

ダイオキシン類汚染土壌から分離された微生物の特徴について

Isolation and Characterization of a fungus from a dioxin-contaminated soil

惣田 昱夫*, 今井 絵理奈**, 古市 徹***

Ikuko SOUTA*, Erina IMAI** and Thoru FURUICHI***

Abstract

A fungal isolate from a dioxin-contaminated soil sample was characterized for its ability to degrade the dioxin-like compound 3Cl-DD and lignin. The following became clear. 1) Lignin was decolorized by 90% after 3 days of culture. 2) Based on the analysis of 28S rDNA, the fungus was identified as *Aspeligillus japonika*. 3) During the same time period, the fungal isolate was able to degrade 20% of the 100 ppm 3Cl-DD present in the culture medium.

1. はじめに

ダイオキシン類は、ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン (PCDD) とポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) に加え、コプラナーポリ塩化ビフェニル (Co-PCBs) の三種類の化合物の総称である。異性体が多く、そのうち毒性のあるものは PCDD では 75 種類中 7 種類、PCDF は 135 種類中 10 種類、PCB209 種類中 Co-PCB は 13 種類とされている。最も毒性の強い異性体は、2, 3, 7, 8-TCDD である。ダイオキシン類は、量的に少ない量で急性毒性を示し、長期摂取により発ガン、成長抑制、生殖毒性などの慢性毒性も示す特異的な化学物質¹⁾である。

ダイオキシン類の主な発生源は、有機塩素系農薬等の製造過程や、塩素漂白や塩素殺菌の過程、廃棄物の焼却燃焼過程、過去に生産された化学物質である。中でもゴミ焼却による発生が多いとされ、現在では排出抑制基準が設けられ発生量は減少し大気中のダイオキシン濃度は低くなっているが、解体された焼却場の適正な処理が行われなかったこと等により、これらのダイオキシン汚染土壌等の無害化処理は現在でも課題となっている。

2010年 3月 5日受理

* 理工学部 物質生命科学科

** 理工学部 物質生命科学科卒業生

*** 北海道大学大学院工学研究科

本研究では、厚木飛行場周辺の焼却施設から排出されたダイオキシン類により汚染された土壌のバイオレメディエーションの実験を行い、ダイオキシン類が減少しているライシメーター²⁾から、ダイオキシン分解菌の分離を試みた。リグニン分解菌はダイオキシン類を分解^{3,4,5,6)}するという報告があることから、分離した菌がリグニンと三塩素化ダイオキシンである 3, 7-threochlorodibenzo-p-Dioxin (3Cl-DD) の分解の特徴を調べた。また分離した分離菌の菌種の同定も行った。

2 実験方法

2.1 ダイオキシン分解菌の分離と培養条件

厚木飛行場周辺のダイオキシン汚染土壌を用いバイオレメディエーションの実験を行いダイオキシン類の減少が認められた土壌 1g を生理食塩水 9ml に溶かし、その上清 1ml をリグニン培地 20ml の入った 50ml の遠沈管に入れ、室温で 1 週間、150rpm で振とう培養した。1 週間後、リグニン脱色が確認されたサンプルから 1ml をビフェニール 200ppm の入った LB 平板培地に入れ 30°C で培養した。ビフェニールが分解され黄色くなった培地に生育した菌をリグニン培地 20ml に一白金耳植菌し、同じく室温で 1 週間、150rpm で振とう培養した。リグニンの脱色を確認された培地をダイオキシン分解菌とした。リグニン培地組

成は、リグニン 0.1g、グルコース 1.0g、 K_2HPO_4 0.1g、 $(NH_4)SO_4$ 0.2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g、NaCl 0.2g、 $CaCO_3$ 0.2g、微量塩類溶液 0.1ml($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.01g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/100ml)である。

