

担子菌類によるダイオキシン汚染された環境の修復に関する研究

研究期間(平成 13 年度～14 年度)

高田 智*, 飯田隆雄*, 須田隆一*, 石橋哲也*², 堀川和美*, 世良暢之*, 村上光一*,
中山 宏*, 石黒靖尚*, 松枝隆彦*, 黒川陽一*, 飛石和大*

要 旨

担子菌によるダイオキシン類の環境汚染修復法を確立するため, 化学物質の分解能が優れ, 保存安定性の高い担子菌類の探査・検索を行った. 森林地帯から腐朽材を採取し, 分解活性, 保存法及び分解活性の長期安定化法を検討した. 採取した 557 の腐朽材から 206 株のリグニン分解性担子菌類が得られた. それらをブナ木粉培地とポテトデキストロース寒天(PDA)培地に植え培養した. 生育後, 前者はダイオキシン分解の一次スクリーニングに供するとともに冷蔵保存, 後者は冷凍保存した. 一次スクリーニングの結果, 30%以上の分解率を示す株が 24 株得られ, そのうち 50%以上の分解率を示す株は 7 株であった. それらについてダイオキシン分解能の再現性及び保存による劣化をみるため二次スクリーニングを行った. 冷蔵保存株を用いた二次スクリーニングでは, ほとんどの株で一次スクリーニングよりも低かったが, 2, 3 の株では分解率は 20-30%と低いが一次スクリーニングと同程度の分解率が得られた. さらに, 冷蔵及び冷凍保存株の両方を用い, 活性の回復とその維持を図るため, 木粉, 米ぬか等の種々の培地を作成し保存性を調べた. しかし, 冷凍保存株では活性の回復がみられる株はなかった. 一方, 木粉生育株において No. 264 だけが木粉を含む培地で植え継ぎ, 生分解を行った場合, 分解能が維持できることが判明した. この株は冷蔵及び冷凍保存でも活性は保たれた. この株を用いて, 大牟田川のダイオキシン調査で汚染の原因となった油状物質中のクロロベンゼン類及びダイオキシン類の分解を試みた. その結果, クロロベンゼン類については塩素数の多いペンタ及びヘキサクロロベンゼンはほとんど分解されなかったが, その他は 20%以上分解され, そのなかでも 1, 3, 5-トリクロロベンゼンが最も高く 73. 4%分解された. ダイオキシン類については含有量の多かった七及び八塩素化体について測定した. 八塩素化体の分解率は 10%程度と低かったが七塩素化体は 30 から 40%分解された. 本研究では, ①木粉を含む培地で生育させ, 冷蔵又は冷凍保存すると分解活性を維持することができること及び②多種類の化学物質に汚染された水環境の修復に応用が可能であることを実験的に示した.

[キーワード:担子菌類, ダイオキシン類, 環境汚染修復]

1. はじめに

リグニンは微生物による分解を受け難く, 自然界に存在する有機物のなかで最も分解され難い物質とされているが, 担子菌類はこのリグニンを分解する優れた能力を備えている. なかでも白色腐朽菌の 1 種 *Phanerochaete chrysosporium* は種々の化学物質の分解能力が報告されている¹⁾⁻²⁾. しかし, 他の担子菌類に関する研究は非常に限られている. 著者らは白色腐朽菌 *P. chrysosporium* 及び *P. sordida* によってダイオキシン類や PCBs が分解されることを明らかにした³⁾⁻⁵⁾. 担子菌類は多くの化学物質を同時に分解する能力があることから, 環境修復(バイオレメ

ディエーション)には最適な微生物であると期待されている.

担子菌類をバイオレメディエーションに応用するためには, その分解活性が, 長期間維持され且つ安定であることが必須条件である. 今までの研究で *P. chrysosporium* と *P. sordida* はダイオキシンの分解能を示したが分解活性を維持し長期間保存することが難しかった. そこで, 新たに森林地帯より担子菌類を採取し, ダイオキシン分解能をもった菌類をスクリーニングし, 保存法, 活性回復法について調査した.

