

# 13. 微生物による流出油漂着沿岸海域の環境修復技術に関する研究

## (1) 固定化海洋油分解微生物による沿岸海域の環境修復技術

担当機関 経済産業省 独立行政法人 産業技術総合研究所 小比賀秀樹

分野 水環境

研究期間 平成10年～平成14年度

研究予算総額 71,219千円

### 研究の背景と目的

21世紀に向けて、環境調和型の生物学的油濁浄化技術の開発、また、油流出時の環境修復技術や海洋生態系や生物への影響に関する研究の強化が望まれている。沿岸海域における石油汚染に対応するためには、流出油漂着海岸の微生物分解による自然浄化過程を解明すると共に、重質油に対し、複合微生物 栄養塩同時固定化担体を応用した環境修復加速技術の開発、および沿岸海域における流出油の微生物分解による自然浄化能の見積もりや、バイオ修復技術を現場に適応した場合の評価を的確に行うための基盤技術の確立が必要である(図1)

本研究では、栄養塩固定化海洋油分解微生物による流出油漂着海岸の、好気環境及び嫌気環境における微生物分解による自然浄化過程を解明し、これを応用した環境修復加速技術を構築することを目的とする。

### 研究の成果

#### 1. 沿岸海域模擬観察装置の制作

本研究では、沿岸海域における漂着油の、好気性 嫌気性の油分解微生物により分解されていく過程を明らかにし、栄養塩の補給あるいは微生物の固定化等の手段を用いることにより、沿岸海域の油分解微生物コンソーシアによる漂着油分解の促進条件を見いだすことが目的である。我々は、これまでにフラスコレベルでの実験で微生物 栄養塩固定化油分解微生物による浮上油の分解促進を研究してきた。しかし、あくまでも閉鎖的なフラスコレベルの実験では、実際に油汚染が発生している環境への応用となるとまだまだ多くの問題が残されている。残された問題のひとつの解決法として、これまでの閉鎖系での油分解の評価だけでなく、できるだけ開放系に近い環境で油分解過程を評価する必要があると考え、沿岸海域模擬観察装置を制作して実験を行った(図2)。

#### 2. TLC-FID(イアトロスキャン)法による重質油成分分析の検討

これまでに、原油成分の組成分析法としてTLC-FID法により、極性の異なる複数の溶媒を用いて多段階展開により原油成分を飽和画分、芳香族画分、アスファルテン画分、レジジン画分に分別し、水素炎で燃焼して分析することが行われている。ただ、異なる溶媒で展開するため、各展開溶媒に対してスポットした原油成分の展開速度にばらつきが生じ、各画分の分離性能や内部標準として用いる 1-オクタデカノールとの原油成分の分離が困難な場合が数多く生じていた。そこで、今回、ジクロルメタンによる展開を2回繰り返すことにより内部標準として用いる 1-オクタデカノールと原油成分との分離を改善し、再現性よく分離を行うことができた。

##### 2.1 C重油の調整

昭和シェル石油から分譲されたC重油をサンプル及び微生物分解の基質として用いた。TLC-FID法による組成分析の場合、シリカロッドに添加する量が適切でないと、サンプルの燃え残りが発生して測定値に誤差が生じるので、分析するC重油の濃度は5%(v/v)を上限とし、適宜希釈することにより検量線を作成した。スポット量は1マイクロリットルとした。

展開溶媒としては、ヘキサン、ジクロルメタン、ジクロルメタン・メタノール混合溶媒(9:5(v/v))の3種類を用いた。分析装置はヤマトロン社製イアトロスキャンMk-5、用いるクロマトロッドは展開幅0.6mのシリカロッドを用いた。データ処理装置とイアトロスキャン間の電気信号受け渡し時にゴーストピークが生じ、原点付近にとどまるレジジン画分と重なる場合が生じたので、サンプルをスポットするところを原点から5mm上へずらすことにより、これを回避した。展開槽の中へ紙を立てかけることにより十分に溶媒で飽和させた後、ヘキサンで9.5cmまで展開し、乾燥した後、6.0cmのところまでジクロルメタンで2回展開した。次いで、ジクロルメタン・メタノール混合溶媒で2.0cm展開することにより、内部標準として用いる 1-オクタデカノールと原油成分との分離を改善し、再現性よく分離を行うことができた。

ただ、問題として飽和画分と芳香族画分ピークの間に分離のピークが見られた。分配クロマトグラフの性質と芳香族画分を移動させるジクロロメタンのロッド上での展開距離から考えて、この境界に現れるピークをクロマトグラフ上で、図3のように、分離すると検量線が原点を通る性質が改善した。

## 2.2 TLC-FID(イアトロスキヤン)法による油分解微生物の培養液の分析

C重油を炭素源として、瀬戸内海からスクリーニングした油分解微生物の重油分解過程の解析に、今回の改良法を適用した。海水培地を用い、以下の組成の補助栄養塩を添加し、培養温度 20℃、振幅 100rpm で培養した。

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02g/L, Yeast Extract 0.05g/L, クエン酸鉄IIアンモニウム 0.02g/L, 天然海水 1L  
培養1週間後、培養液からヘキサン・トルエン(6:4)の混合溶媒でC重油を抽出した後、分解前と分解後のC重油成分の組成分析をTLD-FID法で測定した。分析結果を図3に示す。この結果より、瀬戸内海からスクリーニングしたこの油分解微生物は、飽和炭化水素をよく分解することが明らかとなった。

## 3. 重質油分解微生物群の探索

当所で開発した栄養塩固定化発泡性担体を用いて、日本各地の海水中に存在する油分解微生物による分解活性の測定を行うとともに、重質油分解微生物群の探索を行った。日本近海の次の各地域の港でサンプリングを行った。

北海道：苫小牧港、小樽港、祝津港、余市港、霧多布、網走港 東京都：お台場

山口県：宇部港 福岡県：北九州 鳥取県：境港

海岸の海水を1リットルずつ、殺菌したポリプロピレン容器にサンプリングし、4℃に保存した。200mlの海水を取り10ミクロンの篩を持つガラスフィルターでろ過した後、2つの培養器に分注し、一方は121℃、15分間の殺菌を行い、残りのサンプルについては、そのまま培養器に入れ栄養塩固定化担体とC重油を加えて培養を行った。

