



Title	石油汚染土壌における優占石油分解菌に関する研究
Author(s)	軽部, 真起子; 宮, 晶子; 谷口, 紳
Description	第11回衛生工学シンポジウム (平成15年11月6日 (木) -11月7日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 一般セッション . 4 廃棄物・汚染修復 . 4-1
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 11, 171-174
Issue Date	2003-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7073
Type	departmental bulletin paper
File Information	11-4-1_p171-174.pdf



4-1

石油汚染土壌における優占石油分解菌に関する研究

(株)荏原総合研究所 生物研究室 ○軽部 真起子、宮 晶子
(株)荏原製作所 環境修復事業センター 谷口 紳

1.はじめに

石油汚染土壌の修復技術として、土着微生物群の活性化により浄化を行うバイオスティミュレーション法が一般的に用いられている。しかしながら、石油類は構成成分が多岐にわたる上に、土壌そのものの性状にも差異があるため、汚染状況はサイト毎に大きく異なる。効率的な石油汚染土壌浄化を行うためには、予め土壌の石油分解特性、すなわち石油分解微生物群集構造をモニタリングし、土壌に応じた施工法を適用することが重要である。一方、微生物を利用する浄化という点において、安全性および信頼性を高めるためにも、安全性評価技術（検出技術・解析技術）の開発が求められている。われわれは、複数の石油汚染土壌に石油を添加して、バイオスティミュレーション条件で集積培養実験を行い、石油成分を炭素源として利用できる微生物群集（石油分解微生物群集）を増殖させ、その群集構造と土壌の石油分解特性の関係を調査してきた。本研究では、石油成分のうち油膜や油臭の原因であると考えられている脂肪族炭化水素（直鎖、分岐鎖アルカン）を分解の対象として、分解微生物群集に関する知見を収集し、土壌中からアルカン分解菌を特異的に検出・定量化する手法を開発したので報告する。

2. 石油分解微生物群集に関する知見の収集

2.1 実験方法

1) 石油を用いた集積培養実験

5種類の異なる履歴の石油汚染土壌に、アルカン成分を約30%含む原油を230~280℃で熱処理して軽質分を除去した油(Weathered crude oil; 以下 W.oil とする)を炭素源として添加し、集積培養実験を行った。実験条件は土壌2g、W.oil 10mg、滅菌水10mLと、窒素源として塩化アンモニウム35mg/L、リン源としてリン酸水素二ナトリウム10mg/Lを50mLガラス製遠沈管に添加し、2週間28℃で振とう培養した(以下-w.oilと表す)。また、対照系は炭素源の添加のみを行わず、バイオスティミュレーション条件で培養した(以下-controlと表す)。

2) 各土壌の石油分解特性

試料の石油分解特性を定性・定量的に評価するため、集積培養実験後の全油分を各土壌集積培養体から抽出し、GC-MSで全イオン検出法により直鎖アルカン(炭素数10~36)と分岐鎖アルカン(プリスタン、フィタン)を測定した。また、各構成成分の濃縮率は、原油中に含まれる17 α (H), 21 β (H)-ホパンを内部標準物質として補正した。

3) 各土壌中の石油分解微生物群集構造の解析

各土壌集積培養体中の全DNAを抽出し、微生物特有の16S rRNA遺伝子(16S rDNA)を標的としたPCR法と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法で、土壌中に存在する主要な石油分解微生物群集を検出し、データベース上で既知の塩基配列と比較し、同定した。

4) 各土壌中から単離された細菌群の石油分解特性の調査

実験終了時の各土壌集積培養体から、栄養寒天培地(Tryptic Soy Broth-agar)を用いて菌の単

離を行った。単離した各菌は、液体栄養培地で一晚増殖させた後、W.oil を単一炭素源として添加した液体無機培地に 1%(容量%)入れ、2 週間振とう培養したものを GC-MS 分析することで、菌の石油分解特性を調査した。

2.2 実験結果と考察

1) 各土壌のアルカン分解特性

図 1 には、各土壌のアルカン分解特性を GC-MS 分析により調査した結果を示した。直鎖アルカンについては、集積培養期間 2 週間で各土壌とも分解することがわかった。一方の分岐鎖アルカンについては、95%以上の分解率を示した土壌 I と土壌 V 以外の 3 土壌では、ほとんど分解していなかった。これらの結果から、土壌 I と土壌 V が総合的にアルカン分解に優れていることがわかった。

