



地球環境改善が期待される 嫌氣的石油分解細菌

今 中 忠 行*

Oil Assimilating Bacteria and Pollution Control

Key words: Oil Assimilating Bacteria, Pollution Control,
Pseudomonas Anaerooleophila

はじめに

我々の快適な生活を支えている最大のエネルギー源は石油である。世界の石油の総生産量は、年間約30億トンでありその約1/3が海上輸送されている。このうちの約0.1%が何らかの形で海に流出しているといわれ、これに海底油田の開発などが進めばますます海洋の油汚染が進むものと懸念される。また1989年にアラスカ湾で起きた大型タンカーの事故で大量の原油が流出したし、湾岸戦争時にはイラクにより故意に原油が放出された。

このようにして流出した原油が海洋生物に与える影響は大きく、水生生物を死滅させるといった直接的被害のみならず、間接的には食物連鎖の混乱や大気などの地球環境も悪化することになる。それでは海洋汚染対策はどうなっているのだろうか。油が海上に流出したら、まずオイルフェンスで囲んでその拡散を防ぎ、次いで吸引装置・油吸収材などで回収する。またこれら物理的方法に加えて、油処理剤で乳化分散させるなど科学的処理も併用する。しかしこれですべてが解決する訳ではなく、処理できずに広がった油は海岸に漂着したり、中には海底に沈澱するものもある。海岸に漂着した油の場合は、自然界に存在する好気性石油分解菌により徐々に

分解されるし、必要に応じてこれらの微生物と炭素源やリンなどの混合物を散布することにより生物的処理を促進することも可能である。しかしこれらの生物的処理が有効なものも酸素が存在する場所に限られている。例えば、前述したアラスカでの原油流出事故の場合、海岸線はきれいになってはいるが、それを約10cm掘ってみると、そこには黒い原油が未だに分解されずに残っているのが現状である。嫌氣的(無酸素)条件である海底に沈澱した油は、これと同様に残っているものと考えられる。このような状況を改善するには嫌氣的条件で原油を分解する微生物を発見し、これを利用することが必要であろう。この思いが研究を進めるエネルギーになっていた。

石油発酵の歴史

微生物による石油の分解が発見されたのは、19世紀末のことであるが、石油を微生物工業の原料として考え、活発な研究がなされたのは1960年ごろからである。当時、世界の将来における食糧危機が叫ばれていたのが直接の原因であり、世界中で石油分解菌の分離が試みられた。その結果、多くの細菌、酵母、カビが分離され、その生理学的研究が進んだ。石油の主要成分であるn-パラフィン(脂肪族炭化水素)は最も還元された炭素であり、これを酸化分解するには、糖質原料を用いた発酵の約3倍の酸素が必要であることが、理論的にも実験的にも明らかにされた。また現在では、いくつかの細菌が、硝酸還元・硫酸還元・メタン生成などと共役することにより、嫌氣的に芳香族炭化水



*Tadayuki IMANAKA
1945年3月25日生
1969年大阪大学大学院工学研究科
修士課程修了
現在、大阪大学工学部応用生物工
学科、教授、工学博士、バイオテ
クノロジー
TEL 06-877-5111(内線4351)

素を利用できることが認められている。そこで、われわれは脂肪族炭化水素の嫌氣的分解菌の探索を始めた。

嫌氣的 n-パラフィン分解菌の分離

特殊な性質をもつ微生物を自然界から分離するためには、目的に応じた分離源を選ばなくてはならない。そこで、われわれは油田付近から多くの土壌を採取し、これから石油分解に関わる細菌の分離を試みた。まず無機塩よりなる基本培地 (0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgCl₂, pH7) に 1.5% アガロース (寒天の主成分) を加えて固化し、その上に 30 μl の n-テトラデカン (n-TD と略す) を広げ、そこに土壌試料を塗布した。このプレートを嫌氣性混合ガス (CO₂ : H₂ : N₂ = 5 : 5 : 90) 存在下、37°C で 2 週間保存すると、この環境において生育する細菌が一株分離されたので、これを HD-1 株と名付けた。この菌株は、1% n-TD を含む液体培養では、油滴表面に付着してこれを分解利用している。

