

海域の油汚染に対する環境修復のための  
バイオレメディエーション技術と  
生態系影響評価手法の開発  
(環境修復技術開発研究)

Bioremediation for spilled oil and its risk assessment for marine ecosystem

平成 11 ~ 14 年度

FY 1999 ~ 2002

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/index-j.html>

海域の油汚染に対する環境修復のための  
バイオレメディエーション技術と  
生態系影響評価手法の開発  
(環境修復技術開発研究)

Bioremediation for spilled oil and its risk assessment for marine ecosystem

平成 11 ~ 14 年度  
FY 1999 ~ 2002

環境修復技術開発研究「海域の油汚染に対する環境修復のためのバイオレメディエーション技術と生態系影響評価手法の開発」  
(期間 平成11～14年度)

特別研究責任者：渡辺正孝  
特別研究幹事：内山裕夫, 木幡邦男  
報告書編集担当：木幡邦男, 牧 秀明

## 序

本報告書は、平成10年度に環境修復技術開発研究として開始され、平成13年4月の当研究所の独立行政法人化に伴い特別研究として継承され、平成14年度まで実施された「海域の油汚染に対する環境修復のためのバイオレメディエーション技術と生態系影響評価手法の開発」の研究成果をとりまとめたものである。

平成9年1月に日本海で起きたロシア船籍タンカー・ナホトカ号による重油流出事故は、我が国の日本海沿岸において水産資源、沿岸部の生態系や親水機能に甚大な被害を及ぼしたのは周知の通りであり、同年夏には東京湾におけるダイヤモンドグレース号タンカー座礁による原油流出事故が起き、平成14年には、四件の貨物船の座礁・沈没事故による燃料重油流出事故が発生した。このように周囲を大型船舶が頻繁に航行する海洋に囲まれ、また原油の大部分を海外からの輸入に依存している我が国では、常に流出油事故による災害の可能性にさらされている。

流出油で汚染された海岸の浄化法としては、物理的回収方法が主要な手段であるが、近年、土壤汚染浄化法として一部適用されている、汚染物質分解微生物を活用したいわゆるバイオレメディエーションが、沿岸漂着油の除去方法としても注目されてきている。物理的回収方法では回収が困難な場所や、除去仕切れなかった残存油の浄化に、バイオレメディエーション適用の可能性があると考えられる。沿岸部漂着油のバイオレメディエーションには、土着の石油分解微生物を増殖・活性化させるために窒素・リン等の栄養塩を外部から付与する、いわゆるバイオスティミュレーションが適当であると考えられるが、海外での事例報告でもその効果については一様ではなく、我が国での沿岸部実現場における公正な評価により得られた知見はほとんど無い状況にあり、その有効性と安全性について確認する必要があると思われた。

このような背景のもとに、本研究は、(1) 沿岸部における石油バイオレメディエーションの小規模現場試験と影響評価 (2) 石油バイオレメディエーションに伴う微生物群集構造変化の解析 (3) 底質を含む簡易モデル生態系 (マイクロコズム) による石油分解と生態系影響評価について主に遂行してきた。その結果、以下の点が明らかになった。1) 栄養塩を付与しない場合でも沿岸部における石油の自然分解は予想以上に活発であったが、栄養塩の付与により石油の生分解が有意に促進された。2) 石油の実質上の微生物分解率は約3割であった。3) 海洋性小型甲殻類や珪藻を用いた影響評価試験では、栄養塩の付与による悪影響は見られなかった。4) 土着の微生物群集構造は栄養塩の付与により大きく変化したが、時間が経つにつれ復帰した。5) 底生生物に対する石油の影響は、生息空間の物理的閉塞の寄与が大きかった。これらの成果は、今後、環境省による何らかの指針を通じて活用され、今後の環境技術政策に有効な知見を提供するものと考えている。

これまでの研究過程で、国内外の多くの方々にご協力とご助言を頂いた。兵庫県城崎郡香住町や鹿児島県西之表市(種子島)における現場実証試験では、研究の性格上特に、関係省庁、地元自治体や漁業関連の方々のご理解とご協力を頂いた。ここに深く感謝の意を表すとともに、今後とも適切なご意見を賜りたいと思う次第である。

平成15年9月

独立行政法人 国立環境研究所  
理事長 合 志 陽 一

## 目 次

1 研究の目的と経緯	1
2 研究の成果	3
2.1 日本海沿岸部における石油バイオレメディエーション現場実証試験	3
2.1.1 はじめに	3
2.1.2 現場試験方法	3
2.1.3 添加肥料量の影響	4
2.1.4 添加肥料の窒素存在形態の影響	8
2.1.5 バイオレメディエーションによる石油除去の収支	10
2.2 太平洋沿岸部における石油バイオレメディエーション現場実証試験	11
2.2.1 はじめに	11
2.2.2 現場試験方法	12
2.2.3 肥料添加の効果	13
2.3 石油分解に伴う微生物群集構造の変化と炭化水素分解遺伝子の挙動	14
2.3.1 バイオレメディエーションの環境への影響をどうやって評価するか	14
2.3.2 PCR-DGGE法で明らかになった環境への影響	15
2.3.3 クローンライブラリー法で明らかになった環境への影響	17
2.3.4 どの位の栄養塩を添加すれば良いのか？	19
2.3.5 油分解菌の挙動をどうやって調べる？	19
2.3.6 油分解に貢献する微生物は？	20
2.4 石油バイオレメディエーション実施時の生物影響	21
2.4.1 海洋性小型甲殻類を用いた影響評価試験	22
2.4.2 海洋性小型甲殻類による石油バイオレメディエーション現場試験の安全性評価	23
2.4.3 藻類培養試験を用いた影響評価試験	25
2.4.4 藻類培養試験によるバイオレメディエーションの生態系影響の評価	25
2.5 底質を含む簡易モデル生態系（マイクロゾム）による石油分解と生態系影響評価	27
2.5.1 はじめに	27
2.5.2 石油汚染に対する底質モデル生態系の応答	27
2.5.3 底質モデル生態系に残された課題	28
2.6 まとめと今後の展望	29
[資料]	
I 研究の組織と研究課題の構成	33
1 研究の組織	33
2 研究課題と担当者	33

II 研究成果発表一覧 .....	34
1 誌上发表 .....	34
2 口頭発表 .....	35
3 特許 .....	37

# 1 研究の目的と経緯

平成9年（1997年）1月、日本海でロシア船籍タンカー・ナホトカ号による油流出事故が発生し、破損した船体から流出した約6,200キロリットルといわれる大量のC重油が山形県から島根県にいたる海岸に漂着し、我が国沿岸海域における油流出事故としてきわめて大規模な被害をもたらした。この事故では水産資源への被害のみならず、12府県にわたって海鳥等の海洋生物や、海岸部の貴重な生態系及び景観にも重大な影響をもたらした。また同年夏には、東京湾におけるダイヤモンド・グレース号事故や、海外でも東南アジア史上最大の石油流出事件とされるシンガポール海峡におけるエボイコス号事故と、比較的大規模な油流出事故が相次いで起こり、1999年にはイスタンブール沖のボスポラス海峡、2000年にはフランス プルターニュ半島沖、南アフリカ沖、2001年にはガラパゴス諸島付近と、それぞれ小規模ながらタンカー事故による油流出が連続的に発生した。2002年には、スペイン沖でプレステージ号による大規模なタンカー事故が発生し、大量の流出油が沿岸部に甚大な被害をもたらした。さらに同年、我が国でも島根、鹿児島、大島、茨城の各沿岸で沈没・座礁した貨物船から流出した燃料重油が近傍の海岸に漂着し、沿岸汚染対策などで地元関係者を悩ませた。また最近、サハリン沖で大規模な海底油田の開発が行われつつあり、北海道付近の海域における油流出事故が懸念されている。

この様な状況にかんがみ、平成9年に橋本元総理・ゴア前副大統領会談において「日米コモン・アジェンダ」に基づく提案の一つとして「油流出事故への対応における協力」が位置づけられた。環境省では、油流出と油処理剤の環境影響調査、海洋や沿岸の油汚染に対するバイオレメディエーションに係る情報交換に関し、コモン・アジェンダの下で日米間における技術交換を推進してきた。さらに環境省では、上記ナホトカ号油流出事故に際しては平成7年に閣議決定された「油汚染事故への準備及び対応のための国家的な緊急計画」に基づき、関係省庁と連携をとりながら対応を行っている。その一環として、水産庁と共同で油漂着海岸における栄養剤散布による土着性分解微生物の活性化を利用した油汚染浄化技術について、環境影響および有効性等に関する基礎的知見を得ることを目的として、流出油バイオレメディエーション

技術の調査を開始した。

流出油で汚染された海岸の浄化法としては、汲み取りや拭き取り、汚染箇所の掘削、または高压熱水洗浄などによる物理・化学的回収方法が主要な手段である。しかし、人手に頼る方法では多大の労力が必要となること、また、重機や化学物質を使用する方法では沿岸生態系に与える影響が大きいことや、膨大な費用が必要となることが技術上の問題点として指摘されている。

近年、土壌汚染浄化法として一部適用されているバイオレメディエーションが、沿岸漂着油を除去し海岸の環境を修復する方法としても注目されてきている。この技術は、天然に存在する汚染物質を分解する微生物を活用するという穏和な特質上、生態系に与える影響が軽微であり、また費用的にも安価であることが期待されている。沿岸漂着油のバイオレメディエーションの適用対象としては、上記のような物理的回収方法が困難な場所や、物理的回収で除去仕切れなかった残存油の浄化に可能性があると考えられる。汚染除去手段として適用するバイオレメディエーションは、表1に示した2種類に大別される。海岸の汚染除去には、バイオオーグメンテーションを適用するのではなく、窒素・リン等の栄養塩を外部から付与する、いわゆるバイオスティミュレーションが適当であると考えられる。それは適用環境が海洋であり、浄化対象が石油であるため、土着の分解微生物が既に相当量現場中に存在する可能性が高く、それを凌駕する量の分解微生物を外部から供給することは現実的ではないと考えられるためである。事実、海外で試みられた幾つかの実現場における試行事例をみても、バイオオーグメンテーションの効果が認められていないのが現状である。

表1 バイオレメディエーション技術

名 称	特 徴
バイオスティミュレーション	汚染現場に栄養塩、酸素などを外部から供給し、現場に生息している微生物の分解活性を高める
バイオオーグメンテーション	外部で分解能力に優れた分解菌を単離の上、大量に増殖し、これを汚染現場に供給する

実験室内の油と分解微生物だけからなる単純な系では、栄養塩の付与により石油分解が促進されることが確認されている。しかし、汚染された海岸で流出油の除去を目標とするならば、様々な生物が存在し互いに影響しあう現場における分解有効性が確認されなければならない。

ところが、海外での事例報告においても、現場試験の結果のほとんどは地理学的、気象学的、生態学的諸条件等の現場の状況により浄化効果が左右されることから、その効果については定まった評価が得られていないのが現状である。また、我が国での沿岸部の汚染現場における実施例は限られており、学術的なあるいは公的機関による評価により得られた知見はほとんど無い状況にあった。

バイオレメディエーションが生態系に与える影響についても不明な点が多く、その評価のためには、現場を模した実験施設（マイクロコズム）や、現場を実験のために一部隔離した施設（メソコズム）等のモデル生態系による実験的解析に加え、現場における実際の生態系に及ぼす影響評価解析を行うことが重要である。これらの生態系影響について検討を加え、かつ有効性についての現実的な知見を得ることが、適正な流出油バイオレメディエーション技術の確立のために必要不可欠である。

以上のような国内外の情勢から、本課題においては、油汚染により損傷をうけた海岸の環境修復を図るバイオ

レメディエーション技術につき、我が国の沿岸部における小規模の現場試験を通じて、その有効性と影響評価について、評価手法の開発を含め研究を遂行してきた。

研究は主に次の3課題に沿って行われた。

課題1. 沿岸部における石油バイオレメディエーションの小規模現場試験と影響評価

課題2. 石油バイオレメディエーションに伴う微生物群集構造変化の解析

課題3. 底質を含む簡易モデル生態系（マイクロコズム）による石油分解と生態系影響評価

課題1では、室内実験で得られた知見を基に、現場における有効性を確認するため、実海岸に小型の実験容器などを設置し、数ヶ月間に渡り油分解過程をモニターした。このうち、兵庫県城崎郡香住町で行った試験の結果を2.1節に、また、鹿児島県西之表市（種子島）で得られた結果を2.2節に記載した。課題2では、安全性の評価法を確立することを主な目的とした研究を行い、微生物群集構造を遺伝子的に解析した結果を2.3節に、また、海域に存在する甲殻類や植物プランクトンを用いてバイオレメディエーションの影響を調査した例を2.4節に記載した。干潟や浅海域も流出油による汚染が懸念されるが、課題3では干潟に存在する底生生物への流出油の影響について室内実験により検討し、2.5節にその結果を記載した。



## 2 研究の成果

### 2.1 日本海沿岸部における石油バイオレメディエーション現場実証試験

#### 2.1.1 はじめに

平成9年1月、日本海で発生したロシア船籍タンカー・ナホトカ号による油流出事故により、山形県から島根県にいたる日本海沿岸は大規模な被害を受けた。中でも、兵庫県、京都府、福井県、石川県の海岸における被害は甚大であった。このような状況から、国立環境研究所では、汚染海岸におけるバイオレメディエーション実証試験を行う計画を立案し、これら府県の地元機関に協力を依頼したところ、兵庫県の関係機関から試験実施場所候補地の提案を頂いた。

研究の目的と経緯の章に記載したように、バイオレメディエーション技術の有効性や安全性の評価のためには、実海岸における試験が不可欠であるが、もちろん、これは地元関係者の方々のご理解とご協力が無ければできない。幸い、本研究では、兵庫県立公害研究所（現 兵庫県立健康環境科学研究所）を初めとする兵庫県の関係者、地元柴山漁業組合等の了解を得られ、兵庫县城崎郡香住町にある海岸を試験場所とすることができた。

#### 2.1.2 現場試験方法

試験場所として選定したのは、兵庫县城崎郡香住町佐津の佐古谷海岸（図1）である。周辺は岩礁地帯であるが、入り江の奥は砂礫浜になっている（図2）。この海岸にもナホトカ号事故による流出油が漂着し、一時は黒い重油で覆われていた。また、高波により漂着油の一部は汀線より十数メートル陸側にまで打ち上げられていた。地元の方々による油除去が行われたが、この海岸には人家が無いこと、また海水浴などの利用が無いことから、我々が予備調査を行った平成9年の夏にも、まだ流出油で汚染された礫が多く見いだせた。しかし、冬季の波浪が高いことから、漂着油の物理的な剥離、再分散が起こることで、年々、漂着油で汚染された礫を見いだすのは難しくなった。

本研究では、この海岸で、平成10年から平成13年までの夏季に現場実証試験を行った。この中から、平成12年に行った添加肥料の量と分解効率の関係について実験した例と、平成13年に行った肥料の形態と分解効

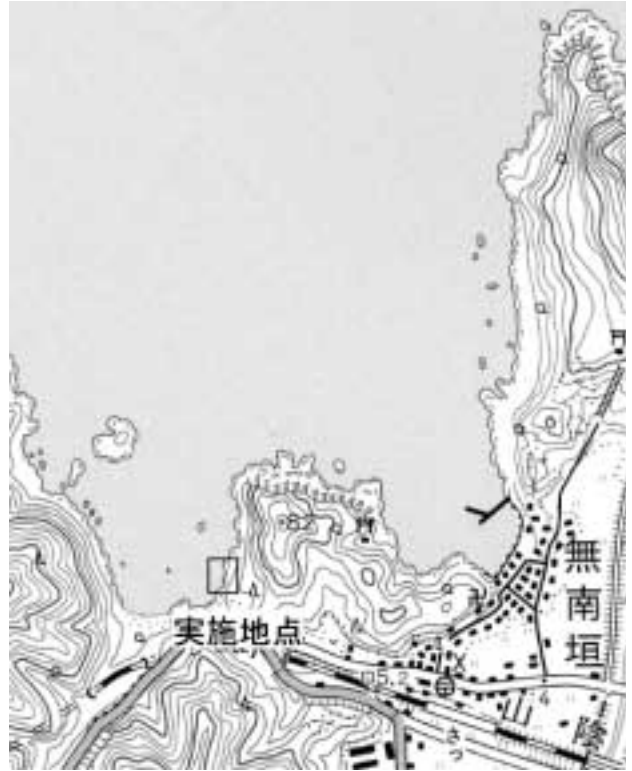


図1 兵庫县城崎郡香住町佐古谷試験現場周辺地図  
出典：国土地理院・地形図閲覧サービスホームページ



図2 佐古谷試験現場 上：海岸全体図、下：実験装置設置場所  
図中央下部に見えるプラスチック製の中にも、アクリル製容器（図4）を各3個ずつ設置した。

率の関係について実験した例を、それぞれ2. 1. 3項と2. 1. 4項にまとめた。

### 2. 1. 3 添加肥料量の影響

一般の海域の海水中の栄養塩濃度は、石油分解細菌が増殖・活動するには低く、効率よく石油の微生物分解を行わせるために、外部から肥料などにより栄養塩を補給する必要がある。ここでは、添加肥料量と石油の微生物分解の活性について調べるために、添加肥料量を変えて現場試験を行った。

各供試試料は以下のように調製した。平成11年度までの分解試験では、現場に残された漂着油で汚染された小石や礫を対象としたが、これらは年々減少し、本試験を行った平成12年では、試験に十分な量を集めるのが困難であった。そこで、石油試料としては、我が国が中東より大量に輸入しているアラビアンライト原油を海水と共に強制かくはんすることによりムース化し、試験現場の海砂と混合したものを使用した。これを、石油の外部への漏出を少なくするため、また、栄養塩の局所的な濃度を高めるために、孔径70 $\mu$ mのテフロン製網により作製した小袋に一袋当たり約10g充填したものを調製した(図3)。海砂に含まれる石油含量は約0.023g/g-海砂であった。これを複数個、側面に多数の小孔を開けた円筒型のアクリル容器(図4)内に充填し、三個のアクリル容器を一組としてプラスチック製の網籠に固定し(図5)、現場海岸部の磯場で波が緩衝されている浅場に設置した(図6)。設置したアクリル容器から、試験期間中約3週間ごとに、小袋を一つずつ取り出し、研究所に持ち帰って石油分解の程度を測定した。

土着の石油分解細菌を活性化するために用いた肥料は、現場において、ある程度長期間に渡る肥料添加の効果を持続させるために、市販されている汎用の農業用緩効(徐放)性合成窒素肥料(イソブチリデン二尿素[IBDU:架橋型尿素, 商品名:スーパーIB, 三菱化学製])顆粒を窒素源として使用した。リン源としては、リン酸マグネシウム・カルシウムの顆粒(リンスター30, 三菱化学製)を使用した。これらを、表2に示したように三段階に量を変えて添加した。

現場実証試験は平成12年の6~9月の約三ヵ月間実施した。試験期間中、開始時は1週間、その後は約3週間ごとに各種試料の採取を行い、石油成分の減少、栄養塩濃度、海砂付着細菌数の経時変化を調べた。

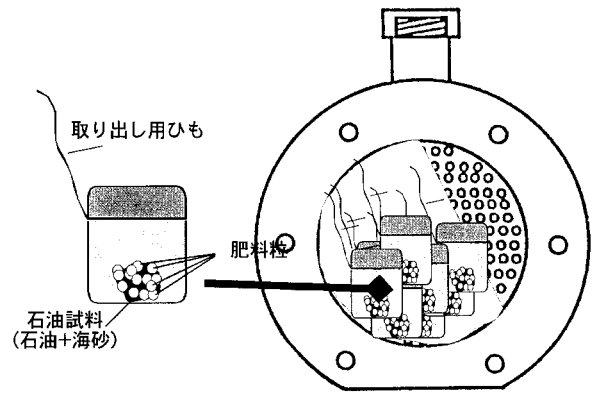


図3 現場試験供試石油試料と実験用アクリル容器への充填  
現場で採集した海砂や小石にムース状にした供試石油を混合し、テフロン網製の小袋(左図)に入れ、それを海水交換を良くするために側面に穴を開けたアクリル容器(右図)に入れて現場に設置した。

