研究論文

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の増殖に
及ぼす重金属の影響Effect of Heavy Metals on the Growth of Basidiomycete
Phanerochaete chrysosporium

明石 竹弘*・月原 貴久**・羅 栄*・青山 勲*

ABSTRACT

We investigated an effect of heavy metals on the growth of basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. After inoculating spores in the liquid culture medium with cadmium, copper, manganese and zinc, and the growth of *Phanerochaete chrysosporium* was followed by measuring the absorbance of them. The area value calculated from the growth curve for 48 and 96 hours was used as an index of the growth characteristic. Copper ($10\sim1000\mu\text{eq}/\ell$) and manganese ($10\sim12000\mu\text{eq}/\ell$) did not affect the growth excessively. Cadmium caused remarkable growth inhibition at the high concentration ($3000\sim8000\mu\text{eq}/\ell$). While zinc promoted the growth remarkably at the low concentration ($10\mu\text{eq}/\ell$), however it decreased at the high concentration ($8000\sim12000\mu\text{eq}/\ell$).

Key Words : white rot fungi, heavy metal, growth promotion, growth inhibition, growth curve

要 旨

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* の増殖に及ぼす重金属の影響を検討した。Cd²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺を添加した液体培養培地に胞子を接種し、吸光度を測定する事によって菌体の増殖を測定した。増殖特性を表す指標として増殖曲線から算出した48および96時間のエリア面積値を用いた。Cu²⁺ ($10\sim1000\mu\text{eq}/\ell$)、Mn²⁺ ($10\sim12000\mu\text{eq}/\ell$) は菌体の増殖に著しい影響を及ぼさなかった。Cd²⁺ は高濃度域 ($3000\sim8000\mu\text{eq}/\ell$) において著しい増殖阻害を及ぼした。Zn²⁺ は低濃度 ($10\mu\text{eq}/\ell$) で菌体増殖に対して著しい促進作用を及ぼしたが、高濃度域 ($8000\sim12000\mu\text{eq}/\ell$) になると促進作用は低下した。

キーワード： 白色腐朽菌, 重金属, 増殖促進, 増殖阻害, 増殖曲線

1. はじめに

近年、環境中に放出された有害化学物質を除去する手法の一つである Bioremediation が注目されている。Bioremediation とは微生物機能により有害化学物質を炭酸ガス、水、無機塩などの無害物質にまで変換させて汚染された環境を修復する技術であり、Biostimulation と Bioaugmentation の 2 つに分類される。前者は汚染された環境に存在する微生物 (microflora) に対して栄養塩の添加、エアレーションを行い微生物機能の活性を高める手法であり、

後者は浄化機能を有する微生物を汚染された環境中に導入する手法である¹⁾。

担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*) は木材の主成分であるリグニンを分解する白色腐朽菌である。この菌体はダイオキシン類などの難分解性物質を分解する能力を有するため、現在、Bioaugmentation においてこの菌体を利用する研究が盛んに行われている^{2,3,4)}。

Bioaugmentation を行う場合、汚染された環境に共存する物質が、導入する微生物の生長、代謝などに対してどのような影響を及ぼすかを把握しておく

* 岡山大学資源生物科学研究所 Takehiro AKASHI, Rong LUO, Isao AOYAMA

** 岡山理科大学理学部 Takahisa TSUKIHARA

1998年11月2日受付

1999年2月5日受理

必要性がある。特に重金属類は必ず環境中に存在し、微生物に多大な影響を及ぼす。*P. chrysosporium* に及ぼす重金属の影響としては酵素活性への影響が報告されている^{4,5)}。*P. chrysosporium* はリグニン分解酵素としてリグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガニペルオキシダーゼ (MnP) などを分泌する。培養液中にマンガンが存在すると、MnP 活性は増大し LiP 活性は抑制される。逆に、マンガンが存在しない状態では LiP 活性は増大し MnP 活性は抑制される。しかし、マンガン以外の重金属類が *P. chrysosporium* に及ぼす影響を調査した報告は少ない。そこで本研究では、培養培地にカドミウム (Cd^{2+})、銅 (Cu^{2+})、マンガン (Mn^{2+})、亜鉛 (Zn^{2+}) を添加し、重金属類が *P. chrysosporium* の増殖に及ぼす影響を検討した。

2. 実験材料と方法

2.1 供試菌体

本実験では供試菌体として *Phanerochaete chrysosporium* (IFO31249) を使用した。この菌体は発酵研究所から分与され、これを継代培養したものを用いた。菌体は PDA 培地 (ポテトデキストロース寒天培地) に植種し、 39°C で 3 日間培養後 4°C で保存した。この継代培養は 2 ヶ月毎に行っている。菌体を実験に使用する時は、保存菌体を PDA 培地に植種し、 39°C で 3 日間前培養を行った。その後、白金耳で菌体を培地から採取し、滅菌水に懸濁した。そしてガラスウールを用いて懸濁液を濾過し、濾液を孢子懸濁液として実験に使用した。

