

# 白色腐朽菌を用いたダイオキシン類低減化に関する研究 —実証化に向けた検討— (第1報)

三木 崇・吉川昌範

Degradation of Dioxins by White Rot Fungi  
- Tests toward the Practical Application - (1)

Takashi MIKI, Masanori YOSHIKAWA

## 1. はじめに

キノコに代表される白色腐朽菌<sup>1)</sup>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<sup>2~4)</sup>。

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、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<sup>5-11)</sup>。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。今回、これまでの基礎試験で比較的良好な結果が得られた食用キノコ株・変異株を対象に、ダイオキシン汚染土壌の液相分解試験、精製酵素液による散布方式の分解試験を実施した。併せて、分解メカニズムに関する検証と土壌の溶媒抽出処理に関する検討を行った。

## 2. 方法

### 2. 1 白色腐朽菌の選定

分解試験には、これまでの検討で分解効果が確認できた以下の菌株を使用した。詳細は既報<sup>12-14)</sup>のとおりである。

#### ① 県内産食用キノコ株

- ・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提供を受けた「ふくひら1号」、「ふくひら2号」を使用した。県内産キノコの分解酵素はラッカーゼ (Lac) が主体的で、ダイオキシン分解に活用できれば、栽培後の廃棄物 (廃菌床) の有効活用に繋がるメリットがある。

#### ② 福井大学所有の変異株

- ・野生株 (L-25 株) のイオンビーム照射により突然変異

させ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

ダイオキシン類の分解は、既報<sup>12-14)</sup>の条件下で、(a)液相分解、(b)固相分解にて行った。分解効果の確認のため、植菌していないコントロール試料を調製し、試料間の比較により低減化率 (%) を求めた。分析誤差を考慮し、「低減化率 30% 以上」を分解効果の有無の判断基準とした。

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は 10,000pg-TEQ/L、河川水の環境基準値 (1pg-TEQ/L) の 10,000 倍となる。OCDD/OCDF は使用が禁止されている農薬 (PCP: ペンタクロロフェノール) 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残留している異性体である。

### 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、20 μL 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。

固相分解試料の場合、含水率の高いものは約 100mL 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。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 県内産キノコによる分解

#### (1) DXNs 標準物質の液相分解

ふくひら 2 号を用いた液相分解試験の結果、10,000pg の 2,3,4,6,7,8-HxCDF について、1 日間で約 30%、7 日間で約 80%、28 日間で 90% 弱の低減化が確認できた。ふくひら 1 号と 2 号の比較では、ふくひら 2 号のほうがやや優位な結果が得られており、これは Lac メディエータ (ABTS) 添加時の変色度合 (≒ 酵素濃度) の差異と対応

する傾向であった。

なお、櫻井らの酵素条件に関する基礎研究<sup>15)</sup>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酵素濃度が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、定期的な栄養源の添加などで菌の活性を高く保つ工夫が必要と考えられる。

## (2) 汚染土壌の液相分解

液相分解処理システム(回転型バイオリアクター)の実用化に向けた検討として、土壌試料の液相分解試験を実施した。

ふくひら2号で、底質試料、水田農業系汚染土壌試料について28日間の液相分解を行ったが、どちらも明確な分解効果は認められなかった。

底質・土壌試料にはフミン酸などの有機腐敗物や金属元素、雑菌類が存在しており、これらが酵素反応を妨害する可能性も考えられたため、土壌試料の洗浄処理による液相分解を検討した。土壌洗浄は、10gの試料に対し、蒸留水1Lでの水洗・風乾処理、同じく水洗処理後のエタノールすすぎ(200mL)・風乾処理、エタノール300mLでの洗浄・風乾処理を行った。底質3.0gを28日間液相分解した結果、水洗試料は誤差範囲内で明確な効果が認められなかったものの、エタノールを使用した2試料では、OCDDなど各異性体について4割前後の低減化が認められた(図1)。後述の低極性溶媒(アセトン・トルエン)を用いた超音波土壌洗浄試験の結果からも、土壌粒子からエタノールへの移行率は十分低いと考えられるが、現在、ろ液成分についても確認の分析を行っている。

