

白色腐朽菌によるダイオキシン類浄化処理工法の検討

キノコを使った環境浄化

田窪 祐子・森橋 大輔・山本 達生^{*1}・小口 深志

Examination of a Dioxin Purification Processing Method of Construction by White Rot Fungus

Yuko TAKUBO, Daisuke MORIHASHI, Tatsuo YAMAMOTO, Fukashi OGUCHI

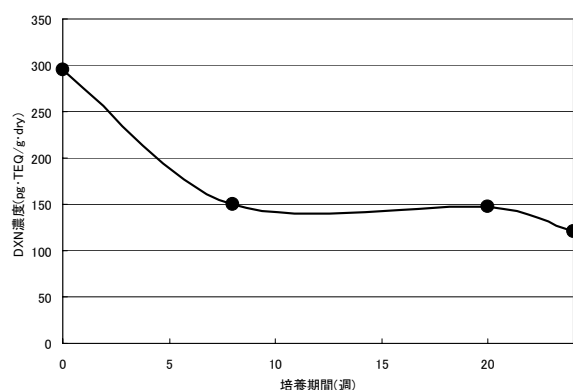


図 1 ダイオキシン類分解状況



図 2 菌糸蔓延状況

研究の目的

ダイオキシン類は難分解性であり、土壌や河川・湖沼・海域に堆積するため、環境に大きな影響を与えており問題となっている。現在ダイオキシン類を浄化技術は高熱に溶解等であり、浄化時の体量エネルギー消費、土壌移動等の問題がある。

そこで、木材腐朽菌の1種である白色腐朽菌を用いてダイオキシン類を分解することを考えた。白色腐朽菌は様々な環境汚染物質を分解する能力を持つが、生息条件が厳しく、土壌中ではすぐに死滅してしまう。そのため、剪定枝に白色腐朽菌を担持した環境浄化資材を用いた浄化工法について検討を行うことを目的とした。

技術の説明

白色腐朽菌は木材腐朽菌の1種であり、木材成分中のダイオキシン類と似た構造を持つそのリグニンを分解する際に産生する酵素（リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ等）によりダイオキシン類を分解すると考えられている。本技術は木材表面に生息する白色腐朽菌を使用して土壌中のダイオキシン類を分解するものである。土壌中では繁殖することの出来ないが、木質系資材に担持することで繁殖を可能とし、また土壌と混合するだけの簡単な施工法で原位置でのダイオキシン類の浄化を可能としたものである。

主な結論

環境浄化資材作成方法の検討により、安価な種菌法による製造が可能であることが判明した。また、野外浄化試験を実施したことにより以下のことが判明した。

- ① 浄化処理期間は8週間程度である。
- ② 最もダイオキシン類の分に有効な白色腐朽菌は *phanerochaete sordida* であった。
- ③ 処理土壌厚は10cm以内であり、土壌中空気量確保が必要である。
- ④ 白色腐朽菌は処理後8週間ですべて死滅するため、周辺環境への影響はない。

白色腐朽菌を剪定枝に担持した環境浄化資材を使用することで、土壌と混合するだけの簡単な施工により土壌中ダイオキシン類を分解することが確認できた。今後は、高濃度汚染土壌への適用、環境浄化資材の更なるコストダウン等を行う予定である。

※1 先端建設技術センター

白色腐朽菌によるダイオキシン類汚染土壌の浄化処理工法の検討

田 窪 祐 子 森 橋 大 輔
山 本 達 生^{*1} 小 口 深 志

要 旨

ダイオキシン類は、ほとんど分解しないため土壌や河川・湖沼・海域に堆積するため、環境問題となっている。現在、堆積したダイオキシン類を浄化するには、高熱による溶解等の技術が使われているが、浄化時の大量エネルギー消費、ダイオキシン類を含んだ土壌の移動等の問題がある。

