

海洋油濁浄化に係わる微生物生態系の解析技術に関する研究 (I)

油濁海水中の微生物バイオマスの評価手法

A Study on Methods for Characterizing Microbial Ecosystems of Oil Biodegradation in Seawater (I)

Method for Evaluation of Microbial Biomass in Oil Polluted Seawater

石渡 寛之*
Hiroyuki Ishiwata吉川 聡雄*
Fusao Yoshikawa小島 雅樹*
Masaki Kojima丸山 明彦**
Akihiko Maruyama河野 泰広**
Yasuhiro Kawano東原 孝規**
Takanori Higashihara

要 約

近年、石油流出事故などによる海洋油濁の対策技術として、微生物を用いた環境調和型の生物学的浄化技術（バイオレメディエーション）が世界的に注目されているが、この技術を適用して効果的に浄化を行うためには、現場海域の微生物生態系における微生物群集を定量的および定性的に解析する技術の確立が必要である。

本報では、海水中の微生物群集を定量的に評価する手法として、微生物バイオマスを測定する方法の一つであるアデノシン 5' - ミリン酸（ATP）測定法に着目し、ATPの抽出方法の検討、天然海水および油濁海水試料への適用、さらに油濁海水試料への栄養源の添加実験などの検討を行った。その結果、油濁海域海水中の微生物バイオマスの評価手法として、ATP測定法が有効であることを明らかにした。

目 次

- § 1. はじめに
- § 2. ATP抽出方法の検討
- § 3. 全菌数測定法との比較
- § 4. 油濁海水試料への適用
- § 5. 油濁海水試料への栄養源の添加実験
- § 6. まとめ
- § 7. おわりに

§ 1. はじめに

近年、海洋の汚染が世界的にみられているが、その中でも、海洋油濁（石油による海洋の汚染）は、海洋生態系や水産生物に深刻な影響を与えるため、世界的に重要な環境問題となっている。

海洋への石油の流出は、タンカーの海難事故などによる流出のほか、タンカーなどの船舶から常時排出されるビルジ排水やバラスト水、洗浄排水、また海底油田や石油コンビナートからの流出、あるいは陸上の精油所や石油化学工場からの含油汚泥、含油排水などの排出によるもので、年間数百万トンにも及ぶと報告されている。また、わが国の沿岸海域においても、海洋汚染の事例のう

* 技術研究所先端技術研究課

** 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

ち、石油による汚染件数が全体の約50%と高い割合を占めている¹⁾。

海洋に流出した石油の処理方法としては、石油の拡散範囲を包囲し回収する方法や、石油を直接海上で焼却する方法、あるいは化学処理剤を用いて乳化分散させる方法などの物理・化学的処理が一般的に行われているが、いずれも完全に石油を処理・除去できる技術ではない。それらの処理方法で完全に除去されない未回収の石油は、最終的に自然生態系の自浄作用（海洋に生息する微生物の働き）により徐々に分解されている。近年、このような自然生態系の自浄作用を高度に利用したバイオレメディエーションに大きな期待が寄せられている²⁻⁶⁾。

バイオレメディエーションによる海洋油濁の浄化方法には、海洋に欠乏している窒素やリンなどの栄養源を散布し、自然生態系の自浄作用を促進する方法と、分離培養した強力な石油分解活性を有する石油分解微生物、あるいは遺伝子工学的な手法により石油分解活性を強力に改良した石油分解微生物を散布する方法などが考えられている^{2,3)}。しかし、バイオレメディエーションを現場海域で効果的に適用するためには、油濁浄化に係わる微生物生態系を微生物群集レベルで定量的および定性的に解析する技術の確立が必要である。

そこで、今回、筆者らは、微生物生態系における微生物群集を定量的に評価するために、海水中の微生物バイオマスを測定する方法について検討した。

海水中の微生物バイオマスを測定する方法には、希釈平板法や最確数（MPN）法などの生菌数測定法、あるいは海水中の微生物細胞を蛍光色素などで染色し、顕微鏡で直接計数する全菌数測定法⁷⁾、または微生物菌体成分由来のデオキシリボ核酸（DNA）、ATP、ムラミン酸、脂肪酸、リボ多糖類などの指標物質を測定する方法⁸⁻¹⁰⁾がある。しかし、これらの方法を油濁海水に適用した例は、ほとんど報告されていない。

本報では、石油成分による測定阻害がもっとも少ないと推測されるATP測定法に着目して、ATPの抽出方法の検討、天然海水および油濁海水試料への適用、さらに油濁海水試料への栄養源の添加実験などを行い、油濁海水中の微生物バイオマス評価手法としての有効性について検討を行った結果について述べる。

