

石油の乳化・資化性を有する「高度耐塩性の海洋性細菌」の探索と、 海洋汚染の防止のための石油関連化合物の分解への応用

中島 伸佳¹, 石原 浩二²

¹岡山県立大学保健福祉学部, ²岡山理科大学理学部

概要 石油(重油や原油)を資化・分解する機能を有する微生物を探索することを目的として、日本の亜熱帯海域(石垣島の北方海域)の海底の岩礁などから海洋性微生物のスクリーニングを行った。まず、ヘキサノ酸やヘキセン酸により耐性化した細菌群を選択し、さらに、そのライブラリーの中から石油類を分解して生育することが可能な超耐塩性の海洋性細菌を単離した。本細菌は石油などの油脂類に対して強い乳化作用を示し、しかも、石油類を唯一の炭素源として生育する能力を有していた。また、簡易的な同定を行った結果、本菌は *Oceanobacillus iheyensis* に近似した海洋性のグラム陽性細菌であると考えられた。

具体的には、日本の亜熱帯海域の海底(約70 m 付近)の岩礁(沖縄県の石垣島北方海域)を無菌的に「海洋性微生物の給源」として採取し、それらを滅菌生理食塩水中で数日間浸漬することにより抽出液を調製した。その抽出液(1 ml)を、石油の最終代謝物であるアルカン酸(hexanoic acid)とアルケン酸(*trans*-3-hexenoic acid)を添加(各3~5%)した「3% NaCl 含有ペプトン・ブイオン培地(PB 培地, pH 7.4)」中で、25度での振盪培養(100 rpm)を繰り返し、生育してきた微生物群の「集積培養」による「耐性化」を行った。続いて、NaCl 濃度は3%で PB 培地を1/10に希釈した培地(1/10PB 培地)中に重油(または原油)をそれぞれ直接添加して培養を継続することにより、石油資化性細菌の「スクリーニング」を試みた。重油添加量を増加(上限0.5%)させながら、それらの海洋性微生物の「継代培養(7日間おきに移植)」を行った。これらの海洋性微生物を、重油を直接塗抹した1/10に希釈 PB 寒天培地(NaCl 濃度は3%)上で単離した。

続いて、単離した微生物を「グラム染色」し、顕微鏡観察を実施した。本微生物の「簡易的な同定」は2% NaCl 添加 SCD 寒天培地で培養し、生化学試験により実施した。

原油(0.5%)、もしくは重油(0.5%)を添加した1/10PB 培地中に海洋性細菌を植菌し、25度で7日間振とう培養の後、添加した原油を取り除いたものを「サーファクタント試料液(5 ml)」とした。次に、その試料液を用いて、原油、重油、CoQ10 あるいはエラスチンなどの化学成分を溶解(0.1 g)させ、サーファクタントを生産している状態を確認した。

また、原油(0.5%)、重油(0.5%)またはオリーブ油(0.5%)を添加した PB 培地(30 ml)中に本海洋性細菌(No.1株)を植菌し、25度で2日間、振とう培養を行った化学合成培地を調製して、石油成分の資化性の確認を行った。化学合成培地は N 源を硫酸アンモニウムに限定し、C 源として油脂成分(1.0%)を添加した培地(スラント)を用いた。C 源として原油、重油、オリーブ油、decane、sodium hexanoic acid、*p*-dichlorobenzene を使用した。このスラントを用いて、本海洋性細菌を25度で7日間静置培養し生育の有無を判定した。

さらに、この「海洋性のグラム陽性桿菌」は好気性で、pH6.8~10での pH 条件下での生育が可能であり、NaCl 濃度が0.5%程度では生育速度が遅かったが2%以上で生育が良好となり20%でも生育が可能なることから耐塩性がかなり高いことが明らかとなった。

「簡易的な生理試験」結果より、本細菌の生育条件及び生理試験からの性状は、*Oceanobacillus iheyensis* と酷似しており *Oceanobacillus iheyensis* に近い海洋性細菌であろうと考えられた。ただし、遺伝子鑑定等の詳細な分類同定は実施し

