

微生物群による流出原油や有機物の分解処理に関する研究

宗景志浩*・服部進**・岩崎望***
蒲生啓司****・山崎堯右*****

1. はじめに

ロシア船籍タンカー「ナホトカ号」の転覆事故に伴う C 重油の流出は日本海沿岸を広く汚染し、生態系に大きな被害を与えた。油処理のため、一部で外国製の微生物製剤や油分散剤が使用されただけで、大部分の流出油は”柄杓”を使った原始的な方法で回収された。微生物製剤や分散剤は生態系の二次的な汚染をもたらす可能性もある(鈴木ら, 1999) ことから、使用に当たっては慎重にならざるを得ないが、もともと自然界におけるバイオリメディエーション能力は大きいはずである。日本海沿岸でも、自然界に存在する炭化水素分解菌による流出重油の分解がみられ、意外に早く浄化されたようである。板垣・石田 (1998), 板垣 (1998) は、沿岸に流れ着いた油塊から炭化水素分解能力のある微生物の単分離に成功しているし、世界的にも多くの炭化水素分解菌の存在することが報告されている(清水, 1978; 後藤ら, 1996)。

本研究では、自然界から収集した微生物群を用いて C 重油、流出重油及び有機物の分解能力を調べた。本菌群は、自然界由来の多種微生物を継代培養している間に徐々に低温下でも強力な有機物分解能、炭化水素分解能、農薬分解能などを獲得したものである。

2. 方 法

(1) 有機物分解実験

予備実験として糠、おから、グルコース、サラダ油などの有機物分解能を調べた。いずれも試料に滅菌水と菌液を加え、栄養塩(硝酸アンモニウム、リン酸カリウム、クエン酸鉄)及び pH を調整した。また、静置培養、振とう培養も行った。ここでは表-1 に示すグルコースとサラダ油の分解実験例を紹介する。これら有機物の菌による分解能を濁度を指標として測定し、市販の EM 菌のそれとも比較した。さらに、グルコース分解産物を高速液体クロマトグラフを用いて定量した。

表-1 有機物分解実験条件 (培養温度=25°C)

実験番号	SR 1	G 3	G 4	G 6	G 7
サラダ油 (g)	20	—	—	—	—
グルコース (g)	—	20	20	20	20
滅菌水 (cc)	200	200	200	100	100
硝酸アンモニウム (cc) *1)	0	0	0	2	2
リン酸カリウム (cc) *2)	2	2	2	2	2
クエン酸鉄 (cc) *3)	2	2	2	2	1

G 3 は試料の滅菌あり, G 7 は S 菌でのみ実験

*1) 硝酸アンモニウム 20 g+100 cc 蒸留水

*2) リン酸カリウム 2 g+100 cc 蒸留水

*3) クエン酸鉄 1 mg+100 cc 蒸留水

(2) 重油分解実験

表-2 には重油分解の実験条件を示した。実験に用いた C 重油は揮発成分が気化して粘度の高い水飴状を呈していた。流出重油はさらに硬化していた。実験-1 では、この状態の重油をそのまま、実験-2 では、テトラデカン (重油の 3~4 倍量) で、実験-3 では灯油 (重油の 2 倍量) で薄めて使った。重油添加量は Sugiura et al. (1997) の添加量 (4-5g/l) に比べ、実験-1 で 1.3 倍、実験 2 及び 3 では溶媒も含めて、それぞれ 5 倍、4 倍である。

実験-2 と 3 では、蒸留水及び海水 (深層水) に栄養塩を添加した液体培地に本菌群を移植した。これを 2 日間培養した後、テトラデカンや灯油で薄めた C 重油及びナホトカ号流出重油を添加し、25°C 恒温下で培養した。実験-1 は曝気培養し、実験-2 及び 3 は振とう培養した。

顕微鏡観察による菌の増殖と pH 及び培地の変化を確かめながら、定期的に均一に混合した培地から 5 cc を採取した。これを n-ヘキサンを用いて分液した後、重油成分をガスクロマトグラフ質量分析計 (Perkin-Elmer 社製 TurboMass) を用いて定量した。

