
富山湾沿岸域海水よりの石油分解菌の単離とそのキャラクタリゼーション

研究代表者 理学部 中村 省吾

要 旨

大型タンカー事故などによる海洋の重油汚染を除去・修復するために、近年、重油分解菌を用いた生物的除去・修復技術（バイオレメディエーション）が注目を浴びている。しかし、重油成分は複雑かつ多様で、各成分に応じた分解菌がまだ十分には単離されていない。そこで、我々は、富山湾沿岸域の漁港の海水から土着の分解菌の単離を試みた。そして、単離を試みたすべての漁港の海水から、これまでに7種類の分解菌・分解菌叢が単離できた。そして、4種類の分解菌について、16S rRNA 遺伝子の塩基配列によって種の同定を行った結果、これまでのところ、3種類が *Alcanivorax* 属であることが、また1種類が *Pseudomonas* 属であることが判った。さらに、これら *Alcanivorax* 属3種の菌体組成を SDS-ゲル電気泳動で調べたところ、大まかなバンドパターンは互いに良く似ていたが、それぞれ特有のバンドが複数見られたことから、それぞれ同属であっても異なった種または種内変異である可能性が示唆された。なお、予備的な実験でそれぞれの重油分解率を調べたところ、4.6~8.6%となった。

はじめに

ナホトカ号などの重油タンカー事故や、水島精油所などの石油精製工場の大規模な原油流出事故、さらには、各種輸送タンカーのバラスト水、産業排水、都市下水、産業廃棄物などによって、日常的、慢性的な海洋の石油汚染が生じている^{(1),(2)}。このような、石油による海洋汚染は、水産業だけでなく、自然環境や生態系にも大きな影響を及ぼす、地球規模での深刻な環境汚染問題となりつつある。そこで、そのような汚染修復を目的として、数十種類の石油分解菌が単離され、その分解菌の生育を増進する「肥料」と呼ばれる化学剤の開発がなされてきた。そして、米国ではそれらの一部が製品化され、販売もされている。

実際、タンカー事故による重油流出では、荒天下の海上回収や、砂礫地帯や岩石の隙間に漂着した重油の回収は非常に困難となる。したがって、重油分解菌や肥料を用いた生物的環境修復技術（バイオレメディエーション）に大きな関心が寄せられている。しかし、重油は数百種類の炭化水素からなると言われており、その成分は大変複雑なため、それぞれの成分に対応した実用可能な分解菌が、まだ十分には見つかっていない。さらに、すでに単離されている分解菌に関しても、それらの重油分解機構は、ほとんど明らかにされていない。

そこで、我々は、富山湾沿岸域の海水から土着の重油分解菌の単離を試みている。ここでは、平成14年度の富山大学学長裁量経費及び富山第一銀行奨学財団の研究助成金によってVBLで行った研究成果について報告する。

材料と方法

重油分解菌は、富山湾沿岸域の、氷見漁港、岩瀬漁港、魚津漁港、経田漁港、四方漁港から採取した廃油膜を含む海水より単離した。まず、油膜を含む海水の試料を、重油入り NSW 培地⁽³⁾ (NH_4NO_3 1.0g, K_2HPO_4 0.02g, Yeast extract 0.5g, 自然海水 800ml/l) に加え、

室温で5-7日間振盪培養(TAITEC RECIPRO SHAKER NR-1,3; 速度:120回/分)をした。なお、自然海水は石川県七尾市黒崎海岸(富山湾)で採水したものをを用いた。前記の操作によって重油の乳化が見られた培地の一部を、5mg/mlの重油を加えた1.5%NSW寒天培地に接種した。そして、7-10日後に、形成されたコロニーを単離し、5mg/mlの重油を加えたNSW液体培地に植付けて、5-10日間振盪培養を行った。以上の操作により単離された、重油乳化能を持つ菌は、5mg/mlの重油を加えたNSW寒天培地に植え付けて保存した。

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、濃度10%または15%、厚さ1mmのゲルを用い、室温下40Vの定電圧で行った。泳動には、バクテリアを含む培養液とLaemli⁽⁴⁾のsample solutionを1:1に混ぜ、3分間煮沸したものを試料として用いた。泳動後のゲルは、Morrissey⁽⁵⁾の方法に従って銀染色を行った。

一方、種の同定は16S rRNA遺伝子の塩基配列により行った。16S rRNA遺伝子は、真正細菌の16S rRNAに共通した配列を持つプライマーを作成し、PCRキット(Amersham Pharmacia Biotech社)を用いて、分解菌から抽出したDNAとプライマーから16S rRNAの遺伝子を増幅させた。増幅した遺伝子は、アガロースゲル電気泳動にかけた後、切り出して抽出し、plasmid pCR2.1とligationさせ、DH5 α (*E. coli*)に挿入transformさせた。次に、transformした菌を増殖させた後、それらから精製して得たplasmid DNAを、DNAシーケンサー(ABI PRISM 377, Perkin-Elmer ABD社)にかけて塩基配列を調べた。その塩基配列から、既知のバクテリアの塩基配列と照らしあわせ、一致するバクテリアをBLAST(Basic Local Alignment Search Tool.)で検索し、同定した。

重油の分解率は、乾燥重量法によって測定した。十分に重油が乳化した培養液を分液漏斗(IWAKI)に移し、クロロフォルム(WAKO 特級)により重油成分を抽出した。その試料に、Na₂SO₄(WAKO)を少量加え完全に脱水させた後、ロータリーエバポレーター(IWAKI REN-1000VW, 30°C)で濃縮した。そして、それを秤量瓶に移し80°Cで3時間乾燥させ、デシケーター中で冷却した後、その重量とコントロールの重量との差より分解率を求めた。

