

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18310055
 研究課題名（和文） 農産廃棄物固定化担子菌による有機性農薬汚染土壌のバイオレメディエーション法の開発
 研究課題名（英文） Development of Bioremediation Method for Soil Contaminated by Organic Pesticide by Basidiomycete Immobilized on Agricultural Waste
 研究代表者
 星野 一宏 (HOSHINO KAZUHIRO)
 富山大学・理工学研究部・准教授
 研究者番号：20222276

研究成果の概要：近年、環境汚染物質による土壌汚染物質が問題となっており、現在その対策が急務となっている。特に、農薬などに使用されていた有機塩素系化合物は難分解性を示し、極微量であっても内分泌攪乱性や発癌性を示す極めて有害な物質である。現在、このような化合物を自然界から分解・除去するために、生物の代謝機能を利用するバイオレメディエーション法が注目されている。この技術は従来の物理化学法とは異なり、常温・常圧で行えるため安価に処理できるという点と、汚染現場で直接浄化するため、広範囲にわたり利用できるという利点がある。そこで、本研究では有機性農薬汚染土壌に対して菌体を添加するバイオオーギュメンテーション法の原理に基づき、汚染土壌の浄化法の開発を行った。具体的には、担子菌の一種であるカワラタケ *C.versicolor* の Lignin 分解酵素発現システムを活用した、土壌浄化のための資材の開発と、その特性を評価するために、農薬 PCP (Pentachlorophenol) を含む模擬汚染土壌中での担子菌の挙動、酵素分泌特性および、PCP 分解特性について検討した。使用した菌株は各種土壌中で増殖が可能であり、Lignin 分解酵素を分泌することが確認できた。特に、本研究で開発した稲わらと玄米をベースにした固定化担体に生育させたとき、Mn-Peroxidase の活性を極めて向上させることが可能であることが判明した。また、土壌中での担子菌の生育を測定するために、土壌からの担子菌 DNA の抽出方法および Real-time PCR 法を用いた菌体数の概算方法を確立した。この方法を用いて、汚染土壌模擬カラム中へ農産廃棄物固定化担子菌を投入することにより、土壌中の地表から地下に向けての増殖および酵素分泌挙動と農薬の分解との関連を評価できることを実証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,500,000	2,850,000	1,235,000
2007年度	3,300,000	990,000	429,000
2008年度	2,700,000	810,000	351,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：環境学 環境技術・環境材料

キーワード：バイオレメディエーション、農産廃棄物、担子菌、環境浄化、分子生物学、土壌浄化、農薬

1. 研究開始当初の背景

近年、農地等に蓄積した農薬、工場跡地や廃棄物埋め立て地などに蓄積した有機塩素系化合物が、生態系に対して悪影響を及ぼし始めていることから広範囲な土壌浄化法の開発が急務になっている。以前より、これら環境汚染物質の浄化には、客土といった土壌置換法、回収土壌の溶剤による洗浄や焼却処理が行われてきたが土壌中に低濃度で広く拡散した環境汚染物質を土壌から回収や処理するための高いコスト、完全無毒化の達成など数多くの問題を抱え現状ではそのための十分な対策はなされていない。さらに、最近、内分泌攪乱物質などの環境汚染物質による河川や土壌のリスクやその生態・生体系への影響など研究が進み益々深刻な事態となってきた。この様な背景から環境汚染物質の汚染の拡大を防止するとともに汚染された河川や土壌を処理するために、簡便・安価で、かつ、環境負荷を与えない環境浄化技術として微生物の代謝機能を活用したバイオレメディエーション法に注目が集まっている。容器製の環境汚染物質による土壌汚染を処理させるためには、On-Site 処理が可能なバイオレメディエーション法の開発が必須であり、この基盤技術として 1) バイオスティミュレーション(土着微生物増殖法)と 2) バイオオーギュメンテーション(外来微生物導入法)の2つ技術が検討されている。前者の方法はその浄化効果が汚染土壌中に存在している微生物群に依存し、また、後者の方ではその浄化効果は高いものの微生物の優先的な増養の供給及び酸素の供給、酵素分泌能の維持などを行う必要があり、いずれの技術も二長一短があり、この技術を発展させるためには土壌中の微生物の挙動解析、生物化学工学随知見に基づく解析と、それらに基づく土壌浄化プロセスの開発を行う必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、我々が以前行っていた農産廃棄物の微生物変換に関する研究と、数年前より担子菌カワラタケ(*Coriolus versicolor*)を用いた排水中の内分泌攪乱物質等の環境汚染物質の分解および無毒化プロセスの開発、さらには、排水中の活性汚泥(複合微生物群)のバイオスティミュレーション法による活性制御等の成果をもとにして、担子菌自身と、担子菌が分泌するリグニン分解酵素を環境材料として活用し、同時に農産廃棄物を活用しながら、土壌浄化型バイオスティミュレーションにより土壌中の環境汚染物質を効率よく