2.2 リグニン脱色と菌数の測定

リグニン培地 20ml を 50ml 遠沈管に入れ培養し、その 1.0ml をマイクロチューブに取り、12000rpm で 15 分間遠心分離した。上清 0.5ml は、4 倍希釈した後 480nm で透過率を測定し、リグニンの脱色の変化を測定した。また、混釈法により菌数を測定した。シャーレに希釈水 1ml とツァペックドックス寒天培地を加え、30°C で 1 週間培養した。培養後コロニー数をカウントし、菌数を求めた。

2.3 ダイオキシン類分解試験

本分解試験では 3Cl-DD を使用した。リグニンの脱色試験で脱色が確認できたサンプルから 1ml をリグニン培地に入れ再度 4~6 日間前培養した。リグニンを除いたリグニン培地 25ml の入った遠沈管に各々 5ml ずつ分注した。この遠沈管の最終濃度が各々 1ppm、10ppm、100ppm となるよう 3Cl-DD を添加し、3 種類の試料を作成し、3 日間 25°C、150rpm で振とう培養した。

2.4 抽出方法

2.4.1 分解代謝物の抽出^{7,8)}

培養後、培地液を 50ml 共栓試験管に移し、塩酸を加え pH2 とした。この試料を酸性抽出画分とした。抽出は、酢酸エチル 10ml を入れ約 5 分間振とう後、軽く遠心し、酢酸エチル層を分取した。これを 2 回繰り返した。次に分取した酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、1 ml 以下に濃縮した。

2.4.2 ダイオキシン類抽出^{9,10)}

酢酸エチルで抽出した後の培地を水酸化ナトリウムで中性に戻し、中性抽出画分とした。抽出は、トルエン 10ml を入れ約 5 分間振とうし、トルエン層を分取した。これを 2 回繰り返した。次に有機物の分配のため、硫酸を用いてトルエン層を洗浄した。この洗浄は、硫酸層の黄色の着色が目で確認できなくなるまで行った。硫酸処理したトルエン層は蒸留水で 2 回洗浄した。さらに無水硫酸ナトリウム

で脱水後、濃縮し 1ml に定量した。

2.4.3 回収率の測定

植菌していない水 20ml およびリグニン培地 20ml よりダイオキシン類の抽出を行った。

3Cl-DD 分解試験においても培養後の培地に内部標準物質として ^{13}C でラベルした 2,3,7-3Cl-DD を添加し、回収率を求めた。

2.5 分析条件

GC-MS 分析計 島津製 QP-5050A 型を用いて分析した。分析条件は以下の通りである。

カラム：DB-5 (0.22mm×30m)

キャリアガス：He 1.3ml/min

インターフェイス：250°C

3Cl-DD 代謝物分析の GC 条件：

昇温条件：100°C, 1 min hold、
100~250°C/10°C/min、
250°C 5min hold

測定モード：Scan

3Cl-DD 定量分析の GC 条件：

昇温条件：100°C、1 min hold、
100~250°C 10°C/min
250°C 5min hold

測定モード：SIM

SIM 測定イオン：286.95 298.00

2.6 SDS-PAGE 法^{11,12)}

2.6.1 酵素の抽出

培養 8 日目の培地液 20ml を 2000rpm で 10 分間遠心分離し、上清と沈殿物に分けた。上清は、攪拌型ウルトラホルダーで 5ml 以下になるまで濃縮した。

沈殿した菌体は、ビーズビーターで 10 分間破碎した後メンブレンフィルター (0.45 μm) 付きマイクロチューブを用いて 10000rpm、10 分間遠心を行い、濾液を濃縮した。

2.6.2 SDS-PAGE の作成

BIO-RAD 製を使用し、以下の組成でゲルを作製し、50

mA で電気泳動し、染色、脱色を行なった。11%アクリルアミドゲルの組成は以下の通りである。

アクリルアミド	3.7ml
1.5M トリス	2.5ml
10%SDS	0.1ml
イオン交換水	4.4ml
テトラメチルメチレンジアミン	0.012ml
APS	0.1ml

