

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19360400
 研究課題名 (和文) 深海環境下における油の微生物分解速度およびその支配因子の評価
 研究課題名 (英文) Biodegradation kinetics of oil in deep sea
 研究代表者
 柴田 清 (SHIBATA KIYOSHI)
 千葉工業大学・社会システム科学部・教授
 研究者番号：20281991

研究成果の概要 (和文)：本研究では深海における沈船中残存油の微生物分解処理の可能性を検討するために、高圧下におけるフェノールの微生物分解について実験的に調査した。その結果、*Pseudomonas stutzeri* 単離株を用いた場合、海表面条件下ではフェノール分解が進行することが確認されたが、2.0MPa～5.0MPa 加圧下では分解の進行が確認できなかった。一方、深海泥試料を添加した場合は常圧よりも加圧下の方が分解の進行が速いことが観察され、深海環境下でも有機物の微生物分解が進行する可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：Experimental study has been conducted to investigate possibility of biodegradation of oil in deep sea. *Pseudomonas stutzeri* has ability to decompose phenol at sea surface condition, however such decomposition was not observed under 2.0 to 5.0MPa pressure. On the other hand, phenol decomposed faster at high pressure than at atmospheric pressure, when sediment taken from deep sea was mixed. It indicates the possibility of the biodegradation of oil in deep sea.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・船舶海洋工学

キーワード：海洋環境、環境保全、応用微生物、深海環境、環境技術、油汚染、バイオレメディエーション、海洋生態

1. 研究開始当初の背景

油の流出をともなう衝突や座礁といった船舶の事故は、その頻度こそ減少しているものの、生態系への甚大な被害を与える危

険性が高い。最近でも1997年1月の日本海におけるナホトカ号、1999年12月のフランス沖でのエリカ号、2002年11月のフランス、スペイン沖でのプレステージ号な

ど、大きな被害をもたらした事例がある。また、さらに、沈没した船舶の船倉には積荷あるいは燃料としての油類が残存することも少なくなく、沈没した船舶の経年劣化により油が流出する危険性がある。沿岸域において原因不明の油漂着が観察されることがあり、沈船からの油流出の可能性が指摘されている。そのため、沈船中の油類の積極的な回収や、沈船の引き上げの試みもなされている¹⁾。世界中には8500隻以上の沈船(タンカー150トン以上、その他の船舶は400トン以上)があり²⁾、残存油は少なくとも250万トン、最大で2040万トンと推計されている³⁾。

油流出事故時の対策としては、機械的な汲み取りによる回収や、吸着マットによる除去、分散剤による処理などが一般に実施されている。一方、自然環境中に石油類を分解する多種多様な微生物が生息することはすでに多くの研究者によって確認されている。これらの土着の微生物に栄養分を与えることによって活動を活性化させたり、分解機能を有する微生物を新たに導入することによる土壌地下水の浄化や船舶などからの流出油の処理が提案されているが⁴⁾、これらは表層および沿岸域に限られている。

前述のような深海に沈んだ船倉に格納されたままの油類を考える場合、深海のような低温高圧の環境下でも数多くの生物が生存することを考えれば、微生物による分解の可能性も推測される。海洋科学技術センターの森屋と堀越⁵⁾は1993年に深海底泥から炭化水素分解能を有する微生物が発見している。しかし、深海では温度が低く生物活動が緩慢と考えられ、実際の分解速度の評価はまったくなされていない。また、船舶が深海に沈む場合であっても、沈没の初期に船内に浸入するのは表層の海水であり、表層水が油類と接触したまま深海環境へ運ばれる可能性がある。その場合は表層に棲息する微生物のうち油分解機能を有するものが深海環境下で活動できるかどうかの問題となる。

実際に沈没した船舶に残存する油を回収する必要性有無の判断には、沈船の損傷状況とともに、油の残存量の推定も必要となる。深海環境で自然のまま油の分解が進行するかどうか、進行するとすればその速度を見積もることが求められる。しかし、常圧常温環境下であっても、分解の速度を定量的に評価したものはほとんど無く、深海環境下では報告は見当たらない。

本研究に先立ち、筆者ら⁶⁾は平成16年から17年度において科学研究費補助金基盤研究(B)(2)1636044「沈船による油汚染リスク削減を目指した高圧下の深海における油の微生物分解挙動解析」において、深海に沈んだ

