

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)

三木 崇・熊谷宏之

Degradation of Dioxins by White Rot Fungi (2)

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おり、ダイオキシン類などの難分解性物質についても、白色腐朽菌による分解・無害化処理が期待され、基礎的な培養条件にて分解効果が確認されている報告^{2)~4)}もある。

また、福井県内におけるダイオキシン類の実態として、これまでの調査の結果、一部河川で環境基準値 (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^{5)~8)}した。

我々は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検討を行い、その有効性を確認したが⁹⁾、凝集沈殿法で回収した排水汚泥にはダイオキシン類が残存するため、無害化処理が必要となる。

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、白色腐朽菌を用いたダイオキシン類の低減化について検討した。

2. 方法

2. 1 白色腐朽菌の選定

分解試験には以下の9種類の菌を使用した。

①福井大学所有の野生株

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³⁾菌株として、福井大学所有の野生株 (L-25 株) を使用した。野生株の分解酵素はマンガンペルオキシターゼ (MnP) が主体的である。

②県内産食用キノコ株 (4種類)

福井県内で食用に栽培されているキノコ類として、県総合グリーンセンターから、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) が廃棄物として発生し、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利用することが出来れば、廃棄物の低減化と有効活用に繋がる利点がある。分解酵素量について吸光光度測定を行った結果、4菌株ともLacが主体的であった。

③福井大学所有の変異株 (4種類)

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、固相分解の2通りを行った。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

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7~10日間振盪培養して菌体を成長させた。分解対象試料 (標準物質や土壌、活性汚泥など) を添加し、更に28日間以上振盪培養して分解試料とした。なお、酵素抽出液分解では、試料と混合後、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。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。

培養液成分は、福井大学所有の野生株、変異株について、ポテトデキストロースブロス (以下、PDB) 24g/L、ポリペプトン 0~45g/L、MnSO₄ 0.01~0.1mMであり、県内産キノコ株は、PDB 12~24g/L、ポリペプトン 0~12g/L、MnSO₄ 0~0.1mMである。また、Lac機能を活性化させるメディエータとして、ヒドロキシトリアゾール、ピオール酸、ABTSの3種類を選定し、分解対象試料と同時に添加した。(終端濃度で1mM)

今回の実験で用いた分解対象試料は、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や、活性汚泥である。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 (TEQ) 濃度は、河川水の環境基準値 (1pg-TEQ/L) の10,000倍に相当する。OCDD/OCDFは旧農薬 (PNP) に特徴的なダイオキシン類であり、水田土壌等から比較的高濃度で検出されている。

(2)固相分解

単純な静置培養と、菌体に水分や糖類を直接与えて攪

拌する静置・攪拌培養で行った。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。

静置培養：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、120℃での滅菌処理後に植菌した。14 日間室温で静置培養した後、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)を添加して十分攪拌した。

2. 3 試料のダイオキシン類分析

液相分解試料に、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 画分に分離し、20 μL 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。

なお、当初は、液相分解試料をろ液と残渣に分け、ろ液を液-液抽出する方法で測定していたが(図1)、試料間で回収率のバラツキが大きいという難点があり、50%を下回るケースもあった。

このため、最初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(図2)。

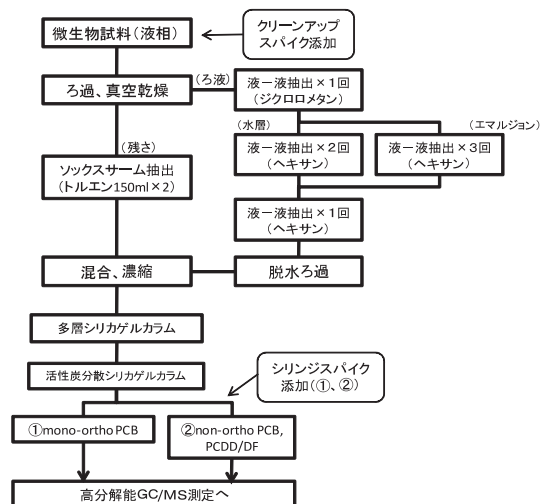


図1 微生物分解試料の分析フロー

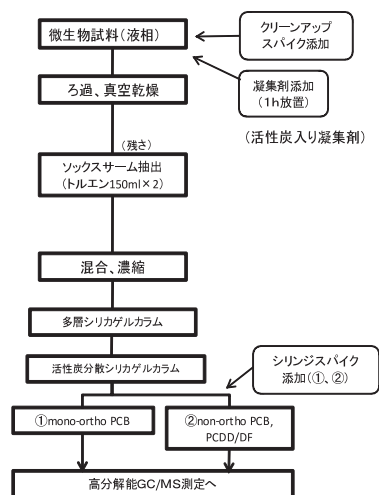


図2 微生物分解試料の分析フロー
(活性炭凝集剤添加法)

