

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Ade Andriani
審査委員	主査 伊藤 和貴 副査 大谷 慶人 副査 枝重 有祐 副査 片山 健至 副査 橋 燦郎

### 論文名

Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Crude Oil by Saline-Alkaline Tolerant Fungi  
(海水およびアルカリ性耐性菌による多環芳香族炭化水素(PAHs)および原油の生分解)

### 審査結果の要旨

今日、難分解性の環境汚染物質などによる環境汚染が大きな社会問題となっている。原油中の多環芳香族炭化水素 (PAHs) は、発ガン性や突然変異誘発性などの毒性を有する難分解性の環境汚染物質である。油井や製油所、貯蔵施設などからの PAHs やこれを含む原油の流出漏出により海や海岸が汚染されている。しかし、この汚染およびこれを含む原油による汚染の浄化が種々試みられているが、微生物による浄化の検討は少ない。

バイオレメディエーションは、その場での処理で PAHs などの汚染物質を分解できるが、この汚染浄化には、海岸土壌や海水条件下で、難分解性物質を分解できる白色腐朽菌 (WRF) のような微生物が必要である。WRF は PAHs などの難分解性環境汚染物質を分解できる酵素、リグニン分解酵素 [リグニナーゼと総称され、ラッカーゼ(Lac)、マンガンペルオキシダーゼ(MnP)、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)が見出されている] を産出する菌として知られている。WRF による PAHs の分解は海水でない (酸性) 条件下での研究が殆どで、海水およびアルカリ性条件下での研究は少ないが、これらに耐性を有する WRF を用いれば、PAHs および原油による海岸土壌汚染や幅広い海洋汚染を浄化できる可能性があると考えられる。

そこで本研究では、海水およびアルカリ性ストレス下でも成育できる菌を用いて、PAHs の分解について検討するとともに、原油分解菌を用いたバイオレメディエーションによる原油 (アスファルト、C 重油、A 重油) 汚染海岸土壌の浄化について検討した。

まず始めに、天然から採取した 82 種の菌から、海水およびアルカリ性耐性を示す一種の菌、*Bjerkandera adusta* SM46 菌を単離した。この菌を種々の条件[pH(3~9), 海水塩濃度(0~35g/L)]下での麦芽抽出物(ME)液体培養で PAHs の一種、ベンゾ[a]ピレン(BaP)を分解した。海水塩濃度 20g/L までは酸性条件下での液体培養と同様に菌も成育し BaP を分解した。しかし、海水塩濃度 35g/L になると菌の成育阻害が見られ、BaP の分解率は低下した。しかしながら、ME 液体培養 (pH8.2) 時に酵素活性剤 (MnSO<sub>4</sub>) を添加すると、塩濃度

35g/Lでも MnP や LiP 活性は酸性(pH4.5)条件下でのそれらに比べ、各々約 7 倍、約 5 倍向上し、BaP の分解率も約 2 倍向上した (30 日培養後)。また、この菌による BaP の生分解について検討した。BaP は BaP-1,6-dione に酸化された後、naphthalene acetic acid, hydroxylbenzoic acid, benzoic acid, catechol を経て分解されることを明らかにして、BaP 分解経路を示すとともに、芳香環の開裂にリグニン分解酵素が関係していることを示した。さらに、この菌による BaP 分解率を高めるため、リグニン分解酵素活性を高める物質、Tween 80 (T-80) と MnSO<sub>4</sub> を用いて、等高線プロット解析により分解率向上の条件検討を行った結果、T-80 では 0.4~0.7% の濃度で、MnSO<sub>4</sub> では 0.4mM 以上の濃度で最高の分解率が得られることを見出した。そして、これらを海水-アルカリ性ストレス下でのこの菌による BaP 分解に適応すると、分解率が向上 (44%以上) すること、MnP 活性だけでなく Lac 活性も向上することを見出した。

次に、バイオレメディエーションによる PAHs に汚染された海水や海岸土壌を効率的に浄化するため、*B. adusta* SM46 菌を担持させる最適の担体を見出すことを試みた。4 種のリグノセルロース担体 (麦わら、カボック繊維、木粉、古紙) にこの菌を担持して、各 PAH (naphthalene, phenanthrene, benzo[a]pyrene, chrysene) の分解を行った。その結果、各 PAH の分解率は、naphthalene, phenanthrene, benzo[a]pyrene, chrysene の順に低下した。これは分子構造の違いによるものと考えられた。4 種の担体中では、麦わらが最適の担体であることを見出した。麦わらにこの菌を担持すると菌の成育が速くなるだけでなく、Lac、MnP、LiP 活性も向上した。また、PAHs 分解における担体の最適粒径も検討し、840 $\mu$ m が最適であることも見出した。これらのことから、この菌を担持した担体を液体培養してリグニン分解酵素を生産させるよりも、この菌を担体に担持した固体培地でリグニン分解酵素を産生させる方が PAHs の分解には効率的であると考えられた。

さらに、原油 (アスファルト、C 重油、A 重油) 汚染海岸土壌を浄化するため、BaP 含有海水 ME 寒天培地上で成育できる *B. adusta* SM46 菌を含む 5 種の原油分解菌を選抜した。原油分解には酵素 (リグニナーゼとジオキシゲナーゼ) が重要な働きをしているので、5 種の菌を C 重油で汚染された海岸土壌中で共培養 (2 種宛) して両酵素活性および C 重油分解率を調べた。その結果、*Pestalotiopsis* NG007 菌と *Polyporus* sp.S133 菌を共培養 (比率 1:3) した場合に両酵素活性および C 重油分解率が最高になることを見出した。そして、両菌を共培養した培養物を用いるバイオレメディエーションによる原油 (アスファルト、C 重油、A 重油) 汚染海岸土壌 (各汚染濃度: 1,000, 15,000, 30,000ppm) の浄化を行った。その結果、汚染濃度(1,000ppm)では各汚染海岸土壌とも高い分解率 (約 70~95%) を示したが、汚染濃度が高くなる程分解率の低下が見られた。また、分解率を高めるため、定期的に栄養源 (麦芽抽出物 10%) のみ、栄養源および酵素活性剤 [T-80(0.5%) と MnSO<sub>4</sub> + CuSO<sub>4</sub>(1mM)] を添加して検討した。いずれの方法でも、無添加に比べ、分解菌の成育を促進し分解酵素活性が高まり原油汚染海岸土壌中の原油の分解率が高まることを見出した。栄養源および酵素活性剤を添加した場合には、無添加に比べ大きな分解率の向上 (約 1.2~4.5 倍) が認められた。これらのことから、原油分解菌を用いるバイオレメディエーションにより原油汚染海岸土壌が浄化できることを明らかにした。

以上から、天然から単離した海水-アルカリ性耐性菌による BaP の分解、その分解経路、分解率を向上させるための条件検討、分解菌の酵素活性を高める担体を見出すとともに、原油汚染海岸土壌を原油分解菌を用いたバイオレメディエーションにより浄化できることを明らかにした。

本論文の公開審査会は 2017 年 8 月 5 日に高知大学農林海洋科学部で開催され、論文審査と質疑応答が行われた。それに引き続いて、学位論文審査委員会を開催して審査し、審査委員全員一致して、本論文が博士 (学術) の学位を授与するに値するものと判断した。