

機関番号：16301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580178
 研究課題名（和文）天然から得た石油分解能を持つ新規な木材腐朽菌を用いた石油汚染土壌浄化法の研究開発
 研究課題名（英文）Research and development for purification of oil-contaminated soil using newly natural fungal isolate having ability for degradation of oil
 研究代表者
 橘 燦郎（TACHIBANA SANRO）
 愛媛大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：10112319

研究成果の概要（和文）：天然から単離した石油分解能を持つ木材腐朽菌を用いて、石油汚染土壌の浄化法を開発するため、まず始めに数種の PAH（多環芳香属炭化水素）の生分解を行うとともに、その分解機構を解明した。そして、その結果を基に、PAH 汚染土壌の浄化法を明らかにした。さらに、開発した PAH 汚染土壌浄化法を基に、分解菌を培養した培養物と油吸収材を併用する原油(C 重油)汚染土壌の浄化法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Method for purification of crude oil (C heavy oil)-contaminated soil was tried to develop using a newly natural wood-rotting fungal isolate having ability for degradation of petroleum. For the first time, biodegradation of several kinds of PAH (polyaromatic hydrocarbon) with the fungus was conducted and found the degradation pathway of PAH by the fungus. On the basis of the results, the method for purification of PAH-contaminated soil was found by use of the fungus. And furthermore, on the basis of the developed method, the method for purification of crude oil (C heavy oil) -contaminated soil was developed by the combined use of the solid medium prepared from the fungus and a kind of oil absorber.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：森林資源利用化学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：石油汚染浄化、浄化技術、石油分解菌、木材腐朽菌、多環芳香族化合物、微生物製剤、C-重油汚染土壌浄化、油吸収材

1. 研究開始当初の背景

近年、石油精製施設や給油所などから漏れた石油（特に原油や重油）による土壌汚染が大きな社会問題となっておりその対策が急務とされている。しかし、石油汚染土壌問題への対応の必要性が指摘されている¹⁾にもかかわらず石油中の有害物質は対象外とされ

ている。しかしながら、これらを分解除去しないかぎり、何時までも土壌中に残留し続け、農作物への悪影響や農作物を通じての人体汚染並びに、地下水を汚染し周辺住民の健康被害を発生させる。そのため、石油中の有害物質を効率よく分解する微生物の単離及び、それを用いた石油汚染土壌の効率的な浄化

法の開発が強く望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、天然から石油分解菌を選抜するとともに、石油分解能を有する新規な木材腐朽菌を用いて、(1)石油中の難分解性で有毒な多環芳香族炭化水素(PAH)の分解機構及び分解に関与する酵素の解明、(2)分解菌及び分解菌から調製した製剤(微生物製剤、酵素製剤)を用いた PAH 汚染土壌浄化法及び重油汚染土壌浄化法の研究開発、さらに(3)原油(C 重油)汚染土壌の新規で効率的な浄化法を研究開発することである。また、(4)酸性条件下だけでなく、塩基性条件下でも PAH を分解できる菌の選抜も試みた。

3. 研究の方法

(1) 石油分解菌の選抜

愛媛大学農学部周辺から採取した土壌及びキノコからフェナントレンおよびクリセン寒天培地上で成育できる菌を選抜した。さらに、クリセン液体培地で分解菌を選抜した。選抜した PAH 分解能の高い菌、S133 及び数種の PAH 分解能の高い菌を研究に用いた。

(2) PAH の液体分解

Mineral salt broth(MSB)培地および Malt extract 培地で 3 種の PAH(フェナントレン、クリセン、ベンゾ[a]ピレン)を分解した。また、分解に及ぼす栄養源、攪拌等の影響も調べた。分解率は GC/MS で定量し、分解生成物は GC/MS における標品とのマススペクトル及び保持時間との比較から同定した。また、培養液中の酵素、マンガンペルオキシダーゼ(MnP)²⁾、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)³⁾、ラッカーゼ(Lac)⁴⁾、カテコール-1,2-および-2,3-ジオキシゲナーゼ(1,2-Dioxy)⁵⁾、(2,3-Dioxy)⁵⁾の活性を調べた。

