

白色腐朽菌を用いた石油系汚染土壌の浄化技術の基礎的研究

(株)竹中工務店 技術研究所 ○奥田 信康, 大澤 武彦, 矢部 誠一

1. はじめに

石油系汚染土壌の対策方法としては土壌細菌を用いたバイオレメディエーションが主流である。しかし、石油系汚染物質は、炭化水素類を中心とした混合物であり、現場の菌を活性化させるだけでは全ての物質の分解は困難であり、処理後に難分解性かつ有害な多環芳香族類（PAH）類などが残存する可能性も高い。

我々は高い分解能力を有する白色腐朽菌を用いたバイオレメディエーション技術の実用化を目指し、本研究ではその第一歩として、純粋培養系における白色腐朽菌の各種環境条件での酵素活性発現条件を明らかにし、PAHの分解性評価を行った。

2. 実験方法

2.1 白色腐朽菌

実験に用いた白色腐朽菌は、関東学院大川本研より供与頂いた *Phanerchaete chrysosporium* ME-446 株(以下、ME)、BKM-F-1767 株(以下、BKM)、および、財)醗酵研究所から購入した *Pleurotus ostreatus*(以下、ヒラタケ)、*Coriolus versicolor*(以下、カワラタケ)、*Lentinula edodes*(以下、シイタケ)の5種類である。

2.2 酵素活性の環境条件依存性の評価

3種の酵素活性、リグニンペルオキシダーゼ活性(以下、LiP)、マンガンペルオキシダーゼ活性(MnP)、ラッカーゼ活性(Lac)を白色腐朽菌の分解性能の指標とし、純粋液体培養¹⁾の培地条件(温度・pH)に対する各5種の白色腐朽菌の酵素活性の発現性を評価した。酵素活性の測定方法を表1に、温度依存性およびpH依存性の実験条件を表2-1,2-2に示す。

2.3 PAHの生分解性の評価

実験条件を表3に示す。純粋培養状態でのPAHの分解性を評価した。グルコースを炭素源として各白色腐朽菌の孢子懸濁液を3日間前培養した後、4種のPAH(フェナントレン、アントラセン、ピレン、ベンゾ(a)ピレン)を添加した。その後、所定の期間で三角フラスコ内部の液体および固体の全量をジクロロメタンで溶媒振とう抽出し、高速液体クロマトグラフにてPAH濃度を測定した。

2.4 酵素活性の持続性の評価

きのこ栽培用培地に培養させた白色腐朽菌(ME、ヒラタケ、カワラタケ、シイタケ)の菌床20gを120mlの0.5Mの酒石酸ナトリウム緩衝液(pH=5.0)と混合撹拌し、5A種ろ紙でろ過し粗酵素抽出液を作製した。上部をパラフィルムで

表1 酵素活性測定方法¹⁾

項目	条件
前処理	培養液を12,000rpm、10minにて遠心分離し、その上澄み液を活性測定に使用
LiP活性測定方法	ヴェラトリアルアルデヒドの生成速度を、310 nmの吸光度の増加速度から算定
MnP活性測定方法	グアヤコールの酸化速度を、465 nmの吸光度の増加速度から算定
Lac活性測定方法	ABTSの酸化速度を、420 nmの吸光度の増加速度から算定

表2-1 酵素活性の温度依存性の実験条件

項目	条件
培養温度	10, 20, 30, 35, 40
測定日	1, 3, 5, 7, 10日目(各3サンプル)
培養条件	培地pH4.5、静置培養、低窒素条件

表2-2 酵素活性のpH依存性の実験条件

項目	条件
培養pH	3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0
測定日	1, 3, 5, 7, 10日目(各3サンプル)
培養条件	培養温度30、静置培養、低窒素条件

表3 PAH生分解性の実験条件

項目	条件
添加PAH初期濃度	フェナントレン、アントラセン、ピレン10 mg/l、ベンゾ(a)ピレン5 mg/l
培養条件	3日間前培養後にPAHを添加 酵素活性測定用培地、低窒素条件、30℃恒温、静置培養
培地pH	ME、BKM pH4.5 ヒラタケ・カワラタケ・シイタケ pH7
測定日	3, 7, 10, 14日目

