〈論 文〉

海洋微生物による原油の分解について

Degradation of crude oils by marine microorganisms in enriched seawater medium

村 上 昭 彦* 鈴 木 一 信* 山 根 晶 子*
Akihiko MURAKAMI Kazunobu SUZUKI Akiko YAMANE

Abstract

Degradation of three kinds of crude oils such as Arabian light, Berri and Murban crude oil by a pure bacterial strain, *Caulobacter* sp., and by mixed culture integrated from the sea water sampled at Kawasaki Harbor was studied experimentally in the enriched seawater (ESW) medium.

The degradation of oils were determined in total residual oil and in four fractions of saturated, aromatics, asphaltene and column residue by use of column chromatography.

The saturated fraction was most biodegradable and the aromatics followed for all three crude oils in both pure and mixed cultures. The asphaltene and the column residue were not degraded apparently by microorganisms in 30 days incubation. Crude oils in pure culture were degraded from 30 to 36 percent and 45 to 55 percent in mixed culture. Activities of oil degradation were higher in mixed culture. Average degradation rates of crude oil for the duration of rapid disappearance of oil were calculated to be in a range from 4.92 to 5.83 mg-oil l⁻¹h⁻¹ for pure culture and from 15.1 to 19.4 mg-oil l⁻¹h⁻¹ for mixed culture. Relative degradation of n-paraffin of different carbon numbers in saturated fraction was similar in both cultures.

Key words: oil, biodegradation, marine microorganisms

1. 諸 言

近年、海洋環境に事故や船舶等によって放出される石油およびその関連物質は、少なくとも年間数百万トンに達するものと推定されており、海洋の石油による汚染は世界的に重要な環境問題となっている。海洋に流出した石油は、初め蒸発、溶解などの物理化学的变化を受けるが、このような除去過程は比較的早く終ると考えられ、次いで海水中的の微生物の作用によって消失して行くが、この微生物による石油の分解除去過程は、海洋の油汚染に対する最も重要な自浄作用と思われる^{1,2)}。

海洋石油分解微生物による原油あるいは石油系炭化水素の微生物分解過程を検討することは、海水中における石油の微生物による分解除去速度を評価する基礎として重要である。著者らは、既に東京湾で採取した海水から単離した *Flavobacterium* sp. および川崎港で

採取した海水から単離した *Caulobacter* sp. による海水中での n-パラフィンの分解速度³⁾、および *Caulobacter* sp. による海水中でのアルキルベンゼン、A 重油および Iranian heavy 原油の消失速度⁴⁾について報告した。

本報においては、前報^{3,4)}と同じ *Caulobacter* sp. および川崎港から採取した海水をクロシンを唯一の炭素源として集積培養した混合培養系によって、Arabian light 原油、Berri 原油、および Murban 原油の3種類の原油について、栄養塩添加海水中での消失速度を測定し、さらにカラムクロマトグラフィによって原油を4成分に分画して各成分の微生物分解について測定、検討した結果について述べる。

* 東京農工大学工学部化学工学科 〒184 小金井市中町2-24-16, Department of Chemical Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, Naka-machi 2-24-16, Koganei, Tokyo 184 Japan

2. 実験法

2.1 石油分解微生物

本研究において用いた海洋石油分解微生物は、一つは前報^{3,4)}と同じグラム陰性の好気性桿菌で付着柄を有する *Caulobacter* sp. であり、他は1983年3月9日川崎港で採取した海水からケロシンを唯一の炭素源とする栄養塩添加海水培地で集積培養することによって、石油分解微生物の密度を高めた混合培養系である。混合培養系の構成細菌の同定は行なわなかった。

2.2 原油

本実験で使用した原油は、Arabian light 原油, Berri 原油および Murban 原油の3種類であり、東亜燃料工業株式会社より提供を受けたものである。これらの原油は、海洋流出原油を模擬するため、および微生物の増殖に有害と思われる低沸点成分を除去するために、ビーカーに入れ100℃の湯浴中で48時間前処理をして揮発性成分を除いたのち、微生物による分解実験に供した。

