

# 博士学位論文

重油生分解能の高い

微生物群集の確立と生態機能解析

平成 19 年 3 月

近畿大学大学院  
農学研究科 応用生命化学専攻  
(主査: 藤田 藤樹夫 教授)

尾 崎 信 源

(和文題目)

重油生分解能の高い微生物群集の確立と生態機能解析

近畿大学大学院  
農学研究科 応用生命化学専攻  
尾崎 信源  
(主査:藤田 藤樹夫 教授)

(英文題目)

Studies on the Isolation and Ecological Functions  
of Microbial Consortia able to Degrade  
Crude Petroleum at High Rates

Shingen Ozaki

March, 2007

Graduate School, Kinki University  
Division of Agricultural Science  
Major: Applied Bioscience  
(Advisor: Prof. Tokio Fujita)

---

Submitted to the Graduate school, Kinki University, to fulfill the requirement  
for the Doctorate Degree.

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 緒論  | 1  |
| <b>第一章 重油分解能の高い微生物群集 K-3 の確立と群集解析</b>                         |    |
| 1. 緒言   | 5  |
| 2. 実験材料および実験方法  | 6  |
| 3. 実験結果および考察  | 15 |
| 4. まとめ  | 26 |
| <b>第二章 芳香族炭化水素画分分解能の高い微生物群集 No.22 の確立と炭素源の変化に伴う優勢種の変動</b>     |    |
| 1. 緒言   | 28 |
| 2. 実験材料および実験方法  | 30 |
| 3. 実験結果および考察  | 38 |
| 4. まとめ  | 61 |
| <b>第三章 No.22 群単離菌の混合培養による群集の再構築と芳香族炭化水素分解における非分解菌の群集内での役割</b> |    |
| 1. 緒言   | 63 |
| 2. 実験材料および実験方法  | 64 |
| 3. 実験結果および考察  | 67 |
| 4. まとめ  | 75 |
| <b>総合考察</b>   | 76 |
| <b>参考文献</b>   | 81 |
| <b>SUMMARY</b>  | 94 |
| <b>謝辞</b>   |    |

## 緒論

遺伝子組換えやメタボリックエンジニアリングなどの手法を用いて、微生物の酵素生産量や酵素活性を高め、低コスト・高収率で有用物質を生産する方法が確立されてきた。この手法は閉鎖系で単一種の微生物を純粋培養するのに適した方法である。一方、個々の微生物の能力は飛び抜けて高くなくても、異なった能力をもつ微生物が集まって形成された群集は、単一種の微生物より大きな能力を安定して発揮することができる。とくに開放系で使用するとき、この微生物群集が大きな役割を果たす。

たとえば、味噌、酒、黒酢などの伝統的発酵食品の製造や生ゴミのコンポスト化、活性汚泥法による下水の浄化、メタン発酵などでは、特定の微生物を単離することなく、その環境に生息する多数の微生物を利用し、分解や発酵過程は群集中の優勢種が変動しながら機能的に進行すると考えられている<sup>1,2)</sup>。このように風味を求める発酵食品の製造や多様な物質、難分解性物質の分解には、多種類の微生物が共存する微生物群集を利用するのが有用であると考えられる。

しかし、発酵や分解処理過程に関わる微生物群集の詳細な役割は、ほとんど解明されていない。そこで群集を構成する多様な微生物の相互関係や群集が高度な機能を有する原因を明らかにできれば、これまでの経験と勘に頼って群集を維持してきたやり方から、群集を科学的に制御し、より効率的に機能する構成種を明らかにすることができる。群集の有効活用は、今後の微生物の利用分野に大きく寄与できると期待している。

本研究では、流出した重油を効率よく安定して分解できる2種類の微生物群集を自然界から確立するとともに、構成種の同定、群集から微生物の単離、炭素源が変化したときの優勢種の変動、単離菌が群集内で果たす役割を解明した。

重油は多種類の炭化水素から構成され、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画すると、飽和炭化水素画分(飽和画分)、芳香族炭化水素画分

(芳香族画分)、レジン画分、そしてアスファルテン画分の4つに分画することができる<sup>3)</sup>。重油の約8~9割は飽和画分と芳香族画分で、特に芳香族画分は難分解性物質を多く含んでいる<sup>4)</sup>。そのためタンカー座礁事故などにより海洋へ重油が流出したり、工場や貯油タンクなどから重油が漏出して土壌や地下水を汚染すると、その被害は大きく、今後の環境修復の課題として安全で安価な処理技術の開発が求められている。

汚染重油の処理方法の1つとして、化学薬品で中和する方法があるが、この方法は散布した化学薬品で二次汚染を引き起こす危険性が指摘されている。そこで注目されているのが、微生物による環境修復(バイオレメディエーション *bioremediation*)技術である。バイオレメディエーションとは、微生物、植物、動物などがもつ生物機能を活用して、汚染された環境を修復する技術である。

重油分解菌に関する研究は幅広く行われていて、重油中の多種類の成分を分解する多様な微生物が自然界に存在していることが明らかにされてきた<sup>5-8)</sup>。しかし、分離された重油分解微生物は、一部の重油成分を分解できるだけで、分解能力が限定されていることもわかってきた<sup>9)</sup>。現在では、単一種の微生物で重油を分解して浄化することは難しいという認識が広く受け入れられるようになってきた。

つまり、重油分解に関わる様々な能力をもった複数の微生物で構成された群集が、異なる能力を効率よく発揮できる環境下で、重油を分解させることが求められている<sup>10)</sup>。たとえば、界面活性物質を生産する微生物が重油成分を乳化分散させることによって、別の種が重油成分を生分解しやすくするとか、ある種が生分解できない代謝中間体を、別の微生物種が分解するといった関係が考えられる。さらに、微生物群集は混入してきた他菌に対して、機能的に抵抗性を示すことが期待できるので、流出重油の実用的な処理に適していると考えられる。

しかし、重油を効率よく分解する微生物群集を確立したという報告は極めて少なく、さらに群集内での構成微生物の役割を明らかにした報告はまだない。これは、群集を構成する難培養性微生物の存在が、群集の解析を

困難にしてきた原因の 1 つであると考えられる。実際、従来の方法で単離、培養できる微生物は自然界に生息する微生物の 1% にしか満たないと言われている<sup>11)</sup>。自然界の環境条件を研究室で再現できないことや、微生物間の相互作用、増殖速度など、解明されていないことが多すぎるからである。

しかし近年、分子生物学的手法が発展し、群集の構成微生物を解析できるようになってきた<sup>12~14)</sup>。しかも、その解析方法は目的に応じて多種多様である。微生物群集の多様性を調べる terminal-restriction fragment length polymorphism(T-RFLP) と denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)、相対的な構成菌種の割合はクローンライブラリーや定量リアルタイム PCR、菌種の数把握するためには蛍光標識したプローブを用い顕微鏡で細胞を直接観察する fluorescence *in situ* hybridization(FISH)法が挙げられる。著者はこれらの方法を駆使し、確立した 2 種類の微生物群集を解析した。

第一章では重油を炭素源として集積培養を繰り返し、7 日間で重油(10g/l)の飽和画分を 56%、芳香族画分を 46%分解できる微生物群集 K-3 を新潟県の油田跡地から確立し、その構成菌種を PCR-DGGE 法を用いて明らかにした。また、K-3 群から構成菌を単離し、*Pseudomonas* 属が飽和および芳香族画分の分解に積極的に関与していることを明らかにした。

しかし、K-3 群は、重油中の芳香族画分を分解するときに飽和画分を要求した。そのため、分解の容易な飽和画分が速やかに生分解されると、難分解性の芳香族画分の濃度が相対的に上昇することが容易に予想された。閉鎖的な培養系では、高濃度の芳香族炭化水素は分解菌に毒性を示して分解を遅らせると考えられる。芳香族画分を唯一の炭素源として添加した培地に生育し、芳香族画分を分解できる新たな微生物群集が求められた。

第二章では、重油中の芳香族画分を唯一のエネルギー源・炭素源として利用できる群集を新たにスクリーニングした。新潟県にある油田から石油汚染土壌をサンプリングし、芳香族画分をエネルギーおよび炭素源とした培地で 7 日間培養後、生育の認められた集積培養液を新しい培地に継代し、

これを 20 代繰り返した。その中から、安定した生育を示し、培養 7 日間で芳香族画分を 30%分解できる微生物群集 No.22 を確立した。No.22 群からは構成菌を 3 株分離できたが、PCR-DGGE 解析では、14 本の DNA バンドが検出され、No.22 群は多様な菌種で構成されていることを明らかにした。また、芳香族画分添加培地で培養した培養液を、飽和画分をエネルギーおよび炭素源とする培地で培養すると、飽和画分の分解に lag time が出現した。このときの群集構成を PCR-DGGE 解析すると、DNA バンドパターンが変動し、優勢種の変動が示唆された。そこで、クローンライブラリー法と定量リアルタイム PCR 法を用いて、芳香族画分と飽和画分に変化したときの優勢種の変動を検討した。

第三章では、No.22 群から単離した 3 株が、群集内で果たす役割を検討した。芳香族画分を分解できる Y1 と Y4 株を、芳香族画分をほとんど分解できない Y3 株と混合培養すると、単独あるいは 2 株混合培養したときよりも芳香族画分の分解率が上昇し No.22 群とほぼ同じ値になった。そこで Y3 株が、群集内で芳香族画分の分解に果たす役割を検討し、Y3 株がバイオフィルムを形成すること、形成されたバイオフィルムに Y1 と Y4 株、さらに水に難溶性の芳香族炭化水素化合物が付着し、マイクロフローラを形成していることを見出した。また Y3 株は、Y1 と Y4 株の芳香族画分の分解を促進する物質を生産していた。このように、No.22 群が群集として優れた機能性を発現できる要因の一部を明らかにした。

## 第一章

### 重油分解能の高い微生物群集 K-3 の確立と群集解析

#### 1. 緒言

近年、重油中の多様な成分を分解する様々な微生物が報告されてきた<sup>5~8)</sup>。その結果、単離した微生物が分解できる炭化水素の範囲に限度があることを明らかにされた<sup>9)</sup>。このことが、重油の存在する環境には炭化水素を資化する多様な微生物が生息している背景となっていると推測している。さらにこのことは、単一種の微生物を用いて汚染重油を浄化することが極めて難しいことを示唆している。

汚染重油を浄化するためには、自然環境下で形成された重油分解微生物群集が効率よく働く環境をプラントや実験室などの閉鎖環境内に作ることが必要である。そして確立した重油分解微生物群集を維持、保存する方法を確立して、またリアクターなどで実際に汚染重油を処理できれば、単独の微生物ではなし得ない速度で重油中の多様な成分を分解できると期待される。

このような群集では、構成微生物間で適切な協力関係が構築されている。例えば、ベンズピレン分解の際には、まずベンズピレンを可溶化する微生物が優勢となり、次いでベンズピレンを分解する微生物が優勢になると報告されている<sup>15)</sup>。汚染重油を微生物で効率よく浄化をするためには、目的とする微生物群集の確立と、群集を維持、保存する技術、または制御する技術を確立することが必要である。

しかし、これまでに重油分解微生物群集を確立した報告は極めて少ないため、最初に基礎的な条件や知見を得ることが必要であった。そこで本章では、重油を高効率で分解できる微生物群集の確立と、確立した群集の分解特性と構成微生物を明らかにした。



## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1 試料および集積培養

重油分解微生物群の分離試料には、秋田県豊川油田(42 試料)と黒川油田(24 試料)、新潟県東山油田(12 試料)と西山油田(24 試料)から採取した原油汚染土壌 102 試料を使用した。試料は、重油を 10 g/l 添加した無機塩培地(蒸留水 1000 ml あたり、NH<sub>4</sub>Cl, 2.5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g; NaCl, 2.0 g; ZnCl<sub>2</sub>, 0.01 g; FeSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.01 g; CaCl<sub>2</sub>, 0.01 g, pH 7.0)に接種し集積培養(37°C, 125 strokes/min)した。分解基質の重油は関西電力株式会社から供与いただいた C 重油(粘度 550 cSt、比重, 0.96 g/cm<sup>3</sup>、硫黄含量, 2.1 wt%)を使用した。集積培地には、菌叢の安定化を図るために多孔質性セラミック (φ3 mm, Shibata-engei Ltd., Tokyo, Japan) を 40.0 g/l 添加した。集積培養 7 日後、重油が可溶化・分散した培養液を、新しい集積培地に継代培養した。継代培養を繰り返しても、重油が安定して可溶化・分散した培養液を選抜し、残存している重油中の飽和画分と芳香族画分を Thin-layer chromatography/Flame ionization detector (TLC/FID) 法で定量した。一方、安定して高い分解率を示した集積培養液は重油分解能の高い微生物群集として選出され、確立した微生物群集は、継代培養を繰り返して維持するとともに 10 %(v/v) グリセロール溶液に懸濁して - 80°C で凍結保存した。

### 2.2. 重油の分画

重油はシリカゲルカラムで分画した<sup>16)</sup>。使用したカラムは、内径 11 cm、長さ 100 cm、充填容積 7600 ml で、充填したシリカゲル(Wakogel C-200, Wako, Osaka, Japan)に重油 20 g を吸着させた。最初に 6.0 l の *n*-ヘキサンで洗浄後、8.0 l の *n*-ヘキサンで飽和画分を、12.0 l のジクロロメタンで芳香族画分を溶出させた。

重油 10 g から、飽和画分は 4.8 g、芳香族画分は 3.6 g 得られた。TLC/FID 分析で各画分のピークを確認し、Gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS)分析でそれぞれの画分に飽和炭化水素や芳香族炭

化水素が含まれていることを確認した。GC-MS 分析には、JEOL JMS-GCmate mass spectrometer を使用し、イオン源を 70eV に設定し測定した。GC カラムは、DB-1(30 m×0.32 mm, I.D. 0.25  $\mu$ m, J&W Scientific, Folsom, CA)を使用し、カラムオープン温度は 40°C から 40°C /min で 120°C まで昇温し、4°C/min で 300°C まで昇温させた。注入口の温度は 300°C、検出器の温度は 320°C に設定した。スプリット比は、1:100 に設定した。そして、飽和画分からは、C<sub>10</sub> から C<sub>35</sub> の飽和炭化水素のピークとそのフラグメントイオンを確認した。芳香族画分からは、r.t. 20 min までに出現したピークに 2 から 4 員環の芳香族化合物を確認し、側鎖にアルキル基の付加した物質や硫黄分を含む物質のフラグメントイオンも得られた。

### 2.3. 炭化水素分解試験

分解試験に使用した集積培地 5.0 ml は、炭素源に 4.0 g/l 飽和画分、4.0 g/l 芳香族画分、10.0 g/l 重油、または飽和画分と芳香族画分を無機塩培地に添加して調製し、群集や単離菌を接種して 37°C で振とう培養(125 strokes/min)した。培養液に内部標準物質を加えて、残存している炭化水素を TLC/FID 分析で定量して分解率を求めた。

分析試料は、培養液 5.0 ml に内部標準物質としてステアリルアルコール(5.0 g/l, ナカライテスク株式会社) 1 ml を加えた後、*n*-ヘキサン：トルエン/6:4 (v:v)15 ml 加えて炭化水素を抽出し、減圧乾固した後、抽出溶媒で 5.0 ml にメスアップして調整した。

試料は TLC/FID 分析(イアトロスキャン MK-6s, Iatron Mitsubishi Inc., Tokyo, Japan) で定量した<sup>17)</sup>。この方法は、重油成分を TLC で 3 つの画分(飽和画分、芳香族画分、レジンとアスファルテン混合画分)に分画した後、飽和画分と芳香族画分を FID で定量し、コントロールに対する培養液中の残存量を差し引いた割合を分解率として表示した。

分析試料をクロマロッド-SIII(Iatron Mitsubishi Inc.)に 1  $\mu$ l スポットし、恒湿槽に 10 分間保った後、*n*-ヘキサンを入れた展開槽内で、10 分間ハン

ギングしてから飽和画分を 10 cm 展開した。ハンギングと展開は 40°C の恒温槽内で行った。展開後、室温で 2 分間乾燥させて、溶媒を除去した。展開したロッドを安定化させるため、再び 10 分間恒温槽に保った。次に、*n*-ヘキサン:トルエン/2:8(v:v) で 5 cm 展開させ、芳香族画分と内部標準を展開した。イアトロスキャンを用いて室温で 2 分間乾燥させたロッドを FID 分析した。FID 分析は、水素と空気の流量比を H<sub>2</sub>:air/160:2000 ml/min に調整して行った。

## 2.4. GC 分析による炭化水素分解の確認

### 2.4.1. 飽和画分と芳香族画分の生分解試験

集積培地 5.0 ml に、飽和画分あるいは芳香族画分を 4.0 g/l となるように添加したこれらの培地に、重油添加培地で 7 日間前培養した K-3 群培養液を 100 μl 植菌し、振とう培養 (37°C, 125 strokes/min) した。培養液に内部標準物質 [*n*-ヘキサトリアコンタン(C<sub>36</sub>), 5.0 g/l] 1.0 ml を加えた後、*n*-ヘキサン:トルエン/6:4(v:v) で抽出、減圧乾固物を、飽和分は抽出溶媒で 5.0 ml に、芳香族分は 1.25 ml にメスアップしたものを分析試料として、GC 分析した<sup>18)</sup>。

GC 分析には GC-14B(Shimadzu, Kyoto, Japan) を使用し、検出には FID を用いた。カラムは DB-1(30 m×0.32 mm, I.D. 0.25 μm, J&W Scientific) を使用し、キャリアーガスには窒素(48 ml/min) を用いた。サンプルは 1 μl を注入し、スプリット比は 1:100 で分析した。飽和画分測定時のカラムオープン温度は、初期温度 80°C から毎分 12°C で 300°C まで昇温させた。注入口と検出器の温度は 300°C に設定した。芳香族分測定時のカラムオープン温度は、40°C から 40°C/min で 120°C まで昇温し、次いで 4°C/min で 300°C まで昇温させた。注入口の温度は 300°C、検出器の温度は 320°C に設定した。

### 2.4.2. 飽和画分と芳香族画分を共に添加したときの生分解試験

培養液に残存する飽和および芳香族炭化水素を、固相抽出法を用いて分

別した。まず、内部標準を添加した培養液を *n*-ヘキサン:トルエン/6:4(v:v)で抽出し、抽出物を石油エーテルで 3.0 ml にメスアップした。Sep-Pack (Waters, Milford, MA, USA) SI の上に CN を接続した固相に試料溶液を 3 ml アプライした後、石油エーテル 8.0 ml を固相に流して、溶出液を減圧乾固後、*n*-ヘキサンで 5.0 ml にメスアップしたものを飽和画分の分析試料とした。次に、芳香族画分を石油エーテル:ベンゼン/3:1(v:v)10.0 ml で溶出した。溶出液を乾固し、*n*-ヘキサン:トルエン/6:4(v:v)で 1.25 ml にメスアップして、芳香族分の分析試料とした。各試料とも、濃縮乾固を行う直前に内部標準を加えた。GC 分析条件は、前述の方法(2.4.1)に従った。

## 2.5. PCR-DGGE 解析

DNA 抽出方法は、Ziiou ら<sup>19)</sup>の方法を一部改変して、培養液から多くの DNA を抽出できるようにした。No.22 群継代培養液 20 ml を遠心分離して、得られた沈殿物は滅菌済み超純水(S.P.W.)で 2 回洗浄後、675  $\mu$ l の DNA extraction buffer に懸濁し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結した。融解したサンプルに、10 mg/ml の proteinase K(Wako)を 7.5  $\mu$ l 加えた後、 $37^{\circ}\text{C}$ に保って 5 min 間隔で攪拌しながら 30 min インキュベートした。これにラウリル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate:SDS, 200 g/l, Wako)溶液 75  $\mu$ l 添加した。 $64^{\circ}\text{C}$ に保って 20 min 間隔で攪拌しながら 1 h インキュベートし、氷水中で 10 min 静置後、 $-30^{\circ}\text{C}$ で 30 min 凍結させてから  $65^{\circ}\text{C}$ で 15 min インキュベートして融解させた。この凍結融解操作を繰り返し、3 度目の凍結時に Phenol-chloroform-isoamyl alcohol/50:49:1(v/v, PCI)を 375  $\mu$ l 添加してから凍結した。融解したサンプルを遠心分離(15000 rpm, 10 min, 室温)した後、上清(水層)を回収した。これに 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl (TE)緩衝液(pH 8.0)にフェノールを飽和させた溶液 700  $\mu$ l 添加し、穏やかに混和した後、遠心分離(15000 rpm, 10 min, 室温)した。上清(Phenol 層)を除去した後、PCI を同量添加して、遠心分離(15000 rpm, 10 min, 室温)した。上清(水層)を回収した後、Chloroform : Isoamyl

alcohol/24:1(v/v, CIA)を同量添加し、穏やかに混和した後、遠心分離(15000 rpm, 10 min, 室温)した。上清(水層)を回収後、2-propanolを0.7倍量添加して静置(2 h あるいは 一晚, 室温)したサンプルを遠心分離(15000 rpm, 10 min, 20°C)して、上清を除去した。得られた沈殿物に70% (v/v)エタノール1000 µlを添加し、遠心分離(12000 rpm, 5 min, 20°C)して洗浄後、エタノールを除去して沈殿物を風乾させ、S.P.W. 20 µlに溶解した。得られた溶液は、分光光度計で260 nmにおける吸光度を測定し、DNA濃度を求めた。

PCRにはAmpli Taq Goldセット(Perkin-Elmer Japan, Applied Biosystems Division, Chiba, Japan)を用い、反応液は、10×Taq Gold Buffer 5 µl、25 mM MgCl<sub>2</sub> 6 µl、各デオキシヌクレオシド3リン酸(各2.0 mM) 5 µl、各プライマー(各10 µM) 1 µl、鋳型DNA(30 ng/µl) 1 µl、Ampli Taq Gold(5 U/µl) 1 µl、そしてS.P.W. 30 µlからなる全量50 µlの系とした。プライマーセットには、16S rRNA遺伝子のV3領域の約200 bp(*E. coli* No.341-534)を増幅するようにGCクランプ(5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3')付のGC-341F(5'-GC クランプ -CCTACGGGAGGCAGCAG-3')と534R(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')を用いた<sup>20)</sup>。

サーマルサイクラーには、My Cyclor™ Thermal Cyclor(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いた。サイクル条件は、Pre-run(95°C, 10 min)を行った後、熱変性(93°C, 1 min)、アニーリング(48°C, 70 sec)、伸長反応(72°C, 70 sec)を25サイクル行い、最後にPost-run(72°C, 10 min)を行った。

PCRで目的配列が増幅されたことを確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。ゲルは20.0 g/lアガロース(Agarose S, Wako)、バッファーは0.5×TAE、DNAマーカーには100 bp DNA Ladder(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いた。泳動後、Ethidium-bromideにゲルを10 min浸漬し、Kodak Gel Logic 200 Imaging System(Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いてUVを透過し、検出されたDNAバンドを撮影した。

菌群の DNA サンプルは 4 本分の PCR 産物を増幅して、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN, Santa Clarita, CA, USA)を用いて濃縮した。PCR 産物は、1.5 ml エッペンドルフチューブに全量(計 200  $\mu$ l)移し、Buffer QX1 600  $\mu$ l を加えて 30 sec 攪拌した。QIAEX II を 5 $\mu$ l 加え遠心分離(12500 rpm, 30 sec, 20 $^{\circ}$ C)した後、上清を除去した。次に Buffer PE を 500  $\mu$ l 加えて洗浄し、遠心分離(12500 rpm, 30 sec, 20 $^{\circ}$ C)を行って上清を除去した。この操作を 2 回繰り返して行った。得られた沈殿物は風乾した後、20  $\mu$ l の S.P.W.を加えて室温で 5 min 静置し、遠心分離(12500 rpm, 30 sec, 20 $^{\circ}$ C)した。得られた上清は新しいエッペンドルフチューブに回収した。

DGGE 解析には、Dcode system (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を使用した。ゲルは、変性剤濃度とアクリルアミドの両方に濃度勾配をつけたダブルグラジエントゲルを用いた<sup>21)</sup>。変性剤の濃度勾配は、泳動方向に 20-50 %となるよう調整し、変性剤濃度は 7.0 M の尿素と 40 % (v/v)の脱イオンホルムアミドを 100 %とした。ポリアクリルアミド(アクリルアミド:ビスアクリルミド/37.5:1, Bio-Rad Laboratories, Inc.)には、6-9 % (v/v)の濃度勾配をつけた。泳動 Buffer には、0.5 $\times$ TAE Buffer を用い、60 $^{\circ}$ C、200 V で 6 h 電気泳動を行った。ゲルは、SYBR gold(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)に 30 min 浸漬し、Kodak Gel Logic 200 Imaging System を用いて UV を透過し、検出された DNA バンドを撮影した。

DGGE 解析で得られたバンドは切り出され、これをテンプレートとして 16S rRNA 遺伝子の V3 領域約 200 bp を増幅した。使用したプライマーや DNA ポリメラーゼ、PCR の条件は、前述の方法にしたがったが、PCR サイクル数は 25 サイクルから 18 サイクルに変更した。PCR を行った後、電気泳動で増幅を確認し、さらに、DGGE でバンドの純度を確認した。DGGE で検出したバンドを再度切り出し、PCR を行い精製後、塩基配列を解析した。

## 2.6. 菌株の分離

7日間培養した K-3 群培養液を滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈した。希釈液 100  $\mu$ l を 10.0 g/l グリセロール添加無機塩培地と R2A 平板培地 (Difco Lab., Becton and Dickinson Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に塗抹し、37°C で 1 から 2 日間培養した。形態の異なるコロニーを選択し、再び 10 倍段階希釈液を平板に塗抹し、コロニーの均一性を確認した。

## 2.7. 分離株の同定

### 2.7.1. 形態学的、生理・生化学的性状

分離株を位相差顕微鏡 (Nikon) で観察して、菌の形態と運動性を調べた。グラム染色は常法<sup>22)</sup>にしたがっておこない、その他の生理・生化学的性状は Api 20E 同定キット (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) を使用した。

### 2.7.2. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析

培養液 5.0 ml を集菌洗浄した後、40 mM EDTA を含む 100 mM Tris-HCl (TE) 緩衝液 (pH 8.0) 500  $\mu$ l に懸濁した。100 g/l sodium dodecyl sulfate (SDS, Wako) 溶液 100  $\mu$ l と Benzyl chloride (Nakarai Tesque Inc., Kyoto, Japan) 300  $\mu$ l を添加し、よく攪拌後 50°C ウォーターバス中で 30 min インキュベートした<sup>23)</sup>。その後、3.0 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) を 300  $\mu$ l 添加し、室温で 15 min 静置した。遠心分離 (15,000 rpm, 15 min, 20°C) 後、回収した上清に 2-Propanol を 1000  $\mu$ l 加え、室温で 5 min 静置後、遠心分離 (15000 rpm, 5 min, 20°C) して得られた沈殿物を 70 % (v/v) エタノールで 2 回洗浄を行ってから乾燥させた。得られた沈殿物を、S.P.W. 50  $\mu$ l に溶解した。50 倍希釈液の 260 nm における吸光度を分光光度計で測定し、DNA 濃度を求めた。