ていない。

本海洋性細菌に類似した海洋性微生物の作用によるものと考えられる培養液中での油の「物理的变化(乳化)」が確認されたことから、この細菌が「バイオサーファクタント」などを分泌して石油成分を乳化(可溶化)する作用を有している可能性が示唆された。また、本菌は高度の耐塩性(20% NaCl 存在下でも生育可能)を有する好アルカリ性(pH10程度までのアルカリ条件下で生育可能)の海洋性細菌であるため、石油資化・分解能も有している可能性が高いと考えられた。

本細菌の培養液からサーファクタント試料液を調製し、原油、重油、CoQ10あるいはエラスチンなどの化学成分を溶解(0.1 g)させ、サーファクタントを生産している状態を確認したところ、本菌が石油などの油脂成分を乳化(可溶化)するサーファクタントを生産していることが明らかになった。

本株を用いて油脂の乳化の状態も確認した。その結果、菌の増殖に伴って原油は細かい粒子状への変化、重油は細かい油滴への変化、オリーブオイルはむしろ白濁も確認され、菌を植菌していないものは、原油、重油、オリーブ油共に大きな油滴状のままであった。このことより、それぞれの油脂が、本菌が誘導的に産生した「バイオサーファクタント」により乳化(可溶化)されていると考えられた。

本海洋性細菌の培養中に添加した原油や重油を粒子状に乳化させることが確認されたので、サーファクタントの生産のみならず、油脂成分の資化性も有している可能性があると考え、本海洋性細菌を25度で7日間静置培養し、資化性の有無を判定した結果、*p*-dichlorobenzeneを除く複数の油脂成分を炭素源とした化学合成培地において、本海洋性細菌の生育が優位に確認された。

以上の結果から、今回、日本の亜熱帯海域(石垣島の北方海域)の海底から単離された本海洋性細菌が、石油などの油脂類の乳化(可溶化)作用を示し、さらに、それらの油脂類の資化性を有することが明らかになった。また、本海洋性細菌が菌体外に生産するバイオサーファクタント(糖脂質やリン脂質などを始めとする関連化合物であると推定される)は、その培地中に石油成分を添加している場合にのみ誘導的に産生されていることも確認された。

従って、今回の研究結果はこれらの亜熱帯海域の海底にも「石油や天然ガス」を始めとした海底地下資源が存在している事実を裏付ける可能性も示唆される。今後、この「バイオサーファクタント成分」の単離と構造決定、並びに「乳化・資化された石油関連化合物」の本微生物菌体内での分解における代謝経路の解明などが待たれる。

1. はじめに

19世紀以降の重工業を始めとした各種の産業の発展は、人類の生活に多大な貢献をもたらしたが、その結果として、様々な環境汚染や自然破壊を引き起こし、近年、地球温暖化や異常気象に至る地球規模で大きな問題に至っている。

従って、今世紀は、「エネルギー源」として「化石燃料(石油など)」を燃焼させる「非持続的経済構造」を改め、農畜水産物や食品廃棄物、あるいは家畜排泄物などの「有機系バイオマス」を再利用し、持続的な「循環(リサイクル)型経済社会構造」を構築する必要性が求められている。

しかも、永続的な地球環境の保全のためには、ヒトの生存環境中に過剰に付加・蓄積された「バイオマス」は適切な手段により、再び地球環境中に効率的かつ安全に「分解(変換)と還元」がなされなければならない。

その一例として、石油は我々の生活に欠かせない「化石燃料」であるが、石油工業の発展とともに、タンカー事故による原油漏れや工業施設などからの廃油の流出などによる海洋汚染を招く結果となり、環境への影響も懸念されている。

一方、石油の存在条件下にも微生物は生息しており、それらの中には石油成分を資化して生育しているものも存在し、環境浄化の観点から注目されている。

本研究では、「環境汚染の防止を生物、特に微生物の機能に求める研究」の一環として、石油由来の油脂関連化合物の資化・分解能力を有する海洋性細菌を、熱帯海域の海底土壌から新たに探索し、その資化性のメカニズムを科学的に解明した上で、特に、海洋、内海、河川などにおける海洋等の水質汚染を防止するための「新規なバイオ技術(バイオレメディエーション法)」を開発することで、究極的には「地球環境の保全と保護」に貢献することを最

