

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2報)

三木 崇・吉川昌範

Degradation of Dioxins by White Rot Fungi
—Test Toward The Practical Application— (2)

Takashi MIKI, Masanori YOSHIKAWA

ダイオキシン類分解処理システムの実証化に向けて、フラスコ内での基礎試験、バイオリアクターの設計検討、分解効率の改善、分解メカニズムの検討およびリアクター試験などを行った。実証化に近い条件として、ダイオキシン類以外の汚染物も含む実際の汚染土壌抽出液に対して、変異菌のフラスコ試験で4~7割、ふくひら2号のリアクター試験で6割程度の分解効率を確認した。また、リアクター試験では染料など高濃度の多環芳香族化合物に対する分解処理能力も確認できた。リアクター槽の材質など分解条件に改善の余地が認められたが、難分解性有機物等に対する分解処理技術としての応用は十分可能であると考えられる。

1. はじめに

キノコに代表される白色腐朽菌^{1,2)}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³⁻¹⁷⁾。

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¹⁸⁻²¹⁾。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²²⁻²⁶⁾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²⁷⁻³⁰⁾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。ダイオキシン分解に使用できれば、収穫後の廃棄物 (廃菌床) の有効活用に繋がるメリットがある。同時期に提供を受けた「マイタケ」、「エノキタケ」については酵素分泌量やRBBR退色試験の反応が薄く、分解用途には不向きと考えられた。酵素測定の結果、県内産キノコの分解酵素はLacが主体的であった。

② 福井大学所有の変異株

変異株は、若狭湾エネルギー研究センターのイオンビーム照射装置を利用して野生株 (L-25株) を品種改良したものである。分解酵素はMnPが主体的で、酵素量は野生株の約1.5倍である。

2. 2 分解試験

ダイオキシン類の分解は、既報²⁷⁻³⁰⁾の条件下で、菌培養液の振盪培養による「液相分解」、土壌粒子等への直接培養 (もしくは試作型粗酵素液の散布) による「固相分解」の形で行った。液相分解については、三角フラスコでの100mL培養と、卓上型培養装置での1.5L培養を検証した。

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、コントロール試料と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。

ダイオキシン類 (DXNs) 標準物質として、2,3,4,6,7,8-HxCDF (TEF=0.1)、OCDD/OCDF (TEF=0.0003) 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、OCDD/OCDFはPCP農薬に特徴的なダイオキシン類である。

また、処理システムの大規模化のための検証として、市販の卓上型培養装置を購入し、高濃度の染料分解試験と汚染土壌抽出液の直接分解試験を行った。

(1) フラスコ分解

500mLの培養用三角フラスコ内に24g/LのPDB (ポトデキストロースブロス) 培養液100mLをオートクレーブ処理 (121℃) し、シャーレ培養した菌を添加して150rpmで振盪培養した。2週間程度の培養によって多数

の粒子状の菌体が成長した後、分解対象物の汚染抽出液や標準物質をアセトン 1～2mL に溶解させて添加し、28 日間の振盪培養を行った。

(2) リアクタ分解（卓上型培養装置）

卓上型培養装置（丸菱バイオエンジニアリング製 MDL300 型 D-3L）をダイオキシン類分解試験に使用した。PDB 培養液濃度 24g/L、液量 1.5L、攪拌速度 150rpm である。培養液のオートクレーブ後、予めフラスコ培養した菌培養液 200mL を添加して 1～2 日攪拌し、さらに分解対象となる汚染土壌抽出液や染料溶液を添加した。試料溶液の培養液中への均一な分散のため、溶媒は全てアセトン系に転溶した。また、培養液を好氣的条件とするため、液面に均一な発泡が生ずる程度の通気量を確保した。

2. 3 試料のダイオキシン類分析

液相分解試料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 1g（リアクター分解は 1.5g）添加して攪拌し、1 時間静置した後、吸引ろ過して一晩風乾した。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処理後、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、20～40 μ L まで最終濃縮した。GC/HRMS 測定では SP-2331、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。

3. 結果と考察

3. 1 県内産キノコによる分解

3. 1. 1 液体試料（DXNs標準物質）／液相分解

ふくひら 2 号を用いて、フラスコ内で DXNs 標準物質の液相分解試験を行った。詳細は既報²⁷⁻³⁰⁾のとおりである。

2,3,4,6,7,8-HxCDF 10,000pg について、低減化率の経時変化は、1 日間（n=2）で 36%、3 日間で 55%、7 日間で 81%、28 日間で 87%であった（図 1）。

また、同様の分解条件で、OCDD/OCDF 10,000pg を検証した結果、28 日間で 93%の分解効果が認められた。

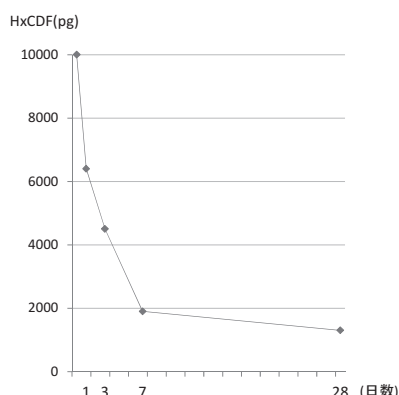


図 1 2,3,4,6,7,8-HxCDF 液相分解（経時変化）

3. 1. 2 固形試料（汚染土壌）／液相分解

回転型バイオリアクターの実用化に向けた検討として、フラスコ内で土壌試料の液相分解試験を行った。詳細は既

報²⁷⁻³⁰⁾のとおりである。

ふくひら 2 号で、底質試料 3g、高濃度汚染土壌 2g について 28 日間の液相分解を行ったが、いずれ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、土壌試料に簡易洗浄を行い、その後同様の液相分解を行った。

