

海洋流出油のバイオレメディエーション小規模現場試験

Pilot-scale Field Bioremediation Tests for Oil Spill at Coastlines in Japan

牧 秀明^{1*}, 木幡 邦男², 内山 裕夫³, 渡辺 正孝⁴, 濱田 誠一⁵
HIDEAKI MAKI, KUNIO KOHATA, HIROO UCHIYAMA, MASATAKA WATANABE and SEIICHI HAMADA

¹ 独立行政法人国立環境研究所地域環境研究センター 〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

² 埼玉県環境科学国際センター 〒347-0115 埼玉県加須市上種足 914

³ 筑波大学生命環境科学研究科 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

⁴ 慶應義塾大学政策・メディア研究科 〒252-0882 神奈川県藤沢市遠藤 5322

⁵ 独立行政法人海上災害防止センター 〒220-8401 神奈川県横浜市西区みなとみらい 3-3-1

* TEL: 029-850-2394 FAX: 029-850-2569

* E-mail: hidemaki@nies.go.jp

¹ National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

² Center for Environmental Science in Saitama, 914 Kamitanadare, Kazo, Saitama 347-0115, Japan

³ Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

⁴ Keio University, Shonan Fujisawa Campus, 5322 Endo, Fujisawa, Kanagawa 252-0882, Japan

⁵ Maritime Disaster Prevention Center, 3-3-1 Minatomirai, Nishiku, Yokohama, Kanagawa 220-8401, Japan

キーワード: バイオレメディエーション, バイオスティミュレーション, 流出油, 現場実験, 微生物群集構造

Key words: bioremediation, biostimulation, oil spill, field experiment, microbial population

(原稿受付 2011年10月29日/原稿受理 2011年11月9日)

1. はじめに

2011年3月11日に発生した東日本大震災では、東北地方の太平洋沿岸部を襲った津波が壊滅的な被害を与えたが、臨海部に設置されていた漁船用の燃料油タンク、石油コンビナート、火力発電所も甚大な被害を受け¹⁾、石油・重油の流出や炎上という二次災害を引き起こした。

海外では2010年4月にメキシコ湾で海底油田採掘基地が爆発炎上し、海底から暴噴した莫大な量の原油が漏れ、その量は78万キロリットルにも達したとされている²⁾。さらに同じ年7月に中国は大連の石油パイプライン爆発事故が起り、9万トン近くの原油が流出したとされている³⁾。また2011年11月には、ブラジルのリオデジャネイロ沖の海底油田から2,400バレルの原油が流出する事故が発生した。

世界的にみてタンカーによる流出油事故は着実に減少しつつあるが⁴⁾、上記のように海底油田や臨海部の石油関連施設による流出油事故が顕在化している。

流出油で汚染された海岸の浄化法としては、汲み取りや拭き取り、汚染箇所の直接掘削、または高圧熱水洗浄等による物理・化学的回収方法が主要な手段であり、短時間の内に大きな浄化効果が期待出来る。しかし、人力による方法では多大の労力が必要であり作業上の危険が

伴うこと、物理・化学的浄化方法では沿岸生態系に与える影響が大きい場合があることや、使用する資器材や運用費用がかさむという問題がある。

流出油が海岸に漂着した場合の浄化法の一つとしてバイオレメディエーションが挙げられ、1989年に米国アラスカ州でエクソン・ヴァルディーズ号タンカーから大量の原油が流出した際に大規模に実施されたが⁵⁾、流出油事故が非常に少ない我が国沿岸部では未だに本格的には実用化されていないのが現状である。

海洋流出油のバイオレメディエーションにおいては、油分解微生物を培養・調製したものを外部から汚染現場に散布するバイオオーグメンテーションではなく、元来、汚染現場に存在する石油分解微生物が炭化水素の分解を行う際に、濃度が低いために制限(律速)因子となっている窒素・リン等の栄養塩を外部から付与することにより、原油の分解を促進させるバイオスティミュレーションを主に採用しているが、その効果については室内実験ではほぼ一貫して認められているものの⁶⁾、開放系である野外実現場においては一様ではないことがこれまで報告されている⁷⁾。

我々はこれまで、1997年に起こったナホトカ号タンカー事故により流出した重油が漂着した日本海沿岸部(兵庫県北部)と、太平洋側ではしばしば廃油タールボールが漂着している種子島沿岸部においては中東産原

油を用いた小規模のバイオレメディエーション現場実験を実施してきた⁸⁻¹¹⁾。さらに北海道オホーツク沿岸では、現在、油田開発と採掘が盛んになりつつあるサハリン島沖海底油田産原油を用いた寒冷域での現場実験も行ってきた^{12,13)}。

以上のように、実験現場の海水温・地温、波浪、栄養塩濃度、礫や砂等の構成要素のみならず、実験に供試した原油の種類も様々であり、それぞれの現場と原油の特性固有の知見を得ることが出来たので本稿で紹介したい。

2. 日本海と太平洋沿岸域における中東産原油を用いたバイオレメディエーション現場試験

日本海側では、兵庫県香住町の佐古谷海岸部（図1. 以下、香住町海岸部という）にて現場試験を行った。潮汐差は小さく0.1 m程度である。この海岸には1997年1月に発生したナホトカ号事故に由来する流出重油が漂着し、一時はかなりの量の漂着重油が見られた。試験は2000年度の6～9月⁸⁾と、2001年度の5～10月⁹⁾にかけて実施した。

太平洋側では、鹿児島県種子島の東海岸部（図1. 西之表市立山地区舞床浜。以下、種子島東海岸部という）にて現場試験を行った^{10,11)}。ここには、起源は不明ながら大小さまざまな廃油ボールが間欠的に打ち上げられ、潮汐差は約1.3 mと日本海側に比べて非常に大きくなっている。試験は2001年度の11～2月にかけて行った。

供試原油としては、我が国が中東より大量に輸入しているアラビアンライト原油をバットに入れて室温で3日間ゆっくり往復振とう・攪拌して揮発性成分を留去し、重量が約20%減少したものと、試験現場の海砂（湿潤のまま）と混合したものを使用した。これを、原油の外部への漏出を最小限にとどめるために、孔径70 μmのテフロン製網により作製した小袋に一袋当たり約10～25 g 充填した（図2左）。海砂に含まれる原油含量は約

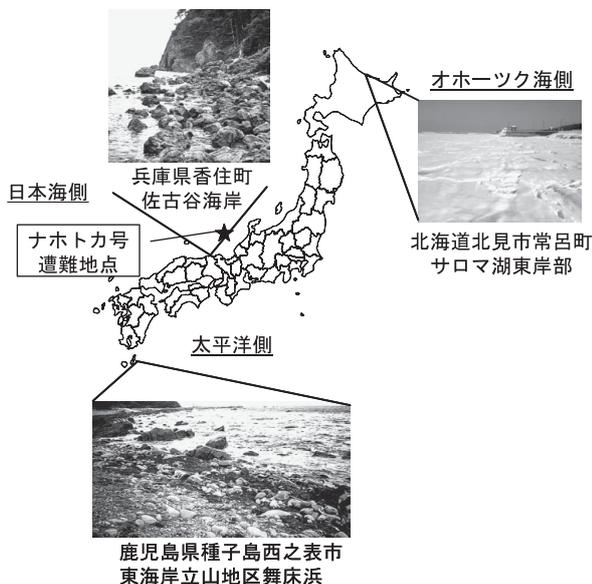


図1. 小規模原油バイオレメディエーション現場試験実施地点

1.8～2.3%（重量比）であった。

栄養塩付与のために、農業用に市販されている汎用型の緩効（徐放）性合成窒素肥料であるイソブチリデン二尿素（架橋型尿素，商品名：スーパー IB，三菱化学製）を主として用い、香住町海岸部における現場試験（2001年）では窒素形態による原油分解促進効果を評価するために別途、表2に示すように合成樹脂被覆型硝酸アンモニア（硝安コート）、硫酸アンモニア（硫安コート）、尿素肥料（LPコート：以上、チッソ旭肥料製）を窒素源として用いた。リン源としては、リン酸マグネシウム・カルシウムの顆粒（リンスター 30，三菱化学製）を使用した。

前述の原油混合海砂を調製した時と同様に、これらを一定量ポリエステル製の網袋に充填し、原油混合海砂入り網袋と共に以下に述べる試験装置内に設えた。対照として肥料を添加しない試験区を設けた。なお肥料の添加は試験開始時のみに行い、試験期間中途での追加施肥は行わなかった。2000年に香住町海岸部で行った現場試験では、表1のように肥料量を三段階に変えて添加した。

試験装置は二種類のものを用いた。香住町海岸部では、側面に多数の小孔を有する円筒型のアクリル容器（図2右）を使用し、内部に原油混合海砂の入ったテフロン製網を複数個入れたアクリル容器三個を一組としてプラスチック製の網籠に固定し、現場海岸部で波が緩衝されている礫・岩礁帯の浅場に設置した（図3）。種子島東海岸部においては、網目1 cmのステンレス製網からなる40 cm × 40 cm × 10 cmの角形の網籠（図4）を使用し、これに原油混合海砂充填テフロン製網を適当数入れ、内部の隙間を現場付近の小石、礫、砂利で埋め合わせ、汀線に沿って約2 m間隔で、一日二回冠水と干出

