

原著論文 (通常論文)

油分解細菌の分離とバイオオーグメンテーションへの利用

Isolation of Oil-Degrading Bacteria and Their Application to Bioaugmentation

高松 邦明¹, 山津 敦史², 宮北 憲治³, 今中 忠行^{1*}

KUNIAKI TAKAMATSU, ATSUSHI YAMATSU, KENJI MIYAKITA and TADAYUKI IMANAKA

¹ 立命館大学生命科学部生物工学科 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

² 株式会社アイアイビー 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1 立命館大学テクノコンプレックス 244 号

³ 株式会社奥村組 〒545-8555 大阪市阿倍野区松崎町 2-2-2

* TEL/FAX: 077-561-5811

* E-mail: imanaka@sk.ritsumei.ac.jp

¹ Department of Biotechnology, College of Life Sciences, Ritsumeikan University,
1-1-1 Noji-higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

² IIB Inc., 1-1-1 Noji-higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

³ Okumura Corporation, 2-2-2 Matsuzaki-cho, Abeno-ku, Osaka 545-8555, Japan

(原稿受付 2012年2月22日/原稿受理 2012年5月7日)

We have isolated three alkane-utilizing bacteria, strains No. 2, No. 5 and No. 10, from oil-contaminated soil. Enrichment cultures were performed in media containing fuel oil as the major carbon source. These strains could grow on alkanes as the sole carbon source and the chain-length of alkane that utilized by the strains were different from each other. The sequences of the 16S ribosomal RNA gene of strains No. 2, No. 5 and No. 10 indicated phylogenetic positions of the strains within the genus *Novosphingobium*, *Pseudomonas* and *Rhodococcus*, respectively. Strains No. 2, No. 5 and No. 10 were therefore designated *Novosphingobium* sp. No. 2, *Pseudomonas* sp. No. 5 and *Rhodococcus* sp. No. 10, respectively. For specific identification of the strains, oligonucleotide primers based on 16S-23S intergenic spacer region were designed. The strains could also be determined quantitatively by PCR with the specific primers and most probable number (MPN) method. Laboratory test of bioremediation revealed that strains No. 2, No. 5 and No. 10 could decrease total petroleum hydrocarbons contained in soil and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis was effective for monitoring of microbes in soil. Strains No. 2, No. 5 and No. 10 were applied to bioremediation of oil-contaminated field and purification was successfully completed.

キーワード: 油汚染土壌, 生物修復, 油分解菌, 微生物同定, 毒性試験

Key words: bioremediation, oil contamination, alkane utilization, PCR-MPN

土壌汚染は環境への負荷という問題だけではなく、土地売買の際にトラブルになるなど社会問題としても解決の急がれる重要な問題である。特に石油類による汚染は、ガソリンスタンドやボイラー設備の跡地などで近年頻繁に発生しており、切実な問題となっている。これまで、油汚染土壌の処理には掘削除去法が多く採用されてきたが、昨今の経済情勢や環境意識の高まりを受け、掘削除去に代わる低コスト・低環境負荷の浄化技術が切望されており、微生物による浄化に期待が集まっている。

微生物に汚染物質を分解させることで汚染を浄化する方法 (バイオレメディエーション) には、土着の微生物を活性化する方法 (バイオスティミュレーション) と汚染物質の分解に優れた微生物を外から投入する方法 (バイオオーグメンテーション) がある。バイオオーグメンテーションを意識した汚染物質分解菌に関する研究は数多くの報告があり、主に新規微生物の分離や分解機構の解明、分解に関する遺伝子の解析などの研究が行わ

れている¹⁻⁵⁾。最終的にはこれらの研究成果を実際の汚染現場に適用することが期待されているが、微生物の安全性や環境への影響を十分検討する必要があり、その評価手法・基準の確立が望まれていた。こうした背景から、国は平成17年に「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」を策定し、バイオオーグメンテーションに利用する微生物の安全性および環境への影響評価について一定の評価手法や考え方を示した⁶⁾。この指針では、利用する微生物の安全性の評価には、動物を用いた病原性・毒性試験等の直接的評価の他に、近縁種の病原性調査、温度・pH等の好適生育環境の検討、土壌中の利用微生物数の把握、土壌微生物に与える影響の解析などによる多面的な評価の必要があるとしている。

本研究は、重油を基質としたスクリーニングにより3株の油分解菌を取得し、同定や特性の解析など基礎的な研究を進めた。また同時に、バイオオーグメンテーションへの適用を見据えた応用的研究も行った。すなわち、

土壌中での菌数モニタリングのために、種または株ごとに特異的な塩基配列を持つとされる 16S-23S intergenic spacer 領域の塩基配列に基づいた特異的プライマーを設計し⁷⁻¹³⁾、PCR 法と最確数法 (Most Probable Number (MPN) 法) を組み合わせた PCR-MPN 法¹⁴⁾ による検出・定量が可能であることを確認した。また、油汚染土壌を用いた実証実験を行い、これら 3 株の油分低減効果を検証し、土壌微生物のモニタリング方法として T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析が有効であることを確認した。最終的に経済産業省および環境省から「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に適合した微生物であることの確認を受けた後、実際の油汚染浄化工事に適用し、8 ヶ月間の実地データを得てこれら 3 株の評価を行った。

1. 実験方法

1.1. 土壌試料の取得源

2 種類の油汚染土壌 S1 (砂質土, 中質油汚染) および S2 (粘性土, 潤滑油汚染) は国内のガソリンスタンド跡地および工場跡地より取得した。

1.2. 微生物の取得源

国内の油田から油含有土壌を取得し、微生物分離源とした。塩基配列比較のための微生物はすべて理化学研究所バイオリソースセンター (JCM) より購入した。

1.3. 培地および培養方法

油分解微生物のスクリーニングに用いた培地は、無機塩培地 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 5 g/l, NH_4Cl 1 g/l, MgSO_4 0.12 g/l, CaCl_2 0.011 g/l) に A 重油を 10 g/l 添加した無機塩重油培地および Luria-Bertani (LB) 寒天培地 (trypton 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 1 g/l, agar 15 g/l) とした。無機塩重油培地で 30°C, 数日間の集積培養を数回繰り返した後, LB 寒天培地上で 30°C で培養しコロニーを分離した。

微生物の生育測定の際には無機塩培地に glucose 1 g/l, yeast extract 1 g/l, tryptone 1 g/l を加えた無機塩 GYT 培地を用いた。培地の pH 調整には 1 N NaOH および 1 N HCl を用いた。生育測定の際は 30°C で振盪培養を行い、一定時間毎に培地の濁度 (OD_{660}) を測定した。

ゲノム取得のための微生物の培養は、無機塩 GYT 培地を用いた。最確数法のための培養には、無機塩培地に octadecane 1 g/l, yeast extract 0.5 g/l を添加した培地を用いた。いずれの場合も 30°C で振盪培養を行った。

土壌中の微生物数の測定には、以下の寒天培地を用いた希釈平板法を用いた。土壌試料は滅菌水で適宜希釈した後、培地に塗布して 30°C で 4 日間培養し、出現したコロニー数から微生物数を計算した。一般細菌用培地 (yeast extract 1 g/l, glucose 1 g/l, K_2HPO_4 0.3 g/l, KH_2PO_4 0.2 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.12 g/l, agar 15 g/l), 嫌気性菌用培地 (peptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, beef extract 2 g/l, NaCl 5 g/l, cystein-HCl 0.3 g/l, agar 15 g/l), 放線菌用培地 (humic acid 1 g/l, Na_2HPO_4 0.5 g/l, KCl 1.7 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/l, CaCO_3 0.02 g/l, thiamine-HCl 0.5 mg/l,

riboflavin 0.5 mg/l, nicotinic acid 0.5 mg/l, pyridoxine-HCl 0.5 mg/l, pantothenate-Ca 0.5 mg/l, inositol 0.5 mg/l, *p*-amino-benzoic acid 0.5 mg/l, biotin 0.25 mg/l, cycloheximide 50 mg/l, agar 15 g/l, pH 7.2), 真菌用培地 (KH_2PO_4 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, peptone 5 g/l, glucose 10 g/l, rose bengal 33 mg/l, streptomycin 30 mg/l, agar 15 g/l)¹⁵⁾。

