

VII-116

白色腐朽菌によるフミン質の分解除去に関する基礎的研究

日本上下水道設計株式会社 ○小野寺誠
 岩手大学大学院 学生員 篠崎淳
 農林水産省森林総研東北支所 窪野高徳
 鹿兒島高等専門学校 山内 正仁
 岩手大学工学部 正 員 相沢治郎 海田輝之

1. はじめに

現行の塩素処理の過程において、塩素と水中の有機物が反応して、発ガン性のあるトリハロメタン（THM）のような消毒副生成物が発生することが明らかになった。また、人間の活動による水道水源の水質の悪化や水資源としての下水処理水の再利用に伴い、今後いっそうトリハロメタン問題は重要度を増すものと考えられる。このTHM生成に関して前駆物質での1つであるフミン質は、生物学的に難分解性であることが知られており、この除去は物理的・化学的処理によるもので、生物学的処理を試みた例は少ない。本研究ではフミン質がリグニンと同様な官能基を有していること¹⁾に着眼し、リグニン分解酵素を有している白色腐朽菌により前駆物質であるフミン質を分解除去する可能性を検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 実験材料

a) 白色腐朽菌（カワタケ, *Trametes versicolor* WD1670）の培養方法

本研究では、農林水産省森林総合研究所腐朽病害研究室より分譲された白色腐朽菌（カワタケ, *Trametes versicolor* WD1670）を使用した。分譲された菌株をポテトデグストロース寒天（PDA）斜面培地に接種し、18℃で培養した後に実験の保存用菌株として保存した。この保存用菌株を2%（W/V）麦芽エキス液体培地に接種し、5Lの三角フラスコ、エアーフィルター付き通気装置およびマグネティックスターラーによる攪拌装置からなる簡易培養槽において25℃で培養した。培養液を遠心分離（5,000rpm, 10min）し菌糸体を集菌した後、滅菌水で洗浄し再び遠心分離し集菌するという操作を4～5回繰り返した。その後ホモジナイズした菌糸体懸濁液を実験の接種源とした。なお、これらの操作はすべて無菌的に行った。

b) フミン酸標準溶液の調整

試薬フミン酸（和光純薬工業製）5gを0.1Nの水酸化ナトリウム1に入れ、マグネティック・スターラーにより1時間分散溶解し、1晩暗所に静置した。この溶液をメンブレンフィルター（1.0μm）で濾過し、不溶性の部分を除去した。次に、濾液をpH6に調整し、メンブレンフィルター（1.0μm）で不溶性の部分を除去し、さらに濾液をpH1に調整した後遠心分離により沈澱物を回収し、50～60℃で乾燥させたものをフミン酸とした。

実験では、このように精製したフミン酸を0.1Nの水酸化ナトリウム

に溶解し、pH6に調整した後、間断滅菌しフミン酸標準溶液とした。

2.2 実験方法

表-1に本研究に使用した基礎培地、表-2に実験条件を示す。オートクレーブにより滅菌した基礎培地にフミン酸標準溶液をRun1で0mg/l、Run2で10mg/l、Run3で20mg/l、Run4で30mg/l、Run5で50mg/lになるように添加した。そして接種源を一定量添加し、振とうフラスコ内において、25℃で振とう培養した。その後、経日的に菌糸体濃度、pH、フミン酸濃度、各態窒素濃

表-1 基礎培地（11中）

N源（2.4mM）	
・ NH ₄ Cl	0.064 g
・ NaNO ₃	0.102 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.05 g
CaCl ₂	0.08 g
Thiamine・HCl	0.10 mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.01 g
C ₆ H ₁₂ O ₆	10.00 g

表-2 実験条件

Run1	基礎培地
Run2	基礎培地+フミン酸（10mg/l）
Run3	基礎培地+フミン酸（20mg/l）
Run4	基礎培地+フミン酸（30mg/l）
Run5	基礎培地+フミン酸（50mg/l）

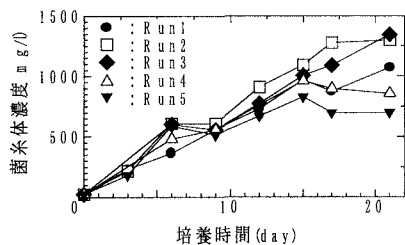


図-1 菌糸体濃度の経日変化

キーワード：白色腐朽菌、フミン質、トリハロメタン

連絡先：☎020-8551 岩手県盛岡市上田4-3-5 TER019-621-6450 FAX019-621-6460

度を測定した。なお、フミン酸濃度は、25mlの培養液を遠心分離し、上澄液を20ml採水し、pH6に調整した試料（試料1）、また菌糸体を含む沈殿物を蒸留水で洗浄し、遠心分離した上澄液（試料2）、さらに洗浄された菌糸体に0.1Nの水酸化ナトリウムを加え35℃で振とうし、遠心分離した上澄液（試料3）の各試料について吸光度 E_{460} より求めた。また、それぞれのフミン酸濃度の総計を全フミン酸量とした。

