石油系炭化水素を対象とした発光バクテリアを用いた 簡易土壌汚染評価手法の開発* – 抽出溶媒の選定および石油系炭化水素の毒性評価 –

杉 田 創¹ 駒 井 武²
西 脇 淳 子³ 川 辺 能 成⁴

Development of Simplified Soil Pollution Evaluation Method using Luminous Bacteria for Petroleum Hydrocarbons – Selection of Extraction Solvent and Toxicity Evaluation of Petroleum Hydrocarbons –

by Hajime SUGITA^{a*}, Takeshi KOMAI^a,
Junko NISHIWAKI^a and Yoshishige KAWABE^a

a. Institute for Geo-Resources and Environment, National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology, 16-1 Onogawa, Tsukuba, 305-8569, Japan
(*Corresponding author E-mail: hajime.sugita@aist.go.jp)

It is demanded more convenient survey methods for soil pollution by oils and techniques for toxicity evaluation of petroleum hydrocarbons. The quantitative bioassay using luminous bacteria has not been established. The accumulation of data obtained under scientific condition setting is required.

Firstly, methanol, ethanol and n-propanol which are both moderate hydrophilic and oleophilic, were examined whether they are adequate as the extraction solvent for soil polluted by oils. From the results in bioassay test using luminous bacteria, methanol was selected as the most suitable extraction solvent from them.

Secondly, the acute toxicity evaluation and the detection limit of gasoline, heating oil, light oil, benzene, toluene, n-hexane and carbon disulfide were experimentally examined. The severity of toxicity on luminous bacteria by each 100 vol% of them (without solvent) except n-hexane was carbon disulfide > toluene > gasoline > benzene > methanol > heating oil > light oil. Although the toxicities of 100 vol% of heating oil, light oil and n-hexane were weaker than that of methanol, the use of methanol as the solvent improved the detection sensitivity for them and was possible to detect the toxicity of them by luminous bacteria. The appropriate reaction time for toxicity evaluation or screening may be 15 to 45 minutes. The severity of toxicity on luminous bacteria evaluated using methanol solvent was gasoline > n-hexane > heating oil > toluene > carbon disulfide > benzene > light oil. Also, this study showed potential for quantitatively evaluating in the ranges of 0.02 to 1 vol% of gasoline and heating oil, 0.1 to 5 vol% of light oil and carbon disulfide, 0.2 to 5 vol% of benzene, 0.1 to 1.0 of toluene and 0.05 to 0.5 vol% of n-hexane in methanol solvent (extractant).

KEY WORDS: Soil Pollution, Luminous Bacteria, Petroleum Hydrocarbons, Toxicity Evaluation, Extraction Solvent, Alcohols

1. 緒 言

近年、ガソリン等石油系炭化水素による土壌汚染が顕在化している。石油系炭化水素（鉱油類）による土壌汚染に関しては、環境省から「油汚染対策ガイドライン」¹⁾が出されており、その中で全石油系炭化水素（TPH）試験方法として水素炎イオン化検出器

ガスクロマトグラフ（GC-FID法）、赤外分光分析法（IR法）、重量法（ノルマルヘキサン抽出法）が示されている。しかし、これらの分析法では、高額な分析装置及び比較的高度な分析技術、そして多くの時間が必要であり、また分析精度等についてもいくつかの問題点が指摘されている¹⁾。加えて、環境省が実施した土壌汚染による生態系・生活環境への影響調査²⁾にもあるように、石油系炭化水素の生態等への影響についても詳細な検討がなされているとはいえない。そのため、石油系炭化水素による土壌汚染については、より簡便な汚染調査・毒性評価手法の開発が求められている。

一方、汚染物質の毒性を総合的に判断する方法として、メダカやミジンコ等微小生物を使用したバイオアッセイが近年行なわれるようになってきた²⁻¹²⁾。これらのバイオアッセイでは、DNA解析等も行なわれ、慢性毒性や発ガンリスク等について評価・検討が行なわれている。また、急性毒性や汚染物質の簡易検出技術

*2010年2月19日受付 2010年9月28日受理 資源・素材学会平成20年度(2008年)春季大会において一部発表

1. 普通会员 工博(独)産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 主任研究員

2. 普通会员 工博(独)産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 副部門長

3. 農博 明治大学 研究・知財戦略機構 研究推進員

4. 普通会员 工博(独)産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 主任研究員

[著者連絡先] FAX: 029-861-8773 (産総研・杉田)

E-mail: hajime.sugita@aist.go.jp

キーワード: 土壌汚染, 発光バクテリア, 石油系炭化水素, 毒性評価, 抽出溶媒, アルコール

として、発光バクテリアを用いたバイオアッセイが注目されつつある¹³⁻²³⁾。これは代謝によって発光する特殊なバクテリアの性質を利用して、その発光強度の減少量あるいは減少速度によって汚染物質の毒性を検知・評価するものである。しかしながら、現在発光バクテリアによるバイオアッセイには定量的に評価を行なえる方法として確立したものはなく、科学的な方法と条件設定に基づいた詳細な研究データの蓄積が望まれているのが現状であり、特に土壌汚染を対象としたものは皆無と言ってよい。