鶏卵1個約60gに粉末状のアルギン酸ナトリウム1gを加え、ミキサーで攪拌して起泡させた後、5gのアルデヒド加工尿素及び1gのリン酸マグネシウム(Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>)を加え、気泡を潰さないように混合した。次いで、1gの炭酸カルシウムを少量の水に分散させた後混合液に均一になるように加え、同じく少量の水に溶かした1gのグルコノデルタラク톤を加えて素早く攪拌する。この気泡を含む混合溶液を直径1.5cm高さ2cmのアクリル製の円筒に混合物を注ぎ込み、キトサンとセルロースからなる中級球を中心に埋め込んだ(図4)。30分後にアクリル酸円筒から出し、0.5%グルタルアルデヒドを含む5%塩化カルシウム溶液の中に約3時間浸漬した。このようにしてできた生分解性の中級球を持つ栄養塩固定化発泡体を水洗し、凍結乾燥した(図5)。

## 4. 栄養塩固定化担体による油分解微生物群のC重油分解活性測定

栄養塩固定化担体を用いて、日本沿岸海域の海水に生息する油分解微生物群の、C重油分解活性の調査を次のような手法で行った。海水100mlに対してC重油(コスモ石油坂出精油所分譲)及び栄養塩固定化担体を1g加え、20℃、100rpmで往復振とう培養を行った。14日間培養した後、培養液のpHを1N塩酸で2.0に調整し、ヘキサン:トルエン(6:4)混合溶媒を用いて、残存する重油成分を抽出し、TLC-FID法により各成分の分析を行った。蒸発その他による補正の目的で、サンプリングした海水を殺菌した培養器を用いて同様な実験系を行い、コントロールとした。

採取した各地の海水には、栄養塩固定化発泡性担体を用いることにより、C重油を分解する微生物群が程度の差はあるものの、どこの地域の沿岸海水にも存在した。北海道の祝津、霧多布のようにほとんど分解しない海域も存在したが、特に、苫小牧港及び東京湾の海水ではC重油成分の40%近くが分解した(図6)。

## 5. 栄養塩担持セラミック担体の調整

沿岸海域の底部に定着するような栄養塩固定化担体として、ジルコニアを母材とした担体鉱物原料中に、リン酸水素マグネシウムを13wt%含有させて多孔質の球状担体を調整した(図7)。次に、ホルムアルデヒド100mLに尿素31gを溶解し、縮合させて液状尿素樹脂とした。この液状尿素樹脂とアルデヒド加工尿素(チツツ製)25gを、バインダーとなるシリカゾルに混合して、球状多孔質に吸引により含浸させて200℃で熱処理を行った。

### 5.1 栄養塩担持セラミック担体の油分解微生物の担持特性

供試菌は通性嫌気条件下、流出油成分の1つジベンゾチオフェンを分解する微生物を用いた。基質であるジベンゾチオフェンは培養液から酢酸エチルで抽出後、ガスクロマトグラフ法で、その減少量を測定した。使用した培地組成を以下に示す。

MEDIUM1

MEDIUM2

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0	g/L	栄養塩担持セラミック担体		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0	g/L	MgCl <sub>2</sub>	0.2	g/L
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.0	g/L	FeCl <sub>2</sub>	0.01	g/L
MgCl <sub>2</sub>	0.2	g/L	CaCl <sub>2</sub>	0.01	g/L
FeCl <sub>2</sub>	0.01	g/L			
CaCl <sub>2</sub>	0.01	g/L			

## 5.2 窒素及びリン酸の溶出挙動

図8に、80°Cで加速溶出試験を行った結果を示す。この結果より、アンモニア体窒素及びオルトリン酸は4~6ppmで一定しており、シリカゾルによる被覆効果による溶出制御が起こっていると考えられた。L培地で4日間好氣的に培養した供試菌を、遠心分離した後に、生理食塩水に懸濁させその懸濁液の中に栄養塩担持セラミック担体を無菌的に嫌気条件下減圧処理して吸着させた。その後、嫌気環境下10mlの海水を加え2個(約0.2g)の担体を加えて基質を添加した。培養は30°Cで120rpmの振とう速度で1週間行った。窒素源として、アセトアルデヒド加工尿素を担持した担体は、基質であるジベンゾチオフェンが海水中に溶解し、担体中に固定化された菌体は標準状態のフリーセルの場合の50%の分解活性を示した(図9)。

この実験結果より、本担体は沿岸海域に存在し、酸素の分圧の低い状態におかれていても分解する活性の菌を保持する性質がみられた。この性質は、沿岸海域に漂着した流出油成分の微生物による分解に対して有効であると考えられる。

## 6. 栄養塩担持多孔性セラミック担体による嫌気環境下における油分解特性の評価

培養株として、東京湾からC重油を基質として得られた油分解微生物群を用い、C重油を基質としてマリブロスで1週間嫌氣的に培養した前培養菌体を、遠心分離によって集菌した後、海水に懸濁した後、油分解微生物群をそのまま栄養塩担持セラミック担体を無菌的に嫌気条件下減圧処理して吸着させた。その後、30ml容量のバイアル瓶に、嫌気環境下5mlの海水を加え10個(約2g)の担体と基質であるC重油0.5mlを添加した。

本培養は、窒素嫌気環境下20°Cで120rpmの振とう速度で3ヶ月間行った。基質であるC重油は培養液からクロロホルムで抽出後、TLC-FID法で測定した。

分解基質としてC重油を選択し、東京湾で採取したC重油分解微生物群を用いて、嫌気環境下におけるC重油の分解の活性を調べた結果、C重油成分はほとんど分解されなかったが(図10)、C重油の分散が起こり、石油分散成分の存在が示唆された(図11)。

