

裾花川の石油湧出地点より単離した バクテリア(*Acinetobacter beijerinckii* susohanaR) の石油分解能

森脇 洋^{1,2,3*}, 藤井朱瑞¹, 伊藤 隆², 野村隆臣¹

¹信州大学繊維学部, ²信州大学基盤研究支援センター機器分析支援部門上田分室,
³信州大学先鋭領域融合研究群先鋭材料研究所

Oil-degrading property of a bacterial strain (*Acinetobacter beijerinckii* susohanaR)
isolated from the oil-leaching site at Susohana River

Hiroshi Moriwaki^{1,2,3*}, Suzu Fujii¹, Takashi Ito^{1,2}, Takaomi Nomura¹

¹Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, ²Shinshu University,
Division of Instrumental Analysis (Ueda branch), Research Center for Supports to
Advanced Science, ³Shinshu University, Research Initiative for Supra-Materials,
Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research.

(要旨) 長野市北部を流れる裾花川の川底の石油湧出地点から採取した砂より、石油を分解するバクテリアを単離することに成功した。その球菌は唯一の炭素源として A 重油を用いた培地で培養が可能であった。16S rDNA による系統解析、形態観察、細菌学的特性試験から、そのバクテリアは *Acinetobacter beijerinckii* の近縁種であることが明らかになった。また、*Acinetobacter beijerinckii* の標準株と形状およびいくつかの生理・生化学的性状試験の結果が異なっていたこと、さらに次世代 DNA シーケンスの結果から、このバクテリアを *Acinetobacter beijerinckii* の新株であると結論づけ、*Acinetobacter beijerinckii* susohanaR 株 (SHR) とした。軽油を加えた培地において 6 日間、SHR を培養したところ、軽油中の *n*-アルカンを 81% 分解した。また、SHR は高い乳化活性を有しており、バイオサーファクタントを産生していると考えられた。

キーワード：石油分解, *Acinetobacter beijerinckii*, 裾花川, 16S rDNA 解析, バイオサーファクタント, 次世代 DNA シーケンス

Keywords: Oil degradation, *Acinetobacter beijerinckii*, Susohana River, 16S rDNA analysis, Next generation DNA sequence

1. はじめに

水環境や土壌環境における油汚染は生態系に悪影響をおよぼす深刻な環境問題である¹⁾。油汚染はタンカーの座礁、工場からの油の漏洩といった様々な事故により引き起こされる²⁾。油汚染が起こった際、その対策として、油を除去する技術が必要となる。主な油の除去法として、ポンプによる油の吸引、油吸着材による油の吸着除去などがある³⁾。近年になって、油汚染の浄化技術として油の微生物分解を利用した

手法の開発に大きな注目が集まっている。微生物分解を利用した油浄化法は合成ポリマーを用いる油吸着法と比較して、生物資源を応用したクリーンな浄化手法であると言える^{4,5)}。

長野市西部を流れる裾花川は、千曲川の支流のひとつである(図-1)。興味深いことにこの川岸あるいは川底に石油が湧出している地点がある(図-2)。裾花川流域はフォッサマグナの北端に位置し、周辺の地層は泥岩層と凝灰岩層からなる地層構造を有して

おり、石油の産生、滞留しやすい地点であるといえる⁹⁾。この石油湧出地点は1871年に石坂周造が設立した日本初の石油会社である長野石炭油会社(1872年に長野石油会社に改名)が開発を試みて失敗して以降、放置されている。ちなみに石坂周造は「石油」という言葉の命名者でもあり、日本の石油産業に大きな功績を残した人物である。

我々は裾花川の石油湧出地点の土壌に石油を分解する細菌が存在するのではないかと考えた。そこで、石油を分解する細菌を単離することを目的として、裾花川の川底にある石油湧出地点より砂を採取し、その砂の抽出液から集積培養を行った。結果、唯一の炭素源としてA重油を含む培地で生育した細菌の単離に成功した。本研究ではこの細菌について16S rDNA解析による系統解析を行い、種の特定を行った。また、次世代DNAシーケンス解析により得られた遺伝子配列から石油分解に関連する酵素を推定した。さらに、この細菌の石油分解能を明らかにすることを目的とし、軽油に含まれる*n*-アルカンの分解率を測定した。