水・エタノールを用いた常温条件の 1 回のすすぎ操作で、底質 3g を簡易洗浄し、28 日間液相分解を行った。その結果、水洗試料の低減化率は 3 割未満で目立った効果が認められなかったが、水洗浄 - エタノール洗浄系とエタノール洗浄系の 2 試料では、各異性体について 35%、45%の低減化が認められた。酵素の阻害成分が除去された可能性や、アルコール洗浄によって易溶性の夾雑物・有機物成分が減少したことで、分解対象となる有機物の全体量が減少し、相対的にダイオキシン類との反応効率が改善された可能性が考えられる。

なお、土壌の簡易洗浄分解試験とは別に、常温常圧条件下における汚染土壌中ダイオキシン類の簡易抽出法として、アセトン、トルエンによる超音波抽出を行った。しかし、3 サイクルの超音波抽出 - 遠心分離回収後も、いずれの系でも 6 割以上のダイオキシン類が土壌中に残留しており、常温条件下における全量回収は困難であることが確認された。

3. 1. 3 固形試料／固相分解

（DXNs標準物質 - 木材チップ、模擬汚染土壌）

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、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い。分解後は木材チップが白く干乾びて、針状に痩せ細った状態であった。木材チップ自体が多量の有機物であるため、ダイオキシン類に対するラジカル分解効果が相対的に減少した可能性や、土壌粒子表面のダイオキシン類に対して菌体や酵素の接触が不十分であった可能性が考えられる。

3. 2 福井大学所有の変異株による分解

分解試験においては、品種改良操作で得られた多数の候補から、その都度性能の良さそうな 4～5 品種を選定して分解試験に使用した。

また、酵素製剤の実用化を目標に、無菌大量培養液から粗酵素精製液を作製し、模擬汚染土壌への散布・攪拌処理による分解試験を検証した。

3. 2. 1 液体試料（DXNs標準物質）／液相分解

4 種類の変異株で DXN 標準試料(OCDD,OCDF)の液相分解を行った結果、OCDD で 51～82%、OCDF で 40～83%の低減化が確認できた。詳細は既報²⁷⁻³⁰⁾のとおりである。

3. 2. 2 固形試料（汚染土壌）／液相分解

回転型バイオリアクターの実用化に向けた検討として、土壌試料の直接処理（液相分解）試験を実施した。

変異株 6 種を用いて、底質試料 4g、水田農業系汚染土壌 2g をフラスコ内で、28 日間の液相分解を行った。いず

れのケースも低減化率は3割未満であり、良好な結果は得られなかった。菌体の生育状況に特段異常は認められず、土壌中の金属類・フミン酸等による酵素阻害影響の可能性も考えられた。

3. 2. 3 液体試料（汚染土壌抽出液）／液相分解

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 に水田農薬系汚染土壌抽出液 1mL を添加して液相分解を行った。28 日間の分解の結果、変異株 4 種で 35～66% の低減化が確認できた。

また、高濃度汚染土壌抽出液（320pg・TEQ/mL）について分解試験を行った結果、変異株 4 種で 41～69% の低減化が確認できた（図 2）。実際の汚染土壌にはダイオキシン類以外の夾雑物（PAHs など）も多く含まれており、実用化に近い条件でも分解が進行することが確認できた。

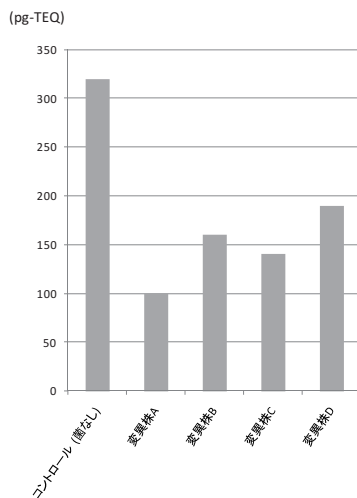


図 2 高濃度汚染土壌抽出液／液相分解
(福井大学 変異株)

3. 2. 4 固形試料（汚染土壌）／試作型粗酵素液

汚染土壌への酵素散布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。

高濃度ばいじんを含む模擬汚染土壌試料を対象に、プレハブ倉庫の一角で H₂O₂ 添加・攪拌処理を行った。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 H₂O₂ 添加・攪拌頻度を管理しながら再試験を行ったが、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用の硫酸バンドや金属成分が多く含まれているため、これらの成分が酵素反応を妨害している可能性がある。

3. 3 分解メカニズムに関する検討

3. 3. 1 分解効率の改善に関する検討

分解効率の向上を目的に、ふくひら 2 号で 3 種類の Lac メディエータ（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。

Lac メディエータ添加試験（1mM）の結果、低減化率はメディエータ無添加系が 89～93%（n=3）と最も良好であり、メディエータ添加系はいずれも無添加系より 1～3 割程度劣る結果となった（図 3）。

なお、ふくひら 1 号と 2 号の比較では、低減化率はふくひら 2 号のほうが 1～2 割程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）と一致する傾向であった。また、ふくひら 1 号・2 号の両者で、前述の試験同様、ABTS 添加系の方が非添加系より 3 割前後劣る結果となった（図 4）。

また、培地成分について、PDB に窒素成分（ポリペプトン）を添加した系では、菌体は PDB 培地と同程度成長するものの、分解効果は全く認められなかった。服部らの *P.chrysosporium* を用いた培養試験では、菌の生育とともに菌から天然型のメディエータ成分（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 やメディエータが全く生産されないことが確認されており³¹⁾、ふくひら 2 号も同様の傾向ではないかと考えられる。生育中の菌体からもメディエータ³²⁾が分泌されることから、今回のメディエータ添加試験は過剰供給であったものと考えられる。