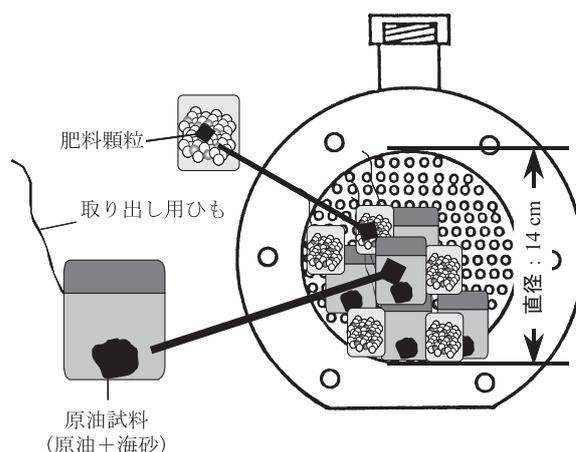


図2. 現場試験供試原油試料と香住町海岸部において使用した実験用アクリル容器

表1. 2000年香住町海岸部における現場試験に添加した肥料量

試験区	窒素肥料	リン肥料
①	非添加	非添加
②	1 g (窒素換算 0.32 g)	0.2 g (リン換算 0.07 g)
③	3 g (窒素換算 1 g)	0.6 g (リン換算 0.21 g)
④	15 g (窒素換算 5.3 g)	3 g (リン換算 1 g)

を繰り返すような位置に埋設した(図5)。なお、肥料添加試験区、非添加(対照)試験区共に、重複検体数 $n=3 \sim 6$ となるように原油混合海砂入り網袋と試験装置を設置した。

肥料は表3のように添加量を二段階(②少量施肥, ③大量施肥)に分けて、原油混合海砂の入ったテフロン製網に入れた。

以上、設置したアクリル容器、ステンレス籠それぞれから、試験期間中約2~3週間毎に、原油混合海砂入り網袋を適当数取り出し、残存原油分の分析を行った。

残存原油分は、前述のように経時的に試験現場より採取した原油を含んだ海砂試料を風乾させたものからジクロロメタンで抽出を行い、孔径 $0.45 \mu\text{m}$ の PTFE フィルターにてろ過し、溶媒を留去させた後に全抽出物を秤

表2. 2001年香住町海岸部における現場試験に添加した窒素肥料内訳

試験区	窒素肥料の種類	アクリル容器1個当たりの添加量 * 窒素換算 42 g
①	無添加	—
②	被覆型硝酸(硝酸アンモニア)	*152 g
③	被覆型硫安(硫酸アンモニア)	*224 g
④	被覆型尿素	*96 g
⑤	架橋型 (IBDU)	*120 g

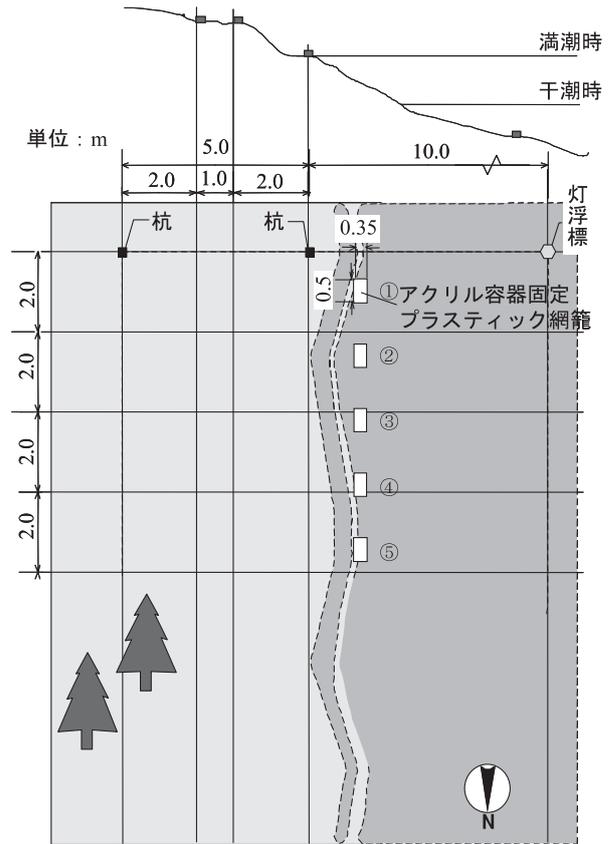


図3. 香住町海岸部における試験装置設置模式図
試験区の番号については表1, 2を参照

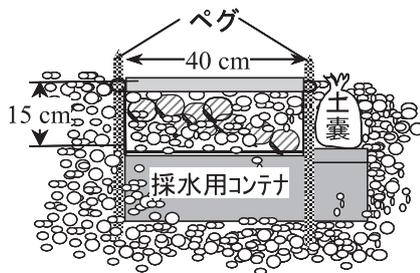


図4. 種子島東岸部とサロマ湖岸東岸部における試験現場に埋設したステンレス網籠

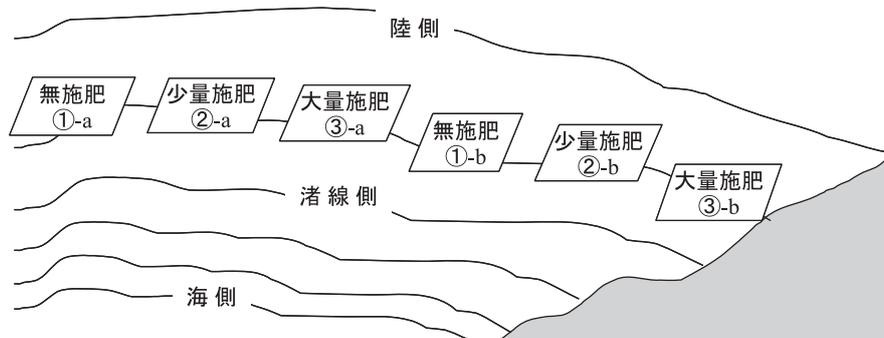


図5. 種子島東海岸部試験現場におけるステンレス製網籠の配置模式図
①は肥料非添加(対照)試験区, ②, ③は肥料添加試験区(詳細は表3を参照)
図中 a, b は同一肥料条件の重複した網籠を表す。

量した。次に原油中に含まれる半揮発性の脂肪族、芳香族それぞれの炭化水素化合物を質量分析器付きガスクロマトグラフ (GC-MS) を用いて選択イオンモードにて分析した。アルカン類については炭素数 13 ~ 35 の直鎖型のもの他に、分岐型のプリスタンとフィタン、芳香族炭化水素ではナフタレン (置換アルキル基炭素数 0 ~ 4)、フルオレン (0 ~ 2)、ジベンゾチオフェン (0 ~ 3)、フェナンスレン (0 ~ 3) のアルキル基非置換体と原油に含まれる特徴的な一連のアルキル基置換体について定性・定量を行った。

各成分の残存率は、供試原油に含まれる化合物の中で微生物による分解をほとんど受けないことから使われるホパンとの相対比から計算した¹⁴⁾。

海砂からの原油分の物理的除去、実質上の微生物分解の寄与率は以下のように見積もった。すなわち、海砂中の残存原油含量は、抽出・乾固した原油分の重量を抽出後の海砂の乾燥重量で割って求め、試験初期 (分解前) と任意時間経過後 (分解後) の比より海砂からの原油分の総除去率を算定した。実質上の原油の微生物分解率は、前述のホパンの残存原油分中の含量濃度の濃縮率の

逆数として求めた。GC-MS にてホパンを分析する際には、上記の抽出・乾固した原油塊を溶媒に定溶した試料を供しているため、原油分の分解に伴い、ホパンの濃度がどのくらい増加するのかを把握することが出来る。従って、分解前と分解後の原油塊中のホパン濃度の比を算定し、その逆数から微生物分解率を求めることが可能である。

2.1. 個々の炭化水素化合物の分解

図 6 に種子島東海岸部における原油分解の過程を GC-MS のクロマトグラムにて示した。クロマトグラム中に規則的に並んで見られるピークは、炭素数 13 ~ 35 程度の直鎖アルカンであり、肥料添加試験区では、これらのピークが試験開始後約 3 週間で速やかに消失されたのに対して、肥料非添加 (対照) 試験区ではまだかなり残存していることが判る。

各炭化水素類の分解の経日変化を図 7 (香住町海岸部) および 8 (種子島東岸部) に示した。上記 GC-MS のクロマトグラムでも示した種子島東海岸部においては肥料添加試験区で速やかな分解が見られるが、香住町海岸部では試験開始後 94 日後でも約半分近くのアルカン類が残存しており、肥料添加試験区では非添加 (対照) 試験区と比較して初期段階では分解促進効果がみられたが、結果的に分解程度の差異は小さかった。しかし、芳香族化合物の中でも易分解性であるナフタレン類に関しては、香住町海岸部でも肥料添加による分解促進効果は大きかった。香住町海岸部と種子島東海岸部では前述のように試験区の設置方法や使用器材が異なり、必ずしも厳

表 3. 2000 年種子島東海岸部における現場試験に添加した肥料量

試験区	窒素肥料 (IBDU)	リン肥料 (リンスター)
①	無添加	無添加
②	2 g (窒素換算 0.64 g)	0.2 g (リン換算 0.07 g)
③	20 g (窒素換算 6.4 g)	2 g (リン換算 0.7 g)

