

発表番号 23 (0520)

耐塩性微生物を利用した沿岸環境の浄化と当該微生物の耐塩性機構の解明

濱田 奈保子 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科)

海洋環境や海洋資源の有害物質による汚染は深刻な問題であり、これら有害物質で汚染されている環境を早急に修復する必要がある。その方法の一つに生物の機能を利用し修復する技術、いわゆるバイオレメディエーションがある。この技術はこれまで、流出された重油処理やダイオキシンで汚染された土壌の修復に応用されてきたが、複合汚染の浄化には技術的な問題が残されている。すなわち、特定の有害物質に対しては効果がみられるが、複数の有害物質が混在している系ではその効果がみられない例がほとんどである。通常、我々が住んでいる環境は複合汚染された状況であることから、本研究では、各汚染物質にターゲットを絞るよりも多種多様な有害物質で複合汚染された場合を想定し、基質特異性が広く、高い酸化還元電位を有する故に種々の有害物質を分解する可能性があるリグニン分解酵素に着目した。また、海洋環境下及び各種産業廃液中では高濃度の塩分が存在するため、耐塩性を有する微生物を用いたバイオレメディエーション技術開発が求められている。このような背景から、耐塩性を有するリグニン分解微生物を用いた海洋環境、特に沿岸域の汚染浄化と当該微生物の耐塩性機構を解明することを目的とした。

本報告では、以前、沿岸域から取得した耐塩性のリグニン分解微生物 SN-3 菌(特願 2005-068945)を用いた場

合に、藻類の光合成を阻害する各種染料及び水産分野での内分泌攪乱化学物質であるトリブチルスズ(TBT)、トリフェニルスズ(TPT)が複合汚染された環境下においても有意にこれら環境有害物質を分解することを明らかにした内容について報告する。また、本微生物は NaCl 0-12 % (W/V), pH 2-11, 4-37 °C の範囲で生育可能な *Pestalotiopsis* 属の糸状菌と同定された。本菌はリグニン分解酵素のうち、ラッカーゼ(EC 1.10.3.2)のみを生産し、最適条件下での本酵素の分解活性は、335 U/L であり、代表的なリグニン分解微生物である *Phanerochaete chrysosporium* が産生する酵素活性に比べて短期間で高い酵素活性を示すことを明らかにしたことから、沿岸環境域でのバイオレメディエーションにおいて大変有望な菌であると思われた。また、SN-3 菌が生産するラッカーゼを市販品 2 種(*Rhus vernificera* 由来及び *Trametes versicolor* 由来の市販標品)と比較したところ、耐塩性に大変優れ、高塩濃度環境において市販の酵素よりも優位に働くことが示唆された。耐塩性を持つラッカーゼの報告は例がなく、本研究が初めての報告であると思われる。ラッカーゼを用いた浄化は、これまで報告されてきたマンガンペルオキシダーゼやペルオキシダーゼと比較し、過酸化水素や硫酸マンガンを使用しないといった点においてもより環境に優しい方法といえる。

助成番号 0520

耐塩性微生物を利用した沿岸環境の浄化と当該微生物の耐塩性機構の解明

濱田 奈保子 (東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科)

1. 研究目的

海洋環境や海洋資源の有害物質による汚染は深刻な問題であり、これら有害物質で汚染されている環境を早急に修復する必要がある。その方法の一つに生物の機能を利用し修復する技術、いわゆるバイオレメディエーションがある。これまで本技術は、流出された重油処理やダイオキシンで汚染された土壌の修復に応用されてきたが複合汚染の浄化には技術的な問題が残されている。すなわち、特定の有害物質に対しては効果がみられるが、複数の有害物質が混在している系ではその効果がみられない例がほとんどである。通常、我々が住んでいる環境は複合汚染された状況であることから本研究では各汚染物質にターゲットを絞るよりも多種多様な有害物質で複合汚染された場合を想定し、基質特異性が広く、高い酸化還元電位を有するが故に種々の有害物質を分解する可能性があるリグニン分解酵素に着目した。また、海洋環境下及び各種産業廃液中では高濃度の塩分が存在するため、耐塩性を有する微生物を用いたバイオレメディエーション技術の開発が求められている。このような背景から、耐塩性を有するリグニン分解微生物を用いた海洋環境、特に沿岸域の汚染浄化と当該微生物の耐塩性機構を解明することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 供試菌の同定

供試菌 (SN-3 菌と呼称) は、以前に奄美大島の湿地帯より分離したリグニン分解微生物を用いた¹⁾。現在知られているリグニン分解菌には、*Phanerochaete chrysosporium* を代表とする担子菌に属するもの、*Phlebia* 属などの糸状菌が報告されている。本菌が既知のリグニン分解菌と同一であるか、新規のものであるかを確認するため、菌糸、生殖器官(分生子)等の形態学的特長による属の同定と、D1D2 領域及び ITS 領域の塩基配列に基づく分子生物的手法を用いた。使用したプライマーは D1D2 領域については NL-1 (GCATATCAAGCGGAGGAAAG) 及び NL-4 (GGTCGGTGTTCGAAGACGG)、ITS 領域に対しては ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) 及び ITS4 (TCCTCCGCTTATGTATGC) を使用した。形態学的特