PCR には Ampli Taq Gold セットを用い、反応液は、10 $\times$  Taq Gold Buffer 5 $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub> 6 $\mu$ l、各デオキシヌクレオシド 3 リン酸 (各 2.0 mM) 5  $\mu$ l、各プライマー (各 10  $\mu$ M) 1  $\mu$ l、鋳型 DNA (30 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、Ampli Taq Gold (5 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l、そして S.P.W. 30  $\mu$ l からなる全量 50  $\mu$ l の系とした。プライマーセットには、16S rRNA 遺伝子の約 1500 bp を増幅するように

27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')と 1492r

(5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3') を用いた。サーマルサイクラーには、My Cyclor™ Thermal Cyclor を用いた。サイクル条件は、Pre-run(94°C, 7 min)を行った後、熱変性(94°C, 45 sec)、アニーリング(55°C, 45 sec)、伸長反応(72°C, 45 sec)を 30 サイクル行い、最後に Post-run(72°C, 10 min)を行った。PCR で目的配列が増幅されたことを確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。ゲルは 20.0g/l アガロース、バッファーは 0.5×Tris-Acetic Acid-EDTA (TAE)Buffer (Bio-Rad Laboratories,Inc.)、DNA マーカーには、λ-*Eco*T14I digest (Takara Bio Inc.)を用いた。泳動後、Ethidium-bromide(Wako)にゲルを 10 min 浸漬し、Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて紫外線(UV)を透過し、検出された DNA バンドを撮影した。

PCR 産物を 15.0 g/l アガロースゲルで電気泳動し、検出した目的バンドをメスで切り出し、1.5 ml エッペンドルフチューブに回収した。QIAEX II Gel Extraction Kit を用いてゲルから DNA を抽出しこれを精製 DNA サンプルとしてシーケンス解析に用いた。

## 2.8. シーケンス解析

シーケンス解析は、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ,USA)を用いてダイレクトシーケンスを行った<sup>24)</sup>。用いたシーケンスプライマーをTable 1 に示した。DNAシーケンサーには、ABI PRISM 3100 DNA Sequencer(Applied Biosystems)を用いた。決定された塩基配列は、DNA Data Bank of Japan(DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)に登録されている塩基配列に対してBLAST検索を行い、相同性の高い菌株を検索した。



**Table 1. Sequence primers**

| <b>Primers</b>               | <b>Direction</b> | <b>Position*</b> | <b>Sequences</b>                  |
|------------------------------|------------------|------------------|-----------------------------------|
| <b>16S rRNA gene primers</b> |                  |                  |                                   |
| <b>f1L</b>                   | <b>Forward</b>   | <b>9-27</b>      | <b>5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'</b>  |
| <b>f2L</b>                   | <b>Forward</b>   | <b>517-535</b>   | <b>5'-CCAGCAGCCGCGGTAATAC-3'</b>  |
| <b>f3L</b>                   | <b>Forward</b>   | <b>1093-1111</b> | <b>5'-GTCCCGCAACGAGCGCAAC-3'</b>  |
| <b>r1L</b>                   | <b>Reverse</b>   | <b>535-517</b>   | <b>5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'</b>  |
| <b>r2L</b>                   | <b>Reverse</b>   | <b>804-785</b>   | <b>5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-3'</b> |
| <b>r3L</b>                   | <b>Reverse</b>   | <b>1110-1092</b> | <b>5'-TTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'</b>  |
| <b>r4L</b>                   | <b>Reverse</b>   | <b>1405-1388</b> | <b>5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'</b>   |
| <b>rE1L</b>                  | <b>Reverse</b>   | <b>344-326</b>   | <b>5'-GTAGGAGTCTGGACCGTGT-3'</b>  |
| <b>DGGE primers</b>          |                  |                  |                                   |
| <b>341F</b>                  | <b>Forward</b>   | <b>341-358</b>   | <b>5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'</b>    |
| <b>534R</b>                  | <b>Reverse</b>   | <b>344-326</b>   | <b>5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'</b>    |

\*Based on 16S rRNA gene of *E. coli*(1541bp)

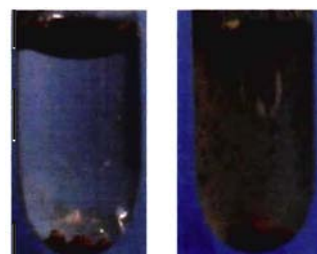
### 3. 実験結果および考察

#### 3.1. 重油生分解能の高い菌群の選出

重油を分散・乳化し、さらに継代培養を繰り返しても飽和画分や芳香族画分を安定して分解した K-3 群を重油生分解能の高い微生物群集として選抜した(Fig. 1)。K-3 群の炭化水素分解率は、継代 20 回までは不安定であったが、それ以降安定し、32 代目の飽和画分分解率は 7 日間で 40-60 %、芳香族画分分解率は 40-50 %に達した(Fig. 2)。

K-3 群のように、重油を炭素源とした培地に集積培養して、重油中の炭化水素を安定して高分解する群集が確立された報告は少ない。Sugiura ら<sup>25)</sup>は 5 g/l 重油添加培地に群集 SM8 を培養すると 10 日目に飽和画分を 40-53 %、芳香族画分を 11-18 %分解したと報告している。Viñas ら<sup>26)</sup>も、異なる条件で 3 つの群集を確立し、これらの群集は飽和画分を 34-60 %、芳香族画分(主に多環芳香族炭化水素)を 7-19 %分解したと報告している。

培養条件や、用いた重油の性状などが異なるため、単純に比較することは難しいが、K-3 群はこれまでに報告されている群集より、重油中の飽和画分や芳香族画分を共に高



Control K-3 culture

Fig.1. Growth of the K-3 consortium in a medium with crude petroleum.

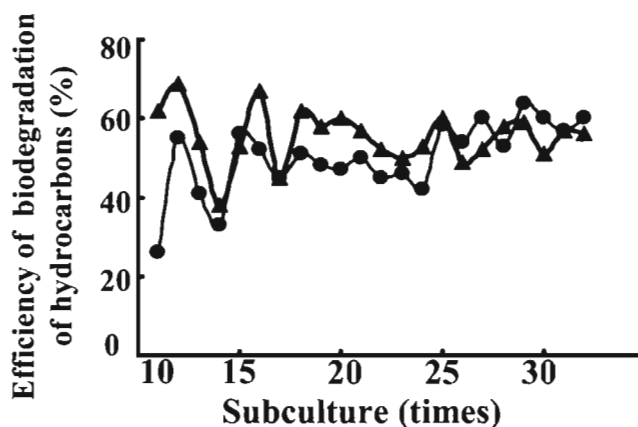


Fig. 2. Degradation of saturated and aromatic hydrocarbons by the K-3 consortium subcultured in the enrichment medium supplemented with crude petroleum (10 g/l). ●, degradation of saturated hydrocarbon; ▲, degradation of aromatic hydrocarbon.

い割合で分解できる優れた群集である。

確立した K-3 群を長期間保存するために  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存し、1 ヶ月後に復元した群集は、重油添加無機塩培地で良好に生育した。また菌叢は、DGGE 解析で変化していないこと確認した。これにより、K-3 群を長期保存することが可能となった。また通常の群集の維持は、7 日間隔で継代培養で行い、現在 200 代目を超えているが、菌叢が変化していないことを DGGE 解析で確認している。

### 3.2. 重油から分画した飽和画分と芳香族画分の生分解

K-3 群を飽和画分あるいは芳香族画分を炭素源とした培地で 7 日間培養すると、飽和画分を 40 % 分解したが、芳香族画分の生分解率は 7 日で 2~3 % しかなく、14 日で 8 %、21 日でも 20 % と低かった (Fig. 3)。この値は、Fig. 2 の重油添加培地で培養したときの芳香族画分の分解率 (40~50 %, 7 日間) に比べると著しく低かった。

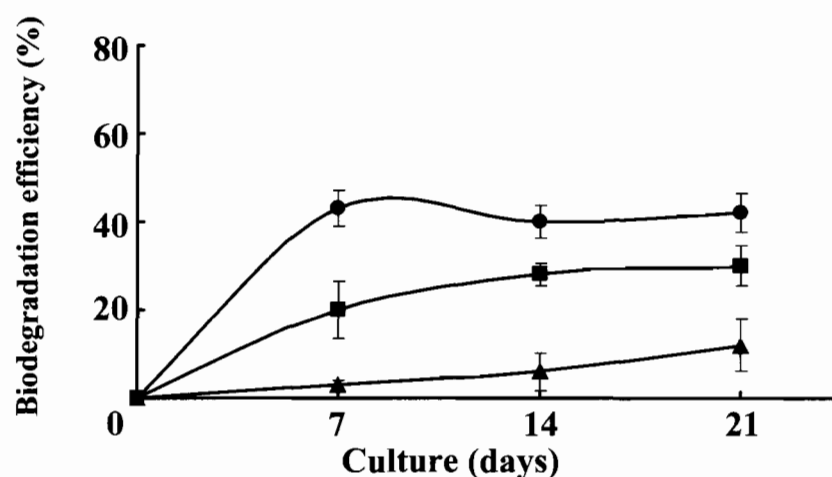


Fig. 3. Degradation of saturated and aromatic hydrocarbons by the K-3 consortium. ●, degradation of saturated hydrocarbon in the enrichment medium supplemented with saturates (4 g/l); ▲, degradation of aromatic hydrocarbon in the medium with aromatics (4 g/l); ■, degradation of aromatic hydrocarbon in the medium with aromatics and saturates. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

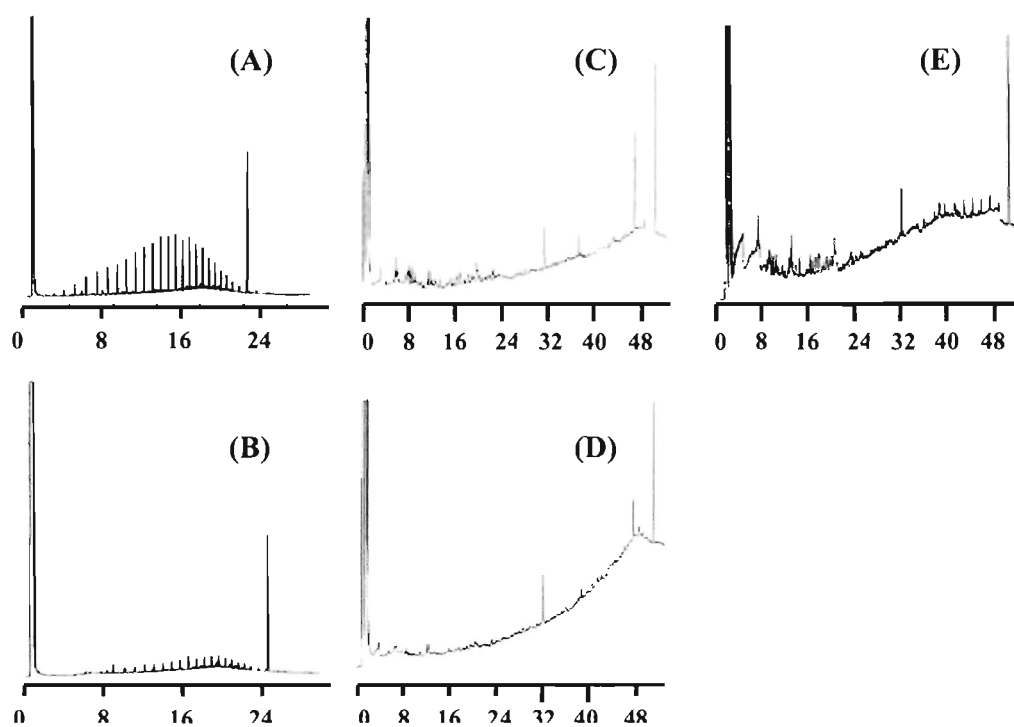
そこで、飽和画分と芳香族画分を一緒に添加した培地で培養すると、飽和画分の分解率は 40 %と変わらなかったが、芳香族画分分解率が 7 日目では 20 %に上昇した(Fig. 3)。この結果は、K-3 群が芳香族画分を分解するときには、飽和画分を要求することを示している。たとえば、芳香族画分の分解に働く酵素系を合成するため、あるいは芳香族画分分解酵素系が分解反応を触媒するのに必要な ATP や補酵素などを合成するために飽和画分のような利用しやすい(分解しやすい)物質が必要であると考えられる。

重油から分画した飽和画分を GC 分析したところ、C<sub>10</sub>~C<sub>35</sub> の鎖長をもつ飽和炭化水素のピークを検出することができた (Fig.4-a)。K-3 群培養液から抽出した飽和画分の GC クロマトグラムでは、各ピークが一様に減少していたことから、K-3 群は、C<sub>10</sub>~C<sub>35</sub> の飽和炭化水素を均一に分解できる点に特徴がある (Fig. 4-b)。飽和炭化水素を生分解できると報告されている *Acinetobacter* sp.は、C<sub>7</sub>からC<sub>20</sub>の飽和炭化水素をよく分解するが、C<sub>30</sub>以上の炭化水素分解力は低いと報告されている<sup>27)</sup>。K-3 群のようにC<sub>35</sub>付近までの長鎖飽和炭化水素を分解できる微生物群集は報告が少ない。

一方、芳香族画分を添加した K-3 群培養液からは、芳香族画分のピークが明確に減少していることを確認することが出来なかった(Fig. 4-c)が、飽和画分と芳香族画分を同時添加した培地で培養した K-3 群培養液では、飽和炭化水素のピークは均一に減少し、さらに芳香族画分も r. t. 12 min 前後の大きなピークが大きく減少していた(Fig. 4-d)。

TLC/FID と GC 分析の結果から、K-3 群は芳香族画分を分解するときに飽和画分を要求することが明らかとなった。*Burkholderia cepacia* 2A-12 は、フェナントレンを分解するときに Yeast extract のような補助基質を添加すると、分解活性が 3 倍に高まったと報告されている<sup>28)</sup>。また、*Pseudomonas saccharophila* P15 は、サリチル酸を含む培地で前培養すると、フェナントレン分解酵素であるジオキシゲナーゼが誘導されることが明らかにされている<sup>29)</sup>。このように、補助基質や分解酵素の誘導物質となる基質を芳香族炭化水素と共に添加すると、芳香族炭化水素分解活性

が上昇することから、飽和画分の代わりに Yeast extract を 1 g/l 添加して、K-3 群のフェナントレン(60 mg/l)分解率を測定した。その結果、フェナントレンは 7 日間で 30 %分解された。Yeast extract 無添加で培養したとき、ほとんど分解されなかったことから、飽和画分や Yeast extract は、K-3 群が芳香族炭化水素を分解するときの補助基質として機能していると推察される。



**Fig. 3.** GC analysis of extracts from the culture solutions of the K-3 consortium. The K-3 consortium was cultured in media supplemented with the saturated hydrocarbon fraction (B), with the aromatic hydrocarbon fraction (C), and with the saturated and aromatic hydrocarbon fractions (D) after seven days. GC analysis of the extracts from the medium with the saturated (A) and aromatic (E) hydrocarbon fractions (A was the control against B, and E was that against C).

### 3.3. PCR-DGGE 法による K-3 群の群集構造解析

K-3 群培養液を DGGE 法で解析した結果、5 本の DNA バンド(A~E)が検出された (Fig. 5)。各バンドの塩基配列約 200 bp を決定し、相同値の高い属種を検索した結果、バンド A は *Pseudomonas aeruginosa* MO2 (AY162138)、バンド B は Uncultured *Alphaproteobacteria* (AY144193)、バンド D は *Ochrobactrum anthropi* AS5 (AM113857) と 100% の相同値を示した。また、バンド C と E は *Gamma proteobacteria* 綱に含まれる菌と推定した (Table 2)。5 本の DNA バンドは、いずれも *Alpha* と *Gammaprpteo*bacteria 綱に分類された。

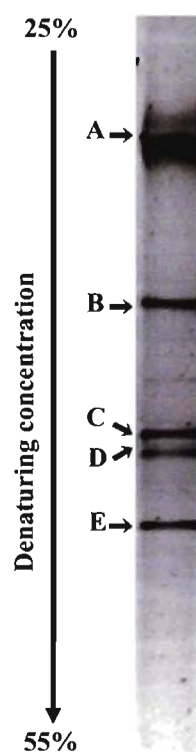


Fig. 5. DGGE of 16S rRNA gene bands obtained from the K-3 consortium.

### 3.4. K-3 群培養液からコロニーの単離

K-3 群培養液から、形態の異なるコロニーを 6 株選抜した (Fig. 6)。6 株を R2A 平板培地で培養すると、5 株 (G-1, 2, 4, H-1, 2) で蛍光物質の生産が認められた。これら 5 株は R2A 平板培地で優先的にコロニーを形成し、G3 株のコロニーは、出現頻度も出現数も少なかった。

Table 2. 16S rRNA gene sequences of the major DNA bands detected by PCR-DGGE.

| band | Phylogenetic group         | Closest sequence (Accession No.)                  | Homology (%) |
|------|----------------------------|---|--------------|
| A    | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MO2 (AY162138)      | 100          |
| B    | <i>Alphaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Alphaproteobacterium</i> (AY144193) | 100          |
| C    | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured bacterium (AY218747)                   | 98           |
| D    | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Ochrobactrum anthropi</i> AS5 (AM113857)       | 100          |
| E    | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured bacterium (AY218737)                   | 99           |

### 3.5. K-3 群から分離した株の同定

#### 3.5.1. 生理・生化学的性状

6 株はいずれもグラム陰性で運動性を有する桿菌であった。蛍光物質を生産した 5 株は、*Pseudomonas aeruginosa* の特徴を示したが、詳細な生理・生化学的特徴の違いから、さらに 3 つのグループ (G1 と G2 株、G4 株、H1 と H2 株) に分けることができた (Table 3)。

また、これら 5 株の DNA を抽出し、DGGE 解析すると、K-3 群培養液から検出された *Pseudomonas aeruginosa* と同じ位置 (バンド A, Fig. 5) にバンドが出現した。

G3 株の性状やコロニー形態は *Pseudomonas* 属とは大きく異なっていた (Table 3)。G3 株を DGGE 解析すると、K-3 群培養液から検出された *Ochrobactrum anthropi* AS5 のバンド (バンド D, Fig. 5) と同じ位置にバンドが出現した。

これらの結果から、蛍光物質を生産する 5 株は *Pseudomonas* 属、G3 株は *Ochrobactrum* 属と同定した。

#### 3.5.2 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析

単離 6 株の DNA から 16S rRNA 遺伝子を PCR 法で増幅した。この PCR 産物をシーケンスして全塩基配列を決定した。その結果、*Pseudomonas* 属 5 株のうち、同じ性状を示した G1 株と G2 株、H1 株と H2 株は塩基配列が一致したことから同一株と同定した。決定した塩基配列は、DDBJ に G1 株, Accession number AB126582; G3 株, AB120120; G4 株, AB222019; H1 株, AB222018 として登録した。Blast 検索すると、G1 株と H1 株の塩基配列は、*Pseudomonas aeruginosa* AL98 (AJ249451) と 99.9%、G4 株は、*Pseudomonas* sp. A3 (Y13246) と 99.9%、G3 株は

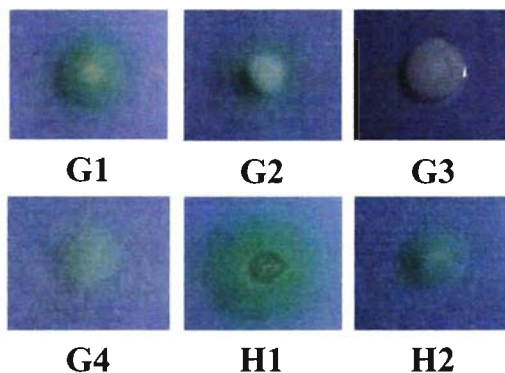


Fig. 6. Six strains isolated from the K-3 consortium.

**Table 3.** Morphological and physiological characteristics of isolated strains from the K-3 consortium.

|   | G1       | G2       | G4       | H1       | H2       | <i>P. aeruginosa</i><br>IAM1514 <sup>T</sup> | G3       |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|--|----------|
| <b>Oxidase</b>                          | +        | +        | +        | +        | +        | +  | —        |
| <b><math>\beta</math>-galactosidase</b> | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>Arginine dihydrolase</b>             | +        | +        | +        | +        | +        | +  | —        |
| <b>Lysine decarboxylase</b>             | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>Ornithine decarboxylase</b>          | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>Urease</b>                           | +        | +        | —        | +        | +        | —  | —        |
| <b>Tryptophan deaminase</b>             | +        | +        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>Gelatinase</b>                       | +        | +        | —        | +        | +        | +  | —        |
| <b>Utility of citric acid</b>           | +        | +        | +        | +        | +        | +  | —        |
| <b>Production of H<sub>2</sub>S</b>     | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>Production of indole</b>             | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>Production of acetoin</b>            | —        | —        | —        | —        | —        | —  | +        |
| <b>Acid production from sugar</b>       |          |          |          |          |          |  |          |
| <b>Glucose</b>                          | +        | +        | —        | +        | +        | +  | —        |
| <b>D-Mannitol</b>                       | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>Inositol</b>                         | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>D-Sorbitol</b>                       | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>L-Rhamnose</b>                       | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>Saccharose</b>                       | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>D-Melibiose</b>                      | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>D-Amygdalin</b>                      | —        | —        | —        | —        | —        | —  | —        |
| <b>L-Arabinose</b>                      | +        | +        | —        | +        | +        | —  | —        |
| <b>OF test</b>                          | <b>O</b> | <b>O</b> | <b>O</b> | <b>O</b> | <b>O</b> | <b>O</b>                                     | <b>O</b> |

*Ochrobactrum anthropi* LMG3306 (U88440)と 99.7 %の高い相同値を示し、系統樹でも同じクラスターを形成した(Fig. 7)。

形態学および生理・生化学的性状と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の結果から、G1、G2、H1、H2 株は *Pseudomonas aeruginosa*、G4 株は *Pseudomonas* sp.、G3 株は *Ochrobactrum anthropi* と同定した。その結果、K-3 群は、*Pseudomonas* 属と *Ochrobactrum anthropi* および未分離の 3 株(バンド B, C, E, Fig. 5)で構成されていることを明らかにした。



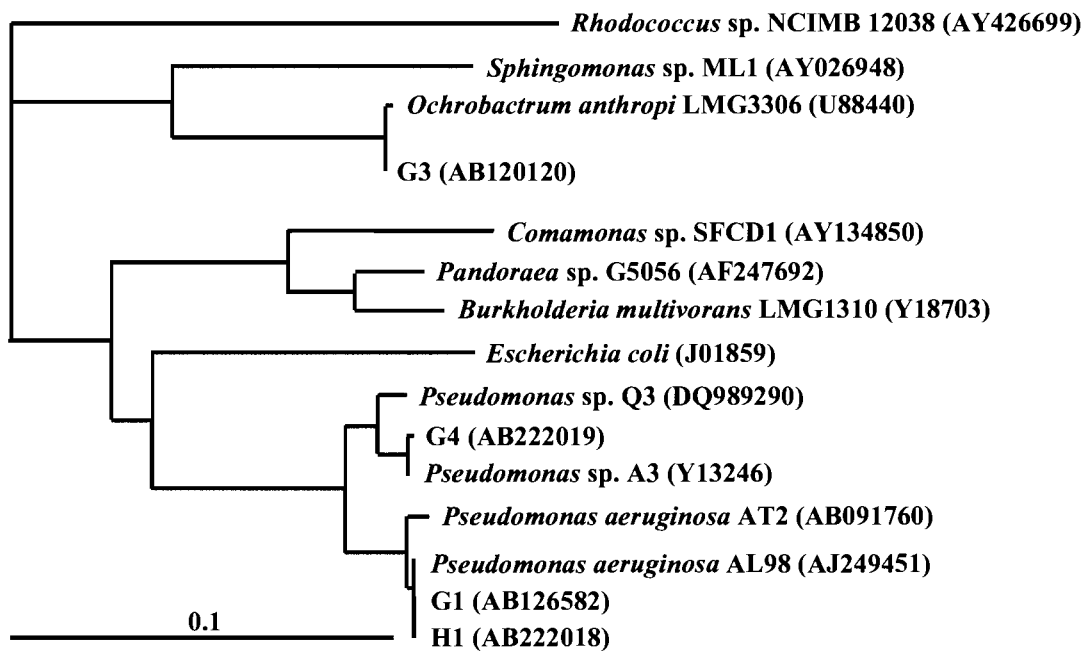


Fig. 7. Physiological tree of isolated strains from the K-3 consortium.

### 3.1.10. 分離株の重油生分解

分離した 6 株を重油（10.0 g/l）添加無機塩培地で培養し、重油の形態変化を観察するとともに、重油中の飽和炭化水素と芳香族炭化水素の生分解率を測定した。*Pseudomonas aeruginosa* G1 をはじめ *Pseudomonas* 属と同定された培養液(G2、G4、H1、H2 株)では良好な生育が認められ、継代培養しても重油が培養液中に乳化されるなどの形態変化が観察された (Fig. 8)。

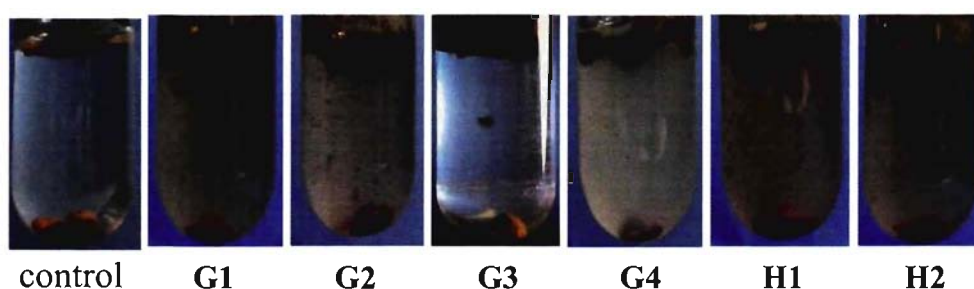


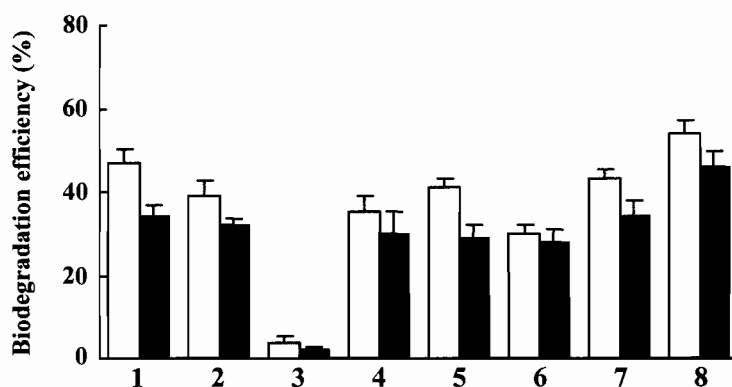
Fig. 8. Bacterial growth of isolated strains from the K-3 consortium in medium with crude petroleum.

