

【論文】

油による海洋汚染に対するバイオレメディエーションの基礎研究
—カビ培養系による重油の微生物分解—吉岡 隆充*¹Basic Research of Bioremediation for Marine Oil Spills
—Biodegradation of Fuel Oil by a Mold Cultivation System—

Takamitsu Yoshioka

Abstract

The effectiveness of bioremediation for oil spills, which used mold instead of bacteria, was examined. In the biodegradation of fuel oil type C by use of shaking culture system, Czapek's medium was superior to Potato-Dextrose medium. Furthermore, the contents of nitrogen and phosphorus in Czapek's medium were changed because the artificial culture medium, Czapek's medium, is easy to change an ingredient ratio, and influence of nitrogen and phosphorus in the biodegradation of oil was investigated. As a result, it became clear that the content of phosphorus influenced the oil degradation.

Key Words: Bioremediation, Biodegradation, Oil spills

1 緒言

現在、地球温暖化を抑制するため温室効果の高い二酸化炭素の放出削減が急務となっている。このことから、二酸化炭素の放出が少ない各種の新エネルギーの研究がなされてはいるが、いまだにエネルギー源として石油に依存する部分が多く、さらに、東日本大震災における原発事故がこれに拍車をかけている。また、石油に由来する製品の多くが人類の生活を支えていくうえで無くてはならないものとなっている。ところが残念なことに日本には石油が産出しないので、石油確保のため多くの大型石油タンカーが産出国と日本の間を往復しており、また、非常時を想定して日本国内にはいくつもの石油備蓄基地が建設されている。このような現状において、石油タンカーの海難あるいは備蓄基地の破損が起ると、日本の沿岸及び領海が流出した油によって大規模に汚染されるという事態に陥ることとなる。現実には1997年には「Nakhodka号」による北陸海岸への大規模油汚染を日本は経験し、2007年の隣国韓国での「Heibei Spirit号」の油による海洋汚染も記憶に新しい。さらに、カラフトからの原油輸送も今後本格的になると考えられ、油による海洋汚染に対する方策、特に汚染された海域の浄化方法について早急に

確立する必要がある。

これまでに物理的に油を回収する装置が各種開発されてきてはいるが、気象あるいは地形等による制約から人力での回収に頼らざるを得ない場合も多いことが「Nakhodka号」による油汚染事故でも明らかとなった。この人力による回収には限界があり、回収されずに残った油は自然界の浄化作用に頼る他ない。2001年に世界海事機構(IMO)が提唱した油汚染の浄化における指針¹⁾においても、海域を汚染した油を可能な限り回収した後には、特別の理由がない限り自然の浄化作用に任せるのが適当であるとしている。このようなことを背景として、自然の浄化能力を高めることにより、浄化を促進させるバイオレメディエーション(Bioremediation)が油汚染浄化法として検討されることとなった。バイオレメディエーションの実際例としては、1989年の「Exxon Valdez号」によるアラスカ海岸における油汚染の浄化に対して大規模な試験実験²⁾がなされ、また、日本においても「Nakhodka号」汚染事故を契機に多くの研究機関が、汚染海域からの油の浄化に利用可能な油分解能を有する微生物(バクテリア)の単離あるいはそれを用いた油分解実験が試みられてきた。

しかしながら、これまでのバクテリアを用いた油

Received

*1 海上保安大学校 yoshioka@jcga.ac.jp

分解実験においては、原油の一部の成分（飽和炭化水素画分）の分解にはある程度の効果が見られたが、原油の約 2/3 を占める成分（芳香族画分、レジン分及びアスファルテン分）にはほとんど効果がないことが判明し³⁾、効果的な浄化法として確立するに至っておらず、より高い油分解能を有する微生物のスクリーニング（自然環境中から目的とする微生物を探索すること）が必要不可欠となっていた。また、現時点での油汚染に対するバイオレメディエーションは、汚染地域に生息する油分解能を有する細菌を空気（酸素）及び栄養塩を投与することにより活性化し、油分解を促進させる方法（バイオスティミュレーション Biostimulation）及び他の場所から得た細菌と栄養塩を汚染区域にばらまく方法（バイオオーグメンテーション Bioaugmentation）が検討されてはいるが、散布した栄養塩が海域にとどまらない、播種した細菌がその海域で生育しない、細菌の大量増殖により二次汚染あるいは生態系の変化が生じる、コストがかかるなどの問題点があり、実際の油処理に実施されたことはない。また、このバイオレメディエーションの応用方法として、製材時に生じる廃棄物である杉皮に汚染油を染み込ませて回収した後に土中に埋め、土中の微生物により分解させる方法⁴⁾も検討されてはいるが、油の染み込んだ杉皮を埋める広大な土地の長期確保・維持管理に問題があり、実用化とまでには至っていない。