1.4. 生理学的特性の解析

API 20NE キットおよび ATB VET キット (共に bioMerieux) を用いて、微生物の生理学的特性および抗生物質感受性の解析を行った。資化性の検討には糖、糖アルコール、有機酸、アミノ酸、芳香族化合物、アルカン、シクロアルカン、アルコールなどを代表する数種類の物質を、唯一の炭素源として無機塩培地にそれぞれ 1 g/l 添加し 30°C, 4 日間振盪培養した。培地の濁度 (OD_{660}) を測定し、ネガティブコントロールとの比較から資化性を判定した。

1.5. 遺伝子の取得および DNA シーケンス

微生物からゲノムを抽出する際には、PCI (phenol 50 v/v%, chloroform 48 v/v%, isoamyl alcohol 2 v/v%, Nacalai Tesque) を用いた。

16S rRNA 遺伝子の取得には、16Sf1 プライマー (5'-CTCAG AACGA ACGCT GGCGG CAT-3') および 16Sr1 プライマー (5'-GGTTA CCTTG TTACG ACTTC ACCCC-3') を用いた。16S-23S intergenic spacer 領域の遺伝子取得には、ISF1 プライマー (5'-ATTAG ATACC CTGGT AGTCC ACGC-3') および ISR1 プライマー (5'-TTCGC CTTTC CCTCA CGGTA CT-3') を用いた⁸⁾。PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。

DNA の単離の必要があるときは pUC118 プラスミド (Takara) に DNA を組み込み、*Escherichia coli* DH5 α (Toyobo) を用いてクローニングした。プラスミドの精製には QIAGEN Plasmid Kits (QIAGEN) を用いた。

塩基配列の解析には ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いた。系統樹の作成は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を基にデータベースより相同性の高い塩基配列を検索し、近隣接合法を用いた¹⁶⁾。Bootstrap の実行回数は 1,000 回とした。

1.6. T-RFLP 解析

土壌を一定量採取し、ISOIL (ニッポンジーン) を用いて土壌中の total DNA を抽出した。抽出した total DNA をテンプレートとして、FAM 標識した 16Sf1 プライマーと 16Sr1 プライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。PCR 産物は精製後、制限酵素 (*Hae*III, TOYOBO) で処理した。得られた DNA 断片を ABI Prism 3100 genetic analyzer を用いてキャピラリー電気泳動し、結果を GeneMapper (Applied Biosystems) で解析した。

1.7. 土壌油分濃度測定

土壌 30 g を採取し、無水硫酸ナトリウム 2 g, シリカゲル 2 g, ジクロロペンタフルオロプロパン 50 ml を加

えて30分間振盪抽出した。5分間静置した後、濾過し溶媒層を回収した。非分散型赤外線分析計 (HORIBA OCMA-355) により赤外吸収を測定し、標品との比較から油分濃度を算出した。

浄化工事における油分濃度測定および油臭・油膜強度の判定は、21地点・深度の土壌を採取しその平均をとった。油臭・油膜強度は「油汚染対策ガイドライン—鉱油類を含む土壌に起因する油臭・油膜問題への土地所有者等による対応の考え方—¹⁷⁾」を参考に、6段階 (油臭) または5段階 (油膜) で評価した。測定は日本環境株式会社に委託した。

1.8. 動物を用いた病原性・毒性試験

ラットを用いた試験では3菌等量混合物 (No. 2株, No. 5株およびNo. 10株) を 1×10^6 , 1×10^7 および 1×10^8 cells/body の濃度で各群雌雄5例の Crl : CD (SD) ラットに単回経口投与し、2週間にわたり一般状態、体重推移を観察した。また観察期間終了後に剖検を行い、外表、内部器官および組織を観察した。対照群には生理食塩水を同様の方法で投与した。試験は株式会社新日本科学安全性研究所に委託した。

ヒメダカを用いた試験では3菌等量混合物の 1×10^4 , 1×10^5 および 1×10^6 cells/ml の3濃度区および対照区としての無処理区を設け、微生物をヒメダカに水中暴露させた。ヒメダカは各区10尾を試験に供し、試験液は活性炭により脱塩素した水道水を希釈水として用いた。温度は $23 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。2週間にわたり試験液の濁り、沈殿・浮遊物、死亡数、毒性症状を観察した。試験は株式会社エスコに委託した。

2. 実験結果

2.1. 微生物の分離および同定

重油を主な炭素源とする無機塩重油培地でのスクリーニングにより、約200株の微生物を分離した。これらを再び無機塩重油培地で培養し、菌体の生育のよい10株を選抜しそれぞれNo. 1株~No. 10株と名付けた。16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析によりNo. 1株~No. 10株の同定を行い、近縁種の病原性を調査した。病原性菌の判定は病原体等安全取扱・管理指針 (日本細菌学会) のバイオセーフティ指針に沿った¹⁸⁾。近縁種に病原性菌のないNo. 2株, No. 5株およびNo. 10株の3株を以降の研究対象とした。No. 2株, No. 5株, No. 10株はそれぞれ *Novosphingobium capsulatum* (99%), *Pseudomonas citronellolis* (99%), *Rhodococcus boritolerans* (99%) と最も相同性が高く、系統樹上でこれらの属の細菌が形成するクラスターに位置した (Fig. 1)。

No. 2株, No. 5株, No. 10株の生理学的特性をAPI 20NE キットを用いて解析した。また、ATB VET キットを用いて抗生物質感受性の解析を行った。結果をそれぞれ Table 1 および Table 2 に示した。

2.2. 好適生育環境の検討

No. 2株, No. 5株, No. 10株を pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 に調整した培地で培養し (20°C), 生育測定を行った (Fig. 2)。また 10, 20, 30, 37, 40, 50°C の温度下で培

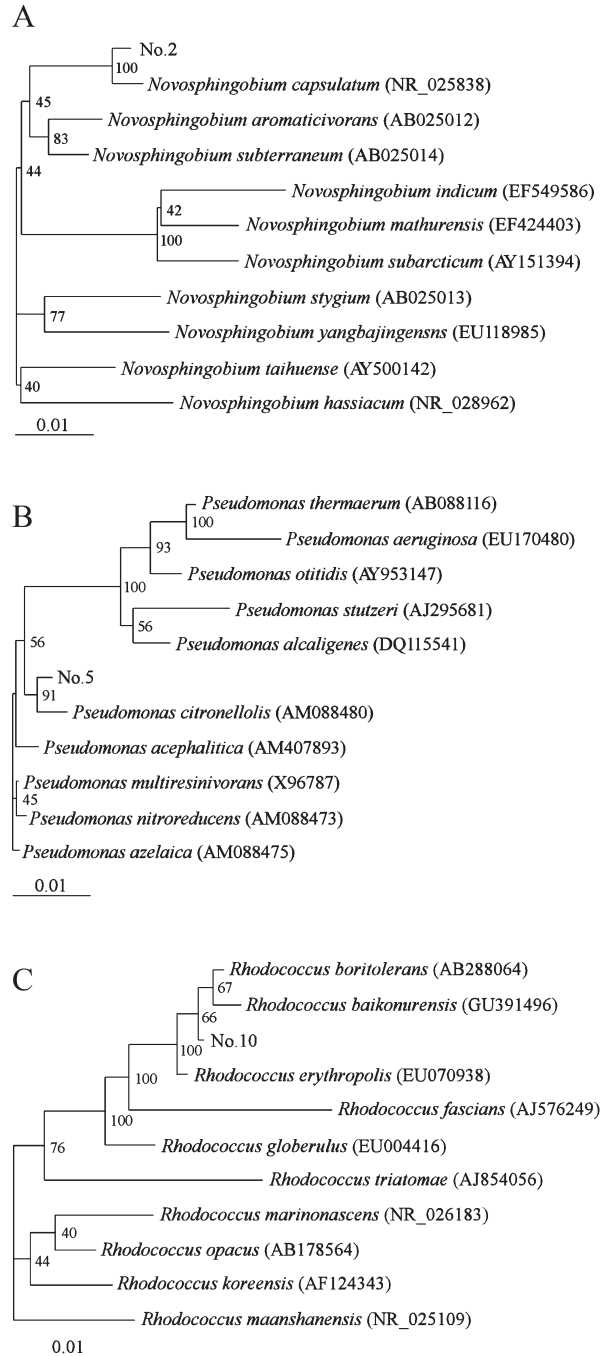


Fig. 1. Phylogenetic trees of *Novosphingobium* species (A), *Pseudomonas* species (B) and *Rhodococcus* species (C) based on the 16S rRNA sequences. Segments corresponding to an evolutionary distance of 0.01 are shown with the bar.