木材腐朽菌の一種である白色腐朽菌はさまざまな環境汚染物質を分解する能力を持っている。木材表面を生息環境するため、粉碎した剪定枝と白色腐朽菌を組み合わせた環境浄化資材を開発した。この資材を使用して土壌と混合するだけの簡単な施工でダイオキシン類の野外浄化試験を。その結果、以下のことが判明した。

- ① 浄化処理期間は8週間程度。
- ② 最もダイオキシン類を分解することができるのは*phanerochaete sordida*であった。
- ③ 処理土壌厚は10cm以内であり、土壌中空気量確保が必要。
- ④ 白色腐朽菌は処理後8週間でほとんど死滅するため、土着の微生物群、植生等への影響はない。

キーワード ダイオキシン類／白色腐朽菌／剪定枝／土壌

目 次

- | | |
|------------|-----------|
| 1. はじめに | 4. 野外浄化試験 |
| 2. 白色腐朽菌とは | 5. まとめ |
| 3. 環境浄化資材 | 6. おわりに |

EXAMINATION OF A DIOXIN PURIFICATION PROCESSING METHOD OF CONSTRUCTION BY WHITE ROT FUNGUS

Yuko TAKUBO
Tatsuo YAMAMOTO

Daisuke MORIHASHI
Fukashi OGUCHI

Synopsis:

Dioxin hardly disintegrates and accumulates in the soil, a river, wetlands, and a sea area. Purification technology of dioxin is the dissolution by high heat, but there are problems to use energy in large quantities. The white rot fungus have ability to resolve various environmental pollution materials into. We examined a method of construction to mix the environmental purification material which put a pruning branch and a white rot fungus together with the soil. As a result, we understood the following things.

- ① A purification period is around 8 weeks.
- ② It was *phanerochaete sordida* that dismantled dioxin most.
- ③ The processing soil is less than 10cm, and air is necessary.
- ④ There is not influence in microbe in the soil and plants.

* 1 先端建設技術センター

1. はじめに

次世代の負の遺産といわれているダイオキシン類は、ほとんど分解しないためいったん自然界に出てしまうと土壌や河川・湖沼・海域に堆積する。そのため、環境に大きな影響を与えており問題となっている。現在、堆積したダイオキシン類を浄化するには高温高熱による熔融等の技術が使われている。しかし、これらの既存の技術には浄化時の大量エネルギー消費、ダイオキシン類を含んだ土壌移動等問題がある。

高温高熱による浄化と異なり、エネルギー消費が少なく環境にやさしい浄化工法としてバイオレメディエーションが挙げられる。たくさんの微生物のなか、様々な環境汚染物質を分解する能力を持っているとして注目されているものとして、白色腐朽菌がある。¹⁾しかし、生息環境が木材表面であること、紫外線に弱いこと、土壌中では繁殖できないことなどさまざまな問題があり土壌汚染浄化工法として実用化するのが難しいものであった。

そこで、白色腐朽菌を本来の生存場所である木材に担持させることでその問題を解決することができると考えた。本研究では白色腐朽菌を担持させた木材資材の製造方法について検討を行った。また、実際に野外サイトにてダイオキシン類分解浄化試験を行った結果についても述べる。

2. 白色腐朽菌とは

木材を腐朽できる菌は、木材腐朽菌と総称され褐色腐朽菌と白色腐朽菌の2種類が存在する。褐色腐朽菌がダイオキシン類と似た構造を持つリグニンをほとんど分解しないのに対し、白色腐朽菌はリグニンを分解することができる菌である。それぞれの菌の木材成分分解割合を図-1に示す。²⁾

