ノート

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）

三木崇・熊谷宏之

Degradation of Dioxins by White Rot Fungi

Takashi MIKI，Hiroyuki KUMAGAI

１．はじめに

キノコに代表される白色腐朽菌[1]は、自身の分解酵素（LiP:リグニンペルオキシターゼ、MnP:マンガンペルオキシターゼ、Lac:ラッカーゼ）によって、複雑な化学構造を有する木材構成成分のリグニンなど、難分解性物質を分解できることが知られている。

一方、福井県内のダイオキシン類実態としては、我々の調査研究の結果、一部河川で環境基準（1pg-TEQ/L）を超過するダイオキシン類汚染が確認され、その原因は一般的な汚染要因（燃焼、農薬（CNP、PCP）、PCB 製品など）だけでなく、繊維染色事業所からの染色排水（染料）が寄与していることを解明[2)~5)]した。そこで、染色排水のダイオキシン類低減化対策の必要性が生まれ、その手段として凝集沈殿法の検討を行い、有効性を確認した[6)]。

しかしながら、凝集沈殿法によって回収した排水汚泥中にはダイオキシン類が残存することから、その汚泥を無害化する必要がある。これまでの研究から、ダイオキシン類などの難分解性物質について、キノコによる分解・無害化に向けた利用が期待され、基礎的な実験系にて分解効果が確認されている報告[7)~9)]もある。

そこで、低コストで環境負荷の小さな処理技術としてバイオレメディエーションを活用した低減策を考え、白色腐朽菌および県内産キノコによるダイオキシン類の低減化に着目した。

著者らは、微生物やキノコによる分解試験の基礎条件(有効な菌種や分解効果、培養条件等）について検討した。

２．方法

２．１　L-25 株による分解試験

分解方法は、液相分解、固相分解の２通りで行い、菌を添加しないコントロール試料を用意し、分解後の試料とコントロール試料と比較することで低減化率を求めた。

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

(1)液相分解

培養液は、ポテトデキストロースブロス（以下、PDB）24g/L、ポリペプトン 1～45g/L、$MnSO_4$ 0.01～0.1mM である。

培養液 100ml を、振とう用の三角フラスコに入れ、菌体を添加して 30℃、150rpm で約１週間振とう培養した。

分解効果の確認のため、染色排水由来に特徴的なダイオキシン類である 2,3,4,6,7,8-HxCDF を 10,000pg 添加し、前述の条件で 28 日間以上培養分解した。

液相分解に関しては①単純培養分解、②酵素抽出液分解、③排水汚泥分解、の３種類を用意し、通常濃度培地と高濃度培地の条件下で分解効果を検証した。分解条件の定義は以下の通りである。

①単純培養分解：上記培養条件での分解。

②酵素抽出液分解：培養液から菌体を除去した抽出液を用いた分解。培養期間は約１ヶ月。

③排水汚泥分解：上記培養条件での排水汚泥の分解。

なお、②酵素抽出液分解では、酵素の分解活性に必要な過酸化水素水（1mM）を２日毎に約 1ml 添加し、分解期間は他より短めの 14 日間としたが、これは共同研究者の助言に基づくもので、初期の酵素抽出液には分解酵素が十分に存在しているが、時間とともに酵素が分解して活性が失われると予想されることから、分解に長期間費やしても意味がないと判断したためである。

(2)固相分解

市販の PDB 寒天培地で培養した菌体を 1cm² 程度にカットし、5.0g の模擬汚染土壌（もしくは排水汚泥）に３片載せ、３日毎に約 1ml の純水を滴下して 28 日間以上室温(20～25℃)で静置培養した。

模擬汚染土壌は、ダイオキシン類濃度が非常に低い清浄な赤土に、2,3,4,6,7,8-HxCDF を 10,000pg 添加して調整した。

固相分解としては、上記条件で培養分解した④模擬汚染土壌分解、⑤排水汚泥分解、の２種類であり、通常培地と高濃度培地について検証した。

２．２　県内産キノコによる分解試験

実験系としては、液相分解として①単純培養分解（通常、高濃度培地）、②セルロース培地分解（2.4g/100ml）、固相分解として、③単純培養分解（30 日）、④単純培養分解（180 日）、化学触媒添加系として、⑤過酸化水素水添加分解（0.1～1mM：1ml/3days）、⑥酸化カルシウム分解（CaO 1g、H_2O_2 (0.1mM) :1ml/3days）、の計６種類である。

