

報告

Moraxella sp. KE-2991による石油系炭化水素類の分解とその特徴について

惣田 昱夫
(環境工学部)

Noto

Characteristics of Degradation of Petroleum Hydrocarbons by *Moraxella* sp. KE-2991

Ikuo SOUTA
(Environmental Engineering Division)

キーワード：原油，微生物分解，炭化水素，代謝，バイオレメディエーション

1. はじめに

原油の輸送途上での事故等により流出した原油は海洋等を広く汚染し、多くの海洋生物等に被害を与えている¹⁾。最近では、原油等による汚染量が多くなり、自然環境中における浄化能力をこえ、次第に環境汚染物質として増加しつつあり、その除去対策が急がれている²⁾。特に、海底中には処理できなかった原油中の長鎖炭化水素類がタール・ボールとなり沈殿し海底資源に被害を与えている³⁾。

これまで石油系炭化水素類の微生物分解に関する研究が多数行われ、微生物分解の特徴やその代謝経路の解明が行われている³⁾⁻⁵⁾。海底等に堆積するタール・ボール等の難分解性物質の生物処理を行う場合、主成分である長鎖炭化水素類の微生物分解に関する知見が必要となる⁶⁾。しかし、海底に蓄積しつつあるタール・ボール等の微生物分解に関する知見は、難分解性であることや分析上の問題もあり、これまで比較的少ない。

そこで、タール・ボール等長鎖の炭化水素類の微生物分解や分解代謝物質等に関する基礎的資料を得るため、海洋から分離した原油分解菌 *Moraxella* sp. KE-2991株⁷⁾を用いて、この長鎖炭化水素類及び石油系製品の分解に

関する試験を行った。その結果、若干の基礎的知見が得られたので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬及び材料

長鎖炭化水素類は、n-ヘネコンサン(C₂₁)、n-トリアコンタン(C₃₀)、n-ヘキサトリアコンタン(C₃₆)、n-テトラコンタン(C₄₀)の4種類の標準炭化水素(ガスクロ工業製)を用いた。長鎖炭化水素類を含有する製品として流動パラフィン(和光純薬工業製)とB重油(出光興産製)を用いた。n-ヘキサトリアコンタンの分解代謝物質の同定には、市販の標準物質(和光純薬工業製)、n-ヘキサデカン酸、n-オクタデカン酸(和光純薬)を使用した。

2.2 各種炭化水素類の分解試験

2.2.1 培養条件及び用いた菌種

分解試験には、海洋から分離した *Moraxella* sp. KE-29917)を用いた。試験培地は、300mlの培養フラスコに200mlの海水とペプトン0.1%を入れ、121℃で15分間高圧滅菌し、1N NaOHでpHを7.0に調整した後、n-ヘネコサン(C₂₁)、n-トリアコンタン(C₃₀)、n-ヘキ

サトリアコンタン(C₃₆), n-テトラコンタン(C₄₀)を、各々最終濃度が100ppmとなるよう添加し、作成した。この培地に、LB液体培地で24時間振盪培養した菌0.2mlを接種し、25℃、10日間、100rpmで振盪培養した。

石油製品である流動パラフィン及びB重油の分解除去に関する試験は以下の通り行った。

分解試験に用いた休止菌体は、72時間の培養したLB液体培地を遠心分離(8000rpm)後、2回生理食塩水で洗浄して作成した。この菌体約1gを海水50mlと0.5%のペプトンの入った200mlの培養フラスコに入れ、流動パラフィン及びB重油を最終濃度が0.5%となるよう添加し、72時間、60rpmの条件で分解試験を行った。また、n-ヘキサトリアコンタンの分解経時変化の試験は上記培地を用い、n-ヘキサトリアコンタンを100ppm入れた培地を5試料作成し、それぞれ0、1、2、3、4日間振盪培養した。