図-1 サンプルング地点の地図

2. 実験

2-1 試薬

ポリペプトンは日本製薬株式会社製を用いた。酵母エキスはバクトン・ディッキンソン社から購入した。塩化ナトリウムは純正化学株式会社から、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム、塩化アンモニウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、*n*-ヘキサン、*n*-オク

タン、スクアラン、硫酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬株式会社より購入した。塩化ナトリウムは純正化学株式会社より得た。軽油は関東化学株式会社製を用いた。*n*-アルカン混合標準液は林純薬工業株式会社から購入した。

2-2 サンプルング

2016年7月10日に裾花川の川底にある石油湧出地点から砂を採取した。サンプルングポイントの周辺地図を図-1に示す。油膜がサンプルング地点周辺の淀みで確認された。また、採取地点付近の石の底部が黒色を呈していた(図-2)。この変色は湧出する原油の影響であると考えられる。採取した砂試料は培養試験を開始するまで冷蔵庫で保存した。



図-2 サンプルング地点の写真
水面に油膜が観察される(I)。また、石の底部が黒変しているのが確認できる(II)。

2-3 細菌の単離

滅菌水100 mLに砂1 gを懸濁させ、静置することで上澄み液を得た。坂口フラスコに無機塩培地200 mLとA重油6 mLを入れ、A重油が単一炭素源の培地を作った。そこに上澄み液1 mLを混合し、30°C、200 rpmの条件で振盪培養を3日間行った。培養後、再度、坂口フラスコにA重油が単一炭素源となる液体培地を作り、菌液を1 mL加えて30°C、200 rpmの条件で振盪培養を3日間行った。これらの操作方法⁷⁾にて集積培養を一ヶ月間繰り返した(3日×10回)。さらに、プレーティングにより得られたコロニーから細菌を単離した。この株をSusohanaR (SHR)とした。単離した細菌を走査型電子顕微鏡

(JSM-6010LA, 日本電子)にて観察し, さらに生理・生化学的性状試験, 16S rDNA 解析および次世代 DNA シーケンス解析を行った. これらの解析はテクノスルガ・ラボに委託した.

2-4 増殖曲線

オートクレーブにて滅菌した LB 培地に冷凍保存しておいた SHR 菌液を添加 (0.02 v/v) し, OD₆₀₀ が 1.5 になるまで 30 °C, 200 rpm にて前培養した. この前培養した菌液を, LB 培地に 200 μL (1/100) 添加し, 振盪培養器にて 30 °C, 200 rpm の条件で振盪培養した. 培養開始から培養液を適宜, 1 mL ずつ分取し, OD₆₀₀ を測定して経時変化を観察した⁷⁾.

2-5 軽油添加無機塩培地での増殖

500 mL 容の坂口フラスコに無機塩培地を 200 mL 入れ, オートクレーブにて滅菌した. 滅菌済みの培地に軽油と前培養した菌液を 1 mL ずつ添加し, 振盪培養機にて 30 °C, 120 rpm で巡回培養した. 坂口フラスコから 5 mL ずつ適宜, 試料を分取し, OD₆₀₀ の経時的な変化を観察した.

無機塩培地+軽油+菌液のサンプルについて, 濁度の変化から試料中の菌体量を推定した. 坂口フラスコから採取した培養液をよく混合させて, エッペンチューブに 200 μL を分取した. 蓋を開けた状態のエッペンチューブをサーモアルミバスで 98 °C, 2 時間静置することで水分と油分を完全に蒸発させた. ここに 200 μL の PBS(-) を添加し, よく振り混ぜて再分散させた. この OD₆₀₀ 値が菌体由来であると見なした.

2-6 油分解能の検討

試験管に無機塩培地を 10 mL 添加し, シリコセンで蓋をしてオートクレーブにて 120 °C, 21 分間滅菌した. 室温まで冷却した後, 軽油と前培養した菌液を 50 μL ずつ添加した (1/200). 本培養は振盪培養機にて 30 °C, 200 rpm で振盪培養し, 試料ごとに振盪時間を変化させて培養液を分析に供した. 培養後の試料は 30 mL ファルコンチューブに移し替え, スクアラン 78 ppm を含むヘキササン 10 mL で油分の等量抽出を一晩行った. なお, スクアランは内部標準物質として用いるため添加した. 培養液をファルコンチューブに移し替える際, 試験管に残った油分残渣は少量のアセ

トンで洗い落とし, 抽出溶媒に加えた. 120 rpm でこの混合溶液を一晩振盪後, 水層を取り除き, 残りの有機層に無水硫酸ナトリウムを適量加えて 10 分間振盪することにより脱水した. 脱水後, 有機層をバイアル瓶に適量取り, GC (島津製作所, GC-2400) により分析した⁸⁾. なお, コントロールとして菌体未添加の試料についても同様の作業を行い, 培養期間中の環境損失を推定した.