そこで、培養液に残存している重油を抽出後、TLC/FID で分析し、生分解率を求めたところ、5 株 (G1、G2、G4、H1、H2 株) は重油の飽和画分と芳香族画分を 7 日間で 30~50 % 分解していたが、生育の認められなかった *O. anthropi* G3 株は、ほとんど分解しなかった (Fig. 9)。また 5 株は、芳香族画分を唯一の炭素源とする培地で培養すると生育しなかった。しかし、飽和画分と芳香族画分を共に添加して培養すると、重油を炭素源としたときと同じ分解率を示し、K-3 群と同様に芳香族画分の分解に飽和分を要求した。

この結果から、*Pseudomonas* 属が K-3 群の優勢種の 1 つで、K-3 群の重油分解に大きな役割を果たしていると考えた。

しかし、重油分解能の低い G3 株も、K-3 群の重油を生分解するとき、何らかの役割を果たしているのではないかと考え、G3 株単独と、G3 株と G1 から H2 株とを組み合わせる混合培養し、分解率を測定した。その結

果、混合培養したときの分解率は、各菌を単独培養したときの生分解率とほぼ同じ値を示した(Fig. 10)。これらの結果から、*O. anthropi* G3 株は重油の生分解には直接関与していないことを明らかにすることができた。



**Fig. 9.** Degradation of saturated and aromatic hydrocarbons by the K-3 consortium and the isolated strains in the medium supplemented with crude petroleum (10 g/l). Results are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). 1, strain G1; 2, strain G2; 3, strain G3; 4, strain G4, 5, strain H1; 6, strain H2; 7, mixture of six isolated strains; 8, the K-3 consortium. White bar, saturated hydrocarbon; Black bar, aromatic hydrocarbon.

Komukai ら<sup>30)</sup>は、飽和炭化水素と芳香族炭化水素の生分解において、*Pseudomonas putida* と *Acinetobacter* sp. を混合培養すると、単独培養のときよりも飽和炭化水素と芳香族炭化水素の生分解率が上昇したと報告している。しかし、今回確立した K-3 群では、複数の *P. aeruginosa* が重油生分解に主要な役割を果たしており、G3 株は *Acinetobacter* sp. のように重油の分解には積極的に関与しているのではなく、*P. aeruginosa* が分解した分解物を代謝していると推測している。

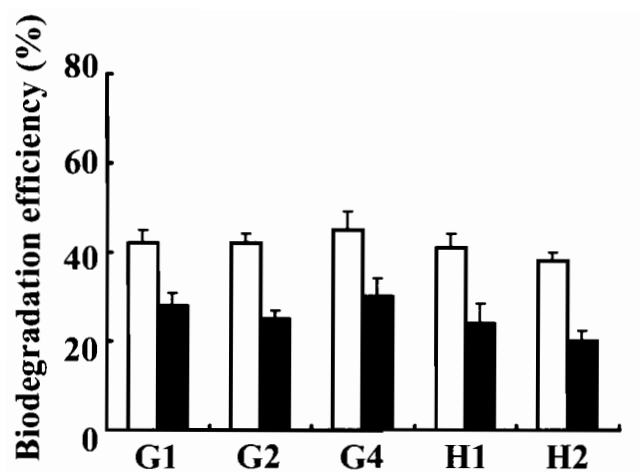


Fig. 10. Degradation of saturated and aromatic hydrocarbons by the combination of strain G3 and other isolated strain.

#### 4. まとめ

秋田県や新潟県の各油田から採取した重油汚染土壌から重油生分解能の高い微生物群集をスクリーニングした結果、黒川油田から採取した試料(K-3)を添加した集積培養液に重油の可溶化と分散が認められ、継代培養を繰り返しても重油中の飽和画分と芳香族画分が安定して分解された。

次に、シリカゲルカラムクロマトで重油を4つの画分に分画した。得られた飽和画分と芳香族画分をエネルギー・炭素源とした培地を用いて分解試験を行ったところ、K-3群は7日間で飽和画分を40%分解したが、芳香族画分は2~3%しか分解しなかった。ところが、芳香族画分に飽和画分を添加して7日間培養すると、芳香族画分の分解率は20%まで上昇した。

培養液中に残存した炭化水素をGC分析すると、K-3群はC<sub>10</sub>~C<sub>35</sub>の飽和炭化水素を均一に分解していた。また、K-3群を飽和画分と芳香族画分添加培地で培養すると、飽和画分のピークだけでなく、芳香族画分のピークも減少していることを確認することができた。

飽和画分の代わりにYeast extractを添加しても、K-3群による芳香族画分の分解率が上昇した。これらの結果から、K-3群は芳香族画分を分解するとき、飽和画分やYeast extractのような補助基質を必要とすることを明らかにした。

K-3群培養液をDGGE解析した結果、5本のバンドを検出した。また、R2A寒天培地を用いて、形態の異なる6個のコロニーを分離した。分離株の16S rRNA遺伝子の塩基配列と生理・生化学的性状をもとに、G1、G2、G4、H1、H2株は*P. aeruginosa*、G3株は*Ochrobactrum anthropi*と同定した。分離株の重油生分解特性から、*P. aeruginosa*と同定された5株が重油生分解に主要な役割を果たしていると考えた。

本研究で確立したK-3群は、重油中の飽和炭化水素や芳香族炭化水素を安定して効率的に生分解することができた。K-3群の分解率は、本研究室で単離してきた単一種の菌と比べると、分解の速さも分解基質の範囲もはるかに優れていた。また、自然界から重油中の飽和および芳香族画分を安定して高分解率で分解できる微生物群集をスクリーニングする手法や保

存方法、群集構成菌の解析など、群集解析に必要な基礎技術を確立することができた。K-3 群は、今後の環境浄化の研究に大きく貢献すると期待している。

## 第二章

### 芳香族炭化水素画分分解能の高い 微生物群集 No.22 の確立と炭素源の変化に伴う優勢種の変動

#### 1. 緒言

重油中の飽和炭化水素は、微生物によって比較的容易に分解されるが、発がん性をもつと言われている芳香族炭化水素は微生物にとっても分解しにくい物質である。そのため、重油汚染事故が起こると、自然界に長期間残留する。これまでに芳香族炭化水素を分解できる多数の微生物が単離され、分解経路や分解酵素の遺伝子について研究がすすめられている<sup>31)</sup>。

これら単離微生物をメタゲノム解析すると、芳香族炭化水素の分解経路の一部の遺伝子しか保有しないことや、発現していないことが明らかとなってきた<sup>32)</sup>。これらの結果は、これからの環境浄化分野では、群集内の微生物が果たす役割と微生物間の相互作用を解明することが必要であることを示している。さらに、安定した微生物群集を育成し、長期間維持・保存する技術や、その系を構成する微生物種を解析する手法を確立することも必要になってくる。

近年、広く用いられているパターン・多様性解析法のひとつである DGGE 法は、対象遺伝子を PCR 増幅後、核酸二本鎖変性剤(尿素、ホルムアミド)の濃度勾配を形成させたポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると、配列の異なる DNA 分子は部分解離する変性剤濃度が異なるため、DNA の移動度が異なり分離することができる<sup>33)</sup>。この他に、環境中の微生物群集から抽出した DNA からリボソーム DNA をクローン化し、複数種の混合状態にあった遺伝子を単一として取得し、数十から数千のクローンのライブラリーを構築するクローンライブラリー法<sup>34)</sup>や、特定の菌種または菌株に対して特異的なプライマーを設計し、リアルタイム PCR を行うと最初の DNA 量と増幅回数から群集中で特定の菌種や菌株の相対的な割合を求めることができる<sup>35)</sup>。Sekiguchi ら<sup>36)</sup>は、水中に生息する微

生物群集の構成比率をクローンライブラリー法により明らかにしている。

本章では、芳香族画分を高効率で分解する微生物群集を新たにスクリーニングし、No.22 群を確立した。次いで、PCR-DGGE 法、クローンライブラリー法、そしてリアルタイム PCR 法を用いて No.22 群を構成する微生物の比率を明らかにした。その結果、No.22 群を飽和炭化水素画分および芳香族炭化水素画分を炭素源とした培地で培養すると優勢種が異なることを明らかにした。また、それぞれ優勢種の芳香族炭化水素や飽和炭化水素に対する分解特性を明らかにして、優勢種が変動した理由の一部を明らかにした。



## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1 試料および集積培養

芳香族画分分解微生物群は、新潟県にある東山油田(21 試料)と西山油田(32 試料)から採取した原油汚染土壌 53 試料から分離した。芳香族画分を 4.0 g/l 添加した無機塩培地(蒸留水 1000 ml あたり、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2.5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 g;  $\text{NaCl}$ , 2.0 g;  $\text{ZnCl}_2$ , 0.01 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.01 g;  $\text{CaCl}_2$ , 0.01 g, pH 7.0)に試料を加え集積培養(37°C, 125 strokes/min)した。分解基質の芳香族画分は、シリカゲルカラムを用いて重油から分画した。集積培地には、菌叢の安定化を図るために多孔質性セラミック ( $\phi 3$  mm, Shibata-engei Ltd., Tokyo, Japan) を 40.0 g/l 添加した。

集積培養 7 日後、芳香族画分が可溶化・分散した培養液を新しい集積培地に継代培養した。継代培養を繰り返しても、芳香族画分が可溶化・分散した培養液に残存している芳香族画分を TLC/FID で定量した。一方、安定して高い分解率を示した集積培養液を芳香族画分分解能の高い微生物群集として選出した。確立した微生物群集は、継代培養を繰り返して維持するとともに、10 %(v/v)グリセロール溶液に懸濁して -80°C で凍結保存した。

3 員環芳香属炭化水素のフェナントレン( $\text{C}_{14}$ )やアントラセン( $\text{C}_{14}$ )、4 員環のピレン( $\text{C}_{16}$ )および芳香族炭化水素代謝中間体として選出したカテコール、1-Hydroxy-2-Naphthoic acid(1H2N)、サリチル酸、 $\sigma$ -フタル酸、*cis,cis*-ムコン酸、ゲンチジン酸は、和光純薬株式会社(Wako, Osaka, Japan)より購入した。飽和炭化水素にはエイコサン( $\text{C}_{20}$ , Wako)を使用した。

### 2.2. 炭化水素の分解試験

No.22 群と単離株を芳香族画分や飽和画分を単独または混合添加して培養したときの分解率を測定した。測定方法は、第一章と同様の方法で行った。また、無機塩培地 5.0 ml にフェナントレン、アントラセン、ピレ

ンをそれぞれ 60 mg/l 単独添加した培地と、0.12 g/l の芳香族画分と共に添加した培地に 7 日間前培養した No.22 群培養液を 500  $\mu$ l 移種し、37  $^{\circ}$ C で振とう培養(125 strokes/min)した。GC 分析の試料は、培養 0, 7, 14, 21 日目の培養液に、内部標準物質として 0.6 g/l の *n*-ヘキサトリアコンタンを 1.0 ml 添加し、*n*-ヘキサン:トルエン/6:4(v:v)15 ml で残存している炭化水素を抽出し、減圧乾固後、抽出溶媒で 5.0 ml にメスアップして調整した。

### 2.3. ガスクロマトグラフィー(GC)分析

飽和および芳香族画分の GC 分析は、第一章の方法に従って行った。アントラセン、フェナントレン、ピレンを分析するときは、カラムオープン温度を初期温度 40 $^{\circ}$ C から 40 $^{\circ}$ C/min で 120 $^{\circ}$ C まで昇温し、続いて 8 $^{\circ}$ C/min で 300 $^{\circ}$ C まで昇温させた。注入口の温度は 300 $^{\circ}$ C、検出器の温度は 320 $^{\circ}$ C に設定した。

### 2.4. No.22 群構成菌の分離

#### 2.4.1. 芳香族画分の乳化

クロロホルムに溶解した芳香族画分を 5 %(v/v)Plysurf A-210G 溶液 (Dai-ichi-Kogyo Seiyaku Co., Ltd., Kyoto, Japan)に添加し、ホモジナイザーで激しく攪拌(10000 rpm, 30 sec)して乳化した。乳化液を濾過した後、80 $^{\circ}$ C に保ってクロロホルムを除去した。得られた溶液は 1 %(w/v)芳香族画分乳化液として、4 $^{\circ}$ C で保存した。

#### 2.4.2. 分離培地と純粋分離

No.22 群培養液からコロニーを分離するために、1 %(w/v)芳香族画分乳化液を芳香族画分が 0.3 %(v/v)となるように添加した無機塩アガロース平板培地を作成した。アガロースは 1.5 %(w/v)アガロース S(Wako)を使用した。No.22 群培養液を生理食塩水で 10 倍段階希釈して平板培地に 50  $\mu$ l 塗抹し、37 $^{\circ}$ C で 7 日以上培養した。そして、形態の異なるコロニーを選抜した。分離したコロニーが均一であることを確認した後、供試株とした。

## 2.5 分離株の同定

分離株は、形態学的、生理・生化学的性状と 16S rRNA 遺伝子の塩基配列から同定した。分離株のうち Y1 と Y4 株は、第 1 章に記述した方法で同定し、Y3 株は一部追加試験を行った。

### 2.5.1. Y3 株の形態学的及び生理・生化学的特徴

Y3 株(*Hyphomicrobium facile*)を供試株として、C1 化合物の資化性を検討した。C1 化合物には、メタノール(CH<sub>3</sub>OH)、メチルアミン塩酸塩(CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>·HCl)、メタンスルホン酸(CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H)を用い、無機塩平板培地に塗布した。そして、芳香族画分添加無機塩平板培地で前培養した Y3 株を植菌し、37 °C で培養後、生育を確認した。また、Api20 や Api50CH キット(Biomerieux, Marcy l'Etoile, France)を用いて生理・生化学的特徴や炭水化物の資化性を検討した。Y3 株の形態学的特徴や運動性は、位相差顕微鏡(Nikon, Tokyo, Japan)と走査型電子顕微鏡(S-900, Hitachi High-Technologies Co. Tokyo, Japan)で観察した。

## 2.6. クローンライブラリー法

No.22 群培養液から抽出した全 DNA から、16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅した。増幅した DNA のベクターへのライゲーション、大腸菌への形質転換は、QIAGEN PCR CLONING KIT(Quiagen Inc., Santa Clarita, CA, USA)を用いて行い、操作はキットに記述されている方法に従った。

クローニングにより得られた組み換え大腸菌コロニーを 50~100 個選抜し、20 µl の S.P.W.を含むエッペンドルフチューブ(1.5 ml)に懸濁し、94°C で 5 min 加熱したものを DGGE 解析に使用する粗 DNA 試料とした。

PCR には Ampli Taq Gold セット(Perkin-Elmer Japan, Applied Biosystems Division, Chiba, Japan)を用い、反応液には、10×Taq Gold Buffer を 1.5 µl、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 1.5 µl、各デオキシヌクレオシド 3 リン酸(各 2.0 mM)を 1.5 µl、各プライマー(各 10 µM)を 0.3 µl、粗 DNA を 0.5 µl、Ampli Taq Gold(5 U/µl)を 0.1µl、そして S.P.W.を 8.9 µl 添加して

全量 15  $\mu$ l の系とした。プライマーセットには、M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') と M13r (5'-AACAGCTATGACCATG-3')を用いた。

サーマルサイクラーには、My Cyclor™ Thermal Cyclor(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いた。サイクル条件は、Pre-run(94°C, 7 min)を行った後、熱変性(94°C, 30 sec)、アニーリング(50°C, 30 sec)、伸長反応(72°C, 1 min)を 30 サイクル行い、最後に Post-run(72°C, 5 min)を行った。

PCR で目的配列が増幅されたことを確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。ゲルは 10.0 g/l アガロース(Agarose S)、バッファーは 0.5×TAE、DNA マーカーには $\lambda$ -EcoT14I digest (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いた。泳動後、Ethidium-bromide にゲルを 10 min 浸漬し、Kodak Gel Logic 200 Imaging System (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて UV を透過し、増幅された DNA バンドを確認した。得られた増幅産物をテンプレートとして、V3 領域を PCR で増幅し DGGE 解析した。そして、22 群の DNA バンドと出現する位置を比較し、各バンドの出現割合を求めた。そして、同じ位置に DNA バンドを示すクローンの配列をシーケンス解析した。選出したクローンは、カナマイシンを含む Luria Bertani (LB)培地で 18 h 培養し、組み換え大腸菌のプラスミドを Fastplasmid Mini Kit(eppendorf AG,hamburg, Germany)を用いて抽出し、挿入配列をシーケンスした。

## 2.7. 定量リアルタイム PCR 解析

No.22 群を構成する Y1 や Y4 株の 16S rDNA のシーケンスと、クローンライブラリーで得られたクローン F 株の挿入配列から、それぞれに特異的なプライマーを設計した(Table 4)<sup>37, 38</sup>。

まず、Y1 と Y4 株のゲノム DNA を抽出し、設計したプライマーが特異的に働いていることを確認するため、得られた全クローンの 16S rRNA 配列と Y3 株のゲノム DNA に対して、リアルタイム定量 PCR を行い、Y1

と Y4 株以外の DNA では、全く増幅されないことを確認した。次に、Y1 と Y4 株のゲノム DNA 濃度を測定し、テンプレート DNA 濃度 10 ng でリアルタイム PCR を行い、添加 DNA 濃度と増幅回数でスタンダードカーブを描いた。また、コロニーを分離できなかったバンド F も、設計したプライマーの特異性を確認した後、Y1 および Y4 株と比較するために、バンド F の 16S rRNA 遺伝子が挿入されたプラスミド DNA をテンプレートとして、PCR で増幅し、増幅産物の濃度と増幅断片の平均分子量から、増幅された断片の数をコピー数として算出した。Y1 と Y4 株についても、同じ方法でコピー数を求めた。そして、コピー数  $10^8$  copys/ng でリアルタイム PCR を行い、添加した 16S rDNA 量と増幅回数でスタンダードカーブを描いた。

**Table 4. Primers used for quantitative real-time PCR in this study.**

| <b>Primer</b> | <b>Sequence (5'-3')</b>    | <b><i>E. coli</i> position</b> |
|---------------|----------------------------|--------------------------------|
| <b>Y1-2F</b>  | <b>ACCTACCCTTGACATGTAC</b> | <b>982-1001</b>                |
| <b>Y1-2R</b>  | <b>CATGCAGCACCTGTGTTA</b>  | <b>1055-1038</b>               |
| <b>Y4-1F</b>  | <b>ACATCGGAACATGTCCTG</b>  | <b>121-138</b>                 |
| <b>Y4-1R</b>  | <b>CCATCGGCCAACCTAT</b>    | <b>238-222</b>                 |
| <b>DF-1F</b>  | <b>CATTGATACTGGCTCGC</b>   | <b>633-650</b>                 |
| <b>DF-1R</b>  | <b>AGTGTTGGTCCAGGAAG</b>   | <b>750-734</b>                 |

飽和および芳香族炭化水素画分を炭素源として培養した No.22 群の培養液から DNA を抽出し、10 ng に調整したものをテンプレートとして定量リアルタイム PCR (LightCycler, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) で測定した。試薬は LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I を使用した。反応液の組成は LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を 2  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> を 2.4  $\mu$ l、10 pmol/ $\mu$ l プライマーを各 1  $\mu$ l、そして distilled water を添加して 18  $\mu$ l とした。最後に DNA を 2  $\mu$ l 添加した。バンド F の時だけ 25 mM MgCl<sub>2</sub> を 3.2  $\mu$ l 添加した。

リアルタイム定量 PCR の条件は、最初 95°C で 10 min 変性させたあと、1 サイクルを 95°C で 15 sec、68°C で 6 sec、72°C で 20 sec の条件で 35 サイクル行った。蛍光強度は、各サイクルの後に測定した。温度 transition は 20°C/sec で、アニーリングは 2°C/sec で行った。PCR 産物が特異的に増幅されていることを確認するために、melting curve を解析した。95°C で変性後、70°C で 15 sec アニーリングし、0.1°C/sec の温度勾配で 95°C まで温度を上げながら、蛍光強度を測定した。

## 2.8. 単離株の芳香族炭化水素分解経路の推定

### 2.8.1 資化性試験

単離株の資化性は、フェナントレン分解経路中間体を唯一の炭素源として添加した無機塩培地で培養して生育を確認した。供試株には Y1 と Y4 株を用い、基質には、カテコール、1H<sub>2</sub>N(2 % [v/v] エタノールに溶解)、サリチル酸、*o*-フタル酸、*cis,cis*-ムコン酸、ゲンチジン酸を 0.1 mM になるように添加した。前培養は、芳香族画分(2 g/l)添加改良 R2A 培地で、37°C で振とう培養(18 h, 125 strokes/min)した。得られた菌体を 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)で 2 回洗浄し、同 buffer で 1.5 ml に懸濁した。本培養は、各基質を添加した無機塩培地に、100  $\mu$ l 植菌し 37 °C で振とう培養(24 h, 125 strokes/min)して生育を観察した。

### 2.8.2. HPLC による代謝産物の測定

供試株と基質の調製、前培養は資化性試験(2.8.1)に従った。本培養は、Yeast extract(0.5 g/l)を加えた無機塩培地に各基質を分注した後、Y1 と Y4 株を 100  $\mu$ l 植菌し、37°C で 0, 1, 2 日間振とう培養(125 strokes/min)した。まず、酢酸エチル 5 ml で培養液を抽出し、次いで、1 N HCl で培養液を pH 2.0 に調整した後、再度酢酸エチルで抽出し、減圧乾固した。これをメタノール 5 ml に溶解し、HPLC サンプルとした<sup>39)</sup>。

HPLC 分析には逆相 C18 カラム(COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II、Nakarai Tesque Inc., Kyoto, Japan)を用いた。移動相には 0.2 % (v/v) 酢酸水とメタノールを用い、40 min でメタノール量が 10 % から 90 % (v/v) になるよう

にグラジエントをかけ、その後 10 min 間メタノール 100 %(v/v)で流した。さらに 10 min 間でメタノールが 10 %(v/v)になるようにグラジエントをかけた。流速は 1.0 ml/min、溶出物は UV 254 nm で検出した。HPLC は、株式会社日立ハイテクノロジーズの Elite La Chrom を用いた。

### 2.8.3. 酸素消費量の測定

供試株と前培養は資化性試験(2.8.1)に従った。基質はカテコールと 1H<sub>2</sub>N を用いた。酸素消費量は Hansatech Oxygraph(Kyokko Trading co.,ltd, Tokyo, Japan)を用いて測定した。本培養は、芳香族画分(4.0 g/l)添加改良 R2A 培地を振とう培養フラスコ 4 本に 50 ml 添加し、前培養した供試株懸濁液を 1.0 ml 植菌した後、37°Cで振とう培養(8 h, 125 strokes/min)した。対数増殖後期の培養液 50 ml を集菌(3000 rpm, 15 min)し、50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)で 2 回洗浄した後、3 ml の Buffer で懸濁した。この懸濁液の OD<sub>610</sub>を測定した後、飢餓培養(2 h、37°C)を行った。菌懸濁液 1.5 ml を反応容器に加え、35°Cでプレインキュベートして溶存酸素濃度が安定していることを確認した。これに 10 mM の基質を 15 µl 添加して、酸素消費量を記録した。

### 2.8.4. 粗酵素活性の測定

Y1 と Y4 株の分解酵素活性は、生成物の色調の変化や、基質の減少、補酵素の増減を吸光度で測定した。菌体は、芳香族画分添加無機塩培地で培養、集菌洗浄して PBS 緩衝液に懸濁した。粗酵素溶液は、菌体懸濁液を超音波処理(4°C, 1 min, 5 cycles 20 kHz)し、遠心分離(15000 rpm, 4°C, 30 min)して上清を回収した。

各分解酵素は、粗酵素溶液 2.9 ml に各基質を 0.1 ml 添加し、37°Cで 30 min 反応させた後、反応液の吸光度を測定して酵素活性の有無を確認した。測定した酵素と基質、測定波長を Table 5 にまとめた<sup>40~47</sup>。

Naphthalene dioxygenase と Catechol 2,3-dioxygenase は、基質を添加した平板培地で培養して、コロニー周辺の色調の変化を観察した。Naphthalene dioxygenase は、1 mM のインドールを添加した 1.0 g/l Yeast extract 添加無機塩平板培地で培養した。インドールが

Naphthalene dioxygenase により 2,3-Dihydro-1H-indole-2,3-diol に変換され、その後自然酸化されて青色を呈するか観察した。Catechol 2,3-dioxygenase は、インドールの代わりにカテコールを添加して、生成物の 2-hydroxymuconic-semialdehyde に由来する黄色を観察した<sup>48)</sup>。

**Table 5. Determination of enzyme activity in the catabolic pathway.**

| enzyme                              | wave length | substrate                     |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------------|
| 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase  | 300nm       | 1-hydroxy-2-naphthoic acid    |
| 1-hydroxy-2-naphthoate hydroxylase  | 340nm       | NADH *                        |
| salicylate hydroxylase              | 340nm       | NADH *                        |
| 2-carboxybenzaldehyde dehydrogenase | 340nm       | NADH *                        |
| catechol 1,2-dioxygenase            | 260nm       | <i>cis,cis</i> -muconic acid  |
| catechol 2,3-dioxygenase            | 375nm       | 2-hydroxymuconic-semialdehyde |
| gentisate 1,2-dioxygenase           | 334nm       | maleyl pyruvate               |

\* : nicotinamide adenine dinucleotide

## 2.9. 菌体膜の疎水性試験

菌体の膜疎水性(親油性)は、Rosenberg ら<sup>49)</sup>の方法を参考に測定した。菌体は SCD 培地(日本製薬株式会社, 東京)で培養し、対数増殖初期に集菌したものを使用した。菌体は生理食塩水で洗浄し、OD<sub>610</sub> を 0.3 に調整した。菌懸濁液は 3.0 ml ずつ試験管に分注し、*n*-octane(C<sub>8</sub>)、*n*-hexadecane(C<sub>16</sub>)、xylene をそれぞれ 0.01~0.5 ml 添加し、2 min 攪拌した。その後、15 min 以上静置し、水層の吸光度(A<sub>400</sub>)を測定して、攪拌前の濁度と比較した。濁度の減少度は、(攪拌後の菌液の A<sub>400</sub>/最初の菌液の A<sub>400</sub>) × 100 の数式で求め、百分率で表示した。



### 3. 実験結果および考察

#### 3.1. 芳香族炭化水素生分解能の高い菌群の選出

20 回継代培養した集積培養液から、菌の生育が良好で芳香族画分の分散が認められた No.22 群集積培養液を選出した。No.22 群は集積培地で継代培養を続けた結果、7 日間で芳香族画分分解率 30 %と安定した分解率を示した(Fig.11)。添加した芳香族画分は管壁から剥がれ落ち、培養液中に乳化・分散していた (Fig. 12)。

No.22 群は、第一章で確立した K-3 群による分解が難しかった芳香族画分を、唯一のエネルギーおよび炭素源として良好に生育し高い分解能を示した。重油中の芳香族画分を安定して分解できる群集を確立した報告は、これまでにない。また、Sugiura ら<sup>25)</sup>や、Vinas ら<sup>26)</sup>が報告した重油を炭素源とした集積培地で確立した群集の芳香族画分の分解率は、20 %に満たないことと比較しても、培養 7 日間で芳香族画分を 30 %分解できる No.22 群が、高い分解能を有していることは明らかである。

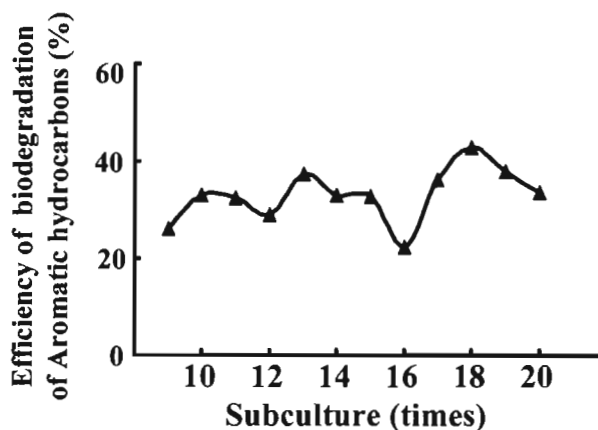


Fig. 11. Degradation of saturated and aromatic hydrocarbons by the No.22 consortium subcultured in the enrichment medium supplemented with aromatics (4.0 g/l). ▲, degradation of aromatic hydrocarbon.