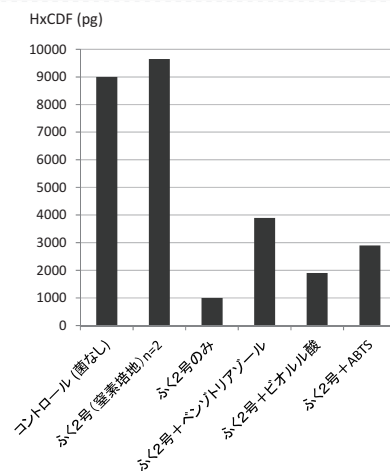


図 3 Lac メディエータ添加分解試験（ふくひら 2 号）

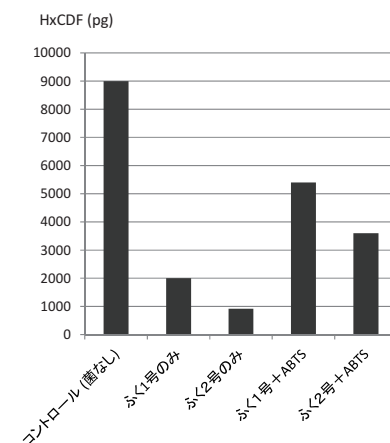


図 4 ABTS 添加分解試験（ふくひら 1 号、2 号）

3. 3. 2 菌体内代謝酵素に関する検討

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^{33,34)}。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 5）。また、インヒビタ濃度が高い系ほど、菌体の成長が鈍く、液面の発泡もほぼ消失している状態であった。ダイオキシン類が菌体吸着している場合は、シトクローム P-450 も分解に寄与する可能性が考えられる^{2,9,10,13)}。

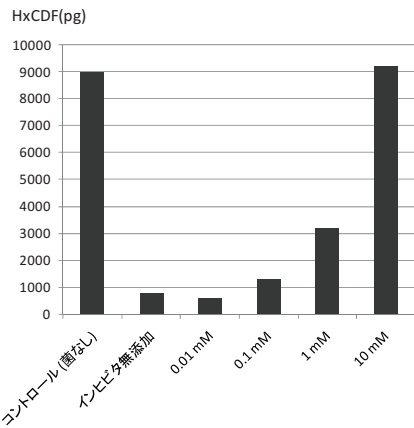


図 5 シトクローム P-450 インヒビタ添加試験

3. 4 基礎試験総括

3. 4. 1 各種試験系と培地条件に関する検討

液体試料／液相分解の系で良好な分解効果が認められたが、他の系では目立った分解効果は得られなかった（図 6、7）。また、ふくひら 2 号の培地条件は、低窒素培地を用いることが必須条件で、ポリペプトン等の窒素成分を含む培地では分解が進行しないことが確認された。白色腐朽菌の菌体外酵素としては、過酸化水素存在下で基質を一電子酸化する LiP と MnP、同様に分子状酸素を電子受容体とする Lac が知られている。分解機構は、酵素の酸化還元反応を起点に有機物ラジカルを生成して難分解性有機物の開裂反応を行うものであり、分解対象物の基質特異性はないと考えられる。なお、MnP の反応機構は図 8 のとおりである。

また、ダイオキシン類の分解は、シトクローム酵素阻害剤によっても妨害される傾向が確認された。菌体表面へのダイオキシン類の吸着・取り込みを経ることで、菌体内酵素も分解に寄与している可能性が考えられる。

	白色腐朽菌	
	固相分解	液相分解
土壌粒子 (固体)	× (木材チップ)	△ (培養液)
	× (直接培養)	× (酵素液)
DXN標準物質 (液体)	△ (木材チップ)	○
汚染土壌抽出液 (液体)	—	○

