

鉱物油脂分解菌の実用化

株式会社 三 鳴

背景・目的

ガソリンスタンドや工場跡地を始め土壤浄化が必要とされている土地は、全国で32万ヶ所にも及ぶと言われている。本年2月の土壤汚染対策法施行により、こうした潜在的需要は一気に顕在化すると予想され、安価で処理時間の短い浄化方法の開発が急務となっている。一方、従来の土木や設備側の視点に立った汚染土壤修復工法では価格と効果の両面で限界があるとされ、昨今は微生物を使った原位置処理法が注目を浴びている。そこで、2年計画として高機能鉱物油分解生物と当該微生物の能力を最大限引出し得る工法を開発し、事業化までもっていくことを目的に本研究に着手した。

内容・方法

1) 油分解能の高い菌株の単離:

- ①サンプリング:鉱物油分解能の高い菌株を得るために、豊富温泉の温泉水や土壤、厚田油田跡の土壤、北海道大学キャンパス内の土及び泥、家庭の灯油タンク等、北海道各所からサンプリングした。
- ②集積培養:LB培地もしくは最少塩(MS)培地に1%灯油を加えた液体培地、又は4.5%テトラデカンを含む完全合成培地(pH9)で集積培養を行った。
- ③分解菌候補株の単離:その後、灯油又はテトラデカン分解能を指標に寒天培地上で菌株を単離した。

2) 単離した菌株の同定:

単離した有望株は生理学的、生化学的性状検査及び分子生物学的手法により同定した。

3) 鉱物油分解試験:

- ①油脂分解能試験:1%のディーゼル油を含む液体培地もしくは土壤に液体培地を加えたものに、菌の培養液を接種し20℃で培養することによって行った。
- ②鉱物油の分析方法:分解程度は培地から全油脂分を抽出し、ガスクロマトグラフィーで分析した。油脂成分の同定にはガスクロマトグラフ-質量分析計を用いた。

結果・成果

1) 単離された油脂分解菌:

取得したサンプルから、最終的に灯油又はテトラデカンの分解能を指標とした実験により合わせて11株の鉱物油分解菌を単離した。その内、灯油分解菌7株に関して各種鉱物油(ガソリン、灯油、ディーゼル油、潤滑油)の分解能、分解速度、増殖の温度依存性等を詳細に検討したところ、家庭にあった古い灯油タンク内の水をサンプルとして単離されたWatG株と北海道大学構内の池の泥から単離されたHokM株が、各種の鉱物油の利用性が高く増殖能も優れていた為、最も有力な候補菌株と見なされた。

2) WatG株とHokM株の性質:

①各種鉱物油の利用性:WatG、HokM共にディーゼル油は最も効率よく分解し、次いで灯油、潤滑油(エンジンオイル)、ガソリンの順であった。ディーゼル油分解能試験では、WatGは2週間でほぼ完全に分解し、HokMでは2週間で約70%分解した。

②生育特性:WatG、HokM共に30℃に至適増殖温度を持ち、4℃、50℃でも増殖した。

③菌株の同定:WatGについては、生化学的な性状解析、16S rDNA配列に基づく系統解析、DNA-DNA交雑実験の結果、*P. aeruginosa*であることがわかり、*Pseudomonas aeruginosa* WatG株と同定した。HokMは、16S rDNA配列に基づく系統解析の結果、*Serratia marcescens*に極めて近縁の新株であることが分かった。

3) WatGによる土壤中での鉱物油分解:

WatG株がその鉱物油分解能を土壤中でも発揮できるかどうかを、土壤に1%のディーゼル油を加えた人工的な汚染土壤を用いることによって行った。その結果、1週間でディーゼル油中の炭化水素がおよそ40%分解され、当該菌株が本プロジェクトにおいて利用可能な微生物であることが明らかとなった。土壤を予め滅菌した場合は分解率が若干低下することから、予め土壤中に生息する微生物がディーゼル油分解に係わっていることが分かった。又、培養開始から2週間後に更に新たな培地を添加することによって分解率は60%程度に上昇した。

興味深いことに、鉱物油の分解は、WatG自身により合成される糖脂質であるラムノ脂質の分泌を伴うことが認められた。土壤中でもラムノ脂質の分泌を見出したのは本研究が初めてである。

4) 結論

家庭の古い灯油タンク内の水から単離されたWatG株は、高い鉱物油分解能を示した。性状検査により *P. aeruginosa*であることがわかり、*Pseudomonas aeruginosa* WatG株と命名した。WatG株は、液体培地中の鉱物油を効率よく分解するだけではなく土壤中のディーゼル油も分解した。土壤中での培養において、i) 界面活性物質のラムノ脂質の分泌が見られたこと、ii) 分解処理中の土壤に更に培地を添加することによってディーゼル油分解率の上昇が見られたこと、から培養条件の改善等WatG株を高機能化することによりWatG株の実用化が期待できる。

今後の展望

今回得られた高機能鉱物油分解菌と昨年度試作した汚染現場での微生物大量培養装置を使って、汚染土壤を用いた中規模実験及び現場実験を行うと共に、土壤及び土木工事に関する専門企業と提携し、微生物の能力を最大限活用可能な新しい汚染土壤浄化処理工法を開発していく。具体的には、従来の薬注方式を改良した工法もしくは植物のファイトレメディエーションを活用した新しいバイオリアクターを使っての工法を研究・開発していく。又、汚染土壤の鉱物油分解菌叢を知る為の分子生物学的手法を用いた簡便な検出方法の開発にも着手していく。