このバイオレメディエーションにおいては微生物の生物分解作用により油分解を行うため、二酸化炭素を放出せずに処理できるという利点がある。現在は、せっかく回収された油も再利用が難しく、回収に使用したマット等とともに焼却処分される場合も多く、大量の二酸化炭素の放出につながっており、この点においてもバイオレメディエーションにかかる期待は大きい。

これまでに我々は、スラッジオイル中及びタールボールの表面にカビが発生することに着目し、これ

から 9 種のカビを単離・同定^{5,6)}した。そして、これらのカビは油に対して耐性を持ち、油を生物分解し増殖している可能性が高いことが示唆されることより、寒天培地上のこれらのカビ菌糸に A 重油を投与しての油微生物分解を検討⁷⁾し、スラッジより単離した *Fusarium solani* が油分解菌としての能力が高いことを明らかにした。しかしながら、このカビを用いて油汚染のバイオレメディエーションを行うには、A 重油より分解しにくい成分が多い C 重油をどのくらい分解できるかという点についても検討する必要がある、さらにより高い分解条件の検討も必要であった。

本研究においては、油の分解菌として *Fusarium solani* を使用して C 重油の分解について検討し、細菌を用いた場合よりも高い分解性を示すことが明らかとなり、また、油分解系の培地成分を検討することにより、さらに高い分解性が見込まれることが判明したので報告する。

2 実験方法

2.1 油分解実験に用いるカビ菌株及び培養方法

油分解を検討するカビ菌株として、スラッジより単離⁵⁾し継代培養・保存していた *Fusarium solani* を用いることとした。図1に *Fusarium solani* の巨大コロニーの写真、図2にその菌糸及び胞子の写真を示した。このカビは長い綿糸状の菌糸を伸ばして成長し、成長している間は胞子をあまり形成せず、また、色素の産生も少ないという特徴を有する。胞子を多く形成するカビをバイオレメディエーションに用いた場合には、必要以上の広範囲にカビの繁殖が広がり、生態系に大きな影響を与える危険があり、さらに、カビが産生する色素には毒性を有するものもあり二次汚染の危険性も考えられる。この点を考慮すると、*Fusarium solani* が単離していた菌株の中では最もバイオレメディエーションに適した菌株であると考えられた。

また、カビは基本的には好気性であるので、通常は

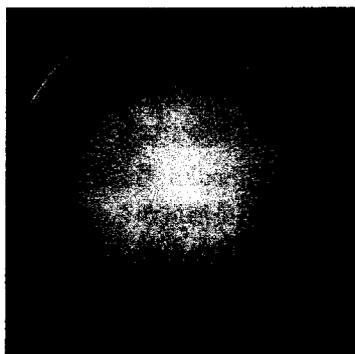


図1 *Fusarium solani* の巨大コロニー



図2 *Fusarium solani* の菌糸及び胞子

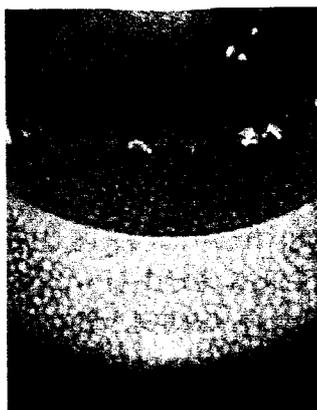


図3 *Fusarium solani*の液体培養菌糸

寒天培地の表面で培養を行うか、液体培地を使用する場合でも静置培養を行って培地表面に菌糸を浮遊させて培養を行う。ところが、スラッジより単離した *Fusarium solani* は液体培地中での振とう培養により増殖することができ、しかも培地中では菌糸が球状となり(図3)、全く孢子も色素も作らない。このことは、このカビを用いてのバイオレメディエーションが検討された際に、このカビに由来する二次汚染の心配が少なくすむという利点となり、また培地表面に培養したカビに油を投与する方法と比較し、培地体積あたりでの油分解効率は格段に高くなることが予想された。このことから、油分解系におけるカビの培養方法として液体培地を用いた振とう培養を行うこととした。

