

キノコ菌床による難分解性物質汚染土のバイオレメディエーション

—キノコ菌床のリグニン分解酵素活性と多環芳香族炭化水素の分解能—

岡田 俊也 大出 英子
大島 義徳 辻 博和

Bioremediation of Recalcitrant Chemical Pollutant-Contaminated Soil — Applying Edible Mushroom Cultivation Waste to Bioremediation —

Shunya Okada Eiko Oide
Yoshinori Oshima Hirokazu Tsuji

Abstract

Bioremediation is a viable and cost effective method for soil contaminated with a variety of chemical pollutants. White-rot fungi, with emitted extracellular free radicals, are known to be able to decompose lignin, which is usually nonbiodegradable by most bacteria. The decomposition mechanism has been shown to be attributed, at least in part, to lignolytic peroxidases.

We examined a method that utilizes edible mushroom cultivation waste as the microbial source, and found that these waste materials have high lignolytic peroxidase activity and degraded polyaromatic hydrocarbons in sands.

概要

バイオレメディエーションは、低濃度の汚染物質が広く拡散して存在している汚染土壌に有効な方法であり、コスト的にも有利である。白色腐朽菌は様々な難分解性化合物に対して他の微生物にみられない分解特性を示すことで注目を集めている。本開発では白色腐朽菌としての食用菌に注目し、その菌床を用いた汚染土のバイオレメディエーションについて実験検討を行い、以下の知見を得た。1) 食用菌菌床、廃菌床とも高いリグニン分解酵素活性を持つ。2) 食用菌は土に混合した場合でも増殖可能である。3) 食用菌菌床の添加によって、人工汚染土中の多環芳香族炭化水素類を分解することができる。

1. はじめに

ダイオキシン類をはじめとする難分解性環境汚染物質の処理は、通常熱分解処理に代表される物理化学的方法によって行われる。これらの方法は、発生源での生成量低減策として用いる場合、あるいは汚染物質が量的にまとまって得られる場合には有効な方法であるが、ダイオキシン汚染にみられるように、汚染物質が低濃度で、広い範囲に拡散している場合には対処が困難であり、新しい方法の開発が必要となっている。バイオレメディエーションは、このような条件に対して有効な方法である。

本開発は、白色腐朽菌に属する食用キノコの菌床、廃菌床（キノコを収穫した後のオガクズ培地）を、土中の難分解性環境汚染物質の分解に活用しようとするものである。この方法では、分解菌の大量培養のコストを低く抑えることができ、加えて菌の安全性の確認についても、新規の微生物を使用する場合に比べて遙かに解決が容易である。これらは他の微生物を用いたバイオレメディエ

ーションにはない特長である。

本開発は、(財)地球環境産業技術研究機構(RITE)の技術開発促進事業に参画して実施しているものです。

2. 白色腐朽菌による難分解性物質の分解

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium*によって、各種色素、農薬、多環芳香族炭化水素類などの、難分解性で見なされている化合物が分解されることが示されて以来、その特性は多方面で注目されている。¹⁾

白色腐朽菌は難分解性の化合物であるリグニンを分解することができる。リグニンは芳香環に炭素数が3個の側鎖、水酸基、メトキシル基のついた基本構造が3次元的に重合した複雑なフェノール性高分子である。この構造中には多様な結合があつて、単一の酵素ではこれらの結合のすべてを分解することは困難である。白色腐朽菌のリグニン分解能を担っている酵素群はリグニン分解酵素と総称され、リグニンパーオキシダーゼ(LiP)、マンガ

パーオキシダーゼ (MnP) およびラッカーゼ (Lac) の3種からなる。前2者は過酸化水素を、後者は分子状酸素を電子受容体として基質の1電子酸化を触媒する。1電子酸化によってラジカルを生じる基質であれば、これを初発の反応として酸化分解が進行することになり、多くの難分解性物質の分解にこれらの酵素が関与していると考えられている。²⁾ Table 1 にリグニン分解能を持つ微生物を示した。リグニン分解酵素を持つ微生物は自然界に広く分布しているが、特に活性の高い微生物の多くは白色腐朽菌に属しており、現在食用として生産されているキノコのほとんどがこの白色腐朽菌である。

