

# 秋田県内土壌からの石油分解細菌の検索

渡 邊 敏 彦・船 木 一\*・佐 藤 裕 介\*\*

## Screening of Petroleum-decomposing Bacteria in the Soil of Akita Prefecture

Toshihiko WATANABE, Hajime FUNAKI, and Yusuke SATO

(1998年11月24日受理)

Forty-one strains of petroleum resistant bacteria were isolated from the soil samples in Akita prefecture. Among them, 6 strains were shown to decompose petroleum, and yielded the bacterial cell mass. In the simplified field experiments, about a half weight of added heavy oil of A degree was disappeared by incubation with these bacteria in a month period. Moreover, several strains of them could grow under both oxygen and oxygen-free atmospheres. These findings would contribute to promote more detailed studies on hydrocarbon metabolism in petroleum-decomposing bacteria.

### 1 はじめに

地球上の環境汚染は21世紀へ向けて人類の生存を脅かす存在となっている。地球上の汚染物質は、その始まりより主に微生物あるいは微小動物（原生動物）の働きにより分解、利用されてきた。微生物のこのような性質は広く活性汚泥の利用という形で、都市廃水、産業廃水、また特殊な産業廃水（例えばメッキ廃液のシアン化ソーダや屠殺場の含脂肪廃液など）に馴養させた微生物によって環境は浄化されてきた。

しかしながら、近年の化学工業の発展、中でも石油化学工業の発展により生産された製品は微生物による分解を受け難く、環境汚染の大きな原因となっている。更に、それらの原料である石油も同様に微生物による分解は通常困難とされている。近年日本海沿岸でのタンカー事故による石油流出は我々の記憶に新しい。

我々はこれら石油により汚染された環境の浄化に適する微生物を身近な所から検索、単離を試み、その単離菌株を用いた原油の分解活性の測定を行った。さらに単離菌株の部分的な性質も検討した。秋田県はわが国有数の石油生産県であり、県内には多

数の油井がある。また中には未だに石油の自噴する露頭も存在する。このような環境には当然石油を分解して、これをエネルギー源として生育している微生物の存在が推定される。これが秋田県に範囲を限定した理由である。石油による汚染というように全く人工的な極限状態に於て、どのような微生物が生育しているかについては既に幾つかの報告がなされている。1番目はn-パラフィン資化性の酵母、細菌についてである（文献1）。これはsingle cell proteinとして、将来の食料問題の解決を目指したものであった。2番目はHorikoshi *et al* らの報告（文献2, 3, 4）に示されているように、高濃度の有機溶媒（トルエン）中で*Pseudomonas* 属細菌が生育可能であることが示されたことである。3番目にKato *et al*（文献5）は界面活性剤添加により長鎖炭化水素の分解が促進される*Acinetobacter* 属細菌の存在を報告している。4番目に辻、千野らは湾岸戦争で原油に著しく汚染されたクエートの油田地帯で、石油分解性細菌の積極的な増殖、活性化を試みており、微生物の栄養源を与えることで、1年間で約1/4まで石油の炭化水素を分解することに成功している（文献6）。また、石油分解細菌として*Pseudomonas* 属、*Acinetobacter* 属、*Alcaligenes* 属細菌などの存在も報告しているが、酸素の重要性についても暗示しているようである。我々は上記の結果を踏まえ、より嫌気的条件を好む石油分解性細菌の単離についても

