

わが国の沿岸海域における炭化水素酸化細菌 に関する生態学的研究—VI*

海洋中の重油分解細菌のスクリーニング法

藤沢 浩明・村上 正忠

Ecological Studies on Hydrocarbon-oxidizing Bacteria
in Japanese Coastal Waters—VI
Screening Method of Heavy Oil-decomposing
Bacteria in the Sea

By

Hiroaki FUJISAWA and Masatada MURAKAMI

The present study was undertaken to find out a useful method for the screening of heavy oil-decomposing bacteria in the area polluted by the Mizushima Oil Refinery Accident, a serious spill of heavy oil (grade C) into the sea. The results obtained can be summarized as follows; A membrane filter method was available for isolating directly heavy oil-decomposing bacteria groups A and B from seawater and bottom sediment. Serial dilutions of bacterial source were filtered through a membrane filter of 0.45 μm in pore size. Bacteria caught on the filter were incubated for 14-21 days at 25°C on agar medium A or B in which heavy oil (grade C) was added as substrate, and colonies of bacteria grown up on the filter were picked up. These bacteria isolated were incubated in liquid medium A or B in which heavy oil was contained, under constant shaking of 110 strokes per minute at 25°C for 14 days. The remaining hydrocarbons in each culture liquid were separated by silicic acid column chromatography and gravimetrically determined. Each decomposition rate of heavy oil (hydrocarbons) was estimated in comparison with control value. It was recognized by gas chromatography that the greater part of *n*-paraffin components (from *n*-pentadecane or *n*-hexadecane to *n*-tetracontane) in heavy oil was clearly decomposed after incubation. The heavy oil-decomposing activity of bacteria examined was divided into 6 grades on the basis of decomposition rate of the substrate. As to bacteria isolated from seawater and bottom sediment in Bisan Seto and Yoshimi coastal waters, both 98 strains out of the 118 strains of

* 水産大学校研究業績 第915号, 1981年8月10日受理.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 915. Received Aug. 10, 1981.

group A and 140 strains out of the 148 strains of group B possessed clear activity. Especially, 55 strains out of the whole of group A and 103 strains out of the whole group B, ranked with higher three grades. Therefore, it was concluded that the above-mentioned method (isolation of heavy oil-decomposing bacteria and determination of heavy oil-decomposing activity of bacteria isolated), was useful for the screening of heavy oil-decomposing bacteria in the sea.

1. 結 言

水島重油流出事故¹⁻⁴⁾による重油汚染海域には、炭化水素酸化細菌が高い生息密度で存在することが知られ⁵⁾、さらに、炭化水素酸化細菌の生息密度に及ぼす環境因子の影響が解析されている⁶⁾。しかし、流出重油の微生物分解についての知見はきわめて少ない^{4,7)}。

この海域の流出重油に対する自浄作用を評価するためには、重油分解細菌を分離し、これらの細菌について重油分解能を調べる必要がある。ところで、*n*-ヘキサデカンを指標炭化水素とした場合の炭化水素酸化細菌のスクリーニング法⁸⁾がすでに確立されているので、この方法に準じて本研究では、海域からの重油分解細菌のスクリーニング法について、種々検討した。すなわち、メンブランフィルター法によって、海水や底泥から重油分解細菌を分離し、分離菌株の重油分解能の測定条件を、培養日数、重油分解率、重油中の*n*-パラフィン成分の変化などから検討し、有効なスクリーニング法を確立したので、これらの結果について報告する。

2. 実 験 方 法

2.1 供試細菌源

既報⁵⁾で述べた備讃瀬戸(重油汚染海域)および下関市吉見沿岸海域(以下吉見沿岸と略称)から採取した海水と底泥を、重油分解細菌の分離源として用いた。試料中の従属栄養細菌数は、海水で $10^2 \sim 10^4$ cells/ml、底泥で $10^4 \sim 10^8$ cells/gであった。

2.2 供試基質

水島重油流出事故のさいの流出重油と同質の脱硫C重油⁹⁾を、基質として用いた。

2.3 重油分解細菌の分離法

n-ヘキサデカンを指標基質とした炭化水素酸化細菌の分離法⁸⁾に準じた。すなわち、試料をTable 1に示す組成の滅菌基礎塩溶液で順次10倍希釈した後、各希釈液10 mlを滅菌メンブランフィルターで濾過した。この場合、多くの試料を能率的に処理する現場調査の必要性から、10 mlの注射筒の先に、メンブランフィルター(孔径0.45 μm, 直径25 mm)を内蔵したメンブランフィルター保持器(スフィニックス, 日本ミリポア製)を取り付けた簡単な濾過器を用いた。ついで、A寒天培地(Table 2)あるいはB寒天培地(Table 3)10 mlを直径6 cmのシャーレに入れて予め調製した平板の表面に、50 μlの基質(重油を2倍容量の*n*-ヘキサデカンに溶かし、メンブランフィルターで濾過滅菌した)を加え、その上にそれぞれ供試液を濾過したメンブランフィルターを置いて、25°Cで14~21日間培養した。