徴から推定された属と同属の菌、4 株を外部機関より取り寄せ、本菌を含めた合計 5 株について、両増幅断片の 5'-末端側の塩基配列を決定し、DDBJ データベースにより相同性を確認するとともに、リグニン分解酵素のうちのラッカーゼ活性及び高塩濃度下での酵素産生の比較を行った。

2.2 供試菌の培養

SN-3 菌を PDA medium に植菌し、27°C、暗所にて 4 日間培養した後、リグニン分解用培地として知られる Kirk medium²⁾ を改変した培地にて、27°C、暗所にて必要日数振盪培養 (160 rpm) した。培地組成を以下 (Table 1) に示した。

Table 1 Composition of medium in this study

KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	710mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	100mg
Thiamin	1mg
Glucose	10mg
2,2-dimethyl succinate	1.5g
Ammonium tartrate	200mg
MnSO ₄ ·5H ₂ O	35mg
NaCl	70mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	7mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	7mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	7mg
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0.7mg
H ₃ BO ₃	0.7mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.7mg
Nitritoltriacetate	105mg
Tween80	500mg
Deionized water	1L

2.3 酵素活性の計測

2.2 に記した方法に従い培養した培養液を遠心 (15,000 g, 2 min) 後、培養上清とし、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS) を基質とし、酵素反応により酸化される ABTS を分光光度計により Abs. 410 nm で測定し、ラッカーゼ活性を算出した。

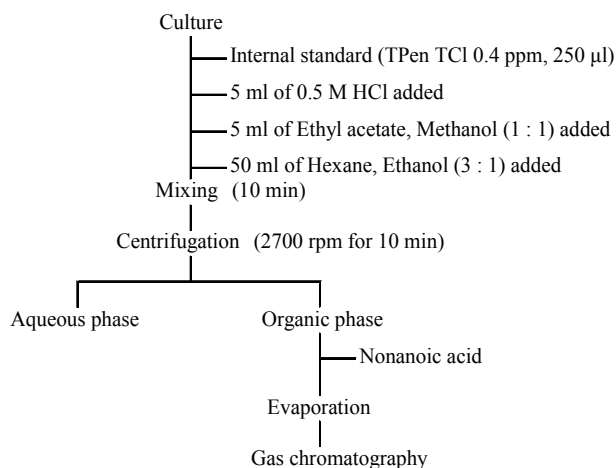
2.4 環境有害物質の定量

本研究では、環境有害物質として藻類の光合成を阻害する各種染料および船底塗料、生簀の防汚剤として長期間にわたり使用され続けてきた有機スズ化合物であるトリブチルスズ (TBT) とトリフェニルスズ (TPT) をモデル

化合物として用いた。染料はインクや繊維、化学実験等で汎用されているものとして Reactive Black 5 (SIGMA), Reactive Red 120 (ICN), Reactive Green 5 (ICN), Reactive Orange 14 (SIGMA), Reactive Blue 5 (SIGMA), Poly-R 478 (SIGMA), Aniline Blue (Wako), Coomassie Brilliant Blue (CBB, G250, ICN), Crystal Violet (Wako), Remazol brilliant blue R (RBBR, SIGMA) の 10 種を用いた。また、食品添加物であるタール色素として、Food Red No.2 (Amaranth), Food Red No.3 (Erythrosine), Food Red No.102 (New Coccine), Food Red No.104 (Phloxine), Food Red No.105 (Rose Bengale), Food Red No.106 (Acid Red), Food Red No.40, Food Yellow No.4 (Tartrazine), Food Yellow No.5 (Sunset Yellow), Food Green No.3 (Fast Green), Food Blue No.1 (Brilliant Blue) の 11 種を用いた。これら染料を終濃度 70 ppm になるように改変培地 (詳細な組成は Table 1 に記載) に添加後、各染料の最大吸収波長を分光高度計を用いて測定した。実験は全て植菌しないコントロールを用意し、振盪培養や pH、塩濃度が染料に与える影響を考慮した。分解率は Sanroman らの方法 (Sanroman et al., 1998)³⁾ を参考に以下の様に定義した。

$$\text{分解率 (\%)} = \frac{\text{初期最大吸収波長の吸光度} - \text{最大吸収波長の吸光度}}{\text{初期最大吸収波長の吸光度}} \times 100$$

TBT および TPT の定量は Mizuishi らの方法⁴⁾ に従い、行った。詳細は下記の Fig. 1 にフローチャートで示した。



GC column: DB-1 (15 m×0.32 mm I.D., df=0.1 µm)
 Column temperature: 80°C (1 min), 10°C/min, 230°C (1 min)
 Injection temperature: 250°C
 Injection mode: splitless (1 min)
 Detector : FPD
 Sample: 1 µl