GC による測定の結果, C9 までの短鎖アルカンは長時間培養することにより揮散のためにコントロールにおいてもピーク強度が顕著に減少することが分かった. また, C23 以上のアルカンは軽油中のマトリックスによる影響により, 定量が困難であった. これらのことから, 本研究においては, C10-C22 の *n*-アルカンについて定量を行った.

バクテリアによる油分解率(%)は培養後の C10-C22 の *n*-アルカン量をコントロール中の C10-C22 の *n*-アルカン量 (培養時間と同時間, 振盪操作を行ったもの) で割ることにより算出した.

3. 結果と考察

3-1 SHR のキャラクタリゼーション

16S rDNA 解析により, 得られたバクテリア株は *Acinetobacter beijerinckii* と 99% の相同性がある球菌(図-3, 図-4)であることが分かった. また, *Acinetobacter beijerinckii* 標準株と今回単離した SHR についての生理・生化学的性状試験結果を表 1 にまとめた. *Acinetobacter beijerinckii* は, 1980 年にヒトの臨床サンプルから単離された非運動性の球桿菌である. 本実験で得られた SHR は球菌であり, 溶血性を持たず, β-Alanine, L-Arginine, DL-Lactate, citrate を利用できず, Malonate を利用できるという点で標準株と異なっていた.

以上の結果から, SHR は *Acinetobacter beijerinckii* の同族同種であることが示唆された. また, 細胞形態解析および生理・生化学的性状試験の結果が標準株といくつかの相違点があることから, SHR を *Acinetobacter beijerinckii* に属する新株であると結論づけた.

