

## II - 684

### 海水中の原油の微生物分解

大阪大学大学院 学生員 仲宗根琢磨  
大阪大学工学部 正員 古川憲治  
大阪大学工学部 正員 藤田正憲

#### 1.はじめに

現在、世界各地で多発する海洋の原油流出事故の対処法として、汚染原油の自然浄化過程において重要な役割を担っている微生物による原油分解を組み入れた生物学的な原油除去方法の開発に大きな期待が寄せられている。本研究では、海洋での原油汚染の生物学的浄化方法の確立を最終目標として、大阪市大正港の海水から海水性原油分解菌を集積培養、純粋分離し、その海水性原油分解菌による原油分解特性、原油分解に及ぼす環境因子の影響を検討した。

#### 2.実験材料並びに方法

##### (1) 植種源

工場や船舶から漏出または排出されたマシンオイル、重油などを含めた油によって汚染を受けていると考えられる大阪市大正港の表層水を採取し、植種源とした。

##### (2) 原油分解菌の集積培養並びに純粋分離

大正港で採取した海水10mlと表-1に示すクロシン培地100mlを300ml容の三角フラスコに加え、28℃、120rpmで回転振盪培養した。顕微鏡観察により微生物の増殖を確認した後、その培養液10mlを表-1のクロシン培地100mlに加え、300ml容の三角フラスコ中で、28℃、120rpmで再び回転振盪培養した。この操作を数回繰り返すことによって、海水性原油分解菌を集積分離した。また、表-1のクロシン培地や表-2の原油培地の液体培地と寒天培地に植え継ぐことにより、海水性原油分解菌を分離した。

##### (3) 原油分解率

300ml容の三角フラスコに表-2に示す原油培地100mlを投入し、集積培養液、または分離株を5%植菌した後、回転振盪培養（28℃、120rpm）を行った。所定時間後に、残存原油をペンタンとベンゼンの混合液（ペンタン：ベンゼン＝4：1）で抽出して全残存原油量を測定し、原油分解率を求めた。

##### (4) 原油成分の分離

カラムクロマトグラフィーにより原油の成分別分離を行った。カラムは内径20cm、長さ16cmのガラス管に約200メッシュの活性アルミナを充填容積40mlとしたものである。充填に際しては空のカラムに40mlのヘキサンを満たしてから活性アルミナを少量ずつクラックを生じないように振動を与えつつ充填した。ヘキサンを充填層の上面に来るようにした後、ヘキサン・ベンゼンで抽出した全残存原油を少量のヘキサンで溶解し、カラム頂に供給した。しかるのちヘキサンをカラム頂が常にヘキサンで浸るように少しずつ全部で200ml供給し、展開した。ヘキサンを流出させた後、同一方法でベンゼン、次いでメタノールで展開した。ヘキサン溶解分（飽和分）、ベンゼン溶解分（芳香族分）、メタノール溶解分（アスファルテン分）を残存原油から分離した後、各溶解分より溶媒を揮発させ、各分画分を重量法で定量した。カラム残留分は全残存原油量からそれぞれの画分量を引くことにより算出した。

#### 3.結果及び考察

##### (1) 原油分解菌の集積並びに純粋分離

大正港から採取した海水を表-1のクロシン培地に加え集積培養を行い、得られた集積培養液を集積菌（大正港）とした。また、表-1のクロシン培地や表-2の原油培地を用いて、海水性原油分解菌を分離した。さらに、この海水性原油分解菌を細菌同定キット「アビ20NE」（FRANCE BIO MERIEUX S.A.）を用いて同定した結果、分離株は *Pseudomonas aeruginosa* であることが分かった。

##### (2) 原油分解に及ぼす環境因子の影響

pH、塩濃度、栄養塩濃度、酵母エキス濃度、及び窒素源の5つの環境因子を変化させた原油培地に集積菌（大正港）、分離株を植菌し、回転振盪培養（28℃、120rpm）を行い、環境因子の影響を検討したところ、次の結果が得られた。

純粋菌は窒素要求性が厳密であり、また集積菌（大正港）と比較すると2倍の濃度の栄養塩が必要であることが

表-1 クロシン培地の組成

|                                  |                     |
|----------------------------------|---------------------|
| Haleの人工海水                        | 900ml(1)を900mlに濃縮)  |
| KNO <sub>3</sub>                 | 361.0mg(T-N=50mg/l) |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 45.84mg(T-P=10mg/l) |
| オイルエマルジョン*                       | 100ml               |

注) 1NのNaOHによりpH7.8に調整

\*オイルエマルジョンは、クロシン10ml、Tween80（乳化剤）0.05g、イオン交換水90mlの合計100mlの混合液を超音波発振器で10分間超音波処理することにより乳化させた。