\* 現在 弘前大学農学部学生

\*\*秋田高専学生

秋田県内土壌からの石油分解細菌の検索

検討を行なった。石油による汚染事故現場の多くが必ずしも好氣的条件にある訳でないことを考えると、その期待される効果は大きいものと考えられる。

2 実験方法

2-1 供試試料

- (A) 秋田県八橋油田油井周辺の土壌
- (B) 秋田県黒川油田油井および露頭周辺の土壌
- (C) 秋田県船川港の海水
- (D) 秋田県秋田市郊外の山砂

試料(A)および(B)は現在も採油中であり、(C)は巨大タンカーの出入りする原油貯蔵基地である。(D)は有機物の少ない場所として選んだ。

2-2 石油資化菌の単離

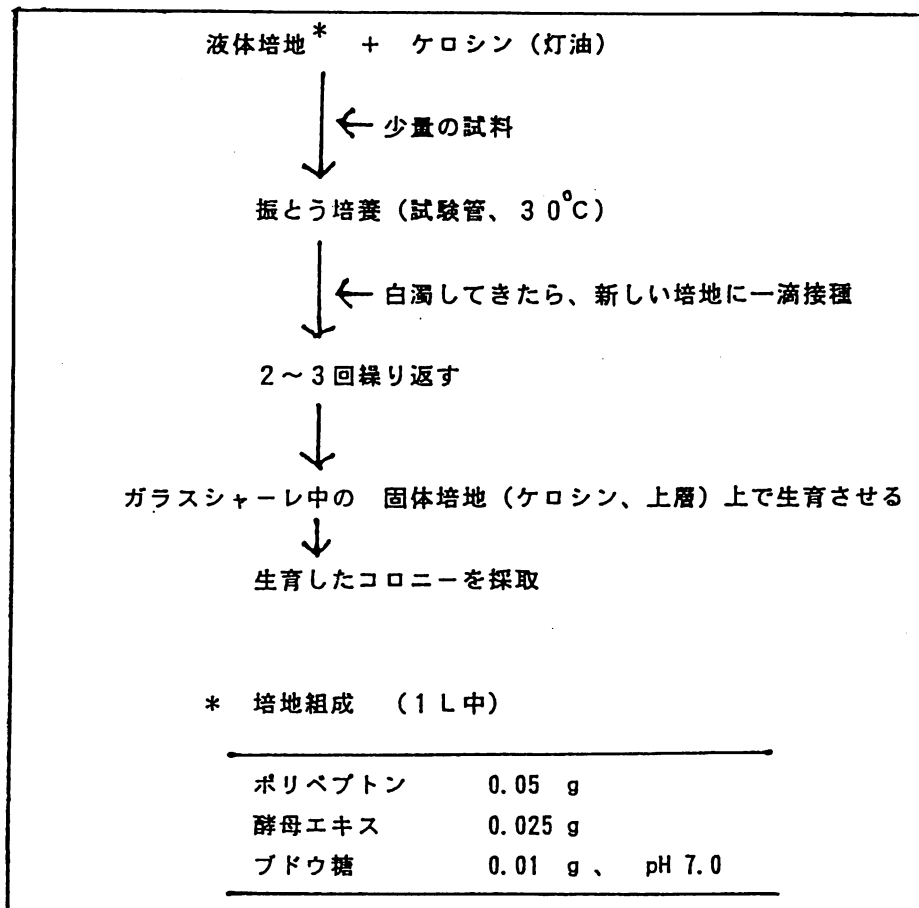
2-1に述べた秋田県内の場所から、現在までに約30試料を採取した。以下 Table 1 に示す方法により行った。外径18 mm、長さ180 mm の試験管に液体培地を15 ml 宛注入し、115°C、10分間滅菌する。少

量の試料を夫々の試験管に添加し、更に石油成分としてのケロシン（灯油）を培地上面約5 mm に重層してブチルゴム栓で密閉する。30°C で数日間振とう培養した後、ケロシン層及び培養液部分を新規培地に少量添加して目的とする細菌の増殖を図った（集積培養, Enrichment culture）。これを2~3回繰り返した後、白濁した培養液の少量を寒天平板培地（ガラス製シャーレ、培地入り）に接種し、その上面を薄くケロシンで重層する。ビニールテープで開口部をふさぎ30°C で培養する。生育した菌体は雑多な種類の細菌群であるので、その純化を新しい寒天平板培地により行い、単一コロニーをピジョンスラントに生育させ、保存する。