図 6 各種試験系 結果概要

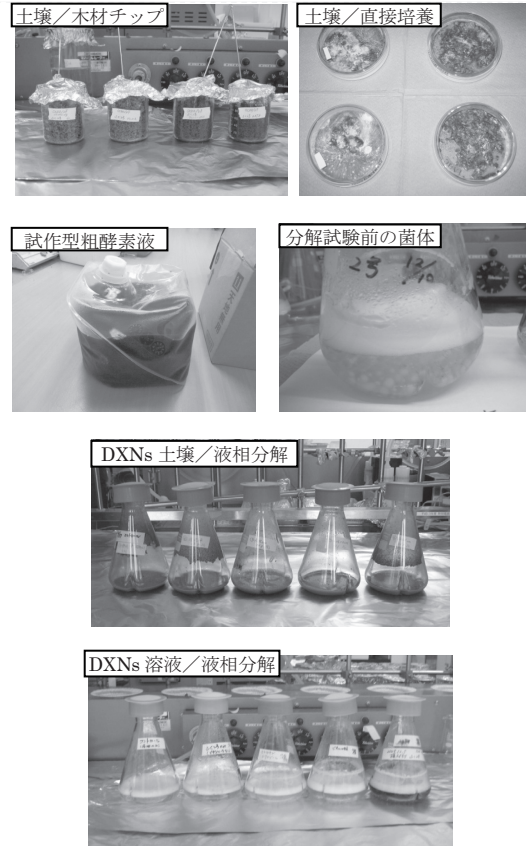


図 7 各種分解試験の様子

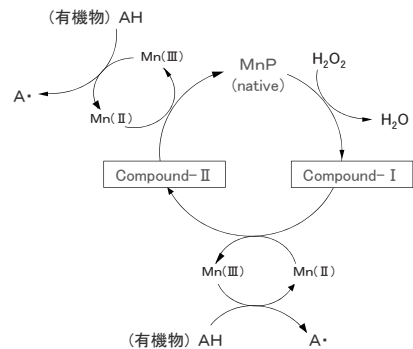


図 8 MnP の触媒サイクル

3. 4. 2 ラジカル分解処理の検討（超音波分解試験）

本研究の分解プロセスは白色腐朽菌によるフリーラジカル生成を利用したものだが、高周波の超音波照射によってもラジカル生成が誘起されることが報告されている³⁵⁾。機械的に多量のフリーラジカルを生成出来れば同様の分解をより短時間で行うことが可能と考えられる。また、汚染試料の下処理に活用できれば、粗処理によって有機物を減少させ、リアクターの分解処理時間をその分短縮することが可能となる。超音波照射によるラジカル生成－有機物分解の文献報告を参考に、福井大学の超音波照射装置を使用して光触媒／超音波照射試験を行った。（ラジカル生成による分解効果と、キャビテーション生成・圧壊による分解効果が期待できる。）

一般的に排気ガス処理などで用いられる光酸化触媒は粒子径の小さなアナターゼ型 TiO_2 だが、水の酸化反応は4電子反応であるため、結晶性が高いルチル型 TiO_2 のほうが、正孔が表面拡散しやすく、触媒活性が高いことが報告³⁶⁾されている。

ビーカ内に汚染土壌試料 2g、ルチル型 TiO_2 0.1g、もしくは FeCl_3 (フェントン反応試薬) 0.1g を混合し、照射槽内で 429kHz の高周波超音波を 2~6h 照射した。ダイオキシン類分析の結果、触媒無添加系も含め、いずれも分解効果は認められなかった。

分解効果が得られなかった原因は不明だが、森田らの 200kHz 超音波照射試験においても、溶存ダイオキシン類に対しては分解が緩やかに進行するが、焼却飛灰中のダイオキシン類に対しては分解が進行しないことが報告されている³⁷⁾。可能性の一つとしては、文献のように水溶液系への直接照射ではないため、ビーカや土壌粒子などの重量物によって超音波波長が減衰した可能性が考えられる。しかしながら実用化の際には多量の汚染土壌を処理するため、少量の重量物で影響を受けるようであれば、実用化への適用は困難といえる。

3.5 バイオリアクターの設計検討

3.5.1 リアクター設計

これまでの基礎試験の傾向を踏まえ、固形試料・液体試料の両方を液相分解可能なシステムとして、メーカに基本設計を依頼した。設計条件としては、①培養条件：回転中に培養液の無菌曝気が可能であること、②攪拌条件：多量の固形試料攪拌のため、ミキサー車のような横置きドラム回転型であること、の2点である。

メーカ設計案は角度を任意に調整できる可倒式のドラム回転型で、回転軸の中心部に空気管を通す設計であったが、実用化に際しては以下の課題が考えられた。

1つは漏えいの問題であり、設計案では培養液と接する回転軸シール部に消耗部品のメカニカルシールが採用されている点である。土壌など細かな粒子の多い試料などは軸封止部の摺動面に傷が付きやすく、高濃度汚染液の漏えいに至る可能性が高い。

もう1つはコスト面の課題である。消耗部品のメカニカルシール自体も安価ではないことと、横置きドラム回転型の場合、同サイズの縦型容器/スクルー攪拌型(液体試料のみ処理可能)の簡易な構造に比べ、製造コストが3倍以上となり、イニシャルコスト・ランニングコストの面でかなり割高となる。

これまでの基礎試験で良好な結果が得られた系は液体試料のみであることから、固形試料の処理は対象外とし、市販の卓上型微生物培養装置を購入して汚染溶液/液相分解の実証化試験に使用することとした。

3.5.2 リアクター培養条件の検討

卓上型培養装置を使用して培養分解試験を行った。

分解前の予備培養の際、当初は、シャーレ培養した菌体を数 mm 角で 20~30 枚投入して多数の菌粒子が成長するまで攪拌培養したが、事前培養に 20 日間近く要しており培養液が古くなってしまうこと、攪拌培養中に一部の菌体が塊状になり、生育ムラが生じやすいことなどの問題点があった。

このため、培養条件の見直しを行い、事前にフラスコ培養した菌培養液 200mL を投入することとした。その結果、分解に最適な成長段階の菌体を大量培養することが可能となり、培養液も調整後 1~2 日の新しい状態で分解試験

を開始することができた。同様の手順で更なる大量培養も十分可能であると考えられる。

3.6 リアクター染料分解試験

多量の有機物に対する分解処理能力の確認や有機物の吸着挙動の評価を目的として、染料分解試験を行った³⁸⁾。

染料など多環芳香族類の多くは親水性が低いため、加工用途に合わせて分散剤が添加してあるものもあるが、水溶液系では沈殿物が生ずる製品も多い。培養液系での分解試験のため個々の製品について水溶性の高い染料を確認し、アゾ系染料 1 種類(赤色系)、アントラキノン系染料 1 種類(青色系)を選定した。

また、櫻井らの酵素分泌条件に関する研究報告^{39,40)}では、白色腐朽菌はグルコースなど栄養源の添加後 5 日間程度で分解酵素量が最大となり、同時に栄養源もほぼ消費され、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。このため、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分解効果を望めないと思われる。当該培養装置では自然蒸発に伴う液面低下も起こるため、定期的に水分・栄養分の追加補給を行うこととした。