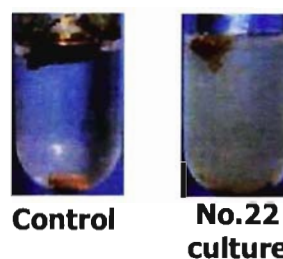


Fig. 12. Growth of the No.22 consortium in a medium with crude petroleum.

### 3.2. PCR-DGGE 法による No.22 群の群集構造解析

No.22 群を DGGE 解析した結果、14 本の DNA バンド(A~N)を検出した(Fig. 13-a)。No.22 群は、K-3 群(DNA バンド 5 本)よりも多くの菌種で構成されていた。得られた DNA バンド約 200 bp の塩基配列を解析した結果、*Alpha* や *Gammaproteobacteria* の他に、K-3 群では検出されなかった *Betaproteobacteria* が多く検出された(Table 6)。炭素源を重油から芳香族画分に変えて集積培養すると、同じサンプリング地点から異なる微生物群集を得ることができた。

確立した No.22 群を 1 ヶ月間  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存後、芳香族画分添加培地に復元して継代培養を 5 回繰り返しても、生育は良好であった。しかし、その培養液を DGGE 解析すると DNA バンド数が保存前より減少していた(Fig. 13-b)。凍結に弱い微生物が群集中に存在すると考えられる。現在、No.22 群は、7 日間隔で継代培養して維持し、180 代目を越している。継代 180 回目の培養液を DGGE 解析しても DNA バンドは保持されていた。

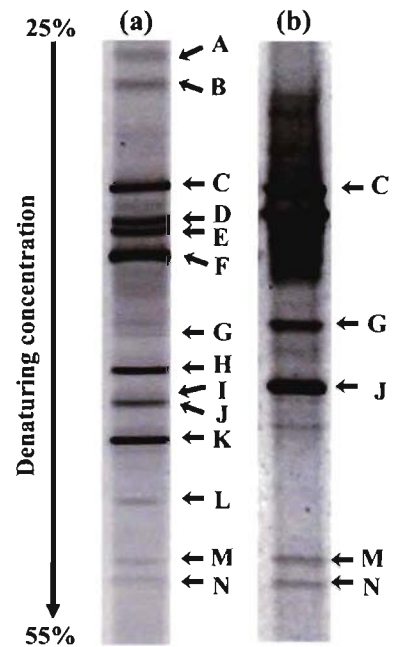


Fig. 13. DGGE of 16S rRNA gene bands obtained from the No.22 consortium subculture (a) and recovered culture (b).

**Table 6. 16S rRNA gene sequences of the major DNA bands detected by PCR-DGGE.**

| band | Phylogenetic group         | Closest sequence (Accession No.)                     | Homology (%) |
|------|----------------------------|--|--------------|
| A    | <i>Betaproteobacteria</i>  | <i>Burkholderia</i> sp. (X87275)                     | 97           |
| B    | <i>Betaproteobacteria</i>  | <i>Burkholderia pyrrocinia</i> RG6-5 (AY949201)      | 99           |
| C    | <i>Betaproteobacteria</i>  | <i>Burkholderia</i> sp. MGK2 (AY995179)              | 100          |
| D    | <i>Betaproteobacteria</i>  | <i>Pandoraea</i> sp. HPC336 (AY999021)               | 100          |
| E    | <i>Betaproteobacteria</i>  | <i>Burkholderia multivorans</i> LMG 14293 (AF097531) | 100          |
| F    | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Gammaproteobacterium</i> (AY144261)    | 95           |
| G    | <i>Alphaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Alphaproteobacterium</i> (AY144193)    | 100          |
| H    | <i>Betaproteobacteria</i>  | Bacterium BA128 (AF364862)                           | 93           |
| I    | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Hyphomicrobium facile</i> ATCC 27489 (Y14311)     | 100          |
| J    | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Frateuria aurantia</i> IFO3245 (AJ010481)         | 98           |
| K    | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured bacterium (AY096170)                      | 96           |
| L    | <i>Alphaproteobacteria</i> | Uncultured bacterium (AJ876453)                      | 98           |
| M    | <i>Alphaproteobacteria</i> | Uncultured bacterium (AY678241)                      | 99           |
| N    | <i>Alphaproteobacteria</i> | Uncultured bacterium (AF523875)                      | 99           |

### 3.3. No.22 群培養液からのコロニーの単離

No.22 群培養液を芳香族画分添加無機塩アガロース平板培地に塗抹し、形態の異なるコロニー3個を選抜した(Fig. 14)。Y1 株は平板培地上で黒色コロニーを形成し、Y3 株は白色、Y4 株は無色のコロニーを形成した。平板培地の組成を変えてコロニーの単離を試みたが、3 株以外に新たな菌株を得ることはできなかった。



**Fig. 14.** Three strains isolated from the No.22 consortium.

### 3.4. No.22 群から分離した菌株の同定

3 株はいずれもグラム陰性で運動性を有する桿菌であった。供試した 3 株は、いずれもオキシダーゼとアルギニンジヒドラーゼ、ゼラチナーゼ活性が陽性で、アセトインを産生した。 $\beta$ -galactosidase は Y4 株にのみ認められた。Y1 株は D-Amygdalin から酸を生成したが、Y4 株は生成しなかった。さらに Y4 株は、Glucose や D-Mannitol から酸を生成した。Y3 株は、供試したいずれの糖からも酸を産生しなかった (Table 7)。

Table 7. Morphological and physiological characteristics of isolated strains from the No.22 consortium.

|   | Y1       | Y3       | Y4       |
|---|----------|----------|----------|
| <b>Oxidase</b>                          | +        | +        | +        |
| <b><math>\beta</math>-galactosidase</b> | -        | -        | +        |
| <b>Arginine dihydrolase</b>             | +        | +        | +        |
| <b>Lysine decarboxylase</b>             | -        | -        | -        |
| <b>Ornithine decarboxylase</b>          | -        | -        | -        |
| <b>Urease</b>                           | -        | -        | -        |
| <b>Tryptophan deaminase</b>             | -        | -        | -        |
| <b>Gelatinase</b>                       | +        | +        | +        |
| <b>Utility of citric acid</b>           | +        | -        | +        |
| <b>Production of H<sub>2</sub>S</b>     | -        | -        | -        |
| <b>Production of indole</b>             | -        | -        | -        |
| <b>Production of acetoin</b>            | +        | +        | +        |
| <b>Acid production from sugar</b>       |          |          |          |
| <b>Glucose</b>                          | -        | -        | +        |
| <b>D-Mannitol</b>                       | -        | -        | +        |
| <b>Inositol</b>                         | -        | -        | -        |
| <b>D-Sorbitol</b>                       | -        | -        | -        |
| <b>L-Rhamnose</b>                       | -        | -        | -        |
| <b>Saccharose</b>                       | -        | -        | -        |
| <b>D-Melibiose</b>                      | -        | -        | -        |
| <b>D-Amygdalin</b>                      | +        | -        | -        |
| <b>L-Arabinose</b>                      | -        | -        | -        |
| <b>Methanol</b>                         | -        | +        | -        |
| <b>OF test</b>                          | <b>O</b> | <b>-</b> | <b>O</b> |

芳香族画分添加無機塩アガロース平板培地で培養した単離株 (Y1, Y3, Y4) から DNA を抽出し、DGGE 解析を行って No.22 群の結果と比較した。Y1 株のバンドは No.22 群の DNA バンド D (*Pandoraea* sp. と同定) と同じ位置に出現した。Y3 株は DNA バンド I と、Y4 株は 4 本の DNA バンドが出現したが、いずれも No.22 群の DNA バンド A, B, C, E と同じ位置で *Burkholderia* の DNA バンドと一致した。

Y1 と Y4 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析して Blast 検索した。決定した塩基配列は、DDBJ に登録した (Y1 株, Accession number AB222022; Y4 株, AB222021)。Blast 検索した結果、Y1 株は *Pandoraea* sp. G5056 (AF247692) と 99.9 %、Y4 株は *Burkholderia multivorans*

BMU18703 (Y18703)と 99.9%の高い相同値を示し、同じクラスターを形成した(Fig. 13, 15)。そこで、Y1株は *Pandoraea* sp.、Y4株は *Burkholderia multivorans* と同定した。*Burkholderia* 属は 2000年に *Pseudomonas* 属から独立した新属<sup>50)</sup>、*Pandoraea* 属は *Burkholderia* 属から 2002年に独立した新属である<sup>51)</sup>。

Y3株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、DDBJ に Accession No. AB222020 として登録した。BLAST 検索した結果、Y3株は *Hyphomicrobium facile* ATCC27489 (Accession No. Y14311)と最も高い 99.2%の相同率を示し、同じクラスターを形成した(Fig. 15)。

Y3株は、桿状菌体から糸状性の菌糸のような器官が発芽して伸長し、その先に娘細胞を形成する特徴的な形態を有することと運動性が観察された(Fig. 16)。これらの形態学的特徴は *Hyphomicrobium* 属<sup>52)</sup>の特徴と一致していた。

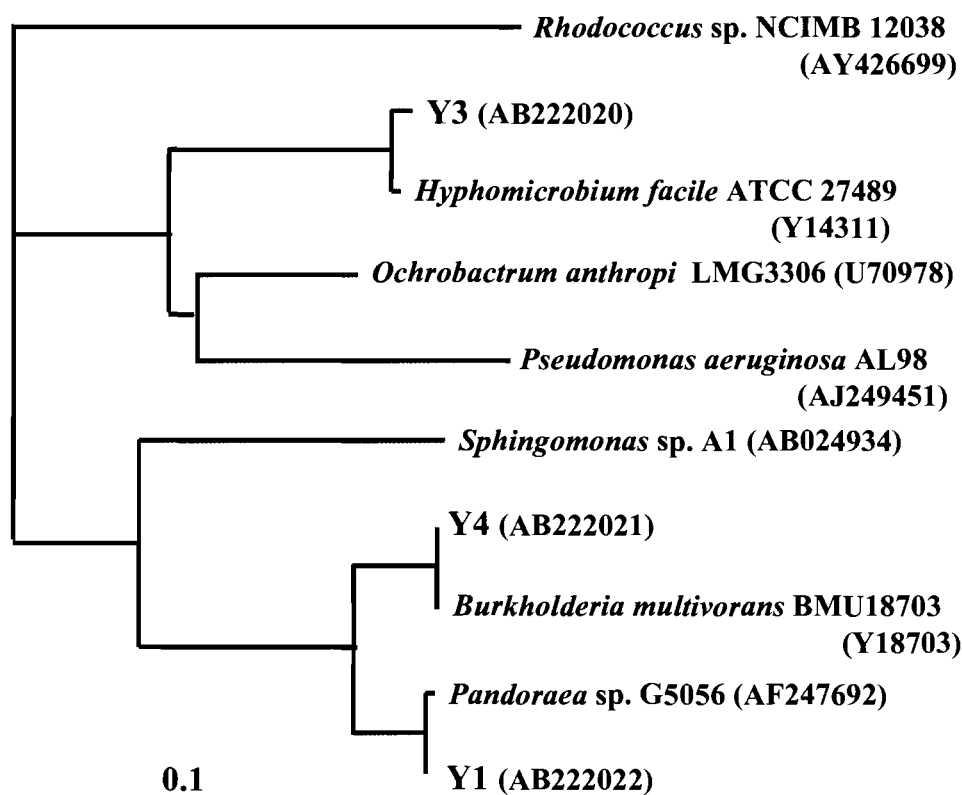


Fig. 15. Physiological tree of isolated strains from the No.22 consortium.

Api50CH キットを用いて炭水化物の資化性試験を行ったところ、49 種類いずれの炭水化物も酸化や資化をしなかった。*Hyphomicrobium* 属は、メタノールなどの C1 化合物を資化して、生育する特性が報告されている<sup>52)</sup>ことから、メタノール(CH<sub>3</sub>OH)、メチルアミン塩酸塩(CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>·HCl)、メタンスルホン酸(CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H)を唯一の炭素源とする培地で培養した。メタンスルホン酸は、工場や火力発電所などで燃料を燃やしたとき排出される飛灰中に存在し、産業廃棄物でもある。*Hyphomicrobium* 属は、メタンスルホン酸処理に利用できる微生物として、Ghisalba ら<sup>53)</sup>により報告された。また、メタンスルホン酸の大気中濃度が生物活動の指標とされているため、メタンスルホン酸資化性細菌として *Hyphomicrobium* 属や *Methylobacterium* 属細菌が、De Marco ら<sup>54)</sup>により分離されている。

Y3 株はメタノールを塗布した無機塩平板培地でコロニーを形成したが、メタンスルホン酸やメチルアミン塩酸塩では生育が認められなかった。また、エタノールでも生育を確認することはできなかった。これらの形態学および生理学的性状と C1 化合物を資化できることは、Bergey's Manual<sup>51)</sup>に記載されている *Hyphomicrobium facile* ATCC27489 株の性状とほぼ一致していた。また、16S rRNA 遺伝子塩基配列の結果とあわせて、Y3 株を *Hyphomicrobium facile* と同定した。



**Fig.16.** The cell of *H. facile* Y3 observed by scanning electron microscope. Scale bar, 2  $\mu$ l.

### 3.5. No.22 群による芳香族炭化水素の生分解

No.22 群は重油中の芳香族画分を効率的に分解した。重油中の芳香族炭化水素混合物以外に、フェナントレンやアントラセン、ピレンなど単一種の芳香族炭化水素を分解できるか実験した。

芳香族画分を炭素源とした継代培養液と比べると、単一種の芳香族炭化水素添加培地における No.22 群の生育は弱かった。また、培養 21 日後に残存している芳香族炭化水素を GC 分析したところ、添加した芳香族

炭化水素のピークは r .t. 10~17 min に残存し、ピーク面積もコントロールとほぼ同じだった(Fig. 17)。このことから、No.22 群は単一種の供試芳香族炭化水素をほとんど分解できず、菌群の生育も弱いことを見出した。

そこでこれらの培地に芳香族画分を少量(0.12 g/l)添加して培養すると、供試した芳香族炭化水素のピークが減少し、分解率もフェナントレンは 7 日間で 100 %(60 mg/l)、アントラセンは 14 日間で 90 %(53 mg/l)、ピレンも 14 日間で 50 %(30 mg/l)と高い値を示した(Fig. 17)。

*Pseudomonas saccharophila* P15 は、サリチル酸を含む培地で前培養すると、フェナントレン分解酵素のジオキシゲナーゼが誘導生産されると報告されている<sup>29)</sup>。No.22 群も、芳香族画分の添加により供試した芳香族炭化水素を分解する酵素系が誘導生産された可能性が示唆された。また GC 分析の結果から、3 種類の芳香族炭化水素のピークは培養と共に減少し、新たなピーク(代謝副産物)は出現しなかったことから、No.22 群は供

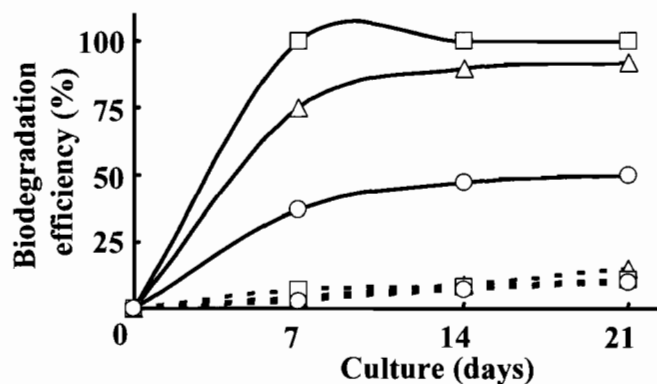


Fig. 17. Degradation of phenanthrene (○), anthracene (△), and pyrene (□), in the enrichment medium supplemented with aromatic hydrocarbon fractions (120 mg/l) by the No.22 consortium. Solid lines showed the culture with aromatic hydrocarbon fractions, and dashed lines showed the culture without aromatic hydrocarbon fractions.

試した 3 種類の芳香族炭化水素を完全分解していると考えた。

また、*Burkholderia cepacia* 2A-12 がフェナントレンを分解するとき、Yeast extract のような補助基質を添加すると、分解活性が 3 倍に高まると報告されている<sup>28)</sup>。そこで No.22 群でも補助基質の添加が芳香族炭化水素の分解に与える効果を検討した。60 mg/l のフェナントレンと共に芳香族画分(40, 120 mg/l)あるいは飽和画分(120 mg/l)、Yeast extract(0.5 g/l)を補助基質として無機塩培地に添加した。その結果、フェナントレン分解率はどの補助基質を添加しても上昇した。また、芳香族画分では濃度依存性が認められ、40 mg/ml では分解速度が低下した。

### 3.6. No.22 群による飽和画分と芳香族画分の分解

芳香族画分添加培地で継代培養した No.22 群の芳香族画分分解率を経時的に測定したところ、培養 7 日目で 26 %、14 日目以降で約 66 % (2.6 g/l) の安定した分解率を示し (Fig. 18)、GC 分析でも均一にピークが減少し、特に r .t.10~20 min 付近のピークが大きく減少していた (Fig. 19)。また、飽和画分と芳香族画分を共に添加した培地で培養しても、7 日間で芳香族

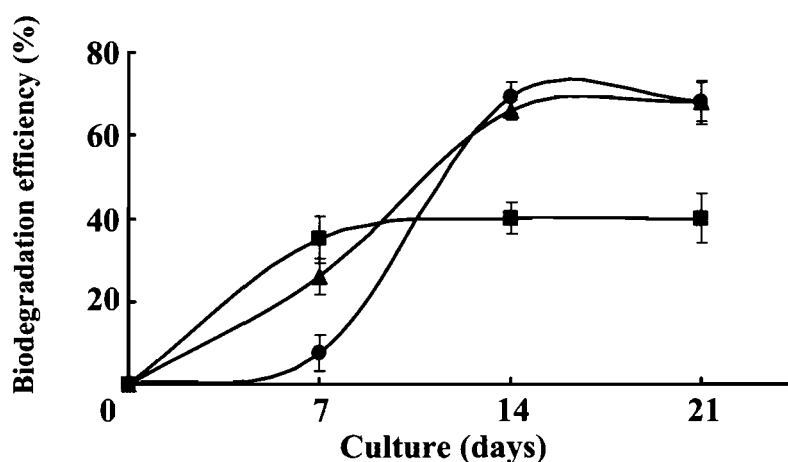


Fig. 18. Degradation of saturated and aromatic hydrocarbons by the No.22 consortium.

●, degradation of saturated hydrocarbon in the enrichment medium supplemented with saturates (4 g/l); ▲, degradation of aromatic hydrocarbon in the medium with aromatics (4 g/l); ■, degradation of aromatic hydrocarbon in the medium with aromatics and saturates. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

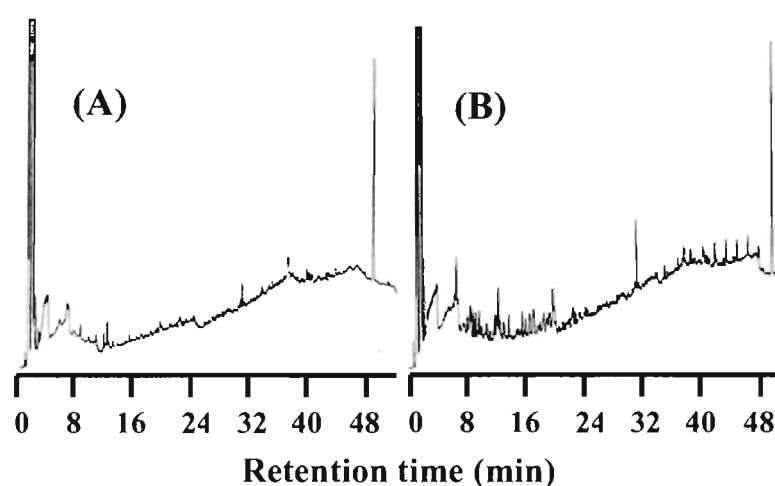


画分を 35 % (1.4 g/l) 分解した。一方、芳香族画分で継代培養した No.22 群を飽和画分添加培地に移植したところ、7 日目で 7 % (0.28 g/l) しか飽和画分を分解できなかった。しかし、14 日目には 69 % (2.76 g/l) まで分解率が上昇した (Fig. 18)。

このように、芳香族画分添加培地で継代培養していた No.22 群を飽和画分添加培地に移植すると、飽和画分分解率に lag time が現れたのは、炭素源の変化に対応して、優勢種も変化したという仮説を立てた。

優勢種の変化によって発酵や分解過程が進行する現象は、伝統的な発酵食品の製造や、コンポストの発酵段階で起っていることがよく知られている<sup>1, 2)</sup>。たとえば、Pedro ら<sup>2, 55)</sup>は、コンポスト化過程に注目し、温度や pH、水分含量の変化によりコンポスト中の優勢種が変化することを PCR-DGGE 法とリアルタイム PCR 法で明らかにしている。

No.22 群も炭素源の種類が変わると優勢種を変化させて新たな炭素源を分解している。すなわち No.22 群は、群集構成菌の構成比率を変えて周囲の環境変化に対応し、群集として機能的に働いていると予想した。



**Fig. 19.** GC analysis of extracts from the culture solutions of the No.22 consortium. The No.22 consortium was cultured in media supplemented with the aromatic hydrocarbon fraction (A) after seven days. GC analysis of the extracts from the medium with the aromatic hydrocarbon fractions (B).

### 3.7. 飽和画分や芳香族画分で培養したときの菌叢変化

#### 3.7.1. PCR-DGGE 解析

芳香族画分で継代培養した培養液と、継代培養液から飽和画分あるいは芳香族画分、さらに飽和画分と芳香族画分を共に添加した培地に移植し、21日間培養しながら経時的に培養液をサンプリングして DGGE 解析した。

炭素源を変えると DNA バンドの出現や消失が認められ DNA バンドパターンが変化した (Fig. 20)。飽和画分や混合培地で培養すると、バンド A、B、C、E、J や N は、明るさが増し強く検出された。一方、バンド D、F、H、K と M は、薄くなった。これは、飽和画分を分解できる微生物が優勢になったことを示しており、前述の飽和画分分解率の急激な上昇を支持している。

また、飽和画分添加培地で継代培養したとき消失した DNA バンドも、再び芳香族画分添加培地で培養すると、バンドが出現してきたことから、炭素源の変化に伴って優勢種が変化しても、構成菌種は保持されていることを明らかにした。この結果から、No.22 群は飽和炭化水素から芳香族炭化水素まで広い分解スペクトルを有していることを明らかにした。

#### 3.7.2. クローンライブラリー解析

No.22 群を異なる炭素源で培養すると、DNA バンドパターンが変化するを PCR-DGGE 解析で明らかにした。この結果は、菌叢の変化を定性的に示しているが、優勢種の定量的な変化を示すことはできない。そこで、飽和画分や芳香族画分を炭素源とする培地で培養したときの No.22 群の優勢種を定量的に示すために、クローンライブラリー解析を行った。

解析には 3 種類の培養液を用いた。芳香族画分に継代培養した培養液、そこから飽和画分に移植した培養液、この培養液を再び芳香族画分に移植した培養液である。継代培養液からは 76 個、飽和画分培養液からは 42 個、芳香族画分培養液から 70 個のクローンを獲得し、これらの 16S rRNA 遺伝子を DGGE 解析して No.22 群の DNA バンドに帰属した。

### 3.7. 飽和画分や芳香族画分で培養したときの菌叢変化

#### 3.7.1. PCR-DGGE 解析

芳香族画分で継代培養した培養液と、継代培養液から飽和画分あるいは芳香族画分、さらに飽和画分と芳香族画分を共に添加した培地に移植し、21日間培養しながら経時的に培養液をサンプリングして DGGE 解析した。

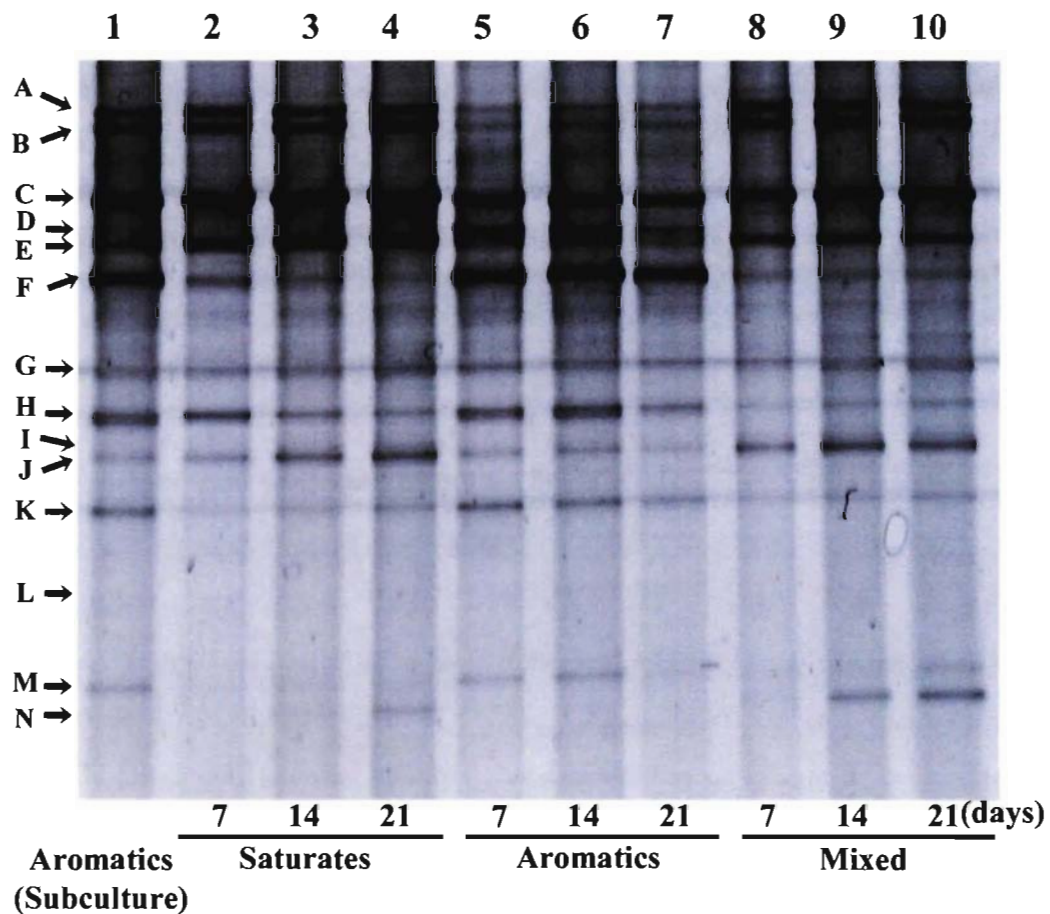
炭素源を変えると DNA バンドの出現や消失が認められ DNA バンドパターンが変化した (Fig. 20)。飽和画分や混合培地で培養すると、バンド A、B、C、E、J や N は、明るさが増し強く検出された。一方、バンド D、F、H、K と M は、薄くなった。これは、飽和画分を分解できる微生物が優勢になったことを示しており、前述の飽和画分分解率の急激な上昇を支持している。

