

土壌および地下水中の灯油に 及ぼす揮散と微生物分解の影響

小林 規矩夫

Effects of Volatilization and Biodegradation
on Kerosene in Soil and Groundwater

Kikuo KOBAYASHI

山梨県内で油類による土壌、地下水汚染が何例か発生し、その多くは汚染が狭い範囲に限られていたものの、着臭、油膜等で長期間にわたり深刻な問題となった事例もあった。このような油分の汚染事例では採取した試料の色、臭気、粘性、比重とともに、赤外吸収スペクトル、ガスクロマトグラム等から油分の同定を行っている。県内で発生した油分による汚染事例の原因物質としては、身近なところで大量に使用されている灯油が最も多くなっていた。

このような灯油による汚染事例の際、汚染現場から採取した試料をガスクロマトグラフで測定すると、多くの場合市販灯油のピークパターンとはやや異なった傾向を示した。これは環境中で灯油が何らかの作用を受け変性したものと考えられた。

従来、油分による環境汚染としては、タンカー事故等による大規模な海洋汚染がよく知られており、海洋に流出した原油の挙動については多くの報告がある¹⁾。流出原油は海洋中で最終的に、揮散、懸濁、沈降、光分解といった物理化学的な変性、微生物分解を経てやがて消失していくと考えられている²⁾。しかし、土壌、地下水中に混入した油分の変性、分解については十分検討されていない。

そこで今回、土壌、地下水汚染事例での灯油の変性原因について、揮散と微生物分解を中心に検討した。さらに関連物質の直鎖状の飽和炭化水素（以下n-アルカンと略す）、軽油の微生物分解についても検討した。

試験方法

1. 灯油の同定方法

試料の上層を採りn-ヘキサンで希釈した液、又は試

料をn-ヘキサンで抽出した液をガスクロマトグラフで測定し、市販灯油のガスクロマトグラムとのピークパターンと比較し、同定した。

また、炭化水素の炭素数は標準品のn-アルカン（炭素数8~25）の保持時間とマススペクトルから決定した。

2. 揮散試験

灯油3mlを遠沈管に取り、これに室温で1時間、窒素ガスを吹き付けたものと、灯油10mlを100mlのビーカーに取り、室温に7日間放置したものをガスクロマトグラフで測定した。

3. 微生物分解試験

1) 灯油分解菌の分離

灯油汚染事例で地下水とともに湧出した灯油の回収に使用していたオイルマットに付着した粘性の物質を採取し、これをPAS培地³⁾30mlに懸濁させ、灯油30mgを加えて、30°Cで2日間、振とう培養した。この培養液1.0mlを取り、同様に培養を繰り返した。

分解菌の分離は、10倍のスケールで同様に培養した液を冷却遠心（4°C, 10,000rpm, 10分間）後、沈殿した菌体を0.05Mリン酸緩衝液（pH7.5）で2回洗い、さらに遠心し沈殿物を分離してresting cellとした。

なおPAS培地はK₂HPO₄ 5.68g, KH₂PO₄ 2.19g, NH₄Cl 2.76gを1Lに溶かし滅菌したPA培地にMgSO₄ 19.5g, MnSO₄·H₂O 5g, FeSO₄·7H₂O 1g, CaCl₂·2H₂O 0.3g, L-アスコルビン酸 1gを1Lを含む滅菌したS溶液を1%になるように加えて調製した。

2) 微生物分解試験方法

分解試験はPAS培地30mlに、resting cellをリン酸緩衝液に懸濁させ、濁度がOD 0.6となるようにした

液を1.0ml, さらに灯油 30mg を加え, 30℃で振とう培養した。この培養液から経時的に 2 ml を分取し, n-ヘキサン 4ml で抽出し, ガスクロマトグラフで測定した。

同様な方法で標準品の n-アルカン, 軽油の微生物分解試験も行った。

4. 測定条件

ガスクロマトグラフ測定条件

機種種: HP5890 検出器: FID
 カラム: DB-5(J&W社製) 0.53mm φ×15m
 膜厚 1.5 μm
 カラム温度: 50℃(2min)–15℃/min–140℃–25℃
 /min–280℃
 検出器温度: 250℃
 注入法: スプリット・スプリットレス法