(3) PAH 汚染土壌の浄化

固体培地(分解菌を木粉と栄養源で培養)を PAH 汚染土壌(PAH 濃度:1, 10ppm)に 10%加えて処理した(25°C暗所下 0~30 日間)。また、栄養源、界面活性剤添加等の浄化への影響も調べた。所定期間処理後、土壌試料をソックスレー抽出(ジクロロメタン)した後、抽出液をシリカゲルカラムで精製して、GC/MS で分析・定量した。分解率は処理前後の PAH の濃度から算出した。

(4) 微生物製剤及び酵素製剤の調製

微生物生材は分解菌の培養液に担体(粒状活性炭等)を加えて調製した。酵素製剤は培養液からの粗酵素をゲル包括剤(アルギン酸)で固定化して作製した。

(5) 植物を用いた PAH 汚染土壌の浄化

PAH(クリセン)汚染土壌にエニシダ、ハギ、ユーカリ、スーダングラスを植栽してビニールハウス内で栽培(20~25°C、0~8 週間)した。所定期間培養後、処理土壌をソックスレー抽出した後、(3)と同様にして分析・定量した。

土壌中のペルオキシダーゼ活性⁶⁾はグアイヤコール酸化物(470 nm)から、デヒドロゲナーゼ活性⁷⁾は TPF(Triphenyl formazan)(492 nm)の吸光度の変化から測定した。

(6) 原油(C 重油)汚染土壌の浄化

(2)と同様にして液体培養で原油(C 重油)の分解を行った(25°C、120rpm、15、30 日間)。

(3)と同様に作製した固体培地を原油(C 重油)汚染土壌(濃度 1000~15000ppm)に加えて処理した(0~60 日間)。所定期間培養後、(2)と同様にして汚染土壌をソックスレー抽出した。濃縮後、Chainneau ら⁸⁾の方法により、アルカン部、芳香族部、NSO 部、ASP 部に分画した。その値から THC(Total hydro carbon)を算出し、処理前後の THC の変化から分解率を算出した。なお、汚染土壌を(2)の培養液に加えてスラリー状での分解も行った。

(7) 新規の石油分解菌のスクリーニング

(1)と同様にして、愛媛大学農学部周辺から採取した土壌及び腐朽材から PAHs 分解能の高い菌を選抜した。さらに、人工海水(pH8.3)で調製した PAH 寒天培地上で成育できる菌を選抜した。そして、最終的に海水で調製した PAH 液体培地で PAH(クリセン)分解速度の速い菌を選抜した。

4. 研究成果

(1) 石油分解菌の選抜及び PAH の分解

① 石油分解菌の選抜

124 種の試料から PAH(フェナントレンおよびクリセン)を含む Malt Extract 寒天培地上で成育速度の速い菌を選抜した結果、S133 菌を含む 7 種の分解能の高い菌を単離した。

② 分解菌による PAH の分解

S133 菌は 3 種の PAH、フェナ、ントレン⁹⁾、クリセン⁹⁾(Fig. 1)、ベンゾ[a]ピレン⁹⁾をそれぞれ 24%、36%、30%分解(1mM、30 日培養)した。培養時に界面活性剤及び攪拌を行うと、分解率は約 1.5~2.5 倍増加した。また、分解に関与する酵素は、ジオキシゲナーゼとリグニナーゼであることも見出した。バクテリアによる PAH 分解にはジオキシゲナーゼが関与している¹⁰⁾といわれている。しかし、木材腐朽菌の一種である S133 菌を用いた本研究

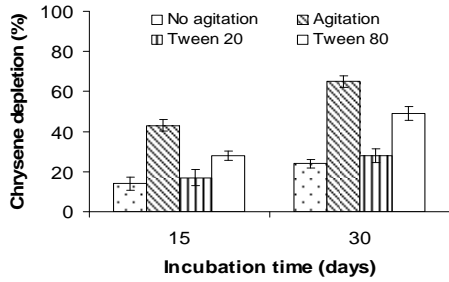


Fig.1 Effect of agitation and kind of surfactants on degradation of chrysene by S133.