§ 2. ATP抽出方法の検討

環境試料中のATPの測定方法は、1966年にHolm-Hansenら¹¹⁾により報告され、その後、一部改変された方法がいくつか報告されている。しかし、海水中の懸濁

態ATPの測定方法は、十分に確立されていない。

そこで、今までに報告されているATP測定法を海水試料に適用して、抽出緩衝液の種類、抽出温度、および抽出時間などについて検討を行った。

2-1 材料および方法

(1) 海水試料の採取

神奈川県の大井町三浦半島南端相模湾の表層水を、滅菌した5ℓ容のポリびんを用いて直接採取し、海水試料とした。採取場所は図-1に示した。

(2) 海水試料の前処理

採取した海水試料は、プランクトンネット（xx20：孔径200μm）でろ過した後、孔径1μm、3μm、および10μmの3種類のニュクリポアーフィルター（Nuclepore Co Ltd.）を用いて、海水中の懸濁態粒子が1μm以下、3μm以下、および10μm以下の3画分になるようにサイズ分画して実験に供した。

(3) ATPの測定方法

①ATP抽出緩衝液

ATP抽出緩衝液としては、次の3種類を用いた。

- a. トリス緩衝液（0.025mol/ℓ，pH7.75）¹⁰⁾
- b. リン酸緩衝液（0.06mol/ℓ，pH7.4）¹¹⁾
- c. Glycine・Mg-EDTA緩衝液（Glycine:0.01mol/ℓ，Mg-EDTA:0.005mol/ℓ，pH10.0）¹²⁾

これらの抽出緩衝液は、すべて超純水（Milli Q water, Millipore Co.）を用いて調製し、1mol/ℓのHClまたは1mol/ℓのNaOHでpH調整した。

②抽出方法の検討

サイズ分画した海水試料を孔径0.22μmのメンブランフィルター（Type GV, Millipore Co.）でろ過し、得られた懸濁態粒子を加温しておいた抽出緩衝液中に入れた。抽出後、直ちに氷冷して遠心分離を行い、その上清を懸濁態ATP測定用試料とした。

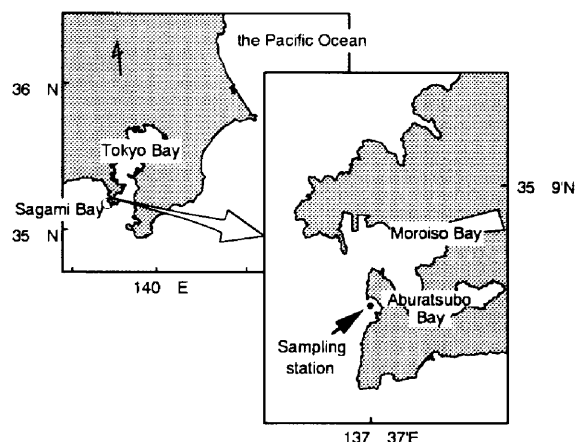


図-1 海水採取場所

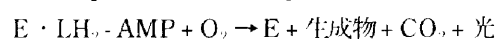
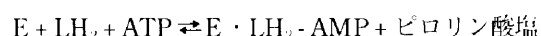
抽出温度および抽出時間は、最初に、それぞれの抽出緩衝液の原法¹⁰⁻¹²⁾に準じて行った。

次に、各抽出緩衝液の中でもっとも優れていた抽出緩衝液について、より高感度に測定する方法を確立するため、抽出緩衝液量、抽出温度、および抽出時間について検討を行った。

さらに、最適抽出時間を決定するため、既知濃度のATP標準試薬を用いて、ATPの回収率に及ぼす抽出時間の影響についても検討した。

③ ATP測定

測定装置は、ATPフォトメーターAF-100 (TOA Co Ltd.)を使用した。この装置は、下記のルシフェリン・ルシフェラーゼ反応 (生物発光) の原理を利用したものである。



ただし、 LH_2 :ルシフェリン、E:ルシフェラーゼ

測定方法は、懸濁態ATP測定用試料100 μl に発光試薬100 μl を加え、ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応に基づく発光量を、反応開始後、一定時間内の積分値として測定し、ATP濃度に換算した。

2-2 結果および考察

(1) 各抽出緩衝液の海水中懸濁態ATPの抽出効率および抽出後の安定性

各抽出緩衝液の海水中懸濁態ATPの抽出効率および抽出後の安定性について検討した結果を、サイズ画別に図-2から図-4に示した。

海水中の懸濁態ATPを測定する場合、一般的にトリス緩衝液が用いられているが、本結果では、いずれのサイズ画分においても、Glycine・Mg-EDTA (GME) 緩衝液を用いた場合が、トリス緩衝液およびリン酸緩衝液と比較し、もっとも高いATP濃度を示した。また、GME緩衝液では、ろ過水量が10mlでも測定可能であり、海水中の懸濁態ATPの抽出効率において、もっとも優れていることが認められた。