終目的としている。

2. 材料と方法

2.1 海洋性細菌の分離

日本の亜熱帯海域の海底(約70 m 付近)の岩礁(沖縄県の石垣島北方海域)を、無菌的に「海洋性微生物の給源」として採取し、それらを滅菌生理食塩水中で数日間浸漬することにより抽出液を調製した(Fig. 1)。

その抽出液(1 ml)を、石油の最終代謝物であるアルカン酸(hexanoic acid)とアルケン酸(*trans*-3-hexenoic acid)を添加(各3 ~ 5%)した「3%NaCl含有ペプトン・ブイオン培地(PB培地, pH 7.4)」(Table 1)中で、25度での振盪培養(100 rpm)を繰り返し、生育してきた微生物群の「集積培養」による「耐性化」を行った。続いて、NaCl濃度は3%のまま、PB培地を1/10に希釈した培地(1/10PB培地)中に重油をそれぞれ直接添加して培養を継続することにより、石油資化性細菌の「スクリーニング」を試みた。重油添加量を徐々に増加(上限 0.5%)させながら、それらの海洋性微生物の「継代培養(7日間おきに移植)」を実施した。



Fig. 1. 亜熱帯海域の海底から採取した岩礁

Table 1. PB培地(完全培地)の組成

Peptone (Casein)	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Meat extract	5.0 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
NaCl	30.0 g
Distilled water	1.0 L
pH 9.0	

2.2 海洋性細菌の単離と同定

さらに、これらの海洋性微生物を、重油を直接塗抹した1/10に希釈PB寒天培地(NaCl濃度は3%)上で単離した。次に、単離した微生物をグラム染色し、顕微鏡観察した。更なる本菌の同定は、(株)ユニオンバイテック(大阪)に依頼した。2% NaCl加SCD寒天培地で培養し、各種生化学試験により同定された。

2.3 海洋性細菌による油脂成分等の乳化(培養液による可溶性)

原油(0.5%)、または重油(0.5%)を添加した1/10PB培地中に海洋性細菌(No.1株)を植菌し、25度で7日間振とう培養の後、添加した原油を取り除いたものを「サーファクタント試料液(5 ml)」とした。次に、その試料液を用いて、原油、重油、CoQ10あるいはエラスチンなどの化学成分を溶解(0.1 g)させ、サーファクタントを生産している状態を確認した。

2.4 海洋性細菌による油脂成分等の乳化(生育に伴う可溶性)

原油(0.5%)、重油(0.5%)またはオリーブ油(0.5%)を添加したPB培地(30 ml)中に本海洋性細菌(No.1株)を植菌し、25度で2日間、振とう培養を行った。

2.5 海洋性細菌による油脂成分の資化

化学合成培地(Table 2)を調製して、石油成分の資化性の確認を行った。化学合成培地はN源を硫酸アンモニウムに限定し、C源として油脂成分(1.0%)を添加した培地(スラント)を用いた。C源として原油、重油、オリーブ油、

Table 2. 化学合成培地の組成

(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
Yeast extract	0.2 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.01 g
CoCl ₂ ·H ₂ O	0.01 g
NaCl	30 g
Distilled water	1.0 L
pH 9.0	

decane, sodium hexanoic acid, *p*-dichlorobenzene を使用した。このスラントを用いて、本海洋性細菌を25度で7日間静置培養し、生育の有無を判定した。

3. 結果と考察

3.1 海洋性細菌の分離

石油資化性細菌の「スクリーニング」の結果、石油の最終代謝物を含む PB 培地で生育が可能であった「海洋性微生物群」が得られた。本微生物群を、1/10PB 培地中で7日間培養し、「継代培養」を行った際の培養液の変化(添加した石油成分の状態変化)を、以下の Fig. 2に示した。

3.2 海洋性細菌の単離と同定

「海洋性微生物」から重油を直接、塗抹した PB 寒天培地(上述)上で、「原油や石油を資化する海洋性細菌」を単離し、この株をNo.1株とした。No.1株をグラム染色し、顕微鏡観察した結果、グラム陽性桿菌であった(Fig. 3)。さらにこの「海洋性のグラム陽性桿菌」は、好気性で、pH6.8~10での pH 条件下での生育が可能であり、NaCl 濃度が0.5%程度では生育速度が遅かったが、2%以上で生育が良好となり、20%でも生育が可能なることから、耐塩性もかなり高いことが明らかとなった(Table 3)。