HD-1 株の諸特性

本菌株はグラム陰性の桿菌で孢子形成能はなく、酸素があっても生育できる通性嫌氣性細菌であることが確認できた。これを様々な条件で培養するうちに、n-TD を含まない培地でも生育することが明らかになり、CO₂ ガスを唯一の炭素源として利用できることが確認された。すなわち、HD-1 株は化学独立栄養細菌であるといえる。この菌は原油を初めとして、C₁₀-C₁₆ の飽和脂肪族炭化水素、環状炭化水素 (シクロヘキサン) さらには芳香族炭化水素 (トルエン、ベンゼンなど) も嫌氣的に利用することができる。またエタノールなどのアルコールを利用することはできるが、グルコースなどの糖類は利用できなかった。

この HD-1 株は好氣的条件下で炭化水素を資化することもできる (通性嫌氣性菌) ので取り扱い易い菌でもある。栄養寒天培地 (L 培地 : 0.5% 酵母エキス, 1% トリプトン, 0.5% NaCl, pH7) で好氣培養し、得られた菌体を水に懸濁すると、それぞれの細胞が側面を合わせ

て凝集しており、細胞表層が極めて疎水的であることが予想された。

そこでこの菌のクロロホルム・メタノール抽出画分としての疎水性物質含量を測定した。L 培地で培養した場合には、約 20% n-TD 添加培地で培養すると 30-50% が疎水性物質であった。一方、対照として大腸菌 (*Escherichia coli*) と枯草菌 (*Bacillus subtilis*) について調べたところ、それぞれ乾燥菌体重量の 7% と 4% であった。大腸菌が内膜と外膜の 2 層を有しており、枯草菌の細胞膜は 1 層であることから、3.5-4% の疎水性物質含量が 1 層の膜に相当すると考えられる。従って、HD-1 株は数層以上の細胞膜をもっていることが予想された。

原油分解菌の電子顕微鏡観察

HD-1 株を好氣的条件下 L 培地で培養し、透過型電子顕微鏡で細胞の断面を観察したのが図 1 である。細胞表層が異常に厚く、疎水性物質含量の多さより膜が数層以上あると予想され

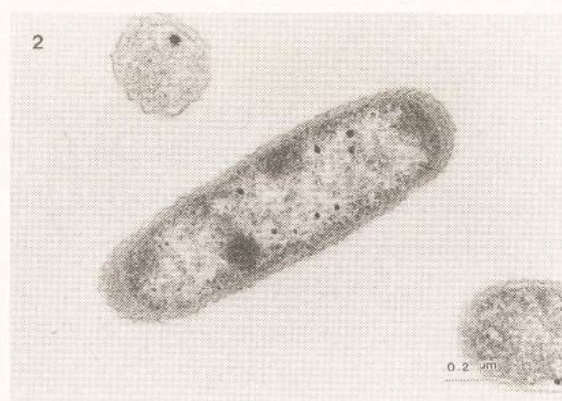


図 1

たことが実証されたものと思われる。また縦断面でも横断面でも明らかなように、表層に激しい凹凸がみられる。

同じ菌株を、嫌氣的条件下、基本培地 + n-TD で培養した場合の透過型電子顕微鏡観察結果を図 2 に示す。油の取り込みを効果的に行なうためか、細胞表層の凹凸は激しく、細胞質内には油滴と思われる胞が多数認められる。これは、細胞内に直接取り込んだ n-TD が貯蔵されているのだらうと考えられる。

以上の性質をもった菌は従来の分類には認め

今後の展望

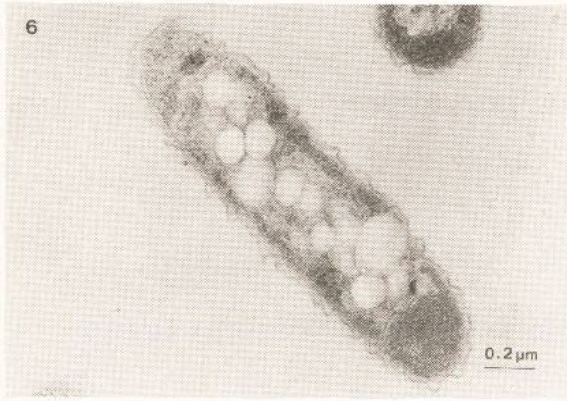


図2

られず、*Pseudomonas* 属細菌の新種とおもわれたので、嫌気条件下で石油を好むとの意味を込めて *Pseudomonas anaerooleophila* と命名した。