## 研究のまとめ

採取した各地の海水には、栄養塩固定化発泡性担体を用いることにより、C重油を分解する微生物群が程度の差はあるものの、どこの地域の沿岸海水にも存在した。北海道の祝津、霧多布のようにほとんど分解しない海域も存在したが、特に、苫小牧港及び東京湾の海水ではC重油成分の40%近くが分解した。

ジルコニアを母材とした担体鉍物原料中に、リン酸水素マグネシウムを13wt%含有させて多孔質の球状担体を調整した。次に、ホルムアルデヒド100mLに尿素31gを溶解し、縮合させて液状尿素樹脂とした。この液状尿素樹脂とアルデヒド加工尿素(チソ製)25gをバインダーとなるシリカゾルに混合し球状多孔質に吸引により含浸させて200°Cで熱処理を行い窒素成分を固定した。

窒素源としてアセトアルデヒド加工尿素を担持させたジルコニア製多孔質担体は、基質であるジベンゾチオフェンが海水中に溶解し、担体中に固定化された菌体は標準状態のフリーセルの場合の50%の分解活性を示した。この実験結果より、本担体は沿岸海域に存在し、酸素の分圧の低い状態におかれていても重質油の成分を分解する活性の菌を保持する性質がみられた。この性質は沿岸海域に漂着した流出油成分の微生物による分解に対して有効であると考えられる。

分解基質としてC重油を選択し、東京湾で採取したC重油分解微生物群を用いて、嫌気環境下におけるC重油の分解の活性を調べた結果、C重油成分はほとんど分解されなかったが、C重油の分散が起こり、石油分散成分の存在が示唆された。

研究概念説明図  
微生物による流出油源着沿岸海域の環境修復技術に関する研究

経済産業省 独立行政法人 産業技術総合研究所

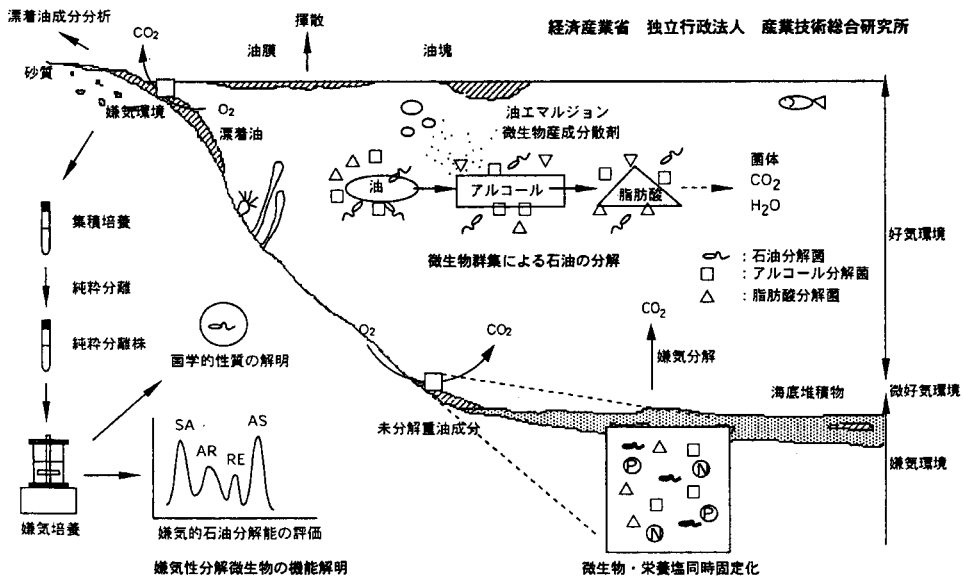
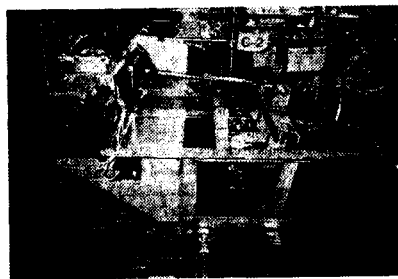
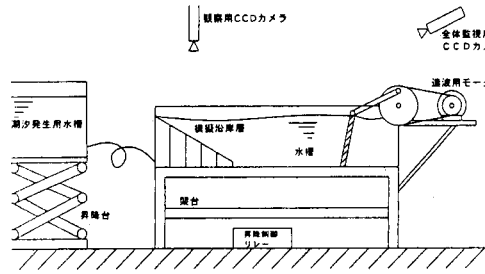


図1 栄養塩固定化浮上性担体を使う固定化海洋微生物による流出油分解 (概念図)

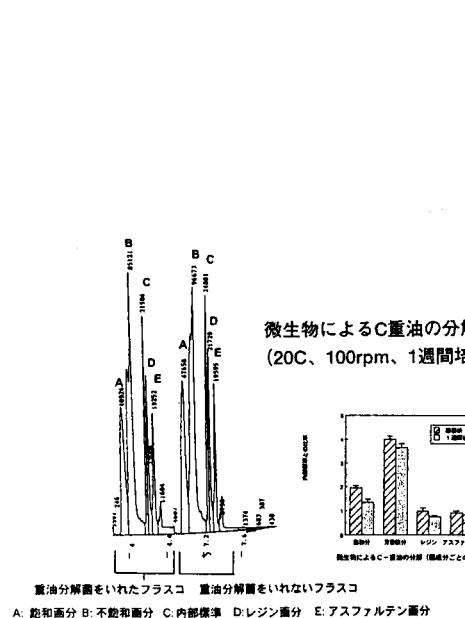
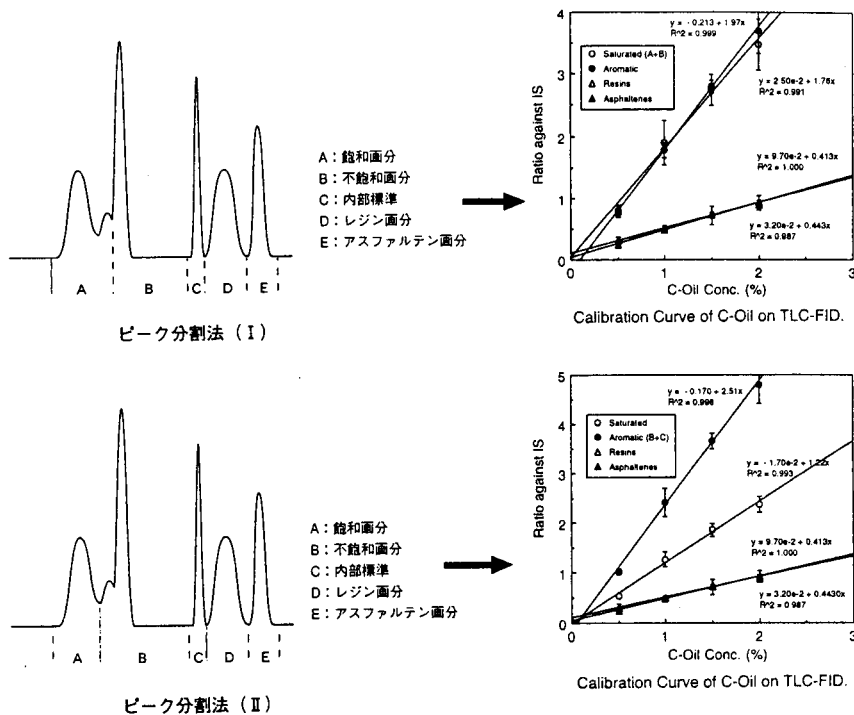