2.7 分解菌の同定^{13,14)}

2.7.1 光学顕微鏡による形態観察

ダイオキシン分解酵素を出すカビをツアベックドックス液体培地にて、150rpm で3日間振とう培養し、ペレット状の菌体をプレパラートに乗せ、光学顕微鏡により観察した。

2.7.2 SEM による形態観察

ダイオキシン分解酵素を出すカビをツアベックドックス平板培地で30℃、1週間ほど培養し、SEM(JSM-5400、日本電子)により観察した。

観察試料は、真鍮試料台に培養したカビを両面テープで貼り、FINE COAT (JFC-1100E、日本電子)で5分間金蒸着した。

2.7.3 DNA 解析¹⁵⁾

ポテトデキストロース寒天培地「ダイゴ」(日本製薬、東京)で25℃、3日間培養した菌株を用いて DNeasy plant Mini Kit(QIAGEN,Hilden,Germany)により DNA を調整し、これをテンプレートとしてプライマーNL1,NL2,NL3 及び NL4(Donnell,1993)で PCR を行った。ABI PRISM3100 Genetic Analyzer System でシーケンスを行い、国際塩基性配列データベースで相同性検索を行った。

3. 実験結果

3.1 リグニン分解菌の分離

リグニン分解用培地にダイオキシン類含有土壌サンプルを入れ培養したところ、リグニンが分解され脱色が確認

された。この試料を3回ほど集積培養し、その中から1種類の、リグニンを分解する菌が分離され、SI-2000 とした。

3.2 リグニン脱色と菌増殖の測定

リグニン脱色と菌増殖の測定結果を図1に示した。図1より菌数は、培養開始から3日間で 10^8 を越え、定常期となった。リグニンの脱色は菌の増殖からやや遅れて3~6日目に活性が高くなった。リグニン脱色率は、8日で90%となった。培養8日後の脱色の写真を図2に示した。

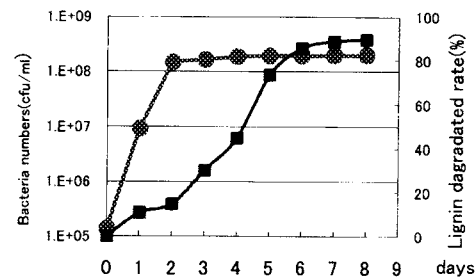


図1 リグニンの脱色率と菌増殖の関係

●Lignin degraded rate ■Bacteria numbers



図2 8日後の SI-2000 株によるリグニンの脱色

3.3 ダイオキシン類分解試験

3.3.1 好氣的分解試験

SI-2000 を用いて、1,10,100ppm の3種類入った3Cl-DD 分解試験を行った。分解能力の検定を行うため3日間測定した結果を図3に示した。3Cl-DD 濃度が1ppm(5μg 含有)の場合、3日目でGCMS のTIC の3Cl-DD のピークが検出されなくなった。10ppm(同50μg)では約70%(35μg)、

100ppm では約 20%の減少率(100 μg)であった。

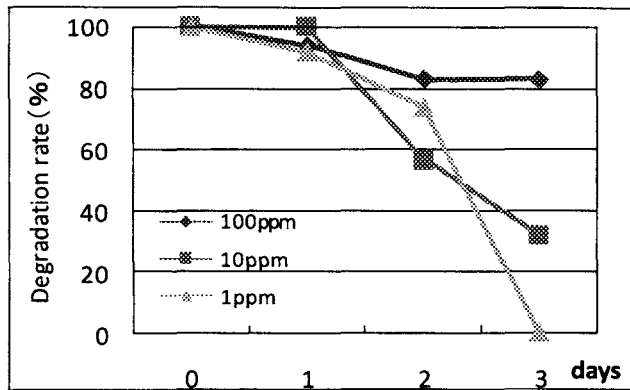


図3 3Cl-DDの濃度の違いによる分解の経時変化

3.3.2 回収率測定

ダイオキシン類抽出におけるロスを換算するため、回収率の測定を行った。植菌していない水 20ml およびリグニン培地 20ml よりダイオキシン類の抽出を行った結果、水からはほぼ 100%、リグニン培地からは 90%回収できた。