上記の方法で単離された細菌類の石油資化（分解と利用）能力の検定には2つの方法を行った。

第一の方法は前記の液体培地を試験管に分注し、滅菌後被検菌を夫々接種する。ケロシンを添加したものと、無添加のものについて培養を行い、それらの菌体の生育量を比較する。もしケロシンを炭素源として利用する細菌がいた場合、ケロシン無添加の

Table 1 実験方法



場合と比較して、菌体の生育が促進されると考えられることより、生育量がより大きい菌株を石油資化菌候補とする。第二の方法は、純化の際に用いた方法と同様にして培地入りシャーレに細菌を接種したのち、1滴ケロシンを落とし表面に拡散させ、30°Cで生育させる。菌体が生育後実体顕微鏡で観察し、ケロシンの薄膜に変化が生じたものを石油資化菌候補とする。海水を試料とした場合は、海水をそのまま培養液とし、ケロシンを添加した。

### 2-3 単離菌株による原油の分解

自然状態における石油の分解実験へのアプローチとして、単純化した系を構築し、Table 3に示した。即ち、実験室内のドラフト中に小型振とう培養機を設置し、フィールド実験を模して解放系（前培養以外は滅菌操作は行わない）において、三角フラスコを緩く振とうを行い、中の原油（A重油）の変化を追跡した。約一か月後に反応を停止し、残存原油をヘキサンで抽出し、比濁法および乾燥物重量法にて測定した。

Table 2 単離菌株の性質

菌株名	グラム染色	形	大きさ	鞭毛
20	陰性	桿菌	1.44x0.52	あり
35	陰性	桿菌	1.63x0.72	あり
37	陽性	球菌	—	未確認
39	陽性	球菌	—	未確認
40	陽性	球菌	—	未確認
18	—	—	—	未確認