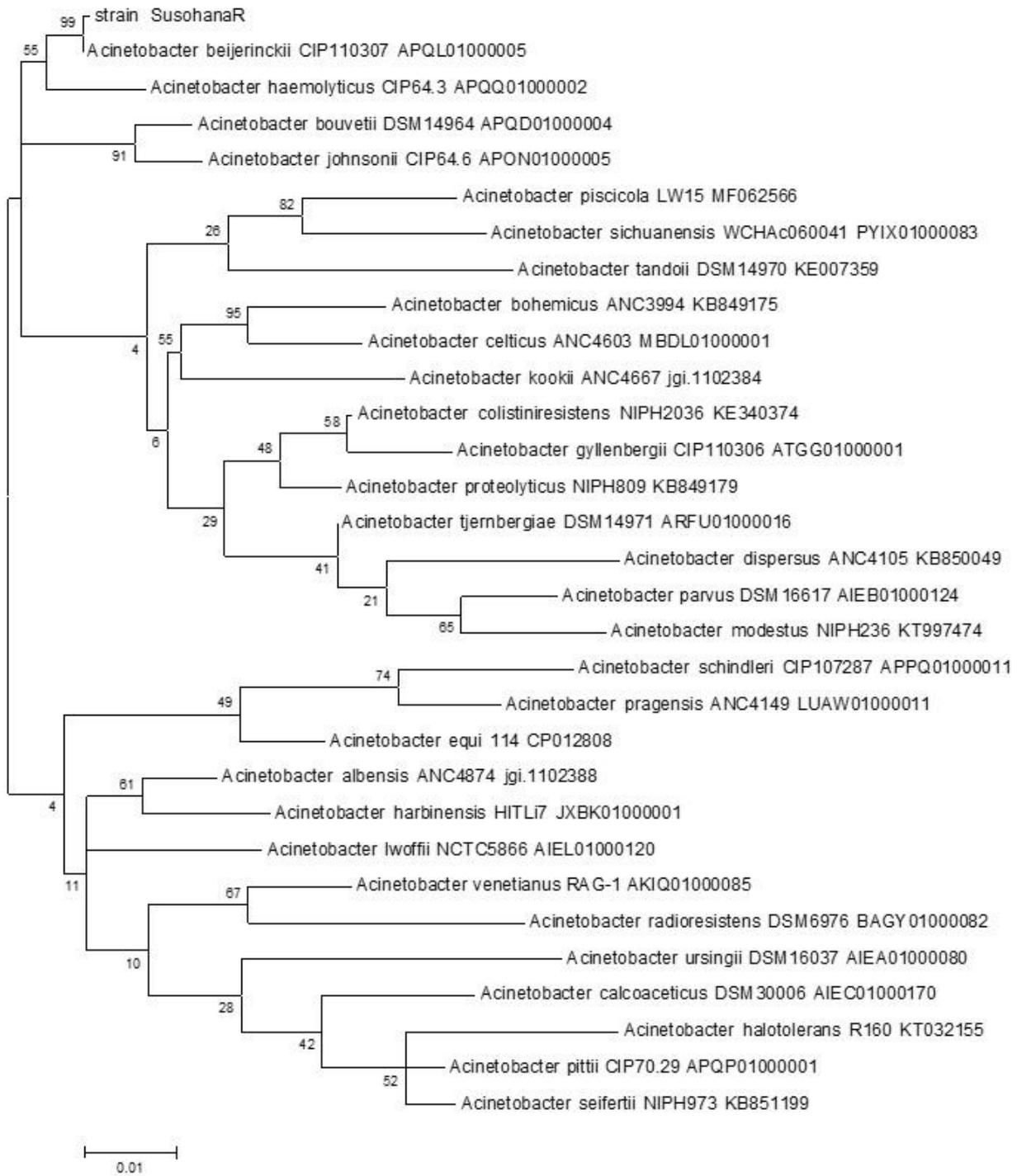


図-3 16S rDNA 解析に基づく簡易分子系統樹

表 1 *Acinetobacter beijerinckii* (CIP110307^T)および SHR の生理・生化学的性状

Characteristics	SHR strain	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> strain CIP 110307 ^T (NIPH 838 ^T)
Colony: Color	creamy	nd
Diameter (mm) (24 hours)	≤ 1.0	1.0–2.0
Elevation	low convex	convex
Margin	entire	entire
Opacity	opaque	slightly opaque
Shape	circlar	circlar
Surface	smooth	smooth
Texture	butyrous	nd
Cell: Gram stain	negative	negative
Motility	-	-
Shape	cocci (round)	cocobacilli (ovoid)
Size (μm)	φ1.0–1.2	nd
Spore	-	-
Catalase reaction	+	+
Oxidation/Fermentation test (D-Glucose)	-/-	nd
Hemolytic activity	-	+
Oxygen preference	strictly aerobic	strictly aerobic
Temperature at 30°C	+	+
37°C	+	+
45°C	-	-
Utilization of β-Alanine	+	-
L-Arginine	w	-
DL-Lactate	+	-
Malonate	-	+
Nitrate reduction (<i>NO</i> ₃) [*]	-	-
Indorle production (<i>TRP</i>) [*]	-	-
D-Glucose fermentation (<i>GLUf</i>) [*]	-	-
Alginate dihydrolase (<i>ADH</i>) [*]	-	-
Urease (<i>URE</i>) [*]	-	-
Hydrolysis of Esculin (β-Glucosidase) (<i>ESC</i>) [*]	-	-
Geratin (Protease) (<i>GEL</i>) [*]	-	-
PNPG ^{**} (β-Galactosidase) (<i>PNPG</i>) [*]	-	-
Utilization of D-Glucose (<i>GLU</i>) [*]	-	-
L-Arabinose (<i>ARA</i>) [*]	-	-
D-Mannose (<i>MNE</i>) [*]	-	-
D-Mannitol (<i>MAN</i>) [*]	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine (<i>NAG</i>) [*]	-	-
Maltose (<i>MAL</i>) [*]	-	-
Gluconate (<i>GNT</i>) [*]	-	-
n-Caprato (<i>CAP</i>) [*]	+	+
Adipate (<i>ADI</i>) [*]	-	-
DL-Malate (<i>MLT</i>) [*]	+	+
Citrate (<i>CIT</i>) [*]	-	+
Phenylacetate (<i>PAC</i>) [*]	-	-
Oxidase reaction (Cytochrome oxidase) (<i>OX</i>) [*]	-	-
Genomic DNA G+C content (mol %)	38.20	38.26
Genomic DNA size (Mb)	3.48	3.56