水槽及び造波部



沿岸海域模擬装置概念図

図2 沿岸海域模擬観察装置



### 栄養塩固定化浮上性担体

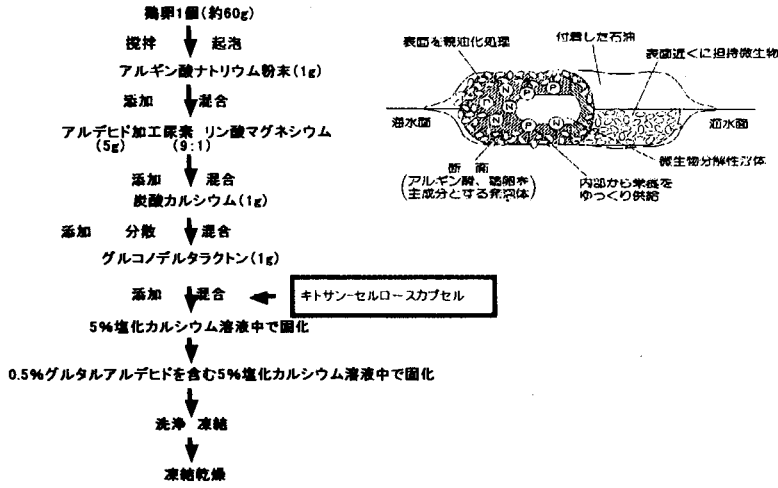


図4. 栄養塩固定化浮上性担体の調整法

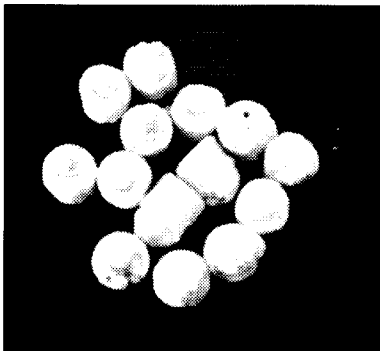
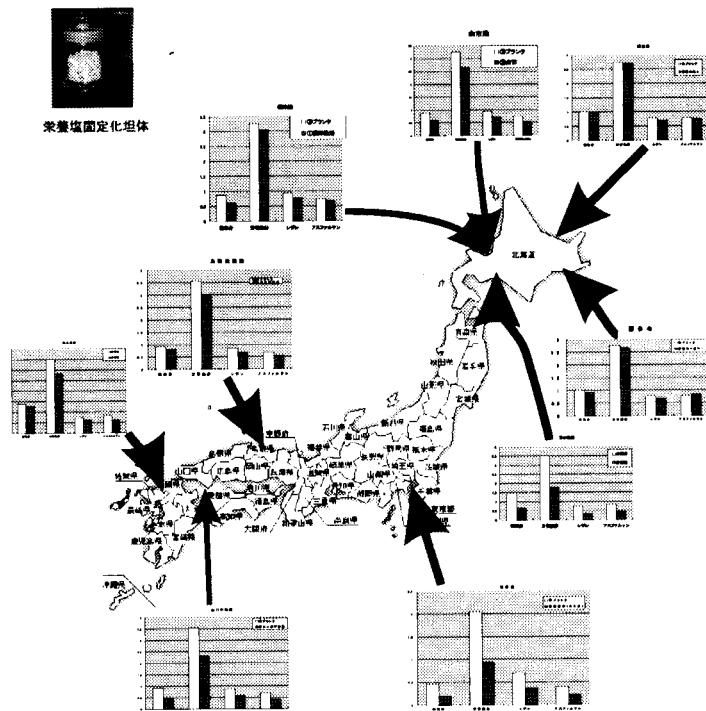


図5. 栄養塩固定化浮上性担体



□:コントロール:殺菌した海水+C重油+栄養塩固定化浮上性担体  
 ■:分解試験サンプル:サンプリングした海水+C重油+栄養塩固定化浮上性担体

図6. 栄養塩固定化浮上担体を用いた日本各地の海水中に存在する微生物によるC重油分解活性.