GC/MS測定条件

機種種: JMS AX-505W (日本電子製)
 カラム: DB-5 (J&W社製) 0.25mm φ×30m
 膜厚 0.25 μm
 カラム温度: 50℃(2min)–15℃/min–140℃–25℃
 /min–280℃
 注入法: スプリット・スプリットレス法
 イオン化法: EI法
 イオン化電圧: 70eV イオン化電流: 300 μA

試験結果と考察

1. 灯油のガスクロマトグラム

市販灯油のガスクロマトグラムを図1に示した。灯油は炭素数が8から16付近までのn-アルカンが主成分で, これが規則的なピークを示し, n-アルカンのピーク

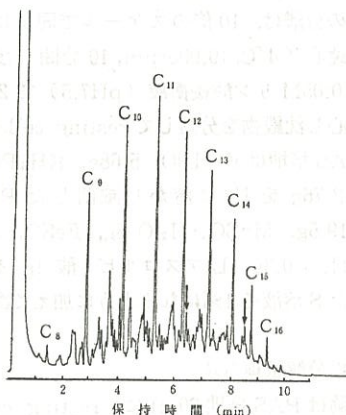


図1 灯油のガスクロマトグラム

クの間には n-アルカン以外の炭化水素等の多くのピークが出現している。

市販灯油のほとんどがこれと同様のピークパターンを示した。なお図の C_x は n-アルカンの炭素数を示す。

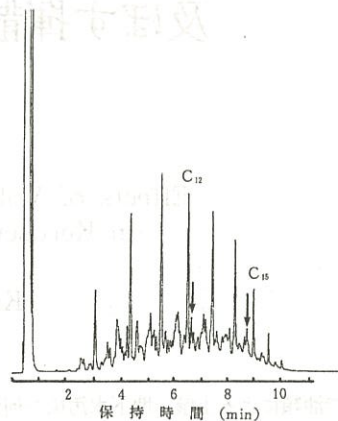


図2 汚染事例の灯油のガスクロマトグラム

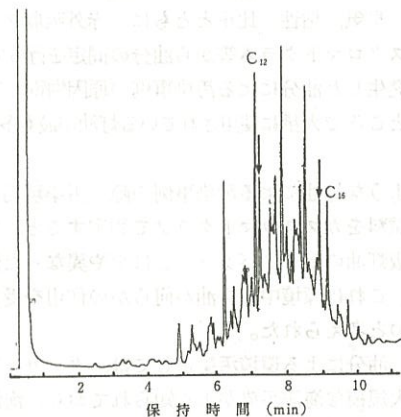


図3 汚染事例の灯油のガスクロマトグラム

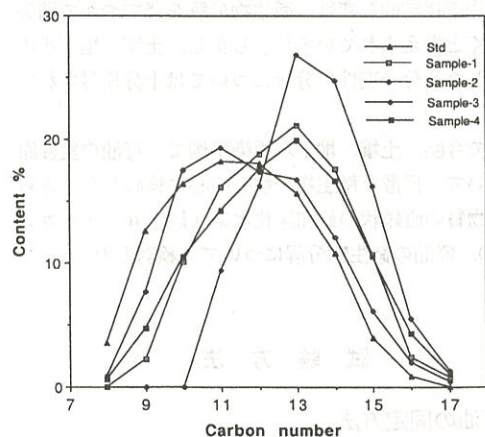


図4 汚染事例での灯油中の n-アルカン組成の変化

2. 汚染事例での灯油の変性

灯油が土壤中に浸透し、地下水等に混入した試料の中で、ガスクロマトグラムのピークパターンが市販灯油と異なっていた例を図2, 3に示した。2例とも図1の市販灯油に比べると炭素数の少ない炭化水素（短鎖長側）のピークが消失したり、小さくなっていて、この部分が異なったパターンを示した。

この傾向は他の汚染事例でも認められ、4例のガスクロマトグラムのピーク高から各n-アルカンの構成割合を算出し図4に示した。市販灯油(std)に比べ、sample3はほぼ同様なパターンを示したが、他の3例はいずれもピークの高さが長鎖長側に移行し、特にsample2はこの傾向が顕著であった。