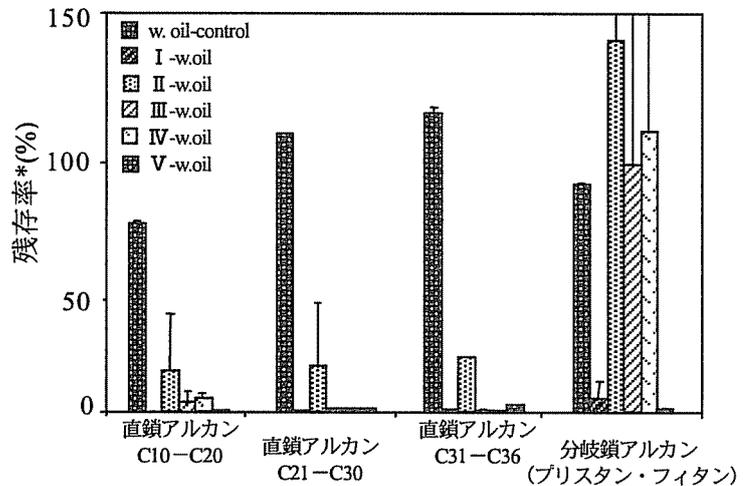


図 1. 各土壌のアルカン分解特性 (培養 2 週間目)。
(*W.oil の初期濃度を 100%としたときの残存率(%)で示す)

2) 各土壌のアルカン分解細菌群集構造

図 2 には、アルカン分解に優れていた土壌 I および土壌 V と、アルカン分解率が低かった土壌 II の 3 土壌のアルカン分解微生物群集構造を PCR-DGGE 法で解析した結果を示した。各土壌から検出されたバンド (細菌) の位置と塩基配列をそれぞれ解析したところ、土壌 I および土壌 V の W.oil 集積培養体中から、図中の A と B で示したバンドが同位置に検出され、このバンドの塩基配列を解析したところ、*Rhodococcus* sp. に近縁な細菌であることがわかった。また、この細菌は土壌 I と土壌 V から単離した。一方の土壌 II からは、*Pseudomonas* sp. に近縁な細菌を検出し、単離した (図中のバンド C)。また、その他の土壌 III、IV についても同様の解析を行ったが、今回は結果を省略した。

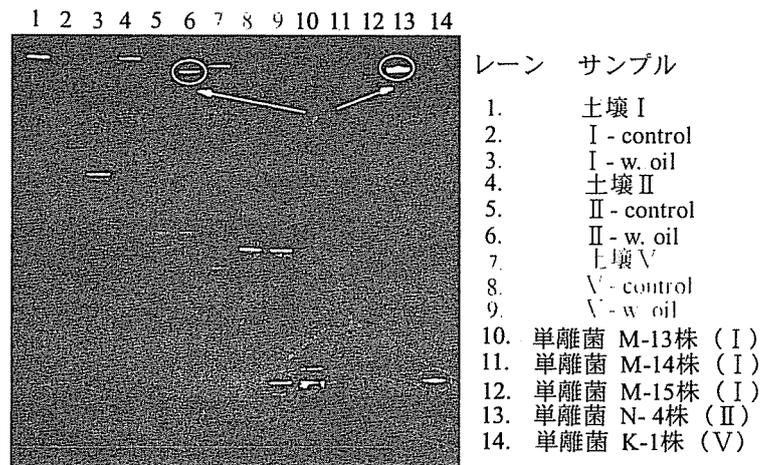


図 2. PCR-DGGE 解析による土壌 I、土壌 II、土壌 V のアルカン分解微生物群集構造 (16S rDNA, V3 region)

3) 単離した細菌のアルカン分解特性

次に、土壌 I から検出、単離した *Rhodococcus* sp. に近縁な細菌 (M-13 株) と、土壌 II から検出、単離した *Pseudomonas* sp. に近縁な細菌 (N-4 株) のアルカン分解特性を比較調査した結果を図 3 に示した。M-13 株は、全アルカン成分の 95%以上を分解する分解能を有することが示されたが、一方の N-4 株は、直鎖アルカン (C10~C36) を約 50%分解したが、分岐鎖アルカン (プリスタン・フィタン) については、分解していないことが明らかとなった。また、土壌 V から検出、単離された K-1 株も、M-13 株と同様に

