

ダイオキシン類汚染土壌における白色腐朽菌の動態と分解性に関する研究

福岡大学 (学) 宮原喬志 (非) 坂口潤 (正) 鈴木慎也 (正) 松藤康司
九州大学 (非) 原田和寿 (非) 亀井一郎 (非) 近藤隆一郎

1. はじめに

ダイオキシン類は、その強い毒性や環境中での蓄積性などから社会的関心の高い物質である。2000 年 1 月に施行されたダイオキシン類対策特別措置法により環境基準が定められ、ごみ焼却施設においてはダイオキシン類低減対策が行われるようになった。しかし、その化学構造の安定性から一度大気中に拡散すると土壌や底質などに蓄積されるなど、長期に亘る環境汚染をもたらす。土壌や底質中のダイオキシン類を浄化するにあたり、物理・化学的な方法が検討されているが、いずれもコストが高く莫大なエネルギーを必要とするため、安価でエネルギー消費の少ない微生物による環境修復技術が注目されている。ダイオキシン類の生物分解に関する研究が数多くなされている中で、白色腐朽菌が関心を集めるのは、難分解性物質であるリグニンを単独で完全に分解することができる微生物であり、ダイオキシン類を含む種々の化学物質をも分解できるという点である。この白色腐朽菌は、元来、枯れ木や倒木などを生活圏とする微生物であることから、土壌中における動態については明らかにされていないのが現状である。本研究は、白色腐朽菌 *Phlebia brevispora* によるダイオキシン類汚染土壌の有効な浄化法を検討するにあたり、土壌試料を対象とした動態解析手法の確立、および土壌試料が菌の動態や分解性に与える影響を確認することを目的として実施した。

2. 実験概要

図-1 に研究フローを示す。本研究では白色腐朽菌の動態解析の指標として、「エルゴステロール」と呼ばれる真菌類の細胞膜の主要構成成分に着目した。菌の動態を直接把握する指標としては菌体重量があるが、土壌が混入したサンプルでは菌体重量の測定が出来ない。エルゴステロールはそうしたサンプルを対象としたときにも抽出可能なため、本研究では液体培養系において菌体重量とエルゴステロールの相関を確認し、動態解析指標としての有用性を示した後、土壌中における白色腐朽菌の動態解析および分解性の確認を行った。

図-2 に液体培養フローを示す。プレート培養終了後、菌体懸濁液を直接Kirk液体培地へ添加し、所定期間培養後、Marthaら¹⁾の方法に従いエルゴステロールの定量および菌体重量の測定を行った。エルゴステロールは真菌類の細胞膜に含まれる成分を抽出し、定量しているのに対して、菌体重量は所定期間培養後、吸引濾過し、残渣の乾燥重量を測ったものである。図-3 に土壌培養フローを示す。プレート培養終了後、パーライトと呼ばれる多孔質な無機物質の下で前培養を行い、土壌中へ菌体を導入し、所定期間培養を行った後、W.D.Grantら²⁾の方法に従いエルゴステロールの定量を行った。表-1 に対象試料である真砂土の性質を示す。実汚染土と比較して、有機物含有量が少ないことが分かる。土壌中へ白色腐朽菌を導入する基材としては、木材チップが考えられたが、分析の際の夾雑物排除、培地濃度の調整により栄養源の調整が可能な点を考慮して本研究ではパーライトを使用した。実験には 100ml 容共栓付三角フラスコを使用し、全量抽出による実験を

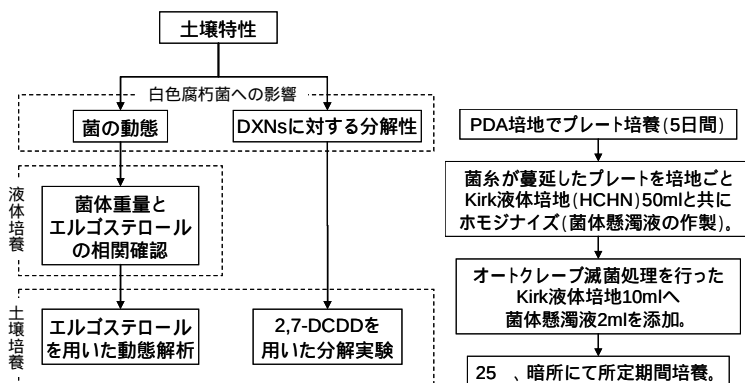


図-1 研究フロー

図-2 液体培養フロー

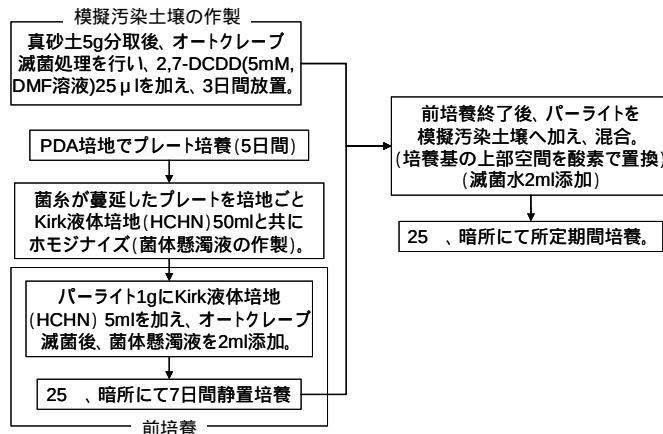


図-3 土壌培養フロー

表-1 対象試料の性質

	真砂土	N土
pH	5.5	5.0
ORP (mV)	268	237.0
EC (mS/m)	2.46	7.5
TN (mg/g)	0.01	0.1
TOC (mg/g)	0.03	0.5
強熱減量 (%)	7.3	13.0

