

ナホトカ号重油漂着と重油分解細菌による生物浄化

板垣 英治*・石田 啓**

1. 緒 論

平成 9 年 1 月 2 日, C 重油 19,000 キロリットルを満載したロシア船籍タンカー「ナホトカ号」は, 島根県沖 106 km の荒天の日本海を航行中, 船体を破断し, 船首部分が 1 月 7 日に福井県三国町の海岸に漂着座礁した。破断した重油タンクから推定 6,240 キロリットルの暖房用 C 重油が流出し, 石川県沿岸 18 市町をはじめ福井県や京都府の海岸に次々と漂着した。特に多量の重油の漂着した海岸の市や町は, 重油汚染のために, 漁業や観光に多大の被害を受けた。石川県では 202,947 人が重油除去作業にあたり, 22,199.1 キロリットルの油を回収し, また金沢市では, 重油回収には 14,083 人が, 汚染海岸の浄化には 5,574 人が出勤し, 194.8 キロリットル(ドラム缶 974 本)の重油を回収したが, それでも海岸には, 依然として漂着重油が残る状況であった(金沢市油流出災害記録, 1998)。一般に, 海水中には種々の重油炭化水素分解細菌が生息することが知られており, それが海洋の油汚染において, バイオレメディエーションに重要な役割を演じていることが判明している。ところが, 我が国では, この細菌の生息を調査確認した地域は限られており(藤沢ら, 1978; Higashihara et al., 1978), 今回の重油汚染地域でのこの細菌についての情報は全く無く, 漂着した C 重油の生物浄化についての評価・期待は, 全く分からない状況であった。本論文では, 金沢市の海岸に漂着した重油に, 重油炭化水素分解細菌が附着・増殖していることを確認し, 漂着重油の生物浄化による自然回復の過程を, 1 年間にわたって観察した。さらに, 漂着油塊から, 多数の海洋性重油炭化水素分解細菌(以下重油分解菌と略す)の菌株を単離し, その重油分解能を研究して, その能力の優れたものをスクリーニングした。

2. 実験方法

2.1 油塊試料採取

油塊試料は, 金沢市打木浜, 専光寺浜, 金石浜および大野浜に設定した定点より, 毎月採取した。図-1 に採取

点の概略を示すが, 各採取地点は, 汀線より約 40~60 m 陸側地点である。採取した試料は, 採取日の内に, 生息細菌の菌数計測に用い, 残存試料は 4°C で保存した。対照試料として, 各浜の海水および砂を随時採取した。なお隣接する内灘浜での試料を, 平成 9 年 3 月 12 日および 16 日に採取した。

2.2 重油分解菌の分離と培養

重油分解菌の培養は, Sugiura et al. (1997) の無機塩類培地を用い, 生育を促進するために酵母エキスを微量添加した(Higashihara et al., 1978)。n-テトラデカン($n-C_{14}H_{30}$)を炭素源およびエネルギー源とする時は, 5 ml/l 添加した。他種 n-アルカンも同様に使用した。漂着重油を用いる時は, n-ヘキサンに溶解し, 不溶物を除去して液体培地に添加した。

添加重油量は, ヘキサン溶液の乾燥重量から求めた。振とう培養は, 試験管(直径 12 mm)または坂口フラスコ(500 ml)を用い, 振とう培養機(130 回/分)で 28°C で行った。寒天平板培地は 3% 寒天を含む重油-無機塩類培地, n-テトラデカン-無機塩類培地を用いた。細菌の分離は油塊試料を少量(0.1 g 程度)とり, 3% NaCl を加え, 細菌の抽出を行い, 抽出液を寒天平板培地に塗布

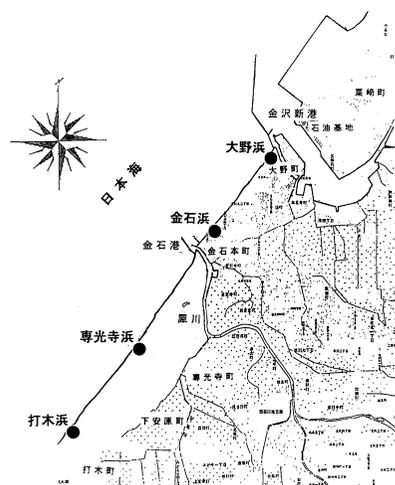


図-1 金沢海岸における漂着重油試料採取地点

* 理博 金沢大学教授 理学部化学科
** 正会員 工博 金沢大学教授 工学部土木建設工学科

展開し、28°Cで培養して行った。適宜、コロニーを選択し、培養を繰り返すことにより、単一菌株を得た。

2.3 菌数の測定

油塊試料の重量を測定後、100~200 mgを試験管にかき取り、その重量を測定した。これに3%NaClを1ml加え、微温等中で加温後、洗浄用音波発生器で1分間処理し、その上澄み液を試料原液とした。10倍希釈法により希釈し、テトラデカン—無機塩類寒天培地の表面に塗布し、28°Cでの培養を行った。7日目に生育したコロニー数を求め、元の油塊試料中の菌体概数を求めた。