Table 1. Composition of basal salt solution

NaCl	30.0 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2 g
KCl	0.3 g
FeCl ₂ · <i>n</i> H ₂ O	0.01 g
Distilled water	1000 ml
pH adjusted to 7.5	

このようにして、メンブランフィルター上に発生した重油分解細菌のコロニーをFig. 1に示した。これらのコロニーを釣菌し、少量の重油を加えた寒天斜面培地(ZOBELL 2216E 改変培地¹⁰⁾, Table 4)に接種し、25°Cで数日間培養した後、重油を含まない同上の寒天平板培地を用いて常法によって純粋分離した。分離菌株は、重油を加えた

寒天斜面培地で継代培養した。

Table 2. Composition of agar medium A* for isolation of heavy oil-decomposing bacteria group A

Basal salt solution**	1000 ml
L-Alanine	1.0 g
Agar	15.0 g
pH adjusted to 7.5	

* Fifty microliters of substrate composed of heavy oil/*n*-hexane (1/2) was poured onto the surface of each plate medium (about 10 ml of this culture fluid per Petri dish of 6 cm in diameter).

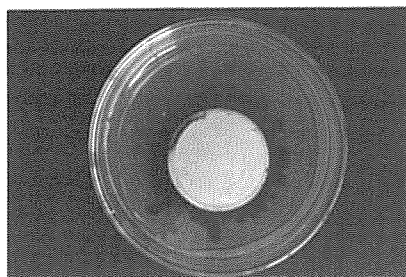
** See Table 1.

Table 3. Composition of agar medium B* for isolation of heavy oil-decomposing bacteria group B

Basal salt solution**	1000 ml
Ammonium chloride	1.0 g
Agar	15.0 g
pH adjusted to 7.5	

* Fifty microliters of substrate composed of heavy oil/*n*-hexane (1/2) was poured onto the surface of each plate medium (about 10 ml of this culture fluid per Petri dish of 6 cm in diameter).

** See Table 1.



(A)



(B)

Fig. 1. Colonies of heavy oil-decomposing bacteria on membrane filter.

(A): Heavy oil-decomposing bacteria group A incubated on agar medium A (Table 2) for 21 days at 25°C. Bacterial source is sea-water sampled from Yoshimi coastal waters.

(B): Heavy oil-decomposing bacteria group B incubated on agar medium B (Table 3) for 21 days at 25°C. Bacterial source is the same as that in (A).

Table 4. Composition of agar slant

Peptone	1.0 g
Yeast extract	0.2 g
Agar	15.0 g
Filtered seawater	1000 ml
pH adjusted to 7.5	

A small quantity of heavy oil is added to each slant.

ここで、上述のA培地 (Table 2) 上に増殖する細菌を重油分解細菌A群 (A群と略称) とし、B培地 (Table 3) 上に増殖する細菌を重油分解細菌B群 (B群と略称) とするが、A群およびB群の意義については、既報¹¹⁾ で述べたとおりである。

2.4 分離細菌の重油分解能の測定法

重油を含まない斜面培地 (Table 4) で、供試細菌を25°C、3日間、2回培養した後、それぞれ1白金耳量 (約 10^8 cells) をA群の菌株についてはA液体培地 (Table 5) に、またB群の菌株についてはB液体培地 (Table 6) に接種した。このさい、予め基質100~120 mg を精秤して500 ml の肩付フラスコに入れ、各培地50 ml を加え、綿栓した後高圧殺菌して用いた。

細菌を接種した培養フラスコを、25°C で14日間振盪培養 (110ストローク/分) した後、既報⁹⁾ のケイ酸カラムクロマトグラフィーによって、重油中の炭化水素を分画・定量した。なお、全炭化水

Table 5. Composition of liquid medium A for heavy oil-decomposing bacteria group A

Basal salt solution*	1000 m/
L-Alanine	1.0 g
pH adjusted to 7.5	
Heavy oil**	2.0 g

* See Table 1.

** A hundred mg of heavy oil is added to each 50 m/ of the fluid without oil.

Table 6. Composition of liquid medium B for heavy oil-decomposing bacteria group B

Basal salt solution*	1000 m/
Ammonium chloride	1.0 g
pH adjusted to 7.5	
Heavy oil**	2.0 g

* See Table 1.

** A hundred mg of heavy oil is added to each 50 m/ of the fluid without oil.

素量は、重油添加量を100 mg に換算した場合の mg 数で表わした。同一方法によって定量した対照培地の全炭化水素量を基準にして、培養後の炭化水素減少率 (%) を求め、これを重油分解率 (%) とした。重油分解率によって、各菌株の重油分解能を次の6段階に格付けした。± < 重油分解率 5%, 5% ≤ ± < 10%, 10% ≤ ± < 20%, 20% ≤ ± < 30%, 30% ≤ ± < 40% および 40% ≤ ±。

2.5 基質中の *n*-パラフィン成分の分析法

細菌による基質の分解状態をより明らかにするために、各培養液の重油の炭化水素画分中の *n*-パラフィン成分を、既報⁹⁾で述べたガスクロマトグラフィーによって、定性分析および定量分析した。定量分析においては、標準物質添加法⁹⁾によって *n*-ペンタデカン〜*n*-テトラコンタンの *n*-パラフィン成分 (以下 C_i と略称、炭素数 $i = 15, 16 \dots 40$) について、各成分の重量および全成分の合計重量を求め、いずれも重油添加量を100 mg に換算した場合の mg 数で表した。また、 $C_{15} \sim C_{20}$,