また、飽和画分添加培地で継代培養したとき消失した DNA バンドも、再び芳香族画分添加培地で培養すると、バンドが出現してきたことから、炭素源の変化に伴って優勢種が変化しても、構成菌種は保持されていることを明らかにした。この結果から、No.22 群は飽和炭化水素から芳香族炭化水素まで広い分解スペクトルを有していることを明らかにした。

#### 3.7.2. クローンライブラリー解析

No.22 群を異なる炭素源で培養すると、DNA バンドパターンが変化することを PCR-DGGE 解析で明らかにした。この結果は、菌叢の変化を定性的に示しているが、優勢種の定量的な変化を示すことはできない。そこで、飽和画分や芳香族画分を炭素源とする培地で培養したときの No.22 群の優勢種を定量的に示すために、クローンライブラリー解析を行った。

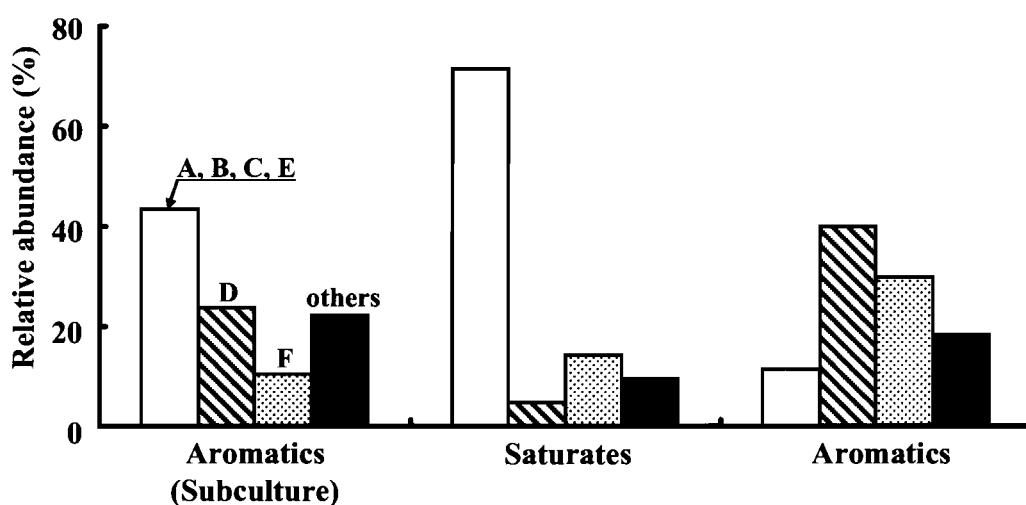
解析には 3 種類の培養液を用いた。芳香族画分に継代培養した培養液、そこから飽和画分に移植した培養液、この培養液を再び芳香族画分に移植した培養液である。継代培養液からは 76 個、飽和画分培養液からは 42 個、芳香族画分培養液から 70 個のクローンを獲得し、これらの 16S rRNA 遺伝子を DGGE 解析して No.22 群の DNA バンドに帰属した。



**Fig. 20.** DGGE patterns of consortium No.22 in the saturated culture (lane 2-4), the aromatic culture (lane 5-7), or a mixed culture containing both hydrocarbons (lane 8-10). Lane 1 was the subculture on the aromatics as the seed culture. Lanes 2 to 4, 5 to 7, and 8 to 10 were the subculture on the same medium at seven day intervals.

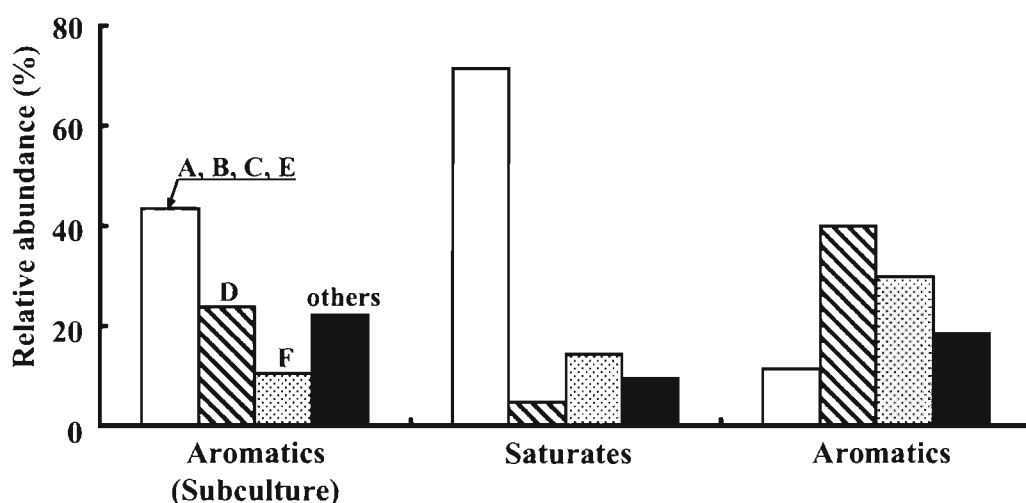
まず、継代培養液をクローン解析すると、*Burkholderia* 属が 42 %、*Pandoraea* 属が 24 %、DGGE バンド F のクローンが 11 % を占め、これら 3 株が優勢種であった。継代培養液を飽和画分で培養すると、*Burkholderia* 属は 42 % から 72 % に増加したが、*Pandoraea* 属は 24 % から 5 % に減少した。そして、再び芳香族画分で培養すると、*Pandoraea* 属の割合が 40 % に増加した (Fig. 21)。

これらの結果から、No.22 群を飽和画分で培養すると、*Burkholderia* 属が優勢種となり、飽和画分の分解に *Burkholderia* 属が積極的に関与していることが示唆された。また、芳香族画分の分解には *Burkholderia* 属の他に *Pandora* 属も一定の割合で存在し、さらに最後の芳香族画分培地で 30 %まで増加した DNA バンド F に帰属できる微生物も分解に関与していると考えられた。バンド F に帰属した構成菌は、今回行った方法ではコロニーを形成しなかったため、得られたクローンの挿入配列を解析した。近縁種を Blast 検索すると、*Brachymonas petroleovorans* CHX<sup>56)</sup> (AY275432) と最も高い 92 %の相同値を示したことから、バンド F は *Brachymonas* sp. F と仮同定した。



**Fig. 21.** Community profiles of the clone libraries composed by the DNA bands of DGGE in the subculture on aromatics (seed culture), the saturated culture, and the aromatic culture. The consortium was cultured for 7 days on each medium. The numbers of total clones in the library from the aromatics, the saturated, and the aromatic culture were 76, 42, and 70 clones, respectively. White bar, *Burkholderia* sp.; Striped bar, *Pandora* sp.; Dotted bar, *Brachymonas* sp. F; Black bar, others bands. Relative abundance was calculated by the following equation. Relative abundance (%) = {(number of categorized clones)/(total number of selected clones)} x 100.

これらの結果から、No.22 群を飽和画分で培養すると、*Burkholderia* 属が優勢種となり、飽和画分の分解に *Burkholderia* 属が積極的に関与していることが示唆された。また、芳香族画分の分解には *Burkholderia* 属の他に *Pandora* 属も一定の割合で存在し、さらに最後の芳香族画分培地で 30 %まで増加した DNA バンド F に帰属できる微生物も分解に関与していると考えられた。バンド F に帰属した構成菌は、今回行った方法ではコロニーを形成しなかったため、得られたクローンの挿入配列を解析した。近縁種を Blast 検索すると、*Brachymonas petroleovorans* CHX<sup>56)</sup> (AY275432) と最も高い 92 %の相同値を示したことから、バンド F は *Brachymonas* sp. F と仮同定した。



**Fig. 21.** Community profiles of the clone libraries composed by the DNA bands of DGGE in the subculture on aromatics (seed culture), the saturated culture, and the aromatic culture. The consortium was cultured for 7 days on each medium. The numbers of total clones in the library from the aromatics, the saturated, and the aromatic culture were 76, 42, and 70 clones, respectively. White bar, *Burkholderia* sp.; Striped bar, *Pandora* sp.; Dotted bar, *Brachymonas* sp. F; Black bar, others bands. Relative abundance was calculated by the following equation. Relative abundance (%) = {(number of categorized clones)/(total number of selected clones)} x 100.

以上の結果から、クローンライブラリー解析により、飽和画分で *Burkholderia* 属が、芳香族画分では *Burkholderia* 属の他に *Pandoraea* 属と *Brachymonas* 属が優勢種となっていることを明らかにした。

### 3.7.3. 定量リアルタイム PCR 解析

クローンライブラリー解析では、クローン数が多い株からは正確な数値を求めることができるが、クローン数が少ない株では、選出したクローンによって数値が大きく変動する欠点がある。一方、定量リアルタイム PCR では、これらをより正確に測定することができるので、クローンライブラリー解析で優勢種として名前があがってきた *B. multivorans* Y4 と *Pandoraea* sp. Y1、*Brachymonas* sp. F に特異的なプライマーを設計して、リアルタイム PCR で群集内での構成割合を求めた。

まず、Y1 と Y4 株はコロニーとして単離することができたので、ゲノム DNA を抽出して、2 株の DNA が No.22 群の全 DNA に占める割合を求めた。その結果、Y4 株は飽和画分と芳香族画分で、それぞれ 68 % と 30 % と高い割合を占めていた。一方、Y1 株はそれぞれ 0.07 % と 3 % と低い割合だった (Fig. 22-a)。特に、飽和画分を炭素源として培養したとき 0.07 % まで構成比率が低下した。群集に占める Y1 と Y4 株の割合は、クローンライブラリー解析の結果と異なっていたが、飽和画分で Y4 株が増え、Y1 株が減少したのは、クローンライブラリーの結果と一致していた。

次に、コロニーを形成しなかった *Brachymonas* sp. F が飽和画分と芳香族画分で培養した群集内で、どのように変動したかを明らかにするため、まず挿入配列の 16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅し、得られた PCR 産物の濃度から、増幅されたコピー数を求めた。次に、テンプレートとして試料に添加したコピー数と増幅回数との関係をリアルタイム PCR で求めた。同様の操作を Y1 と Y4 株でも行って、群集中の DNA 量をコピー数に換算して、3 株の変動を比較した。

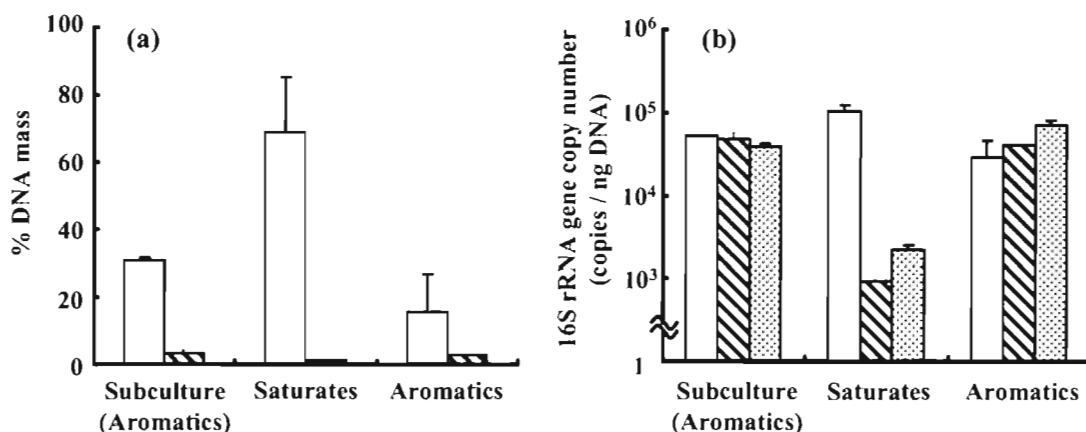


Fig. 22. The quantitative analysis of *B. multivorans* Y4 (white bar), *Pandoraea* sp. Y1 (striped bar), and *Brachymonas* sp. F (dotted bar) in the No.22 consortium based on DNA mass (a) and the 16S rRNA gene copy number (b) using the quantitative real-time PCR. Two separate trials were conducted for the analysis of each other. Results are expressed as the mean  $\pm$ SD ( $n=3$ ).

その結果、芳香族画分から飽和画分で培養した *Brachymonas* sp. F のコピー数は、 $10^5$  から  $10^3$  copies/ng に大きく減少したが、再び芳香族画分で培養すると  $10^5$  copies/ng まで増加した。この変動パターンは、Y1 株と同じであった(Fig. 22-b)。

以上の結果から、Y4 株は No.22 群を飽和画分で培養したとき優勢種 (68 %)となることを定量リアルタイム PCR でも確認することができた。一方、芳香族画分で培養した No.22 群では、Y1 と Y4 株が群集の 3 %と 30 %を占めていた。2 株を合わせても 33 %にしかならないことから、芳香族画分培養液には F 株のようにコロニーとして分離できない他の菌株が優勢種として存在する可能性も考えられる。また、Y1 株と *Brachymonas* sp. F は、芳香族画分で培養した群集で構成比が高まることから、芳香族炭化水素の分解に関与していることが示唆され、クローンライブラリーや DGGE 解析の結果を支持していた。



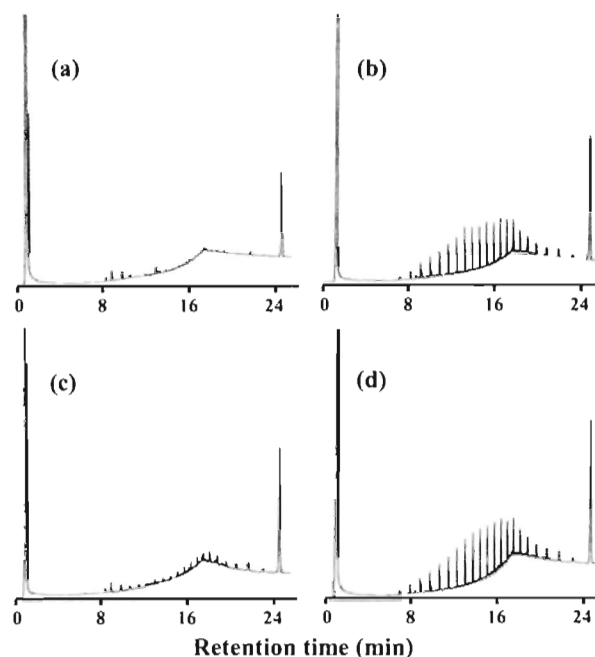
### 3.8. 単離株による飽和炭化水素の分解

飽和画分を炭素源とする培地で No.22 群を培養すると、Y1 と Y4 株の構成比が大きく変動し、Y1 株は減少し、Y4 株は増加した。この理由の 1 つに、飽和画分の分解能力の違いがあると考え、Y1 と Y4 株の飽和画分分解能を比較した。

Y1 株と Y4 株は飽和画分を炭素源とする培地で培養し、残存した飽和画分を抽出して GC 分析した。その結果、Y1 株では飽和炭化水素のピークがほとんど減少しなかったのに対して、Y4 株と No.22 群ではピークが大きく減少した(Fig. 23)。

また、飽和画分の構成成分の 1 つであるエイコサン(C<sub>20</sub>)を用いて分解試験を行った結果、Y4 株は分解したが Y1 株は分解しなかった(Fig. 24)。補助基質として Yeast extract を培地に添加しても、Y1 株の分解率は増加しなかった。

これらの結果から、Y1 と Y4 株の飽和炭化水素に対する分解能に顕著な違いが認められた。Y1 株は飽和画分分解能が低いために、飽和画分培地では構成比を低下させ、逆に、Y4 株は高い分解能をもっているため、構成比を高めたと考えられた。



**Fig. 23.** GC analysis of extracts from the culture solutions of consortium No.22 (a), strain Y1 (b), and strain Y4 (c), and the control (d). The consortium and the isolates were cultured in medium supplemented with the saturated hydrocarbon fraction for six days. GC conditions were described previously<sup>12)</sup>. Hexatriacontane was used as an internal standard (retention time 24 min). The medium was used as the control.

### 3.9. Y1 株と Y4 株の膜疎水性

Y1 と Y4 株の飽和炭化水素分解特性が異なるもう 1 つの原因に、菌体の膜疎水性が関係していると考え、両株の膜疎水性を測定した。膜疎水性は、菌懸濁液に炭化水素を添加して攪拌した後、水層(菌懸濁液)から有機層(炭化水素)に移動した菌体量を攪拌前後の濁度から評価した。攪拌しても濁度の変化が無いものは 100%、有機層に菌体が移動し攪拌前より濁度が低下すると値が低くなる。

その結果、Y1 株はオクタン(C<sub>8</sub>)やヘキサデカン(C<sub>16</sub>)の飽和炭化水素層にはほとんど親和性を示さず、ほぼ 100%を示した(Fig. 25-a)。一方、Y4 株は飽和炭化水素層に親和性をもち移動した。0.1 ml のオクタンを添加すると濁度が 50%に、ヘキサデカンを添加すると 80%まで低下した(Fig. 25-b)。

このように Y4 と Y1 株の膜表面の疎水性は異なっていて、Y4 株は飽和炭化水素に高い親和性を示したが Y1 株は示さなかった。この飽和炭化水素への親和性の違いも飽和炭化水素に対する分解特性の違いとして反映していると考えている。

一方、菌懸濁液にキシレンを添加すると、Y1 株の濁度は 50%、Y4 株では 25%に低下した。Y1 と Y4 株は、ともに芳香族炭化水素分解能をもつことから、キシレンに親和性を示したと推察される。

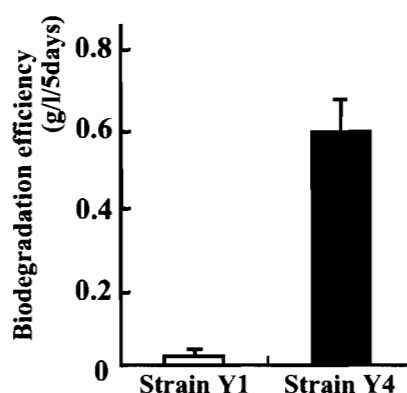


Fig. 24. Degradation of *n*-eicosane by strains Y1 and Y4. The bacteria were cultured in medium containing 1 g/l of *n*-eicosane at 37°C and 125 rpm for five days. The residual *n*-eicosane in the culture solution was extracted and analyzed by GC. Results are expressed as the mean  $\pm$ SD ( $n=3$ ).

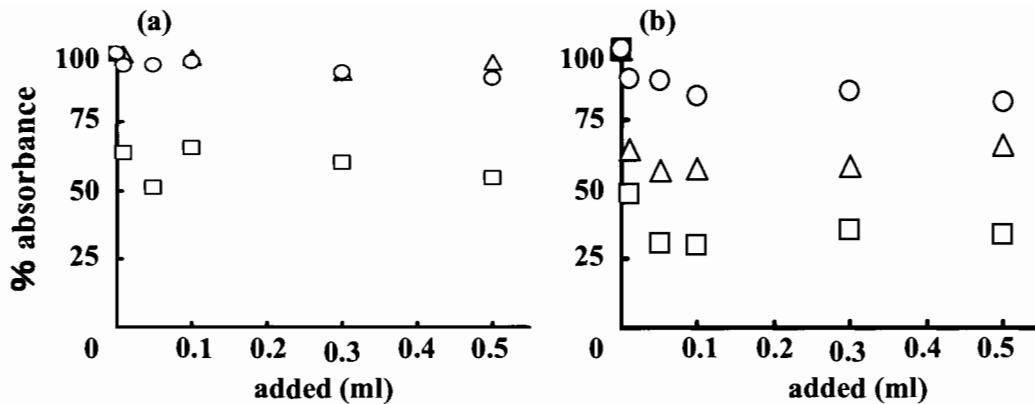


Fig. 25. The cell-surface hydrophobicity of *Pandoraea* sp. Y1 (a) and *B. multivorans* Y4 (b) was measured by adherence to hydrocarbons, *n*-hexadecane (○), *n*-octane (△) and xylene (□).

### 3.10. 単離株による芳香族画分の分解と分解経路の推定

#### 3.10.1. 芳香族画分の分解

No.22 群から分離した Y1 と Y4 株は、芳香族画分を 17~18% 分解した。しかし、これらの値は No.22 群の分解率より低かった。また Y3 株は、芳香族画分をほとんど分解しなかった (Fig. 26)。

また、Y1 と Y4 株は、フェナントレン (60 mg/l) を唯一の炭素源とする無機塩培地で培養すると、ほとんど分解しなかった。ところが補助基質として 1 g/l の

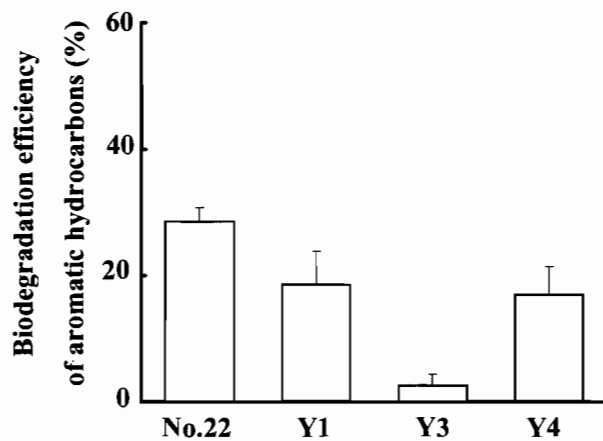


Fig. 26. Efficiency of degradation by the No.22 consortium and the isolated strains in the medium with the aromatic hydrocarbon fraction (4 g/l). Results are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

Yeast extract や 0.12 g/l の芳香族画分添加して 7 日間培養すると、No.22 群と同じように GC 分析検出限界レベルまで分解した。

これらの結果は、Y1 と Y4 株の芳香族画分分解には補助基質を要求す

るものの、分解能力は同程度で、No.22 群の芳香族炭化水素の分解に 2 株が大きな役割を果たしていることを示している。また、Y3 株はメチロトロフ細菌で、芳香族画分をほとんど分解しなかったことから、芳香族炭化水素の分解には直接関与していないことを明らかにした。

*Burkholderia* 属は、芳香族炭化水素やダイオキシン類などを分解する微生物として環境中から多数単離されている。*Burkholderia cepacia* VUN 10001 は、フェナントレンやピレン(100 mg/l)を唯一の炭素源とし、7 日間で検出限界レベルまで分解できる高い能力を示した<sup>57)</sup>。*Pandoraea* 属は、 $\gamma$ -hexachlorocyclohexane (lindane) や endosulfan など、ダイオキシン類を分解する微生物として報告されている<sup>58,59)</sup>が、芳香族炭化水素を分解するという報告や、群集から分離され分解活性を測定した報告はない。芳香族炭化水素を基質として培養した培養液を DGGE 解析し、出現した DNA バンドが *Pandoraea* 属と近縁であったという報告しかなかった<sup>60)</sup>。また、*Hyphomicrobium* 属が芳香族炭化水素を分解した報告はなかった。

### 3.10.2. 資化性試験

3 員環芳香族炭化水素であるフェナントレンの代謝経路は、大きく 4 つの経路が報告されている<sup>31)</sup>。まず、芳香環の 1 位と 2 位の炭素がジオキシゲナーゼによって酸化されることから分解が始まる。そして、1-hydroxy-2-naphthoate (1H2N)まで分解されると、 $\sigma$ フタル酸を経てプロトカテキュ酸へと分解されるフタル酸経路と、サリチル酸へと分解される経路に分かれる。サリチル酸からは、さらにゲンチジン酸へと分解される経路と、カテコールへと分解される 2 つの経路に分かれ、カテコールからもメタ開裂、オルト開裂により分解経路が分かれる<sup>31)</sup>(Fig.27)。例外として、*Sphingomonas* 属では、フェナントレンの 3 位と 4 位の炭素が酸化される代謝経路が報告されている<sup>61)</sup>。本研究では、Y1 や Y4 株で Fig. 27 に示した 4 つの経路の存在を代謝中間体の資化性と酵素活性から検討した。

最初に、それぞれの代謝中間物質を唯一の炭素源として添加した無機塩培地における生育を検討した。1H2N は水に難溶であるため、エタノールに溶解して資化性を検討した。Y1 株は 1H2N を炭素源とする培地に生育したが、コントロールのエタノール添加培地にも生育し、培養液の濁度はほぼ同じだった。その他の供試中間体は資化することができなかった。一方、Y4 株はいずれの代謝経路中間体も資化できず、エタノールも資化できなかった。

No.22 群や Y1、Y4 株は、芳香族画分(0.12 g/l)や Yeast Extract (1.0 g/l) を培地に添加するとフェナントレンを分解することができた。

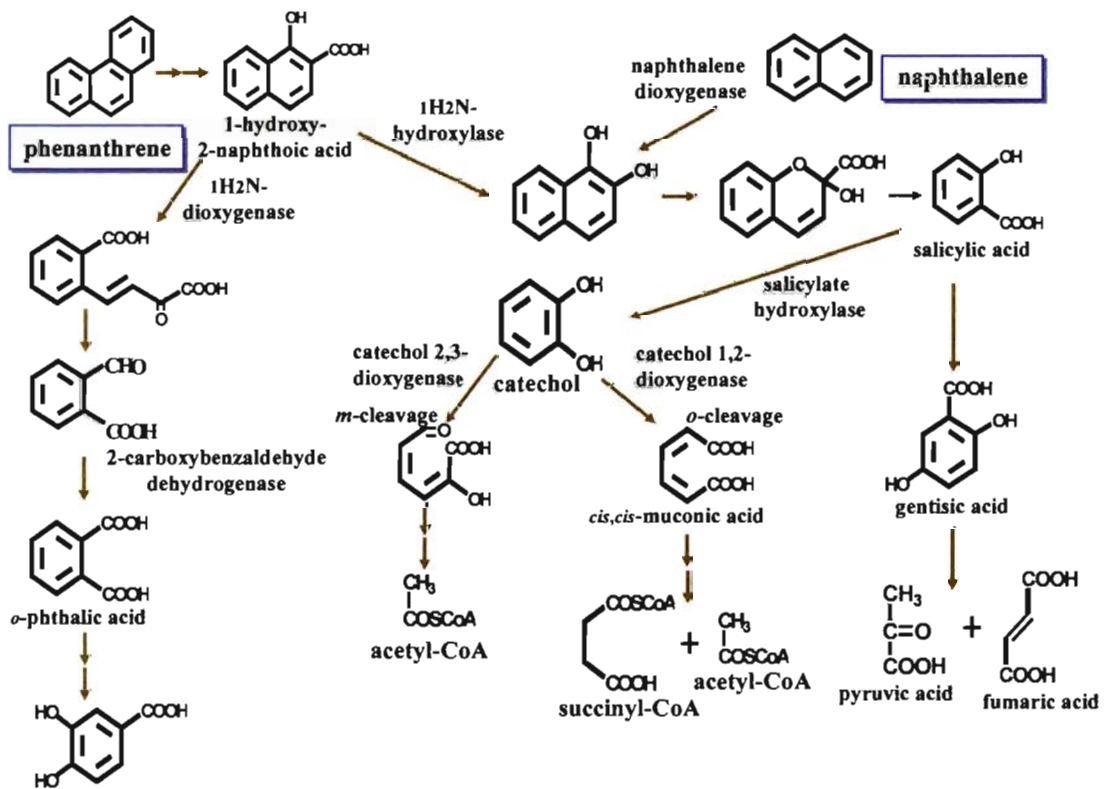


Fig. 27. Proposed catabolic pathway of phenanthrene and naphthalene degradation in general.

