

ダイオキシン分解菌を用いたダイオキシンの分解処理について

環境工学部

惣田 昱夫

北大大学院工学研究科

古市 徹、石井一英

1 はじめに

現在、ごみ焼却場の飛灰や焼却灰中のダイオキシンの無害化処理は、かなり急がれた課題である。また、既存のダイオキシン汚染土壌の無害化・浄化も重要な課題となっている。

ダイオキシン類無害化のための処理方法には、UV法（紫外線照射法）や土壌焼却、溶融固化等があるが、いずれも処理費用が高い等の問題がある。処理時間が長いという欠点はあるが、エコ的で・安価な方法として期待されているのが、微生物を用いて各種汚染土壌等を浄化するバイオレメディエーション技術である。

2 目的

ダイオキシン類を含む焼却灰や汚染土壌等の浄化をバイオレメディエーション技術で行うには、ダイオキシン分解菌の特徴や分解力、分解代謝物そして他の微生物との共生問題等いくつか技術的にも越えなければならない課題がある。これらの課題を解決し、現場で使用できるバイオレメディエーション技術を開発するため、まず、ダイオキシン分解力の強い菌の検索し、その分解力等を把握することを試みた。ダイオキシン分解菌の検索に当たっては、混合菌の検索をターゲットとした。混合菌は多くの菌種を含むためダイオキシン類を完全に分解する可能性があり、条件によっては他の微生物との共生問題をクリア出来ると考えられる。そこで、本研究では、ダイオキシン分解力のある混合菌を各種土壌中から検索し、混合菌に含まれる代表的菌の同定及びダイオキシン分解等の特徴について検討した。

3 調査方法

3.1 分解菌の検索および菌類の同定

焼却灰や汚染土壌等の浄化をバイオレメディエーションにより行うために、県内各地20カ所から採取した土壌および木材等から分解力の強い混合菌の検索を行った。

混合菌にいるダイオキシン分解菌種を調べるためピフェニール添加培地を用いて集積培養した。培養後、生育した菌株を単一菌株に分離した。さらに分離菌株のピフェニール資化性を調べ、分解菌として選別した。これらの菌株の各種生理生化学的性質を調べ、菌種の同定を行った。

3.2 各種ダイオキシン類の分解基礎試験

3.2.1 各種菌類の培養条件及びダイオキシン類の分解基礎試験

各種分解試験には混合菌を用いた。使用した菌体は以下の方法で作成した。

混合菌はLB培地にて、24時間、25℃で振とう培養した後、遠心分離した。試験用培地は、20 mlの無機培地と遠心分離菌体0.5gそして各種ダイオキシンを加えて作成した。この培地を25℃、12時間および目的とする各期間振とう培養した。

3.2.2 ダイオキシン類分解ラボ試験

ダイオキシン汚染土壌の分解試験用試料は半回転式培養器に汚染土壌 1kg、混合菌、おから及びビールかすを入れ、水分を 60%にして作成した。比較のため混合菌を入れない対照区も作成した。試験期間中、好気性にするため一日一回試料を攪拌した。

3.2.3 分解試験に用いたダイオキシン類

分解試験に用いた標準ダイオキシン類及び汚染土壌は以下のとおりである。

1) ジベンゾフラン (DF)、2) ジベンゾ-p-ジオキシン (DD)、3) モノクロロジベンゾフラン (1Cl-DF)、4) 2,3,7-トリクロロジベンゾジオキシン (2,3,7-TCDD)、5) 焼却場周辺土壌

3.3 ダイオキシン類の抽出及び分析法

試験終了後、培地を分液ロートに入れ、塩酸で酸性にしたのち等量の酢酸エチルを加え5分間振とうした後1分間静置し、上層の溶媒層を分離した(3回繰り返した)。本抽出液に硫酸ナトリウムを入れ脱水した後、エバポレーターで濃縮し、1mlに定容した。2,3,7-TCDDのサロゲートにより回収試験も行った。

定量はキャピラリカラムSP-2331 (スプリング社製、60m×0.25mm、膜厚0.25um)及びDB-5 (J&W社製、30m×0.25mm、肉厚0.25um)を用いて、四重極型GC/MS分析計及び磁場型GC/MS (日本電子製)で行った。分析条件は以下のとおりである。

1) 分解物の分析

70	× 1 min
100 ~ 180	5 /min
180 ~ 250	3 /min
250	17min hold
注入口	250 スプリットス
キャリアガス	He 1ml/min
イオン化条件	EI法、
イオン源温度	170
イオン化電圧	70eV
測定モード	SIM

2) ダイオキシン類分析条件

100	× 1 min
100 ~ 310	5 /min
180 ~ 250	3 /min
250	17min hold
注入口	250 スプリットス
キャリアガス	He 1ml/min
注入口	250 スプリットス
キャリアガス	He 0.8ml/min
イオン化条件	EI法、
イオン源温度	170
イオン化電圧	70eV
測定モード	SIM

3.4 ジベンゾフランの分解物の同定

分解菌によるジベンゾフラン(DF)の分解物の同定は以下の方法で行った。

分解菌を24時間培養した後、遠心分離(12000rpm, 10min)し、上澄と菌体に分けた。この菌体をPAS培地20mlに入れよく懸濁する。本溶液1mlを培養瓶に入れ1000ppmのDF