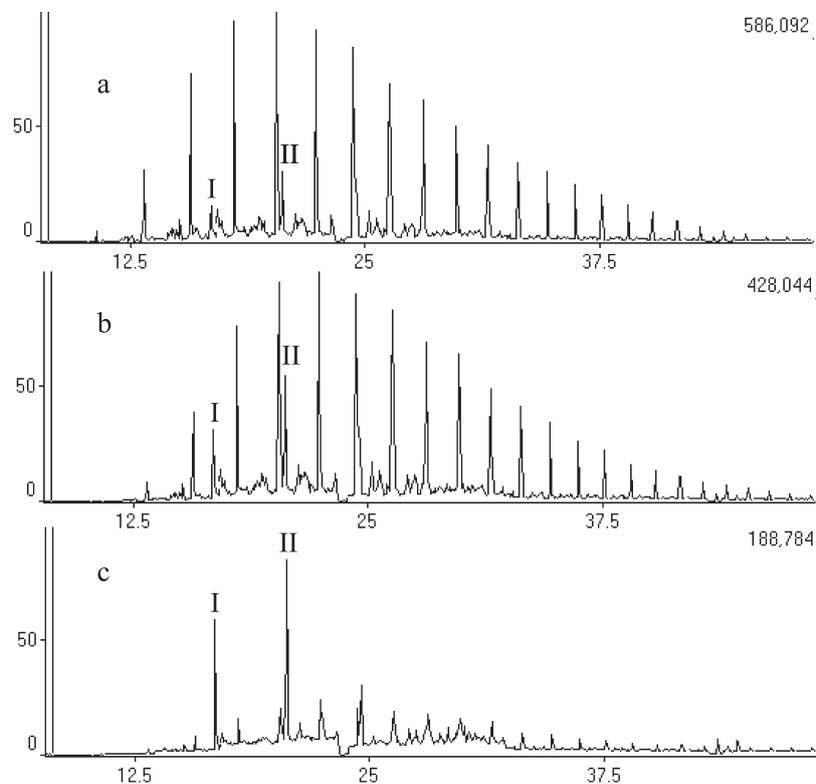


図 6. 種子島東海岸部での現場試験における原油分解過程を GC-MS クロマトグラムにて示したもの。a が試験初期 (0 日目), b, c が試験開始後 22 日目, b: 肥料非添加 (対照) 試験区, c: 肥料添加試験区
クロマトグラム中のピーク I と II は内部標準物質

密な比較は出来ないが、現場により原油中の炭化水素化合物の分解活性・様式が異なることが示され、潮汐や波浪による海水の動きや、土着の分解微生物の相違が大きく影響をおよぼすことが考えられた。因みに海水温（平均）は、香住町海岸部では2000年度が26°C、2001年度が24.4°C、種子島東海岸部では19.2°Cと、実施時期を反映して香住町海岸部の方がかなり高かった。また、原油中に含まれる他の芳香族炭化水素化合物についても分解がみられ、ナフタレン類の次にはフルオレン類が速く消失し、ジベンゾチオフェン類、フェナンスレン類の

順で分解性が低くなっていた。最終的な分解率は、アルカン類で37～76%（香住町海岸部）、85～95%（種子島東海岸部）、ナフタレン類で36～94%（香住町海岸部）、93～98%（種子島東海岸部）、フルオレン類で35～98%（香住町海岸部）、83～95%（種子島東海岸部）、ジベンゾチオフェン類で30～78%（香住町海岸部）、59～92%（種子島東海岸部）、フェナンスレン類で35～78%（香住町海岸部）、66～92%（種子島東海岸部）であった。

肥料添加量が及ぼす影響を香住町海岸部における2000年に実施した現場試験において評価したところ、図9に示す通りアクリル容器内部海水中の栄養塩濃度は、試験開始時に添加した肥料初量に応じた増加が見られた。試験開始後1週間目では肥料を添加した試験区において高い栄養塩濃度が持続されていたが、その後は非添加（対照）試験区の濃度との差が小さくなった。

実験に供した原油海砂混合物に付着している土着菌数も肥料添加量に応じて多くなっており、肥料添加量の大小にかかわらず、非添加（対照）試験区に比べてほぼ一桁高い菌数が試験期間中維持されていた（図10）。肥料添加量が最大の試験区（試験区④）では、菌数も最大となっていた。

原油中に含まれる各化合物の初期段階における分解についても、添加肥料量の増加に伴い分解速度が向上する効果が認められた（図7）。ただし、最終分解率は肥料添加試験区、非添加（対照）試験区ともに、ほぼ同様の値となった。

また異なった形態の窒素肥料添加による原油中の炭化水素分解促進効果について香住町海岸部で2001年に行った現場試験において検討したところ、アルカン類の分解については肥料非添加（対照）試験区との明瞭な差は無かったが、ナフタレン類、フルオレン類、ジベンゾチオフェン類、フェナンスレン類といった芳香族化合物については、実験終了時に肥料非添加（対照）試験区ではどの化合物も50%以上が残存していたのに対し、硝

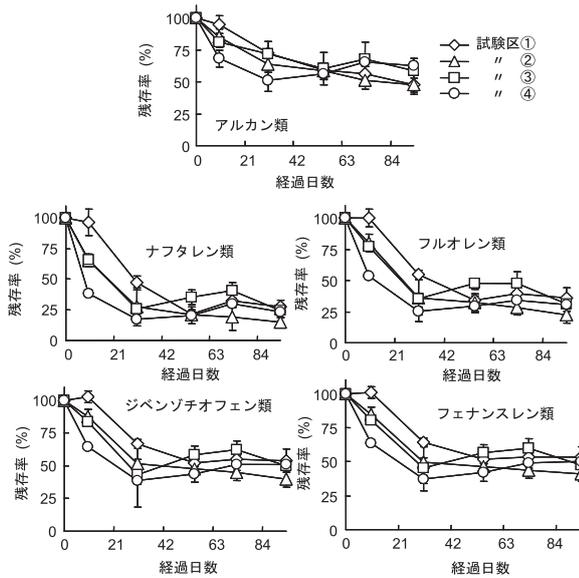


図7. 2000年香住町海岸部現場試験における原油中の炭化水素類の分解
①は肥料非添加（対照）試験区、②～④は肥料添加試験区（詳細は表1を参照）

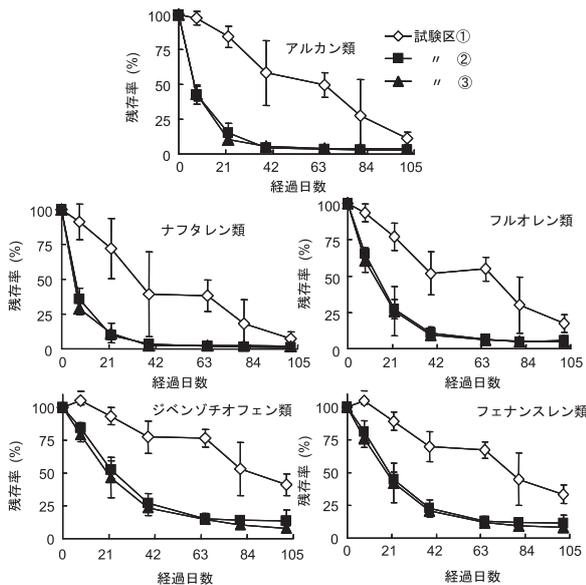


図8. 種子島東海岸部現場試験における原油中の炭化水素類の分解
①は肥料非添加（対照）試験区、②、③は肥料添加試験区（詳細は表3を参照）

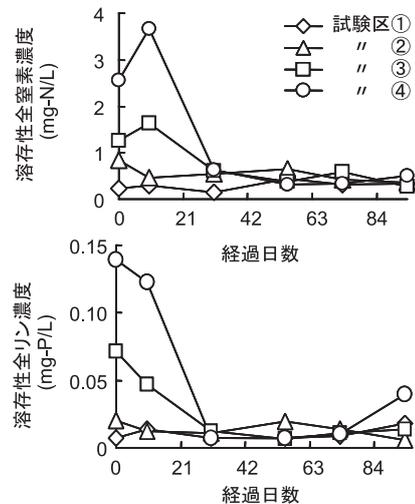


図9. 2000年香住町海岸部における現場試験に用いたアクリル容器内の栄養塩濃度の経時変化
①は肥料非添加（対照）試験区、②～④は肥料添加試験区肥料添加については表1を参照

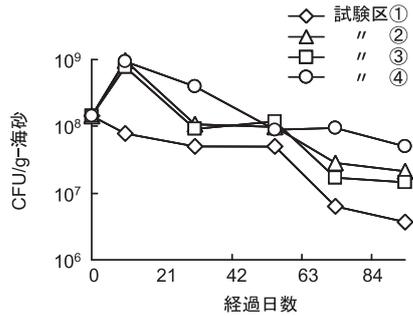


図 10. 2000 年香住町海岸部現場試験における原油混合海砂付着菌数の経時変化 (フィルター浸潤原油の揮発蒸気を曝した無機海水平板培地による培養法による)。
①は肥料非添加 (対照) 試験区, ②~④は肥料添加試験区
肥料添加については表 1 を参照