土壌からの油類の抽出には、一般に二硫化炭素や *n*-ヘキサンが用いられているが、本研究では抽出液を検液としてバイオアッセイを行なうため、抽出溶媒には石油系炭化水素を汚染土壌から抽出するための親油性の他にバクテリアを含む塩水に溶解させるための溶媒としての親水性が必要であり、かつ抽出溶媒自体のバクテリアへの影響（毒性）が小さいことも重要である。それゆえ、二硫化炭素は親水性が低くそれ自体の毒性が極めて強く、*n*-ヘキサンはそれ自体が石油系炭化水素であり検出目的物質のひとつであることから、本研究では抽出溶媒として不適当であると判断した。そこで、適度な新油性と親水性を併せ持つ物質としてアルコール類の中から、メタノール、エタノール、*n*-プロパノールを抽出溶媒の候補とし選定し、その適性を試験することとした。

本研究では、石油系炭化水素の中でもガソリンスタンド等で広く販売・使用されているガソリン、灯油、軽油に加えて、ベンゼンやトルエン、さらに比較として *n*-ヘキサン及び二硫化炭素について、発光バクテリアを用いて急性毒性評価および検出限界等について実験的に検討を行なった。

2. 実験方法

2・1 発光バクテリア

本実験に用いた発光バクテリアの種類は *Aliivibrio fischeri* (旧名 *Vibrio fischeri*) であり、日立化成工業株式会社から提供を受けた。この発光バクテリアは 50 ml のプラスチック容器に約 1g (塩溶液を含む) が冷凍保存されたもので、NaCl 溶液 (約 0.4 mol/L) を再活性化溶液として所定量 (約 50 ml) 添加して解凍することにより、再活性化し発光する。

2・2 検液の調製

アルコール類については、メタノール (99.9%, Fisher Scientific), エタノール (99.5%, 和光), *n*-プロパノール (99.5%, 和光) をそれぞれイオン交換水で希釈し、所定の濃度 (1, 10, 25, 50, 75, 100 vol%) に調製した溶液を検液として準備した。ガソリン (レギュラーガソリン), 灯油, 軽油については、一般のガソリンスタンドで販売されているものをメタノールで希釈して所定の濃度に調製したものを検液として準備した。その他、試薬として購入したベンゼン (99.0%, 和光), トルエン (99.5%, 関東化学), *n*-ヘキサン, 二硫化炭素 (99.0%, 関東化学) をそれぞれメタノールで希釈して所定の濃度に調製したものを検液として準備した。なお、調製した濃度は、ガソリン、灯油及び *n*-ヘキサンについては、0.001, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 vol%, 他の石油系炭化水素については、0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 vol% とした。これらの濃度に設定した理由は、予備実験の結果から毒性評価に関するデータ解析を行なうのに必要あるいは適当な濃度と判断したためである。

2・3 測定方法

発光バクテリアの発光強度をルミノメーター (RT01, 日立化成工業株式会社) で測定した。ルミノメーター付属のプレートには 24 個のセルがあり、同時に 24 試料の測定が可能である。検液を添加しない場合、発光バクテリアの発光強度は、測定環境温度

に依存するが、室温 (20 ~ 25℃) では概ね再活性後約 30 分から 120 分程度安定して高い値を維持した。そこで、再活性後の発光バクテリア溶液をそれぞれのセルに所定量 (通常 2 ml) 取り、再活性後約 45 ~ 60 分後に発光強度を測定して、そのときの値を初期値とした。そして、それぞれのセルに検液を所定量 (通常 50 μ l) 添加し、直ちに発光強度を連続測定して経時変化を記録した。この測定開始時刻を反応開始時間と見なすこととする。なお、同一検液を 3 つのセルに添加し、その平均値をデータ解析に使用した。ただし、3 つの測定値の中で大きく逸脱した値があった場合には、その値を除外して、残りの 2 つの値の平均値をデータ解析に用いた。

また、本研究で対象とした石油系炭化水素は揮発性が比較的高いので、測定中の揮発の影響を確認するために、セルに検液を添加後、パラフィルム (PARAFILM®) を圧着させてプレート上面を覆い、個々のセルからの試験物質の揮発による影響を可能な限り小さくした測定方法と前述の措置を行なわない場合とで、発光強度の測定値にどの程度の違いが生じるかについても検討を行なった。