3.6.1 アゾ系染料の分解

培養液中(ふくひら2号)の染料濃度が約 70ppm となるよう、アゾ系染料(赤色系)を添加し、14 日目、21 日目に培養液を 100mL 追加添加した。

菌培養液に染料を添加した直後は透視度が 1cm 程度と、培養液中の菌体が殆ど視認できない状態であったが、20 日間程度の培養により、培養液は僅かに赤みが残った透明な液へ変化した。回転軸に付着して団子状に成長した菌体には多少の着色が認められるが、培養液中の粒子状の菌体や外壁に付着成長した菌体など、総じて無色に近い状態であった(図9)。

28 日間の分解後、70ppm 染料培養液と分解後培養液の吸光度を比較した結果、染料に起因する吸収波長ピーク強度(493nm)は 8.3%に減少しており、染料の約 9 割が培養液中から分解・除去されたと考えられる(図10)。

今回用いた染料は水溶性の高い製品であるが、菌体の一部は培養液と比べて若干赤みが強いことから、培養液中では染料など多環芳香族類の菌体への吸着や取り込みが起こっている可能性が高い。汚染土壌抽出液に含まれるダイオキシン類は疎水性が極めて高い化学物質であり、菌体への吸着・取り込みは染料以上に起こりやすい状況であると考えられる。

分解後の染料のダイオキシン類濃度を測定した結果、Total-TEQ の減少は 2 割程度だが、当該試料にはほとんど含まれない異性体が高濃度で検出され、過去の HxCDF 分解試験、高濃度汚染土壌抽出液分解試験の異性体パターンの特徴と一致する結果となった。Total-TEQ に関しては約半量が明らかなコンタミ影響だが、コンタミ影響をあまり受けていない異性体 3 種はいずれも 7 割以上減少しており、染料同様に良好な分解効果が示唆された。

3.6.2 アントラキノン系染料の分解

前述の分解試験と同様、培養液中(ふくひら2号)の染料濃度が約 100ppm となるよう、アントラキノン系染料(青色系)を添加し、14 日目、21 日目に培養液を 100mL 追加添加した。

染料投入直後は透視度が 1cm 程度と、培養液中の菌体が殆ど視認できない状態であったが、20 日間程度の培養によって、培養液は透明な茶褐色気味の液へと変化した(図11)。

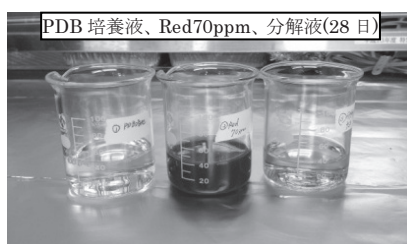
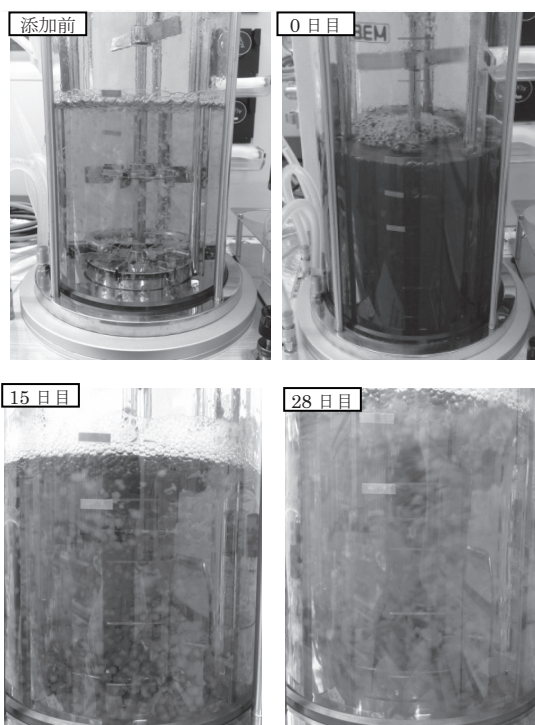


図9 アゾ系染料分解試験 (Red 70ppm)

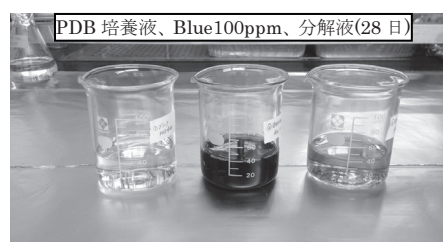
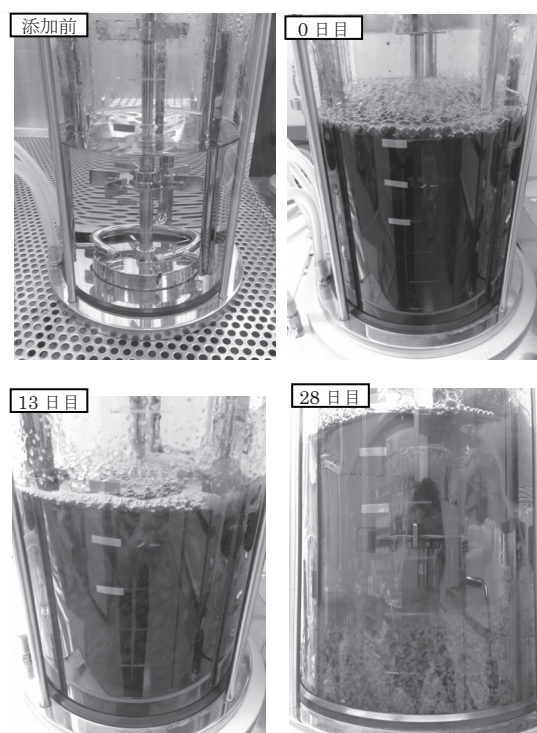


図11 アントラキノン系染料分解試験
(Blue 100ppm)