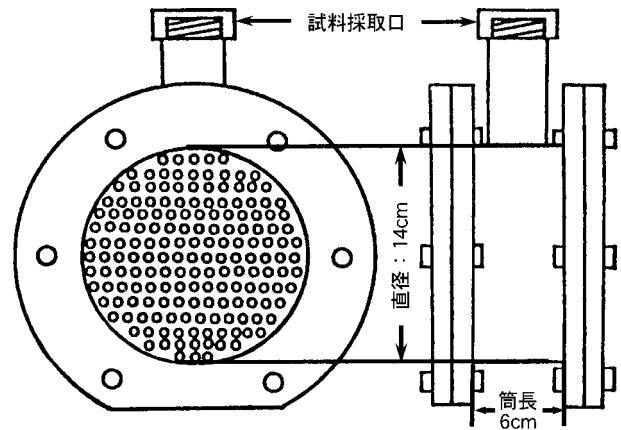


図4 佐古谷海浜部現場試験に用いたアクリル製石油分解実験容器

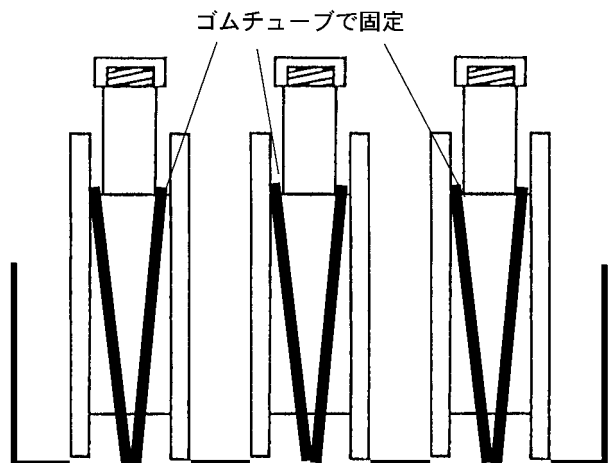


図5 アクリル容器を固定したプラスチック製網籠

表2 各試験区と添加肥料量

試験区	添加肥料量	
	窒素肥料	リン肥料
①	無添加	無添加
②	1g (窒素換算0.32g)	0.2g (リン換算0.07g)
③	3g (窒素換算1g)	0.6g (リン換算0.21g)
④	15g (窒素換算5.3g)	3g (リン換算1g)

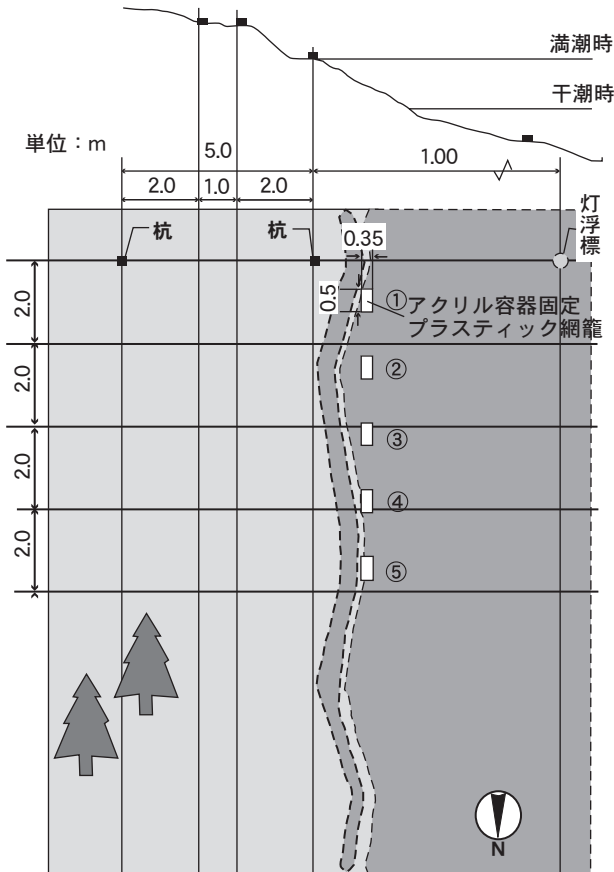


図6 佐古谷海浜部における実験装置設置模式図  
試験区の番号については2.1.3項, 2.1.4項を参照  
設置の様子は図2参照。

石油は、回収した砂試料を風乾させたものから有機溶媒で抽出を行い、溶媒を留去させた後に全抽出量を秤量した。次いでその成分につき、質量分析器付きガスクロマトグラフ (GC/MS) を用いて分析した。GC/MS の分析で測定できるのは石油成分のうち半揮発性炭化水素化合物である。これらの定性・定量を選択イオンモードにて行った。

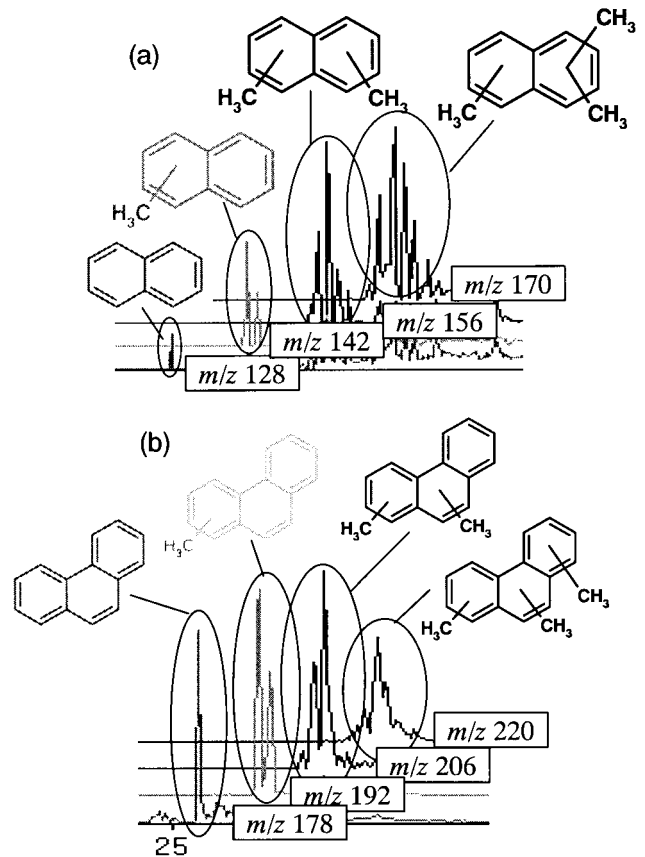


図8 ナフタレン (a) とフェナンスレン (b) のアルキル基非置換体と一連の置換体のGC/MS分析によるマスクロマトグラム (MC)

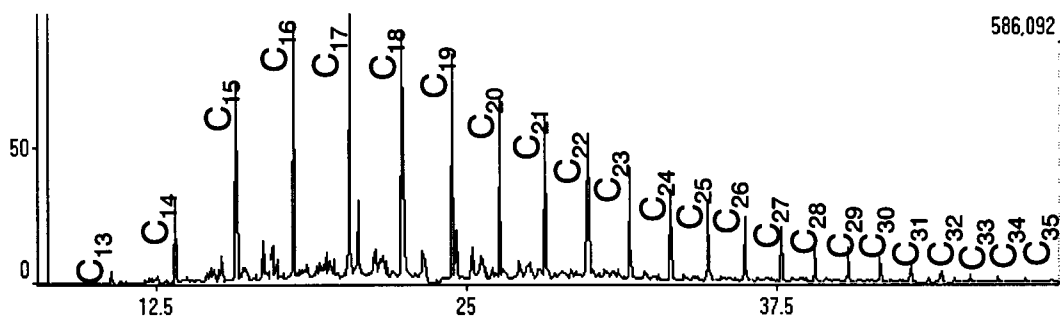


図7 GC/MS分析によるアラビアンライト原油中のアルカンのマスクロマトグラム  
ピーク上のC右下の数は炭素数を表す。

本研究では、半揮発性炭化水素化合物をアルカン類、ナフタレン類、フルオレン類、ジベンゾチオフェン類、フェナンスレン類に分類し、それぞれの分解過程を示した。なおアルカン類（図7）については炭素数13~35の直鎖のもの他に炭素数17のプリスタンと18のフィタンといった分岐型のもの、芳香族化合物では、ナフタレン、フルオレン、ジベンゾチオフェン、フェナンスレン（図8）のアルキル基非置換体と石油に特徴的に含まれている一連のアルキル基置換体について分析を行った。

各成分の残存率は、供試原油に含まれる化合物で微生物による分解をほとんど受けないことから通常指標として使われるホパン（図9）との相対比から計算した。試験初期のホパンとの相対比と分解後の相対比から、各グラフの縦軸の残存率（%）は次式にて示される。

$$\frac{A/H}{A_0/H_0} \times 100 (\%)$$

ここにAは任意の経過日数後における各成分の分析値、Hは任意の経過日数後におけるホパンの分析値、A<sub>0</sub>は初期における各成分の分析値、H<sub>0</sub>は初期におけるホパンの分析値である。

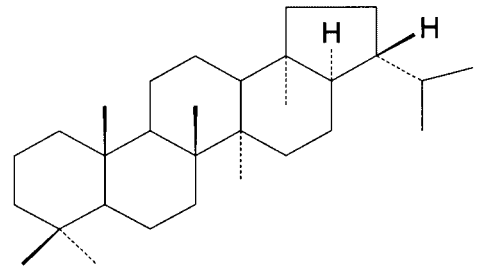


図9 17α(H), 21β(H)-ホパン

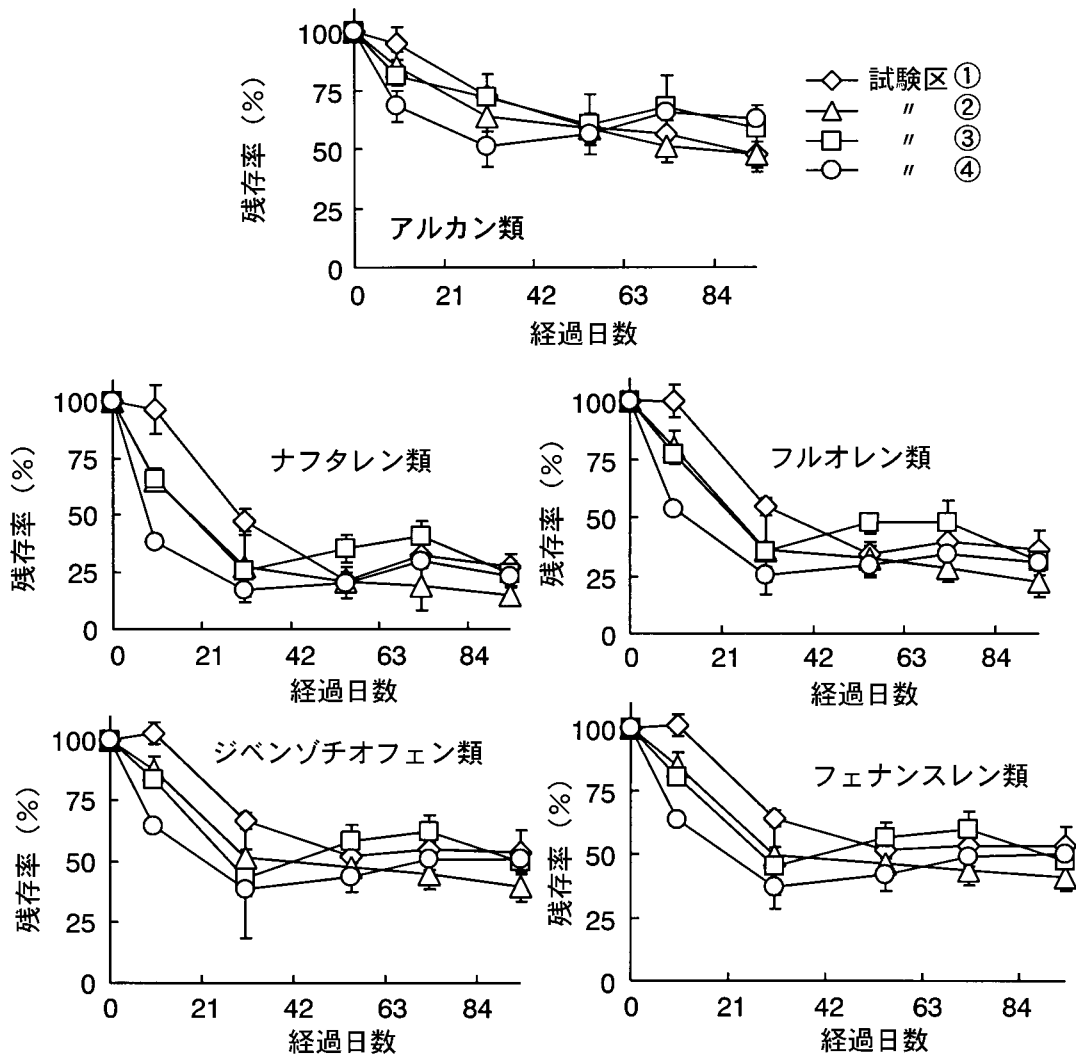


図10 佐古谷海浜部現場試験における原油中の半揮発性化合物の分解  
試験区①は肥料無添加区、試験区②~④は肥料添加区  
添加肥料については、2.1.3項、および表2を参照。



栄養塩の分析は、全窒素、全リン分析のためのアルカリ過硫酸カリウム加熱処理による分解を行った後に、自動分析器により測定を行った。

海砂付着細菌数は、滅菌海水に砂試料を適当量懸濁・超音波処理し、適宜希釈したものを栄養塩を添加した人工海水寒天培地に塗抹し、石油を浸潤させたフィルターを平板培地（シャーレ）の蓋内部に静置し、蒸発する炭化水素で微生物を増殖させ、出現するコロニーを計測した。

試験期間中の平均海水温は26.0℃であった。微生物による石油の分解には酸素が必要であることから、酸素が十分でないと石油分解が制限される。そこで、アクリル容器内の海水の溶存酸素濃度を測定したところ、試験期間を通して嫌気的環境にはなっていなかった。

全ての試験区において、これら代表的な半揮発性化合物の有意な減少がみられた（図10）。特に、肥料無添加（対照）区においても、予想されていたよりも活発な石油分解が観察された。現場試験を行った佐古谷では、日本海との海水交換が良く、貧栄養海域であると言える。これを反映して、肥料無添加である試験区①では試験期間を通して窒素・リンとも低い濃度であった（図11）。

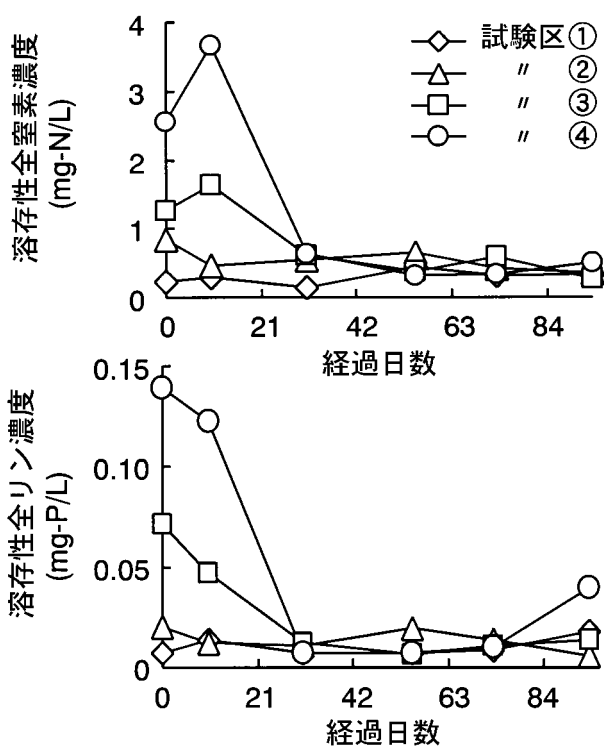


図11 アクリル容器内の栄養塩濃度の経時変化  
試験区①は肥料無添加区、試験区②～④は肥料添加区  
添加肥料については、2.1.3項、および表2を参照。

しかし、この低い濃度においても、それぞれの石油成分が分解され、試験中期以後は分解速度、程度共に肥料添加区とほぼ同一であった。

肥料添加区において、アクリル容器内部海水中の栄養塩濃度には、実験初期の栄養塩添加量に応じた増加が見られた（図11）。実験開始後1週間目のサンプルでは、高い栄養塩濃度が持続したが、その後は無添加区の濃度との差が小さくなった。

実験に供した石油・海砂混合物に付着している土着菌数も添加肥料量に応じて多くなっており、肥料添加量の大小にかかわらず、非添加区に比べてほぼ一桁高い菌数が試験期間中維持されていた（図12）。肥料添加量が最大の区（試験区④）では、菌数も最大となっていた。

石油中に含まれる各化合物の初期段階における分解についても、添加肥料量の増加に伴い分解速度が向上する効果が認められた。ただし、最終分解率は肥料添加区、無添加（対照）区ともに、ほぼ同様の値となった。石油成分ごとの分解性を比較すると、ナフタレン類が最も易分解性であり、次いでフルオレン類、ジベンゾチオフェン類、フェナンスレン類の順で分解性が低下した。ナフタレン類とほぼ同様に易分解性であると考えられるアルカン類は、本試験では、最終分解率が最も低かった。

実験室内の油と分解微生物だけからなる単純な系では、栄養塩の付与により石油分解が促進されることが確認されている。しかし、様々な生物が存在し互いに影響しあう自然環境では、必ずしも肥料を添加することが直接に微生物による油分解を促進しないことが知られている。

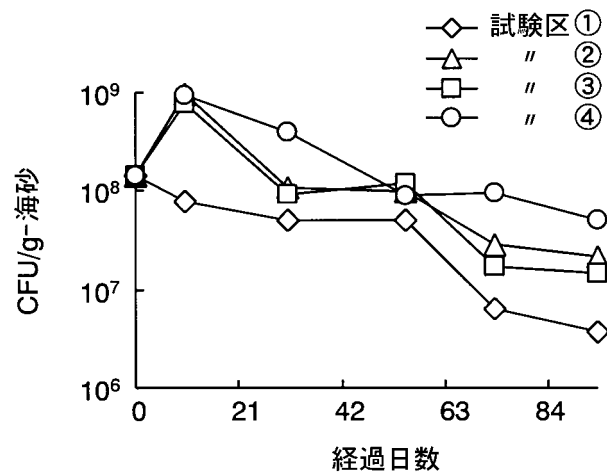


図12 海砂付着菌数の経時変化  
試験区①は肥料無添加区、試験区②～④は肥料添加区  
添加肥料については、2.1.3項、および表2を参照。

表3 試験条件一覧

試験区	添加窒素肥料		添加リン肥料	
	種類	アクリル容器1個当たりの添加量*窒素換算42 g	種類	アクリル容器1個当たりの添加量リン換算8 g
①	無添加	—	無添加	—
②	被覆型硝酸 (硝酸アンモニア)	*152 g	被覆型 (リンコート)	24 g
③	被覆型硫酸 (硫酸アンモニア)	*224 g	同上	同上
④	被覆型尿素	*96 g	同上	同上
⑤	架橋型(IBDU)	*120 g	顆粒型 (リンスター)	同上

ここにはデータを示さないが、我々の実験でも肥料の添加により、容器内の植物プランクトン量の指標となるクロロフィル *a* 濃度が大きく増加した。このことは、添加した肥料が、油分解微生物ばかりでなく植物プランクトンの増殖にも利用されていることを示す。増加した植物プランクトンは、新たな有機物源となり、これを資化する微生物の増加をもたらすと考えられ、石油の分解と拮抗することも予想される。さらに、微生物の増加は、それを捕食する微小動物の増加を促す可能性がある。バイオレメディエーションを現場に適用するためには、これら自然の生態系全体の応答も考慮する必要があるだろう。