船舶中に残存する油類の微生物分解の可能性を調査するために、20MPa、5°Cの条件で、表層海水と直鎖アルカンを10日から75日間緩やかに攪拌し、分解の進行度合いを調査した。その結果、10日間で67%あるいは41日間で73%分解された場合もあったが、ほとんど分解が認められない場合も観察された。また、これら実験前後の海水中微生物相をDGGE-PCR法により解析した結果、圧力、油添加の有無、栄養塩添加の有無により発達する微生物相に大きな変化が生じることは観察されたが、油分解機能を有する微生物を特定することはできず、また実験条件の効果を説明できる系統だった変化も観察できなかった。これらの結果は、主に実験に供した天然海水中に存在する微生物が実験の都度のこととなり、実験条件の同一性が確保できなかったことによると考えられた。

2. 研究の目的

上記のような背景に鑑み、本研究では自然界でのサンプルに起因する変動を排除するため、まず単離石油分解菌株を用いて高圧下での油類の微生物分解が可能であることを確認する。その上で、分解速度に及ぼす各種要因の影響を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、単離された石油分解菌として *Pseudomonas stutzeri* DSM8034 株を用いフェノールの加圧下での分解可能性を調査した。また天然海水起因のサンプルとして深海採取泥を用い、同様の実験を行った。ここでフェノールを被分解物質として選んだ理由は、*Pseudomonas stutzeri* が芳香族分解菌として報告されていること、およびフェノールが水溶性であり、菌との接触面積を確保できること、および液相が均一になるので少量のサンプルで代表性が確保できるためである。

(1) 供試微生物

海洋性の芳香族分解菌とされている *Pseudomonas stutzeri* DSM8034 株(DSMZ社)はペレットとして購入し、滅菌水で10倍希釈し、Marin Broth 2216(Difco社)を使用して平板培地・斜面培地・液体培地を作り48h培養した。培養できた微生物はビーズ(マイクロバンク:アスカ純薬株式会社)に取り、冷凍保存(-30°C)をし、適宜分解実験に供した。

深海泥サンプルは海洋技術センターがインドネシア付近のハルスベラ海溝3000m~5000mで採取したものである。塊状で入手したため、ハンマーで破碎し、約1gを各分解実験に用いた。

分解実験に当たっては、平板寒天培地で48時間培養後のコロニー数カウントによる菌数と吸光度との関係を予め検量線として求め、それに基づき供した菌濃度を把握するようにした。

(2) 実験装置

実験装置全体の構成図を図1に外観写真を図2に示す。

微生物分解実験用容器（以下「セル」）は内容積約100mL、常用圧力30MPaのステンレス鋼製で、マグネチックスターラによる内部攪拌が可能である。セルはその外側に設けたジャケットに恒温冷媒（水+エチレングリコール）を流通させることによって一定温度に保持される。加圧操作は手動式プランジャーポンプによって行い、液体によっても気体によっても加圧が可能である。また、セルの蓋に排出弁をつけることで圧力を利用した中間物質の抽出が可能になっている。セル内部の温度はタイプKのシース熱電対で、圧力は半導体歪ゲージによってモニタリングされる。

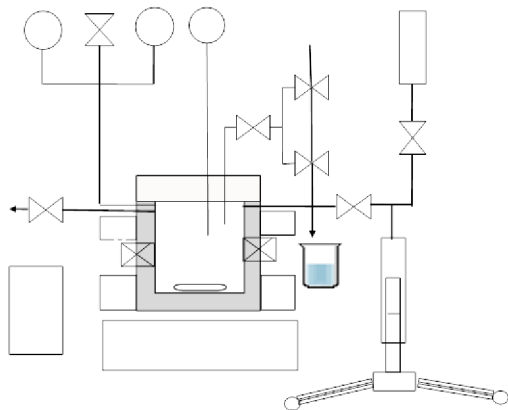


図1 深海環境模擬実験装置概略図

(3) 実験方法

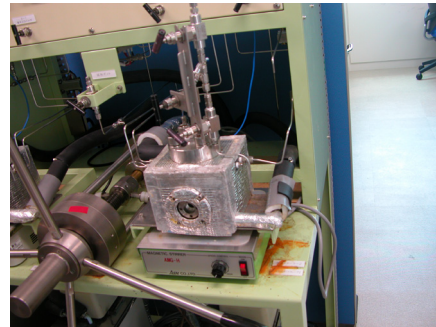
約100mLの滅菌人工海水に、被分解物質としてフェノールを加えたものを、常圧実験の場合は共栓付きガラス製三角フラスコ、高圧の場合は前項で述べたセルに入れ、分解実験に供した。初期のフェノール濃度は0.5%、および0.05%とした。なお、*Pseudomonas stutzeri*は0.5%の濃度でも耐性を持つことを確認している。