* API 20 NE test (abbreviation of each test is indicated as italic characters)

** p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside

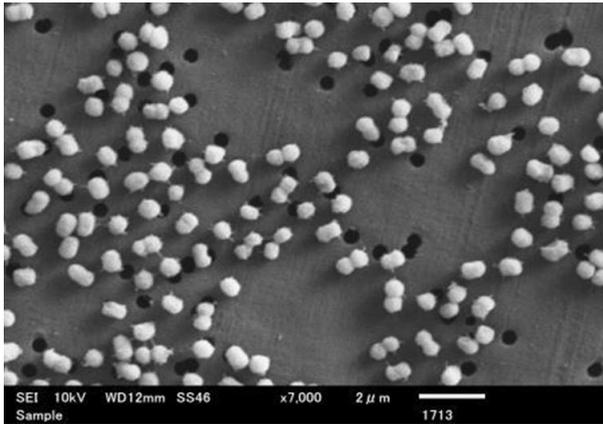


図-4 SHR の走査型電子顕微鏡写真

3-2 BLAST 検索による石油代謝関連酵素の探索

次世代 DNA シーケンスの結果を基に、BLAST 検索により解析を行ったところ、SHR には Alkane-1 monooxygenase (EC 1.14.15.3), Rubredoxin, Rubredoxin-NAD(+)-reductase (EC 1.18.1.1), Alkanesulfonate monooxygenase (EC 1.14.14.5), Cyclohexanone monooxygenase (EC 1.14.13.22) という油分解に関わると推測される酵素をコードする 5 つの遺伝子があることが分かった。これらの酵素は、カプロラクタム分解経路や脂肪酸分解経路および硫黄代謝で機能する。この結果は SHR が石油分解性を有することを強く示唆する。

Acinetobacter 属細菌は多様な炭素化合物の資化能を有し、アルカン分解性を有する株の報告例もある⁹⁾。

以上のことから、SHR も石油分解能を有している可能性が高いと考え、SHR の軽油中の *n*-アルカン分解能について検討を行った。

3-3 SHR の増殖特性

LB 培地での増殖曲線を図-5 に示す。培養 2-4 時間で対数増殖期となり、24 時間後に静止期となった。

無機塩培地に軽油を添加して SHR を培養した際の OD₆₀₀ の経時変化を図-6 に示す。培養三日後には培養液は白色の濁りを示した。この培養液の濁りは菌体の増殖によるものと油がバイオフィリアクタントの作用で乳化することによるものの双方が原因となって発生すると考えられる。

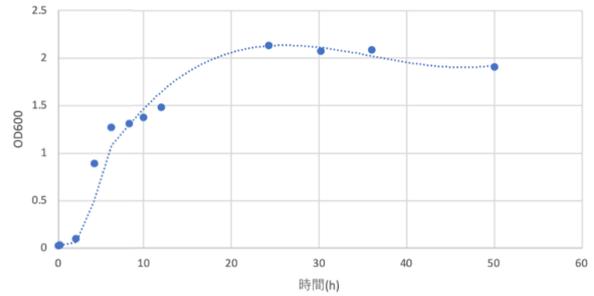


図-5 LB 培地における SHR の増殖曲線

2-5 に記した手法により菌体の増殖による濁度を求めた。菌体の増殖によると考えられる OD₆₀₀ 値の経時変化はロジスティック型の曲線が得られたことから軽油を炭素源として SHR が増殖していると考えられる。また、バイオフィリアクタントによる乳化が培養液の OD₆₀₀ 値に大きく寄与していることが示唆された。*Acinetobacter* 属細菌はエマルザンと総称される乳化物質を産生することが報告されている⁹⁾。SHR についても同様のバイオフィリアクタントが産生されたと予想される。

LB 培地では 2-4 時間で対数増殖期となったが、炭素源が軽油の場合は、0~24 時間が誘導期で、1-4 日が対数増殖期となった。この結果は、SHR は軽油に含まれるアルカン類と比較して LB 培地に含まれるグルコースなどの易分解性炭素を優先的に栄養源とすることを示唆している。