* 福岡県保健環境研究所

(〒818-0135 福岡県太宰府市大字向佐野 39)

*² 福岡県リサイクル総合研究センター

(〒808-0135 福岡県北九州市若松区ひびきの 2-1)

2 研究方法

2-1 担子菌の採取

平成 11 年 8 月から平成 12 年 11 月にかけて福岡県および屋久島の森林地帯から可能な限り多くの担子菌を採取した。採取地点及び腐朽材数は表 1 に示す。福岡県森林林業技術センターから分与された株は *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) である。

表 1 グニン分解性担子菌類のスクリーニング結果

採取地点	採取日	腐朽材数	リグニン分解性株数
英彦山系	H7. 8. 24	68	18
五箇の荘	H7. 9. 16	2	0
森林林業技術センター	H11. 9	2	2
背振山系	H7. 10. 4	38	16
古処山系	H7. 10. 7	52	14
屋久島	H11. 10. 13-15	176	80
釈迦岳	H7. 11. 9	82	35
三郡・宝満山系	H8. 1. 19	65	17
岳滅鬼山	H8. 3. 20	18	6
皿倉山	H8. 3. 28	14	0
犬ヶ岳	H8. 11. 28	40	18
合計(枚数)		557	206

2-2 リグニン分解性担子菌類のスクリーニング法

リグニン分解性能のスクリーニングは西田らの簡易法(担子菌類に存在するフェノールオキシダーゼの有無で判定)で行った。リグニン分解性を示した菌株はブナ木粉に植菌し、一定期間(最大 30 日)培養した。生育がみられた菌株について、一次スクリーニングを行った。一次スクリーニングに使用した菌株は木粉と共に 4℃で保存した。ダイオキシンの分解の再現性及び保存による劣化の有無をみるため、一定期間(6-12 ヶ月)保存後、ポテトデキストロース寒天(PDA)培地に植え継ぎ、植種菌を調製し、ダイオキシン分解試験の二次スクリーニングを行った。二次スクリーニングにおいて、保存に対する安定性及び分解に再現性がみられる株の選択を行い、ダイオキシン類分解試験を実施した。さらに、活性に再現性が認められた菌類について保存法(4℃, -80℃)、植継、培養法等を詳細に調査した。採取した腐朽材には種々の微生物が寄生していると考えられ、まず、着生した担子菌類を純化するため、ペノミル及びストレプトマイシンを含む PDA 培地に植種した。生育した菌についてリグニン分解性試験を行った。リグニン分解性を示した菌類は PDA 培地で生育させた後、木粉培地に植え継ぎ、培養すると共に、PDA 培地で生育させた菌株は-80℃で冷凍保存(以下、PDA 生育冷凍保存株という)した。

2-3 担子菌の保存方法の検討

化学物質の分解においては、一般的に保存株から PDA 培地に植え継いで植種菌とする方法が用いられている。分解活性に関する当所における過去の調査では、木粉を含む培地に戻すことによって活性の若干の回復がみられたことから、今回はリグニン分解活性がみられた株(PDA で生

育させた株)を木粉培地に植え、培養した菌株を第一次スクリーニングに使用した。木粉で生育させた菌株は木粉と共に 4℃で保存した(以下、木粉生育冷凍保存株という)。実験はリグニン分解酵素が分泌される低窒素(LN)培地及び分泌されないとされているポテトデキストロース(PD)培地の両方で行った。第一次スクリーニングにおいて、分解が認められた菌株を PDA 培地に植え継ぎ、その生育度が良好な株を第二次スクリーニングに供した。一次、二次スクリーニングとも菌類を培地に植種し、6 日後にダイオキシン類標準品(ジベンゾ-p-ジオキシン及びジベンゾフランのそれぞれ 2, 3, 7, 8 位が塩素置換された四から八塩素化体の 10 種類:図 5, p. 7)を添加し、15 日間培養したのち、生分解を停止、クリーンアップ後、内部標準品を加え、ダイオキシンの濃度を高分解能ガスクロマトグラフ-質量分析計で測定した。