行った。液体培養系では、シリコ栓を使用した。土壌培養系では、培養基の上部空間を酸素で置換し、ガラス栓とテフロンテープで密栓後、10日ごとに酸素パージを行った。

3. 結果および考察

白色腐朽菌の同定法として、同じ時期に同様の条件で充填したサンプルを用いて、対峙培養を行い、実験系に影響を及ぼすものの混入がないか確認を行い、白色腐朽菌であることを確認した。

図-4に菌体重量とエルゴステロールの相関図を示す。両者の間には、比較的高い相関が見られ、白色腐朽菌の動態解析に対するエルゴステロールの有用性が示唆された。次に、図-5に液体培養系における菌体重量とエルゴステロールの経日変化を示す。どちらも20日目までに増加のピークを迎え、20日目以降減少傾向を示した。以上のことから、菌体重量の代替指標として、エルゴステロールの有効性を確認し、土壌中における白色腐朽菌の動態解析を行った。

図-6にエルゴステロールの経日変化を示す。0日目の時点では土壌培養のエルゴステロールの方が多い。この原因として、1)土壌で培養を行う際には予めパーライトに植菌して前培養し定常状態になったものを使用した、2)元来、土壌に生息していた真菌類に由来するエルゴステロールの影響などが考えられる。図から分かるように、土壌中で培養したときの増加のピークは、充填後10日間でこれを境にエルゴステロールは減少傾向にある。一方、液体培地中で培養した条件は、最初の5日間に一つ目の増加のピークを迎えた後、15~20日目にかけてもエルゴステロールの増加が確認された。土壌培養系では、充填初期に栄養源を消費して10日目にピークを迎えた後、死滅期へ向かうと考えられた。これに対し、Kirk 液体培地中での培養は栄養源が長期間残存しているため土壌培養に比べ、比較的低く緩やかにエルゴステロールの増加が見られたと考えられる。

前に述べた土壌培養系と同じ条件の下で、2,7-DCDD 分解実験を行ったところ、20日間の処理で約70%の顕著な分解が確認された。

4. 結論

本研究で得られた白色腐朽菌の動態に関する知見を以下に要約する。

- 1)液体培養系において菌体重量とエルゴステロールの定量を行ったところ、比較的高い相関が見られ、動態解析のための指標としてエルゴステロールの有用性が示唆された。
- 2)エルゴステロールを指標とした土壌中における動態では、充填初期に顕著な増加が見られた後、早い段階でエルゴステロールの減少が確認されたが、同様の条件で行った白色腐朽菌による2,7-DCDD 分解実験では、20日間の処理期間で約70%の分解を確認した。

【参考文献】

- 1)Martha Barajas-Aceves ,Mainul Hassan ,Raunel Tinoco ,Rafael Vazquez-Duhalt (2002) : Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass , Journal of Microbiological Methods , 50 , pp.227-236.
- 2) W.D.Grant , A.W.West (1986) : Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of microbial biomass , Journal of Microbiological Methods , 6 , pp.47-53.

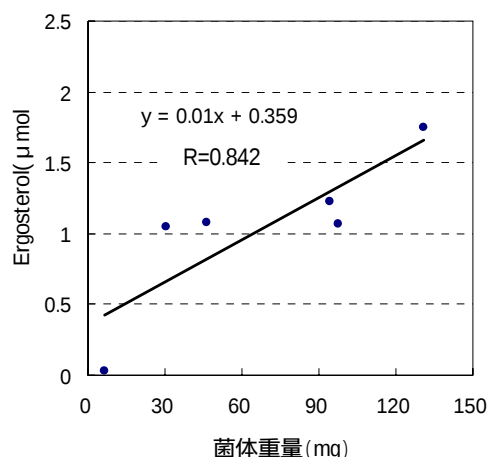


図-4 菌体重量とエルゴステロールの相関図

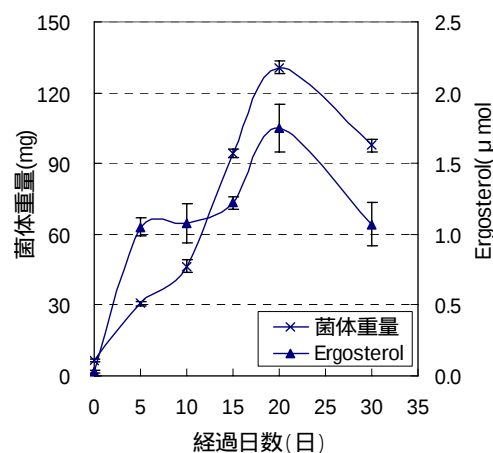


図-5 菌体重量とエルゴステロールの経日変化

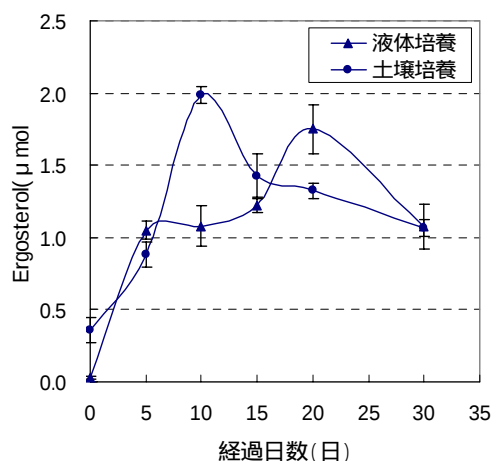


図-6 エルゴステロールの経日変化