(3) 重油粘度

C 重油の粘度は、重油層を落下する平均速度 (V) を測定することによって算定できる。鉄球の重量と直径 (D) 及び重油密度から鉄球の抗力係数 C_D を計算する。一方、球の抗力係数 C_D とレイノルズ数 ($Re = VD/\nu$) との既存

* 正会員 農博 高知大学教授 農学部生産環境工学科
.. (有)マックスユニティー
... 農博 高知大学助教授 海洋生物教育研究センター
.... 理博 高知大学助教授 教育学部化学科
..... 工博 高知大学名誉教授 Y のデザイン研究所

表-2 重油分解実験条件

実験区分	実験-1			実験-2				実験-3			
実験番号	O4S	O4SS	O4ST	E21	E22	E23	E24				
深層水(cc)	30	50	—	100	100	—	—				
蒸留水(cc)	—	—	25	—	—	100	100				
糖添加量(cc)	0.1	10	25	5	5	5	5				
硝酸アンモニウム(mg)	—	50	50	100	100	100	100				
リン酸カリウム(mg)	—	5	5	10	10	10	10				
クエン酸鉄(mg)	—	1	1	2	2	2	2				
溶媒(cc)	—	テトラデカン1cc			灯油1.33cc						
C重油(cc)	0.2	0.25	0.25	—	—	0.66	—				
ナホトカ号流出油(cc)	—	—	—	—	0.66	—	0.66				
培養条件	曝気			振とう							

解特性が良い。G 6には硝酸アンモニウムを加え、G 3及びG 4には加えていない。また、G 3はグルコース試料を滅菌している。実験開始後12日目に硝酸アンモニウムを添加したG 4、7日目にpHを調整したG 3では、直後に急激な濁度の上昇がみられる。これらの実験から、窒素分を含まないグルコース試料ではアンモニアを要求し、かつpHを調整してやることにより分解が進むことが分かる。

図-2は、振とう培養(G 7)と静置培養(G 6)による差をみたもので、前者はクエン

酸鉄の添加量が後者の半分であるにもかかわらず、振とうすることにより飛躍的に増殖が進む。

図-3は、グルコース(G 6)及びサラダ油(SR 1)を試料として市販のEM菌と本菌(S菌)の分解能を比較したものである。いずれの試料でも、好気条件下では本菌の分解能が高い。特にサラダ油には硝酸アンモニウムを加えていないにもかかわらず、本菌の分解能が優れている。

図-4には、本菌を用いたグルコース分解産物の濃度変化をpHの推移と共に示した。実験開始後2日目にはマロン酸や酢酸などの有機酸が定量された。しかし、これらはpHが急低下するに伴って減少し、代わってクエン酸が急増している。これは、クエン酸利用能を有する本菌の活動が低下したことによる。pHを調整することにより、クエン酸が減少しマロン酸、酢酸が再び増加した。

4. 重油の分解特性

(1) C重油分解実験結果

C重油分解の予備実験で、蒸留水に糖を大量に添加し

の関係から、鉄球の抗力係数に対応したレイノルズ数を求め、動粘度(ν)を得る。このようにして求めたC重油の動粘度は、20℃で0.2m²/s、25℃で0.1m²/s程度で、これはタービンオイルの約500倍であった。

(4) 炭化水素分解菌の単分離培養

微生物群の中から、炭化水素分解能力を有する菌を単分離するために、シャーレにマッコニー培地や寒天培地を作成して菌群を移植した。シャーレの中の特徴あるコロニーから釣菌して新たな培地に移植した。これらの釣菌培養を数回繰り返すことによって3種類の菌の単分離が成功したので、さらに菌の生理的検査を行った。

今回のC重油分解実験は概ね好気的条件下での実験といえるが、連続培養下では炭酸ガスが発生して嫌気条件下に移行していた。そこで、API 20細菌検査キットを用いた生理的試験を行った。