密閉、室温(15~20℃)、静置状態で保管し、粗酵素抽出液のMnP活性の経時変化を測定した。

3. 実験結果

3.1 酵素活性の環境条件依存性

酵素活性は菌体の増殖に伴い徐々に向上し、7日目頃に最大値となるケースが多かった。各温度、pHの環境条件における酵素活性の最大値を比較して、各々酵素活性発現に最適な環境条件の評価を行った。温度依存性の結果を表4-1に、温度依存性の結果を表4-2に示す。

(1) 温度依存性

LiP活性ではME、BKMに対しては30℃、他の3種に対しては35~40℃の活性が高かった。MnP活性では35~40℃、Lac活性でも30℃以上で活性が上昇する傾向が認められた。

キーワード：白色腐朽菌 酵素活性 PAH 土壌浄化

連絡先：〒270-1395 千葉県印西市大塚1-5-1 (株)竹中工務店 技術研究所 tel.0476-47-1700 fax0476-47-7744

(2) pH 依存性

LiP 活性では pH4.5 付近で、MnP で pH5 付近での活性が高い。Lac 活性では、ME, BKM は pH4.5 付近で、他の 3 種は pH6 での活性が高くなり酵素発現に適した pH 域に違いがあることが判明した。全体的に培養温度を 35 ~ 40 とすることで大幅に活性が向上し、20 以下では極端に活性が低下することがわかった。シイタケでは 40、その他 4 種は 35 で最も活性が高かった。

3.2 PAH の生分解性

各 PAH の減少の経時変化を図 1 に、培養後 15 日目の各 PAH の減少率を図 2 に示す。

フェナントレンは 7 ~ 15 日で全ての白色腐朽菌で 90% 近く分解された。アントラセンは 15 日で ME, BKM、カワラタケでは 80% 前後、カワラタケ、シイタケでは 40 ~ 50% 程度が分解された。ピレン、ベンゾ(a)ピレンでは、顕著な減少は認められなかった。ベンゾ(a)ピレンに対して ME と BKM の除去率がやや高く、15 日目で 50% 程度であった。

3.3 粗酵素抽出液の酵素活性の持続性

MnP 活性の経時変化を図 3 に示す。縦軸は各白色腐朽菌の MnP 活性初期値を 100% とした。粗酵素抽出液は非常に高い MnP 活性を示した。シイタケが最も高く、抽出直後で 78U/ml、20 日後まで 70 ~ 130U/ml を維持した。ME は最大の活性は 3U/ml 程度であったが、10 日目までそのレベルを維持した。ヒラタケ、カワラタケは、時間の経過に伴い MnP 活性が低下し、6 日後には初期の 20% 以下となった。

4. まとめ

ME, BKM は、培養 pH4.5、培養温度 30 で、LiP 活性および MnP 活性が向上し、フェナントレン、アントラセンを 90% 近く、ベンゾ(a)ピレンを 50 ~ 60% 程度分解した。

ヒラタケ、カワラタケ、シイタケは培養温度 30 度以上、培養 pH 中性域で MnP 活性および Lac 活性が向上し、フェナントレンを 90% 程度、アントラセンを 40 ~ 75% 程度分解した。

シイタケ、ME は粗酵素抽出液の状態でも 10 日程度は、MnP 活性を高いレベルで維持しうる可能性を見出した。

5. 今後の課題

今後は、白色腐朽菌を用いたバイオレメディエーション技術の実用化を目指し、混合系かつ開放系での成立性の検討を進めてゆきたいと考えている。

表 4-1 酵素活性の温度依存性結果

	LiP 活性 (U/ml)					MnP 活性 (U/ml)					Lac 活性 (U/ml)				
温度(℃)	10	20	30	35	40	10	20	30	35	40	10	20	30	35	40
ME	0.57	0.67	1.61	1.46	0.81	0.03	0.01	0.95	1.4	0.91	0.15	0.08	0.24	0.08	0.67
BKM	-	0.4	1.32	1.33	0.63	-	0.05	0.96	1.24	1.25	0.11	0.09	0.15	0.19	0.07
シイタケ	0.36	0.46	0.44	0.85	1.33	-	0.06	0.37	0.69	1.08	0.22	0.17	0.18	0.1	0.08
カワラタケ	0.23	0.48	0.4	0.71	0.55	0.04	0.05	1.07	0.81	1.4	0.21	0.22	0.08	0.25	0.44
ヒラタケ	0.13	0.34	0.52	0.54	0.65	-	0.18	0.49	1.5	1.35	0.14	0.23	0.43	0.13	0.1

