

ガソリン汚染地下水におけるBTXの自然減衰評価

高畑 陽*¹・帆秋 利洋*¹・笠井 由紀*²・渡辺 一哉*²

Keywords : BTX, natural attenuation, monitored natural attenuation, anaerobic bacteria, PCR-DGGE

BTX, 自然減衰, 科学的自然減衰, 嫌気性微生物, PCR-DGGE

1. はじめに

ガソリンスタンド等から地盤中へガソリンが漏洩し、土壌や地下水汚染を引き起こす事例が近年多く報告されている。ベンゼン、トルエン、キシレン (BTX) はガソリンの成分であり、人体への有害性が高く、かつ水溶性も高いため、要監視物質として規制されている。BTXは好気環境下で容易に生分解されることが知られており、近年では嫌気環境下においてもこれらを分解可能な微生物の存在が明らかになってきている。

MNA (Monitored Natural Attenuation) は、汚染物質に対する環境リスクが低減されたと考えられるサイトにおいて揚水処理やエアスパージングなどの積極的浄化を停止した後に適用する浄化手法である。すなわち、汚染物質が自然減衰していくプロセスを注意深くモニタリングすることにより汚染地下水を監視する浄化代替法である¹⁾。MNAは、浄化コストの削減が可能であると共に、一般的な浄化方法と比較して適用範囲が広いという特徴を有する。地下水のモニタリング情報は、自然減衰ポテンシャルの把握や現在進行している分解状況を評価することに使用する²⁾。特に、BTXは好気性微生物の他、嫌気性の硝酸還元菌、硫酸還元菌、鉄還元菌、メタン生成菌など多くの微生物により分解される³⁾。したがって、汚染域における自然減衰ポテンシャルを知るためには、地下水に存在する微生物の種類や機能について正確に把握することが重要と考えられる。

本研究では、約10年間揚水処理を実施し、浄化処理を停止した熊本市内のガソリン汚染サイトを対象として、汚染域内外に設置された複数の観測井戸において地下水のモニタリングを定期的実施した。BTX汚染サイトの地下水水質指標と微生物生態の関係から、本サイトにお

ける自然減衰による汚染物質の浄化特性について検討し、これまでに得られた知見について報告する。

2. 調査および試験方法

2.1 サイト概要およびサンプリング方法

研究対象としたサイトは、熊本市内の東野地区に位置する。本地区は各家庭に浅い掘り抜き井戸を有しており、1991年1月にガソリンスタンドの貯留タンクから漏洩したガソリンが各家庭の井戸から検出されるまでは、地下水を飲料水として利用していた。汚染が確認された第一帯水層の土質は、透水性の良い砂層である。地下水位は北北東から南南西の方向に約0.5%の水位勾配がある(図-1)。現地簡易透水試験による地下水流速は、約10m/年であった。年間の地下水位季節変動は、約1mである。

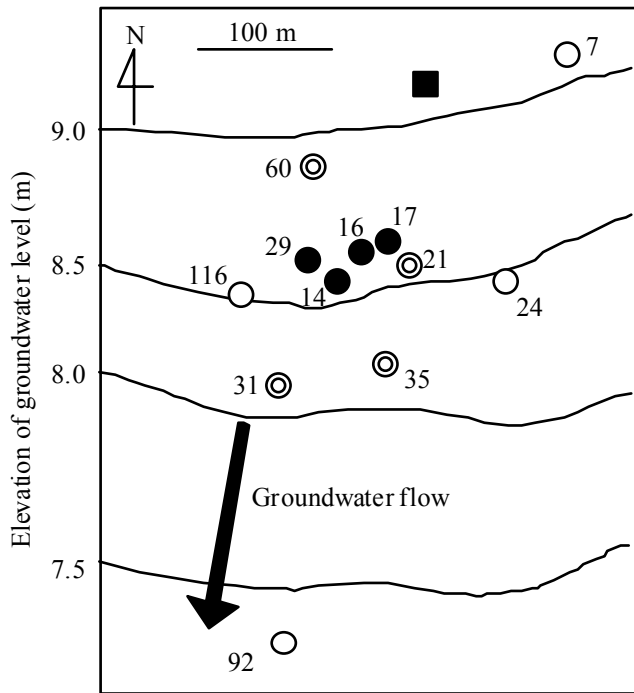
1992年2月より、井戸14に設置された揚水曝気装置を用いてガソリン汚染地下水の浄化処理が開始された。汚染域の中心(井戸29)および境界域(井戸60)における地下水中のBTX濃度経時変化を図-2に示す。2002年4月に揚水曝気装置を停止し、地下水のモニタリングによるMNAを開始した。汚染域の内外に位置する12本の観測井戸で採取した地下水を滅菌したガラス瓶に採取し、24時間以内に分析を実施した。