養し (pH 7), 生育測定を行った (Fig. 3)。No. 2株は $30^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$, pH 6~7 が生育に最適であり, $20^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$, pH 5~7 が生育に好適な環境であった。No. 5株は $30^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$, pH 6~7 が生育に最適であり, $20^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$, pH 5~7 が生育に好適な環境であった。No. 10株は 30°C , pH 6~7 が最適であり, $20^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$, pH 5~8 が生育に好適な環境であった。

Table 1. Results of API 20NE tests on strains No. 2, No. 5 and No. 10.

Test	No. 2	No. 5	No. 10
Oxidase	+	+	-
Catalase	+	+	+
Reduction of nitrate to nitrites	-	+	-
Reduction of nitrate to nitrogen	+	No test	+
Indole production	-	-	-
Acidification of glucose	-	+	-
Arginine dihydrolase	-	+	-
Urease	-	-	+
Hydrolysis of esculin	+	-	+
Hydrolysis of gelatin	-	-	-
β -Galactosidase	+	-	-
Assimilation of:			
Glucose	+	+	+
L-Arabinose	+	-	+
D-Mannose	+	-	-
D-Mannitol	-	-	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	-	+
Maltose	+	-	-
Gluconate	+	+	+
n-Capric acid	-	+	-
Adipic acid	+	-	+
DL-Malic acid	+	+	+
Citrate	-	-	+
Phenylacetate	-	+	+

+ Positive, - negative

2.3. 資化性の検討

No. 2 株, No. 5 株, No. 10 株の資化性の検討を行った (Table 3)。糖や有機酸等の基質の他に, 石油の分解能力を調べるために, 石油に含まれる主な成分も対象とした。No. 10 株がフェノールを資化する以外は 3 株とも芳香族化合物を資化することができなかった。一方, 3 株ともアルカンをよく資化し, 特に No. 10 株は広い範囲のアルカンを資化することができた。No. 2 株と No. 5 株は No. 10 株が資化できない炭素数 30 や 31 のアルカンを資化することができた。

2.4. 特異的プライマーの設計および検出

No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の 16S-23S intergenic spacer 領域塩基配列の比較対象として, 系統樹上でそれぞれの株に近縁である *Novosphingobium capsulatum* (JCM 7452), *Novosphingobium taihuense* (JCM 12465), *Novosphingobium resinovorum* (JCM 12332), *Pseudomonas citronellolis* (JCM 21587), *Pseudomonas nitroreducens* (JCM 2782), *Pseudomonas stutzeri* (JCM 5965), *Rhodococcus erythropolis* (JCM 3201), *Rhodococcus baikonurensis* (JCM 11411), *Rhodococcus globerulus* (JCM 7472) を入手し, PCR によりこれらの 16S-23S intergenic spacer 領域の DNA を得た。DNA はクローニングした後, 各々の塩基配列を解析した。No. 2 株と *N. capsulatum*, *N. taihuense* および *N. resinovorum* の塩基配列比較から No. 2 株に特異的な領域を探索し, 検出用

Table 2. Results of ATB VET tests on strains No. 2, No. 5 and No. 10.

Test	No. 2	No. 5	No. 10
Erythromycin	+	+	-
Lincomycin	+	+	+
Pristinamycin	+	+	-
Tylosin	+	+	-
Colistin	-	-	+
Cotrimoxazole	+	+	+
Sulfamethizole	+	+	+
Flumequine	+	+	+
Oxolinic acid	+	+	+
Enrofloxacin	+	-	-
Nitrofurantoin	+	+	+
Fusidic acid	+	+	-
Rifampin	+	+	-
Metronidazole	+	+	+
Penicillin	+	+	+
Amoxicillin	+	+	-
Amoxicillin + clavulanic acid	+	+	-
Oxacillin	+	+	+
Cephalothin	+	+	-
Cefoperazone	+	-	+
Streptomycin	+	-	+
Spectinomycin	+	-	-
Kanamycin	-	-	+
Gentamicin	-	-	-
Apramycin	-	-	-
Chloramphenicol	+	+	+
Tetracycline	+	+	+
Doxycycline	+	+	-

+ Resistant, - sensitive

プライマーの候補となるプライマーを数種類設計した。同様に, No. 5 株と *P. citronellolis*, *P. nitroreducens*, *P. stutzeri* の比較および No. 10 株と *R. erythropolis*, *R. baikonurensis*, *R. globerulus* の比較から No. 5 株および No. 10 株用の候補プライマーを数種類設計した。候補プライマーの絞り込みには No. 2 株, No. 5 株, No. 10 株および比較対象微生物のゲノム DNA をテンプレートにした PCR を行い, アガロースゲル電気泳動によってバンドの有無および位置を確かめた。最終的に No. 2 株検出用プライマーとして No. 2-F2 (5'-CGCCT TTGAG CCTTT GGGTT C-3') および No. 2-R1 (5'-TGAAC GACGA CCGTA ATCGT CA-3'), No. 5 株検出用プライマーとして No. 5-F2 (5'-GAATG TTCGG TGGTT GAATG AAC-3') および No. 5-R1 (5'-CCTAG GTTAT CCTAG GTGGG-3'), No. 10 株検出用プライマーとして No. 10-1F1 (5'-GAGCA TTCTC CAATC CAATA-3') および No. 10-4R1 (5'-CCAGA CCACT TCCAC TAACC CTG-3') の各プライマーを選抜した。No. 2 株検出用プライマーを用いた PCR では, No. 2 株の DNA をテンプレートとした場合のみ予想された 514 bp の位置にバンドが見られ, その他の微生物の DNA をテンプレートとした場合にはバンドは見られなかった。同様に No. 5 株用プライマーでは No. 5 株の DNA をテンプレートとし