#### 2.1.4 添加肥料の窒素存在形態の影響

平成13年には、石油分解細菌活性化用の農業用緩効(徐放)性合成窒素肥料として、これまで使用してきた架橋型尿素肥料 (IBDU) の他に、被覆型硝酸アンモニア (硝安コート)、硫酸アンモニア (硫硝コート)、尿素肥料 (LP コート: 以上、チッソ旭肥料製 [かっこ内の名称は商品名]) を用い、窒素肥料の形態の差による石油分解促進効果の差を調査し、形態別に現場における有効性を検討した。

現場試験は、2.1.3項で述べたものと同様、図3、4に示したアクリル容器を図6のように兵庫県城崎郡香住町佐古谷 (図1,2) の海岸に設置して行った。供試石油試料も2.1.3項と同様、アラビアンライト原油を海水と共に強制かくはんすることによりムース化したものを使用した。各試験区と供試肥料の種類と添加量は表3にしたがって実施した。

現場試験は平成13年5月30日～10月9日にかけて行い、実験開始後二回の試料採取は2週間ごとに、その後

は3週間ごとに行った。石油成分、栄養塩濃度、海砂付着細菌数の分析・測定は前節2.1.3項で述べたのと同様に行った。

試験期間中の平均水温は24.4℃であった。

実験に供した石油・海砂混合物に付着している土着菌数は、肥料の形態によらず全ての肥料添加試験区において、無添加区に比べて約一桁高い値を試験期間中保持しており (図13)、肥料添加の効果が見られた。また、付着菌数の変化には、添加肥料の形態の違いによる系統的な差は見られなかった。

前項 (2.1.3) と同様に、肥料の添加による石油の分解・除去促進効果が見られた (図14)。アルカン類の分解については肥料無添加区との明瞭な差は無かったが、ナフタレン類、フルオレン類、ジベンゾチオフェン類、フェナンスレン類といった芳香族化合物については、実

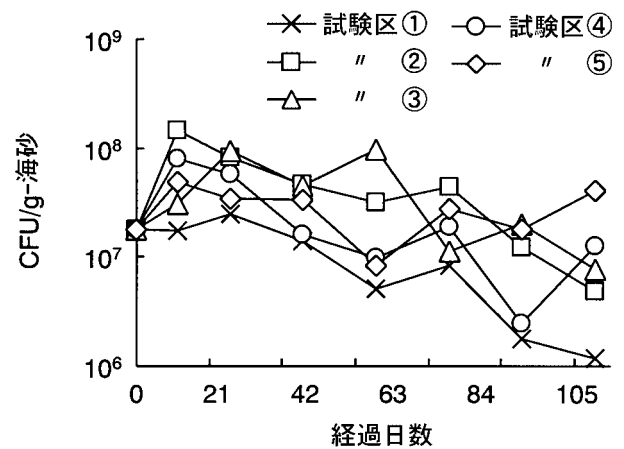


図13 海砂付着菌数の経時変化

試験区①は肥料無添加区、試験区②～⑤は肥料添加区  
添加肥料については、2.1.4項、および表3を参照。

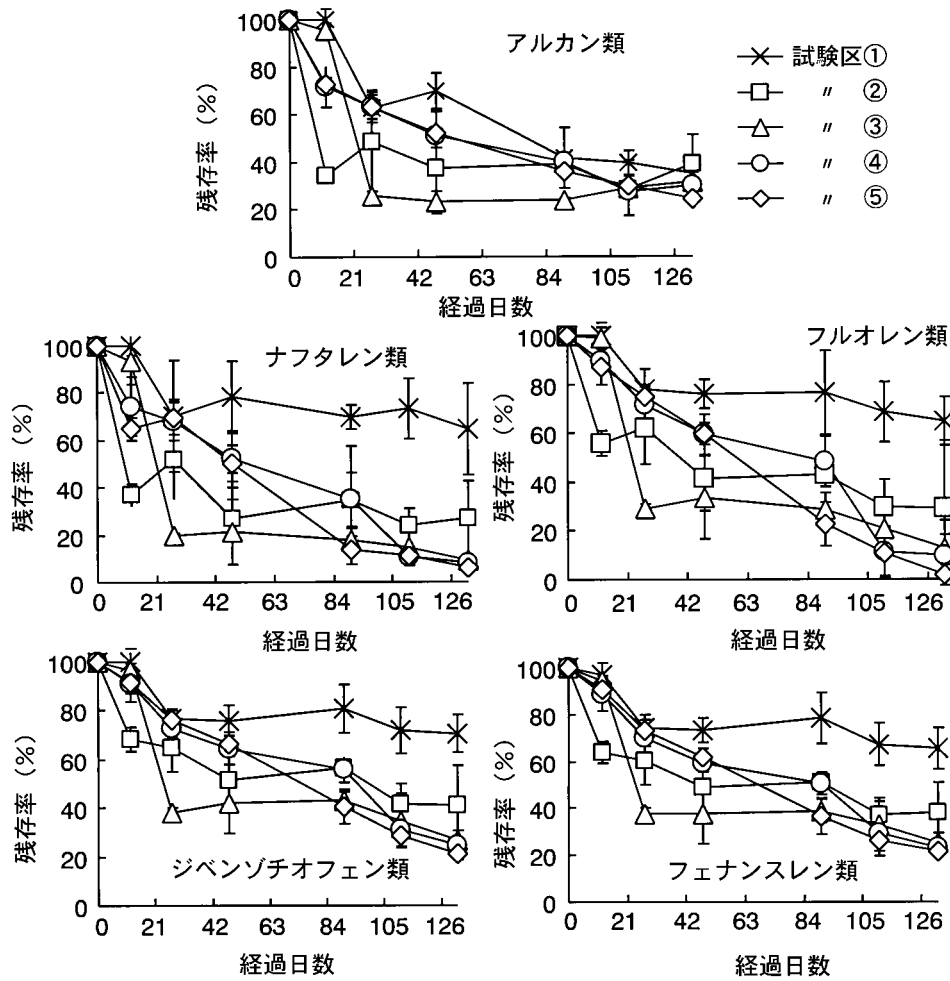


図14 佐古谷海浜部現場試験における原油中の半揮発性化合物の分解  
 試験区①は肥料無添加区，試験区②～⑤は肥料添加区  
 添加肥料については，2.1.4項，および表3を参照。

試験終了時に肥料無添加区ではどの化合物も50%以上が残存していたのに対し，硝酸アンモニア添加区（試験区②）以外の肥料添加区では70～90%の分解が見られた（図14）。

異なった添加肥料の形態による石油分解・除去促進効果について検討したところ，無機態窒素肥料である硝酸アンモニア（試験区②），硫酸アンモニア（試験区③）添加区では，試験開始3週間までの初期には，各石油成分の分解促進効果が，他の有機態窒素肥料添加区（試験区④，⑤）よりも顕著であった。しかし試験中～後期においては，硝酸アンモニア添加区での石油成分分解促進効果は鈍化し，他はみな同程度だった。

実験終了時に，海砂中に残存する全石油量を測定し，石油汚染担体としての海砂からの全石油除去量について検討したところ，窒素肥料として硝酸アンモニアを添加した試験区②では，個別の石油成分の分解促進効果が低

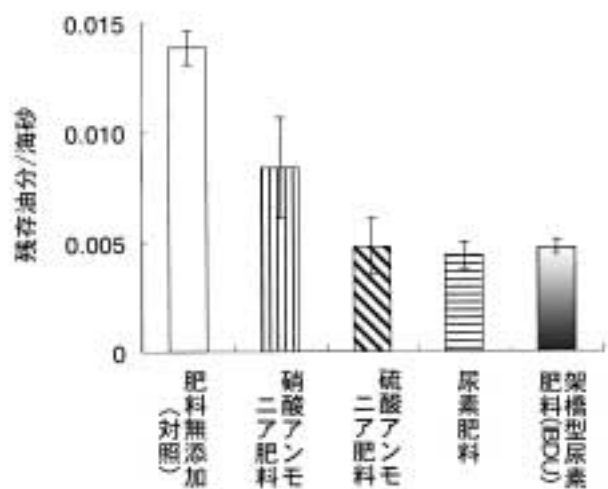


図15 佐古谷海浜部における現場試験終了時（132日目）の残存油量



図16 石油被汚染担体（海砂・礫）からの、石油の剥離・分解量の収支

かったこと（図14）と対応して、肥料無添加区の約半分の石油が残存していたが、その他の肥料添加区では残存油量が肥料無添加区の約1/3にまで減少していた（図15）。汚染物質である石油が減少したことだけを考えれば、肥料添加の効果があったといえるが、減少した部分がすべて微生物により分解されたわけではない。次節で、この点について考察する。

### 2.1.5 バイオレメディエーションによる石油除去の収支

海岸へ漂着した原油・重油など汚染物としての石油は、海水中や砂浜の間隙水中などに存在する石油分解微生物により炭酸ガスと水とに分解される（図16）。前節までに、バイオレメディエーションとして肥料を添加することで、この微生物による石油分解を促進させられることが明らかになった（図10, 14）。これは、肥料添加により栄養塩濃度が高くなることで分解微生物の分解活

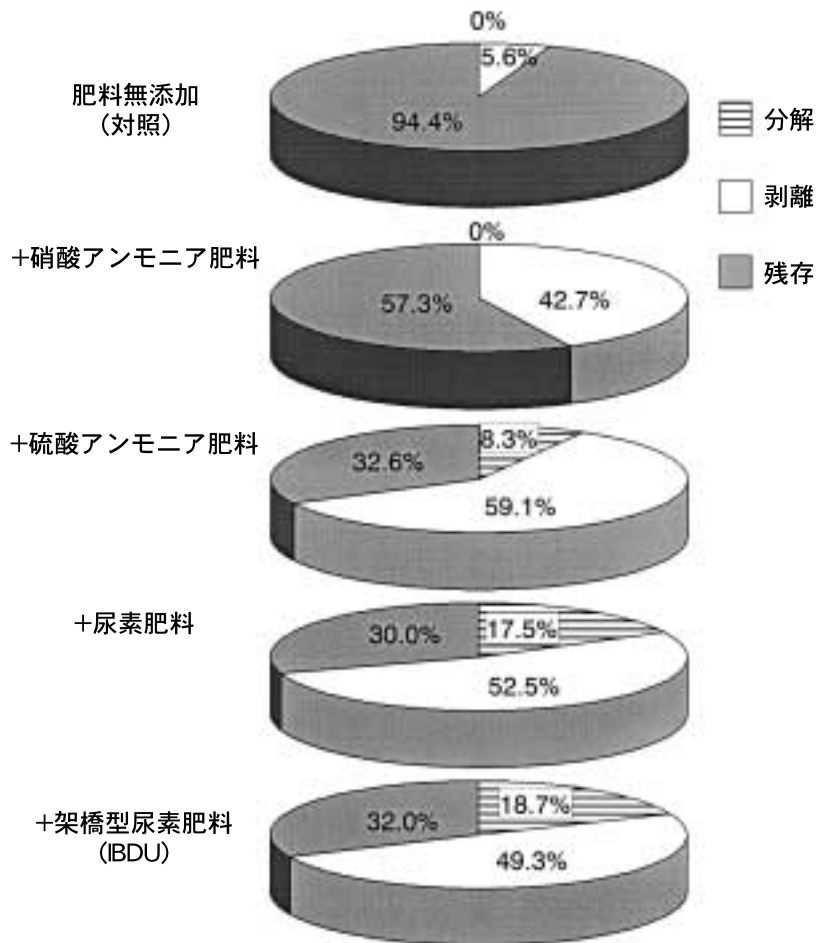


図17 油除去の物質収支と実質上の生分解の寄与



性を高めたことと、微生物数を増加させた（図12、13）効果によるものと思われた。

一方、石油分解菌の中にはバイオサーファクタントと呼ばれる界面活性剤状物質を生産するものが存在することが知られている。界面活性剤は石油と海水との混合を容易にするため、この効果で海砂からの石油の剥離が促進される（図16）。本現場試験でも、肥料添加によりバイオサーファクタントの生産も併せて促進されたことにより、海砂からの石油の剥離が促進された可能性があるものと考えられた。

図15で示されたように、肥料添加区では汚染海砂に含まれる石油の全量が132日後にかなり減少したが、この減少量のどの程度の割合が微生物の分解によるのかを検討した。石油の微生物による分解進行具合を評価するために指標としている、原油中に含まれる難分解性化合物であるホバン（図9）は、石油の分解が進めば、相対的にその濃度は必然的に上昇する。このホバンの濃縮度合いから2.1.4項に記した実験における石油の全分解量を見積もったところ、約20%と算定された（図16）。

上記の全剥離量と併せて石油除去全体の収支を試算したところ、実質上の微生物による生分解の寄与率が、硝酸アンモニア添加区ではほぼ0%、硫酸アンモニア添加区、および尿素と架橋型尿素添加区で約10~20%となっており、硝酸を含んでいるものでは石油の生分解、剥離共に効果は薄く、逆に尿素のように、有機態窒素の方が効果が大きいことが示された（図17）。肥料を添加した試験区のすべてについて、剥離による物理的な除去が4~6割程度と大きな割合を占めることが明らかになり、バイオレメディエーションの作用の一つとして、微生物による分解の活性化に加えて、バイオサーファクタント生産の増加に伴う汚染担体からの剥離も大きい要因と考えられた。

## 2.2 太平洋沿岸部における石油バイオレメディエーション現場実証試験

### 2.2.1 はじめに

タンカー事故に限らず海難事故などで油が流出して海岸に漂着しており、流出による海岸汚染は我が国の海岸のどこで起こるか特定できない。したがって、海岸環境を修復するためのバイオレメディエーション技術では、様々な地理的、気候的、生態的条件の異なる環境下で、その有効性や安全性が評価されなければならない。たと

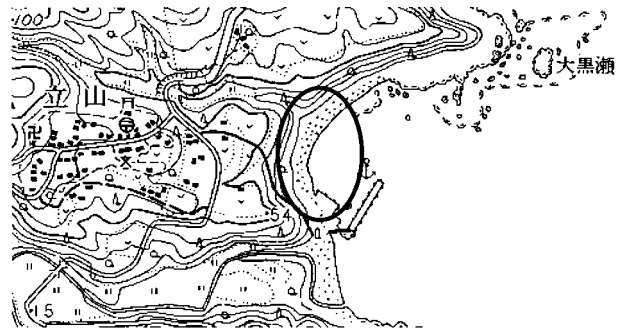


図18 種子島東海岸西之表市立山実験現場周辺地図  
丸で囲んでいる部分が試験現場

出典：国土地理院・地形図閲覧サービスホームページ



図19 種子島東海岸部試験現場

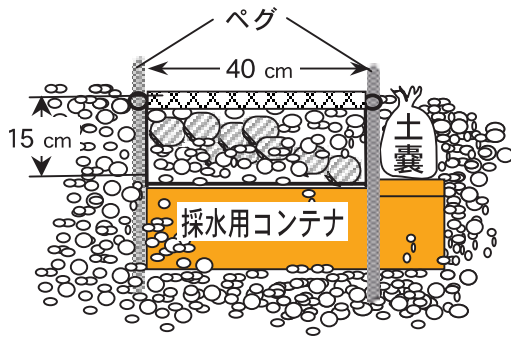


図20 種子島試験現場に埋設した採水用コンテナ付きステンレス網籠

えば、日本海沿岸部は一般に干満差が小さく、これまで2.1節で述べてきた現場試験を行った佐古谷の海岸部では平均0.13m程度である。このため、日本海側は太平洋側の干満差の大きな環境とは大きく異なる。石油が海水に浸漬することが分解に大きく影響すると考えられるが、2.1節で述べてきた試験現場では、試験に供試した石油試料の海水の冠水と干出を定期的に繰り返すことが難しいことから、潮汐差が大きい海岸を新たに探した。潮汐差が大きく（約1.3m）、航路が近いことから、慢性的に廃油ボールが海岸部に打ち上がる鹿児島県種子島の東海岸部（図18）が試験現場に適していたため、ここで小規模石油バイオレメディエーション現場試験を行うことにした。この試験現場の設営に関しては、環境省、鹿児島県関係部局、西之表市、種子島漁業協同組合などの方々のご協力を頂いた。

### 2.2.2 現場試験方法

試験を行った種子島の立山地区の海岸は、夏期には台風の影響などにより波高10mを超える波浪が押し寄せる海岸であり、比較的大きな砂利や礫で構成される浜である（図19）。石油分解実験は、この地区の漁港の防波堤の内側で行った（図18）が、この場所でも、日本海沿岸部で用いたようなアクリル容器（図3、4）を設置するのに適した波浪が緩衝された場所が無かった。したがって、枠の強度を増すため、種子島の実験ではステンレス製の網籠を使用した（図20）。ステンレス製網籠は、外部との海水交換を良くするため、1 cmメッシュのス



テンレス製網で囲まれている。

この中に、2.1.3項や2.1.4項で述べたものと同様に調整した石油を混合した砂れきを入れた孔径70 $\mu$ mのテフロン製網の小袋（図3）をそれぞれ30袋程度入れ、隙間を小石、礫、海砂で埋め合わせた後に汀線に沿って浜に埋設した。海水による浸潤を確保するため、平常潮位時に一日二回冠水と干出を繰り返すような位置に調節した。また、各ステンレス網籠の下部には、採水して栄養塩濃度を分析するための合成樹脂製のタンクを備え付けた（図20）。ステンレス網籠の流出を防ぐために、ペグで固定し、さらに各網籠をロープで連結した後に大きめの石で周りを覆い固定した（図19下）が、数mの波浪が押し寄せるときには、全体が掘り起こされることもあった。

ステンレス籠内に入れたテフロン製網の小袋には石油を混合した海砂とともに、肥料を充填した。窒素源としては2.1.3項と同様に、日本海沿岸部における現場試験で用いた緩効（徐放）性合成窒素肥料（IBDU）顆粒を使用した。リン源としては、リン酸マグネシウム・カルシウムの顆粒（リンスター）を使用した。これらを、表3に示したように2段階に量を変えて添加した。表3で示された量で肥料を添加した小袋を入れたステンレス製網籠を、それぞれ2個用意し、約2 m間隔で海浜に埋設した（図19下、図21）。

試験は波浪の高い夏期を避け、2001年11月～2002年2月にかけて行った。



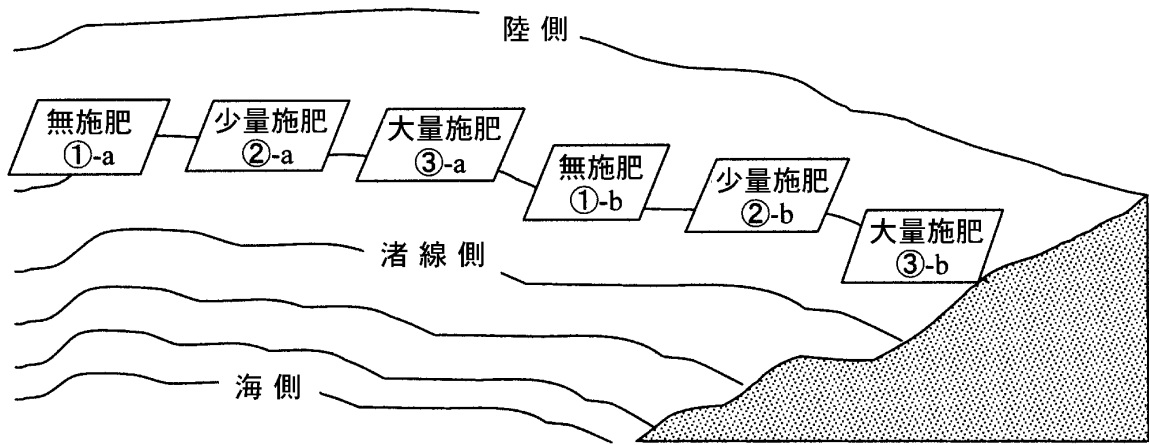


図21 種子島東海岸部試験現場におけるステンレス製網籠の配置模式図

試験区①は肥料無添加区、試験区②、③は肥料添加区  
 添加肥料については、2.2.3項、および表4を参照  
 図中a, bは同一肥料条件の重複した網籠を表す。

表4 各試験区と添加肥料量

試験区	添加肥料量	
	窒素肥料(IBDU)	リン肥料(リンスター)
①	無添加	無添加
②	2 g (窒素換算0.64 g)	0.2 g (リン換算0.07 g)
③	20 g (窒素換算6.4 g)	2 g (リン換算0.7 g)