2.2.2 分解量の測定

分離菌による分解量の測定は以下の通り行った。所定時間培養後培養液を15分間、8000rpmで遠心分離し、菌体と上澄液とに分離後、上澄液にトルエン：ジエチルエーテル(2：1)(以下、抽出液とする)を25ml入れ、未分解の炭化水素類を抽出した。この操作を3回行った。菌体層も同様に蒸留水を25mlと抽出液を加え激しく攪拌し懸濁状態にした後、25mlのトルエンを加え、合計3回抽出した。これらの抽出液を合量し、ロータリーエバポレーターで濃縮し10ml定容量とした。この抽出液を一定量に希釈し、FID-ガスクロマトグラフ(島津製作所製、GC-16A)により定量した。キャピラリーカラムはスーパーキャップス(0.25mmI.D.×4.0m×0.1μm,東京化成工業製)を用いた。カラムの初期温度を50℃に設定し2分間保持した後、380℃まで毎分20℃で昇温させた。GCの注入口及び検出器温度は300℃に設定した。注入に当たってはスプリットレスモード(サンプリング時間2min)を使用した。キャリアガスには窒素を用い、線速度30cm/sec、メイクアップガス流量は40ml/minとした。

各種炭化水素類の分解量はあらかじめ作成した検量線を用いて定量した。内標準物にはn-ヘプタコサン(C₂₇)を用いた。また、流動パラフィン及びB重油の分解量の計算は、各種の化合物が含有しているため主ピーク20の面積をそれぞれ求め、その平均値を各製品の分解率とした。

2.2.3 n-ヘキサトリアコンタンの分解代謝物質の同定

2.2.1で作成した休止菌体1gと液体培地にn-ヘキサトリアコンタン0.1g、そして海水25mlを50mlの試験管に入れ30℃、70rpmの条件で1,2,3時間、振盪培養した。

培養後、培養液を15分間、8000rpmで遠心分離し、菌体と上澄液とに分離した。上澄液に1N HClを1ml加え酸性にした後、抽出液を25ml入れ(3回抽出する)未分解のn-ヘキサトリアコンタン及び分解代謝物質を抽出した。

これらの抽出液を合量し、ロータリーエバポレーターで濃縮し10ml定容量とした。この抽出液を100μlにジアゾメタン100μlを加えメチル化した。反応液1μlを、GC/MS(HP,Model 5890 Series II,HP 5989A MS)により同定した。キャピラリーカラムはDB-1(0.25mmI.D.×30m×0.1μm, J & W Science製)を用いた。カラム温度は40から280℃に設定し、7℃/minで昇温させた。注入口及び検出器温度は250℃に設定した。注入に当たってはスプリットレスモード(サンプリング時間2min)を使用した。キャリアガスにはHeガスを用い、EI 70eVとした。

3. 結果及び考察

3.1 *Moraxella* sp.KE-2991による各種炭化水素類の分解

各種炭化水素類の分解量は検量線を作成し、定量した。この検量線の相関係数は0.992~0.996といずれも良好な直線性を示した。図1にヘキサトリアコンタンの検量線を示した。各種炭化水素類の分解量の計算は検量線により行った。各種炭化水素類の回収率は85~88%であった。

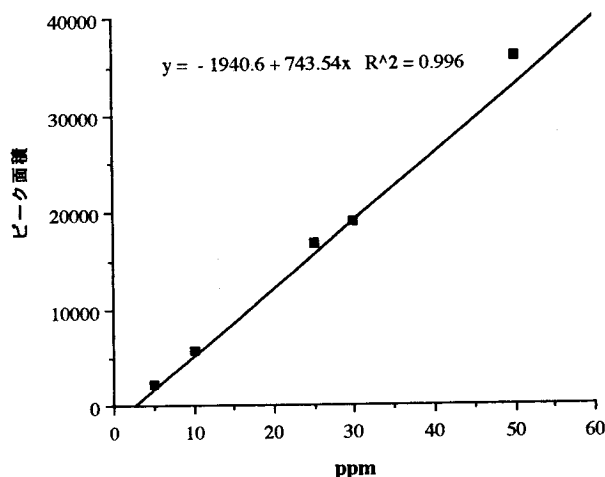


図1 n-ヘキサトリアコンタンの検量線

Moraxella sp.KE-2991による各種炭化水素類の分解結果を表1に示した。各種炭化水素類の分解率は、C₂₁ 31.6, C₃₀ 6.4, C₃₆ 7.2, C₄₀ 11.9であった。