2.3 実験操作

Caulobacter sp. を用いた純粋培養系についての実験手順を Fig. 1 のフローシートに示した。ケロシンを唯一の炭素源として調製した斜面培地に保存しておいた *Caulobacter* sp. は、天然海水（三浦半島荒崎で採取して6ヵ月以上暗所に保存したもの）に NH_4Cl 100mg/l, K_2HPO_4 10mg/l, および酵母エキス10mg/l を加えた栄養塩添加海水 (ESW_1) に50mg/l のケロシンを加えた400mlの海水培地により、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で2日間前培養を行った。振盪条件は後述の本実験と同様である。

本実験に際しては、保存天然海水に NH_4Cl 1,000 mg/l, K_2HPO_4 100mg/l, 酵母エキス10mg/l を加えた栄養塩添加海水 (ESW_{10}) 90ml, 前述の前培養液10ml, および所定の原油0.5g を500mlの坂口フラスコに加えた。このように調製した坂口フラスコを10~12本用意し、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で振幅5 cm, 110strokes/min で振盪培養した。別に100mlの ESW_{10} に所定の原油0.5g を加えた500mlの坂口フラスコを4~7本用意し同様の操作を行なった。これは海洋石油分解微生物の接種のない場合の原油の減量を求めて、微生物分解のある場合の結果と比較するためのものであり、ここではこの操作を Weathering と呼ぶことにする。いずれの場合にもフラスコには綿栓をして酸素の供給が維持されるようにした。また、坂口フラスコ、 ESW , および原油はあらかじめオートクレーブで滅菌した。

所定の日数毎にフラスコ内の全菌数と残存油量とを測定した。残存油については、カラムクロマトグラフィによって飽和分、芳香族分、アスファルテン分、およ

Fig. 1 Flow sheet for experiment of microbial degradation of crude oil.

びカラム残査分の4成分に分画した。さらに飽和分についてはFID ガスクロマトグラフによって、飽和分中のn-パラフィンの炭素数による減少の差異の有無について検討した。実験期間は30日間とした。

混合培養系においては、油濁海域から採取した海水30ml を ESW_1 120ml に加え、50mg/l のケロシンを添加したのち $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で5日間振盪培養によって集積培養したものを、純粋培養系の場合の前培養液と同様に取り扱い、以後の実験手順は Fig. 1 のフローシートに従った。

2.4 測定法

(1) 全菌数の測定 培養液中の細菌数は、残存油量の測定前に菌数計算室を用いた検鏡法によって全菌数として計数した。

(2) 残存油量の測定と各成分への分画 所定の日数毎にフラスコ内の全残存油量をn-ペンタン80ml, ベンゼン20ml の混合溶媒で抽出したのち、あらかじめ精秤した100ml のビーカーに移し、 30°C に設定したマントルヒーターを用いて溶媒を揮発させた。恒量になったことを確かめたのち全残存油量を算出した。

次いで活性アルミナを用いたカラムクロマトグラフィによって、各原油について4成分への分画を行

なった。活性アルミナは80~100メッシュのものをを用い、カラム径は20mmとした。空のカラムに60mlのn-ヘキサンを満してから活性アルミナを少量づつクラックを生じないように振動を与えながら充填容積60mlになるまで充填した。n-ヘキサンの液面が充填層上面になるようn-ヘキサンを流出させたのち、残存油を20mlのn-ヘキサンに溶解してカラム頂に供給した。しかるのちn-ヘキサン120mlを $10\text{ml cm}^{-2}\text{h}^{-1}$ の速度で滴下し展開した。n-ヘキサンを完全に流出させたのち、同一条件でベンゼン、次いでメタノールを用いて展開した。このようにして飽和分(n-ヘキサン溶離分)、芳香族分(ベンゼン溶離分)、アスファルテン分(メタノール溶離分)、およびカラム残渣分の4成分に分画した。カラムクロマトグラフィによる分画後、各溶離分は50℃に設定したマントルヒーターで溶媒を揮発させ、恒量となったところで精秤して各分画量の定量を行なった。カラム残渣分は全残存油量と3つの溶離分の和との差から算出した。