### 2.2.3 肥料添加の効果

実験に供した石油・海砂混合物に付着している土着菌数は、肥料添加量の大小にかかわらず全ての肥料添加区において、非添加区に比べて1～2桁高い菌数を試験期間中保持していた(図22)。

実験を行ったのが晩秋～冬季であるため、平均水温が19.2℃と2.1節に記載した日本海沿岸部における夏期の試験実施時の海水温より低いにもかかわらず、総じて肥料添加による分解促進効果が顕著であった(図23)。特に、日本海沿岸の現場試験では分解が悪かったアルカン類(図7)が、種子島の実験では最も早期に分解が進み、実験の最後では、肥料添加区においてその90%以上分解されていた(図23)。

芳香族化合物ではナフタレン類が最も易分解性であり、次いでフルオレン類、ジベンゾチオフェン類、フェナンスレン類の順で分解性が低下していたが、日本海沿岸部における現場試験よりも、どの成分も早期にほぼ完全に消失していた(図23)。種子島における実験で、日本海沿岸に比べ微生物による分解の速度が速く、また残存する石油が少なかったことの一つの理由の一つに、2.2.1項で述べたように種子島では潮汐差が大きく(約1.3m)、試験実施地点で干出と冠水を規則的に繰り返したことがあげられるだろう。これにより、干出時には網籠に酸素

の供給が十分に行われ、また分解微生物にとって必須の海水が定期的に供給される。種子島における実験の方が、分解微生物にとって増殖環境が良かったであろうことは、種子島の実験の方が付着菌数の肥料添加区と無添加区の比が大きいまま推移したことからも推測される(図13, 22)。

種子島の海岸では、実験期間中もたびたび高波があったため、波浪による物理的な石油の剥離も予想された。そこで、日本海沿岸部における現場試験(2.1.5項)で石油が分解された割合を推定したのと同様の方法で、ホパン(図9)を指標として石油分解の割合を推定し、石油除去の収支を試算した。その結果、種子島の実験では、実質上の生分解の寄与率が肥料添加区で約2割となっており、剥離に伴う除去が4～6割程度と考えられた。

以上の結果から、波浪が穏やかな時期の日本海沿岸部

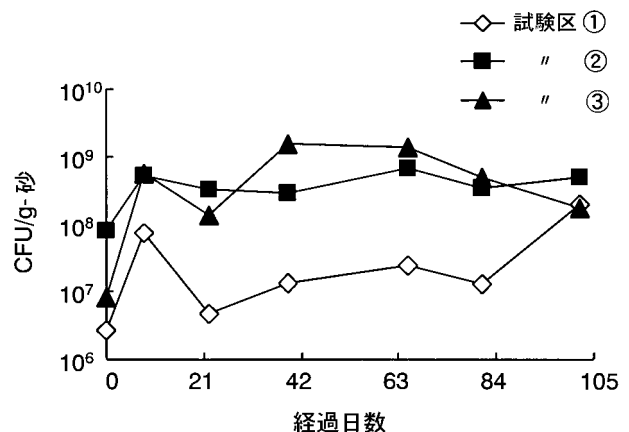


図22 海砂付着菌数の経時変化

試験区①は肥料無添加区、試験区②、③は肥料添加区  
 添加肥料については、2.2.3項、および表4を参照。

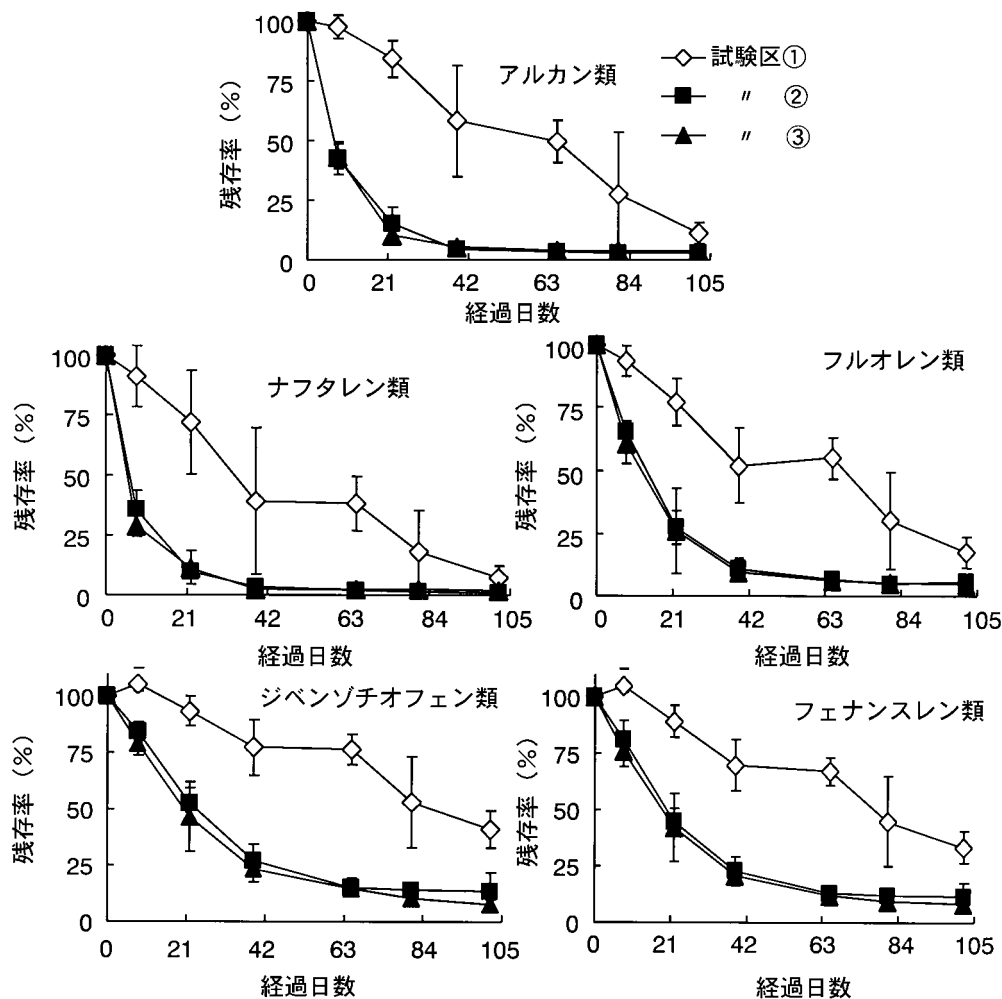


図23 種子島東海岸部現場試験における原油中の半揮発性化合物の分解

試験区①は肥料無添加区、試験区②、③は肥料添加区  
 添加肥料については、2.2.3項、および表4を参照。

のように干満差が小さい海域で常に海水中に浸潤しているよりは、種子島沿岸域のように潮汐が明瞭で、干出と冠水を規則的に繰り返す潮感帯に流出油が漂着している場合の方が、より大きな肥料添加による微生物分解促進効果が期待できる。

### 2.3 石油分解に伴う微生物群集構造の変化と炭化水素分解遺伝子の挙動

#### 2.3.1 バイオレメディエーションの環境への影響をどうやって評価するか

バイオスティミュレーション (表1参照) の環境への影響評価を行った例は数少なく、とりわけ、微生物群集への影響を調べた例は極めて少ない。バイオスティミュレーションでは窒素・リンなどを含む栄養塩を対象地域に散布するため、土着微生物群集に何らかの変化が生じることが考えられ、本技術の安全性を考察する上で微生

物群集への影響を知ることは非常に重要である。しかしながら、わずか10年程前までは微生物群集構造の解析は主として培養法により行われてきた。すなわち、菌を培養して単離し、解析していた。しかし、海水環境中に生息する細菌のうち、培養できるものは1%以下であることが知られており、本手法が群集構造の解析に不十分であることは明らかである。

近年、16S rRNA遺伝子 (16S rDNA) の塩基配列に基づく系統解析が提唱され、さらに対象とする遺伝子の一部のみを選択的に増幅することができるPCR法の発明により、少量のDNAから多量の全く同じDNAを得ることができるようになったため、16S rDNAを用いた微生物の分類に関する研究 (系統解析) が格段に進歩した。本手法は培養操作を必要としないため、自然界の微生物群集構造を解析するためには有効な手法であることが期待された。この様な背景を基に、rRNA遺伝子

を標的とした様々な手法が開発され (図24), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法もその一つである。

DGGE法を用いれば、PCR法で増幅したDNAを、各塩基配列の違いにより分離することができる。DGGE法の原理を図25に示す。2本鎖DNAが1本鎖に解離すると、ポリアクリルアミドゲル中での移動度が非常に遅くなる。2本鎖が部分的に解離する条件 (温度, 変性剤濃度) は、それぞれの微生物から調製したDNAの塩基配列に依存する。したがって、長さが同じでも塩基配列の異なるDNA断片を変性剤 (尿素およびホルムアミド) の濃度勾配を持つゲル中で泳動すると、ゲル中での移動度が異なり、分離することが可能となる。

以上より本研究では、バイオスティミュレーション技術において行われる栄養塩散布が微生物群集に及ぼす影響を調べるため、平成10~12年に兵庫県の日本海沿岸で行った現場実証試験 (2.1節) において得られた試料につき、まずPCR-DGGE法を用いて土着細菌群集構造の変化を調査した。次いで、これを16S rDNA塩基配列決定法 (クローンライブラリー法) で解析し、これら手法の有効性を検討した。

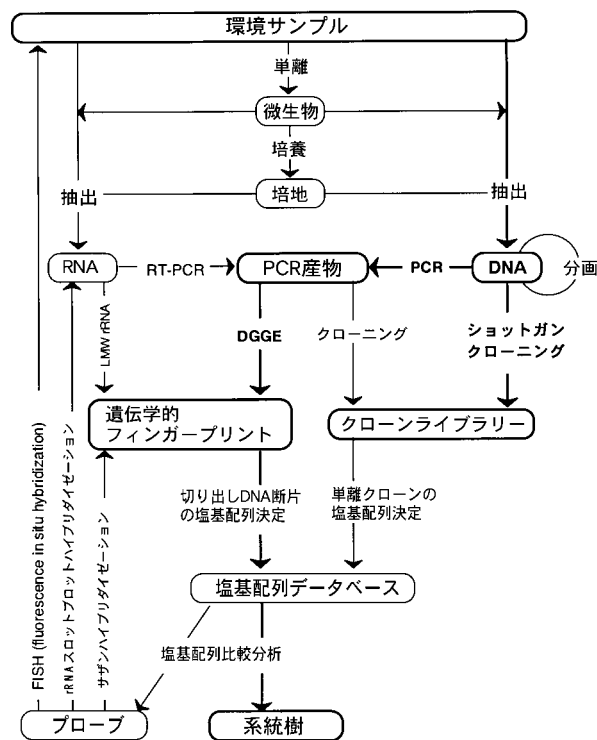


図24 分子生物学的手法に基づく微生物群集構造の解析フローチャート

### 2.3.2 PCR-DGGE法で明らかになった環境への影響

実証試験現場には、図26に示したように栄養塩散布区と海水のみを散布した対照区を設置し、それぞれの調査地点の地下から間隙水を採取し全DNAを抽出した。次いで、16S rDNAの一部領域をPCRで増幅し、DGGEで泳動して解析を行った。各調査地点でのDGGEパターンを

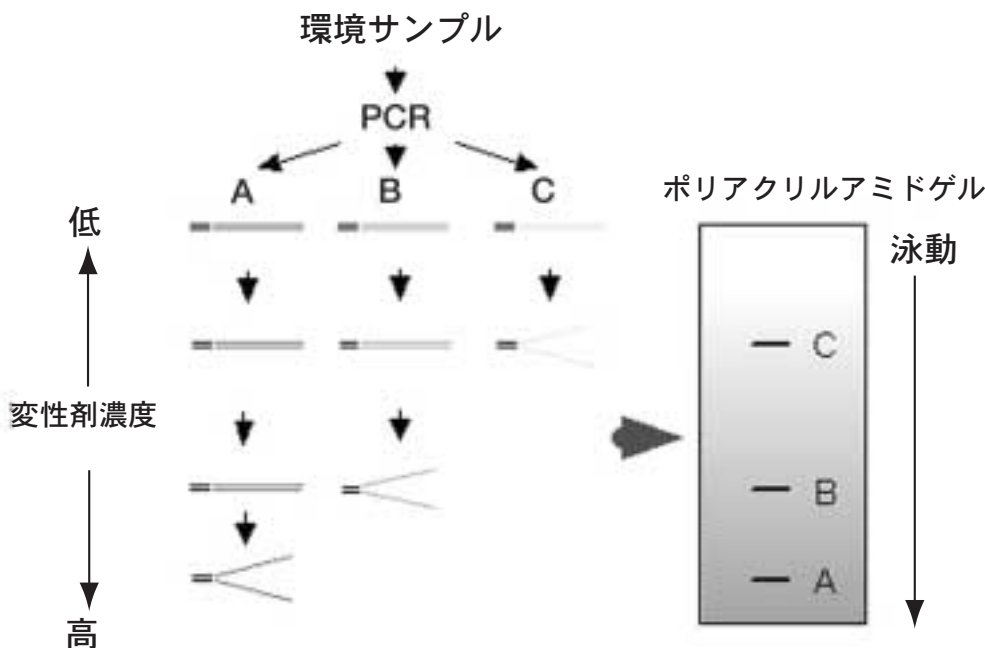


図25 DGGEの原理

図27に示した。さらに、この結果で得られた各調査点での変化を理解するため、統計的手法の1つである主成分分析で処理した。主成分分析法とは、バンドパターンの類似性を2次元のグラフを用いて視覚化する方法で、電気泳動ゲル上でバンドパターンの類似しているサンプル同士は近くに、似ていないサンプルほど遠くに離れてプロットされる。ここでは図を示さないが、同様の解析を2.3.4項でも行った(図30)。

主成分分析によれば栄養塩を散布した期間中では、散布区であるAu-8(調査点8の8月)とS-8(調査点8の9月)は他のサンプルとは大きく異っており、一方、栄養塩散布を終了した12月(D-8, D-11, D-13)および翌年4月(Ap-8, Ap-11, Ap-13)においては同時期のサンプルが類似していた。この結果から、栄養塩散布により微生物の群集構造が著しく変化したが、散布終了後3ヵ月経過すると対照区と似通った群集構造に戻ることが示され、栄養塩の影響が消滅したことが明らかとなった。

また、各調査点(8, 11, 13)の時系列変化を追うと、いずれも季節変動による共通の変化を示し、人為的な処理を施さなくても自然界の微生物群集構造は季節変

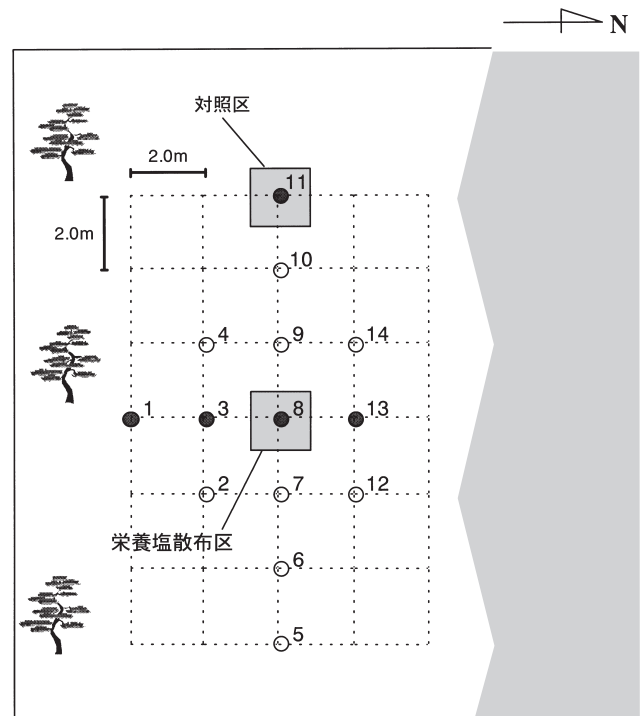


図26 兵庫県城崎郡香住町佐古谷の実証試験現場における間隙水の採取調査点位置  
黒丸で示した調査点において間隙水および微生物試料の採取を行った。

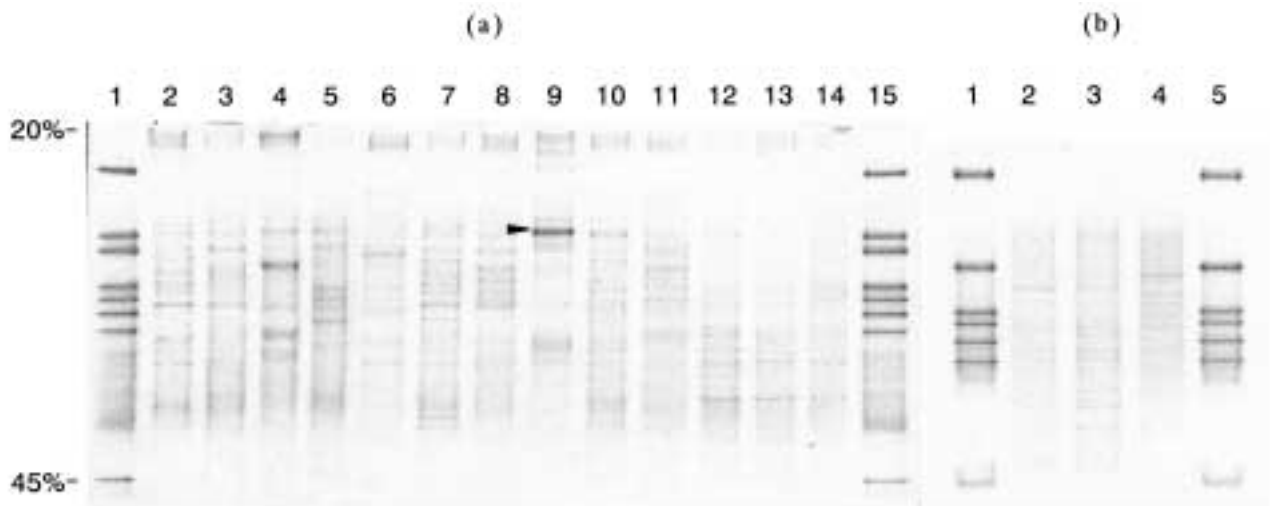


図27 各調査点での細菌群集のDGGEパターン

(a) は平成10年8月, 9月, 12月, (b) は平成11年4月におけるそれぞれ各調査点細菌群集のDGGEパターンである。  
(a) のレーン1, 15は作成したマーカー, レーン2~6は平成10年8月にそれぞれSta. 1, 3, 8, 11, 13から採取, レーン7~11は平成10年9月にそれぞれSta. 1, 3, 8, 11, 13から採取, レーン12~14は平成10年12月にSta. 8, 11, 13から採取した試料を使用。  
(b) のレーン1, 5は同じく作成したマーカー, レーン2~4は平成11年4月にSta. 8, 11, 13から採取した試料を用いた。  
ただし (b) のマーカーではプラスチド由来のバンドは除いてある。  
矢印で示した濃いバンドは切り出して塩基配列を決定した。  
ゲル左側の数字はその位置における変性剤濃度を示す。  
図は階調を反転させてある。

動することが明らかとなった。それぞれの調査点の中でも特に栄養塩散布区であるSta. 8における変動が極めて大きく、これは栄養塩散布の影響が大きいと考えられる。この様に、自然界で生じた目に見えない微生物変動が本手法を用いることによって明らかにされた。

主成分分析の他に、DGGEのバンドパターンを解析するもう一つの方法に多様性指数の算出がある。本解析法も、得られたDGGE泳動パターンを素材として用いるが、各レーンにおけるバンド数が多ければ、そのサンプルには多数の細菌種が存在することを意味する。バンドの多様性はすなわちそれぞれの調査点における細菌群集の多様性を表すことになる。したがって、各レーンの多様性指数を求めて比較すれば、微生物群集の変動を多様性の変動として解析することができる。

