

生物的油濁処理技術開発試験の長い道のり

元東京大学海洋研究所教授

元生物的油濁処理技術開発専門部会座長 清水 潮

1. はじめに

微生物により油濁処理を行うというプロジェクトが漁場油濁被害救済基金(油濁基金)によって始められたのは1988年(昭和63年)である。2003年(平成15年)まで、15年間続いたこの事業も、有効でかつ生物危害の少ない新規分解促進剤の開発に成功することによって幕を閉じることができた。油濁基金の理事ならびに職員の方々の長い間のご努力、採算を度外視して協力頂いた関係企業、この間殆どメンバーの移動もなくお付き合い頂いた専門委員会の方々のご努力に感謝いたします。以下、この事業の推移を振り返ってまとめてみたい。

2. 事業の目的

海に流れた石油は最終的にはバクテリアによって分解され、水、二酸化炭素その他の分解産物になり、消失する。石油成分の中で分解されやすい部分は1、2週間から数ヶ月の間に分解されるが、難分解性の成分は長く残り、主な部分が分解されるまでには数年あるいは数十年、すべてが分解、消失するのはさらに長い歴史的な時間を要する。油濁によって生物に悪影響を与えるのは分子量の小さい石油成分で、これは微生物による分解を受けやすい成分でもある。

海洋の石油分解細菌は古くから知られていたが、特に1940年代からロシアのミローノフ、アメリカのゾベルなどの研究者によって多くの知識が集積されてきた。

油濁基金のプロジェクトは海上での油濁事故の処理にこのバクテリアの力を借りようという発想に基づく。すなわち海上で発生した油濁事故はオイルフェンス、吸着マット、ポンプ・ひしゃくによるくみ上げなど、人力をつかった物理的な方法で処理されるが、流出した油を完全に除去することは難しい。とくに海岸に漂着し、砂浜、砂礫岩礁などに吸着した石油は、

長期間残存し、海の生物に悪い影響を与える。このような石油はバクテリアによって分解され時間とともに消失するが、培養した分解微生物あるいは微生物増殖促進剤を撒くことによってこの分解を促進しようという狙いである。

3. 実施期間

昭和 63 ~ 平成 2 年度： 石油分解微生物の予備的な探索

平成 3 ~ 5 年度： 調査、フィジビリティースタディー

平成 6 ~ 12 年度： 開発試験、模擬フィールド試験、生物影響試験、新規処理剤の総合評価

平成 13 ~ 15 年度： 処理剤の改良、生物安全性評価、フィールド試験、効果的使用法の検討

4. 委員会および専門部会：

事業は当初油濁被害防止対策検討委員会の石油分解微生物分科会によって平野敏行委員長の下で検討・評価が行われていたが、平成 3 年度には生物的油濁処理技術開発検討委員会、さらに平成 6 年度には専門部会が設けられ、事業の検討・評価が行われた。専門部会の委員は多少の変動があったが、最終的には筆者(座長)のほかに徳田拡士、大久保勝夫、東原孝規、木村凡のメンバーで、いずれも石油分解微生物、石油の生物危害についての専門家である。それぞれご多忙の中を長い間、熱心に専門部会の活動に参加して頂いた。

5. 事業の経過：

5.1 石油分解微生物の予備的な探索

初めに述べたように海の石油分解微生物は古くから研究され、また、その微生物の活動を助けるために栄養分を添加する試みも以前から行われていた。

ところがこの時期にあらためて海洋の石油分解細菌に目を向けさせるいくつかの出来事があった。ひとつは著名な海洋微生物学者であるオッペンハイマー教授 (Carl Oppenheimer) が石油分解微生物を油濁の処理に効果的に使用できると主張して、自ら会社をおこし、オッペンハイマー製剤 (Oppenheimer Formulae) なる微生物製剤を市販したことである。この製剤には世界各地の油濁事故現場から集められた石油分解菌がグラムあたり千億 ($10^{11}/g$) も含まれており、海洋現場の石油を速やかに分解、消失させると主張された。彼の製剤については多くの議論があるが、その効果については現在では疑問視する声が多い。

また、大阪大学工学部でも石油を速やかに分解する細菌を発見したという新聞報道があり、海洋科学技術センターでも「世界で初めて」海洋から石油分解細菌を発見した、などというテレビ、新聞での報道がなされた。