さらに、各抽出緩衝液で抽出した後、4℃で保存した懸濁態ATP濃度は、GME緩衝液の場合、7日間保存しても、ほとんど変化が認められなかった。しかし、トリス緩衝液およびリン酸緩衝液では、ATP濃度の低下が著しかった。このように、GME緩衝液は、抽出後のATPの安定性においても、もっとも優れていることが認められた。

これらの結果は、トリス緩衝液およびリン酸緩衝液では、抽出時や測定時、あるいは4℃の保存中において、

緩衝液中のATPが加水分解されていたのに対し、GME緩衝液では、Tobinら¹²⁾が指摘しているように、Mg-EDTAが共存金属イオンの影響を緩和し、ATPが安定になるためと考えられる。

(2) サイズ画分による影響

図-2から図-4に示したように、0.22 μm ~ 1 μm 、0.22 μm ~ 3 μm 、および0.22 μm ~ 10 μm の各画分とも、GME緩衝液を用いることにより、海水中の懸濁態

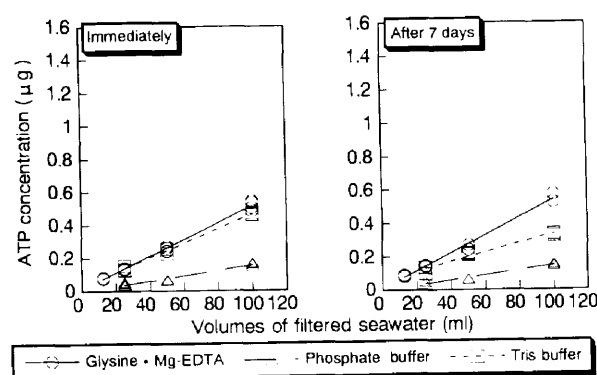


図-2 海水中懸濁態ATPの抽出効率および抽出後の安定性 (懸濁態粒子画分: 0.22 ~ 1 μm)

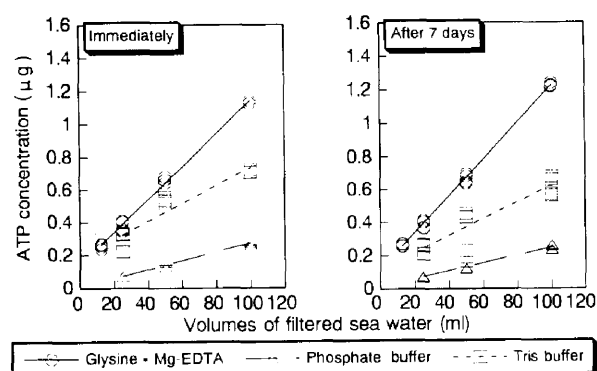


図-3 海水中懸濁態ATPの抽出効率および抽出後の安定性 (懸濁態粒子画分: 0.22 ~ 3 μm)

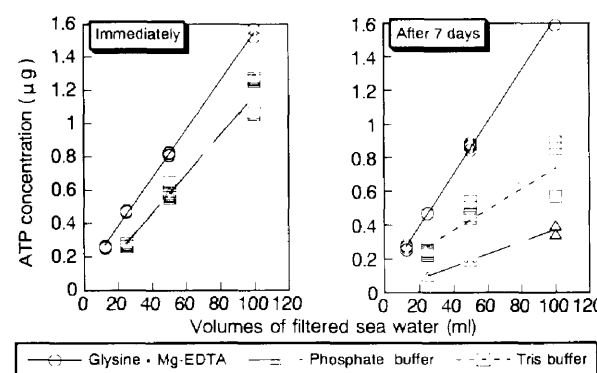


図-4 海水中懸濁態ATPの抽出効率および抽出後の安定性 (懸濁態粒子画分: 0.22 ~ 10 μm)

ATPが効率よく抽出され、かつ安定に測定可能であった。

一般的に、天然での海洋細菌の大きさは、 $1\ \mu\text{m}$ 以下の球状細菌が多く、有機物の少ない低栄養海域では、 $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の球菌も存在するが、大部分のものは $0.22\ \mu\text{m}$ 以上の大きさである。また、実験室で培養した細胞のように径が $1\ \mu\text{m}$ ちかく、長さが $3\sim 4\ \mu\text{m}$ のような桿菌は、きわめて富栄養化の進んだ海域以外ではほとんど存在しないといわれている¹³⁾。すなわち、GME緩衝液を用いる方法が、低栄養海域から富栄養海域まで、幅広い海域の試料に対して、適用できることを示している。