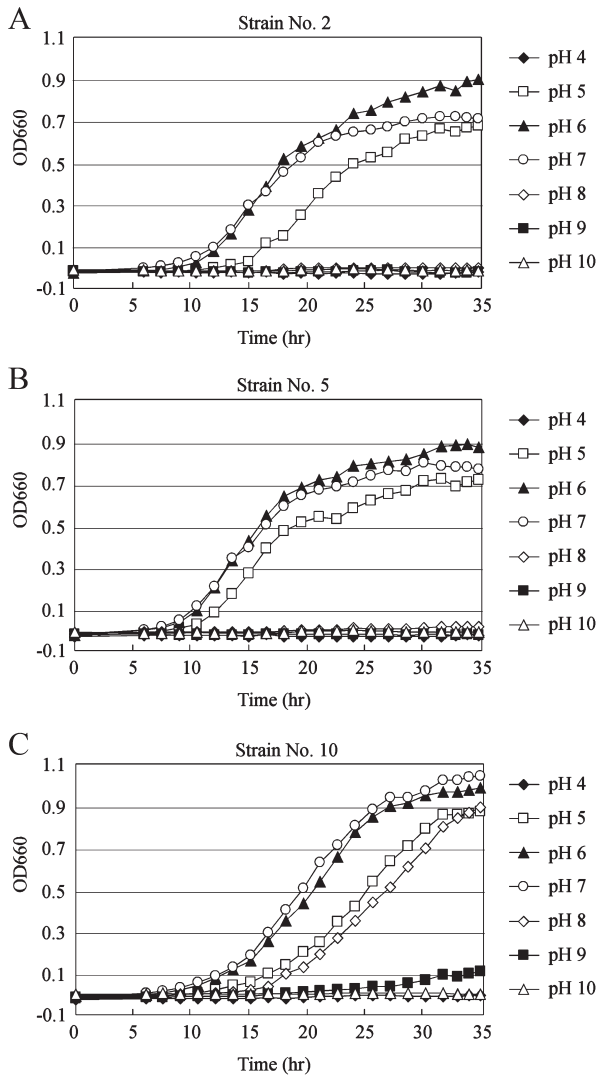


Fig. 2. Effect of initial pH on cell growth of strains No. 2 (A), No. 5 (B) and No. 10 (C). Cell growth at pH 4 (black diamonds), 5 (white squares), 6 (black triangles), 7 (white circles), 8 (white diamonds), 9 (black squares) and 10 (white triangles).

た場合のみ 355 bp に、No. 10 株用プライマーでは No. 10 株の DNA をテンプレートとした場合のみ 282 bp にバンドが見られ、他の微生物の DNA をテンプレートとした場合ではバンドは見られなかった (Fig. 4)。

2.5. 土壌中での検出確認

No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株を実際の油汚染土壌に添加し、それぞれの検出を試みた。滅菌していない土質、油質の異なる 2 種類の油汚染土壌 S1 および S2 にこれら 3 株をそれぞれ約 10^5 cells/g 乾土となるように添加し、よく混合した。3 株を添加した土壌 S1 および S2 を 1 g ずつ採取し、それぞれに滅菌生理食塩水 9 ml を加えて希釈、懸濁したのち、その 100 μ l を試験管に調製した 5 ml の最確数法用培地に別々に添加した。30°C で 4 日間振盪培養し、生育した微生物のゲノムを抽出した。抽出したゲノムをテンプレートとし、No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株検出用の特異的プライマーを用いて PCR を行った。比較対象として、3 株を添加

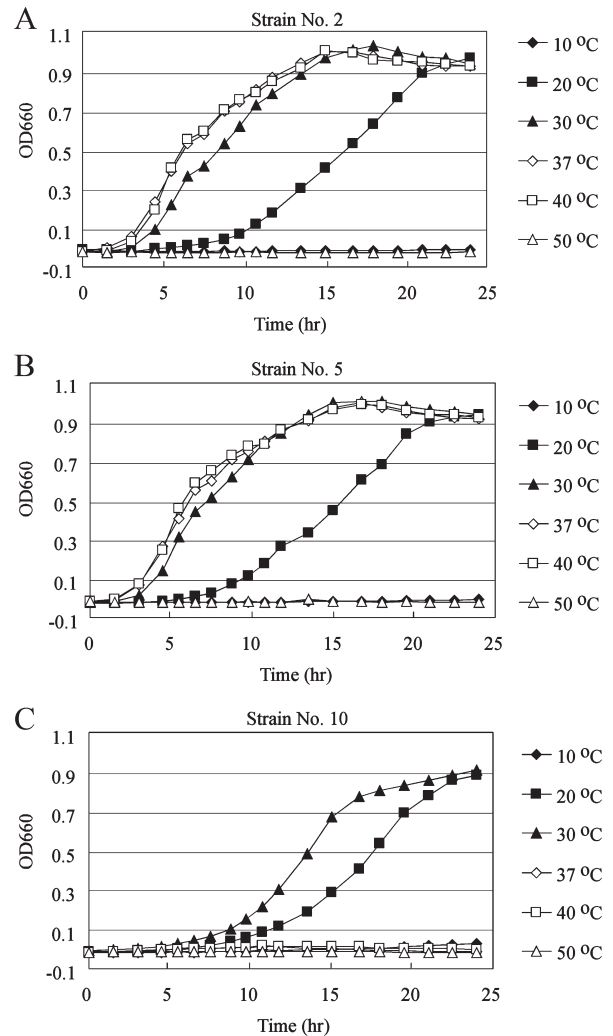


Fig. 3. Effect of temperature on cell growth of strains No. 2 (A), No. 5 (B) and No. 10 (C). Cell growth at 10°C (black diamonds), 20°C (black squares), 30°C (black triangles), 37°C (white diamonds), 40°C (white squares) and 50°C (white triangles).

しない土壌 S1 および S2 でも同様の操作を行った。アガロースゲル電気泳動の結果、3 株を添加した土壌 S1 および S2 からは No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の検出を示すバンドが予想された位置に現れ、3 株を添加しない土壌 S1 および S2 からはバンドは現れなかった (Fig. 5)。

2.6. PCR-MPN 法による微生物の定量

滅菌していない土壌 S1 に No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株を $10^5 \sim 10^6$ cells/g となるように添加した。No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株は LB 寒天培地上に塗布し、30°C で 2 日間培養したのち出現したコロニーを数えて添加した菌数を把握した。No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株を添加した土壌 S1 を 1 g 採取し、滅菌生理食塩水で 10 倍, 100 倍……と 10 倍ずつ 10^7 倍まで段階的に希釈した。10 倍から 10^7 倍までの 7 段階の希釈液を、それぞれ 3 本の 5 ml 最確数法用培地に 100 μ l ずつ添加し、振盪培養した。4 日間の培養の後、目視で明

Table 3. Growth of strains No. 2, No. 5 and No. 10 on various substrates.

Carbon source	No. 2	No. 5	No. 10	Carbon source	No. 2	No. 5	No. 10
Starch	+	+	+	Decane (C10)	-	-	+
Maltose	+	-	-	Undecane (C11)	-	-	+
Lactose	-	-	-	Dodecane (C12)	-	-	+
Sucrose	+	-	+	Tridecane (C13)	-	-	+
Raffinose	+	-	-	Tetradecane (C14)	-	-	+
Trehalose	+	-	+	Pentadecane (C15)	-	+	+
Glucose	+	+	+	Hexadecane (C16)	-	-	+
Fructose	+	+	+	Heptadecane (C17)	-	+	+
Mannose	+	-	+	Octadecane (C18)	+	+	+
Galactose	+	-	+	Nonadecane (C19)	+	+	+
Arabinose	+	+	-	Icosane (C20)	-	+	+
Xylose	+	-	+	Henicosane (C21)	-	+	+
Glycerol	+	+	+	Docosane (C22)	-	+	+
Erythritol	-	-	-	Tricosane (C23)	-	+	+
Fumarate	+	+	+	Tetracosane (C24)	-	+	+
Malate	+	+	+	Pentacosane (C25)	-	+	+
Acetate	-	+	+	Hexacosane (C26)	-	+	+
Succinate	+	+	+	Heptacosane (C27)	+	+	+
Citrate	-	-	+	Octacosane (C28)	+	-	+
Pyruvate	+	+	+	Nonacosane (C29)	+	-	+
Glutamate	+	+	+	Triacosane (C30)	-	+	-
Benzene	-	-	-	Hentriacontane (C31)	+	+	-
Toluene	-	-	-	Dotriacontane (C32)	+	+	+
Phenol	-	-	+	Tritriacontane (C33)	+	+	+
Aniline	-	-	-	Tetracontane (C34)	+	+	+
Xylene	-	-	-	Pentatriacontane (C35)	+	-	+
Naphthalene	-	-	-	Cyclohexane	-	-	-
Anthracene	-	-	-	Ethylmercaptan	-	-	-
Methanol	-	-	-	Dimethyl disulfide	-	-	-
Ethanol	-	+	+	Thiophen	-	-	-
				Pyridine	-	-	-