分解させるための環境修復プロセスを開発することを目的とする。一般に、担子菌、特に白色腐朽菌は炭素源や窒素源の枯渇とともに各種リグニン分解酵素を菌体外へ分泌し、クロロフェノール系化合物や Dioxin などを酸化分解しその毒性を軽減することが研究室レベルで広く検討されている。しかし、このような汚染土壌中では担子菌の増殖を促すための栄養は枯渇していることが予想される。そこで、廃棄物として処分されている未利用な農産物、稲わらなどを固定化用担体とした栄養源供給型の固定担子菌を調製する。この際、我々が過去の研究より発見した Laccase 誘導剤である天然由来のフラボノイド化合物をバイオスティミュレーション材料として添加し、この誘導剤を含む稲わら固定化担子菌の環境汚染物質の分解性能を評価する。さらに、これを土壌中へ投入した際の担子菌の増殖特性、リグニン分解酵素の分泌特性などを明らかとした後、リグニン分解酵素の継続的な分泌生産を確立する。さらに、これらの成果をもとに土壌中での他の微生物との関係を明確にした後、汚染土壌カラムを用いた模擬フィールド試験により有機性農薬の分解能力を評価する。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに白色腐朽菌 12 種類および褐色腐朽菌 1 種類を使用した。前培養はペトリディッシュを用いて Potato dextrose agar (Difco Co. USA) 39 g/l の培地に植菌し、28℃で7日間暗所静置培養を行った。本培養は主に黒ボク土(乾燥重量 10 g)を蒸留水で含水率 50%に調整し、PCP (100 mg/kg)を添加したものをを使用した。植菌方法は農産廃棄物(稲藁、菜の花の茎各乾燥重量 10 g)を蒸留水で含水率 50%に調節し 121℃で 15 分間滅菌した後、前培養した菌を植菌し、さらに 20 日間静置培養した菌体を土壌中に添加した。Lignin 分解酵素は Laccase (Lac), Peroxidase (POD), Manganese-peroxidase (MnP), および Lignin-peroxidase (LiP)の活性を、各々に対する基質を用いて吸光度変化を測定することにより行った。

また、疑似汚染土壌カラムとして、内径 7.5 cm 高さ 40cm の塩ビのカラムを使用した。黒ボク土を詰めたカラムには汚染土壌 1 kg を充填した。土壌からの DNA の抽出は、フミン質の除去に効果的な①土壌用 DNA 抽出キット (ISOIL)、多糖類・ポリフェノールの除去に効果的な②酵母・細菌類 DNA 抽出キット (ISOPLANT II)、針葉樹など植物の DNA 抽出に用いられ、多糖類・ポリフェノールの

除去に効果的な③CTAB 法を行った。抽出した gDNA をもとに我々が設計した2組のプライマーセットを用いた Real-time PCR により土壤中の菌体量を測定した。また、モデル農薬として使用した PCP の土壤中の濃度は、ソックスレー抽出器を用いて n-ヘキサン抽出を行った後、HPLC により測定した。検出器は Diode Array Detector SPD-M 10A を使用し、カラムは Wakosil Agril-9 を用いて分析した。

4. 研究成果

(1) 土壤中での担子菌の増殖と Lignin 分解酵素群の分泌挙動

はじめに、13 種類の担子菌を用い、黒ボク土に PCP を添加した場合と添加しなかった場合の Lignin 分解酵素を測定し、担子菌のスクリーニングを行った。Fig. 1 にはその時使用した菌株および各土壤中に分泌された Lignin 分解酵素を調べた結果である。各土壤において Lac 活性と LiP 活性が確認できた。PCP を添加しなかった場合に最も Lac 活性が高かったのは、*C.versicolor* NBRC 30388 の 40.0 nkat/g-wet soil であった。また、PCP を添加した場合に Laccase 活性が最も高かったのは *C.versicolor* NBRC 30340 の 43.1 nkat/g-wet soil であった。以上の2種類の担子菌と、本研究室で以前より使用していた *C.versicolor* NBRC 4937 を以下の研究に使用した。

