

原著論文（短論文）

バイオサーファクタント生産菌の分離とバイオレメディエーションへの利用

Biosurfactant-Producing Bacteria and Its Application to Bioaugmentation

高松 邦明¹, 山津 敦史², 今中 忠行^{1*}

KUNIYAKI TAKAMATSU, ATSUSHI YAMATSU 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クス244号

*TEL/FAX: 077-561-5811

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

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

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

(原稿受付 2013年4月16日／原稿受理 2013年6月20日)

We isolated a biosurfactant-producing bacterium No. 1 from oil-contaminated soil. The sequences of the 16S ribosomal RNA gene of No. 1 indicated phylogenetic position of genus *Pseudomonas*. Strain No. 1 was therefore designated as *Pseudomonas* sp. No. 1. Strain No. 1 and three oil-degrading bacteria (No. 2, No. 5 and No. 10) were simultaneously applied to bioremediation of oil-contaminated soil. As a result it was revealed that No. 1 and three bacteria could be successfully applied to decrease total petroleum hydrocarbons in soil, oil slick and smell.

キーワード：バイオサーファクタント生産菌, バイオレメディエーション, 油汚染土壤, 油膜, 油臭

Key words: Biosurfactant-producing bacterium, bioremediation, oil-contaminated soil, oil slick, oil smell

土壤汚染は環境問題だけでなく、ブラウンフィールド化、不動産価値の低下等、社会経済問題としても解決の急がれる重要な問題である。特に、化学工場やボイラーエquipmentの跡地などの油汚染土壤は、切実な問題となっている。油汚染土壤の浄化技術としては、化学的手法、物理的手法が存在するが、コスト、環境負荷の点で問題がある。近年、産業経済情勢や環境意識の高まりに伴い、微生物を利用するバイオレメディエーションが、低コスト・低環境負荷の浄化技術として実用化への取り組みがなされ、これに呼応し、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、技術の実用化の支援体制を整えた¹⁾。微生物を利用するバイオレメディエーションの中でも特に、バイオオーグメンテーションについては、近年注目が高まっており、技術の進展と波及効果が期待されている。

油汚染分野に限らず、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²⁻⁶⁾。最終的にはこれらの研究成果を実際の汚染現場に適用し、浄化性能及びコスト等技術的検証が期待されているが、同時に安全性や環境への影響を十分検討する必要がある。平成17年に国が策定した「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」に、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が示されている¹⁾。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、土壤中の利用微生物数の把握、土壤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。

現在、油汚染土壤の微生物を利用するバイオレメディエーションは適用範囲が狭く、高濃度油汚染土壤浄化は物理的手法・化学的手法に頼らざるを得ない状況である。また、C重油等重質油や多環芳香族に関する微生物分解機能及び分解に関与する微生物についての知見がほとんどないのが実情である。

本研究は、重油を基質としたスクリーニングによりバイオサーファクタント（生物由来の界面活性剤）生産菌（No. 1 株）を取得し、同定や特性解析等基礎的な研究を進めた。同時に、No. 1 株を活用した、油膜・油臭除去及び微生物分解促進技術を確立し、油分解に関与する微生物や分解機構に関する検討を行い、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。即ち、筆者らが研究開発した3種類の油分解菌⁷⁾、*Novosphingobium* sp. No. 2 (No. 2 株と称する)、*Pseudomonas* sp. No. 5 (No. 5 株と称する) 及び

Rhodococcus sp. No. 10 (No. 10 株と称する) から構成される油分解菌（以下 3 菌株と称する）を利用するバイオオーゲンテーションへの適用を目的に No. 1 株の油臭・油膜消滅及び油分分解促進効果を検証した。

まず油汚染土壤は国内の工場跡地より取得し、これを微生物分離源とした。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。これらをそれぞれ栄養培地で培養し、バイオサーファクタントの生産性が高い 1 株を選抜しそれを No. 1 株と名付けた。なおバイオサーファクタント生産菌のスクリーニングおよび油膜排除活性の測定は Morikawa らの方法⁸⁾ に従った。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。また微生物の生理学的特性解析や遺伝子の取得および DNA 塩基配列の決定、系統樹の作成や土壤油分濃度測定は前報の方法⁷⁾ に準じた。