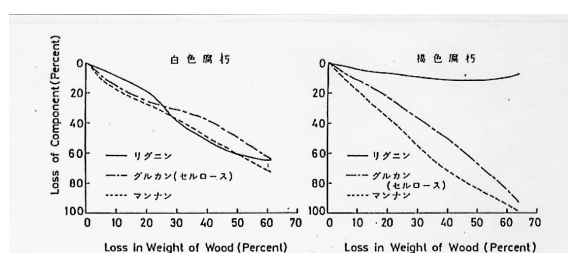


図-1 木材成分分解率²⁾

白色腐朽菌の中でもリグニンを優先的に分解する菌があり、ダイオキシン類分解能力が高いのはこのタイプの菌である。

白色腐朽菌がダイオキシン類を分解する機構はまだ解明されていないが、ダイオキシン類と似た構造を持つリグニンを分解するときに産生される酵素、リグニンペルオキシダーゼ(Lip)、マンガンペルオキシダーゼ(Mnp)及びラッカーゼ(Lac)の働きによるものと考えられている。¹⁾白

色腐朽菌は好気性菌であり、生育温度としては28℃～30℃を好むものである。分解できる環境汚染物質としては、ダイオキシン類のほかビスフェノール A などの環境ホルモンなどが上げられる。

3. 環境浄化資材

白色腐朽菌を担持させた木材資材を環境浄化資材と称す。本章では環境浄化資材を製造するに当たり、最も安価な製造方法と考えられる「種菌法」で可能かどうかの検討を行った。まず、環境浄化資材となる剪定枝へ植え継ぐ種菌製造に関する検討を行った。その後、環境浄化資材となる剪定枝に添加する種菌の最適値について検討を行った。

種菌及び環境浄化資材の評価は白色腐朽菌の産生するMnp酵素活性³⁾により判定することとした。

3.1 種菌製造材選定のための培養試験

(1) 試験概要

最適な種菌製造材を選定するために表-1に示す6ケースについて白色腐朽菌の培養試験を行った。使用した製造材は剪定枝、木粉、ケナフ粉末の3種類である。培地はそれぞれの資材を含水率70%程度に水、PDで水分調整を行い、オートクレープ処理したものとした。PDはポテトデキストロース培地であり、高い栄養分を含んでいるものである。培地が栄養分を含有していた方がよいのか、製造材だけの方が良いのか使用した白色腐朽菌は *phanerochaete sordida* である。培養は4週間行い、1週間ごとにMnp活性を測定した。

表-1 試験ケース一覧

	製造材種類	培地	菌種
case1	剪定枝	水	<i>phanerochaete sordida</i> (YK-624)
case2	木粉		
case3	ケナフ粉末		
case4	剪定枝	PD※	
case5	木粉		
case6	ケナフ粉末		

※Potate Dextrose 培地

(2) 結果及び考察

菌の培養状況を写真-1,2に示す。いずれの資材、培地においても菌糸は1週間目から確認された。培地の違いによる菌糸の繁殖状況に差は見られなかった。

次にMnp活性を図-2に示す。水培地、PD培地共に2週目に最も活性が高くなる傾向が見られた。木粉PD培地(Case5)が木粉水培地(Case2)より高い活性を示した以外は、全て水培地の方が活性が高かった。この結果よりPD培地を添加する必要は無いと考えられる。ケナフ粉末に関しては、菌糸の繁殖状況では他の資材と差は見られな

いが、Mnp 活性は全体的に低い値となった。これは、ケナフ粉体が他の資材と比較して簡単に栄養分となる成分が多いため、リグニン分解酵素を産生していない状態になっているものと推測される。

最も高い Mnp 活性を示したのは木粉水培地 (Case2) であった。しかし、3 週目で一気に活性が落ちてしまうことから、培養期間の厳密な管理が必要と考えられる。それに対し剪定枝水培地 (Case1) は 2 週目の活性は木粉水培地 (Case2) に劣ったものの、徐々に小さくなる傾向を示した。実際の施工性、コスト面を考慮すると剪定枝水培地が最適であると考えられる。

