土壌における
油の生分解率測定実験

研究者
柴　蔵之介　　鈴木　空芽　　鈴木　晴香　　中島　健太　　樋屋　彩音

指導教諭
山岡　久俊　先生

要旨(Abstract)

我々は微生物の働きによる油分解の作用に着目した．有機廃棄物を用いた微生物の油分解作用は知られているが，自然浄化による微生物の油分解作用についてはそこまで知られていない．そこで特定の土壌中の微生物によってその土壌と関連した油はどれほどの量分解されるのか，並びに有機廃棄物を加えていない土壌ごとの鉱物油の分解量，また土壌中の油分の簡易測定方法について調べることにした．

我々は，ヘキサンを用いた土壌中の簡易的な油分の測定方法を確立し，この方法を用いて油分を測定した．

有機廃棄物を加えない土壌において鉱物油の平均分解量は 5.１％であった．

はじめに

1-1 研究の動機

近年，環境保全に対する動きが高まっている中で，我々は家庭内で簡単に生ごみを処理することができ，堆肥としてリサイクルができるコンポストに着目した．生ゴミに油分が含まれていると，油分自体が分解されるまでに長時間を必要とするだけでなく，油分が他の有機物の表面を覆うことで好気条件の維持を難しくし，コンポスト化における良好な有機物分解を困難にすることが知られている．一方で，コンポスト内の油分含有量が多すぎなければコンポスト化過程で油は良好に微生物分解されることも報告されている．[1]

加えてエンジンオイルなどの鉱物油をコンポストに入れることは一般的にはあまり良くないとされているが，土壌に対して 5%の油汚染なら有機廃棄物を加えることで 92%という高い生分解率を示すことが報告されている．[2]

そこで我々は有機廃棄物を使わなかった場合，鉱物油は自然浄化によってどれほどの量が分解されるのかを調べることにした．

1-2 実験へと至る経緯

まず我々はくん炭と米糠を使用し，作成したコンポストに鉱物油を入れ，分解の様子を観察する実験を行った．本来想定されるはずの微生物による温度変化が見られず，元となるコンポストに有機廃棄物のみを加えたポジティブコントロールにおいても微生物による有機物の分解は判断できなかった．この実験方法では微生物の活動が活発に行われていない可能性が高いため，コンポストには別の土壌を用いることとした．また土壌中の油量の測定方法として，試料を多量の水の中に入れて撹拌し，試料から分離した油分によってできた油膜の面積を調べることで油量を推定しようとしたが，水より比重の小さい土壌(くん炭)や細かなゴミなどが浮いてしまったため，くん炭を土壌に用いることは適切ではないと判断した．

そこで我々は，マツヤニが自然界で生分解されることに着目した．人工的に作成したコンポストの土壌に比べ，微生物が多く存在すると考えられる自然由来の土壌では多様な微生物による相互作用によって微生物による分解が早まることから，特定の土壌には特定の油を分解することに特化した微生物が生息していると仮定した．仮説をもとに採取してきた土壌に，有機廃棄物を加えずに鉱物油他４種の油を入れ，生分解率の変化について調べることとした．

土壌中の油量を求める方法として[2]の実験においては，土壌中の窒素(N)の測定には，試料と硫酸を混ぜて加熱し，含まれる窒素を硫酸アンモニウムに変換する．その後，アルカリ性にして加熱し，発生するアンモニアの量を滴定によって定量するケルダール法[3]を，リン(P)・炭素(C)の測定には，溶液試料を Ar プラズマ(約 8,000K)に噴霧する事で，元素の定性・定量を可能とする ICP−OES[4]を用いていたが，費用や設備の都合上，これらの方法は断念せざるを得なかった．

そこで我々は土壌中の油量を直接測定することで生分解率を測定することとした．

土壌中の油量を直接調べるためにはノルマヘキサン抽出法や GC-FID 法，抽出比濁法などを用いた TPH 濃度の測定が主となっている．ここではノルマルヘキサン抽出法[5]をベースとした独自の実験方法を用いて実験を行った．

2. ヘキサンを用いた土壌中の油量測定実験

2-1 目的

土壌中の油量を簡易的に測定することにより，微生物による油分の分解量をより正確に測定することができる実験方法を確立すること．

2-2 仮説

ノルマルヘキサン抽出法を参考にヘキサンを用いることで，油と土が分離しやすくなり土壌中の油の残量を減らすことができる．よって土壌中の油量をより正確に調べることができる．