原油分解菌KE-2991株によるC₂₁の分解率は31.6%と他の炭化水素類と比べ高いものの、炭素数が30を越えた長鎖の炭化水素類では全体に低い。なかでもC₃₀では6.4%と最も低い値である。このように、長鎖の炭化水

表1 *Moraxella* sp.KE-2991による各種炭化水素類の分解率

	n-ヘネコサン(C ₂₁)	n-トリアコンタン(C ₃₀)	n-ヘキサトリアコンタン(C ₃₆)	n-テトラコンタン(C ₄₀)
分解率(%)	31.6	6.4	7.2	11.9

素類の分解率が低くなったのは、培地に炭素源として長鎖の炭化水素類が添加されており、これらの物質を資化し、菌が生育するまでに時間がかかったためと考えられる。海水や河川等の混合菌を用いた試験でも長鎖の炭化水素類の分解は時間がかかっている³⁾⁹⁾。一般的に、その菌の持つ分解特異性が知られており、ここで各長鎖炭化水素類の分解に差が出たことは、この菌の特異性により分解率に差がでたものと推測される。

以上のように、今回の実験の結果やこれまでの知見から考えると、原油等に含有される比較的短鎖の炭化水素類(炭素数C₂₀以下)では微生物分解を早くうけ、長鎖炭化水素類では分解が遅くなる²⁾³⁾⁹⁾ものと考えられる。原油が流出した場合、貧栄養状態にある海洋では、特に短鎖の炭化水素類が微生物分解を受け、やがて長鎖の炭化水素類が分解されることになる。そのため長鎖の炭化水素類は分解が遅れるため、海底までの沈下の過程で分解量が少なくなり多くの残査が海底に沈み、堆積するものと予想される。

3.2 n-ヘキサトリアコンタンの分解経時変化

長鎖n-ヘキサトリアコンタンの分解経時変化を図2に示した。本試験は長鎖の炭化水素類を短期間に処理するため休止菌体を用いた試験である。図のように、本菌

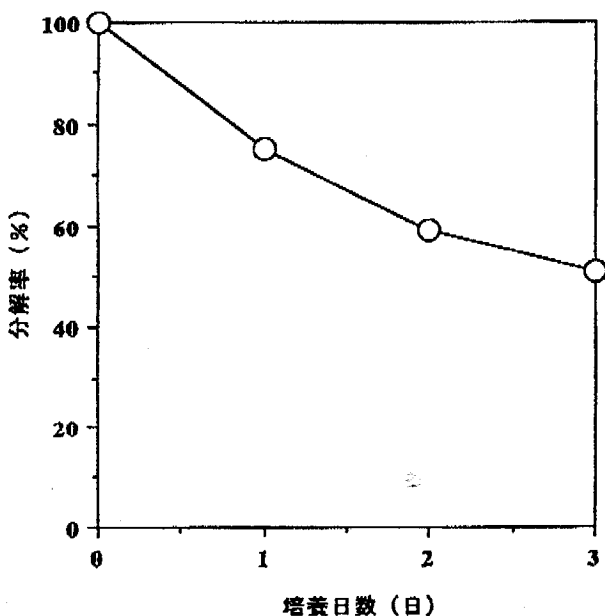


図2 EK-2991菌によるn-ヘキサトリアコンタン分析の経時変化

株によるn-ヘキサトリアコンタンのような長鎖の炭化水素の場合でも培養4日目まで分解率は49.1%を示した。この実験結果は長鎖炭化水素類の分解に休止菌体や菌の固定化を用いることにより、微生物分解の遅い長鎖炭化水素類でも短時間に分解処理できることを示している。

3.3 流動パラフィン及びB重油の分解

Moraxella sp.KE-2991による流動パラフィン及びB重油の分解結果は59.1, 49.0%であった。その流動パラフィンのクロマトグラムは図3に示した。流動パラフィンの回収率は75%, 重油では77%であった。流動パラフィンは比較的短期間に分解が進む。