液相分解の培養条件は前述のとおりだが、固相分解に関しては、県内キノコの成長のしやすさと実用性を考慮し、５g の木材チップに菌を植えて約１週間成長させ、その後模擬汚染土壌と混合した。

分解条件の定義は以下の通りである。

＜液相分解＞

①単純培養分解：上記培養条件での分解。

②セルロース培地分解：培養液の成分を、セルロース

2.4g/100ml、$MnSO_4$ 0.1mM とした。PDB 等は不使用。

＜固相分解＞

③単純培養分解：上記培養条件での分解。（30 日）

④単純培養分解：上記培養条件での分解。（180 日）

⑤過酸化水素水添加分解：上記培養条件に加え、過酸化水素水（0.1mM、1mM）を３日に 1ml 添加。

⑥酸化カルシウム分解：上記培養条件の培地に CaO 1g を混合し、過酸化水素水(0.1mM)を３日に 1ml 添加。

今回の実験では分解効率を上げるため、化学触媒として過酸化水素や酸化カルシウムを選定し、模擬汚染土壌・木材チップ系に添加した。

これらの物質の添加理由は、白色腐朽菌は酵素と過酸化水素を分泌して酵素反応を行っている [1]ため、外部から過酸化水素を与えることで現在よりも酵素反応が促進される可能性が考えられること、また、酸化カルシウムは、物質自体がダイオキシン類分解作用を有しており、安価で環境毒性もないため、環境土壌へ散布する際に有効と考えたことの２点である。なお、両者とも過酸化水素水(0.1～1mM)を３日毎に約 1ml 添加し、その都度、全体が均一な濃度となるよう攪拌した。

２．３　白色腐朽菌の選定

全部で５種類の菌を、以下の観点で選定した。

(1) 既に染料やダイオキシン類の分解効果が確認されている [7,8]ものを選定した。これは、福井大学が所有する L-25 株で、酵素分泌量が多いため、高い分解効果が期待できる。この L-25 株の分泌酵素はマンガンペルオキシターゼ（MnP）が主体的である。

(2) 汎用性と県内産のきのこの有効活用を期待して選定した。これは、福井県内で食用に栽培されているキノコ類（４種類）であり、収穫後には廃菌床と呼ばれる根の部分が廃棄物として発生し、焼却処分されている。

また、廃菌床の有効活用に繋がるという可能性がある。

県内産キノコとして、県総合グリーンセンターから４種類（ふくひら１号、ふくひら２号、マイタケ、エノキタケ）の提供を受け、吸光光度計を用いた酵素測定を行った。

２．４　試料のダイオキシン類分析

各試験で得られた処理液に、内標準物質としてクリーンアップスパイクを添加し、吸引ろ過操作によってろ液と残渣に分けた（図１）。

残渣については Gerhardt 製ソックスサームでトルエン抽出を２回行い、ろ液はジクロロメタンとヘキサンによる液-液抽出を計７回実施し、硫酸ナトリウムで脱水処理した後に両抽出液を混合した。(培養液は有機物を多く含んでおり、液-液抽出の際にはジクロロメタンと培養液の混合相（エマルジョン）が発生する。このため、水相と混合相について３回ずつヘキサン抽出を行うこととした。）なお、固相試料の場合は、ろ過操作と液-液抽出を省略し、ソックスサーム抽出から開始した。

得られた抽出液を多層シリカゲルカラムで精製した後、活性炭分散シリカゲルリバースカラムで mono-ortho PCBs 画分と non-ortho PCBs/PCDDs/PCDFs 画分に分画し、20μl まで最終濃縮した。HRGC/HRMS による測定では、既報 [10]の測定条件下で、GC カラムとして SP-2331 と RH-12ms の２種類を用いて同定・定量を行った。

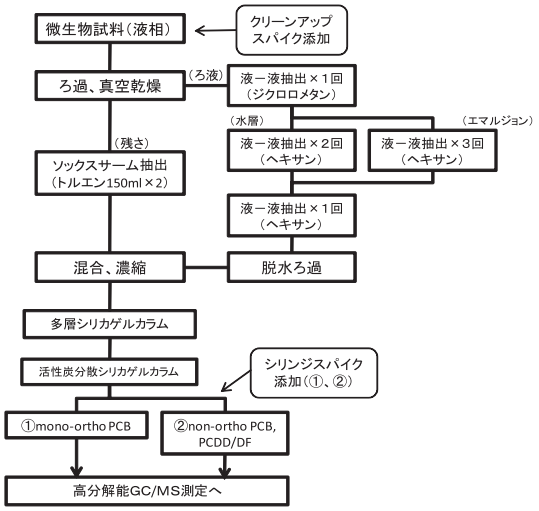

図１　微生物分解試料の分析フロー（液相試料）

３．結果と考察

３．１　Ｌ - 25 株による分解結果

L-25 株を用いて液相分解、固相分解を行った結果を表１に示す。

今回の研究では、分解効果の有無の判定として、低減化率 30%を判断基準とした。これは、JIS K 0312 等の「ダイオキシン類の測定方法」に準ずる考え方である。