3. 有機物の分解特性

図-1は栄養塩を変えたグルコース試料の分解特性を濁度で比較したものである。試料G 4、G 3、G 6の順に分

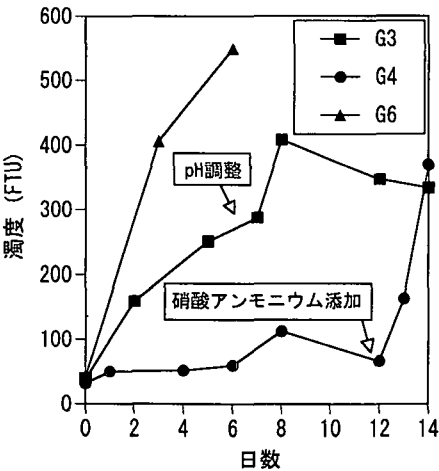


図-1 グルコース分解特性 (栄養塩添加効果)

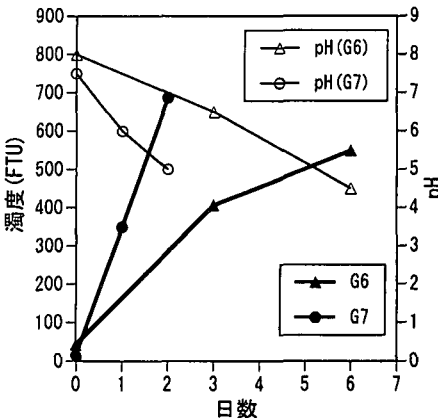


図-2 グルコース分解特性 (振とう効果)

たり、全く添加しなかった培地では分解が進まなかった。前者では炭化水素より糖をよく吸収し、後者では浸透圧の関係で蒸留水の中では菌が増殖できなかったためであろう。また、粘度の高いC重油を薄めることなく、かつ大量に(培地の量と等量)添加した場合にも分解しなかったり、分解が始まっても極めて緩慢であったりした。

そこで、Sugiura et al. (1997) の報告を参考にして、実験-1では、深層水 30 cc に糖培地に保存していた原菌

を 0.1 cc 加え、さらに、C 重油 0.2 cc (6.7 cc/l) を添加した。その結果、やや高めの栄養塩と塩分を含む深層水の中でも菌は生存可能となり、糖を加えなかったためか、エネルギー源として炭化水素を利用したものと思われる。実験経過を表-3 に示した。実験開始後 2 日目には $0.5 \times 1 \mu\text{m}$ 程度の微小な菌が増殖し、活発に運動していた。しかし、4 日目には運動性のない $2 \times 4 \mu\text{m}$ 程度の短桿菌(S 菌)が増殖しており、添加した重油塊が縮小していた。5 日後には S 菌がさらに増殖し、6 日後には重油塊は完全に消失した。この間、pH は 5~6 を維持していた。海水を基本培地としているため、糖培地のように急激に低下することはなかった。

表-3 C 重油分解実験-1 の経過

日付	経過	pH
実験開始日	深層水 30 cc に原菌液 0.1 cc を移植, C 重油 0.2 cc 添加, 曝気開始	7
2 日後	微小菌増殖, 活発に運動	5
4 日後	S 菌増殖, 油球僅かになる	6.5
5 日後	S 菌さらに増殖	5.5
6 日後	重油は完全に消失し, 茶褐色化	6

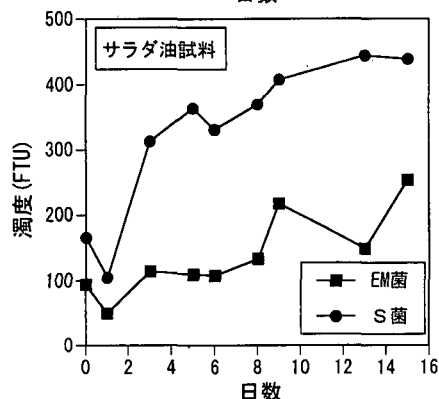
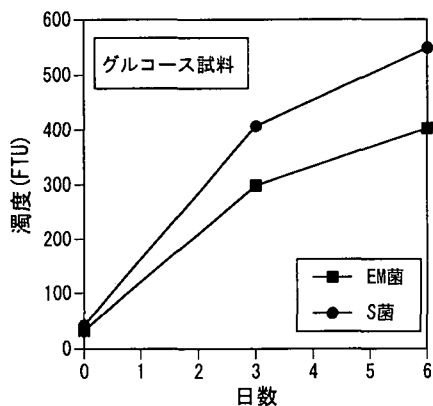


