特集 水産微生物のリアルタイムモニタリング

海洋での流出油事故と微生物のモニタリング—メソコスム実験

大和田 紘一,^{1*} 西村 昌彦²

¹熊本県立大学環境共生学部, ²東京大学海洋研究所

Microbial monitoring during oil spill accidents in marine environment-mesocosm experiments

KOICHI OHWADA^{1*} AND MASAHICO NISHIMURA²

¹Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, Kumamoto, Kumamoto 862-8502,

²Ocean research institute, University of Tokyo, Nakano, Tokyo 164-0014, Japan

1. はじめに

原油あるいは重油の流出事故はこれまでも世界中の沿岸域で起こり、大きな災害となってきた。この中で特に大きいのは湾岸戦争やメキシコ湾油田事故による油田からの流出油である。その他はナホトカ号などタンカー事故による流出がかなり多く、国際油濁統計によると1967年以降の30年間では大きなタンカー事故が平均で3年に2回の割合で起こっているという。我が国でも、三菱・水島精油所(1974年)、ジュリアナ号(1971年)、ナホトカ号(1997年)など大きな流出油の事故が上げられる。¹⁾ 海洋に流出した石油成分は、揮発して大気に放出されたり、微生物による分解を受けて浄化されたり、また分解を受けにくい成分は固形となって漂着あるいは海底に沈んでいくなどさまざまな運命をたどりながら、海域は浄化されていく。²⁾

著者らはナホトカ号の事故の後、日本学術振興会の未来開拓推進事業の中で、流出油の沿岸生態系への影響評価に関する研究を行う機会があったので、その結果の一部について紹介をしたい。浜名湖に面した静岡県浜名郡舞阪町にある東京大学大学院農学生命科学研究科付属水産実験所構内の魚類飼育用コンクリート水槽内にメソコスム装置を建造した。メソコスムは直径1.5 m、高さ3.0 mの強化プラスチック製円形水槽(容量5,000リットル)4基と同じ大きさの貯水槽2基から構成され、20 rpmで回転する攪拌装置と底には堆積物を10 cmの厚さに敷くことの出来るトレイ、また透明なプラスチックによる上面のカバーを備えている。実験用の海水はすぐ隣の浜名湖の表面水を水中ポンプによって採取し、地中の配管を通じて直接に貯水槽に送って貯留し、そこからポンプによって実験水槽に供給するようにした。メソコスムの詳しいことに関しては Ohwada *et al.*³⁾あるいは大和田ら¹⁾を参照していただきたい。

2. メソコスム実験

石油のモデル試料として昭和シェル石油製のA重油を用い、海水10リットルにA重油500 gの割合で混ぜ、800 rpmで2時間攪拌した後の水画分を水溶性画分としてメソコスムに負荷して実験を行った。メソコスムタンクには浜名湖の表面水をポンプで汲み上げ、そこに30リットルの水溶性画分を負荷して実験を行った。また、分散型石油処理剤(分散剤)を使つての実験では、水溶性画分30リットルに分散剤(タイホー工業, Taiho self mixing S-7)120 gを加え、対照区として海水のみのタンクと比較した。これらのタンクは、備え付けの攪拌装置を用いて30分間攪拌後、実験を開始した。

重油成分の分析はGC-MS法,⁴⁾ 細菌の計数はDAPIを用いる蛍光顕微鏡法,⁵⁾ ウイルスの計数はSYBR Green Iを用いる蛍光顕微鏡法,⁶⁾ 細菌増殖速度の指標としてのFDC(分裂細胞の割合)はHagstrom *et al.*⁷⁾に従った。海水中の細菌の濃縮とDNA抽出精製はSomerville *et al.*,⁸⁾ Steward *et al.*⁹⁾に準拠し、Muyzer *et al.*¹⁰⁾の方法でゲル上に展開されたバンドパターンを解析した。