表 4-2 酵素活性の pH 依存性結果

	LiP 活性 (U/ml)					MnP 活性 (U/ml)					Lac 活性 (U/ml)				
pH	3	4	4.5	5	6	3	4	4.5	5	6	3	4	4.5	5	6
ME	0.87	0.84	1.62	0.89	0.25	0.04	1.27	0.96	1.13	1.08	0.09	0.16	0.23	0.16	0.09
BKM	0.97	0.56	1.32	1.03	0.37	0.23	0.47	0.97	1.05	0.61	0.05	0.15	0.16	0.05	0.13
シイタケ	0.79	0.29	0.44	0.42	0.51	0.16	1.09	0.98	0.71	1.03	0.11	0.09	0.17	0.48	0.86
カワラタケ	0.02	0.19	0.4	0.49	0.33	0.05	0.51	1.07	0.88	0.54	0.09	0.12	0.08	0.46	0.8
ヒラタケ	0.21	0.52	0.52	0.39	0.36	0.06	0.32	0.49	1.13	0.79	0.15	0.34	0.43	0.33	0.82

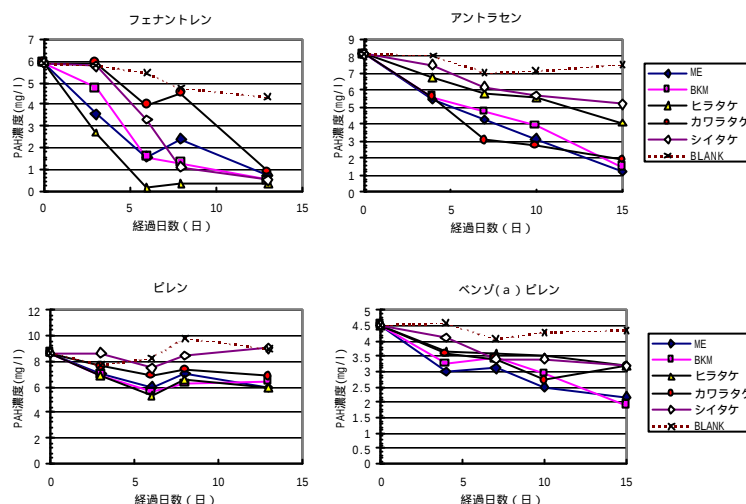


図 1 PAH 生分解性実験結果

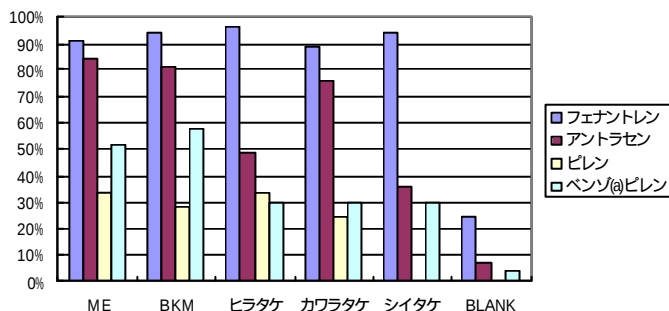


図 2 培養後 15 日目の PAH 減少率

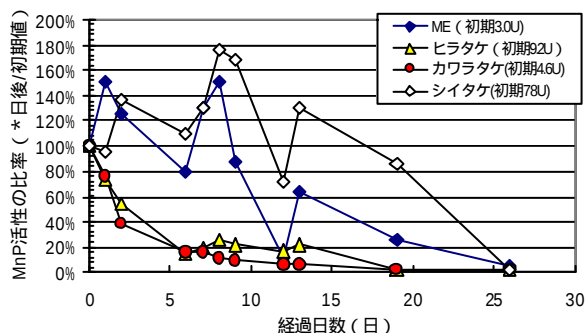


図 3 粗酵素抽出液の MnP 活性の経時変化

参考文献

- 1) 沈、川本、環境化学、10(1)、1-11(2000)