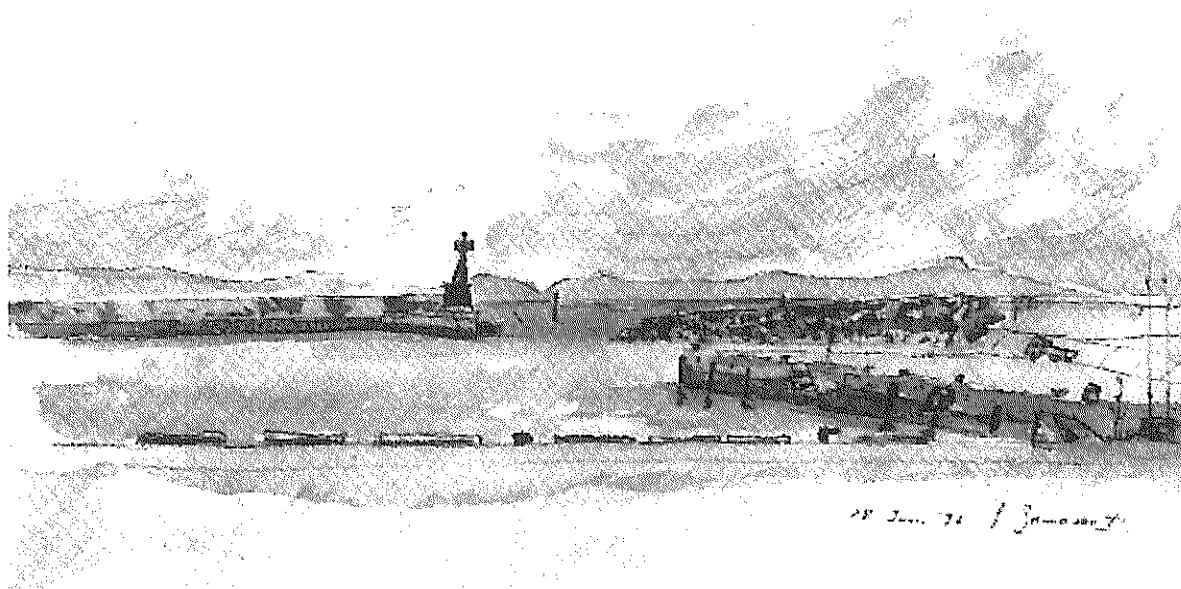


バイオレメディエーションによる海洋汚染対策

—ナホトカ号重油流出事故への適用—



ナホトカ号海洋油汚染バイオレメディエーション研究会

も く じ

はじめに	寺川 恒明	1
研究会メンバー及び作業分担		2
1. 流出重油の性状と化学組成	穂積 豊治	3
2. 油処理用微生物製剤の生物に対する安全性		
2.1 魚類に対する安全性	廣田晏士	5
2.2 海産無脊椎動物の発生に対する安全性 —ウニの発生実験による評価—	堤 裕昭	9
3. 流出重油の微生物製剤による分解性	穂積豊治	15
4. 流出原油の微生物製剤による現場分解実験	堤 裕昭・高井孝次・鴻野雅一	19
5. ナホトカ号海洋油汚染バイオレメディエーション研究会の実験結果に対する評価	大和田紘一	31
.....		
資料1 ナホトカ号重油流出事故発生の経過		34
資料2 現場における微生物製剤による油処理		35
資料3-4 EPA* (米国環境保護局) の「NCP** (国家緊急計画) 製品目録」		36
ナホトカ号海洋油汚染バイオレメディエーション研究会活動記録		38

はじめに

1997年1月、日本海で発生したナホトカ号による重油流出事故は大変不幸な出来事であり、沿岸経済や自然環境に与えた影響は図り知れないものでありました。当初漂着した重油回収は、地元関係者とボランティアの皆様方による人海戦術に頼る他に方法はありませんでした。しかしながら、可能なかぎり重油を回収した後も、自然の浄化能力に頼るのみでは、汚染された自然環境の速やかな回復は極めて困難と考えていました。我々はここで世界的な海洋微生物学者であるオッペンハイマー博士（米国）に出会い、海外では既に実用化されているバイオレメディエーション（微生物の働きを活用した汚染修復技術）を知りました。

ナホトカ号の船尾部も依然として島根県隠岐島沖の海底に放置されたままで、四方を海に囲まれた島国としての問題は”もし（IF）“ではなく、”いつ（WHEN）“という気がしてなりません。当組合では早速このバイオレメディエーションによる漂着油の分解促進に関する有効性を実証すべく、「ナホトカ号海洋油汚染バイオレメディエーション研究会」を発足させ、室内試験と現場実験を行いました。幸いこの活動に対しては兵庫県のご支援も得られ、全国から寄せられた義援金からの資金援助もいただいております。

今回の報告書にまとめられた研究結果や、実際に我々が現場において試用した経験から判断しても、天然微生物の働きを活用したバイオレメディエーションによる環境浄化は、効果、安全性、経済性から考えて非常に有効な方法と考えられます。今回の出来事をきっかけとしてバイオレメディエーションが広く一般に認識されることを願ってやみません。

重油回収ならびに研究会にご協力いただきました関係の皆様方にたいして深く感謝の意を表しますと共に、この研究結果が今後の環境保全対策に活用されることを期待して、ご挨拶とさせていただきます。

1997年2月

柴山港漁業協同組合

代表理事組合長 寺川 恒明



1997年2月8日撮影、兵庫县城崎郡香住町無南垣の海岸にて

研究会メンバー及び作業分担

寺川 恒明 (柴山港漁業協同組合 代表理事組合長)

研究会代表

堤 裕昭 (熊本県立大学生活科学部 助教授)

実験室内における安全性試験および現場実験 (分解実験) の画像解析による数値化

眞鍋 武彦 (兵庫県立水産試験場)

現場実験計画の作成 (アドバイザー)

穂積 豊治 (昭和シェル石油株式会社中央研究所)

流出重油の成分分析および実験室内における分解性試験

廣田 晏士 (ヤクルト薬品工業株式会社)

実験室内における安全性試験

高井 孝次 (富士包装株式会社)

現場作業及び記録

鴻野 雅一 (有限会社 オッペンハイマーテクノロジージャパン)

現場作業及び微生物製剤の提供

.....

評 価

大和田 絃一 (東京大学 海洋研究所海洋微生物部門 教授)

.....

総まとめ

株式会社 住友海上リスク総合研究所調査第2部

協力 水道機工株式会社地質環境プロジェクト

1. 流出重油の性状と化学組成

穂積 豊治 (昭和シェル石油株式会社)

ナホトカ号から流出したものは重油である。図 1.1 に示すように、重油は常圧蒸留残渣油や減圧蒸留残渣油等に灯油や軽油を混ぜて作られる。この報告書では、ナホトカ号船首より抜き取った重油の性状や化学組成を分析し、その結果を以下に示す。

流出重油

外観：黒色で粘性のある液体

臭気：弱い重油臭がある

水分含量：46.9 wt% (KF 法) *

* 参考値として対照 JIS 規格 C 重油の水分含量を挙げると、342ppm である。水分含量がエマルジョン様で約半分に達しており、そのことによって重油に強い粘性が生じていると考えられる。

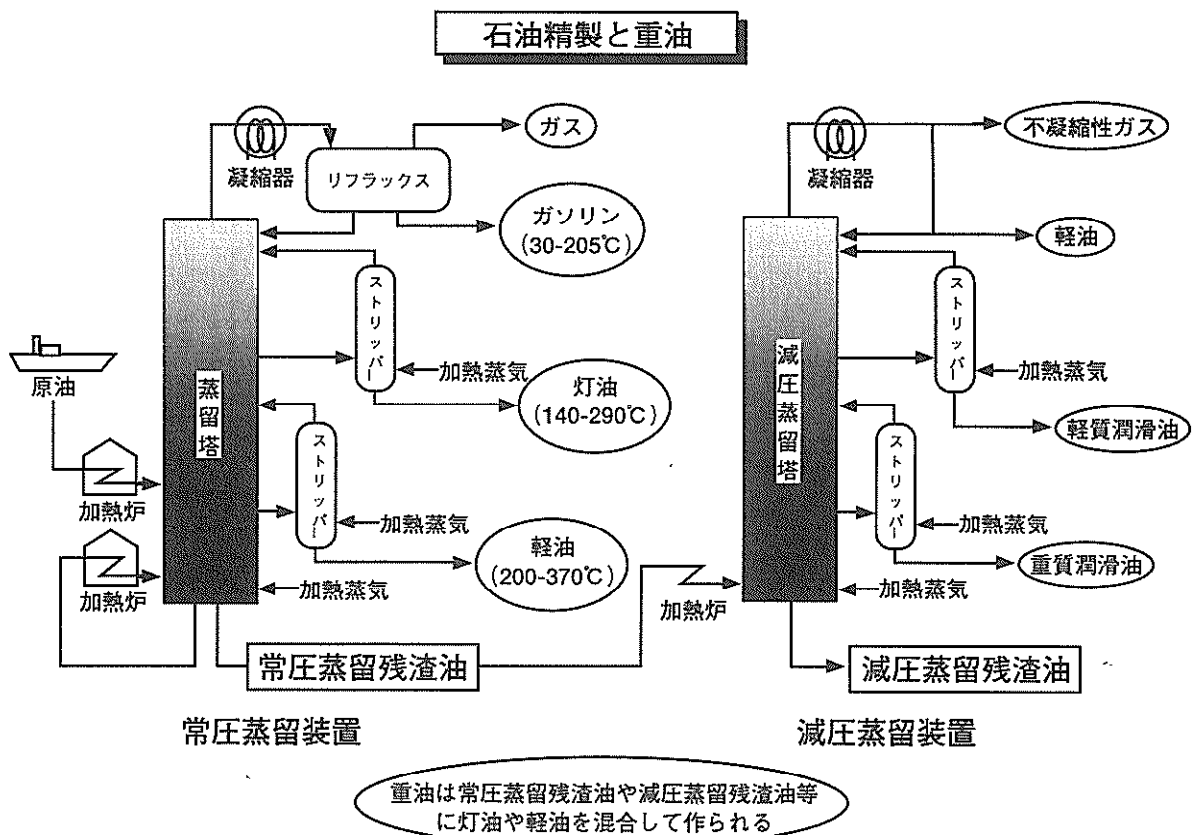


図 1.1 原油の精製法と重油の製造過程

水分除去後の分析結果

(トルエン抽出により水分を除去した。)

硫黄分：0.5wt% (レコ法)

金属・元素組成 (ppm)

Ca	Mg	P	Al	Fe	Na	Ni	Pb	Si	Sn	V	N*
1	5	2	2	3	46	10	1	1	1	22	0.204

* wt%

赤外吸収特性の分析結果

(フーリエ変換赤外分光光度計 (日本分光 (株) Valor-111 型) を使用した。)

2950, 1600, 1460, 1380, 880, 820, 740, 720 cm^{-1} に吸収が見られ、JIS 規格 C 重油とほぼ同様な吸収曲線を示した。

ガスクロ蒸留による分析結果

(回収率 53%)

初期沸点	留出点	5%	10%	20%	30%	40%	50%
260°C		307°C	338°C	382°C	422°C	469°C	523°C

参考値として対照 JIS 規格 C 重油の初期沸点は 157°C であり、エンドポイントは 496°C であった。

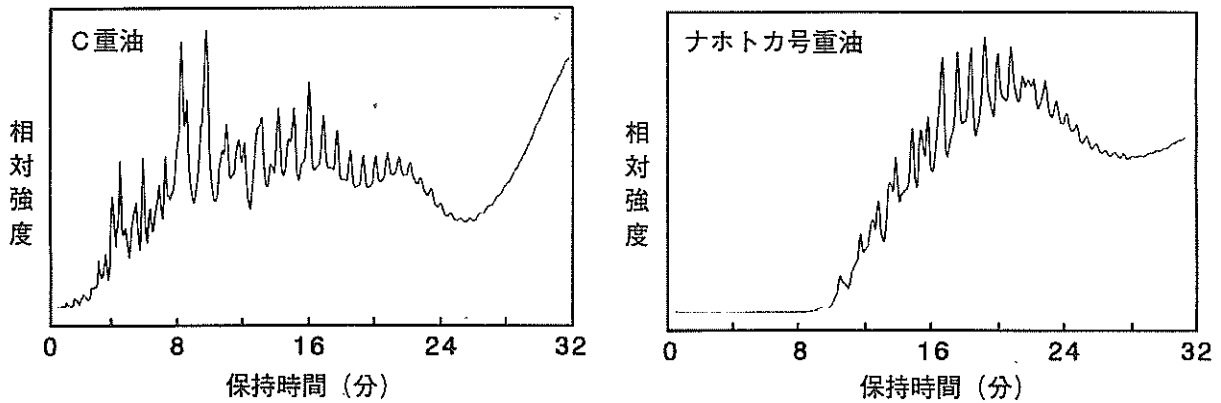


図 1.2 ガスクロ蒸留による重油の分析結果

イヤトロスキャン分析による油の成分分析の結果

IATROSCAN TLC/FID Analyzer (NEW MK-5) ヤترون社を用いて分析した。

飽和分 15%、芳香族分 50%、レジン分 17%、アスファルテン分 18%

2. 油処理用微生物製剤の生物に対する安全性

2.1 魚類に対する安全性

廣田晏士（ヤクルト薬品工業株式会社）

はじめに

(株)ヤクルト本社の子社 日本クロレラ(株)はクロレラを培養し、生クロレラ濃縮液を稚魚の餌であるワムシの餌料として販売している。生クロレラ濃縮液の品質管理のために、クロレラ・ワムシ・魚の飼育試験を実施し、安全なクロレラの供給で長年関係業界から信用を得ている。また、ヤクルトグループは稚魚の飼育時に発生する水質の悪化および土砂の腐敗を防ぐため、各種の微生物製剤の開発に取り組んでいる。このように、ヤクルトグループでは魚の安全性に対する少々の蓄積した技術と知見を所有しているため、筆者は、今回日本クロレラ(株)の協力を得て、油処理のための微生物製剤の一種であるフォーミュラ1およびテラザイム（オッペンハイマーバイオテクノロジー社、資料3, p.36参照）のデバスズメダイ（海産熱帯魚）の飼育水に添加した時の生残率への影響（急性毒性試験）と、アユの配合飼料に添加して稚アユに経口投与した時の生残率への影響（亜急性毒性試験）を調べた。微生物製剤であるフォーミュラ1とデバスズメダイおよび稚アユの組合せで、それぞれ7日間の短期飼育試験を実施した。つぎに、稚アユとテラザイムの組合せで1ヶ月の長期飼育試験を実施した。