2.4 重油含量の測定

油塊試料の重量を求め、約1gを精秤し、これに2mlのn-ヘキサンを添加、可溶性成分を抽出し、これを1ml分取し、窒素気流下乾燥し、さらにデシケーター内で減圧乾燥した後、秤量した。重油炭化水素の分析は、酢酸エチル抽出物を濃縮後、ガスクロマトグラフィ(OV-17カラム、3m)で行った。

2.5 菌株の炭化水素と重油の分解能検定

分離した菌株をテトラデカン58mg含む5mlの液体培地に接種し、振とう培養を行い、生育を560nmでの濁度の測定で調べた。重油を用いた場合は、培地表面に浮遊する油塊の消失、培地の濁りなどから、定性的に変化を観察した。

2.6 細菌の検鏡

分離した菌株は、Pt-Pd—コーティング後、走査電子顕微鏡(日立U-2250SおよびS-3200N)で観察した。

3. 結果

3.1 採取した油塊

平成9年1月18日に金沢海岸への重油の漂着が始まり、荒天のため波打ち際から30~60mとかなり離れた

地点に多く油塊が見られた。試料採取点は図-1に示した海岸の漂着重油量の多い地点を選び、金石浜では波打ち際から65m、大野浜では40mとし、この設定場所(2m×2m)より採取した重油塊の採取日と重量を表-1に示すが、油塊は砂浜の表層より20cm以内の所に分布していた。漂着重油の化学組成は、C₂₀のEicosaneを中心に、C₉~C₃₀の炭化水素であり、芳香族成分は少なかった(柴田康行ら、1997)。

3月16日に内灘浜で採取した油塊は、写真-1に示すように、重油の周りに砂粒が付着した状態のものであった。しかし6月18日に大野浜で採取した油塊は、写真-2に示すように、その性状を崩れ易いものへと大きく変えていた。重油含量は、漂着時の1月の油塊のn-ヘキサン抽出物としては約46%であり、2月に採集した砂粒を付着するものでは、約25%であった。

図-2は、表-1に示した油塊のその後の重油含量の変化を調べたものであり、漂着した油塊の重油含量は、初めの6ヶ月で急速に低下し、約4%程度に下がっていた。

3.2 油塊に生息する細菌

3月に採取した油塊を用い、重油あるいはテトラデカンを炭素源とする培地を用いて細菌の生育実験を行ったところ、濁度を増し細菌の生育がみられた。テトラデカン—無機塩類寒天平板培地に油塊を塗布し、28°Cで7日

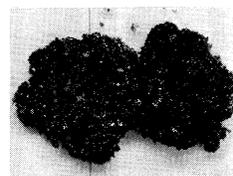


写真-1 3月の油塊

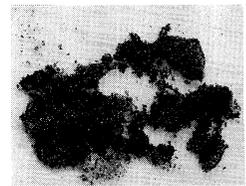


写真-2 6月の油塊

表-1 油塊試料の重量、採取場所、採取日

月日	打木浜			専光寺浜			金石浜			大野浜			内灘浜
	表層	0-10	10-20	表層	0-10	10-20	表層	0-10	10-20	表層	0-10	10-20	
3.16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.47
4.17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	(重油)	—	—	—
5. 7	6.55	0.22	0.27	2.06	0.99	0.14	2.57	1.37	—	2.31	0.80	0.73	—
6. 9	1.72	0.31	—	0.808	—	—	0.339	0.136	—	2.287	0.401	—	—
7.18	0.465	1.278	—	0.433	—	—	0.649	—	—	1.471	—	—	—
8.19	0.92	—	—	0.86	—	—	1.21	—	—	2.59	—	—	—
9. 9	3.51	—	0.84	*	—	—	2.45	4.19	3.97	3.16	2.1	—	—
10.16	3.79	1.399	—	*	—	—	4.347	2.447	—	1.886	3.57	—	—
11.21	—	—	—	—	—	—	3.97	3.05	—	1.97	—	—	—
12.16	—	—	—	—	—	—	4.423	3.62	—	26.31	—	—	—
1.13	—	—	—	—	—	—	3.21	3.64	—	22.37	1.45	—	—
2.24	—	—	—	—	—	—	0.77	0.803	—	0.734	—	—	—
							1.17	1.492	—	1.104	—	—	—
3.17	—	—	—	—	—	—	1.314	1.408	0.637	1.423	1.886	—	—