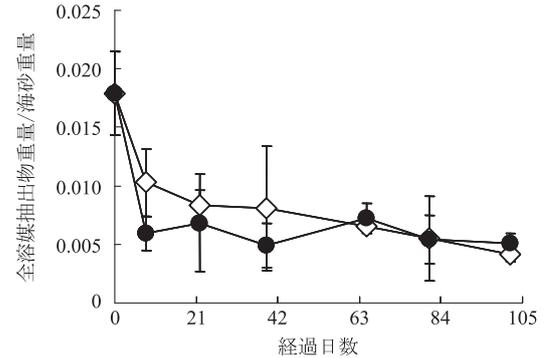


図 12. 種子島東海岸部での現場試験における原油混合海砂中に含まれる原油含量の変化。◇肥料非添加 (対照) 試験区, ●肥料添加試験区

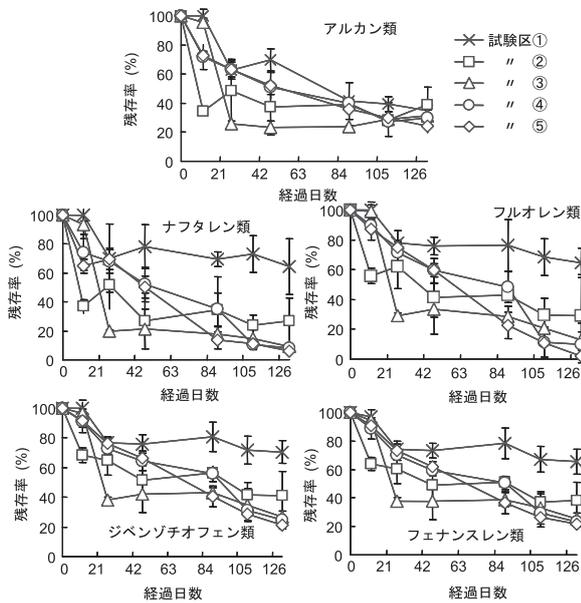


図 11. 2001 年香住町海岸部現場試験における異なる窒素形態の肥料添加による原油中の炭化水素類の微生物分解促進効果の比較
①は肥料非添加 (対照) 試験区, ②~⑤は肥料添加試験区
添加肥料については表 2 を参照

酸アンモニア添加試験区 (試験区②) 以外の肥料添加試験区では 70~90% の分解が見られた (図 11)。無機態窒素肥料である硝酸アンモニア (試験区②), 硫酸アンモニア (試験区③) 添加試験区では, 試験開始 3 週間までの初期には, 各原油成分の分解促進効果が, 他の有機態窒素肥料添加試験区 (④, ⑤) よりも顕著であった。しかし試験中~後期においては, 硝酸アンモニア添加試験区での原油成分分解促進効果は鈍化し, 他はみな同程度だった。

2.2. 原油除去の収支

図 12 に種子島東海岸部における試験に供した原油混合海砂中の原油含有量の経日変化を示した。図 8 に示した個々の炭化水素化合物の分解と同様に, 試験開始後 50 日目くらいまでには肥料添加試験区において原油含有量の減少の割合が大きくなっている。最終的な原油

含有量の残存率 (総除去率) は, 肥料添加試験区で 28% (72%), 非添加 (対照) 試験区で 23% (77%) であった。除去された分の内, 微生物分解が占める割合をホバン濃度の濃縮率の逆数から見積もったところ, 試験開始後 39 日目の時点では, 肥料添加試験区で 33%, 非添加 (対照) 試験区で 0%, 102 日目では, 肥料添加・非添加 (対照) 試験区共に 26% であった。これより, 大凡の海砂中の原油分の収支を見積もると, 残存が約 25%, 物理的除去が 45%, そして実質上の微生物分解が 30% と算定された (図 13)。

この原油の微生物分解, 物理的除去, そして残存の収支に添加肥料の窒素形態がおよぼす影響を評価したところ, 実質上の微生物による生分解の寄与率が, 硝酸アンモニア添加試験区ではほぼ 0%, 硫酸アンモニア添加試験区, および尿素と架橋型尿素添加試験区で約 10~20% となっており, 硝酸を含んでいるものでは原油の生分解, 物理的除去共に効果は低く, 逆に尿素のように, 有機態窒素の方が効果が大きいことが示された (図 14)。

肥料を添加した試験区のすべてについて, 剥離による物理的な除去が 4~6 割程度と大きな割合を占めていたが, これはバイオレメディエーションの作用の一つとして, 微生物による実質的な炭化水素の分解の活性化に加えて, バイオサーファクタント生産に伴う汚染担体 (海砂) からの原油分の剥離促進作用が大きいと推測された。

3. 微生物 (細菌) 群集構造の変化

近年, ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅した細菌の持つ 16S rDNA を対象としたクローンライブラリ法や変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法が, 微生物の群集構造の解析によく用いられるようになった。これらの手法により, 小規模バイオレメディエーション試験を行った香住町海岸部現場の土着細菌相に原油分解促進のために添加した肥料 (栄養塩付与) のおよぼした影響や, 原油中の炭化水素の分解進行度合との関係を調べた。

方法としては, 肥料添加を行った現場試験区周辺の間隙水, もしくは現場試験に供試した原油混合海砂から混合細菌群の全 DNA を抽出し, それを鋳型にして 16S rDNA の一部領域を PCR で増幅したものをクローンラ

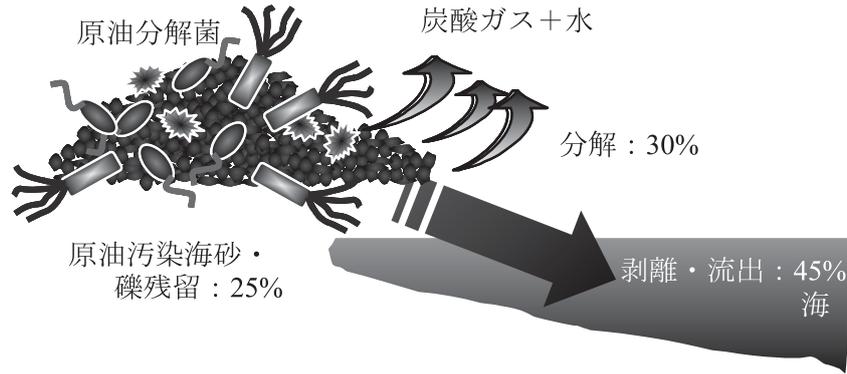


図 13. 原油被汚染担体（海砂・礫）からの原油分の剥離・分解量の取支
種子島東海岸部における現場試験結果（肥料添加試験区における試験終了時）から算定したもの。

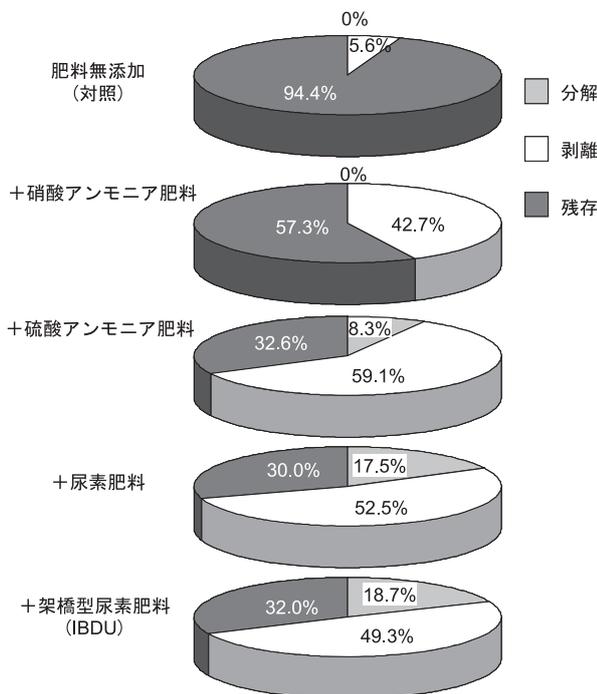


図 14. 原油油除去の物質収支と実質上の生分解の寄与、および異なる窒素形態の肥料添加の効果の比較（2001年香住町海岸部現場試験における結果に基づく）

イブライ解析と DGGE に供試した。クローンライブラリ解析では、得られたクローンの塩基配列を決定し、ライブラリに含まれている細菌相の門、または亜門を同定し、その構成比（組成）を調べた。DGGE では分離・検出された DNA バンドの濃淡をデンストメーターで測定し、同じ泳動距離を有する DNA バンドの濃淡を定量化したデータを各同一試験区毎に主成分分析により解析した。

3.1. クローンライブラリ解析によるバイオレメディエーション実施が土着細菌相に与える影響とその回復の評価¹⁵⁾

図 15 に示すように現場試験途中では、肥料を添加した試験区の内、約 90% が γ -プロテオバクテリア網で占められていたのに対し、肥料非添加（対照）試験区においては γ -プロテオバクテリア網が半分程