(3) 抽出時間による影響

これまでの抽出方法は、Tobinら¹²⁾の方法に準じて、抽出緩衝液量 $5\ \text{ml}$ 、抽出温度 115°C 、抽出時間5分間で

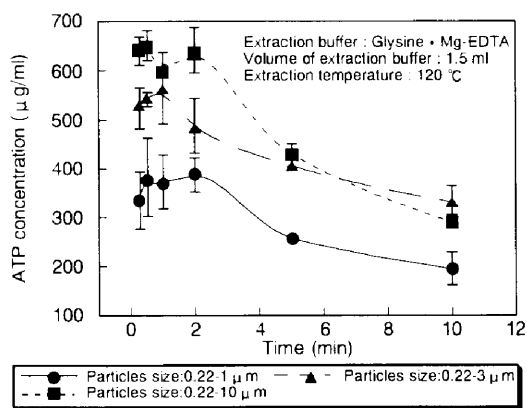


図-5 海水中懸濁態ATPの抽出に及ぼす抽出時間の影響

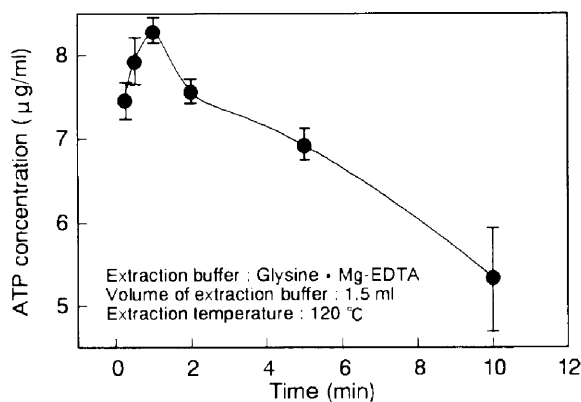


図-6 ATPの回収率に及ぼす抽出時間の影響

表-1 GME-ATP測定法の諸条件

抽出緩衝液	Glycine・Mg-EDTA (Glycine: 10mM, Mg-EDTA: 15mM, pH 10)
抽出緩衝液量	5ml
抽出温度	120℃
抽出時間	1min

行った。次に、より高感度に測定するため、抽出緩衝液量 $1.5\ \text{ml}$ 、抽出温度 120°C に変更し、懸濁態ATPの抽出に及ぼす抽出時間の影響について検討した結果を図-5に示した。

抽出緩衝液量 $1.5\ \text{ml}$ 、抽出温度 120°C に変更した場合は、2分間以上の抽出を行うと、各サイズ画分とも懸濁態ATP濃度が著しく低下することが認められた。

このことは、Levinら¹⁴⁾の活性汚泥からのトリス緩衝液によるATP抽出、および国包ら¹⁵⁾が培養した植物プランクトンのATP抽出について報告している結果とほぼ一致しているが、懸濁態ATP濃度が最大になる抽出時間は、サイズ画分により多少異なっていた。

そこで、最適抽出時間を決定するため、ATP標準溶液を用いて、ATPの回収率に及ぼす抽出時間の影響について検討した結果を図-6に示した。

図に示すとおり、ATPの回収率は、抽出時間が1分間の時、最大の約100%であった。

したがって、抽出緩衝液 $1.5\ \text{ml}$ 、抽出温度 120°C に変更した場合は、抽出時間を1分間にすれば、抽出時の加水分解などの影響をもっとも少なくすることができると考えられた。

以上のことから、従来用いられていた方法よりも、表-1に示した方法(GME-ATP測定法)で、海水中の懸濁態ATPを高感度に測定できることが明らかになった。

§3. 以下の実験には、GME-ATP測定法を用いて検討を行った。

§3. 全菌数測定法との比較

GME-ATP測定法を適用して現場海水中の懸濁態ATP濃度を測定し、細菌の微生物バイオマスの季節変動を把握するとともに、その測定値と直接計数した全菌数との相関について検討を行った。

3-1 材料および方法

(1) 海水試料の採取と前処理

1994年1月から1995年10月までの間に、図-1に示した観測点から表層水を、計6回採取した。採取した天然海水は、§2.と同様にサイズ分画して実験に供した。

(2) 海水中の全菌数の測定

Hobbieら¹⁶⁾の方法に準じて、サイズ分画した海水試料に最終濃度が約2%になるようにグルタルアルデヒド(Wako Co Ltd.)を添加し、試料中の微生物を固定した。その後、その一定量を蛍光色素(DAPI:4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Co.)により染色し、孔径 $0.22\ \mu\text{m}$ のニュクレオアフィルター上にろ過濃縮した。そのフ