このような背景の中で、油濁基金としてもこのような報道の真偽を確かめるとともに、主体的に海洋から有効な石油分解細菌を分離してみようという試みを始めることになった。

この事業に参画して頂いたのは東京久栄株式会社で、同社では角本明研究員を中心にプロジェクトを組み、緯度、および富栄養化の程度の異なる東京湾、瀬戸内沿岸、秋田県沿岸及び本州沿岸のから海水、底泥、プランクトンなどのサンプリングをして石油分解細菌の採取を精力的に行った。同社では経済的にも人の面でも多大な力をこの事業に注ぎ、その結果いくつかの有望な分解細菌を分離された。最終的に選別された 36 菌株の石油分解細菌はアラビアンライト石油を 30 日間に 32~38% 分解する能力をもっていた。このような菌株は油濁事故の際に現場に撒くことによって石油分解を促進することが期待できる。しかし、そのためには大量の細菌培養を生きたまま保存するという困難な問題を解決しなければならない。当初の計画では生存性の強い芽胞細菌の中に石油分解性の強い菌株を期待していたが、残念ながらそのようなものは探索の中で見つからなかった。

このような準備段階の研究結果と経験から、石油分解細菌の現場での増殖を促進する栄養素剤の開発を目的としてさらに本格的な研究・開発プロジェクトが開始された。

石油分解細菌栄養素剤

陸での砂漠にしばしば例えられるように海洋は栄養の乏しい環境である。沿岸海水でも微量のリンは表層の植物プランクトンに吸い取られて殆どゼロの状態であり、また、窒素も富栄養化の進んだ内湾ですら海水1リットル中1ミリグラムにも満たない。このような環境では海水に石油(炭化水素)が流出しても、それを分解する細菌は炭素以外の栄養素が足りないために十分増殖し、活性を発揮することができない。このような貧栄養の海水に窒素・リンを加えて石油分解細菌の増殖を促し、石油の分解を活発に進めようという試みは多くの研究者によって行われてきた。

培養した石油分解細菌を撒くより、現場にもともと住んでいる分解細菌を活性化した方がよいという考えには有力な根拠がある。

まず海水中の石油分解細菌は、種類が非常に多く、また、それぞれの海洋の特別な環境に適応して生きている。このような細菌は普段は数も多くないが、環境に石油が流入したときには適当な栄養が伴えば勢いよく増え、その数は莫大なものに達する。これに対してあらかじめ石油分解細菌製剤に含まれる細菌数は誠に微々たるものであり、撒かれた環境の中で活発に増殖しなければ分解効果を発揮することはできない。過去の多くの研究によって、海洋に撒かれた培養微生物は必ずしも環境に適応せず、一時的に増殖しても、環境に固有の細菌群集との競争に負けて多くは消え去ってしまうことが分かっている。

このような根拠から、石油分解細菌を撒くよりも、海洋に固有の数多くの種類の石油分解細菌に必要な栄養を与えて活性化させようという考え方の方が有力になってきた。

本プロジェクトでもこのような方向で平成3年から新たなプロジェクトが始まった。

5.2 調査、フィジビリティースタディー(平成3～5年度)

1) 各国の文献調査

平成3年から5年までの間、世界各国の「石油微生物製剤」と「栄養素剤」の調査、文献と特許検索を行った。

調査は昭和シェル石油株式会社の調査システムを中心として行い、その時点までに行わ

れていた調査・研究・特許の殆どを網羅する約570件の詳細なデータベースが完成した。データベースはフロッピーディスクの形で関係者に配布した。

2) 既存の石油分解促進剤の調査

平成3年時点で米国の「国家緊急防災計画(NCP)」に登録されている石油分解促進剤についての情報を集め、その中から多く用いられている「石油微生物製剤」、「分解促進栄養素剤」についてサンプルの入手を試みた。入手した4種類の石油微生物製剤(オープンハイマー製剤ほか3種類)、また2種類の栄養素剤(Inipol EAP 22 (Elf Aquitaine, Artix, France)、Customblen (Scotts Company, Ohio, USA))について微生物製剤については微生物数・組成の検査、評価、栄養素剤については成分の化学分析を行った。

3) サンプルについての性能評価

これらのサンプルについて、C重油に対する分解性を実験室内でテストした結果、4種類のサンプルの中ではInipol EAP 22が最も高い分解性(31日間に17%の分解率)を示した。

