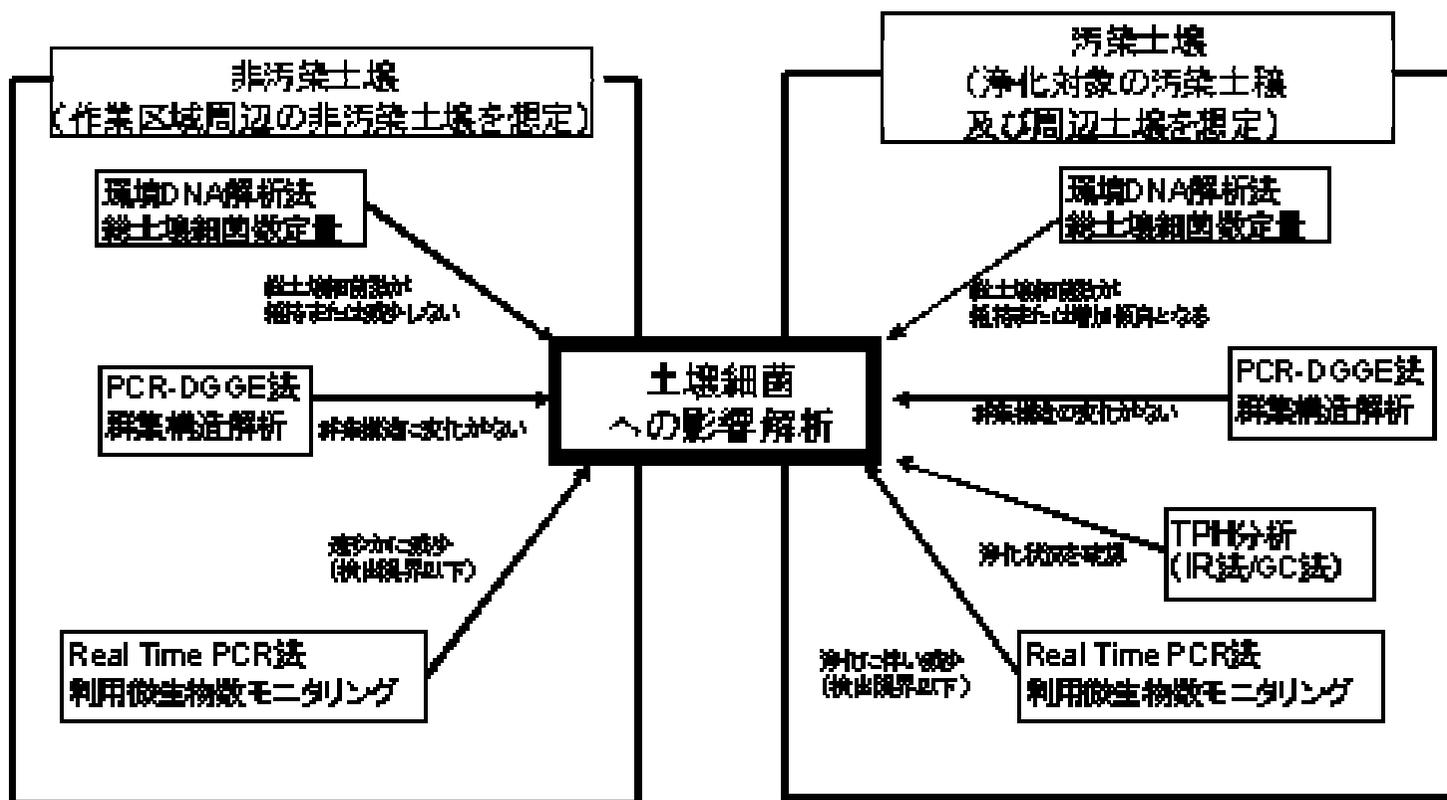
安全性評価方法の全体流れ



安全性評価

—環境省、経産省：微生物によるバイオレメディエーション
利用指針への対応—

土壌微生物評価法の概要



安全性評価

ー環境省、経産省：微生物によるバイオレメディエーション
利用指針への対応ー

非汚染土壌での微生物影響解析

- ・土壌微生物数におよぼす影響解析(eDNA 解析法)
- ・土壌微生物の群集構造に及ぼす影響解析(PCR-DGGE 法)
- ・石油分解菌数の挙動解析(Real-time PCR)

汚染土壌での微生物影響解析

模擬汚染土壌でのバイオレメディエーション

- ・油分濃度
- ・総微生物数(eDNA 解析法)、群集構造(PCR-DGGE)
- ・石油分解菌数(Real-time PCR)
↓(油分浄化の確認)
- ・総微生物数(eDNA 解析法)
- ・群集構造(PCR-DGGE)
- ・石油分解菌数(Real-time PCR)
- 周辺土壌との比較

動植物への安全性評価

- ・マウスへの安全性評価
- ・植物を用いた安全性評価

利用微生物の情報

- ・16S rDNA 解析
- ・微生物病原性・毒性情報の検索

バイオレメディエーション利用微生物の環境影響の判断

安全性評価(大臣確認書)

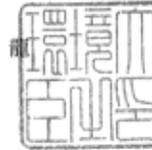
平成 23・03・03 製第 9 号
環水大総発第 110506001 号
平成 23 年 5 月 6 日

日工株式会社
取締役社長 深津隆彦殿
株式会社熊谷組
取締役社長 大田 弘殿
学校法人立命館
理事長 長田豊臣殿

経済産業大臣 海江田 万里



環境大臣 松本 龍



微生物によるバイオレメディエーション利用指針に基づく確認について

微生物によるバイオレメディエーション利用指針（平成17年経済産業省・環境省告示第4号）第5章に基づき、下記浄化事業計画の確認申請については、同指針に適合していることを確認します。

記

確認申請日	平成23年3月3日
浄化事業計画名	バイオオーグメンテーションによる鉱油類汚染土壌の浄化

まとめおよび今後の展開

1. 石油分解菌ならびに土中に存在する土着の石油分解に寄与する菌、さらには総土壌微生物について、遺伝子解析により定量方法を開発した
2. バイオレメディエーションによる浄化過程において、常に石油分解に寄与する菌や土壌微生物全体の動向を把握することが可能となった
3. 安全性評価に基づき、浄化に使用する石油分解菌 (*Rhodococcus* sp.NDKK6株および*Gordonia* sp.NDKY76A株) について、経済産業省および環境省より、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に適合しているとして、大臣確認を取得した
4. 石油分解菌の外販も視野に入れつつ、各工法の実用化を進める