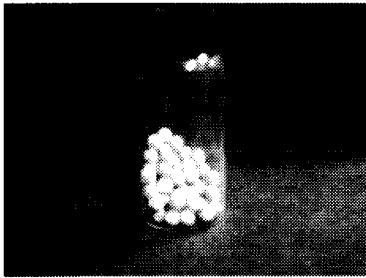


図7. 栄養塩固定化セラミック担体

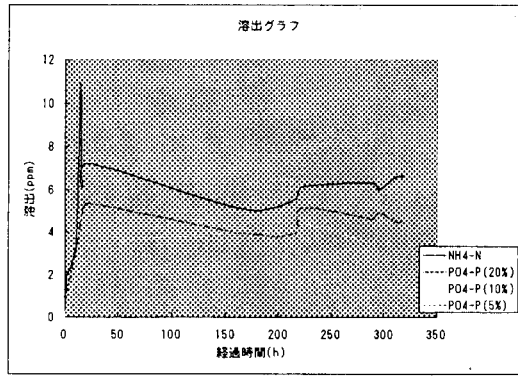


図8. 窒素及びリン酸の溶出挙動

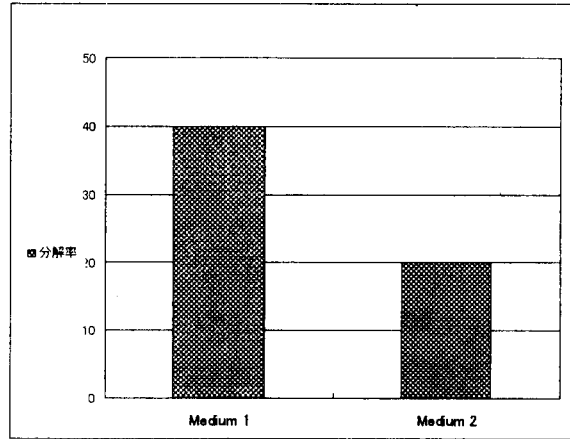


図9. ジベンゾチオフェンを分解する微生物 に対する栄養塩固定化セラミック担体の影響



図11. C重油嫌気分解試験後の様子

右側: 菌体添加系    左側: 菌体無添加系

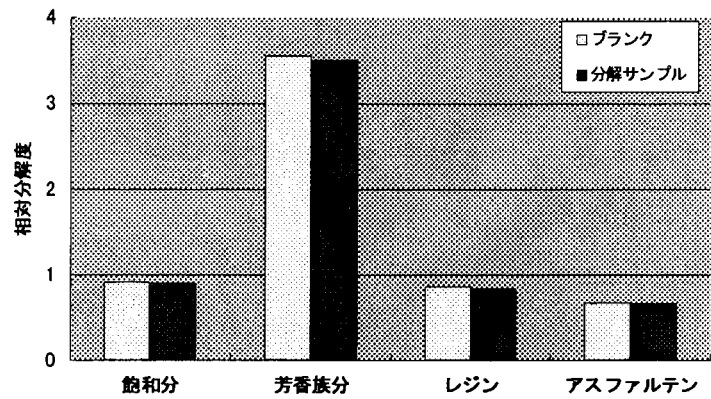


図10. C重油を基質として嫌気分解試験を行った結果

## 研究発表

発表題名	掲載法/学会等	発表年月	発表者
紙上発表			
栄養源及び石油分解微生物コンソーシアを固定化した担体によるC重油の分解	生物工学会誌、77巻、5号 181-186	1999年	福岡聰、小比賀秀樹、垣田浩孝、上嶋洋、北村孝雄、丸山明彦、東原孝規
生分解性素材を用いた微生物・栄養塩同時固定化担体による流出油の分解	化学装置 vol.41, No.7	1999年7月	小比賀秀樹、福岡聰、垣田浩孝、北村孝雄
口頭発表			
石油分解菌固定化担体によるC重油の分解	第2回マリンバイオテクノロジー学会大会、広島	1998年5月	福岡聰、小比賀秀樹、垣田浩孝、上嶋洋、北村孝雄、丸山明彦、東原孝規
栄養源および石油分解微生物コンソーシアを固定化した担体によるC重油の分解	テクノフォーラム'99・イン・かがわ	1998年5月	福岡 聰、小比賀秀樹、垣田浩孝、上嶋 洋、北村孝雄、丸山明彦、東原孝規
「海洋油分解微生物・栄養塩同時固定化担体による流出油の分解」	環境技術推進会議特別講演会、札幌	1999年10月	小比賀秀樹、垣田浩孝、福岡聰、北村孝雄
栄養塩固定化担体による海洋油分解微生物のスクリーニング	第4回マリンバイオテクノロジー学会、高松	2000年5月	小比賀秀樹、福岡聰、垣田浩孝、北村孝雄
微生物・栄養塩同時固定化担体による流出油成分の分解	環境技術推進会議特別講演会、呉	2000年12月	小比賀秀樹、福岡聰、垣田浩孝

## 工業所有権

特許等の名称	願書年月日	公告番号	公告期日	登録番号
なし				

# 13. 微生物による流出油漂着沿岸海域の環境修復技術に関する研究

## (11) 沿岸海域における微生物の流出油分解機能の評価技術

担当機関 経済産業省 独立行政法人 産業技術総合研究所 丸山明彦、田中一裕

分野 水環境

研究期間 平成10年～平成14年度

研究予算総額 63,558千円

### 研究の背景と目的

近年、石油による海洋汚染は、海洋の生態系や水産生物などに悪影響を及ぼすことから、世界的な環境問題となっている。海洋に流出した石油は、蒸発したり光や酸素による物理化学的な変化を受けるが、最終的には、海水や底泥中の多種多様な微生物の共同作業により分解される(図1)。この微生物活動を促進し環境浄化を図ろうというバイオ修復技術の開発が注目を集めている。しかし、従来の分離培養法によるアプローチのみでは限界が大きく、その技術開発の有効性の評価を困難にしている。そこで本研究では、油濁浄化に関わる好気性微生物群集を対象にして、集積培養、単一分離、再構築という方法での共同作業の検出や解明を図る。また、沿岸の油濁浄化に関わる微生物群集全体の組成や機能の評価に関わる手法の開発や適用を図るとともに、分解菌群の添加効果について擬似汚染環境下で実際に評価を行い、微生物による流出油漂着沿岸海域の環境修復技術開発に資することを目的とする。一方、漂着油の一部は海浜の砂泥下部等の嫌気環境に移行し分解されるものと考えられるが、それについての解明は著しく遅れている。そこで、これら嫌気性微生物の分離培養や機能の解明を図ることを目的とする。

