

# 燃料油分解菌の分離とn-アルカン分解活性の評価

井上智実\* 中村静夫\*\* 山本貴志\*\*\* 坪内武夫\*\*\*

## 緒言

現在、燃料油による土壤汚染の修復では多くの場合、掘削除去による土壤の入れ替え法が用いられている。一方で、燃料油は生物分解可能なアルカンや芳香族炭化水素などで構成されていることや、費用の低減が期待されることから微生物を用いた土壤修復法が利用されるようになってきている。本研究では、アルカン分解性菌の土壤浄化(バイオオーグメンテーション)への利用を目的として、土壤中に生息する燃料油分解活性の高い微生物の分離と、分離株による燃料油中のn-アルカン分解特性を評価した。更に、分離株と同属種の既存分離株とのn-アルカン分解における競合性試験を行い、分解能が低い同属種に対する優位性を確認した。

## 実験方法

燃料油の分解試験は、無機培地(硫酸アンモニウム 3.0 g/L, 硝酸ナトリウム 1.5 g/L, リン酸水素カリウム 0.5 g/L, 微量無機塩, pH 7)を用いた。また、菌株の純化には、LB 培地(ポリペプトン 10 g/L, 酵母エキス 5 g/L, 塩化ナトリウム 5 g/L, pH 7)を用いた。

燃料油分解菌の集積培養は、無機培地 10mL に対して A 重油 10 $\mu$ L を添加した培地液を L 字型試験管(以下, L 字管)中で作成し、この培地液に採取土壌 1g を加えて 30 $^{\circ}$ C, 45rpm で傾斜振とうしながら、培養液が懸濁するまでインキュベートを継続した。次に、生じた菌体懸濁液を同様の条件で作製した培地液に 100 $\mu$ L 接種して継代培養を行った。この操作を 6 回繰り返して集積培養体を形成させた。最終的に得られた集積培養体を段階的に希釈し、無機寒天培地上に塗布した後、A 重油(10 $\mu$ L)を滴下してコンラージ棒で塗布した。このプレートを 30 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートした後、明瞭なコロニーが形成された培地を選択し、プレート上の単独コロニーを LB 寒天培地上に 16 株釣菌して純化を継続した。

集積培養で分離した菌体は、A 重油を用いたn-アルカンの分解試験に供した。まず、0.1% LB-無機培地 5mL に対してA重油 5 $\mu$ Lを添加した培地液をL字管中で作製し、この培地液に分離菌体のコロニーを一白金耳植菌した。分解試験では、L字管を30 $^{\circ}$ C, 45rpmで所定時間の傾斜振とうを行った。分解液はバイアル瓶に移し、酢酸エチルを加え、振とうして未分解のA重油を抽出した。なお、抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、ガスクロマトグラフ分析に供した。

競合性試験における分解では、L 字管中に無機培地 5mL, A 重油 5 $\mu$ L を添加した培地液を作製し、各々の菌株培養液(OD<sub>660</sub>=1.2) を 33  $\mu$ L ずつ添加して 30 $^{\circ}$ C, 45rpm で所定時間の傾斜振とうを行った。なお、分離株との競合性試験に用いた菌株には、工業試験場が保有する *Acinetobacter* sp. A-1 株と *Acinetobacter* sp. A-71 株を使用した。この 2 株はそれぞれある程度の n-アルカン分解活性を持つことが確認されており、鉱物油による汚染環境の浄化において使用実績がある。

競合試験における各株の占有率の推移は T-RFLP 解析を用いて調査した。なお、T-RFLP 解析における各株の判別は、16S rDNA 増幅に使用するプライマー 27F と 1492R によって増幅される遺伝子断片の領域で複数の消化断片長を有する制限酵素サイトの塩基配列から決定した。

## 結果と考察

採取した土壌を用いて集積培養を行ったところ、ボイラーの給油口付近から採取した土壌について培地の懸濁が確認された。この試料について、A重油を塗布した無機寒天培地上でコロニーを形成させて16株を分離した。これらの分離株を用いてA重油分解試験を行い、高い分解率(24時間: 70.7%, 48時間: 84.1%)を示したKO14-1

\*化学食品部 \*\*九谷焼技術センター \*\*\* (株)ゲイト

株を選抜した。

KO14-1株について、30℃、pH 7におけるA重油中のn-アルカン分解率を72時間にわたり測定したところ、図1に示すようにn-アルカンの分解率は10時間後に42.7%、24時間後に81.5%に到達し、分解の即効性が確認された。また、72時間後の分解率は83.1%であった。

