

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340075

研究課題名(和文) イチョウ葉堆肥化における残留性有機汚染物質の分解

研究課題名(英文) Degradation of Persistent Organic Pollutants in ginkgo leaf compost

研究代表者

久松 伸 (Hisamatsu, Shin)

麻布大学・その他部局等・講師

研究者番号：10198997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：堆肥化が困難だと言われているイチョウ落葉を用いて堆肥化を行い、その堆肥化過程に存在する微生物フローラを調べた。その結果、微生物フローラは堆肥化過程で大きく変化することがわかった。また、堆肥化過程で内部温度が上昇する時期に微生物を単離して、各微生物のPCB分解能を調べたところ、ほとんどの試料で培養液中のPCB量が半減することがわかった。特に、1つの細菌では、約90%の減少を確認できた。

研究成果の概要(英文)：Microorganism flora in the compost using the ginkgo fallen leaves which is difficult to make composization was examined. As a result, microorganism flora changed widely during the compost process. Microorganisms were obtained from the compost when internal temperature risen in the compost process and PCBs degradation by microorganism was analyzed. The results were obtained that the PCB amount in the medium decreased in about half within all samples. In particular, the decrease of the PCB amount to about 90% was confirmed by one bacteria.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：イチョウ堆肥 微生物 PCB 分解

## 1. 研究開始当初の背景

現在、ポリ塩化ビフェニル (PCB) を始めとする残留性有機汚染物質 (POPs) は、環境中で分解されにくく生物濃縮により様々な生物に有害な影響を及ぼすため、その製造や使用が禁止されている。「残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約」による国際的取り組みも行われ、我が国に於いても「PCB 廃棄物特別措置法」が施行されるなど、POPs の廃絶や処理が進められている。PCB を大量に含むコンデンサーなどは、保管後、国により指定された焼却処理施設によって随時処理が進められているが、保管場所に於ける漏洩や紛失などの問題も起こっている。また、微量の PCB を含む廃電気機器については徐々にその処理に着手が始まった段階であり、最近では有機顔料中に副生する PCB についてもその対策を迫られているのが現状である。このように、適切な保管がされている PCB については、段階的に処理が行われているが、一方で漏洩、紛失ばかりでなく各種の工業製品から新たに POPs が副生していることを考慮すると、これら環境中へ放出された PCB についての対応は非常に重要な課題である。

POPs は、有機化合物であることから 1,000 を超える高温下にさらすことで分解することが可能であり、大量の PCB の処分についてはこの方法が主に行われている。一方、環境中に暴露された POPs については、微生物や植物を用いた環境修復の試みが行われており、これまでに PCB を分解することができる微生物もいくつか見つかった。しかしながら、見つかった微生物の多くは、200 を超える分子種が存在する PCB のうち、低塩素化の分子種程これらの微生物に分解されやすく、高塩素化になるにつれて分解が困難になっていく傾向があるため、現在でも高い PCB 分解能を有する微生物の検索が行われている。これらの微生物は、汚泥や、ビフェニルを取り扱う工場など、様々な環境から単離が試みられている。

これまで申請者は、白色腐朽菌のリグニン分解酵素 (ラッカーゼ) 遺伝子やラット由来の P450 遺伝子をクローニングし、植物培養細胞に導入してその PCB 分解能を調べてきた (Fujihira et al., 2009, Appl. Microbiol. Biotechnol.; Nakamura et al. 2012, AMB Express)。その結果、一定の分解は確認できたが、遺伝子組換え植物を用いて環境修復を行う場合、遺伝子組換え体としての応用を考えると、野外での使用には様々な手続きや社会の受け入れが必要となってくるため、自然界に存在する微生物をそのまま利用することは利点も多い。一般的に、機能ある微生物の探索は様々な分野でも行われているが、その環境で生存している微生物を単離し純粋に培養することが困難な場合も多い。

ところで、我が国において古くからイチヨウが植えられている。このイチヨウは、長寿

であり、剪定にも強いことから街路樹にも利用されており、また、神社仏閣における境内にも植えられている。このイチヨウには、蟬やカブトムシなどの昆虫を見かけることはほとんどなく、その葉は油分を多く含んでいるため燃えにくいとされている。また、一般的な木本の落ち葉は堆肥化させて腐葉土として利用されているものの、従来からイチヨウ葉は堆肥化させることができないとされており、ほとんどが焼却処分されている。

## 2. 研究の目的

最近ではイチヨウ葉の堆肥化の試みも行われており、イチヨウ以外の樹木の葉と混合することで堆肥化を行うことも可能である。また、葉を粉砕して米ぬかなどの発酵助剤を添加することでイチヨウ葉のみで堆肥化が可能であるとの特許 (特許第 450580 号、特開 2005-306694) もある。申請者も、平成 23 年度からイチヨウ葉の堆肥化の試みを行っており、平成 23 年 12 月に実施した予備実験では、土壤に落葉したイチヨウ葉を敷き詰め、そのイチヨウ葉をワイヤーが接続してある円盤を回転させることで草を刈る機械を用いて粉砕し、ブルーシートを覆って放置したところ、ブルーシート内部の温度上昇が認められ、約 3 ヶ月で堆肥化を行うことができた。これは、イチヨウ葉を粉砕した場所の土壤に生息していた微生物がイチヨウ葉に付着し発酵が進んだと推測した。そこで、コンクリート型枠用合板で囲ったボックス内 (底部に合板はない) に原形のままのイチヨウ葉とイチヨウ葉を粉砕した場所の土壤を投入して、午前 8 時におけるボックス内の温度変化及び外気温を調べたところ、外気温に対して内部温度は顕著な変動を示し、約 60 まで上昇した。ボックス内部のイチヨウ葉を攪拌する「切り返し」の操作を 3 度行ったところ、内部温度の上昇が観察されたことから、切り返しによるエアレーションが改善されたこと及び微生物の必要な栄養が行き渡ったと考えられる。堆肥化の過程では、50~80 の温度上昇が観察されるため、今回の実験から原形のイチヨウ葉に土壤を混和することのみで堆肥化が行えることがわかった。一方、土壤を添加しなかった原形イチヨウ葉では、このような温度上昇は観察されず、堆肥化させることはできなかった。このことから、イチヨウ葉に添加した土壤内に、堆肥の材料にはなりにくいといわれるイチヨウ葉を分解できる微生物が存在していると推測された。また、これらのイチヨウ葉堆肥をプラスチック製の土嚢袋に入れて野外で保管したところ、他の落ち葉で作成した堆肥入れた土嚢袋に比べ、土嚢袋の劣化が早かった。このことから、イチヨウ葉堆肥中に存在する微生物は疎水性の高い物質の分解能が高いことが推測された。そこで、油分が多く堆肥化が難しいイチヨウ葉に着目し、このイチヨウ葉を主原

