

微生物分解による汚泥・土壌のダイオキシン類 低減化に関する研究 (第3報)

三木 崇・熊谷宏之*1・坪川博之

Degradation of Dioxins by White Rot Fungi (3)

Takashi MIKI, Hiroyuki KUMAGAI, Hiroyuki TSUBOKAWA

1. はじめに

キノコに代表される白色腐朽菌¹⁾は、リグニンペルオキシターゼ (LiP)、マンガンペルオキシターゼ (MnP)、ラッカーゼ (Lac) などの分解酵素によって、木材の難分解性物質 (リグニン) を分解することが知られており、同様に難分解性物質であるダイオキシン類についても、分解効果が確認されている²⁻⁴⁾。

一方で、福井県内の一部河川で過去に確認されたダイオキシン類の環境基準値 (1pg-TEQ/L) 超過事案について、我々は詳細な調査研究を行い、繊維染色事業所からの染色排水 (染料由来) が主要因であることを解明し、染色排水のダイオキシン類低減化対策として凝集沈殿法の有効性を確認した⁵⁻¹⁰⁾。しかしながら、凝集沈殿法はダイオキシン類を回収する手法であるため、排水汚泥の無害化処理が必要である。

既存のダイオキシン処理技術としては、汚染土壌を対象とした電極溶融法 (ジオメルト工法) などが知られている。当手法は短時間で分解処理が可能だが、汚染土壌を 1600℃以上に加熱するため、処理コストが高く、多量の電気エネルギーを必要とし、処理後には新たな産業廃棄物 (ガラス固化体) が発生するといったデメリットもある。

本研究では、低コストで環境負荷の小さな処理技術として、白色腐朽菌の分解酵素を利用した分解処理システムを確立し、汚染土壌や汚泥の処理技術として普及を図ることを目的としている。研究では、効果的な菌種や分解条件、培養条件について検討を行った。

2. 方法

2.1 白色腐朽菌の選定

分解試験には、これまでの試験で分解効果が確認できた以下の菌を使用した。詳細は既報¹¹⁻¹²⁾のとおりである。

①県内産食用キノコ株4種

- ・福井県内で実際に収穫されているキノコ類として、県総合グリーンセンターより、ふくひら1号、ふくひら2号、マイタケ、エノキタケの4種類の菌株の提供を受けた。食用キノコ株は、キノコの収穫後に根の部分 (廃菌床) が廃棄物として焼却処分されている。このため廃菌床をダイオキシン分解に活用できれば、廃棄物の低減化と有効活用に繋がる利点がある。室温条件下で培養したポテトデキストロース

ブロス (PDB) 培養液を測定した結果、分解酵素は4菌株とも Lac が主体的であった。

②福井大学所有の変異株4種

- ・野生株 (L-25 株) の突然変異とスクリーニングを繰り返して得られた新種の菌株である。分解酵素はマンガンペルオキシターゼ (MnP) が主体的で、酵素量は野生株の約 1.5 倍である。

2.2 分解方法

分解試験は、液相分解、固相分解で行った。分解効果を確認するため、菌を添加しないコントロール試料を用意し、分解後試料とコントロール試料とを比較することで以下の低減化率を求めた。本研究では、JIS の測定誤差の定義に基づき、低減化率 30% を分解効果の有無の判断基準とした。

$$\text{低減化率(\%)} = \frac{\text{コントロール試料(pg)} - \text{分解後試料(pg)}}{\text{コントロール試料(pg)}} \times 100(\%)$$

(1)液相分解

三角フラスコ内の培養液(100mL)を 121℃で加熱滅菌した後植菌し、30℃、150rpm で 10~14 日間振盪培養して菌を成長させた。分解対象試料 (標準物質や土壌、活性汚泥など) を添加し、分解のため、更に 28 日間以上振盪培養した。