また、*Pseudomonas stutzeri*を用いた実験では、溶液に栄養としてペプトン0.05gを、一部の深海泥サンプルを用いた実験ではC:N:P比をレッドフィールド比に合わせるよ

うにリン酸水素ナトリウムとリン酸二水素アンモニウムを加えた。高圧実験における加圧媒体としては窒素を用いた。



(a) 装置全体



(b) 高圧セル

図2 深海環境模擬実験装置外観写真

中間試料として常圧実験の場合は3mL、高圧の場合は1mLずつ採取し、溶剤としてベンゼンを10mL加える抽出操作を2回繰り返し、得られる油相をあわせてガスクロマトグラフヒによってフェノール濃度を定量し、分解率を算出した。

なお、*Pseudomonas stutzeri*の初期濃度は 2.7×10^7 から 3.5×10^9 cells/mlであった。

所定の分解期間終了後、高圧セル及び三角フラスコからサンプルを取り出し、生菌数を測定するため、菌を集菌してコロニーカウントをおこなった。

4. 研究成果

(1) *Pseudomonas stutzeri*におけるフェノール分解

初期濃度 0.5%濃度のフェノールを海表面

条件 (0.1MPa) と高圧条件 (5.0MPa) で微生物分解した時の分解率を図3に、菌数変化を図4に示す。0.1MPaでは最終的に10%の分解率を得たが、5.0MPaでは最終分解率が2%であった。微生物数の増加については0.1MPaでは2~4日目にかけて 10^4 の増加が起こったが、その後増加が見られなかった。一方、5.0MPaではほぼ吸光度の変化が観察されなかった。

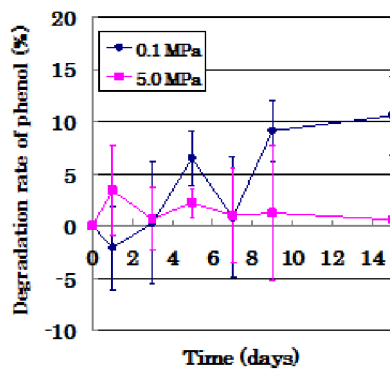


図3 0.1MPaと5.0MPaにおけるフェノールの *Pseudomonas stutzeri*による分解 (初期フェノール濃度0.5%)

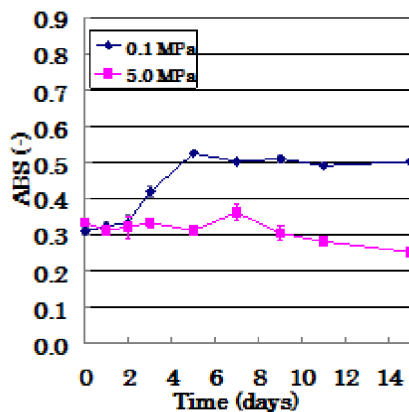


図4 0.1MPaと5.0MPaにおけるフェノールの *Pseudomonas stutzeri*による分解実験中の菌数変化 (初期フェノール濃度0.5%)

図5と6には初期フェノール濃度を0.05%とした場合の、*Pseudomonas stutzeri*によるフェノール分解結果を示す。0.1MPaでは7日目からフェノールの分解が始まり、9日目には99.2%の分解率が得られた。しかし、高圧条件 (1.0MPa) 以上になると15日間分解実験を行ったが4条件とも2%の分解率にとどまった。微生物数を見ても、0.1MPaにおいて2日目に大きく菌数を増加させている。しかし、その後は定常期が続き菌数の増加が見られなかった。その後、炭素源がなくなり死滅