+ Growth, - no growth

らかに菌の生育の見られない試験管は陰性と判定した。生育の見られる試験管から微生物のゲノムを抽出し、これをテンプレートとして No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株検出用の特異的プライマーを用いて PCR を行った。PCR 後の電気泳動で予想される位置にバンドが出現したものを陽性とし、それ以外を陰性と判定した。最確数表 (3 本法) を用いて、陽性試験管の数からそれぞれの菌株の最確数 (MPN) を求めた¹⁴⁾。No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の最確数はそれぞれ 1.1×10^5 cells/g, 4.6×10^5 cells/g, 2.4×10^5 cells/g となり、添加量 (No. 2 株: 1.4×10^5 cells/g, No. 5 株: 3.2×10^5 cells/g, No. 10 株: 4.0×10^5 cells/g) とほぼ同程度の値が得られた (Table 4)。

2.7. 油汚染土壌を用いた実証実験 (油分分解試験および菌相解析)

バイオオーグメンテーションへの適用に先立って、実際の油汚染土壌を用いた実証実験を行い、No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の油分低減効果および土壌微生物に与える影響を調べた。

減菌していない 2 種類の油汚染土壌 S1 および S2 そ

れぞれ 10 kg をプラスチック製コンテナに台形状に積み上げ、No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株をそれぞれ約 10^6 cells/g となるよう添加した。また、栄養物質として硫酸アンモニウム 1.2 g/kg, 過リン酸石灰 0.3 g/kg を同時に添加した。対照区として S1, S2 とも 3 株を添加しない (栄養物質は添加する) 区を設けた。これらを室温に静置し、週に 3 回程度の頻度で攪拌および給水を行った。任意の時点で土壌の残存油分濃度 (Fig. 6), No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の菌数 (Fig. 7), 土壌微生物の菌数 (Fig. 8) を測定した。No. 2 株, No. 5 株, No. 10 株の菌数測定および土壌微生物の菌数測定は 3 株を添加した区のみ実施し、それぞれ PCR-MPN 法および寒天培地を用いた希釈平板法で菌数測定を行った。

また、試験開始前および 28 日後の時点での土壌を採取し、T-RFLP 解析を行った (Fig. 9)。同時に土壌中の total DNA から 16S rRNA 遺伝子を取得し、クローニングした後、各々の塩基配列を解析した。土壌微生物の 16S rRNA 遺伝子クローンは 2 種類の土壌からそれぞれ 50 個ずつ得た。T-RFLP 解析の結果から、試験開始前に比べて増加した DNA がいくつか確認できた (Fig. 10 矢印)。16S rRNA 遺伝子クローンの塩基配列解析の結果

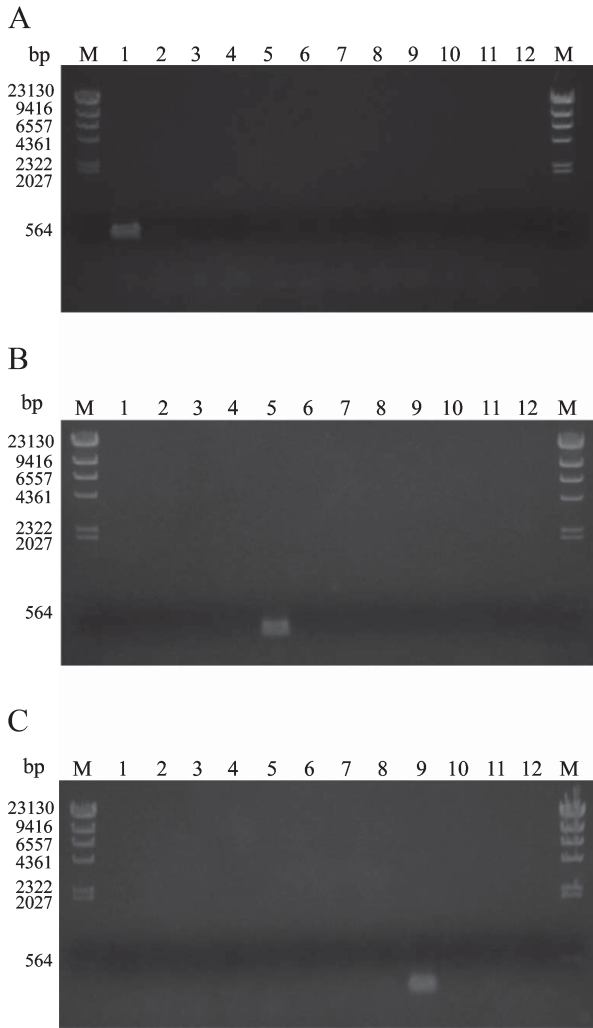


Fig. 4. PCR of 16S-23S intergenic spacer regions of strains No. 2, No. 5, No. 10 and their related species using the specific oligonucleotide primers for strains No. 2 (A), No. 5 (B) and No. 10 (C). PCR was performed with genomic DNA of strain No. 2 (lane 1), *N. capsulatum* (lane 2), *N. taihuense* (lane 3), *N. resinovorum* (lane 4), strain No. 5 (lane 5) *P. citronellolis* (lane 6), *P. nitroreducens* (lane 7), *P. stutzeri* (lane 8), strain No. 10 (lane 9), *R. erythropolis* (lane 10), *R. globerulus* (lane 11) and *R. baikonurensis* (lane 12) as template. M: molecular weight marker.

Table 4. Most probable numbers (MPN) of strains No. 2, No. 5 and No. 10 added to oil-contaminated soil.

Dilution	Numbers of tubes showing positive results of PCR with the specific primers for:		
	Strain No. 2	Strain No. 5	Strain No. 10
10 ⁻¹	3/3	3/3	3/3
10 ⁻²	3/3	3/3	3/3
10 ⁻³	3/3	3/3	3/3
10 ⁻⁴	2/3	3/3	3/3
10 ⁻⁵	0/3	1/3	0/3
10 ⁻⁶	0/3	0/3	0/3
10 ⁻⁷	0/3	0/3	0/3
MPN (cells/g)	1.1 × 10 ⁵	4.6 × 10 ⁵	2.4 × 10 ⁵
Addition of strains (cells/g)	1.4 × 10 ⁵	3.2 × 10 ⁵	4.0 × 10 ⁵

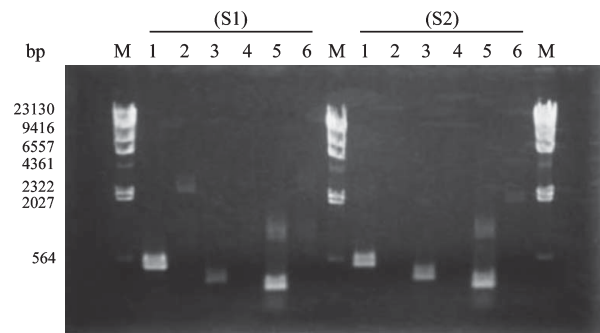


Fig. 5. Detection of strains No. 2, No. 5 and No. 10 from oil-contaminated soils S1 and S2 by PCR. PCR was performed by using specific primers for strains No. 2 (lanes 1 and 2), No. 5 (lanes 3 and 4) and No. 10 (lanes 5 and 6). Template DNA was obtained from the soils, which were added with the strains at a concentration of approximately 10⁵ cells/g each (lanes 1, 3 and 5) or were not added with the strains (lanes 2, 4 and 6). M: molecular weight marker.