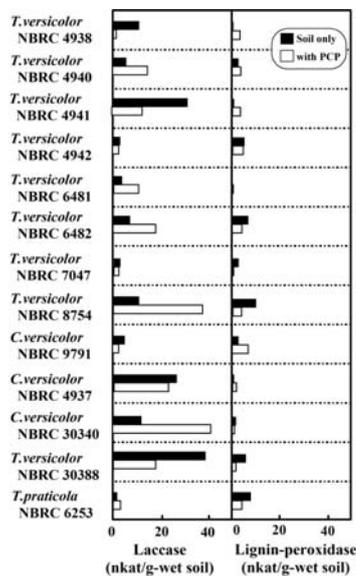


Fig.1 カワラタケの土壤中での Lignin 分解酵素の分泌

次に、選出した3種類の担子菌について、様々な土壤中においても Lignin 分解酵素を分泌するかどうかを調べ、更に担子菌のスクリーニングを行った。使用した土壤は、海砂、川砂、山砂、鹿沼土、赤玉土、黒ボク土(新)および黒ボク土(古)の7種類である。Fig.2

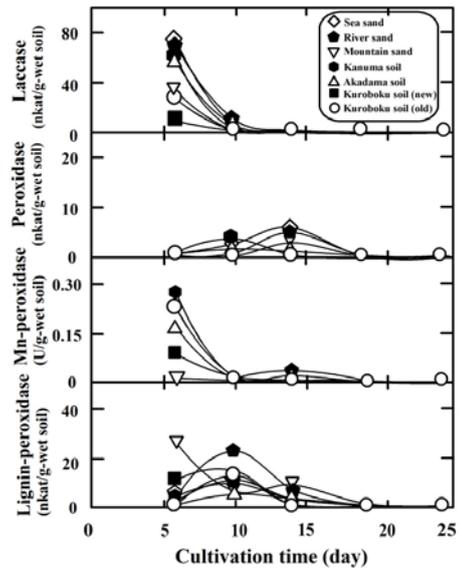


Fig.2 *C.versicolor* の土壤中での Lignin 分解酵素の分泌特性

は、一例として *C.versicolor* NBRC 4937 の各土壤に分泌された Lignin 分解酵素を測定した結果を示す。各土壤培養において、4種類すべての酵素分泌が確認できた。Lac 活性は培養初期に上昇し、10 日程でほぼ認められなかった。また、海砂、川砂は黒ボク土の2.5~3倍程度の酵素分泌が確認できた。POD 活性は、活性のピークが10日、14日目に出ており、分泌量は全て 10 nkat/g-wet soil 以下となった。MnP 活性は6日目にピークがあり、あとはほぼ 0 nkat/g-wet soil になった。LiP 活性は10日目にピークが出て、活性は 10 nkat/g-wet soil 前後になった。以上の結果より、種々の土壤に対しても、選択した担子菌は Lignin 分解酵素を土壤中へ分泌することがわかった。また、各土壤中へ担子菌を植菌し、数日間培養すると、うっすらとではあるが土壤表面に白い菌体が確認できたので、担子菌も増殖していることが確認できた。

(2) 農産廃棄物固定化担子菌の開発

稲藁と菜の花の茎の部分に *C.versicolor* NBRC 4937 を固定化させ、それを 100 ppm の PCP を添加した土壤に植菌した時の Lignin 分解酵素の分泌および PCP の分解能力を測定した。その結果、担子菌の固定化は、前培養した担子菌を細かく砕いた稲藁、菜の花の茎に植菌し、10 日間静置培養することで固定化を行った。この菌体を、PCP を 100 ppm 添加した黒ボク土(乾燥重量 10 g)に 0.5 g 添加し、PCP の分解を行った。Lignin 分解酵素は Lac 活性、POD 活性、および MnP 活性が確認できた。Lac 活性は3日目がピークで、ゆっくりと減少していった。Per 活性および MnP 活性は、10 日目にピークを迎え、ゆっくりと