多様性指数は、種の豊富さ（DGGEパターン中のバンド数）とそれぞれの種における個体数の多さのバラツキ（バンド数の相対的輝度）という2つの概念を結合させた統計的な数値であり、ここではShannon-Weaver関数 $H'$ を用いた。ちなみに $H'$ は次の式で表される。

$$H' = - \sum P_i \log P_i$$

ただし、 $P_i = n_i/N$ 、 $n_i$ : バンド $i$ のデンストグラムにおけるピーク面積（輝度）、 $N$ : バンドのピーク面積の合計である。

多様性解析の結果を図28に示す。対照区であるSta.11では、 $H'$ は1.07から1.16の範囲にあり、試験期間を通じて多様性に大きな変動はなかった。一方、散布区であるSta. 8においては、栄養塩散布期間中である8月および9月には $H'$ はそれぞれ0.85、0.72と多様性はSta.11（対照区）に比べ低かった。しかし、栄養塩散布が終了した12月および平成11年4月になるとそれぞれ1.20、1.18と高くなり、Sta.11とほぼ同等であった。多様性指数による解析結果と主成分分析結果を比較すると、若干の異なった点が見られるものの、全体的な変動傾向は一致しており、これら解析手法が有効であることが示された。

以上の結果から、PCR-DGGE法を用いることにより、培養を伴った従来法では不可能であった自然環境中の細菌群集構造変化の解析を可能にすることができた。また、

これまで環境浄化対策の終了時点を明確に示す手法はなかったが、本手法はその決定に際し有効なツールとなり得る可能性を示した。

### 2.3.3 クローンライブラリー法で明らかになった環境への影響

DGGE法は多くの試料中の細菌群集をバンドパターンとしてとらえることができ、試料間の細菌群集構造を比較するには非常に適した方法であるが、バンドの分離能の限界上詳細な細菌群集の解析には適していない。環境影響を種レベルでより詳細に検討したい場合には、多くの細菌種を検出する必要がある。このため、各調査点から採取した間隙水から全DNAを抽出し、このうちの16S rDNAのほぼ全長をPCRで増幅した後、必要に応じていつでも目的のDNAを取り出せるようにクローン化した。ここでは、取り扱いが簡単な大腸菌にプラスミドベクターを介して目的の遺伝子を取り込ませクローンライブラリーを作成した。このライブラリーには各種細菌の16S rDNAが収集されていることになる。

次いで、ライブラリー中の16S rDNAコレクションから手当たり次第にピックアップしてDNAの塩基配列を解読し、その情報に基づいて系統樹を作成して試験区の

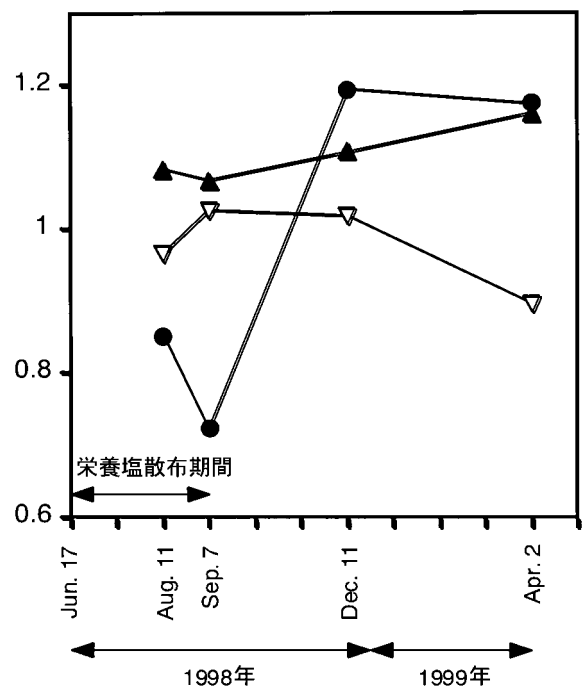


図28 各調査点での細菌相の多様性変化  
DGGEパターン中のバンド数およびその相対的輝度より各調査点細菌相の多様性指数を算出した。各シンボルはそれぞれ●Sta. 8 (散布区), ▲Sta. 11 (対照区), ▽Sta. 13を表す。

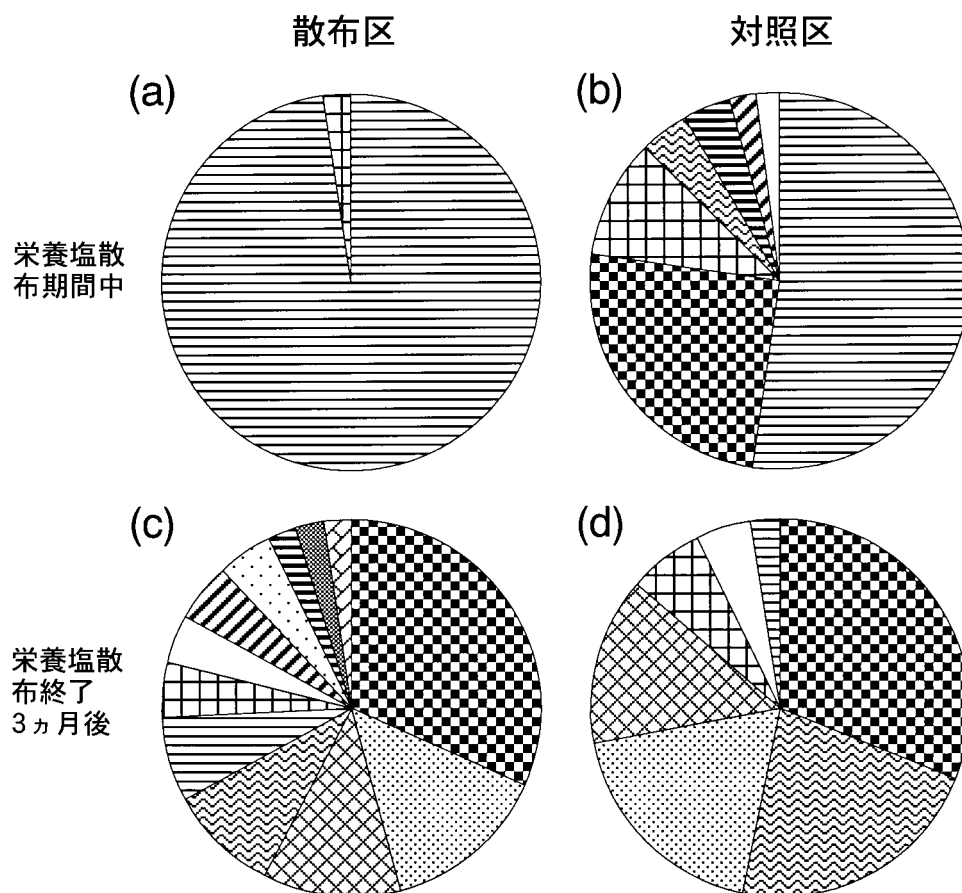


細菌群集構造の解析を行った。系統樹は、各クローンの塩基配列の類似性に基づいて統計学的に作成されるもので、類似した菌株は近接した枝に分布し、違いの大きい菌株同士は離れた枝に位置することになる。

栄養塩散布期間中の9月では散布区 (Sta.8) および対照区 (Sta.11) を比較すると、散布区から得られたクローンの大部分が類似した塩基配列を示したために、系統樹では一つのグループを作り、特定の細菌が優占したことを示した。一方、対照区から得られたクローンは系

統樹中で分散して多様に存在し、様々な細菌種が存在したことを示した。次いで、栄養塩散布終了後3ヵ月が経過した12月における散布区および対照区の系統樹を構築した結果、9月の系統樹とは明らかに異なり、散布区と対照区のクローンは系統樹中で多様に入り混ざって混在していた。つまり、栄養塩を散布した区およびしない区のどちらにも様々な細菌種が存在し、多様性に富んでいたことが示された。

以上から、栄養塩を散布することにより細菌群集構造



### Division and Subdivision

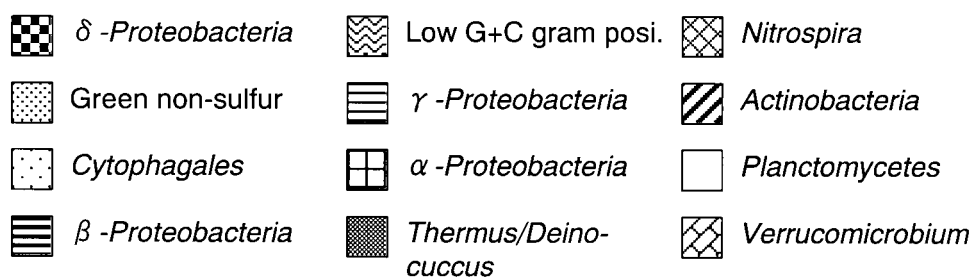


図29 栄養塩散布中である平成10年9月の散布区 (a), および対照区 (b), 栄養塩散布終了後3ヵ月が経過した12月の散布区 (c), および対照区 (d) のクローンライブラリーをdivisionレベルで分類し、円グラフで表した。クローン総数は、(a) 46, (b) 48, (c) 43, (d) 42である。



は大きく変化して特定の菌種が優占化したが、散布を止めて3ヵ月が経過すると栄養塩を散布しなかった場所と同じように多様性に富んだ細菌群集に戻る事が明らかとなった。この現象は、図29に示したように各クローンライブラリーを分類学上の属よりも大まかなディビジョンレベルで分類して表すと、いっそう明瞭に示された。9月の散布区では、全クローンのうち約90%がγグループに属する同一の菌株であったのに対し、散布終了後には各種のグループに属する細菌群集構造に回復したことが明らかとなった。これは、上記のPCR-DGGEを用いた解析結果と一致しており、異なる2つの分子生物学的手法により同様の結果が得られたことは、実際の現場での細菌群集構造の変動をかなり正確に把握できたと考えられる。

9月の散布区において全体の約90%を占めていた優占種に関し、16S rDNAの全領域の塩基配列を決定し他の菌株との相同性を検討した結果、*Pseudomonas putida*と最も近縁の株であった。*P. putida*は土壌や水中に普遍的に検出される細菌で、様々な脂肪族および芳香族炭化水素を分解する菌としても知られている。栄養塩散布により優占化したクローンが、石油分解にどの程度関与したかは明らかではないが、何らかの関連はあると考えられる。いずれにせよ、栄養塩散布により*Pseudomonas putida*の近縁株が優占化し、散布終了後には速やかに無処理の対照区の群集構造と同様になり、バイオレメディエーションにおける安全性の確保が得られたと言えよう。また、16S rDNAのクローンライブラリー法を併用することでより詳細を明らかにすることができ、バイオレメディエーション技術の細菌群集への影響評価はもちろん、広く自然環境中の細菌群集構造変化を解析するために強力なツールとなり得ることが判明した。

### 2.3.4 どの位の栄養塩を添加すれば良いのか？

散布する栄養塩の量的変化に伴い、細菌群集の受ける影響がどの様に変動するのかを調べるため、2.1.3項で述べた佐古谷海岸で行った現場試験の試料について、細菌群集構造の変化を観察した。全DNAを海砂サンプルから抽出し、PCR-DGGE法を用いて細菌群集構造変化を解析した。この結果、無肥料試験区では試験開始時とほとんど変わらないバンドパターンの変化を示していたが、栄養塩添加量が多くなるにしたがって、バンドパターンの経時的変化度合いも大きくなる事が示された。

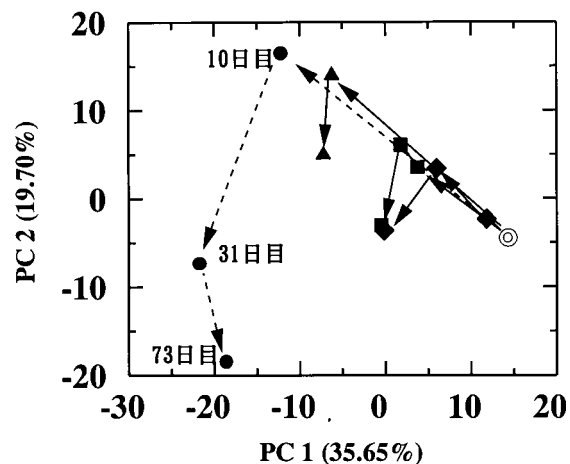


図30 平成12年度佐古谷海岸で得た試料についてDGGEバンドパターンの主成分分析による解析

○肥料添加前, ◆無肥料, ■N 1 g, P 0.2 g, ▲N 3 g, P 0.6 g, ●N 15 g, P 3 g, ・PC1は第1主成分, PC2は第2主成分を表す。

このDGGEバンドパターンを主成分分析にかけて、構造変化を視覚的により分かりやすくなるよう試みた(図30)。その結果、無肥料試験区では試験開始時の位置からあまり大きな移動は見られないが、栄養塩添加量が多くなるにしたがいその移動度合いも大きくなり、最も添加量の多い試験区では、試験開始時と大きく異なった位置に移動し、特に31日目までの移動が著しいことが認められた。このことから、栄養塩散布による細菌群集構造の変遷は散布量が多くなるほどに大きくなり、その変化は散布の初期段階で大きく、この間に油成分の分解が促進されたものと考えられる。この結果を油成分の化学分析結果と照合すると、細菌群集構造を大きく変えるほどに栄養塩を添加しないと分解促進効果は得られないことが示された。

### 2.3.5 油分解菌の挙動をどうやって調べる？

石油は、多種多様な化合物の混合物であり、含まれる化合物の数は数万を超えると考えられる。しかし同定されている化合物はごくわずかであり、しかもその組成は産地によって異なる。しかし、石油は大まかに飽和分、芳香族分、レジジン分、アスファルテン分の4成分に分画され、このうち微生物分解の対象となる主な成分はアルカン類と芳香族化合物であるから(2.1.3項参照)、これら化合物の分解菌に着目すればほとんどの油分解菌を包括することができると考えられる。図31にアルカン類の代表としてn-オクタンの分解経路を、また図32に芳香族化合物の骨格であるベンゼン環の分解経路を示した。

まずアルカン分解菌は、アルカンの末端を酸化することでアルコール→アルデヒド→高級脂肪酸へと順次変換し、最終的には完全分解すると考えられている。その過程でオクタンだけでなく他のアルカン類においても高級アルコールまで分解するのにアルカン-1-モノオキシゲナーゼ（アルカンヒドロキシラーゼ）遺伝子すなわち*alkB*を利用して分解するという共通点を持っている。したがって、環境中のアルカン分解菌を特異的に検出するには、*alkB*を対象にすればそのほとんどを網羅できると考え、この分解酵素遺伝子の特異的に検出するため、目的とする塩基配列だけを増幅するためのPCRプライマーを設計した。この手法の有効性は、各種のアルカン分解菌を使って立証することができた。

また芳香族化合物の分解経路では、図32に示したように、ベンゼン環の分解によってカテコールが生成される。このカテコールの分解は、メタ開裂に関与するカテコール-2, 3-ジオキシゲナーゼ（以下C23O）遺伝子、オ

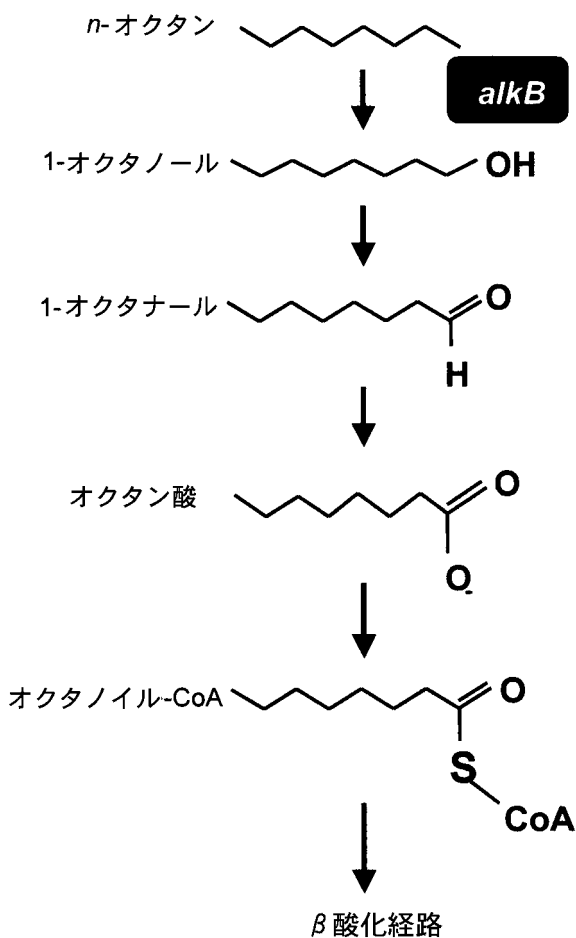


図31 n-オクタンの分解経路

ルト開裂に関与するカテコール-1, 2-ジオキシゲナーゼ（以下C12O）遺伝子の各分解酵素遺伝子により2つの経路に分かれ、最終的にはTCAサイクルへと代謝される。そこで、芳香族化合物分解菌を環境中から特異的に検出するには、この2つの分解酵素遺伝子に着目すれば、この分解系を有する油分解菌を検出できると考え、それらを特異的に検出できるPCRプライマーを設計し、各種の芳香族化合物分解菌を使ってその有効性を立証できた。

### 2.3.6 油分解に貢献する微生物は？

上記で作成した油分解菌検出用プライマーを用いて、平成12年に実施した現場実証試験（2.1.3項）のサンプルに適用し、それらの経時変化を解析した。検出には、定量的な測定も可能なりリアルタイムPCR法を用い、各分解酵素遺伝子の定量化を試みた。リアルタイムPCR法では、PCR産物の増加に伴って蛍光強度も増加し、

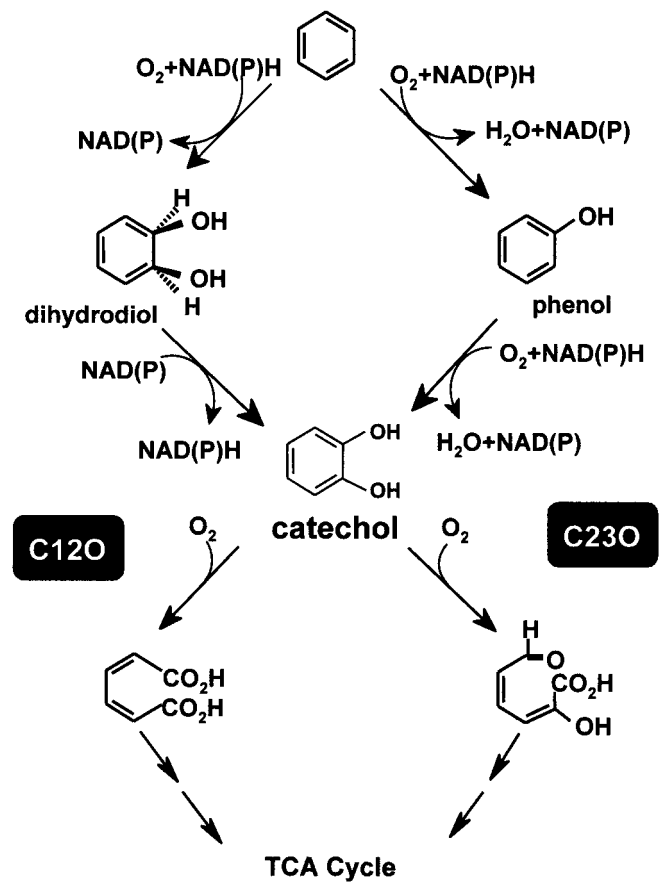


図32 芳香族化合物の分解経路

蛍光を測定することにより産物量を定量することができる。

まず栄養塩の添加前では、*alkB* (Group I) および *alkB* (Group II) とともに検出限界以下であったが、10日目にはわずかに増幅し、31日目には顕著な増幅が見られた(図33, 34)。その後73日目には、31日目の3分の2程度まで減少した。このことから、本試験では*alkB*を保持するアルカン分解菌が栄養塩添加によって試験初期の短期間に増殖し、油成分の分解を促進させたものと考えられる。また、73日目では遺伝子量が減少したが、それ以前にすでにアルカン類の分解が十分に行われ、残存量が少なくなったためと考えられた。これは、石油成分の分解の結果(図10)と一致している。また、C12O遺伝子では、栄養塩添加前および10日目には検出限界以下であったが、31日目にはDNA量が急激に増幅した(図35)。これは、10日目から31日目にC12O遺伝子を保有する微生物が増殖し、油成分の分解を促したものと考えられる。化学分析からも、芳香族化合物のうちナフタレン類、ジベンゾチオフェン類、フルオレン類、フェナンスレン類は31日目までに50%以上分解されることが示されており、本解析結果と一致している。