また、3Cl-DD 分解試験においても培養後の培地に内部標準物質として ¹³C でラベルした 2,3,7-3Cl-DD を添加したところ、約 80%の回収率であった。

3.4 リグニン分解酵素の SDS-PAGE^{16,17)}

リグニンの脱色を行う菌の酵素を確認するため SDS-PAGE を図 4 示した。細胞内と細胞外濃縮液を泳動した。細胞内濃縮液に 20 近くのバンドが確認された。このうち 22kDa、35kDa、53kDa、57kDa、90kDa の位置にバンドが確認された。リグニン分解酵素として知られて

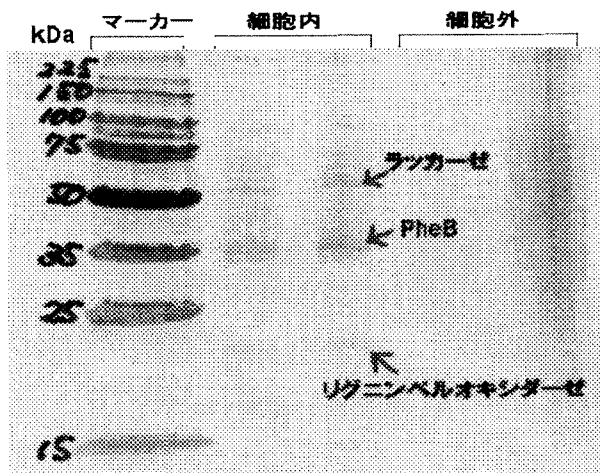


図4 SI-2000の酵素の SDS-PAGE

いるリグニンペルオキシダーゼは 22kDa、PheB は 35kDa、ラッカーゼは 53kDa と判明している。これらの位置にバンドが認められた。

3.5 分解菌の同定

3.5.1 顕微鏡観察¹⁵⁾

光学顕微鏡で観察した菌の写真を図 5 に示した。また、SEM で撮影した菌全体の写真を図 6 に示した。

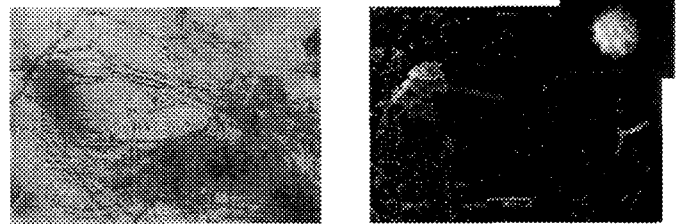


図5 顕微鏡による SI-2000 図6 電子顕微鏡による菌糸と孢子

顕微鏡による観察で菌糸が、SEM では菌体の長さ約 250 μm、孢子は 3~4 μm と確認された。また、孢子は突起状の球形をしていた。

3.5.2 DNA 解析及び系統樹^{15,16)}

28SR-DNA の解析を行った。解析した結果、*Asperigillus japonica* 近縁種の糸状菌であった。その系統樹を図 7 に示した。

4. 考察

分離菌のリグニン分解試験の結果では、10日間でリグニンの茶褐色を分解・脱色することがわかった。

リグニンの濃度が 100ppm 程度に下がると、肉眼ではほぼリグニンの茶褐色の色は確認できなくなるが、実験開始時リグニンの濃度が 1000ppm の培地が、10日後には 123.8ppm まで低下し、脱色がはっきりと目視された。この結果から菌数の増加は早く、リグニン脱色は遅れていることから、脱色するのは菌の生成した酵素、リグニンペルオキシダーゼ等¹²⁾による分解であると推測された。SDS-PAGE でも 22kDa の位置に酵素の存在が認められて

いる。

リグニンは製紙・パルプ工業における廃液に多く含まれ、河川の泥濁を引き起こし問題となっている。今回分離した菌種はリグニンを効率よく分解することから、本菌を利用するならリグニン廃液を効率よく分解処理¹²⁾出来るのではないかと考えている。