減少していった。一方、PCP濃度は、コントロールの場合、3日目に80 ppmまで減少し、その後ゆっくりと減少し、14日目以降約20 ppmで変化しなくなった。それに比べ、菌のみ、稲藁、菜の花に固定化した担子菌を汚染土壌に添加させた場合、3日目までに20 ppm以下まで急激に減少した。これらの結果より、PCPの分解には土壌中に分泌されたLac大きく作用しているといえる。また、菌のみ、稲藁、菜の花の各条件によっても分解能力の違いが出たが、担子菌が農産廃棄物に固定化されやすいものほど土壌中の菌体量が増え、より多くのPCPが分解されたと考えられる。

農薬等による土壌汚染サイトは一般に貧栄養状態の土壌である。このような現場においてバイオレメディエーションを行う場合、土壌へ投入した担子菌が効率よく増殖し、リグニン分解酵素群を効率よく分泌させる必要がある。このような必要性から多収穫米の玄米及び稲わらを *C.versicolor* への栄養源とした新規な農産廃棄物固定化担子菌を開発した。担子菌の固定化方法として、多収穫米の稲わら、玄米、および稲わらと玄米の混合の3種類を用いて、それぞれのバイオマスをミキサーにて粉碎・微細化した後、オートクレープ処理を行うことにより無菌状態の固定化担体を調製した。この *C.versicolor* を植菌し約1週間インキュベートすることにより固定化担子菌を調製した。玄米に固定化した菌体および稲わらに固定化した担子菌では、いずれも酵素の分泌や菌糸の生育の点で良好な結果は得られなかった。一方、稲わらと玄米の混合担体に固定化した場合、通常の培養では発現が認められなかった POD そして MnP 活性が確認でき、それぞれ 102 μ kat/mL、282Unit/mLであった。特に、この MnP の分泌量は現在までに報告されている他菌株での最大 MnP 分泌量より数倍高い発現量である。この成果をもとに、この固定化担子菌を用いた PCP を含むモデル汚染土壌の浄化を試みた。

(3) 分子生物学的ツールを用いた土壌中の担子菌の増殖定量法の確立

培養した *C.versicolor* から上記の3種類の方法により DNA 抽出をおこない、ITS 領域のプライマーを用いて PCR を行った結果、抽出方法であっても目的遺伝子が増幅され検出が可能であったが、土壌と菌体を混合させた場合は、①で抽出した場合のみ目的遺伝子が検出された。Lac 領域のプライマーを用いた場合でも同様の結果が得られた。Fig.3 は土壌中に重量の異なる既知の *T. versicolor* を混合させ、DNA 抽出を行った後、Real-time PCR 法によって DNA 溶液中に含まれる *C.versicolor* 由来 DNA の定量を行った結果である。土壌に添加した菌体量と検出された DNA

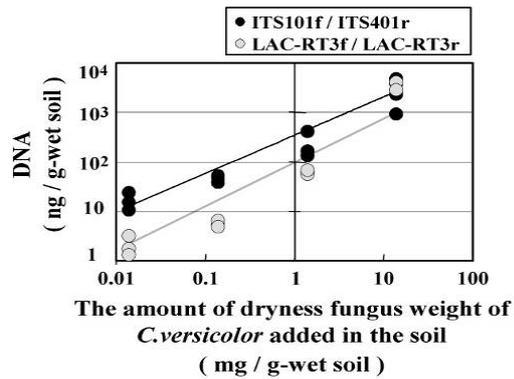


Fig.3 土壌に添加した *C.versicolor* の菌体重量とDNA量の関係

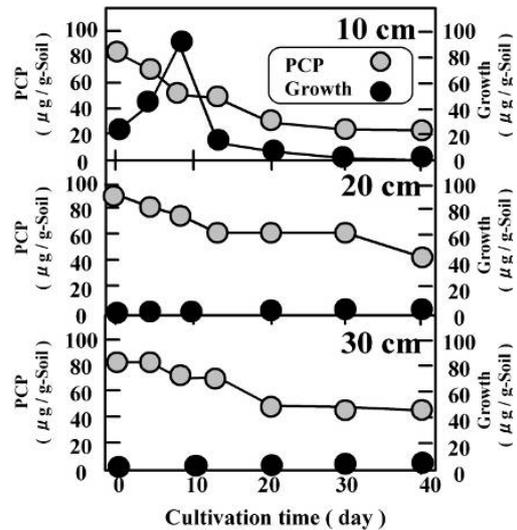


Fig.4 PCP汚染土壌カラム内の *C.versicolor* の増殖とPCP含量

量の間には比例関係が成り立ち、異なる領域であっても同様な結果が得られた。また、同じ条件で行った3点のバラツキは少なく、以上の操作によって土壌中の *C.versicolor* のDNA量を定量でき、菌体量を推算できた。