2.2 供試重金属類

本実験で *P. chrysosporium* に暴露させた重金属類は、カドミウム (Cd^{2+})、銅 (Cu^{2+})、マンガン (Mn^{2+})、亜鉛 (Zn^{2+}) の 4 種類である。使用した重金属類の化学形態はすべて硫酸塩形態である。

2.3 重金属暴露実験方法

本実験は重金属を添加した培地に孢子を接種し、微生物培養装置「BIOSCREEN-C」(ラボシステム社

製) により培養を行った。「BIOSCREEN-C」は 100 個のキュベット (1 キュベットの内容量: $600\mu\ell$) を有するプレート 2 個を設置し、静置培養を行える装置である。そして設定された時間間隔でキュベットに投与した溶液の吸光度を自動的に測定する事ができる。菌体増殖量は、培養液中の吸光度を測定する事によって行った。

培養温度は $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、測定波長は 660nm 、培養期間は 96 時間、吸光度の測定間隔は 30 分とし、孢子接種量は $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ とした。実験に使用した培地は P. Bonnarne ら⁵⁾の培地から Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} を除外した培地を基本培地 (コントロール) として使用した。培地組成は以下の通りである。

基本培地 (1 ℓ あたり) : glucose 10g, diammonium tartrate 0.2g, KH_2PO_4 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, thiamine hydrochloride 1mg, 20mM sodium tartrate (pH 4.5), 2.5mM veratryl alcohol

微量元素溶液 70ml

微量元素溶液 (1 ℓ あたり) : nitrilotriacetic acid 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.0g, NaCl 1.0g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, CoSO_4 0.1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, AlK (SO_4)₂ $\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, H_3BO_3 0.01g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g

培地中の重金属濃度段階は表 1 に示す通りで行った。また、実験は 4 回の繰り返し操作を行い、その平均値を菌体増殖量の解析に使用した。

3. 結果および考察

3.1 *P. chrysosporium* の増殖曲線

3.1.1 基本培地

本実験では *P. chrysosporium* の増殖に及ぼす Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} の影響を調べるため P. Bonnarne らの培地から Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} を除外した培地をコントロールとして使用した。元の培地には、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} が、5.607、405.98、48.69 $\mu\text{eq}/\ell$ 含有されている。そのため最初に元の培地と Cu^{2+} 、

表 1 重金属濃度段階

種類	濃度段階 ($\mu\text{eq}/\ell$)											
Cd^{2+}	10	100	200	500	1000	1500	2000	3000	4000	6000	8000	
Cu^{2+}	10	100	200	500	1000							
Mn^{2+}	10	100	500	1000	2000	3000	4000	6000	8000	10000	12000	
Zn^{2+}	10	100	500	1000	2000	3000	4000	6000	8000	10000	12000

図-1 基本培地による *P. chrysosporium* の増殖曲線

Mn^{2+} , Zn^{2+} を除去した培地とで増殖比較実験を行った。その結果、両者の培地の菌体増殖量に大きな差が生じた。これを図-1に示す。この結果より、培地から除外した重金属 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} の成分が *P. chrysosporium* の増殖に大きく関与している事が示唆された。

3.1.2 増殖曲線による Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} の影響解析

図-2には *P. chrysosporium* の増殖に及ぼす Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} の影響を増殖曲線によって示した。 Cd^{2+} は低濃度域では促進、高濃度域で阻害

作用の両影響を与えた。培養を開始して72時間後では、 $10 \sim 1500 \mu eq/l$ までがコントロールの吸光度より高い値となった。そして96時間後になると、 $10 \sim 2000 \mu eq/l$ までがコントロールより高い値となり、 $3000 \sim 8000 \mu eq/l$ においてはコントロールより低い値となった。 Cu^{2+} , Mn^{2+} の両元素とも、実験を行った濃度範囲では、菌体の増殖に対して著しい影響を及ぼさなかった。 Zn^{2+} は培養開始から48時間後において、全ての濃度段階の吸光度がコントロールの値より高い値となり、 $10 \mu eq/l$ の低濃度でも菌体の増殖に大きく関与している事が示唆された。

3.1.3 エリア面積による Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} の影響解析

次に、実験を開始してから所定時間までの増殖曲線の積分値からエリア面積を算出した。このエリア面積によって Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} の影響解析を行った。各重金属の48, 96時間後のエリア面積を図-3に示し、コントロールのエリア面積に対する促進・阻害率(%)を表した濃度-影響曲線を図-4に示した。促進および阻害率(%)は次式によって算出した。

$$\text{促進または阻害率 (\%)} = (A - B) / B \times 100$$

図-2 増殖曲線による Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} の影響解析
I : Cd^{2+} , II : Cu^{2+} , III : Mn^{2+} , IV : Zn^{2+}

図一三 エリア面積による Cd²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ の影響解析
I : Cd²⁺, II : Cu²⁺, III : Mn²⁺, IV : Zn²⁺
□ : ~48時間, ■ : ~96時間

図一四 エリア面積値から算出した濃度-影響曲線
I : ~48時間, II : ~96時間
◆ : Cd²⁺, □ : Cu²⁺, △ : Mn²⁺, ● : Zn²⁺