3Cl-DD の各濃度の分解試験では、濃度によって分解率が異なっている。一般に化学物質の分解は存在する酵素量に比例することから 3Cl-DD の分解量は菌が生産した酵素量によって決定される。培地中の含有濃度が 500 μg (100ppm) と多いほど分解率は 20%と低い分解量は 100 μg と多い。高濃度の方が菌の活性を高め分解酵素生産量を多くしているようである。

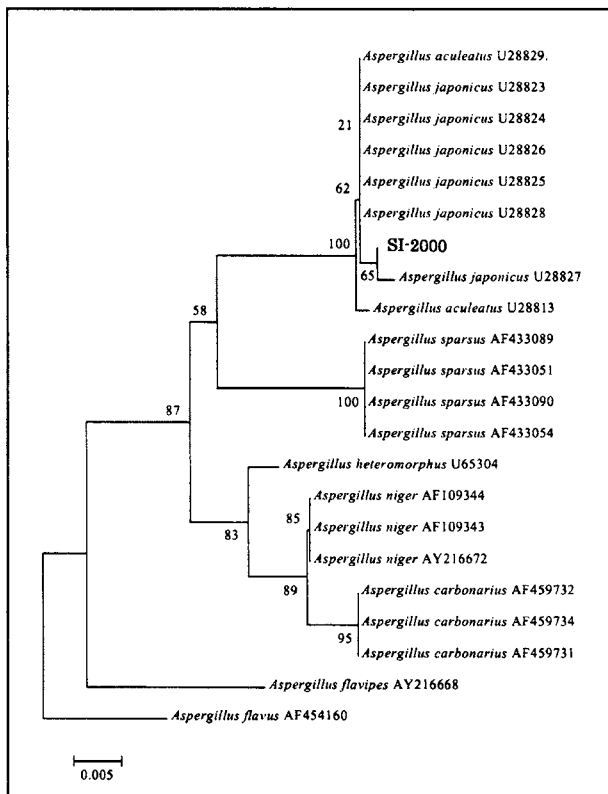


図7 *Asperigillus japonica* SI-2000 の系統樹

菌の活性は、添加された化学物質の量や毒性によっても異なる。本菌株を有効利用する場合、酵素の活性化条件は重要となる。コカII SDS-PAGE は 8 日目の分解終了時の培養液の泳動であることから確認されたバンドが薄いものとなっている。今後さらに検討し、酵素類の解析を進めた

いと考えている。

また、一般にダイオキシン類の分解では中間代謝物^{10,17,18)}が生成する。GC-MS で 3Cl-DD 分解と分解代謝物を調べたが、予想される開環前の中間代謝物は確認されなかった。そのため本分解菌による分解代謝経路を確定できなかった。しかし、リグニンペルオキシダーゼやラッカーゼ等の酵素を含む培養液によるダイオキシン類を分解した報告^{6,12)}によると開環前の分解物がわずかながら検出されることや本試験でも開環後の代謝物と思われるベンゼン化合物が確認されたことから、本菌株による 3Cl-DD の分解が行われたものと推測している。

菌種の同定では、光学顕微鏡による形態観察で糸状菌と確認された。糸状菌は、カビと呼ばれ糸状の菌糸を伸ばして生育し、胞子を形成する。

SEM 写真では菌糸と胞子嚢、胞子が確認され、顕微鏡では菌糸などが見られた。これらの結果から糸状菌と確認された。また、本菌株の 28Sr-DNA の解析と系統樹作成により *Asperigillus japonica* の近縁種と判明している。本菌株は有害性の少ない菌種であると考えている。

