

## 2J14-1 重油生分解能の高い複雑微生物系の解析

○尾崎 信源<sup>1</sup>, 岸本 憲明<sup>1</sup>, 吉岡 佐知子<sup>1</sup>, 藤田 藤樹夫<sup>1</sup>  
(近畿大院農・応生化)

【目的】難分解性環境汚染物質を含む流出重油は、自然界では複数の微生物によって生分解されると考えられている。演者らは国内の油田4ヶ所から汚染土壌を採集し、1%重油添加培地で集積培養を繰り返し、重油中の飽和・芳香族炭化水素の生分解率をTLC/FID分析して、生分解力の高い菌群を選出した<sup>1)</sup>。本研究では重油生分解能の高い複雑微生物系のDGGE解析と、構成微生物の純粋分離を行った。

【方法および結果】1週間重油中の飽和分と芳香族分を60%分解できる集積培養液K-3群を選出し、DGGE解析したところ4本のバンドを検出した。現在各DNAバンドの塩基配列を解析している。また、培養液を1%グリセロール添加無機塩平板培地やR2A平板培地に塗抹したところ形態の異なるコロニーをいくつか分離した。単離できたコロニーは生理生化学的性状から大きく三つのグループに分かれ、1%重油添加培地にこれら分離株を培養したところ、重油成分の生分解率は40~50%であった。現在、コロニーの同定と分離株を混合培養したときの重油生分解率を検討している。

1) 尾崎信源ら、日本農芸化学会2003年度大会要旨集 p.232

## Analysis of complex microbiological system that have high biodegrading ability of crude petroleum.

○ Shingen Ozaki, Noriaki Kishimoto, Sachiko Yoshioka, Tokio Fujita  
(Grad. Sch. Appl. Life Chem., Kinki Univ.)

**Key words** biodegradation, crude petroleum, complex microbiological system

## 2J14-2 石油汚染土壌の分子生態解析

○笠井 由紀<sup>1</sup>, 高畑 陽<sup>2</sup>, 渡辺 一哉<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>海洋バイオ研,<sup>2</sup>大成建設)

【目的】石油成分は地下で頻りに検出される汚染物質の一つであり、汚染の形態やコストの問題から、それらに対する効率のよい嫌気バイオレメディエーション法の開発が望まれている。そこで本研究では、土壌や地下水中で重質油等の難分解性石油成分の嫌気生分解を促進するための共通基盤技術を確立することを目的とし、嫌気石油分解に関わる主要微生物を分子生態学的手法により解析した。

【方法及び結果】石油精製工場跡地から重油汚染土壌および非汚染土壌を採取し、これらの土壌中に存在する石油分解菌の石油成分に対する分解活性を測定したところ、汚染土壌は非汚染土壌よりも高い嫌氣的石油分解活性を示した。土壌からDNAを抽出し、16S rDNAのV3領域をPCR増幅し、DGGE法で解析したところ、非汚染、汚染土壌では優占化している菌層に違いが見られ、汚染土壌のみでepsilon proteobacteriaが検出された。次に、16S rDNAクローニングによる系統解析を行ったところ、汚染土壌サンプルからepsilon proteobacteriaに属するクローンが検出され、DGGE解析の結果と一致した。また、archaeaの解析を行ったところ汚染土壌からCrenarchaeotaに属するクローンが多く検出された。本研究開発は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から委託を受けて、「生分解・処理メカニズムの解析と制御技術の開発」プロジェクトの一環として実施したものである。

## Molecular analysis of microbial diversity in petroleum-contaminated soil

○ Yuki Kasai<sup>1</sup>, Yoh Takahata<sup>2</sup>, Kazuya Watanabe<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>MBI,<sup>2</sup>Taisei Co.)