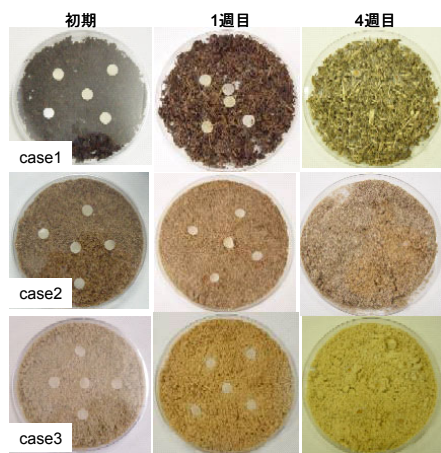


写真-1 水培地培養状況



写真-2 PD 培地培養状況

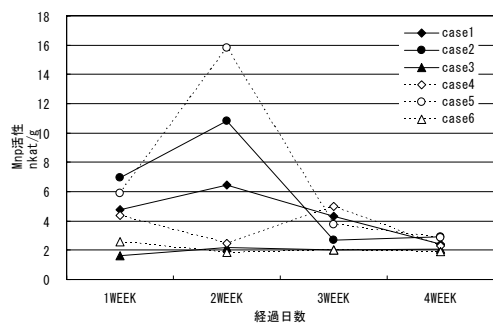


図-2 *phanerochaete sordida* Mnp 活性

3.2 種菌摂取量検討

(1) 試験概要

実際に環境浄化資材を作成するには、3.1 で検討した種菌を剪定枝に接種する。この摂取量によって資材に添加する菌量が変わるため、その品質が大きく変化する。そこで、接種量の検討を行った。表-2 に試験ケースを示す。培養後の環境浄化資材の評価は Mnp 活性にて行ったが、ダイオキシン類濃度測定も行った。なお、ダイオキシン類分析は公定法で行った。使用した菌株は種菌製造材の選定試験と同様 *phanerochaete sordida* を使用し、培養期間は3週間とした。

表-2 試験ケース

	接種量 (%)	菌種
case1	0.5	<i>phanerochaete sordida</i>
case2	1.0	
case3	2.0	
case4	2.5	

(2) 結果及び考察

phanerochaete sordida の Mnp 活性結果を図-3 に示す。最も活性が高かったのは case4 (2.5%) であった。しかし、case3 (2.0%) と大きな違いはなかった。

次にダイオキシン類分解試験結果を図-4 に示す。Case3 (2.0%) と case4 (2.5%) はほぼ同等の浄化効果であった。

Mnp 活性、ダイオキシン類分析試験結果とコスト面を考慮して種菌摂取量は 2% が最適であることが判明した。

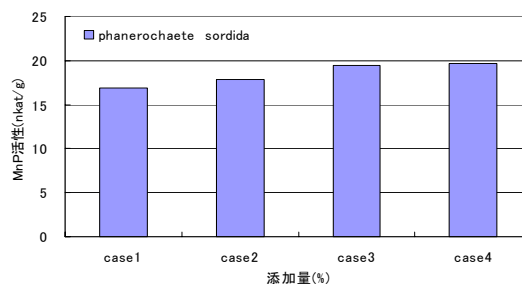


図-3 添加量による Mnp 活性比較

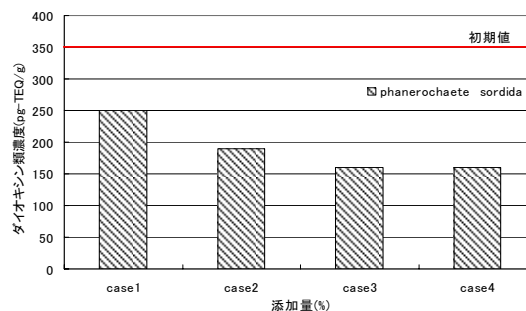


図-4 ダイオキシン類濃度

4. 野外浄化試験

前項で指摘した条件の環境浄化資材を使用して野外浄化試験を行った。場所は東京都内焼却場に隣接する雑木林である。この場所は焼却場から排出した降灰による低濃度広範囲の汚染が確認されている。試験は平成 16 年 7 月 20 日から行った。ダイオキシン類濃度のほか土壌微生物への影響、周辺植生への影響などについて調査を行った。