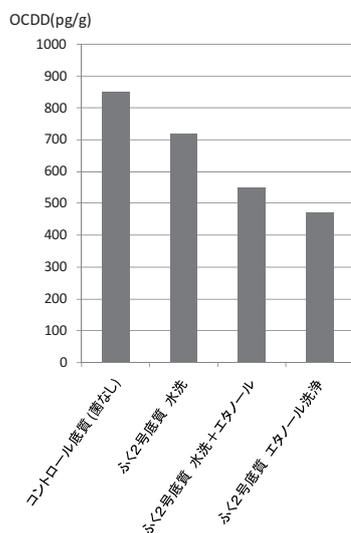


図1 底質洗浄後の液相分解試験(OCDD濃度)

## (3) 汚染土壌の固相分解

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、純水やグルコース水溶液、ABTS水溶液を添加した。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。

## (4) 培地条件・分解メカニズムに関する検討

分解効率の向上を目的に、3種類のLacメディアータ(ヒドロキシベンゾトリアゾール、ピオール酸、ABTS)を用いて分解試験を実施した。

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、3種類の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、ふくひら1号に比べふくひら2号の方がABTS添加系・無添加系とも低減化率は高くなった。また、ふくひら1号・2号ともABTS添加系の方が無添加系より2~3割程度劣る結果となった。

培地成分による違いとして、PDB(ポテトデキストロースブロス)に窒素成分(ポリペプトン)を添加した系では、菌はPDB培地と同程度成長したが分解効果は全く認められなかった。服部ら<sup>16)</sup>の*Pchryso sporium*を用いた培養試験では、菌の生育とともに菌からメディアータ成分(ベラトリアルアルコール)が分泌されること、さらに、窒素添加培地の場合、菌は同様に成長する一方でLiPやメディアータが全く生産され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。菌体からも天然型メディアータ<sup>17)</sup>が分泌される状況を踏まえ、今回のメディアータ実験系は供給過剰であった可能性が考えられる。

また、分解メカニズムに関する検証として、菌体内の代謝酵素であるシトクロームP-450の阻害物質(インヒビタ)の添加試験を行った<sup>18-19)</sup>。分解開始時にシトクロームP-450阻害剤(ピペロニルブトキシド)を終端濃度で0.01~10mMとなるよう添加したところ、コントロール試料に比べ1mMで分解効率が3割程度低下し、10mMでは分解がほぼ阻害されることが確認できた(図2)。仮に、分解プロセスが菌体外酵素だけでなくシトクロームP-450などの菌体内酵素も関与している場合、分解反応はダイオキシン類と菌体が接触する形で進行している可能性が高い。汚染土壌からダイオキシン類を剥離して菌体に吸着させるプロセスが分解の律速になっている場合には、人為的に剥離・吸着させる手法を検討する必要がある。

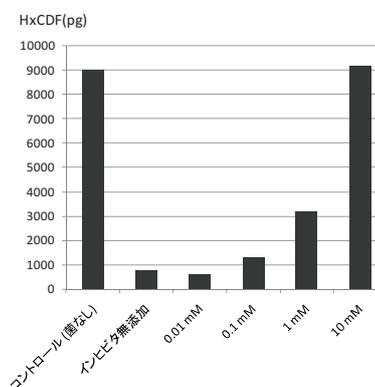


図2 シトクロームP-450インヒビタ添加試験

**(5) 土壌の溶媒抽出処理に関する検討**

土壌洗浄法の基礎試験として、常温条件下での有機溶媒によるダイオキシン抽出法について検討した。

底質 2.0g と溶媒 25mL (アセトン、トルエン) を遠心分離管に入れ、300min<sup>-1</sup> で 10 分間振盪した後、超音波槽で 10 分間の抽出を行い、3000rpm で遠心分離して溶媒を回収した。一連の抽出操作を 3 サイクル行い、溶媒による違いや (アセトン 3 回、アセトン 1 回・トルエン 2 回)、超音波照射の有無による差を検証した。試料中の濃度が高い OCDD について、残渣試料の分析結果を図 3 に示す。各異性体について概ね 3 ~ 4 割が抽出できたが、アセトン・トルエンによる違いや超音波照射の有無による抽出差は認められなかった。