2.2 カビ培養系によるA及びC重油の分解

一般にカビの培養にはポテトブドウ糖寒天(PDA)培地⁸⁾が適しているとされている。表1にPDA培地の成分を示した。本研究では、カビ培養系にPDA培地から寒天を除いた液体培地(以後PD液体培地と記載する)を用い、ロータリーシェーカーを使用した振とう培養によって油の分解を検討することとした。

PD液体培地 200 mL を内容量 300 mL の三角フラスコに入れ、シリコ栓で封をした後、オートクレーブを用いて滅菌(2.2気圧、120°C)した。この滅菌培地にカビを接種し、インキュベーター内(30°C、暗所)で振とう培養(回転速度 100 rpm)による前培養を1週間行った。この前培養により液体培地中に菌糸球が増殖したフラスコに、A重油及びヘキサンで溶解したC重油を1g、2g及び5g(C重油にあつてはヘキサン中の真のC重油重量)をそれぞれ投与し、前培養と同条件で本培養を4週間行った。C重油をヘキサンに溶かして投与するのは、C重油の粘性が高く、そのままでは各フラスコに同量のC重油を投与することが困難であるが、均一溶液とすればピペット等を用いることにより一定量を容易に分取・投与できることによる。培養終了後、フラスコ

表1 培地成分

PDA 培地		Czapek 培地	
ジャガイモ	200g	シヨ糖	30g
ブドウ糖	20g	NaNO ₃	2g
寒天末	15g	K ₂ HPO ₄	1g
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
		KCl	0.5 g
		FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
		寒天末	15g
蒸留水	1L	蒸留水	1L
pH	6.8~7.0	pH	5.6

コ内に分解されずに残存する重油をヘキサン抽出し、このヘキサン抽出液から、69°C(ヘキサンの沸点)に温度調整したアルミブロックヒーターを用いてヘキサンを留去し、得られた残油の重量を測定した。

なお、バッチ条件が異なると、そこに生育するカビの生育に大きな差が出る場合もあり、油投与量の影響による分解量の違いを比較・検討することが難しくなることが分かった。これを避けるためには、分解を検討するバッチ全てについて、接種する菌株、前及び本培養の条件をそろえることが必要不可欠である。しかしながら、このように培養条件を同じにするように配慮をしても、菌の接種に微妙な違いがあるのか、分解に少しの差が生じることがある場合があり、カビ培養系での分解を数値化して判断するには複数のバッチの平均をとるのが必要であることがわかった。ところが、同時にロータリーシェーカーに架けて培養できるフラスコ数が12個までに限られることにより、A重油及びC重油の投与量を3段階に変えた6項目の検討を同時に行うためには、1項目あたり二つのバッチから得られた値の平均にせざるを得ないことになった。以下の実験においても同様に、二つのバッチの平均値を値とすることとした。

また、この4週間にわたる培養期間において、A重油にあつては揮散による見かけ上の重油分解率の増加が、C重油にあつてはカビ菌糸への付着による見かけ上の分解率の増加が考えられた。これらの揮散・付着による見かけ上の分解率の増加の寄与を確認するため、前述の分解実験と同様に1週間の前培養を行ったカビ分解系をオートクレーブで滅菌(2回)したバッチに2gのA重油及びC重油を投与したものと、前培養後に滅菌せずに2gの重油を投与したバッチを調製し、油を投与後さらに4週間の本培養を行って、滅菌を実施したものとし、両者の比較よりA重油の揮散及びC重油の菌糸への付着の割合を検討することとした。前培養後に滅菌をして、以後のカビによる油の代謝・分解をなくしているため、その後の本培養後(カビは死滅して

いるので培養という表現より単なる攪拌後としたほうがいいかもしれない)の油量の減少は、攪拌中に揮発性成分が揮散した、あるいは死滅して分解能力はないが液体培地中に浮遊しているカビ菌糸に粘性の高い油が付着した結果と考えることができる。従って、バッチの見かけ上の分解率から滅菌をしてカビによる分解を阻害したバッチから算出した揮散・付着率を差し引いたものが真の油分解率となる。