2-3 実験方法

一定体積の土に油の体積を以下のように変化させたサンプルを用意した．このとき，油の質量と土の体積に対してどれだけの比率の油が加えられているかを示したものを条件横の括弧に記載した．

(これ以降，この比率のことを『油分比率』と定義する)

条件に従って土と鉱物油を用意し，ビーカーに入れ，良く撹拌した．

サンプルは土 5ml に対して，鉱物油を

・7ml(140%，5.83g)
・6ml(120％，5.00g)
・5ml(100%，4.21g)
・4ml(80%，3.30g)
・3ml(60%，2.17g)
・2ml(40%，1.63g)
・1ml(20%，0.85g)

土 10ml に対して，

・1ml(10%，0.85g)
・0.75ml(7.5%，0.59g)
・0.5ml(5%，0.42g)
・0.25ml(2.5%，0.22g)
・0.1ml(1%，0.10g)

加えた試料を用意した．

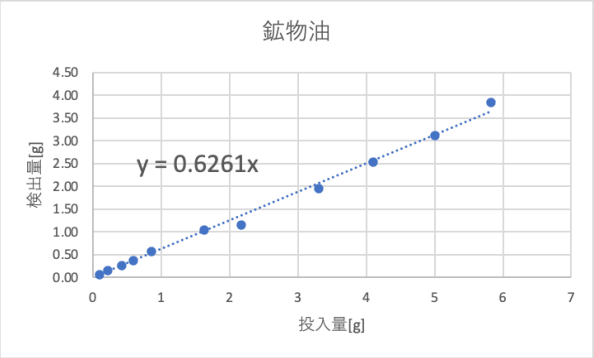
基準となる土の量を 5ml から 10ml に変えた理由は油分比率を維持しつつ，最初に加える油量を増やすことで，実験結果として出てくる油量を増加させるという目的がある．

その後ヘキサン 30ml を加え，よく撹拌し，不織布を用いて大きな土を取り除く．さらにろ紙でろ過し，細かな土を取り除く．ドラフトに濾液を入れ，1 日以上待つことでヘキサンを完全に揮発させた．(予備実験により，4 時間でヘキサン 30ml が揮発したため，完全にヘキサンが揮発したと考えられる 1 日以上の期間放置した．)

その後，ビーカー内に残った油の質量を測定し，実験開始時の鉱物油の質量と比較する．

2-4 結果

各条件につき 3 回この実験を行い，検出した油の質量を平均したデータを(グラフ１)に示す．横軸は実験前に投入した油の質量を，縦軸は実験によって検出した油の質量を示している．



相関係数 1.０

(グラフ１)

これらのグラフから，土壌へ投入した鉱物油と検出量には強い正の相関があることがわかった．

2-5 考察

(グラフ 1)より，本実験においても条件の基準となるグラフを作成することで，土壌中に含まれる油量を推定することができると考えられる．

3.測定した油量の値から実験前に土壌に含まれていた油量を測定するための基準の作成

3-1 目的

2-3 の実験方法によって測定した値から，実際に土壌中に含まれていた油量を推定するための基準となるグラフを作成すること．

3-2 実験方法

2-3 と同じ実験方法を用いて実験を行った．

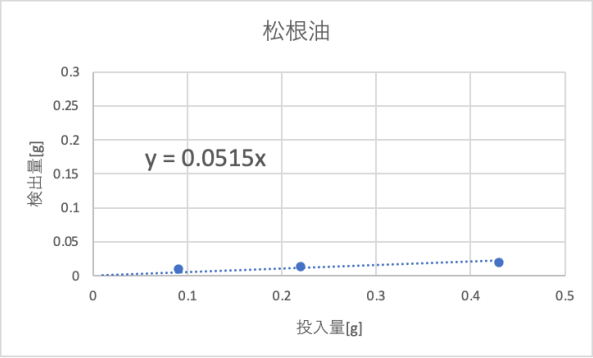
実験には次の 5 種類の油を用いた．

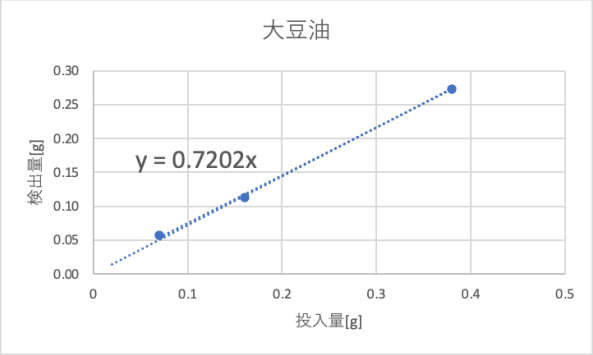
・松根油(純テレピン油)
・大豆油(理研　国産大豆油)
・ひまわり油(Rio santo サンフラワーオイル)
・菜種油(日清キャノーラ油)
・鉱物油(エンジンオイル)