優れたアルカン分解特性を示した。

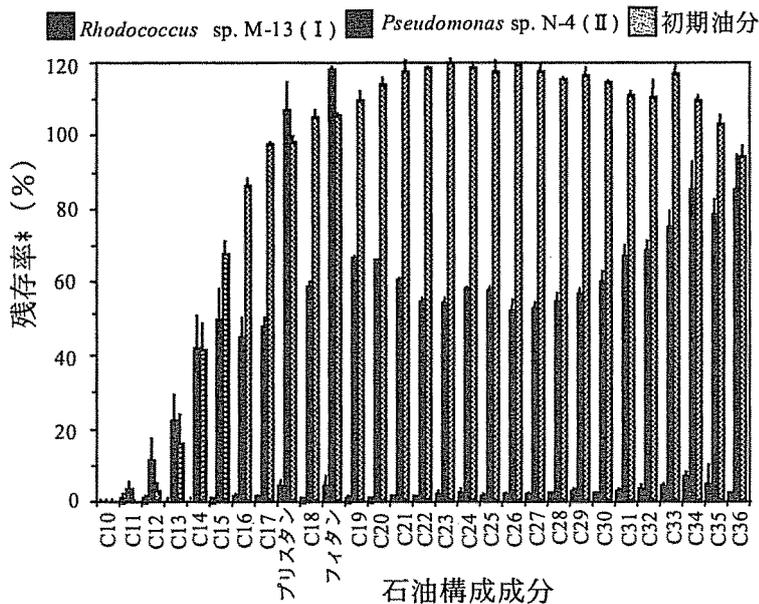


図3. *Rhodococcus* sp. M-13 株と *Pseudomonas* sp. N-4 株の W.oil 中アルカン成分の分解の様相 (*W.oil の初期濃度を 100%としたときの残存率で示す)

4) 考察

土壌 I と土壌 V が高いアルカン分解能を持っていることが明らかとなった。さらに、土壌 I と土壌 V から検出・単離されたアルカン分解菌 *Rhodococcus* sp. M-13 株、K-1 株が直鎖、分岐鎖アルカンについて 95%以上の分解能を持つことが明らかとなった。以上の結果から、土壌 I と土壌 V から検出・単離された *Rhodococcus* sp. M-13 株、K-1 株が各土壌中のアルカン分解に関与していることが示唆された。

3. 有用アルカン分解菌の検出・定量法の開発

直鎖と分岐鎖アルカンを非常によく分解する *Rhodococcus* sp. M-13 株、K-1 株が、土壌中でアルカン分解に関与することが示唆されたので、アルカン分解菌 *Rhodococcus* sp. M-13 株および K-1 株の挙動を調査するために、土壌中から *Rhodococcus* sp. M-13 株と K-1 株を検出する手法および定量する手法の開発を行った。

3.1 実験方法

1) *Rhodococcus* sp. M-13 株および K-1 株の分子系統学的分類解析

土壌 I から単離した *Rhodococcus* sp. M-13 株と、土壌 V から単離した *Rhodococcus* sp. K-1 株の 16S rDNA の塩基配列約 1500 bp を決定し、系統解析を行った。各菌の 16S rDNA は、プライマー Pr0R (*E. coli* position 8-28) とプライマー 9Rev (*E. coli* position 1525-1541) を用いて PCR により増幅した後、塩基配列を決定した。その後、各菌の塩基配列をデータベース上で既知の塩基配列と比較し同定した。また、分子系統学的位置を調査するため、比較的近縁な細菌群の塩基配列をもとに系統樹を作成した。

2) *Rhodococcus* sp. M-13 株、K-1 株の検出法の開発と各土壌中での検出と定量

Rhodococcus sp. M-13 株と K-1 株の 16S rDNA 塩基配列による分子系統学的位置をもとに、この 2 株に特異的な塩基配列部位を検索し、これらを特異的に検出するプライマーを設計した。また、このプライマーを用いて、各土壌（土壌 I, II, III, IV, V）から抽出した DNA に対して PCR を行い、各土壌中の *Rhodococcus* sp. M-13 株と K-1 株の検出と定量を試みた。定量は、競合 PCR 法で行った。