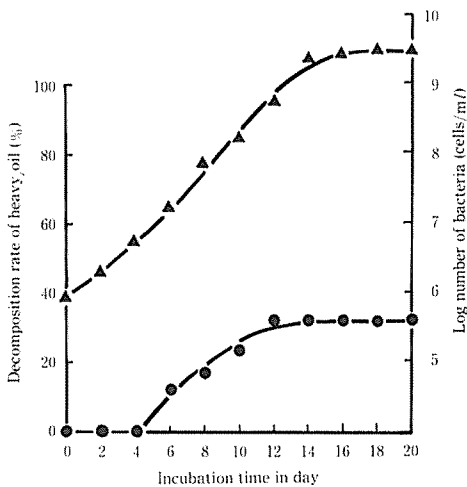


Fig. 2. Time course of decomposition of heavy oil by a typical culture of heavy oil-decomposing bacteria group A (WA52'10-7).

● : decomposition rate of heavy oil.
▲ : number of bacteria.

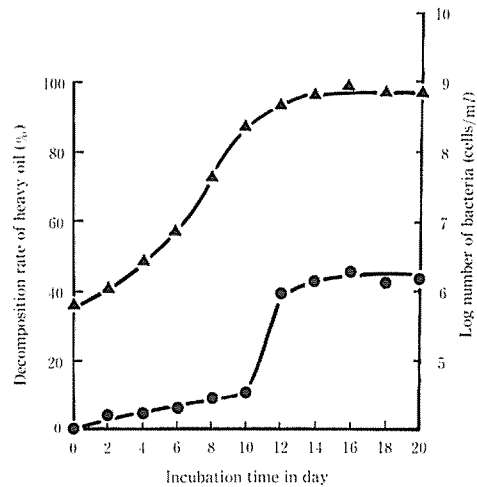


Fig. 3. Time course of decomposition of heavy oil by a typical culture of heavy oil-decomposing bacteria group B (WB522-3).

● : decomposition rate of heavy oil.
▲ : number of bacteria.

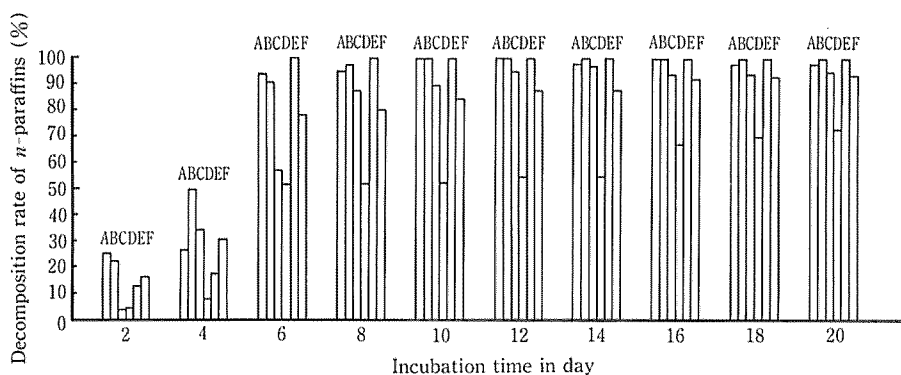


Fig. 4. Change in decomposition rate of *n*-paraffins during incubation of a typical culture of heavy oil-decomposing bacteria group A (WA52'1₀-7).
 A: C₁₅~C₂₀ (carbon chain length of *n*-paraffin) fraction, B: C₂₁~C₂₅,
 C: C₂₆~C₃₀, D: C₃₁~C₃₅, E: C₃₆~C₄₀, F: C₁₅~C₄₀.

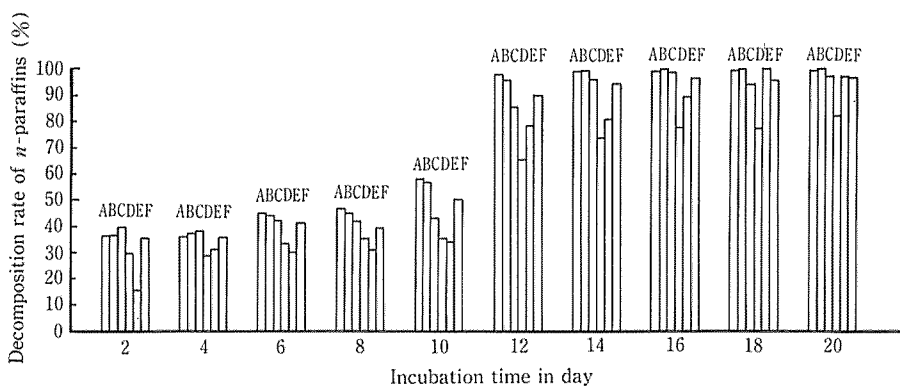


Fig. 5. Change in decomposition rate of *n*-paraffins during incubation of a typical culture of heavy oil-decomposing bacteria group B (WB522-3).
 A: C₁₅~C₂₀ (carbon chain length of *n*-paraffin) fraction, B: C₂₁~C₂₅,
 C: C₂₆~C₃₀, D: C₃₁~C₃₅, E: C₃₆~C₄₀, F: C₁₅~C₄₀.