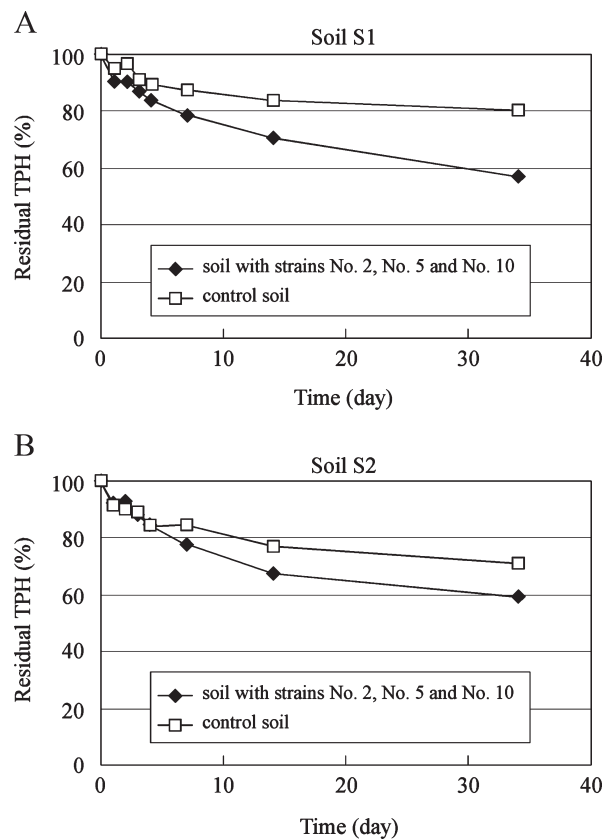


Fig. 6. Residual total petroleum hydrocarbons (TPH) in oil-contaminated soils S1 (A) and S2 (B) in laboratory test of bioremediation. Initial TPH concentrations of soils S1 and S2 were approximately 6,000 mg/kg and 10,000 mg/kg, respectively, and residual TPH were shown at the ratio to initial values. The soils were added with the strains No. 2, No. 5 and No. 10 at a concentration of approximately 10⁶ cells/g each (black diamonds) and control soils were not added with the strains (white squares).

から DNA 中の制限酵素サイトを調べ、増加した DNA の長さとは照合して増加した菌種を特定した。土壌 S1 で顕著に増加した微生物は *Parvibaculum lavamentivorans* (相同性 95%), *Dyella ginsengisoli* (相同性 97%), *Enterobacter ludwigii* (相同性 99%) であり、土壌 S2 で顕著に増加した微生物は *Solimonas soli* (相同性 97%), *Bacillus thuringiensis* (相同性 99%) であった。いずれの微生物もバイオセーフティレベルは 1 であった。

2.8. 安全性の確認

No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の安全性を確かめるため、動物を用いた病原性・毒性試験を行った。ラットを用いた単回経口投与試験においては、2 週間の観察期間中どの群においても死亡は見られず、一般状態、体重推移および剖検においても異常は認められなかった (data not shown)。ヒメダカを用いた水中暴露試験においては、2 週間の観察期間中、対照区との差異は観察されず、供試魚への影響は認められなかった (data not shown)。

2.9. 油汚染土壌浄化工事モニタリング

国内の重油汚染サイトにおいて No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株を用いた浄化工事が 8 ヶ月間にわたって行われた。対象土量は約 3,000 m³ で、油汚染は帯水層に存在したため、地下水循環方式が採用された。No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株を浄化開始時にそれぞれ約 1×10^5 cells/g となるように添加し、以降は添加しなかった。浄化工事開始前から 8 ヶ月目までの No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の菌数 (Fig. 10) と土壌油分濃度 (Fig. 11) を調べた。菌数は代表的な 1 地点を PCR-MPN 法で測定し、油分濃度は 21 地点・深度の平均をとった。また、6 段階 (油臭) または 5 段階 (油膜) で 21 地点・深度の油臭・油膜強度を評価した。浄化工事開始前の平均油臭強度、平均油膜強度はそれぞれ 4.23, 3.47 であったが、8 ヶ月目には平均油臭強度 2.66, 平均油膜強度 2.05 となり、浄化目標である油臭強度 3, 油膜強度 2 をほぼ達成していた (data not shown)。

3. 考 察

本研究では、重油を基質としたスクリーニングで得られた約 200 株の微生物から 3 種類の油分解菌 No. 2 株, No. 5 株, No. 10 株を選抜した。選抜方法はバイオオーグメンテーションへの適用を見据えて、実用性・安全性を重視した。すなわち、選抜の第一段階では、重油培地での生育のよい菌を選抜し、第二段階では近縁種に病原菌のいない菌を選抜した。第二段階の選抜ではバイオセーフティレベル 2 以上の病原菌に加え、バイオセーフティレベル 1* に分類される日和見細菌も病原菌とみなし、これらを近縁にもつ菌を除外した。

16S rRNA 遺伝子解析から No. 2 株, No. 5 株, No. 10 株はそれぞれ *Novosphingobium* 属, *Pseudomonas* 属, *Rhodococcus* 属に属する細菌であることが判明した。この結果を受け、No. 2 株, No. 5 株, No. 10 株をそれぞれ、*Novosphingobium* sp. No. 2, *Pseudomonas* sp. No. 5, *Rhodococcus* sp. No. 10 と命名した。石油成分の分解に関

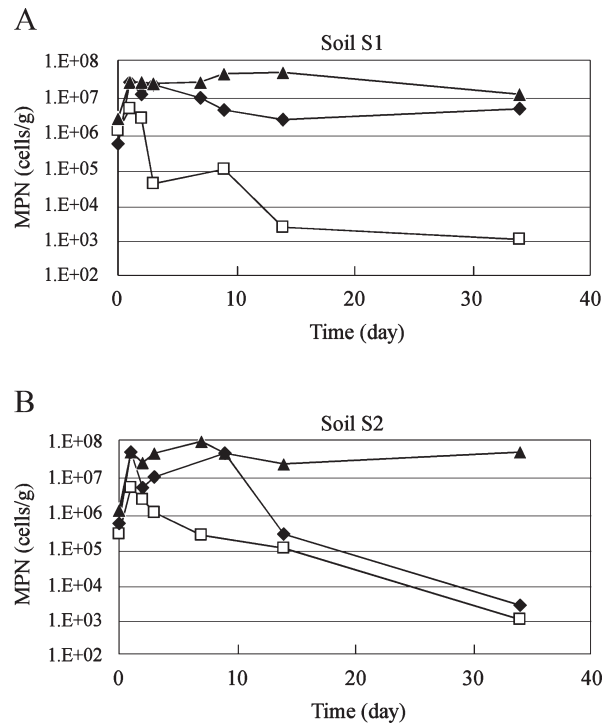


Fig. 7. Most probable numbers (MPN) of strains No. 2 (black diamonds), No. 5 (white squares) and No. 10 (black triangles) in oil-contaminated soils S1 (A) and S2 (B) in laboratory test of bioremediation.

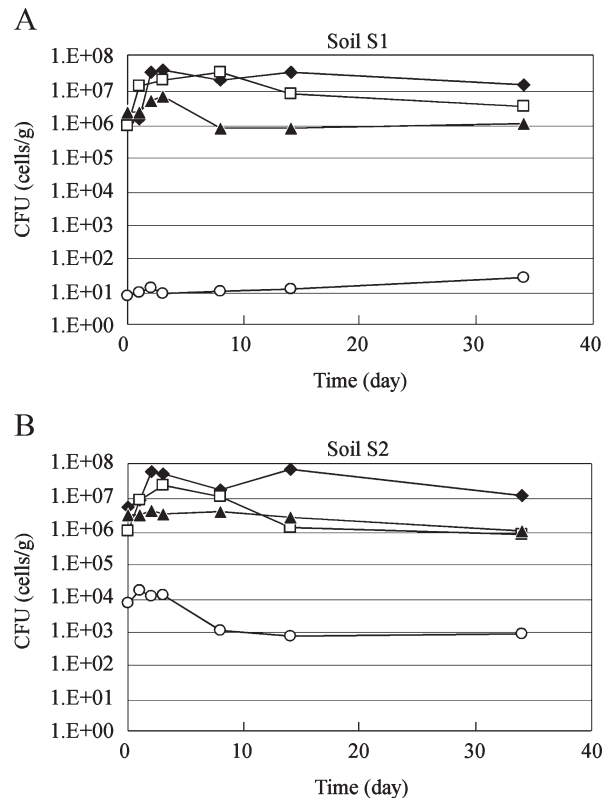


Fig. 8. Colony forming units (CFU) of aerobes (black diamonds), anaerobes (white squares), actinomycetes (black triangles) and fungi (white circles) in oil-contaminated soils S1 (A) and S2 (B) in laboratory test of bioremediation.