2・4 毒性の評価方法

ブランクとしてイオン交換水またはメタノールのみを加えたセルの発光バクテリアのある時間での発光強度 I_{Blank} をそのセルの発光強度の初期値 $I_{\text{Blank}0}$ で割った値 ($I_{\text{Blank}} / I_{\text{Blank}0}$) を基準として、検液を加えたセルの発光バクテリアのある時間での発光強度 I_X をそのセルの発光強度の初期値 I_{X0} で割った値 (I_X / I_{X0}) を相対評価することによって、その物質 X の毒性を評価する。つまり、下式で表される発光バクテリアの相対発光強度比 S [%] の値を毒性評価の指標とする。

$$S = (I_X / I_{X0}) / (I_{\text{Blank}} / I_{\text{Blank}0}) \times 100 \quad \cdots \cdots \cdots (1)$$

したがって、 S の値が低いほど発光バクテリアに対する毒性が高いことを意味する。

3. 実験結果および考察

3・1 抽出溶媒の選定

Fig. 1 (a) ~ (c) にメタノール、エタノール、*n*-プロパノールを検液とした試験結果をそれぞれ示す。なお、検体としたイオン交換水のみを加えたものをブランクとしてそれぞれの相対発光強度比 S [%] を求め、各同一条件で得られた 3 つの測定値の平均値を図中にプロットした。また、各条件で得られた S の平均値と最大値並びに最小値を基にして求めた最大測定誤差を Table 1 に示す。 S の測定誤差は全体的にアルコール濃度が高いほど高くなっているが、メタノール及びエタノールについては全濃度に渡って、*n*-プロパノールについても 50 vol% までは測定誤差はかなり小さく、良好な再現性と測定精度の高さを示している。しかしながら、*n*-プロパノールについては 75 vol% 及び 100 vol% での測定誤差が非常に大きくなっている。これは *n*-プロパノールの毒性の強さと親水性の低さが相互に寄与しているためと考えられる。

Fig. 1 に示されているように、全体的には、アルコール濃度が高いほど S は低く (つまり毒性は高く) なっているが、エタノール及び *n*-プロパノールについては、10 及び 25 vol% で S が 100 % を一時的に大きく超えている時間帯が認められる。この S の上昇分は Table 1 に示されている測定誤差よりもかなり大きいことから、少量のアルコールの添加は、発光バクテリアの活性を一時的に高める働きがあると考えられる。

比較しやすいように、10 vol% 及び 100 vol% のアルコールを検液とした実験結果を Fig. 2 (a) 及び (b) にそれぞれ示す。10 vol% の試験においては、エタノールと *n*-プロパノールで S が 100% を

Fig.1 Plot of relative luminescence intensity ratio against time for alcohols.
(a) Methanol, (b) Ethanol, (c) n-Propanol, Blank : 100 vol% water

Table 1 Maximum measurement error in relative luminescence intensity ratio.

Concentration [vol%]	Methanol [%]	Ethanol [%]	n-Propanol [%]
1	1.6	2.2	1.2
10	1.4	1.3	2.9
25	1.5	2.6	2.8
50	2.9	3.5	5.7
75	2.3	6.3	24.2
100	4.1	6.9	31.2

大きく超えている時間帯が存在するが、メタノールでは測定中の全時間帯 (2 時間) に渡って S はほぼ 100% 付近にあり、ブランクとほぼ同等の値を維持した。また、100 vol% の毒性の強さは、 n -プロパノール > エタノール > メタノールであることがわかる。

Table 2 に本研究で使ったアルコール類のオクタノール/水分分配比等物性データを示す。なお、オクタノール/水分分配比 ($\log P_{ow}$) 及び蒸気圧については、安全衛生情報センターの GHS モデル MSDS 情報²⁴⁾ 並びに独立行政法人 製品評価技術基盤機構、化学物質総合情報提供システム²⁵⁾ から引用した値を用いた (Table 3 についても同様である)。Table 1 のオクタノール/水分分配比 ($\log P_{ow}$) の値と Fig. 1 及び 2 から、 $\log P_{ow}$ が高いものほど発光バクテリアに及ぼす毒性が強いことがわかる。一般的にオクタノール/水分分配比が高いほど生態への毒性が強いと言われており、アルコール類について得られた本試験結果と合致する。

以上の結果から、メタノールは他のアルコール類と比較して発光バクテリアに与える影響が小さく、目的物質の検出を阻害しにくい物質であると考えられることから、本バイオアッセイを行な

Fig.2 Plot of relative luminescence intensity ratio against time for concentration of alcohols.
(a) 10 vol%, (b) 100 vol%, Blank : 100 vol% water

Table 2 Physical data on alcohols.

species	rational formula	carbon number	log Pow*	vapor pressure* [kPa (25°C)]
Methanol	CH ₃ OH	1	-0.74	16.8
Ethanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	2	-0.3	7.893
n-Propanol	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -OH	3	0.25	2.76

* The values are quoted the reference list number 24) and 25)

Fig.3 Plot of relative luminescence intensity ratio against time for toluene covered with or without Parafilm.