### 研究の成果

#### A. 好気性微生物

日本海重油流出事故で大量の流出重油が漂着した石川県沿岸域では最も汚染された地点(珠洲西海岸・長橋)において、事故後1年半にわたって、海水中の微生物群集によるC重油分解能を明らかにした。同調査地点の現場海水試料に栄養塩を添加した培養系では、分解細菌が短期間で著しく増殖しC重油分解活性を示したが、栄養塩無添加系ではC重油の分解はほとんど認められなかった(図2)。このことから、汚染沿岸域に栄養剤を散布することが有効であることを明らかにした。

瀬戸内海沿岸域の海水試料から、集積培養法により脂肪族炭化水素分解菌(GR211P1株)とグラム陽性細菌(GR211W、GR211Y株)からなるC重油分解菌コンソーシア(複合微生物系)を取得した。この3種混合菌コンソーシアでは、分解菌GR211P1単独の場合に比べ、重油成分中の飽和画分の分解が促進されることを明らかにした。

これまでに、流出油で汚染された現場海域海水中の微生物群集や汚染沿岸域から分離した細菌による重油の分解性は、重油中の飽和画分は比較的良好に分解されるが、難分解性の多環芳香族炭化水素(PAH)等を含む芳香族画分の分解は少なく、縮合した芳香族環構造で分子量の大きいレジン画分やアスファルテン画分はほとんど分解されないことを認めた。難分解性のPAH分解菌を分離するため、分解菌の培地組成を検討し、流出重油で最も汚染された地点の海水試料から集積培養法によりPAH分解細菌の分離に成功した。さらに集積培養法により分離した菌株の内、2菌株(MAI4、MAI8)の分類同定や16S rDNAの塩基配列に基づく分子系統解析を行った結果、これらの菌株は既知の属種に分類できず、新属新種の微生物と判断された。

一方、重油流出事故で大量の流出油が漂着した福井県三国町沿岸油濁環境下に生息していた石油分解微生物の分子レベルでの解析を進め、これまで日本沿岸海域では未報告の芳香族炭化水素分解菌が優占することを解明し(図3)、その塩基配列情報からこれに特異的なDNAプローブの開発に成功した。前記GR211P1についても、同様に新たなプローブを開発した。これらのプローブについては、顕微鏡下での遺伝子相補性解析に基づく細胞識別手法(FISH法)によりその有効性を確認した。さらに、自然環境中での石油分解細菌等の優占度を分子・細胞レベルで解析するため、定量的な微生物相解析手法の開発



を行った。その結果、多様な自家蛍光物質を含む石油成分の妨害を受けず、手間のかかる放射性同位元素や既に特許化されている酵素学的遺伝子増幅反応(PCR)を用いず、全群集中に占める特定微生物の優占度測定を可能にする手法(FDBH法)を確立した(図4)。それに拠って、上記芳香族炭化水素分解菌や脂肪族炭化水素分解菌の検出用プローブを用い、日本海重油流出事故直後の汚染海水中より採取し凍結保存していた微生物拡散試料を対象に、これら分解細菌の優占割合を見積もった。その結果、事故直後の油濁沿岸海水中には前者が約25%、後者が4-7%の割合で分布していることを見出した。さらに、その他の海域においてもこれら微生物種が検出されたことから、これらは広く日本周辺の沿岸海域に分布する常在菌と推測された。この定量的な微生物相解析手法は、従来法では分離・培養が容易でない石油分解菌を分子遺伝学的に検出・定量し、その環境中での全微生物に占める分解菌の優占度測定を可能にするものであり、汚染環境の診断やその浄化・修復技術開発に不可欠な評価手法の一つとして有益なものと考えられた。

また、日本海重油流出事故海域から分離した好気性多環芳香族炭化水素分解細菌を対象に、その基質分解能等を調べた。用いた2菌株(ANI7A, ANI7P)は、いずれもフェナントレイン(PHE)を20~30%分解したが、アントラセン(AN)は数%しか分解しなかった。一方、別途分離したMAI8菌株とのコンソーシアでは、PHEの分解率が単一菌株時の約2倍向上した。分子系統解析や分類学的性状試験の結果、前2菌株はコロニー色調が異なるものの同一種と見なされた。さらに、これら石油分解細菌の種特異的検出を可能にするDNAプローブを開発した。

最後に、分離した日本沿岸域で石油分解に寄与する可能性の高い4種微生物コンソーシアを用い、人為的な汚染環境下においてそれらが石油分解にどのような影響を及ぼすのかを調べた。同時に、その分解過程においてこの石油分解菌コンソーシアがどのような挙動を示すのかを、独自に開発したDNAプローブと定量的なFISH法を用いて解析した。その結果、栄養塩類の添加に加え、これら微生物の接種により石油分解が大きく促進されることを見出した(図5)。さらに、4株のうち1株は添加直後より減少、残り3株は時間とともに増加したが、その挙動には明瞭な菌株差があることを見出した。このように、本研究で用いた手法や得られた知見は、今後のバイオ修復技術の開発や評価に大きく貢献するものと考えられた。

## B. 嫌気性微生物

平成10~11年度に開発した、油存在下での嫌気性微生物培養条件を用い、平成12年度には東京湾試料からトルエンを嫌氣的に分解できる微生物の純粋分離に成功した。平成13年度には、その純粋分離株の菌学的性質について、具体的には、生育の温度依存性、pH依存性、塩濃度依存性、利用可能な電子供与体、電子受容体等について調べた。その結果、この嫌気性炭化水素分解細菌は、至適生育温度が35°Cで、硫酸塩や亜硫酸塩等を利用することがわかった。

## 研究のまとめ

微生物による流出油漂着沿岸海域の環境修復技術開発に資することを目的として研究を行った。その結果、

- (1)沿岸海域の石油分解が栄養塩類の添加により促進されることを確認した。
- (2)好気性石油分解菌を分離し選抜するとともに、複数菌株接種時の分解特性の変化を調べた。
- (3)二三の新規微生物を含め、選抜した分解菌を特異的に検出するDNAプローブを開発した。
- (4)別途確立した分子定量解析手法により、実際の石油流出事故海域試料で2種の分解菌を検出、その優占度解析を実現した。