また、図1~3でC12, C15のn-アルカンとその近くの矢印で示したn-アルカン以外の炭化水素のピーク高の比をみると、図1の市販灯油は0.17, 0.43で、図2は0.16, 0.43とほぼ同じであったが、図3は0.57, 0.90と大きく異なっていた。このことから図2と図3

に示した汚染事例の灯油はそれぞれ異なった作用を受けて変性したものと考えられた。

3. 揮散試験結果

室温に7日間放置した試料のガスクロマトグラムを図5に示す。図1の市販灯油のピークパターンに比べ、

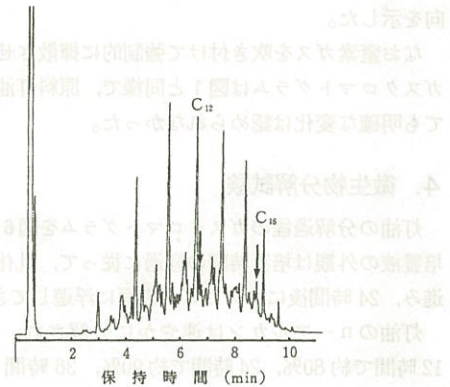


図5 室内に放置(7日間)した灯油のガスクロマトグラム

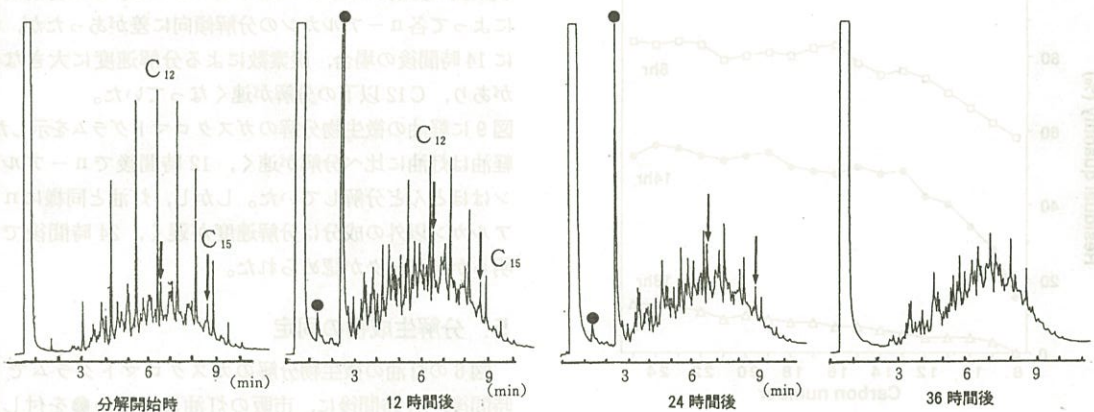


図6 灯油の微生物分解過程のガスクロマトグラム

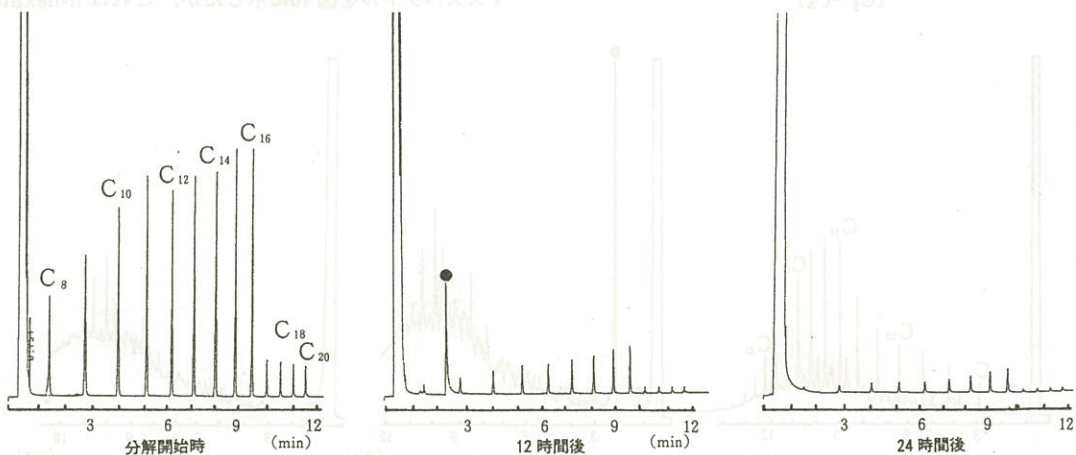


図7 標準品n-アルカンの微生物分解による減少(C₈~C₂₀)