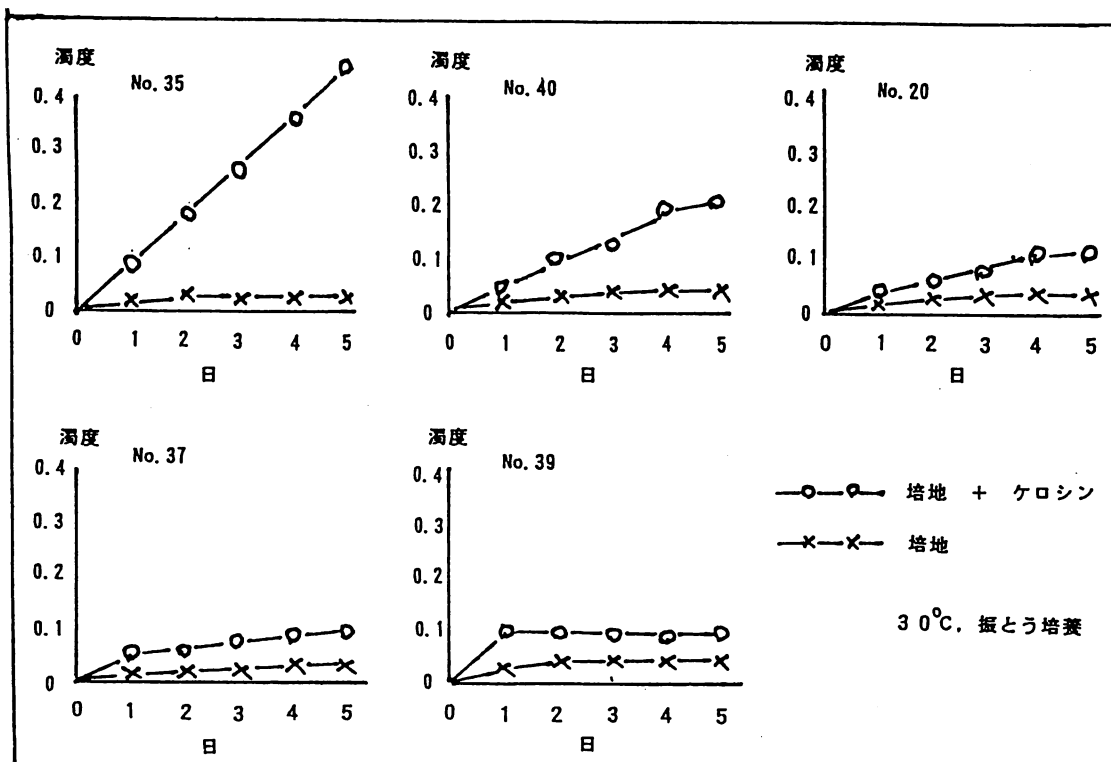


Fig. 1 ケロシン添加による生育（濁度）の促進

2-4 分子状酸素非存在下における生育

菌株単離に用いたと同様の固形培地（ガラスシャーレ）2個に単離した菌株を塗沫し、ケロシンを重層する。1個は開口部をビニールテープで密閉し、30°Cで培養する。あとの1個はデシケーターに入れ、真空ポンプにて脱気後、Arガスを注入する。これを数回繰り返し、最後にArガス注入後、デシケーター（シャーレ入り）を30°Cのインキュベーターに入れ培養する。

3 実験結果および考察

3-1 ケロシン資化菌株の取得

現在迄に試料(A)及び(B)からケロシン存在下で生育する菌株として41株を単離した。試料(C)については培養液の白濁化が見られたが、単離には至っていない。試料(D)は目下検討中である。