図-3 有機物分解能の比較

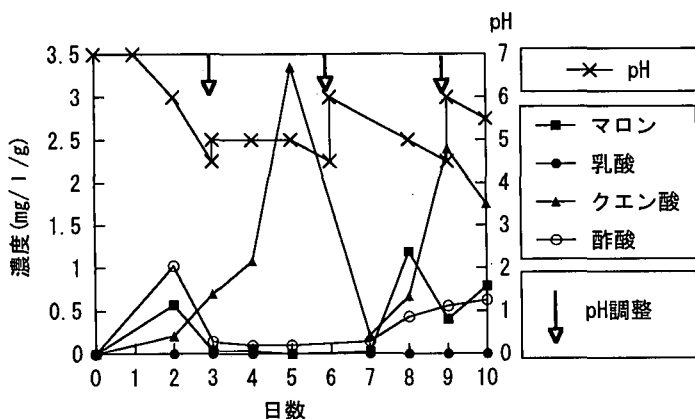


図-4 グルコース分解産物濃度 (単位試料当たり)

実験-2では、溶媒を含めた炭化水素の添加量はいくつもの多いが、培地に糖と栄養塩を添加したため、実験開始後 2 日目にはいずれの培地でも菌が大増殖した。3 日目には炭化水素の分解がかなり進み、糖添加蒸留水培地 O4ST は 4 日目に、糖添加海水培地の O4SS も 7 日目には油球が消失して茶褐色に変色し、分解がほぼ完了したことを確認した。

実験開始直後で表面に多くの重油が残っている場合は、培地の中から均一にサンプルすることが困難であるため、ある程度分解が進んだ段階から炭化水素成分を調べた。

図-5 は C 重油と分解後のサンプルのガスクロマトグラムの例である。7.68-7.69 分付近のピークは分析時に標準物質として添加したプリスタンである。C 重油では 5 分から 11 分付近のリテンションタイムの間に、炭素鎖で C_{11} から C_{24} のピークが規則正しく現れ、分解後のサンプルではピーク高さと面積が減少した。これらの面積比率から炭化水素残留率を求めた。

実験-2 及び実験-3 の炭化水素残留率を図-6, 7 に示した。図-6 では、単位培地当たりの溶媒を含む炭化水素添加量は最も多いにもかかわらず、8 日目には残留率は僅か数%にまで減少していた。