3. 実験結果および考察

図-1および図-2に菌糸体濃度およびpHの経日的な変化を示す。菌糸体濃度は、培養開始後15日目まではほぼ直線的に増加し、フミン酸を添加していないRun1に比べ、フミン酸を10mg/l添加したRun2において菌糸体濃度は高く、50mg/l添加したRun5では低いことが観察された。これらのことからフミン酸は低濃度においては菌糸体の増殖を刺激するが、高濃度では抑制するものと考えられる。pHは、菌糸体の増殖初期において急激に低下し、その後徐々に上昇することが観察された。これは、一般に考えられている基質代謝によるシュウ酸などの有機酸の生成と生成された有機酸塩がさらに資化されることなどに関係するものと思われる²⁾。

図-3および図-4にアンモニア性窒素濃度および硝酸性窒素濃度の経日的な変化を示す。アンモニア性窒素は、各Runにおいて若干消費速度が異なるが、培養初期において急激に減少し、全てのRunにおいて培養6日目に欠乏状態となった。また、硝酸性窒素は、ほぼ直線的に減少し、菌糸体濃度の差より消費速度が異なることが観察された。これらから白色腐朽菌は、アンモニア性窒素を優先的に消費するが、培養初期から硝酸性窒素も消費するものと考えられる。

図-5における全フミン酸濃度の経日変化を示す。全フミン酸濃度は、全てのRunにおいてほぼ直線的に減少し、白色腐朽菌はフミン酸を分解することが分かった。また、フミン酸濃度が高いRunほどフミン酸の除去速度が大きく、除去率が高いことが分かった。

図-6に一例としてRun5における形態別フミン酸濃度の経日的な変化を示す。溶解性のフミン酸は、培養初期に急激に減少しその後徐々に減少し、また視覚的にもフミン酸の脱色が観察された。遠心分離により沈殿するフミン酸は、培養初期においてpHの低下などにより急激に増加し、その後徐々に減少することが観察された。菌糸体に吸着するフミン酸濃度は、菌体濃度の増加と共に増加し培養21日目には全フミン酸濃度の94%に達し、吸着量は培養15日目に最大で67%になりその後徐々に減少することが観察された。また、全フミン酸において吸着部分の増加と沈殿部分の減少が類似していることから菌糸体に吸着するフミン酸は沈殿部分の比較的大きなフミン酸であると思われる。

4. まとめ

本研究から白色腐朽菌はフミン酸を分解することが明らかになった。また、菌糸体への吸着によりかなりのフミン酸が除去されることも観察された。今後は、白色腐朽菌によるフミン酸の分解に適した最適条件について、さらに白色腐朽菌の菌体外酵素による直接的なフミン酸の分解除去などの実験を行っていきたい。

<参考文献>

- 1) Benzing-Purdie, L. & J. A. Ripmeesier: Melanoidins and soil organic matter: evidence of strong similarities revealed by ^{13}C CP-MAS NMR, Soil Sci. Soc. Am. J. 47, pp. 56-61, 1983
- 2) 青島清雄、椿啓介、三浦宏一郎：菌類研究法, P44, 共立出版, 1983

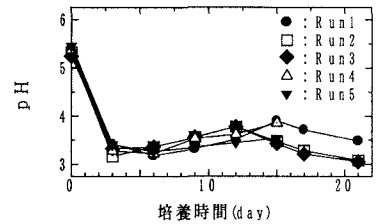


図-2 pHの経日変化

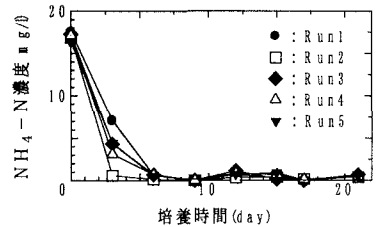


図-3 NH₄-Nの経日変化

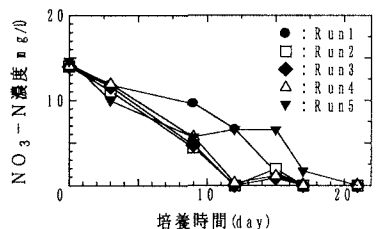


図-4 NO₃-Nの経日変化

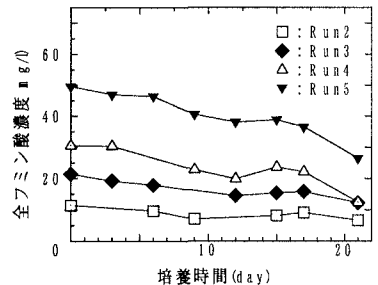


図-5 全フミン酸濃度の経日変化

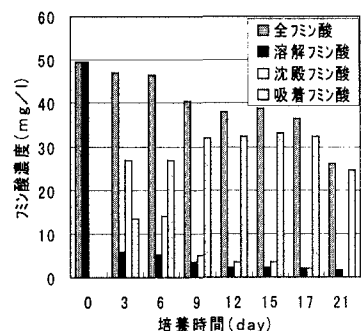


図-6 形態別フミン酸濃度の経日変化