C₂₁~C₂₅, C₂₆~C₃₀, C₃₁~C₃₅およびC₃₆~C₄₀の5区分について、各区分ごとの合計重量を求めた。さらに、対照値との比較から、培養後の重油中の*n*-パラフィンの各成分、全成分および区分ごとの成分の分解率(%)をそれぞれ算出した。

3. 結果および考察

3.1 培養日数に伴う基質の分解経過

培養に適した日数を知るために、A群およびB

群の代表菌株、WA52'1₀-7 およびWB522-3を用いて、培養中の重油分解率(%)および生菌数(対数)の経時変化を調べ、それぞれFig. 2およびFig. 3に示した。また、培養中の重油の*n*-パラフィン(C₁₅~C₄₀)について、上述の方法によって各成分量を求め、全成分(C₁₅~C₄₀の合計)および5区分(C₁₅~C₂₀, C₂₁~C₂₅, C₂₆~C₃₀, C₃₁~C₃₅およびC₃₆~C₄₀の各区分ごとの合計)の分解率(%)を計算し、それぞれの経時変化をFig. 4およびFig. 5に示した。

Fig. 2 から, WA52'1₀-7 については, 培養日数 4 日まで重油の分解がみられず, その後10日まで分解が進み, 12日で最高の分解率に達し, その後20日まで一定値を示した。細菌の増殖曲線も重油分解率の変化とおおむね似た傾向を示しており, 2~12日で対数期, 14~20日で停止期にあると考えられる。Fig. 3 から, WB522-3 の重油分解については, WA52'1₀-7 の場合に比べて分解がおそく, 10日まで分解がゆるやかで, 10~12日に急に分解が進み, 14日で最高の分解率に達し, その後20日まで一定値を示した。細菌の増殖曲線は, WA52'1₀-7 の場合とよく似た傾向を示した。

Fig. 4 から, WA52'1₀-7 の培養中の *n*-パラフィン成分の変化についてみると, 重油分解率の変化がみられない2~4日に, すでに *n*-パラフィンの分解が起こっていることが認められた。各区分ごとの成分は, いずれも14日でおおむね最高の分解率に達した。

Fig. 5 から, WB522-3 の *n*-パラフィン成分の変化については, 培養初期からすでに分解がみられ, 重油分解率の低い6~10日にかなり高い *n*-パラフィン分解率が認められた。各区分ごとの成分は, おおむね12~14日で最高の分解率に達した。また Fig. 4 および Fig. 5 から, 両菌株とも C₃₁~C₃₅ の D 区分を除く他の 4 区分 (A, B, C および E) は, おおむね一様に分解されることが明らかである。D 区分の分解率が他区分の分解率に比べて低いことについては, さらに後で言及する。

多くの他菌株の重油分解についても, 上述の両

菌株の炭化水素および *n*-パラフィンの分解結果とよく似た傾向が認められた。したがって, 重油分解細菌の培養日数としては, 基質の分解が最高に達する14日が適していると考え, 以下の実験ではこの条件を用いた。

3・2 海水および底泥から分離した細菌の重油分解能

備讃瀬戸および吉見沿岸の海水から分離した A 群70菌株および B 群104菌株について, 重油分解能を調べた結果を Table 7 に示す。また, 両海域の底泥から分離した A 群48菌株および B 群44菌株について, 重油分解能を調べた結果を Table 8 に示す。なお, 海水からの分離細菌では, A 群70菌株のうち, 備讃瀬戸からの分離細菌が32菌株, 吉見沿岸からの分離細菌が38菌株であり, B 群104菌株のうち, 備讃瀬戸からの分離細菌が64菌株, 吉見沿岸からの分離細菌が40菌株であった。底泥からの分離細菌では, A 群48菌株のうち, 備讃瀬戸からの分離細菌が32菌株, 吉見沿岸からの分離細菌が16菌株であり, B 群44菌株のうち, 備讃瀬戸からの分離細菌が29菌株, 吉見沿岸からの分離細菌が15菌株であった。これらの海水および底泥から分離した菌株については, いずれも両海域をこみにして検討した。

Table 7 から, 海水から分離した A 群70菌株のうち, 重油分解率 5% 以上の明らかな基質分解能 (+, ++, +++, 以下同じ) を示す細菌は62菌株 (88.6%) であり, 重油分解率20% 以上の強い基質分解能 (++, +++ および +++, 以下同

Table 7. Heavy oil-decomposing activity of bacteria groups A and B isolated from seawater in Bisan Seto and Yoshimi coastal waters

Decomposing activity of heavy oil	Number of strains of heavy oil -decomposing bacteria group A	Number of strains of heavy oil -decomposing bacteria group B
± < Decomposition rate 5 %	8 (11.4)	8 (7.7)
5 % ≤ + < 10 %	4 (5.7)	5 (4.8)
10 % ≤ ++ < 20 %	17 (24.3)	32 (30.8)
20 % ≤ +++ < 30 %	29 (41.4)	47 (45.2)
30 % ≤ +++ < 40 %	8 (11.4)	10 (9.6)
40 % ≤ +++	4 (5.7)	2 (1.9)
Sum	70 (100)	104 (100)

Note: The figure in parentheses shows value in percentage.