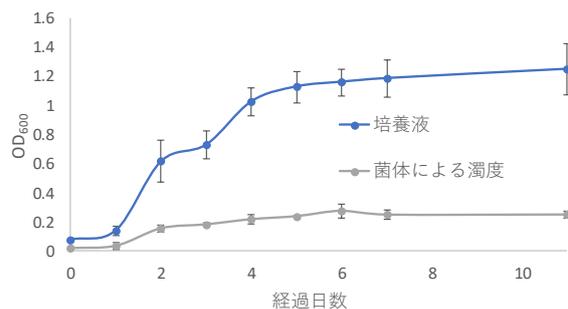


図-6 無機塩培地に軽油と SHR 菌液を加えて培養した試料の OD₆₀₀ 値の経時変化

3-4 SHR の石油分解能

軽油中の *n*-アルカンの分解について GC により経時変化を観察した。培養 6 日後の培養液からヘキサン抽出した試料のガスクロマトグラムを図-7 に示す。

図-7 のガスクロマトグラムにおいて各 *n*-アル

カンのピーク強度がコントロールと比較して SHR 株存在下では大きく減少している。C10 から C22 までの *n*-アルカンが SHR により分解されることが分かった。

n-アルカンの分解率の経時変化を図-8 に示す。軽油中の *n*-アルカンは培養開始後2日まではほとんど分解されなかった (分解率は4.7%)。4日後になって分解率は62%と著しく増加した。6日目は81%だった。

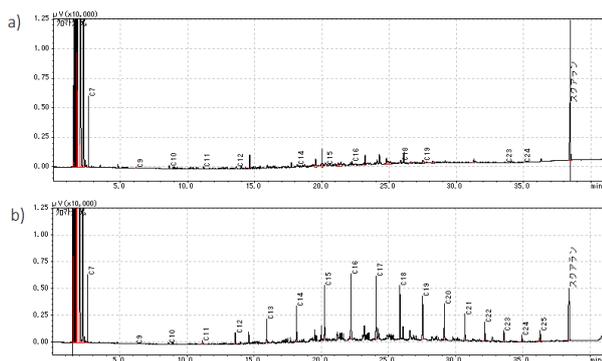


図-7 無機塩培地に軽油と SHR 菌液を加えて6日間培養した試料のヘキサン抽出液のガスクロマトグラム(a)と無機塩培地に軽油を加えて6日間、振盪した試料 (コントロール) のガスクロマトグラム(b)

4. 結論

裾花川の石油湧出地点から単離したバクテリアが *Acinetobacter beijerinckii* の新株であり、*n*-アルカン分解能を有することを明らかにした。生物多様性条約により、遺伝子資源の重要性に注目が集まっている現在において、石油分解能を有するバクテリア新株を長野県下で単離したこ

表2 種々の油分解バクテリアの分解率

Strain	Oil	Initial conc.(%)	Incubation time(h)	Decomposition rate(%)	Ref.
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> SusohanaR	Light oil	0.5(v/v)	144	81	this work
<i>Acinetobacter beijerinckii</i> ZRS	Light oil	0.5(w/v)	168	20	[10]
<i>Acinetobacter</i> sp. M-1	<i>n</i> -alkane(C16)	0.1(w/v)	36	<97*1	[11]
<i>Acinetobacter</i> sp. A3	Bombay High crude oil	0.5(v/v)	120	60	[12]
<i>Acinetobacter baumannii</i>	crude oil	1(w/v)	120	40	[13]
<i>Acinetobacter</i> sp. ODDK71	waste oil of car engine	1(w/v)	96	20	[14]
	<i>n</i> -alkane	1(w/v)	96	100	[14]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> S30	Gujarat crude oil	1(v/v)	360	29	[15]
	Bombay High crude oil	1(v/v)	360	50	[15]
<i>Alcaligenes odorans</i> P20	Gujarat crude oil	1(v/v)	360	37	[15]
	Bombay High crude oil	1(v/v)	360	45	[15]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> S30 and <i>Alcaligenes odorans</i> P20	Gujarat crude oil	1(v/v)	360	40	[15]
	Bombay High crude oil	1(v/v)	360	58	[15]
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Diesel oil	1(w/v)	192	50	[16]

*1: 界面活性剤を添加。

とは意義がある。

表2にこれまで報告されている石油分解バクテリアの分解率をまとめた。培養条件、分解率の算出法が報告により異なるため単純に比較できないが、SHRの*n*-アルカン分解率は他の株と比較して高いレベルにあると考えられる。SHRはバイオセーフティーレベルが1であることも確認しており、実際の油汚染サイトにおける環境浄化への適用が期待できる。