料とした堆肥において、その堆肥化の過程で生息する微生物を利用すれば効率よく POPs を分解することができるのではないかと考え、今回の申請を行うことにした。

### 3. 研究の方法

まず、イチヨウ落葉の堆肥化を行うにあたり、堆肥化過程物中の微生物フローラを調べることとした。落葉した原型のイチヨウ葉を木枠の中に投入し、蓋をした後、内部温度の変化を計測した。内部温度が変化する毎に堆肥化過程物の一定量を分取し、そこから DNA を抽出してリボゾーマル RNA 遺伝子の塩基配列を網羅的に調べ、微生物フローラを解析した。

また、堆肥化過程で最も重要だと考えている最初の内部温度上昇時の堆肥化過程物を分取し、その試料から微生物の単離を行った。微生物の単離は、堆肥化過程物を滅菌水に懸濁後、ろ紙でろ過し、そのろ液を菌液として培養に用いた。使用した培養液は、イチヨウ落葉を純水で煮て得られた煮汁含んだ寒天培地に塗抹した。26 暗所にてインキュベーション後、得られたコロニーを単離した。単離したコロニーは、イチヨウ煮汁を含んだ液体培地に加え、数日振盪培養後、各種の PCB を添加し、更にインキュベーションを行った。その後、PCB を吸着してくれる攪拌子（スターバー、ゲステル社製）を加え一定時間攪拌し、その攪拌子を熱脱着装置に連結した GC-MS で各 PCB 量を測定した。

### 4. 研究成果

今回、堆肥化が難しいとされるイチヨウ落葉を実験材料に用いたが、本研究課題を実施する以前は効率良く堆肥化が進行するものが多かったものの、本研究期間内においては、効率良く堆肥化が進行しない場合もあり、計画通りの実験が進めづらい状況にあった。堆肥化が効率良く進行しない場合は、イチヨウ落葉に土壌や前年作製した堆肥を混入させるなどして、何とか堆肥化を進めることができた。しかしながら、堆肥化が進行したのが春先にさしかかるなど確実にイチヨウ落葉の堆肥化は、まだまだ各種の条件を調べる必要が有ることがわかった。

ところで堆肥化が行われる際、どのような微生物が堆肥化に関与しているかを調べるために、まず、堆肥化過程中に温度変化が起こる時点で堆肥化過程物を採取し、各時点の微生物フローラを遺伝子解析技術で調べた。その結果、実験期間中の細菌は 386 属が確認された。その中で *Streptomyces* 属は堆肥化の開始時点ではほとんど検出されなかったが、堆肥化過程物中の温度上昇時に最も多く検出されるようになった。古細菌においては実験開始直後のみ検出された。真菌は実験開始時点ではほとんど検出されていなかった *Aspergillus* 属が、その後各時点で優占的な真菌として存在していることが分かった。平成 26 年度の実験では、イチヨウ落葉寒天培

地を用いて培養できる微生物は少なく、堆肥化過程中最も温度上昇がみられる時点で 4 種の形態の異なる真菌と思われる菌のみが単離培養できたことから、これらの真菌を PCB の分解実験に用いることにした。また、平成 27 年度の実験では、真菌はほとんど単離できず、細菌のみが単離された。年度によって単離できた微生物が異なったのは、培養に使用したイチヨウ煮汁が異なっていたことが考えられた。

微生物の PCB 分解実験に先立ち、簡易的な PCB 分析方法を検討するため、PCB 混合液を入れてスターバーで 2、24 及び 48 時間攪拌した試料を測定したところ、いずれの攪拌時間でも定量的に PCB を検出できることが分かった。この分析方法を用いて、得られた 4 種類の真菌、及び 21 種の細菌の培養液に PCB 混合液（#81、#77、#126 及び#169 を含む）を添加し、インキュベーション後の各 PCB 濃度を測定した。その結果、いずれの真菌も菌無添加のコントロールに対して、#81、#77、#126 及び#169 の PCB 濃度がそれぞれ約 40% の減少していることがわかった。更に、細菌の多くは約 50% の減少を示したが、1 つの細菌については、PCB に含まれる塩素数にかかわらず供試した PCB 全ての量が約 90% 減少させることができた。

これらのことから、今回得られた微生物は PCB の分解を行うことができる可能性があるため、応用研究に向けて更に研究を進めていく必要があると考えられた。特にほとんどの PCB 分子種を減少させることができた細菌については、本課題の研究期間後も研究対象として実験を進めており、現在、そのゲノムシーケンスを実施する計画をしている。

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
久松 伸 (HISAMATSU SHIN)  
麻布大学・生命・環境科学部：講師  
研究者番号：10198997

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：