3. 菌床中のリグニン分解酵素活性

3.1 実験内容

現在市販されているキノコの多くは、オガクズを固めた「菌床 (きんしょう)」と呼ばれる培地を用いて人工的に生産されている。キノコを収穫した後の菌床が「廃菌床」(はいきんしょう) で、その多くは廃棄物として処分されているが、これにも菌糸、酵素が含まれており、難分解性環境汚染物質に対しても分解能力を持つことが期待できる。まず食用菌菌床・廃菌床中のリグニン分解酵素活性を測定し、酵素活性からその評価を行った。

3.2 材料

Table 2 にリグニン分解酵素抽出試験に使用した6種の食用菌を示す。これらをKYS 8, KYS 9, KYS 10, KYS 11, KYS 12, KYS 13とする。

菌床は接種からの培養期間によって「まん延」、「完熟」、「廃床」の3種に分けられる。「まん延」は接種した菌の菌糸が菌床全体に伸長した状態、「完熟」は増殖がさらに進行し、キノコの発生操作に適した状態となったものをさす。

3.3 リグニン分解酵素の抽出及び活性測定法

粉碎した菌床 10g に脱イオン水 50ml を加えて 30 分間激しく振盪し、10,000rpm で 10 分間遠心してその上澄みを取り、リグニン分解酵素の粗酵素抽出液とした。活性測定に基質には 2,6-Dimethoxyphenol を用い、30℃、5 分間の反応時間中に生じる酸化生成物を 469 nm の吸光度の増加から求めた。³⁾ 酵素活性は 1 秒間に 1mol の基質を酸化できる活性量を 1 katal (kat : 酵素活性の S I 単位) として示した。

リグニン分解酵素のうち、過酸化水素無添加系での活性をラッカーゼ活性、過酸化水素添加、Mn³⁺イオン非存在下での活性をリグニンパーオキシダーゼ活性、過酸化水素添加、Mn³⁺イオン存在下の活性をマンガーパーオキシダーゼ活性とした。

Table 1 リグニン分解酵素を持つ微生物
Microorganisms Having Ligninase Activity

微生物種	リグニン分解活性	
1. 担子菌類		
<i>P. chrysosporium</i>	白色腐朽	大
<i>P. radiate</i>	白色腐朽	大
<i>C. versicolor</i>	白色腐朽	大
<i>L. edodes</i> (シイタケ)	白色腐朽	大
<i>T. palustris</i>	褐色腐朽	小
2. 不完全菌類、子囊菌類		
<i>Fusarium solani</i>		小
<i>Cheatomium globosum</i>	軟腐朽	中
3. 放線菌		
<i>Nocardia</i> 属		小
<i>Streptomyces</i> 属		小

Table 2 培養期間からみた菌床の種類
Classification of Mushroom Cultivation
According to their Cultivation Stage

種類	接種からの日数(日)		
	まん延	完熟	廃菌床
KYS8 ヒラタケ科	18	23	30
KYS9 サルノコシカケ科	30	50	80
KYS10 キシメジ科	35	86	300
KYS11 キシメジ科	44	112	130
KYS12 キシメジ科	23	32	65
KYS13 モエギタケ科	35	60	90