No. 1 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した (DDBJ の accession 番号 AB827325)。この情報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系統樹を作成した (Fig. 1)。その結果、No. 1 株は *Pseudomonas citronellolis* (99%) と最も相同性が高く、系統樹上でこの属の細菌が形成するクラスターに位置していた。さらに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⁹⁾。本菌の近縁種はバイオセーフティーレベル 1 であり病原性のないものだったので、No. 1 株は安全であると判断した。

No. 1 株は 5~35°C で生育し、最適生育温度は 25°C であった。また pH 6~10 で良好な生育を示した。また本菌の生理学的特性と抗生物質感受性をそれぞれ Table 1 と 2 に示す。硝酸の還元能や糖鎖の β-結合切断活性はなかった。また抗生物質の抗菌スペクトルはおおむね

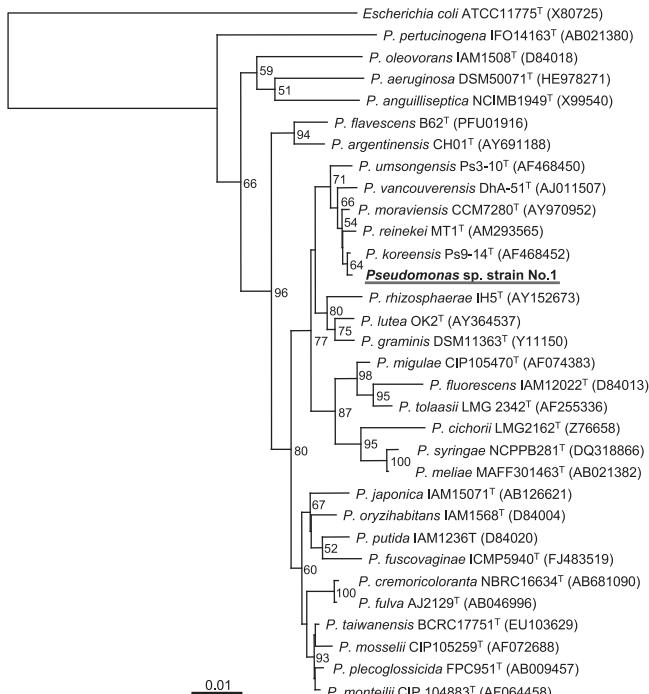


Fig. 1. Phylogenetic tree of strain No. 1 and the related bacteria

Table 1. Results of API 20 NE test on strain No. 1

Oxidase	+
Reduction of nitrate to nitrites	-
Reduction of nitrate to nitrogen	-
Indole production	-
Acidification of glucose	-
Arginine dihydrolase	+
Urease	-
β-Glucosidase	-
Protease	+
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

Table 2. Results of ATB VET test on strain No. 1

Erythromycin	R
Lincomycin	R
Pristinamycin	R
Tylosin	R
Colistin	R
Cotrimoxazole	R
Sulfamethizole	R
Flumequine	S
Oxolinic acid	S
Enrofloxacin	S
Nitrofurantoin	R
Fusidic acid	R
Rifampin	S
Metronidazole	S
Penicillin	R
Amoxicillin	R
AMOX+CLAV. AC	R
Oxacillin	R
Cephalothin	R
Cefoperazone	R
Streptomycin	S
Spectinomycin	S
Kanamycin	S
Gentamicin	S
Apramycin	S
Chloramphenicol	R
Tetracycline	S
Doxycycline	S

S; Sensitive, R; resistant

Table 3. Criteria to judge the level of oil slick and oil smell in bioremediation

Level	Oil smell	Level	Oil slick
0	Odorless	0	None
1	Odor barely recognizable	1	barely detectable (only small spots are visible)
2	Weak odor, but recognizable	2	Detectable (low) (Silver and/or rainbow colored stripes are detectable)
3	Clearly recognizable odor	3	Detectable (moderate) (Silver and/or rainbow colored patches are clearly detectable)
4	Strong odor	4	Detectable (high) (Silver and/or rainbow colored slick fully covers water surface)
5	Overwhelming odor		