次に KO14-1 株を含む *Acinetobacter* 属 3 株の n-アルカン分解における競合性試験を行った結果を表 1 に示す。KO14-1 株が単独で存在する系 1 では、24 時間後に 45.4%の分解率、48 時間後には 73.5%の分解率であった。これに対して、系 1 に A-1 株と A-71 株をそれぞれ 33μL 加えた 3 種混合系である系 2 では、24 時間後は 63.2%に達し、KO14-1 株単独系よりも 17.8%高い値が得られた。一方、48 時間後では、KO14-1 株単独系の分解率が 73.5%であったのに対し、3 株混合系は 77.2%であり、分解率の差が 3.7%に減少した。このことは、次の 24 時間で、混合系における株の競合を生じるため、基質分解能の高い KO14-1 株の優先化が進んだ結果と考えられた。

そこで、最も分解に寄与した株を明らかにするために T-RFLP 解析を行い、各株の占有率の推移を調べた。

T-RFLP解析では、*AluI*および*Sau96I*の2種類の制限酵素を用いることで、DNA増幅に使用するプライマー27Fと1492Rの領域に異なる塩基長を持つDNAの断片が得られ、A-1株では72bp、A-71株では236bp、KO14-1株では198bpの断片長となることが判明した。そこで、これらの断片長を利用してT-RFLP解析を行ったところ、図2に示すように、分解開始時に他の2株とほぼ同程度の37.1%であったKO14-1株の占有率は、24時間後には80.3%に増大し、その値は48時間後も維持されていることがわかった。また、KO14-1株の占有率の上昇とともに分解率が急激に上昇しており、n-アルカン分解がKO14-1株の活性に由来していることがわかる。これらの結果から、3株混合系(系2)においてKO14-1株が同属種の存在下でも優先化され、アルカン分解に寄与していると言える。

## 結言

- (1) A重油を単一炭素源としたスクリーニングで得られたKO14-1株は、pH7、30℃の条件下で24時間後にA重油中のn-アルカン成分の81.5%を分解した。
- (2) KO14-1株にn-アルカン分解菌である*Acinetobacter*属のA-1株とA-71株を混合した結果、48時間後に77.2%の分解率が得られた。T-RFLP解析により、この混合系におけるアルカン分解に寄与した株を判別した結果、KO14-1株が優占種であることが確認された。

## 論文投稿

環境技術学会誌 2015, vol. 44, no.5, p. 268-276.

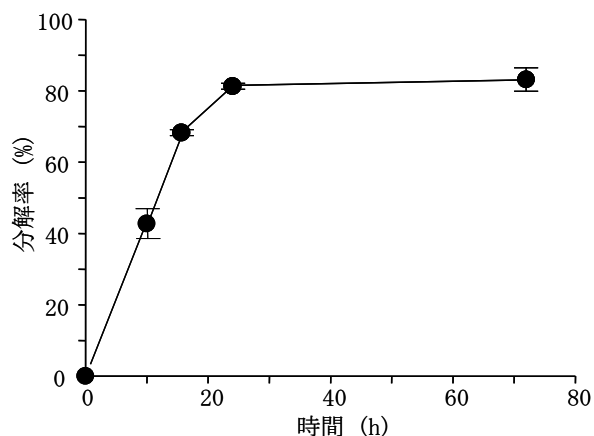


図1 KO14-1株によるn-アルカン分解の経時変化

表 1 競合性試験における n-アルカン分解率

系	培養液添加量(μL)			合計	分解率(%)	
	KO14-1	A-1	A-71		24H	48H
1	33	—	—	33	45.4	73.5
2	33	33	33	99	63.2	77.2

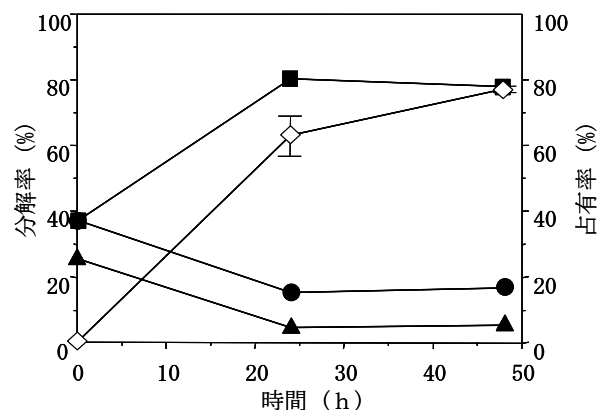


図2 3株混合系における分解率と占有率の推移

◇,分解率; ▲,A-1株占有率;  
●,A-71株占有率; ■,KO14-1株占有率