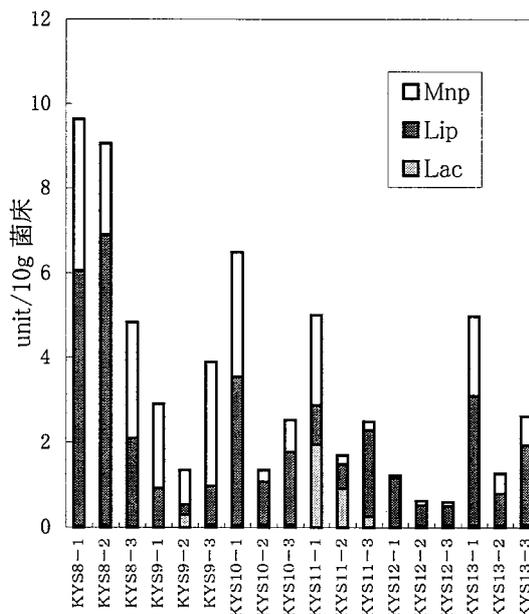


Fig. 1 食用菌菌床中のリグニン分解酵素活性
Ligninase Activity in Mushroom Cultivation

3.4 結果及び考察

Fig. 1 に各菌床のリグニン分解酵素活性を示す。各菌ごとに、まん延、完熟、廃菌床の3種の活性を示し、各々1, 2, 3の番号で区別した。

今回測定したすべての菌床からリグニン分解酵素活性が検出された。これらの中ではKYS 8, KYS 10, KYS 11, KYS 13が高い活性を示した。これらの菌が示した活性は、リグニン分解酵素の応用研究に広く使用される *P. chrysosporium* を同一条件で培養した時の活性よりも高かった。リグニン分解酵素としてはLiP, MnP活性が高く、Lac活性が低い傾向がみられた。難分解性の環境汚染物質の分解にとって鍵になる酵素は、非フェノール性化合物に対しても高い分解活性を持つ Lip であると言われており、これはむしろ望ましい結果である。

「廃菌床」のリグニン分解酵素活性を、「まん延菌床」、「完熟菌床」と比較すると、KYS 9を除く他のキノコで明らかに低下していた。しかし各々のキノコの最も高い活性を示す時期と比較しても、1/2~1/3の活性を維持しており、菌床、廃菌床とも分解菌の微生物資材として十分使用可能であると考えられる。

4. 土-菌床混合系での菌の増殖

4.1 実験内容

白色腐朽菌は基本的に木質系の培地に増殖するもので、土が混入した条件は菌の増殖にとって良好な環境ではない。菌床を汚染土のバイオレメディエーションに適用するためには、土壤中においても、ある期間は増殖を維持させる必要がある。そのために、土に菌床を混合し、混合物の酸素吸収速度の変化を測定する事で、菌の増殖の有無を調べた。

4.2 方法

4.2.1 土-菌床混合物の調製と培養 非滅菌の園芸用黒土に対して、KYS 8菌床を10, 25, 50% (V/V)の割合で混合し、水分条件を一定にして、25℃で7日間静置培養した。

4.2.2 土-菌床混合物の酸素吸収速度の測定 培養中の土-菌床混合物の一定量をとって2 mlの懸濁液とし、酸素電極法によって酸素吸収速度を測定した。測定には Rank Brothers社製酸素電極を用いた。

4.3 結果及び考察

結果を Fig. 2 に示す。土のみでは、酸素吸収速度の増大はほとんど起こらなかった。これに対して10及び25% (V/V)の菌床を添加した系では、7日間の静置で酸素吸収の明らかな増大が生じた。50% (V/V)添加系では4日目に酸素吸収速度の増大が生じ、7日目にはさらに吸収速度は増大した。ここでは特に図示しないが、静置培養と

