



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	石油汚染土壌の浄化：バイオレメディエーションは有効か？
Author(s)	奥山，英登志
Description	北海道大学大学院地球環境科学研究院平成19年度公開講座 快適環境をまもる微生物たちの姿とはたらき. 平成19年8月21日～9月25日. 札幌市
Relation	北海道大学大学院地球環境科学研究院平成19年度公開講座 快適環境をまもる微生物たちの姿とはたらき. 第2回.
Issue Date	2007-08-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/36616
Type	lecture
File Information	koukai-okuyama.pdf



第2回 8月28日(火)

石油汚染土壌の浄化～バイオレメディエーションは有効か？～

講師：大学院地球環境科学研究院 准教授 奥山英登志

はじめに

去年（2006 年）の雪解けの頃、知床半島に近いオホーツク海沿岸で、油塊や油にまみれた多数の海鳥の死骸が打上げられているのが発見されました。このニュースを聞き、1997 年 1 月に日本海（島根県隠岐島沖）で起きたロシアのタンカーナホトカ号の重油流出事故を思い出した方も多いのではないのでしょうか。1989 年以降の比較的大きなタンカーからの石油流出事故を表 1 にまとめてみました。

石油などで汚染された環境を生物の力によって浄化する技術をバイオレメディエーションといいます。この技術は、例えば汚染物質を燃やしてしまう方法などに比べて、環境に優しいといわれています。しかし、必ずしも有効でないこと、外来生物を導入することへの違和感などから使いにくい技術でもあります。石油によって汚染された土壌を対象にした微生物を使ったバイオレメディエーションの問題点と新たな可能性について、私たちの研究室で行った実験結果を基に考えてみます。

表 1. 1989 年から 1999 年までの主なタンカーからの石油流出事故*

年	船名	旗国	汚染被害国	流出量（トン）	事故内容
1999	エリカ	マルタ	フランス	10,000+	破損
1997	ナホトカ	ロシア	日本	6,200	破損
1996	シー・エンプレス	リベリア	イギリス	72,000	座礁
1991	ABT サマー	リベリア	アンゴラ	260,000	火災
1989	エクソン・バルディス	アメリカ	アメリカ	37,000	座礁

*海上技術安全局安全基準課安全評価室資料（平成 12 年）の一部を改変して引用した

バイオスティミュレーションとバイオオーグメンテーション

バイオレメディエーションには、汚染箇所に栄養塩や酸素などを投入して土着性の微生物の力を利用するバイオスティミュレーション（BS）と、汚染箇所に汚染除去能力に優れた微生物を栄養塩や酸素と共に投入するバイオオーグメンテーション（BA）があります。両者の簡単な説明と長所・短所を表 2 にまとめました。この講義の最後に出てくる原地性バイオオーグメンテーション（原地性 BA）も含まれています。

表 2. バイオスティミュレーション、バイオオーグメンテーション、原地性バイオオーグメンテーション技術の説明

	技術の内容	長所	短所
バイオスティミュレーション (BS)	汚染箇所に栄養や酸素を供給し、土着性の微生物を活性化して汚染を除去する。	・環境への影響が小さい	・遅効性・効果がない場合がある
バイオオーグメンテーション (BA)	汚染箇所に栄養や酸素ともに石油分解能に優れた微生物を供給して、汚染を除去する。	・即効性	・効果がない場合がある・近隣住民の不安
原地性バイオオーグメンテーション (原地性BA)	浄化すべき汚染箇所に生息する微生物 (群) を予め取得しておき、これを用いてBAを行う。	・環境への影響が小さい ・即効性	・予想していた汚染が起こらないと、無駄になる

表 3. 土壌中での軽油分解率と検出された細菌の種類数

	2 週間後の分解率%	土着細菌の種類**	単離された細菌
対照*	15		
BS (未滅菌土壌を使用)	15	10	1 (単離株 J)
BA (未滅菌土壌を使用)	51	6	2 (単離株 N と O)
BA (滅菌土壌を使用)	46	0	—

*滅菌土壌を使用し、栄養塩・石油分解菌を加えず、軽油のみを加えた (自然蒸発)。

**PCR 変性剤濃度勾配電気泳動法で検出された DNA バンドの数を土着細菌の種類数とした。

石油分解菌とその性質

石油を分解する能力を持つ細菌はいたるところにいますと考えられます。私たちが発見したものの中で最も高い石油分解能を持つ細菌は、古い石油タンクの水受け部分に溜まった水から単離されたものです。この石油分解菌 (WatG 株) は灯油や軽油の他にガソリンや重油、自動車のエンジン油なども分解することがわかっています。

石油分解菌の土壌中での石油の分解性

WatG 株が土壌中でも石油分解能力を示すことを確認するために土壌培養実験を行いました。これは、軽油と栄養成分を加えた水田の土壌に WatG を接種して培養するものです。WatG を接種するときは、土壌をそのまま (未滅菌土壌といいます) 用いる場合と、土着の細菌の影響を取り除くために滅菌操作をした土壌 (滅菌土壌といいます) を用いる場合があります。一定時間の培養後、土壌中の油分を抽出し、定量しました。培養 2 週間後の結

果をみると、BA では滅菌土壌、未滅菌土壌の場合も軽油の分解が見られます（表 3）。土着菌が存在する場合（未滅菌土壌での BA）の方が、WatG 単独の場合（滅菌土壌での BA）よりも分解活性が高いことがわかります。また、BS はほとんど効いていませんが、培養時間が長くなるにつれて BS の効果が現れ、BA との差は小さくなり、4 週間以降ではほとんど差はなくなりました。