うための抽出溶媒としては、メタノールが最も優れていると判断した。また、メタノールの濃度が低いほど発光バクテリアへの影響が小さいことから、検出液の溶媒としては低濃度であるほど望ましいことになるが、現実的には土壌に付着した石油系炭化水素を抽出しなければならないため、本試験では 100 vol% のメタノールを抽出溶媒として選定し、以後の石油系炭化水素の毒性評価を行なうこととした。

3・2 発光強度測定時における石油系炭化水素の揮発の影響

石油系炭化水素の一例としてトルエンを用い、パラフィルム (PARAFILM®) を圧着させてプレート上面を覆ってセルからの揮発を防いだセルと、パラフィルムなしのセルでの発光バクテリアの相対発光強度比 S を比較した試験の結果を Fig. 3 に示す。なお、トルエン濃度 0.1 vol% 及び 1.0 vol% の検液はメタノールを溶媒としており、100 vol% はトルエン濃度 100% の試薬をそのまま検液として用いた。いずれの濃度についてもパラフィルムで覆ったセルの S の値が、パラフィルムで覆っていないセルの値よりもわず

Fig. 4 Plot of relative luminescence intensity ratio against time for 100 vol% of petroleum hydrocarbons.

Table 3 Physical data on petroleum hydrocarbons.

species	rational formula	carbon number	log Pow*	vapor pressure* [kPa (25°C)]
n-Hexane	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	6	4.11	20.4
Benzene	C_6H_6	6	2.13	12.7
Toluene	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	7	2.73	3.79
Carbon disulfide	CS_2	2	1.94	48.2
Gasoline	—	5~12	2~7	—
Heating oil	—	9~15	3.3~6	—
Light oil	—	11~24	3.9~6	—

* The values are quoted the reference list number 24) and 25)

かながら高くなっているが、0.1 vol% 及び 1.0 vol% は全時間に渡って、加えて 100 vol% の検液についても測定時間 60 分までは、測定誤差を考慮すると有意な差異とは認められない。しかしながら、濃度 100 vol% については測定時間が 75 分以上でパラフィルムの有無で S の値の差は時間の経過に伴い大きくなっており、トルエンの揮発による影響が生じている可能性がある。以上から、石油系炭化水素の濃度が低い場合には揮発の影響はほとんどないと考えられるが、濃度が高くなるにしたがって、揮発の影響が生じると推測されるため、石油系炭化水素の毒性評価を行なう試験では、検液をセルに添加後、速やかにパラフィルムを圧着させてプレート上面を覆ってから、発光強度の連続測定を行なうこととした。また、後述の軽油等でも同様の傾向が見られるが、Fig. 3 中のトルエン濃度 0.1 vol% のように、反応時間が進むにつれて、一旦低下した S が上昇するものがあった。これは発光強度の値自体が上昇したわけではなく、ブランクであるメタノールのみを検液として添加したセルの発光バクテリアの発光強度の減少率が、トルエン等を検液として加えたセルの発光強度の減少率をある時点から上回ったためである。

以上のことから、本バイオアッセイを適応する条件として、反応時間の設定が重要かつ必須であることがわかった。実際には抽出溶媒中の石油系炭化水素濃度が 100 vol% に近い高濃度になることは有り得ないので、Fig. 3 のデータプロットから毒性評価を行なう反応時間としては 15 分～45 分程度が適当であると判断した。そのため、測定時間は 60 分で十分と考えられるため、以後の石油系炭化水素の毒性試験では、ひとつの試験についての測定時間を 60 分間とした。

3・3 メタノール溶媒なしでの石油系炭化水素の毒性評価

メタノールで希釈していない各石油系炭化水素（つまり各濃度は約 100 vol%）を検液とした試験結果を Fig. 4 に示す。なお、メタノールを検体として発光バクテリアに加えたものをブランクとしてそれぞれの相対発光強度比 S [%] を求めた。n-ヘキサンを除いた全体的な毒性の強さは、二硫化炭素>トルエン>ガソリン>ベンゼン>メタノール>灯油>軽油の順である。n-ヘキサンの S は添加後上昇し、15 分以降では時間の経過とともに低下しているが、反応時間 60 分でもメタノールと同程度の毒性しか示さな

Fig. 5 Plot of relative ratio of luminescence intensity against time.
(a) Gasoline, (b) Heating oil, (c) Light oil, Blank : 100 vol% methanol

かった。

Table 3 に本研究で使用した石油系炭化水素等のオクタノール／水分配比や蒸気圧データを示す。オクタノール／水分配比 ($\log P_{ow}$) は、軽油、灯油>n-ヘキサン、ガソリン>トルエン、ベンゼン>二硫化炭素であるが、濃度 100 vol% の毒性は $\log P_{ow}$ が低いものほど高い傾向が見られ、アルコール類で得られた結果と全く逆の傾向を示した。この理由として、疎水性が高い物質ほど水溶液に溶解できないために、塩水中に存在している発光バクテリアに吸収されず影響を及ぼすことができなかったと考えられる。つまり、オクタノール／水分配係数 ($\log P_{ow}$) は、一般的には生態濃縮のしやすさの目安とされるが、急性毒性評価を行なう本バイオアッセイでは、発光バクテリアへの吸収されやすさ、水への溶解のしやすさが重要なファクターになると考えられる。そのため、 $\log P_{ow}$ が低い物質ほど毒性影響を及ぼしやすいと考えられる。なお、炭素数が 6 である鎖式飽和炭化水素である n-ヘキサンは比較的炭素数の低い炭化水素を多く含むガソリンに近い毒性値を示すと予想されたが、濃度 100 vol% の n-ヘキサンの毒性は、ガソリンよりもむしろ軽油や灯油に近い傾向を示した。