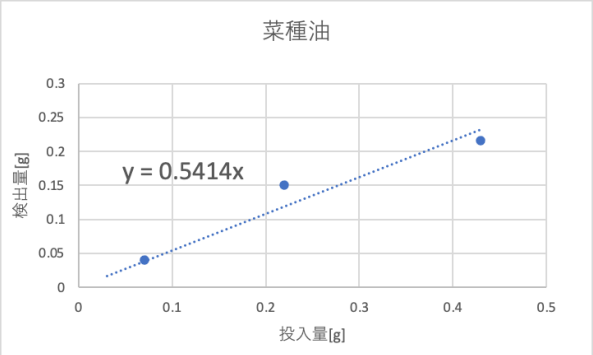
土壌 10ml に対して，それぞれの油を 0.5ml，0.25ml，0.1ml 加え，それぞれ 3 回ずつ検出実験を行った．それぞれのデータをまとめ，条件ごとに平均したデータでグラフを作り，これを基準とする．

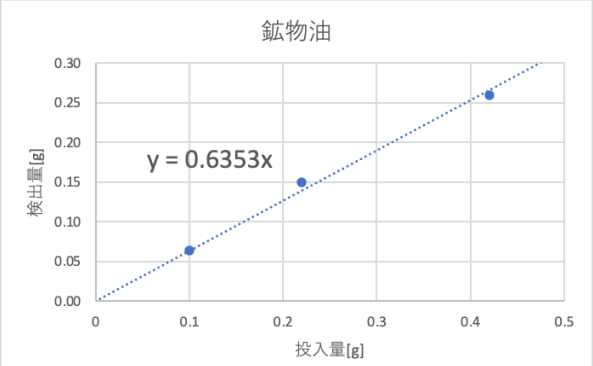
なお，用いた土壌は 2-3 の実験で用いたものと同じもので行った．

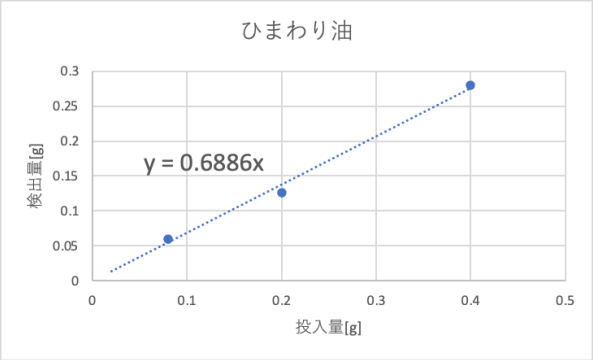
3-3 実験結果











(グラフ 2)

3-4 考察

3-4-1 松根油のグラフについて

松根油のグラフは他のグラフと比べて傾きが非常に小さい結果となった．我々が使用した純テレピン油は揮発性有機化合物であるため[6]，ドラフトでヘキサンを揮発させる際に松根油も揮発してしまった可能性が高いと考えられる．このため，松根油のデータは信憑性に欠けると考えられる．

4.微生物による油の生分解率に関する実験

特定の土壌，油の種類の組み合わせにおける生分解率測定実験

4-1 目的

土壌中の微生物の環境の変化によって，分解される油の量，種類などにどのような影響があるのかを明らかにし，土壌中に含まれる油を分解するのに適した土を探すことである．

4-2 仮説

松の幹に傷をつけることで，テレピン油やロジンの原料となる生松脂が流れ出ることが知られている[7]．テレピン油やロジンは工業油として使用されるが，その原料となる生松脂が松の木の周りに漏れ出したとしても，松の木が枯れ，周囲の環境が破壊されることはない．これは松の木の下の土壌にいる特定の微生物が生松脂の油分を分解しているからではないかと考えた．そこで，油の原料となる