フィルターをスライドガラス上に蛍光顕微鏡用エマルジョンオイルを用いて固定して、位相差落射蛍光顕微鏡で観察し、細胞数を計数した。

3-2 結果および考察

GME-ATP測定法を用いて、天然海水中的懸濁態ATP濃度の季節変動を測定した結果を図-7に示した。

天然海水中的懸濁態ATP濃度は、各サイズ画分とも夏季に増加し、秋季にかけて徐々に減少する傾向がみられた。また、冬季は各サイズ画分間の差が小さかったが、夏季には $10\mu\text{m}$ 以下の画分と $1\mu\text{m}$ 以下の画分に大きな差がみられた。この結果は、一般に海水中的細菌量が一次生産の低い冬季に最低となり、春季、一次生産の増加に伴って増加し、夏季、秋季はいずれも比較的高レベルに保たれるが、この間は、より短い時間単位の藻類の変動やその他の要因で変動するといわれている¹³⁾細菌数の季節変動とよく一致している。このように、GME-ATP測定法を用いて、天然海水中的懸濁態ATP濃度の季節変動を測定することが可能であった。

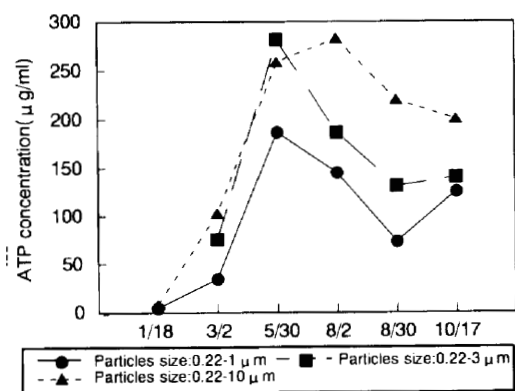


図-7 現場海水中的懸濁態ATP濃度の季節変化

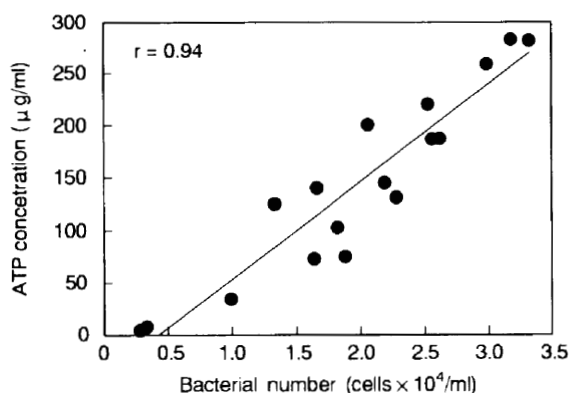


図-8 海水中懸濁態ATP濃度と全菌数との関係

次に、GME-ATP測定法により測定した懸濁態ATP濃度と全菌数との関係について検討した結果を図-8に示した。

各サイズ画分について、懸濁態ATP濃度をY軸に、全菌数をX軸にとりプロットすると、相関係数 $r=0.94$ のよい相関が認められた。

以上のことから、GME-ATP測定法を用いて、天然海水中的懸濁態ATP濃度を測定することにより、現場海水中的細菌の微生物バイオマスを明確に測定できることが明らかとなった。

§ 4. 油濁海水試料への適用

油濁海水中的懸濁態ATP濃度を測定する場合、石油成分が懸濁態ATPの抽出や測定などに影響を及ぼすと考えられる。そこで、それらの影響を調べるため、油濁海水試料を調製し、GME-ATP測定法を適用して検討を行った。

4-1 材料および方法

(1) 油濁海水試料の調製

石油源には、船舶燃料用のC重油を用いた。C重油は主として複雑な各種の炭化水素から構成され、それ以外にアスファルト質、樹脂質などの組成の明確ではない分子量の大きい化合物やイオウ化合物、窒素化合物、金属などを含むものである。

海水は、図-1に示した観測点から採取した表層水を、§2.と同様にサイズ画し、 $10\mu\text{m}$ 以下のものを用いた。その前処理した海水にC重油濃度が1% ($10\text{g}/\ell$) になるように添加し、油濁海水試料を調製した。

(2) 油濁海水中的懸濁態ATP濃度の測定

C重油成分による懸濁態ATPの抽出・測定阻害を調べるため、GME-ATP測定法を用いて、天然海水および油濁海水中的懸濁態ATP濃度を測定した。また、油濁海水中的C重油成分の除去効果を確認する目的で、GME緩衝液にクロロホルムを25、50、75%濃度になるように添加し、GME-ATP測定法と同様の手順で、天然海水および油濁海水中的懸濁態ATP濃度を測定した。さらに、標準添加法によりATP回収率を求めた。

4-2 結果および考察

天然海水およびC重油が1%存在している油濁海水中的懸濁態ATP濃度をGME-ATP測定法で測定した結果と、GME緩衝液にクロロホルム添加した場合の結果を図-9に示した。