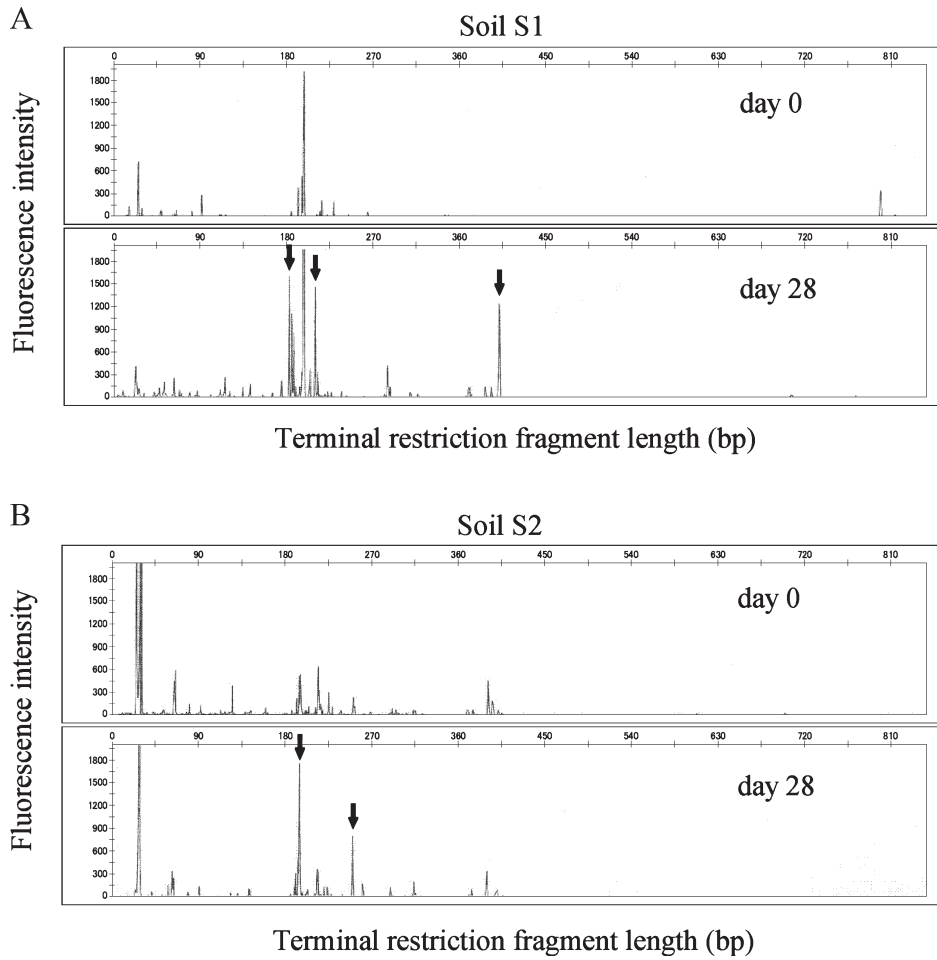


Fig. 9. T-RFLP patterns of microbes in oil-contaminated soils S1 (A) and S2 (B) in laboratory test of bioremediation. 16S rRNA genes obtained by amplification of total DNA from the soils were digested by restriction enzyme *Hae*III and analyzed by capillary electrophoresis. Peaks of increased DNA fragments after 28 days were indicated by arrows.

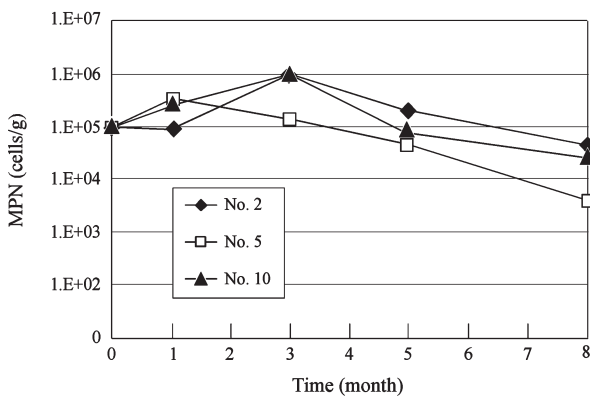


Fig. 10. Most probable numbers (MPN) of strains No. 2 (black diamonds), No. 5 (white squares) and No. 10 (black triangles) in soil from oil-contaminated field. The strains were added to the field at a concentration of approximately 1×10^5 cells/g each for bioremediation.

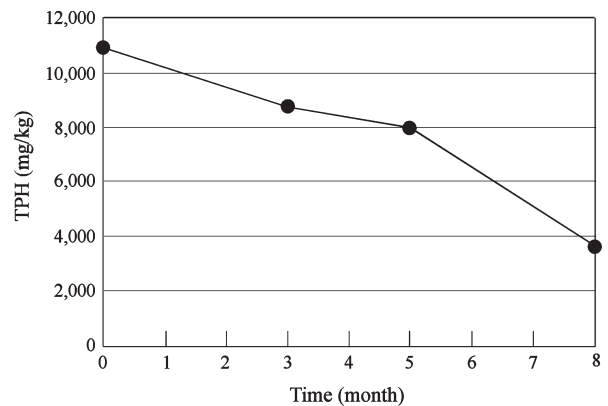


Fig. 11. Concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH) contained in soil from oil-contaminated field. Values of TPH are the average of 21 points of the field.

しては、*Novosphingobium* 属および近縁の *Sphingomonas* 属、また *Pseudomonas* 属、*Rhodococcus* 属においていずれもアルカンや多環芳香族化合物の分解菌の報告がある^{1-4,19,20)}。資化性の検討から No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株はアルカンを資化することがわかった。その他の石油成分をほとんど資化できなかったことから 3 株の重油培地での生育は主に重油中のアルカンを基質としていたと考えられる。No. 10 株は特に広い範囲のアルカンを資化できたが、No. 2 株および No. 5 株は No. 10 株の資化できないアルカンを資化できた。実際の現場に適用する際には 3 株同時に使うことでお互いを補い、より効率的な浄化が期待できる。好適生育温度の検討から、No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株は 20°C~30°C で生育がよいことがわかった。地域や季節にも左右されるが、土壌中の温度と大幅な乖離はないと思われ、土壌中での油分分解に適した特性を持つことが確認できた。

No. 2 株、No. 5 株、No. 10 株の土壌中での菌数を把握するためのツールとして、16S-23S intergenic spacer 領域の塩基配列を利用した特異的検出・定量方法の確立を試みた。No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株の 16S-23S intergenic spacer 領域は、近縁種と似通った塩基配列を持ちながらも特異的な部分があり、これを利用したプライマーを設計し PCR を行うことで、近縁種を誤って検出することなくこれら 3 株を検出することができた。実際の現場ではこれら 3 株の他に多くの土壌微生物が存在するため、PCR のテンプレートとなる土壌 DNA には多くの微生物由来のゲノムが含まれることになる。近縁種でなくとも誤って検出する可能性があるため、実際の油汚染土壌を用いて検出の確認を行った。この際、土壌から直接ゲノムを抽出する方法は、土壌に含まれる油の影響から抽出効率が悪かったため、培養を挟んでゲノムを得ることとした。培養には他の微生物の生育を極力抑えるために、No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株が利用でき他の微生物があまり利用できないと思われる octadecane を主な基質とした。培養後に抽出したゲノムには No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株以外の微生物由来のゲノムが多少なりとも含まれていると考えられるが、それらを誤って検出することなく 3 株を特異的に検出することができた。