単離した41株についてケロシンを炭素源として利

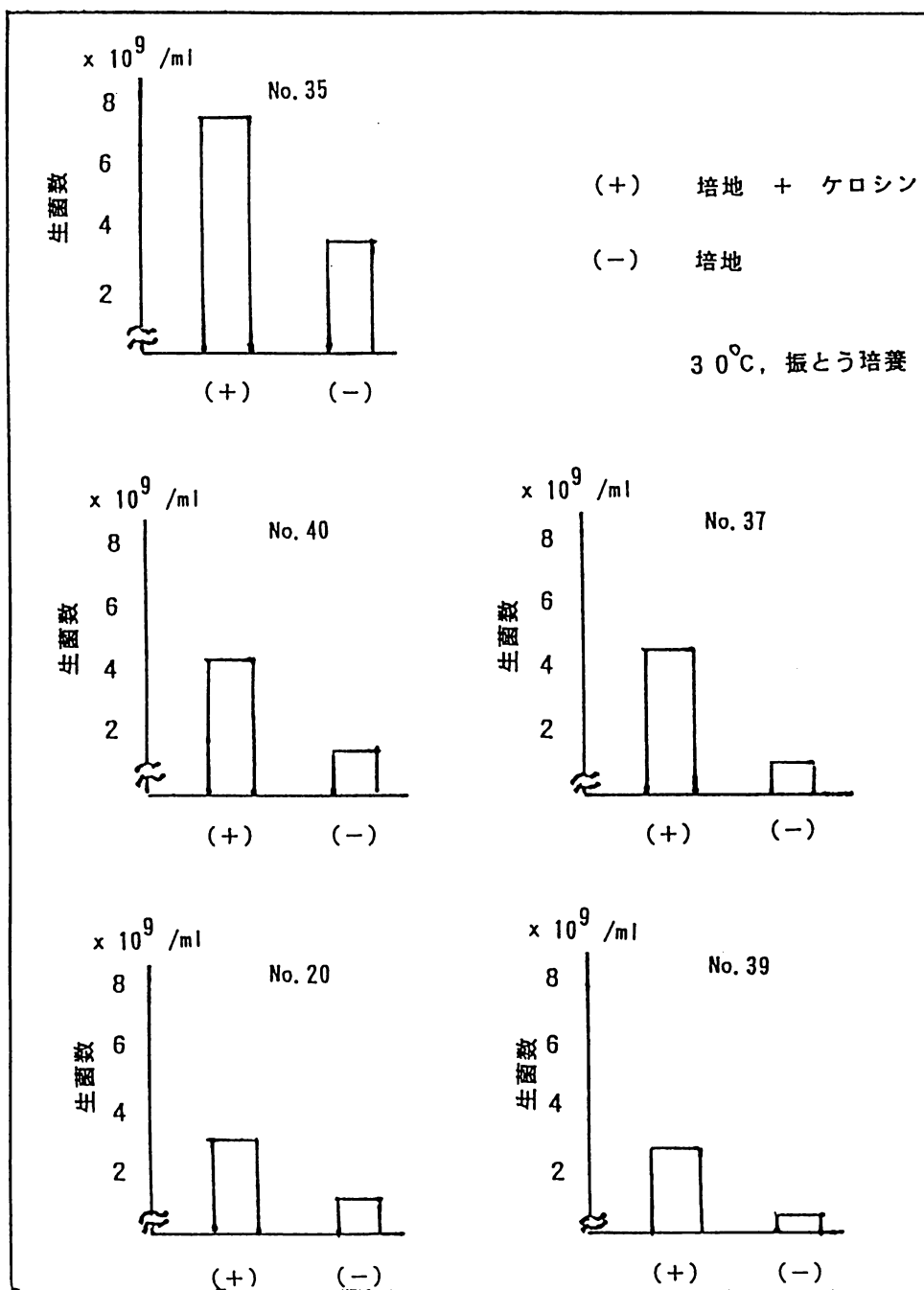


Fig. 2 ケロシン添加による生育（生菌数）の促進

用するかを第一の実験方法により検討した。ケロシンを利用する菌株は、利用しない菌株より当然その生育量（培養液の濁度および生菌数）は大きいと考えられる。その結果を濁度については Fig. 1 に、生菌数については Fig. 2 に示した。生育が促進された 5 株のうち、No. 35 株は特に濁度における促進効果が大きいようである。なお、本実験以降に単離された菌株のうち、No. 18 株については No. 35 株と同程度の促進効果が見られたことよりこれ以降の実験に供した。また第二の実験方法については、ケロシンの粘度が低いためか未だ成功していない。

### 3-2 単離菌株の性質

#### 3-2-1 電子顕微鏡写真での観察

単離菌株はケロシン存在下および非存在下で培養した後、常法に従い処理し、走査型電子顕微鏡により観察した。代表として No. 35 株を選び、その写真を Fig. 3 および Fig. 4 に示した。興味深いことには、本菌は Fig. 3 より桿菌であるが、ケロシン存在下 (Fig. 4) では短桿菌あるいは球菌に近い変化が見られることである。ケロシンが細胞には毒物と考えられることから、この現象は表面積を極力小さくしてケロシンの細胞内への侵入を防いでいるためと考えられる。さらに興味深いことは、Fig. 4 より細胞の表面から多量の物質が出ていることである。本物質については、これを酵素などで切断、抽出し、構成成分の検討が必要であるが、現在考えられることは、粘質物のように見えるこの物質を菌体外に出すことにより、これもケロシンの細胞内への侵入を防いでいるのではないと思われることである。この様に

しても細胞内へ入ったケロシンについては、分解、利用していると考えられる。

#### 3-2-2 菌学的性質

Table 2 に示した通り、グラム染色での挙動、菌の形態などより、幾つかの種類の細菌が取得された。このことは文献(6)などに示されているように多くの属にまたがって広く石油分解細菌が存在しており、我々もそれらの幾つかの細菌を取得した可能性が高いが、未だ同定にはいたっていない。