実験材料および実験方法

供試微生物製剤

この実験で使用した微生物製剤は、資料集に掲載されているフォーミュラ1およびテラザイムで、タンカーなどの石油流出事故対策に使用されているものである。なお、テラザイムはフォーミュラ1を菌数で100倍希釈した商品である。

供試魚

デバスズメダイは海水で生育し、水質の変化に敏感である。また、本微生物製剤も海水で使用されることから、本試験ではデバスズメダイを採用した。アユは稚魚の時代は海水で生育し、その後、川で成育する魚類である。また、餌の良否および毒性に敏感な魚であることも採用した理由の一つである。

デバスズメダイは（有）日海センター（鑑賞魚店、神奈川県）より市販されているものを購入し、稚アユは（株）浜名水産で生産されているものを使用した。

魚の飼育用飼料

デバスズメダイにはテトラマリーンラージブレーク（テトラベルケ社）を使用し、稚アユには日本農産2号（日本農産工業社）を使用した。



アユ（幼魚） *Plecoglossus altivelis*
 （出典：編／監修：川那部浩哉・水野信彦、
 「日本の淡水魚」、山と溪谷社）



デバスズメダイ（幼魚） *Chromis viridis*
 （出典：益田一 著、「海水魚」、山と溪谷社）

飼育設備および試験場所

デバスズメダイの飼育試験は20ℓの水槽で行い、飼育中の水質悪化を防ぐため、サンゴ砂をろ過材にした底面ろ過方式を採用した（図2.1.1）。酸素の補給はエアポンプを使用して行った。試験は日本クロレラ（株）の試験室で行った。アユの飼育は100ℓの水槽（稚鮎飼育用水槽）で行い、飼育水は地下水を掛け流しにし、換水率は8回転/日とした（図2.1.2）。

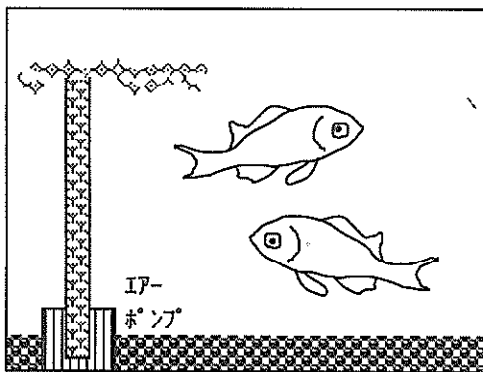


図2.1.1 デバスズメダイの実験飼育槽（20ℓ）

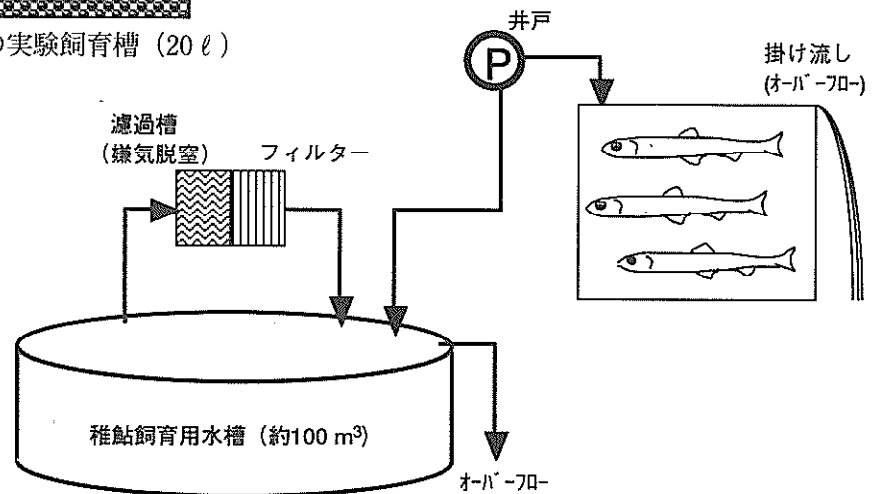


図2.1.2 アユの実験飼育槽（100ℓ） 全国の川に放流するための稚鮎飼育用水槽（実験飼育槽のアユが死滅した場合に水質が原因かどうかを確認できるように、この水槽と同じ原水（井戸水）を実験に用いた）

飼育水

淡水の場合は地下水（ポンプアップ水）を用い、溶存酸素量（DO）が十分で水が汚染しないように、掛け流しにした。また、人工海水の場合はマリンアート（千寿製薬社）500gを25ℓの水に溶解して使用した。

短期試験の結果

1. デバスズメダイに対するフォーミュラ1の添加試験

各試験区に10尾のデバスズメダイ（平均体長約3cm、体重約1g）を20ℓの人工海水中で7日間飼育することによって行った。飼育中の水温は28℃の恒温で、給餌は朝、昼、晩の3回に分けて行った。用いたフォーミュラ1の量は、試験区では本製剤を飼育水に対して0.1%になるように添加したものであり、対照区は飼育水のみとした。飼育開始後7日目のデバスズメダイの生存数を測定することにより、本微生物製剤の急性毒性試験を調査した。その結果は次の表に示すように、死亡したデバスズメダイはなく、本製剤の急性毒性は認められない。

表2.1.1 デバスズメダイの生存におよぼすフォーミュラ1の影響（7日間の短期試験）

	死亡数（尾）	生残数（尾）	生残率（%）
対照区	0	10	100
試験区	0	10	100

2. アユの稚魚に対するフォーミュラ1の投与試験

各試験区に20尾の稚アユ（平均体長約8cm、体重約5g）を100ℓの淡水（地下水）中で7日間飼育することによって行った。飼育中の飼育温度は19～20℃の恒温で、給餌は朝、昼、晩の3回に分けて行った。用いたフォーミュラ1の量は、試験区では餌に対して0.1%になるように餌に添加したものであるが、対照区には本製剤を添加しない餌を与えた。飼育開始後7日目の稚アユの生存数を測定することにより本製剤の急性毒性試験を調査した。その結果は次の表に示すように、死亡した稚アユはなく、本製剤の急性毒性は認められない。

表2.1.2 アユ稚魚の生存におよぼすフォーミュラ1の影響（7日間の短期試験）

	死亡数（尾）	生残数（尾）	生残率（%）
対照区	0	20	100
試験区	0	20	100

長期試験の結果

アユの稚魚に対するテラザイムの投与試験

実際に油処理のための野外試験に使用するテラザイム（フォーミュラ1の100倍希釈製剤）の稚アユの生存に対する影響を30日間の長期飼育試験で調べた。この試験では各試験区に20尾の稚アユ（平均体長約8cm、体重約5g）を80ℓの淡水（地下水）中で30日間飼育することによって行われた。飼育中の飼育温度は19～20℃の恒温で、給餌は朝、昼、晩の3回に分けて行った。用いたテラザイムの量は、試験区では餌に対して0.1%になるように餌に添加したものであるが、対照区には本製剤を添加しない餌を与えた。飼育開始後30日目の稚アユの生存数を測定することにより本製剤の亜急性毒性を調べた。その結果は表2.1.3.に示すように、両区において、供試魚の死亡が認められた。しかしながら、本製剤を使用した区の死亡数は対照区のそれよりも少なかった。その上、死亡した全数のアユを解剖し、内臓の異常があるかどうかを観察してみたが、両区の死亡魚にその異常所見は全く認められなかった。

表2.1.3 アユ稚魚の生存に対するテラザイムの影響（30日の長期試験）

	死亡数（尾）	生残数（尾）	生残率（%）
対照区	5	15	75
試験区	4	16	80

微生物製剤に対する安全性の評価

短期試験の結果からフォーミュラ1の急性毒性はないと判断できる。なお、魚体表面などに特に異常も認められなかった。長期試験においては両区とも供試魚の死亡が見られた。しかしながら、その数は試験区は対照区のそれよりも少なく、また、全死亡魚の解剖を行った結果、異常は全く認められなかった。しかも、試験魚の死亡した日は最初の1週間に集中していた。さらに、魚体表面に特に異常は見られなかった。試料製剤に毒性がある場合、供試魚に内出血に伴う椎骨の異常湾曲の発症があると言われているが（西内1973）、そのような出血・椎骨の異常湾曲の発症は認められなかった。したがって、試験魚の死亡の原因は供試製剤の影響というよりは、飼育環境の変化によるショックに起因した死亡ではないかと推測される。以上のことから、本製剤の亜急性毒性に関しても、認められないと判定された。

謝辞：本文の御校閲を賜った熊本県立大学堤助教教授ならびに本実験にご協力をいただいた日本クロレラ株式会社織田部長に深謝します。

引用文献

西内康浩(1973) 農薬製剤の数種淡水動物に対する毒性—XIV、水産増殖 20, 59-67

2. 油処理用微生物製剤の生物に対する安全性

2.2 海産無脊椎動物の発生に対する安全性 —ウニの発生実験による評価—

堤 裕昭 (熊本県立大学 生活科学部)

はじめに

海上で油流出事故が発生した場合、その流出油の多くは、化学油処理剤と呼ばれる薬剤で処理される。その薬剤には、油処理剤、油ゲル化剤、抗乳化剤、集油剤などが含まれる。その中でもっとも広く用いられているのが油処理剤で、パラフィン系の炭化水素溶剤と約20%の界面活性剤を含むものがある (cf. 藤井1992)。この作用は油を界面下へ懸濁分散させるものである。この油処理剤の使用に当たっては、そのもの自体の魚類への毒性 (Mori et al. 1984)、油と反応して乳化油となった場合の魚類や海産生物への毒性 (Mori et al. 1983, 1984, Baker et al. 1984) などが指摘され、一方で微生物による流出油の分解を促進する効果が認められるなどの指摘もあり (Nagy et al. 1984, Linden & Rosemarin 1985)、その使用の是非が問われている。

本研究においては、カナダ環境省およびアメリカ環境保護庁で、近年、海水の生物検定法に用いられているウニ卵の受精実験を、ラッパウニ (*Toxopneustes pileolus*) の卵を用いて行い (小林直正1997)、油処理剤の水生生物への影響を調査した。この実験では、早春から夏季にかけて海岸に棲息する生物が盛んに繁殖を行っているときに、油流出事故が発生し、そこに事故処理の手段として大量の油処理剤 (パラフィン系の炭化水素溶剤) が投入された場合を想定して、その時に、油処理剤使用が棲息する生物の発生にどのような影響を及ぼすのかということに注目した。また、従来の油処理剤より生物に対する毒性が少ないとされる微生物の活性を利用した油処理剤 (微生物系油処理剤)、ならびに界面活性剤を用いた油処理剤もあるので、その代替品として、界面活性剤の含有量がほぼ等しい家庭用洗剤を使用して実験を行い、その生物の発生への影響を比較した。