そこで無機塩培地に Yeast extract を 0.5 g/l 加えて培養したところ、Y1 と Y4 株共に生育した。次に、Yeast extract と代謝中間体を添加した無機塩培地に Y1 と Y4 株を培養し、HPLC を用いて代謝中間体のピークの減少を調べた。その結果、Y1 株は培養 1 日で、サリチル酸と *o*-フタル酸、ゲンチジン酸のピークを検出限界まで減少させたが、カテコールや *cis,cis*-ムコン酸はほとんど減少しなかった (Table 7)。また、Y4 株では培養 1 日後に、カテコール、サリチル酸、*cis,cis*-ムコン酸、ゲンチジン酸のピークが減少していた。1H2N のピークは、今回の分析条件では確認することができなかった。*o*-フタル酸のピークは、Y1 株で減少したが (Fig. 28-b)、Y4 株では減少しなかった (Fig. 28-c)。カテコールは、Y1 株を 1 日培養すると r.t. 13.44 min に新たなピークが出現したが (Fig. 29-b)、Y4 株ではカテコールのピークが消失していた (Fig. 29-c)。

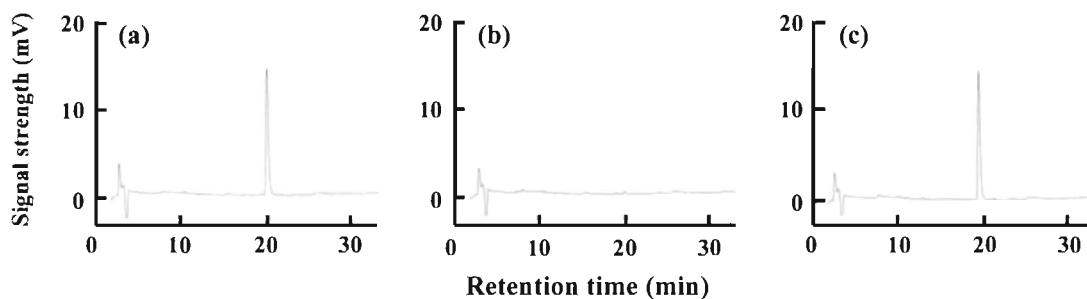
これらの結果から、Y1 株はフェナントレンを、フタル酸とゲンチジン酸およびカテコールを経る経路で分解することが、一方、Y4 株はカテコールとゲンチジン酸を経る分解経路で分解することが示唆され (Fig. 31)、両株のフェナントレン分解経路は一部異なることを示した。

**Table 7. Substrate degradation patterns of bacterial isolates by HPLC.**

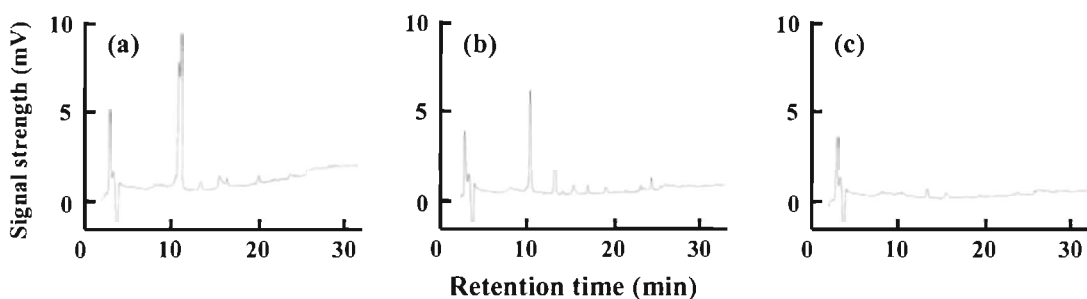
| strain                   | substrate |       |             |                         |                              |               |
|--------------------------|-----------|-------|-------------|-------------------------|------------------------------|---------------|
|                          | catechol  | 1H2N* | salicylates | <i>o</i> -phthalic acid | <i>cis,cis</i> -muconic acid | gentisic acid |
| <i>Pandoraea</i> sp. Y1  | +         | NT    | +           | +                       | ±                            | +             |
| <i>B. Multivorans</i> Y4 | +         | NT    | +           | -                       | +                            | +             |

+, decreased a peak of substrate ; -, not decreased a peak substrate ; NT, not tested

\*1-Hydroxy-2-Naphthoic acid



**Fig. 28.** HPLC analysis of extracts from the culture solutions of strain Y1 (b), and strain Y4 (c), and the control (a). The isolates were cultured in medium supplemented with the *o*-phthalic acid for one day. The medium was used as the control.



**Fig. 29.** HPLC analysis of extracts from the culture solutions of strain Y1 (b), and strain Y4 (c), and the control (a). The isolates were cultured in medium supplemented with the catechol for one day. The medium was used as the control.

### 3.10.3. 酸素消費量の測定

フェナントレンが 1H2N やカテコールを経て代謝されるとき、1H2N ジオキシゲナーゼやカテコールジオキシゲナーゼなどの酵素が働いて、酸素を消費することが報告されている<sup>46, 62)</sup>。そこで、Y1 や Y4 株懸濁液に 1H2N やカテコールを添加して、酸素が消費されるか検討した。

Y1 株は 1H2N を基質としたとき、酸素を消費したが、1H2N を溶解しているエタノールを添加したときも、同じ傾きで酸素を消費した。これより、Y1 株は 1H2N ではなくエタノールを分解して酸素を消費していると考えた。

次に、カテコールを基質としたとき、Y4株のみで顕著な酸素消費(11.2 nmol/min/mg dry cells)が認められた(Fig. 30)。この結果は、カテコール添加培地でY4株を培養するとピークが減少した資化性試験の結果を支持した。一方、Y1株では酸素消費を確認できなかったが、資化性試験でカテコールのピークが減少し新たなピークが出現したことから、酸化反応とは異なる反応でカテコールを分解していることが示唆された。

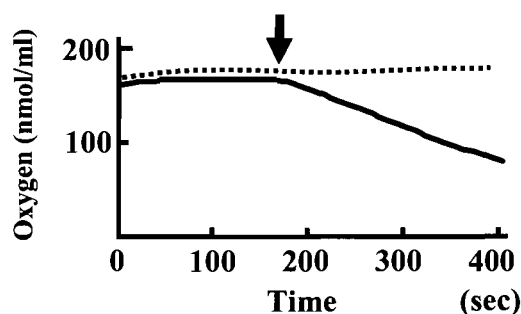


Fig. 30. Oxygen consumption in the suspension with the catechol by strain Y1 (dashed line) and strain Y4 (solid line). At a point indicated an arrow, the catechol was

#### 3.10.4. 酵素活性試験

代謝中間体分解酵素活性は、Y1 や Y4 株の菌体破砕液上清を粗酵素溶液として用い、資化性試験で示唆された結果を酵素活性で確認した。酵素活性は、基質や生成物、補酵素の増減を各波長で測定し、増減を確認した (Table 5)。

Salicylate hydroxylase 活性は Y1 と Y4 株ともに認められたことから、サリチル酸からカテコールへ分解する経路の存在を確認することができた。カテコールを基質として Catechol 1,2-dioxygenase の活性を測定したとき、Y4 株で吸光度が顕著に上昇し、活性を確認できたが、Y1 株では吸光度が安定しなかった。Catechol 1,2-dioxygenase は、カテコール経路のオルト開裂に関わる酵素である。一方、カテコールのメタ開裂を行う Catechol 2,3-dioxygenase の 375 nm の値は、両株とも変化がなく、カテコールを平板培地に塗抹して両株を培養しても、2-hydroxymuconic-semialdehyde に由来する黄色を呈しなかった。以上の結果から、Y4 株はカテコールをオルト開裂で分解する経路をもち、Y1 株は HPLC でカテコールから新たなピークが出現していることから、オ

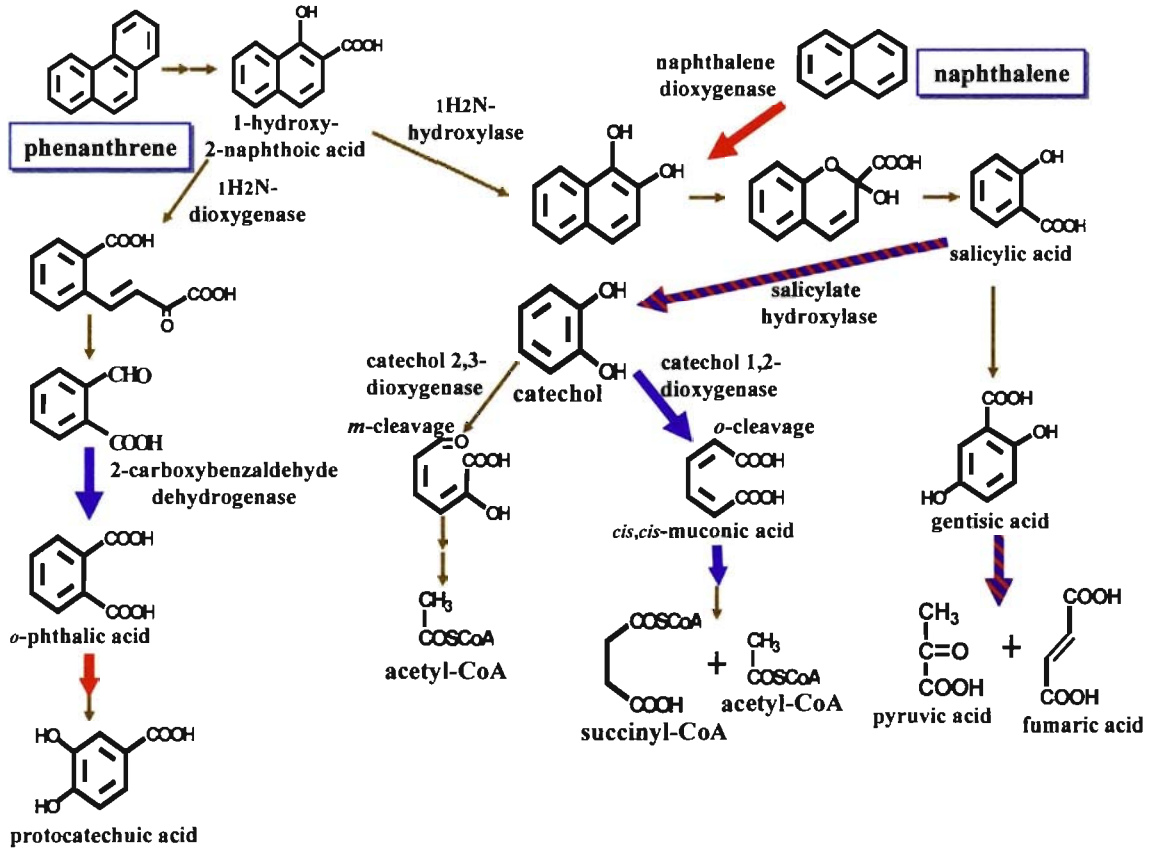


ルトやメタ開裂以外の経路でカテコールを分解していることを明らかにした。この結果は、資化性試験や酸素消費試験の結果とも一致していた。

また、ナフタレン分解の最初に働く naphthalene dioxygenase 活性の有無は、インドールを塗抹した平板培地で培養した菌体が青色を呈することで判定した。Y1 と Y4 株を培養すると Y1 株でのみ青色を呈したことから、Y1 株は naphthalene dioxygenase をもつことを明らかにした。両株は異なるフェナントレンおよびナフタレン分解経路をもつことが示唆された。

これら以外の酵素活性は、活性が弱く明確な結果を得ることはできなかった。今後は、遺伝子やタンパク質レベルで検討する必要がある。

以上の結果から、既知のフェナントレンやナフタレン分解経路を参考に、Y1 と Y4 株の芳香族炭化水素分解経路を示した (Fig. 31)。



**Fig. 31.** Proposed catabolic pathway of phenanthrene and naphthalene degradation in general. Presumed pathway of strain Y1 and Y4 was showed as the red arrow (strain Y1), blue arrow (strain Y4), and striped arrow (strain Y1 and Y4).

#### 4. まとめ

重油中の芳香族炭化水素を安定して、高効率で分解できる微生物群集を新たにスクリーニングして No.22 群を確立した。No.22 群は、芳香族画分を 7 日間で 30 % 分解した。難分解性の芳香族炭化水素と無機塩を含む培地で良好に生育し、分解できる No.22 群を確立できたことは、汚染重油を生分解する実用的な研究へ発展させるためにも重要な成果と言える。

No.22 群培養液を PCR-DGGE 解析すると、14 本の DNA バンドが検出された。DNA バンドを解析すると全てグラム陰性菌で、*Alpha* や *Gammaproteobacteria* 以外に、K-3 群では検出されなかった *Betaproteobacteria* の存在が確認され、多様な菌種で構成されていることを明らかにした。しかし、No.22 群からは構成菌 3 株 (*Pandoraea* sp. Y1、*Hyphomicrobium facile* Y3、*Burkholderia multivorans* Y4) しか分離できなかったことから、No.22 群には分離の難しい(難培養性)微生物がまだ多数存在している。

No.22 群の芳香族画分や飽和画分の分解率を測定するなかで、芳香族画分添加培養液を飽和画分培地に移植すると、飽和画分分解活性に lag time が出現することに着目した。この lag time 中に群集内で菌叢(優勢種)が変動しているという仮説をたて、PCR-DGGE 解析すると、飽和画分で強く出現する DNA バンドと逆に消滅していく DNA バンドが観察され、バンドパターンがはっきりと異なっていた。

さらにクローンライブラリー法で優勢種の変化を定量的に調べると、芳香族画分では *Pandoraea* 属と *Brachymonas* 属、飽和画分では *Burkholderia* 属の割合が高まっていたことから、これらの菌が分解に強く関わっていることが示唆された。さらに、これら 3 株の変動を定量リアルタイム PCR で解析すると、クローンライブラリーで得られた結果と同じ傾向が認められた。特に、*B. multivorans* Y4 は飽和画分で 68 % と極めて高い割合で存在し、芳香族画分でも 15~30 % の比率を占めていた。一方、*Pandoraea* sp. Y1 の構成比率は、芳香族画分で 3 %、飽和画分では 0.07 % と非常に低かった。*Brachymonas* 属はコロニーとして分離できなかった

ため、DNA コピー数で比較した結果、*Pandoraea* sp. Y1 と同じ変動を示した。これらの結果から、飽和画分の分解には *B. multivorans* Y4 が、芳香族画分では *B. multivorans* Y4 に加えて、*Pandoraea* sp. Y1 や *Brachymonas* sp. F が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

この菌叢変化を引き起こす原因の 1 つが、Y1 や Y4 株の飽和炭化水素分解特性の違いであることを見出した。飽和画分培地に Y4 株を培養して GC 解析すると、飽和炭化水素は均一に減少したが、Y1 株を培養するとほとんど減少しなかった。また、無機塩培地にエイコサン(C<sub>20</sub>)を 1 g/l 添加して分解率を測定しても、Y4 株はほぼ完全に分解したが、Y1 株はほとんど分解できなかった。さらに、Y4 株はオクタンやヘキサデカンに高い親和性を示して炭化水素層に菌体が移動して、菌懸濁液の濁度が 20~50 % 減少したが、Y1 株は飽和炭化水素に親和性を示さなかった。これらの結果から、飽和炭化水素に対する親和性と分解能力の違いが、飽和画分培地で菌叢変化を引き起こしている原因であることを明らかにした。

さらに、Y1 と Y4 株の芳香族炭化水素分解経路が異なっていることを明らかにした。Y1 と Y4 株は、飽和炭化水素に対する親和性や分解経路など異なっている点もあるが、2 株は群集内で互いに補いながら芳香族炭化水素を分解していると推察している。

本章では、分子生物学的手法を活用して、群集を構成する菌種の同定、さらに異なった環境下におかれると No.22 群は優勢種を変動して環境変化に対応していることを明らかにした。

芳香族炭化水素を分解するとき、株と株の機能的な補完作用をより詳細に解明するためには、構成菌をより多く単離することが重要と考えている。No.22 群から 3 株の構成菌しか単離できなかった。菌群による分解メカニズムを深く理解するためには、難培養性微生物を含めて各菌種のより詳しい情報が必要である。

### 第三章

## No.22 群単離菌の混合培養による群集の再構築と 芳香族炭化水素分解における非分解菌の群集内での役割

### 1. 緒言

No.22 群培養液から単離した 3 株のうち、Y1 と Y4 株は芳香族画分を分解できたが、Y3 株はほとんど分解できなかった。Y1 と Y4 株は、群集内で芳香族画分を直接分解する重要な役割を果たしていると考えられるが、Y1 と Y4 株を単独または 2 株混合培養しても、それらの分解率は No.22 群の分解率に及ばなかった。ところが、Y1 と Y4 株に芳香族画分非分解菌である Y3 株を加えて混合培養すると、芳香族画分の分解率が上昇し、群集とほぼ同じ値を示した。これは Y3 株が芳香族画分の分解に間接的に寄与しているためと考え、Y3 株の役割を明らかにした。

Y3 株は、メチロトローフ細菌として知られている *Hyphomicrobium* 属と同定された。メチロトローフ細菌は、補酵素であるピロロキノリンキノン類を生産することが知られている<sup>63, 64)</sup>。そこで、Y3 株は Y1 と Y4 株の生育や芳香族炭化水素の分解に必要な微量栄養素を生産している可能性を検討した。

また *Hyphomicrobium* 属は、菌体同士が集合して、ロゼッタ状のミセルを形成し、これが界面活性剤様の働きをすることが報告されている<sup>64)</sup>。さらに、メチロトローフ細菌はメタノールなどの有毒物質を資化するとき、菌体周辺にバイオフィルムを形成することも明らかにされている<sup>65)</sup>。

Y3 株のこれら特徴が、3 株混合培養系の芳香族画分分解率を上昇させているという仮説を立てて実験を行った。また、3 株混合培養系での Y3 株の動態を直接顕微鏡で観察するために、FISH 解析を行った。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1 供試菌株

No.22 群から単離した *Pandoraea* sp. Y1 と *Hyphomicrobium facile* Y3、*Burkholderia multivorans* Y4 を使用した。

### 2.2. 炭化水素の分解試験

No.22 群と単離株の芳香族画分分解率は、第 1 章と同様の方法で測定した。*Pandoraea* sp. Y1 と *B. multivorans* Y4 は、R2A 培地で 1~2 日、37°C で前培養した。*H. facile* Y3 は、メタノールを塗布した無機塩平板培地で前培養した。前培養した単離株は、滅菌生理食塩水に懸濁し OD<sub>610</sub> を 0.5 に調整後、50  $\mu$ l ずつ芳香族画分添加無機塩培地に植菌した。培養液に残存した芳香族画分は、TLC/FID で測定し分解率を求めた。

### 2.3. *H. facile* Y3 株培養液上清の調製

*H. facile* Y3 は、1 %(v/v)メタノールを添加した無機塩培地 50 ml で 2 日間、37°C、125 stroks/min で振とう培養した。培養液を 3500 rpm で 20 min 遠心分離して上清と菌体に分離した。上清は凍結乾燥して-30°C で保存した。

### 2.4. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) 解析

*H. facile* Y3 と *Pandoraea* sp. Y1 あるいは *B. multivorans* Y4 を 2 株混合培養したときと、単離 3 株を混合培養したときの培養液中の *H. facile* Y3 を、FISH 法で顕微鏡観察した。

Y3 株に特異的な蛍光プローブとして Y3-Cy3 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3')を設計した。プローブには、蛍光色素の Cy3 を 5'末端にラベルした(Nippon EGT co., ltd., Toyama, Japan)。3 株混合培養液は、培養 0、4、7 日目にサンプリングして FISH 解析した。FISH 解析は Amann ら<sup>11)</sup>や、Manz ら<sup>67)</sup>の方法を参考にした。

ハイブリダイゼーションは、ゼラチンでコーティングしたスライドガラ

ス上で行った。99.5 % (v/v) エタノールに浸漬したスライドガラスを乾燥し、コーティング液(純水 100 ml あたり: 0.1 g ゼラチン, 0.05 g 硫化カリウムクロム)に 70°C で 1 min 浸漬してゼラチンコーティングスライドガラスを作製した。

サンプリングした培養液は、遠心分離(2500×g, 4°C, 5 min)にかけて、沈殿物を 500 µl の PBS で 2 回洗浄(2500×g, 4°C, 5 min)した。菌体には、phosphate-buffered saline solution (PBS: pH 7.4, 130 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)を 500 µl と 4 % (v/v)ホルマリンを 500 µl 添加し、4°C で 12 時間固定した。再び、PBS で 2 回洗浄して得られた菌体を 150 µl の PBS に懸濁し、凍結融解を 2 回繰り返し、99.5 % (v/v)エタノールを 150 µl 添加して菌体を固定化した。この菌体は-30°Cで使用するまで保存した。

固定化した菌懸濁液を、スライドガラスに滴下して乾燥させた。乾燥した菌体に 50 pmol/l プローブ溶液を 1 µl とハイブリダイゼーション緩衝液(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.01 % [w/v] sodium dodecyl sulfate [SDS], 20 % [v/v] formamide)を 8 µl 添加し、40 °C で 180 min 反応させた。洗浄は、洗浄液(0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.01 % [w/v] SDS)に 40°C で 40 min 浸漬してから、純水で洗い流して乾燥させた。退色防止剤には ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を使用し、操作方法は試薬に記載されている方法に従った。退色防止剤に 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI)が含まれているため、同時に全菌体を DAPI 染色した。退色防止処理をしたサンプルにカバーガラスをかぶせ、周りをマニキュアでコーティングしてから蛍光顕微鏡で観察した。蛍光顕微鏡は OLYMPUS BX-51(OLYMPUS, Tokyo, Japan)を使用した。Cy3 用のフィルターセットには HQ:CY3 を、DAPI 用には UV-2A を使用した。

## 2.5. アルシアンブルー染色とフクシン染色

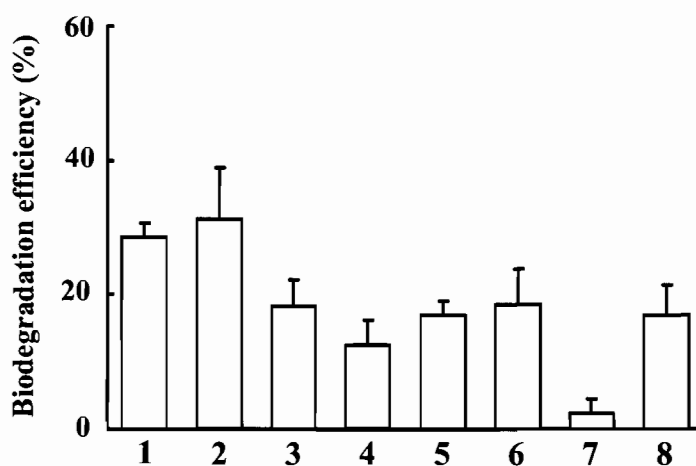
培養液中に生産されたムコ多糖は、アルシアンブルー染色で検出した。芳香族画分添加培養液は、FISH 解析と同様にホルマリンで菌体を固定し、ゼラチンコーティングスライドガラスに滴下して乾燥させた。ムコ多糖染色は、酸性アルシアンブルー溶液(pH 2.5, Wako)を添加し、室温で 30 min 染色後、純水で洗浄した。菌体染色はアルシアンブルー染色後、石炭酸フクシンを滴下し室温で 5 min 染色後、純水で洗浄した。調製したスライドガラスサンプルは蛍光顕微鏡(OLYMPUS BX-51)で観察した。石炭酸フクシン溶液は、A 液(塩基性フクシン 0.3 g, 95 %エタノール 10 ml) と B 液(5 g 石炭酸, 95 ml 蒸留水)を作成し、A, B 両液を混合して調製した。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1. 単離株混合培養による芳香族画分の分解

*Pandoraea* sp. Y1 と *H. facile* Y3、*B. multivorans* Y4 を芳香族画分を唯一のエネルギーおよび炭素源とした培地で培養すると、芳香族画分分解率に差が認められた。Y1 や Y4 株は 7 日間で 17~18%分解したが、Y3 株はほとんど分解しなかった(Fig. 32)。

単離した 3 株を 2 株ずつ組み合わせて混合培養したが、どの組み合わせの系でも、芳香族画分の生分解率は 18 %前後で、単一株による分解率と変わらなかった(Fig. 32)。芳香族画分を分解できる Y1 と Y4 株を混合培養しても分解率は変わらなかったが、芳香族画分非分解菌 Y3 株を加えた 3 株で混合培養すると、分解率が 31 %まで上昇し、No.22 群の分解率と同じ値を示した(Fig. 32)。



**Fig. 32.** Efficiency of degradation by the No.22 consortium and the isolated strains in the medium with the aromatic hydrocarbon fraction (4 g/l). Results are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). 1, the No.22 consortium; 2, strains Y1, Y3 and Y4; 3, strains Y1 and Y4; 4, strains Y3 and Y4; 5, strains Y1 and Y3; 6, strain Y1; 7, strain Y3; 8, strain Y4.