結果と考察

富山湾沿岸域の、氷見・四方・岩瀬・魚津・経田の各漁港で採取した油膜を含む海水から、重油を乳化・分解する菌(又は菌叢)を単離することができた(表1)。そして、16S-rRNA遺伝子の塩基配列から、単離出来た計7種類の菌または菌叢の種の同定を行った。その結果、HIM-2(氷見漁港の海水より単離)は*Pseudomonas*属と同定されたが、UOZ(魚津漁港の海水より単離)、KYO(経田漁港の海水より単離)、YOK(四方漁港の海水より単離)の3種類については、すべて*Alcanivorax*属と同定された。日本海沿岸のオイルボールからは、*Alcanivorax*属が優先的に検出されたとの報告⁽⁶⁾もあり、富山湾沿岸域でも*Alcanivorax*属が広範に分布していることが強く示唆された。また、目視でも、各漁港に油膜が浮いているのがしばしば観察されたが、重油分解菌が比較的容易に単離されたことから、富山湾沿岸域には石油汚染が起きていることが考えられた。

ところで、UOZ、KYO、YOK、3種の単離菌の菌体組成を比較するためにSDSゲル電気泳動を行ったところ、3種の基本的なバンドパターンは、互いに非常によく似ていたが、それぞれで数本のバンドに違いが見られた(図1)。この結果から、3種は同属であっても、それぞれ異なる種または種内変異であることが考えられた。そして、同じ富山湾沿岸域であっても、

漁港によってそれぞれ特徴的な *Alcanivorax* 属の種または種内変異が分布している可能性が示唆された。

なお、重油分解率を乾燥重量の変化で求めた予備的な結果では、HIM-2 が 7.7- 8.6%、UOZ が 8.6%、KYO が 7.8%、YOK が 4.5%と、それぞれ分解能を持っていることが示された。今後は、この乾燥重量の変化から重油全体に対する分解率を確定していくとともに、重油の大まかな成分別での分解率も併せて調べていく予定である。

参考文献

- (1) 松永勝彦ら. 1996 海と海洋汚染 三共出版
- (2) Swannell R. P. J., Lee K., and McDonagh M. 1996. *Microbiol. Rev.*, 60:342-365.
- (3) Higashihara T., Sato A., and Shimizu U. 1978. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44:1127-1134.
- (4) Laemmli U. K. 1970. *Nature*, 227:680-685.
- (5) Morrissey J. H. 1981. *Anal. Biochem.*, 117:307-310.
- (6) Kasai Y., Kishira H., Syutsubo K., and Harayama S. 2001 *Environ. Microbiol.*, 3:246-255.

表 1 富山湾沿岸域海水より単離された重油分解菌

株名	採取場所	種名	特徴	重油分解率
HIM-1	氷見漁港	未同定		
HIM-2	氷見漁港	<i>Pseudomonas</i> 属	桿菌, 運動性あり	7.7-8.6%
IWA	岩瀬漁港	未同定		
UOZ	魚津漁港	<i>Alcanivorax</i> 属	桿菌, 運動性無し	8.6%
YOK	四方漁港	<i>Alcanivorax</i> 属	桿菌, 運動性無し	4.5%
KYO	経田漁港	<i>Alcanivorax</i> 属	桿菌, 運動性無し	7.8%

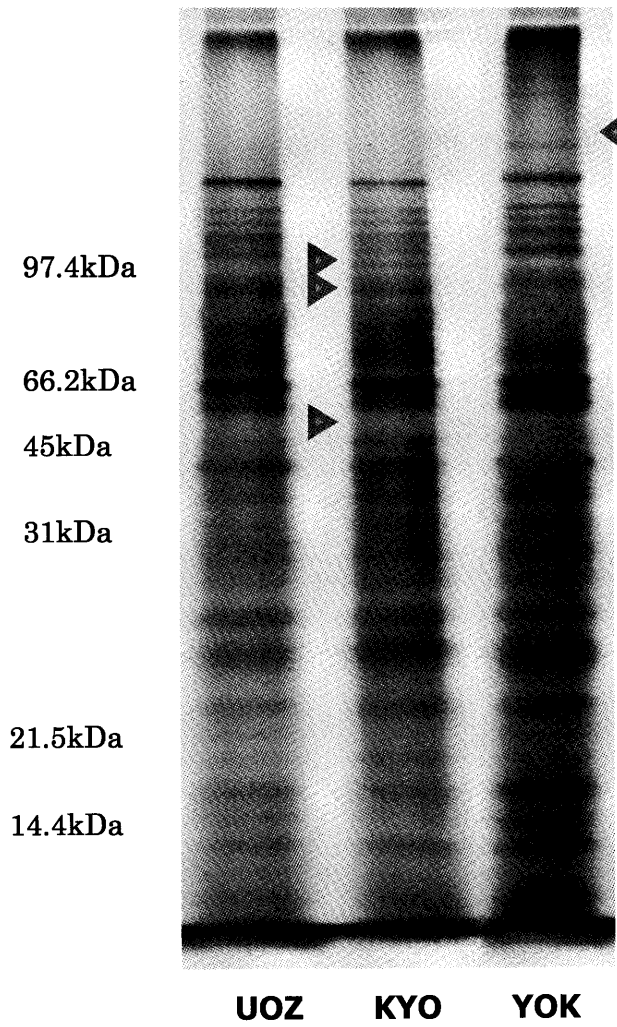


図 1. 3種の単離菌の SDS-PAGE 像。左から UOZ, KYO, YOK の SDS-PAGE パターンを示す。KYO では赤の矢じり(約 104, 81, 50kDa), YOK では緑の矢じり(約 150kDa)にそれぞれに特有なバンドが見られる。