5. まとめ

ダイオキシン汚染土壌からダイオキシン分解菌として分離した分解菌 SI-2000 の特徴を調べた。以下のことが明らかとなった。

- 1) 分離菌 SI-2000 によりリグニン分解が確認された。
- 2) SI-2000 株による 3 塩素化ダイオキシンの分解が確認された。
- 3) 培養液中からリグニン及びダイオキシン分解酵素として知られているリグニンペルオキシゲナーゼとラッカーゼのバンドが認められた。
- 4) SI-2000 株は、28Sr-DNA の解析から *Asperigillus japonica* の近縁種の糸状菌と同定された。

6. 謝辞

本研究は平成 17 年度環境省廃棄物処理等科学研究費の援助で実施した。また遺伝子の解析で (株) テクノスルガ (静岡市清水区) の援助をいただいた。併せて感謝します。

7. 参考文献

- 1) 惣田 昱夫：医療廃棄物とダイオキシン、機能水医療研究, 11, 9-14(1999)
- 2) Ikuo souta, Tohoru Furuichi et al: A characteristics of the reduction in dioxins for 24 months in the expamination of a bio-remediation Lysimeter, *68, Organohalogen Compounds*, 1488-1491 (2006)
- 3) 惣田 昱夫：高分子、内分泌攪乱物質ならびに毒性物質の生分解⁸ 9.ダイオキシンの生分解について, 防菌防黴, *33*, 21-28(2005)
- 4) 橋 燦郎：ダイオキシン汚染土壌の木材腐朽菌による生物処理, 用水と廃水, *41*, 8-12(1999)
- 5) 伊藤和貴 他：木材腐朽菌によるバイオレメディエーション (II) ダイオキシン分解菌の酵素活性と 2,7-Dichlorodeibenzo-*p*-Dioxin の分解との関連およびダイオキシン分解菌のスクリーニング法の改良, 紙パ義協誌, *51*, 1759-1768(1997)
- 6) 斉藤祐司他：ダイオキシン類及び PCB 汚染度の浄化システムの開発, 大成建設技術センター報, *39*, 1-21(2006)
- 7) Nobutada Kimura and Yoshikuni Urushigawa : Metabolism of Dibenzo-*p*-Dioxin and Chlorinated Dibenzo-*p*-Dioxin by a Gram-Positive Bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101. *J. Biosci. Bioeng.*, *92*, 138-143(2001)
- 8) Kensuke Furukawa, Noboru Tomizuka, and Akira Kamibayashi: Metabolic Breakdown of Kaneclors (Polychlorobiphenyls) and Their Products by *Acinetobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, *46*, 140-145(1983)
- 9) Rolif-Michael Wittich et al: Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, *49*, 489-499, (1998)
- 10) Kunichika Nakamiya, Tohoru Furuichi : Isolation of a fungus from denitrifying activated sludge that degrades highly chlorinated dioxins, *J Mater Cycles Waste Manage*, *4*, 127-134(2002)
- 11) 井本泰治 著: 蛋白質工学研究法、生物化学実験法 *40*、学会出版センター(2002)
- 12) 金山 望 他： *Aspergillus terreus* LD-1 の生産するアルカリ性リグニンペルオキシダーゼの精製と諸性質、環境技術、*31*, 644-651(2002)
- 13) 山崎省二 編：カラーアトラス環境微生物、オーム社(2002)
- 14) 山田英智 編：微生物学における電子顕微鏡技術、医学・生物学のための電子顕微鏡実験法 4、学会出版センター(1995)
- 15) 久米田裕子：カビ同定法の簡易、迅速化—分子生物学的手法を中心に—, 防菌防黴誌, *33*, 569-576(2005)
- 16) 鈴木健一郎 編：微生物の分類・同定実験法、シュプリンガー・フェアラーク東京(2002)
- 17) Rolif-Michael Wittic et al : Metabolism of Dibenzo-*p*-Dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1, *Appl. Environ. Microbiol.*, *58*, 1005-1010(1992)
- 18) Satoshi Takada et al : Degradation of Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans by the White Rot Fungus *Phanerochaete soridida* YK-624, *Appl. Environ. Microbiol.*, *62*, 4323-4328(1996)