

VII-19

白色腐朽菌によるフシ質の除去に関する基礎的研究

岩手大学 学生員 ○小野寺誠 篠崎淳
 農林水産省森林総研東北支所 窪野高德
 岩手大学工学部 正員 相沢治郎 海田輝之

1. はじめに

現行の浄水処理システムにおいて塩素は、細菌の消毒、鉄やマンガンの酸化などに用いられている。また、人間活動による水道水源の水質の悪化、水資源としての下水処理水の再利用化に伴い、塩素消毒の強化が図られる可能性がある。しかしながら、その塩素消毒の過程で塩素と水中の有機物が反応して、発がん性のあるトリハロメタン(THM)のような副生成物が発生することが明らかになった。このTHM生成に関して、前駆物質での1つであるフシ質の存在は重要な要素であり、生物学的に難分解性であることが知られている。一方、木材腐朽菌の1つである白色腐朽菌は、リグニン分解酵素をもち、セルロースおよびヘミセルロースと同程度に難分解性のリグニンを分解する¹⁾。そしてフシ質がリグニンと同様な官能基を有していること²⁾に着眼し、本研究は白色腐朽菌によりフシ質を分解除去し、THM生成の低減化を図ることを目的とする。

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キストロス寒天(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、エアフィルター付き通気装置およびマグネティック・スタータ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回繰り返して行った。その後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) フシ酸標準溶液の調整

試薬フシ酸(和光純薬工業製)5gを0.1Nの水酸化ナトリウム1lに入れ、マグネティック・スターターにより1時間分散溶解し、一暗所に静置した。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シ酸とした。実験では、このように精製したフシ酸を0.1Nの水酸化ナトリウムに溶解し、pH6に調整した後、間断滅菌しフシ酸標準溶液とした。

表-1 基礎培地(1l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

Run	基礎培地(無調整)	フシ酸
Run1	基礎培地(無調整)	
Run2	基礎培地(無調整)	+フシ酸
Run3	基礎培地(N源無添加)	+フシ酸

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。Run1は基礎培地、Run2は基礎培地にフシ酸を100mg/lになるように添加したもの、Run3は基礎培地のN源を除きフシ酸を100mg/lになるように添加したものとした。これら各条件の液体培地に接種源を一定量接種し、1lの振とうフラスコ内において、25℃で振とう培養した。その後、経日的に菌糸体の乾燥重量、pH、フシ酸濃度を測定した。なお、フシ酸濃度は、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)、菌糸体を含む沈澱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E₄₃₀より求めた。またそれぞれのフシ酸濃度の総量を全フシ酸量とした。

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。N源を制御していないRun1およびRun2におい

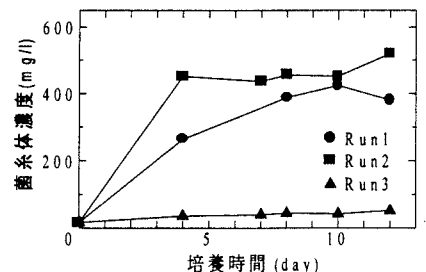


図-1 菌糸体濃度の経日変化

ては、急激な菌糸体の増殖が観察されたが、N源を制御したRun3では、若干の菌糸体の増殖が観察された。また、フミン酸を添加したRun2の方がRun1に比べ菌糸体の増殖量が多かった。これらのことからフミン酸は菌糸体の増殖を刺激するか、またはN源になり得ることが考えられる。pHは、菌糸体の増殖初期において急激に低下し、定常期においては徐々に上昇することが観察された。これは、増殖期の部分について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、また定常期の部分については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³⁾。