(4) 汚染土壌模擬カラム中での担子菌の増殖・酵素生合成および分泌特性の解明

小型の土壌カラム(内径7.5cm, 高さ50cm)に *C.versicolor*あるいは農産廃棄物を用いて調製した固定化担子菌を投入し、それぞれの条件での土壌中での担子菌の増殖、細胞内リグニン分解酵素の発現量、土壌中でのリグニン分解酵素を培養工学と分子生物学的手法を用いて検討した。結果をFig.4に示す。土壌表面から10 cm 下部において菌体は次第に増殖し培養8日目に最大値を示し、その後減少することがわかった。しかし、土壌表面から20と30 cm においては菌体の増殖はわずかな増殖しか認められなかった。このことから土壌上部に添加した白色腐朽菌は約10 cm までは移動し増殖できるもののそれ以下の地点まではほ

とんど移動できなかつたものと推察される。また、土壌中のLacの活性と、土壌中のPCP濃度を調べた結果、土壌表面から10、20、30 cmの地点いずれにおいてもLacは検出されPCPは分解していることから、土壌上部に存在している菌体からLacなどのリグニン分解酵素が分泌され、それが土壌下部に向かって移動し反応したことによりPCPの分解が進んだことがわかった。

(5) 固定化担子菌を用いたバイオレメディエーション法による環境汚染物質汚染土壌の浄化

農薬として使用されていたペンタクロロフェノール(PCP)をモデル物質とした有機汚染土壌の浄化に適応させた。PCPの分解は、土壌表面及び土壌中に均一に混合した場合菌体の増殖に伴ってリグニン分解酵素の分泌が促進し、同時にPCPの分解も進むことが判明した。また、地表表面に担子菌を添加した場合でも、カラム底部でLacを確認でき、分泌された酵素は、時間とともに地下に浸透していき、PCPの分解を促したことがわかった。また、100ppmの濃度であったPCPは培養30日目において地下50cmにおいても約20ppmにまで減少させることが可能であることが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① K.Hoshino, R. Watanabe, M. Takano, Biodegradation of PCP in soil by bioaugmentation method with white-rot fungus *Coriolus versicolor*, *J.Biotechnol.*, 136S, S704, 2008, 査読の有
- ② K.Hoshino, R.Watanabe, Biodegradation of PCP in soil by using white-rot fungus *Coriolus versicolor*; *J. Ecotechnol. Res.*, 8, 34-38, 2008, 査読の有
- ③ R.Watanabe, K.Hoshino, Estimation of white-rat fungus in soil based on specific DNA by real-time PCR, *Biochem.Eng.J.*, 36, 432-436 2008, 査読の有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kazuhiro Hoshino, Rie Watanabe, Maki Takano, Biodegradation of PCP in soil by bioaugmentation method with white-rot fungus *Coriolus versicolor*, 8th International Biotechnology Biotechnology Symposium & Exhibition, October 12-17, 2008, Dalian, China

- ② 神田瑞希、星野一宏、Real-time PCR方を用いた環境中の微生物定量法の開発、化学工学会新潟大会 8.21-22 (2008)、新潟
- ③ 神田 瑞季、高野 真希、星野 一宏、Real-time PCR法を用いた環境中の微生物数の定量化、3.18-20 化学工学会 第74年会, 2009, 横浜
- ④ 星野 一宏、渡邊 理恵、加賀谷 重浩、環境汚染物質汚染土壌カラムを用いた白色腐朽菌の挙動解析、化学工学会 第72年会、3.19-21, 2008, 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 一宏 (HOSHINO KAZUHIRO)
研究者番号: 20222276

(2)研究分担者

加賀谷重浩 (KAGAYA SHIGEHIRO)
研究者番号: 50272894