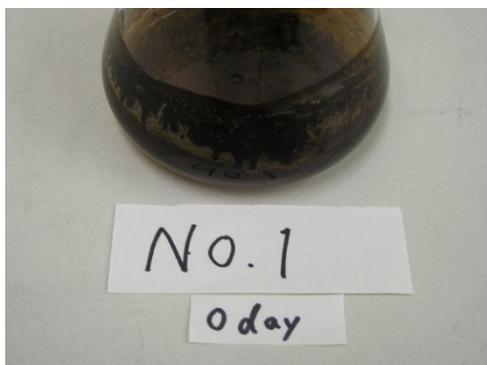
また、糖類などの資化性による「簡易的な生理試験」を行った結果、本細菌では、芽胞形成が認められなかったが、生育条件、及び、生理試験からの性状は、*Oceanobacillus iheyensis* と酷似しており¹⁾、*Oceanobacillus* 属には芽胞形成の認められない株も多いことから、*Oceanobacillus iheyensis* に近い海洋性細菌であろうと考えられた(Fig. 4)。ただし、遺伝子鑑定等の詳細な分類同

定は実施していない。

Oceanobacillus iheyensis は1,050 mの深さの深海で見られた耐塩性で好アルカリ性の細菌であると報告されて

Table 3. 同定結果

検査項目	細菌 No.1
形態	桿菌
グラム染色	+
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
芽胞	形成なし
嫌気性寒天での生育	-
VP	-
グルコースからのガス産生	-
カゼイン加水分解	+
ゼラチン加水分解	-
デンプン加水分解	-
クエン酸塩の利用	+
プロピオン酸塩の利用	-
硝酸塩の還元	-
硝酸塩からのガス産生	-
インドール産生	-
pH5.7での生育	-
pH6.8での生育	+
pH10での生育	+
2%NaClでの生育	+
5%NaClでの生育	+
7%NaClでの生育	+
10%NaClでの生育	+
15%NaClでの生育	+
20%NaClでの生育	+
35°Cでの生育	+
45°Cでの生育	-



培養0日目



培養10日目

Fig. 2. 重油または原油を添加した1/10 PB 培地による、海洋性微生物菌群

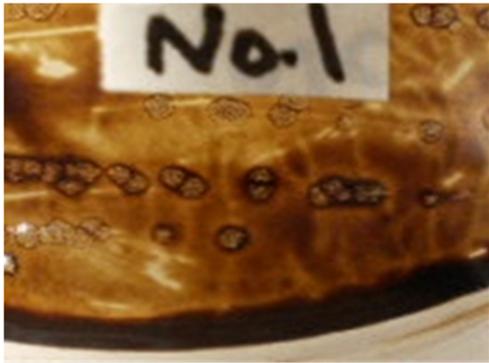


Fig. 3. 海洋性細菌の寒天培地上に形成されたコロニー

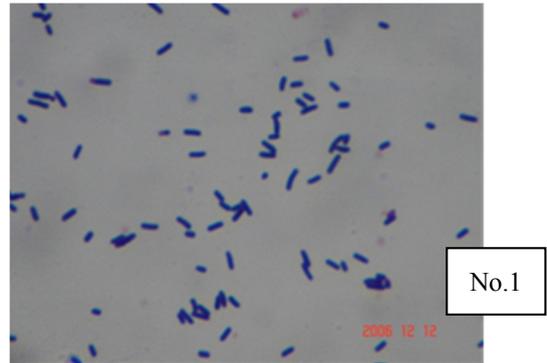


Fig. 4. 単離した海洋性細菌 (No. 1) のグラム染色写真 (光学顕微鏡、油浸レンズ、 $\times 1,000$ 倍)



Fig. 5. 培養液による重油、原油、CoQ10、エラスチンの乳化(可溶化)

いるが¹⁾、本海洋性細菌に類似した海洋性微生物の作用によるものと考えられる培養液中での油の「物理的変化(乳化)」が確認されたことから、この細菌が「バイオサーファクタント」などを分泌して石油成分を乳化(可溶化)する作用を有している可能性が示唆された。