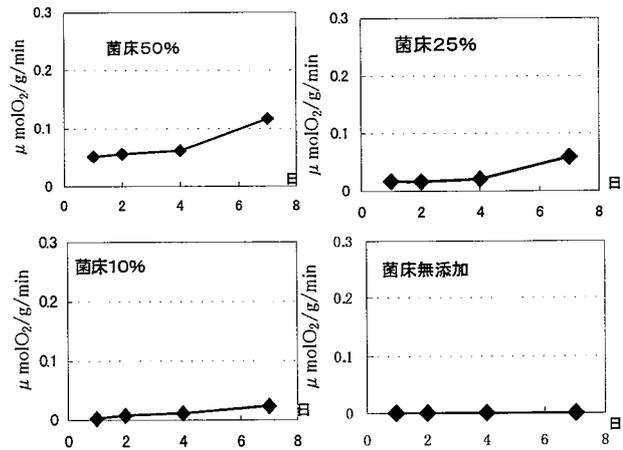


Fig. 2 土-菌床混合物の酸素吸収速度の変化
Changes of the Oxygen Consumption Rate of
Soil-Mushroom Cultivation Mixture

もにリグニン分解活性も上昇してくることから、土-菌床混合物の酸素吸収速度の増大は、菌の増殖による呼吸量の増大によるものと判断した。

これらの結果から、菌床を土に混合した場合にも菌が増殖可能であることが明らかとなった。しかしながら混合系において、添加後に速やかな増殖を起こさせるためには、一定量の菌床の添加が必要であることも示唆している。

5. 菌床による多環芳香族炭化水素の分解

5.1 実験内容

菌床は難分解性汚染物質を分解することができるのかどうかを明らかにするために、砂に多環芳香族炭化水素 (PAH: Poly Aromatic Hydrocarbon) を添加して「人工汚染土」をつくり、これに菌床を添加混合し、培養過程におけるPAHの減少を測定した。

5.2 方法

分解試験にはKYS 6, KYS 8, KYS 9, KYS 10, KYS 11, KYS 13の6種の菌を用いた。

ジクロロメタン/アセトニトリル(7:3)混合溶媒を用いてアントラセン、フェナントレン、ピレン、ベンズピレンの各1,000ppm混合溶液を調製し、これを砂5gに対し各20ppmになるように添加した後、溶媒を蒸発させ、「人工汚染土」とした。これにほぐした菌床3gを添加し、水分を調整して、25℃で4週間培養した。砂はゴルフ場グリーンを目土用のものを滅菌して用いた。以上の操作は100mlのねじ付きピンを用いて行った。