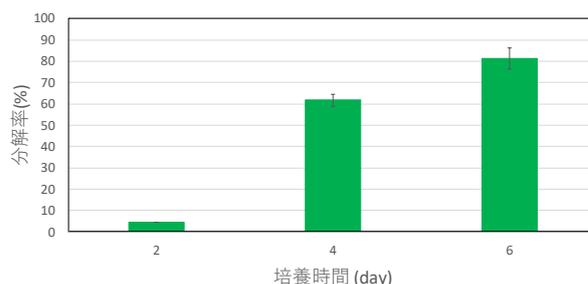


図-8 SHRによる軽油中の*n*-アルカン(C10-C22)分解率の培養時間による変化 (n=3)

謝辞

本研究を実施するにあたり信州大学基盤研究支援センター機器分析支援部門上田分室 P-DEX 微生物班、とくに梅田悠生氏と岩月研祐氏にご協力いただいた。ここに謝意を表する。

【参考文献】

- 1) Pius, D. S. K.: Short-term effects of oil pollution on Species numbers and productivity of a simple terrestrial ecosystem, Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological, Vol. 26, pp87-91, 1981.
- 2) Wake, H.: Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment, Estuarine, Coastal and Shelf Science, Vol. 62, pp131-140, 2005.
- 3) Moriwaki, H., Kitajima, S., Kurashima, M., Hagiwara, A., Haraguchi, K., Shirai, K., Kanekatsu, R. and Kiguchi, K.: Utilization of silkworm cocoon waste as a sorbent for the removal of oil from water, Journal of Hazardous Materials, Vol. 165, pp266-270, 2009.
- 4) Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T.C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. R. and Kodali, V. P.: Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution- a review, Petroleum, Vol. 4, pp241-249, 2017.
- 5) Nanat, I. M.: Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review, Bioresource Technology, Vol. 51, pp1-12, 1995.
- 6) 市川 正夫: 日本の屋根 長野県の鉱山と鉱石-鉱山開発の歴史と現状-, 信毎書籍出版センター, 2010.
- 7) 井上 智実, 中村 静夫, 山本 貴志, 坪内 武夫: 燃料油分解菌の分離と *n*-アルカン分解活性の評価, 環境技術 44 巻 5 号, pp268-27, 2015.
- 8) 小西 正朗, 堀内 淳一: 細胞の増殖を捉える-計測法から比速度算出まで-, 生物工学 第 93 巻 3 号, pp149-152, 2015.
- 9) 坂井 康能, 加藤 暢夫: 細菌はどのようにして石油を分解するか-*Acinetobacter* 属細菌の新しいアルカン分解経路-, 化学と生物 第 35 巻 4 号, pp 284-289, 1997.
- 10) Huang, L., Xie, J, Shi, X. and Lian, J.: Research on the isolation, identification and degradation characteristics of a diesel oil degrading strain, Advanced Material Reseach, Vol. 641-642, pp206-210, 2013.
- 11) Sakai, Y., Maeng, J. H., Tani, Y. and Kato, N.: Use of long-chain *n*-alkanes(C₁₃-C₄₄) by an isolate, *Acinetobacter* sp. M-1, Biosci. Biotech. Biochem., Vol. 58, No. 11, pp2128-2130, 1994.
- 12) Hanson K.G., Anuranjini N., Madhavi K. and Anjana D.: Bioremediation of crude oil contamination with *Acinetobacter* sp. A3, Current Microbiology, Vol. 35, pp191-193, 1997.
- 13) Mishra, S., Sarma, M. P. and Lal, B.: Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter Baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm, FEMS Microbiology Letters, Vol. 235, pp323-331, 2004.
- 14) Koma, D., Hasumi, F., Yamamoto, E., Ohta, T, Chung, S. Y. and Kubo, M.: Biodegradation of long-chain *n*-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp., Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 91, pp94-96, 2001.
- 15) Lal, B. and Khanna, S.: Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*, Journal of Applied Bacteriology, Vol. 81, pp355-362, 1996.
- 16) Huang, L., Ma, T., Liang, F. L., Liu, R.L. and Li, G. Q.: Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*, Marine Pollution Bulletin, Vol. 56, pp1714-1718, 2008.

(原稿受付 2020. 3. 6)