

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成9年度博士課程 進学

氏名 張 小凡

指導教官氏名 小柳津 広志

論文題目 多環芳香族化合物汚染土壌の修復技術

1991年イラク軍はクウェートから退去する際に788の油井を破壊し、そのうち613の油井において火災が発生し、76の油井から原油が土壌へと噴出した。一日に燃焼及び噴出した原油は約2~4百万バレルにのぼり、その状態は300日にわたって続いた。油井からあふれ出した大量の原油のうち、燃え残ったものは、オイルレイクとなった。オイルレイクはクウェートの7つの主要な油田のうちの5つの油田に位置しており、数で250以上、面積で49平方キロメートル以上である。噴出した原油は砂漠土壌に浸透し、地下水を汚染し、経済的に大きな問題となるとともに人間の健康にも多大な影響を与えるものと危惧されている。この原油によって汚染された土壌を処理、修復する既存の技術としては、物理、化学的処理が実用化されているが、経済性、安全性等の面でバイオレメディエーション技術の活用も期待されている。本研究では、クウェートの石油汚染現場を対象として、バイオレメディエーション技術の実用化をめざしたいくつかの検討を行った。

1、多環芳香族化合物汚染土壌の浄化処理技術の検討

これまでの試験によって、多環芳香族化合物汚染土壌の汚染除去を促進するための資材として椰子殻炭が優れていることが確認されている。そこで、この研究では椰子殻炭よりさらに優れた資材を探すこととした。いろいろな検討の結果、低温炭化炭が椰子殻炭より優れた資材であることが明らかとなった。低温炭化炭は石油の吸収力が高く、海洋汚染などの現場での石油の回収に利用されている。低温炭化炭と椰子殻炭の分解促進効果を比較する実験を行った結果、同じ条件で培養150日経過時点で、椰子殻炭ではTEMで平均

約 32 % が減少したが、低温炭化炭では平均約 40 % の減少が確認され、低温炭化炭が椰子殻炭以上の分解促進効果を発揮することが確認された。次に、日本の土壌をクウェート石油汚染土壌に添加することにより、石油分解が促進されるか検討した。この結果、クウェート石油汚染土壌に 10 % の割合で日本の土壌を添加することによって、著しく石油成分分解が促進された。また、この混合土壌を新しいクウェート汚染土に 10 % の割合で添加すると、同様に分解が促進された。このことは、クウェート土壌の微生物相が貧弱であることが、石油成分の分解を遅らせていることを示している。

2、多環芳香族化合物分解菌の単離、同定、及び分解機構の検討

1 の実験、及びこれまで当研究室で行なわれた一連の実験結果から、クウェートの汚染現場においてより効果的に汚染を除去するためには、石油成分特に多環芳香族化合物分解菌の添加が有効であると考えられた。そこで、多環芳香族化合物のモデル物質としてピレンとフェナントレンを選び、これを唯一の炭素源、エネルギー源として生育する菌株のスクリーニングを行った。この結果、ピレン、フェナントレンを分解する菌株各 1 株を取得した。リボソーム 16S rRNA の部分塩基配列の解読、及びホモロジー検索により、2 株とも *Sphingomonas* 属に含まれると判断され、それぞれ PY3 と PH2 に命名した。PY3 株及び PH2 株の芳香環の分解経路を解明するため、インドール、及び 2,3-ジヒドロキシビフェニルなどを用い、その分解性を調べた。また、フェナントレンを用い、休止菌体反応を行った。GC-MS 分析を行った結果、それらの菌株による多環芳香族化合物の分解は初発酸化を経由し、メタ開裂で分解が進むことが示された。これらの菌株は、クウェート土壌から集積されたもので、クウェート石油汚染現場にも適応すると考えられた。また、*Sphingomonas* 属は、これまで歴史的に人畜に重篤な病気は全く引き起こしていないため、微生物添加（バイオオーグメンテーション）に利用可能と考えられた。

3、*Sphingomonas* のピレン分解遺伝子のクローニングと塩基配列の解読

実験 2 で分離されたピレン分解菌を微生物添加試験に使用するためには、添加細菌の菌数のモニタリングの必要がある。そこで、この研究では PY3 株を用いてピレンの分解に関与する遺伝子をクローニングし、塩基配列を解読し、この遺伝子でモニタリングすることとした。PY3 株から全 DNA を抽出し、制限酵素で部分消化して、その DNA の部分断片を大腸菌 PUC119 プラスミドに組込んで、大腸菌 JM109 細胞内でクローン化した。また、2,3-ジヒドロキシビフェニルの分解力を指標にして大腸菌から活性を示すコロニー