2.2 地下水質および微生物分析

地下水の溶存酸素(DO)、酸化還元電位(Eh)、pHはマルチモニタリングシステム(U-22、堀場製作所)を用いて現地で直接測定した。BTXの分析はページ&トラップGC-FID法により測定した。炭酸塩(HCO_3^-)、硝酸塩(NO_3^-)、および硫酸塩(SO_4^{2-})の濃度はHPLC法により分析した。地下水中の溶存鉄およびマンガンイオン濃度は原子吸光光度計を用いて測定した。全菌数はアクリジン染色直接計数法により計測した⁴⁾。

* 1 技術センター土木技術研究所水域・生物環境研究室

* 2 (株)海洋バイオテクノロジー研究所



■, Contaminated source (gas station); ●, Wells in the contaminated zone; ◎, Wells in the interfacial zone; ○, Wells in the background (non-contaminated zone).

図-1 研究対象とした汚染サイトの平面地図と井戸配置
Location and map of the study area

2.3 地下水のBTX分解ポテンシャル

ガソリン汚染地下水のBTX汚染に対する好気および嫌気分解能力を評価するため、2003年3月に井戸29および井戸60から採取した地下水を用いてBTX分解能力調べた。採取直後の地下水試料を滅菌済みの125mlバイアル瓶に完全に満たし、滅菌済みのテフロンコーティング済みブチルゴム栓で密栓した。その後、ベンゼン、トルエン、*m*-キシレン、*p*-キシレン、*o*-キシレンを各バイアル瓶の添加濃度がそれぞれ4.0、1.0、0.22、0.22、および0.29mg/lになるように分注した。バイアル瓶は20℃の恒温槽で6週間培養し、培養期間中のBTX濃度を測定した。

2.4 DGGEプロファイルによる分子生態解析

バッチ培養試験後の培養液を濾紙に収集した菌体からDNAを抽出した。バクテリアの16S rDNAのV3可変領域 (*E.coli*配列における341から534bpsに相当する配列) をP2およびP3プライマーによりPCR (Polymerase Chain Reaction) 増幅後、その増幅産物をDGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法により泳動した⁵⁾。DGGEで分離された個々のDNA増幅断片は、笠井らの手法により遺伝子配列を決定した⁶⁾。

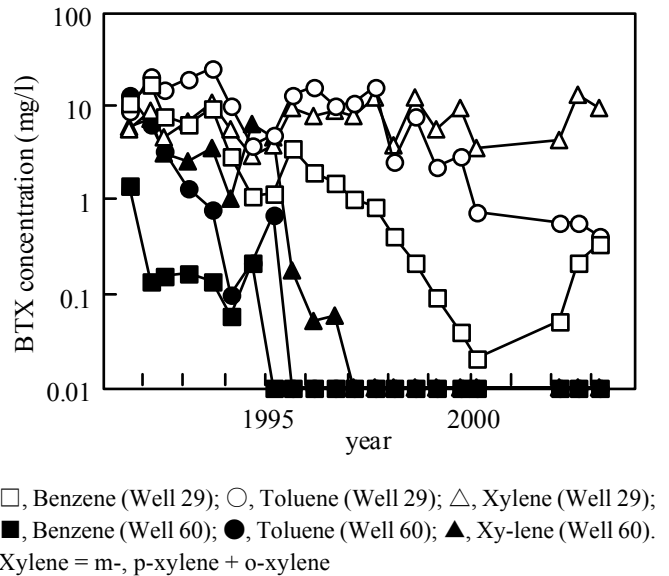


図-2 地下水中のBTX 経時変化
Changes in BTX concentrations in groundwater

3. 結果および考察

3.1 地下水の化学的および生物学的性状

BTXは汚染域 (井戸14、16、17、29) で季節変動を伴い観測され、BTX濃度の明確な減少傾向はMNA導入後1年間は観測されなかった。一方、境界域 (過去に汚染が確認されたが、MNA導入前には汚染が確認されなくなった井戸21、31、35、60) では、BTXが調査期間中に一度も観測されなかった。この結果は、汚染範囲が下流方向に拡大していないことを示唆している。