Pseudomonas 属細菌の特徴と一致していた。

油臭・油膜強度は「油汚染対策ガイドライン－鉱油類を含む土壤に起因する油臭・油膜問題への土地所有者等による対応の考え方－」¹⁰⁾を参考に、6段階（油臭）または5段階（油膜）で評価した（Table 3）。油臭強度の測定方法は、土壤 50 g を 500 ml のガラスびんに入れ、ふたをして約 25°C で 30 分間静置した後、直ちに土壤から発生する臭いを嗅ぎ、Table 3 の基準に沿って 6 段階で判定した。油膜強度の測定方法は、黒い台の上に置いた直径 9 cm のシャーレに蒸留水 50 ml を測り入れ、5 g の対象土壤を静かに入れた。直後の液面を目視し、Table 3 の基準に沿って 5 段階で判定した。

バイオオーグメンテーションへの適用を目的に No. 1 株+3 菌株の油臭・油膜試験を行った。まず、410 mm×610 mm×160 mm の大きさのトレイに油汚染土壤 40 kg（湿土）を入れ均一に混合した。No. 2 株、No. 5 株、No. 10 株 および No. 1 株を 1 株あたり 10^6 cells/g 湿土の濃度で油汚染土壤に添加し、よく混合した。菌を添加した土壤は屋外にふたをせずに置き、1 日～4 日おきに油臭・油膜の強度を測定した。対照区として 3 菌株のみを添加した区を作り、同様の実験を行った。No. 1 株を添加することにより油臭・油膜は早期に無くなかった。一方 3 菌株のみでは油膜強度 3、油臭強度 1 まで低下したがそれ以上の改善が認められなかった（Fig. 2）。なお No. 1 株の菌数は最終的に初発時の 10 分の 1 以下に低下していたので環境に悪影響はないと言断できる。

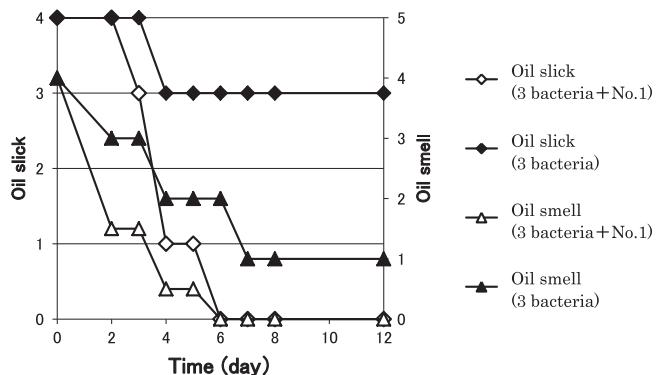


Fig. 2. Effect of strain No. 1 on oil slick and smell in the process of bioremediation

No. 1 株を添加することにより、既報の 3 菌株の油分解効果を高める促進効果が認められた。これらの結果は、現実的に重要な問題となっている油膜、油臭問題を No. 1 株の添加により解決できる方策を示したものと考えられる。なお今後の課題としてここで示されたバイオサーファクタントの分子構造を明らかにすることが必要であろう。

文 献

- 1) 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.
- 2) Habe, H. and T. Omori. 2003. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 225–243.
- 3) van Beilen, J.B. and E.G. Funhoff. 2007. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 13–21.
- 4) Heinaru, E., M. Merimaa, S. Viggør, L. Merit, I. Leito, J. Truu, and A. Heinaru. 2005. FEMS Microbiol. Ecol. 51: 363–373.
- 5) de Carvalho, C.C.C.R. and M.M.R. da Fonseca. 2005. FEMS Microbiol. Ecol. 51: 389–399.
- 6) 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.
- 7) 高松邦明, 山津敦史, 宮北憲治, 今中忠行. 2012. 環境バイオテクノロジー学会誌. 12: 47–57.
- 8) Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, and T. Imanaka. 1993. J. Bacteriol. 175: 6459–6466.
- 9) 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.
- 10) 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.