4.1 試験概要

野外試験浄化のフロー図を図-5 に示す。

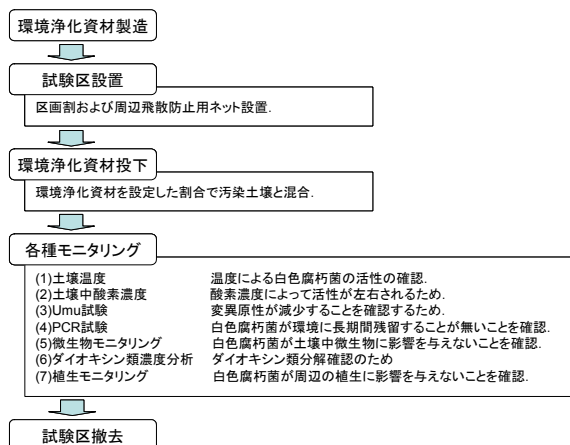


図-5 試験フロー

試験に使用した白色腐朽菌は *phanerochaete sordida* のほか、*phanerochaete sordida* より Mnp 活性が高くダイオキシン類分解の可能性がある *phanerochaete* 属（仮名:A 菌）、*polyporales* 属（仮名:B 菌）の 3 種類を使用した。試験ケースを表-3 に示す。土壌と環境資材の配合比は全て湿重量とした。土壌中微生物モニタリング等の比較のため、対照区として e 区、f 区を設け、e 区には殺菌した剪定枝のみを加え、f 区は汚染土壌のみを設置した。

各試験区は地表面から深さ 5cm 程度掘削後整地し、厚さ 12mm、幅 450mm のブルーシートで被覆した合板を立て込んで区画割を行った。また、試験区の周辺は高さ 1.8m の防風ネットで覆った。

表-3 試験ケース一覧

区画	白色腐朽菌の種類	配合比	備考
a	<i>Phanerochaete Sordida</i> (YK-624)	10:10※	
b	<i>phanerochaete</i> 属 (A 菌)		
c	<i>polyporales</i> 目 (B 菌)		
d			リン酸添加 (B 菌が酸性環境下を好むため)
e		-	対照区(剪定枝のみ)
f		-	対照区(汚染土壌のみ)
g	<i>Phanerochaete Sordida</i> (YK-624)	10:10	
h	<i>phanerochaete</i> 属 (A 菌)	10:10	

※10:5 添加1週間後に残量を追加投下

4.2 結果及び考察

(1) 土壌温度及び気温・雨量計測結果

温度条件と微生物の活動との関係を把握するため、浄化対象土壌の温度計測を行った。センサーは地表面から 3cm 下の地中に設置し連続計測を実施した。その結果を図-6 に示す。試験中は真夏日と熱帯夜が続き土壌温度も高い温度を示した。白色腐朽菌は 35℃以上で活性が著しく低下するため、悪条件となったことがわかった。11 月ごろより天候が安定し良好な条件となった。後ほど示すように土壌中に白色腐朽菌の菌糸を確認した。

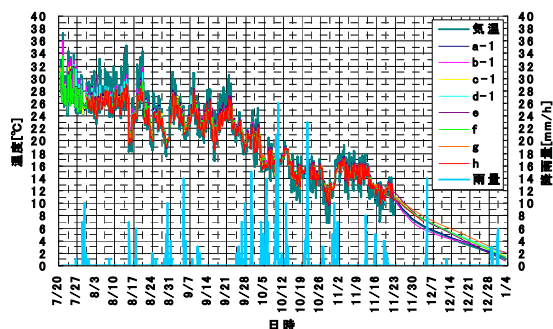


図-6 試験区の土壌温度・気温・雨量

(2) 土壌中酸素濃度結果

白色腐朽菌は好気性微生物であるため、土壌中の酸素濃度にその活性が大きく影響を受ける。計測の結果、土壌中の酸素濃度は全ての試験区画で大気中とほぼ同等の濃度を示した。しかし、土壌中の空隙率は降雨や散水等で徐々に低下したと考えられるため、土壌の単位体積当たりの酸素量は試験開始時に比べ終了時の方が低下していたと推測される。