3・4 メタノール溶媒下での石油系炭化水素等の毒性評価

Fig. 5 (a) ~ (c) にガソリン、灯油、軽油をメタノールに溶解したものを検液とした試験結果を示す。ガソリンの毒性の強さは、試験されたほぼ全濃度範囲に渡って、ガソリンの濃度が高くなるにしたがって高くなる傾向を示している (Fig. 5 (a))。濃度 100 vol% ではメタノールよりも毒性は低かった灯油についても、1 vol% 以下の濃度の毒性はメタノールよりも高く、0.001 vol% 程度まで本バイオアッセイにより検出可能であり、また、その毒性の

Fig.6 Plot of relative luminescence intensity ratio against time.
(a) Benzene, (b) Toluene, (c) n-Hexane, (d) Carbon disulfide,
Blank : 100 vol% methanol

強さは濃度の高いほど高くなっている (Fig. 5 (b))。軽油についても灯油と同様に、濃度 100 vol% ではメタノールよりも毒性は低かったが、0.1 vol% ~ 5 vol% の濃度範囲での毒性はメタノールよりも高く (Fig. 5 (c))、本バイオアッセイにより検出可能である。しかしながら、軽油については反応時間が進むにつれて、一旦低下した S が上昇するものがあった。これは 3・2 章でも記載したように、それらの発光強度の値自体が上昇したわけではなく、ブランクであるメタノールのみを検液として添加したセルの発光バクテリアの発光強度の減少率が、軽油等を検液として加えたセルの発光強度の減少率をある時点から上回ったためであり、Fig. 5 のデータプロットからも毒性評価を行なう反応時間として 15 分 ~ 45 分程度が適当であると思われる。また、Fig. 5 (a), (b), (c) を比較すると、同じ濃度での毒性の強さは、ガソリン > 灯油 > 軽油の順となっており、全体的に炭素数が小さい炭化水素を多く含む軽油ほど発光バクテリアに及ぼす毒性が高くなっている。

Fig. 6 (a) ~ (d) にベンゼン、トルエン、n-ヘキサン、二硫化炭

素をメタノールに溶解したものを検液とした試験結果をそれぞれ示す。全体的な毒性の高さ (S の低さ) は、n-ヘキサン > トルエン > 二硫化炭素 > ベンゼンとなっている。Table 3 を見ると $\log P_{ow}$ は、n-ヘキサン > トルエン > ベンゼン > 二硫化炭素となっており、完全には一致していないが、 $\log P_{ow}$ が高いほど毒性が高い傾向が見られる。これは各濃度 100 vol% の試験結果とほぼ真逆である。この理由として、メタノールを溶媒にすることによって各石油系炭化水素が水性の溶液 (再活性化溶液) への溶解が容易になり、発光バクテリアにそれらが吸収されやすくなったことが考えられる。なお、Fig. 6 (c) に示されている 1 vol% 以下の濃度の n-ヘキサンの毒性挙動は、100 vol% の結果 (Fig. 4) とは異なり、Fig. 5 (a) に示されているガソリンの毒性挙動に類似した傾向を示している。

3・5 相対発光強度比-濃度相関式

続いて、本バイオアッセイによる石油系炭化水素の定量化について検討を行なった。抽出溶媒中の石油系炭化水素の濃度と発光バクテリアの相対発光強度比 S の減少量との間に相関関係は認められるが、単純な比例関係ではないことは、Fig. 5 及び 6 のデータからも明らかである。そこで、反応時間 30 分での相対発光強度比の値 $S_{t(30)}$ を石油系炭化水素の各濃度 C に対して片対数及び両対数プロットし、相関性を検討した。それぞれのプロットで良好な相関性が認められるならば、片対数プロットからは式 (2)、両対数プロットからは式 (3) で表される近似曲線が得られることになる。

$$S_{t(30)} = \alpha + \beta \log C \quad (2)$$

$$\log S_{t(30)} = \log \gamma + \varepsilon \log C \quad (3)$$

それぞれの近似曲線の相関係数 R が 0.99 程度になる範囲のデータを使用したプロットを Fig. 7 に示す。片対数プロット (Fig. 7 (a)) 及び両対数プロット (Fig. 7 (b)) とともに、ある程度の濃度範囲で良好な相関性が見出せた。Table 4 及び 5 にそれぞれに適用したデータの各石油系炭化水素の濃度範囲と、近似式 (2) 及び (3) から得られたパラメータ α , β , γ , ε の値及び相関係数 R を示す。

