

学位論文題名

Analysis of microbial community structure and
isolation of novel sulfate-reducing bacteria, in relation
to the petroleum hydrocarbon degradation

（石油系炭化水素分解に関与する微生物群集構造の解析と
新規硫酸還元菌の分離）

学位論文内容の要旨

石油は多くの生物に対して高い毒性を持ち、環境中に放出されると重大な環境汚染問題となる。原油汚染の浄化、修復技術として、生物の作用を利用するバイオレメディエーションが期待される。既に実践的な研究も行われているが、その安全かつ確実な適用のためには、汚染現場における微生物群集の解析や、個別の微生物の性状を知るなどの基礎的な研究の重要性が依然として高い。

近年の分子生物学的手法の発展により、汚染現場における微生物群集の迅速な解析が可能となった。16S rRNA 遺伝子を指標とする解析は、存在する微生物の系統学的情報を与えるが、その機能に関する情報をもたらさない。炭化水素分解に関与する機能遺伝子を標的とした解析は、環境中で実際に分解に関与する微生物を調べるのに有用なツールである。機能遺伝子を対象とした従来の研究の多くは、単一の遺伝子に着目して解析している。しかし、実際の原油には様々な物質が含まれるため、原油分解過程の全容を把握するためには、複数の機能遺伝子を指標とした解析が必要であると考えられる。

本研究では、複数の機能遺伝子を指標として、原油で汚染された2地点の土壌における微生物群集構造の解析を行った（第2章）。北海道石狩油田および厚田油田の原油汚染土壌を用いて、16S rRNA 遺伝子を指標とする PCR-DGGE（PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動）解析を行った結果、2地点間で微生物群集構造が異なることが示された。さらに、アルカンあるいは単環芳香族化合物の好気または嫌気分解に関与する機能遺伝子を標的としたプライマーセット5つを用いてクローニング解析を行った。その結果、用いたプライマーセットにより解析結果は異なった。特に、単環芳香族化合物の好気分解において、環開裂に関与する機能遺伝子を標的とした解析では、2つのプライマーセットを用いることにより、より多くの情報を得ることが可能であることが示唆された。原油汚染環境の微生物群集を調べるには、複数の機能遺伝子を指標として用いる解析が有用であることを実証した。

石油系炭化水素の微生物による分解は好気条件下でより進行しやすい。しかし、原油で汚染された環境では、好気性微生物の酸素消費により容易に嫌気条件が形成される。そのため、原油汚染環境の生物学的修復を行ううえで、嫌気条件下における分解メカニズムを解明することは極めて重大な課題である。原油の嫌気分解が特に重要になると考えられる海洋には、硫酸塩が豊富に含まれている。そのため、硫酸還元菌による分解が重要になると考えられる。

海洋堆積物の多くは、低温かつ嫌気的な条件下にさらされている。しかし、これまでに報告された研究の多くが中温条件下で行われており、低温下での炭化水素分解硫酸還元菌についての知見は少ない。本研究では、硫酸還元条件下において、石油系炭化水素分解微生物群集に温度が与える影響を調べるために、異なる条件下で石油系炭化水素分解—硫酸還元集積培養系を確立した。さらに、培養系内の微生物群集構造を解析した（第3章）。