一方、C23O遺伝子は*alkB*及びC12O遺伝子で見られた結果とは異なり、遺伝子量の増加は見られず、つまり、本試験において芳香族化合物分解菌のうちC23O遺伝子を保有する微生物は対象地域にはあまり存在せず、油成分の分解に貢献しなかったものと考えられる。

さらに、現場試料より油分解菌を分離し、DNAの塩基配列を解析することにより微生物の同定を試みた。この結果、*alkB*を保有する*Rhodococcus*属が数多く検出されたことから、本実証試験において対象地域で優占化して油成分の分解を促進させたのは*Rhodococcus*属であることが強く示唆された。

## 2.4 石油バイオレメディエーション実施時の生物影響

実際の海域でのバイオレメディエーション実証試験の安全性を評価する方法としては、試験海域周辺の生物相の変化をモニターすることや、試験海水を試験水として用い室内で飼育した植物プランクトンや小型動物に暴露させ、その毒性を調べる方法などが知られている。前者では試験の規模が小さくまた長期にわたる場合、周辺海域の生物相の季節変動が大きいことにより、その変動が自然のものか試験の影響かを区別することがはなはだ困

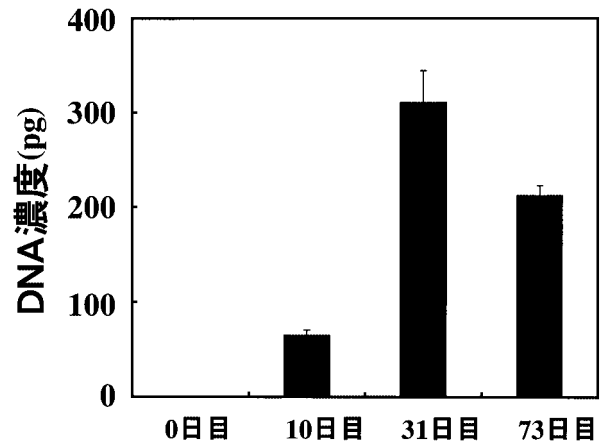


図33 リアルタイムPCRによる*alkB* (Group I)の経時的解析  
0日目は検出限界 (50pg) 以下として評価された。

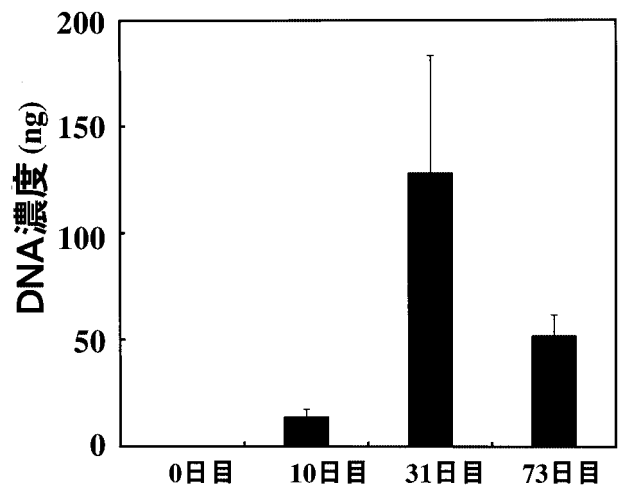


図34 リアルタイムPCRによる*alkB* (Group II)の経時的解析  
0日目は検出限界 (3.125 ng) 以下として評価された。

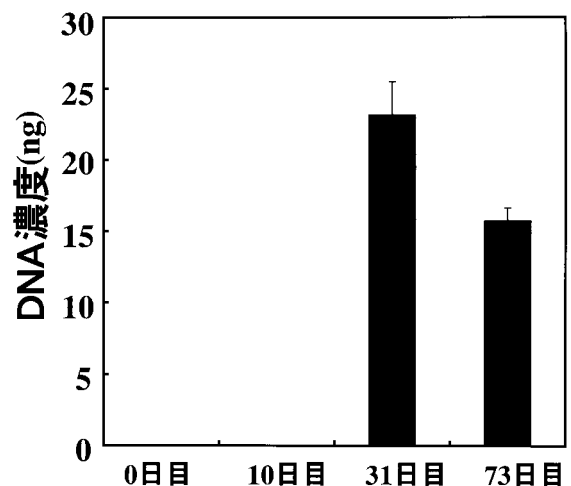


図35 リアルタイムPCRによるC12Oの経時的解析  
0日目および10日目は検出限界 (500 pg) 以下として評価された。

難な場合が多い。一方、後者では培養や飼育が容易な生物を用いることにより簡便で短期間による生物影響を把握できるメリットがある。ここでは後者の方法を用い、試験海域に生息していた小型甲殻類や、毒性試験としてよく使用されている植物プランクトンを使用した生物影響評価試験を実施した。

#### 2.4.1 海洋性小型甲殻類を用いた影響評価試験

石油バイオレメディエーションに用いる肥料などによる実施時の生物影響を評価するために、本研究ではまず急性毒性試験の供試生物の探索から開始した。試験生物として備えていなければならない条件は幾つかあり、汚染物質に対して感受性が高いこと、生息分布域が広範囲であること、実験での操作が容易であること、さらに、野外及び室内で十分な量の生物個体が得られることなどがあげられる。一般的に甲殻類は汚染物質に対し高い感受性をもつ生物として知られており、また、我が国の沿岸に普遍的に存在することから、本研究では、適切な海洋生物として海洋性小型甲殻類を選定した。今回選定した種は、日本沿岸域に広く分布し、体長2～10mmとピペット操作で採取が可能で、当研究所において室内での繁殖法が確立しているヨコエビの1種であるフサゲモクズ (*Hyale barbicornis* : 図36) である。

そこで初めに、このヨコエビが石油関連物質に対してどのような感受性を持っているのか試験を行った。試験液として、C重油と海水を激しく混合させた際に水相に溶け出した石油成分である水溶性画分、1989年のアラ

スカでの原油流出事故の際にバイオレメディエーション用栄養剤として実際に漂着油汚染現場に散布されたフランスelf社製のInipol EAP22、重油水溶性画分とInipolを混合させたものの3種類を用意した。それぞれ、C重油の水溶性画分(図37中、W-で表記)では1, 10, 50, 100%の4濃度、Inipol EAP22(図37中、I-で表記)では10, 100, 500, 1000 mg/lの4濃度、重油水溶性画分(W-100)とInipol (I-100)を混合させたもの(図37中、F-で表記)では1, 10, 50, 100%の4濃度について、ヨコエビの感受性を検討した。

ヨコエビを無給餌で10日間飼育し、その生残を観察した結果、対照区において、全てのヨコエビが96時間(4日間)生残したことにより、各種試験の4日間の生残率を比較した(図37)。これより重油水溶性画分の各濃度ではヨコエビに大きな影響は見られなかったが、



図36 フサゲモクズ *Hyale barbicornis*  
日本の沿岸部に広く分布する甲殻(端脚)類

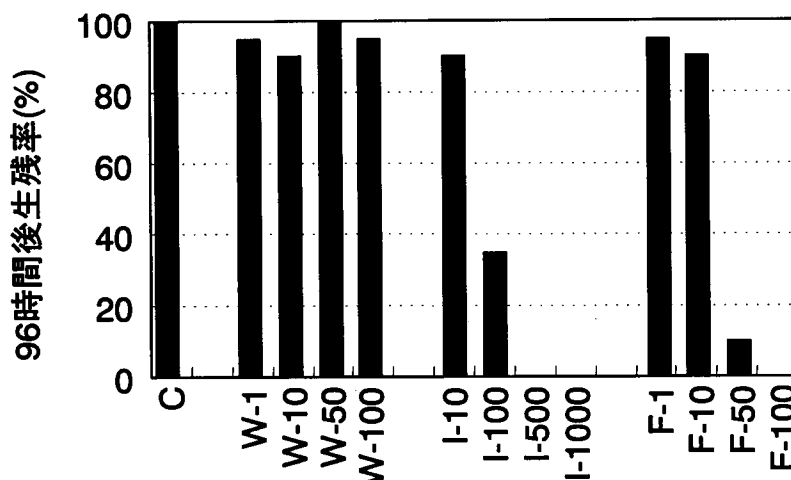


図37 各種試験液における96時間(4日間)のヨコエビの生残率

C: 対照(無添加), W: 重油水溶性画分を添加, 数字は海水に対する水溶性画分の割合(%), I: Inipolを添加, 数字は濃度(mg/l), F: 重油(W-100)とInipol(I-100)の混合液を添加, 数字は海水に対する混合液の割合(%)



Inipolでは100~1000mg/l、重油水溶性画分とInipolを混合させたものでは50%と100%に高い毒性が見られた。その中でも特に興味深いのは100%水溶性画分とInipol 100mg/lを混合させて作成した混合物100%の生残率がゼロという値になったことである。Inipol 100mg/l単独での生残率は35%であったにもかかわらず、重油水溶性画分と混合したことによって生残率が大きく低下してしまった。このことは2種類の物質を混合した場合その毒性は単独のものより強くなることを示しており、これまでよく知られている現象を、今回追認することができた。

表5 Inipol EAP22の96時間LC50値の比較

供試生物	96時間LC50 (mg/l)
本試験生物ヨコエビ	44
アミ	15
モエビ	360
チグリオプス	53
サケ	1500
ニシン	100
ヒラメ仔魚(日齢20日)	17
ヒラメ仔魚(日齢30日)	153
シロギス稚魚(日齢120日)	224
アコヤ貝(月齢21ヵ月)	636

次にヨコエビの感受性をInipolの96時間の半数致死濃度LC50について既往文献から求めた他の海洋生物と比較した結果(表5)、ヨコエビの感受性はアミやヒラメ仔魚には若干劣るものの、感受性の高い生物群の部類に属することが判明した。本種は繁殖率の高さや飼育が容易なこと、また広範囲におよぶ生息分布などからみても、試験生物としての能力を備えていると思われた。

#### 2.4.2 海洋性小型甲殻類による石油バイオレメディエーション現場試験の安全性評価

まず現場試験の安全性を評価するまえに、化学物質としての肥料自体の毒性を調べた。始めに肥料を海水へ溶出させるために窒素肥料(IBDU) 220mg/lとリン肥料(リンスター30) 44mg/lを海水36lに添加し、通気を施した。この海水を2~4週間間隔で採水し、その栄養塩を分析した。肥料の窒素濃度はアンモニア態として、リンはリン酸態として溶出し、前者は38日目以降急激に増加し最大7mg/l近くに達したが、後者は23日目まで増加し、その後安定した(図38上)。この栄養塩の溶出過程から、現場においても初めの1ヵ月間でリン酸態リンや硝酸・亜硝酸態の無機窒素が速やかに溶出し、その後、アンモニア態窒素が溶出することが推察された。

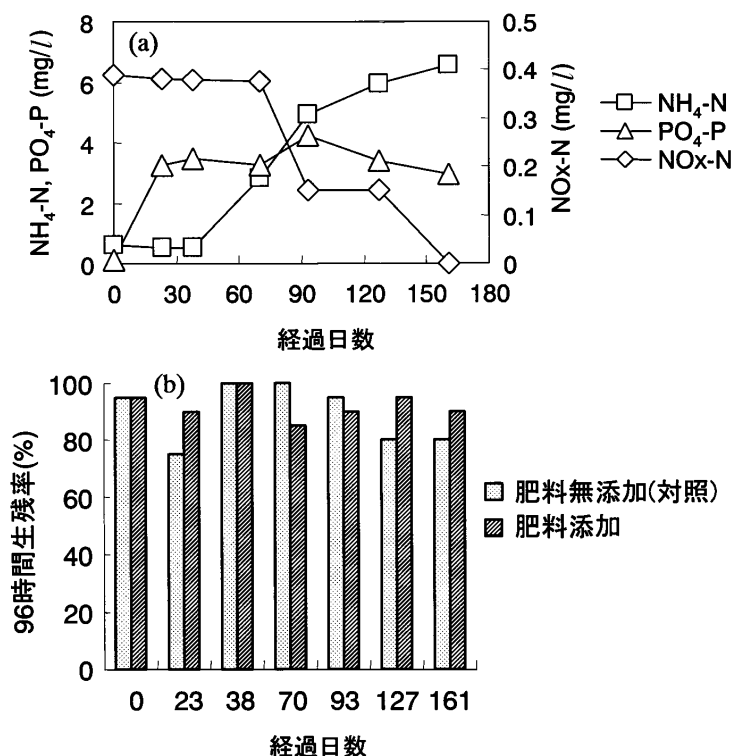


図38 石油バイオレメディエーション現場試験に用いた農業用緩効性肥料顆粒からの栄養塩の溶出 (a) とその溶出液中におけるヨコエビの生残率 (b)

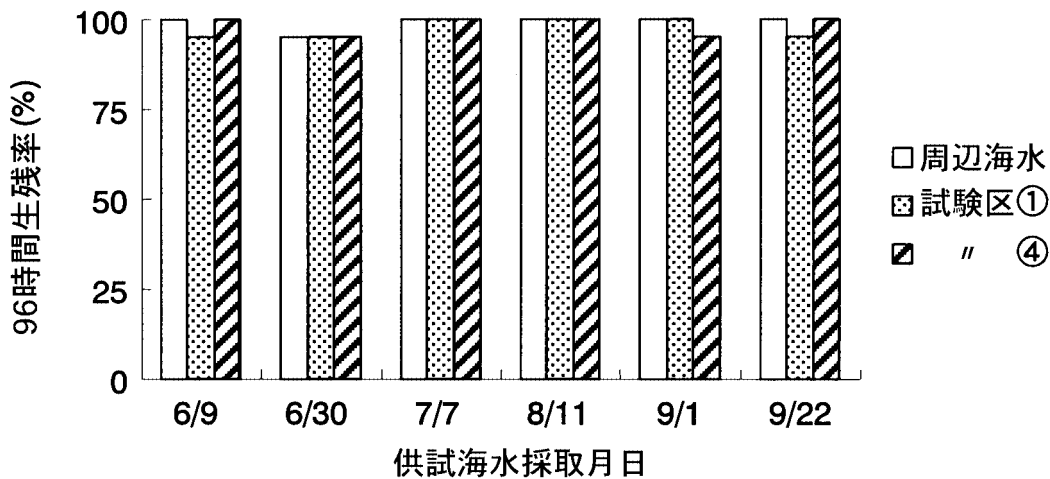


図39 日本海佐古谷海浜部における石油バイオレメディエーション現場試験用アクリル容器内海水を用いたヨコエビの生残試験  
試験区①は肥料無添加区，試験区④は肥料添加区。添加肥料については，2. 1. 3項，および表2を参照。

肥料溶出液の毒性試験はヨコエビ幼体を用いて4日間の急性毒性試験（生残率）とした。試験日は上記採水日と同様で2～4週間間隔で行った。試験液800mlに10個体の幼体を投入し，絶食とした。試験は2回の繰り返しとした。試験結果において，いずれの試料においても対照区に比べ大きな差は認められなかった（図38下）ことより，高いアンモニア態窒素とリン酸濃度にもかかわらず肥料溶出液にはヨコエビに対する毒性は認められなかった。

兵庫県佐古谷におけるバイオレメディエーション現場試験での安全性評価において用いた試験海水は2. 1. 1項

で述べた試験現場に設置したアクリル容器内の海水を経時的に採取したものである。毒性試験方法は上記肥料毒性試験法と同様にした。毒性試験結果はいずれの試料においても対照区に比べ大きな差は認められなかった（図39）。このことから，本試験からは毒性のある物質は溶出していなかったと判断された。

種子島海岸部におけるバイオレメディエーション現場試験での安全性評価において用いた試験海水は2. 2節で述べた試験現場に埋設した原油-海砂混合試料が入っているステンレス籠下部に設置した採水用タンク内（図20）に貯まった海水を経時的に採取したものである。

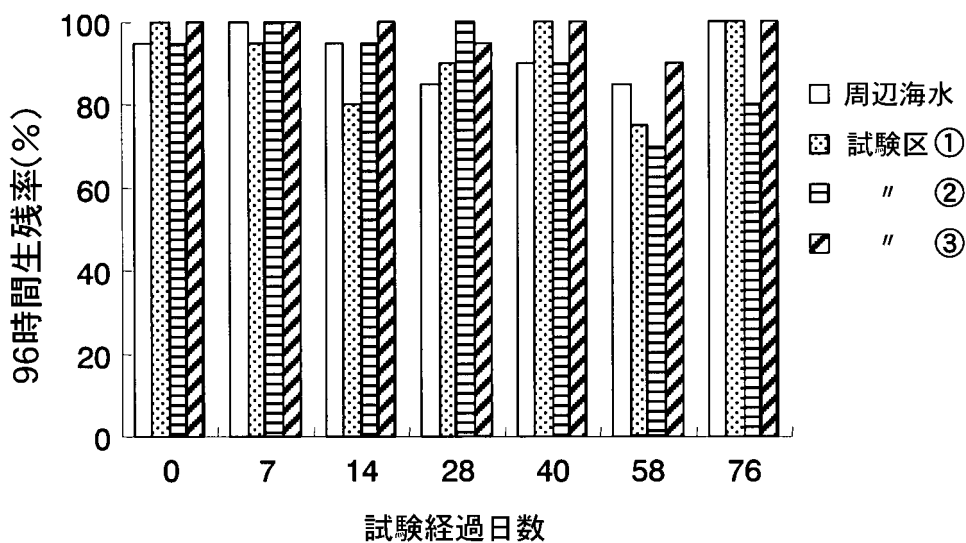


図40 種子島東海岸部における石油バイオレメディエーション現場試験用ステンレス籠下容器内海水を用いたヨコエビの生残試験  
試験区①は肥料無添加区，試験区②，③は肥料添加区。添加肥料については，2. 2. 3項，および表4を参照。

その毒性試験結果はいずれの試料においても対照区に比べ大きな差は認められなかった(図40)。このことから、兵庫県佐古谷での試験同様、本試験からは毒性のある物質は溶出していなかったと判断された。

以上の結果から、今回の石油バイオレメディエーション試験の規模では、少なくとも現場周辺海域に生息する海産動物への影響は小さいものと考えられる。今後、安全性評価を実行する際に、供試生物として甲殻類以外の生物を考慮する必要があるだろう。さらに、本報告で述べた急性毒性だけでなく、慢性毒性試験法についてもその試験方法の開発を行い、両者合わせて実施することにより総合的な評価を検討する必要があるだろう。

#### 2.4.3 藻類培養試験を用いた影響評価試験

湖水や海水に存在する藻類(植物プランクトン)を用いて、生物学的に水質を評価する手法が知られている。藻類生産の潜在能力を測定するもので、AGP(Algal Growth Potential)試験と呼ばれ、採集した試水に藻類増殖に必要な栄養塩などを添加して増殖量を測定する。一般には、水域の富栄養化度の判定や増殖を制限する栄養塩の推定等に利用されるが、藻類増殖に対する阻害物質の有無の推定にも利用可能である。ここでは、石油バイオレメディエーション剤の現場への適用が富栄養化をもたらさないか、藻類の増殖に悪影響を与えないかを中心に、環境に与える影響評価手法の一つとしてAGP試験を用いた。対象とした藻類は、日本沿岸海域に広く分布する珪藻*Skeletonema costatum*(以下*S. costatum*と略す)を選定した。