*Pseudomonas*による他の分解結果(分解率は37%, 添加率が1%)⁶⁾と比較してもKE-2991菌はかなり高い分解力を持っていることが判かる。また、図3A及びBから含有物質の分解を見ると、いくつかの物質に分解が良くないものが見られる。分解は全体的に進むが、なかでも短鎖の炭化水素類(保持時間で6分以前のピーク)が長鎖類に比べ分解はやや早かった⁷⁾。

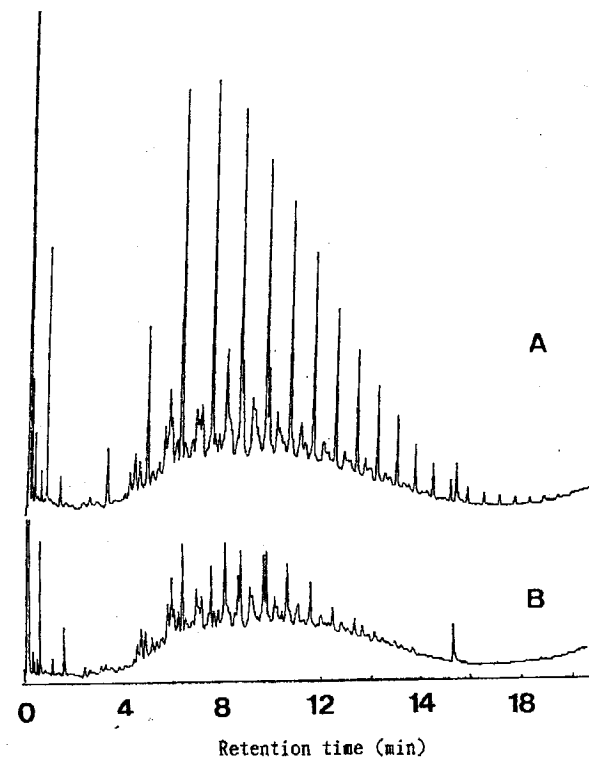


図3 流動パラフィンのガスクロマトグラム

A: 培養後の流動パラフィン

B: EK-2991株による流動パラフィンの分解残査物

B重油の分解率は流動パラフィンに比べやや低かった。このクロマトの結果でも短鎖の炭化水素類の方が分解は良好であり、その分解も全体的に進行していた。

微生物にとって難分解性の長鎖の炭化水素類を多く含有する流動パラフィン等も *Moraxella* sp. KE-2991 菌を用いることにより、比較的短時間に分解処理が出来ることを示している。これらの結果は、微生物の長鎖炭化水素類の分解の特徴を見るための基礎データとしてではなく、KE-2991 菌を用いた菌の固定化による処理を行う場合の基礎資料となるものと予想される。

以上のような結果を参考に、今後分解困難な長鎖炭化水素類を効率よく処理するため、KE-2991 株の生産する分解酵素類の性質について調べていきたいと考えている。

3.4 KE-2991 株によるヘキサトリアコンタンの分解代謝経路

KE-2991 株によるヘキサトリアコンタンの分解代謝経路を調べるため、その分解代謝物質を分離を行った。分解物のGC/MSのTICを図4に、中間代謝物質のマススペクトルを図5～6に示した。TICのピーク1はヘキサデカン酸、2はオクタデカン酸、3のピークはヘキサトリアコンタンのマススペクトルと一致した。また、ヘッドスペースを用いた実験法¹⁰⁾によりから二酸化炭素が検出された(データ未掲載)。

