

B-43 南極土壌由来の難分解性化学物質 分解菌の単離および分解特性探索 —特に南極土壌試料について—

○吉田 愛里¹・山内 瑞穂¹・星野 保²
張 俗喆^{1*}・菊池 慎太郎¹

¹室蘭工業大学大学院工学研究科応用理化学系専攻 (〒050-8585 北海道室蘭市水元町27-1)

²産業技術総合研究所 バイオマスリファイナリー研究センター (〒739-0046 東広島市鏡山3-11-32)

* E-mail: ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

1. はじめに

現在、微生物の代謝能力を生かすバイオレメディエーションが注目を集めている。しかし、低温域での生物による汚染修復法であるバイオレメディエーションに関する研究はほとんど炭化水素化合物（石油など）に焦点をあわせており、他の難分解性芳香族化合物の分解に関する低温域での生物分解に関する研究と知見はほとんどないのが現状である。したがって、本研究では常低温域である南極土壌中の一般細菌及び真菌類を探索した上、これらの微生物試料を用いて難分解性芳香族化合物の分解可能性を検証した。

2. 実験方法

(1) 一般細菌による難分解性化学物質分解実験

好気条件下で難分解性化学物質を効果的に分解する微生物を探索するために南極土壌由来の集積培養系（6ヶ月間集積）を用いて分解実験を行った。これらの培養は、難分解性化学物質（100 mg/L）を単一炭素源とする MS 無機塩培地と、MS 無機塩成分に炭素源やエネルギー源である酵母エキス（0.5 g/L）とグルコース（1 g/L）を加えた後、ターゲット物質である難分解性化学物質を加えた培地の 2 種類を使用し、4℃、160 rpm の条件で振盪培養を行った。実験に用いた難分解性化学物質のリストを表 1 にまとめた。

(2) レマゾールブリリアントブルー-R (RBBR) 分解実験

ポテトデキストロース (PD) 培地に RBBR 0.04 g/L 及び寒天 2% を加えた、PD・RBBR 寒天培地を

作製した。それらに、南極土壌から単離した真菌 8 株を植菌し、RBBR が脱色するかを観察した。

表 1 試供難分解性化学物質

難分解性化学物質	初期濃度 (mg/L)
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	100
ビフェニル	100
4-ノニルフェノール	100
p-t-オクチルフェノール	100
4-クロロフェノール	100
ビスフェノール A	100
フェノール	100
4-ブチルフェノール	100
4-イソプロピルフェノール	100
2,4-ジクロロフェノール	100

(3) 真菌類における 4-ブチルフェノール分解実験

MS 無機塩培地に炭素源としてグルコース（1 g/L）と酵母エキス（0.5 g/L）に加え、さらに分解対象物質である 4-ブチルフェノール（50 mg/L）を添加した液体培地に、RBBR の脱色が見られた真菌（4 株）を接種し、1 週間、20℃で静置培養した。接種は固形培地に生育したコロニーを用いて行った。

(4) *Penicillium* sp. CHY-2 株の 4-ブチルフェノール分解における温度の影響

(3) 項で使用した液体培地を用い、固形培地に生育した *Penicillium* sp. CHY-2 株のコロニーを接種し、培養を行った。培養条件は、10、15、20℃においては 1 週間静置培養し、4℃においては、3 週間静置培養を行った。

(5) 分析方法

分解実験開始後、経時的に培養液を回収し、酢酸エチルで抽出した抽出液の一部を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に供して残存濃度の測定を行った。なお、生物分解の検証はオートクレーブ滅菌後の CHY-2 株入りの反応液を対照系 (コントロール) とし比較した。さらに、分解産物のピーク有無を確認し、生物分解であることを確認した (データ省略)。