培養液成分については、以下のとおりである。

<福井大学所有の変異株>

PDB 24g/L、ポリペプトン 0~45g/L、MnSO₄ 0.01~0.1mM。

<県内産キノコ株>

PDB 12~24g/L、ポリペプトン 0~12g/L、MnSO₄ 0~0.1mM。

Lac メディエータとして、ヒドロキシベンゾトリアゾール、ピオール酸、ABTS の3種類を、分解対象試料と同時に、終端濃度で 1mM となるよう添加した。

また、分解対象試料として、ダイオキシン類 (DXNs) 標準物質の 2,3,4,6,7,8-HxCDF (TEF=0.1)、OCDD/OCDF 混合液 (TEF=0.0003) 各 10,000pg を使用した。2,3,4,6,7,8-HxCDF は、染色排水由来に特徴的なダイオキシン類であり、今回の実験系における培養液中の毒性等量濃度は 10,000pg-TEQ/L で、河川水の環境基準値 (1pg-TEQ/L) の 10,000 倍となる。OCDD/OCDF は失効済の農薬 (PNP) に特徴的なダイオキシン類であり、現在でも水田土壌などに多く見られる異性体である。

*1 福井県丹南健康福祉センター
(元衛生環境研究センター)

(2)固相分解

単純な静置培養では、土壌に菌糸が行き渡るような成長が認められなかったため、菌体に水分や糖類を直接与えて3日毎に攪拌することとした。(以下、静置・攪拌培養という。)模擬汚染土壌は、ダイオキシン類濃度が非常に低い赤土に、2,3,4,6,7,8-HxCDFを10,000pg添加して調整した。

<静置・攪拌培養>

粉末状に粉碎した木材チップ14gを米ぬか2.0gと混合し、純水24mlを加え、121℃での滅菌処理後に植菌した。14日間室温で培養した後、分解対象試料を添加し、2mL/3daysの頻度で、純水、グルコース水溶液(100g/L)、ABTS水溶液(20.5g/L)を添加して攪拌した。

2.3 試料のダイオキシン類分析

液相分解試料(約100mL)にクリーンアップスパイク、捕集剤(凝集剤に活性炭分散シリカゲル混合、pH5~6調整)を添加し、1時間程度放置した後、吸引ろ過して一晚風乾した。風乾試料をGerhardt製ソックスサームにてトルエン抽出を2回行った。多層シリカゲルカラム、活性炭分散シリカゲルカラムでmono-ortho PCBs画分とnon-ortho PCBs/PCDDs/PCDFs画分に分離し、20μLまで最終濃縮した。GC/HRMSではSP-2331とRH-12msの2種類のGCカラムを用いて、毒性等価係数(TEF)を持つ29異性体を単独定量した(図1)。

固相分解試料の場合、含水率の高いものは100mL程度の純水を加えて液相分解試料と同様の処理を行った。含水率の低いものは、ろ過操作を省略してソックスサーム抽出から実施した。

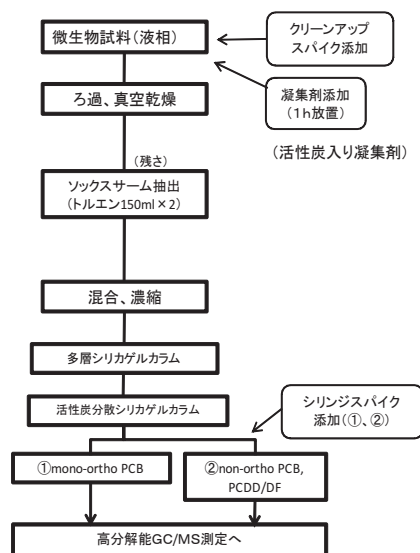


図1 微生物分解試料の分析フロー

(備考)

当初は、液相分解試料を吸引ろ過した後、ろ液はジクロロメタン(30mL)とヘキサン(30mL)で液-液抽出を計7回実施して脱水処理し、残差の抽出液と混合していたが、液-液抽出の際にエマルジョンが発生して回収率が悪化する場合が多く、50%を下回る試料もあった。このため、分析開始時に活性炭凝集剤を添加して溶液中のダイオキシン類を全て沈殿物として回収することで、回収率が平均80~90%まで大幅に改善され、同時に分析の簡易化・迅速化も達成された。