培養中の藻類増殖量を測定するために、培養液のCOD、クロロフィル*a*量を測定するなど種々の手法が適用されている。しかし、培養期間中に毎日これらを測定するには、測定作業の煩雑なこと、分析に供するに足るだけの大量の培養液が必要なことと相まって、一度に多試料の測定は困難であるなどの問題点があった。そこで、本研究では培養容器と吸光度測定用のセルを兼ねる培養容器を使用してクロロフィル*a*量で藻類増殖量を評価した。長さ120mm、内径22mmの平底試験管を培養容器とし、分光光度計の光電子増倍管の直前に固定できるようにセルホルダーを自作して、可視吸収スペクトルを測定した(図41)。

培養容器に海水20mlを封入して*S. costatum*を培養した。培養容器を直接分光光度計にセットして750nmを

対照光とした培養液の差吸収スペクトルを測定し、吸収スペクトル上の640nm付近と700nm付近の変曲点に接するように引いた直線と吸収極大点Pから波長軸に下ろした垂線との交点Qとの距離PQ(O.D.)を増殖量の指標とした(図42)。

#### 2.4.4 藻類培養試験によるバイオレメディエーションの生態系影響の評価

日本海海域で採取した海水の0.8μmのヌクレポアフィルターを用いてろ過したものと、ろ過処理をしないもののそれぞれに、増殖試験のため栄養塩類を加えたものと、無添加のものを培地として用意し、それらに*S. costatum*を接種して培養を行った。また、佐古谷海岸部の間隙水を播磨灘沖合いの海水に添加した試水と佐古谷海岸部周辺の海水のそれぞれをろ過滅菌し、*S. costatum*の培養実験を行った。

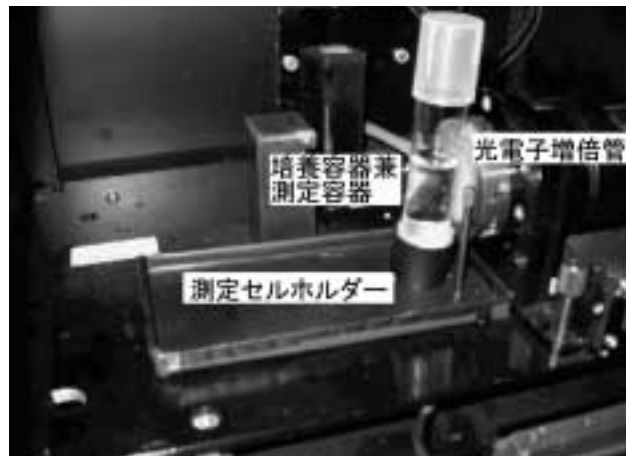


図41 日立製作所製U-4000紫外可視分光光度計の試料測定室内と培養容器

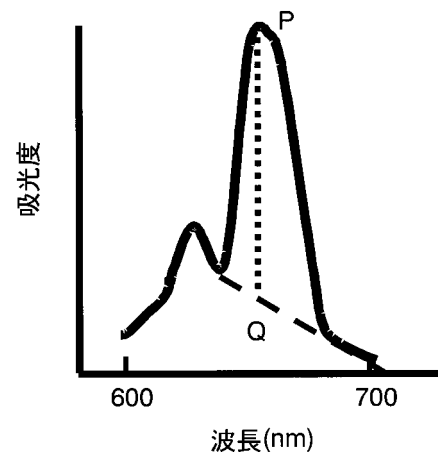


図42 植物プランクトンの吸収スペクトルと増殖量測定のための解析方法

(1) 現場海水中での珪藻*S. costatum*の増殖特性

石油バイオレメディエーション現場試験を行った佐古谷付近(図1参照)の無南垣, 居組, 竹野地区周辺の海域の海水はいずれも貧栄養であり, 栄養塩を添加しなければ*S. costatum*は増殖しなかった(図43(a))。また栄養塩類を添加したものは, 対照とした瀬戸内側の播磨灘沖海水に栄養塩類を添加したものと同様に増殖し, 増殖阻害物質や細菌の存在は認められなかった。ろ過処理しない海水では動物プランクトンが増殖したため, 到達最大増殖量がやや小さくなるものの, 顕著な増殖阻害効果は認められなかった。

佐古谷海浜部の間隙水及び海水の培養実験の結果を図43(b), (c)に示した。海水は採取時期によって*S. costatum*の増殖を強く阻害する場合があります, 対数増殖が開始されるまで4~6日の誘導期間を要した。また間隙水を添加した海水では添加量が多いほど, 誘導期が長くなった。この間隙水は海水と近くの山からの伏流水とが混ざったものである。この増殖阻害効果が海水によってもたらされたものか, 伏流水によってもたらされたものかは不明であった。また異なる時期に採取した海水では増殖阻害の効果は全く認められなかった。これより, この増殖阻害効果は時期的に変動の大きい物質によってもたらされたものであると推察されたが, どのような物質であるかは判明しなかった。

(2) 石油バイオレメディエーション現場試験海域での植物プランクトンの増殖特性

兵庫県佐古谷におけるバイオレメディエーション現場

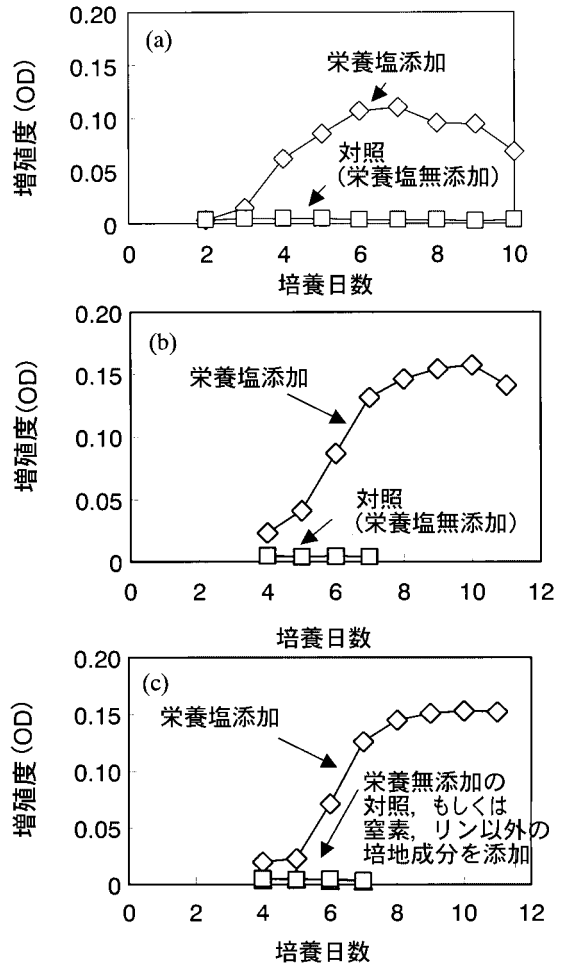


図43 日本海沿岸兵庫県城崎郡各海岸部における試水を用いた珪藻*S. costatum* 増殖特性  
(a) 無南垣, 居組, 竹野地区の海水, 佐古谷海浜部  
(b) 間隙水, および (c) 海水

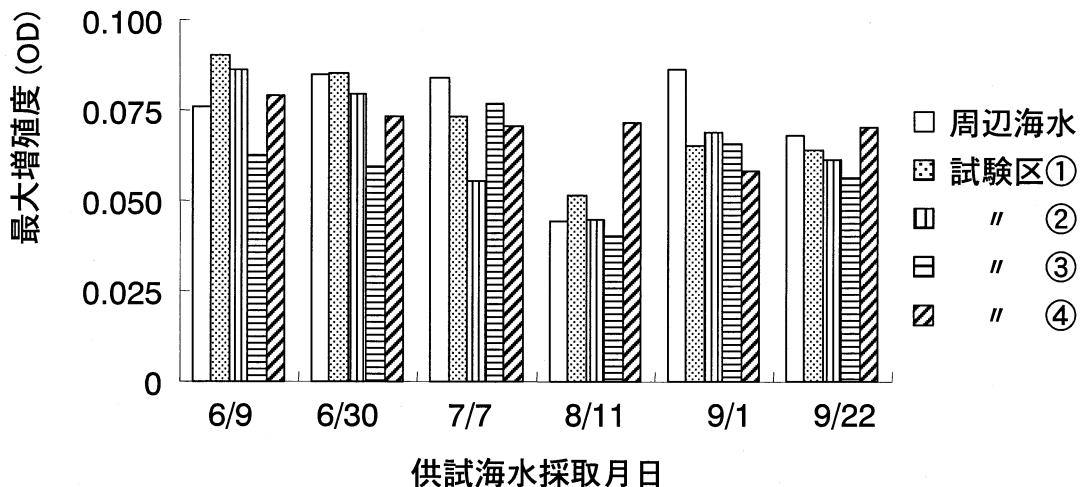


図44 日本海佐古谷海浜部における石油バイオレメディエーション現場試験用アクリル容器内海水の珪藻*S. costatum*を用いたAGP試験  
試験区①は肥料無添加区, 試験区②~④は肥料添加区。添加肥料については, 2. 1. 3項, および表2を参照。



試験の概要は2.1節で述べた通りである。この現場試験による海域生態系への影響を調べるために、増殖に必要とされる窒素、リン、シリカ、重金属類およびビタミン類を添加したもの（全添加と略す）、栄養塩類無添加のそれぞれの条件で*S. costatum*の培養を行った。

全添加の増殖状況から阻害作用の有無、栄養塩無添加での増殖状況から、富栄養化の進行状況を評価した。AGP試験の最大増殖量を採取日ごとに図44に示した。全添加の各試料で*S. costatum*の増殖状況に誘導期間の延長、増殖量の減少等、増殖阻害物質の影響は認められなかった。栄養塩無添加試料での増殖状況はシリカ添加試料での増殖量より小さいことより*S. costatum*の増殖はシリカ、窒素或いはリンによって制限されると考えられる。試料中での増殖状況はバイオレメディエーション実験によって散布された栄養剤の影響を反映すると考えられ、沖合い海水、および試験区直近、試験区域内で採取した海水では全く影響は認められなかった。

以上の結果より、藻類の増殖から評価した場合には、今回用いたバイオレメディエーション用の肥料の導入は環境に大きな影響を及ぼさなかったと考えられる。

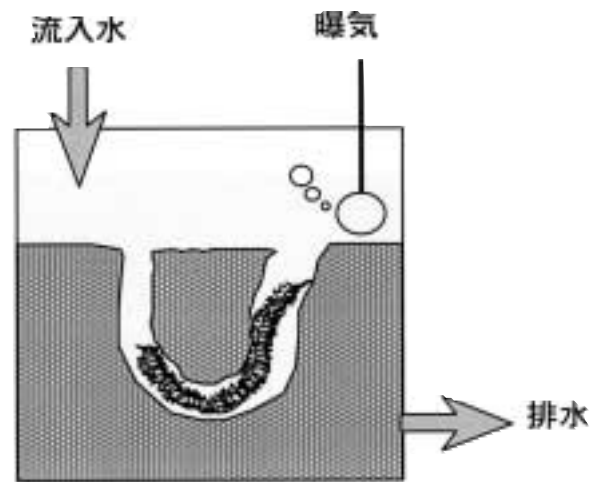
## 2.5 底質を含む簡易モデル生態系（マイクロゾム）による石油分解と生態系影響評価

### 2.5.1 はじめに

海洋に流出した石油の流達場として浅海域、沿岸域などがあるが、中でも干潟は、ゴカイ、アサリなどの底生生物の摂食行動による有機物の浄化や、潮干狩り、野鳥観察などのレクリエーション、また、稚魚・幼魚の育成の場であり、極めて特殊かつ社会生活上でも重要な位置にある。このような場所において油流出事故が発生した場合、景観の悪化や悪臭を発生し、また、移動力に乏しい貝類などの底生生物は多大な影響を受け、さらに海産資源を生活の糧にしている地元住民にも深刻な被害を与える。

以上のように、重要な浄化の場としての干潟に及ぼす影響については、エコトーンの保全や汚染環境の修復、影響評価などといったアセスメントを行う意味でも重要であるが、このような場をモデルとした生態系影響評価手法については要望されているものの、研究成果が少ないのが現状である。

本研究では上記の点をかんがみ、干潟の底生動物を主要構成生物とした干潟生態系モデルの構築と影響評価手



供試生物	ゴカイ <i>Neanthes japonica</i> 1系 (150 cm <sup>2</sup> ) につき20個体
供試海水	自然海水+人工排水の混合海水 (500 ml, 海水の塩分15psu) 12時間干満サイクル
供試海砂	東京湾三番瀬の海砂 2 l

図45 干潟モデル実験装置 実験方法の概要

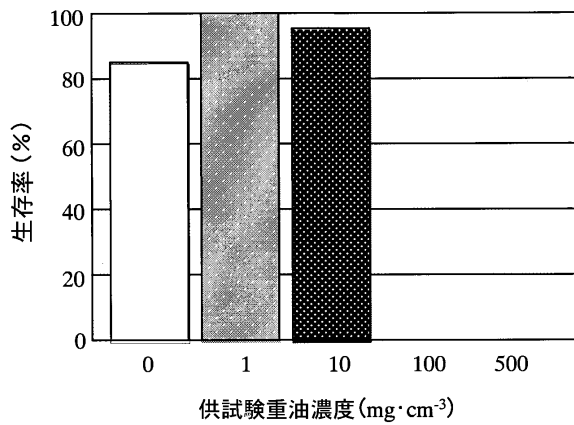
法の確立を目的とし、干潟の底生生物で、他の生物の死骸や有機物の摂食、巣穴での蠕動運動による底質部への酸素の供給等の行動により、有機物浄化の役割を担い、干潟において重要な位置付けにある環形動物多毛類ゴカイ *Neanthes japonica* を用いて、ゴカイ、および細菌類よりなるマイクロゾムを作成し、流出事故を想定した石油、およびその対策としての分散剤等の散布によるゴカイに対する影響、干潟の浄化能力に及ぼす影響を明らかとする石油の影響評価を行った。

### 2.5.2 石油汚染に対する底質モデル生態系の応答

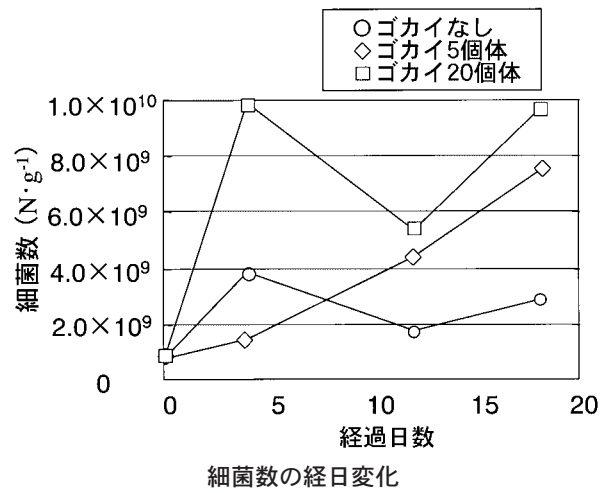
(1) モデル干潟系 (図45) 内において、ゴカイ単独系では重油の急性毒性により巣穴の形成や呼吸阻害等の物理的影響が大きく、半数致死量は71 mg・cm<sup>-3</sup>であった。また、重油濃度が1~10 mg・cm<sup>-3</sup>では通常の摂食量の16~66%に減少するが、試験開始12日後に通常量に回復した (図46)。

(2) 細菌とゴカイの共生下ではゴカイのいない系と比べて細菌の増殖が活発となり、重油成分中のアルカン類の分解率も高まった (図47)。

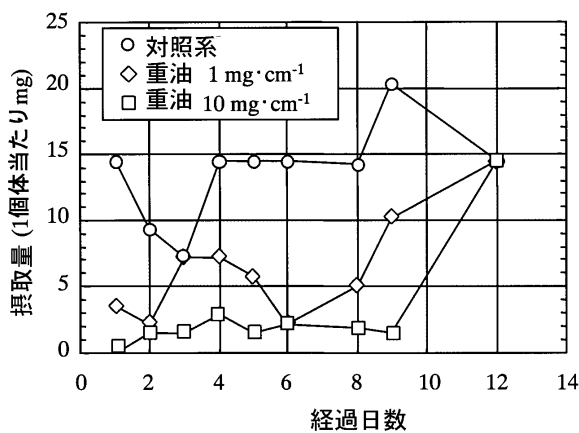
(3) 添加した重油の影響によってゴカイが死亡した系



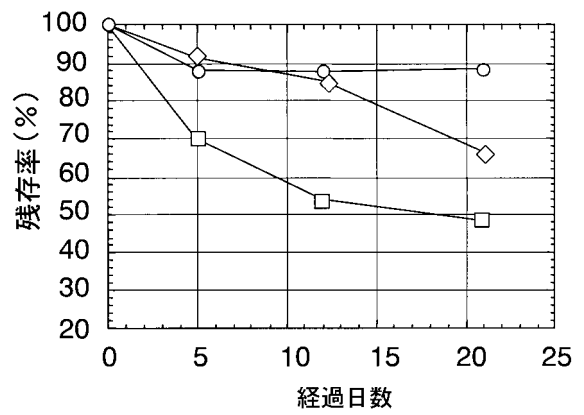
ゴカイの生存率 (1ヵ月後)



細菌数の経日変化



ゴカイの摂取量の経日変化



重油成分 (アルカン) の残存率

図46 ゴカイに及ぼす重油の影響

図47 ゴカイの存在が細菌数と重油の分解に及ぼす影響

では、死骸由来の有機物やその分解産物が大きく影響することで水質が悪化し、重油添加前の通常の水質に回復するまで要した期間は20日間であったが、ゴカイが重油による影響を受けても生存し続けた系においては水質への影響が見られなかった。

(4) 流出した重油に対する化学的処理として散布される分散剤は、海水中の分散剤濃度が規定範囲濃度であれば底生動物には安全であるが、単純に重油の濃度に合わせて多量に散布した場合、高い毒性として影響があることが分かった。

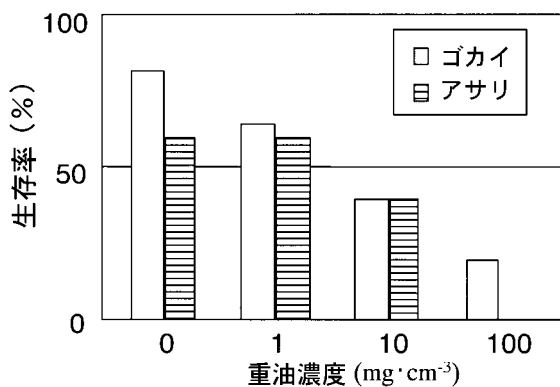
(5) 多毛類としてのゴカイ、および貝類としてのアサリの共生下では、高濃度の重油の添加によって両生物とも生存率が著しく減少したが、低濃度環境下ではアサリよりもゴカイの生存率が高いことから、アサリは重油などの影響に対して高い感受性を持ち、低濃度でも影響を

受けやすいことが分かった (図48)。

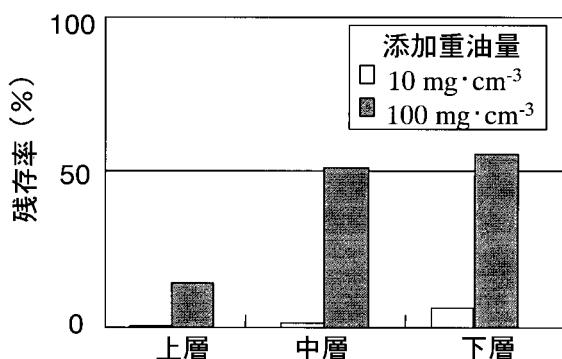
(6) 潮感帯モデルでは、潮の干満によって比較的早く重油を底質部へと浸透させ、生物による重油の生分解を困難にするとともに、重油成分中の高分子化合物は底質の下層に蓄積されることが分かった。

### 2.5.3 底質モデル生態系に残された課題

今後の課題として、重油の生物に対する純粋な物理・化学的な影響のみではなく、干潟に生息する細菌類から魚類・鳥類などの大型捕食動物間における重油成分中の物質循環機構の解明や、生物を取り巻く温度や塩分濃度、有機物量などの環境要因の変化を基にした、実際の現場により近づけた環境下での研究、さらに、影響を受けた生物の次世代への影響なども考慮に入れた長期的な評価も必要であると考えられる。