期となったため微生物数が減少したとみられる。一方、高圧下においては吸光度の増加もなかったことから菌数の増加もなかった可能性が示唆され、*Pseudomonas stutzeri*は圧力の増加とともに活動が鈍化することが観察された。

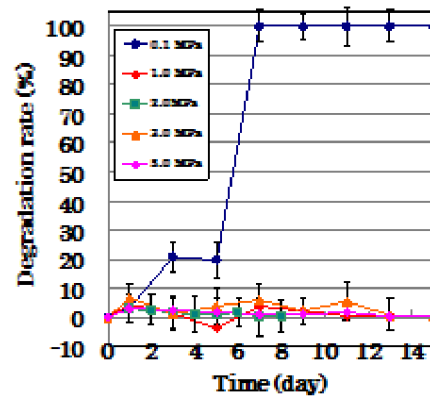


図5 0.1MPaと5.0MPaにおけるフェノールの *Pseudomonas stutzeri*による分解 (初期フェノール濃度0.05%)

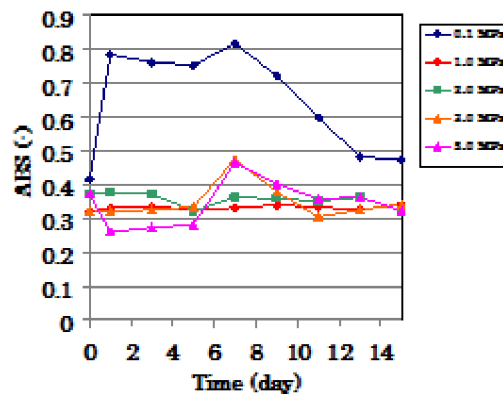


図6 0.1MPaと5.0MPaにおけるフェノールの *Pseudomonas stutzeri*による分解における菌数変化 (初期フェノール濃度0.05%)

(2) 常圧条件における深海泥試料によるフェノールの微生物分解

以上のように *Pseudomonas stutzeri* では加圧化における分解が期待できないことから、深海において採取された泥に耐圧性を有する微生物が付着しており、そのなかに炭化水素資化菌が存在することを期待して、フェノールの分解実験を行った。

まず、炭化水素資化菌の存在を確認するため、常圧で滅菌人工海水にペプトンを0.05gと深海泥サンプル約1gを加え、初期濃度0.5%からのフェノール分解を追跡した。しかし、安定した分解率が得られず、5%前後の分解率にとどまり、また、フェノールを添加した寒天培地においても菌の増殖が見られな

った。

そこで、菌の生育を促進する目的で、栄養塩となるリン酸水素ナトリウムと水素アンモニウムを滅菌人工海水に添加し、0.05%の初期濃度のフェノールの分解を試みたところ、図7に示すように7日目から分解率の上昇が始まり、10日目で分解率100%に達し、良好な分解性を示した。

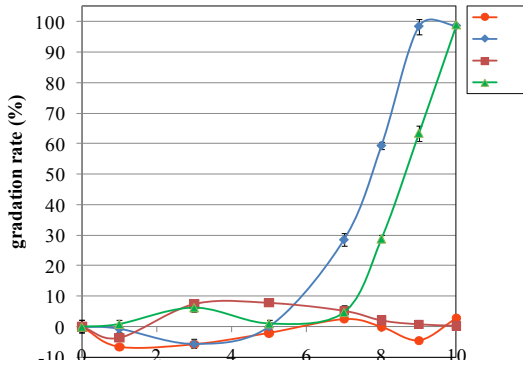


図7 深海泥試料を用いた常圧条件下でのフェノールの分解

(3) 深海泥試料を用いた高压におけるフェノール分解

深海泥サンプルを1MPaから20MPaの間のさまざまな圧力下におき、フェノールの分解経過を観察した結果を図8に示す。実験した条件の中では、10MPaの分解速度が一番速く10日目までに10%のフェノールを分解した。その後、27日目で15%にまで分解率が上昇したが、その後50日目までの範囲ではほとんど分解率の上昇がなかった。また、5MPa、1MPaの順で分解速度が速くなり、最終的には18%と一番速い10MPaの分解率に並ぶ形となった。15MPaでは最終フェノール分解率が10%となり、20MPaにおいては3%であった。15MPaは15日目の一段階目の上昇と30日目の二段階目の分解率上昇は10MPaに比べてゆるやかなものになった。