3.2 実験結果と考察

1) *Rhodococcus* sp. M-13 株、K-1 株の分子系統学的解析と検出法の開発

Rhodococcus sp. M-13 株と K-1 株の 16S rDNA の塩基配列 1511bp は、解析の結果、完

全に一致していることがわかり、データベース上で *Rhodococcus* sp. strain DN22 (Gene Bank accession number X89240) の 16S rDNA の 1474bp と一致しており、最も近縁であることがわかった (図 4. 網掛け部)。そこで、M-13 株および K-1 株を特異的に検出するためのプライマーを設計し、それを用いて各土壤中から *Rhodococcus* sp.M-13 株および K-1 株の検出を試みたところ、土壌 I と土壌 V において検出されたが、その他の土壌 (土壌 II, III, IV) 中からは検出されなかった。

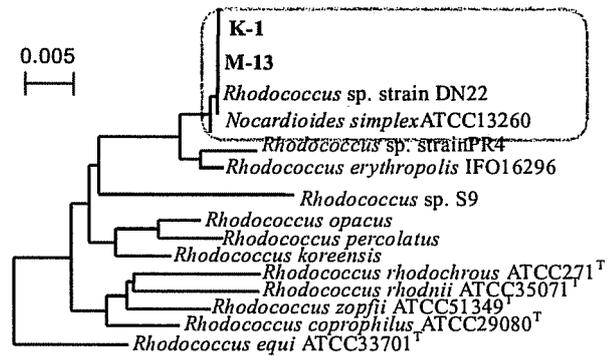


図 4. *Rhodococcus* sp.M-13 株および K-1 株の分子系統学的位置(16S rDNA, NJ 法)

2) *Rhodococcus* sp. M-13 株、K-1 株の定量法の開発

次に、土壌 I と土壌 V 中の *Rhodococcus* sp. M-13 株あるいは K-1 株をそれぞれ 16S rDNA を指標として競合 PCR 法により定量した。図 5 には、各土壌の①土壌②土壌-control (バイオスティミュレーション条件で培養) ③土壌-w.oil (土壌に炭素源として W.oil を添加し集積培養) の、各土壌 1g から抽出した DNA あたりのコピー数で結果を示した。土壌 I および土壌 V 中には、M-13 株あるいは K-1 株が 10^7 コピー/g 存在したが、③では、 10^9 コピー/g 存在していることから、W.oil で土壌を集積培養することにより、M-13 株あるいは K-1 株が各土壌中においてアルカンを分解したこと、つまりアルカンを炭素源として増殖したことが明らかとなった。

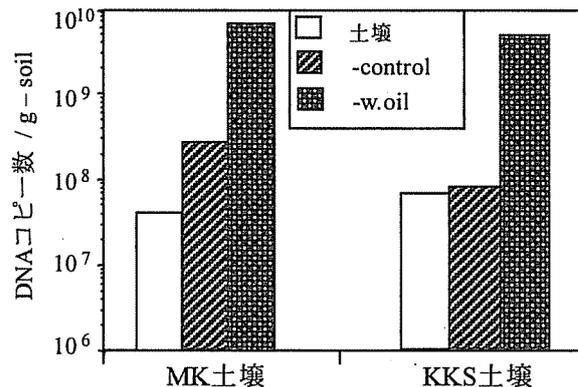


図 5. 土壌 I、土壌 V 中の *Rhodococcus* sp.M-13 株および K-1 株の定量結果(16S rDNA, 競合 PCR 法)

4. おわりに

本研究で単離した、直鎖アルカンと分岐鎖アルカンを分解する *Rhodococcus* sp.M-13 株および K-1 株は、土壌中のアルカン分解に関与し、浄化技術に有用な菌であることが明らかとなった。また、土壌中の *Rhodococcus* sp. M-13 株あるいは K-1 株が土壌中に 10^7 コピー/g 存在する場合には、バイオスティミュレーション法によるアルカン汚染土壌浄化の適用性が高いと考えられる。さらに、特異的検出法および定量法は、バイオ処理技術効果の定量評価法として有効であることも示された。

今後は、有用なアルカン分解菌である *Rhodococcus* sp.M-13 株および K-1 株を石油汚染土壌浄化に利用していくために、増殖促進法などを開発するとともに、様々な石油汚染土壌を用いて実際の浄化効果を検証していく予定である。

謝辞：本研究を行うにあたり独立行政法人 国立環境研究所、珠坪 一晃主任研究員に多大なるご協力を得ました。ここに記して感謝いたします。