C8～C10の短鎖長のn-アルカンのピークが低くなり、揮散したものと考えられた。

しかし、C12、C15のn-アルカンと矢印で示すn-アルカン以外の炭化水素のピーク比は0.17、0.33と市販灯油とほぼ同様な値であった。この揮散試験で得られたピークパターンは図2に示した汚染事例と似た傾向を示した。

なお窒素ガスを吹き付けて強制的に揮散させた灯油のガスクロマトグラムは図1と同様で、原料灯油と比較しても明確な変化は認められなかった。

4. 微生物分解試験

灯油の分解過程のガスクロマトグラムを図6に示した。培養液の外観は培養時間の経過に従って、乳化、白濁が進み、24時間後にはスクムが表面に浮遊してきた。

灯油のn-アルカンは速やかに分解され、分解率は12時間で約80%、24時間で約90%、36時間で約98%であった。

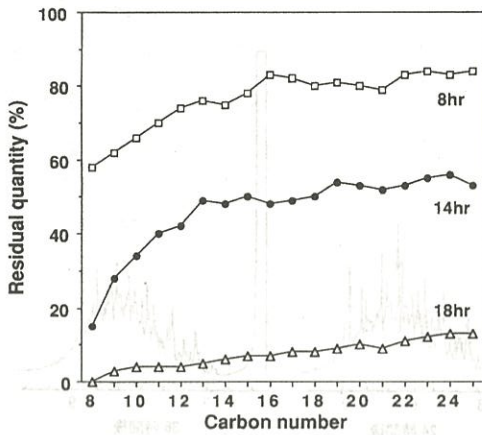


図8 微生物分解過程でのn-アルカンの炭素数別残存率 (C₈～C₂₅)

一方、n-アルカン以外の炭化水素の分解は、矢印で示したC12、C15付近のピークでみると、両者ともに12時間で約60%、36時間でも約70%の分解率でn-アルカンに比べ分解速度が遅くなっていた。

図6のC12、C15のn-アルカンと矢印で示したピークの比は12時間で0.45、0.80、24時間で0.73、1.40と分解の進行に従って大きくなっていった。図3でも同様な傾向がみられることから、この汚染事例では土壌、地下水において微生物分解を受けたと考えられた。

さらに、この菌を用いて同様な方法で標準品のn-アルカン、軽油についての微生物分解試験を行った。

標準品のn-アルカン(炭素数8～20)の分解過程のガスクロマトグラムを図7に示した。灯油と同様に分解が速く進行した。図8に別のn-アルカン(炭素数8～25)の分解試験結果から算出した炭素数別の残存率を示した。n-アルカンの残存率は8時間で58～84%、14時間で15～56%、18時間で0～13%となっていた。また炭素数によるn-アルカンの分解速度は、短鎖長側に比べ長鎖長側が遅くなるとの報告があるが⁴⁾、今回も長鎖長側の分解がわずかに遅くなっていた。また分解時間によって各n-アルカンの分解傾向に差があったが、特に14時間後の場合、炭素数による分解速度に大きな差があり、C12以下の分解が速くなっていた。

図9に軽油の微生物分解のガスクロマトグラムを示した。軽油は灯油に比べ分解が速く、12時間後でn-アルカンはほとんど分解していた。しかし、灯油と同様にn-アルカン以外の成分は分解速度が遅く、24時間後でも明らかなピークが認められた。

5. 分解生成物の同定

図6の灯油の微生物分解のガスクロマトグラムで12時間後、24時間後に、市販の灯油にはない●を付したピークがあらわれている。保持時間の遅い方のピークのマススペクトルを図10に示したが、これはn-hexanol