*: 侵食により採取地点消滅。0-10: 地表面から地中10cmまで、10-20: 地中10cmから20cmまで

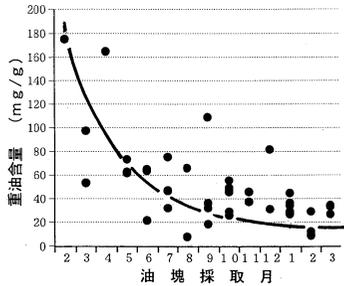


図-2 漂着油塊の重油含量の経時変化

間培養したところ、写真-3示すように、白い斑点状の多くのコロニーが見られた。これらの細菌を繰り返し培養することにより、炭化水素を炭素源、エネルギー源として生育する細菌（すなわち重油分解細菌）であることを確認した。3月より毎月、4海岸に設定した地点より採取した油塊の外見、重油含量および重油分解細菌の菌数を計測し、漂着した油塊の生物浄化の進行状況を調査した。

図-3は、表-1に示した重油塊1gあたりに生息・増殖する細菌の菌数（概数）の1年間の変化を調べた結果であり、油塊には 10^6 から 10^8 個/gの重油分解細菌が生息する事が明らかとなった。特に注目すべき事柄は、冬期で低温にもかかわらず、 10^8 個の細菌が、漂着してわずかの日数しか経っていないものに見られることであった。3月から6月にかけての菌数の増加と、重油含量の著しい低下および油塊の高い粘度を持った構造体から脆い構造体への変化（写真-2）とは、互いに関係があると考えられる。

油塊より重油炭化水素を抽出し、ガスクロマトグラフィで分析した結果も、6月に採取した重油含量の低い油塊では、各炭化水素含量の低下を示していた。対照として調査した金沢海岸の海水中の重油分解菌の菌体数は

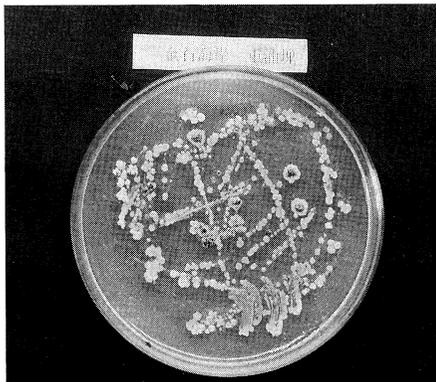
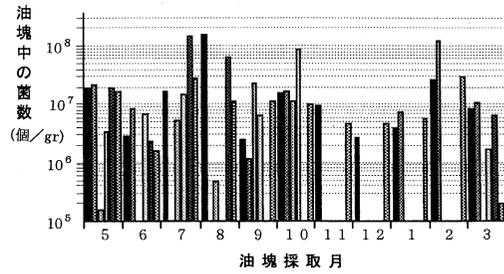


写真-3 金沢海岸の重油分解細菌のコロニー



■ 大野浜表層 ■ 大野浜 0-10 ■ 打木浜表層
 ■ 打木浜0-10 ■ 専光寺浜表層 ■ 金石浜表層

図-3 重油塊に生息する菌数の経時変化

$10 \sim 10^2$ 個/mlであり、波打ち際の砂では、約 10^3 個/gであった。

3.3 油塊よりの重油分解菌分離とその性状

毎月採取した油塊より重油分解細菌を分離し、約25の菌株を得た。これらをテトラデカン-無機塩類液体培地および重油-無機塩類液体培地を用いて、さらにスクリーニングを行うことにより、これらの培地で生育のよい、すなわち重油分解能の高い菌株4種（SY 103, UT 103, O 209, K 103）を選び出すことが出来た。

図-4に、これらの菌株についてテトラデカン-液体培地で培養実験を行った結果を示す。どの菌株も24時間で対数期を終え、旺盛な生育を示した。この時のテトラデカン消費は8.4~30 mgあった。