材料と方法

実験に使用したラッパウニは、熊本県天草郡苓北町の富岡湾の海底から採集した。実験は、海水に家庭用中性洗剤 (界面活性剤が約20%含まれている)、油処理剤 (パラフィン系の炭化水素溶剤、香住町で使用された処理剤と同じものを入手した)、微生物系油処理剤 (テラザイム、オッペンハイマーバイオテクノロジー社) を、それぞれコントロール (0ppm)、1ppm、5ppm、10ppm、50ppm、100ppm の濃度に調整した。これらの溶液を300 ml のビーカーに取り、その中に多数のラッパウニの卵子を入れ、精液を1滴加えて受精実験を行った。受精の操作から少なくとも5分後以降に、各ビーカーから卵子を取り出してスライドグラスにマウントし、顕微鏡下において卵100個当たり受精膜を形成した卵の個数を計数し、この操作を4回行い、その平均値を卵の受精率データとして用いた。これらの実験作業は熊本県立大学生生活科学部食

物栄養学科1年生の生物学実験受講者27名の協力を得て、本学部の実験室で1997年7月14日に行った。

結果

実験結果を表2.2.1に示した。各実験の平均値について分散分析(ANOVA)を行い、Scheffe's Fの方法によってそれらの平均値の差の有意性を検定した(表2.2.2、図2.2.1)。コントロールの海水中では、平均で95%の卵で受精が見られた。これに対して、100ppm溶液ではコントロールに対して、すべての溶液で受精率の有意な低下がみられた(ANOVA, $P < 0.01$)。しかしながら、テラザイム溶液の卵の受精率は68%に達しているのに対して、家庭用中性洗剤および油処理剤の受精率は、それぞれ0%、4%にとどまり、テラザイム溶液と他の溶液の間に受精率の大きな差が見られ、統計学的にも有意であった($P < 0.01$)。

50ppm溶液では、テラザイム溶液の受精率が80%に達し、コントロールの受精率との間に統計学的に有意な差がみられなかった(ANOVA, $P = 0.24$)。油処理剤の受精率も13%に増加したが、家庭用中性洗剤の

表2.2.1 ウニの卵100個あたりの受精卵の数

	受精率 (%)		受精率 (%)		
	コントロール	濃度	中性洗剤	油処理剤	テラザイム
	93		0	0	86
	98		0	4	42
	93		0	6	76
	97		0	6	67
平均値	95	100ppm	0	4	68
			0	0	95
			4	22	60
			1	13	93
			0	18	71
平均値		50ppm	1	13	80
			0	23	96
			7	41	90
			14	40	95
			2	59	86
平均値		10ppm	6	41	92
			0	78	92
			23	46	93
			48	59	94
			9	60	89
平均値		5ppm	20	61	92
			93	96	96
			68	59	95
			76	75	95
			89	80	97
平均値		1ppm	82	78	96

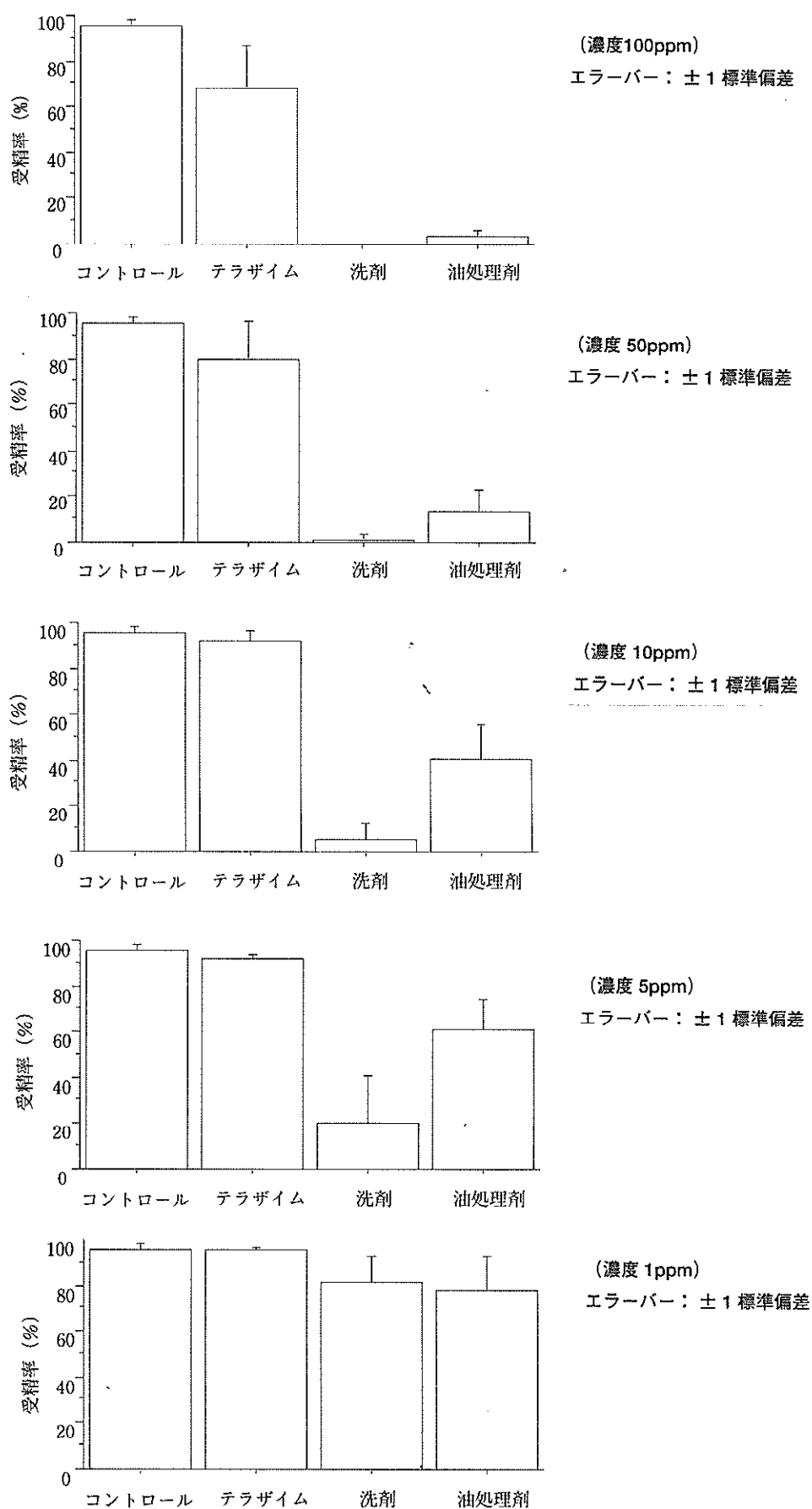


図 2.2.1 各濃度の溶液中におけるラップパウニの卵の受精率

Scheffe : 濃度100ppm

効果 : 薬品

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
コントロール, テラザイム	27.500	21.952	.0132	S
コントロール, 洗剤	95.250	21.952	<.0001	S
コントロール, 油処理剤	91.750	21.952	<.0001	S
テラザイム, 洗剤	67.750	21.952	<.0001	S
テラザイム, 油処理剤	64.250	21.952	<.0001	S
洗剤, 油処理剤	-3.500	21.952	.9649	

Scheffe : 濃度50ppm

効果 : 薬品

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
コントロール, テラザイム	15.500	22.699	.2351	
コントロール, 洗剤	94.000	22.699	<.0001	S
コントロール, 油処理剤	82.000	22.699	<.0001	S
テラザイム, 洗剤	78.500	22.699	<.0001	S
テラザイム, 油処理剤	66.500	22.699	<.0001	S
洗剤, 油処理剤	-12.000	22.699	.4365	

Scheffe : 濃度10ppm

効果 : 薬品

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
コントロール, テラザイム	3.500	19.269	.9495	
コントロール, 洗剤	89.500	19.269	<.0001	S
コントロール, 油処理剤	54.500	19.269	<.0001	S
テラザイム, 洗剤	86.000	19.269	<.0001	S
テラザイム, 油処理剤	51.000	19.269	<.0001	S
洗剤, 油処理剤	-35.000	19.269	.0008	S

Scheffe : 濃度5ppm

効果 : 薬品

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
コントロール, テラザイム	3.250	28.544	.9866	
コントロール, 洗剤	75.250	28.544	<.0001	S
コントロール, 油処理剤	34.500	28.544	.0167	S
テラザイム, 洗剤	72.000	28.544	<.0001	S
テラザイム, 油処理剤	31.250	28.544	.0304	S
洗剤, 油処理剤	-40.750	28.544	.0053	S

Scheffe : 濃度1ppm

効果 : 薬品

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	p値	
コントロール, テラザイム	-.500	22.120	.9999	
コントロール, 洗剤	13.750	22.120	.3051	
コントロール, 油処理剤	17.750	22.120	.1352	
テラザイム, 洗剤	14.250	22.120	.2777	
テラザイム, 油処理剤	18.250	22.120	.1212	
洗剤, 油処理剤	4.000	22.120	.9501	

表 2.2.2 4つの実験設定間において、溶液の濃度別にラッパウニの卵の受精率に関して、分散分析による有意差の検定を行った結果。S：危険率5%で統計学的有意差があることを示している。

受精率 (1%) との間に統計学的な有意差は見られず (ANOVA, $P=0.44$)、共にコントロールに対して著しく低い値にとどまった。

10ppm 溶液ではテラザイムの受精率が 92% に達し、コントロールの受精率との差はわずか 3% にすぎなかった。油処理剤の受精率も 41% に増加したが、コントロールおよびテラザイム溶液とは、有意な差が見られた (ANOVA, $P<0.01$)。

5ppm 溶液でもテラザイムの受精率は 92% に達した。油処理剤および家庭用中性洗剤の受精率もそれぞれ 61%、21% に増加したが、コントロールおよびテラザイム溶液とはなお有意な差が見られた (ANOVA, $P<0.02$)。

1ppm 溶液では、いずれの実験でも受精率が 78% 以上の値を示した。コントロールに対して、いずれの溶液の場合も受精率に有意な差は見られなかった (ANOVA, $P>0.12$)。

考 察

日本で使用されている油処理剤は、近年、環境に配慮した改良が進み、世界的でもっとも低毒性と評価される製品が多い (徳田 1997a,b)。しかしながら、この実験における油処理剤を混ぜた溶液では、その濃度が 5ppm で、すでにウニの卵の受精率に影響が出ているのが見られた。濃度の増加とともに受精率は大幅に低下し、50ppm 以上の濃度では受精率は 13% 以下となった。このような濃度は流出油を処理する水域や海岸においては容易に到達する濃度であると考えられる。また、この実験では油処理剤の単独の効果を見たが、実際には処理して乳化した油との相乗効果で、毒性が単独使用の場合よりもかえって高くなる場合があることも指摘されている (Mori et al. 1983, 1984, Baker et al. 1984)。今回のナホトカ号からの流出重油の処理にあたって使用された油処理剤が、海産生物の初期発生に悪影響を及ぼしていたことは十分考えられることである。

テラザイムを混ぜた溶液では、濃度が 100ppm にも到達する条件下においても、なお 68% の受精を可能にしている。50 ppm 以下であれば受精率が 80% 以上に達し、コントロールとの受精率の差に統計的な検定差は見られなくなる。テラザイムのような微生物系の油処理剤は、油処理剤よりも生態系に大きな影響を及ぼすことなく、油の分解を促進する働きを持つものとして期待することができる。

引用文献

- Baker, J.M., Little, D. I., Wilson, C. M (1984) Comparison of the fate and ecological effects of dispersed and nondispersed oil in a wavrity of intetidal habitats. Astm. Spec. Tech. Publ., 239-279.
- 藤井孝 (1992) 流出油防除処理技術の現状と課題。JETI 40, 48-52.
- 小林直正 (1997) 環境汚染を調べる—ウニ卵による海水の生物検定。サイエンティスト社、p.83.
- Linden, O., Rosemarin, A., Lindskog, A., Hoglund, C., Johaohansson, S. (1985) Ecological effects of oil versus oil plus despersant on the littoral ecosystem of the Baltic Sea. Proc.1985 Oil Spil Conf., pp. 485-490.
- Mori, K., Kobayashi, K., Fujishima, T. (1983) Effects of the toxicity of mineral oil and solvent emulsifier upon the eggs of marine fish. Bull. Fac. Mie Univ. 10: 15-23.
- Mori, K., Kimura S., Aoki, K., Saito Y. (1984) Effects of the toxicity of mineral oil and solvent emulsifier upon the larvae and young of marine fish. Bull Fac. Fish. Mie Univ. 11:27-35.
- Nagy, E., Scott, B. F., 1984, Hart J.(1984) The fate of oil and oil-dispersant mixtures in freashwater ponds.Sci. Total Environ. Sci. Total Environ. 35: 115-133.
- 徳田拡士 (1997a) 日本海の重油流出事故に関する特集。水産海洋研究 61: 225-242.
- 徳田拡士 (1997b) 油処理剤の効用。海上防災 '97: 21-23.