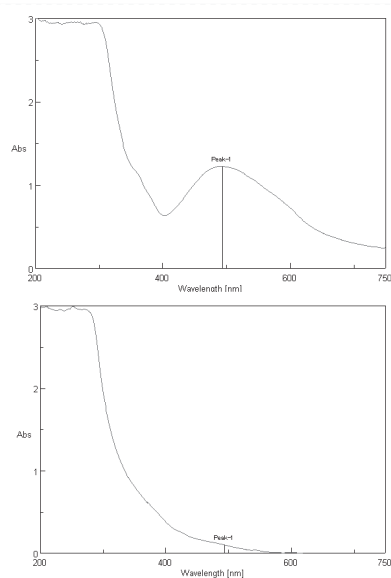


図10 アゾ系染料分解試験の吸収スペクトル
(上: Red 70ppm 培養液、下: 28日分解後)

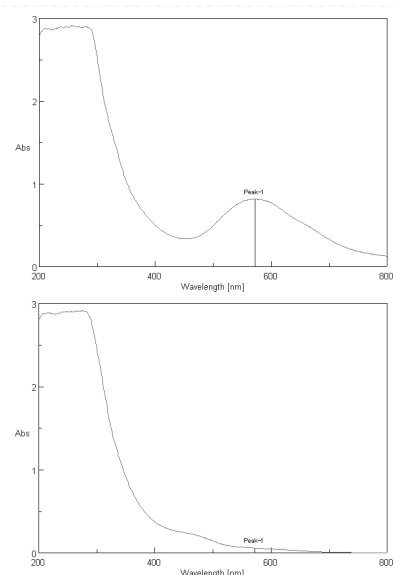


図12 アントラキノン系染料分解試験の
吸収スペクトル
(上: Blue 100ppm 培養液、下: 28日分解後)

28 日間の分解後、100ppm 染料培養液と分解後培養液の吸光度を比較した結果、染料の吸収波長（572nm）はピーク強度が 6.6%まで減少しており、染料の約 9 割が培養液中から分解・除去されたものと考えられる（図 12）。

また、分解後は槽内全ての菌体が淡い紫色を呈しており、完全脱色の一手手前のような印象であった。アゾ系試験と比べ菌体への着色度合いが大きいように見受けられるが、この要因としては、初期濃度が 100ppm と高いことや、青色が菌培養液の対照色で目立ちやすいためと思われる。

なお、今回の染料分解試験では、界面活性剤入りの染料の添加の際、加熱殺菌処理（121℃）に伴う熱変性を避けるため、殺菌のため染料水溶液の調製時にエタノール水（30%）を用い、アセトンもやや過剰気味に使用した。

このためか、通常は 1～2 日経過後から培養液界面近傍で菌が付着成長するがその兆候が認められず、3～4 日経過後から培養液の揮発臭が消えて菌生育時の特有の臭いが感じられるようになった。したがって、今回の 28 日間の分解期間のうち、最初の数日間は生育ロスが発生していた可能性がある。

また、培養液の追加添加から数日間は白色腐朽菌特有の臭いが強くなることから、菌が活発な成長状態にあると思われる。今回の培養液濃度条件は簡易的なものであり、培養液初期濃度と追加添加の頻度や添加量を改良することで、菌の成長を促し酵素生産性をより高い状態で維持できるものと思われる。

3. 7 ダイオキシン類標準物質の分解

卓上型培養装置により、2,3,4,6,7,8-HxCDF 10,000pg の分解試験を行った。分解期間は、基礎試験の結果を基に 7 日間とした。

コントロール試料として、加熱殺菌済の菌体による 7 日間の添加回収試験を行ったが、ダイオキシン類の回収率が非常に悪く、平均 3,100pg（n=3、2,500～3,800 pg）であった。従来のフラスコ試験では系内がガラス壁と菌体・培養液だけであり、親油性のダイオキシン類は大部分が菌体に吸着しているものと考えられるが、今回の培養装置はガラスと金属の間に樹脂製のパッキンが使用されており、菌体よりパッキン側へ優先的に吸着している可能性が高い。実験後には超音波洗浄、実験開始前には槽内の有機溶媒洗浄を入念に行っており、吸着ロスの多くはこれらの過程で洗い流されているか、一部はパッキンに強固に吸着しているものと推定される。

同一の分析条件で、生育中の菌体による分解試験を行った結果、回収量は 440pg（n=1）であった。添加回収試験（コントロール系）との比較は 86%の低減化であり、フラスコ試験とほぼ同程度の結果が確認された（図 13）。

槽内や攪拌構造物のアセトン脱脂綿拭き取り操作だけでは十分な回収率が得られなかったため、通常の拭き取り回収後にアセトン 1.8L を入れ、1 時間超音波洗浄して全量を濃縮して固形物抽出液と合わせ、分析試料とした。その結果、回収率は 6 割程度まで改善されたことから、以降の分析はこの方法で行うこととした。

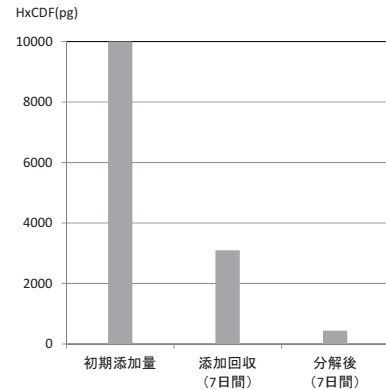


図 13 2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF リアクター分解試験

3. 8 汚染土壌抽出液の分解

卓上型培養装置により、高濃度汚染土壌抽出液の分解試験を行った。標準物質と異なり、ダイオキシン以外の夾雑物・有機ハロゲン化合物も多く含まれていると考えられることから、分解期間は 14 日間とした。