植物が生育した土壌ではその油分を分解するのに適した微生物がおり，特定の油の生分解率が上昇するという仮説を立てた．

4-3 実験方法

4-3-1 試料の作成方法

実験材料

実験には 3-2 で検証した 5 種類の油を用いた．

土壌は次の 4 種類を用意した

・みはらしファームマレットゴルフ場内の松林の土壌(写真 1)
・大豆畑の土壌(写真 2)
・ひまわりの下の土壌(写真 3)
・伊那北高校グラウンドの土壌(写真 4)

各油と各土壌を組み合わせたもので実験を行う．

(写真 1)

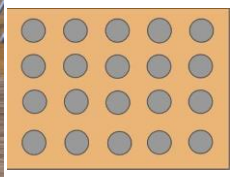
(写真 2)

(写真 3)

(写真 4)

土と油を加え，分解の様子を観察する容器を作成した．A4 段ボールをカッターで半分に切り，通気性をよくするために，きりで等間隔に穴を開ける．また，油が段ボールに染み込むのを防ぐために，セロハンテープを用いてクッキングシートを内部に貼り付けたものを用意した．(写真 5)(図 1)

この容器に，上記条件の土 5L を入れ，さらに実験の対象となる油 250ml をそれぞれに加えたものを，計 20 個用意する．この油の量は[2]を参考にして土に対して 5%の量となるようにした．一日一回よく攪拌し，土壌中の温度を測り霧吹きで水を満遍なく吹きかけ，土壌が乾燥して微生物の活動が低下するのを防ぐ．これを約三ヶ月間続ける．


(写真 5)(図 1)

4-3-2 pH の測定方法

三角コーナー用のネットに各種土 10ml を入れ，水 100ml を入れたビーカーに沈ませる．ビーカー内で攪拌後，ネットを取り出して pH メーターでビーカー内の pH を測定する．

4-3-3 土壌中の油量の測定

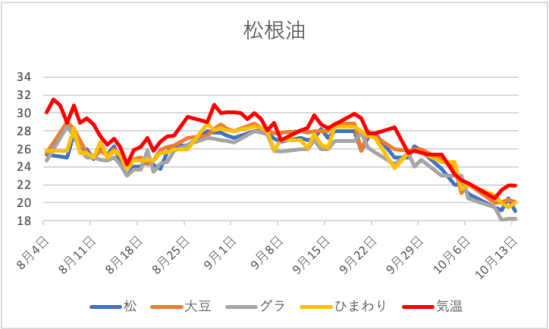
2-3 の実験方法を元に実験を行う．

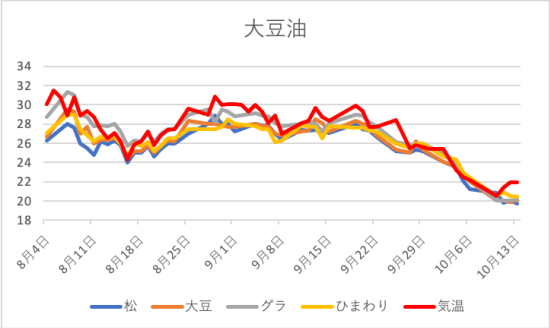
土壌中の残油量が均一になるようによく混ぜた試料から土 10ml を採取する．その後 2-3 と同様の実験手順によって土壌中の油を検出する．