#### 3-3 単離細菌による原油の分解

Table 3 に示した単純化した系で行ったフィールド実験の結果を Fig. 5 に示した。未分解の重油の定量は 2 つの方法を用いた。第 1 法はヘキサンで抽出した重油を一定量に希釈し、光度計にてその濁度を測定（比濁法）し、対照実験の値に対する百分率で示した。分解が進めば当然その濁度は低下する。用いた菌株は No. 35, No. 18 ともほぼ 50% の分解率が得られた。第 2 法は抽出液のヘキサンを含む揮発性成分を除去した後の重量を測定し、最初に添加した重油の値に対する百分率で示した。この場合も第 1 法とほぼ類似の結果がえられた。重油中の揮発性成分はいずれの場合も同じ値であり、また自然界からの雑菌汚染などもいずれの場合も同じ値と考えられるから、ここで得られた結果は、真の分解率を示していると考えられる。

対照実験 1 の結果は大変興味ある現象と考えられる。すなわち、自然系においては特定の菌株を添加しなくとも、ある程度の栄養物があれば、そこに存

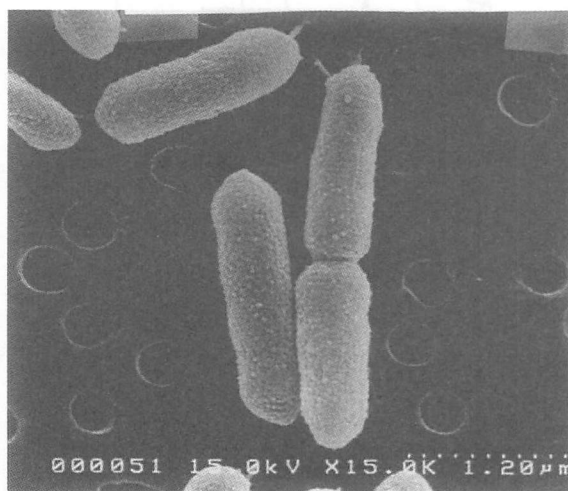


Fig. 3 No. 35 株の走査型電子顕微鏡写真 (ケロシン非存在下培養)

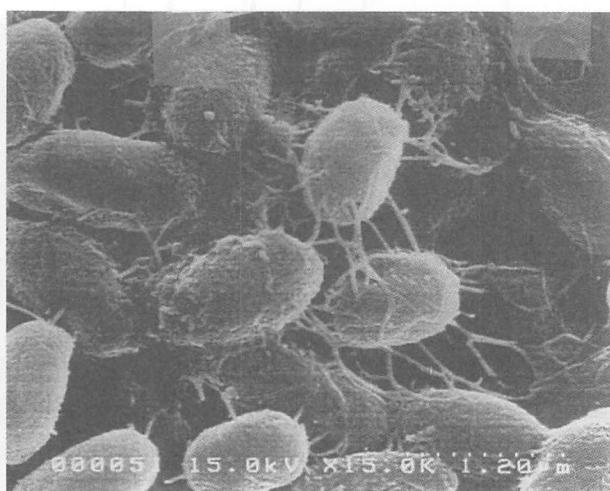


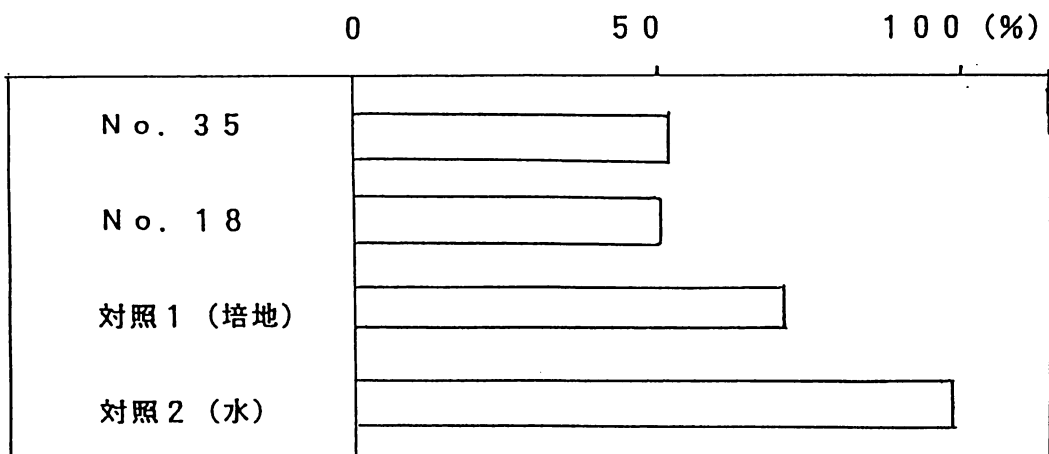
Fig. 4 No. 35 株の走査型電子顕微鏡写真 (ケロシン存在下培養)