2.3 培養系に用いる人工培地の選択

PD 液体培地の場合は、ポテト抽出液を主な栄養源とすることになるが、バッチごとに使用したポテトに由来する培地成分比が異なる可能性がある。カビの油分解能を高める検討をするためには、活性化成分の添加を行い、培地の成分組成を変えて比較する必要があるが、バッチごとに培地成分比が異なるとこの比較が難しくなる。さらに、本格的に PD 液体培地を用いてバイオレメディエーションを行うこととなると、食料となるポテトを食用とは異なる目的で多量に消費することとなり、全世界的な人口増加に係わる食糧の確保が考えられている現状を鑑みると大きな問題となる可能性もある。したがって、薬品を混合して調製ができる人工培地を使用することが、大型プラントの構築も考慮に入れて実験を進めていくうえでは都合がよい。

PDA 培地の次に一般的にカビの培地として使用されているのは、人工培地の Czapek 培地⁹⁾であり、この培地を使用すれば培地成分中に加えられている炭化水素の分解を促進させるとされている窒素分あるいはリン分等の割合を自由に変えることができる。表 1 に Czapek 培地成分を示した。このようなことから、PDA 培地の代わりに Czapek 培地を油分解系の培地に選び、Czapek 培地成分から寒天を除いた液体培地(以後 Czapek 液体培地と記載する)で油分解を検討することとした。

分解に供する油としては、自然界において分解されにくいとされているレジジン分及びアスファルテン分をより多く含む C 重油を選び、PD 液体培地及び Czapek 液体培地の二つの分解系について前述 2.2 の分解実験と同じ方法で C 重油(2g)の分解を検討した。

2.4 Czapek 液体培地成分の油分解への影響

バクテリアを用いての炭化水素の微生物分解において、窒素分及びリン分の影響が大きい⁸⁾ことが知られている。このことから、表 1 に示した Czapek 培地の窒素分である硝酸ナトリウム(NaNO_3)の分量を 2 倍に、またリン分のリン酸水素 2 カリウム(K_2HPO_4)の分量を 2 倍に、そして両方の分量を 2 倍にしたバッチをそれぞれ調製し、C 重油の分解実

表 2 投与量による A 重油の微生物分解の差

バッチ	1g	2g	5g
投与量	1.05g	2.12g	5.26g
残油量	0.14g	0.66g	3.42g
見かけ上の分解量	0.91g	1.46g	1.84g

表 3 投与量による C 重油の微生物分解の差

バッチ	1g	2g	5g
投与量	1.01g	2.01g	5.17g
残油量	0.72g	1.59g	4.08g
見かけ上の分解量	0.29g	0.42g	1.09g