P. anaerooleophila の代謝経路

本菌の代謝経路を予想したのが図3である。最も酸化された状態の炭素である CO_2 は、順次還元され菌体を構成する有機物となる。この還元力は根本では H_2 から供給されており、還元型 $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ などが還元的生合成に利用されているのであろう。しかしメタンの生成は実験的に認められなかった。また *n*-TD などの飽和脂肪族炭化水素の酵素的不飽和化により、自らは酸化されながら還元力を供給し、さらには水を利用してアルコールになり、通常の代謝経路に組み込まれていくものと思われる。このように *n*-TD を添加することにより CO_2 の利用経路が強化されるであろう。

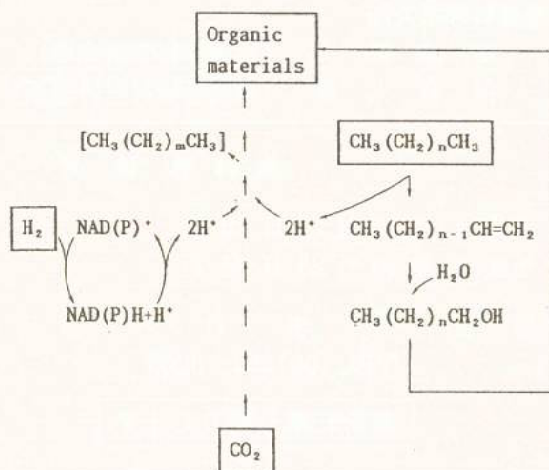


図3

我々は、光エネルギーを必要とせずまたメタンの生成を伴わずに CO_2 ガスを唯一の炭素源として無酸素状態で生育する細菌 (HD-1 株) を原油噴出口付近の土壌より分離した。石油を添加した培地で HD-1 株を培養した場合、酸素の有無に関係なく菌体増殖が促進されると共に細胞内に油滴が確認されたことから、石油も炭素源として利用していることが明らかとなった。つまり、HD-1 株は CO_2 ガスを固定化する能力と無酸素状態で石油を分解する能力を兼ね備えていると言える。

さらに HD-1 株が、細胞外にも石油に親和性のある界面活性物質を生産していることを確認している。実際、油田から分離した多くの微生物はそれぞれ固有の界面活性物質を生産していることが多い。これらの界面活性剤は生物分解性に優れ、環境保護の点から今後、合成洗剤剤にとって代わることが期待されている。そこで、これらの特性をそれぞれ強化することにより、地球環境の保護に実際に役立つものと期待できる。

一方、石油生成の由来は 19 世紀以来、論争がなされてきたにも拘わらずいまだ結論が出されていない難問題である。これまでに有力な成因説として、石油は生物の死骸からできたとする有機説と太陽系の生成時に生じたメタンガスが地殻に蓄えられて地球内部のフィッシャートロプッシュ類似反応によって石油に変化したと考える無機説が提唱されているが決定的な証拠がない。ここで述べた HD-1 株を CO_2 ガスを唯一の炭素源として生育させた場合にも、細胞内に含まれる疎水性物質の含量が非常に高い (30~40%) ことから石油の生成に HD-1 株が関与している可能性もある。

今後は本菌を用いて、

- ①タンカー事故などで分解されないまま海底に蓄積した原油を嫌氣的に処理する。
- ②地球温暖化の主な原因である CO_2 ガスを HD-1 株に固定化する。
- ③触媒として細菌が石油生成に貢献し得る可能性を追及し、炭素物質循環経路を整理する。このような研究を進めていきたいと願っている。