Table 8. Heavy oil-decomposing activity of bacteria groups A and B isolated from bottom sediment in Bisan Seto and Yoshimi coastal waters

Decomposing activity of heavy oil	Number of strains of heavy oil -decomposing bacteria group A	Number of strains of heavy oil -decomposing bacteria group B
± < Decomposition rate 5 %	12 (25.0)	0 (0)
5 % ≤ ± < 10 %	9 (18.8)	0 (0)
10 % ≤ ± < 20 %	13 (27.1)	0 (0)
20 % ≤ ± < 30 %	8 (16.7)	26 (59.1)
30 % ≤ ± < 40 %	4 (8.3)	15 (34.1)
40 % ≤ ±	2 (4.2)	3 (6.8)
Sum	48 (100)	44 (100)

Note: The figure in parentheses shows value in percentage.

じ)をもつ細菌は41菌株(58.6%)であった。また、B群104菌株のうち、明らかな基質分解を示す細菌は96菌株(92.3%)であり、強い基質分解能をもつ細菌は59菌株(56.7%)であった。

Table 8 から、底泥から分離したA群48菌株のうち、明らかな基質分解能を示す細菌は36菌株(75.0%)であり、強い基質分解能をもつ細菌は14菌株(29.2%)であった。また、B群44菌株の全部が強い基質分解能を示した。

海水および底泥からの分離細菌をこみにすると、A群では、118菌株中98菌株(83.1%)が明らかな基質分解能を示し、55菌株(46.6%)が強い基質分解能を示した。また、B群では、148菌株中140菌株(94.6%)が明らかな基質分解能を示し、103菌株(69.6%)が強い基質分解能を示した。これらの結果から、本実験で用いたメンブランフィルター法は、海水や底泥から重油分解細菌を高率に分離できる上、操作が簡便であるため、海洋中の重油分解細菌の分離法として実用性が高いと考えられる。

3.3 重油分解細菌の基質分解後における *n*-パラフィンの組成

重油分解細菌による基質分解後の炭化水素画分中の各 *n*-パラフィン成分を定量した。A群およびB群の基質分解能の強い菌株と弱い菌株についての代表例を、それぞれ Table 9 および Table 10 に示し、さらにそれらのガスクロマトグラムを Fig. 6 および Fig. 7 に示した。

Table 9, 10 および Fig. 6, 7 から、A, B両群とも基質分解能の強い菌株にあつては、 C_{16} ~ C_{40} の各 *n*-パラフィン成分がおおむね一様によく分解され、また基質分解能の弱い菌株にあつても、大部分の *n*-パラフィン成分について明らかに分解が認められた。そして、全炭化水素分解率が高いほど、全 *n*-パラフィン分解率も高い傾向がみられた。

n-パラフィンが微生物によって分解される場合、一般に C_{10} ~ C_{25} の成分が最もよく分解されることが知られているが¹²⁾、重油中の *n*-パラフィン成分については、明らかにこれと異なっている。ただし、基質分解能の強い菌株について、 C_{15} ~ C_{20} 、 C_{21} ~ C_{25} 、 C_{26} ~ C_{30} 、 C_{31} ~ C_{35} および C_{36} ~ C_{40} の各区分ごとの分解率をみると、いずれの場合も C_{31} ~ C_{35} 区分が他の4区分に比べて、約30~40%低いことが認められた。このことは、 C_{31} 、 C_{32} および C_{33} の分解率が他の *n*-パラフィン成分の分解率に比べて、はるかに低いからであつて、他の多くの重油分解細菌についても同じ傾向がみられた。重油中の *n*-パラフィン成分のうち、 C_{31} 、 C_{32} および C_{33} が重油分解細菌によって分解されにくいことは興味ある現象であるから、今後標品を用いて検討したい。

また、Table 9 および Table 10 から明らかなように、基質分解能が強い菌株では、*n*-パラフィン分解率が高いのみでなく、炭化水素分解率がかなり高い。なお、対照の基質中の全炭化水素量に対する全 *n*-パラフィン量の割合は、いずれも約4%

Table 9. Amount of each *n*-paraffin in heavy oil and its decomposition rate after incubation of typical cultures of heavy oil-decomposing bacteria group A