3. 結果と考察

3.1 県内産キノコによる分解

予備試験として、RBBR (Remazol Brilliant Blue R) 色素培地を用いた培養試験(20℃)を行った。4菌株のうち、ふくひら1号、ふくひら2号は成長が早く、植菌から9日間後には、菌糸の成長とともにRBBR色素の退色(分解)が認められた。一方、マイタケ、エノキタケでも最終的には色素の退色は認められたが、成長速度や退色の度合いは、ふくひら1号・2号に比べ低調であった。4菌株を室温条件下で培養したPDB培養液を吸光度測定した結果、分解酵素は4菌株ともLacが主体的で、MnP、LiPはNDであった。ふくひら1号、2号の方がLac量は多く、以降の実験は、酵素量や成長速度に優れた「ふくひら2号」を中心に行った。

(1)Lacメディエータ液相分解

分解試験の際には、菌を添加しないコントロール試料を用意して低減化率を計算した。コントロール試料の場合でも、液体振盪中の物理的な吸着・飛散ロスや、僅かな紫外線による光分解などでダイオキシン類濃度が減少する可能性もあるが、いずれの実験系でも28日間経過後に初期添加量の8~10割が回収でき、特段問題となる系は認められなかった。

ふくひら2号で10,000pgの2,3,4,6,7,8-HxCDFを1~28日間、液相分解した結果を図2に示す。培養フラスコ内の菌の生育状況には若干のバラツキがあるため、分解期間1日の結果には、最も生育の良いものと悪いものを使用して平均値を求めた。結果は1日目が5,600pgと7,200pg、平均で6,400pgと、3割程度の低減化が認められた。また、7日間経過後は1,900pgで8割程度、28日間経過後は1,300pgで9割弱の低減化であった。

本研究では分解試験を様々な実験条件で行ったこともあり、余裕を見て28日間の分解を基本としたが、処理システムとしての時間効率を考慮すると、1バッチの分解期間は1~2週間程度で良いと考えられる。

なお、櫻井らの酵素条件に関する基礎研究¹³⁾では、白色腐朽菌はグルコースなどの栄養源の添加直後から分解酵素を放出して5日間程度で最大値に達し、同時にグルコースもほぼ消費され、以降は自己消費や分解によって減少していく状況が報告されている。このことから、新たな栄養源の供給がない状況下での長期間の分解はあまり効果が望めないものと推察され、バイオリアクタに生きた菌を使用する場合は、定期的に栄養源を添加するなど、菌の活性を高く保つ工夫が必要と考えられる。

次に、Lacの分解効果を増加させることが報告されているヒドロキシベンゾトリアゾール、ピオール酸、ABTSの3種類のメディエータを選定し、分解対象試料の投入

時に、終端濃度で 1mM となるよう添加し、28 日間の液相分解を行った。結果を図 3～5 に示す。ふくひら 2 号での分解試料は、コントロール試料と比べ HxCDF について 57～89%、OCDD/OCDF について 61～93%の低減化が確認できた。また、培地に窒素成分 (ポリペプトン) を使用した系では、菌は同程度成長したが分解効果は全く認められなかった (図 3)。服部ら¹⁴⁾の *Pchrysosporium* を用いた培養試験では、窒素含有培地の場合、菌重量は同程度成長するものの、LiP 活性やメディアータ (ベラトリアルアルコール) 生産が全く発現しないことが確認されており、本研究も同様の傾向ではないかと考えられる。

なお、OCDD/OCDF 分解試験のうち、ヒドロキシベンゾトリアゾール添加系 (1mM) の低減化率は 14%と、他の実験系と比べて非常に低い結果となった (図 5)。これは、分解後試料から酸味の効いた強い腐臭がしており、培養液が若干白濁していた状況を踏まえると、メディアータ添加時に雑菌が混入した可能性が高い。このためヒドロキシトリアゾール添加系に関しては参考値として扱うこととし、集計結果からは除外した。