図-7 (上図) は実験開始後の pH と菌

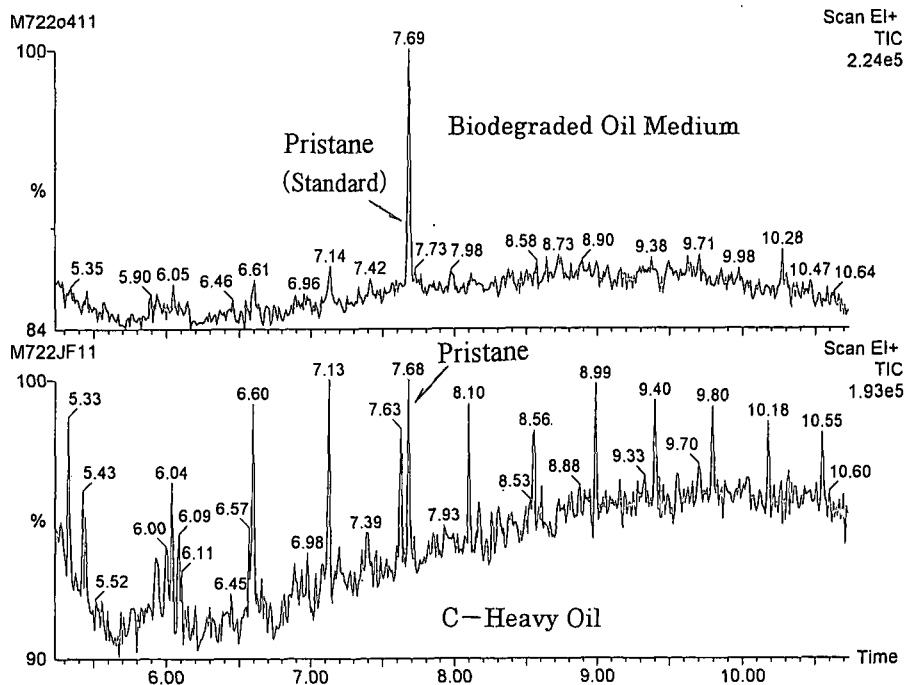


図-5 ガスクロマトグラム (下: C重油, 上: 分解液)

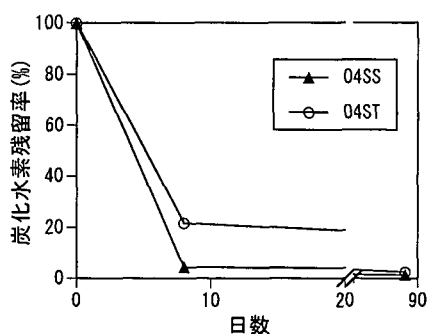


図-6 重油分解実験結果 (実験-2)

の細胞数(相対値)の推移を示したものである。細胞数は菌の顕微鏡写真から菌数を直接読みとったもので、絶対値ではないが菌の増減を知ることができた。下図は実験開始後9日目からの炭化水素成分の残留率を示している。菌は移植後急激に増加するが、3日目からpHが下がり始め6日目にはpH=2となっている。同時に相対菌数も激減して増殖初期の値にまで近づいたため、リン酸二水素カリウムを加えてpHを6~7まで上昇させた。これにより、菌数は再び上昇し始めたが、実験開始後12日目以降、菌数もpHもほぼ一定となった。しかし、菌数は最大菌数を示した4日目値までは増加しなかった。

炭化水素残留率は9日目に糖添加海水培地で20%、糖

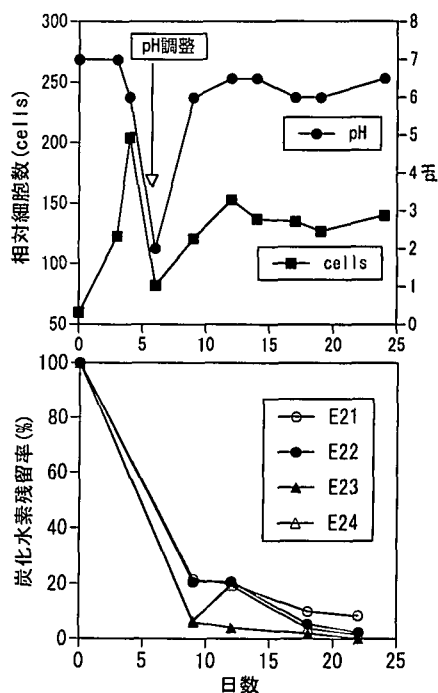


図-7 重油分解実験結果 (実験-3)

添加蒸留水培地で6%程度となり、これ以降も徐々に減少し続け20日後には炭化水素成分はほとんど消失した。菌数が開始直後ほどに増加しなかった理由としてエネルギー

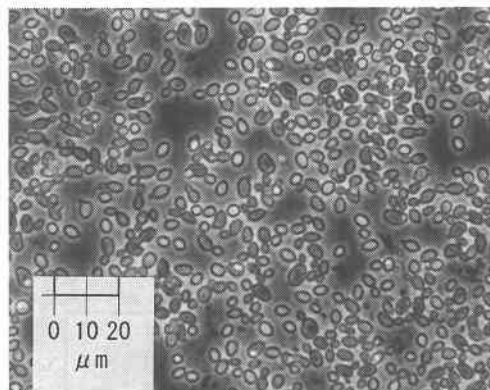


写真-1 重油分解菌顕微鏡写真

ギー源としての炭化水素が減少したことが考えられる。pH が低下し始めた 3 日目から pH を調整しておれば分解がさらに促進されると考えられた。また、分解速度は蒸留水培地に比べ海水培地がやや劣る程度で大きな違いはみられなかった。