所定の培養期間終了後、凍結乾燥を行い、砂-菌床混合物中のPAHをジクロロメタンで抽出し、高速液体ク

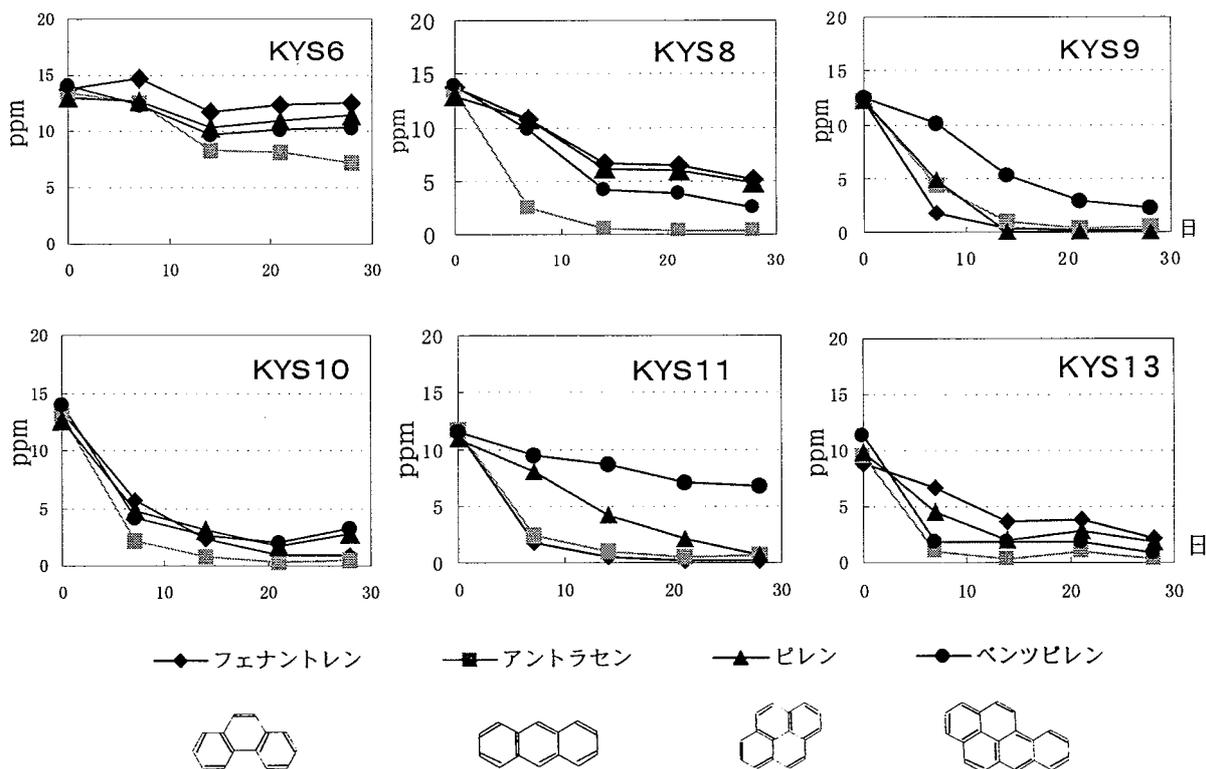


Fig. 3 白色腐朽菌菌床による多環芳香族炭化水素の分解
Degradation of Polyaromatic Hydrocarbons by Adding of
Sawdust Culture of White-rot Fungi

ロマトグラフィー (Hewlett Packard 1090) で定量した。

5.3 結果及び考察

Fig. 3 に分解試験の結果を示す。今回試験に用いた6種の白色腐朽菌では、KYS 6を除く5種で、培養過程におけるPAHの減少が生じた。オートクレーブで滅菌した菌床を添加した場合、ここでは特に図示しないが、PAHの減少は生じなかった。これらの結果は、添加した菌によってPAHが他の化合物に変換、あるいは分解されたことを示している。なお試験の開始時の回収率の低下は、滅菌菌床、非滅菌菌床の両方でみられ、PAHの菌床へ吸着などが生じたものと思われる。

供試した菌床の中ではKYS 10、KYS 13が、他の菌床に比べてPAHの分解速度が大きかった。これに対して、KYS 9ではベンズピレン、KYS 11ではピレン・ベンズピレン、KYS 8ではピレン・ベンズピレン・フェナントレンの分解速度が低かった。

6. まとめ

食用菌菌床・廃菌床は高いリグニン分解酵素活性を保持していること、また多環芳香族炭化水素を含む人工汚染土に菌床を添加、培養することで、これらの化合物を

分解できることを示した。食用菌は総じて高い分解活性を示したが、対象となる化合物によっては、菌による分解能に差がみとめられた。

今後は、多環芳香族炭化水素がさらに高濃度の場合、加えて他の難分解性汚染物質に対する分解能等を明らかにするとともに、実汚染土に対しても適用し、キノコ菌床によるバイオレメディエーション工法の開発を進めたい。

参考文献

- 1) S. D. Aust and J. D. Stahl: Biodegradation of Dioxin and Dioxin-like Compounds by White-Rot Fungi, in Biodegradation of Dioxin and Furans, R.M. Wittich ed., pp.188~196, Springer, (1998)
- 2) 島田幹夫: リグニン分解酵素, キノコの化学・生化学, 水野卓・川合正充編著, 学会出版センター, pp.183~196, (1992)
- 3) Perie, F and M. Gold: Manganese regulation of Manganese peroxidase expression and lignin degradation by white rot fungus, Apple. Environ. Microbiol., vol. 57, pp22~245, (1991)