3. 流出重油の微生物製剤による分解性

穂積豊治（昭和シェル石油株式会社）

微生物製剤によるナホトカ号からの流出重油の生分解性実験を実施し、分解能力を評価した。

実験材料

生分解性実験を行う培地として、完全合成培地を用いた。その成分は以下の通りである。

表 3.1 微生物製剤による流出重油の生分解性実験に用いた培地の成分

硫酸アンモニウム	0.6 g/l 又は 0.06 g/l	塩化コバルト	100 µg/l
硫酸マグネシウム	0.05 g/l	塩化ナトリウム	100,000 µg/l
0.1 mol リン酸緩衝液	3 ml/l	塩化カルシウム	100,000 µg/l
ほう酸	500 µg/l	硫酸マンガン	200 µg/l
硫酸銅	40 µg/l	モリブデン酸ナトリウム	200 µg/l
硫酸第一鉄	400 µg/l	蒸留水	1 l
硫酸重鉛	200 µg/l	pH (0.1N HCl)	7.0

微生物製剤 テラザイム（オッペンハイマーバイオテクノロジー社）

試験重油

ナホトカ号の船首部より抜き取った重油

C 重油（JIS 規格）

軽油（JIS 規格）

DITA（生分解試験標準物質）（Diisotridecyl Adipate）

試薬

四塩化炭素（特級、抽出用）、無水硫酸ナトリウム（特級）

器具及び機器

500 ml エレンマイヤーフラスコ、500 ml 分液ロート、FT-IR（VALOR-III、日本分光社）、

IATROSCAN TLC/FID Analyzer（NEW MK-5、ヤترون社）、恒温振とう培養器

実験方法

1. フラスコに 0.10 g の試験検体（C 重油、軽油、DITA）をそれぞれ正確に量り取る。ナホトカ号重油は 1.88 g を正確に量り取る。1 検体につき 3 つのフラスコを 1 組とする。
2. テラザイム 5.0 g を正確に量り、上記の各フラスコに加える。

3. スパーテルで良く混和し、水を加えた時に油滴が生じないように機械的に分散させる。
4. 培地 100 ml をそれぞれのフラスコに入れ、振とう培養器に設置する。
5. 培養器を 25 °C、150 rpm で 1 週間、2 週間、3 週間それぞれ培養する。
6. 培養後、培養液は 50 ml の四塩化炭素で 2 回抽出する。エマルジョンができた場合は、3,000 rpm で 10 分遠心分離し、四塩化炭素溶液を回収する。
7. 四塩化炭素溶液は無水硫酸ナトリウムで脱水した後、赤外分光器で定量測定をする。
8. 検量線は個々の検体を用い 2,950 cm⁻¹ で作成した。
9. ヤトロスキヤンは n-ヘキサン (100%)、トルエン (100%)、ジクロロメタン：メタノール (95:5) で順次展開し測定した。

実験結果と考察

テラザイムによる分解試験、イヤトロスキヤンによる試験油および処理残油の組成分析の結果を、それぞれ、表の 3.2 および 3.3 に示した。実験開始時の油の濃度は、各実験ともに 1,000ppm に調製されてい

表 3.2 テラザイムによる分解試験の結果 (平均値 ± S.D., n=3)

検体名	処理期間		1 週間		2 週間		3 週間					
ナホトカ号重油	888 ± 28ppm		11%	13%	766 ± 98ppm		23%	30%	655 ± 93ppm		35%	40%
C 重油	800 ± 100ppm		20%	23%	777 ± 88ppm		22%	33%	664 ± 146ppm		34%	47%
軽油	428 ± 111ppm		57%	68%	282 ± 71ppm		72%	76%	128 ± 13ppm		87%	80%
DITA	602 ± 29ppm		40%	59%	466 ± 43ppm		53%	74%	298 ± 78ppm		70%	81%

分解試験の培地中の硫酸アンモニウム濃度：上段 0.6g/l、下段 0.06g/l

表 3.3 イヤトロスキヤンによる試験油および処理残油の組成分析の結果

試験油の成分組成 (処理前)				
	飽和分	芳香族分	レジン分	アスファルテン分
ナホトカ号重油	15%	50%	17%	18%
C 重油	17%	40%	29%	14%
軽油	72%	28%		
試験油の成分組成 (処理後)				
	飽和分	芳香族分	レジン分	アスファルテン分
ナホトカ号重油	19%	51%	25%	5%
C 重油	16%	44%	32%	8%
軽油	75%	25%		

る。

テラザイムによる分解試験は、硫酸アンモニウム濃度が異なる2つの培地(0.6g/l、0.06g/l)で行った。数値から分かるように、硫酸アンモニウム濃度の違いによる分解率の著しい差は観察されなかった。ナホトカ号重油の方がC重油に比べて実験開始から1週間後で分解率が低いのは、含まれている軽質溜分の含量が少ないためと思われる。この事は軽油の方が重油に比べてはるかに良い分解率を示すことから裏付けられる。DITAはCECの生分解性試験に使用される標準物質である。CECの方法では150 mlの培地にDITAを7.5 mg加え、その分解が80%以上されることと規定しているが、本実験では他の検体との比較目的で100 mgのDITAを100 mlの培地に加え実施した。CECの濃度であれば完全に資化される。DITAは炭素鎖が分岐しており通常の直鎖化合物よりは分解が困難と理解されている、生分解性試験では通常数10から数100ppm以下の物質の分解を目標としている。本試験では評価試験の精度を上げるためにあえて1,000ppmの物質分解を、5.0 gのテラザイムで培地100 mlに対し実施した。5.0 gで期待される菌数は 5×10^7 個/ml未満である。この点ではCECの方法が $10^4 \sim 10^7$ 個/mlの細菌と規定しているが、これを著しく逸脱しているものではなく、本試験の結果が大幅に変わることは考えられない。

イヤトロスキャンによる成分分析の結果からテラザイムが最終的にはあらゆる石油成分の分解に効力を発揮することが示唆された。試験期間はCECの方法に基づき最長3週間としたが、時間と共に分解は進行しており、難分解性の重油でも時間と共にテラザイムによる分解が期待される。

ナホトカ号重油流出事故の概要

1997年1月2日に鳥取県隠岐島沖で沈没したロシアタンカー「ナホトカ号」から流出した重油は、1月9日未明および19～22日にかけて、但馬海岸に漂着した。その回収作業は、県、市町、漁業者に加えて、地元住民、消防団、ボランティア、自衛隊の協力のもと、積極的に実施された（事故発生の経過に関する詳細は、資料1, p.34を参照されたい）。しかしながら、沈没した船体にはまだ最大9,900klの重油が残存し、1日に3～14klずつ漏出していると推定される（1997年11月現在では、1kl以下とみられる）。漏出油は現場海域で拡散消滅しており、現時点では問題は起きていない。沈没船体の処理については、技術的、経済的観点から、早期に抜本的な処置ができない状況である。

地元における漂着重油の回収

「ナホトカ号」から流出した重油は、1月9日未明に香住町から豊岡市沿岸を中心に漂着した。まだ漂流している重油は県および漁業者が主体となって回収にあたり、海岸に漂着した重油は市町が主体となって回収作業を行い、いずれもひしゃくや手網等を用いた人海戦術によるものであった。油処理剤については、原則として海上では使用しないこととし、使用する場合は事前に漁業協同組合の了解を得ることとした。漂着重油については、2月中旬の時点で、目に見える範囲では概ね除去作業が完了したが、岩場あるいは砂浜の砂の中などには、なお油塊が付着、混入している場合が多くみられる状況であった。

微生物製剤を用いた漂着重油処理の試み

香住町の海岸においては、漂着した重油の分解を促進するために、漂着重油を微生物製剤を用いて処理する試みが、地元漁業共同組合の要請にオープンハイマートテクノロジージャパン社が協力するかたちで2月上旬より開始された。

29 神戸 1997年(平成9年)2月7日 金曜日 神戸

神戸

回収重油 香住で実験

バクテリアで分解

米の学者協力 町は効果に期待



岩場などにはからびついたロシアタンカーの漂着重油の回収に悩む城崎郡香住町で6日、微生物（バクテリア）に油を食わせる実験が、漁協などの支援で始まった。この微生物を閉じ込めた微生物製剤の樽が、米国のテキサス大名誉教授カール・オープンハイマーさんがボランティアで協力し、現場の無難な環境で使用法などを説明した。町対策本部は効果に期待を寄せている。

関係者によると、このバクテリアは油を分解して脂質に分解し、最後は水と二酸化炭素にまで分解した。この日、無雨且つ海が穏やかで、魚介類の発生はなかった。九〇年にメキシコ湾で発生した油流出事故で生態系に深刻な被害をもたらした。バクテリアは約十街、粘土状粉末一キロにバクテリア十億から一億個が含まれ、水をかけると活動する。町職員や香住海上保安隊長が立ち会い、寺川恒明、山田隆雄、組合長ら十数人が現場で実験を支援し、たわしでこするなどの作業を同時に繰り返した。岸壁に付いた油は油膜では数分後に油分がはがれた。見えていたのは「回収に困っていたから驚いた」。米国のバクテリアなどを使えば環境浄化技術の先進国とされる。知人の紹介で実験協力をしたオープンハイマーさんは「地元の方が苦労して作業する姿に感動した。ある程度の油を取り除いた後、へらる素手で取りにくい油の処理には効果があるはず」と語っていた。実験は当分の間、続けられる予定。

バクテリアを食った油をたわしでこする作業を見守るカール・オープンハイマーさん（城崎郡香住町の無雨環境で）

4. 流出原油の微生物製剤による現場分解実験

堤 裕昭 (熊本県立大学 生活科学部)・高井孝次 (富士包装株式会社)・
鴻野雅一 (オープンハイマーテクノロジージャパン)

はじめに

従来より、油流出事故によって汚染された地域における流出油の処理には、パラフィン系および界面活性剤系の油処理剤が広く用いられてきたが、これらに対しては、魚類への毒性 (Mori et al. 1984) の他、油と反応して乳化油となった場合の魚類や海産生物への毒性 (Mori et al. 1983, 1984, Baker et al. 1984) などが指摘されている。一方、この研究報告書で生物に対する安全性試験を行った油処理用微生物製剤 (フォーミュラー1、テラザイム、オープンハイマーバイオテクノロジー社) は、魚類に対する急性毒性および亜急性毒性の見地から何ら問題を見出すものではなかった (2.1 魚類に対する安全性、p.5-8)。むしろ、ウニの発生に及ぼす影響を評価する実験では、今回のナホトカ号からの重油流出事故による汚染処理に用いられたパラフィン系の油処理剤よりも生物の発生に対する影響が明らかに少ないという結果を得ている (2.2 海産無脊椎動物の発生に対する安全性、p.9-14)。また、ナホトカ号からの流出重油が漂着した兵庫县城崎郡香住町において、漂着油の回収作業に従事した地元漁業共同組合の関係者からの私信では、油処理用微生物製剤を水に溶いて漂着油に振りかけた後、数日後には、漂着油が固化して回収作業がきわめて容易になったという報告も得ている (資料 2, p.35)。

そこで、この油処理用微生物製剤の漂着油処理に対する効果を科学的な研究手法にもとづいて明らかにすることと、将来の油流出事故に伴う汚染に備えて、より効果の高い対策法を再検討することを目的として、ナホトカ号から流出した重油が漂着して汚染した兵庫县城崎郡香住町の海岸において、汚染された自然石および漂着した重油を塗ったコンクリート・ブロックを用意し、それらに油処理のために開発された微生物製剤を振りかけて、重油汚染の現場における分解実験を行い、微生物製剤の重油分解促進効果について検証した。

実験地

実験は兵庫县城崎郡香住町無南垣の海岸において、海に向かって大きな岩の右側に実験区、左側にコントロール区を設定した (図 4.1)。双方の区域は大きな岩を隔てて約 50 m の距離にあり、このような場所を実験地として選んだのは、双方の区域の間で直接的に海水が交流しないように配慮したためである。