接種源として干潟の堆積物を用い、原油を唯一の炭素およびエネルギー源とする集積培養系を硫酸還元条件下で確立した。硫酸還元の生成物である硫化物濃度を経時的に測定したところ、両培養系間で硫化物濃度の増加量が異なり、集積培養系内の微生物群集全体としての原油分解能が培養温度によって異なることが示唆された。また、集積培養系の原油成分をガスクロマトグラフィーにより分析した結果、8℃-および28℃-集積系で、減少した成分に違いがみられた。次に、各集積系の培養液を接種源とし、パラキシレンを唯一の炭素源とした硫酸還元集積培養系を8℃および28℃下で確立した。パラキシレンは単環芳香族化合物の中でも難分解であり、分解できる硫酸還元菌は未だ分離されていない。パラキシレン培養系では、8℃-および28℃-培養系間の生成硫化物濃度の差が、原油を基質としたときと比べて小さかった。したがって、硫酸還元条件下における炭化水素分解微生物群集に温度が与える影響は、基質によって異なると考えられる。各培養系よりDNA抽出を行い、16S rRNA 遺伝子および硫酸還元菌のもつ *dsrB*（異化型亜硫酸還元酵素βサブユニット）遺伝子を指標とするPCR-DGGE解析により、微生物群集構造を比較した。その結果、培養温度および基質による群集構造の違いが見られた。唯一の炭素源が炭化水素であることから、温度により炭化水素分解に関与する微生物が異なることが示唆された。また、系統解析により、8℃-原油分解培養系から単環芳香族炭化水素分解硫酸還元菌に近縁な配列が得られた。さらに、シーケンス解析を行ったDGGEバンドの多くが、有機物を二酸化炭素まで酸化する、完全酸化型硫酸還元菌に近縁であることが示された。

第4章では、8℃-パラキシレン分解培養系および28℃-パラキシレン分解培養系から新規硫酸還元菌の分離を行った。8℃-パラキシレン分解培養系から得られた分離株8aA2は、16S rRNA 遺伝子配列の系統解析により、*Desulfobacterium autotrophicum* と相同性99%であることが示された。また、28℃-パラキシレン分解培養系から得られた分離株28bB2は、オルトキシレン分解硫酸還元菌 *Desulfosarcina ovata* に相同性99%であることが示された。炭化水素利用性実験により、28bB2株はトルエンを酸化する一方で、オルトキシレンを含む他の単環芳香族炭化水素やアルカン、ナフタレンは分解しなかった。また、クウェート湾岸原油汚染地帯の海洋堆積物を接種源として確立したパラキシレン分解—硫酸還元集積培養系から新規硫酸還元菌を分離した。16S rRNA 遺伝子配列の系統解析により、分離株はデルタプロテオバクテリアに属し、*Desulfosarcina variabilis*、*Desulfosarcina cetonicum*、オルトキシレン分解硫酸還元菌 *Desulfosarcina ovata* に相同性97%であることが示された。得られた分離株PL12は中温性、完全酸化型の硫酸還元菌であった。分離株はパラキシレンを含む単環芳香族炭化水素を利用しなかった一方で、*n*-アルカンを利用した。系統学的および生理学的特性から、PL12株は新属の硫酸還元菌であると考えられる。

アルカンは代表的な石油系炭化水素である。石油に多く含まれ、その微生物学的な分解が注目される。本研究で得られたPL12株は、アルカン分解硫酸還元菌としての情報を与えると考えられる。

単離株を得て、その最適生育条件を調べることは、バイオスティミュレーション（栄養素の添加や通気など、条件を整えることにより汚染現場に存在する汚染物質分解微生物を活性化させるバイオレメディエーションの手法）への応用として役立つと期待できる。また、遺伝子配列の解析により、機能遺伝子を標的とする解析のツール改良にも役立つと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	福 井	学
副 査	教 授	森 川	正 章
副 査	准教授	奥 山	英登志
副 査	准教授	笠 原	康 祐
副 査	助 教	小 島	久 弥

学 位 論 文 題 名

Analysis of microbial community structure and isolation of novel sulfate-reducing bacteria, in relation to the petroleum hydrocarbon degradation

(石油系炭化水素分解に関与する微生物群集構造の解析と
新規硫酸還元菌の分離)

石油は多くの生物に対して高い毒性を持ち、環境中に放出されると重大な環境汚染問題となる。原油汚染の浄化、修復技術として、生物の作用を利用する方法が期待される。炭化水素分解に関与する機能遺伝子を標的とした解析は、環境中で実際に分解に関与する微生物を調べるのに有用である。本研究では、複数の機能遺伝子を指標として、原油で汚染された2地点の土壌における微生物群集構造の解析を行った(第2章)。北海道石狩油田および厚田油田の原油汚染土壌を用いて、16S rRNA遺伝子を対象とするPCR-DGGE(PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)解析を行った結果、2地点間で微生物群集構造が異なることが示された。さらに、アルカンの好気分解、単環芳香族化合物の好気および嫌気分解のそれぞれに関与する機能遺伝子を標的としたプライマーセット5つを用いてクローニング解析を行った。その結果、原油汚染環境の微生物群集を調べるには複数の機能遺伝子を指標として用いる解析が有用であることを実証した。