なお、対照試料として、同様な期間培養した菌をオートクレーブで滅菌し、ダイオキシンを加え、15 日間培養したものを用いた。

2-4 生分解試験法

第二次スクリーニングにおいて活性がみられた菌類のなかから、PDA 生育冷凍保存株及び木粉生育冷凍保存株について、ダイオキシン分解試験を行い、活性の低下がみられない株を選択し優良株とし、環境試料に応用した。また、活性の維持又は回復の可能性を探るため、種々の培地を調製し、検討した。

3 結果及び考察

3-1 生分解試験法の検討

菌株 No. 264 を用いて分解試験後の検体の抽出方法及びばす回収率の影響を検討した。菌をそのままヘキサン又は酢酸エチルで抽出した場合、回収率はそれぞれ 20.5 及び 20.1%であった。一方、菌を硫酸で溶解した後、ヘキサンで抽出すると回収率は平均 80.6%であった。この結果より生分解後、硫酸を添加し検体を抽出する必要があることが確認された。

一次スクリーニングでは菌を木粉とともに接種するが、木粉は硫酸に溶解されない。木粉にダイオキシンが吸着され、回収率に影響することが考えられるが、木粉とともに接種した実験と PDA ディスクを接種した実験では全く同じ結果が得られることから木粉に吸着されていたとしてもヘキサンでダイオキシンは完全に回収されることが分かり、実験結果には影響がないことが判明した。

3-2 腐朽材の採取及びリグニン分解性試験

表 1 に示したように平成 11 年 8 月から平成 12 年 11 月にかけて森林地帯から採取した 557 の腐朽材について、リ

グニン分解性試験を行った結果、206 株（37%）がリグニンの分解能力を示した。

3-3 ダイオキシン分解菌の一次スクリーニング

一次及び二次スクリーニング結果の一部を表 2 に示した。一次スクリーニング結果、30%以上の分解率を示した菌類は 24 株であった。LN 及び PD 培地の両方で分解がみられた株数は 5 株であり、LN 及び PD 培地のいずれかで分解が認められた菌類はそれぞれ 11 株、8 株であった。また、LN 及び PD 培地の両方で 50%以上の分解率を示した菌類は No. 6 の 1 株のみであり、それぞれ 65.0%及び 59.4%であった。LN 培地だけでは 3 株で、No. 55 (64.2%)、No. 77 (51.7%) 及び No. 279 (70.3%)、PD 培地においても 3 株で No. 5 (50.9%)、No. 201 (87.0%) 及び No. 438 (63.2%) であった。

3-4 ダイオキシン分解菌の二次スクリーニング

二次スクリーニングについては木粉生育冷蔵保存株を PDA 培地に植え継ぎ、生分解試験を行った。一次スクリーニングにおいて 30%以上の分解が認められた 24 株のうち 3 株は LN 及び PD 培地において菌の生育が非常に悪いか又は全く生育せず、二次スクリーニングを行うことはできなかった。残りの 21 株とその他 20%以上の分解率を示し、保存状態がよく、また、生育のよい株 21 株についても二次スクリーニングを行った。二次スクリーニングの結果は No. 43, 266 及び 292 は一次スクリーニングと同等の結果が得られたが、その他の株は一次スクリーニングよりも非常に低い分解率であり、50%以上の分解率を示す株は得られなかった。このように保存（3 ヶ月から約 1 年）によって急速に分解能力が落ちることが判明した。そのなかでも、最も高い分解率は No. 266 で LN, PD 培地でそれぞれ 27.6%及び 37.1%であった。

3-5 分解活性回復法の検討

二次スクリーニングで最高の分解率を示した No. 266 は元来、他の菌類に比較して非常に生育速度が遅い株であった。この実験は菌株を保存後、2 ヶ月半経過後行ったものであった。その分解を再確認するために、保存 10 ヶ月後、同様な実験を行ったところ、PDA 培地での生育は初期の速度より更に遅くなり、培地全体がワインカラーとなり、生分解に適さない株に変化した。また、PDA 生育冷凍保存株も PDA 培地上での生育状況は同様であった。このことから一次スクリーニングで分解活性がみられた株のうち、PDA 培地、LN 及び PD 培地での生育、更に保存状態のよかった 8 株（No. 9610219, 6, 43, 55, 264, 269, 292, 438）について木粉生育冷蔵保存株と PDA 生育冷凍保存株を用いて活性維持及び回復法の検討を行った。No. 201 については冷凍保存株について行った。