(3) ダイオキシン類濃度分析結果

図-7～12 に各試験区のだいオキシン類分析結果を示す。これらより *phanerochaete sordida* を添加した a 区、g 区及び *phanerochaete* 属(A 菌)を添加した b 区においてダイオキシン類濃度が低下する傾向が見られた。当初の予測では環境浄化資材作成時に産生した酵素により、土壌投下時に急激にダイオキシン類の分解が進むものと考えられたが、全ての試験区において 1 週目以降も分解が進んだことから違うことが判明した。また、先に述べたように試験実施中は記録的な猛暑であり白色腐朽菌の活性が低下していたこと及び散水による土壌中空隙量の減少による酸素不足がダイオキシン類の分解が遅れた原因と思われる。8 週目にダイオキシン類が顕著に低下したのは、その間に攪拌を行い土壌中に酸素を供給した効果と考える。このことから、好気的環境維持が白色腐朽菌の活発な活動にはかせないものであるとわかった。8 週目の g 区土壌中に菌糸が蔓延している状況を写真-3 に示す。

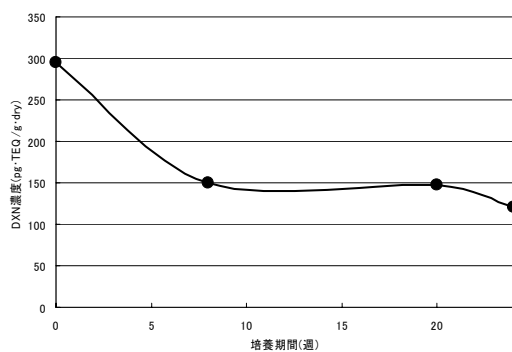


図-7 a区ダイオキシン類濃度分析結果

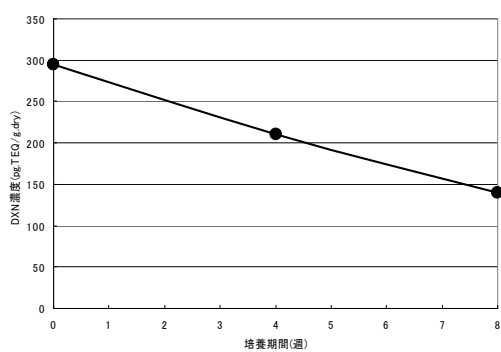


図-11 g区ダイオキシン類濃度分析結果

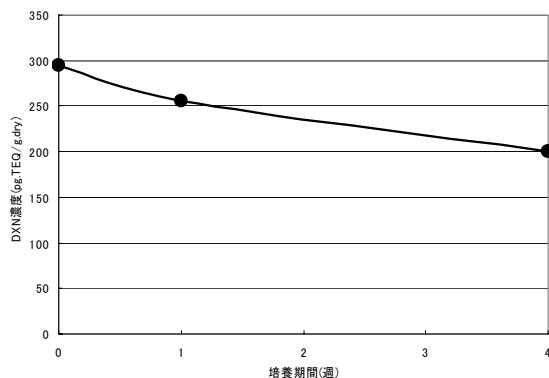


図-8 b区ダイオキシン類濃度分析結果

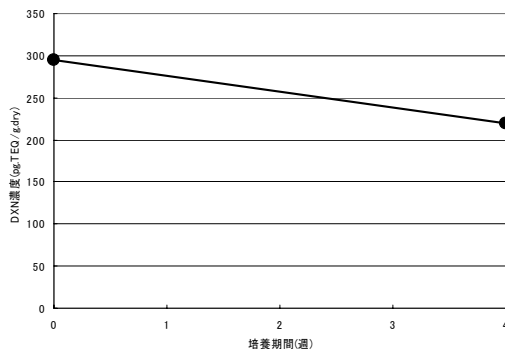