(1) 重油成分分解過程での微生物群集の遷移¹¹⁾

重油負荷区(oil)と対照区(con)での重油成分(PAHs)、細菌の増殖速度(FDC)、細菌数およびウイルス数の経時変化を図1に示した。重油負荷区においては、重油成分を添加後急速に細菌の増殖速度が上がり、同時に細菌数も急激に高くなっている。一方、重油の低分子量成分のnaphthaleneやphenanthreneは急激に減少した。また細菌数の増加に伴って、ウイルス数も急激に増加しているのも興味がある。重油低分子量成分の分解に係わる細菌の増加に伴って、その細菌に感染するウイルスが増加したものと考えられる。一方、対照区においてはこの間にほとんど変化が認められない。図2には、メソコスム海水中の細菌から増幅した16S rDNA

図1 重油成分負荷タンクと対照タンクにおける重油成分と微生物数の変化

A: 重油成分 (PAHs); ●, naphthalene, ×, phenanthrene, ○, naphthalene, ■, phenanthrene. B: 細菌数 (いずれも ●, 負荷タンク, ○, 対照タンク). C: ウイルス数 (●, 負荷タンク, ○, 対照タンク).

図2 16S rDNA 断片の DGGE 法によるバンドパターン
res-0: 実験開始時のタンク。oil-1, oil-3, oil-6: 負荷タンクのそれぞれ 1 日, 3 日, 6 日後。con-1, con-3, con-6: 対照タンクのそれぞれ 1 日, 3 日, 6 日後。

図3 DGGE 法によるバンド数の時間経過

●, 負荷タンク, ○, 対照タンク。

遺伝子断片の DGGE バンドパターンを, また図 3 にはこの間のバンド数の変化を示した。重油成分の負荷前と初めの 24 時間くらいは, バンドパターンに変化がなく約 34 本のバンドであるが, 3 日後には重油添加区では 41 本に変化し, 6 日後には急激に減少して 27 本になっ

図4 16S rDNA断片のDGGE法によるバンドパターン
SEA: 対照タンク, OIL: 重油添加タンク, OD: 重油+分散剤添加タンク。

ていた。一方、対照区ではバンド数にはほとんど変化が認められなかった。これらは重油成分の内の低分子成分が実験開始後、3日くらいで海洋細菌によって急激に分解を受けていることを示しており、急激に増加した、いくつかのバンドに相当する細菌群集がこの分解に関与していることを示している。

(2) 重油成分および分散剤を加えた系での微生物群集の遷移⁴⁾

対照タンク (SEA), 重油添加タンク (OIL), 重油+分散剤タンク (OD) を用いての120時間の実験の例では、細菌数はSEAタンクで、 $1.0\text{--}2.0 \times 10^6$ cells/mLと大きな変動はなく、またOILタンクにおいては、 $1.8\text{--}3.7 \times 10^6$ cells/mLと変動したが、重油添加後24時間にピークに達し、その後は減少していった。それに対して、ODタンクにおいては、開始時には 2.3×10^6 cells/mLだったのが、急激に増加をして72時間後には 6.0×10^6 cells/mLに達していた。この過程のDGGEパターンを図4に示した。SEAおよびOILタンクにおいては実験期間中、バンドパターンが比較的安定しているのに対して、ODタンクにおいては24時間後からパターンに変化が認められている。さらに解析を進めるために多次元尺度法によるクラスター解析を行った結果を図5に示した。この図からは、細菌群集は3つのグループに明瞭に分かれ、SEAとOILタンクではグループIからIIaに遷移しているのに対して、ODタンクの細菌群集はグループIから全く異なるグループIIbに遷移したことが分かる。主なバンドを構成する細菌については系統解析によって、その分類学的な位置も明らかにされている。この実験の例においては初めの24時間くらいの間に低分子の重油成分の分解に関与しているが、それ以降においては分散剤に反応していることが分かる。これに