秋田県内土壌からの石油分解細菌の検索

Table 3 単離細菌による原油分解

供試菌株	No. 35 No. 18 対照区 1 培養液添加 対照区 2 蒸留水添加
前培養	1夜、30°Cで液体培養(40ml)
本培養	500ml容三角フラスコ中、細かい海砂利約300g、 培養液40ml(対照区は培養液または蒸留水40ml添加) A重油 1.5g、9月~10月、26日間、室温、振とう
原油分解の検出	ヘキサン可溶部を取り、比濁法および乾燥物重量法

比濁法  
分解比(比対照2)



乾燥物重量法  
残存量(残存重油/添加重油)

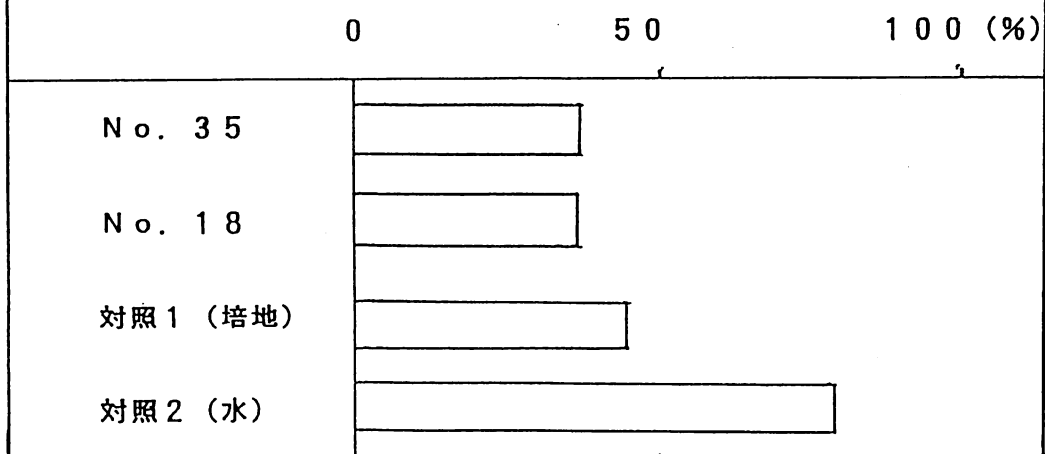


Fig. 5 単離細菌による原油分解

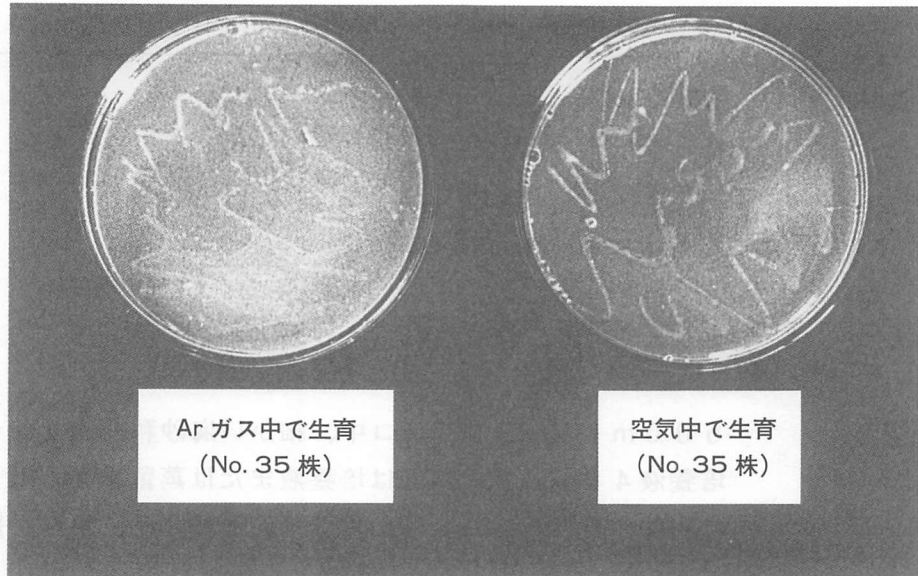


Fig. 6 分子状酸素の必要性

在した微生物あるいは別の場所に由来する微生物により石油の分解が進むということである。この結果はクエートにおける原油汚染砂漠の回復の報告(文献6)とよく一致している。なお完全な無菌系における実験は2つの理由から行わなかった。1つは技術的な面であり、他方はフィールドにおける結果こそが大切であるからである。

### 3-4 分子状酸素存在下, 非存在下における生育

ケロシン存在下, 固体培地により, 空気中およびArガス中でNo. 35株の培養を行った。Fig. 6に示す通り, 両培養ともほぼ同様の生育が見られた。従来, 細菌による石油の分解経路は好气的条件においてのみ研究されている。石油( $-(CH_2)_n-$ )は一般に分子内に酸素が無いが, あまり含まれていないことより, その利用には, 炭水化物( $CH_2O$ )の利用の場合に比べ約3倍量の分子状酸素が必要と言われていた(文献7)。そして最終的には脂肪酸の分解経路である $\beta$ 酸化により酸化されていると考えられる。本実験において分子状酸素非存在下においても, 酸素存在下とほぼ同様な結果が得られたことは, 従来考えられていた経路以外にも, 石油(ケロシン)の炭化水素の分解系が存在する可能性が示されたことであり, 今後この分野での研究に対し, 本菌株および同様の結果がえられた菌株の重要性は大きいものと考えられる。なお結果(写真)は省略したが, その他の菌株(Nos. 40, 20, 37&39株)についても, ほぼ同様な結果が得られている。