石油分解微生物製剤は大きな効果をもたなかった。製剤中の石油分解微生物数は $10^3 \sim 10^7$ 程度で、カタログに掲げられている 10^{11} には遠く及ばなかった。このことは、微生物製剤については保存中の菌死滅の問題が解決されていないことを示している。

また、天然の海砂に海水、C重油を加え、微生物製剤あるいは栄養素剤を加えて細菌相の推移を観察した。その結果どの場合にも初めの一ヶ月の間に菌数の急激に増大した後、日数とともに減少する傾向がみられた。微生物製剤を加えた試験では加えた細菌は一時的な増加はみられたが、すぐに固有の細菌相が優越し、顕著な石油分解の能力も見られなかった。

海砂をつかった実験でも栄養素剤(Inipol EAP 22)は比較的高い石油分解促進の効果が認められた。

4) サンプルの安全性評価

入手した4種の微生物製剤と2種の栄養素剤について、ヒメダカ、マダイについて半数致死濃度(LD₅₀値)を、また珪藻(スケルトネマ・コスタツム)に対する成長阻害濃度(EC₅₀値)を試験した。

その結果微生物製剤と栄養素剤のカスタムブレン(Costomblen)については大きな毒性は認められなかったが、従来もっとも多く使われている Inipol EAP 22 はきわめて毒性の高いことが示された。ヒメダカに対する24時間半数致死量は184ppm、ノリに対する毒性(形態変化)量は37ppmで、いずれも他の製剤の100倍あるいはそれ以上の毒性であった。Inipol EAP 22は欧米での安全性評価試験でも魚類に対する毒性が高く、とくに貝類、貝類幼生に対する毒性の高いことが報告されている。したがって、わが国の沿岸海域でこの剤を使うことには生態系に大きな影響を及ぼす恐れがある。

以上の調査、予備試験の結果から、本プロジェクトでは、海洋の石油分解細菌の増殖と分解活性を促進し、なおかつ沿岸生物に対する毒性の低い新規の栄養製剤の開発に取り組むことになった。

5.3 新規栄養製剤の開発試験(平成6~15年度)

1) 開発の目標

これまで欧米を中心に開発されてきた石油分解細菌栄養素剤は次のような性状をもっている。

1. 海洋環境に少ない窒素とリンをおもな栄養源とし、それらの栄養源を無機化合物の形で含んでいる。
2. 海水中での溶解・拡散を防ぐため、栄養成分を難溶解性の化合物にし、あるいは固体脂肪酸の中に封じ込めている。
3. 剤を海水中で溶解・拡散させるために溶剤を加えているものが多い。

本プロジェクトで新規に開発した剤も上のような特徴を含みながらも、それに加えて次のような改良を志した。

1. 有機物栄養源を含んでいる。これは石油分解細菌を含め、大部分の海洋細菌がその増殖のために有機物を必要とし、あるいは有機物によって増殖が著しく促進するという事実を根拠としている。

2. 既知の栄養剤はいずれも難溶解性をうたっているが、実際にテストをすると大部分が1,2週間の間に海水に拡散して失われてしまう。一方石油は難分解性の成分を多く含み、細菌による石油分解も月単位の長時間を要する。このため、さらに溶解性を遅らせる工夫が必要になる。このため、難溶解性の有機物、無機物を含む多くの剤を考案し、最終的には固形化剤をもちいて栄養製剤を成形することによって、任意の溶解性を保つ剤を開発した。

3. アラスカにおけるエクソン・バルディーズ号油濁事故を含め、現在までもっとも多く使用されてきた Inipol EAP 22 は、その有効性について議論があるほかに、生物毒性が極めて高いという欠陥をもっている。本プロジェクトでは毒性の低い構成成分を使用し、さまざまな生物影響評価試験を通して、海洋で生物、生態系に影響を与えないような剤の開発をおこなった。

開発試験(平成3～5年度の予備開発を含む)の委託を受け、取り組んで頂いたのは株式会社ネオス中央研究所で、同社では大川直士部長、平山政生、小川紀之、川竹泰司及び河野充男研究員を中心に永年にわたって終始熱心に関与し、フィールド試験に携わって頂いた。

2) 漂着油解乳化剤の開発(予備段階の開発)

海岸に漂着する石油は、石油の量により油中に水の入った(油中水滴型)、あるいは水中に油の入った(水中油滴型)エマルジョンになる。大量の石油が流れた場合はこの油中水滴型のムース状のエマルジョンになり、容積が大きくなり、処理に多大の労力を必要とする。また、処理剤もエマルジョン内部には到達しない。このため、本プロジェクトでは当初、栄養素