図5 バンドパターンに基づく多次元尺度法によるクラスター解析
■: 対照タンク, △: 重油添加タンク, ×: 重油+分散剤添加タンク, 数字は経過時間を示す。

についてはさらに検討を行い、細菌群集はこの分散剤を分解していることを確かめている。

3. おわりに

私どもは重油の水溶性画分に焦点を絞り、メソコスムの中に浜名湖の表面海水を導入して、実験を行った。本稿ではその中の細菌群集の変化をモニターすることに限定して紹介した。非常に濃度が希薄であっても、海水中に重油の水溶性画分が入ってくると、まず細菌群集が活発に低分子画分の分解に当たり、増殖していく。ある種の細菌群が活発な増殖を始めると、その捕食者としての従属栄養性鞭毛虫や繊毛虫などの原生動物の増殖が始まる。これと同時に細菌に感染するウイルス（バクテリオファージ）なども活動を始めることが明らかになった。

これは即ちマイクロビアルループに関係した微生物群集が活性化されたことを意味している。また微生物による分解を受けにくい高分子の成分は植物プランクトンや懸濁粒子に吸着して、海底へと輸送されることも明らかになった。³⁾ ナホトカ号の事故の際には、この事故に近い海域において細菌群集の中では *Cycloclasticus pugetii* が急激に優占種となり、油の分解に関与していた過程が報告されている。¹²⁾

謝辞

本研究を行うに当たり、東京大学大学院農学生命科学研究科付属水産実験所の教官と職員の方々に大変お世話になったことに謝意を表したい。本研究は日本学術振興会の未来開拓推進事業の一環として行われた。

文 献

- 1) 大和田紘一, 西村昌彦, 和田 実, 野村英明, 柴田晃, 岡本 研, 豊田圭太, 吉田明弘, 高田秀重, 山田美穂子. 重油の微量水溶性画分が沿岸生態系に与える影響に関するメソコスム実験. 海洋微生物-II 基礎, 応用研究とその利用. 月刊海洋号外 2003; **35**: 113-119.
- 2) 大和田紘一. 石油の分解除去. 「海の環境微生物学」(石田祐三郎, 杉田治男編) 恒星社厚生閣, 東京. 2005; 204-209.
- 3) Ohwada K, Nishimura M, Wada M, Nomura H, Shibata H, Toyoda K, Yoshida A, Takada H, Yamada M. Study of the effect of water-soluble fractions of heavy oil on coastal marine organisms using enclosed ecosystems, mesocosms. *Mar. Poll. Bull.* 2003; **47**: 78-84.
- 4) Yoshida A, Nomura H, Toyoda K, Nishino T, Seo Y, Yamada M, Nishimura M, Wada M, Okamoto K, Shibata A, Takada H, Kogure K, Ohwada K. Microbial responses using denaturing gradient gel electrophoresis to oil and chemical dispersant in enclosed ecosystems. *Mar. Poll. Bull.* 2006; **52**: 89-95.
- 5) Porter KG., Feig YS. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 1980; **25**: 943-948.
- 6) Noble RT, Fuhrman JA. Use of SYBR Green for rapid epifluorescence count of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 1998; **14**: 113-118.
- 7) Hagstrom A, Larsson U, Horstedt P, Normark S. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979; **37**: 805-812.
- 8) Somerville CC, Knight IT, Straube WL, Colwell RR. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; **55**: 548-554.
- 9) Steward GF, Azam F. Bromodeoxyuridine as an alternative to 3H-thymidine for measuring bacterial productivity in aquatic samples. *Aquat. Microb. Ecol.* 1999; **19**: 57-66.
- 10) Muyzer G, Dewaal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 1995; **164**: 165-172.
- 11) Nishimura M, Yoshida A, Toyoda K, Yamada M, Nomura H, Wada M, Okamoto K, Shibata A, Takada H, Ohwada K. Mesocosm experiment on the succession of microbial community in response to oil contamination to coastal seawater. *La mer* 2006; **44**: 59-65.
- 12) Maruyama A, Ishiwata H, Kitamura H, Sunamura M, Fujita T, Matsuo M, Higashihara T. Dynamics of microbial populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetii* following the Nakhodka oil spill. *Microb. Ecol.* 2003; **46**: 442-453.