MNA導入前後における非汚染域 (井戸7)、汚染域 (井戸29)、および境界域 (井戸60) における地下水の化学的、生物学的な性状を表-1に示す。非汚染域と比較して汚染域では溶存酸素、硝酸塩、硫酸塩の消失、鉄イオン、マンガンイオン、硝酸塩の生成が確認され、本サイトで汚染物質の生物学的な分解が生じていると考えられた²⁾。境界域では非汚染域の水質と比較して、溶存酸素濃度が低く、全菌数は高濃度で存在した。したがって、境界域で微生物活性が高くなっていると推察された。

3.2 地下水のBTX分解ポテンシャル

好気条件下におけるBTX分解ポテンシャルは、地下水を空気存在下で培養し検討した。井戸60から採取した地下水に栄養塩等を添加せずに培養した結果、BTXは2週間以内に完全分解され (図-3、A)、境界域における地下水が高いBTX分解ポテンシャルを有していることが示された。一方、井戸29から採取した地下水に添加したBTXは、栄養塩等を添加せずに培養した条件ではほとんど減少せず

(図-3、B)、溶存酸素の存在下では漸減した(図-3、C)。溶存酸素および栄養塩(窒素、リン)が供給された条件で、汚染域の地下水は境界域から採取した地下水と同様の分解傾向を示した(図-3、D)。したがって、汚染域における地下水中のBTXの好氣的生分解は、電子受容体に相当する酸素だけでなく、微生物の増殖に必要な窒素およびリン等の微量元素の両者が不足していることにより制限されているものと推察された。

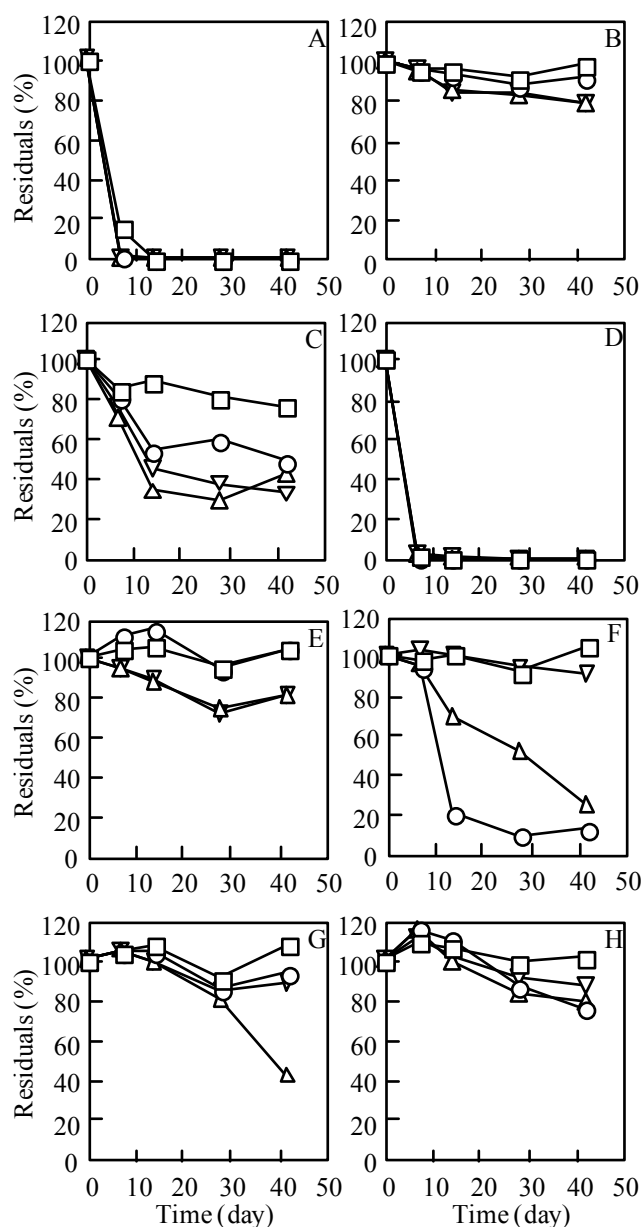
次に、汚染域における嫌気条件下のBTX分解ポテンシャルを把握するため、採取した地下水に栄養塩(窒素、リン)を添加した条件、栄養塩と共に硝酸塩、硫酸塩、鉄塩(3価鉄)を添加し、空気が存在しない条件で培養を行った(図-3、E~H)。硝酸塩と硫酸塩の添加によりトルエンと*m*-、*p*-キシレンの分解が促進され、これらの電子受容体が汚染域に供給された場合に本サイトでBTXの嫌気分解が起こる可能性が高いと考えられた。一方、ベンゼン、*o*-キシレンは42日間の培養期間では減少せず、嫌気的生分解が起こりにくいものと推察された。