でのPAH分解にはジオキシゲナーゼとリグニナーゼが関与していることを見出した。そのため、本研究で用いた分解菌のPAH分解力はバクテリアのそれよりも強いと考えられた。

S133菌によるクリセンの分解経路をFig. 2に示した¹¹⁾。代謝物の同定から、ジオキシゲナーゼがクリセんに作用し、ジオキシ化合物が生成した後、この化合物は酸化されクリセンキノンを生産する。さらにジオキシゲナー

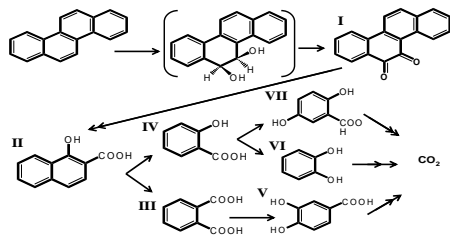


Fig.2 Degradation pathway of chrysene by S133.

ゼとリグニナーゼが作用して、1-ヒドロキシ-2-ナフタレン酸、サリチル酸、カテコールを経てクリセシンが分解されると考えられた。また、フェナントレン¹²⁾、ベンゾ[a]ピレンもS133菌による分解機構の解明から、ジオキシゲナーゼが作用した後、リグニナーゼとジオキシゲナーゼが作用してこれらのPAHを分解していることを明らかにした。

(2) PAH 汚染土壌の浄化法

クリセシン及びベンゾ[a]ピレン汚染土壌浄化時に固体培地を加えて処理した場合、30日処理で各々最高82%、42%浄化できた。また、浄化時に栄養源、界面活性剤を添加すると、浄化率は約1.5倍増加した。結果の一部をFig. 3に示した。これらの結果から、汚染土壌に固体培地、栄養源、界面活性剤を添加してPAH汚染土壌を浄化するPAH汚染土壌浄化法を開発した。

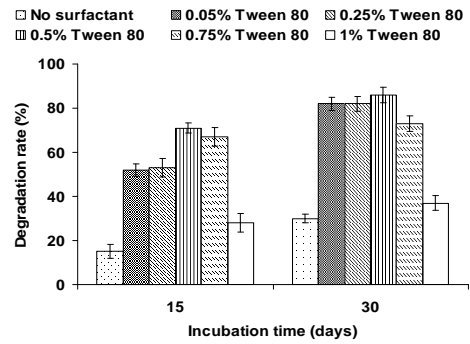


Fig.3 Effect of surfactant concentration on degradation of chrysene in soil by S133.

(3) 製剤によるPAH汚染土壌の浄化

① 微生物製剤によるPAH汚染土壌浄化

石油分解菌を3種の担体に担持させて微生物製剤を調製した。その製剤の菌糸成長率および土壌中での酵素活性から評価した。担体(粒状活性炭)に石油分解菌を担持させた微生物製剤が最も性能が良いことを見出した。この製剤を用いたPAH汚染土壌浄化結果の一部をFig. 4に示した。栄養源がグルコースの場合に最大分解率59%を示した。数種の栄養源の混合添加では分解率は低下した。これは、多量の栄養源添加により、S133のPAH分解酵素産出が抑制されたためと考えられた。

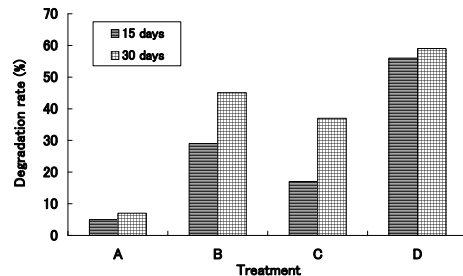


Fig.4 Degradation of chrysene in soil by microbial preparation with or without addition of nutrients during treatment.

Notes: A: no addition; B: glucose + shiitake-no sato; C: shiitake-no-sato; D: glucose.

② 酵素製剤によるPAH汚染土壌浄化

S133菌からの粗酵素をアルギン酸で固定化して作製した酵素製剤を用いたPAH汚染土壌浄化処理により、7、15日処理で各々クリセシンを21%、24%分解できた。この酵素製剤処理では、浄化時間を短縮することはできたが、浄化率が低かった。今後、製剤中の酵素量を増やすことやマンガニオンを土壌に添加して酵素処理を行いなどさらなる浄化条件検討が必要と考えられた。