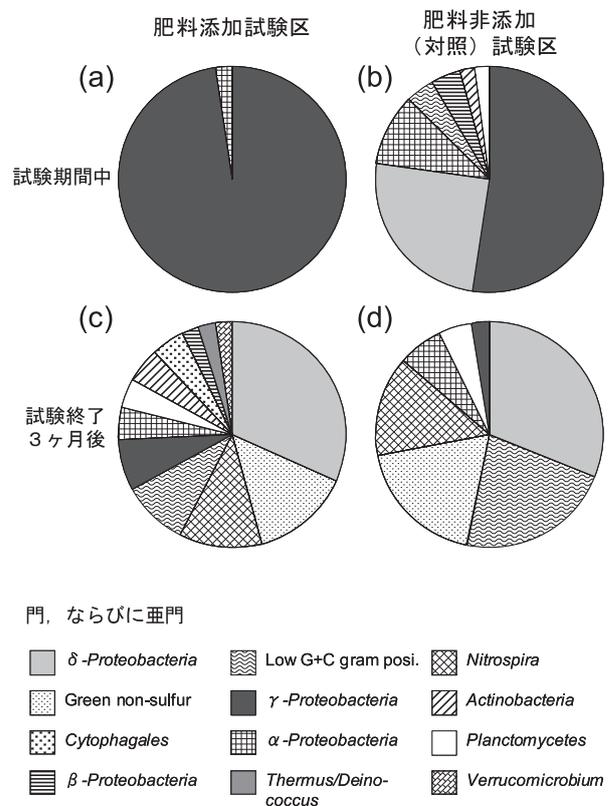


図 15. 現場試験における肥料添加試験区 (a)、および肥料非添加（対照）試験区 (b)、試験終了後 3 か月が経過した肥料添加試験区 (c)、および肥料非添加（対照）試験区 (d) の細菌相を 16S rDNA クローンライブラリーを門レベルで解析し、その組成を示したもの。解析クローン総数は、(a) 46、(b) 48、(c) 43、(d) 42 である。

度を占め、4 分の 1 が δ -プロテオバクテリア網、残りが α -プロテオバクテリア網や β -プロテオバクテリア網や放線菌となり、肥料添加試験区より多様な細菌相が保たれていた。なお肥料添加試験区の内全クローンの大部分を占めていた γ -プロテオバクテリア網で種レベルまで同定したところ、*Pseudomonas putida* の近縁種であることがわかった。現場試験を終了して原油試料を撤去し肥料添加の影響が無くなってから 3 ヶ月後には、肥料添加試験区と非添加（対照）試験区共に最早 γ -プロテオバクテリア網は優占しておらず、代わりに低 G+C グラム陽

性菌や緑色非硫黄細菌、亜硝酸酸化細菌である *Nitrospira* 属等が増大し、多様性が増していた。さらに肥料を添加していた試験区の細菌相の 16S rDNA のクローンの組成が肥料非添加（対照）試験区のそれと相似するようになり、肥料添加による栄養塩付与が土着の微生物細菌群集構造におよぼしていた影響が消失していたことが示された。

原油混合海砂から抽出した混合細菌群の全 DNA を鋳型として PCR で増幅された 16S rDNA の DGGE で分離されたバンドパターンの変化を図 16 上に示した。

肥料添加量の最も多い試験区の試験開始後 73 日目（最終日）の箇所で顕著なように、肥料添加試験区の DGGE で分離・検出される DNA バンドパターンでは、ある特定のものの濃さが増加する傾向があり、その結果、検出される DNA バンドの多様性を減じていた。この DGGE で分離・検出される DNA バンドパターンの主成分分析結果を図 16 下に示したが、肥料非添加（対照）試験区に比べ添加試験区では経時的な変化が大きくっており、またその度合は添加肥料量が増えるほど大きくなる傾向が明確に見られた。前述の添加肥料量と栄養塩濃度（図 9）と原油混合海砂に付着している細菌数（図 10）との関係、および原油中の各炭化水素分解促進効果（図 7）との関係を考え併せると、肥料添加量を増して栄養塩濃度が高くなることにより原油混合海砂に付着している原油分解に係わる細菌群が優占化した（土着細菌相が大幅に変化した）結果、原油中の各炭化水素の分解が促進されたと考えられる。言い換えると、原油中の炭化水素の微生物分解を促進させるためには、肥料添加による十分な栄養塩付与を行って土着細菌の群集構造を大きく変化させる必要があると考えられた。

3.2. 炭化水素代謝に関わる酵素遺伝子存在量の変化¹¹⁾

原油に含まれる比較的低分子の炭化水素の微生物による分解・代謝経路は、ある程度解明されており、その内、幾つかの経路に係わる酸化酵素の遺伝子も特定され塩基配列も報告されている。脂肪族の炭化水素を酸化する代表的な酸化酵素遺伝子であるアルカン-1-モノオキシゲナーゼ（アルカンヒドロキシラーゼ）遺伝子 (*alkB*) と、代表的な芳香族炭化水素代謝に関わる酸化酵素のカテコール-1,2-ジオキシゲナーゼ (C12O)、カテコール-2,3-ジオキシゲナーゼ (C23O) の遺伝子に関しては、比較的多くの塩基配列情報が報告されており、いずれも高い相同性を有している^{16,17)}。

そこでこれらの炭化水素酸化酵素遺伝子に共通な配列を見出し、設計した PCR 増幅用プライマーを用いて、2000 年に香住町海岸部で実施した現場試験に供試した原油混合海砂試料より抽出した混合細菌相の DNA 試料を対象にして、*alkB*、C12O、C23O 遺伝子量の経時変化をリアルタイム PCR を用いて調べた。

まず試験開始時には *alkB* は検出限界以下であったが、10 日目にはわずかに増幅し、31 日目には顕著な増幅が見られた（図 17a）。その後 73 日目には、31 日目の 3 分の 2 程度まで減少した。このことから、本試験では *alkB* を保持するアルカン分解菌が原油の存在と肥料添加による栄養塩増加によって試験初期の短期間に増殖し、アルカンの分解を促進させたものと考えられる。こ

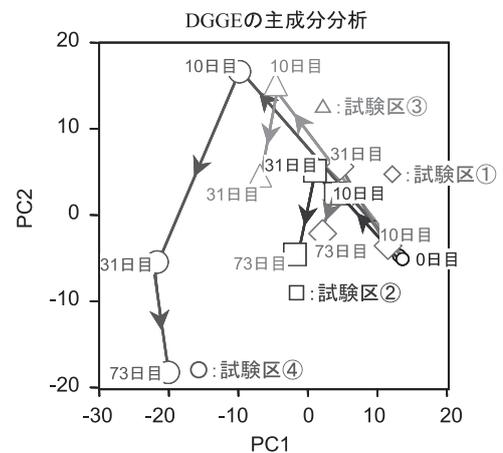
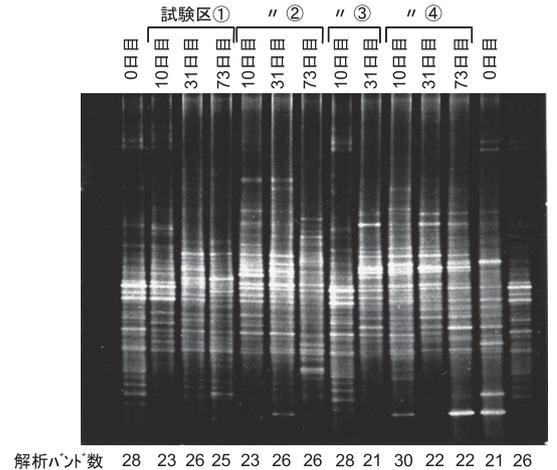


図 16. 2000 年香住町海岸部における現場試験試料の混合細菌相の 16S rDNA の PCR-DGGE 結果（上）とそのバンドパターンの主成分分析による解析結果（下：PC1 は第 1 主成分、PC2 は第 2 主成分を表す）。肥料添加については表 1 を参照

れはアルカン類の分解の結果（図 7）と一致している。また、C12O 遺伝子は、試験開始前と開始後 10 日目には検出限界以下であったが、31 日目には DNA 量が急激に増幅した（図 17b）。これは、10 日目から 31 日目に C12O 遺伝子を保有する微生物が増殖し、芳香族炭化水素の分解を促したものと考えられる。芳香族炭化水素のナフタレン類、ジベンゾチオフェン類、フルオレン類、フェナンスレン類は 31 日目までに 50% 以上分解されることが示されており（図 7）、本解析結果と一致している。いずれの場合も肥料非添加試験区では *alkB* も C12O 遺伝子も肥料添加試験区より存在量は少なかった。

興味深いことに C23O 遺伝子は *alkB* 及び C12O 遺伝子とは異なり、遺伝子量の増加は見られなかった。本現場試験において C23O 遺伝子を保有する微生物はあまり存在せず、原油中の芳香族炭化水素の代謝・分解に対する寄与が小さいと考えられた。

4. 北海道オホーツク沿岸におけるサハリン沖油田産原油を用いた現場試験

現在、サハリン周辺海域では大規模な海底天然ガス

田・油田開発が行われている。最初に採掘が進められたサハリン2では年々産油量が増加し、2007年には約170万トンの原油が産出される一方、パイプラインによるサハリン島内の不凍港への送油により通年操業が開始されている。さらに、サハリン2より原油埋蔵量が多いとされるサハリン1産原油についても我が国への輸入が開始されるという状況を鑑み、想定されるタンカー事故等による油流出事故に対応するために、我が国でも有数の水

揚げ高を誇るオホーツク沿岸を含む北海道北部沿岸海域を対象とした緊急時計画が2007年末に策定された^{18,19)}。

後述するようにサハリン1, 2それぞれから産出される原油は、その性状が中東産のものとは違い、特にサハリン2産のヴィーチャーズ原油は脂肪族炭化水素の組成が著しく異なっている。そのため、微生物による分解性については不明であり、寒冷地である北海道沿岸部における原油分解の進行度合についても未知であるため、実際の現場試験において評価される必要があると考えられる。