(2) 炭化水素分解菌の生理検査

本実験で用いた微生物群の中には数種類の優勢な細菌が含まれていたが、予備実験を繰り返す中で C 重油の分解に関与している菌群の単分離化を進め、さらに、分離菌について API 20 細菌検査キットを用いた細菌の生理検査を行った。

写真-1 は単分離した炭化水素分解菌の顕微鏡写真である。炭化水素分解菌 (S 菌) は、大きさが $2 \times 4 \mu\text{m}$ 程度の短桿菌で、グラム陽性、非運動性を示した。

API 20 による検査結果を表-4 に示した。これによると、S 菌にはクエン酸利用性、アセトイン産生、白糖分解能などが特に高いことが分かった。特に糖分解性は嫌気条件下では発酵性を示した。しかし、本検査キットでは菌の同定には至らなかった。

5. 結 論

自然界から収集した微生物群を用いて C 重油や流出重油に含まれる炭化水素と有機物の分解能力を調べ、以下の結果を得た。

(1) 本微生物群は、海水や蒸留水中でも糖、硝酸アンモニウム、リン酸カリウム、クエン酸鉄などを加えることによって活発に増殖したが、増殖率は pH に大きく左右された。

(2) グルコース分解産物としてマロン酸、酢酸などの有機酸が生産された。クエン酸利用性を有するため、pH が低下して活動が弱まるとクエン酸が増加した。

表-4 生化学検査結果 (S 菌)

反応/(酵素)	32 時間後
(β -ガラクトシダーゼ)	—
アルギニンジヒドラーゼ	—
(リジンデカルボキシラーゼ)	—
(オルニチンデカルボキシラーゼ)	—
クエン酸利用性	++
硫化水素産生	—
(ウレアーゼ)	—
(トリプトファンデアミナーゼ)	—
インドール産生	—
アセトイン産生	+
(ゼラチナーゼ)	—
ブドウ糖分解	++
D-マンニトール分解	++
イノシット分解	+
D-ソルビトール分解	+
L-ラムノース分解	+
白糖分解	++++
D-メルビオース分解	+
D-アミグダリン分解	++
L-アラビノース分解	+

(+; 陽性, —; 陰性)

(3) 液体培地に高粘度の C 重油や流出重油を大量に添加した場合は分解に時間を要したが、テトラデカンや灯油で薄めて粘度を下げた場合は容易に分解され、いずれも茶褐色に変色した。分解速度は pH や栄養塩(特に窒素)添加量に影響を受ける。

(4) 単位培地当たりの重油分解能力は、既報研究結果よりかなり高い。

(5) 単分離できた炭化水素分解菌は、クエン酸利用性、アセトイン産生、白糖分解能などが特に強いことが分かった。特に糖分解性は嫌気条件下では発酵性を示した。

(6) 本微生物群は有機物及び炭化水素の強力な分解能を有しており、利用の可能性のあることが分かった。

参 考 文 献

- 板垣英治, 石田 啓 (1998): ナホトカ号重油漂着と重油分解細菌による生物浄化, 海岸工学論文集, 第 45 巻, pp. 951-955.
- 板垣英治 (1998): 「ナホトカ」号重油流出による環境汚染と生物浄化—重油炭化水素分解細菌の検出と分離—, 日本海域研究所報告, 第 29 号, pp. 1-12.
- 後藤雅史, 原山重明 (1996): 生物機能による環境修復—海城の石油系物質に対するバイオリメディエーション—, 恒星社厚生閣, pp. 35-49.
- 清水 潮 (1978): 微生物の生態 5—海洋の石油汚染と微生物—, 学会出版センター, pp. 197-213.
- 鈴木満平, 栗原真野 (1999): 珪藻の増殖に影響を及ぼす流出油用バイオリメディエーション栄養剤「イニポール」の濃度について, Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., No. 28, pp. 1-4.
- Sugiura, K., M. Ishihara, T. Shimauchi, and S. Harayama (1997): Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil, Environ. Sci. Technol. 31, pp. 45-51.