Fig. 1 Method for extraction and determination of TBT and TPT

TBT 及び TPT の初発濃度は通常は 0.1 ppm とし、1 ppm, 0.1 ppm, 50 ppb, 10 ppb, 2 ppb, 1 ppb, 500 ppt, 100 ppt 及び 50 ppt についても同様に分解実験を行った。

3. 研究結果および考察

3.1 供試菌の同定 (形態学的同定)

SN-3 菌を形態学的見地から観察した結果、菌糸は寒天表面上もしくは寒天内に形成され、無色の有隔壁菌糸の形成が認められた。菌糸幅は細く、ほぼ同じ幅だった。厚壁菌糸 (chlamydospore) の形成は確認されなかった。縦幅は平均 26.9 µm、横幅は平均 6.2 µm であった (n=10)。分生子果は分生子層 (acervular) 様で、黒色で培地にやや埋没して形成され、黒色の分生子塊を出す様子が認められた。

分生子柄は無色で、層状に集合して形成される様子が認められた。分生子形成細胞は無色で円筒形 (cylindrical)、1 細胞から 1 つの分生子を形成する様子が認められた。分生子は紡錘体 (fusiform) で、直線状もしくはやや湾曲し、5 細胞性で、中央の 3 細胞が褐色で両端の 2 細胞が無色を示した。分生子の頂端細胞からは 2~3 本の付属糸 (appendage) が形成され、基端細胞からは 1 本の非分岐の刺状の付属糸が形成される様子が認められた。分生子は黒色ドロップ状の分生子塊となり形成される様子が認められた。長期培養検体からはテレオモルフ (teleomorph) の形成は確認できなかった。これらの形態学的特徴を踏まえ、Arx (1981)⁵⁾, Kiffer and Morelet (2000)⁶⁾, Sutton (1980)⁷⁾ に記載されている菌類の検索表を用いて、本菌の属レベルでの帰属分類群を推定した。その結果、有性生殖器官を形成しないアナモルフ (anamorph) の菌類、不完全菌類 (anamorphic fungi) の中でも分生子果不完全菌類 (Coelomycetes) である *Pestalotiopsis* 属の形態的特徴とほぼ一致した。*Pestalotiopsis* 属に形態的に類似した菌として *Pestalotia* 属、*Truncatella* 属、*Monochaetia* 属等が知られている。これらの属と *Pestalotiopsis* 属は「分生子の細胞数および有色細胞の数、頂端付属糸の数」といった形態的特徴から識別されている。*Pestalotia* 属は 6 細胞 (有色細胞 4) で 3 - 9 本の付属糸、*Truncatella* 属は 4 細胞 (有色細胞 2) で 1 本以上の付属糸、*Monochaetia* 属は 5 細胞 (有色細胞 3) で 1 本の付属糸という特徴を持ち、*Pestalotiopsis* 属と区別することができる。*Pestalotiopsis* 属は研究者によっては *Pestalotia* 属に含まれる場合もあるが、今回は Sutton (1980)⁷⁾ らの見解に従い、SN-3 菌を *Pestalotiopsis* 属と同定した。*Pestalotiopsis* 属は陸上の様々な有機物

や植物基質から分離されている菌として知られている。また、形態的に類似している *Pestalotia* 属が海水と淡水の影響をうける汽水域であるマングローブ植物基質からの報告例が知られている (Kohlmeyer and Kohlmeyer, 1979)⁸⁾。*Pestalotiopsis* 属や *Pestalotia* 属は一般的に陸上植物の病原菌として一般的に知られている菌であるが、塩分の影響を受ける海水域等の環境からの報告例はほとんど無く、今回の微生物の分離場所を考えると生態的に興味を持たれる。同定結果を以下にまとめる。

子囊菌門 (Ascomycota)

↳ 子囊菌綱 (Ascomycetes)

↳ *Sordariomycetidae* 亜綱

↳ クロサワイタケ目 (*Xylariales*)

↳ *Amphisphaeriaceae* 科

↳ *Pestaloshaeria* 属のアナモルフ (anamorph)

↳ *Pestalotiopsis* 属

3. 2 供試菌の同定 (分子生物学的同定)

3. 1に記したように、当該SN-3菌は *Pestalotiopsis* 属と同定されたが、より詳細な同定を行うため、同属の株として、以前我々が沖縄県の湿地帯より分離した *Pestalotiopsis disseminate* AN-7、陸上植物より分離された *Pestalotiopsis funerea* (NARC 5427)、*Pestalotiopsis maculans* (NARC 6316)、*Pestalotiopsis neglecta* (NARC 100098)を含めた計5株について、D1D2領域及びITS領域の塩基配列を決定し、DDBJデータベースにより相同性を確認するとともに、Clustalx、NJPLPTを用いて系統樹を作成した結果をFig. 2, 3に示した。D1D2領域に基づく系統樹の結果からは、5株の差別化は図れなかったが、ITS領域に基づく系統樹においては5株の適性な区別が認められ、SN-3菌は *Pestalotiopsis vismiae* (AF40997)と91.2%の高確率で一致した。現在のところ *Pestalotiopsis* 属は50種以上報告されており (PubMed)、SN-3菌と一致した *Pestalotiopsis vismiae* (AF40997)は *Aucuba chinensis* の葉、*Cycas micholitzii* の葉などより分離が確認されている。