n-アルカン類の微生物分解は末端が酸化されアルコールを生成し、アルデヒド、カルボン酸となった後、 β 酸化をうけ二酸化炭素へと分解される⁴⁾¹¹⁾ことが明

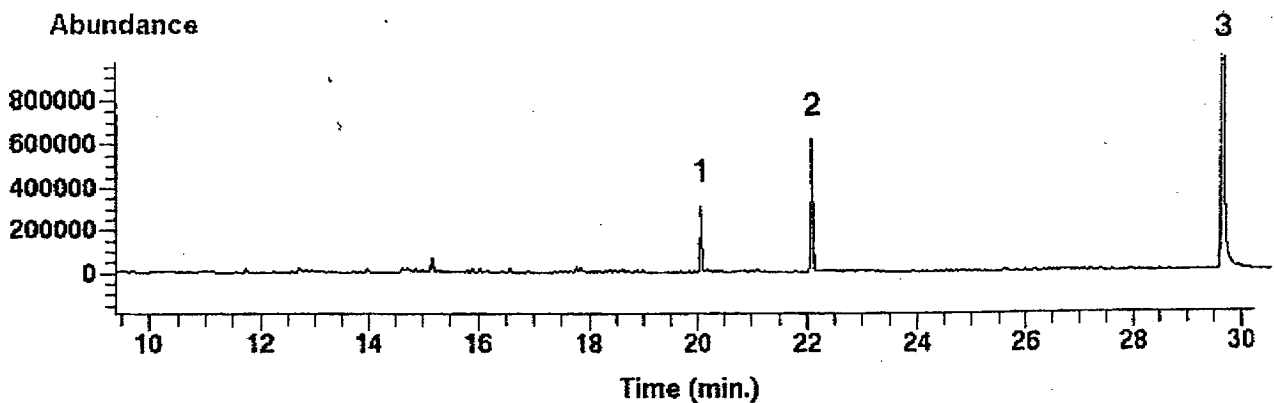


図4 KE-2991株によるn-ヘキサトリアコンタンの代謝物のTotal ion chromatogram

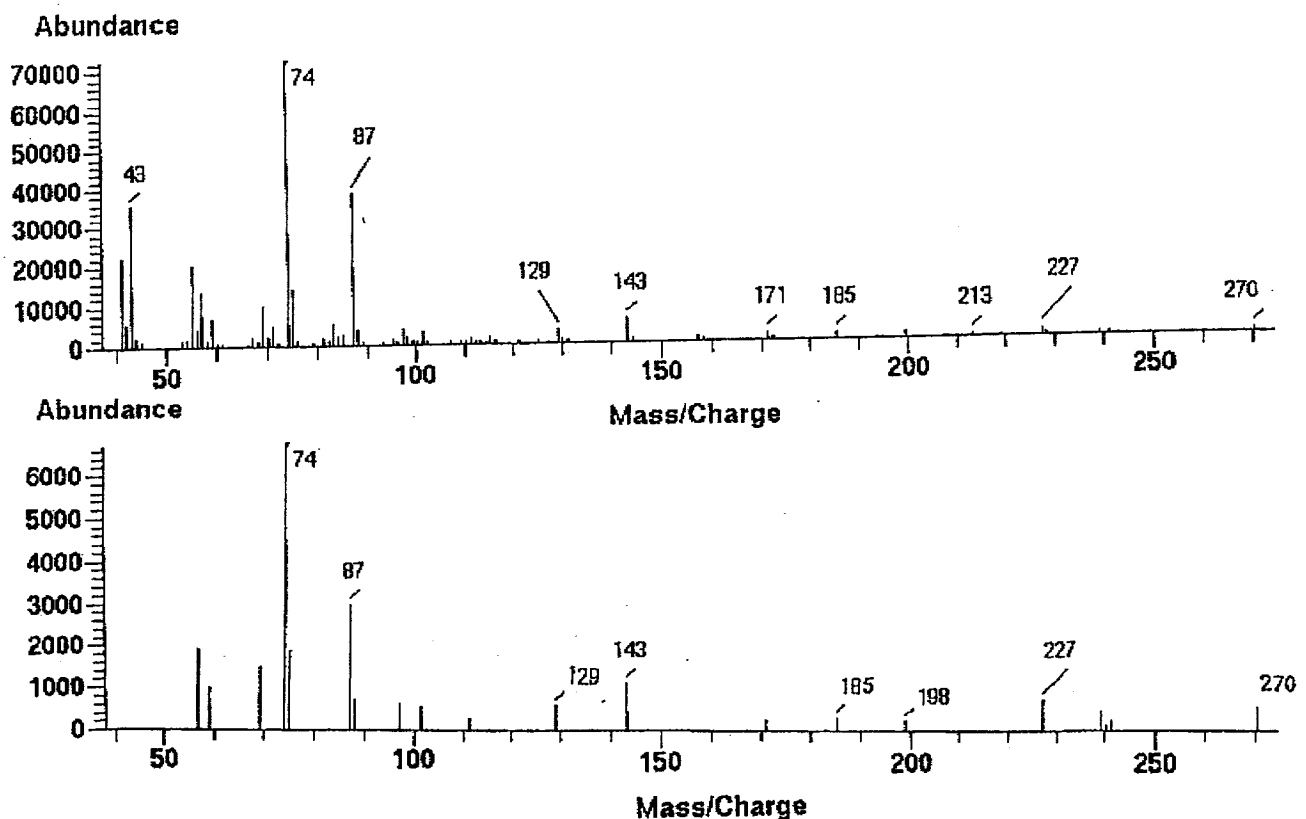


図5 ピーク1のマススペクトル

A: メチル化された分解代謝物、B: ヘキサデカン酸のメチル化スペクトル

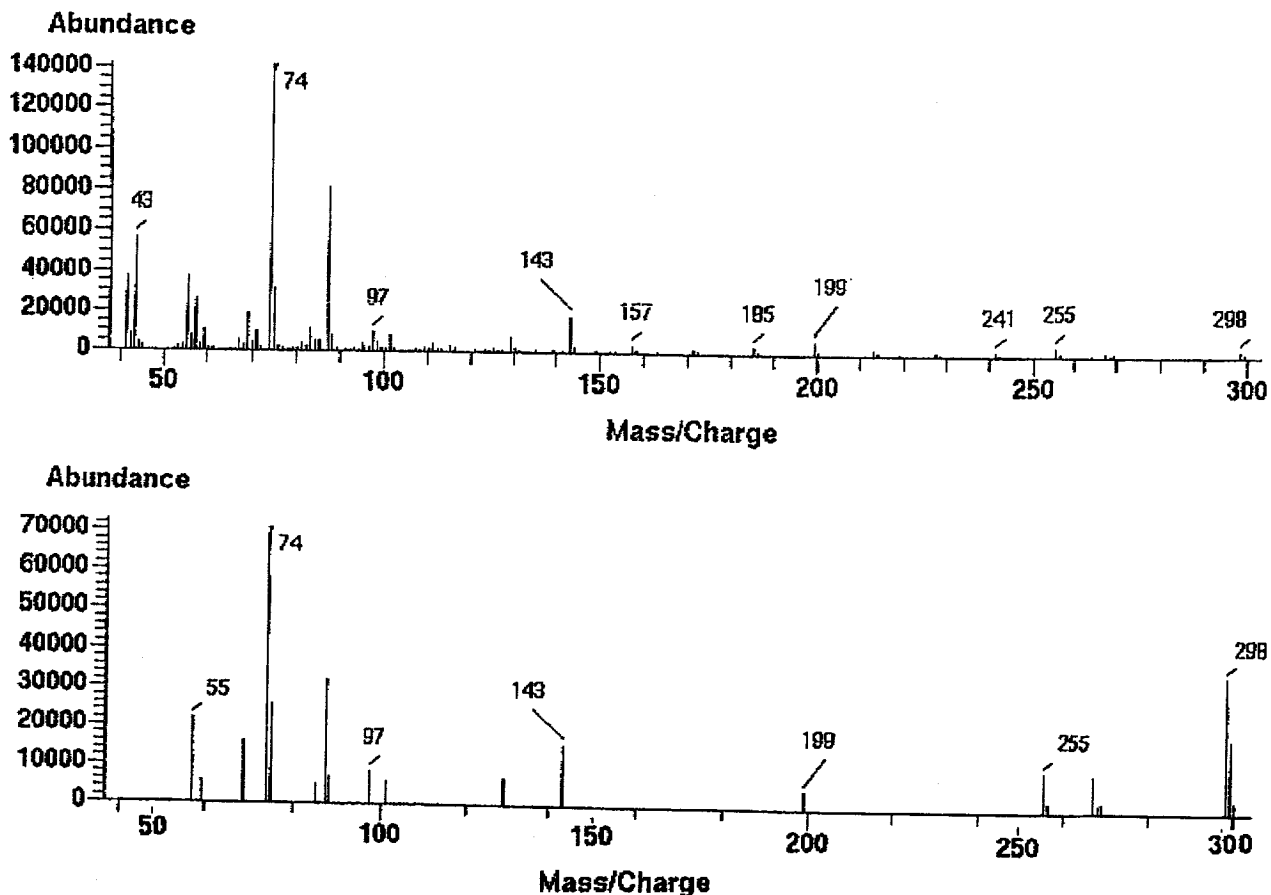


図6 ピーク2のマスペクトル

A:メチル化された分解代謝物、B:オクタデカン酸のメチル化スペクトル

らかになっている。KE-2991株によるn-ヘキサトリアコンタンの分解途中で検出された代謝物から考えると、これまで炭化水素類の分解と同じく、C1末端メチル基が酸化を受け、アルコール→アルデヒド→脂肪酸となる Monoterminal oxidation¹¹⁾により分解が進行するものと推察される。n-ヘキサトリアコンタンの微生物分解経路を推定し、その経路を図6に示した。

4. まとめ

原油分解菌Moraxella sp.KE-2991を用いて長鎖炭化水素類の分解及びn-ヘキサトリアコンタンの分解経路の試験を行った。その結果、以下の知見を得た。

- (1)KE-2991株は、海洋中及び海底タール・ボール化している長鎖炭化水素類であるn-ヘネコサン、n-トリアコンタン、n-ヘキサトリアコンタン、n-テトラコンタンを分解したが、分解率は良くなかった。