Y3 株が分解率上昇のために混合培養系でどのような役割を果たしているのか、いくつかの仮説を考えた。第1は、Y3 株が Y1 と Y4 株の生育を促進する、または分解酵素活性を高める補酵素を生産していると推測した。Shimao ら<sup>68)</sup>は、生分解性樹脂である Polyvinyl alcohol (PVA) を分解する *Pseudomonas* sp. VM15C と、非分解菌 *Pseudomonas putida* VM15A の混合培養系を確立した。この中で、*P. putida* VM15A が生産するピロロキノリンキノン(pyrroloquinoline quinone, PQQ)が、10  $\mu$ g/l の微量で分解菌 *Pseudomonas* sp. VM15C の生育補助物質となることを明らかにした。*Hypomicrobium* 属もこの補酵素 PQQ を生産するため<sup>69)</sup>、Y3 株も同じような物質を生産している可能性があると考えた。

第2は、*Hypomicrobium* 属は特徴的な形態をしていて、菌体が集合したロゼッタ状で培養液中に存在し、ミセル状構造を形成すると Marshall ら<sup>64)</sup>は述べている。Y3 株もロゼッタ状構造をとることを走査型電子顕微鏡で確認した(Fig. 33)。このロゼッタ状構造により芳香族画分が培地中に乳化され、他の分解菌と芳香族画分が接触する頻度が増えることから、芳香族画分が分解されやすくなると考えた。

3つめは、*Hypomicrobium* 属がバイオフィルムを形成することを Banks ら<sup>70)</sup>が報告している。Y3 株もバイオフィルムを生産し、Y1 と Y4 株が芳香族炭化水素を効率よく分解するための場所を提供していると考えた。



Fig. 33. The rosetta cells of *H. facile* Y3 observed by scanning electron microscope. Scale bar, 2  $\mu$ l.

### 3.2. *H. facile* Y3 株培養液上清の分解促進効果

第1の仮説から検証した。Y3株が培養液中にY1とY4株の生育や分解を促進する物質を生産していれば、Y3株の培養液上清を添加しても分解率が上昇すると考えた。

メタノール添加無機塩培地でY3株を2日間培養した培養液上清1000mlを凍結乾燥して3gを調製した。この凍結乾燥物がY1とY4株混合培養液の分解率に与える効果を調べた。

3株混合培養しても20%だった分解率が、Y3株培養液上清凍結乾燥物を添加すると、添加量に応じて芳香族画分分解率が上昇した。約5倍高濃度のY3株培養液上清に相当する14g/lを添加すると芳香族画分の分解率が40%まで上昇した(Fig. 34)。コントロールとして、無機塩培地だけを凍結乾燥して添加しても分解促進効果は認められなかった。

この結果から、Y3株は培養液上清にY1とY4株の芳香族画分の分解を促進する物質を生産している。ただし、凍結乾燥物の添加量が14g/lと多いことから、促進物質は微量しか生産されていないと考えられる。凍結乾燥物から促進物質の単離を試みたが、極微量なため単離できなかった。今後の検討が必要である。

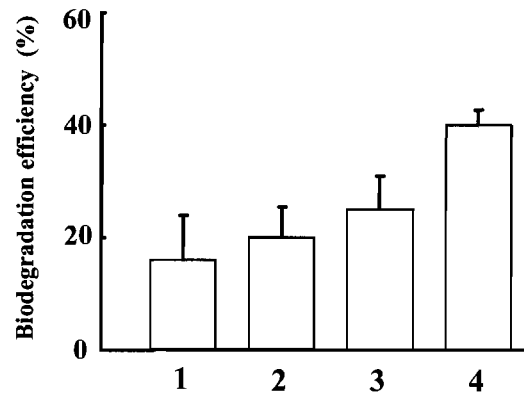


Fig. 34. Effect of culture supernatant with strain Y3 on the efficiency of degradation by the isolated strains in the medium with the aromatic hydrocarbon fraction (4 g/l). Results are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). 1, strains Y1 and Y4; 2, strains Y1, Y3 and Y4; 3, strains Y1, Y4 and 10g/l supernatant of Y3; 4, strains Y1, Y4 and 14g/l supernatant of Y3.

### 3.3. FISH 法による *H. facile* Y3 株の観察

第 2 の仮説を検証した。Y3 株が 3 株混合培養液中でどのように存在しているのか(3 株間の位置関係や、Y3 株がロゼッタ状構造を形成しているのか)を明らかにするため、FISH 法で Y3 株を、DAPI 染色で 3 株全てを染色して顕微鏡で観察した。

まず FISH 解析に必要な Y3 株に特異的なプローブを設計し、このプローブが Y1 と Y4 株には反応しないことを確認した。Fig. 35 は、作成したプローブが Y3 株とハイブリダイゼーションしていることを確認した写真である。

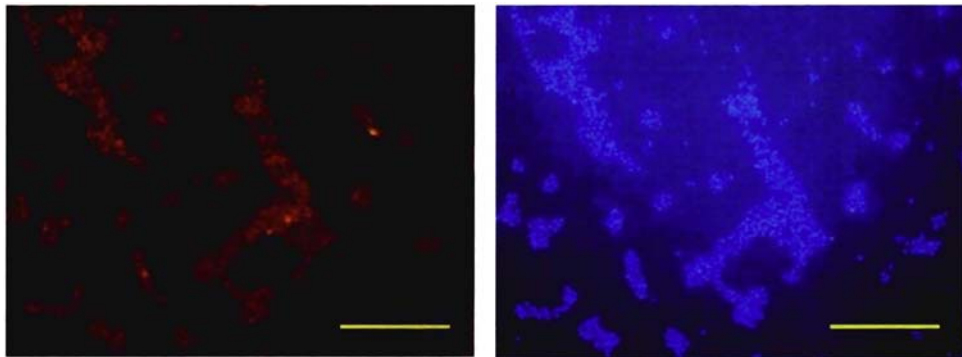


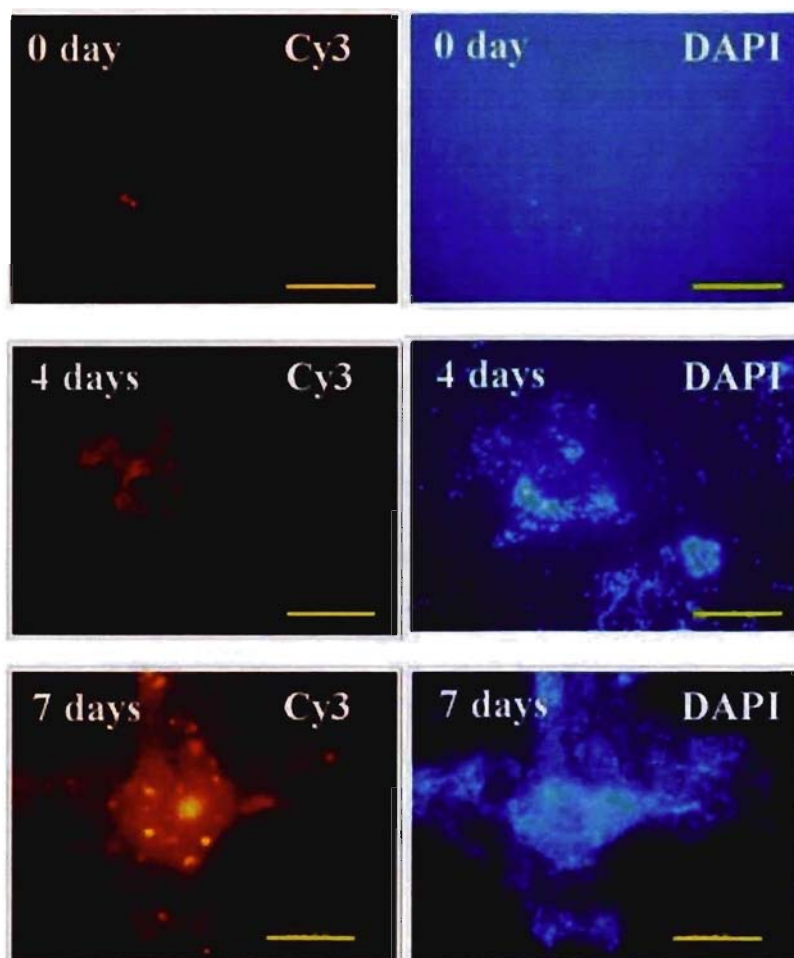
Fig. 35. Photomicrographs of FISH-stained *H. facile* Y3. Each panel showed probe (Y3-Cy3) staining cells (left) and DAPI staining cells (right). Scale bar, 20 $\mu$ m.

3 株混合培養液を FISH 解析すると、培養 4 日目と 7 日目に赤色に蛍光染色された Y3 株を多数観察でき、しかも Y3 株は広範囲に分散しているのではなく集合状態で観察された(Fig. 36)。一方、DAPI 染色された Y3 株以外の菌体は、集合体の中にも観察できたが多くは広範囲に分散していた。

Y3 株を含む集合体は、培養時間とともに大きくなった。また、この集合体は星雲のような不定形をしていて、蛍光染色された Y3 株は不鮮明で大きくぼやけていて、Fig. 35 のように菌の形態をはっきりと確認することができなかった。これは、粘質物のような物質に菌体が吸着され菌体を

覆っているためと推察した。さらに、この蛍光染色された Y3 株の周辺に DAPI 染色された菌体が多数観察された(Fig. 36)。これは、Y3 株が生産した粘質物に Y1 と Y4 株が付着していることを示している。

FISH 解析の結果、第 2 の仮説のように Y3 株は集合体として存在している様子を観察することができたが、この集合体がロゼッタ状構造を形成して、ミセルとして機能しているのか確認できなかった。培養液を経時的に撮影した写真を観察すると、Y3 株はロゼッタ状構造で芳香族画分を乳化していると考えられるよりも、粘質物を生産して他の分解菌を付着させていると考えた方がより正確であると判断した(Fig. 36)。



**Fig. 36.** Photomicrographs of FISH-stained mixture of three isolations in the medium with the aromatic hydrocarbon fraction (4 g/l) after 0, 4, 7days. Each panel showed probe (Y3-Cy3) staining *H. facile* Y3 (left) and DAPI staining whole cells (right). Scale bar, 20 $\mu$ m.

### 3.4. バイオフィルム染色

第3の仮説を検証した。3株混合培養液中のY3株をFISH染色すると、星雲のような不定形の集合体が観察された(Fig. 36)。この不定形物質をアルシアンブルーで染色した。ムコ多糖は、*Pseudomonas* 属などが生産するバイオフィルムの構成糖で、アルシアンブルーで青色に染色される<sup>71)</sup>。また同時に菌体をフクシンで染色して、ムコ多糖類と菌体の位置関係も観察した。

3株混合培養液をアルシアンブルーとフクシンで染色すると、FISH解析と同じように、培養時間とともに青色に染色されたムコ多糖の量が増え、ムコ多糖の周辺には、紫色で染色された菌体が多数観察された(Fig. 37)。Y3株は特徴的な形態をしているため、Y1とY4株と容易に判別することができる。詳細に観察すると、Y3株は粘質物周辺に局在していた。また、粘質物には難水溶性の芳香族画分と思われる茶色の塊も付着していて、塊の周囲にも多数の菌体が付着している様子が観察された(Fig. 37)。

ムコ多糖を生産する菌体を特定するために、芳香族画分添加無機塩培地で3株を単独培養して、培養液をアルシアンブルーで染色した。その結果、

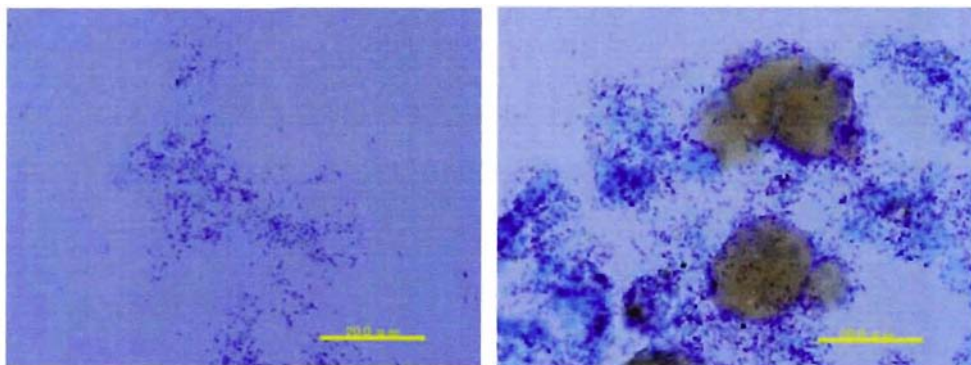
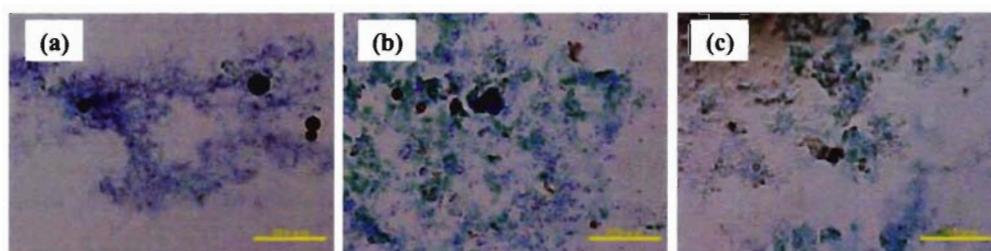


Fig. 37. Photomicrographs of alcian blue (blue) and fuchsin (purple) stained mixture of three isolations in the medium with the aromatic hydrocarbon fraction (4 g/l) after 4 days (left) and 7 (right) days. Scale bar, 20 $\mu$ m.



Y3 株培養液で青色に染まった多量のムコ多糖を観察することができ、Y3 株が粘質物を多量に生産していることを見出した(Fig. 38)。平板培地に Y3 株を培養すると、粘質物はほとんど生産されなかったことから、Y3 株は液体培地で特異的に粘質物を生産すると推察される。一方、Y1 や Y4 株も、Y3 株に比べると極めて少量だがムコ多糖を生産していた。



**Fig. 38.** Photomicrographs of alcian blue (blue) and fuchsin (purple) stained three isolations in the medium with the aromatic hydrocarbon fraction (4 g/l) after 7 days. (a); strain Y1, (b); strain Y3, (c); strain Y4. Scale bar, 20µm.

Y3 株生菌体の代わりに培養液上清の凍結乾燥物を添加して、Y1 と Y4 株を混合培養した。この培養液をアルシアンブルーとフクシンで染色すると、菌体は局在せず分散して存在していた。またアルシアンブルー染色物も局所的に散見できる程度しか生産されていなかった(Fig. 39)。

これらの結果は、Y3 株生菌体がムコ多糖を生産している結果を支持している。また粘質物は分解基質や分解菌を付着させてマイクロフローラを形成するのに重要な役割を果たしていることを示している。難水溶性の芳香族炭化水素を効率よく分解するためには、分解基質と分解能力をもった微生物が高頻度で接触する必要があり、バイオフィームのような粘質物に基質と菌が高密度に付着することは、液体培養液中で芳香族炭化水素を効率的に分解するのに適した環境をつくり出しているのかもしれない。

*Pseudomonas* 属細菌の中には、ラムノリピッドとよばれる糖脂質系界面活性剤(バイオサーファクタント)を生産する菌が報告されている<sup>72)</sup>。Ho<sup>73)</sup>は、*P. aeruginosa* ATCC10145 がヘキサデカンを資化するとき、ラムノリピッドを生産して、培地への溶解度を高めていると述べている。また、Eriksson ら<sup>74)</sup>は、微生物がピレンを包みこむようにバイオフィルムを生産し、菌体がピレンと間接的に接触しながら分解していると報告し、集積培養液からピレン分解菌として *Pseudomonas* 属を単離している。こ

のように、微生物が芳香族画分のような難水溶性で毒性の高い物質を資化するとき、粘質物を生産して分解基質を付着させ、菌体が基質と接触する頻度を高めたり、界面活性剤を生産して基質の溶解度を高めて分解しやすくする工夫をしていると推察された。

以上の結果から、FISH 解析により観察された星雲のような不定形物質はムコ多糖類で、Y3 株が多量に生産することを明らかにした。Y3 株が生産した粘質物は、難水溶性の芳香族炭化水素の塊や分解菌を付着させるバイオフィルムとして機能し、分解菌と分解基質の接触頻度を高めることにより分解率を上昇させていると考えられる。

バイオフィルム以外に、Y3 株が生産する微量栄養素も Y1 や Y4 株の生育と分解活性を高めている可能性が高い。芳香族炭化水素非分解菌である Y3 株は、複数の間接的な働きを行って、No.22 群の芳香族画分の分解率上昇に寄与していると考えられる。

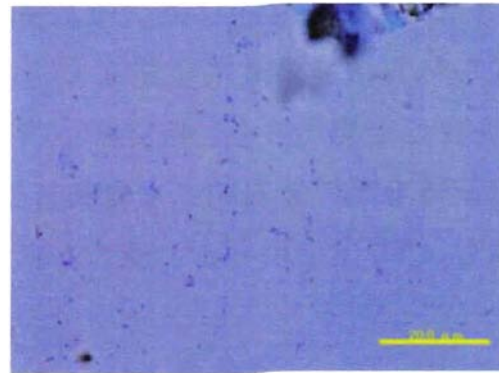


Fig. 39. Photomicrographs of alcian blue (blue) and fuchsin (purple) stained mixture of strains Y1 and Y4 in the medium with the aromatic hydrocarbon fraction (4 g/l) and culture supernatant with strain Y3 after 7 days. Scale bar, 20  $\mu$ m.

#### 4. まとめ

*H. facile* Y3 株は芳香族画分や飽和画分をほとんど分解しないので、No.22 群における存在理由が不明であった。ところが、2 株(*Pandoraea* sp. Y1、*B. multivorans* Y4)混合培養液に Y3 株を加えて培養すると、No.22 群の芳香族画分分解率と同じ値を示した。

芳香族炭化水素非分解菌 Y3 株は Y1 と Y4 株の分解率を高める間接的な働きをしていた。まず Y3 株は、Y1 や Y4 株の分解を促進する物質を生産している可能性が示唆された。次に、Y3 株はムコ多糖を生産した。このムコ多糖に Y3 株以外に多数の Y1 や Y4 株、さらに芳香族炭化水素と思われる塊が付着していた。芳香族炭化水素の多くは難水溶性であるため、粘質物に分解菌と分解基質が高密度に付着したマイクロフローラが形成されると、接触頻度が高まり高効率で芳香族画分が分解するのに寄与していると考えられる。

難水溶性の難分解性物質を微生物で分解するとき、分解能力の高い微生物を自然界からスクリーニングする。そして得られた微生物の分解酵素や代謝系を遺伝子レベルで解明して、より高い分解能力を持つように遺伝子組換え株を取得することなどが考えられ、このような方法も問題解決の 1 つの方法である。しかし、自然界では、全く別の視点から課題を解決している。つまり、直接基質を分解しないが基質分解菌が基質を分解し易くする間接的な能力をうまく活用することにより、安定してより高い分解率を達成している。この後者の方法は、群集という全く異なった能力をもった菌が、互いの能力を活用することによって、全体として高い機能性を発揮するという新しい視点から難分解性物質を分解する手法で、今後の研究方法の 1 つの道を示している。



## 総合考察

事故などで流出した難分解性の汚染重油には、多種類の飽和および難分解性の芳香族炭化水素画分と、それらが重合したレジン画分やアスファルテン画分が含まれているため<sup>3)</sup>、自然界に長期間残存する。このような重油を微生物で分解して修復するバイオレメディエーション(bioremediation)技術が、環境への負荷が低く、コストが安い、広範囲におよぶ汚染にも対応できるなどの利点から注目されている。これまでもアラスカ湾でのタンカー座礁事故や、湾岸戦争で破壊された油井から漏出した汚染重油の浄化に、バイオレメディエーション技術が活用されてきた<sup>75, 76)</sup>。

多数の炭化水素分解菌がすでに分離されている。土壌 1 g 中には $10^8\sim 10^{10}$ 個の細菌が存在するが、その 20 %は炭化水素分解能をもつと報告されている<sup>77)</sup>。すでに *Pseudomonas*<sup>78)</sup>、*Burkholderia*<sup>79)</sup>、*Mycobacterium*<sup>6)</sup>、*Rhodococcus*<sup>7)</sup> 属などの微生物が、優れた炭化水素分解能力をもつことが明らかにされている。

一方で、単一種の微生物では限られた種類の炭化水素しか分解できないことも明らかにされてきた<sup>25, 26)</sup>。Ho ら<sup>61)</sup>は、汚染土壌から *Mycobacterium* 属や *Sphingomonas* 属など 49 株を単離し、これらの 4 員環芳香族炭化水素の分解率を測定すると、ピレンは分解できるが、同じ 4 員環のフルオランテンを分解できない株も分離した。この分解能力の違いは、分解酵素遺伝子の欠失や遺伝子の発現に問題があると報告している。

そこで近年注目されてきた処理技術が、微生物群集の利用である。群集は異なる機能をもつ微生物で構成されるため、ときに単一種よりも高い機能性と能力を発揮することがある。これに着目し、多種類の炭化水素を含む重油の分解にも、群集による効率的な分解が有効であると考えられている。

しかしこれまでに、微生物群集を用いて重油を分解した報告は少ない。そのため重油分解能力の高い群集のスクリーニング法や確立した群集の

保存方法、群集構成微生物の解析や、基質を分解するとき構成微生物が果たす直接的、間接的な役割の解明など基礎的研究が遅れている。その最大の理由は、自然界に生息する 99 %以上の微生物が難培養性微生物であると言われ、これが群集の解析を困難にしている。

微生物群集を科学的に解析して維持、制御できるようにするためには、群集に関する基礎的知見を集め理解を深めることが必要である。

本研究では、まず重油や重油中の芳香族画分を安定して高分解できる 2 種類の微生物群集(K-3, No.22)を新潟県の石油汚染土壌から確立した。得られた群集は、分子生物学的手法を駆使して構成菌を同定するとともに、分解基質を変えたときの優勢種の変動を明らかにした。またコロニーとして分離できた構成菌については、群集が基質を分解するときの役割を解明した。これらの知見は、今後、群集を利用するときの基盤になると期待している。

第一章では、自然界から実験室内（閉鎖系）で重油を高分解できる微生物群集 K-3 をスクリーニングし、群集の保存方法、構成菌種、重油分解に重要な役割を担う属種を明らかにした。K-3 群は 7 日間で重油(10 g/l)中の飽和画分を 56 %、芳香族画分を 46 %分解した。K-3 群の重油分解率は Sugiura ら<sup>25)</sup>が確立した SM8 群より高かったことから、K-3 群は優れた重油分解能力をもつ微生物群集と考えている。

PCR-DGGE 法で K-3 群から 5 本の DNA バンドが検出されたが、コロニーを単離できたのは *Pseudomonas* 属と *Ochrobactrum* 属だけで、残り 3 本のバンドをもつ菌を単離することはできなかった。DGGE 法を活用すると、これまでブラックボックスとして扱われてきた難培養性微生物も含めて、群集を構成するほぼ全ての微生物を DNA バンドで検出することができるようになってきた。しかし、群集の機能を明らかにするためには、全ての微生物を単離して個々の特徴ある性状を明らかにする必要がある、難培養性微生物を単離する新たな技術開発が求められる。

*Pseudomonas* 属が種々の飽和および芳香族炭化水素を分解できること

は古くから知られており、炭化水素分解経路も詳細に研究されている<sup>24, 29, 40)</sup>。たとえば、Foght<sup>29)</sup>らが単離した *Pseudomonas* sp. HL7b は多環芳香族炭化水素から S-, N-, および O-複素環芳香族炭化水素まで広範囲の芳香族炭化水素を分解した。また、*Pseudomonas* 属はバイオサーファクタントを生産して分解基質を乳化することも報告されている<sup>80)</sup>。K-3 群の *Pseudomonas* 属も重油中の飽和および芳香族画分の分解に主要な役割を果たしていると考えているが、*Pseudomonas* 属 5 株を混合培養しても K-3 群の分解率に及ばなかったことから、未分離菌 (DGGE の 3 本のバンド) が炭化水素分解に直接的あるいは間接的に関与していると推察した。

第二章では、重油成分の約半分を占める難分解性の芳香族画分を 7 日間で 30 %分解できる No.22 群を新たに確立し、炭素源が変わると優勢種を変動させることによって、うまく適応していることを明らかにした。

No.22 群からは 14 本の DNA バンドが検出され、K-3 群では検出されなかった *Betaproteobacteria* 綱の細菌も検出された。単離できた *Burkholderia* と *Pandoraea* 属は *Betaproteobacteria* 綱に属する菌で、No.22 群は K-3 群とは異なる属種で構成されていた。*Burkholderia* と *Pandoraea* 属はともに *Pseudomonas* 属から独立した新属で、*Burkholderia* 属はナフタレンやピレンなどの芳香族炭化水素を分解できることが報告されている<sup>2, 4, 7)</sup>。しかし、*Pandoraea* 属が炭化水素を分解した報告はまだなく、本研究が初めてである。

飽和画分培地では Y4 株が構成菌種の 68 %を占めて圧倒的に優勢で、飽和炭化水素の分解に主要な役割を果たしていた。Y4 株は飽和炭化水素分解酵素系を生産できるだけでなく、細胞表層が疎水的で飽和炭化水と高い親和性を示した。微生物が疎水性化合物を分解するときは、分解酵素遺伝子を保有して発現させるだけでなく、基質と接触するために細胞表層の疎水度を高めることも必要であることを見出した。

芳香族画分培地では Y1 と Y4 株と *Brachymonas* sp. F が優勢種になっていると考えている。しかし、クローンライブラリーと定量リアルタイム

PCR 法で Y1 と Y4 株の構成比率が異なっていた。とくにリアルタイム PCR 法では Y1 と Y4 株の比率が 33 %と低かったことから、2 株以外に未分離の構成菌が芳香族炭化水素の分解に直接あるいは間接的に関与している可能性が考えられる。

しかし、未分離の菌を単離して芳香族炭化水素分解能力を試験しないと、明確な結論を出すことができない。ここでも、難培養性微生物を単離する技術開発が求められる。

第三章では、No.22 群から単離した 3 株が芳香族炭化水素分解時に群集内で果たす役割を検討した。とくに、*H. facile* Y3 は芳香族炭化水素を分解できる Y1 や Y4 株と違い芳香族炭化水素非分解菌であり、No.22 群が芳香族炭化水素を分解するときの役割に興味をもった。

Y3 株培養液上清の凍結乾燥物は、濃度依存的に Y1 と Y4 株の生育と分解活性を高めたことから、分解菌が要求する微量物質を生産している可能性が高い。*Hyphomicrobium* 属は PQQ を生産することが報告されている<sup>69)</sup>ことから、類似化合物を生産している可能性は十分考えられる。

また、Y3 株はムコ多糖を生産した。ムコ多糖はバイオフィルムの構成成分で *Hyphomicrobium* 属が生産することは知られている<sup>70)</sup>。分解基質である炭化水素は難水溶性物質である。芳香族炭化水素を水溶液中では油状ではなく固形物として存在している。分解菌は固形物の基質に付着しないと基質を分解することができないため、水溶液中で固形物の基質と分解菌が接触する頻度が極めて低いと分解率は低くなる。しかし、Y3 株の生産するムコ多糖は、水溶液中では難水溶性の分解基質と分解菌を付着させて分解菌と基質との接触頻度を高める場を提供する。つまり、Y3 株の生産するムコ多糖によりバイオフィルムが形成されることが、3 株混合培養液の高い芳香族炭化水素分解率をもたらすもっとも大きな理由であると考えている。

しかし、Y1 と Y3 株、Y4 と Y3 株の 2 株混合培養系では No.22 群に匹敵する高い分解率が得られなかった。この結果はバイオフィルム上では

Y1 と Y4 株の芳香族炭化水素分解に相乗あるいは相加効果が存在することを示している。

重油を微生物で分解するというと、重油成分の分解に直接関わる微生物が研究対象とされてきた。単離株を混合培養して群集を構成させるときも、分解菌が選抜されている。たとえば、*Pseudomonas* と *Bacillus* 属からなる重油分解菌を混合培養すると、単一種よりも高い分解率を示したと報告されている<sup>81)</sup>。

Y3 株のような非分解菌の働きや存在は、これまでほとんど注目されなかった。本章で得られた結果は、重油分解菌の周辺に存在する非分解菌が間接的に機能し、働く重要性を明らかにすることができた。今後これまでと異なる視点から微生物を見直し、このような脇役微生物にも焦点をあてた研究も必要であることを示すことができた。

自然環境中には 99%の未知微生物が存在し、これからは微生物利用分野において貴重な資源であり、今後、高度な活用方法を確立することが求められる。この中から優れた能力をもつ微生物が新たに単離されることも期待するが、群集の中で本来の能力を発揮できる微生物も多数存在していると予測され、難培養性微生物がもつ未知の機能と微生物の組み合わせによる相乗効果についても更なる研究が必要と考えられる。

本研究は、微生物群集の有効性を示し、今後の群集利用に貴重な知見を提供するものである。

## 参考文献

- 1) Clutter, D.R., L. Petrakis, R.L. Stenger and R.K. Jensen. 1972. Nuclear magnetic resonance spectrometry of petroleum fractions. Carbon-13 and hydrogen nuclear magnetic resonance characterizations in terms of average molecular parameters. *Anal. Chem.* **44**: 1395-1405.
- 2) Pedro, M.S., S. Haruta, K. Nakamura, M. Hazaka, M. Ishii and Y. Igarashi. 2003. Isolation and characterization of predominant microorganisms during decomposition of waste materials in a field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.* **95**: 368-373.
- 3) Rosini, F.D. 1960. Hydrocarbons in petroleum. *J. Chem. Educ.* **39**: 554-561.
- 4) Clutter, D.R., L. Petrakis, R.L. Stenger and R.K. Jensen. 1972. Nuclear magnetic resonance spectrometry of petroleum fractions. Carbon-13 and hydrogen nuclear magnetic resonance characterizations in terms of average molecular parameters. *Anal. Chem.* **44**: 1395-1405.
- 5) Ahn, I.S., W.C. Ghiorse, L.W. Lion and M.L. Shuler. 1998. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* G7 on naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 587-594.
- 6) Heitkamp, M.A., J.P. Freeman, D.W. Miller and C.E. Cerniglia. 1998. Pyrene-degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2556-2565.