以上のことから、オホーツク沿岸の最大の海跡湖であるサロマ湖岸において、湖面が結氷する冬季を挟んだ寒冷期と温暖期に分けて、サハリン1産原油と2産ヴィーチャーズ原油を供試した小規模バイオレメディエーション現場試験を実施した。

中東産のアラビアンライト原油とサハリン1産原油と2産ヴィーチャーズ原油の性状を表4に、GC-MS分析における全イオンクロマトグラムを図18に示した。サハリン1産原油、2産ヴィーチャーズ原油共に際立った特徴は、その粘性の低さであり、アラビアンライト原油の約3分の1であった。また硫黄含量もアラビアンライト原油より大幅に低く(約8分の1)、工業利用の観点からはサハリン産原油は良質な原油であることが示された。薄層クロマトグラフィーによる分画分析の結果、サ

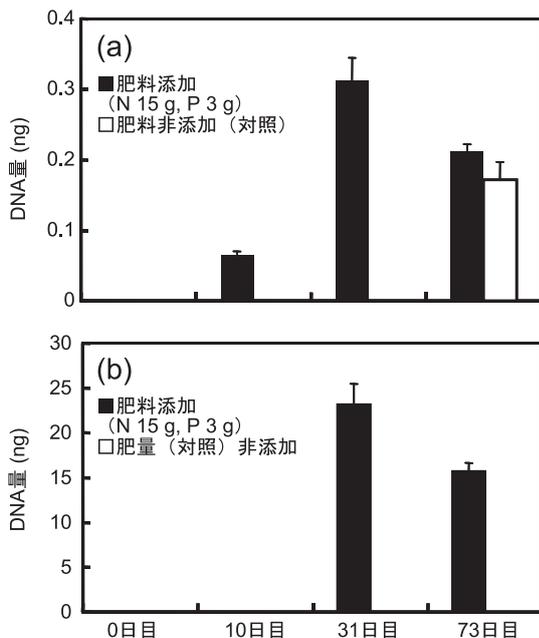


図17. リアルタイムPCRによる2000年香住町海岸部における現場試験試料の混合細菌相中のalkB (a)とC12O (b)それぞれの遺伝子量の経時的解析

表4. 中東産アラビアンライト原油とサハリン産原油の性状比較

	アラビアンライト	サハリン2 ヴィーチャーズ	サハリン1
粘度 (cSt)	7.98 (30°C)	2.8 (30°C)	1.87 (50°C)
硫黄含量 (%重量比)	1.98	0.24	0.31
比重	0.861	0.849	0.827

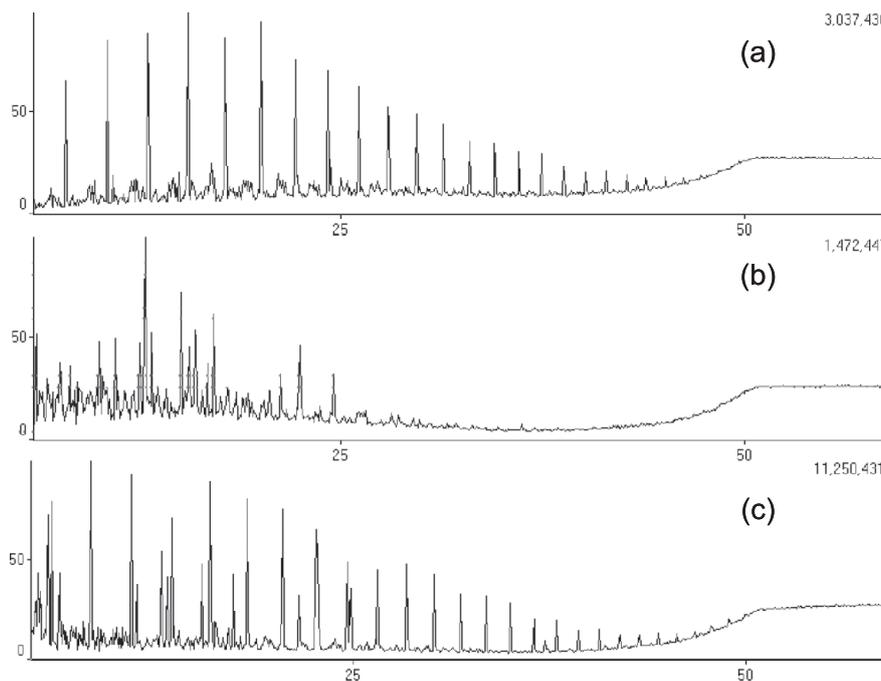


図18. アラビアンライト原油 (a), サハリン2産ヴィーチャーズ原油 (b), サハリン1産原油 (c)のGC-MS分析における全イオンクロマトグラムの比較

ハリン 2 産ヴィーチャーズ原油は極性成分であるレジンの含量がアラビアンライト原油のその半分以下であり、アスファルテン分については検出限界以下であった（データ未発表）。図 18 に示すように、これら 3 種の原油の GC-MS 分析により得られたクロマトグラムの中で、サハリン 2 産ヴィーチャーズが他の二種と比べて相当に異なっていることが判る。アラビアンライト以外の中東産、あるいは中国やブルネイ産の原油でも、粘度や硫黄含量等の性状は相当異なっているが、ガスクロマトグラフィー分析で規則的に連続したピークが現れるような直鎖状の n-アルカン（パラフィン）が検出される場合が多く、サハリン 1 産原油では検出されたが、ヴィーチャーズ原油では検出されず、直鎖状ではない未知のアルカンが含まれていることが示唆された。また、アラビアンライト原油に比べて、シクロヘキシルアルカン類とアルキル基が置換されたフェナンスレン類が多く含まれるのもヴィーチャーズ原油の特徴であった。

サロマ湖東岸部（図 1）における現場試験には、前述の香住町海岸部や種子島東岸部における現場試験で用いたアラビアンライト原油と同様に風化させたサハリン 1 産原油、並びにサハリン 2 産ヴィーチャーズ原油と試験現場の砂とを混合させたものを供試材料として、前述の種子島東岸部における現場試験と同様のステンレス製網からなる角形の網籠を用い、汀線沿いにおよそ 2 m 間隔で湖岸に埋設した。原油混合海砂試料と肥料顆粒の添加についても、種子島東岸部における現場試験と同様の方法で行った。肥料は窒素肥料顆粒（スーパー IB）10 g とリン肥料顆粒（リンスター）1 g が入った網製袋を原油混合砂試料が入った網製袋に入れて添加した。肥料を添加した原油混合砂試料と肥料を添加しなかったものそれぞれを設えた実験用ステンレス製籠はそれぞれ二個ずつ設け、潮汐により一日二回、海水に冠水するように湖岸に設置した（以上図 19）。

原油混合砂試料の採取や残存原油分の抽出、前処理と秤量、代表的な炭化水素類の分析も、香住町海岸部と種子島東岸部において実施した現場試験と同様に行った。試験期間中、併せて試験用ステンレス籠内の地温や間隙水中の栄養塩濃度も測定した。

試験期間は、サハリン 2 産ヴィーチャーズ原油を用いた寒冷期の試験として 2006 年 10 月から 2007 年 6 月までと、同じ原油を用いた温暖期の試験として 2007 年 6 月から同年 11 月までの二回、サハリン 1 産原油を用いた温暖期の試験を 2008 年 6 月から同年 11 月までの一回の計三回実施した。

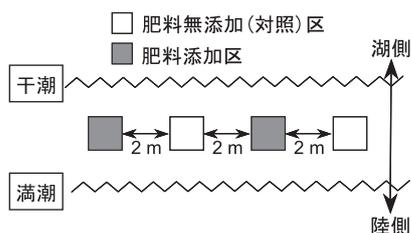


図 19. サロマ湖東岸部における原油分解現場試験用ステンレス籠の埋設配置

4.1. サハリン 2 産ヴィーチャーズ原油を用いた現場試験結果^{12,13)}

2006 年 10 月開始の寒冷期の試験期間中の地温は $-5.7 \sim 20.4^{\circ}\text{C}$ であったが、全期間の約 6 割を占める 10 月中旬から 3 月中旬までの平均地温は 2.8°C であった。2007 年 6 月開始の温暖期の試験における平均地温は 18.4°C であった。

2006 年 10 月開始の寒冷期の試験期間中のステンレス籠内の間隙水中の窒素・リン共に、肥料非添加（対照）試験区においても高い濃度で検出されており（全溶存態窒素：DTN [平均] 2.44 mg/L ，全溶存態リン：DTP [平均] 0.10 mg/L ），試験現場における海砂の間隙水中の栄養塩濃度が元々高いことが示された。窒素については、概ね肥料添加試験区の方が非添加（対照）試験区より高い濃度（平均 3.74 mg/L ）を保っており非添加（対照）試験区より 1 mg/L 以上高くなっていたが、特に試験初期段階におけるその差は顕著だった。一方、リンはむしろ非添加（対照）試験区（平均 0.1 mg/L ）より肥料添加試験区の方（平均 0.09 mg/L ）が低くなっていた¹³⁾。