バイオサーファクタントとは、広い意味では生体由来の界面活性物質であるが、専門分野領域においては、「微生物によって菌体外に生産される両親媒性脂質」などを指し²⁾、海洋等の水質汚染を防止するためのバイオレメディエーション法の研究分野で特に注目されている。しかも、本菌は高度の耐塩性(20% NaCl 存在下でも生育可能)を

有する好アルカリ性(pH 10程度までのアルカリ条件下で生育可能)の海洋性細菌であるため、石油資化・分解能も有している可能性が高いと考えられた。

3. 3 海洋性細菌による油脂成分等の乳化(培養液による可溶化)

そこで、No.1株の培養液からサーファクタント試料液を調製し、原油、重油、CoQ10あるいはエラスチンなどの化学成分を溶解(0.1 g)させ、サーファクタントを生産している状態を確認したところ、本菌が石油などの油脂成分を乳化(可溶化)するサーファクタントを生産していることが明らかになった(Fig. 5)。

3. 4 海洋性細菌による油脂成分等の乳化(生育に伴う可溶化)

さらに、No.1株を用いて油脂の乳化の状態を確認した。その結果、菌の増殖に伴って原油は細かい粒子状への変化、重油は細かい油滴への変化、オリーブオイルはむしろ白濁も確認され、菌を植菌していないものは、原油、重油、オリーブ油共に大きな油滴状のままであった。このことより、それぞれの油脂が No.1株が産生した「バイオサ

ーファクタント」により乳化(可溶化)されているのではないかと考えられた (Fig. 6-8)。

3. 5 海洋性細菌による油脂成分の資化

本海洋性細菌 (No.1株) の培養中に添加した原油や重油を粒子状に乳化させることが確認されたので、サーファクタントの生産のみならず、油脂成分の資化性も有している可能性があると考えられた。

