

石油分解菌 *Gordonia* sp. NDKY76A 株が土壤微生物に及ぼす影響評価試験

株式会社熊谷組 正会員 ○佐々木静郎 正会員 村上 順也
 同 上 正会員 土路生修三 正会員 門倉 伸行
 立命館大学 松宮 芳樹 久保 幹

1. はじめに

石油汚染土壤の浄化対策としてバイオレメディエーションを適用する場合には、利用する微生物が高い油分分解能力を有しているだけでなく、浄化中及び浄化後における生残性や土着の微生物に及ぼす影響について事前に把握しておくことが必要である。本稿では、長鎖炭化水素分解菌 *Gordonia* sp. NDKY76A 株の土壤中での挙動や微生物群集に与える影響を明らかにするための評価試験を行ったので、その結果を報告する。

2. 試験方法

試験に用いた菌 *Gordonia* sp. NDKY76A 株は、大きさが 1-3 μm 程度の好気性グラム陽性菌であり、桿状・球状の両形態をとる(写真1参照)。長鎖環状アルカンを唯一の炭素源として生育し、自然界に普遍的に存在する微生物である。試験は、表1に示したように非汚染土壤(市街地近郊の畑地)、模擬汚染土壤(非汚染土壤にヘキサデカンを 2,500 mg/kg-土壤となるように添加して作製)を対象とし、これら土壤 100g に対して当該菌株を約 1×10^8 cells/g-土壤となるように投与した系列と投与しない系列(コントロールとして、滅菌水を投与)についてバイオレメディエーションを行った。

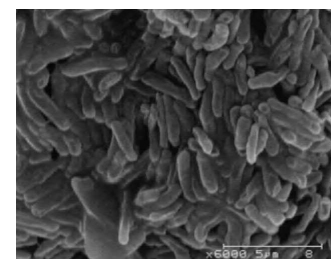
(スケールバー: 5 μm)写真1 *Gordonia* sp. NDKY76 株の SEM 写真

表1 実験条件

No.	対象土壤	汚染源	微生物投与	栄養塩類
1	非汚染土壤	×	○	×
2			×	
3	模擬汚染土壤	○	○	○
4			×	

また、模擬汚染土壤に対しては栄養塩類(4倍濃縮改変 SW 培地)も同時に添加した。試験は、定期的に土壤を採取し、油分濃度(TPH)、総土壤細菌数、*Gordonia* 属細菌数、及び土壤細菌の群集構造の変化について解析した。油分濃度は、H997抽出後、油分濃度計による測定、総土壤細菌数は環境DNA法(菌体DNAを抽出し、そのDNA重量から全菌体数を算出する方法)、*Gordonia* 属細菌数は、上記のDNAをテンプレートとし、alkG遺伝子の特異的に増幅するプライマーを用いたreal time PCR法、土壤細菌の群集構造は16S rRNA遺伝子を標的としたPCR-DGGE法によるクラスター解析によりそれぞれ分析を実施した。

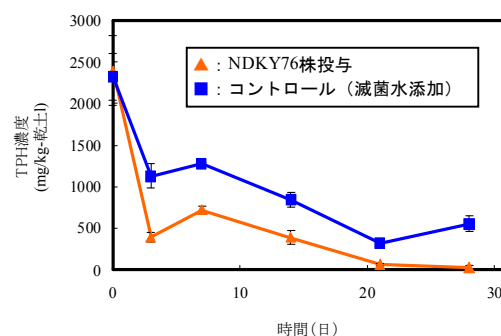


図1 TPH濃度の経時変化(模擬汚染土)

3. 結果及び考察

(1) 油分濃度の変化

図1に模擬汚染土壤における油分濃度の変化を示す。初めの3日間でコントロールの油分除去率が50%程度であったのに対してNDKY76株を投与した系では85%前後の高い油分除去率が得られ、石油分解菌である*Gordonia* sp. NDKY76A株の添加効果が確認された。その後も油分濃度は減少を続け、3週間後では油分濃度が20mg/kg-乾土以下(油分除去率95%以上)にまで低減した。

(2) 土壤細菌数に及ぼす影響

図2に各土壤サンプルにおける総土壤細菌数の推移を示す。模擬汚染土壤にNDKY76株と栄養塩を投与することで、土壤細菌数は経時的に増加し、2週間後には非汚染土壤と同程度の 10^9 オーダーとなった。また、NDKY76株の投与に関わらず、非汚染土壤・模擬汚染土壤のいずれにおいても総土壤細菌数には大きな差異

キーワード 炭化水素分解菌, バイオレメディエーション, Real time PCR, 群集構造, 環境DNA

連絡先 〒300-2651 茨城県つくば市鬼ヶ窪 1043 株式会社熊谷組技術研究所

T E L 029-847-7505

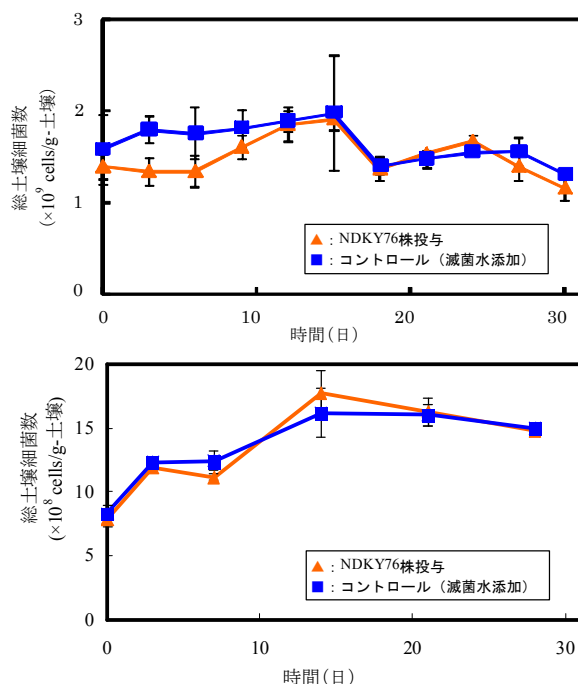


図2 総土壌細菌数の経時変化
(上：非汚染土，下：模擬汚染土)

