

北海道における原油汚染の原地性バイオオーグメンテーション

高橋 麻里奈¹、坂口 直史²、永井 元規²、奥山 英登志^{1,2,3}

¹北海道大学理学部生物科学科,

²北海道大学大学院環境科学院・生物圏科学専攻,

³北海道大学大学院地球環境科学研究院・環境生物学部門

Autochthonous augmentation to crude-oil contamination in Hokkaido

Marina Takahashi¹, Naofumi Sakaguchi², Motonori Nagai², Hidetoshi Okuyama^{1,2,3}

¹Department of Biological Sciences, School of Science, Hokkaido University, ²Course in Environmental Molecular Biology and Microbial Ecology, Division of Biosphere Science, Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University

³Laboratory of Environmental Molecular Biology, Faculty of Environmental Earth Science, Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University

The development of oil fields in Sakhalin, Russia, increases a risk of oil spills. Once an oil spill happens, its ruinous effects would reach northern seacoasts of Hokkaido. Under such situations, we have proposed autochthonous bioaugmentation (ABA), a technology, which uses microorganisms indigenous to contaminated sites or to contamination-predicted sites to clean up pollutants, as an effective bioremediation method more than the existing biostimulation (BS) and bioaugmentation (BA) technologies^{1,2)} (Fig.1). In this study, we conducted ABA experiments using sea sand samples collected at the seacoast of Abashiri City, Hokkaido, facing the Okhotsk Sea and Sakhalin Island. Crude oil-degrading microbial consortia were established using the sea sand and liquid media containing mineral salts medium and crude oil as the sole carbon source. When crude oil-contaminating sea sands were subjected to ABA using the established crude oil-degrading microbial consortia as inoculum under cultivation conditions at 20 °C and 4 °C, and to BS as a control, much higher degradation of crude oil was observed in ABA than in BS at both temperatures. In the profile of PCR-denaturant gradient gel electrophoresis targeting 16S rRNA genes, the ABA-treated sea sand microbial community showed no presence of any predominant bands, suggesting that crude oil could be degraded cooperatively by various types of bacteria but not by predominating oil-degrading bacteria. The necessity and importance of previous arrangement of ABA, particularly at cold areas such as Hokkaido, are discussed.

ロシア・サハリンの油田開発により、北海道沿岸地域が石油汚染にさらされるリスクは非常に高いものとなっている。私たちはこの事実を考慮し、また、従来の生物を用いた汚染浄化技術、バイオレメディエーション(BR)、が必ずしも我が国においては利用しやすいものになっていないことから“原地性バイオオーグメンテーション、autochthonous bioaugmentation (ABA)”¹⁾を、汚染地域に対する効果的な浄化技術として提唱し、利用性の高いものにすべく改良を進めている。BRは、比較的安価で環境への負荷の少ない汚染浄化技術であり、汚染地域に栄養塩や酸素を投入することによって、土着の微生物を活性化し、汚染物質の浄化を促すバイオスティミュレーション(BS)と汚染地域に、汚染物質を分解する外来の微生物を投入するバイオオーグメンテーション(BA)がある(Fig. 1)。BRは、化学的、あるいは物理的方法に比べ環境への負荷が少ないなどの利点はあるが、BSの遅効性、BAについては地域住民の拒否反応など、実用化しにくい問題を抱えている。ABAは、すでに汚染された地域、あるいは汚染が予想される地域から採取した微生物を用いるので、BS、BA両方の利点を併せ持ち、欠点を補う技術である。本研究では、北海道網走市沿岸から採取した海砂を微生物源として得た原油分解性集積培養物を用いて、実験室内でのABA試験を実施した。集積培養では、海砂培地(滅菌した海砂5gに、7.5%(v/w)の無機塩混合物(MSM)

と、唯一の炭素源として 2%(w/w)の原油を加えたもの: SM という)と液体培地 (20 ml の MSM に 2%(w/v)の原油を加えたもの: LM という)を用いた。それぞれの培地に 0.5 g の滅菌していない海砂を微生物源として接種した後、SM を用いたものは静置し、LM を用いたものは振盪 (160 rpm) し、20 °C で 2 週間培養した。次に、SM 培養物の 0.5 g、LM 培養物の 100 μl を新しい SM、LM 培地にそれぞれ接種した。一連の操作を 7 回繰り返したものを、SM 集積培養物、LM 集積培養物として ABA 試験に用いた。集積培養物を加えない BS 実験を対照として実施した。ABA 試験では、海砂 7 g に原油と MSM をそれぞれ 2%、7.5%になるように加えたものを培地とし、0.5 g の SM 集積培養物、あるいは 100 μl の LM 集積培養物を加え、6 週間、4 °C または 20 °C で静置培養を行った。培養中の原油の残存量は 2 週間ごとにクロロホルム・メタノール混液を用いて抽出し、イアトロスキャンで定量した。また、培養物中の微生物の群集構造は、培養物から抽出した全 DNA を鋳型とし、16S rRNA 遺伝子断片を増幅する PCR-DGGE 法によって調べた。その結果、20 °C では、SM 集積培養物が最も効果的に原油を分解すること、4 °C においても ABA が BS に比べ有効だが、わずかながら LM 集積培養物が SM 集積培養物の分解率を上回ることが分かった。ABA を実施した海砂中には特に優勢な DGGE バンドは検出されなかったことから、多数の細菌が協調して原油分解に関与していることが示唆される。本発表では寒冷地域での ABA の事前準備の必要性と重要性を議論する。

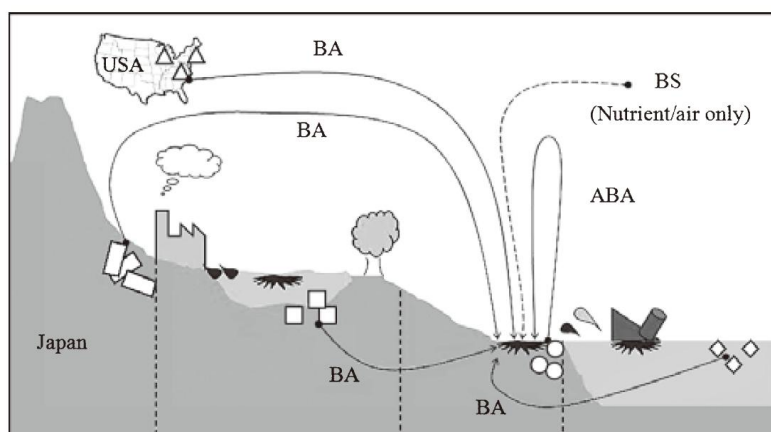


Fig. 1. Illustrated presentation of various types of bioremediation technology. BS, biostimulation; BA, bioaugmentation; and ABA, autochthonous bioaugmentation. (Cited from reference 2).

References

- 1) Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I., and Okuyama, H.: Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation., *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1739-1745 (2007)
- 2) Sakaguchi, N., Bin Haji Mohd Taha, A. I., Maki, H., Hamada, S., Morikawa, M., and Okuyama, H.: Feasibility of bioremediation technologies for managing oil spills caused by the development of the Sakhalin oil fields—Review—. *Seibutsukougakkaishi* 88, 150-157 (2010) (in Japanese with English abstract).