分解結果は、いずれの系も初期濃度に近いダイオキシン類が回収され、①単純培養分解の高濃度培地試料のみ、約 20%の低減化が確認されたが、他の系は 10%未満で、明確な分解効果は認められなかった。

表１：L-25株による分解試験

	方法	分解対象	分解日数	低減化率
液相分解	単純培養 （通常、高濃度培地）	HxCDF（培養液）	38日	通常培地　：10%未満 高濃度培地：約20%
	酵素抽出液 （通常、高濃度培地）	HxCDF（培養液）	14日	10%未満
	排水汚泥 （通常、高濃度培地）	汚泥のみ	51日	10%未満
固相分解	単純培養 （通常、高濃度培地）	HxCDF（土壌）	29日	10%未満
	排水汚泥 （通常、高濃度培地）	汚泥のみ	51日	10%未満

３．２　県内産キノコによる分解結果

食用キノコ株を用いて液相分解、固相分解を行った結果を表２に示す。

いずれの系でも初期濃度に近いダイオキシン類が回収され、低減化率も 10%未満と、４菌種（ふくひら１号、ふくひら２号、マイタケ、エノキタケ）とも分解効果は認められなかった。

なお、実験に先立ち、４菌種の培養液について吸光光度計で酵素量測定した結果、食用キノコが基礎的な培養条件で分泌する酵素はラッカーゼ（Lac）が主体的で、マンガンペルオキシターゼ（MnP）、リグニンペルオキシターゼ（LiP）は殆ど分泌されないことが確認された。これらの酵素が存在しないことが、分解効果が得られなかったことに関連しているといえる。

表2：食用キノコ株（4菌種）による分解試験

	方法	分解対象	分解日数	低減化率
液相分解	単純培養 （通常、高濃度培地）	HxCDF（培養液）	54 日	10%未満
	特殊環境 （セルロース培地）	HxCDF（培養液）	54 日	10%未満
固相分解 （土壌＋木材）	単純培養（30日）	HxCDF（土壌）	30 日	10%未満
	単純培養（180日）	HxCDF（土壌）	180 日	10%未満
化学分解 （土壌＋木材＋触媒）	過酸化水素水 （ふくひら1号）	HxCDF（土壌）	40 日	10%未満
	酸化カルシウム （ふくひら1号）	HxCDF（土壌）	40 日	10%未満

4．まとめ

本年度の基礎的な分解試験では、L-25 株、食用キノコ株ともダイオキシン類濃度の明確な減少は認められなかった。

今後は各種酵素の活性を高める条件など、分解効率の改善を検討していく予定である。

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、福井県総合グリーセンター赤松やすみ主任研究員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) 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）
3) 熊谷宏之他：分散染料中のダイオキシン類分析法の開発―凝集剤を用いた抽出法の評価―，第 16 回環境化学討論会講演要旨集，330-331（2007）
4) 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）
5) 熊谷宏之他：分散染料中のダイオキシン類分析について―抽出法の検討と測定データの特徴―，福井県衛生環境研究センター年報，5，77-84（2006）
6) 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―凝集沈殿、微生物分解、太陽光照射の検討―，福井県衛生環境研究センター年報，6，55-60（2007）
7) H.-R.Kariminiaae-Hamedaani et al. : Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus, Dyes and Pigments 72，157-162（2007）
8) A.Sakurai et al. : Removal of dioxins, endocrine disrupters and dyes by a newly isolated white-rot fungus, International chemical congress of pacific basin societies, Honolulu, USA, CD-ROM723 (2005)
9) C.Adinarayana.Reddy : The potential for white rot fungi in the treatment of pollutant, Current Opinion in Biotechnology 6，320-328（1995）
10) 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―年間濃度変動と各汚染寄与割合の推定―，福井県衛生環境研究センター年報，4，66-71（2005）