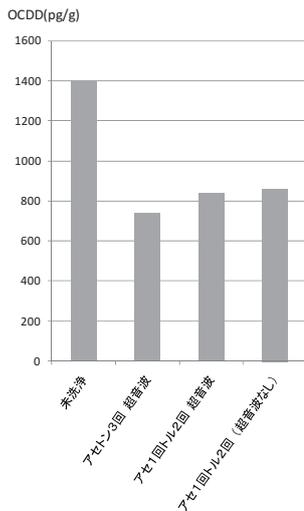


図 3 土壌の溶媒抽出試験 (残渣試料の OCDD 濃度)

**3. 2 福井大学所有の変異株による分解結果**

これまでの基礎試験<sup>12-14)</sup>で比較的良好な結果が得られた変異株と、培養液から精製した粗酵素液を使用した。

**(1) 試作型酵素製剤による固相分解**

汚染土壌への散布形式による環境浄化を目的として、粗酵素液による分解試験を実施した。

高濃度ばいじん試料を対象としたプレハブ倉庫での混合試験では、夏季の半屋外・高温条件下という状況もあり、28 日経過後の試料は腐臭が強く、分解効果は認められなかった。このため実験室内で最適温度条件と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加・攪拌を管理した形にて再試験を行ったが、同様に分解効果は認められなかった。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反応を妨害している可能性も考えられる。

**(2) 汚染土壌の液相分解**

液相分解処理システム (回転型バイオリクター) の実用化に向けた検討として、土壌試料の液相分解試験を実施した。

変異株 6 種を用いて、底質試料、水田農薬系汚染土壌試料について 28 日間の液相分解を行ったが、どちらも明確な分解効果は認められなかった。

土壌中の妨害成分の可能性を考慮し、汚染土壌をソックスレー抽出したトルエン抽出液を濃縮してアセトンに転溶し、培養液 100mL に対し汚染土壌抽出液を 1mL 添加して液相分解を行った結果、コントロール試料に比べ 4 種類の変異株で 3 ~ 7 割弱の低減化が確認できた。

**4. まとめ**

ダイオキシン類分解処理システムの実証化に向けて、これまでの基礎試験で比較的良好な結果が得られた食用キノコ株・変異株を対象に、ダイオキシン汚染土壌の液相分解試験、精製酵素液による散布方式の分解試験を実施した。併せて、分解メカニズムに関する検証と土壌の溶媒抽出処理に関する検討を行った。

- ・汚染土壌や高濃度ばいじん試料の直接処理 (液相分解、固相分解、精製酵素液との混合処理) では、明確な分解効果が得られなかった。
- ・汚染土壌のトルエン抽出液をアセトン転溶し、変異株 (4 種類) で液相分解した結果、3 ~ 7 割弱の低減化が確認できた。
- ・ふくひら 2 号の液相分解で、シトクローム P-450 阻害剤 (ピペロニルブトキシド) を終端濃度で 0.01 ~ 10mM となるよう添加したところ、コントロール試料に比べ 1mM で分解効率が 3 割程度低下し、10mM では分解がほぼ阻害された。
- ・土壌の溶媒抽出試験としてアセトン、トルエンによる 3 回の振盪・超音波抽出を行った結果、抽出量は 3 ~ 4 割程度で、溶媒の違いや超音波照射の有無による抽出効率の差は認められなかった。

今後はバイオリクターの試作に向けて、土壌前処理や土壌抽出条件の改善を行うとともに、酵素製剤についても検証する予定である。

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 23 ~ 25 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(株)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 disrupters 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 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 1 報), 福井県衛生環境研究センター年報, 7, 73-75 (2008)
- 13) 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)
- 14) 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 3 報), 福井県衛生環境研究センター年報, 9, 51-55 (2011)
- 15) A.Sakurai et al. : Peroxidase production by *Coprinus cinereus* using rotating disk contactor, *Biochem. Eng.J*, 10, 47-53 (2002)
- 16) 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)
- 17) 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
- 18) I.kamei et al. : Biotransformation of dichloro-, trichloro-, and tetrachlorodibenzo-p-dioxin by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 68, 560-566 (2005)
- 19) I.kamei et al. : Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenils by white-rot fungus *Phlebia lindtneri*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 73, 932-940 (2006)