培養槽に 270pg-TEQ/mL の汚染土壌抽出液を 1mL 添加して分解試験を行った結果、添加回収試験の平均値が 154pg-TEQ（n=3）、分解試験の平均値が 58pg-TEQ（n=2）であり、低減率は 62%となった（図 14）。

汚染土壌にはダイオキシン類以外の夾雑物（PAHs など）も多く含まれており、実用化に近い条件で分解効果が確認された。

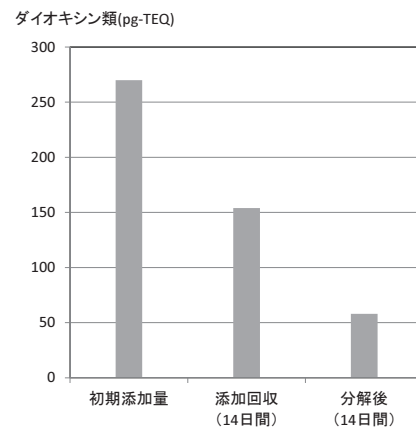


図 14 汚染土壌抽出液 リアクター分解試験

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、フラスコ内での基礎試験、パイオリアクターの設計検討、分解効率の改善、分解メカニズムの検討およびリアクター試験（卓上型培養装置分解試験）などを行った。

4. 1 基礎試験（フラスコ分解 他）

・液体試料／液相分解の系で、良好な分解効果が確認できた。ふくひら 2 号を用いた HxCDF 分解試験では、7 日

間で約 8 割、28 日間で約 9 割の分解が認められた。また、ふくひら 2 号、変異株の OCDD/OCDF 分解試験でも、28 日間で最大で約 8~9 割の低減化が確認できた。ふくひら 2 号に関しては低窒素培地が必須条件である。

- ・変異株（4 種類）を用いた汚染土壌抽出液／液相分解試験では、28 日間で約 4~7 割の低減化が確認できた。
- ・固形試料／液相分解、固形試料／固相分解に関して様々な系を試したが、固形試料を対象とした系では良好な分解効果は得られなかった。また、試作型粗酵素液をばいじん系模擬汚染土壌に攪拌する形で検証したが、この系も良好な結果は得られなかった。

4. 2 分解機構の検証

- ・分解効率の向上を目的に、ふくひら 2 号で 3 種類の Lac メディエータを用いた分解試験を実施した。メディエータ添加系は無添加系より 1~3 割程度劣る結果となった。また、ふくひら 1 号と 2 号の比較では、低減化率はふくひら 2 号の方が 1~2 割程度優位な結果が得られており、ABTS 添加時の変色度合（≒Lac 濃度）と一致する傾向であった。生育中の菌体からは天然型のメディエータが分泌されるため、今回の添加試験は過剰供給であったものと考えられる。
- ・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、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。ダイオキシン類の分解は、シトクローム酵素阻害剤によっても妨害される傾向が確認された。

4. 3 実証化試験（卓上型培養装置）

- ・事前に液相培養した菌培養液を用いることで、分解に適した成長段階の菌体を大量培養することができた。更なる大容量化も十分可能と考えられる。
- ・ふくひら 2 号の染料分解試験により、高濃度の有機物に対する分解処理能力を確認した。また、着色状況から染料（多環芳香族）の菌体への吸着・取り込みが起こっていることを確認した。ダイオキシン類は Kow が約 6~8 と疎水性が非常に高い物質であり、分解過程は染料と同様に、菌体への吸着・取り込みを経て進行しているものと考えられる。
- ・ふくひら 2 号の分解試験で、標準物質（HxCDF）について 86%、実際の汚染土壌の抽出液について 62%の低減化を確認した。フラスコ試験の分析結果と異なりコントロール試料の回収率が非常に悪いが、主な原因は、ダイオキシン類が樹脂製のパッキンへ優先的に吸着し、回収ロスが発生したものと推察される。槽内のアセトン超音波洗浄（1.8L、1h）による回収操作を追加したことで、回収率は 3~4 割から 6 割程度へと改善された。
- ・ダイオキシン類の一部がパッキンに吸着していると仮定すると、これらは分解試験終了後のアセトン超音波洗浄までパッキンに保持されている可能性が高い。言い換えれば、パッキンに吸着したダイオキシン類は分解試験において固形試料と同様の条件下にあり、分解が進行しにくいものと考えられる。したがって、今回のリアクター分解試験に関して、培養槽をパッキン不使用の構造に変更することで、ダイオキシン類が培養液中で効率的に菌体に吸着することとなり、分解効率もある程度改善されることが期待される。

4. 4 総括

- ・液体試料のダイオキシン類に対しては総じて良好な分解結果が得られたが、固形試料のダイオキシン類については、良好な分解効果は得られなかった。
- ・液体試料で良好な結果が得られた要因としては、染料の分解試験の挙動からも、菌体へ多環芳香族類の吸着・取り込みが起こっている可能性が高い。ダイオキシン類が菌体表面に吸着している場合、バルク溶液と比べて分解酵素との接触が増えるものと考えられる。また菌体吸着の場合は、菌体内代謝酵素（シトクローム P-450）も分解に寄与する可能性が考えられる。
- ・酸化還元型 3 酵素によるラジカル反応は、ダイオキシン類に対する基質特異性がある訳ではなく、有機物を無作為に分解する。固形試料のダイオキシン類について目立った分解効果が得られなかった要因は、培地成分や木材チップなど多量の有機物が存在する環境下によって、ダイオキシン類に対するラジカル分解効果が相対的に減少したためではないかと考えられる。
- ・実証化に近い条件として、ダイオキシン類以外の汚染物質も含む実際の汚染土壌抽出液に対して、変異菌のフラスコ試験で 4~7 割、ふくひら 2 号のリアクター試験で 6 割程度の分解効率を確認した。
- ・白色腐朽菌が難分解性物質以外にも高濃度の有機物に対して分解処理能力を有することが確認できた。リアクターの材質や対象物質の試料形態を考慮することによって、有効な分解処理技術としての応用は十分可能であると考えられる。