今回のメディアータ実験系における傾向としては、メディアータ非添加系の低減化率が 89～93% (n=3) と最も良好であり、メディアータ添加系は非添加系より 1～3 割ほど劣る結果となった。また、ふくひら 1 号と 2 号で比較試験を行ったが (図 4)、ふくひら 1 号に比べふくひら 2 号の方が ABTS 添加系・非添加系とも低減化率は高い結果となり、ふくひら 1 号・2 号とも ABTS 添加系の方が低減化率は 2～3 割程度劣る結果となった。なお、ABTS 添加時には、Lac の酸化反応によって培養液が濃い緑色に変色するが、ふくひら 1 号は 2 号に比べ目視で分かる程度の着色差があった。変色度合いは酵素濃度に比例することから、分解効果の優劣を予測する際の目安になると考えられる。

メディアータの機能に関しては、酵素の酸化反応により、カチオンラジカル中間体を形成して基質を分解することが知られており、白色腐朽菌は天然型メディアータを有しているとの報告¹⁴⁾¹⁵⁾がある。このため、今回の液相分解では生きた白色腐朽菌を使用していることから、菌体から天然型メディアータが十分に供給され、人為的な供給は不要であった可能性が考えられる。

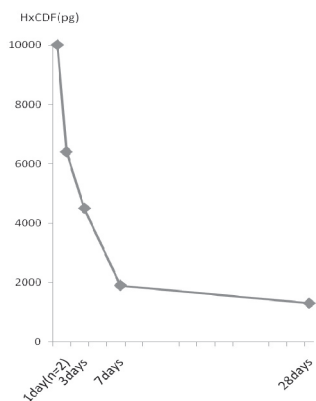


図 2 2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF 液相分解の経時変化

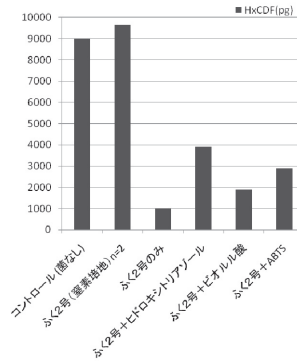


図 3 : 2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF 分解結果 (ふくひら 2 号 + Lac メディアータ)

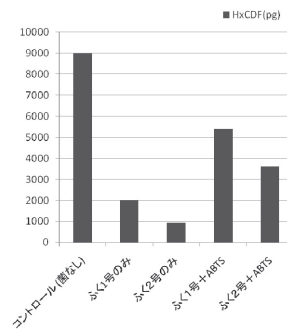


図 4 : 2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF 分解結果 (ふくひら 1 号、2 号 + ABTS)

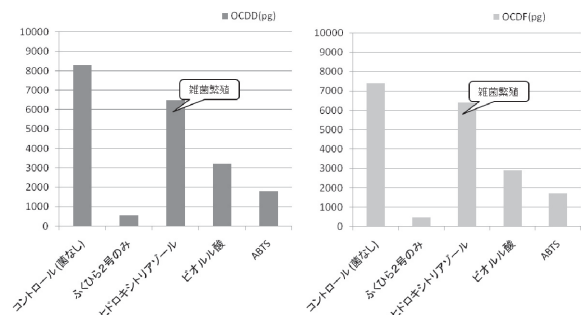


図 5 : OCDD/OCDF 分解結果 (ふくひら 2 号 + Lac メディアータ)

(2) Lac メディアータ固相分解

処理システムの実用化を考慮した分解条件として、HxCDF と OCDD/OCDF の模擬汚染土壌を対象に、木材チップ培養をベースとした固相分解を検討した。当試験では菌の成長や酵素の分泌のため、3 日毎に計 2mL の割合で、純水やグルコース水溶液、ABTS 水溶液を添加した。分解試験の様子と、分解結果を図 6～8 に示す。