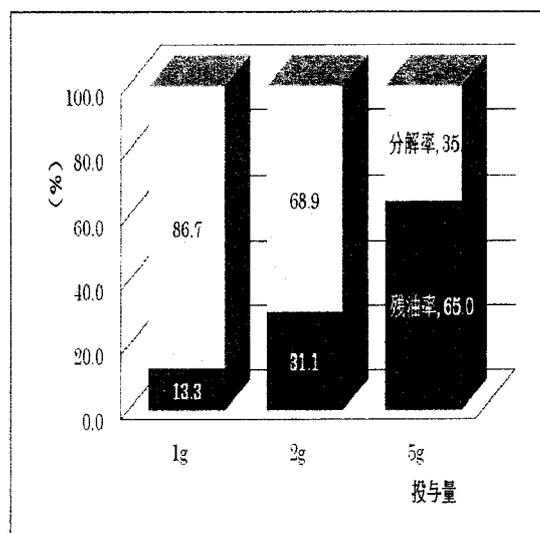


図 4 投与量による A 重油の微生物分解の差

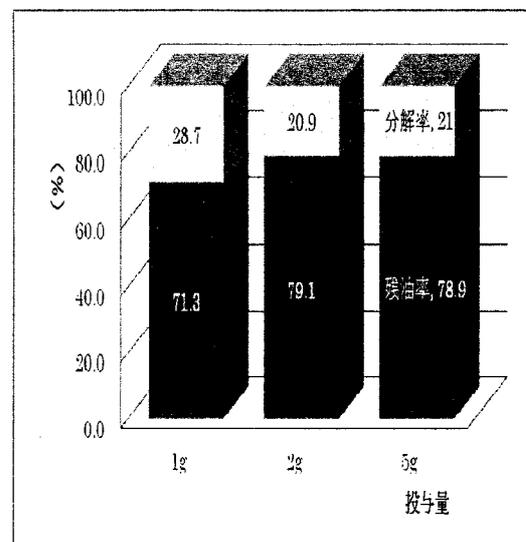


図 5 投与量による C 重油の微生物分解の差

験を前述 2.2 の方法と同じ条件で行い、通常の培地組成成分の Czapek 液体培地での場合と比較した。

3 実験結果と考察

3.1 カビ培養系によるA及びC重油の分解

A 重油約 1g、2g 及び 5g を 1 週間の前培養を行ったカビ培養系にそれぞれ投与して油分解系とし、4 週間の本培養を行った後の油分解系のヘキサン抽出物より得た残油量と油投与量及び見かけ上の分解量を表2に、また、この値から算出した見かけ上の分解率と残油率のグラフを図4に示した。表2に示した残油量は、同量の重油を投与したバッチ二つの平均値をとっており、この値を基にそれぞれの値を計算した。

図4の結果から、投与する A 重油の量が少ないと残油率は減少し、見かけ上の分解率は高くなることが分かった。投与量が多くなるとバッチあたりの見かけ上の分解量は多くなるが、油投与による菌体へのダメージがあるのか、見かけ上の分解率が少なくなり、残油量は多くなった。また、投与量が少ないと、A 重油の揮散の影響が大きく出ることと予想された。以上のことから、200 mL のPD 液体培地の場合、投与する A 重油量は 2g が適量であると判断した。このことは、効率の良いバイオレメディエーションを検討していく上でも妥当な分量であると思料した。

次に、C 重油約 1g、2g 及び 5g をそれぞれ投与した場合を表3及び図5に示した。C 重油の場合も投与量を多くすると A 重油の場合とほぼ同様の傾向を示したが、C 重油の場合は A 重油と比較し残油量が多く、見かけ上の分解率が低いことが判明した。これは、C 重油により多く含まれるとされるレジン分及びアスファルテン分が油の分解を妨げている可能性を示唆している。また、油投与量を 2g 及び 5g にした場合の見かけ上

の分解率がほぼ同じ値になったが、このことは分解能力以上の多量の油を投与した場合に、粘度の高い C 重油が一度菌糸に付着するとこれをヘキサン抽出によって回収することが容易でなく、そのため残油量が少なくなってしまうことに起因するものと考えられた。

通常の油分解実験と同じ前培養を行ったバッチと、滅菌をしてカビによる分解を阻害したバッチから得られたそれぞれの残油量と投与油量から算出した残油率、揮散・付着率及び真の油分解率を、A 重油及び C 重油それぞれについて図6に示した。A 重油の場合は 4 週間の本培養期間の間にかかなりの揮発性成分の揮散が生じていると判断され、C 重油の場合は揮発性の成分は少ないので見かけ上の分解率と真の分解率の差は粘性の高い成分の菌糸への付着が主な要因と判断された。

図6の結果から、これらの油による汚染浄化において、A 重油はバイオレメディエーションが有効で空気中への揮散による効果も期待できるが、C 重油は揮散効果が期待できないばかりか、バイオレメディエーションを用いても効率良く浄化できないことが判明した。このことは、揮発性が高く容易に生物分解を受ける飽和炭化水素画分（A 重油に多い）と、揮発性が乏しく難分解性の芳香族画分、レジン分及びアスファルテン分（C 重油に多い）の成分比がバイオレメディエーションをより効果的に行えるか否かを決定することとなる。そして、バイオレメディエーションを C 重油あるいは原油等の油浄化に有効的に活用するには、より活性をあげる条件等の検討が必要不可欠であることが明らかとなった。