さらに飽和分については、n-ドデカン500mg/lを内部標準物質とした10mlのn-ヘキサンに溶解したのち、FIDガスクロマトグラフ(日立ガスクロマトグラフ163形)によって、炭素数14から32のn-パラフィン量を定量して減少率を求めた。ガスクロマトグラフの操作条件は、カラム内径3mm、カラム長2m、担体は80~100メッシュのセライト、液相はシリコーンOV17、液相5%であり、キャリアガスとして窒素ガスを用い、カラム温度は130℃から310℃まで4℃/minで昇温した。

飽和分中のn-パラフィンの確認は、GC-MS(島津GC-MS7000型)を用いて、標準物質と比較することによってn-パラフィンであること、およびその炭素数を確認した。

3. 実験結果および考察

Fig. 2に *Caulobacter* sp.による3原油の微生物分解時の残存油量および各分画成分の経日変化を、またFig. 3には混合培養系の残存油量および各分画成分の経日変化を示した。○印はWeathering, ●印は微生物分解時の全残存油量を、初期添加全油量に対するパーセントで示したものである。●印と△印との差が飽和分(Sa)の残存量, △印と□印との差が芳香族分(Ar)の残存量, □印と○印との差がアスファルテン分(As)の残存量, および○印がカラム残渣分(Re)の残存量を表わしており、初期添加油量を100%としたときの残存パーセントで表示してある。

Weatheringによる30日後の減少量は、*Caulobacter* sp.による場合0.7~2.6%であり、混合培養系の場合に

Fig. 2 Time course of degradation of residual crude oil, saturated, aromatics, asphaltene and column residue by *Caulobacter* sp.

- W : Weathering
- T : Total residual crude oil
- Sa : Saturated fraction in column chromatograph
- Ar : Aromatics fraction in column chromatograph
- As : Asphaltene fraction in column chromatograph
- Re : Column residue in column chromatograph

は5.3~13.5%となっているが、これは前処理による低沸点成分の除去率の差異によるものと考えられる。微生物分解が起きている場合には、全ての実験において原油が乳化されて海水中に分散していることが観察され、水中に分散しているために蒸発損失はないと考えられること、また Weathering において原油の乳化は

Fig. 3 Time course of degradation of residual crude oil, saturated, aromatics, asphaltene and column residue by mixed culture. Abbreviations are the same as in Fig. 2.

全く観察されず油膜状を保ったことを考え合せると、微生物分解時に Weathering に相当するだけの減少が微生物分解とは別に起きていると見なす必要はないと考えられる。従って、ここでは微生物分解による減少量は初期添加全油量との差と考えた。Weathering の減少量の多い混合培養系においてさえも、微生物分解の大部分が起きる 4 日以内の Weathering による減少量は高々 5% 以下であり、この時点までに原油はエマルジョンとなって海水中に分散し蒸発損失は殆んどないと考えられるので上述の考えは妥当であると思われる。

Fig. 2 において、*Caulobacter* sp. による分解の場合には、2～4 日の緩やかな減少を経過したのち、12～15 日後までに急速に大部分の微生物分解過程が進行し

た。一方、混合培養系においては、Fig. 3 に示されるように実験開始後直ちに急速な微生物分解が起き、4 日後までに大部分の分解過程が進行した。いずれの場合にも、微生物分解の進行過程で原油が乳化したこと、および前報⁴⁾においてアルキルベンゼンの微生物分解に際して微生物が油を乳化するための乳化剤の生成に *n*-パラフィンが必要としたこと、とを考え合せると前処理の段階で飽和分の残存量が多い原油を用いた混合培養系の乳化が早かった理由の一つであると思われる。また、混合培養系の方がより早く油を乳化する能力を有する石油分解微生物が優占種となったことも十分に考えられる。いずれにしる本実験においては原油の乳化と微生物分解の進行とは密接な関連があった。

