

学 位 論 文 題 名

Studies on petroleum degradation in
Pseudomonas aeruginosa strain WatG-added soil microcosms
and their bacterial community change analysis
by molecular biological approach

(*Pseudomonas aeruginosa* WatG 株添加の土壤マイクロコズム中での
石油の分解と分子生物学的手法を用いた
微生物群集構造変化の解析に関する研究)

学位論文内容の要旨

1. はじめに

微生物によるBioremediationには、Biostimulation(BS)とBioaugmentation(BA)がある。目的に合った微生物があり、適切な使用法が確立されているのであればBAの方がより有効であると考えられている。全国に鉱物油汚染地域が多数存在することや、タンク、タンカー事故などの不可避的な鉱物油汚染の可能性から、実用可能なBA法の開発が求められている。

Pseudomonas aeruginosa WatG株(以下WatG)は鉱物油を唯一の炭素源とする無機液体培地(MSM)中で、ガソリン、灯油、軽油、潤滑油を分解し、軽油の場合は、2週間の培養でその成分のほぼ全てを分解する。申請者は、石油汚染土壌を対象とするBA技術の開発を目指しているが、本研究では、WatGの石油汚染土壌浄化への利用性と、効率的な利用法の検討を行なうために、土壤マイクロコズムでの軽油分解能と土壤微生物群集構造を調べた。また、長年原油で汚染された風化実汚染土壌に対するWatGを用いたBAも検討した。

2. 研究方法

2.1 土壌中での軽油分解実験

石油により汚染されたことのない水田土壌2gを試験管に入れ、通気性のあるシリコ栓を付けた。土壌は必要に応じ121°Cで30分のオートクレーブ処理を2回行った。土壌の重さに対し1%(重量比)になるように軽油を加え、LB培地で一晩前培養したWatGを加えた。軽油、WatG、水分を加えた後、土壌をよく攪拌し、20°Cで1週間、暗所で静置培養した。内部標準物質として*n*-ドデカンを加え、ジクロロメタン:エタノール混合溶液(1:1、体積比)を用いて、土壤マイクロコズムから全油分を抽出した。その後、ガスクロマトグラフィー(GLC)により残留油分を定量した。土壤マイクロコズムとして、水田土壌の他、草地土壌、園芸用の目土も用いた。

2.2 土壌からのバイオサーファクタントの抽出

土壤マイクロコズムからのバイオサーファクタントの抽出は、既報に基づき行なった。得られた粗抽出物をクロロホルム:メタノール:酢酸(65:15:2、体積比)混合溶液の系による薄層クロマトグラフィーによって分離した。プリムリンにより全脂質を、 α -ナフトール法によって糖脂質を検出した。

2.3 微生物群集構造解析

土壤微生物群集構造解析は変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)により行なった。実験-2日目に各土壤マイクロコズムにLB培地とWatGを添加し、20°Cで2日間、暗所で静置し、0日目サンプルとした。0日目のサンプリング後、土壤重量に対し1% (重量比)になるように軽油を加え、よく攪拌後、20°C暗所で静置した。実験-2日、0日、3日、7日、14日、28日、60日、150日目に土壤をサンプリングし、残留油分の定量と、土壤DNAの抽出を行なった。土壤より抽出したDNAを鋳型にPCRを行ない、細菌の16S rRNA遺伝子のV3領域を増幅した。PCR産物を20-50%の変性剤濃度勾配を有する6%ポリアクリルアミドゲルにほぼ同量になるように載せ、電気泳動を行なった。SYBR Green IIによるゲル染色後、DGGEバンドをゲルから切り出し、DNA塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、GenBank内にあるBLASTを用い、データベースと照合した。ゲル上のDGGEバンドパターンは、無加重平均距離法(UPGMA)を用いたクラスター解析に供し、サンプル間の土壤微生物群集変化を調べた。また、BS、BAを行なった土壤から内在性菌の単離を行ない、その軽油分解能を調べた。

2.4 風化実汚染土壤中での石油分解

北海道石狩市望来から、長年原油に汚染された風化土壤(全油分4%)を採取し、BSとWatGによるBAを行なった。実験0日目、1週間目、1ヶ月目、2ヶ月目の土壤をサンプリングし、平板培養法による細菌コロニーの測定と、GLCによる残留油分の測定を行なった。また、DGGEによりBS、BA土壤マイクロコズム中の微生物群集構造を解析した。また、DGGEバンドパターンを基に、UPGMAを用いたクラスター解析を行なった。

3. 結果と考察

水田土壤を用いた場合、WatG添加後1週間でBAの未滅菌土壤で50%、滅菌土壤で46%の軽油の減少があり、対照群やBSの場合(共に15%)と比べ有意差が見られた。草地土壤、園芸用の目土を用いてもWatGは軽油分解能を示した。また、WatGと軽油を添加した土壤マイクロコズム中にのみバイオサーファクタントであるラムノ脂質(Rhl)が検出された。