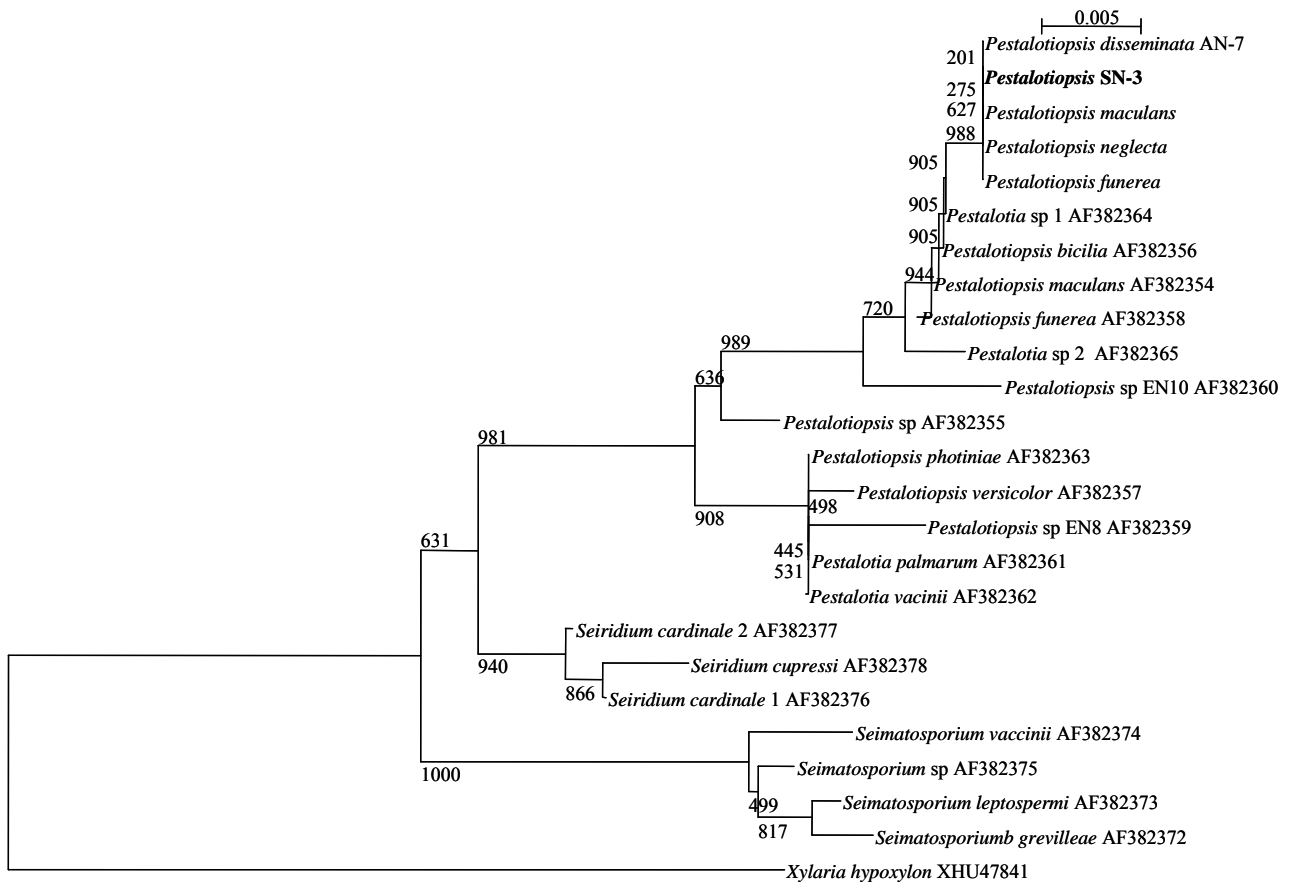


Fig. 2 Phylogenetic tree of isolate SN-3 and related fungi based on D1D2 DNA sequences