2007 年 6 月開始の温暖期の試験においても窒素・リン共に、肥料添加による濃度上昇効果が顕著に現れており、DTN が最高 45.8 mg/L ，DTP が最高 1.1 mg/L に達し、試験期間中の DTN の平均濃度が 17.2 mg/L ，DTP の平均濃度が 0.37 mg/L となり、肥料非添加（対照）試験区における DTN の平均濃度 4.9 mg/L ，DTP の平均濃度 0.14 mg/L を上回っていた¹³⁾。

原油混合海砂に付着している全細菌数は、概ね $10^7 \sim 10^8/\text{g}$ 乾重だったが、肥料添加試験区では非添加（対照）試験区共よりも約 2 倍高かった（データ未発表）。

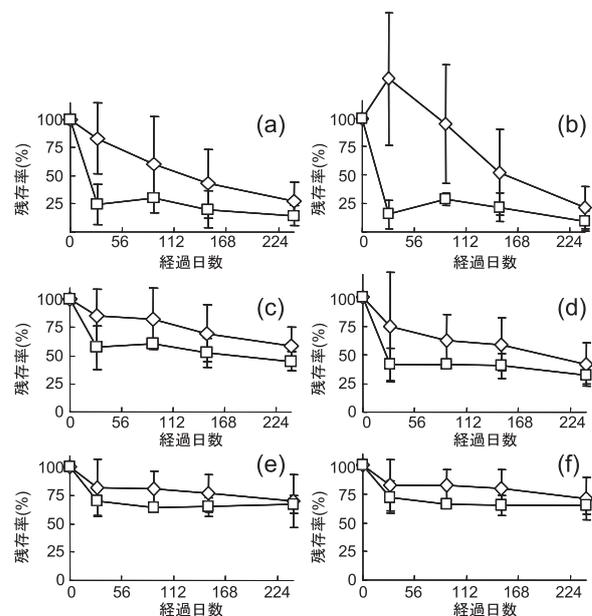


図 20. 2006 ~ 2007 年寒冷期のサロマ湖東岸部での現場試験におけるサハリン 2 産ヴィーチャーズ原油に含まれる各炭化水素の分解
(a) シクロヘキシルアルカン類, (b) ナフタレン類, (c) アルカン類, (d) フルオレン類, (e) ジベンゾチオフェン類, (f) フェナンスレン類
◇肥料非添加（対照）試験区, □肥料添加試験区

ヴィーチャーズ原油に含まれる各炭化水素種ごとの分解（消失）を図 20（2006～2007 年寒冷期）と 21（2007 年温暖期）に示す。2006 年 10 月開始の寒冷期の試験でも、2007 年 6 月開始の温暖期の試験においても、ナフタレン類とシクロヘキシルアルカン類の分解が肥料添加試験区において顕著であり、一回目の試料採取を行った 4～5 週間目に 75～98% 分解されていた。肥料添加による分解促進効果は、2007 年 6 月開始の試験より 2006 年 10 月開始の試験におけるこれらの炭化水素の初期消失において顕著であり、寒冷期における比較的易分解性である炭化水素の微生物分解促進に有効であることが示された。ナフタレン類とシクロヘキシルアルカン類の次にはアルカン類とフルオレン類がよく分解されていたが、既往の事例においては通常の直鎖状アルカン類であればナフタレン類と同等、もしくはそれ以上に早期に分解される場合が多く見られるが、前述のように今回現場試験に用いたヴィーチャーズ原油には通常の直鎖状アルカン類が余り含まれず、詳細な構造は不明ながら分解が遅いことが予想される未知の分岐型アルカンが主成分であることが推測され、結果的に分解され難くなったと思われる。

2006 年 10 月開始の寒冷期の現場試験での肥料添加試験区においてはアルカン類の分解は 50% 以下にとどまっていたが、2007 年 6 月開始の温暖期の試験での肥料添加試験区においては最終的に 80% 以上の分解率が得られていた。比較的難分解性であり高分子の芳香族炭化水素のフェナンスレン類とジベンゾチオフェン類の分解程度は、2006 年 10 月開始の試験、2007 年 6 月開始の試験双方の肥料添加試験区においても低く、試験最終時点においても 60～70% 以上が残留していた。特にフェナンスレン類はヴィーチャーズ原油に比較的多く含まれる芳香族炭化水素であるため、流出油が漂着した場合の環境中における残留性が懸念される。

肥料添加による分解促進効果は炭化水素の種類によって異なっていたが、易分解性のシクロヘキシルアルカン類やナフタレン類、フルオレン類のように、肥料非添加（対照）試験区においてその残存率の変動（振れ幅）が非常に大きくなっている一方、肥料添加試験区におけるそれは小さくなっている傾向が見られた。これは栄養塩の供給により各炭化水素の微生物分解が促進されると共に、分解の進行度合が平滑化されることによるものと推察された。

冬期に氷点下に達する当現場においても、ヴィーチャーズ原油中に含まれるフェナンスレン類とジベンゾチオフェン類以外の炭化水素の分解に対する肥料添加（栄養塩付与）による明確な促進効果が観られた一方、肥料非添加（対照）試験区においても相当の分解が見られたのは、前述のように、試験現場の海砂の間隙水に含まれる栄養塩濃度が元々高いためだと思われる。

前述のように、他の海域でこれまで行ってきたアラビアンライト原油を用いた現場分解試験においては、肥料を添加した場合に分解を評価した全ての炭化水素について 80～90% 以上の分解が見られたが、それらに比べて本現場試験では大幅に分解率が低く、北海道オホーツク沿岸サロマ湖という寒冷水域での微生物による原油の分解活性の低さと、ヴィーチャーズ原油に含まれる特異な

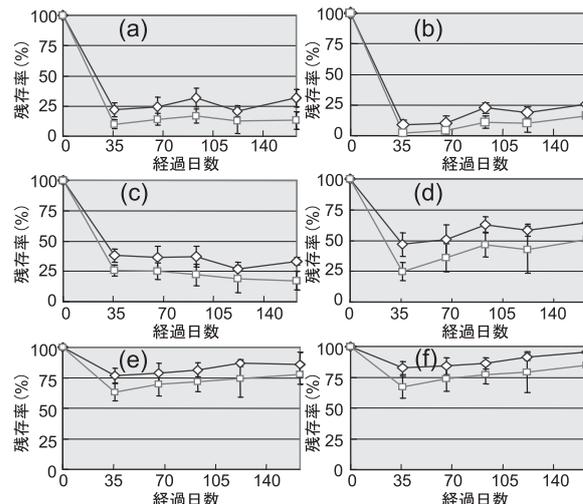


図 21. 2007 年温暖期のサロマ湖東岸部での現場試験におけるサハリン 2 産ヴィーチャーズ原油に含まれる各炭化水素の分解
(a) シクロヘキシルアルカン類, (b) ナフタレン類, (c) アルカン類, (d) フルオレン類, (e) ジベンゾチオフェン類, (f) フェナンスレン類
◇肥料非添加（対照）試験区, □肥料添加試験区

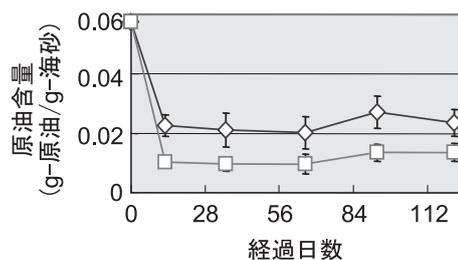


図 22. 2007 年温暖期のサロマ湖東岸部での現場試験における原油混合海砂中の全抽出原油量の推移
◇肥料非添加（対照）試験区, □肥料添加試験区

構造を有するアルカン類と含有量の多いフェナンスレン類とジベンゾチオフェン類といった比較的高分子の芳香族炭化水素の難分解性（残留性）が示唆された。

2007 年 6 月開始の温暖期の試験における、実験に供試した原油混合海砂試料中の原油含量の経日変化について肥料添加試験区と非添加（対照）試験区との間で比較したところ（図 22）、肥料非添加（対照）試験区においても試験を開始してから二週間後には初期原油含有量の約三分之一に減少していたが、肥料添加試験区の原油含量は非添加（対照）試験区のそれのさらに半分ぐらいにまで減少しており、原油に含まれる個々の炭化水素の分解のみならず、現場試験に用いた原油混合海砂に含まれる原油全体量の減少促進効果ももたらすことが示された。

4.2. サハリン 1 産原油を用いた現場試験結果

平均地温は 18.4°C であった。サハリン 2 産ヴィーチャーズ原油を用いた 2006～2007 年に実施した試験時のように、試験に用いたステンレス籠内の間隙水中の平均栄養塩濃度は肥料添加試験区で DTN が 19.9 mg/L、

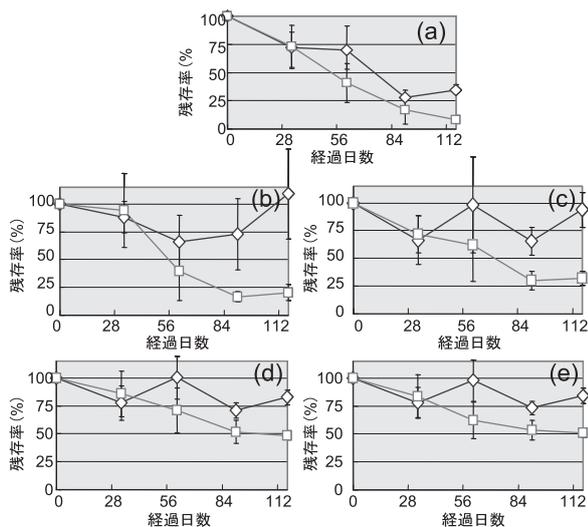


図 23. 2008 年サロマ湖東岸部での現場試験におけるサハリ
ン 1 産原油に
含まれる各炭化水素の分解
(a) アルカン類, (b) ナフタレン類, (c) フルオレン類, (d)
ジベンゾチオフェン類, (e) フェナンスレン類
◇肥料非添加 (対照) 試験区, □肥料添加試験区