150日間継続したBAとBSによる軽油分解の程度は、軽油添加後14日目まではBAの方が高かったが、28日目以降は両者に有意差はなかった。一方、微生物群集構造解析の結果から、LB培地の添加により、BS土壤とBA土壤の双方で土壤内在性菌の増殖が認められ、軽油添加後に、BS土壤とBA土壤のバンドパターンが大きく異なること、BS土壤では、*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*属などに属する既知の*n*-アルカン分解菌に相同な菌に由来するバンドが軽油添加7日目以降に出現し、BA土壤(未滅菌)ではWatG以外のバンドは少数(3本程度)であることなどが分かった。更に、BA土壤(未滅菌)中のWatGのバンド強度は、実験開始28日後から顕著に減少し、150日後にほぼ消失した。しかし、BA土壤(滅菌)では、この間のWatGバンド強度はほぼ一定であった。また、BS土壤から単離した内在性菌1株は、液体培養において軽油分解能を示したが、BA土壤から単離した2株ではそれが認められなかった。

以上の結果から、WatGは土壤中でも軽油分解能を示すことが分かった。また、軽油分解にはWatGが分泌するバイオサーファクタントであるラムノ脂質(Rhl)の関与が示唆された。一方でWatGによるRhlの生産は、土壤微生物群集構造を大きく変えることが予想された。微生物群集構造解析は、BA土壤(未滅菌)、BS土壤における軽油分解にそれぞれWatG、内在性菌の関与を示しているが、後者についてはBS土壤から単離した1株が軽油分解能を示したことからもそれが裏付けられる。しかし、BA土壤から単離した2株は軽油分解能を示さなかったため、BAにおけるWatGと内在性菌の協調は明確ではない。BA土壤(未滅菌)における28日目以降のWatGバンドの減少は、WatGの添加によって変動した土壤微生物群集構造が原状に復帰しうること示す一方で、WatGの追加によるBAの効率化を示唆している。

長年風化した原油汚染土壤では、WatGの添加効果は2ヶ月間でもほとんど見られず、平板培養およびDGGEの結果から、WatGは2ヶ月後には土壤消失することが分かった。この結果は、風化により生成する有毒成分や内在性菌によりWatGの増殖が抑制される可能性を示している。

以上の結果から、汚染直後の土壌など風化過程を経ていない石油汚染土壌の浄化の場合にはWatGを用いたBAは有効だが、長年の風化過程を経た汚染土壌には効力はないことがわかった。後者の場合には、内在性菌を用いたBSとBAとの併用など新たな方法の開発が必要である。DGGEによる経時的な土壌微生物群集構造の解析はBAの有効性の検証、さらには異なる土壌における効率的なBioremediation法の開発手段としての利用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 奥 山 英 登 志
副 査 教 授 森 川 正 章
副 査 教 授 荒 木 義 雄
副 査 助 教 授 山 崎 健 一

学 位 論 文 題 名

Studies on petroleum degradation in *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG-added soil microcosms and their bacterial community change analysis by molecular biological approach

(*Pseudomonas aeruginosa* WatG 株添加の土壌マイクロコズム中での
石油の分解と分子生物学的手法を用いた
微生物群集構造変化の解析に関する研究)

微生物によるBioremediationにはBiostimulation (BS) とBioaugmentation (BA)がある。目的に合った微生物があり、適切な使用法が確立されているのであればBAの方がより有効であると考えられる。鉱物油は2003年2月に施行された土壌汚染対策法の対象には含まれていないが、全国に多数存在する鉱物油汚染地域やタンク事故などによる不可避免的な鉱物油汚染の可能性から、実用可能なBA法開発の必要性は明らかである。2005年3月に経済産業省、環境省が共同で「微生物によるバイオレメディエーション指針」を告示したことから、今後、鉱物油分解菌を使ったBAの実施が見込まれる。

Pseudomonas aeruginosa WatG株（以下WatGという）は、鉱物油を唯一の炭素源とする無機液体培地（MSM）中で、ガソリン、灯油、軽油などを分解し、軽油の場合は2週間の培養でその成分のほぼ全てが分解される。しかし、WatGが土壌環境で石油分解能を発揮するか否かは不明であった。申請者は、WatGによる石油汚染土壌を対象としたBAの実用化を目指し、土壌中でのWatGによる石油分解機構の解明を目的にして、土壌マイクロコズム中でのWatGによる軽油分解能を検証し、土壌微生物群集構造を調べた。また、風化した石油汚染土壌を用い、WatGの実用的な利用についても検討した。