写真-4は24時間後の培養液であり、(a)がO 209株、(b)がUT 103株であるが、それらの白濁状態から、細菌がテトラデカンを消費して生育していることが分かる。これらの菌株をn-ヘキサデカン($C_{16}H_{34}$)、n-オクタデカン($C_{18}H_{38}$)、n-エイコサン($C_{20}H_{42}$)を炭素源、エネルギー源とした場合でも、生育速度の違いはあるが、同様にそれらの炭化水素を消費して生育した。

次に、重油を炭素源とする液体培地での生育実験をおこなった。平成9年4月大野浜で採取した漂着重油をn-ヘキサデカンに溶解し、砂やゴミを除き、滅菌直後の熱い無機塩類液体培地5 mlに65 mgを添加し、ヘキサデカンを揮発して除き、冷却後、それぞれの菌株を植えた。この時の培養液の状態を写真-5に示すと、当初重油滴は、(a)のように液面に浮遊しているが、この重油滴は菌の生育に伴って消滅し、18時間後の培養液の色は、O 209株では、(b)のように黒褐色に、UT 103株では、(c)のように茶褐色に変化した。これは細菌が炭化水素を消費したために、着色成分が液中にけん濁したものと考えられる。特に、(c)のUT 103株では、振とう培養をしているにもかかわらず、試験管壁が油成分で汚れていないこと

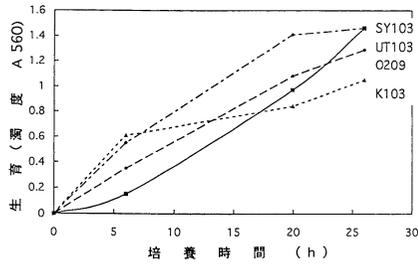
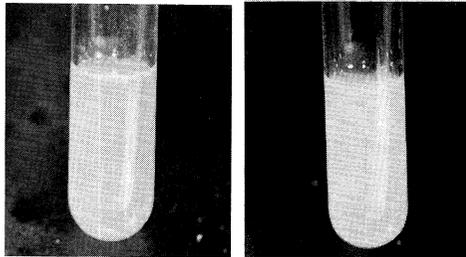


図-4 重油分解能の高い4菌株の生育速度

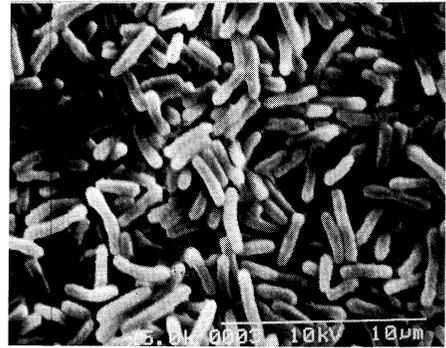
表-2 4種の重油分解細菌の形態と性状

菌株	形態	大きさ (μm)	グラム染色	色素産性
O 209	短桿菌	1.6×0.5	-	赤色
UT 103	短桿菌	1 ×0.6	+	淡黄色
K 103	桿菌	2.3×0.5	-	-
SY 103 red	桿菌	2.3×0.5	-	橙赤色

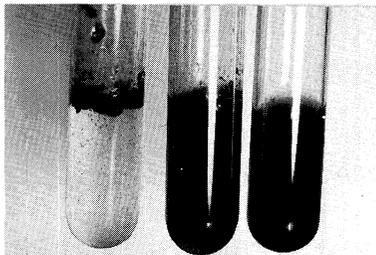


(a) O109 (b) UT103

写真-4 生育した菌株の培養液

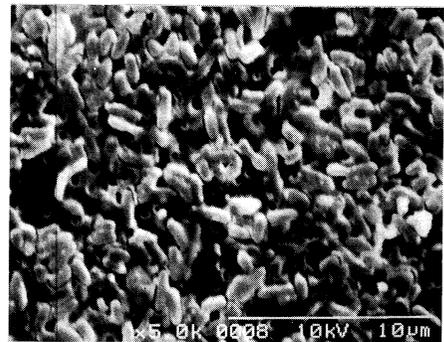


(a) 重油分解細菌 K103

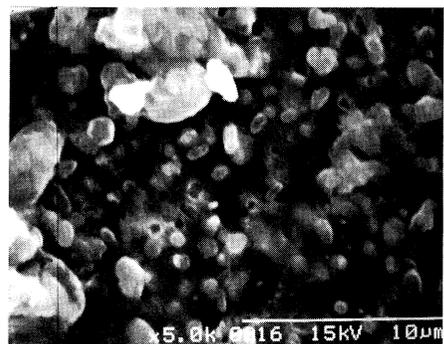


(a) 移植なし (b) O209 (c) UT103

写真-5 重油分解細菌の重油-無機塩類液体培地での培養



(b) 重油分解細菌 O209



(c) 重油分解細菌 UT103

写真-6 重油分解細菌の走査電子顕微鏡写真像

は注目される。

3.4 重油分解細菌の形態と性状

重油分解細菌のうち、図-4に示した高い重油分解能を持つ4菌株の形態と性状を表-2に示し、さらに、走査電子顕微鏡を用いて、K103株、O209株およびUT103株を、倍率5000倍で撮影した写真を、写真-6(a), (b)および(c)に示す。