を含むとともに、エマルジョンを砕き、容積を小さくするための解乳化作用を持たせることを目的のひとつとした。解乳化作用についての検討は平成 3～5 年の段階で行われ、この作用をもつ界面活性剤の開発に成功し、これについての特許の取得(平成 16 年確定)も行った。

3) 新たな栄養素剤の製作(平成 6～14 年度)とフィールド模擬試験(平成 6～11 年度)

平成 3～5 年度の調査・予備試験の結果から、解乳化作用をもつとともに、毒性の少ない、また長期にわたって効果が持続される栄養素剤の開発に取り組んだ。

a) 実験室内での評価

可能性のある窒素源、リン源栄養素について多くの候補化合物を選定し、それぞれについて

実験室内での石油分解試験 模擬フィールドテスト

の順で効果の判定を行った。

実験室内でテストした化合物の数は平成 3～5 年の予備試験で検討した 25 種の窒素化合物、数種のリン化合物を含めほぼ 60 種類に上った。

テストの結果から、窒素化合物としてはオレイン酸アミドおよび難溶解性の CPU 尿素がもっとも効果的であり、リン化合物としてはアルキルエーテルリン酸エステルが適当であることが示された。また、有機体の窒素・リン源としてカゼインを使うことによって、石油分解性が高まり、またその効果も持続することが分かった。

b) フィールド模擬試験での検討

石油汚染現場の模擬フィールドとして初めは箱庭型の海浜の模型をつくり、上部に石油汚染砂をしいて定期的に海水を灌水する方法で実験を行っていた。ついで径 40mm の小型シリンダー中に海砂と石油汚染砂をいれたものを、海砂を満たした径 77mm のシリンダー中

に差し込んだ装置に、潮汐を模して海水を上下させるようにした。平成7年からは、株式会社ネオス敷地内に縦1.3m、横4.5mの人工海浜を造成し、その中に上記のシリンダーを差し込み、約8トンの大型水槽に貯留した瀬戸内海の新鮮海水を供給しながら、人工的な潮汐を作るようにした。実験室内の試験によって有効性の確かめられた製剤について、このような人工海浜で逐次石油分解テストを行った。

検討の結果、実験室段階で高い石油分解促進作用を示した多くの剤が、人工海浜での評価では、いずれも低い活性しか示さないことが分かった。これは潮位差によって海水の交換のある条件では、剤に含まれる窒素・リンが速やかに消失してしまうことによる。従来の石油分解促進剤は難分解性を目的として開発されたものであるにもかかわらず、いずれもほぼ1週間の間に海水に溶解、消失してしまうことが分かった。陸上の土壌で長期間効力を発揮するものとして開発・市販されている窒素・リン酸肥料についても厳しい海洋環境では比較的短期間に溶離してしまう。このため、難分解性を高めるためには剤を固形化する必要のあるという結論になり、さまざまな固形化剤(連結剤)のテストを行った。30種類に及ぶ有機物系、無機物系の様々な粘質物質、固形化物質をテストした結果、最終的には速乾セメントによって剤を固形化することが、もっとも長い保持時間を保ち、栄養分を緩やかに溶かし出すことが分かった。

多くの試行を重ねながら30余りの栄養素剤の開発を行い、さらに人工海浜を用いての試験でテストし、その結果から、最終的に選択された数種類の剤について、自然海浜での最終的な評価試験を行うこととなった。

7) 自然海浜での石油分解試験(平成12～14年度)

a) 実験場所の選定

石油分解促進剤については、最終的には自然の海洋環境でその有効性を試さなければ真に有用なものであるという結論は下せない。このことは本プロジェクトでも当初から議論されていたことであり、そのための候補地として、わが国周辺の無人島、無人海岸など数々の

場所が検討されてきた。しかし、わが国ではこのようなフィールド試験が環境の生態系を乱すのではないかという市民の危惧があり、また漁業権との絡みで、漁場に対する影響への可能性から、実地での評価試験は困難であると考えられた。実際の油濁事故の際にも、処理剤を散布することにはさまざまな問題があり、実施することは難しい。