60 日間の分解の結果、9000pg 前後のコントロール試料に対し、低減化率は概ね 10～20%程度、最大でも 23%と、分析誤差範囲内であった。

3 日毎の攪拌の際には菌糸が成長しており、ABTS の添加の都度、濃い緑色を呈していたことを考慮すると、

分解酵素 (Lac) 自体は分泌されている可能性が高く、土壌粒子に吸着したダイオキシン類と菌体・酵素の接触が十分でない可能性もある。今回の試験方法は非常に簡易的なもので、攪拌方法や培養条件について検討の余地もあることから、分解条件の見直しを行うことで分解効率が改善される可能性も考えられる。

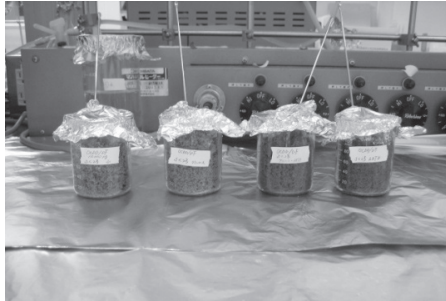


図6：ふくひら2号 2,3,4,6,7,8-HxCDF 固相分解試験 (左から、純水のみ、グルコース溶液、ABTS 水溶液、ABTS+グルコース溶液)

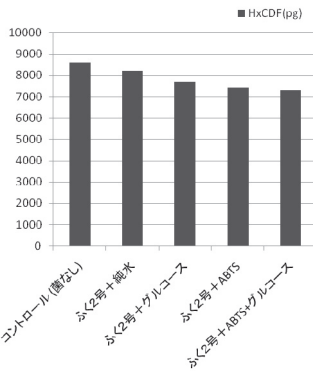


図7：ふくひら2号 2,3,4,6,7,8-HxCDF 固相分解結果

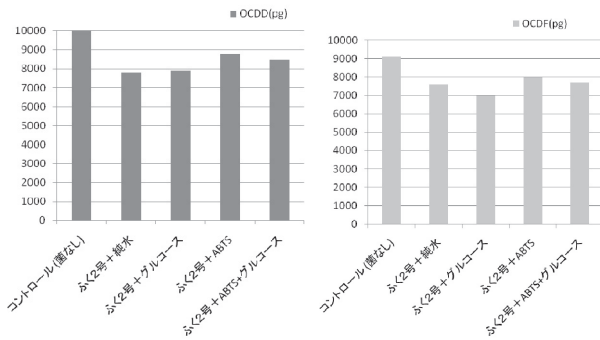


図8：ふくひら2号 OCDD/OCDF 固相分解結果

3. 2 福井大学所有の変異株による分解結果

変異株4種でOCDD/OCDFの液相分解を行った結果、OCDDで51~82%、OCDFで40~83%の低減化率が確認された。

これらの変異株で3.0~4.0gのダイオキシン類汚染土壌の液相分解を行ったが、低減化率は最大3割程度であり、分析誤差範囲を超える明確な分解効果は認められなかった。

また、福井資源化工機の倉庫内で、高濃度ばいじん試料を対象とした精製酵素液の分解試験を行ったが、分解効果は確認できなかった。ばいじん試料には凝集沈殿に用いる硫酸バンドや、金属成分が多く含まれていることから、これらの成分が酵素活性を妨害している可能性も考えられる。

4. まとめ

食用キノコ株(ふくひら2号)での分解効率の改善を目的として、Lacメディエータの添加や培地条件について検討した。

- PDB培地での液相分解の結果、7日間で2,3,4,6,7,8-HxCDF 10,000pgを約8割分解することが確認できた。28日間経過後の低減化も9割弱と大きな変化はないため、時間効率の面からも分解期間は1~2週間で良いと考えられる。窒素成分含有培地では、菌糸は成長したが分解効果は全く認められなかった。
- Lacメディエータ添加系のHxCDF液相分解では、低減化率はメディエータ添加系が89%、添加系は57~79%であり、分解効率は添加系の方が1~3割程度劣る結果となった。実験には生きた菌を使用しているため、メディエータ添加は不要であった可能性も考えられる。OCDD/OCDF液相分解についても、上記と同様の傾向が認められた。
- チップ培養によるHxCDF、OCDD/OCDF固相分解では、菌糸の成長やLac酵素の分泌は認められたが、低減化率は1~2割程度と、分析誤差範囲内であった。