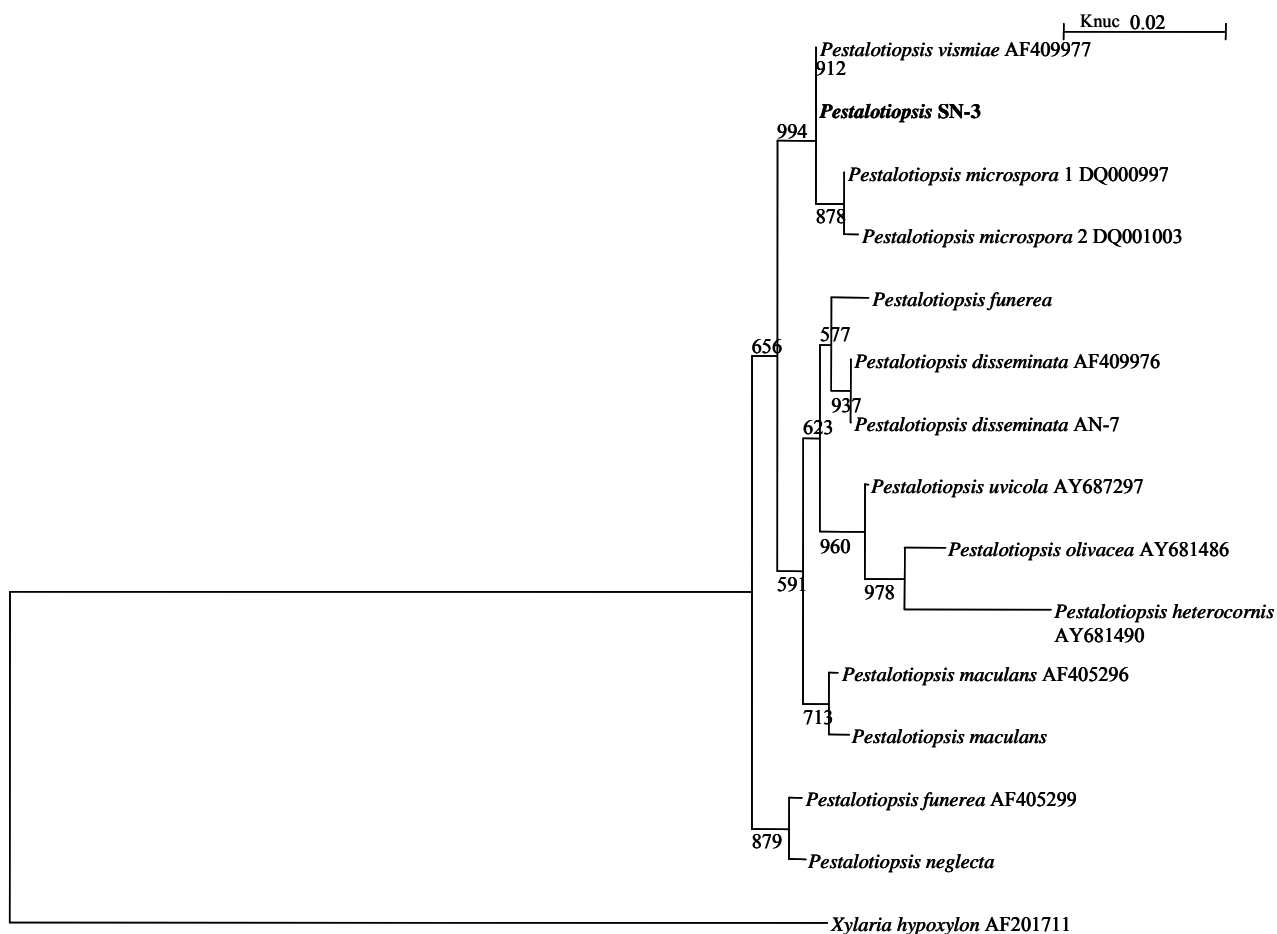


Fig. 3 Phylogenetic tree of isolate SN-3 and related fungi based on ITS1 DNA sequences

Table 2 Comparative study of laccase activities produced by various *Pestalotiopsis* spp. in the presence of salt

NaCl concentration (%)	laccase activity (U/L)					
	SN-3	<i>P. disseminata</i>	AN-7	<i>P. funerea</i>	<i>P. neglecta</i>	<i>P. maculans</i>
0	335.2		22.5	88.4	50.6	65.9
1.5	280.6		10.5	39.6	9.6	22.4
3.0	37.9		0.0	3.1	0.0	1.8
7.0	0.5		0.0	0.0	0.0	0.0

3.3 供試菌のラッカーゼ産生能の比較

高塩濃度下におけるラッカーゼ産生能を本菌と同属である他の4種の菌との比較でまとめた結果をTable 2に示した。ラッカーゼ活性は各菌の最大活性で示したが、他の4種と比較し、SN-3菌のラッカーゼ産生能は格段に高いことが明らかとなった。NaCl濃度が高くなるにつれて相対活性は低くなるが、NaCl濃度0%、1.5%、3%全ての濃度においてSN-3菌の活性が最も強く、沿岸環境下でのバイオレメディエーションにおいて有望であることが示唆された。

3.4 供試菌の産生するラッカーゼの耐塩性検討

SN-3菌が産生するラッカーゼの耐塩性を市販のラッカーゼ標品との比較で検討した結果をFig. 4に示した。NaCl濃度1.5%では、SN-3菌及び*Rhus vernificera*由来のLac活性は共に約45%残存していた。NaCl濃度3%においてはSN-3菌では33%残存しているに対し、*Rhus vernificera*由来のLacは22%残存し、*Trametes versicolor*由来のLacにいたってはほぼ失活していた。NaCl5%ではSN-3菌が23%残存しているのに対し、両者ともほぼ完全に失活した。NaCl10%においてもSN-3菌は失活することなく、当初の活性の22%を残存した。この結果からSN-3菌が耐塩性に大変優れ、高塩濃度環