この実験のうち、活性の維持及び回復が認められた菌株 No. 264 についての結果を以下に示す。

木粉生育冷蔵保存株：PDA 培地に植え継ぎ生分解を行った場合、全く分解はみられなかった。しかし、木粉入り PDA 培地（WPDA）に植え継ぎ実験を行った場合（表 3, No. 1）、LN 培地で 38.7%という分解率が得られ、一次スクリーニングの結果（31.2%）よりも、分解率は高かった。しかし、PD 培地では分解は見られなかった。分解の傾向はみられた。更に、WPDA に植え継いで行った場合、ほとんど分解がみられなかった。

木粉生育冷凍保存株：表 3 の No. 3-6 は 4℃で保存されていた株を約 12 ヶ月後に冷凍保存したものである。実験は約 6 ヶ月冷凍保存後に PD 液体培地で 5 日間培養し、更に表に示すような培地で培養し、生分解を行った。No. 5 の木粉・米ぬか培地に植え継いだ場合、PD 培地で 38.8%の分解率が得られている。

PDA 生育冷凍保存株：木粉株と同様 PDA 培地に植え継ぎ生分解を行った場合、全く分解されなかった。しかし、WPDA に植え継ぎ実験を行った場合の分解率は高くなかったが分解の傾向はみられた。そこで、保存株を WPDA に植え継ぎ、さらにブナ木粉、スギ木粉、米ぬかを種々の割合に混合した培地を用いた生育させ、生分解を行ったところ、若干分解率は回復するものの、分解率は約 20%以下であり、木粉生育株より分解率は PDA 培地で培養したものを冷凍保存しても活性が低下することが判明した。

数多くの菌株について活性回復に関する実験を行ったなかで、No. 264 株は種々の植え継ぎ法によって唯一、分解活性が現れた株である。一次、二次スクリーニングでは LN, PD 培地両方で分解がみられているが（表 2）、分解性回復法の実験では LN, PD 培地のいずれか一方でのみ分解がみられている。この理由は現時点では分からない。今後の調査が必要である。

3-6 環境試料への応用

平成 12 年、大牟田川で検出された黒色油状物質（クロロベンゼン類が主成分でダイオキシン類も含む）を対象に優良株として選択した No. 264 によるクロロベンゼン類の分解とダイオキシン類の分解を試みた。表 5 にクロロベンゼン類の分解結果を示す。ペンタクロ及びヘキサクロロベンゼンはほとんど分解されずその他は 20%以上分解された。なかでも 1,3,5-トリクロロベンゼンが最も高く 73.4%分解された。ダイオキシン類は塩素数が多くても分解されるが、クロロベンゼン類の場合は塩素数が多くなると分解されない。この違いは、ダイオキシン骨格に酸素原子が含まれているため、塩素数が多くても分解されやすくなっているものと考えられる。

表2 ダイオキシン類の分解試験結果

No	採取地点	菌株 No	1 次スクリーニング*		2 次スクリーニング*	
			分解率 (%)		分解率 (%)	
			LN 培地	PD 培地	LN 培地	PD 培地
1	大が丘	961029	35.6	42.9	7.9	10.2
43	英彦山	43	32.5	17.4	25.6	21.3
89	背振	89	24.0	19.1	16.9	15.8
44	古処	128-3	23.7	41.3	2.3	10.3
81	屋久島	228-2	28.5	14.3	6.2	14.9
98	屋久島	264	31.2	36.1	18.5	17.3
99	屋久島	266	35.9	41.8	27.6	37.1
100	屋久島	269	29.3	20.6	18.3	12.2
104	屋久島	279	70.3	12.0	15.8	11.5
112	屋久島	291-3	38.7	5.0	10.0	10.5
113	屋久島	292	28.8	32.3	26.9	17.1