GME-ATP測定法で測定した天然海水中的懸濁態ATP濃度は約 $60\mu\text{g}/\text{ml}$ 、回収率約100%であったが、GME

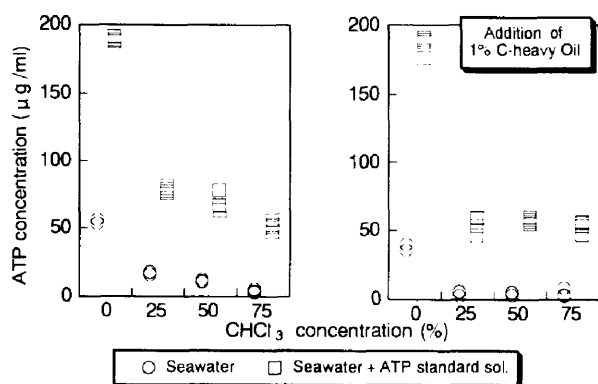


図-9 油濁海水中の懸濁態ATP測定に及ぼすC重油の影響およびクロロホルムの添加効果

緩衝液にクロロホルムを添加すると、いずれの添加濃度においても、懸濁態ATP濃度の測定値は低下した。また、回収率も約30%まで低下し、クロロホルムの阻害的な影響がみられた。

一方、C重油が存在している油濁海水の場合、GME-ATP測定法による測定で、懸濁態ATP濃度が約45 μg/ml、回収率も約90%を示した。このように、油濁海水の場合でも、GME-ATP測定法により、天然海水とほぼ同程度に試料中の懸濁態ATPを測定することが可能であった。しかし、GME緩衝液にC重油除去の目的でクロロホルムを添加すると、油濁海水の場合でも懸濁態ATP濃度および回収率を著しく低下させた。

以上のことから、C重油が1%存在している油濁海水においても、GME-ATP測定法を用いることにより、懸濁態ATP濃度を測定することが可能であり、油濁海水中の微生物バイオマス測定に適用できることが明らかとなった。

§ 5. 油濁海水試料への栄養源の添加実験

GME-ATP測定法を適用して油濁海水試料に栄養源を添加した場合の懸濁態ATP濃度を測定し、微生物バイオマスの変動を把握するとともに、栄養剤を添加した場合の石油分解促進効果について検討を行った。

5-1 材料および方法

(1) 供試材料

海水は、図-1に示した観測点から採取した表層水を、プランクトンネット (xx13:孔径100 μm) でろ過したものを用い、石油源にはC重油を用いた。また、浄化を促進するための栄養源としては、大規模な原油流出事故の際、実際に汚染現場海域に散布され、浄化効果がみられたと報告されている栄養剤 (以下、栄養剤Iとする) を用いた。

(2) 実験区の設定

実験区は、L字型試験管 (30ml 容) に海水10ml を入れたS区、海水10ml にC重油5mgを添加したSO区、海水10ml に栄養剤I 2mlを添加したSI区、および海水10ml にC重油5mgと栄養剤I 2mlを添加したSOI区の4区を設定した。なお、C重油の添加量は、海水中の石油分解菌を分離する際に用いられているNSW培地¹⁾の組成濃度に準じた。

(3) 懸濁態ATP濃度およびC重油濃度の測定

各実験区2系列で20℃、15日間振とう培養した。その間の0、1、3、7、15日目に、海水中的懸濁態ATP濃度およびC重油濃度の測定を行った。

懸濁態ATP濃度の測定は、GME-ATP測定法を用いた。また、C重油濃度の測定は、TLC/FID法¹⁷⁾を改変した方法により、飽和画分 (SA画分)、芳香族画分 (AR画分)、レジニン画分 (RE画分)、およびアスファルテン画分 (AS画分) の4つの画分ごとに行った。

5-2 結果および考察

(1) 微生物バイオマスの変動

各実験区の懸濁態ATP濃度の経日的な測定結果を図-10に示した。

海水のみであるS区の懸濁態ATP濃度は、3日目に約5倍量まで増加し、その後はほぼ一定であった。この変動は、温度と酸素条件を一定にしたため、天然海水中の微生物が海水中的有機物などを利用、増殖し、懸濁態ATP濃度が増加したものと考えられる。

また、C重油を添加したSO区では、1日目に若干増加を示すが、その後はS区よりも低い値で推移した。これは、添加したC重油の細胞毒性などの影響によるものと考えられる。