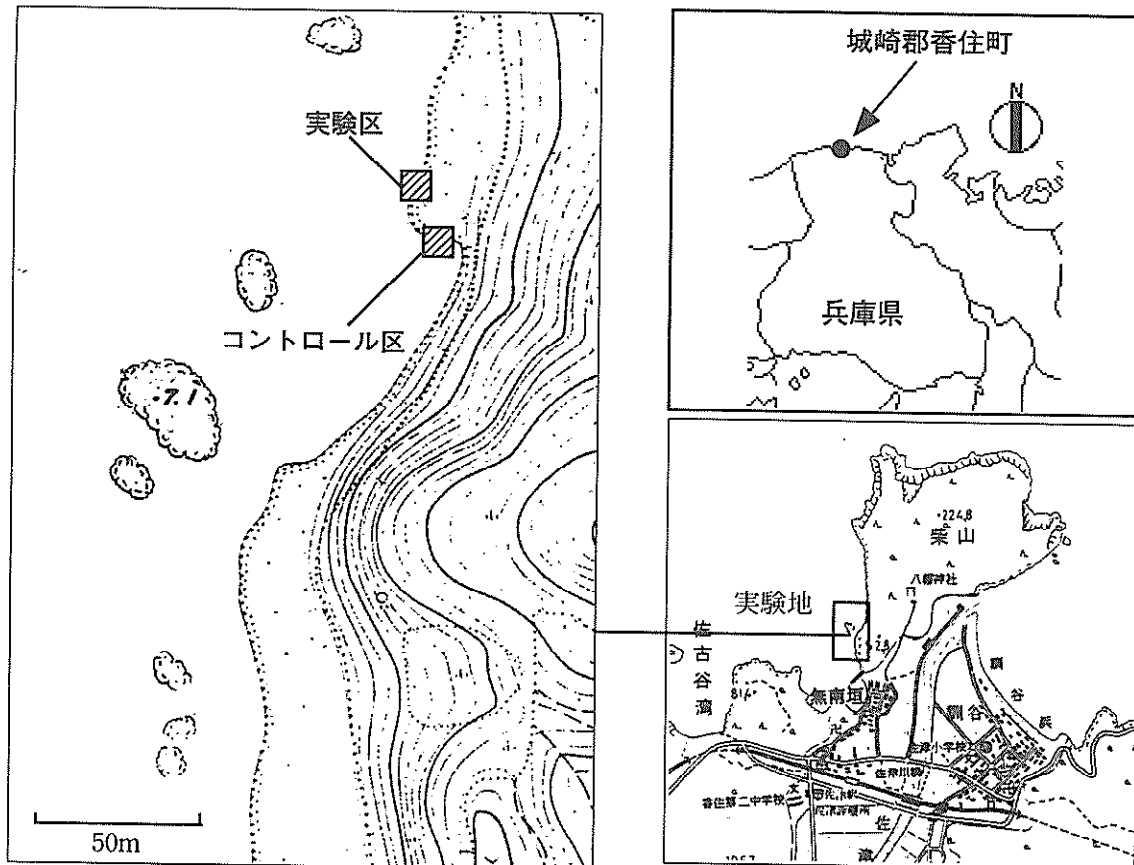


図 4.1 実験地（兵庫县城崎郡香住町無南垣の海岸）

材料と方法

実験地の海岸周辺において、ナホトカ号から流出した重油が付着した自然石の中で比較的表面が平面なものを6個採取するとともに、同じ重油を厚さ約1mmになるように塗ったコンクリート・ブロック（20 x 20 cm）を4個用意した。それぞれの自然石およびコンクリート・ブロックをプラスチック製のバスケット（内径620 x 420 x 320 mm）に入れて、半数を実験区、残りの半数をコントロール区の海岸に、渚線から沖合いの方向へ約2mの海水の浸かる場所に設置した。これらのバスケットは、それぞれ周囲を現場にあった石で囲んで固定した（図4.2）。

実験は1997年7月9日～9月4日までの8週間にわたって行った。毎週1回の割合で、実験区およびコントロール区の双方で自然石およびコンクリート・ブロックを入れたバスケットを岸の陸側に引き上げて約1時間放置し、水切りをした後、真上から捉えるようにして自然石およびコンクリート・ブロックの上面を写真撮影をした。実験区においては、油処理のために開発された微生物製剤（テラザイム、オッペンハイマーバイオテクノロジー社）を、毎週1回、自然石およびコンクリート・ブロックの上面の面積あたり100 g/m²の割合で振りかけた。写真撮影および微生物製剤による処理を終えた後、これらの自然石およびコンクリート・ブロックを入れたバスケットは再び同じ場所に戻して、周囲を石で固定し、次の調査時まで放置した。なお、実験期間中における気象および水質データを付表4.1（p.27）に、実験の作業記録を付表4.2（p.28）にそれぞれ示した。

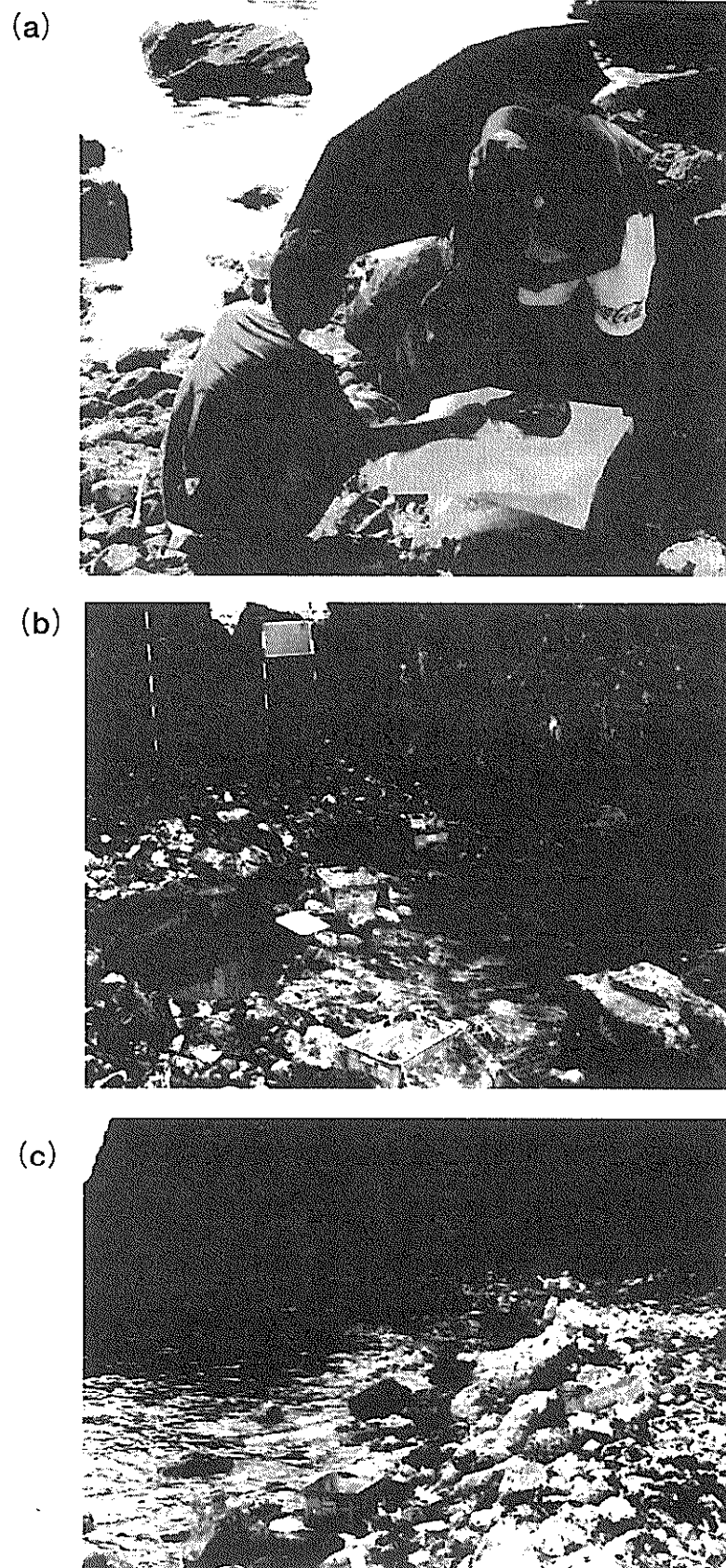


図 4.2 実験を行った海岸（兵庫縣城崎郡香住町無南垣）

(a) 実験中の自然石を撮影している。(b) 実験区 (c)コントロール区

撮影した実験区およびコントロール区の自然石およびコンクリート・ブロックの写真は、イメージスキャナー（EPSON GT6500ART2）を通して、画像処理ソフトウェア（Adobe Photoshop Ver. 3.0）を用いてパソコン（Apple Macintosh 7300/166）に読み込み、さらに画像解析用ソフトウェア（NIH Image Ver. 1.60）を用いて自然石およびコンクリート・ブロックを覆う重油の面積を計測した（図 4.3）。面積の算出法の詳細は以下の通りである。

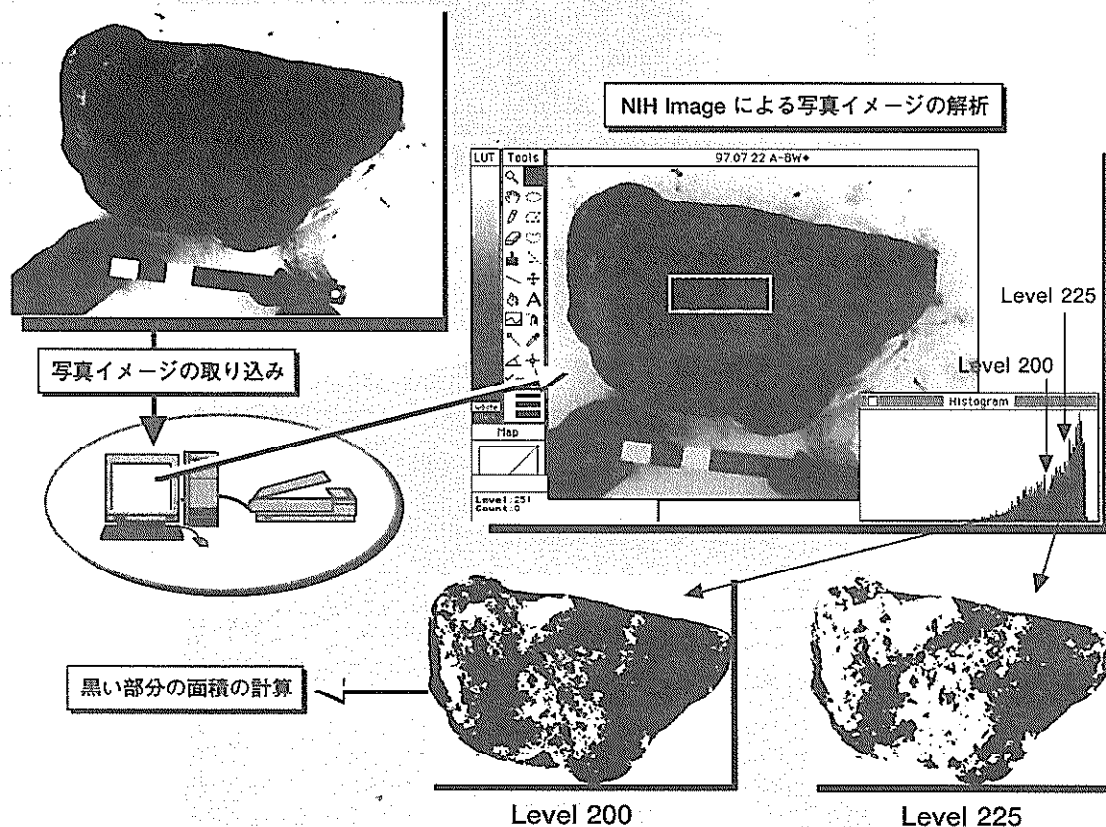


図 4.3 写真画像の取り込みと画像解析による重油に覆われた面積の測定手順

画像解析手順

1. 写真をイメージスキャナーを用いてコンピュータに取り込み、256階調のモノクロの画像ファイルを作成する。
2. この画像ファイルを NIH Image を用いて、モノクロ 256 階調の明暗の度合いによって 3 段階にわけて表示し、それぞれの面積を測定する。

第 1 段階はもともとの基質の色を呈している場所 (bare area) で、第 3 段階は重油が付着して黒色を呈している場所 (black area) である。中間の第 2 段階は、微生物製剤による処理の結果もしくは自然に浄化された結果、重油がはぎ取られていく過程の途上で、まだ薄く汚れている場所 (gray area) である。これら 3 段階の場所の明暗の境界は、撮影時の光条件や背景となる自然石およびコンクリート・ブロックの地色によって、写真ごとに異なる。図 4.3 の例では、画像の濃さのレベルで 200 と 225 のところ明暗の

境界にあり、225 以上を黒色の場所 (black area)、200 ~ 224 の範囲を灰色の場所 (gray area)、200 未満を基質の色を呈している場所 (bare area) と見なして、それぞれの面積を測定した。

解析結果と考察

現場実験を行った自然石およびコンクリート・ブロックの表面について、それらの写真の画像解析結果を図 4.4 に示した。また、画像解析のもととなった写真の一部を図 4.5 および 4.6 に収録するとともに、付表 4.3 および 4.4 (p.29-30) に画像解析の原データを示した。

自然石およびコンクリート・ブロックのいずれにおいても、コントロール区よりも実験区の方で重油に覆われて黒色を呈した部分 (black area) の面積が早く減少した。図 4.4 (a) に示したように、black area の被度は実験開始から 4 週間を経た 1997 年 8 月 6 日には、実験区の自然石では 67%、38%、50%であったのに対して、コントロール区では 66%、82%、71%に達していた。この傾向は、重油をコンクリート・ブロックの表面に塗った実験ではさらに顕著で (図 4.4 (b))、実験開始から 4 週間後には、それぞれ実面積が 400cm² から 13cm²、139 cm² に、被度では 3%、35%まで減少した。その後もコンクリート・ブロックを用いた実験のコントロールでは、200 cm² を越える面積が覆われたままとっていたのに対して、微生物製剤を散布した実験区では 50 cm² に満たない値が記録された。