ここで、A : 試料のエリア面積、B : コントロールのエリア面積である。そして、算出した値が正(+)であれば促進、負(-)であれば阻害を示す。

エリア面積による影響解析の結果、48時間後の Cd²⁺ は全ての濃度段階において阻害傾向を示したが、96時間後では 100~500 μeq/L までが 20% 以上の

促進傾向を示した。Cu²⁺は48, 96時間後とも全濃度においてわずかであるが促進傾向, Mn²⁺は48, 96時間後とも6000 μ eq/l以上から促進傾向を示した。しかし, 増殖曲線(3.1.2)からの解析と同様に, 菌体増殖に対して著しい影響を及ぼさなかった。96時間後のZn²⁺はほとんどの濃度がコントロールのエリア面積に対して2倍以上の値となり, 高い促進作用を示した。しかし, 8000 μ eq/l以上の高濃度域になると促進作用の低下が認められた。

A. M. Falih は *P. chrysosporium* の増殖に及ぼす重金属類の影響を Czapek-Dox 培地を使用し, 菌体乾燥重量によって評価を行っている⁶⁾。これによると培養を開始してから4週間後の結果において, Cd²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺は, それぞれ1779, 6295, 3641, 3394 μ eq/lの濃度で菌体乾燥重量が増加し, Pb²⁺, Ni²⁺は965.3, 3408 μ eq/lの濃度で菌体乾燥重量が減少したと報告している。本研究でも生物にとって毒性が強いCd²⁺は低濃度域において, 菌体の増殖に対して促進作用を及ぼした。また, S. S. Dhawale らは *P. chrysosporium* に対するHg²⁺の影響を評価しており, 19.94 μ eq/lでは胞子の発芽に影響は及ぼさないが, 99.71 μ eq/lになると胞子の発芽が完全に抑制されたと報告している⁷⁾。

今後は *P. chrysosporium* の酵素活性に及ぼす重金属の影響を検討し, また, 微生物は生育する環境要因によって形態が変化するため, 顕微鏡観察による形態変化についても検討を行う予定である。

4. まとめ

培養培地に重金属類(Cd²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺)を添加し, *P. chrysosporium* の増殖に及ぼす重金属類の影響を検討した。培養を開始してから96時間後の増殖曲線から算出したエリア面積値を使用して影響解析を行った結果, 以下の知見が得られた。

- 1) Cd²⁺ (10~8000 μ eq/l) : 100~500 μ eq/l の低濃度域においては, 20%以上の促進率を示したが, 3000 μ eq/l~8000 μ eq/l の高濃度域では20~50%の著しい阻害作用を示した。
- 2) Cu²⁺ (10~1000 μ eq/l), Mn²⁺ (10~12000 μ eq/l) : 両元素とも, 菌体の増殖に著しい影響を及ぼさなかった。

- 3) Zn²⁺ (10~12000 μ eq/l) : 10 μ eq/l の低濃度でも菌体増殖に著しい促進作用を示し, 10~6000 μ eq/l の濃度域で110%以上の促進作用を示した。しかし, 8000~12000 μ eq/l の高濃度域になると促進作用は90%以下に低下した。
- 4) 今回使用した重金属類の中で, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺は生物にとって必須の微量元素である。本実験において, Cu²⁺, Mn²⁺は菌体増殖に著しい影響を及ぼさなかったが, Zn²⁺は菌体の増殖促進に多大な影響を与えることが確認された。
- 5) *P. chrysosporium* を有害化学物質で汚染された環境に導入した場合, 環境中におけるZn²⁺の存在が菌体の増殖促進に寄与する可能性が示唆された。

謝辞：本研究を遂行するにあたり, 九州大学農学部近藤隆一郎助教授に御教授を受けた事を記して謝意を表する。また, 本研究費の一部は文部省科学研究費, 基盤研究B(2)および大原奨励会の助成を得た。

参考文献

- 1) 矢木修身, 内山裕夫：バイオレメディエーションによる有機塩素化合物汚染土壌, 地下水の浄化, 化学工学, **60**, p.194-198 (1996)
- 2) T. A. Ali, M. Wainwright : Growth of *Phanerochaete chrysosporium* in soil and its ability to degrade the fungicide benomyl, *Bioresour. Technol.*, **49**, p.197-201 (1994)
- 3) C. Mougin, C. Pericaud, J. Dubroca, M. Asther : Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Soil. Biol. Biochem.*, **29**, p.1321-1324 (1997)
- 4) S. Sayadi, R. Ellouz : Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, p.1098-1103 (1995)
- 5) P. Bonnamme, T. W. Jeffries : Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, p.210-217 (1990)
- 6) A. M. Falih : Influence of heavy-metals toxicity on the growth of *Phanerochaete chrysosporium*, *Bioresour. Technol.*, **60**, p.87-90 (1997)
- 7) S. S. Dhawale, A. C. Lane, S. W. Dhawale : Effects of mercury on the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **56**, p.825-832 (1996)