3.2 培養系に用いる人工培地の選択

PD 液体培地及び Czapek 液体培地の二つの分解系を用いて、2g の C 重油の分解を比較検討した結果を図7に示した。ただし、以前にも述べたようにロ

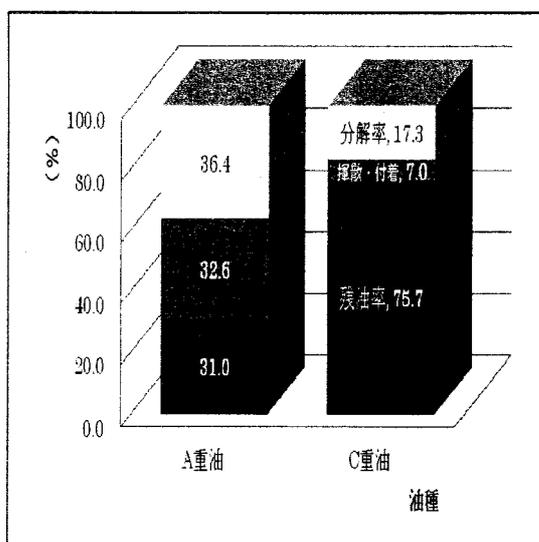


図6 油種による微生物分解の差

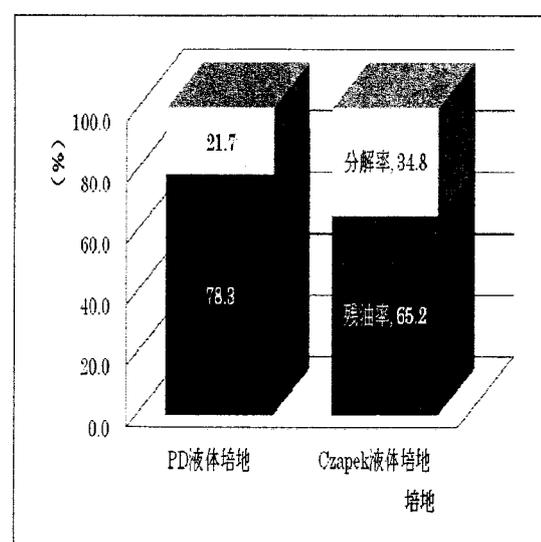


図7 培地による微生物分解の差

一タリーシェーカーに架けられるフラスコ数に限界から、毎回真の分解率を算出するための滅菌した分解系での対比試験を行うことができないため、図 7 に示した分解率は見かけ上の分解率である。しかしながら、C 重油の場合の油の揮散及び付着率はさほど大きくないため、見かけ上の分解率で結果を考察しても間違った判断とはならないと考え、以下の実験では見かけ上の分解率の値を用いて検討することとした。

図 7 の結果から、自然培地の PD 液体培地より人工培地の Czapek 液体培地の方が油に対するカビ分解系の培地として優れていることが判明した。このことは、常に一定の培地成分比の培地を調整できること、培地成分比を変えることにより分解率を高める検討が可能であること等の利点から、今後カビを用いた油汚染のバイオレメディエーションに関する研究を進めていく上で都合がよい結果となった。

3.3 Czapek 液体培地成分の油分解への影響

通常の培地組成成分の Czapek 液体培地 (図 8 に Normal と表記) と NaNO_3 の分量を 2 倍 (N2 倍)、 K_2HPO_4 の分量を 2 倍 (P2 倍)、そして両方の分量を 2 倍 (N,P2 倍) にした Czapek 液体培地を用いて比較した C 重油の分解実験結果を図 8 に示した。

図 8 の結果から、明らかにリン分を 2 倍量にした場合には通常の成分比の場合に比べ 10~20% 分解率が上がることが分かった。一方、窒素分を 2 倍量にした場合には通常の成分比と同じか僅かに分解率が減少する傾向が見られた。バクテリアを用いた炭化水素分解試験の場合には、炭素量の 0.5% の窒素量及び 0.1% のリン量が理想である¹⁰⁾とされている。

もちろん微生物種により炭素量に対する割合及び窒素/リン比が異なる可能性は高いので単純に比較はできないが、今回の実験において、投与した C 重油中の炭素量の割合を 7~8 割とすると、C 重油 2 g 中には約 1.5 g の炭素が含まれることとなる。この炭素量の 0.5% は 7.5 mg (窒素)、0.1% は 1.5 mg (リン) となり、Czapek 液体培地 200 mL 中に含まれる窒素量は 10 mg、リン量は 3.5 mg であるので、窒素・リン共にバクテリアで理想とされる量より濃いこととなる。今後、窒素及びリン量を検討するには窒素量を減少し、リン量を増加させる方向で検討したい。

4 結語

今回の研究によって、油汚染のバイオレメディエーションにカビが有効であることが確認できた。特に、これまでのバクテリアを用いたバイオレメディエーションでは期待できなかった、レジニン分及びアスファルテン分を多く含む C 重油あるいは原油による汚染浄化に対しても効果的であるように思われる。今後、さらに窒素・リン等の培地成分の濃度を検討することにより、さらに分解効率が向上する期待も持てる。

また、人工液体培地による振とう培養が分解系に使用できるということは、大型の培養ジャーを使用した油分解が可能であるということであり、大量の回収油を二酸化炭素を放出することなく分解することのできる画期的な油分解プラント構築につながるものである。また、吸着マット等の油回収機材の再生にも応用できる可能性も有しており、限りある石油資源の節約にもなる。さらに、液体培地中に生育