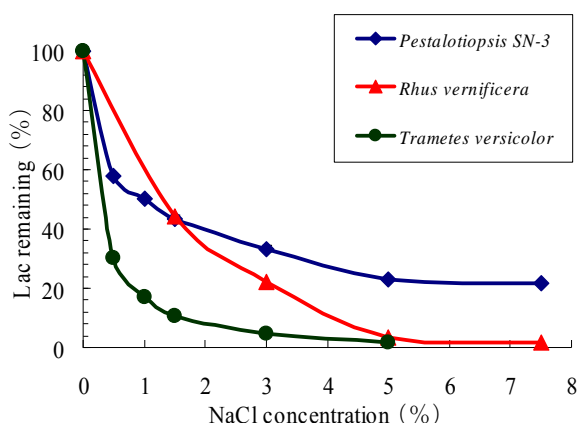


Fig. 4 Comparison of halotolerance between crude enzyme from isolate SN-3 and commercial enzymes

境において市販の酵素よりも優位に働くことが示唆された。これまでは、リグニン分解酵素の中でもリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼ(MnP)を用いたバイオレメディエーションの報告が主流であったが、本菌はリグニン分解酵素の中でも特に強いラッカーゼ活性を有する。MnPを用いた場合には硫酸マンガンを、ペルオキシダーゼを用いた場合は過酸化水素が必要であるが、ラッカーゼを用いたバイオレメディエーションはこれらの化学物質を使用しなくても反応が進行するため、より環

境に優しい方法といえる。耐塩性を有するMnPはLiらにより沖縄の立木より分離された *Phlebia* sp. MG-60 が産生するとの報告がある(Li et al., 2002)⁹⁾が、耐塩性を持つラッカーゼの報告は例がなく、本研究が初めての報告である。Lac はポリフェノールの合成、分解、環境有害物質の分解をはじめ、様々な酸化反応を触媒する酵素であり、各種バイオテクノロジー産業での利用が期待されている。これまで安定性の欠如や純度が問題となっていたが(宮崎, 2005)¹⁰⁾、耐塩性のラッカーゼにより、高塩濃度下での利用が可能となったといえる。

3.5 供試菌を用いた染料分解試験

検討した 21 種の染料の中で分解が認められた 11 種の染料について NaCl 1.5%および 3%添加の場合も含めた分解率を Table 3 に示した。

染料を分解する微生物はこれまで多く報告されてきたが、SN-3 菌のように短期間で Azo, Xanthene, Triphenylmethane, Anthraquinone 骨格と様々な構造を有する染料を分解できる報告は例がなく、種々の染料で複合汚染された環境下において有効であることが示唆された。また、11 種中 7 種においては NaCl 1.5%および 3% 存在下においても染料分解が確認されたことは高塩濃度下における染料廃水、及び沿岸域における環境浄化においても充分対応可能であると考えられる。

Table 3 Effect of NaCl concentration of degradation of dyes

Dyes	Classification	Degradation degree (%)		
		NaCl concentration		
		0%	1.5%	3%
Reactive Black 5	Azo dye	70	38	47
Reactive Red 120	Azo dye	57	0*	0*
Food Red No.2 (Amaranth)	Azo dye	41	16	21
Reactive Green 5	Azo dye	37	29	40
Food Red No.3 (Erythrosine)	Xanthene	93	88	93
Food Red No.104 (Phloxine)	Xanthene	76	67*	48*
Food Red No.105 (Rose Bengal)	Xanthene	76	87	90
Crystal Violet	Triphenylmethane	69	0	0
Aniline Blue	Triphenylmethane	54	50	56
CBB (Coomassie Brilliant Blue)	Triphenylmethane	63	81	82
Reactive Blue 5	Anthraquinone	82	0	0

* Control (No dye added) was degraded by NaCl

Table 4 Effect of initial concentrations on TBT and TPT degradation using SN-3

	1 ppm	0.1 ppm	50 ppb	10 ppb	2 ppb	1 ppb	500 ppt	100 ppt
TBT	58.9	2.2	33.5	39.4	18.5	18.9	36.6	78.5
TPT	8.9	25.1	47.3	47.4	40.2	0.0	0.0	0.0
Mix(TBT)	1.8	27.8	26.2	38.0	20.8	17.3	35.7	45.2
Mix(TPT)	5.7	41.7	36.9	62.7	31.7	0.0	43.5	41.1

Data were expressed as relative residue (%) of each component

Mix: TBT and TPT were added to medium at the same

3. 6 供試菌を用いた TBT 及び TPT 分解試験

TBTを単独添加、TPTを単独添加、TBT、TPT 両者を混合して添加した場合に、それぞれの初発濃度を 1 ppm, 0.1 ppm, 50 ppb, 10 ppb, 2 ppb, 1 ppb, 500 ppt, 100 ppt 及び 50 ppt の 9 種類の濃度について分解実験を行った結果を Table 4 にまとめた(培養は 3 日間)。TBT は全ての濃度で分解が確認されたが、50 ppt では TBT のピークとノイズを区別することが出来ず測定できなかった。