3.3 DGGEプロファイリングによる分子生態解析

汚染域におけるBTX分解微生物の分子生態解析手法は、自然減衰の程度を予測する手法の一つとして開発されている⁷⁾。電子受容体を添加して培養した地下水中のDGGEプロファイルには、地下水中に優占的に存在する微生物と考えられるDNA断片が明確に識別された(図-4)。優占して出現したDNA増幅断片を解析した結果、幾つかの主要なDNA断片は、過去に報告されているBTX分解菌に近縁種であることが示された⁷⁾(表-2)。

表-1 化学的および生物学的な地下水性状
Chemical and microbial signatures for monitor wells

	Well 7		Well 29		Well 60	
	Mar. 02	Mar. 03	Mar. 02	Mar. 03	Mar. 02	Mar. 03
Benzene (mg/l)	<0.01	<0.01	0.05	0.33	<0.01	<0.01
Toluene (mg/l)	<0.01	<0.01	0.59	0.42	<0.01	<0.01
<i>m</i> , <i>p</i> -xylene (mg/l)	<0.01	<0.01	3.00	7.40	<0.01	<0.01
<i>o</i> -xylene (mg/l)	<0.01	<0.01	1.20	2.30	<0.01	<0.01
DO (mg/l)	7.1	6.8	0.1	0.5	4.7	5.3
Eh (mV)	345	151	-36	-125	307	162
pH	6.0	5.8	6.5	6.5	6.1	5.9
NO ₃ ⁻ (mg/l)	2.6	2.7	<0.1	<0.1	5.7	5.2
SO ₄ ²⁻ (mg/l)	16.0	15.0	0.3	<0.1	14.0	13.0
T-Fe (mg/l)	<0.1	<0.1	12.0	17.0	<0.1	<0.1
T-Mn (mg/l)	<0.1	<0.1	22.0	23.0	<0.1	0.7
HCO ₃ ⁻ (mg/l)	46	46	217	276	51	46
Total cell density (×10 ⁵ cells/ml)	1.6	1.1	44.0	9.6	6.5	4.6



BTX in the groundwater obtained from Wells 60 and 29.

A, groundwater without additives (Well 60); B, groundwater without additives (Well 29); C, groundwater with NP solution (1.0 mg/l of NH₄⁺ and 0.2 mg/l of PO₄³⁻) (Well 29); D, groundwater with air (liquid:air = 1:3) and NP solution (Well 29); E, groundwater with 12.4 mg/l of NO₃⁻ and NP solution (Well 29); F, groundwater with 19.2 mg/l of SO₄²⁻ and NP solution (Well 29).

□, Benzene; ○, Toluene; △, *m*-, *p*-xylene; ▽, *o*-xylene.

図-3 地下水中のBTX分解ポテンシャル

Laboratory incubation for biodegradable potential of BTX in the groundwater obtained from Wells 60 and 29

4. まとめ

1) 汚染域の地下水の中では、BTXの生物学的自然減衰に起因する溶存酸素、硝酸塩、硫酸塩等の電子受容体の消費が確認された。

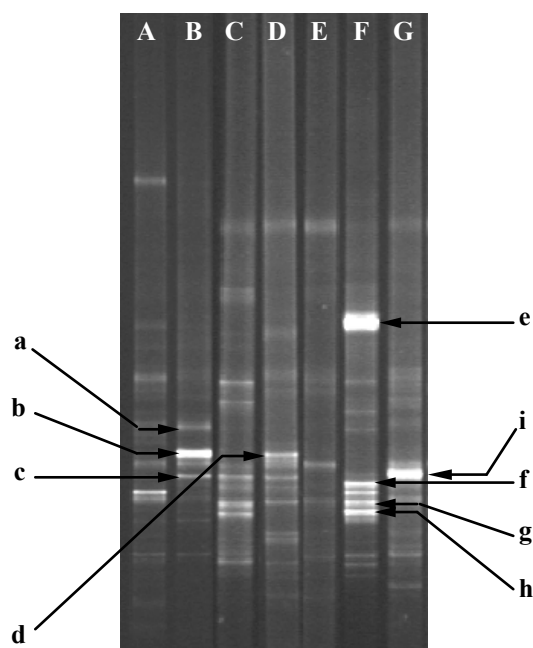


図-4 地下水培養後のDGGEプロファイル
DGGE profiles amplified 16S rDNA fragments after incubation of groundwater