近似式に適用できた濃度範囲を考慮すると、ガソリンについて

Fig.7 Plot of relative luminescence intensity ratio at 30 minutes against concentration of petroleum hydrocarbons:(a) single logarithmic plot, (b) double logarithmic plot

Table 4 Data on parameters in equation (2) and calculated values of $C_{S(100)}$, $C_{S(90)}$, $C_{S(50)}$, $C_{S(15)}$

species	applied range [vol%]	$S_{t(30)} = \alpha + \beta \log C$			$C_{S(100)}$	$C_{S(90)}$	$C_{S(50)}$	$C_{S(15)}$
		α	β	R				
Gasoline	0.02~0.1	-49.40	-82.55	0.994	0.016	0.020	0.063	0.17
Heating oil	0.02~1.0	19.21	-36.03	0.991	0.006	0.011	0.14	1.31
Light oil	0.1~5.0	55.03	-37.63	0.995	0.064	0.12	1.36	11.6
Benzene	0.2~5.0	56.08	-61.05	0.990	0.19	0.28	1.26	4.71
Toluene	0.1~1.0	13.45	-78.90	0.999	0.08	0.11	0.34	0.96
n-Hexane	0.05~0.2	-50.18	-102.81	0.998	0.034	0.043	0.11	0.23
Carbon disulfide	0.1~5.0	48.48	-45.70	0.995	0.07	0.12	0.93	5.40

Table 5 Data on parameters in equation (3) and calculated values of $C_{S(100)}$, $C_{S(90)}$, $C_{S(50)}$, $C_{S(15)}$

species	applied range [vol%]	$\log S_{t(30)} = \log \gamma + \varepsilon \log C$			$C_{S(100)}$	$C_{S(90)}$	$C_{S(50)}$	$C_{S(15)}$
		γ	ε	R				
Gasoline	0.02~1.0	9.19	-0.58	0.990	0.017	0.020	0.055	0.43
Heating oil	0.02~1.0	23.31	-0.34	0.993	0.014	0.019	0.105	3.67
Light oil	0.5~5.0	54.56	-0.41	0.996	0.23	0.30	1.24	23.2
Benzene	0.5~5.0	52.17	-0.74	0.994	0.42	0.48	1.06	5.37
Toluene	0.2~1.0	15.89	-0.95	0.991	0.14	0.16	0.30	1.06
n-Hexane	0.05~0.5	7.53	-0.80	0.995	0.039	0.045	0.093	0.42
Carbon disulfide	0.5~5.0	46.27	-0.61	0.995	0.29	0.34	0.88	6.26

は式(2)よりも式(3)の方が相関性が高いが、灯油では式(2)と式(3)で相関性に大きな差異は認められず、軽油では式(3)よりも式(2)の方が相関性が高いと思われる。また、n-ヘキサンはガソリンと同様に式(2)よりも式(3)の方が相関性が高いが、他の物質(ベンゼン、トルエン、二硫化炭素)では式(3)よりも式(2)の方が相関性が高くなっている。

Fig. 7で示されているデータプロットの相関性は、 $S_{t(30)}$ の値が90%から15%程度の間で比較的良好なものが多かったことから、 $S_{t(30)}$ が90%及び15%になるメタノール溶媒中の各石油系炭化水素の濃度 $C_{S(90)}$ 及び $C_{S(15)}$ [vol%]の値をそれぞれの近似式から求め、Table 4及び5に載せた。また、 $S_{t(30)}$ の値が100%及び50%になるメタノール溶媒中の各石油系炭化水素の濃度 $C_{S(100)}$ 及び $C_{S(50)}$ [vol%]の値も併せて記載している。

本バイオアッセイで毒性評価を適用できる各石油系炭化水素の有効な濃度範囲は、本試験で測定したデータの中でそれぞれの近似式に適用できた濃度範囲または $C_{S(90)}$ から $C_{S(15)}$ の濃度範囲である。しかしながら、式(2)及び(3)から求められた軽油の $C_{S(15)}$ の値である11.6及び23.2 vol%は、本研究で試験したメタノール溶媒中の軽油の最大濃度である5.0 vol%よりも際立って大きい。加えて、試験溶液調製時の目視観察においても、軽油はメタノールに溶解しにくく、5 vol%を超えると分離し混合できなかった。これらのことから、軽油については $C_{S(15)}$ の値は適切な値ではないと判断し、本バイオアッセイを適用できる軽油の最大濃度は、5 vol%程度と結論した。

式(2)または(3)から求められる $C_{S(100)}$ は、仮想的なものではあるが、本バイオアッセイでの各石油系炭化水素の検出限界濃度の目安になる。 $C_{S(100)}$ を基準とした検出性の高さは、灯油>ガソリン>n-ヘキサン>二硫化炭素>トルエン>ベンゼン>軽油の順となる。また、 $C_{S(50)}$ を基準として、毒性の強さを比較すると、ガソリン>n-ヘキサン>灯油>トルエン>二硫化炭素>ベンゼン>軽油の順となる。急性毒性を評価する指標として、 EC_{50} (Median effect concentration)や LC_{50} (Median lethal concentration)が一般に使用されているが、本研究で提案した $C_{S(50)}$ もそれらに類似した指標となるものである。