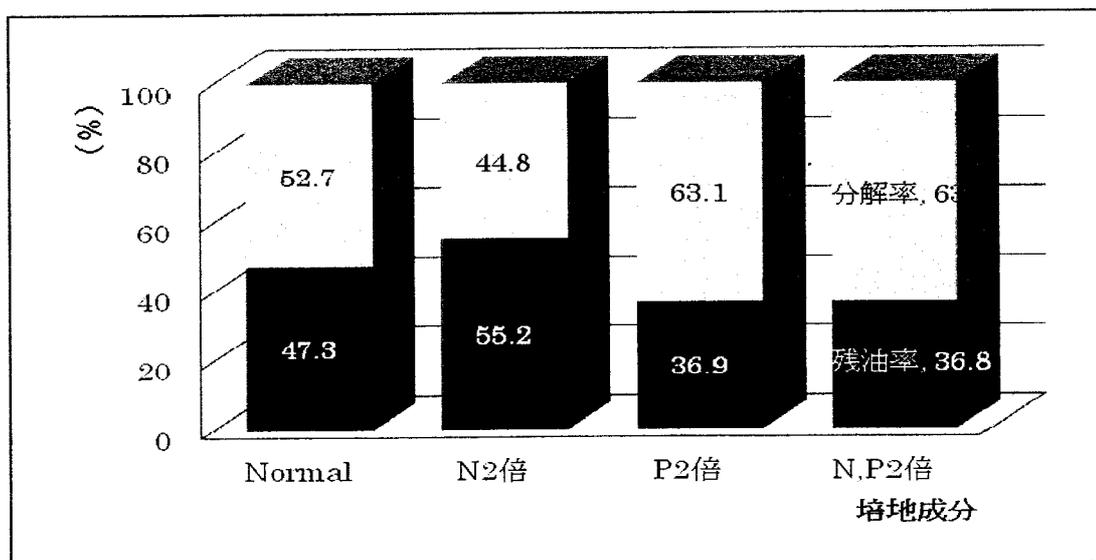


図 8 培地成分による微生物分解の差

したカビ *Fusarium solani* は孢子及び色素を産生しにくいことから、分解後の残渣であるカビ菌糸が環境への二次汚染を引き起こすという危険性は少なく、菌糸の細胞壁には多糖類も含まれることからバイオ燃料の原料にもなる可能性も秘めている。

5 謝辞

今回の論文は、本科第54期大屋裕貴、新妻玲子¹¹⁾、本科第55期金子央、剣持彩実、及び渡邊和英¹²⁾の諸氏が行った特別研究の結果を基に、追加・補足実験を行ってまとめたものである。

参考文献

- 1) *Marine Environment Protection Committee 47th Session, Inf-9*, IMO, 2001.
- 2) Ray GORDON, *Bioremediation and its Application to Exxon Valdez Oil Spill in Alaska*, Geocities Web Site, 1994.
- 3) 今中忠行, 加藤千明, 加藤暢夫, 倉根隆一郎, 西山徹, 矢木修身, 「微生物応用の大展開」, エヌ・ティ・エス, 2002, 845-853.
- 4) 「流出油事故対応総合マニュアル」, (独)海上災害防止センター, 2005, 309-353.
- 5) 吉岡隆充, 古室雅義, 海上保安大学校研究報告第2部, 49(2005), 1-7.
- 6) 高鳥浩介, 「かび検査マニュアルカラー図譜」, テクノシステム, 2002.
- 7) 吉岡隆充, 古室雅義, 海上保安大学校研究報告第2部, 50(2006), 1-9.
- 8) 小崎道雄, 西山隆造, 「応用微生物の基礎知識」, オーム社, 1981, 153.
- 9) 長谷川武治, 「微生物の分類と同定(上)」, 学会出版センター, 1987, 74-75.
- 10) 清水達雄, 藤田正憲, 古川憲治, 堀内淳一, 「地球環境サイエンスシリーズ⑨ 微生物と環境保全」, 三共出版, 2001, 100-105.
- 11) 大屋裕貴, 新妻玲子, 海上保安大学校2007年度本科第54期特別研究論文
- 12) 金子央, 剣持彩実, 渡邊和英, 海上保安大学校2008年度本科第55期特別研究論文