*スクリーニングにおける数値はダイオキシン類 10 種類の分解率の平均値

表3 クロロベンゼン類の分解試験結果

クロロベンゼン類	油状物質中の濃度 (mg/g)	分解率 (%)
モノクロロベンゼン	25.8	21.6
1,3-ジクロロベンゼン	3.6	46.3
1,4-ジクロロベンゼン	162.7	37.3
1,2-ジクロロベンゼン	106.7	54.2
1,2,4-トリクロロベンゼン	71.5	47.1
1,3,5-トリクロロベンゼン	17.0	73.4
1,2,4,5-テトラクロロベンゼン	18.9	28.1
1,2,3,4-テトラクロロベンゼン	81.9	23.0
ペンタクロロベンゼン	27.4	13.5
ヘキサクロロベンゼン	7.7	5.2

油状物質 0.5085g/20ml のアセトン溶液を 10 μ l を加え分解実験を行った

4 結論と今後の課題

256 種の担子菌を採取し、リグニン分解能の一次スクリーニング、ダイオキシン類分解能のスクリーニング、保存方法を検討した結果、以下のことが明らかにした。

①PDA 培地上で生育させた菌類の冷凍保存はダイオキシン分解を目的とする場合、長期間の保存には適切ではない。

②冷凍保存法としてグリセリン溶液で保存した菌類は全く PDA 培地上では生育がみられず、グリセリン保存は担子菌類には適さない。

③木粉で生育させた菌類を冷蔵又は冷凍保存する。市販品の 3ml 程度のチューブに入れ、乾燥を防ぐために、滅菌水を加えて保存する。

④保存株で活性が回復しない場合、腐朽材から分離することによって、以前と同じ活性が得られる場合があった。できれば腐朽材そのものを一次スクリーニングが終わるまで③の方法で保存する。

⑤植え継ぎに用いる培地は PDA 寒天培地よりも 0.2% 木粉入り PDA 寒天培地の方が菌の生育がよい場合があり、その上ダイオキシン分解能も保持されると考えられる。

⑥菌類採取後はスクリーニングを 3 ヶ月以内に終了すること。

No. 264 の分解率は 30%程度と低い、比較的保存に耐え分解能が安定した株であった。No. 264 を多種類の化学物質を含む環境汚染試料に応用したところ、分解できることが分かり、実用化への可能性が示唆された。

以上、提案したダイオキシン分解活性維持法及び保存法

を踏まえ、今後、より分解率の高い菌類を採取することが可能ならば実用化に向けて更に前進すると考えられる。

5 行政的意義、貢献

ダイオキシン類対策の中でも土壤汚染の低減化は行政上重要な課題となっている。現在、ダイオキシン類による汚染土壌の修復法として熱分解法が主に研究されているが、コストが高く、二次汚染の可能性もある。本法は環境の自然回復力を活用しようとするものであるため、二次汚染の少ない環境にやさしい方法と考えられ今後の発展が期待される。

謝辞

この研究にご理解を賜り、終始ご指導、ご支援を頂いた当所 加藤元博所長、北森成治副所長、保健福祉部業務課 今地政美課長技術補佐、保健福祉部企画課 井尻潤企画主幹、田村聡技術主査に深謝します。この調査で用いたブナ及びスギ木粉、米ぬか等は福岡県森林林業技術センターから、快く提供して頂いた。特に資源開発課金子周平課長からきのこについてご指導・ご教授頂いた。ここに深く感謝いたします。この調査で用いた培地の調製についてご協力頂いた佐伯かおり氏に深く感謝するとともに、この調査の遂行にご理解、ご協力を賜った当所病理細菌課 長野英俊主任技師、濱崎光宏主任技師、環境部環境政策課 田中義人技術主査及び当所水質課 志水信弘主任技師に感謝致します。

参考文献

- 1) B. W. Bogan and R. T. Lamar: Appl. Environ. Microbiol., 61, 2631 (1995) .
- 2) J. A. Bumpus, M. Tien, D. Wright and S. D. Aust: Science, 228, 1434 (1985) .
- 3) S. Takada, M. Nakamura, T. Matsueda, R. Kondo and K. Sakai: Appl. Environ. Microbiol., 62, 4323 (1996) .
- 4) 高田智: 環境管理, 35, 562 (1999) . (2002) .
- 5) 特許, 福岡県, 特開平 10-323646.
- 6) 高田智他: 担子菌類によるダイオキシン類の分解研究報告書, 福岡県保健環境研究所 (2003) .