一方、栄養剤Iを添加したSI区とSOI区では、両区とも懸濁態ATP濃度が1日目に増加、3日目に減少、7日目に再び増加し、その後はほぼ一定に推移した。この変動は、微生物の有機物利用能の差に伴うものと考えられる。すなわち、最初に栄養剤Iの利用しやすい成分を分解・利用する微生物が増殖し、懸濁態ATP濃度が増加するが、すぐに懸濁態ATP濃度が減少するのは、栄養剤やC重油の高濃度有機物の負荷により、海水中的微生物相が一時的に影響を与えられたためと推察される。その後、SI区またはSOI区的环境に適応した微生物が増殖し、再び懸濁態ATP濃度が増加したものと考えられる。

また、3日目にSOI区で、SI区よりも非常に大きく減少したのは、高濃度の有機物の存在やC重油の細胞毒性などの複合的な影響によるものと考えられる。

このように、GME-ATP測定法により、栄養源あるい

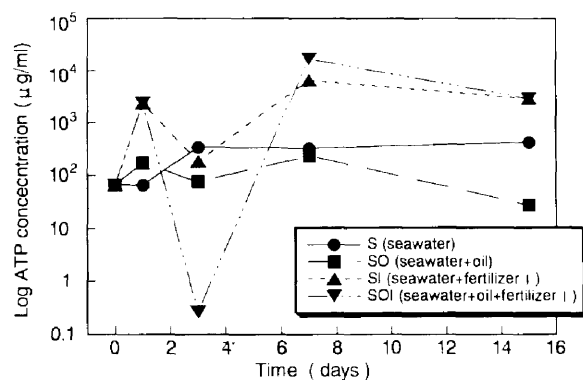


図-10 C重油および栄養剤Iの添加に伴う海水中懸濁態ATP濃度の変動

はC重油を添加した海水中の微生物バイオマスの経目的な変動をモニタリングすることが可能であった。

(2) 栄養剤IのC重油分解促進効果

SO区およびSOI区の海水中のC重油濃度について、SA画分、AR画分、RE画分、およびAS画分の各画分ごとに測定した結果を図-11に示した。

SO区は実験期間15日間では、C重油全重量でほとんど減少がみられなかったが、C重油成分のAR画分が約5%減少し、RE画分が若干増加する傾向が認められた。

一方、SOI区は、全重量で約10%の減少を示した。C重油成分では、SA画分とAR画分がそれぞれ約5%、約10%減少し、AS画分とRE画分が若干増加する傾向が認められた。SOI区はC重油の分解を促進するために栄養剤Iを添加した実験区であるが、C重油全重量で約10%の減少のみであり、著しい効果は認められなかった。

栄養剤Iの他にも、多種の浄化促進栄養剤が開発されているが、現場微生物生態系の相違や環境要因により浄化促進効果が大きく影響されるなどの問題があるといわれている。

今回、実際に油濁海域に散布され効果がみられたと報告されている栄養剤Iが本実験結果では、あまり大きなC重油の浄化促進効果を示さなかったことは、こうした理由によるためと考えられる。

しかし、多くの研究者により、石油分解細菌はほとんどの海域に普遍的に分布していると報告され、また天然海水中の微生物相は、採取場所や時期によって変動するため、種々の海水試料を用いて試験するとともに、実験期間などの各種条件を検討することにより、さらに良い結果が得られることも十分に考えられる。

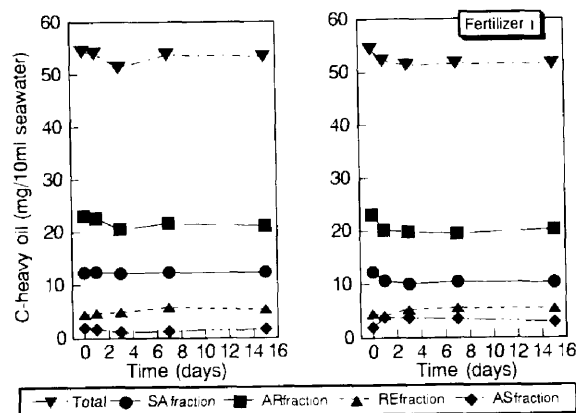


図-11 C重油の分解性に及ぼす栄養剤Iの影響

§ 6. まとめ

油濁海水中の微生物バイオマス評価手法として、ATP測定法に着目し、ATPの抽出方法の検討、天然海水および油濁海水試料への適用、さらに油濁海水試料への栄養源の添加実験などの検討を行い、次の結果を得た。

(1) GME緩衝液は、海水中のATP測定法で従来用いられていたトリス緩衝液やリン酸緩衝液よりも抽出効率および抽出後の安定性において優れていた。

また、抽出緩衝液量1.5ml、抽出時間1分間に変更することにより、従来用いられていた測定方法よりも海水中の懸濁態ATPが、高感度に測定できることを明らかにした。

(2) GME-ATP測定法により、海水中の各サイズ画分において、懸濁態ATP濃度の季節的な変化を測定することが可能であった。

また、その懸濁態ATP濃度と直接計数した全菌数がよい相関を示すことから、GME-ATP測定法を用いて、天然海水中の微生物バイオマスが明確に測定できることを明らかにした。

