

氏名	しら い かつ ひさ 白 井 勝 久
授与学位	博士（工学）
学位授与年月日	平成11年9月8日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第2項
最終学歴	昭和50年3月 山口大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程 修了
学位論文題目	炭化水素分解微生物の環境浄化への応用に関する研究
論文審査委員	主査 東北大学教授 須藤 隆一 東北大学教授 野池 達也 東北大学教授 大村 達夫 東北大学助教授 西村 修

論 文 内 容 要 旨

自然状態のままでは浄化不可能なまでの巨大な規模になった環境負荷を、何とか微生物等の能力を活用して軽減しようと、環境バイオテクノロジーの研究が活発に行われているが、その中で最重要部分を占める分解・変換反応は炭化水素分解微生物の反応を利用する 경우가非常に多い。

炭化水素分解微生物の分解・変換反応を利用する技術で、特に環境バイオテクノロジーとして重要なものに、バイオリクターとバイオレメディエーションがある。バイオリクターは、従来の化学反応技術に比べて、省エネで低コストの環境にやさしい技術として注目されている。また、バイオレメディエーションは、続発する炭化水素類等による海洋や土壌の汚染に対して、今後の環境規制の強化と相まって、手の掛からない浄化法として益々重要度が高まると予想される。

本研究は、炭化水素分解微生物の環境浄化への応用に関して、低分子芳香族についてのバイオリクター、バイオレメディエーションの基礎研究と、海洋油汚染のバイオレメディエーション基礎研究を対象とした。

低分子芳香族としてスチレンとベンゼンを選んだが、これらの液状炭化水素は微生物の生育を阻害する溶媒効果のため資化性微生物の分離や培養が困難で分解微生物の研究がほとんど行われていなかった。また、海洋油汚染については、特に浄化が困難であるタール状に重質化して砂粒や小石に付着した状態の海岸の油汚染を対象にした新規バイオレメディエーション技術を目指した。

バイオリクター、バイオレメディエーションいずれの技術開発においても、先ず優秀な炭化水素分解微生物が必要で、その探索・分離は最重要課題である。本研究の目的は、スクリーニング法等を考案・駆使して優秀な新規炭化水素分解微生物を探索・分離し、それらの炭化水素分解微生物を用いて有用物質を生産する環境にやさしい新規バイオリクターの基礎技術を開発し、環境浄化に寄与する新規バイオレメディエーションの基礎技術を開発することである。