流出油のバイオレメディエーションに関しては、1989 年にアラスカで起きたタンカー事故に伴う大規模な油の流出に対して、その処理に用いられて好成績を上げて以来、注目されるようになってきた (Braggs et al. 1992)。しかしながら、この適用例を含めて、多くの場合、用いられたものは自然界に存在する特定の油分解作用を持つ細菌類の成長を促す栄養剤であり、今回の実験で行ったような微生物の複合体のような製剤を直接岩に付着した重油の塊に振りかけることはなされていない。その効果の程については、この

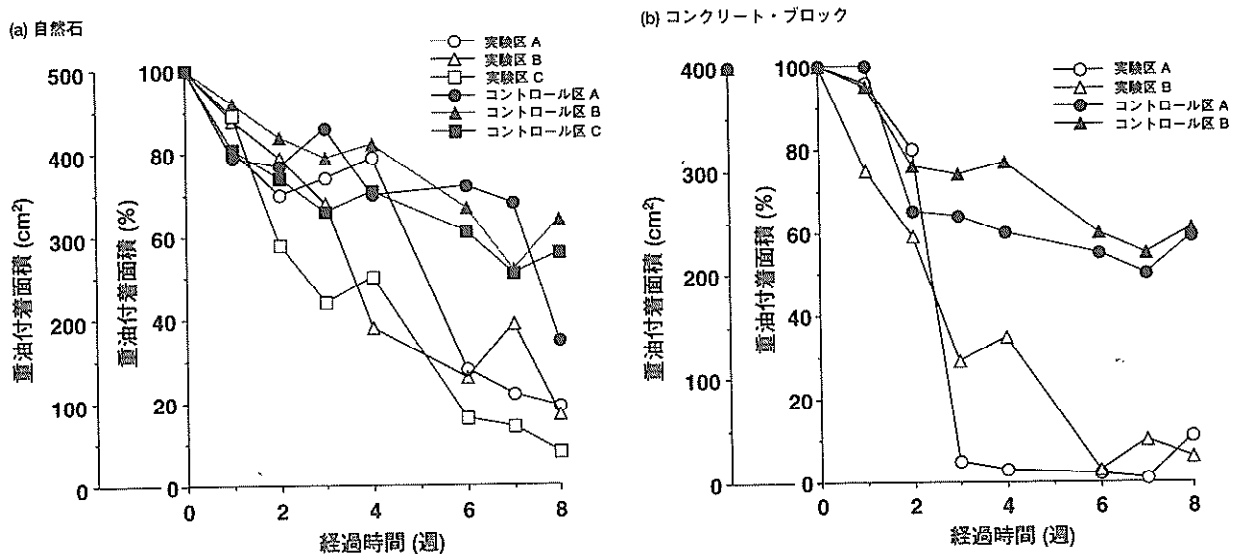


図 4.4 実験区およびコントロール区に設置した (a) 自然石および (b) コンクリート・ブロックの表面で、重油に厚く覆われて黒色を呈している部分 (black area) の面積および被度の変化

実験結果が示すかぎり、実験を行った2ヶ月間のうちに基質を覆う重油をすべて分解するようなものではなかった。しかしながら、コントロールと比較すれば、ある程度、油の分解を促進する効果を望むことができると考えられる。入手可能な学術文献としては、同種の微生物製剤を用いた研究例を見出すことができなかった。テラザイムに関しては、オープンハイマーフォーミュラとしてEPA（アメリカ環境保護庁）の「NCP（国家緊急計画）製品目録」に登録されているものである（資料3-4, p. 36-37）。

流出した油が漂着したような海岸で、油の除去にあたる場合、結局は手作業で漂着油の塊を取り除くことになるのであるが、資料2で示したように、この実験で用いたテラザイムを漂着油に振りかけると表面の粘着性が変化し、容易に基質から剥がれやすくなることが指摘されている。このような効果も、現場作業の重労働を軽減する上では、利用価値のある効果の1つに挙げることができる。

引用文献

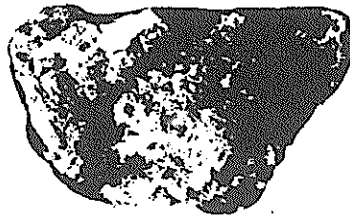
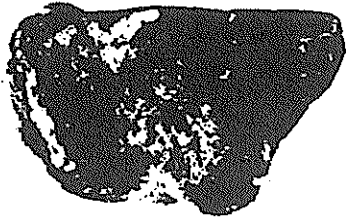
- Baker, J.M., Little, D. I., Wilson, C. M (1984) Comparison of the fate and ecological effects of dispersed and nondispersed oil in a wavrity of intetidal habitats. Astm. Spec. Tech. Publ., 239-279.
- Braggs, J. R. (1992) Bioremediation for shoreline cleanup following the 1989 Alaska oil spill. Exxon Company, Huston, 94pp.
- Mori, K., Kobayashi, K., Fujishima, T. (1983) Effects of the toxicity of mineral oil and solvent emulsifier upon the eggs of marine fish. Bull. Fac. Mie Univ. 10: 15-23.
- Mori, K., Kimura S., Aoki, K., Saito Y. (1984) Effects of the toxicity of mineral oil and solvent emulsifier upon the larvae and young of marine fish. Bull Fac. Fish. Mie Univ. 11:27-35.

(撮影日) 97年7月9日

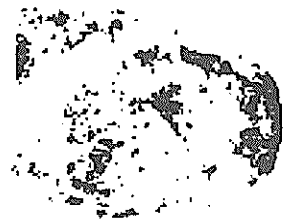
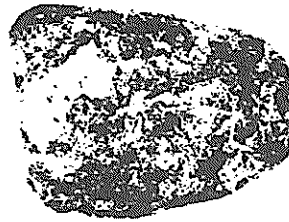
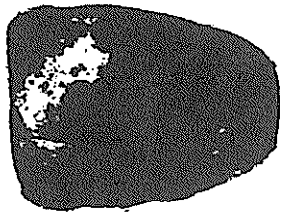
97年8月6日

97年9月4日

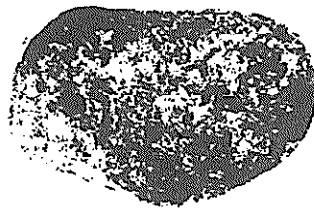
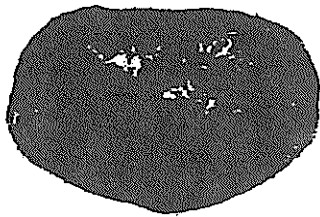
(実験区 A)



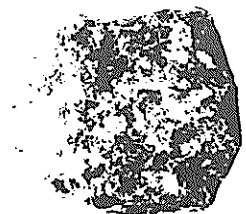
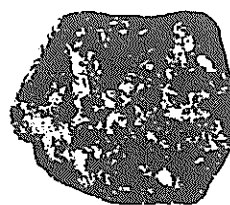
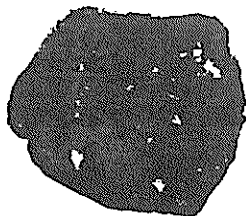
(実験区 B)



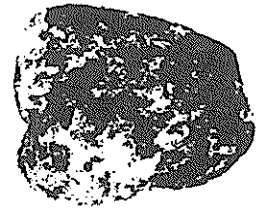
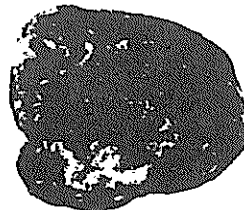
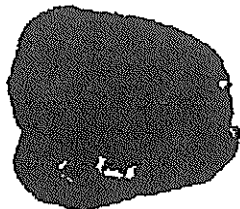
(実験区 C)



(コントロール区 A)



(コントロール区 B)



(コントロール区 C)

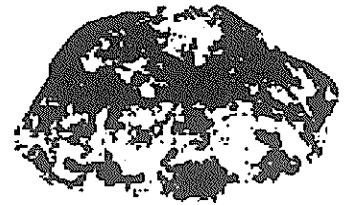
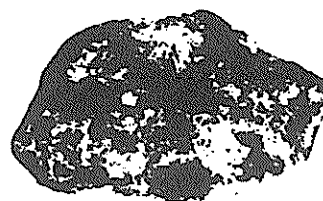
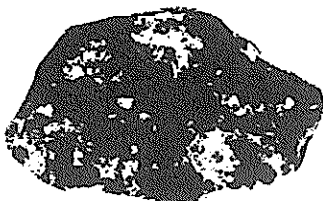


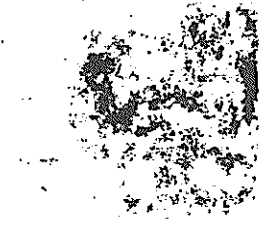
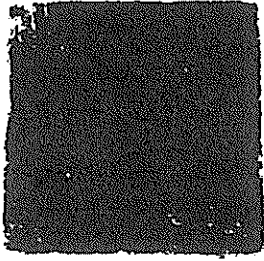
図 4.5 実験区およびコントロール区において、自然石に重油が厚く付着したの表面 (black area) の変化

(撮影日) 97年7月9日

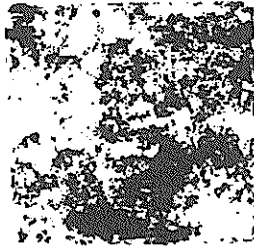
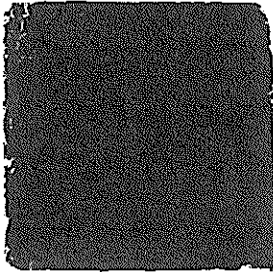
97年8月6日

97年9月4日

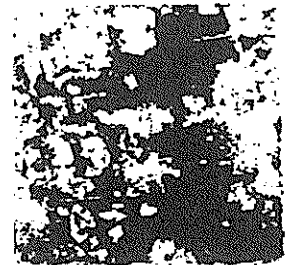
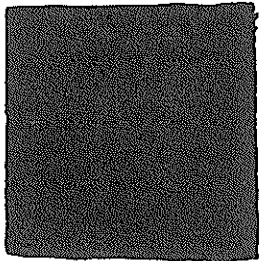
(実験区 A)



(実験区 B)



(コントロール区 A)



(コントロール区 B)

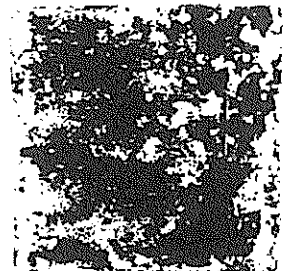
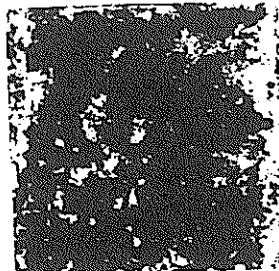
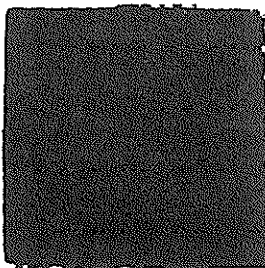