以上から、製剤によるPAH汚染土壌浄化法

を開発したが、浄化条件の検討による浄化率の向上が今後の検討課題と考えられた。

(4) 植物を用いた PAH 汚染土壌の浄化

クリセンは、ハギ植栽土壌およびスーダングラス植栽土壌で8週間処理後それぞれ23%、17%分解された (Fig. 5)。土壌中のペルオキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ活性の変化から、植物の根から微生物を活性化させる物質が放出され、これにより微生物がペルオキシダーゼを産出して土壌中の PAH が分解されることが推察された。

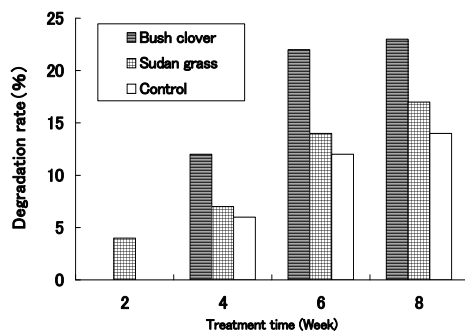


Fig. 5 Phytoremediation of chrysene-contaminated soil by several plants.

以上の結果から、植物を用いる PAH 汚染土壌浄化法として、PAH 汚染土壌に石油分解能のある植物を植栽して分解浄化する方法を見出した。そして、この浄化時に土壌中のペルオキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ活性を高める方法を検討すれば、植物により PAH 汚染土壌は浄化できると考えられた。浄化能の高い植物を見出すことが今後の課題である。

(5) 原油(C重油)汚染土壌の浄化

① 分解菌による C 重油の液体分解

液体培養により高濃度の原油(C重油)を分解できることを見出した。しかし、添加濃度が増加する程、分解率は低下した。

② 分解菌による C 重油汚染土壌の浄化

高濃度の原油(C重油)汚染土壌の浄化について検討した。結果の一部を Fig.6 に示した。石油分解菌により原油(C重油)汚染土壌が浄化できることを明らかにした。しかし、その浄化率は2ヶ月処理で約4割であった。また、空気導入により分解率はさらに20%増加した。これは分解菌が好気性菌のため、空気導入により生育及び活性が増加したためと考えられた。また、栄養源の添加により原油(C重油)汚染土壌の浄化率も増加した。栄養源添加や空気導入等により分解菌の活性を増加させれば、原油(C重油)汚染土壌を浄化できるものと考えられた。なお、市販油分

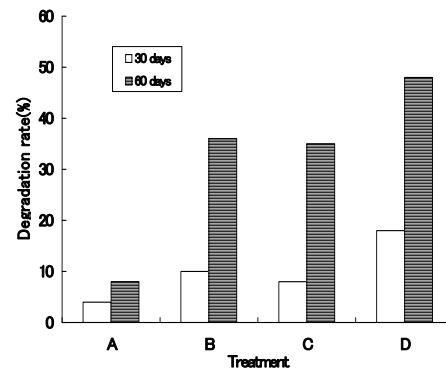


Fig. 6 Effects of sterilization of soil and aeration on purification of crude oil (C-heavy oil)-contaminated soil by the selected fungus.

Notes: A: Untreated, B: non sterilized soil, C: sterilized soil, D: aeration

分解剤による原油(C重油)分解率は栄養源添加のそれとほぼ同等であった。市販油分解剤はバクテリア製剤であるため、飽和炭化水素は分解できても、NSO やアスファルト部は分解し難いものと思慮された。

③ 高濃度 C 重油汚染土壌浄化法の開発

天然繊維2および1の添加により、高濃度のC重油汚染土壌を各々60%、93%浄化できることを見出した (Fig. 7)。これらの結果から、C重油汚染土壌浄化時に石油分解菌を培養した固体培地および天然繊維1を加えることにより、高濃度C重油汚染土壌を効率よく浄化できる方法を開発した。この方法をさらに発展させていけば、実用的な原油汚染土壌の浄化法も開発されるものと考えられた。

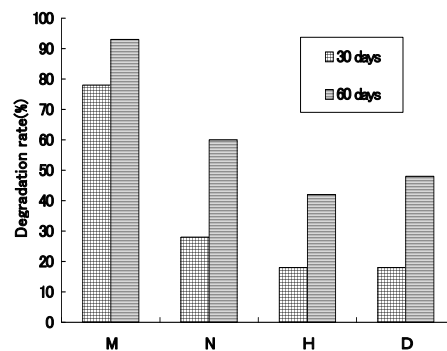


Fig. 7 Effect of addition of natural fibers on purification of crude oil (C-heavy oil) by the selected fungus.