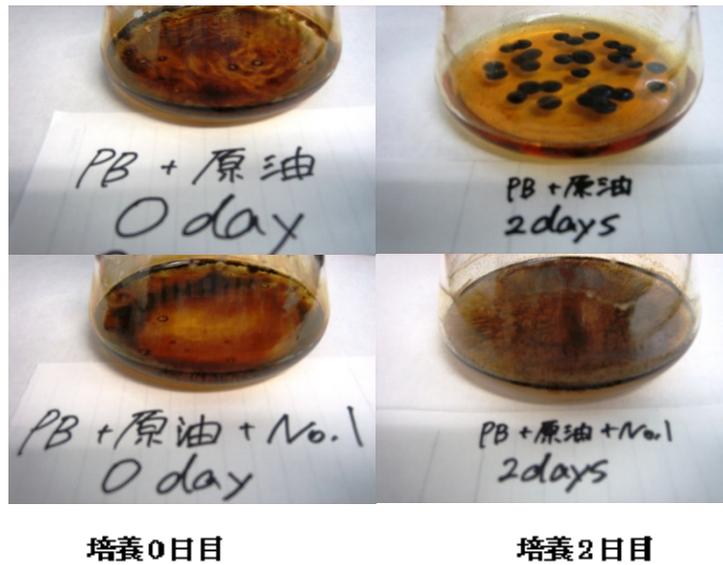


Fig. 6. 原油の乳化(可溶化)状態

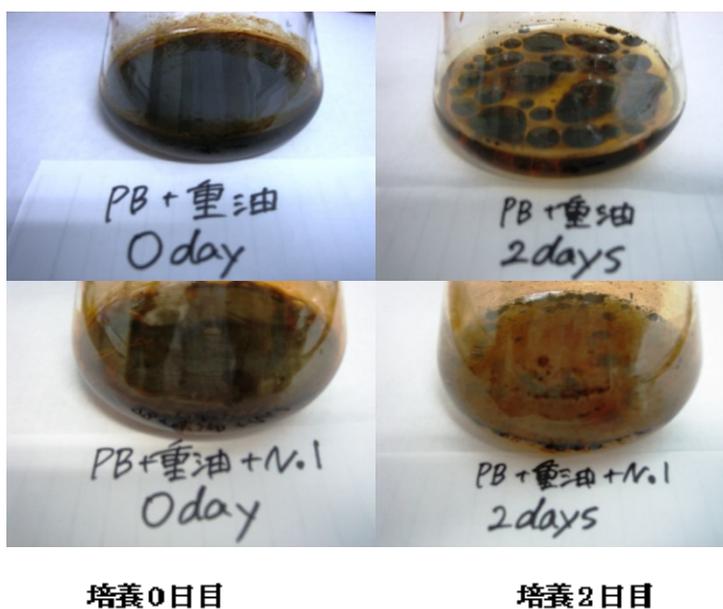


Fig.7. 重油の乳化(可溶化)状態

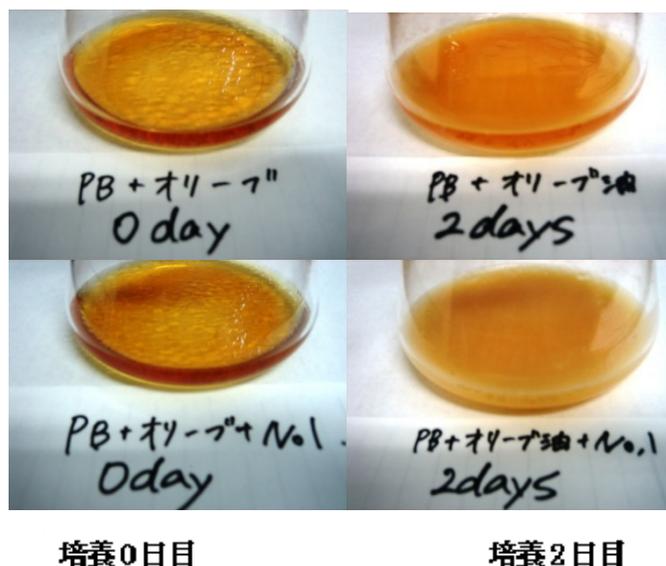


Fig.8. オリーブ油の乳化(可溶化)状態

Table 4. 化学合成培地を用いた油脂成分の資化性

C 源	生育
原油	+
重油	+
オリーブオイル	+
Decane	+
Sodium hexanoic acid	+
p-Dichlorobenzene	-

すなわち、本海洋性細菌を25度で7日間静置培養し、生育の有無を判定した結果、p -dichlorobenzene を除く複数の油脂成分を炭素源とした化学合成培地において、本海洋性細菌の生育が優位に確認された (Table 4)。

以上の結果から、今回、日本の亜熱帯海域(石垣島の北方海域)の海底から単離された本海洋性細菌が、石油などの油脂類の乳化(可溶化)作用を示し、さらに、それらの資化性を有することが明らかになった。

また、本海洋性細菌が菌体外に生産するバイオサーファクタント(糖脂質やリン脂質などを始めとする関連化合物であると推定される)は、その培地中に石油成分を添加している場合にのみ誘導的に産生されていることも確認された。

従って、今回の研究結果は、これらの亜熱帯海域の海底にも「石油や天然ガス」を始めとした海底地下資源が存

在している事実を裏付ける可能性も示唆される。

今後、この「バイオサーファクタント成分」の単離と構造決定、並びに「乳化・資化された石油関連化合物」の本微生物菌体内での分解における代謝経路の解明などが待たれる。

文献

- 1) Lu J., Nogi Y., Takami H. (2001) *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge. FEMS Microbiol. Lett. 205, 291-297.
- 2) 北本 大(2008)生物が作り出す自己組織化材料: バイオサーファクタントの多彩な機能とその応用. 薬学雑誌 128 695-706.

Study on a Bacterium Which Could Emulsify and Assimilate Petroleum

NOBUYOSHI NAKAJIMA¹, KOHJI ISHIHARA²

¹Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University

²Department of Life Science, Faculty of Science, Okayama University of Science

Summary

A marine bacterium, which could grow in the condition of higher concentration of sodium chloride (~20%), was isolated from the subtropical-sea water in Japan. The gram-positive-rod bacterium had an ability to emulsify and assimilate petroleum in the medium anaerobically. It was considered that the bacterium had produced the potent biosurfactant and was resemble to be *Oceanobacillus iheyensis*.