3・6 土壌汚染評価への活用と今後の課題

調査対象となる現場において土壌を汚染している石油系炭化水素の種類がおおよそ推定されているとき、本バイオアッセイ手法

はオンサイトの迅速かつ簡便なスクリーニング手法として適用することが可能であると考えられる。さらに、汚染物質である石油系炭化水素の種類が同定されているならば、現場調査で得られた相対発光強度比の値とTable 4または5のパラメータの値を式(2)または(3)に代入することによって、汚染濃度の概算値をその場で知ることができ、現場での定期的なモニタリングを簡便に実施することも可能であると考えられる。

Table 4及び5に基づく本バイオアッセイにおける定量性を考慮した適用濃度範囲は、ガソリン及び灯油については、0.02~1 vol%、軽油については0.1~5 vol%、ベンゼンについては0.2~5 vol%、トルエンについては0.1~1.0 vol%、n-ヘキサンについては0.05~0.5 vol%、二硫化炭素については0.1~5 vol%程度である。抽出溶媒の回収率にも依存するが、抽出条件として土壌50 gに対してメタノール500 mlで抽出を行なうことを想定するなら、例えばガソリンの場合では、ガソリン

の比重を0.75 g/mlとすると検出・定量可能な土壌中のガソリン含有量は約1500~75000 mg/kg・土壌となる。ただし、本試験で得られたTable 4及び5の値自体は絶対的なものではなく、諸条件によって変動することが予想されるので参考値に止めるべきであり、現場調査に合わせて、本試験と類似した手法を用いて検量線を新たに作成するべきである。

今後は実際にメタノールを抽出溶媒として用いたときの汚染土壌からの石油系炭化水素の抽出率の検証や土壌から石油系炭化水素以外の不純物(重金属類など)の影響についても検討する必要がある。また、ガソリン等石油系炭化水素は多数の炭素数の異なる物質から構成されており、それらは個々に異なる毒性を持っていると考えられたため、個々の成分がどの程度の毒性を有しているかを検証しておく必要がある。

4. 結 言

本研究では、石油系炭化水素を対象として、生態への影響を調べるためのバイオアッセイ法のひとつである発光バクテリア(*Aliivibrio fischeri*)を用いた方法の適用条件を実験的に検討した。本研究で得られた主な研究成果を以下に示す。

(1) メタノール、エタノール、n-プロパノールの中で、発光バクテリアへの影響が最も小さいことから、本研究のバイオアッセイに最適な抽出溶媒としてメタノールを選出した。

(2) n-ヘキサンを除いた100 vol%の各物質が発光バクテリアに及ぼす毒性の強さは、二硫化炭素>トルエン>ガソリン>ベンゼン>メタノール>灯油>軽油であった。

(3) メタノールを溶媒として用いることによって、単独ではメタノールよりも毒性が弱かった灯油、軽油、n-ヘキサンについても、他の石油系炭化水素と同様に発光バクテリアによって毒性を検出することが可能となった。

(4) 毒性評価あるいはスクリーニングを行なうための反応時間は15~45分程度が適当であると思われる。

(5) 100 vol%及び1 vol%(アルコール溶媒中での濃度)以下ともに毒性の強さは、ガソリン>灯油>軽油となり、炭素数が小さい炭化水素を多く含む鉱油ほど発光バクテリアに及ぼす毒性が高くなった。

(6) アルコール溶媒中での毒性の強さは、n-ヘキサン>トルエン>二硫化炭素>ベンゼンとなった。これはメタノールを溶媒に

することによってオクタノール／水分配係数が高い物質であっても塩溶液への溶解が容易になり、発光バクテリアに吸収されやすくなったためと考えられる。

(7) 本研究で提案された $C_S(50)$ を基準とした毒性の強さは、ガソリン > n-ヘキサン > 灯油 > トルエン > 二硫化炭素 > ベンゼン > 軽油の順となる。

(8) 概算的ではあるが、ガソリン及び灯油については、0.02 ~ 1 vol%，軽油及び二硫化炭素については 0.1 ~ 5 vol%，ベンゼンについては 0.2 ~ 5 vol%，トルエンについては 0.1 ~ 1.0 vol%，n-ヘキサンについては 0.05 ~ 0.5 vol% 程度の濃度範囲で定量評価できる可能性を示した。

以上のことから、石油系炭化水素汚染土壌の調査及び評価に発光バクテリア (*Aliivibrio fischeri*) によるバイオアッセイが適用可能であることを示すことができた。