- 2) 境界域の地下水には、非汚染域の約5倍の全菌数が存在しており、培養瓶中に加えられたBTXを速やかに分解した。したがって、境界域では汚染中心域からの汚染物質拡散を抑制する自然減衰ポテンシャルが大きいと考えられた。
- 3) 汚染中心域では好気条件下だけでなく、気条件下でもBTXを分解する微生物が存在した。しかしながら、これらの微生物によるBTXの分解能力は、非汚染域からの電子受容体や栄養塩（窒素およびリン）の供給に制限されていると推察された。
- 4) 培養後の地下水をPCR-DGGE法により解析した際に優占して出現する幾つかのDNA断片は、BTXの分解に関連性の高い微生物の近縁種であった。したがって、培養後の地下水試料をPCR-DGGE法によって解析することにより、汚染サイト内で自然減衰に貢献する微生物種を推定することが可能と考えられた。

謝辞

本調査に際してご協力をいただきました熊本市役所の皆様に深く感謝いたします。

表-2 DGGEプロファイルに出現したDNA断片の同定
Identities of DGGE bands in Figure 4 as determined by partial 16S rDNA sequencing

DNA Eband	Pylogenetic group	Closest 16S rDNA sequence	Identity (%)
a	β -proteobacteria	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	98
b	α -proteobacteria	<i>Sphingomonas</i> sp.	99
c	β -proteobacteria	<i>Leptothrix mobilis</i>	97
d	α -proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	100
e	ϵ -proteobacteria	Uncultured sp.	89
f	β -proteobacteria	<i>Azoarcus evansii</i>	100
g	Bacteria	Uncultured sp.	97
h	β -proteobacteria	<i>Nitrospira</i> sp.	97
i	Firmicutes	<i>Desulfotomaculum</i> sp.	99

本研究は経済産業省、新エネルギー・産業技術総合開発機構の実用化開発助成事業の一環として実施したものであり、本論文は2004年度ヨーロッパ環境バイオテクノロジー学会（ESEB）における講演内容の要約であることを付記する⁸⁾。

参考文献

- 1) Richmond, S.A., Lindstrom, J.E. & Braddock, J.F. 2001. Assessment of natural attenuation of chlorinated aliphatics and BTEX in subarctic groundwater. *Environ. Sci. Tech-nol.* 35:4038-4045.
- 2) Bhupathiraju, V.K., Krauter, P., Holman, H.N., Conrad, M.E., Daley, P.F., Templeton, A.S., Hunt, J.R., Hernandez, M. & Alvarez-Cohen, L. 2002. Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and aviation gasoline contaminated site. *Bioremediation* 13:79-90.
- 3) Kao, C.M. & Prosser, J. 2001. Evaluation of natural attenuation rate at a gasoline spill site. *J. Hazardous Materials*. B82 : 275-289.
- 4) Hobbie, J.E., Daley, R.J. & Jasper, S. 1977. Use of Nucle-pore filters for counting bacteria by fluorescence microcopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1225-1228.
- 5) Muyzer, G., S.Hottentraer, A.Teske and C.Wawer. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities, pp. 1-23. In : A.D.L.Akkermans, J.D.van Elsas & F.J.de Bruijn (eds.). *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 6) Kasai, Y., Kishira, H., Syutsubo, K. & Harayama, S. 2001. Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environ. Microbiol.* 3:1-10.
- 7) Roling W.F.M., Breukelen, B.M., Braster M., Lin B. & Verseveld, H.W. 2001. Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4619-4629.
- 8) Takahata, Y., Kasai, Y. & Watanabe, K. 2004 Assessment of chemical and microbiological signatures during natural attenuation of gasoline-contaminated groundwater. *Proceedings of European symposium on environmental biotechnology*, pp. 827-831, AA. Balkema Publishers.