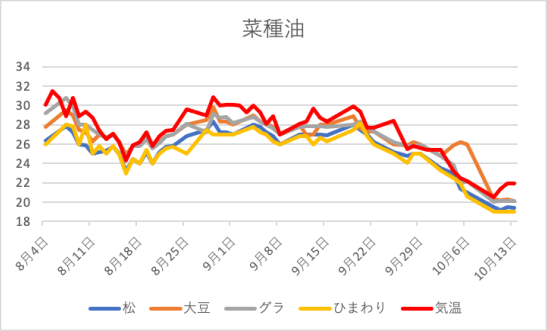
4-4 実験結果

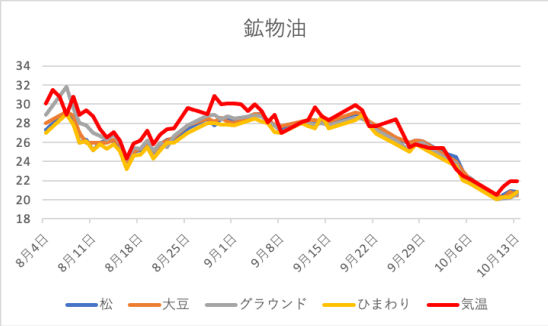
4-4-1 温度

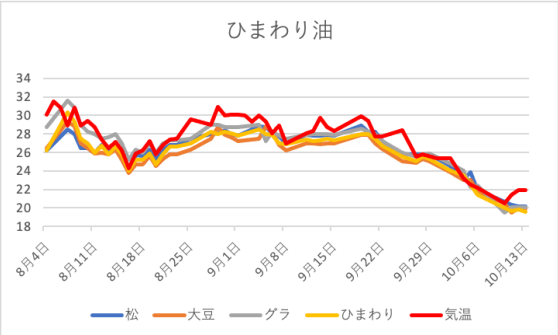
８月から１０月まで約二ヶ月間の温度変化を油ごとにまとめたものを(グラフ 3)に示す．











(グラフ 3)

4-4-2　pH

土壌中の pH の測定方法

８月(実験開始時)と１０月(実験終了時)の試料の pH の推移を表したものを(表 1)に示す.

pHの推移	松根油	大豆油	菜種油	鉱物油	ひまわり油
松の土	7.7→6.8	7.9→4.4	7.3→4.5	7.4→6.8	7.7→5.1
大豆の土	7.7→6.9	7.5→6.4	7.3→6.4	7.4→7.1	7.3→6.6
グラウンド	7.7→7	7.6→6.3	7.4→6	7.5→7.3	7.6→5.9
ひまわりの土	7.9→7.3	7.5→6.6	7.4→6.8	7.5→7.4	7.4→6.8

(表 1)

全てのサンプルで pH が減少したことがわかる.

4-4-3 油の分解率について

実験によって得られた油量を検出値，(グラフ 2)より推定される，実験前に土壌中に含まれていた油量を推定値とする．また実験開始時に土 10ml に混ざっていたとされる油量に対する油分の減少量の割合を示したものを分解率とし，これらをまとめたものを(表 2)に示す.

実験結果		大豆油	菜種油	鉱物油	ひまわり油	松根油
松の土	検出値[g]	0.013	0.063	0.373	0.017	0.010
	推定値[g]	0.019	0.117	0.588	0.024	0.194
	分解率[%]	95.1	72.8	—	93.9	54.8
大豆の土	検出値[g]	0.003	0.050	0.250	0.027	0.000
	推定値[g]	0.005	0.092	0.394	0.039	0.000
	分解率[%]	98.8	78.5	6.3	90.3	100.0
グラウンド	検出値[g]	0.020	0.013	0.230	0.007	0.007
	推定値[g]	0.028	0.025	0.362	0.010	0.129
	分解率[%]	92.7	94.3	13.8	97.6	69.9
ひまわりの土	検出値[g]	0.017	0.043	0.267	0.020	0.000
	推定値[g]	0.023	0.080	0.420	0.029	0.000
	分解率[%]	93.9	81.4	0.1	92.7	100.0
平均分解率		95.1	81.8	5.1	93.6	81.2

(表 2)

表中の灰色で示しているデータは，他のデータと比較して大きな差があったため，データとしない.

4-5 考察

4-5-1 温度変化について

土壌中の温度が気温とほぼ同様に変化をしていることがわかる．よって土壌中の微生物の油分分解による温度上昇は見られなかった.

4-5-2 pH について

pH が減少した理由は水素イオンの増加である．油は微生物によって分解されると最終的に水と二酸化炭素になることが知られており[8]，生じた二酸化炭素によって酸性になったものと考えられる.

松の土では大幅に水素イオンが増加していた．松の土は他の土と比べ，木の葉や枝などの有機物が多く含まれていることが目視で確認できた．これらの有機物が分解され，微生物が住みやすい環境となることで油を分解する活動が促進され，水素イオンが増加したと考えたが，4-4-3 の結果より，松の土での油の分解率は，他の土と比べて大きいと判断することはできなかった.

この理由として，他の有機物が微生物によって分解されることで油の分解が促進されたわけではなく，元々含まれていた有機物の分解による二酸化炭素の発生により水素イオン量が増加したと考えられる.

表 1 から，松根油と鉱物油では水素イオンの増加量が少ないことがわかる．松根油と鉱物油の共通点として工業油であることが挙げられる.