たまたま舞鶴市にある京都大学農学部水産実験場の海浜でこのような実験を行う可能性が示されたことから、大学当局との話し合いがもたれ、京都大学農学研究科の研究スタッフとの共同研究として海浜における石油分解促進の大がかりな実験を行うこととなった。

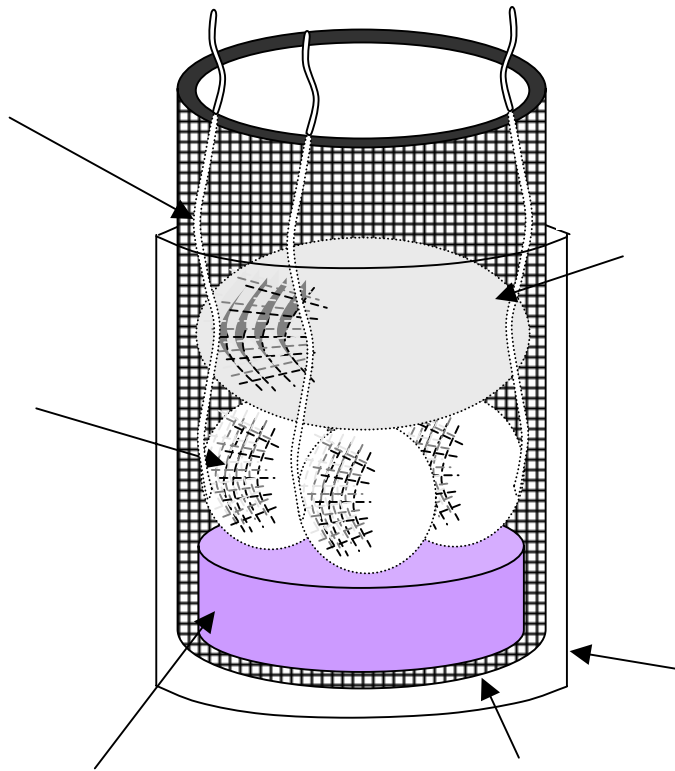
研究には京都大学農学研究科からは上野正博助手、吉永郁生助手および数名の大学院学生が参加し、現場の海洋・気象環境、海洋微生物相、石油分解微生物相の動態などの研究が、石油分解促進剤の効果試験と並行して行われた。海岸における石油分解実験は、現場の潮位、水温、気温とは密接な関係があり、とくに潮位の長期にわたる予測と観察が現場での実験設備の設置位置に緊密な関係がある。また、それぞれの剤が有効であるかどうかの判定についても、表面的な分解率の測定以外に、分解を裏付けるような微生物データが重要である。