土壌マイクロコズムの実験には主に水田土壌を用いた。1%の軽油を加えた水田土壌にWatGを添加したBAでは、1週間で未滅菌土壌では54%、滅菌土壌では49%の分解があり、WatGは土壌中でも軽油を分解することが分かった。また、芝生土壌や園芸用土壌など異なる土壌でもWatGは軽油分解能を示した。

申請者は、WatGによる軽油の分解が予め滅菌した土壌よりも未滅菌土壌で高くなる

理由が、WatGと土壌内在性菌との協調関係に起因していると予想し、軽油分解実験後、土壌からバイオサーファクタントであるラムノ脂質の抽出を試みた。その結果、軽油とWatGを添加した土壌マイクロゾムからのみ、ラムノ脂質が検出された。ラムノ脂質が*P. aeruginosa*により分泌されるバイオサーファクタントであることも合わせて、申請者はWatGによる軽油分解へのラムノ脂質の関与と、ラムノ脂質を介したWatGと土壌内在性菌の協調関係の存在を予想している。土壌環境からのラムノ脂質を抽出したという事例は過去に報告がない。

次に申請者は、土壌中での軽油分解と微生物の関わりの詳細を知るために、16S rRNA遺伝子をターゲットとしたPCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（PCR-DGGE）を用いた微生物群集構造解析を行ない、BS土壌とBA土壌ではDNAバンドパターンが大きく異なることを見出した。この土壌微生物群集構造の変動の主要因がラムノ脂質などWatGの分泌物に起因しているのではないかと考察している。さらにBS及びBA土壌で出現したDNAバンドの塩基配列を決定し、BS土壌では *n*-アルカン分解菌としての報告がある *Acinetobacter*、*Pseudomonas*、*Mycobacterium*、*Rhodococcus*などに属す菌、BA土壌では *Stenotrophomonas*や*Ochrobactrum*などに属す菌が出現し、菌の出現のパターンが、栄養物や軽油の添加などによっても影響を受けることを明らかにした。しかし、BSとBAの土壌に共通して出現するDNAバンドはなかった。一方、WatGのバンドのみに注目した場合、滅菌土壌ではWatGのバンドは維持されるが、未滅菌土壌ではバンドが消失するので、加えたWatGが内在性菌と競合し、やがて消失していくとしている。WatGのこの性質はBAを行う上での利点の1つと考えられる。

申請者はBAとBSによる軽油分解の機構をさらに詳細に調べるため、それぞれの土壌から内在性菌の単離を試み、BA土壌から2株（単離株NとO）、BS土壌から1株（単離株J）を取得した。単離株N、Oとも単独では軽油分解能を示さないが、それぞれをWatGと共存させた場合、単離株NはWatGによる軽油分解を促進し、Oは阻害した。一方、単離株Jは単独で軽油を分解した。申請者はPCR-DGGEの結果も合わせて、BS土壌とBA土壌では軽油分解に関与している内在性菌は全く異なることを明らかにしている。

長年風化した原油汚染土壌にはむしろBSが有効であり、WatGによるBA効果はなかった。平板培養法およびPCR-DGGEの結果、2ヶ月後にはWatG集団が消失していた。この結果は、風化により有毒な成分が生成されたか、もしくはWatGと競合する菌が既に多数存在しているために、WatGが生育（結果的に原油成分の分解）するには、困難な土壌環境であったと考察している。しかし、申請者は風化汚染土壌にMSMを添加することで原油分解菌の集積を施した土壌を風化汚染土壌に接種することにより、有意なBA効果を認めている。

申請者は本研究を次の様にまとめている。1) WatGは土壌中でも軽油分解能を示す。加えて、未滅菌土壌では、滅菌土壌よりも軽油分解率が高かったことから、WatGと土壌内在性菌（例えば単離株N）との協調が示唆される。2) 土壌中での軽油の分解にWatGが分泌するラムノ脂質の関与が示唆される。3) PCR-DGGEの結果から、BS土壌とBA土壌は全く異なる微生物群集構造をもつ。これは、添加したWatGが生産する抗生物質能を有するラムノ脂質やピオシアニンに起因していると考えられる。4) PCR-DGGEの結果から、添加したWatGは、単離株Oのような土壌内在性菌との競合により、最終的には消失する。4) WatGによるBAは、風化されていない汚染土壌には有効だが、長年の風化過程を経た土壌では、BSが有効である。申請者は、汚染土壌の内在性菌を同じ土壌の汚染浄化に利用することがより効果的であろうと考え、汚染現場の石油分解菌を迅速に取

得し、これを同じ汚染現場（原地）におけるBAの接種菌として用いる「Autochthonous bioaugmentation（原地性バイオオーグメンテーション）」技術を提唱した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。