松根油は一部の微生物に対しての殺菌作用があり[9]，これが土壌中の環境を変化させ，分解を妨げた可能性がある．

また，鉱物油は安定した炭素化合物によって微生物の油分の分解を妨げる効果がある．これらの理由によって水素イオンの増加量が少なかったと考えられる．

4-5-3 植物由来の油と土について

我々は，油の原料となる植物が生育している環境の土壌ではその油の分解率が高くなるという仮説を立てた．これに従って実験結果を見ると，大豆油は大豆の土で最も分解されたが，ひまわり油ではグラウンドの土で最も分解率が高くなるという結果になった．

我々の仮説ではグラウンドの土について，植物が多く生えている環境ではないため土壌中に生息している微生物は少なく，油の分解率は低くなると考えていたが，結果から他の土壌における分解率との違いを見ることはできなかった．そこでグラウンドを除く全体のデータを第1群，グラウンドのデータを第2群としてU検定にかけたところ，有意水準5%においてこれらのデータに有意差はないという結果が採択された．このことから，グラウンドの土の中にも油を分解する微生物が存在していたと考えられる．

実験後の考察によってこの事実を検証するために，培地を利用することでグラウンドの土に油を含ませたものの中に微生物が存在する方法が上がったが，確認することまではできなかった．

また同様に時間の都合上確認することはできなかったが，今回の実験では条件とは異なる土を基準として用いていたため，実験結果に土の性質が関わっている可能性も上がった．

4-5-4 鉱物油について

鉱物油におけるそれぞれの土での油分の分解率の平均は5.1%となり，大豆油の95.1%，菜種油の81.8%，ひまわり油の93.6%と比べて非常に低い結果となった．

[2]の論文では，土壌に対して5%の量の鉱物油と有機廃棄物を加えた土壌においては92%の分解率を示すことが報告されていたが，今回の実験では分解率はそこまで高くならないことがわかった．このことから有機廃棄物を加えることが，鉱物油の分解に強く関わっていると考えられる．

5．結論

今回の実験方法によって土壌中の油分含有量を測定することが可能であると考えられる．

鉱物油は有機廃棄物を加えることで分解率が高くなると考えられる．

油とその原料が生育している植物の土壌には，油分の分解量の相関は高そうではあるが，断言するまでには至らなかった．

6．展望

油分測定実験では時間の都合上，１つの条件につき３つまでしかデータを採ることができなかった．データ数を増やして実験を行うことでより正確な実験結果が期待できる．

考察にもあげたように，グラウンドの土でも他の土と同様に油が分解される結果となったため，微生物の生息数や種類を他の土壌と比較したい．油の分解は複数の微生物の相互作用によってなされるため，土壌中の微生物の量と種類を比較することで油の分解率についての考察をさらに深めることができると考える．

7．謝辞

この場を借りて今回の実験に協力していただいた方々にお礼申し上げます．

信州大学農学部伊原准教授には実験について数多くの助言をしていただきました．ここに感謝の意を示します．

並びに有限会社バイオフューチャー業務部の小野氏には，こちらからの質問に対して快く答えていただきました．厚く御礼申し上げます．

8.引用文献

[1]松村英功・佐々木雅浩・徳納佑樹・安部道玄・中崎清彦

コンポスト化過程における油分の分解と油分解菌 Geobacillus pallidus L33-1 株の単離
URL＝
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsmcwm/22/2/22_2_141/_pdf/-char/ja

[2] O. P. Abioye, P. Agamuthu, and A. R. Abdul Aziz
Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments
URL＝
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3388317/

[3] ケルダール法 - フリー百科事典ウィキペディア(Wikipedia)
URL＝https://ja.wikipedia.org/wiki/ケルダール法

[4]誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-OES) - 日鉄テクノロジー
URL＝
https://www.nstec.nipponsteel.com/technology/chemical-analysis/inorganic-analysis/inorganic-analysis_03_icp-ms.html

[5]付票 14 環境省
URL=https://www.env.go.jp/kijun/wt_a14.html

[6]テレピン油 (化学用),国産化学株式会社,D006400-1,2016/09/21 1/9
URL＝http://www.kokusan-chem.co.jp/sds/D006400-1.pdf

[7]⑨H30 研究報告【渋谷】
URL=http://www2.chiba-muse.or.jp/www/SCIENCE/contents/1522436090605/simple/kenkyuhoukoku6.pdf

[8]分解者としての微生物｜バイオテクノロジー｜製品評価技術基盤機構
URL＝
https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/other/bioreme2009/knowledge/bioremediation/bioremediation_2.html#

[9]Pine oil - Wikipedia
URL＝https://en.wikipedia.org/wiki/Pine_oil