No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株の特異的検出が可能になったので、これを最確数法 (MPN 法) と組み合わせた PCR-MPN 法で No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株を定量することを試みた。ここで言う最確数法とは試料の段階希釈液を 3 本または 5 本ずつの試験管で培養し、目的の菌の増殖が確認できれば陽性、そうでなければ陰性として陽性管の数から試料中の生菌数を確率的に推定する方法である。実験の結果、No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株の添加量と PCR-MPN 法で求めた値は同程度であり、PCR-MPN 法での菌数モニタリングが可能であることが確認できた。より精度の高い値が求められる場合には、段階希釈の希釈倍率を下げることや試験管の数を増やすことで対応できると考えられる。

バイオオーグメンテーションに No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株を適用する前に、2 種類の油汚染土壌を用いた実証実験を行った。3 株を添加しない場合と比較して、添加した場合の油分濃度の減少が速く、3 株によ

る油分分解効果が認められた。3 株を添加しない場合においても油分濃度の減少が見られたが、揮発や土着菌による分解の効果があつたと考えられる。また、2 種類の土壌のどちらでも、No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株は試験開始直後に増加が見られ、油分濃度の減少も初期が最も速かった。その後は各株によって挙動が異なるが、おおまかな傾向として菌数の減少が見られ、油分濃度の減少速度も遅くなっていた。菌数の増減と油分の減少速度は相関があると考えられ、実際のバイオオーグメンテーションではこれらのデータを突き合わせることでより精密なモニタリングができると考えられる。

バイオオーグメンテーションでは窒素やリンなどの塩を栄養物質として微生物と一緒に土壌に添加する機会が多いが、栄養物質により土壌微生物の異常繁殖が起こる可能性がある。「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に沿ったバイオオーグメンテーション工事では必ず事前試験が求められ、本番同様の処理を施した場合に病原性菌の顕著な増加がないこと、病原性菌でなくとも土壌微生物の異常な増殖がないことを確認する必要がある。実証実験において、16S rRNA 遺伝子の T-RFLP 解析とクローン解析により、増加した微生物が特定できた。増加した微生物はすべてバイオセーフティレベル 1 の微生物であった。また、土壌微生物は初期に数十倍の増殖が確認されたが、栄養物質や給水、攪拌の効果であると考えられ、異常と思われる増殖は確認されなかった。これらの方法によりバイオオーグメンテーションで必要とされる土壌微生物のモニタリングが可能であることを確認できた。

本研究においては、スクリーニングの段階から病原性菌を近縁を持つ微生物を排除するなど、微生物の安全性を最も重要視した。ラットおよびヒメダカを用いた動物実験を行い、No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株に病原性・毒性がないことを確認するなどの一連の実験結果から、No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株がバイオオーグメンテーションに適用できる安全・有効な微生物であるということが認められ、平成 21 年に経済産業省および環境省より「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に適合した微生物であるとの確認を受けた。

「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の適合確認を受け、国内の重油汚染サイトにおいて、No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株を用いたバイオオーグメンテーション工事が 8 ヶ月間にわたって行われた。浄化工事中の No. 2 株、No. 5 株および No. 10 株の菌数は No. 2 株および No. 10 株が浄化開始 3 ヶ月目に投入量の 10 倍以上まで増加したのに対し、No. 5 株は 1 ヶ月目に 2 倍程度増加した後は減少していた。No. 5 株の菌数が No. 2 株や No. 10 株ほどには増加しなかったのは油質や土壌特性、地理条件などが合わなかった可能性があるが、期間を通して油分濃度の減少、油臭・油膜の軽減は顕著に進んでおり、それぞれの菌株が油分分解に貢献したと考えられる。8 ヶ月目の時点において浄化目標はほぼ達成され、浄化工事は完了となった。今後は現場への適用実績を重ねてデータを集め、より効率的な浄化のための条件を整備することが課題となるだろう。

4. 要 約

バイオオーグメンテーションへの適用を視野に入れ、重油を基質としたスクリーニングを行い約 200 株の微生物を分離した。このうち重油培地での生育の良さ、および近縁種の安全性を考慮し、3 種類の微生物 No. 2 株, No. 5 株, No. 10 株を選抜した。16S rRNA 遺伝子解析により No. 2 株, No. 5 株, No. 10 株をそれぞれ *Novosphingobium* sp. No. 2, *Pseudomonas* sp. No. 5, *Rhodococcus* sp. No. 10 と同定した。各種特性解析により No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の好適生育環境や資化可能物質を明らかにした。No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の特異的検出・定量方法を確立するため、16S-23S intergenic spacer 領域の塩基配列を利用して特異的プライマーを設計し、PCR 法によりこれら 3 株を検出した。この方法は、実際の土壤にこれら 3 株を添加した場合でも他の微生物を誤って検出することなく、特異的に 3 株を検出することができた。また、最確数法と組み合わせることで、土壤中のこれら 3 株の定量が可能であることを確かめた。実際の油汚染土壤を用いた実証実験を行い、No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の油分解能力を確認し、土壤微生物のモニタリングが可能であることを確かめた。No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株の安全性に関する試験を行い、「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に適合した微生物であるとの確認を受けた。No. 2 株, No. 5 株および No. 10 株は実際のバイオオーグメンテーション工事にも適用され、浄化目標を達成した。

文 献

- 1) Habe, H. and T. Omori. 2003. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 225–243.
- 2) van Beilen, J.B. and E.G. Funhoff. 2007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 13–21.
- 3) Heinaru, E., M. Merimaa, S. Viggor, L. Merit, I. Leito, J. Truu, and A. Heinaru. 2005. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 363–373.
- 4) de Carvalho, C.C.C.R and M.M.R. da Fonseca. 2005. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 389–399.
- 5) Kweon, O., S.-J. Kim, R.C. Jones, J.P. Freeman, M.D. Adjei, R.D. Edmondson, and C.E. Cerniglia. 2007. *J. Bacteriol.* 189: 4635–4647.
- 6) 経済産業省・環境省. 2005. 微生物によるバイオレメディエーション利用指針. 経済産業省環境省告示第四号.
- 7) Jones, S.E., A.L. Shade, K.D. McMahon, and A.D. Kent. 2007. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 659–662.
- 8) Valcheva, R., P. Kabadjova, C. Rachman, I. Ivanova, B. Onno, H. Prévost, and X. Dousset. 2007. *J. Appl. Microbiol.* 102: 290–302.
- 9) Ni, Y.-Q., Y. Yang, J.-T. Bao, K.-Y. He, and H.-Y. Li. 2007. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 58–66.
- 10) Chen, T.-L., L.-K. Siu, R.C.-C. Wu, M.-F. Shaio, L.-Y. Huang, C.-P. Fung, C.-M. Lee, and W.-L. Cho. 2007. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 801–806.
- 11) Spargser, J. and R. Rosengarten. 2007. *Vet. Microbiol.* 125: 170–174.
- 12) Gtari, M., L. Brusetti, A. Cherif, A. Boudabous, and D. Daffonchio. 2007. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1031–1040.
- 13) Hassan, A.A., A. Vossen, C. Lämmle, U. Siebert, and J.F. Fernández-Garayzábal. 2008. *Microbiol. Res.* 163: 132–135.
- 14) Miwa, N., T. Nishina, S. Kubo and M. Atsumi. 1997. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 89–92.
- 15) 土壤微生物研究会編. 1997. 土壤微生物実験法. 養賢堂.
- 16) Saitou, N. and M. Nei. 1987. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- 17) 中央環境審議会土壤農薬部会・土壤汚染技術基準等専門委員会. 2006. 油汚染対策ガイドライン. 環境省.
- 18) 篠田純男 (編集代表者). 2008. 病原体等安全取扱・管理指針. pp. 13–35. 日本細菌学会.
- 19) Peng, F., Z. Liu, L. Wang, and Z. Shao. 2007. *J. Appl. Microbiol.* 102: 1603–1611.
- 20) Pinyakong, O., H. Habe, and T. Omori. 2003. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 1–19.