**Key words** 16S rDNA, DGGE, soil bacteria, archaea, petroleum contamination

2J14-3 *Sphingomonas subarctica* T7b 株による種々の Alkyl BT, Alkyl DBT 類縁体の脱硫活性

○夜久 陽祐<sup>1</sup>, 平野 誠<sup>1</sup>, 浅野 行蔵<sup>1</sup>, 富田 房男<sup>1</sup>, 渡邊 君子<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>北大院・農・応用菌学,<sup>2</sup>JCCP・バイオ精製研)

【目的】ディーゼル車の排気ガスは公害となっている。軽油の脱硫には水素化脱硫が行われているが、深度脱硫にはコストが掛かるなどの問題がある。そこで安価なバイオ脱硫を目指し、軽油を唯一硫黄源としてスクリーニングを行い、北海道の土壌より *Sphingomonas subarctica* T7b 株を単離した。本株による脱硫反応は、これまで報告された菌とは異なる特徴が示唆されたため、様々な合成基質を硫黄源として脱硫活性を調べた。その際、既知の株 *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 株を対照として用いた。

【方法と結果】軽油を唯一硫黄源として *S. subarctica* T7b 株をジャー培養した結果、軽油から 7-propyl BT の脱硫が最も速やかに起こった。そこで propyl 基よりも長い側鎖を持つ合成基質を硫黄基質として用い、基質特異性を調べた。これまで脱硫の報告がなかった dibutyl DBT, dipentyl DBT, dodecyl BT, hexyl BT, hexyl BT など基質として、脱硫試験を行った結果、*R. erythropolis* KA2-5-1 株では脱硫活性を示さなかったが *S. subarctica* T7b 株は幅広い基質特異性を示した。今回は *S. subarctica* T7b 株のもつ脱硫菌としての新たな可能性について報告する。

Desulfurization of Alkyl BTs and alkyl DBTs by *Sphingomonas subarctica* T7b

○ Yosuke Yaku<sup>1</sup>, Makoto Hirano<sup>1</sup>, Kozo Asano<sup>1</sup>, Fusao Tomita<sup>1</sup>, Kimiko Watanabe<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Lab. Appl. Microbiol., Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Bio-Refining Process Lab., Japan Cooperation Center, Petroleum)

**Key words** desulfurization, *Sphingomonas subarctica* T7b, alkyl BT, alkyl DBT

2J14-4 好熱性ジベンゾチオフェン脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1 の遺伝子組換えによる脱硫能力の強化

○岩崎 勇一郎, 古屋 俊樹, 石井 義孝, 木野 邦器, 桐村 光太郎  
(早大理工・応化)

【目的】水素化脱硫後の軽油には難除去性有機硫黄化合物であるジベンゾチオフェン(DBT)誘導体が含まれているため、環境負荷低減型の微生物脱硫に期待が寄せられている。本研究では、軽油の脱硫が可能な好熱性脱硫細菌 *Mycobacterium phlei* WU-F1<sup>1)</sup> を宿主として、DBT脱硫能力を強化した組換え体を作成した。

【方法および結果】WU-F1の全DNAライブラリーからDBT脱硫遺伝子群を取得した。WU-F1の脱硫遺伝子は *Bacillus subtilis* WU-S2B の *bdsABC* と100%の相同性を示した。つぎに、WU-F1を宿主とした形質転換系を確立し、*bdsABC* およびWU-F1のフラビンレダクターゼをコードする遺伝子 (*mdsD*) をWU-F1に導入し発現させたところ、作成した組換え体についてDBT脱硫能力の向上を確認した。

1) T. Furuya, et al., FEMS Microbiol. Lett., **221**, 137-142 (2003).

Enhancement of dibenzothiophene-desulfurization by genetic engineering of a thermophilic desulfurizing bacterium *Mycobacterium phlei* WU-F1.

○ Yuichiro Iwasaki, Toshiki Furuya, Yoshitaka Ishii, Kuniki Kino, Kohtaro Kirimura  
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)

**Key words** desulfurization, dibenzothiophene, *Mycobacterium phlei*