これらの結果に基づき、

- (5)栄養塩添加擬似現場培養実験を行い、これら複数の分解菌の接種により分解がさらに促進されることを見出した。
- (6)定量的な細胞解析手法を用い、この分解過程における各々の接種菌株の挙動を解明した。

一方、嫌気性微生物関連では、

- (7)トルエンを嫌氣的に分解する微生物の純粋分離に成功、それが新種の硫酸還元菌であることを解明した。

以上、本研究により、当該技術開発に有効な二三の新しい解析・評価手法や微生物製剤用の新しいシードが得られたことから、本研究は当初目標を十分に達成したと考える。

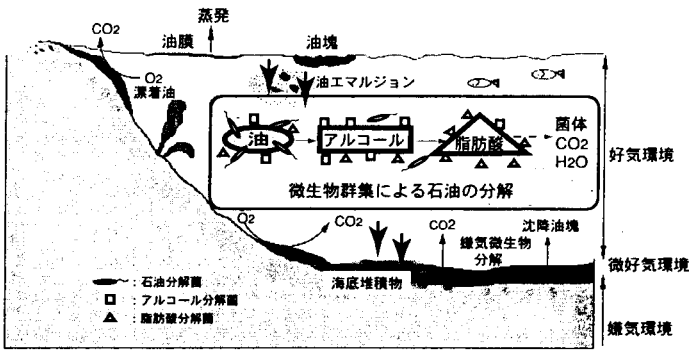


図1. 海洋に流出した石油のゆくえ。多種多様な微生物の共同作業により完全分解されていると考えられる。

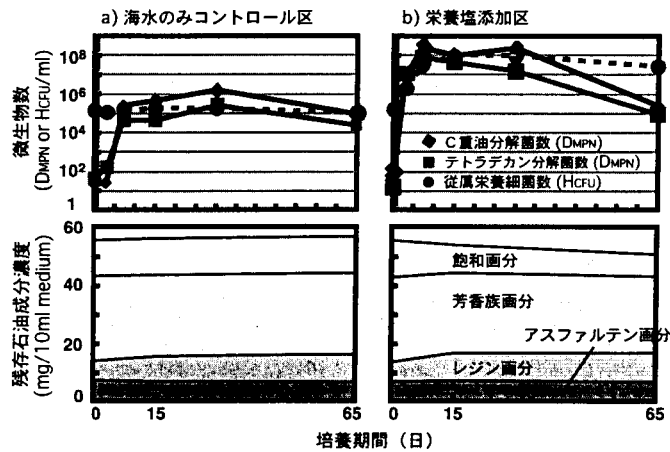


図2. 沿岸海水にC重油を添加した場合の微生物群集と石油成分の経時変化。用いた海水試料は1998年6月に石川県珠洲西海岸長橋にて採取した。

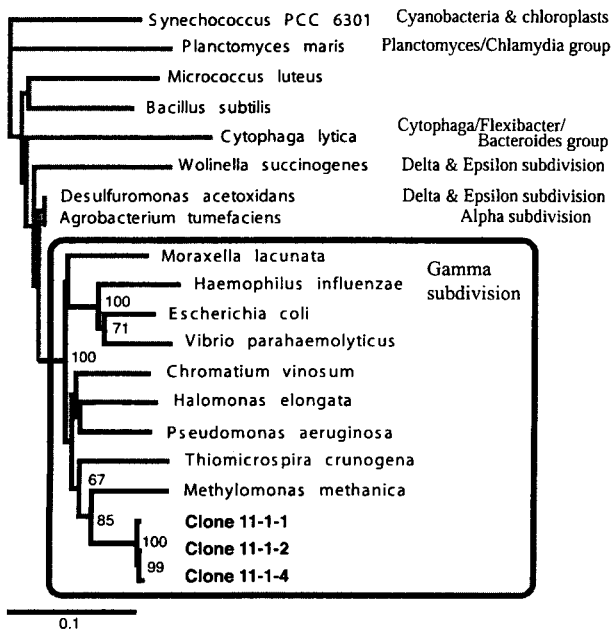
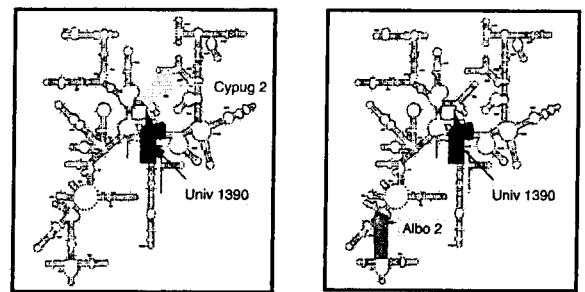


図3. ナトカ号石油流出事故直後の三国町沿岸濁海水中より見出した環境微生物クローンの分子系統学的位置。その最近縁種は *Cycloclasticus pugetii* とその後判明した。



環境試料と関連標準菌株でのデータ収集、比較

- バクテリア各種
- アーキア各種
- ユーカリア各種

$$\%X = \frac{6C1/8N \times (8U/8N)^{-1} - \sum_{i=1}^n [8R_i/8N \times (8U/8N)^{-1}]^{-1}}{\sum_{i=1}^n [8R_i/8N \times (8U/8N)^{-1}]^{-1} - \sum_{i=1}^n [8R_i/8N \times (8U/8N)^{-1}]^{-1}} \times 100$$

$$\%X = \frac{\dots \times (8U/8N)^{-1} - \sum_{i=1}^n [8R_i/8N \times (8U/8N)^{-1}]^{-1}}{\sum_{i=1}^n [8R_i/8N \times (8U/8N)^{-1}]^{-1} - \sum_{i=1}^n [8R_i/8N \times (8U/8N)^{-1}]^{-1}} \times 100$$