この結果から深海環境下にフェノール分解菌が存在し、海表面下~10MPaまででフェノールを分解する可能性がある。また、分解が最大17%で止まってしまった理由として、高压セルでの酸素不足や栄養塩の不足、微生物の増加による環境悪化が考えられる。特に、今回1段階目に10%まで上がり、その後分解率の停滞から分解率が15%に増加した理由として、酸素量の影響があるのではないかと考えている。一般的に有機物の微生物分解は好気性で行う。しかし、中には通性好気性や嫌気性微生物の微生物分解も見られる。本研究の場合、先に好気性のフェノール分解菌が分解を促し、その後に通性好気性または嫌気性微生物がフェノール分解した可能性も考え

られる。

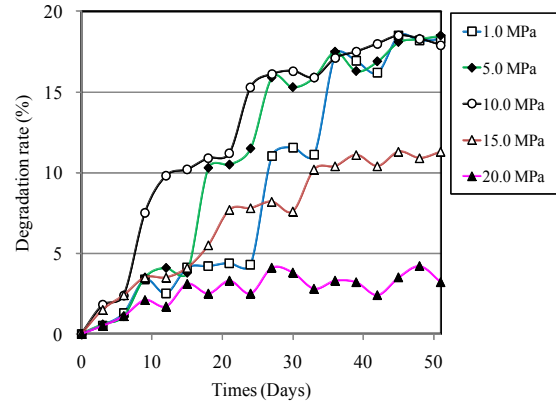


図8 高压力下における深海泥試料によるフェノールの微生物分解

(4) 今後の課題

以上のように本研究では深海環境下でも有機物の微生物分解が進行する可能性が示された。しかしながら、今回フェノール分解に寄与した菌が好気性であるかをはじめ、嫌気性であるかを現象を理解し、分解速度の評価や最適条件の洗濯に繋げるためには明らかにされなければならない課題が多く残されている。圧力のみならず、温度、酸素濃度、栄養塩濃度等が分解速度に与える影響を評価するためには、分解菌濃度を計測あるいは制御しなければならず、まず分解菌の同定あるいは菌叢としての解析が必要である。また、自然界における分解菌の存在に普遍性が期待できるのかを評価するために、様々な菌ありは菌群の高压下における油分解能についても調査を広げる必要がある。

参考文献

- 1). 原正一、黒田貴子、「沈船からの油流出による環境リスク」、日本船舶海洋工学会誌、No. 3, (2005), 57-64
- 2). Environmental Research Consulting, International Marine Shipwreck Database
- 3). Issue paper potentially polluting wrecks in marine waters, International Oil Spill Conference, (2005)
- 4). 例えば、後藤雅史、原山重明、「海域の石油系物質に対するバイオリメディエーション」、石田、日野編「生物機能による環境修復」、(1996)、恒星社厚生閣
- 5). 森屋和仁、堀越弘毅 (1993)、「炭化水素乳化及び可溶化剤」、公開特許公報、特開平5-92133
- 6). 柴田清、「沈船による油汚染リスク削減を目指した高压下の深海における油の微生物分解挙動解析」科学研究費補助金基盤研究(B) (2) 1636044 研究成果報告書、(2006)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件) 中村光芳、柴田清、滝口泰之、山口達明、「高圧におけるフェノールの微生物分解」、日本農芸化学会 2010 年度大会、平成 22 年 3 月 30 日、東京大学駒場キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 清 (SHIBATA KIYOSI)
千葉工業大学・社会システム科学部・教授
研究者番号：20281991

(2) 研究分担者

<2007 年度のみ>

渡辺 一哉 (WATANABE KAZUYA)
海洋バイオテクノロジー研究所・応用微生物研究領域・領域長 2007 年度
東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授 2008 年度
研究者番号：40393467

<2007 年度のみ>

笠井 由紀 (KASAI YUKI)
海洋バイオテクノロジー研究所・研究員
研究者番号：40393467

(3) 連携研究者

滝口 泰之 (TAKIGUCHI YASUYUKI)
千葉工業大学・工学部・教授 2009 年度
研究者番号：40154942

渡辺 一哉 (WATANABE KAZUYA)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授 2009 年度
研究者番号：40393467