Culture	Chain length of <i>n</i> -paraffin																				Total hydrocarbon
	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁ ~C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₁ ~C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₂₆ ~C ₃₀		
WA521 ₆₋₁₀	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.01 (94.4)	0.01 (95.2)	0.02 (97.2)	0.00 (100)	0.01 (95.2)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.01 (99.0)	0.01 (94.4)	0.00 (100)	0.01 (92.9)	0.02 (83.3)	0.01 (90.9)	0.05 (93.0)		
WA523-1	0.00 (100)	0.00 (88.9)	0.01 (47.6)	0.11 (50.0)	0.09 (50.0)	0.12 (42.9)	0.33 (53.5)	0.15 (31.8)	0.16 (23.8)	0.13 (40.9)	0.15 (31.8)	0.10 (44.4)	0.69 (34.3)	0.12 (33.3)	0.08 (50.0)	0.09 (35.7)	0.07 (41.7)	0.06 (45.5)	0.42 (40.8)		
Control	0.00 (0)	0.02 (0)	0.09 (0)	0.21 (0)	0.18 (0)	0.21 (0)	0.71 (0)	0.22 (0)	0.21 (0)	0.22 (0)	0.22 (0)	0.18 (0)	1.05 (0)	0.18 (0)	0.16 (0)	0.14 (0)	0.12 (0)	0.11 (0)	0.71 (0)		
Culture	Chain length of <i>n</i> -paraffin										Total										
	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₄	C ₃₅	C ₃₁ ~C ₃₅	C ₃₆	C ₃₇	C ₃₈	C ₃₉	C ₄₀	C ₃₆ ~C ₄₀	<i>n</i> -paraffin	Total hydrocarbon							
WA521 ₆₋₁₀	0.06 (45.5)	0.05 (54.4)	0.05 (50.0)	0.01 (80.0)	0.00 (100)	0.17 (58.5)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.25 (91.6)	43.7 (42.0)							
WA523-1	0.11 (0)	0.09 (18.2)	0.10 (0)	0.03 (40.0)	0.02 (50.0)	0.35 (14.6)	0.03 (0)	0.03 (0)	0.01 (50.0)	0.01 (50.0)	0.01 (0)	0.09 (18.2)	1.88 (37.1)	71.2 (5.4)							
Control	0.11 (0)	0.11 (0)	0.10 (0)	0.05 (0)	0.04 (0)	0.41 (0)	0.03 (0)	0.03 (0)	0.02 (0)	0.02 (0)	0.01 (0)	0.11 (0)	2.99 (0)	75.3 (0)							

Note: The amount of *n*-paraffin or hydrocarbon is expressed with mg per 100 mg of heavy oil. The value in parentheses shows each decomposition rate (%).

Table 10. Amount of each *n*-paraffin in heavy oil and its decomposition rate after incubation of typical cultures of heavy oil-decomposing bacteria group B

Culture	Chain length of <i>n</i> -paraffin																				Total hydrocarbon
	C ₁₂	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₁₅ ~C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₁ ~C ₂₅	C ₂₆	C ₂₇	C ₂₈	C ₂₉	C ₃₀	C ₂₆ ~C ₃₀		
WB529-3	0.00 (100)	0.00 (100)	0.01 (100)	0.01 (94.4)	0.01 (93.8)	0.00 (100)	0.02 (96.9)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.01 (93.8)	0.03 (75.0)	0.00 (100)	0.04 (94.9)		
WB526-1	0.00 (0)	0.02 (11.1)	0.08 (11.1)	0.16 (11.1)	0.16 (0)	0.19 (0)	0.61 (4.7)	0.21 (8.7)	0.22 (4.3)	0.22 (8.2)	0.21 (12.5)	0.17 (15.0)	1.03 (9.6)	0.17 (22.7)	0.14 (17.6)	0.13 (18.8)	0.11 (8.3)	0.10 (9.1)	0.65 (16.7)		
Control	0.00 (0)	0.02 (0)	0.09 (0)	0.18 (0)	0.16 (0)	0.19 (0)	0.64 (0)	0.23 (0)	0.23 (0)	0.24 (0)	0.24 (0)	0.20 (0)	1.14 (0)	0.22 (0)	0.17 (0)	0.16 (0)	0.12 (0)	0.11 (0)	0.78 (0)		

Culture	Chain length of <i>n</i> -paraffin										Total <i>n</i> -paraffin	Total hydrocarbon
	C ₃₁	C ₃₂	C ₃₃	C ₃₄	C ₃₅	C ₃₁ ~C ₃₅	C ₃₆	C ₃₇	C ₃₈	C ₃₉		
WB529-3	0.07 (65.0)	0.04 (71.4)	0.05 (61.5)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.16 (71.9)	0.00 (100)	0.01 (80.0)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.00 (100)	0.01 (92.3)
WB526-1	0.14 (30.0)	0.10 (28.6)	0.10 (23.1)	0.03 (50.0)	0.02 (50.0)	0.39 (31.6)	0.03 (40.0)	0.03 (40.0)	0.01 (0)	0.01 (0)	0.01 (0)	0.09 (30.8)
Control	0.20 (0)	0.14 (0)	0.13 (0)	0.06 (0)	0.04 (0)	0.57 (0)	0.05 (0)	0.05 (0)	0.01 (0)	0.01 (0)	0.01 (0)	0.13 (0)

Note: The amount of *n*-paraffin or hydrocarbon is expressed with mg per 100 mg of heavy oil. The value in parentheses shows each decomposition rate (%).