対象生物	優先割合 (%)
バクテリアドメイン	50   100
・ 標的微生物 A	20   40
・ 標的微生物 B	10   20
アーキアドメイン	10
ユーカリアドメイン	40

図4. 定量的な蛍光ドットプロットハイブリダゼーションによる相対分子定量法に基づいた環境微生物定量解析。2つの標的微生物分子サイトの相対的な割合から、その微生物の全体に占める割合（優先割合）を見積もる。この場合16S rRNAが標的分子。

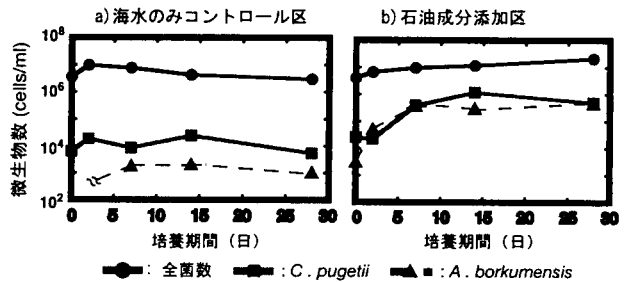


図5. 沿岸海水試料に石油成分を添加したことにより増殖し顕在化した2種石油分解菌。定量的なFISH解析による。

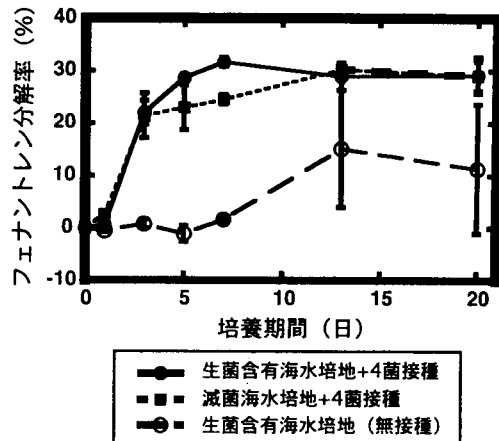


図6. 石油分解菌コンソーシアの添加に伴うフェナントレン分解率の経時変化。分解菌添加により、沿岸海水中の汚染物質分解が大きく促進されることを証明。

# 研究発表

発表題名	掲載法/学会等	発表年月	発表者
(誌上发表) ナホトカ号流出重油の日本海沿岸海域微生物による分解性	環境化学, 8, 787-796	1998年12月	小森正樹、芹川俊彦、庄田丈夫、中村嘉利、澤田達郎、丸山明彦、東原孝規
石油を食べる微生物たち—海洋石油分解微生物とバイオレメディエーション	油濁基金だより、(財)漁場油濁被害救済基金、No.65、1-8	1999年3月	東原孝規
<i>Desulfovirga adipica</i> gen. nov., sp. nov., an adipate-degrading, Gram-negative, sulfate-reducing bacterium	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50:639-644	2000年3月	田中一裕、Erko Stackebrandt、遠山茂広、江口正
分離培養困難な環境微生物へのアプローチ	バイオサイエンスとインダストリー, 60 (1), 31-34	2002年1月	丸山明彦
分子遺伝学・組織化学的解析技術	微生物利用の大展開、今中忠行編、エヌ・ティー・エス、東京、pp182-189.	2002年7月	丸山明彦、砂村倫成
Spectral imaging detection and counting of microbial cells in marine sediment	Journal of Microbiological Methods, 5:57-65	2003年4月	砂村倫成、丸山明彦、辻嶋、倉根隆一郎
Dynamics of Microbial Population and Strong Selection for <i>Cycloclasticus pugetii</i> following the Nakhodka Oil Spill.	Microbial Ecology	印刷中	丸山明彦、石渡寛之、砂村倫成、北村恵子、藤田恒美、松尾勝、東原孝規
ATP 他 14件	地球環境調査計測辞典第3巻 沿岸域編、フジテクノシステム、東京。	印刷中	丸山明彦、石渡寛之
(口頭発表) 海洋油濁環境における微生物群集の挙動	マリンバイオテクノロジー学会大会	1998年5月	丸山明彦
Hydrocarbon-Degrading Potential of Microbial Population in Oil Spill-Affected Coastal Areas in the Sea of Japan	International Symposium on Progress and Prospect of Maine Biotechnology, China	1999年10月	東原孝規、丸山明彦、藤田恒美、石渡寛之、芹川俊彦、小森正樹、松尾勝
アジピン酸を分解する新規硫酸還元菌	日本農芸化学学会大会、東京	2000年4月	田中一裕、Erko Stackebrandt、遠山茂広、江口正
Evaluation of total microbial population and predominant oil-decomposers in oil-contaminated seawater after '97 Nakhodka's oil spill in Japan	5th International Symposium on Environmental Biotechnology, Kyoto	2000年7月	丸山明彦、東原孝規、石渡寛之、藤田恒美、松尾勝、北村恵子、倉根隆一郎
Molecular specification and quantification of predominant microbes in oil contaminated seawater.	9th International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam	2001年8月	丸山明彦、北村恵子、石渡寛之、松尾勝、東原孝規、倉根隆一郎
日本沿岸域に頻出する特定石油分解細菌の定量検出	マリンバイオテクノロジー学会	2002年5月	丸山明彦、北村恵子、飯塚知子、砂村倫成、東原孝規
新規石油分解菌の特異的検出法 他 22件	日本微生物生態学会	2002年11月	三朝千稚、飯塚知子、北村恵子、東原孝規、砂村倫成、丸山明彦

## 工業所有権

特許等の名称	願書年月日	公告番号	公告期日	登録番号
分解細菌を検出または定量する方法およびそれに用いるプローブ	2000. 8. 25	特願平11-237818		
汚染環境および環境試料の分子遺伝学的解析・評価法	2001. 11. 9	特願2001-345154		
新規微生物	2002. 11. 14	特願2002-331358		
Methods and nucleic acid probes for molecular genetic analysis of polluted environments and environmental samples	2001. 11. 9	United State Patent Application No. 10/007, 725		