100 ppt については 80%近く残存しているが、検出限界に近いので正確な測定が出来ない故と思われた。TPT についても全ての濃度で分解が確認され、特に 1 ppb 以下では完全分解が確認された。TBT と同じく 50 ppt では測定不可能であった。TPT は TBT よりも検出されにくく、ピークも弱くなるため、特に微量濃度では抽出過程における消失に注意が必要であった。初発濃度 0.1 ppm の TBT 及び TPT 両者を混合させ添加した場合の分解の経時変化結果を Fig. 5 に示した (n=3)。分解率は単独で添加した結果とほぼ等しく、両者を完全分解するのに要した日数は 6 日間であった。両者を混合した場合にも、全ての濃度で分解が確認された。残存率は単独培養、混合培養との比較において斉一性はなかったことから、両者を混合したことによる SN-3 菌の生育あるいは分解酵素生産抑制に影響を及ぼすわけではないことが示唆された。有機スズ化合物の添加が単独か混合かといった条件より、前培養の菌の状態や培養時の温度、その他の環境条件により分解率は左右されると考えられる。

3. 7 供試菌を用いた複合汚染モデル系における分解試験

3. 5 及び 3. 6 で各種染料および有機スズ化合物 (TBT, TPT) に対する SN-3 菌の分解が確認できたため、分解が確認できた化合物を複数混合させた場合のモデル系を作製し、染料と有機スズ化合物が同時に存在した場合の本菌の分解能を検討した結果、設定した 5 種類 (モデル A, B, C, D, E) の系の中で、3つのモデル系で検討した染料と有機スズ化合物を有意に分解することが明らかになった。Fig. 6 に最も分解が観察されたモデル E の色素分解結果の写真を示した。この時の TBT 及び TPT の最大分解率は TBT が 90%、TPT は完全分解であった。

Fig. 6 の写真から明らかのように、高濃度の NaCl 存在下においても目視で確認可能な脱色が確認され、SN-3 菌は染料の発色団に関わる構造を切断している可能性が示唆された。染料を混合させた場合、最大吸収波長が複数出現すること、あるいは不鮮明になることを考えると、正確な分解率を算出するには HPLC-PDA (フォトダイオードアレイ) による分析が必要であると考えており、今後の課題である。染料を混合させた系における微生物を用いた脱色実験は、4 種類の染料を混合させた場合に 3 日間で十分に脱色した報告がある (Harazono and Nakamura, 2005)¹¹⁾ が、染料と有機スズ化合物が同時に存在する系において両者を分解する微生物の報告は皆無であり、本報告が初めてである。

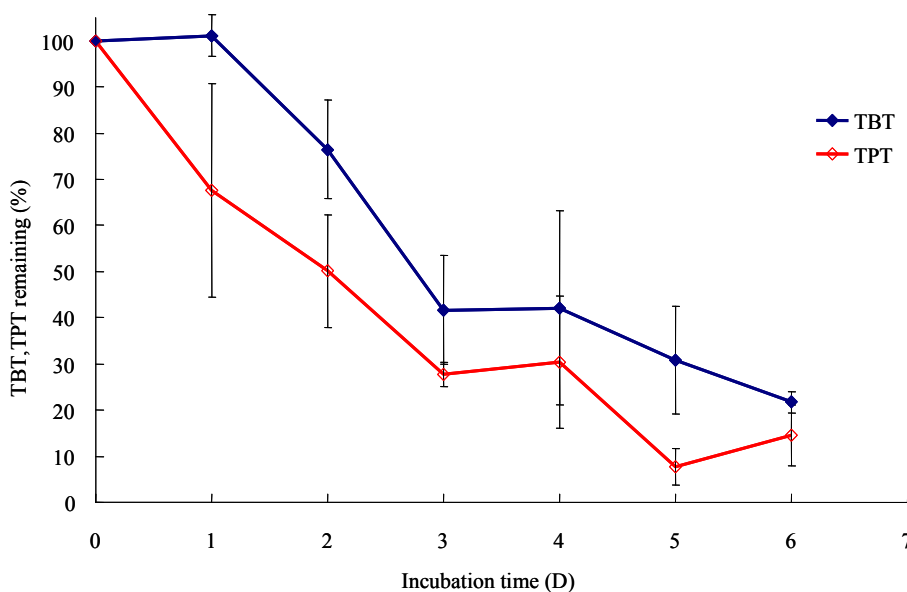


Fig. 5 Time course of degradation of TBT and TPT by isolate SN-3

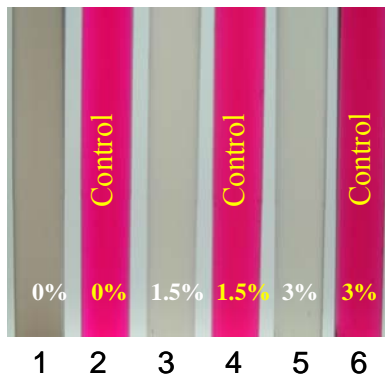


Fig. 6 The photo of degradation of various dyes (Food Red No.2, Food Red No.3, Food Red No.104 and Food Red No.105) including E gruop, TBT and TPT by isolate SN-3.