Notes: M: Natural fiber 1; N: Natural fiber 2; H: Wood Meal (30% addition); D: Aeration

④ C 重油汚染土壌のスラリー状態での浄化の試み

スラリー状態でのC重油汚染土壌の浄化を試みたが、浄化は殆ど進まなかった。これは、石油分解菌の成育に必要な空気が十分に供給されなかったためと考えられた。

(6) 新規の石油分解菌のスクリーニング

愛媛大学農学部周辺土壌および腐朽材(62試料)から、フェナントレンおよびクリセン培地上で成育できる菌 20 種を選抜した。さらに、それらの選抜菌から海水条件下で成育できる菌 7 種を選抜した。そして、7 種について海水で調製した液体培地 (pH=8.3) でのクリセン分解能力を調べた。その結果、1 種の菌 (F092 菌) が最もクリセン分解能が高かった。これらの結果から海水下でも成育できる PAH 分解菌として、F092 菌を単離した。

選抜菌によるクリセン分解時の代謝物を調べた。その結果、1-ヒドロキシ-2-ナフタレン酸、カテコールが代謝物として同定された。F092 菌によるクリセン分解経路は 4.1.2 で示した S133 菌のそれと同様と考えられた。選抜菌による海水上での原油分解については今後の検討課題と考えられた。

参考文献

- 1) 油汚染対策ガイドライン (一油含有土壌による油臭・油膜問題への対応) [環境省 2006 年 (平成 18 年) 3 月] から公表; 生活環境の保全を目的とし、油汚染に対する調査・対策の基本的な考え方。
- 2) M. Tien and T. K. Kirk : Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-Requiring Oxygenase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 2280-2284(1984).
- 3) D.S.Arora, P.K.Gill : Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase, Enzyme Microb. Technol., 28, 602-605(2001).
- 4) A. Leonowicz and K. Grzywicz : Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate, Enzyme Microb Technol, 3, 55-58(1981).
- 5) Teruko Nakazawa and Atsushi Nakazawa : Pyrocatechase (*Pseudomonas*). Methods in Enzymology, 17, 518-522(1970).
- 6) Q.H. Zhou, Z.B. Wu, S.P. Cheng, F. He, G.P. Fu : Enzymatic activities in constructed wetlands and di-n-butyl phthalate (DBP) biodegradation, Soil biology & Biochemistry, 37, 1454-1459(2005).
- 7) 向井千恵, 伊藤和貴, 橘 燦郎 : 数種の植物を用いた土壌中のフェナントレン分解の試み. 日本木材学会中国四国支部大会, 高松, 11 月, 第 18 回日本木材学会中国四国支部研究発表会要旨集, 22-23(2006).
- 8) C.H.Chaineau, G. Rougeux, C. yepremian, J. Oudot: Effect of nutrient concentration on biodegradation of crude oil and associated microbila population in the soil, Soil Biology and Biochemistry, 37, 1490-1497(2005).
- 9) T. Hadibarata, S. Tachibana: Bioremediation of Phenanthrene, Chrysene, and Benzo [a] pyrene by Fungi Screened from Nature. ITB Journal of Science, 41A(2), 88-97(2009).
- 10) R.-H. Peng, A.-S. Xiong, Y. Xue, X.-Y. Fu, F. Gao, W. Zhao, Y.-S. Tian, Q.-H. Yao : Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons, FEMS Microbil. Rev., 32, 927-955(2008).
- 11) T. Hadibarata, S. Tachibana : Biodegradation of chrysene, an aromatic hydrocarbon by *Polyporus* sp. S133 in liquid medium, J. Haz. Mat., 194, 911-917 (2009).
- 12) T. Hadibarata, S. Tachibana : Characterization of phenanthrene degradation by strain *Polyporus* sp. S133, J. Environ. Sci., 22, 142-149(2009).