図-3に各条件における全フミン酸濃度およびRun2における溶解性部分のフミン酸濃度の経目的な変化を示す。Run2においては定常期に入った培養6日目から全フミン酸濃度の低下が観察され、培養12日目に初期濃度の50%に達した。Run3においては菌糸体の増殖量が少ないため明らかなフミン酸濃度の低下は観察されず、Run1においては基質代謝による吸光度 E_{400} の増加は観察されなかった。また、Run2における溶解性部分のフミン酸濃度は、培養初期に急激に低下し、その後徐々に初期濃度の3%以下まで減少したことから、培養初期の段階から視覚的にもフミン酸の脱色が観察された。

図-4にRun2における全フミン酸濃度と菌糸体に吸着したフミン酸濃度の経目的な変化を示す。菌糸体への吸着は培養初期において菌糸体の増殖に伴い急激に起こり、全フミン酸濃度に対する菌糸体に吸着したフミン酸濃度の占める割合は、培養4日目に50%程度になり、その後徐々に増加し培養12日目に94%に達した。このことより吸着によりかなりのフミン酸が除去されることが観察された。吸着量は培養6日目に初期フミン酸濃度のおよそ67%に達した後、徐々に低下した。このことからフミン酸の分解は培養液中および菌糸体表面で起こるものと考えられる。

図-5にRun2およびRun3における溶解性部分のフミン酸の腐植化度 $\log E_{400}-\log E_{600}$ （ただし本実験では試料の7MNaOH溶解は行わなかった）の経目的な変化を示す。腐植化度は、Run2において培養6日目から増加するのが観察されたが、Run3ではほとんど変化が観察されなかった。腐植化度が小さいほど腐植の程度が進行したものであること⁴⁾より、Run2においてフミン酸が分解されていることが確認された。

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。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) 高橋 旨象：きのこ木材，P20，築地書館，1989
- 2) 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
- 3) 青島 清雄、椿 啓介、三浦 宏一郎：菌類研究法，P44，共立出版，1983
- 4) 甲斐 秀昭、橋元 秀教：土壤腐植と有機物，P64，農文協，1976

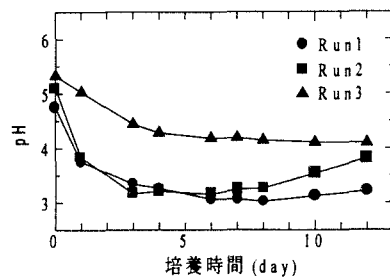


図-2 pHの経日変化

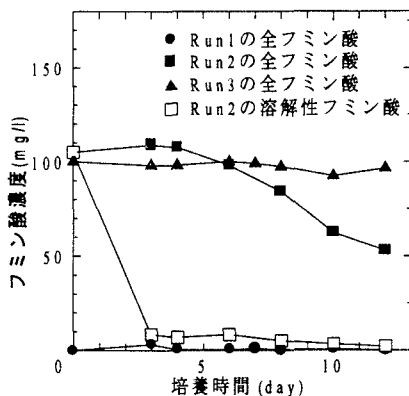


図-3 全フミン酸およびRun2の溶解性フミン酸の経日変化

実験条件: Run2

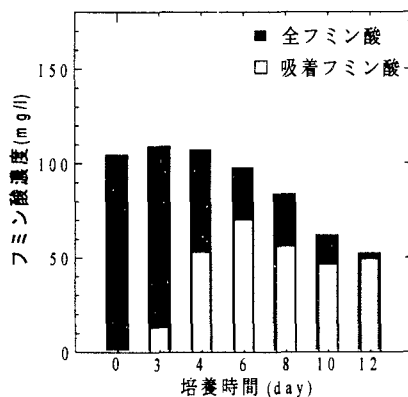


図-4 全フミン酸濃度および吸着フミン酸の経日変化

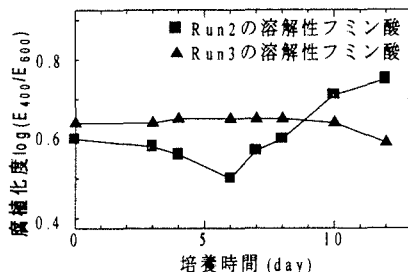


図-5 腐植化度の経日変化