土の中で起こっていること

WatG は土壌中にバイオサーファクタント（界面活性物質）を放出（分泌）することがわかっています。恐らく、バイオサーファクタントによって石油成分を乳化し、細胞内に取込みやすくしていると考えられます。

軽油で汚染された水田土壌を WatG を使って BA を行う場合、滅菌土壌を使うよりも、未滅菌土壌を使った方がより高い分解活性が得られましたが、このことは、未滅菌土壌では、土着細菌と WatG が協調して石油を分解していることを示唆します。そこで、PCR-変性剤濃度勾配電気泳動法という方法によって、土壌中のどのような細菌が石油分解に関わっているかを調べてみました。

PCR-変性剤濃度勾配電気泳動法

この方法では、まず、2 グラムほどの土壌中にいる微生物の DNA を抽出します。その DNA を使って、PCR という方法で全ての細菌に存在するある遺伝子の一部分を増幅します。増幅した遺伝子産物（DNA 断片）を電気泳動にかけると、もし少しでも DNA の塩基配列に違いがあると、変性剤の影響の受け方が異なるためその DNA は分離します。この方法では、異なる二本の DNA のバンドは異なる二種類の細菌に由来するとみなします。つまり、PCR-変性剤濃度勾配電気泳動法によって細菌を培養しなくても、土壌中におおよそ何種類の細菌がいるかの見当をつけることができます。土壌 1 グラム当り 2,000 から 18,000 種程度の生物が生息しているといわれますが、細菌の場合はそのほとんど（99%から 99.9%）は実験室での培養ができない、もしくは困難であるとされていますので、PCR-変性剤濃度勾配電気泳動法はこのような難培養性菌の実態を知る有効な手段の一つとされています。

土壌中の微生物種の変動

軽油で汚染させた水田土壌をバイオレメディエーション処理したときに土壌中のどのような細菌が多く見られるかを PCR-変性剤濃度勾配電気泳動法によって調べると、BS と BA では大きく異なることがわかりました。滅菌土壌を BA 処理した場合は WatG のバンドだけが認められます。しかし、BS と未滅菌土壌を BA 処理した場合は、多数の DNA バンドが見られますが、BS の場合の方がより多種類の細菌が出現することがわかりました。BS と二通りの BA の場合のバンドの数を表 3 にまとめました。興味深いことに、未滅菌土壌の BA と BS の土壌で出現した細菌のバンドで一致するものはありませんでした。

土壤中細菌が互いに協調して石油を分解するという考え方

BS の土壌で出現した DNA のバンドに相当する細菌は実際に軽油の分解に関わっていると考えられます。一方、未滅菌土壌で BA を行った際に出現したバンドも軽油の分解に関わっており、しかも加えた WatG と協調して軽油を分解していることが予想されます。これを確認するため、BA を行った土壌から土着細菌の分離を行いました。表 3 に示すように、この土壌には少なくとも 16 種類の土着性細菌がいると予想されますが、BA を行った土壌から分離できたのは 2 種類でした（分離菌 N と O）。しかし、分離菌 N と O は単独では軽油を分解する能力はなく、WatG と共存させた場合、分離菌 O は WatG の軽油分解能を抑制することが分かりました。ここまでの実験結果からは、WatG が土着細菌と協調して軽油を分解しているという裏づけは得られていません。

水田土壌の土着性石油分解菌

BS 処理を行った土壌からは 1 種類だけ細菌を分離することができました（分離菌 J）。分離菌 J は分離菌 N や O と異なり、単独でも軽油の分解活性を示し、水田土壌中の軽油分解活性は WatG 以上でした。

原地性バイオオーグメンテーション（原地性 BA）という考え方

表 2 にあるように、BA は即効的に石油などの汚染物質を分解するには効果的ですが、対象となる環境条件（土壌の種類・性質や温度）などによってはほとんど効果を示さない場合があります。一方、BS は環境に与える影響が少なく、また社会的な同意を得られやすいという利点がありますが、効果が現れるまでに時間がかかり、もし汚染箇所に有用な菌がいないか、非常に少ない場合は効果を示さないという欠点もあります。私たちはこれらのことを考え、予め汚染が予想される地域の微生物をよく調べておいて、一旦汚染が起こった場合に、分離した細菌や細菌群に使用することによって BA を行う（これを原地性 BA と名づけました）ことによって、より効率的なバイオレメディエーションができるのではないかと考えています。上に述べた分離菌 J を使った実験が原地性 BA に当たります。予め汚染箇所の土壌や微生物についての情報を得ておくことは BS にも役立つはずです。

北海道はサハリン油田に近接しています。今後の本格的な原油生産に伴い、北海道の近海を通るタンカーも増えると思われます。また、暴噴による油井から石油流出も起こるかもしれません。平成 10 年から 14 年にかけて国立環境研究所が兵庫県日本海沿岸などで行った海域の油汚染に対する BS の現場実験では、時間がかかりますが、有効であるという結果が得られています。これは海洋や海岸には能力のある石油分解菌が少なくないことを示唆しています。北海道は冷涼な気候で、流水が接岸するという特殊な事情もありますので、独自の対応が必要です。北海道近海は優れた漁場でもありますので、一旦急があったときに、原地性 BA によってより迅速な対応ができるよう、不断の備えが必要だと考えています。