Caulobacter sp. による分解の場合、および混合培養系の場合のいずれにおいても、経時的に多少の差異はあるものの原油の微生物分解による減少の内容は、先ず飽和分が急速に減少すると共に、これに並行してやや遅い速度で芳香族分が減少している。アスファルテン分とカラム残査分とは、変動はあるものの大きな減少は見られなかった。アルカンが石油分解微生物によってアルコールからカルボン酸に酸化され、次いで β 酸化によって炭素数が減少する経路を経て酸化される⁹⁾ことと、メタノール溶離分であるアスファルテン分の中に脂肪酸カルボン酸やシクロヘキサンカルボン酸などのカルボン酸類が溶離することを考えると、上述の結果はアスファルテン分が全く微生物分解されないことを意味しているとは言い切れないが、30 日間の微生物分解過程においてアスファルテン分には大きな変化がない結果となった。カラム残査分は測定誤差の最も大きい成分と考えられるが、全体として微生物分解の受け難い成分であると考えられる。

Table 1 に初期添加原油、30 日間微生物分解された残存油、30 日間 Weathering された原油の各成分の組成、および *Caulobacter* sp. の場合については 12 日間微生物分解された残存油、また混合培養系については 4 日間微生物分解された残存油の各成分の組成を示した。これから *Caulobacter* sp. の場合、12 日間で 30 日間で微生物分解される 82% 以上の分解が進行していることがわかる。混合培養系では 4 日間で最終値の 52～82% が微生物分解される。初期添加油量に対しては 4 日間で 29～37% の分解がなされている。Berri 原油は 30 日後の分解率は最も高いが、4 日後では最も分解率が低く混合培養系での分解速度は最も遅い。

Fig. 4, 5 に *Caulobacter* sp. および混合培養系によって 3 原油を分解させた時の飽和分ならびに芳香族分の減少過程の経日変化を示した。いずれの場合にも飽和分が急速に分解され分解率も高く、次いで芳香族

Table 1 Biodegradation of crude oil in enriched sea water (residual %)

(a) by <i>Caulobacter</i> sp.					
Crude oil		Initial	B _n ^{a)}	B ₃₀	W ₃₀ ^{b)}
Arabian light	Total ^{c)}	100.0	74.9	69.5	99.3
	Sa ^{d)}	33.0	20.8	15.7	33.9
	Ar ^{e)}	38.7	29.0	26.4	30.5
	As ^{f)}	14.8	13.6	17.4	16.2
	Re ^{g)}	13.5	11.5	10.0	18.7
	Total	100.0	69.7	65.8	98.9
Berri	Sa	35.2	21.3	19.5	36.4
	Ar	26.9	17.6	21.9	30.7
	As	13.6	12.7	13.0	12.5
	Re	24.3	18.1	11.4	19.3
	Total	100.0	69.2	64.0	97.4
	Sa	43.5	26.4	22.8	41.2
Murban	Ar	25.7	16.9	11.9	26.3
	As	16.2	12.9	14.8	14.2
	Re	14.7	13.0	14.5	15.7
	Total	100.0	65.8	53.8	89.8
	Sa	41.1	26.5	12.0	38.5
	Ar	36.2	20.5	15.3	34.5
Arabian light	As	9.5	11.3	13.3	10.8
	Re	13.2	8.3	13.2	6.0
	Total	100.0	71.0	44.4	86.5
	Sa	44.5	27.9	12.2	38.2
	Ar	32.1	24.3	13.4	30.5
	As	12.8	8.5	8.8	11.9
Berri	Re	10.6	10.4	10.0	5.9
	Total	100.0	62.8	54.8	94.7
	Sa	49.8	20.4	14.2	45.4
	Ar	26.7	16.5	13.3	24.5
	As	11.2	12.3	13.5	10.5
	Re	12.3	13.6	13.6	14.3

a) B_n : Residual oil percent after n days biodegradation

b) W₃₀ : Residual oil percent after 30 days weathering

c) Total: Total residual oil

d) Sa : Saturated fraction in column chromatograph

e) Ar : Aromatic fraction in column chromatograph

f) As : Asphaltene fraction in column chromatograph

g) Re : Residue in column

分がやや遅い速度で分解され分解率もやや低かった。

原油による差異は、混合培養系で飽和分においては Murban 原油が最も早く分解されたものの最終的な分解率は殆んど同じであった。Caulobacter sp.による場合も飽和分についてはほぼ同様であった。芳香族分に

Fig. 4 Time course of saturated and aromatics fractions of three crude oils by *Caulobacter* sp.