DTP が 0.49 mg/L, 非添加 (対照) 試験区で DTN が 2.8 mg/L, DTP が 0.13 mg/L となり, 肥料添加により窒素は約 7 倍, リンは約 4 倍高くなっていった。しかしながら, 原油混合海砂に付着している全細菌数は, 肥料添加試験区と非添加 (対照) 試験区共に概ね 10^8 /g 乾重で推移しており, 両者間で有意な差は見られなかった (データ未発表)。

現場試験に供試した原油混合海砂に含まれる残存原油は, 試験開始後一週間後に初期含量の 60% (肥料非添加 [対照] 試験区) ~ 85% (肥料添加試験区) が消失しており, サハリン 2 産ヴィーチャーズ原油を用いた 2007 年に実施した試験時の結果に似ていた。炭化水素の種類により程度は異なるものの, 肥料添加による分解促進効果が見られた。興味深いことにサハリン 2 産ヴィーチャーズ原油を用いた現場試験では, 肥料添加試験区でも試験終了時に半分以上が残存していたジベンゾチオフェン類とフェナンスレン類について, サハリン 1 産原油の場合, 肥料添加試験区では最終的に 50% 近くが分解されていた。またその重複試験区間での分解程度の振れ幅も低くなっていた。このことから, サハリン 2 産ヴィーチャーズ原油では残留性が懸念された芳香族炭化水素のジベンゾチオフェン類とフェナンスレン類について, サハリン 1 産原油に含まれるものはアルキル基置換体の異性体の組成等が異なっており, 結果的にサハリン 2 産ヴィーチャーズ原油に含まれるものより分解性が高くなったと推察された。

5. おわりに

1997 年に日本海で起こったナホトカ号事故と東京湾におけるダイヤモンド・グレース号事故以来, 我が国の沿岸海域では原油・重油を運搬しているタンカーからの大規模な油流出事故は生じていない。しかしながら, 大

型貨物船の座礁等による燃料重油の流出事故は度々発生しており, 規模は大きくないながらも漂着油による沿岸域の汚染は絶えることなく起こっている。冒頭に述べたように 2011 年 3 月に発生した東日本大震災では, 地震動と東北太平洋沿岸部を襲った大津波が臨海部の石油コンビナートや船舶用や火力発電所の燃料油のタンクを破壊し, 周辺沿岸部における石油流出を引き起こした。特に津波の被害が甚大だった宮城県沿岸部では, 津波で巻き上げられた土砂堆積物と流出した燃料油が混合し, そのまま沿岸部に再堆積した結果, 底泥には相当の石油分が含まれ採取された底泥が石油臭を放つことが関係者から報告されている。このような油汚染は例がなく, また底層環境ということで海水温・地温, 並びに溶存酸素量も比較的 low, 微生物分解の活性も高くないことが予想される。しかしながら本稿で述べたように, サハリン産原油のような低粘性で揮発性成分が多いものでは寒冷域でも炭化水素類の分解が期待できることから, 今後, 津波の被害を受け油流出の起こった東北地方太平洋沿岸域では, 底泥中の栄養塩濃度や温度等の石油の微生物分解に影響をおよぼす環境因子と共に, 外部からの栄養塩付与や分解微生物の供給を行わない石油の自然分解・浄化過程と微生物群集の変化の経過観察を併せたモニタリング (いわゆる “monitored natural attenuation” [MNA]) の実施が望ましいと考えられる。

謝 辞

香住町海岸部では, 兵庫県立公害研究所 (現 兵庫県環境研究センター) をはじめとする兵庫県の各関係機関, 香住町, 柴山漁業協同組合の方々に, 種子島東海岸部では, 鹿児島県と西之表市の各関係機関, 種子島漁業協同組合等のご理解とご協力を得て, 現場試験を実施することが出来た。

サハリン 1 産原油と 2 産ヴィーチャーズ原油は, JX 日鉱日石リサーチ株式会社のご厚意により分譲して頂いたものである。

実験に用いました農業用徐放 (緩効) 性肥料顆粒は, 三菱化学株式会社とチッソ株式会社のご厚意により分与頂いたものである。

また, サロマ湖岸における現場試験実施と器材設営, 試料採取等の作業に当たり, 北海道網走支庁, 北見市, 北海道立地質研究所, それにサロマ湖養殖漁業協同組合の皆様のご協力を得た。

この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 総務省消防庁消防大学校 消防研究センターホームページ. 東日本大震災による危険物施設等の被害状況に係る緊急調査の結果について (平成 23 年 4 月 26 日報告). http://www.fri.go.jp/cgi-bin/hp/index.cgi?ac1=JNN2&ac2=&ac3=740&Page=hpd_view
- 2) Deepwater Horizon oil spill. The Encyclopedia OF EARTH. http://beta.eoearth.org/article/Deepwater_Horizon_oil_spill?topic=50364
- 3) China Digital Times (CDT) July 30, 2010 9:58. <http://china.digitaltimes.net/2010/07/us-expert-china-oil-spill-far-bigger-than-stated/>

- 4) International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF) ホームページ. Data & Statistics. <http://www.itopf.com/information-services/data-and-statistics/statistics/#no>
- 5) Bragg, J.R., R.C. Prince, J.B. Wilkinson, and R.M. Atlas. 1992. Bioremediation for shoreline cleanup following the 1989 Alaskan oil spill, Exxon.
- 6) Atlas, R.M. and R. Bartha. 1972. Degradation and mineralization of petroleum in seawater, limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol. Bioengi.* 14: 309-317.
- 7) Swannell, R.P.J., K. Lee, and M. McDonagh. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60: 342-365.
- 8) Maki, H., N. Hirayama, T. Hiwatari, K. Kohata, H. Uchiyama, M. Watanabe, F. Yamasaki, and M. Furuki. 2003. Crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan. *Mar. Poll. Bull.* 47: 74-77.
- 9) Maki, H., T. Hiwatari, K. Kohata, M. Watanabe, H. Miyazaki, F. Yamazaki, and T. Tanimoto. 2002. Effect of nitrogen form for the amendment of crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan. *Proceedings of the Twenty-Fifth Arctic and Marine Oil spill (AMOP) Program Technical Seminar, Environment Canada.* 2: 969-977.
- 10) 牧 秀明, 樋渡武彦, 木幡邦男, 渡辺正孝. 2005. 日本沿岸部における石油バイオレメディエーション現場試験. 流出油の生態系への影響と中・長期モニタリング—ナホトカ号の事例を中心に—水産学シリーズ. 145: 74-84.
- 11) 国立環境研究所特別研究報告. SR-53-2003. 海域の油汚染に対する環境修復のためのバイオレメディエーション技術と生態系影響評価手法の開発 (環境修復技術開発研究). 平成 11-14 年度. <http://www.nies.go.jp/kanko/tokubetu/sr53/sr53.pdf>
- 12) 牧 秀明, 前川公彦, 岡本康男, 濱田誠一. 2008. サロマ湖岸におけるサハリン産原油の現場分解試験. 用水と廃水. 50: 1005-1011.
- 13) 牧 秀明, 濱田誠一. 2010. サハリン産原油の微生物分解とオホーツク沿岸における現場試験. 北海道立地質研究所報告. http://www.gsh.pref.hokkaido.jp/publication/digital_report/gsh_report/81pdf/gshr81_005_012.pdf. 81: 5-12.
- 14) Prince, R.C., D.L. Eimendorf, J.R. Lute, C.S. Hsu, C.E. Haith, J.D. Senius, G.J. Dechert, G.S. Douglas, and E.L. Butler. 1994. 17 α (H),21 β (H)-hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 28: 142-145.
- 15) Ogino, A., H. Koshikawa, T. Nakahara, and H. Uchiyama. 2001. Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. *J. Appl. Microbiol.* 91: 625-635.
- 16) Kohno, T., Y. Sugimoto, K. Sei, and K. Mori. 2002. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. *Microb. Environ.* 17: 114-121.
- 17) Sei, K., K. Asano, N. Tateishi, K. Mori, M. Ike, and M. Fujita. 1999. Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathways. *J. Biosci. Bioeng.* 88: 542-550.
- 18) サハリンエナジー社ホームページ. <http://www.sakhalinenergy.com/en/>
- 19) 濱田誠一, 牧 秀明, 高田雅之, 長 雄一, 島村崇志, 宮木雅美, 仁科健二. 2010. 重点領域研究 オホーツク海沿岸環境脆弱域における油汚染影響評価とバイオレメディエーション実用化に関する研究の概要. 北海道立地質研究所報告. http://www.gsh.pref.hokkaido.jp/publication/digital_report/gsh_report/81pdf/gshr81_001_004.pdf. 81: 1-4.