図 4.6 実験区およびコントロール区において、コンクリートブロックに塗った重油が厚く付着している表面 (black area) の変化

月	日	香住	香住	香住	香住	但馬	但馬	但馬	但馬	但馬	但馬
		気温 (平均) ℃	風速 (平均) m/s	降水量 mm	日照時間 h	雲量 0~10	風力 0~12	波浪 0~9	水温 ℃	塩分 %	日射量 MJ/m ²
7	9	21.2	0.6	28		10	0	1	22.6	33.05	4.93
	10	21.4	0.4	19		10	0	1	22.6	33.10	4.37
	11	22.0	0.5	7		10	0	1	22.7	32.85	3.87
	12	22.4	0.8	93		10	2	1	22.5	33.58	2.12
	13	23.0	0.5	25	0.7	10	0	1	22.8	31.80	9.92
	14	23.7	1.0		0.3	10	1	1	23.0	31.00	13.48
	15	24.9	1.0		0.7	10	1	1	23.2	32.55	10.28
	16	24.6	2.0	1	2.9	7	1	1	23.6	32.25	14.94
	17	21.9	1.5	71		10	1	1	23.8	31.75	3.11
	18	21.3	2.2		11.4	3	0	1	23.7	31.25	29.18
	19	21.4	2.2		13.1	1	3	2	23.6	31.80	28.78
	20	23.7	2.1		9.2	7	0	1	23.9	31.80	25.02
	21	24.9	2.1		6.8	10	0	1	23.9	32.15	24.30
	22	24.6	2.0		11.2	3	1	1	24.1	32.40	25.74
	23	25.4	1.7		11.5	4	2	1	24.5	32.15	25.29
	24	26.0	1.9		12.6	1	2	1	25.4	32.05	26.93
	25	27.6	2.0		9.5	0	4	1	24.4	32.70	25.56
	26	25.0	2.8	43		10	0	2	24.2	32.90	2.50
	27	25.9	3.5	1		9	5	1	23.7	33.05	10.21
	28	22.9	0.4	2		10	0	1	23.5	32.20	4.37
	29	23.6	0.5	6		10	1	1	23.6	32.05	4.70
	30	24.0	1.2	1	4.5	9	1	1	23.0	32.20	18.86
	31	24.7	1.5		3.2	4	1	1	24.0	32.65	17.08
8	1	25.9	1.4		6.0	2	1	1	24.3	32.50	17.06
	2	26.6	1.7		8.1	4	0	1	24.8	32.25	21.82
	3	27.2	1.7	1	8.9	8	0	1	24.7	32.45	24.37
	4	26.9	1.6	5	5.7	3	1	1	24.9	32.50	18.72
	5	23.2	0.6	34		10	0	2	26.6	30.75	1.73
	6	24.7	0.8	29	2.4	10	0	1	25.7	30.70	
	7	24.5	0.8	3	0.2	10	0	1	25.3	32.00	4.34
	8	29.0	1.2		10.1	4	3	1	25.7	31.80	24.98
	9	31.6	2.3		7.9	4	3	2	26.2	31.50	22.34
	10	30.0	0.8		5.7	4	1	1	26.2	32.20	20.32
	11	28.9	1.1		7.3	2	2	1	26.5	31.75	17.89
	12	26.5	1.2		0.8	9	0	1	26.3	31.90	11.65
	13	23.8	0.4	85		10	2	1	26.0	31.70	4.46
	14	24.2	1.6	2	1.0	10	3	1	26.0	31.10	13.37
	15	24.0	1.8		0.3	10	3	2	25.8	31.50	9.00
	16	23.9	1.5	9	4.0	10	2	1	25.5	32.10	16.33
	17	25.7	1.5		9.0	2	2	1	25.6	32.30	22.61
	18	27.5	1.6		6.4	7	3	1	25.5	32.45	19.55
	19	27.4	0.9		8.0	4	3	1	25.6	32.45	20.57
	20	26.5	2.0		9.7	9	2	2	25.9	32.30	23.20
	21	26.6	1.6		8.1	4	2	1	26.6	31.75	21.24
	22	26.8	1.9	1	7.2	3	1	1	26.4	32.20	19.69
	23	25.4	1.7		11.2	2	2	1	26.4	32.10	24.89
	24	24.4	2.3		11.6	0	0	1	26.9	31.90	23.85
	25	23.3	2.3	15	4.0	10	4	2	26.7	31.50	16.40
	26	22.8	2.3		10.6	3	2	2	26.5	32.00	21.42
	27	22.8	2.5		11.7	4	1	1	26.5	32.10	23.98
	28	23.1	2.0		11.2	0	1	1	26.3	32.00	23.11
	29	25.6	2.0		7.9	4	0	1	26.2	32.00	20.21
	30	25.0	1.8		10.1	10	2	1	26.6	32.05	21.44
	31	25.1	1.8		3.8	8	1	1	26.8	32.10	16.60
9	1					5	0	1	27.2	32.00	20.90
	2					4	0	1	27.4	32.00	21.73
	3					10	0	2	27.6	32.00	3.76
	4					7	3	3	26.5	31.70	18.45

付表 4.1 微生物製剤による重油分解実験の期間中における気象および水質データ
 香住：兵庫県気象月報より（神戸海洋気象台監修、財団法人日本気象協会神戸支部）
 但馬：但馬栽培漁業センター 定置観測野帳より

付表 4.2 微生物製剤による重油分解実験の作業記録

月日	曜日	製剤散布 回数	写真撮影	天気	水温	水位	波	時間	作業内容、コメント	作業者
7/9	水	1回目	○	雨	24.0	高		16:00～	・撮影、実験開始 ・散布後はバスケットに戻さず、そのまま陸に揚げておく	小林、鴻野
7/10	木	×	×	曇				10:00～	・石、コンクリをバスケットに戻す	鴻野
7/15	火	2回目	1週目	曇	25.0	少々高		15:00～ 16:00～	・石、コンクリをバスケットから取り出す ・撮影 ・散布後はバスケットに戻さず、そのまま陸に揚げておく	高井、鴻野
7/16	水	×	×	晴	26.0	高		10:00～	・石、コンクリをバスケットに戻す	鴻野
7/22	火	3回目	2週目	晴	29.0			13:30～ 14:30～	・石、コンクリをバスケットから取り出す ・撮影 ・散布後はバスケットに戻す	高井、鴻野
7/25	金	×	×	晴	28.0		おだやか	10:30～	・石、コンクリをバスケットから取り出し、小屋に移す（台風接近のため）	鴻野
7/30	水	4回目	3週目	晴	27.0			16:00～	・撮影 ・散布後はバスケットに戻す	高井、鴻野
8/6	水	×	4週目	曇/雨	27.0	高		15:00～ 16:00～	・石、コンクリをバスケットから取り出す ・撮影 ・付近の油膜がひどい	高井、鴻野
8/8	金	×	×					16:00～	・石、コンクリをバスケットから取り出し、陸に揚げておく（台風接近のため）	高井
8/13	水	×	×	雨	26.5		きつい	15:00～	・大雨のため撮影不可能 ・石、コンクリをバスケットに戻す	鴻野、坊博
8/20	水	5回目	6週目	晴	30.5	少々高		14:30～ 15:30～	・石、コンクリをバスケットから取り出す ・撮影 ・散布後はバスケットに戻さず、そのまま陸に揚げておく	高井、鴻野
8/21	木	×	×	晴	28.0			9:30～	・石、コンクリをバスケットに戻す	鴻野
8/28	木	6回目	7週目	晴	30.0	低		9:00～ 16:00～	・石、コンクリをバスケットから取り出す ・撮影 ・散布後はバスケットに戻す	山本、小林、鴻野
9/4	木		8週目	晴	28.0	高	きつい	11:00～ 14:00～	・石、コンクリをバスケットから取り出す ・撮影、実験終了	高井、鴻野

付表 4.3 微生物製剤による重油分解実験の結果 (自然石)

自然石	Black Area (cm ²)						Gray Area (cm ²)						Bare Area (cm ²)											
	実験区		コントロール		実験区		コントロール		実験区		コントロール		実験区		コントロール		実験区		コントロール					
	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-				
実験期間	272	265	345	330	464	363	272	265	345	330	464	363	272	265	345	330	464	363	272	265	345	330	464	363
0	229	244	335	311	415	282	0	0	0	0	0	0	43	21	10	19	49	81	43	21	10	19	49	81
1	186	232	306	246	427	293	47	0	0	0	13	22	39	33	39	84	24	48	39	33	39	84	24	48
2	160	210	201	238	391	270	48	28	121	52	27	0	64	27	23	40	46	93	64	27	23	40	46	93
3	170	180	153	268	368	240	37	62	132	17	22	0	65	23	60	45	74	123	65	23	60	45	74	123
4	182	100	173	217	379	259	28	136	132	47	30	0	62	29	40	66	55	104	62	29	40	66	55	104
5	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
6	64	69	54	224	313	222	97	127	254	30	93	0	111	69	37	76	58	141	111	69	37	76	58	141
7	50	103	47	210	240	184	107	66	213	39	139	0	115	96	85	81	85	179	115	96	85	81	85	179
8	44	46	29	109	298	204	114	82	276	106	104	0	114	61	40	115	81	159	114	61	40	115	81	159
9	62	40	57	129	226	178	77	67	191	39	115	0	133	158	97	162	123	185	133	158	97	162	123	185

自然石	Black Area (%)						Gray Area (%)						Bare Area (%)											
	実験区		コントロール		実験区		コントロール		実験区		コントロール		実験区		コントロール		実験区		コントロール					
	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-	-A-	-B-				
実験期間	84	92	97	94	89	78	0	0	0	0	0	0	16	8	3	6	11	22	16	8	3	6	11	22
0	68	88	89	75	92	81	17	0	0	0	3	6	14	12	11	25	5	13	14	12	11	25	5	13
1	59	79	58	72	84	74	18	11	35	16	6	0	24	10	7	12	10	26	24	10	7	12	10	26
2	63	68	44	81	79	66	14	23	38	5	5	0	24	9	17	14	16	34	24	9	17	14	16	34
3	67	38	50	66	82	71	10	51	38	14	6	0	23	11	12	20	12	29	23	11	12	20	12	29
4	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
5	24	26	16	68	67	61	36	48	74	9	20	0	41	26	11	23	13	39	41	26	11	23	13	39
6	18	39	14	64	52	51	39	25	62	12	30	0	42	36	25	25	18	49	42	36	25	25	18	49
7	16	17	8	33	64	56	42	31	80	32	22	0	42	23	12	35	17	44	42	23	12	35	17	44
8	23	15	17	39	49	49	28	25	55	12	25	0	49	60	28	49	27	51	49	60	28	49	27	51
9																								

付表 4.4 微生物製剤による重油分解実験の結果 (コンクリートブロック)

Block 実験期間	Black Area (cm ²)		Gray Area (cm ²)		Bare Area (cm ²)	
	実験区 -A-	コントロール 区-B-	実験区 -A-	コントロール 区-B-	実験区 -A-	コントロール 区-B-
0	400	400	0	0	0	0
1	382	299	12	71	6	30
2	319	236	80	39	1	125
3	19	114	360	237	21	49
4	13	139	353	106	34	155
5	***	***	***	***	***	***
6	9	13	349	249	42	138
7	2	38	352	189	46	173
8	42	22	322	230	36	148
9	158	38	178	186	64	176

Block 実験期間	Black Area (%)		Gray Area (%)		Bare Area (%)	
	実験区 -A-	コントロール 区-B-	実験区 -A-	コントロール 区-B-	実験区 -A-	コントロール 区-B-
0	100	100	0	0	0	0
1	96	75	3	18	2	8
2	80	59	20	10	0	31
3	5	29	90	59	5	12
4	3	35	88	27	9	39
5	***	***	***	***	***	***
6	2	3	87	62	11	35
7	1	10	88	47	12	43
8	11	6	81	58	9	37
9	40	10	45	47	16	44

5. ナホトカ号海洋油汚染バイオレメディエーション研究会の実験結果に対する評価

大和田 紘一（東京大学海洋研究所海洋微生物部門）

ナホトカ号による重油流出事故を通じて、重油の回収や重油によって汚染を受けた水域の環境の回復についていろいろな問題が提起されている。その中で、バイオレメディエーションに関しては、その環境をそのまま放置しておけば水域の天然の微生物によって環境が修復されるという意見、修復をアクセラレートするためには石油分解細菌に必要な栄養分を補給しなければならないという意見、さらにその補給方法についても議論がある。また、一方では汚濁を受けた環境に微生物製剤として外部から微生物を導入することによって環境修復を行おうという試みも行われてきている。今回の重油流出事故の際に特に兵庫県城崎郡香住町の地先海岸において試みられたオープンハイマーバイオテクノロジー社製の微生物製剤が非常に有効であったことが、柴山漁業協同組合はじめ組合の方々によって指摘されている。そこで、その有効性をより科学的に確かめようとして行われたのがこの室内実験や現場実験である。オープンハイマーバイオテクノロジー社製のフォーミュラ1とテラザイムという微生物製剤を対象にして、その短期および中長期の安全性、重油ならびに重油成分に対する分解活性を室内実験を通じて調べ、さらに漂着油に汚染された自然石あるいは漂着油を塗り付けたコンクリートブロックに微生物製剤処理を施して、海岸現場において2ヶ月間にわたって対照区と比較しながらその有効性に関する実験を行ったものである。

まず流出油の性状と化学成分を明らかにし、赤外吸収特性からJIS規格C重油とほぼ同様な吸収曲線を示すことを明らかにした。またイヤトロスキヤン分析により、成分組成として飽和画分15%、芳香族画分50%、レジン画分17%、アスファルテン画分18%であることを明らかにしている。

つぎに微生物製剤の魚類に対する安全性として試験魚にはデバスズメダイとアユを用いて、短期および中長期試験を行った。デバスズメダイには飼育水量の0.1%のフォーミュラ1を加え7日間の飼育、またアユには飼料重量の0.1%のフォーミュラ1を加えたものを朝、昼、晩に与え7日間の飼育実験を行って、全く急性毒性が認められなかったことを確認している。稚アユの餌に0.1%量のテラザイム（フォーミュラ1の100倍希釈製剤）を加えて、朝、昼、晩に給餌しながら30日間にわたって飼育したが、対照区と比較して特に目立って死亡魚は増えていないこと、さらに死亡魚については解剖して内臓の異常などを観察したが、異常所見は認められなかった。無脊椎動物の発生に対する安全性試験をテラザイムと油処理剤、中性洗剤とを比較しながら、ラッパウニ卵の受精率を通じて観察している。この結果ではテラザイムでは50ppmで受精率が80%、10ppm以下では90%以上とほとんど影響が認められない。それに対して、油濁事故の際に使われた油処理剤や家庭用の中性洗剤においては5ppmにおいても受精率に対してかなりの影響を与えることが明らかになった。これらの結果より、フォーミュラ1やテラザイムの使用による他の生物への急性あるいは中長期的な安全性については確認されたものと思われる。