福井大学所有の変異菌、精製酵素液を試したが、明確な分解効果は得られなかった。金属成分などが酵素の妨害をしている可能性もあり、現在、汚染土壌やばいじん試料の下処理方法についても検討している。

今後はこれまでの知見も踏まえ、引き続き分解条件の改善を行うとともに、製作した酵素製剤やバイオリアクタを活用し、発展型の実証化試験に取り組む予定である。

なお、本研究は文部科学省「特別電源所在県科学技術振興事業費補助金」により、「化学物質対策調査研究事業(平成20~22年度)」として実施した。

謝辞

本研究を実施するにあたり、技術指導、ご協力いただいた福井大学工学部櫻井明彦准教授、福井県総合グリーンセンター、若狭湾エネルギー研究センター、福井資源化工機の皆様方に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 渡辺隆司：白色腐朽菌のフリーラジカルプロセス、木材研究・資料 第36号、p34-50 (2000)
- 2) H. R. Karimniae-Hamedani et al. : Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus, *Dyes and Pigments* 72, 157-162 (2007)
- 3) A. Sakurai et al. : Removal of dioxins, endocrine disruptors and dyes by a newly isolated white-rot fungus, *International chemical congress of pacific*

- basin societies, Honolulu, USA, CD-ROM723 (2005)
- 4) C.Adinarayana.Reddy : The potential for white rot fungi in the treatment of pollutant, *Current Opinion in Biotechnology* 6, 320-328 (1995)
 - 5) 熊谷宏之他 : 未規制発生源からのダイオキシン類流入河川における汚染機構について一年間濃度変動と各汚染寄与割合の推定一, 福井県衛生環境研究センター年報, 4, 66-71 (2005)
 - 6) 熊谷宏之他 : 福井県の未規制発生源からのダイオキシン類流入河川における年間濃度変動について, 第15回環境化学討論会講演要旨集, 304-305 (2006)
 - 7) 熊谷宏之他 : 分散染料中のダイオキシン類分析について一抽出法の検討と測定データの特徴一, 福井県衛生環境研究センター年報, 5, 77-84 (2006)
 - 8) 熊谷宏之他 : 未規制発生源である染色排水からのダイオキシン類排出機構について, 第16回環境化学討論会講演要旨集, 388-389 (2007)
 - 9) 熊谷宏之他 : 分散染料中のダイオキシン類分析法の開発一凝集剤を用いた抽出法の評価一, 第16回環境化学討論会講演要旨集, 330-331 (2007)
 - 9) 熊谷宏之他 : 染色排水からのダイオキシン類低減化試験について一凝集沈殿、微生物分解、太陽光照射の検討一, 福井県衛生環境研究センター年報, 6, 55-60 (2007)
 - 10) 熊谷宏之他 : 未規制発生源である染色排水からのダイオキシン類排出機構について (その2) 一太陽光照射による PCDFs の生成反応一, 第17回環境化学討論会講演要旨集, 410-411 (2008)
 - 11) 三木崇他 : 微生物分解による汚泥・土壌のダイオキシン類低減化に関する研究 (第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 73-75 (2008)
 - 12) 三木崇他 : 微生物分解による汚泥・土壌のダイオキシン類低減化に関する研究 (第2報), 福井県衛生環境研究センター年報, 8, 74-77 (2009)
 - 13) A.Sakurai et al. : Peroxidase production by *Coprinus cinereus* using rotating disk contactor, *Biochem. Eng.J*, 10, 47-53 (2002)
 - 14) 服部武文 : 木材腐朽菌、菌根菌の二次代謝産物の役割, *木材研究・資料*, 第33号, 1-12 (1997)
 - 15) 河合真吾 : 天然型ラッカーゼメディエータの検索とグリーンケミストリーへの利用, 平成17年度~平成18年度 科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) 研究成果報告書