The concentration of each dyes was 70 ppm and 0.1 ppm TBT and 0.1 ppm TPT were included in Model E system. Lane 1: SN-3 strain was added in medium containing 0% NaCl; Lane 2: Control (SN-3 was not added in medium containing 0% NaCl); Lane 3: SN-3 strain was added in medium containing 1.5% NaCl; Lane 4: Control (SN-3 was not added in medium containing 1.5% NaCl); Lane 5: SN-3 strain was added in medium containing 3% NaCl; Lane 6: Control (SN-3 was not added in medium containing 3% NaCl).

謝 辞

本研究は、財団法人ソルトサイエンス研究財団による平成17年度研究助成により行われたものであり、ここに感謝の意を表す。

引用文献

- 1) 特願 2005-068945 濱田奈保子、斎藤智子: 糸状菌及びこれを用いた環境浄化方法
- 2) Kirk TK, Farrell RL (1987) Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev.*

Microbiol. 41, 465-505

- 3) Sanroman MA, Pazos M, Ricart MT, Camesell C (2004) Electrachemical decolourisation of structurally different dyes. *Chemosphere* 57, 233-239
- 4) Mizuishi K, Takeuchi M, Hobo T (1998) Effect of hydrogen bromide doping on capillary gas chromatographic analysis of tributyltin and triphenyltin halides. *Analyst* 123, 329
- 5) Ark JA von (1981) The genera of fungi sporulating in pure culture 3rd edition. A.R.Gantner Verlag KG. Vaduz Germany 424
- 6) Kiffer E, Morelet M (2000) The Deuteromycetes: Mitosoiric fungi classification and generic keys. Science Publishers Inc., U.S.A. 273
- 7) Sutton BC (1980) The Coelomycetes-fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stroma. CABI International, UK 696
- 8) Kohlmeyer J, Kohlmeyer E (1979) Marine mycology: the higher fungi. Academic Press, New York, USA 690
- 9) Li X, Kondo R, Sakai K (2001) Studies on hypersaline-tolerant white-rot fungi: screening of lignin-degrading fungi in hypersaline conditions, *The Japan Wood Reseach Society* 48, 147-152
- 10) 宮崎健太郎 (2005) 耐熱性ラッカーゼの発見: 高純度ラッカーゼの簡便な量産化が可能に 産総研 2005-04, 18-19
- 11) Harazono K, Nakamura K (2005) Decolorization of mixture of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochate sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. *Chemosphere* 59, 63-68

0520

Bioremediation of coast environment using halotolerant microorganism and clarification of mechanism for halotolerant

Naoko Hamada-Sato
(Tokyo University of Marine Science and Technology)

Summary

The pollution of marine environment and marine resources caused by toxic substances poses a grave problem, and there is a pressing need to remediate the heavily polluted environment as soon as possible. One of the methods to this end is bioremediation, which utilizes the activity of microorganisms as a remediation technique. Although this method has been applied to the treatment of oil spills and the remediation of dioxin-contaminated soil, technical issues remain regarding its use in treating combined pollution, that is, although its effect on specific toxic substances has been observed, no such effect has been observed on most systems containing multiple toxic substances. Because our environment is exposed to combined pollution, in this study, rather than focusing on individual pollutants as targets, we assume the case of combined pollution caused by various toxic substances and focus on lignin-degrading enzymes that have wide substrate specificity and high redox potential, and can degrade various toxic substances. The development of bioremediation technology that utilizes halotolerant microorganisms is desired because of the high concentration of salt in industrial wastewater and the marine environment. With these as the background, our objectives are to use halotolerant lignin-degrading microorganisms to treat the marine environment, specifically coastal waters, and to clarify the mechanism underlying the halotolerance of such microorganisms.

We report herein that SN-3 (Patent application 2005-068945), a halotolerant lignin-degrading fungus isolated from the sea coast, can significantly degrade toxic substances causing combined pollution in the marine environment, including tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT), which are endocrine-disrupting chemicals, and various dyes that inhibit algal photosynthesis. Moreover, SN-3 was identified as a filamentous fungus of genus *Pestalotiopsis* that grew well under such conditions as 0-12% NaCl (W/V), pH 2-11, and 4-37°C. Of the known lignin-degrading enzymes, SN-3 produces only laccase (EC 1.10.3.2), which has activity of 335 U/L under optimal conditions. Compared with the activity of the enzyme produced by the representative lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, SN-3 laccase showed high activity within a short period; thus, SN-3 has high potential for use in coastal bioremediation. In addition, when laccase produced by SN-3 was compared with two commercially available preparations (originating from *Rhus vernificera* and *Trametes versicolor*, respectively), it was found that laccase showed much higher halotolerance and enzymatic activity than the two preparations in a high salinity environment. As far as we know, this is the first report of the halotolerance characteristic of laccase. Compared with hitherto reported treatments with manganese peroxidase and peroxidase, laccase treatment does not require hydrogen peroxide or manganese sulfate; thus, it is a favorable method for use in the environment.