図-12 h区ダイオキシン類濃度分析結果

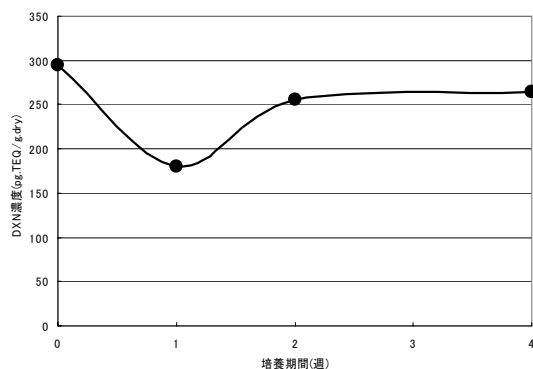


図-9 c区ダイオキシン類濃度分析結果



写真-3 菌糸蔓延状況

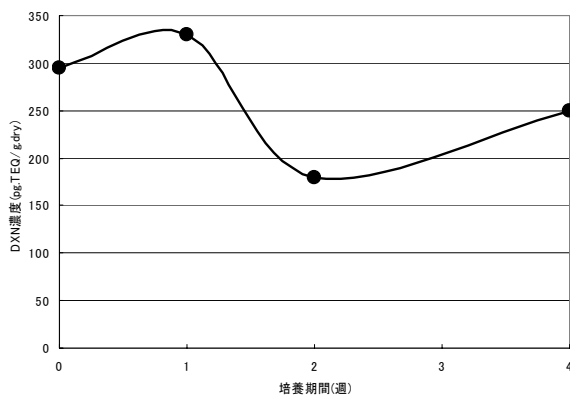


図-10 d区ダイオキシン類濃度分析結果

(4) Umu 試験結果

Umu 試験の1週目の結果を図-13に示す。2,3,4週目も同様に試験を行ったが、いずれも陽性反応の兆候はなかった。この結果より分解生成物は変異原性は無く、安全であることが確認された。

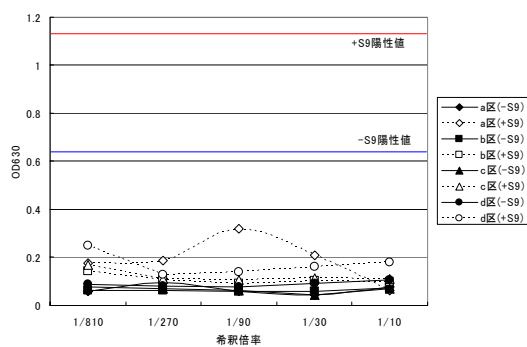


図-13 Umu 試験結果

(5)PCR 試験結果

環境資材に担持させた白色腐朽菌が、浄化対象土壌中でどの程度生存しているかをモニタリングするため PCR 分析を実施した。その結果を表-4 に示す。これより、8 週目以降、白色腐朽菌はほとんど生存していないことを確認した。

表-4 PCR 分析結果

区画	白色腐朽菌の種類	配合比 (土壌湿重量:環境資材湿重量)	0週目	4週目	8週目	16週目
a区	<i>Phanerochaete Sordida</i>	10:10	+++	++	+	-
b区	<i>phanerochaete</i> 属(A菌)		++	-	-	-
c区	<i>polyporales</i> 目(B菌)		++	+	+	+
d区			++	+	+	-