Fig. 5 Time course of saturated and aromatics fractions of three crude oils by mixed culture.

については、混合培養系においては Berri 原油の場合初期の分解が遅いものの最終的な分解率に大差はなかった。一方 *Caulobacter* sp. による分解の場合、18日後までは3原油とも大差がなかったが、30日後の分解率には相当のばらつきがあった。しかし、いずれにしる原油の石油分解微生物による海水中の分解においては、先ず第一に飽和分の微生物分解が急速に起り、これと並行してやや遅い分解速度で芳香族分が分解されること、および飽和分の分解率が最も高く、次いで芳香族分の分解率がこれに次ぐことが結論できる。

Fig. 6 に混合培養系によって Murban 原油を微生物分解させた場合の飽和分について、FID ガスクロマトグラフにより飽和分中の *n*-パラフィンの減少過程を測定した結果を示した。測定値は初期存在量に対する残存パーセントで示したが、炭素数14から32までの範囲で炭素数に関係なくほぼ同じ割合で微生物分解されて行くことが明らかとなった。なお初期添加 Murban 原油中の *n*-パラフィンの中で最も多く含まれるのは *n*-C₂₀H₄₄ であり、*n*-C₁₄H₃₀ はその5.8%、*n*-C₃₂H₆₆ は4.7%含まれていた。*n*-パラフィンの各成分の存在量に大きな差があるにもかかわらず経時的な分解率がほぼ一様であることは、分解速度がほぼ存在量に比例していることを意味していると考えられる。混合培養系による他の2原油の分解、および *Caulobacter* sp. による3原油の分解においても、飽和分中の *n*-パラフィンは、炭素数14から32の範囲で炭素数に関係なくほぼ同じ割合で微生物分解された。

Fig. 7 に混合培養系および *Caulobacter* sp. による原油の分解における全油量の減少と全菌数の経日変化の代表的な一例を示した。混合培養系の場合、油量の減少が早く起きるのに対応して石油分解細菌の増殖も急速である。いずれの場合にも、油量の急激な減少と石油分解細菌の対数増殖期とは対応している。なお混合培養系においては検鏡によって計数された微生物を全て石油分解細菌と見なした。このことはケロシンを唯一の炭素源として集積培養した上に、さらに原油を炭素源とした本培養において全菌数が100倍以上に増加しているので石油分解菌が圧倒的に優占種であると考えられることから不合理ではないと思われる。

前報^{3,4)}と同様にして、全油量が急激に減少する期間の容積当りの平均分解速度 r_m 、およびその時の石油分解菌の細胞1個当りの分解速度 C_m を算出した結果、

Caulobacter sp. について

Arabian light 原油の場合

$$r_m = 5.83 \text{ mg-oil l}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$C_m = 8.32 \times 10^{-11} \text{ mg-oil cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Berri 原油の場合

Fig. 6 Relative degradation of *n*-paraffin of different carbon numbers in saturated fraction of Murban crude oil by mixed culture. W₃₀ and B_n are the same as in Table 1.

Fig. 7 Time course of total residual crude oil and growth of oil-degradable microorganisms. C denotes cell number.

$$r_m = 4.92 \text{ mg-oil l}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$C_m = 2.33 \times 10^{-11} \text{ mg-oil cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Murban 原油の場合

$$r_m = 5.7 \text{ mg-oil l}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$C_m = 6.88 \times 10^{-12} \text{ mg-oil cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

混合培養系について

Arabian light 原油の場合

$$r_m = 17.8 \text{ mg-oil l}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$C_m = 5.83 \times 10^{-10} \text{ mg-oil cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Berri 原油の場合

$$r_m = 15.1 \text{ mg-oil l}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$C_m = 3.88 \times 10^{-10} \text{ mg-oil cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Murban 原油の場合

$$r_m = 19.4 \text{ mg-oil l}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

$$C_m = 1.63 \times 10^{-10} \text{ mg-oil cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