原油で汚染された環境では、好気性微生物の酸素消費により容易に嫌気条件が形成される。そのため、原油汚染環境の生物学的修復を行ううえで、嫌気条件下における分解メカニズムを解明することは極めて重大な課題である。原油の嫌気分解が特に重要になると考えられる海洋には硫酸塩が豊富に含まれているため、硫酸還元菌による分解が重要になると考えられる。

海洋堆積物の多くは、低温かつ嫌気的な条件下にさらされている。しかし、これまでに報告された研究の多くが中温条件下で行われており、低温下での炭化水素分解硫酸還元菌

についての知見は少ない。本研究では、硫酸還元条件下において石油系炭化水素分解微生物群集に温度が与える影響を調べるために、異なる条件下で石油系炭化水素分解—硫酸還元集積培養系を確立した（第3章）。接種源として干潟の堆積物を用い、原油を唯一の電子供与体とする硫酸還元—集積培養系を確立した。8℃-および28℃-培養系間で硫酸還元の生成物である硫化物濃度の増加量が異なり、培養系内の微生物群集全体としての原油分解能が、培養温度によって異なることが示唆された。また、集積培養系の原油成分をガスクロマトグラフィーにより分析した結果、8℃-および28℃-培養系間で減少した成分に違いがみられた。次に、各培養系からパラキシレンを唯一の電子供与体とした集積培養系を、8℃および28℃で確立した。パラキシレンは単環芳香族化合物の中でも難分解であり、分解できる硫酸還元菌は分離されていない。培養系における硫化物濃度の測定により、硫酸還元条件下における炭化水素分解微生物群集に温度が与える影響は、原油とパラキシレンでは異なることが示唆された。原油およびパラキシレン分解集積培養系に対するPCR-DGGE解析の結果、培養温度および用いた基質による微生物群集構造の違いが見られた。次に、培養系の基質を変えたところ、炭化水素分解培養系ではマイナーなメンバーが水溶性基質培養系で検出された。さらに、低温条件下では、単環芳香族炭化水素の分解で主要な役割を果たす硫酸還元菌の系統が、中温条件下の場合とは異なることが示唆された。

第4章では、8℃-および28℃-パラキシレン分解培養系から、それぞれ新規硫酸還元菌の分離を行った。炭化水素利用性実験の結果、8℃-パラキシレン分解培養系から得られた分離株8aA2は芳香族炭化水素やアルカンを分解しなかった。また、28℃-パラキシレン分解培養系から得られた分離株28bB2は、トルエンを酸化する一方で、他の芳香族炭化水素やアルカンは分解しなかった。さらに、クウェート湾岸原油汚染地帯の海洋堆積物を接種源として確立したパラキシレン分解培養系から新規硫酸還元菌を分離した。得られたPL12株はパラキシレンを含む芳香族炭化水素を利用しなかった一方で、*n*-アルカンを利用した。系統学的および生理学的特性から、PL12株は新属の硫酸還元菌であると考えられる。アルカンは代表的な石油系炭化水素である。石油に多く含まれ、その微生物学的な分解が注目される。本研究で得られたPL12株は、アルカン分解硫酸還元菌としての情報を与えると考えられる。

単離株を得て、その最適生育条件を調べることは、バイオスティミュレーション（栄養素の添加や通気など、条件を整えることにより汚染現場に存在する汚染物質分解微生物を活性化させるバイオレメディエーションの手法）への応用として役立つと期待できる。また、遺伝子配列の解析により、機能遺伝子を標的とする解析のツール改良にも役立つと期待される。

審査委員一同は、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、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。