をスクリーニングし、メタ開裂酵素遺伝子を取得した。これらの遺伝子は大腸菌に入れ、2,3-ジヒドロキシビフェニルの休止菌体反応を行った。TLC 及び GC-MS 分析した結果、2,3-ジヒドロキシビフェニルの中間代謝物である安息香酸が検出され、この菌による芳香族化合物の分解は初発酸化を經由し、メタ開裂して分解が進むことが明らかになった。これらの遺伝子の塩基配列を解析した結果、6つの ORF が含まれ、いずれも芳香族化合物のメタ開裂遺伝子と関連していることが示された。また、ホモロジー検索により、他のメタ解裂遺伝子に対する遺伝子レベルの相同性は極めて低いことが確認されたため、この菌株の特異配列を定量的 PCR で測定することによって定量が可能と判断された。

4、石油汚染土壌におけるバイオオーグメンテーションの適用

バイオオーグメンテーション実験には多環芳香族化合物（ピレン）分解菌である *Spingomonas* sp. PY3 株を用いた。実験は、まず室内実験によって行い、この結果に基づいて野外実験を試みた。微生物の添加方法については添加後に菌数が減少することを押さえるための種々の検討を行った。分解の程度は EPA 指定の 16 種類の多環芳香族炭化水素の残留を指標として評価した。添加資材については、低温炭化炭と珪藻土を中心に調整した資材中で高い生残数を維持することが分かった。この方法による微生物添加試験を室内実験で行った。添加後 1 ヶ月培養を行い、HPLC 分析で多環芳香族化合物の残量を分析した結果、ベンズアントラセン、フルオランテンなどの顕著な減少が確認された。しかしながら、ピレンについては減少は確認されなかった。次に、この菌株を用いた添加試験をクウェートブルガン油田のオイルレイク 102 付近に設置された試験地で行った。多環芳香族化合物の残量を分析した結果、バイオオーグメンテーション効果が確認された。

5、モニタリング方法の検討

モニタリングは、PY3 株の 16S rRNA 配列をターゲットとした蛍光プローブを作製し、相補的塩基配列が引き合う性質を示すことを利用して、土壌から抽出されたバクテリア画分を染色する（Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)）方法、PY3 株の芳香環のメタ解裂遺伝子の特異配列をターゲットとして、定量的 PCR で測定する方法、及び PY3 株の 2,3-ジヒドロキシビフェニルの分解性を利用して、コロニーカウントで計数するなどの方法を併用して行った。この結果、FISH 法は *Spingomonas* 特異的プローブを使用したため、PY3 株を特異的に染めることができず、正確な計数には適さないと判

断された。2,3-ジヒドロキシビフェニルの分解活性を指標としたコロニーカウントでは、クウェート土壤中にバックグラウンドとしてこの活性を示す菌株は検出限界以下でしか存在しないため、計数が可能であった。コロニーカウントを基本として、野外試験においてPY3株をモニタリングした結果、添加時に1g土壤あたり 6×10^7 個生息したが、その後10日後までは、 10^6 レベルで残存していることが確認された。しかしながら、14日目以降は急激に菌数の減少が見られた。今後、この減少の原因を解明し、安定に生残させる技術の確立が必要である。

本研究では、クウェート石油汚染土の浄化処理のため、石油成分分解促進資材の添加、石油成分分解菌の分離と同定、分解菌の添加及びモニタリングの方法等について検討を行った。この結果、以下のことが明らかとなった。多様な成分を含む原油を微生物を用いて分解するには、土壤中に存在する多くの微生物の潜在的な分解活性を十分に引き出し分解させると共に、分解能力をさらに強化する意味で分解促進資材を適切な方法で添加することが重要であると考えられた。土壤から分離した多環芳香族化合物分解菌PY3株の添加はクウェート汚染土壤中においても十分分解力の増強に繋がる可能性があることが示された。また現場の環境下において有効なモニタリング方法を確立した。今後は、今回行ったような実際の汚染現場での分解試験から得られる基礎的知見をさらに集積し、適切な分解促進資材の添加、菌株の添加及び添加方法などの検討によって、様々な環境条件下に応用可能なバイオレメディエーション技術が確立できるものと期待される。