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 6 件)

- ① Asep Hidayat, 伊藤和貴, 橘 燦郎, C Heavy Oil Degradation in Sea Water Liquid Medium by *Fusarium* sp., 第55回リグニン討論会講演集、査読無、2010、34-37
- ② Tony Hadibarata, 橘 燦郎, Characterization of phenanthrene degradation by strain *Polyporus* sp. S133, Journal of Environmental Sciences, 査読有、2010、Vol.22、142-149
- ③ Tony Hadibarata, 橘 燦郎, Bioremediation of Phenanthrene, Chrysene, and Benzo[a]pyrene by Fungi Screened from Nature, ITB Journal of Sciences, 査読有、2009、Vol.41A、88-97
- ④ Asep Hidayat, 伊藤和貴, 橘 燦郎, Degradation of chrysene by a fungus isolated from nature, 第54回リグニン討論会講演集、査読無、2009、26-29
- ⑤ Tony Hadibarata, 橘 燦郎, 伊藤和貴, Biodegradation of chrysene, an aromatic hydrocarbon by *Polyporus* sp. S133 in liquid medium, Journal of Hazardous Materials, 査読有、2009、Vol.194、911-917
- ⑥ Tony Hadibarata, 伊藤和貴, 橘 燦郎,

Biodegradation of phenanthrene, an Aromatic hydrocarbon by polyporus sp. S133 in liquid medium、第53回リグニン討論会講演集、査読無、2008、22-25

〔学会発表〕(計7件)

- ① Asep Hidayat、伊藤和貴、橘 燦郎、Degradation of two type crude oil under saline condition by Fusarium sp. F092、第61回日本木材学会大会、2011年3月18-20日、京都大学吉田キャンパス
- ② Dede Heri Yuli Yanto、伊藤和貴、橘 燦郎、Comparison of petroleum asphaltene biodegradation in liquid medium at pH4.5 and saline condition at pH 8.2、第61回日本木材学会大会、2011年3月18-20日、京都大学吉田キャンパス
- ③ Dede Heri Yuli Yanto、伊藤和貴、橘 燦郎、Screening of asphaltene-degrading fungi from nature、日本木材学会中国・四国支部第22回研究発表会、2010年9月13-14日、公立学校共済組合高知会館
- ④ Asep Hidayat、伊藤和貴、橘 燦郎、Degradation of chrysene under saline condition by Fusarium sp. F092、第60回日本木材学会大会、2010年3月17-19日、宮崎観光ホテル
- ⑤ 村上健太、土井慧郎、伊藤和貴、橘 燦郎、白色腐朽菌からの微生物製剤による土壌中のChryseneの分解、第60回日本木材学会大会、2010年3月17-19日、宮崎観光ホテル
- ⑥ Tony Hadibarata、伊藤和貴、橘 燦郎、Microbial degradation of phenanthrene by *Polyporus* sp. S133 in liquid medium、日本木材学会中国・四国支部第20回研究発表会、2008年9月12-13日、愛媛大学
- ⑦ 向井千恵、伊藤和貴、橘 燦郎、ファイトレメディエーションによるクリセン汚染土壌の浄化、第59回日本木材学会大会、2009年3月15-17日、松本大学

〔図書〕(計1件)

- ① Tony Hadibarata、橘燦郎、TERAPUB、Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol.2、2009、341(309-322)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計3件)

名称：石油分解能を有する新規微生物
発明者：橘 燦郎、Asep Hidayat、伊藤和貴

権利者：橘 燦郎、Asep Hidayat、伊藤和貴
種類：特許
番号：特願 2010-180540
出願年月日：平成 22 年 8 月 11 日
国内外の別：国内

名称：石油分解能を有する新規微生物
発明者：橘 燦郎、Asep Hidayat、伊藤和貴
権利者：橘 燦郎、Asep Hidayat、伊藤和貴
種類：特許
番号：特願2009-196424
出願年月日：平成 21 年 8 月 27 日
国内外の別：国内

名称：石油汚染土壌の浄化方法
発明者：橘 燦郎、Tony Hadibarata、伊藤和貴
権利者：橘 燦郎、Tony Hadibarata、伊藤和貴
種類：特許
番号：特願2008-235282
出願年月日：平成 20 年 9 月 12 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橘 燦郎 (TACHIBANA SANRO)
愛媛大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：1 0 1 1 2 3 1 9

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

伊藤 和貴 (ITO KAZUTAKA)
愛媛大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：5 0 2 5 3 3 2 3