謝辞 本研究にあたり、試料のご提供および適切なご助言をいただきました日立化成工業株式会社の皆様には、たいへんお世話になりました。ここに感謝の意を表します。

記 号 表

C	: メタノール溶媒中の石油系炭化水素の濃度 [vol%]
$C_S(X)$	: 式 (2) あるいは (3) において、 $S_t(30)$ が X% になるメタノール溶媒中の石油系炭化水素の濃度 [vol%]
I_{Blank}	: ブランクセルの発光強度
I_{Blank0}	: ブランクセルの発光強度の初期値
I_X	: 物質 X を添加したセルの発光強度
I_{X0}	: 物質 X を添加したセルの発光強度の初期値
P_{ow}	: オクタノール／水比
S	: 相対発光強度比 [%]
$S_t(30)$	: 反応時間 30 分での相対発光強度比 [%]
α, β	: 式 (2) のパラメータ
γ, ε	: 式 (3) のパラメータ

References

- 1) Ministry of the Environment, Government of Japan, Abura-Osen-Taisaku-Guideline, (2006) .
- 2) Geo-environment Protection Center, Heisei-20-Nenndo-Dojyo-Osenn-niyoru-Seitaikai-Seikatsu-Kankyo-eno-Eikyoo-oyobi-Abura-Osenn-niyoru-Dojyo-Osennntou-Chyousa-Gyoumu-Houkokusyo, (2009) .
- 3) Report of Special Research from the National Institute Environmental Studies, Japan, (1995), SR-19-95.
- 4) Report of Special Research from the National Institute Environmental Studies, Japan, (1999), SR-29-99.
- 5) K. Ichikawa, Y. Chung and H. Utsumi: Journal of Japan Society on Water Environment, **20** (1997), 701-704.
- 6) M. Suzuki, B. Kim, J. Sohn, Y. Sakai and A. Sakoda: SEISAN, **50** (1998), 131-134.
- 7) H. Nagashima, T. Fujiwara and Manabu Kunihiro: Journal of Japan Society on Water Environment, **24** (2001), 110-114.
- 8) B. Kim, Y. Sakai and A. Sakoda: SEISANKENKYU, **54** (2002), 55-61.
- 9) R. Shoji, Y. Sakai, A. Sakoda, M. Yamada, S. Mori, A. Yasuhara and Y. Inoue: Journal of Japan Society on Water Environment, **26** (2003), 643-648.
- 10) K. Osaki, S. Kashiwada, S. Mohri, M. Yamada, N. Tatarazako, A. Yasuhara and Y. Ono: Journal of Japan Society on Water Environment, **26** (2003), 751-756.
- 11) R. Shyoji, A. Sakoda, Y. Sakai, H. Utsumi and M. Suzuki: Journal of Japan Society on Water Environment, **23** (2000), 487-494.
- 12) R. Shyoji, Y. Sakai, A. Sakoda, M. Suzuki: SEISANKENKYU, **52** (2000), 89-95.
- 13) Report of Special Research from the National Institute Environmental Studies, Japan, (1998), SR-25-98.
- 14) Report of Special Research from the National Institute Environmental Studies, Japan, (2001), SR-41-2001.
- 15) Report of Special Research from the National Institute Environmental Studies, Japan, (2006), SR-76-2006.
- 16) M. Yamakawa, H. Mizutani, M. Maeda, S. Hayakawa, T. Ito, M. Takakuwa and S. Nakaya: Research Paper of Mie Prefecture Health and Environment Research Institute, **18** (1998), 9-16.
- 17) S. Kitahashi: Annual report of Waste Research and Information Center of Chiba Prefecture, **4** (1997), 99-103.
- 18) S. Kitahashi: Annual report of Waste Research and Information Center of Chiba Prefecture, **6** (1999), 61-64.
- 19) T. Sasajima, K. Kawasaki, T. Mori, T. Kusui, M. Saeki and T. Hashimoto: Annual report of Toyama Prefecture Environmental Science Research Center, **33** (2005), 49-58.
- 20) T. Sasajima, K. Kawasaki, T. Mori, T. Kusui, M. Saeki and T. Hashimoto: Annual report of Toyama Prefecture Environmental Science Research Center, **34** (2006), 114-119.
- 21) Y. Arakawa, M. Nonomura, K. Kurita and H. Sugimori: Bulletin of Tokyo Metropolitan Industrial Technology Research Institute, **2** (2007), 110-111.
- 22) Y. Arakawa, M. Nonomura, K. Kurita and H. Sugimori: Research Paper of Tokyo Metropolitan Industrial, **2** (2007), 110-111.
- 23) K.E.Gustavson, S.A.Sonsthagen, R.A.Crunkilton and J.M.Harkin: Environmental Toxicology, **15** (2000), 421-430.
- 24) GHS model MSDS information, Japan Advanced Information Center of Safety and Health. <http://www.jaish.gr.jp/index.html>, (2009)
- 25) Chemical Risk Information Platform, National Institute of Technology and Evaluation. <http://www.safe.nite.go.jp/japan/db.html>, (2009)