- 7) Tongpim, S. and M.A. Pickard. 1996. Growth of *Rhodococcus* S1 on anthracene. *Can. J. Microbiol.* **42**: 289-294.
- 8) Juhasz, A.L., M.L. Britz and G.A. Stanley. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene and dibenz[*a,h*]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 189-198.
- 9) Watanabe, K.. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 237-241.
- 10) Leahy, J.G. and R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**: 305-315.
- 11) Amann, R.I., W. Ludwig and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- 12) Torsvik, V., L. Ovreas and T.F. Thingstad. 2002. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science.* **296**: 1064-1066.
- 13) Watanabe, K. and N. Hamamura. 2003. Molecular and physiological approaches to understand the ecology of pollutant degradation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 289-295.
- 14) Rosado, A., L. Seldin, A. Wolters and J. van Elsas. 1997. Molecular Microbial Ecology: a minireview. *Braz. J. Microbiol.* **28**: 135-147.
- 15) Kanaly, R.A., R. Bartha, K. Watanabe and S. Harayama. 2000.

Rapid Mineralization of Benzo[*a*]pyrene by a Microbial Consortium Growing on Diesel Fuel. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4205-4211.

16) Chhatre, S., H. Purohit, R. Shanker and P. Khanna. 1996. Bacterial consortia for crude oil spill remedation. *Wat. Sci. Tech.* **34**: 187-193.

17) Goto, M., M. Kato, M. Asaumi, K. Shirai and K. Venkateswaran. 1994. TLC/FID method for evaluation of the crude-oil-degrading capability of marine microorganisms. *J. Mar. Biotechnol.* **2**: 45-50.

18) Hamamura, N. and J. Arp Daniel, 2000. Isolation and characterization of alkane-utilizing *Nocardioides* sp. strain CF8. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 21-26.

19) Ziiou, J., M.A. Bruns and J.M. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 316-322.

20) Muyzer, G.. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek.* **73**: 127-141.

21) Evans, F.F., L. Seldin, G.V. Sebastian, S. Kjelleberg, C. Holmström and A.S. Rosado. 2004. Influence of petroleum contamination and biostimulation treatment on the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based-PCR and DGGE. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 93-98.

22) Kästner, M. and B. Mahro. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic



matrix of compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 668-67.

23) Zhu, H., F. Qu and L. Huang-Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria. *Nucleic Acids Res.* **22**: 5279-5280.

24) Shinoda, Y., N. Kato and N. Morita. 2000. Phylogenetic analysis of a bacterium by sequencing its 16S ribosomal RNA gene. *島津評論* **57**: 121-132.

25) Sugiura, K., M. Ishihara, T. Shimauchi and S. Harayama. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 45-51.

26) Viñas, M., M. Grifoll, J. Sabaté and A.M. Solanas. 2002. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 252-260.

27) Maeng, J.H., Y. Sakai, A. Tani and N. Kato. 1996. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of *n*-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.* **178**: 3695-3700.

28) Kim, T.J., E.Y. Lee, Y.J. Kim, K.S. Cho and H.W. Ryu. 2003. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 411-417.

29) Chen, S.H. and M.D. Aitken. 1999. Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic

hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. Environ. Sci. Technol. **33**: 435-439.

30) Komukai-Nakamura, S., K. Sugiura, Y. Yamauchi-Inomata, H. Toki, K. Venkateswaran, S. Yamamoto, H. Tanaka and S. Harayama. 1996. Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude oil. J. Ferment. Bioeng. **82**: 570-574.

31) Habe, H and T. Omori. 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. **67**: 225-243.

32) Kubota, M., M. Nodate, M. Yasumoto-Hirose, T. Uchiyama, O. Kagami, Y. Shizuri and N. Misawa. Isolation and functional analysis of cytochrome P450 CYP153A genes from various environments. Biosci. Biotechnol. Biochem. **69**: 2421-2430.

33) Muyzer, G.. 1993. Profiling of complex microbial by Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 695-700.

34) Watts, J.E.M., Q. Wu, S.B. Schreier and K.R. Sowers. 2001. Comparitative analysis of polychlorinated biphenyl-dechlorinating communities in enrichment cultures using three different molecular screening techniques. 2001. Environ. Microbiol. **3**: 710-719.

35) Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii and Y Igarashi. 2004. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of

a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. FEMS Microbiol. Ecol. **51**: 133-142.

36) Sekiguchi, H., M. Watanabe, T. Nakahara, B. Xu and H. Uchiyama. 2002. Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 5142-5150.

37) Hori, T., S. Haruta, Z.J., Cui, M. Ishii and Y. Igarashi. 2006. Dynamic transition of a methanogenic population in response to the concentration of volatile fatty acid in a thermophilic anaerobic digester. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 1623-1630.

38) Kato, S., S. Haruta, Z.J. Cui, M. Ishii and Y. Igarashi. 2005. Stable coexistence of five bacterial strains as a cellulose-degrading community. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 7099-7106.

39) Kang, H., S.Y. Hwang, Y.M. Kim, E. Kim, Y.-S. Kim, S.-K. Kim, S.W. Kim, C.E. Cerniglia, K.L. Shuttlesworth and G.J. Zylstra. 2003. Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain. Can. J. Microbiol. **49**: 139-144.

40) Harpel, M.R. and J.D. Lipscomb. 1990. Gentisate 1,2-Dioxygenase from *Pseudomonas*. J. Biol. Chem. **265**: 6301-6311.

41) Parales, R. E., J.V. Palales and D.T. Gibson. 1999. Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity. J. Bacteriol. **181**: 1831-1837.

- 42) Schraa, G., M.L. Boone, M.S.M. Jetten, A.R.W. van Neerven, P.J. Colberg and A.J.B. Zehnder. 1986. Degradation of 1,4-Dichlorobenzene by *Alcaligenes* sp. strain A175. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1374-1381.
- 43) Cavalca, L., E. Dell'Amico and V. Andreoni. 2004. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. *Appl. Microbial. Biotechnol.* **64**: 576-587.
- 44) Fujisawa, H. and O. Hayashi. 1968. Protocatechuate 3,4-dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **243**: 2673-2681.
- 45) Ensley, B.D., B.J. Ratzkin, T. D. Osslund, M.J. Simon, L.P. Wackett and D.T. Gibson. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* result in the biosynthesis of indigo. *Science* **222**: 167-169.
- 46) Iwabuchi, T. and S. Harayama. 1998. Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. *J. Biol. Chem.* **273**: 8332-8336.
- 47) Uz I., Y.P. Duan and A. Ogram. 2000. Characterization of the naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**: 231-238.
- 48) Zhang, H., A. Kallimanis, A.I. Koukkou and C. Drainas. 2004. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic

aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 124-131.

49) Rosenberg, M., D. Gutnick and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 29-33.

50) Coenye, T., E. Falsen, B. Hoste, M. Ohlen, J. Goris, J.R.W. Govan, M. Gillis and P. Vandamme. 2000. Description of *Pandoraea* gen. nov. with *Pandoraea apista* sp. nov., *Pandoraea pulmonicola* sp. nov., *Pandoraea pnomenusa* sp. nov., *Pandoraea sputorum* sp. nov. and *Pandoraea norimbergensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 887-899.

51) Okeke, B.C., T. Siddique, M.C. Arbestain and W.T. Frankenberger. 2002. Biodegradation of gamma-hexachlorocyclohexane (lindane) and alpha-hexachlorocyclohexane in water and a soil slurry by a *Pandoraea* species. *J. Agric. Food. Chem.* **50**: 2548-2555.

52) Hirsch, P. 1989. Genus *Hyphomicrobium* Stutzer and Hartleb 1898, 76<sup>AL</sup>, In L.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig and J.G. Holt (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. **3**: 1895-1904.

53) Ghisalba, O., P. Cevey, M. Kuenzi, and H.-P. Schar. 1985. Biodegradation of chemical waste by specialized methylotrophs, an alternative to physical methods of waste disposal. *Conserv. Rec.* **8**: 47-71.

- 54) De Marco, P., J.C. Murrell, A.A. Bordalo and P. Moradas-Ferreira. 2000. Isolation and characterization of two new methanesulfonic acid-degrading bacterial isolates from a Portuguese soil sample. *Arch. Microbiol.* **173**: 146-153.
- 55) Pedro, M.S., S. Haruta, M. Hazaka, R. Shimada, C. Yoshida, K. Hiura, M. Ishii and Y. Igarashi. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.* **91**: 159-165.
- 56) Rouvière P.E. and M.W. Chen. 2003. Isolation of *Brachymonas petroleovorans* CHX, a novel cyclohexane-degrading  $\beta$ -proteobacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **227**: 101-106.
- 57) Muller, J.G., R. Devereux, D.L. Santavy, S.E. Lantz, S.G. Willis and P.H. Pritchard. 1997. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 329-343.
- 58) Okeke, B.C., T. Siddique, M.C. Arbestain and W.T. Frankenberger. 2002. Biodegradation of *gamma*-hexachlorocyclohexane (lindane) and *alpha*-hexachlorocyclohexane in water and a soil slurry by a *Pandoraea* species. *J. Agric. Food. Chem.* **50**: 2548-2555.
- 59) Siddique, T., B.C. Okeke, M. Arshad and W.T. Frankenberger, Jr.. 2003. Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms. *J. Environ. Qual.* **32**: 47-54.
- 60) Viñas, M., J. Sabaté, C. Guasp, J. Lalucat and A.M. Solanas. 2005.

Culture-dependent and -independent approaches establish the complexity of a PAH-degrading microbial consortium. *Can. J. Microbiol.* **51**: 897-909.

61) Ho, Y., M. Jackson, Y. Yang, J.G. Mueller and P.H. Pritchard. 2000. Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and sediments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 100-112.

62) Prabhu, Y. and P.S. Phale. 2003. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 342-351.

63) Ameyama, M., M. Hayashi, K. Matsushita, E. Shinagawa and O. Adachi. 1984. Microbial production of pyrroloquinoline quinone. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 561-565.

64) Shimao, M., H. Saimoto, N. Kato and C. Sakazawa. Properties and roles of bacterial symbionts of polyvinyl alcohol-utilizing mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 605-610.

65) Marshall, K.C. and R.C. Cruickshank. 1973. Cell surface Hydrophobicity and the orientation of certain bacteria at interfaces. *Arch. Mikrobiol.* **91**: 29.

66) Banks M.K. and J.D. Bryers. 1991. Bacterial species dominance within a binary culture biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1974-1979.

- 67) Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner and K.H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass of proteobacteria : problem and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
- 68) Shimao M., I. Fujita, N. Kato and C. Sakazawa. 1985. Enhancement of pyrroloquinoline quinone production and polyvinyl Alcohol degradation in mixed continuous cultures of *Pseudomonas putida* VM15A and *Pseudomonas* sp. strain VM15C with mixed carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 1389-1391.
- 69) Anthony, C.. 1982. "The Biochemistry of Methylophs," Academic Press Inc., New York, N.Y. pp.152-194.
- 70) Lyton, A.C., P.N. Karanth, C.A. Lajoie and G.S. Sayler. 2000. Quantification of *Hyphomicrobium* Populations in Activated Sludge from an Industrial Wastewater Treatment System as Determined by 16S rRNA Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1167-1174.
- 71) Hattori, M., J. Arita, N. Tabuchi, S. Koike and H. Nakamura. 2005. Fractional determination of sodium chondroitin sulfater / hydroxypropylmethylcellulose mixture using Alucian Blue 8GX. *Bunseki Kagaku* **52**: 259-263.
- 72) Maier, R.M. and G. Soberron-Chavez. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids : biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 625-633.



- 73) Ho, Y., Jackson, M., Yang, Y., Mueller, J.G. and Pritchard P.H. 2000. Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and sediments. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 100-112.
- 74) Erikssona, M., G. Dalhammara and W.W. Mohn. 2000. Bacterial growth and biofilm production on pyrene. *FEMS Microbiol. Ecol.* **40**: 21-27.
- 75) Tsuji, H.. 1996. Bioremediation for oil polluted soil. p. 146-156. *In* T. Kodama (ed.), Actual technology of bioremediation. CMC Publishing Co. Ltd, Tokyo, Japan.
- 76) Bragg, J.R., R.C. Prince, E.J. Harner and R.M. Atlas. 1994. Effectiveness of bioremediation for the *Exxon Valdez* oil spill. *Nature.* **368**: 413-418.
- 77) 清水潮: 1978. 微生物の生態 5, 日本微生物生態学会編, 学会出版センターp. 197.
- 78) Foght, J.M. and W.S. Westlake. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1135-1141.
- 79) Munakata-Marr, J., P.L. McCarty, M.S. Shields, M. Reagin and S.C. Francesconi. 1996. Enhancement of trichloroethylene degradation in aquifer microcosms bioaugmented with wild type and genetically altered *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* G4 and PR1. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 2045-2052.

80) Barathi, S. and N. Vasudevan. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ. Int.* **26**: 413-416.

81) Rahman, K.S.M., J. Thahira-Rahman, P. Lakshmanaperumalsamy and I.M. Banat. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour. Technol.* **85**: 257-261.

## **Studies on the isolation and ecological functions of microbial consortia able to degrade crude petroleum at high rates**

### **Summary**

Bioremediation proved an extremely practical way of decomposing petroleum spilled from a stranded tanker and destroyed oil wells, because of low environmental loading, low cost, and treatment of large polluted areas.

Crude petroleum contains many hydrocarbons which are fractionated into four fractions, saturated and aromatic hydrocarbons, resins, and asphaltenes by silica gel chromatography. Pure cultures of microorganisms generally degrade only a limited number of the compounds found in crude petroleum, but the mixed microbial populations composed of many different bacterial species often achieve a greater degree of biodegradation.

A microbial consortium containing a number of microorganisms which synthesize the degradable enzymes of different parts of the decomposition pathway is considered to be well suited to the degradation of crude petroleum. Another microorganism in the consortium also probably plays a role in the production of micronutrients for other microorganisms in the consortium and in the production of a surface-active agent for the solubilization of hydrocarbons.

We have established, for the first time, two consortia able to degrade crude petroleum at high rates. The microbial species constituting two consortia were analyzed by a combination of colony isolation and the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) -based analysis of 16S rRNA gene fragments directly

extracted from the culture.

Additionally, a transition in the predominant strain in the consortium cultured on media with saturated and aromatic hydrocarbons was analyzed using a combination of PCR-DGGE, clone library, and quantitative real-time PCR. The clarification of species and behavior of microorganisms constituting the consortium should help to provide a stable and high degrading ability for the bioremediation of crude petroleum.

### **1. Isolation and phylogenetic characterization of the consortium K-3 able to degrade crude petroleum at high rates.**

Consortium K-3, capable of degrading 56 % of saturated and 46 % of aromatic hydrocarbons in 10 g/l of crude petroleum, was screened from crude petroleum-contaminated soil. PCR-DGGE and a colony isolation procedure gave five DNA bands, and six different-shaped colonies, respectively, from the K-3 consortium. Uncultured bacteria that failed to be isolated were shown. Among the strains isolated from the K-3 consortium, *Pseudomonas aeruginosa* was the predominant species and decomposed aromatic hydrocarbons in the presence of saturates.

We successfully established basic techniques for screening and preservation of the K-3 consortium, and the analysis of the bacteria constituted the consortium.

### **2. Isolation of consortium No.22 able to degrade aromatic hydrocarbons at high rates and the change in the predominant strain in the consortium cultured on media with saturated and aromatic hydrocarbons.**

Consortium No.22, capable of degrading 66% of aromatics (4 g/l) without supplementation with saturates in fourteen days was screened from crude petroleum-contaminated soil. PCR-DGGE and a colony isolation procedure gave fourteen DNA bands and three different-shaped colonies, respectively, from the No.22 consortium. DNA bands from the No.22 consortium were related to *Alpha*-, *Beta*- and *Gammaproteobacteria*. The predominant bacteria in the consortium No.22 changed from *Burkholderia multivorans* Y4, *Pandoraea* sp. Y1, and *Brachymonas* sp. F to *B. multivorans* Y4 when the consortium was transferred from a medium with aromatic hydrocarbons to one with saturated hydrocarbons. Strain Y4 probably played an important role in the degradation of saturates and aromatics in the consortium, and *Pandoraea* sp.Y1 and *Brachymonas* sp. F played a role in the degradation of aromatics in the consortium with strain Y4. Strain Y4 was able to degrade saturated hydrocarbons with C<sub>16</sub> to C<sub>28</sub> and showed high affinity for saturated hydrocarbon with C<sub>8</sub> and C<sub>16</sub>, whereas Y1 showed no degradation and affinity for saturated hydrocarbons. Strains Y1 and Y4 were able to degrade aromatic hydrocarbons and had the high affinity for xylene. Both strains had a partially different decomposition pathway of phenanthrene.

### **3. Construction of a consortium by a mixed-culture system composed of isolates from consortium No.22, and the role of non-degrading bacteria in the degrading of aromatic hydrocarbons.**

*Hyphomicrobium facile* Y3, a methylotrophic bacterium, had little ability to assimilate and decompose aromatics, but a mixed culture

consisting of three strains (Y1, Y4, Y3) degraded aromatics at a high rate compared with a mixed culture consisting of strains Y1 and Y4. Strain Y3 produced some substances which stimulated the growth of strains Y1 and Y4, and their activity decomposed hydrocarbons. Strain Y3 also produced a number of mucopolysaccharides, which were stained by Alcian Blue dye in the culture. The mucopolysaccharide was a substance like biofilm. The production of a substance like biofilm by strain Y3 was also confirmed by FISH analysis of strain Y3. Strains Y1 and Y4, and solid materials appearing to be water-insoluble aromatic hydrocarbons, adhered to it and microflora were formed. A number of strains of Y1 and Y4 were observed on and around the solid materials adhering to the biofilm. These results show that strain Y3 supports the biodegradation of aromatic hydrocarbons by strains Y1 and Y4, and the degradation rate of the consortium constructed by three strains might lead to acceleration.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました近畿大学農学部教授、藤田藤樹夫先生、同教授、岸本憲明先生に謹んで感謝の意を表します。また、御助言いただきました吉岡佐知子助手に感謝いたします。

本論文を取りまとめるにあたり、有益なご助言を頂き校閲の労をお取りいただきました近畿大学農学部教授、江口充先生に厚く御礼申し上げます。

リアルタイム PCR や DGGE 実験では、機器の利用にあたり終始懇切なるご指導をいただきました東京大学教授、五十嵐泰夫先生、同助教授、石井正治先生、寄付講座教員、春田伸先生ほか、東京大学農学部応用微生物学研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

機器分析に関してご協力いただきました近畿大学共同利用センターの森田全律博士、走査型顕微鏡では、近畿大学生物理工学部の助教授、斎藤卓也先生、近畿大学医学部の柴野三智子先生にご心より感謝申し上げます。

FISH 解析では蛍光顕微鏡の使用にご協力いただきました、奈良先端科学技術大学院大学助手、吉田信行先生、近畿大学教授、米虫節夫先生、同教授、坂上吉一先生にご心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり御協力いただきました大滝真裕氏、一松涼子氏、蚊谷保崇氏、中島潤氏、横見陽子氏、高村友彦氏、志摩祥子氏、山下宜容氏、奥田美沙子氏、上林直樹氏、矢野歩氏、川邊純氏、西尾宜峰氏、河合ゆずか氏、園井健太氏ほか近畿大学農学部農芸化学科応用微生物研究室の卒業生諸氏にご心より感謝申し上げます。

### 3. 実験結果および考察

#### 3.1. 芳香族炭化水素生分解能の高い菌群の選出

20回継代培養した集積培養液から、菌の生育が良好で芳香族画分の分散が認められた No.22 群集積培養液を選出した。No.22 群は集積培地で継代培養を続けた結果、7日間で芳香族画分分解率 30 %と安定した分解率を示した(Fig.11)。添加した芳香族画分は管壁から剥がれ落ち、培養液中に乳化・分散していた (Fig. 12)。

No.22 群は、第一章で確立した K-3 群による分解が難しかった芳香族画分を、唯一のエネルギーおよび炭素源として良好に生育し高い分解能を示した。重油中の芳香族画分を安定して分解できる群集を確立した報告は、これまでにない。また、Sugiura ら<sup>25)</sup>や、Vinas ら<sup>26)</sup>が報告した重油を炭素源とした集積培地で確立した群集の芳香族画分の分解率は、20 %に満たないことと比較しても、培養 7 日間で芳香族画分を 30 %分解できる No.22 群が、高い分解能を有していることは明らかである。

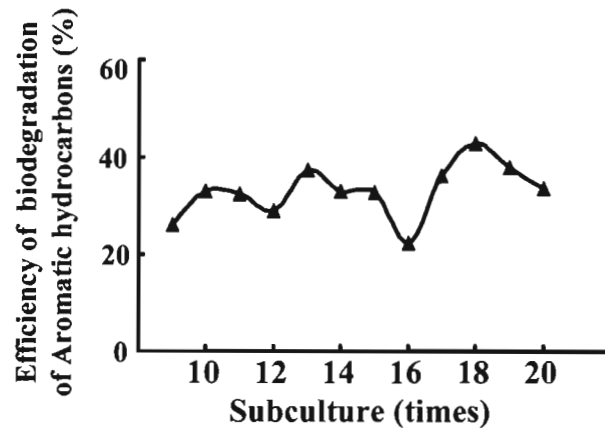


Fig. 11. Degradation of saturated and aromatic hydrocarbons by the No.22 consortium subcultured in the enrichment medium supplemented with aromatics (4.0 g/l). ▲, degradation of aromatic hydrocarbon.

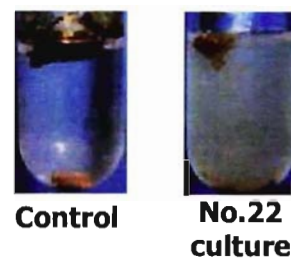


Fig. 12. Growth of the No.22 consortium in a medium with crude petroleum.



### 3.2. PCR-DGGE 法による No.22 群の群集構造解析

No.22 群を DGGE 解析した結果、14本の DNA バンド(A~N)を検出した(Fig. 13-a)。No.22 群は、K-3 群(DNA バンド 5 本)よりも多くの菌種で構成されていた。得られた DNA バンド約 200 bp の塩基配列を解析した結果、*Alpha* や *Gammaproteobacteria* の他に、K-3 群では検出されなかった *Betaproteobacteria* が多く検出された(Table 6)。炭素源を重油から芳香族画分に変えて集積培養すると、同じサンプリング地点から異なる微生物群集を得ることができた。

確立した No.22 群を 1 ヶ月間 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存後、芳香族画分添加培地に復元して継代培養を 5 回繰り返しても、生育は良好であった。しかし、その培養液を DGGE 解析すると DNA バンド数が保存前より減少していた(Fig. 13-b)。凍結に弱い微生物が群集中に存在すると考えられる。現在、No.22 群は、7 日間隔で継代培養して維持し、180 代目を越している。継代 180 回目の培養液を DGGE 解析しても DNA バンドは保持されていた。

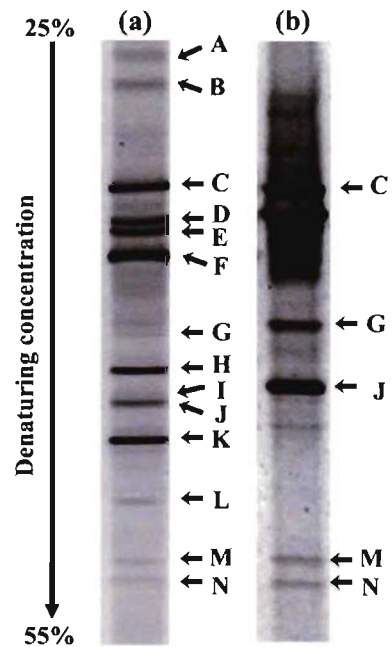


Fig. 13. DGGE of 16S rRNA gene bands obtained from the No.22 consortium subculture (a) and recovered culture (b).