3. 結果と考察

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。

3. 1 野生株による分解結果

福井大学所有の野生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。

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: 福井大学所有の野生株による分解試験

液相分解	分解方法	分解対象	低減化率
液相分解	振盪培養 (通常、高濃度培地)	HxCDF 10,000pg	10%未満 (高濃度培地は約20%)
	酵素抽出液 (通常、高濃度培地)	HxCDF 10,000pg	10%未満
	振盪培養(汚泥) (通常、高濃度培地)	汚泥5.0g	10%未満
	静置培養(土壌) (通常、高濃度培地)	HxCDF 10,000pg (土壌5.0g)	10%未満
固相分解	静置培養(汚泥) (通常、高濃度培地)	汚泥5.0g	10%未満 (菌が死滅)

3. 2 県内産キノコによる分解結果

分解酵素に関する簡単な予備試験として、RBBR 色素培地での室温培養 (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が認められたものの、ふくひら 1 号、2 号に比べ成長が遅く、分解酵素の生産性もやや少なめといえる。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 はほとんど分泌されていなかった。

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。ふくひら 2 号について各種培養条件を検証した結果、多くの系ではコントロール試料、分解後試料とも初期添加量と同等のダイオキシン類が回収され、分解効果は認められなかったが、液相分解の一部の系で、HxCDF について 57~89%、OCDD/OCDF について 61~93% の低減化率が確認された。これらは培地に窒素成分 (ポリペプトン) を使用しない系であり、メディエータ不使用の系で大きな低減化率が確認されたことも考慮すると、低減化に至った要因は培地成分による影響と考えられる (図 3)。なお、OCDD/OCDF を用いた分解試験のうち、ヒドロキシトリアゾール添加系 (1mM) の低減化率は 14% と、他の実験系と比べ非常に低い結果となった (図 4)。これは、分解終了後の当該試料から、酸味の効いた強い腐臭がしていた状況を踏まえると、メディエータ添加時に雑菌が混入して繁殖した可能性が高く、ヒドロキシトリアゾール添加系に関しては参考値とするのが妥当と考えられる。

また、実用化に近い条件として固相分解を検討した結果、水分を添加しない静置培養では 4 菌株とも低減化は認められず、ふくひら 2 号に水分やグルコース溶液、ABTS を 3 日毎に添加した静置・攪拌培養でも、低減化率は最大で 22% と、分解誤差範囲内であった。なお、3 日毎の攪拌時には菌糸が成長しており、ABTS 添加時には酸化作用によって ABTS が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い。

表 2: 食用キノコ株 (4 種) による分解試験

	方法	培地成分	分解対象	低減化率
液相分解 (※全てふくら2号)	振盪培養 ・通常培地 ・高濃度培地	①R10ペプトン12g/L、 PDB12g/L、MnSO ₄ 1mM ②R10ペプトン12g/L、 PDB12g/L、グルコース12g/L、 MnSO ₄ 1mM	HxCDF 10,000pg	10%未満
	振盪培養 ・特殊培地	①セルロース24g/L ②リグニン24g/L	HxCDF 10,000pg	10%未満
	振盪培養 ・低窒素培地 ・メディエータ添加	PDB 24g/L ①メディエータなし、②ヒドロキ シトリアゾール1mM、③ピオ ル酸1mM、④ABTS 1mM	HxCDF 10,000pg OCDD/OCDF 各10,000pg	57～89% 61～93%
	固相分解	静置培養 ・キノコ4種 ・30～180日	模擬汚染土壌5g、木材チップ5g (水分添加せず)	HxCDF 10,000pg
固相分解	静置培養 ・ふくら1号 ・化学触媒系	模擬汚染土壌5g、木材チップ5g ・過酸化水素水 ・酸化カルシウム	HxCDF 10,000pg	10%未満
	静置・攪拌培養 ・ふくら2号 ・メディエータ添加	模擬汚染土壌4g、木材チ ップ40g (水、グルコース、ABTS などを添加して攪拌)	HxCDF 10,000pg	15%未満
	静置・攪拌培養 ・ふくら2号 ・メディエータ添加	木材チップ40g(標準物質を直 接添加。水、グルコース、ABTS 等を添加して攪拌)	OCDD/OCDF 各10,000pg	22～11%