となった。*Caulobacter* sp.による3原油の微生物分解における r_m は、前報^{3,4)}までの結果で初期添加油量が十分に多い場合の値にほぼ対応した。また細胞1個当りの分解速度も前報^{3,4)}において求められたn-パラフィン、アルキルベンゼン、A重油、Iranian heavy 原油の場合とはほぼ一致し、*Caulobacter* sp.は油の種類によらずほぼ同程度の分解速度を示すものと考えてよいと思われる。

混合培養系においては、単位容積当りの分解速度 r_m は*Caulobacter* sp.の純粋培養系の約3倍の速度となった。細胞1個当りの分解速度 C_m は約10倍前後に達しており、混合培養系の方が高い分解能力を有することが明らかである。この理由は明確ではないが、種々の石油分解能力を有する石油分解微生物が共存する混合培養系の方が原油の分解に有利であることを示しており、海洋環境に放出された原油が微生物の作用によって分解除去されて行く速度を推定しようとする場合には考慮されなければならない点であろう。

4. 結 論

川崎港から採取した海水から単離された石油分解細菌*Caulobacter* sp.および1983年3月9日川崎港で採取した海水からケロシンを唯一の炭素源として集積培養した混合培養系の2種の系について、Arabian light 原油、Berri 原油、Murban 原油の3種類の原油の分解率、分解速度、および細胞1個当りの分解速度を実験的に測定した。

各原油は活性アルミナを用いたカラムクロマトグラフィによって、飽和分、芳香族分、アスファルテン分、およびカラム残査分の4成分に分画し、その微生物分解特性について検討した。飽和分については、FID ガスクロマトグラフによってn-パラフィンの炭素数による微生物分解特性を検討した。

その結果、*Caulobacter* sp.を用いた純粋培養系、および集積培養した混合培養系のいずれの系においても、30日間の培養期間中に分解されるのは、全ての原

油について飽和分と芳香族分とであり、飽和分が最も良く分解され、次いで、芳香族分が分解された。アスファルテン分とカラム残査分には大きな変化は認められなかった。また、3原油の全分解率は、純粋培養系で30~36%、混合培養系で45~55%に達した。

本実験において、純粋培養系では実験開始後12日間で大部分の分解が進行したのに対し、混合培養系では4日後までに急速な分解が測定され、混合培養系の方が分解速度も速いことが明らかとなった。

Caulobacter sp.を用いた純粋培養系の容積当りの分解速度 r_m は、4.92~5.83 mg-oil l⁻¹ h⁻¹であり、また細胞1個当りの分解速度 C_m は、0.69~8.32 × 10⁻¹¹ mg-oil cell⁻¹ h⁻¹であったのに対し、混合培養系では r_m は15.1~19.4 mg-oil l⁻¹ h⁻¹であり、 C_m は1.63~5.83 × 10⁻¹⁰ mg-oil cell⁻¹ h⁻¹であった。

飽和分中のn-パラフィンは、炭素数14から32の範囲で炭素数に関係なくほぼ一様に分解された。

謝 辞

川崎港の海水から単離した石油分解細菌*Caulobacter* 属の同定は、農林水産省農業技術研究所の都留信也氏にお願いしたことを付記し、謝意を表します。

(原稿受理 昭和60年3月1日)

引 用 文 献

- 1) Ahearn, D.G. and Meyers, S.P. (1973) The microbial degradation of oil pollutants, Louisiana State Univ. Pub. No. LSU-SG-73-01, 322pp.
- 2) Zobell, C.E. (1969) Microbial modification of crude oil in the sea, Proc. Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills, 317-326, API.
- 3) 村上昭彦, 松田時雄, 渡辺展宏, 長沢伸一(1976) 海洋微生物によるn-Paraffinの分解について, 日本海洋学会誌, **32**, 242-248.
- 4) 村上昭彦, 長沢伸一(1978) 海洋石油分解細菌によるAlkylbenzene, A重油およびIranian heavy 原油の消失速度について, 水質汚濁研究, **1**, 107-113.
- 5) Van der Linden, A.C. and Thijesse, G.J.E. (1965) The mechanism of microbial oxidation of petroleum hydrocarbon, *Advance of Enzymology*, **27**, 465-546.