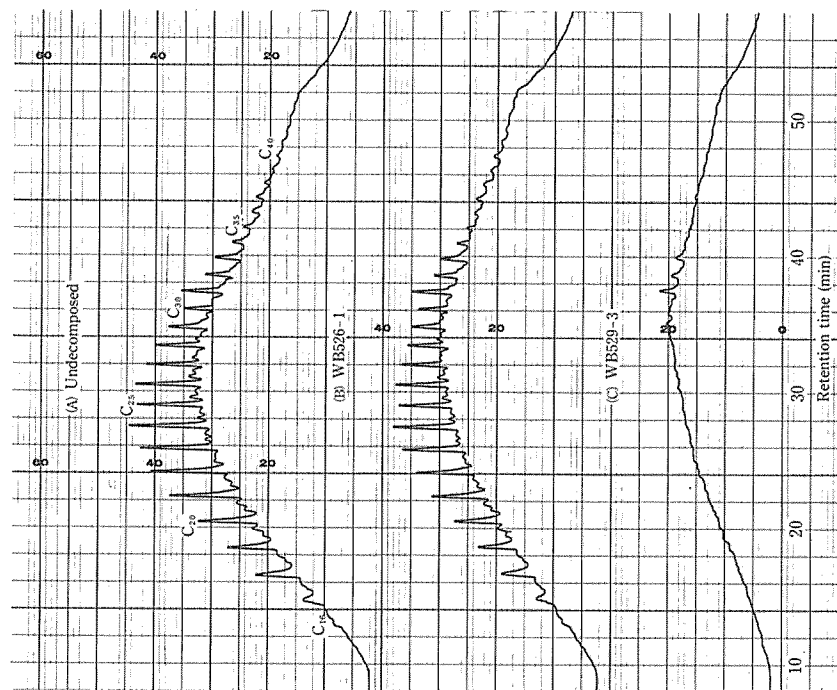


Fig. 7. Gas chromatograms of heavy oil after incubation of typical cultures of heavy oil-decomposing bacteria group B.

(A): Undecomposed heavy oil in medium.
 (B): Heavy oil decomposed by a culture, WB526-1.
 (C): Heavy oil decomposed by a culture, WB529-3.
 C_i : Carbon chain length of *n*-paraffin.

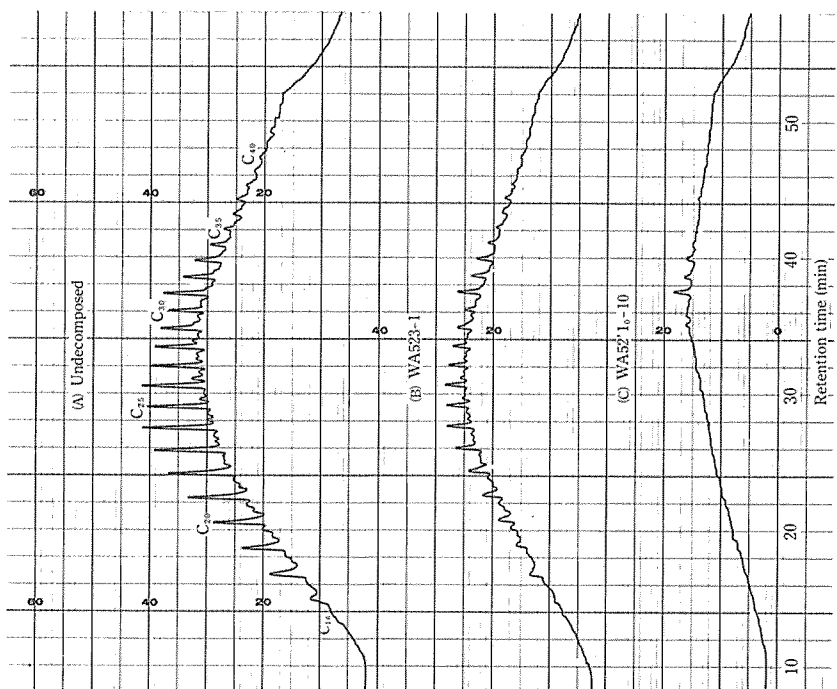


Fig. 6. Gas chromatograms of heavy oil after incubation of typical cultures of heavy oil-decomposing bacteria group A.

(A): Undecomposed heavy oil in medium.
 (B): Heavy oil decomposed by a culture, WA523-1.
 (C): Heavy oil decomposed by a culture, WA521₆₋₁₀.
 C_i : Carbon chain length of *n*-paraffin.

である。さらに、Fig. 6 および Fig. 7 から、これらのガスクロマトグラムのバックグラウンドが、対照に比べてきわめて低いことが明らかである。したがって、重油中に含まれる *n*-パラフィン以外の成分、たとえば芳香族炭化水素などもかなり分解されることが推測される。重油中のどの成分がどの程度分解されるかを検討することは、本研究上きわめて重要であるから、今後追究したい。