各重油濃度における生物の生存率



底質中の重油（アルカン）の残存量

図48 ゴカイ・アサリの共存下における各重油の影響

## 2.6 まとめと今後の展望

本研究では、海岸に漂着した石油などの除去技術としてバイオレメディエーションをとりあげ、その有効性と安全性を評価する手法の開発に努めてきた。石油バイオレメディエーションは、実験室系の石油とその分解菌だけからなる単純な系では、その有効性が確かめられている技術である。しかし、実際に漂着油で汚染された現場にこの手法を適用するためには、さらに確認を要する事項が多くあり、適用に先立ち、現場での小規模実証実験が必要とされている。

本研究では、兵庫県の日本海沿岸と種子島に実証実験場を設置し、バイオレメディエーション技術の現場における有効性と安全性につき、その評価技術の開発を目標に研究を遂行した。

兵庫県の日本海沿岸における実証実験では、以下の事柄が明らかになった(2.1節)。

(1) アルカン類、ナフタレン類、フルオレン類、ジベ

ンゾチオフェン類、フェナンスレン類といった石油に含まれる半揮発性化合物については、肥料非添加区でも有意な分解が見られたが、実質的な全分解量は肥料添加区と比較して大幅に少なかった。

(2) 添加肥料量の増加に応じて、石油中の半揮発性化合物の分解速度も上昇した。

(3) 異なった窒素形態を有する肥料の添加効果を比較したところ、無機態窒素よりは有機態窒素の方が高い石油分解促進効果を有することが示された。

(4) 石油除去の収支を試算したところ、実質上の生分解の寄与率が肥料添加区で約2割であり、剥離に伴う物理的除去が4~6割程度と考えられた。

(5) 肥料添加により、石油の分解と汚染担体である海砂からの剥離は共に有意に促進された。

種子島における実証実験では、さらに次のことが明らかになった(2.2節)。

(6) 干満差の小さい日本海沿岸部より潮汐の大きい太平洋沿岸部の方が、石油の分解活性が高く、特にアルカン類に対して顕著であった。

現場実証試験では上記の有効性の検証と同時に安全性の確認を行った(2.4節)。

(7) 海洋性小型甲殻類や珪藻を用いた試験では、栄養塩の付与による悪影響は見られなかった。

微生物群集構造変化の解析から、石油バイオレメディエーションの安全性を評価する手法を新たに開発した(2.3節)。この手法では、以下の点が明らかになった。

(8) 石油の分解の活性化には微生物群集の多様性の低下を伴った。

(9) 土着の微生物群集構造は栄養塩の付与により大きく変化し、多様性は低下したが、時間が経つにつれ復帰した。

(10) 幾つかの代表的な炭化水素化合物酸化酵素の遺伝子量は、栄養塩付与により大幅に増加した。

干潟・砂浜における石油汚染や、バイオレメディエーションの適用による底生生物への影響を簡易モデル生態系による実験で検討した(2.5節)。

(11) ゴカイやアサリといった、浅海域に生息する代表的な底生生物を用いた実験室内での干潟模擬飼育装置による重油の影響評価試験を行ったところ、底生生物に対する重油の影響は、生息空間の物理的閉塞の寄与が大きいたことが示された。また、ゴカイが存在する系では、存在しない系と比較して、系内の細菌数と重油成分の分解

活性が高いことが示された。

以上、本研究で、石油による汚染現場に肥料を添加すると石油分解が促進されることが確かめられた。同時に、本研究を行った2つの現場では、肥料を添加しない試験区でも、ある程度の石油分解が進んだことから、天然の分解能力が高いことも明らかになった。一方、肥料の添加による微生物や甲殻類への影響が小さかった。これらから、バイオレメディエーションが石油汚染現場の修復技術として有効であることが確かめられた。

これらの知見を基に、今後、以下のような事項について、さらなる検討が必要であると考えられる。

(1) 石油微生物分解促進のための窒素、リン以外の添加物質の検討

実験室内での事例では、鉄分の不足が芳香族化合物の微生物分解の律速因子となっている報告があり、今後、他の微量成分と共に、バイオスティミュレーションに有効な外部補給物質の探索とその評価が必要である。

(2) 寒冷海域での石油微生物分解活性の検討

本報告における現場試験は、我が国の比較的温暖な海域における事例が主たるものであったが、北海道沿岸域

等の寒冷海域における実際の石油の分解活性について検討する必要がある。

(3) 他海域における土着微生物の群集構造の変化と石油分解活性との関係解明

石油分解活性化のためには、土着の微生物群集の多様性が低下し、その構造の変化度合いが大きくなることを伴うと述べたが、このことが、異なった海域においても共通した現象であることを確認する必要がある。また、異なる海域での優占化する石油分解菌について比較・検討する必要があると思われる。

(4) 多様な海洋性生物による石油バイオレメディエーションの影響評価

本報告では、ヨコエビ、珪藻による影響評価を行ったが、他の多様な水産資源生物を利用した生物影響評価についても検討すべきである。

(5) 石油除去の目的設定

現状では、海洋環境における石油汚染に関しては、具体的な遵守すべき濃度基準が設定されていない。そのため、バイオレメディエーション実行時において、例えば石油の毒性の軽減や生物生息地の回復等を指標とした浄化の目標設定の検討が必要である。

## [資料]

## I 研究の組織と研究課題の構成

### 1 研究の組織

#### [A 研究担当者]

流域圏環境管理研究プロジェクトグループ	
プロジェクトグループリーダー	渡辺正孝
海域環境管理研究チーム	
総合研究官	木幡邦男 牧 秀明 越川 海 樋渡武彦
特別流動研究員	
生物多様性研究プロジェクトグループ	
分子生態影響評価研究チーム	内山裕夫* <sup>1</sup>
循環型社会形成推進・廃棄物研究センター	
バイオエコエンジニアリング研究室	稲森悠平

#### [B 客員研究員]

須藤隆一	(埼玉県環境科学国際センター,前東北大学大学院)	(平成10~14年度)
西村 修	(東北大学)	(平成10~14年度)
矢島孝昭	(金沢大学)	(平成10~14年度)
栗原 康	(奥羽大学)	(平成10~14年度)
川端善一郎	(京大大学生態学研究センター)	(平成10~14年度)
須田有輔	(水産大学校)	(平成13~14年度)
森野 浩	(茨城大学)	(平成13~14年度)
庄田丈夫	(石川県環境保健センター)	(平成10~12年度)
木村賢史* <sup>2</sup>	(東京都環境科学研究所)	(平成11~14年度)
石上 裕	(前通産省工業技術院物質工学工業技術研究所)	(平成10~12年度)
坂口 豁	(産業技術総合研究所物質プロセス研究部門, 前通産省工技院物質工学工業技術研究所)	(平成10~12年度)
古城方和* <sup>3</sup>	(前兵庫県立公害研究所)	(平成10~12年度)

#### [C 所外研究協力員]

宮崎 一	(兵庫県立健康環境科学研究センター, 前兵庫県立公害研究所)	(平成10~14年度)
山崎 富夫	(兵庫県立健康環境科学研究センター, 前兵庫県立公害研究所)	(平成10~14年度)

現在の所属 \*<sup>1</sup>筑波大学, \*<sup>2</sup>東海大学, \*<sup>3</sup>平成13年2月ご逝去

### 2 研究課題と担当者 (\*客員研究員)

- (1) 沿岸部における石油バイオレメディエーションの小規模現場試験と影響評価  
渡辺正孝・木幡邦男・牧 秀明・樋渡武彦・須田有輔\*・森野 浩\*・宮崎 一\*・山崎 富夫\*・古城方和\*
- (2) 石油バイオレメディエーションに伴う微生物群集構造変化の解析  
内山裕夫・越川 海・石上 裕\*・坂口 豁\*
- (3) 底質を含む簡易モデル生態系(マイクロコズム)による石油分解と生態系影響評価  
稲森悠平・須藤隆一\*・西村 修\*・矢島孝昭\*・栗原 康\*・川端善一郎\*・庄田丈夫\*・木村賢史\*



## II 研究成果発表一覧

### 1 誌上発表

---

発表者・題目・掲載誌・巻(号)・頁・刊年

---

Hiwatari T., Maki H., Izawa S., Kohata K., Koshikawa H., Watanabe M.: Susceptibility of the hyalid amphipod *Hyale barbicornis* to water-soluble fractions of fuel oil and a bioremediation-amending agent, Inipol EAP, Pol. Arch. Hydrobiol., 47: 651-656, 2000

Ogino A., Koshikawa H., Nakahara T., Uchiyama H.: Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses, J. Appl. Microbiol. 91: 625-635, 2001

Maki H., Hiwatari H., Koshikawa H., Kohata K., Watanabe M., Igarashi T., Suzuki M., Noguchi T., Yamasaki F., Furuki M.: Experimental fuel oil bioremediation in the intertidal zone, In Proc. 6th Int. Symp. 'In Situ and on-site Bioremediation (Phytoremediation, Wetlands, and Sediments), ed.: 321-327, 2001

Maki H., Hiwatari T., Kohata K., Watanabe M., Miyazaki H., Yamasaki F., Tanimoto T.: Effect of nitrogen form for the amendment of crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan, Proc.25th Arctic and Marine Oil spill (AMOP) Program Tech.Semin. Environ. Canada, 2 :969-977, 2002

Hiwatari T., Maki H., Kohata K., Nagata R., Suda Y., Hamaoka S., Watanabe M.: Spatial and temporal distributions of benthoplanktonic fauna in a nearshore zone of Mombetsu, the coast of the Sea of Okhotsk, Proc. 18th Int. Symp. Okhotsk Sea & Sea Ice; Okhotsk Sea&Cold Ocean Res. Assoc.: 137-143, 2003

Maki H., Hiwatari T., Kohata K., Watanabe M.: Crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Okhotsk, Proc. 18th Int. Symp. Okhotsk Sea&Sea Ice; Okhotsk Sea & Cold Ocean Res. Assoc.: 179-183, 2003

Suda Y., Maki H., Kohata K., Nagata R., Hiwatari T., Hamaoka S., Watanabe M.: Ichthyofauna in the surf zone of reflective sandy beach at Mombetsu, Proc. 18th Int. Symp. Okhotsk Sea & Sea Ice; Okhotsk Sea & Cold Ocean Res. Assoc.: 144-148, 2003

Maki H., Hirayama N., Hiwatari T., Kohata K., Uchiyama H., Watanabe M., Yamasaki F., Furuki M.: Crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan, Mar. Pollut. Bull., 47: 74-77. 2003

Maki H., Utsumi M., Koshikawa H., Hiwatari T., Kohata K., Uchiyama H., Suzuki M., Noguchi T., Yamasaki T., Furuki M., Watanabe M.: Intrinsic biodegradation of heavy oil from Nakhodka and the effect of exogenous fertilization at a coastal area of the Sea of Japan, Water Air Soil Pollut., 145: 123-138. 2003

---

## 2 口頭発表

---

発表者・題目・学会等名称・開催都市名・年月

---

- 稲森悠平, 西村 修, 内藤友美, 青山莞爾: 干潟の浄化能および構成底生動物のゴカイに及ぼす重油影響に関するモデル生態系による評価, 第32回日本水環境学会年会, 習志野, 1998. 3
- 稲森悠平, 内藤友美, 西村 修, 松村正利, 木村賢史: 干潟モデルにおける浄化能と底生動物ゴカイに及ぼす重油の影響評価, 日本水処理生物学会, 清水, 1998. 11
- 荻野暁史, 中原忠篤, 内山裕夫, 越川 海, 渡辺正孝: 海域の油汚染浄化に関わる微生物群集の変化: DGGE法を用いた栄養塩散布の影響評価, 1999年度大会日本農芸化学会, 福岡, 1999. 3
- 内藤友美, 稲森悠平, 西村 修, 松村正利: 重油の生態系影響評価のための干潟モデルの構築と解析法の開発, 第33回日本水環境学会年会, 仙台, 1999. 3
- 樋渡武彦, 牧 秀明, 木幡邦男, 井澤俊二: 油汚染の毒性試験生物としての海産ヨコエビ類の評価, 日本海洋学会秋季大会, 函館, 1999. 9
- 稲森悠平, 古屋 昇, 河村 護, 内藤友美: 干潟の現状と保全する上での留意点, 日本水処理生物学会, 吹田, 1999. 11
- 稲森悠平, 牧 秀明, 川崎達也, 村上和仁, 瀧 和夫, 岸良日出男: アルカン分解菌による重油分解促進のための栄養塩添加の効果, 日本水処理生物学会, 吹田, 1999. 11
- 荻野暁史, 越川 海, 渡辺正孝, 中原忠篤, 内山裕夫: 海域油汚染浄化技術の微生物群集構造に及ぼす影響評価, 第15回日本微生物生態学会, 高知, 1999. 11
- 内藤友美, 稲森悠平, 松村正利, 戎野棟一: 干潟の底生動物に及ぼす重油の影響評価手法の開発, 日本水処理生物学会, 吹田, 1999. 11
- 稲森悠平, 牧 秀明, 川崎達也, 村上和仁, 瀧 和夫, 内藤友美, 岸良日出男: 重油分解菌の栄養塩, N/P比変化における重油の分解に及ぼす影響評価, 第34回日本水環境学会年会, 京都, 2000. 3
- 伊澤俊二, 樋渡武彦, 牧 秀明, 木幡邦男: 海産ヨコエビ類を用いた石油の光分解物質の毒性評価, 日本海洋学会春季大会, 東京, 2000. 3
- 内藤友美, 稲森悠平, 松村正利, 川崎達也: 干潟生態系モデルにおける重油の影響特性の評価, 第34回日本水環境学会年会, 京都, 2000. 3
- 牧 秀明, 越川 海, 木幡邦男, 渡辺正孝, 酒井 毅, 佐藤一省, 中越章博, 山崎 富夫, 古城方和: 兵庫県香住町日本海浜部における流出重油バイオレメディエーションの検討, 第34回日本水環境学会年会, 京都, 2000. 3
- Hiwatari T., Maki H., Izawa S., Kohata K.: Susceptibility of the hyalid amphipod *Hyale barbicornis* to oil and fertilizer, 10th Int. Colloquium Amphipoda, Crete (Greece), 2000. 4
- 牧 秀明: 日本海沿岸部における重油バイオレメディエーション現場試験, 日米コモンアジェンダ第2回「油流出対応」作業部会, Seattle, 2000. 10
- 稲森悠平, 小山太志, 村上和仁, 瀧 和夫, 川崎達也: Fill&Drainシステムを用いた潮間帯生物に及ぼす重油の影響評価, 日本水処理生物学会, 相模原, 2000. 11
- 荻野暁史, 内山裕夫: 主成分分析を用いた細菌群集構造の解析~油汚染のバイオレメディエーション試験現場において, 第16回日本微生物生態学会, 土浦, 2000. 11
- 川崎達也, 稲森悠平, 松村正利: 自然干潟より単離した重油分解菌の分解特性評価, 日本水処理生物学会, 相模原, 2000.11
- 稲森悠平, 小山太志, 村上和仁, 瀧 和夫, 川崎達也: 沿岸域潮間帯モデルを用いた重油の影響評価手法の開発, 第35回日本水環境学会年会, 岐阜, 2001. 3
- 川崎達也, 稲森悠平, 村上和仁, 松村正利: 沿岸域から分離した重油分解菌の特性と混合培養系における挙動解析, 第35回日本水環境学会年会, 岐阜, 2001. 3
- 宮崎 一, 山崎 富夫, 前田良将, 古城方和, 牧 秀明, 木幡邦男, 渡辺正孝: 重油分解細菌の集積培養, 第35回日本水環境学会年会, 岐阜, 2001. 3
-



- Maki H., Hiwatari H., Koshikawa H., Kohata K., Watanabe M., Igarashi T., Suzuki M., Noguchi T., Yamasaki F., Furuki M.: Experimental fuel oil bioremediation in the intertidal zone., 6th Int. Symp. 'In Situ and on-site Bioremediation, San Diego, 2001. 6
- Hiwatari T., Maki H., Izawa S., Kohata K.: Acute toxicity of water-soluble compounds from heavy fuel oil by natural sunlight to *Hyale barbicornis* (Amphipoda)., 5th Int. Crustacean Congr. Melbourne, 2001. 7
- Maki H., Hirayama N., Hiwatari T., Kohata K., Uchiyama H., Watanabe M., Yamasaki F., Furuki M.: Crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan., 5th Int. Conf. Environ. Manage. Enclosed Coastal Seas -EMECS 2001, 神戸, 2001. 11
- Miyazaki H., Kamimura I., Yamasaki T., Furuki M., Koshikawa H., Maki H., Kohata K., Watanabe M.: Evaluation of seawater quality in fuel bioremediation field experiment by AGP test, 5th Int. Conf. Environ. Manage. Enclosed Coastal Seas -EMECS 2001, 神戸, 2001. 11
- Ogino A., Koshikawa H., Uchiyama H., Watanabe M., Furuki M.: Monitoring impact of oil biostimulation treatment on indigenous bacterial communities by DGGE and clone library analyses, 5th Int. Conf. Environ. Manage. Enclosed Coastal Seas -EMECS 2001, 神戸, 2001. 11
- 川崎達也, 稲森悠平, 松村正利: 沿岸域からの多環芳香族炭化水素分解菌の集積培養法を用いた分離と分解特性の解明, 日本水処理生物学会, 神戸, 2001. 11
- 川崎達也, 稲森悠平, 牧 秀明, 松村正利: 海洋集積培養微生物による流出油分解特性評価, 第36回日本水環境学会年会, 岡山, 2002. 3
- 牧 秀明, 樋渡武彦, 木幡邦男, 渡辺正孝, 井沢俊二, 鈴木雅博, 山崎 富夫, 古城方和: 日本海沿岸部におけるナホトカ号由来重油の分解性評価, 日本海洋学会春季研究発表大会, 東京, 2002. 3
- Maki H., Hiwatari T., Kohata K., Watanabe M., Miyazaki H., Yamasaki F., Tanimoto T.: Effect of nitrogen form for the amendment of crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan., 25th Arctic & Marine Oil spill (AMOP) Progr. Tech. Semin.; Environ. Can., Calgary, 2002. 6
- 石木広志, 平山則子, 内山裕夫, 牧 秀明: 漂着油浄化過程における細菌群集構造と分解酵素遺伝子の経時的解析, 第18回日本微生物生態学会, 津, 2002. 11
- Hiwatari T., Maki H., Kohata K., Nagata R., Suda Y., Hamaoka S., Watanabe M.: Spatial and temporal distributions of benthoplanktonic fauna in a nearshore zone of Mombetsu, the coast of the Sea of Okhotsk., 18th Int. Symp. Okhotsk Sea & Sea Ice, 紋別, 2003. 2
- Maki H., Hiwatari T., Kohata K., Watanabe M.: Crude Oil Bioremediation Field Experiment in the Sea of Okhotsk., 18th Int. Symp. Okhotsk Sea & Sea Ice, 紋別, 2003. 2
- Suda Y., Maki H., Kohata K., Nagata R., Hiwatari T., Hamaoka S., Watanabe M.: Ichthyofauna in the surf zone of reflective sandy beach at Mombetsu., 18th Int. Symp. Okhotsk Sea & Sea Ice, 紋別, 2003. 2
- 石木広志, 内山裕夫, 平山則子, 牧 秀明: 漂着油浄化過程における油分解酵素遺伝子の経時的解析, 第37回日本水環境学会年会, 熊本, 2003. 3
- 牧 秀明, 樋渡武彦, 木幡邦男, 渡辺正孝, 宮崎 一, 山崎 富夫: 原油微生物分解の海洋現場実験における添加肥料の窒素形態のおよぼす影響, 第37回日本水環境学会年会, 熊本, 2003. 3
-

### 3 特許

吸着型オイルフェンス 特許公開：平10-338928, 登録日：平成15年4月30日, 番号：3418722, 出願人：国立環境研究所長, 発明者：木幡邦男, 竹下俊二



REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM  
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告  
SR-53-2003

---

平成15年 9月30日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番2  
電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

---

印 刷 アサヒビジネス株式会社

〒300-0066 茨城県土浦市虫掛3317-2

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

September 2003

---

無断転載を禁じます