- (2)KE-2991株は原油製品である流動パラフィン及びB重油を高い比率で分解した。
- (3)KE-2991株は長鎖炭化水素であるn-ヘキサトリアコンタンを分解し二酸化炭素を生成した。
- (4)n-ヘキサトリアコンタンの分解代謝物を検出したと

ころ、n-ヘキサデカン酸及びn-オクタデカン酸等の中間代謝物質と二酸化炭素が検出された。このことから、KE-2991株による分解はn-アルカン類のC₁末端が酸化されアルコールを生成し、アルデヒド、カルボン酸となった後、β酸化により二酸化炭素に分解されると推察された。

参考文献

- 1) 川崎健：海の環境学, 新日本出版社, 89~106(1993).
- 2) 鈴木智雄：微生物工業技術ハンドブック, 朝倉書店, 492~496(1990).
- 3) 清水潮：微生物と生態(5), 学会出版センター, 197~213(1989)
- 4) G.K.スクリアピン, L.A.M.ゴロプレーバ：微生物による有機化合物の変換, 学会出版センター, 225~250(1986).
- 5) D. J. Walker, and R. R. Colwell: Long-chain n-alkanes occurring during microbial degradation of petroleum. Can. J. Microbiol. 22, 886~891(1976).
- 6) 藤田藤樹夫, 町田伸夫, 米虫節夫: *Pseudomonas stutzeri* KA 89の好氣的原油分解. 防菌防黴23, 407~411(1995).

~411(1995).

- 7) L. Setti, G. Lanzarini, P. G. Pifferi and G. Spagna: Further research into the aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a *Pseudomonas* sp., *Chemosphere*, **26**(6), 1151~1157(1993).
- 8) I. Souta, N. Awaji and S. Kaneko: Screening of crude oil-decomposing bacteria and the crude oil-decomposing properties of a *Moraxella* isolate. *Anti. Antifung. Agent* **21**(2), 85~87(1992).
- 9) 山根昌子, 岡田光正, 村上昭彦: 多摩川下流域河川表層水中における石油系炭化水素の微生物分解特性, *水質汚濁研究* **14**, 123~126(1991).
- 10) I. Souta, N. Awaji, and S. Kaneko: Properties of an organic solvent-tolerant strain of *Pseudomonas* sp. isolated from sea water, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **22**, 15~22(1994).
- 11) 飯塚弘, 飯田貢: 石油発酵, 幸書房, 298~315(1970).