3. 結果及び考察

(1) 一般細菌による難分解性化学物質分解実験

南極土壌の一般細菌での難分解性化学物質の分解実験ではいずれの条件においても分解が確認できなかった。その理由として、当研究室の佐藤らによると南極土壌由来の PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) による微生物群集解析結果、一般土壌に比べ、多様な微生物が見られなかったことを述べており (データ省略)、今回の実験においても分解可能性を有する微生物 (群) が佐藤らの実験結果のように、ほとんど存在しなかった可能性が考えられる。

(2) RBBR 分解実験

上記の実験結果を基に、リグニン分解能を有する真菌類の探索を行った。事実上、リグニン分解能を有する真菌がリグニンをはじめとする様々な有機化合物を分解できることはよく知られている¹⁾。その分解菌を単離するため、RBRR をターゲットの分解対象物質として用いた結果、試みた 8 株の真菌中で、4 株から分解能が見られた (データ省略)。よって、以降の実験では、それら 4 株を用いて 4-ブチルフェノールの分解実験を行った。

(3) 真菌類における 4-ブチルフェノール分解実験

4-ブチルフェノールを用いた分解実験の結果を図 1 に示した。今回試した RBRR の分解能を示した 4 株の中で、唯一に、*Penicillium* sp. CHY-2 株が約 39% の 4-ブチルフェノールを分解した。

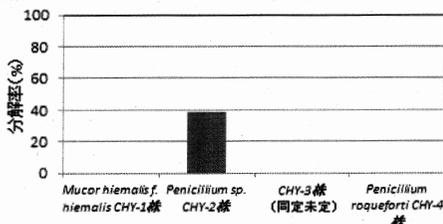


図 1 南極土壌由来の真菌類による 4-ブチルフェノールの分解率

したがって、以降の実験では、温度ごとの分解率についての実験を行った。

(4) *Penicillium* sp. CHY-2 株の温度における 4-ブチルフェノール分解実験

各温度における分解率を図 2 (A, B) に示した。15, 20°C ではどちらも約 97% の高い 4-ブチルフェノールの分解率が確認できた。また、10°C では 15 と 20°C に比べては低いが約 28% の分解が確認できた [図 2 (A)]。一方、4°C では CHY-2 株の増殖が遅かったため、3 週間後の培養液を用いて分解率を測定した。その結果、4-ブチルフェノールの初期濃度の約 61% まで分解した [図 2 (B)]。したがって、10°C においても長期間培養することによって分解率が向上できると考えられる。

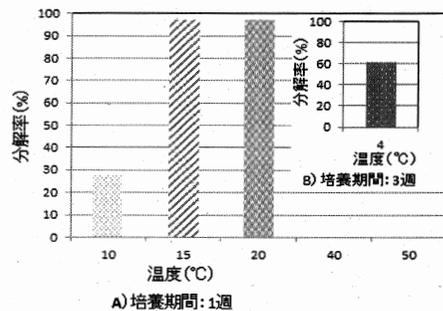


図 2 各温度における 4-ブチルフェノールの分解率

4. 結論

常低温域である南極土壌から難分解性化学物質の分解能を有する一般細菌及び真菌類を探索した結果、単離した菌株の中で唯一に真菌 (糸状菌) である *Penicillium* sp. CHY-2 株が 4-ブチルフェノールを分解することが分かった。これまで低温域の炭水素汚染地域由来の分解菌は幾つか報告されているが、今回のように、順化培養を行わず非汚染地域から分解菌を単離した例は報告されていない。また、4°C においても分解活性を示したため、研究価値の高い菌株であると考えられる。

現在、常低温域での難分解性有機化合物のバイオレメディエーション技術の開発に必要な CHY-2 株の分解特性や、分解メカニズムを酵素や遺伝子レベルで検討している。

5. 参考文献

- 1) Yang Y. S., Zhou J. T., Lu H., Yuan Y. L. and Zhao L. H. (2011) Isolation and characterization of a fungus *Aspergillus* sp. strain F-3 capable of degrading alkali lignin. *Biodegradation*, 22, 1017-1027.