(3) C重油が1%存在している油濁海水においても、GME-ATP測定法により微生物バイオマスを測定することが可能であった。

(4) 油濁海水試料に栄養剤Iを添加した実験において、GME-ATP測定法を適用して海水中の懸濁態ATP濃度の変化をモニタリングすることが可能であった。

以上より、GME-ATP測定法が、油濁海水中の微生物バイオマスの評価手法として、実際に有効であることを明らかにした。

§ 7. おわりに

海洋油濁浄化のみならず、環境中の難分解性有機化合物をバイオレメディエーションにより浄化する試みが実際に行われるようになってきている。しかし、実際にバイオレメディエーションを行う場合、現場環境中の微生物生態系を把握し、コントロールする必要があるが、それを行うための技術はまだ確立されていない。そのため、微生物生態系をブラックボックスとして考えるしかないのが現状である。

今回、筆者らは、GME-ATP測定法により、天然海水や油濁海水中の微生物バイオマスの変動を定量的に把握することが可能であり、実際にバイオレメディエーションを行う場合の微生物生態系解析技術の一つとして有効であることを明らかにした。

今後は、石油分解菌の特異的な抗原や遺伝子を用いて微生物群集中の特定石油分解菌を検出、識別し、定量する方法、また微生物群集をDNAの電気泳動フラグメントパターンで評価し、浄化に関する微生物相の遷移をDNAフラグメントパターンの変化で解析する方法などを検討し、海洋油濁浄化に係わる微生物生態系をより明確に解析する技術を確立する予定である。

参考文献

- 1) 環境庁編：環境白書（総論）平成7年版、水環境の現状、大蔵省印刷局、pp.351-367、1995。
- 2) 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所：平成6年度環境保全研究成果集（Ⅱ）、pp.45-Ⅱ-1～45-Ⅱ-6、1995。
- 3) R.Z.Hoff: Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup, Marine Pollution Bulletin, Vol.26, No.9, pp.476-481, 1993。
- 4) 東原孝規：海洋の油濁と炭化水素分解細菌、微生物工学技術ハンドブック（鈴木智雄監修）、朝倉書店、pp.287-338、1990。
- 5) J.G.Leahy and R.R.Colwell: Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, Microbiol. Rev., Vol.54, pp.305-315, 1990。
- 6) R.M.Atlas and R.Bartha: Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation, Advances in Microbial Ecology, Vol.12 (edited by K.C.Marshall, Plenum Press, New York), pp.287-338, 1992。
- 7) 木暮一啓：微生物の一般的計数法および計量法、海洋微生物研究法（内田元、多賀信夫編）、学会出版センター、pp.33-40、1966。
- 8) 日本海洋学会編：沿岸環境調査マニュアルⅡ（水質・微生物編）、恒星社厚生閣、pp.80-111、pp.269-304、1990。
- 9) O.Holm-Hansen and C.R.Booth: The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance, Limnol. Oceanogr., Vol.11, pp.510-519, 1966。
- 10) R.E.Hadson, O.Holm-Hansen and F.Azam: Improved methodology for ATP determination in marine environments, Mar. Bio., Vol.34, pp.143-149, 1967。
- 11) J.A.Novitsky: Microbial growth rates and biomass production in marine sediment: evidence for a very active but mostly non growing community, Appl. Environ. Microbiol., Vol.53, No.10, pp.2368-2372, 1987。
- 12) R.S.Tobin, J.F.Ryan and B.K.Afghan: An improved method for the determination of adenosine triphosphate in environmental samples, Water Research, Vol.12, pp.783-792, 1978。
- 13) 木暮一啓：生態系の中の微生物、微生物生態学Ⅱ（清水潮編）、共立出版、pp.13-90、1985。
- 14) G.V.Levin, J.R.Schrot and W.C.Hess: Methodology for application of adenosine triphosphate determination in waste water treatment, Env. Sci. and Technol., Vol.9, pp.961-965, 1975。
- 15) 国包章一ら：植物プランクトンのATPの測定法に関する検討、水質汚濁研究、Vol.4, No.5, pp.237-242, 1981。
- 16) J.E.Hobbie, R.J.Daley and S.Jasper: Use of nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy, Appl. Environ. Microbiol., Vol.33, pp.1225-1228, 1977。
- 17) M.Goto et al.: TLC/FID method for evaluation of crude-oil-degrading capability of marine microorganisms, J. Mar. Biotechnol., Vol.2, pp.45-50, 1995。