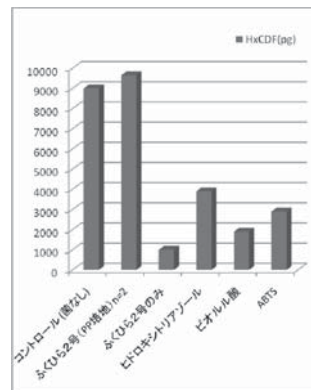


図 3: HxCDF 分解結果 (ふくひら 2 号)

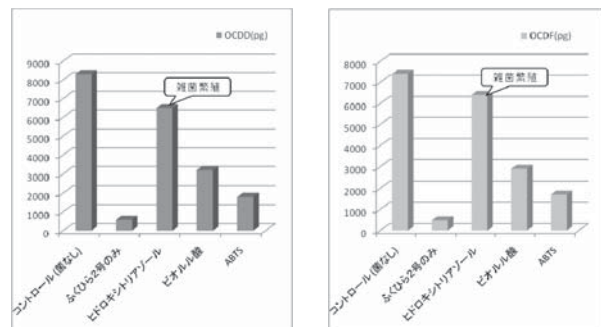


図 4: OCDD/OCDF 分解結果 (ふくひら 2 号)

3. 3 変異株による分解結果

福井大学所有の変異株を用いて液相分解を行った結果を図 5 に示す。OCDD/OCDF について、51~82%、40~83% の低減化率が確認された。なお、変異菌 B は他より分解効果が良好であったが、菌が器壁に吸着する形で成長しており、生育条件は若干異なっていた。なお、分解後の試料について、塩素数の異なる異性体も確認したが、低塩素数の異性体は認められなかった。

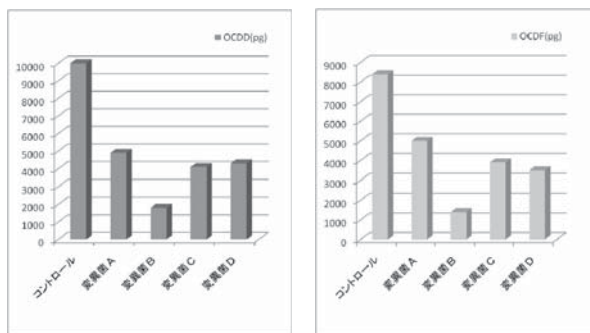


図 5：OCDD/OCDF 分解結果（福井大学所有の変異株）

4. まとめ

食用キノコ株（ふくひら 2 号）での液相分解（28 日間）の結果、2,3,4,6,7,8-HxCDF について 57～89 %、OCDD/OCDF について 61～93%の低減化が認められた。Lac メディエータ添加による効率改善は特に認められなかった。食用キノコ株を木材チップで培養した固相分解（攪拌・静置培養）では、菌糸の成長は認められたが、低減化率は概ね 2 割以下であり、十分な分解効果は認められなかった。このことに関して原因は不明だが、木材チップをベースとした固相分解系においては、分解しやすい有機物(木材チップ)の分解が優先されたり、菌糸と土壌粒子に吸着したダイオキシン類との物理的な接触が少ない可能性などが推察される。

また、福井大学所有の変異株 4 株（A～D）で液相分解（28 日間）を行った結果、OCDD/OCDF について、低減化率は 51～82%、40～83%であった。

今後も引き続き分解条件の改善に取り組むとともに、モデル土壌試料などの分解試験を行い、ダイオキシン類の分解特性の評価や分解機構について検証する予定である。

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、若狭湾エネルギー研究センター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.Kariminiaae-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：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）
- 6) 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）
- 7) 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）
- 8) 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）
- 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—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）
- 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）