前の実験(3・2)で、メンブランフィルター法は、海洋中の重油分解細菌の分離法として有用であることを明らかにしたが、本法による分離菌株が重油中の種々の炭化水素成分を分解することが、本実験結果から必然的に推測されたので、分離菌株について重油分解率(炭化水素分解率)を基準にして基質分解能を格付けする本法も、重油分解細菌の基質分解能の判別法として有用であると思われる。したがって、これらの方法によって、海洋中の重油分解細菌をうまくスクリーニングできることがわかった。なお、既報⁸⁾で *n*-ヘキサデカンを指標炭化水素とした場合の炭化水素酸化細菌のスクリーニング法が確立されているので、本報の結果と考え合わせると、メンブランフィルター法によって対象とする細菌を分離し、次に分離菌株を一定条件で培養した後の基質分解率を求め、これを基準にして各菌株の基質分解能を判別する方法は、海洋中の石油分解細菌のスクリーニング法として一般に通用する適切な方法であると思われる。

4. 要 約

海洋中の重油分解細菌のスクリーニング法について、メンブランフィルター法による重油分解細菌の分離と分離菌株の重油分解能の測定条件を検討し、次の結果を得た。

1. 海水および底泥から、メンブランフィルター法によって、重油分解細菌A群およびB群をよく分離することができた。すなわち、試料を適度に希釈した液一定量をメンブランフィルター(孔径0.45 μm)で濾過し、このメンブランフィルターを予め平板に作成したA寒天培地(L-アラニン1g、寒天15g、基礎塩溶液1l、pH7.5の組成の培地10ml)を直径6cmのシャーレに入れた平板上に、重油を2倍容量の *n*-ヘキサンに溶かして濾過

滅菌した基質50 μl を加えた。),あるいはB寒天培地(塩化アンモニウム1g、寒天15g、基礎塩溶液1l、pH7.5、基質50 μl /培地10ml)の上に置き、25°Cで14~21日間培養し、メンブランフィルター上に発育したコロニーを釣菌する。

2. 分離細菌の重油分解能の測定法として、供試菌株1白金耳量をそれぞれ、500mlの肩付フラスコ中のA液体培地(L-アラニン1g、基礎塩溶液1l、pH7.5、重油100mg/培養液50ml)、あるいはB液体培地(塩化アンモニウム1g、基礎塩溶液1l、pH7.5、重油100mg/培養液50ml)に接種し、25°Cで14日間振盪培養し(110ストローク/分)、培養液中の残存基質をケイ酸カラムクロマトグラフィーによって分画・定量する。対照培地中の全炭化水素量を基準にして各菌株の重油分解率を求め、その値によってそれぞれの重油分解能を判別することが有効である。

3. 重油分解率によって各菌株の基質分解能を6階級に格付けすると(±<基質分解率5%, 5% ≤ + < 10%, 10% ≤ ++ < 20, 20% ≤ +++ < 30%, 30% ≤ ++++ < 40%, および40% ≤ +++++), 海水および底泥から分離したA群118菌株中98菌株(83.1%)が+以上の明らかな基質分解能を示し、55菌株(46.6%)が++++以上の強い基質分解能を示した。また、B群148菌株中140菌株(94.6%)が明らかな基質分解能を示し、103菌株(69.6%)が強い基質分解能を示した。

4. 培養後の重油中の *n*-パラフィンをガスクロマトグラフィーによって定量したところ、基質分解能の強い菌株にあつては、いずれもC₃₁、C₃₂およびC₃₃を除く、C₁₅~C₄₀の各 *n*-パラフィン成分が、一様に高率に分解されることがわかった。基質分解能の弱い菌株にあつても、大部分の *n*-パラフィン成分に分解がみられ、さらに重油の分解に当つては、まず *n*-パラフィンの分解が認められた。

5. 上述の1~4から、本実験で用いた重油分解細菌の分離法および基質分解能の測定法は、海洋中の重油分解細菌のスクリーニング法として有用であることが認められた。

終わりに、本実験に協力された水産大学校微生物学研究室卒論学生であつた辰巳裕二、田辺真二

および橋本憲明の諸君に謝意を表す。なお、研究費の一部分は環境庁水島重油流出事故漁業影響調査費によった。

文 献

- 1) 水島重油流出事故関係環境影響総合検討委員会：昭和49年度同委員会報告書，pp. 1～162 (1975).
- 2) 水島重油流出事故漁業影響調査推進協議会：昭和49年度同協議会調査報告書，pp. 1～246 (1975).
- 3) 村上彰男：石油汚染と水産生物（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1976，pp. 22～37.
- 4) Y. HIYAMA : in "Proceedings of Oil Spill Conference" (ed. by API, USEPA and USCG), American Petroleum Institute, Washington, 1979, pp. 699～707.
- 5) 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦：日水誌，44，91～104 (1978).
- 6) 村上正忠・藤沢浩明・真鍋武彦：日水誌，45，1091～1098 (1979).
- 7) 津田 覚：瀬戸内海の油汚染，大日本図書，東京，1976，pp. 156～157.
- 8) 藤沢浩明・村上正忠：水産大研報，28，101～108 (1980).
- 9) H. FUJISAWA and M. MURAKAMI : *J. Shimonoseki Univ. Fish.*, 27, 131～146 (1979).
- 10) R. MORITA and C. E. ZOBELL : *Deep-Sea Res.*, 3, 66～73 (1955).
- 11) 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦：日水誌，43，659～668 (1977).
- 12) R. BARTHA and R. M. ATLAS : *Advances in Applied Microbiology*, 22, 225～266 (1977).