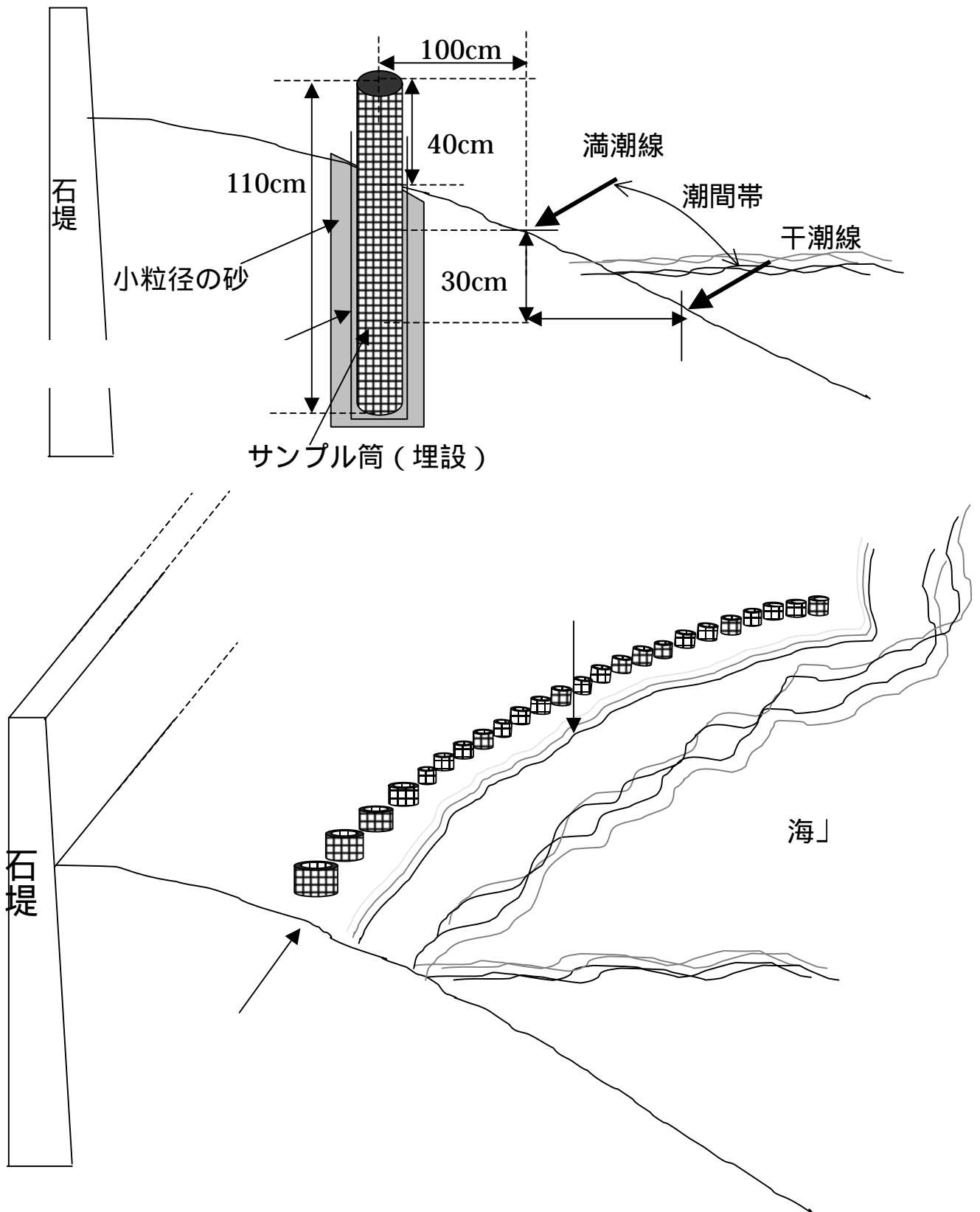
これらの点で、それぞれの専門研究者の全面的な協力を得られたことは幸いであった。

b) フィールド実験の現場と装置

石油分解実験用の装置は実験場北側の浜辺で 15 メートルの長さに設置した。図 1 に示すようなサンプル筒 35 個を浜辺に添って配置し(図 2)、対照を含め 5 種類のサンプルをアトランダムに配置し、異なる季節の 1 ヶ月半から 3 ヶ月半にわたる期間に石油分解実験を行った。実験中、潮位、水温、気温、砂の温度、塩分を連続的にモニターし、期日毎にサンプルの汚染砂を取り出し、油分の量と組成の分析、一般海洋細菌、石油分解細菌の数と遺伝子解析による細菌群集組成を調べた。

フィールドでのこのような実験は予備調査の期間を含め 3 年間(平成 12 ~ 14 年度)続けられ、この間夏、夏 ~ 秋、秋 ~ 冬の 3 期間の試験が行われた。





c) 試験結果

得られた結果を要約すると次のようになる。

汚染砂に含まれる石油の分解は汚染後ほぼ 2 ヶ月の間続き、その間に分解されやすい直鎖型の炭化水素は、完全に分解されたと考えられる。本フィールドのような富栄養化され

た内湾では、他の地域でもほぼ同じような状況が予測される。

分解は分解促進剤の添加によって促進され、対照と比べると、とくに初めの 14 日目、28 日目の分解が著しい。この期間の石油分解量は対照のほぼ 2 倍に達する。

分解促進剤に含まれる窒素栄養分は海水中では比較的速く消失し、2 ヶ月後には対照区と比べて差がなくなる。消失は剤の形態によって異なり、速乾セメントで成形した剤では消失が遅れる。この成形剤でも窒素分の消失は粒子の大きさにより、粒子の小さい(0.85 ~ 1.0mm)剤では速く、粒子の大きい(4.75 ~ 5.6mm)剤の方が窒素分を長く保持する。

汚染砂中の石油分解細菌の数は実験開始後 1 ~ 2 週間間に急激に増加し、それ以降は 3 ヶ月後まで減少する傾向を示す。新たに開発した剤では石油分解細菌の菌数は対照区の砂にくらべて 2 桁、石油に汚染させた対照区あるいはInipol EAP 22 を添加した区に比べてほぼ 1 桁高い石油分解菌数($10^7/g$)がみられた。