この微生物製剤中の微生物によって流出重油あるいはその成分が本当に分解を受けているかを確認めるフラスコ実験はテラザイムを用いて、試験用油としてナホトカ号の船首部より抜き取った重油、C重油(JIS規格)、軽油(JIS規格)、DITA(全分解試験標準物質)について行われた。500ml容フラスコ培地100mlとテラザイム5.0gにそれぞれの分解用基質を加えて、25℃、150rpmで振とう培養をし、3週間にわたって実験を行った。その結果、ナホトカ号重油については1週間に11%、2週間に23%、3週間に35%が(硫酸アンモニウム濃度が0.6g/lで)分解を受けており、C重油では3週間に34%、軽油では分解率高くなり、3週間に87%、同様にDITAでは同じ時期に70%が分解を受けていることが明らかになった。ただ、イヤトロスキヤンによる初期の重油成分と分解後の成分を分析した結果からはあまり判然とした傾向が認められない。例えば、ナホトカ号重油の4画分の内、3週間後に35%の分解を経た後の成分で初期と大きく変わっているのはアスファルテン画分で18%から5%に減少し、レジン画分は17%から25%に増加している。他の飽和画分や芳香族画分はほとんど変化をしていないので、この3週間にどのようなことが起こったのかが判然とはしない。飽和画分や芳香族画分はほとんど同じ割合で分解を受け、一方アスファルテン画分はそれよりもさらに活発な分解を受けたのか。レジン画分はほとんど分解を受けないので%値が高くなっているのか。C重油についてもほとんど同様のことが言えるのではないか。軽油やDITAが非常に分解を良く受けていることは良く理解ができる。重油の分解実験については実際にどの成分がどのように分解を受けているのかについて、もう少し説得力のあるデータが必要であると思われる。

この分解実験に関してはテラザイム中の微生物が重油や他の油成分と接触後にどのような挙動をしているのかについても全くふれていない。初期の微生物濃度がどの程度で、それが3週間にどのような変化をたどるのか、油粒子を分解微生物はどのように利用(あるいは分解)していくのかなどの顕微鏡的な観察も必要ではないかと思われる。これはもっと詳しい研究に待たなくては行けないが、テラザイムには始めにどのような微生物がどれだけ存在し、それが油成分と接触するとそれぞれ個々の微生物群はどのような遷移をたどるのかなどの情報はどうしても微生物製剤を評価するためには必要ではないかと思われる。

現場での分解実験であるが、これは大変興味深い評価法としての試みと考えられる。ここでは2ヶ月間にわたって毎週1回ずつ、実験区および対照区の自然石とコンクリートブロック写真撮影をし、さらに実験区にはテラザイムを100g/m²の割合で施した。実験区と対照区的环境条件をできるだけそろえることは必要であるが、報告書の写真からは充分その点は意識してあるように思われる。画像解析処理の結果は自然石およびコンクリートブロックに関し、重油付着面積あるいは被度について実験区と対照区で充分有為な差が得られているように思われる。

以上、今回の実験を総合的に判断すると、今回試験された微生物製剤フォーミュラ1およびテラザイムの使用に関する他の生物への急性毒性やアユ稚魚に対する1ヶ月飼育程度の中長期試験においては有害性や毒性は認められず、安全性は確かめられたものと思われる。実験室的なフラスコを用いた重油の分解実験においては、テラザイムを用いて重油成分や軽油が充分分解を受けていることは確かめられた。3週間にナホトカ号重油について35～40%が分解を受けた。

漂着油が厚く付着した自然石や漂着油を塗り付けたコンクリートブロックでの現場実験においては実験区と対照区においては充分有為な差が認められ、微生物製剤フォーミュラ1およびテラザイムの有効性は

確かめられたものと思われる。

ではこの微生物製剤はどのような時に有効なのかについて検討してみたい。今回野外実験をしたような漂着油が厚く付着しているような場所においては、繰り返しの使用によって有効になってくるものと思われる。しかし、このようなムース状になりウェザリングを受けた重油については、比較的分解を受けやすい揮発性の成分はほとんどなくなってしまうので、微生物分解が本当にどれほど進むのかについては疑問もある。他にテラザイムのもつ界面活性作用により、重油成分がゆっくり溶け出しているということはないのだろうか。これについては今後の検討が必要かも知れない。海水中に漂う流出油成分については直接の使用は難しいのではないと思われる。汚染水を隔離しての製剤の使用か又はカラムに固定化してそこに汚染水を導入するような使用が考えられる。また、岩礁などの広域的な使用に関しては経済的にどの程度成り立つかを考慮する必要がある。

最後に、微生物製剤の評価に関して私見を述べたい。微生物製剤はある程度複雑な化合物やそれらの混合物を微生物の作用によって良い方向に処理しようというものであるから、多くの場合、単種の微生物ではなく、微生物の混合体である。これらの製剤の効果を評価するためにはまず、製剤の中にはどのような微生物がどれだけ入っているかを知る必要がある。つぎに、この製剤を試料の処理に使った場合、処理される化合物に対して製剤の中のどの微生物が最初に反応し、さらにはどのようなイベントの結果、処理の方向への化学反応が進行していくのかについての客観的な評価が必要になる。単に製剤を加えてある時間が進行すると分解が起こるといようなブラックボックス的な評価では本質がつかみにくい。今後とも、環境浄化に対する微生物製剤の科学的な評価方法の確立は今後の大きな課題ではないと思われる。

ナホトカ号重油流出事故発生の経過

- 1997年1月2日 第八管区海上保安本部（京都市舞鶴市）が未明にナホトカ号の遭難信号を受信。31名を救助した。
- 4日 第八管区海上保安本部がナホトカ号海難・流出油災害対策本部を設置した。
- 6日 第八管区海上保安本部が海上自衛隊へ災害派遣の要請を行った。
- 7日 船首が福井県三国町の海岸に座礁した。重油は福井県および石川県に漂着した。福井県が災害対策基本法に基づいて災害対策本部を設置した。
- 8日 海上保安庁と海上自衛隊が油処理剤の本格的散布を開始した。阪神大震災被災地からボランティアが回収に駆けつける。
- 9日 重油が京都府、兵庫県、鳥取県にも漂着した。
- 14日 第八管区海上保安本部が隠岐諸島沖に沈没した船体から重油漏出を確認した。海洋汚染・海上災害防止法の緊急措置が適用された。
- 15日 第八管区海上保安本部が「流出量は5,000kl」と発表した。ロシア大使が三国町などを視察した。
- 16日 船首からの重油抜き取り作業が開始された。
- 24日 このころ油処理剤の使用を限定するように方針が転換された。
- 27日 海洋科学センターが隠岐諸島の北東約140キロ、水深2,400メートルで船体を確認した。



重油除去作業のボランティアを行う高校生（1997年2月6日撮影、兵庫县城崎郡香住町の海岸にて）

資料 2



(a) 漂着油にテラザイムを振りかけている。



(b) 漂着油をテラザイムで処理した後は、棒を使って石から剥がれるようになった。



(c) 漂着油をテラザイムで処理した後、容易に手で剥がれるようになった。

(1997年2月、兵庫県城崎郡香住町無南垣の海岸にて撮影)

(資料3)

EPA* (米国環境保護局) の「NCP** (国家緊急計画) 製品目録」(1997年1月現在)

Dispersants (分散剤)

COREXIT 9527	NEOS AB 3000	MARE CLEAN 200
SX-100	COREXIT 9500	

Surface Washing Agents (表面洗浄剤)

COREXIT 7664	TOPSALL #30	CN-110
COREXIT 9580	PREMIER 99	SIMPLE GREEN
AQUACLEAN	PETRO-GREEN ADP-7	NATURE'S WAY HS

Surface Collecting Agents (表面集油剤)

Bioremediation Agents (バイオレメディエーション剤)

Microbiological Cultures (微生物剤)

AE BIOSEA PROCESS	WMI-2000	BIOGEE HC
OPPENHEIMER FORMULA	BR	MICRO-BLAZE
STEP ONE	SYSTEM E. T. 20	BET BIOPETRO
ENZYT		

Enzyme Additives (酵素添加剤)

PRP

Nutrient Additives (栄養添加剤)

INIPOL EAP 22	VITA-BUGG.	OIL SPILL EATER II
---------------	------------	--------------------

Miscellaneous Oil Spill Control Agents (種々の油流出制御剤)

PES-51, PETRO-CAPTURE, ZYME-FLOW
WASTE-SET #3200, WASTE-SET #3400, WASTE-SET AGGLOMERATE

* EPA : Environmental Protection Agency ** NCP : National Contingency Plan Product Schedule

.....
オッペンハイマー フォーミュラ (OPPENHEIMER FORMULA)

アメリカ、テキサス大学名誉教授 Carl H. Oppenheimer 博士によって開発された微生物製剤である。1990年にメキシコ湾で発生したタンカー (メガボルグ号) 爆発事故による原油流出時に、その汚染対策として初めて油分解微生物製剤が使用されたものが、このフォーミュラである。上述のように、EPA (米国環境保護局) の「NCP (国家緊急計画) 製品目録」に登録されている。フォーミュラを製品化したフォーミュラ1およびテラザイムは、ともに100%天然の好気性微生物を高濃縮した粉末製剤で、水添加により微生物が活性化し、油を脂肪酸から水および二酸化炭素にまで分解する。

特 徴

1. 外観：灰色の粉末、
2. 構成：天然の好気性微生物、
3. 危険性：微生物は病原性なく、毒性なし
4. 有効温度：2～48℃、
5. 有効pH：5.5～10.0
6. 水添加で活性化

(資料4)

EPA (米国環境保護局) の「NCP (国家緊急計画) 製品目録」についての補足説明

製品をNCP製品に記載することは、EPAとして製品を承認することではではない。この記載は、油放出時の「製品名」使用を、EPAが承認、推奨、認可、承認、または公認することを決して意味するものではない。この記載は、NCP §300.915 のサブパートJの要求に従い、EPAにデータが提出されたことを示すだけである。以下に、EPAの責任否認文書の原文を示す。



UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
WASHINGTON, D.C. 20460

JAN 11 1996

OFFICE OF
SOLID WASTE AND EMERGENCY
RESPONSE

Mr. Chris Scott
Oppenheimer Biotechnology Inc.
P.O. Box 5561
Austin, TX 78763

Dear Mr. Scott:

Thank you for providing the additional technical product data required by the revised National Oil and Hazardous Substances Pollution Contingency Plan (NCP), 40 CFR Part 300, on the Bioremediation Agent "Oppenheimer Formula." Your data submission satisfies the requirements contained in Title 40 of the CFR section 300.915 of the NCP. "Oppenheimer Formula" will remain on the NCP Product Schedule under Bioremediation Agents and may be authorized for use by Federal On-Scene Coordinators in accordance with 40 CFR section 300.910. The technical data for this product will be kept on file by the Oil Program Center pursuant to 40 CFR section 300.920.

Enclosed are some of the relevant provisions in the NCP on restrictions regarding the listing of your product. Please note, you are required to notify the Environmental Protection Agency (EPA) of any changes in composition, formulation, handling procedures, or application of your product. Based on this notice, EPA may require retesting of the product. Also, note that the listing of "Oppenheimer Formula" on the NCP Product Schedule does not constitute approval, certification, authorization, licensing or promotion of the product; nor does it imply compliance with any criteria or minimum standards for such agents. Failure to comply with these restrictions or the making of any improper reference to EPA in an attempt to demonstrate approval or acceptance of the product will constitute grounds for removal of the product from the schedule.

If you have questions, please contact Ms. Gail Thomas in the Oil Program Center at (703) 603-8736.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "David Lopez".

David Lopez
Acting Director
Oil Program Center

Enclosure

ナホトカ号海洋油汚染バイオレメディエーション研究会活動記録

1997年6月3日～4日 第1回検討会

実験地事前調査（兵庫県城崎郡香住町無南垣町）

1997年9月24日 第2回検討会（東京）

1997年10月6日 第3回検討会

兵庫県に対する活動の中間報告（兵庫県庁にて）

1997年12月5日 第4回検討会（東京）

1997年2月2日 第5回検討会（東京）

1998年3月2日 第6回検討会（東京）

バイオレメディエーションによる海洋油汚染対策
ー ナホトカ号重油流出事故への適用 ー

発行日 1998年3月20日
編集 ナホトカ号海洋油汚染バイオレメディエーション研究会
発行 住友海上リスク総合研究所
〒104-8252 東京都中央区新川 2-27-2
電話 (03) 3297-4016, FAX (03) 3552-7576
印刷 株式会社サンワ
〒102-0072 東京都千代田区飯田橋 2-11-8