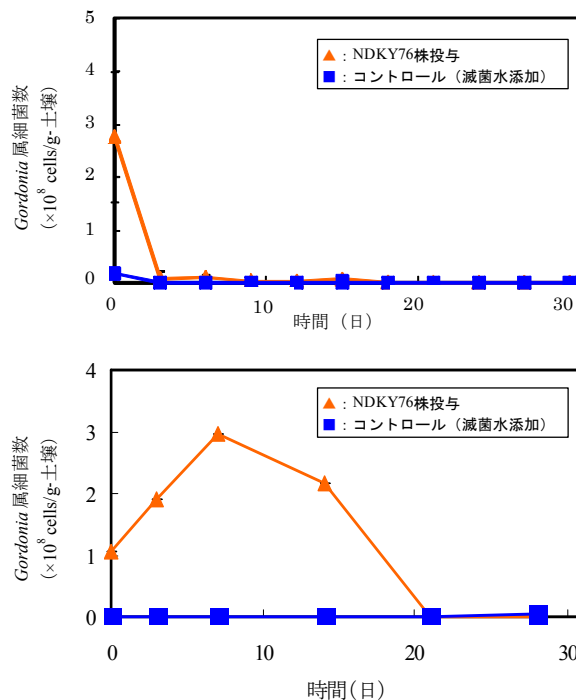


図3 *Gordonia* 属細菌数の経時変化
(上：非汚染土，下：模擬汚染土)

はみられなかった．すなわち，NDKY76 株は油汚染の有無や栄養塩の有無に関係なく，土壌中の総細菌数の変化には大きな影響を与えないと考えられる．

(3) *Gordonia* sp. NDKY76A 株の挙動解析

図3に *Gordonia* 属細菌数の経時変化を示す．非汚染土壌の場合，3日目まで既に検出限界（ 1×10^6 cells/g-土壌）以下になることが確認された．模擬汚染土壌の場合では，初期に一度増加し，その後減少傾向を示し，3週間後には検出限界以下となった．このことから，NDKY76 株は油分を資化している間は残存し，油分の減少とともに菌数も低下していくと考えられる．したがって，本菌株を投与しても短期間に検出限界以下となることから，他の土壌細菌に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる．

(4) 土壌微生物相に及ぼす影響

図4に PCR-DGGE 解析によるクラスター分析結果を示す．

各レーンでの類似度係数（BSI：Band Similarity Index）を求めたところ，菌の投与の有無に関わらず，非汚染・模擬汚染のいずれの土壌においても80%以上の高い類似性が得られた．すなわち，NDKY76A 株の投与は土壌細菌の群集構造には影響しないことが示唆された．

4. まとめ

石油分解菌 *Gordonia* sp. NDKY76A 株の土壌中における挙動や土壌微生物に及ぼす影響について評価試験を行った結果，土壌中の総細菌数には大きな影響を与えないこと，短期間に検出下限値以下に低減すること，土壌の微生物群集構造に影響を及ぼす可能性は低いことが確認された．

謝辞：本報告は，新エネルギー・産業技術総合開発機構「大学発事業創出実用化研究開発事業」の補助を受けて実施された一部をとりまとめたものである．

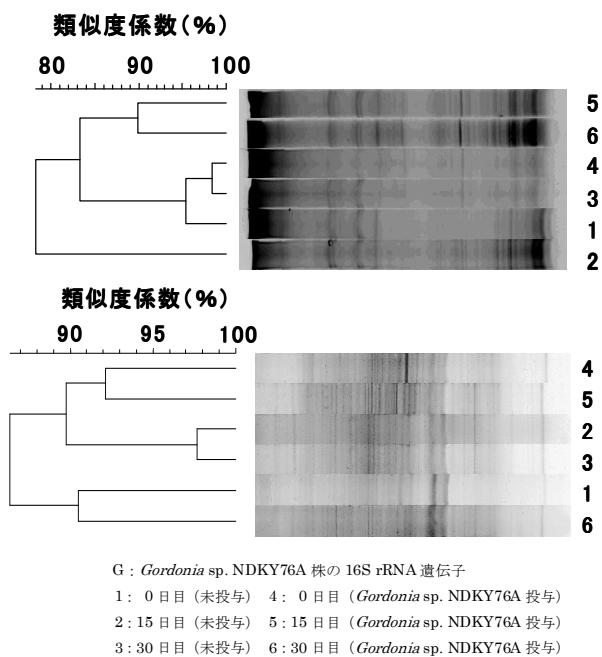


図4 PCR-DGGE 解析結果
(上：非汚染土，下：模擬汚染土)