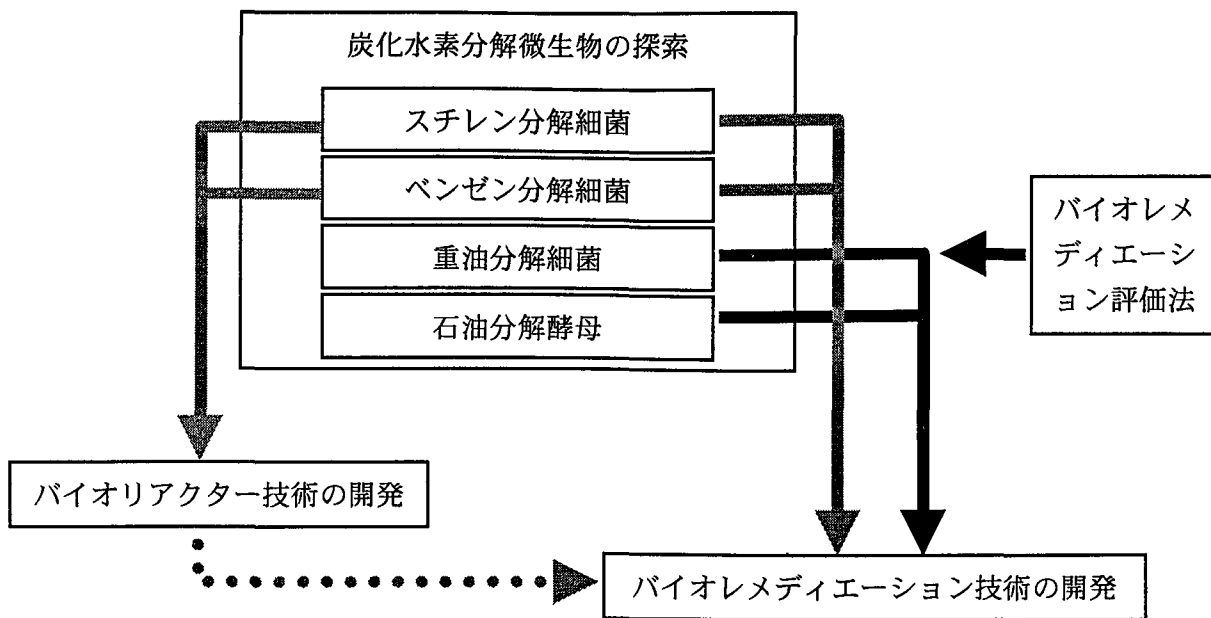


図 研究のフロー

本論文は以下の7章で構成されている。

第1章の総論では、環境問題とバイオテクノロジー、炭化水素分解微生物に関する研究状況、バイオリアクター技術の現状、バイオレメディエーション技術の現状の把握を行って技術課題を抽出し、本研究のテーマとして炭化水素微生物の環境浄化への応用を選定して研究目的を明確にした。

第2章では、低分子芳香族のバイオリアクター研究とバイオレメディエーション研究、海洋油汚染のバイオレメディエーション研究について、既往の研究の整理を行うとともに、本研究の目的を達成するための具体的課題を明確にした。

第3章では低分子芳香族分解微生物の分離とそれを用いた有用物質の生産を検討した結果について述べた。環流土壌法を応用して溶媒効果を回避することにより、新規で分解活性の高いスチレン分解細菌 *Pseudomonas* 305-STR-1-4 とベンゼン分解細菌 *Pseudomonas* BE-81 の分離に成功した。続いて、305-STR-1-4 を用い、代謝経路の解明、alcohol dehydrogenase 阻害剤ピラゾールの有効性発見、培養条件の最適化により、スチレン 20 mg/ml から 24 時間培養により β -フェネチルアルコール 3.6 mg/ml の生産に成功した。また BE-81 を用い、代謝経路の解明、代謝ブロック変異株 136R-3 の育種、休止菌体と固定化菌体の反応条件の検討により、休止菌体反応ではベンゼン 5 mg/ml から 8 時間反応によりカテコール 3.1 mg/ml の生産、固定化菌体反応ではベンゼン 1 mg/ml からカテコール 1.2 mg/ml の生産に成功した。

第4章では、第3章の低分子芳香族分解細菌を用いたバイオレメディエーション基礎技術を検討した結果について述べた。*Pseudomonas* 305-STR-1-4 を用いてスチレン系化合物の分解除去技術を検討し、48 時間培養によりスチレン 20 mg/ml の 99.1% 分解、12 時間の休止菌体反応によりスチレン 0.3 mg/ml の 99.9% 以上分解、48 時間培養によりスチレンオキシド 10 mg/ml の 98.8% 分解、6 時間の休止菌体反応によりスチレンオキシド 0.3 mg/ml の 99.9% 以上分解を達成した。また *Pseudomonas* BE-81 を用いてベンゼンおよびその類似化合物の分解除去技術を検討し、12 時間培養によりベンゼン 10 mg/ml の 99.9% 分解、12 時間の休止菌体反応によりベンゼン 0.3 mg/ml の 99.9% 以

上分解, 6時間の固定化菌体反応によりベンゼン5mg/mlの99.9%以上分解, 24時間培養によりトルエン5mg/mlの97.3%分解を達成し、エチルベンゼン, プロピルベンゼン, ブチルベンゼンの分解の可能性も確認した。

第5章では、石油汚染のバイオレメディエーション評価法として、TLC/FID法による分解活性の評価と、アルミナカラムを用いた浄化効果の評価を検討した結果について述べた。ステアリルアルコールを内部標準にすることによりTLC/FID法を石油類の全成分について簡便に定量分析出来る方法に改良し、石油分解細菌の培養結果について分析して煩雑な重量法の結果と遜色のない分解活性データを確認した。また、アルミナボールカラムの油汚染度を、黒い油汚れの画像解析、この油汚れの抽出液のOD測定、TLC/FID法による残存油量測定の3種で評価する方法を開発し、海岸の砂層の小スケールモデルとしてアルミナボールカラムを設置した干満カラム装置で重油分解細菌を培養して浄化効果評価の可能性を確認した。