遺伝子の電気泳動像とそのクラスター解析による細菌群集の組成の比較によると、開発した分解促進剤(表 1 の Z7-3, Z18 および Z21)を加えた汚染砂では対照区、油汚染砂区、Inipol AP 22 など、他の実験区とは異なる微生物群集を作っており、おそらく特別の石油分解群集が形成されたと考えられる。この特異な細菌群集は 3 ヶ月(112 日)目にも維持されていた。

表 分解促進剤の組成

分解促進剤		Z7-3	Z18	Z21	Z22-PS	Z22-PM	Z22-PL
内 容							
成 分 (%)	CDU-窒素	25	87	78	78	78	78
	カゼイン	10	10	9	9	9	9
	ヘクトライト	1	3	3	3	3	3
	速乾性セメント				10	10	10
	メチルセルロー ス			10			
	水	64					
窒素含量 (%)		8.3	25.0	22.4	22.4	22.4	22.4
粒 径 (mm)				約 5	0.85 ~ 1.0	2.8 ~ 3.85	4.75 ~ 5.6

5.4 石油分解促進剤の生物影響評価

本プロジェクトで開発した石油分解促進剤については、開発の段階を追って生物に対する毒性の評価試験を行った。試験はいずれも日本食品分析センターに委託して実施した。

試験の内容はヒメダカ、マダイに対する急性毒性、スサビノリ、珪藻(スケルトネマ・コスタツム、*Skeletonema costatum*)に対する成長阻害と形態変化、シオダマリミジンコにたいする遊泳阻害である。試験は従来用いられてきた既存の石油分解促進剤 Inipol EAP 22 を対照としながら本プロジェクトで開発されてきたそれぞれの段階の製品について行われた。

予備的な結果は先にのべたが、数次にわたる検討結果でも本プロジェクトで開発された剤については既存品に比べて生物に対する毒性の低いことが示された。

最終的な剤の主な成分を含む Z18(CDU 尿素 87、カゼイン 10、ヘクトライト 3)については、魚類(ヒメダカ、タイ)の急性毒性は 24 時間の半数致死濃度(LD50 値)は 10,000mg/L で、EAP 22 の 21 ~ 29mg/L とは大きな差があり、藻類に対する半数阻害濃度(EC50 値)は EPA22 が 9.5mg/L であるのに対し、Z18 では 100mg/L 以上という値を示した。また、藻類の色調も対照区と比較して濃く、対照区よりも著しく薄い結果となった EPA22 とは対照的な結果が得られた。

現在、石油分解促進剤の毒性についてはまだ公的な基準はないが、海上での石油汚濁事故の際などに使われる石油処理剤については運輸省の定めた法規制、水産庁の指針がある。本プロジェクトで開発された石油分解促進剤の毒性はこれらの基準(ヒメダカ LC50、3,000ppm 以上、スケルトネマ・コスタツム成長阻害 100ppm 以上)を満たすものである。

6. 結論

結果が 1,2 日の間に分かる通常の化学実験とことなり、ひとつの剤の効果を判定するのに少なくとも 1 ヶ月、完全な判定のためには数ヶ月の日時を必要とする。したがって、科学的な評価に耐えうる石油分解促進剤についての研究は少ない。このことが多くの油濁事故で使われた石油分解促進剤の効果についての見解の分裂を生んでいる。

本プロジェクトの研究結果はこのような従来のあいまいな試験研究とは異なり、実験室とフ

フィールドでその効果を十分に検証し、さらに基礎的な微生物学研究によってその効果を裏付けたもので、貴重な資料を提供するものと言える。

得られた製剤は石油分解細菌を急激に増殖させることによって、油濁のさいに大きな生物被害を生む毒性の強い石油画分を速やかに分解、消失させる効果をもっている。また、生物に対する毒性も極めて低いものであった。

このような目的をもつ既存の製剤は有効成分の窒素・リンが急速に消失する欠点を共通してもっているが、本プロジェクトで開発された栄養素剤は、成形の際に剤の大きさを調節することによって、使用される海域の環境条件の中で適当な溶解性を保つようにすることができる。

油濁事故はその突発が予期されない災害であり、それに備えて石油分解促進剤を準備するためには、長期にわたる剤の安定性が問題になる。これについても本プロジェクトで完成された剤は十分な安定性をもっていると判断される。