### 4. 要 約

- (A) 秋田県内より採取した土壌試料より, ケロシン(灯油)存在下で生育する菌株41株を取得した。
- (B) これらの菌株より, ケロシンを資化して生育に利用する菌株6株を得た。
- (C) 自然環境を模したフィールド実験において, 試みた2株は, 1か月で, 添加したA重油の約50%を分解した。
- (D) 単離菌株のうち5株は, 嫌気条件下でも生育することが示され, 細菌による炭化水素の分解系に新しい可能性が示された。

### 5. 謝 辞

本実験に用いた土壌試料を親切に提供していただいた八橋油田および黒川油田の皆様, 電子顕微鏡撮影にご協力戴いた東北大学農学部電顕室, 佐藤鶴治氏に感謝いたします。

本研究に要した研究費の一部は(財)マエタテクノロジーリサーチファンドの平成9年度研究助成資金より支払われました。ここに謝意を表します。

### 6. 文 献

- (1) A. Inoue *et al*; *Nature*, **338**, 264 (1989)
- (2) K. Morita *et al*; *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 168 (1993)

秋田県内土壌からの石油分解細菌の検索

- (3) 堀越 弘毅 化学と生物 35, 182 (1997) 2128 (1994)
- (4) K. Horikoshi & W.D. Grant; "Superbugs", Springer-Jpn. Sci. Soc. Press (1991) (6) 辻, 千野; Bioscience & Industry 55, 431 (1997)
- (5) N. Kato *et al*; *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, (7) 天羽ら; 新版精説応用微生物学, p. 314, 光生館, 1986