表-2 原油培地の組成

|                                  |                   |
|----------------------------------|-------------------|
| Haleの人工海水                        | 100ml             |
| KNO <sub>3</sub>                 | 36mg(T-N=50mg/l)  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 4.6mg(T-P=10mg/l) |
| 酵母エキス                            | 100μg             |
| アラビアンライト原油                       | 100mg             |

注) 1NのNaOHによりpH7.8に調整

分かった。酵母エキスの添加効果は、純粋菌の場合でも集積菌(大正港)の場合でも見られた。また、原油分解菌は低pHの海域では通常の海域と同様に分解能を発揮できるが、淡水や高濃度海域では著しく分解能が低くなることが分かった。

(3) 集積菌並びに分離株による原油分解特性

集積菌(大正港)はこれまでの知見と同様に飽和分を最もよく分解し、次いで、芳香族分がやや遅れて分解された。しかし、アスファルテン分とカラム残留分はほとんど分解されなかった。分解は実験開始後、7~10日間ほどでその大部分が停止した。分離株は集積菌に比べて飽和分と芳香族分をあまり分解しておらず、全体的に分解率は悪い結果となった。しかし、カラム残留分を比較的分解しているようなので今後の研究が必要である。

#### 4. 結論

原油は様々な炭化水素の混合物であるため、ここで得られた結果は環境因子の面からも混合系の微生物群による分解の方が有利であった。しかし、強力な原油分解能を有する細菌を得ることができれば、これをあらかじめ増殖して添加することもでき、浄化が促進されると考えられる。本結果より、より強力な原油分解菌の検索、その大量培養方法、原油分解能誘導方法などが今後の課題である。

#### 5. 参考文献

- 1) 村上昭彦、鈴木一信、山根晶子、草間忠男：海水培地中での *Pseudomonas* sp. による原油分解、*Journal of the Oceanographical Society of Japan* vol.41, pp.337-344
- 2) Atlas, R. M., and R. Bartha.: Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, vol.45, No.1, 180-209 (1981)

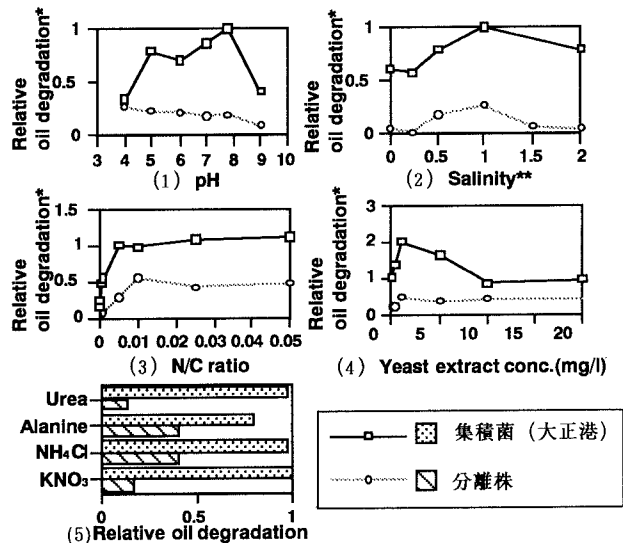


図-1 原油分解に及ぼす環境因子の影響

三角フラスコによる回分培養 28℃ 120rpm

培養時間7日間 初発原油濃度1000mg/l

添加栄養塩濃度 T-N=50mg/l T-P=10mg/l (3)を除く)

添加酵母エキス濃度1mg/l (4)を除く)

植菌量5% (前培養条件 ケロシン濃度1%)

\*集積菌の分解率を1.0とした。(酵母エキス無添加)

\*\*実際の海水濃度を1.0とした

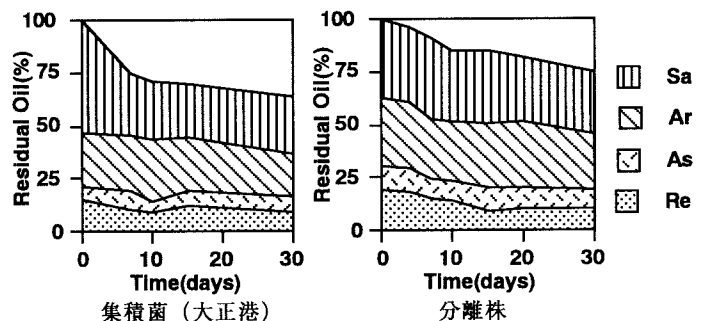


図-2 集積菌(大正港)、または分離株による原油分解特性

三角フラスコによる回文培養 28℃ 150rpm

培養時間 7日間 初発原油濃度 1000mg/l

添加栄養塩濃度 T-N=50mg/l T-P=10mg/l

添加酵母エキス濃度 1mg/l

植菌量 5% (前培養条件 ケロシン濃度1%)