これらの細菌は海洋性好氣的従属栄養細菌であり、色素の形成は炭化水素-無機塩類培地に生育した時に見られ、栄養培地に生育する場合には見られない。グラム染色およびDNA塩基組成分析も行ったが菌株を同定するまでには至っていない。

4. 結 論

ナホトカ号の重油が石川県の海岸に漂着し、多くの人

材、機材を投入しての回収作業が行なわれたが、完全な除去は困難であった。重油の自然浄化としては、C重油が難拡散性で高粘度の油であることを考えると、化学的・

物理的分解や拡散消滅などは期待できないが、微生物による分解は大いに期待されるものであった。しかし、従来、日本海側の海岸や港湾での重油分解細菌についての調査報告はなく、今回の流出事故において、本研究により初めて調査が行われた。

重油の漂着した時期が冬期であり、微生物の活動にとって好条件ではないにもかかわらず、3月に採取した油塊に約 10^8 個/gの重油分解細菌が付着し、5月、6月に採取した油塊の細菌数は、 10^8 個に達し、さらに気温の上昇により微生物の活動が盛んになって、7月までに含量の急速な低下が観察され、日本海側での重油分解細菌の実態が明らかになった。

本研究は、金沢市の4海岸を中心としての調査を行ったものであるが、隣接の内灘浜、加賀市塩屋浜で採取した油塊からも重油分解細菌を検出した(板垣英治, 1998)。これらの単離菌株のn-アルカン分解能(炭素源としての生育能力)、重油分解能を培養実験により調べ、4菌株を優れた能力を持つ菌株として選択した。

その細菌学的性質はそれぞれ異なるが、テトラデカンをはじめ、高級炭化水素を炭素源、エネルギー源として、また、重油も同様に代謝した。特にUT 103株は培養実験において、油滴を24時間以内に完全に消滅させ、茶褐色の乳濁液に変えた。このことは、この菌株はおそらく強いアルカン酸化酵素活性を持っているものと考えられる。

今回のような油流出事故において、微生物の油分解能を利用した自然界での浄化も考えられており、自然条件の基で石油分解細菌がどのように働くか、その働きを促

進するにはどのようにすればよいかなどの基礎的な研究を行うことにより、バイオによる有用な環境復元手法が得られると期待されている。

謝辞:本研究にあたり、油塊試料の採取にご尽力下さった金沢市の関係各位、走査電子顕微鏡観察に助力を賜った金沢大学工学部五十嵐心一助教授、山戸博晃技官、日立エンジニアリング株式会社テクノリサーチセンター和田正夫氏および西村雅子氏に、深謝の意を表す。また本研究の一部は文部省特定研究費補助金「流出重油処理対策と海洋環境復元に関する研究」の補助を受けて行ったものであり、記して謝意を表す。

参 考 文 献

- 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, 金沢大学日本海域研究所報告, 第29号, pp. 1-12.
- 金沢市(1998): 「金沢市ロシアタンカー油流出災害記録」, 「取り戻したぞふるさとの美しい海」
- 柴田康行, 畑野 浩, 木村祐二(1997): 国立環境研究所, ナホトカ号油流出事故緊急環境調査について(中間報告), 国会図書館
- 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦(1978): 我が国の沿岸海域における炭化水素酸化細菌に関する生態学的研究 II, 水島重油流出事故によって汚染された海域の炭化水素酸化細菌の分布, 日本水産学雑誌 44 巻, pp. 91-104.
- Sugiura, K., M. Ishihara, T. Shimauchi and S. Harayama (1997): Physicochemical properties and biodegradability of crude oil, Environ. Sci. and Technol., Vol. 31, pp. 45-51.
- Higashibara, T., R. Sato, and U. Simizu, (1978): An MPN method for the enumeration of marine hydrocarbon degrading bacteria, Nippon Suisan Gakkaishi, Vol.44, pp. 1127-1134.