第6章では、海岸の油汚染のバイオレメディエーション基礎技術を検討した結果について述べた。サイフォン型干満カラムを用い、C重油分解活性が既知の石油分解微生物の2~5倍高い細菌*Rhodococcus I-7-2*, *Rhodococcus I-15-1*, *Agrobacterium W181-1*を分離したが、干満カラム装置ではほとんど浄化効果を示さなかった。また、既存微生物を対象にしたスクリーニングにより、明確に油汚れを浄化する酵母*Candida M23-2*を見出した。本酵母は他の石油分解微生物よりも3~4倍以上の浄化効果を示し、実際の海岸油汚染を浄化する新規バイオレメディエーション技術の可能性を示した。液体培養での重油分解活性は油分解糸状菌*Cunninghamella*等より本酵母は低く、干満カラム装置での浄化効果は液体培養での活性を単純には反映しないことが明らかになった。

第7章では、第1章から第6章で述べた内容について章毎にその要点を述べ、論文の総括を行った。また、炭化水素分解微生物の環境浄化への応用に関して、今後の課題と展望について記載した。

本研究の成果を踏まえて今後の実用化研究が必要であるが、検討を要する課題として、まずスチレン分解細菌とベンゼン分解細菌によるバイオリクター研究においては、高活性菌体の収量の向上、生産物阻害や非酵素的酸化の回避による生産量の向上、工業的連続生産用の固定化菌体法の改良を検討する必要がある。また、これらの分解細菌を用いたバイオレメディエーション研究では、まだ現状は低分子芳香族の微生物分解に関して液体反応での基礎データ取得ができた段階で、実際の環境汚染に即したバイオレメディエーション系の構築が今後の大きな課題であるが、それに繋がる微生物の性能評価を検討する必要がある。さらに、バイオリクターの環境汚染への適用を検討する必要がある。

一方、海岸油汚染のバイオレメディエーション基礎研究においては、海岸のモデルである干満カラム装置での浄化効果が顕著に高い酵母を見出したが、本酵母だけが何故に海岸を模した干満カラム装置内で浄化効果を顕著に示すのか、カラム内での微生物の挙動等の解析による浄化効果の本質の解明が今後の課題である。本酵母は実際の海岸油汚染の浄化に利用される可能性が期待され、今後は海岸の砂層により近いモデル装置での試験、さらに実際の海岸での試験を行い、本酵母の実用の可能性を明らかにして行く必要がある。

審査結果の要旨

微生物の能力を活用して環境への汚濁負荷を軽減する、バイオテクノロジーの研究が活発に行われている。炭化水素関連の環境問題は非常に多く、炭化水素分解微生物を活用した省エネで低コストの環境にやさしいバイオリクター技術と、海洋汚染や土壌汚染等の修復や浄化をめざしたバイオレメディエーション技術に対する期待はきわめて大きい。本論文は、炭化水素分解微生物の環境浄化への応用に関して、炭化水素としてスチレンやベンゼン等の低分子芳香族と、海岸の重質化して付着状態にある汚染油を対象にし、スクリーニング法等を考案・駆使して優秀な新規炭化水素分解微生物を探索・分離し、それらの炭化水素分解微生物を用いて新規バイオリクターの基礎技術を開発し、また環境浄化に寄与する新規バイオレメディエーションの基礎技術を開発した成果をまとめたもので、全編7章から構成される。

第1章は総論であり、本研究の背景と目的を示している。

第2章では、炭化水素分解微生物を応用したバイオリクター研究とバイオレメディエーション研究について、既往の研究から問題点を明らかにするとともに、本研究の具体的課題を示している。

第3章では、環流土壌法によりスチレン分解細菌とベンゼン分解細菌の分離に成功し、これらの微生物を用いて、 β -フェネチルアルコールとカテコールの大量生産が達成されたことを示している。これは有用な成果である。

第4章では、前章の低分子芳香族分解細菌を用い、バイオレメディエーション基礎技術を検討してスチレン類とベンゼン類のほぼ100%分解が達成されたことを示した。これも有用な知見である。

第5章では、海岸油汚染のバイオレメディエーションの評価として、TLC/FID、画像解析等による浄化効果の評価法を確立したことを示した。これは重要な成果である。

第6章では、海岸の小スケールモデルとして考案した干満カラム装置での微生物スクリーニングと活性評価を行い、本装置内のアルミナカラムに付着したC重油を浄化する新規酵母を見出したことを示した。これは特に重要な成果である。

第7章は、総括と結論である。

以上要するに本論文は、活性の高い新規炭化水素分解微生物を探索・分離し、新規バイオリクターの基礎技術、また環境浄化に寄与する新規バイオレメディエーションの基礎技術を開発した成果を示したもので、環境工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。