土壌からのDNA抽出効率、PCR増幅阻害が全試料とも一定であることを条件としてPCR増幅物のアガロースゲル電気泳動像より判定を行った。

+++ : 増幅産物が大量に確認される。
++ : 増幅産物が確認される。
+ : 増幅産物がわずかに確認される。
- : 増幅産物が確認されない。

(6)微生物モニタリング結果

遺伝子型手法(MPN-PCR 法)及び表現型手法により、最も外的因子により影響を受けやすい窒素循環に関する微生物群の遷移の調査を行った。

MPN-PCR 法による *amoA* 遺伝子及び *nirK* 遺伝子の定量の結果、両機能遺伝子数は浄化の有無によらず、顕著な変動は確認されなかった。一方、表現型手法による測定において a~d 区画において浄化初期に e 及び f 区画よりも高い脱窒菌数を示した。これは脱窒菌が従属栄養菌であるため、環境資材中の栄養分の持込みによる影響を受けたものと考えられる。これらの区は浄化期間が進むにつれて無処理区と同様のレベルまで減少したことから、浄化による微生物生態系機能への影響は一時的であることが示唆された。微生物相の変化についても顕著な変化は見られなかった。これらの結果より白色腐朽菌を担持した環境浄化資材を土壌中に投下することによる微生物への影響は無いことが確認された。

(7)植生モニタリング結果

ダイオキシン類を浄化するために、浄化対象地区に環境資材を投入した場合の周辺環境への影響を調査するため、試験区内及びその周辺における植生モニタリング調査を実施した。

試験区は環境浄化資材による浄化処理区、地表面を攪拌しただけの区、浄化処理区の隣接区、浄化処理区の遠隔区の4区分け12箇所にて調査を行った。

平成15年9月から平成17年1月までの四季を通しての調査の結果、環境浄化資材による浄化処理により地表面を攪拌したことで一時的に植生が減少したが、その後萌芽が認められており、今回の環境浄化資材と土壌を混合する工法が周辺植生に与える影響は特に見られなかった。

5. まとめ

環境浄化資材作成方法の検討及び野外浄化試験を行った。環境浄化資材作成方法の検討により以下のことが判明した。

- ① 種菌法による環境浄化資材作成が可能。
- ② 種菌製造材は剪定枝を使用し、栄養源は必要ない。
- ③ 種菌の接種量は製造する環境浄化資材の2.0%が適量である。

また、野外浄化試験では以下のことが判明した。

- ① 浄化処理期間は8週間程度である。
- ② 最もダイオキシン類の分解に有効な白色腐朽菌は *phanerochaete sordida* であった。
- ③ 処理土壌厚は10cm以内であり、土壌中空気量確保が必要である。
- ④ 白色腐朽菌は8週間程度でほとんど死滅するため、周辺環境への影響は無い。

これらの試験により白色腐朽菌を剪定枝に担持した環境浄化資材を使用することで、土壌と混合するだけの簡単な施工により土壌中ダイオキシン類を分解浄化することが確認できた。

6. おわりに

現在、経済産業省及び環境省による「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」の安全性確認の申請中である。この申請で微生物及び工法の安全性を国に確認してもらうことになり、申請した全ての場所で利用可能となる。

今後の予定としては、環境浄化資材のコストダウン及び高濃度汚染土壌による分解効果確認を行う予定である。

参考文献

1) Satoshi Tnaka, Matayoshi Nakamura, Takahiko Matsueda, Ryuishiro Kondo, and Kokki Sakai:
Degradation of Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and polychlorinated Dibenzofurans by the White rot fungus *phanerochaete sordida* YK-624, APPL. ENVIRON. MICROBIOL.,Dec,1996,PP4323-4328

2) 西田友昭：白色腐朽菌及びその酵素によるバイオレメディエーション,ECO INDUSTRY,3月号,pp.17-29,2001.

3) Naoto Ogawa, Hideo Okamura, Hirofumi Hitai, and Tomoaki Nishida:
Degradation of the antifouling compound Irgarol 1051 by manganese peroxidase form the white rot fungrs *Phanerochaete chrysosporium* ,Chemospheres, 55,2004,pp487-491