謝辞

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）」として実施しました。

本研究を実施するにあたり、技術指導等に御協力いただいた福井大学工学部櫻井明彦教授、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) 宍戸和夫 編：キノコとカビの基礎化学とバイオ技術、229-253（2002）
- 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) K.Balli et al : Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, Journal. Bacteriology , vol 174, No.7, 2131-2137（1992）
- 5) R.Michael et al : Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1 , Appl Envi Microbiology, Vol.58, No.3, 1005-1010（1992）
- 6) L.Monna et al : Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63 , Appl Envi Microbiology, Vol.59, No.1, 285-289（1993）

- 7) In-Hyun Nam et al : Biotransformation of 1,2,3-tri- and 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas whittichii* strain RW1, Appl Environ Microbiol, Vol.72, No.1, 112-116 (2006)
- 8) S.Takada et al. : Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, Appl Microbiol Biotechnol, 62, No.12 4323-4328 (1996)
- 9) T.Mori et al. : Oxidation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by the white-rot fungus *Phlebia lindtneri*, Appl Microbiol Biotechnol, 60, 200-205 (2002)
- 10) I.Kamei et al. : Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-p-dioxin, Appl Microbiol Biotechnol, 69, 358-366 (2005)
- 11) H.Suhara et al. : Monitoring of white-rot fungus during bioremediation of polychlorinated dioxin-contaminated fly ash, Appl Microbiol Biotechnol, 62, 601-607 (2003)
- 12) C.Adinarayana.Reddy et al : The potential for white rot fungi in the treatment of pollutant, Current Opinion in Biotechnology 6, 320-328 (1995)
- 13) A.Hiraishi : Biodiversity of dioxin-degrading microorganisms and potential utilization in bioremediation, Microbes Environ, vol.18, No.3,105-125 (2003)
- 14) S.Tachibana et al : Bioremediation of dioxin contaminated soil by fungi screened from nature, Pakistan Journal Biol Sci, 10(3) ,486-491 (2007)
- 15) 橋燦郎 : 木材腐朽菌を用いたバイオレメディエーションによるダイオキシン及び環境ホルモン汚染土壌の浄化, 地球環境, vol.15 No.1, 63-68 (2010)
- 16) 山本忠他 : 針葉樹パーク分解微生物の検索, 岩手県工業技術センター研究報告, 第11号, 61-65 (2004)
- 17) 高田智他 : 担子菌類によるダイオキシン類汚染された環境の修復に関する研究, 第2回福岡県環境研究所研究終了報告会講演要旨集, 217-221 (2002)
- 18) 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, 福井県衛生環境研究センター年報, 4, 66-71 (2005)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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) —太陽光照射による PCDFs の生成反応—, 第17回環境化学討論会講演要旨集, 410-411 (2008)
- 22) 二瓶裕之他 : コンポスト化処理技術を用いたダイオキシン類汚染土壌浄化システムの開発, 三井造船技報, No185, 23-29 (2005-6)
- 23) 四本瑞世他 : 有用分解菌によるダイオキシン汚染土のバイオレメディエーション (その1), 大林組技術研究所報, No62, 105-108 (2001)
- 24) 齊藤祐二他 : ダイオキシン類及び PCB 汚染土の浄化システムの開発—リグニン分解酵素による酵素分解反応—, 大成建設技術センター報, 第39号, 21-1-8 (2006)
- 25) 中谷龍男他 : 微生物製剤を用いたダイオキシンの生物処理システムの技術開発, 公益財団法人国際環境技術移転センターHP, 京都議定書達成産業技術開発促進事業, 平成15年度概要 (2010.4 掲載)
- 26) 埼玉県環境防災部ダイオキシン対策室 : 埼玉県におけるダイオキシン類低減化・無害化等研究推進事業報告書, 廃菌床を用いたダイオキシン類低減化実証化試験結果, 43-72 (2003)
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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 (2010)
- 30) 三木崇他 : 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 (第1報), 福井県衛生環境研究センター年報, 10, 53-56 (2011)
- 31) 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)
- 32) 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17~18年度 科学研究費補助金 (基盤研究(C)) 研究成果報告書
- 33) 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)
- 34) I.Kamei et al. : Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus *Phlebia brevispora*, Appl Microbiol Biotechnol, 73, 932-940 (2006)
- 35) 崎山和亨他 : 二酸化チタン/超音波触媒法による過酸化水素生成機構の解析, 金沢大学自然計測応用研究センター年報 135-140 (2007)
- 36) 西島一元 : 高感度可視光応答型二酸化チタンの開発に関する研究, 九州工業大学学術機関リポジトリ (2008)
- 37) 森田昌敏他 : 環境ホルモンの分解処理技術に関する研究 (内分泌攪乱化学物質総合対策研究) 平成11~14年度, 国立環境研究所特別研究報告, 1-12 (2003)
- 38) H.-R.Karimniaee-Hamedani et al. : Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus, Dyes and Pigments 72, 157-162 (2007)
- 39) A.Sakurai et al. : Peroxidase production by *Coprinus cinereus* using rotating disk contactor, Biochem. Eng.J, 10, 47-53 (2002)
- 40) S.Fujihara et al. : Optimization of medium components for manganese peroxidase production by white rot fungus strain L-25, Journal. Biochem. Eng.J, vol 41, No.8, 796-803 (2008)