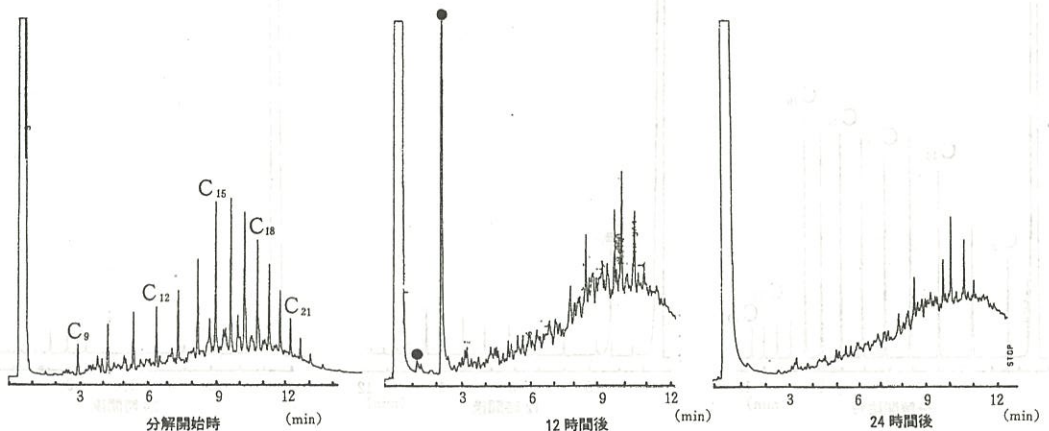


図9 軽油の微生物分解過程のガスクロマトグラム

と同定された。これは標準品のn-アルカン、軽油の場合にも同様に検出された。

一般にn-アルカンの分解はアルコール、アルデヒド、脂肪酸を経てアシル CoA へと変化し、さらにβ酸化と呼ばれる代謝経路によって二酸化炭素と水に完全分解されることがわかっている⁵⁾。しかし、今回の抽出、測定方法ではアルコール類以外は検出されなかった。

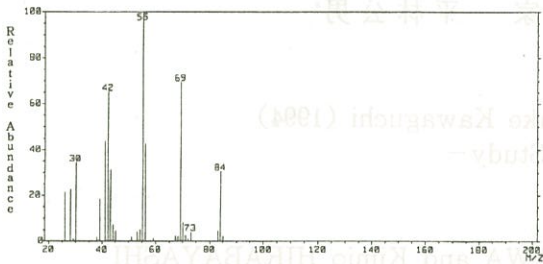


図10 灯油の分解生成物のマススペクトル

ま と め

灯油による土壌、地下水汚染事例での汚染試料中の灯油は市販灯油とは異なったガスクロパターンを示し、変性したものが多い。この原因と推定される、環境中における揮散と微生物による生分解について検討した。

- 1 灯油は揮散等で炭素数が少ないn-アルカンが失われる。この場合はn-アルカンとn-アルカン以外の炭化水素の含有割合はあまり変化がみられなかった。
- 2 灯油は微生物により容易に分解した。n-アルカンがより速く分解し、n-アルカンとn-アルカン以外の炭化水素の含有割合は分解が進行するに従い変化した。
- 3 汚染事例での試料中の灯油はガスクロマトグラムから揮散、生分解等の影響を受けたものと考えられた。
- 4 n-アルカンは炭素数により分解速度が異なっていて、炭素数が少ないものが分解が速かった。
- 5 軽油、標準n-アルカンも同じ分解菌で速やかに分解した。
- 6 n-アルカンの分解生成物としてアルコール類を検出した。

文 献

- 1) 後藤雅史, 石原正美, 原山重明: 用水と排水, 37, 290-296 (1995)
- 2) 村上昭彦, 鈴木一信, 山根昌子: 水質汚濁研究, 8, 373-379 (1985)
- 3) 古川謙介: 微生物の分離法, 667-675, R&D プラニング
- 4) 山根昌子ら: 水質汚濁研究, 14, 123-126 (1991)
- 5) 村上昭彦, 長沢伸一: 水質汚濁研究, 1, 107-113 (1978)



図11 調査地点の位置