を10ul添加し、24時間振とう培養した。培養後1.2mlの水酸化ナトリウムを加え、5分間放置した。放置後、溶液をすべて取り出し、カラム (Extrelute3 [メルク社製]) に移し、5分間放置した。そこに、20mlのヘキサンを加え、カラムを通し、出てきたヘキサン溶液を回収した。次に、カラムに1N塩酸を1.8ml加え、5分間放置した後、20mlの酢酸エチルを加え、出てきた溶液を回収した。二つの抽出液をそれぞれ1mlに濃縮し、四重極型GC/MS分析計で中間代謝物の分析を行った。

4 結果及び考察

4.1 ダイオキシン分解菌の同定

炭素源として添加したビフェニールは、菌により分解され一方のベンゼン環が開環されると、培地が黄色くなる。この黄色に着色した培地の混合菌をビフェニール資化菌群 (ダイオキシン分解可能菌) とし、計二つの混合菌 (MIX2001-T2菌、MIX2001-01菌とした。) が選択された。このうち一つの混合菌 (MIX2001-T2) を、さらにビフェニール添加培地で24時間生育させて、中に含まれる主な菌種を調べたところ6菌株が分離された。これらの菌株を生理生化学的方法により同定した結果を表1に示した。

表1 混合菌 MIX2001-T2 の同定結果

菌種	T2-1	T2-2	T2-3	T2-4	T2-6	T2-7
形態	R	R	R	R	R	R
芽胞	-	+	-	-	-	-
運動性	-	D	+	+	-	+
グラム反応	-	+	-	-	+	+
空気中での生育	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ反応	+	+	+	+	+	+
トリクロムリンダールゼ反応	+	D	+	+	-	+
ブドウ糖分解	+	D	+	+	+	-
OF	0	F/0-	F	0	F	
同定された菌種	<u>Flavobacterium</u> sp.	<u>Butillus</u> sp.	<u>Vibrio</u> sp.	<u>Pseudomonas</u> sp.	Coryneform	<u>Alcaligenes</u> sp.

4.2 2,3,7-TCDDの分解

各種実験に使用した。またMIX2001-T2及びMIX2001-01における2,3,7-TCDDの分解率について調べた。結果は表2のとおりであった。

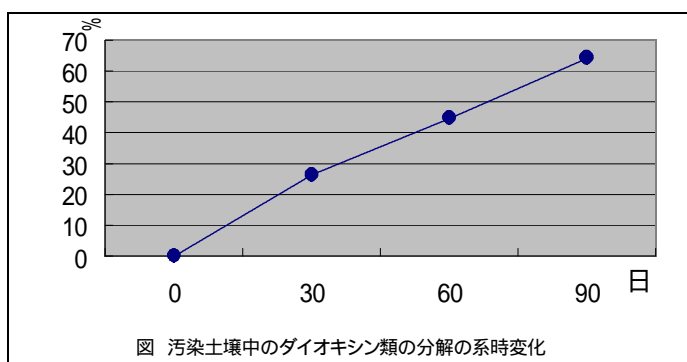
表2 2 混合菌による2,3,7-TCDDの分解率 (%) の変化

時間 (日)	1	8	35
MIX2001-T2	2.5	16.3	89.2
MIX2001-01	2.6	17.8	90.3

4.3 汚染土壌中のダイオキシン類の分解

汚染土壌中のダイオキシン類の分解を調べた。その結果を図に示した。

表のとおりダイオキシンの値をTEQ 換算値でみて、3ヶ月後に64.1%の分解率を示した。一般的な微生物分解性からみて、高い分解率と思われる。



4.4 DF、2,3,7-TCDD等の分解代謝物質

MIX2001-T2及びMIX2001-01菌によるDF、及び2,3,7-TCDDの分解代謝物について調べた。DFの中間代謝物として、カテコール、ベンズアルデヒドが、塩化カテコールや塩化ベンズアルデヒド及び塩化ベンジルアルコールが2,3,7-TCDDの中間代謝物として確認された。

5 まとめ

今回検索した混合菌は各種ダイオキシンや汚染土壌中のダイオキシンに対しすぐれた分解力を示した。混合菌によるダイオキシン分解に関する知見は少ないことから、今回の結果は、混合菌の特徴を知る上で、貴重なデータと考えている。また、飛灰や焼却灰等は、ダイオキシン類だけでなくPCBやヘキサクロロベンゼン等、ベンゼン環が塩素化された化学物質を多く含んでいる。焼却場等から排出された物質により汚染された土壌等を浄化を想定する場合、ダイオキシン類だけでなく他の化学物質についても併せて分解出来る菌種（混合菌）が要望される。

これらのことを踏まえ、現場に適応できるよう、今後ダイオキシンだけでなくPCB等、有機塩素系化学物質の分解について、また、濃度やダイオキシンの種類による分解や分解力の違い、分解経路についての違い等も検討していきたいと考えている。

(本研究は平成13年度環境省廃棄物処理等科学研究費及び民間との共同研究により実施した。)

参考文献

- 1)古市徹他：ダイオキシン微生物処理技術の研究、環境省平成13年度廃棄物処理等科学研究報告書
- 2)R.M. Wittich: Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms, Appl. Environ. Microbiol., 49, 489-499(1998)
- 3)Hideaki Nojiri et.al: Bacterial degradation of aromatic compounds via angular dioxygenation, J.Gen.Appl.Microbiol., 47,279-305(2001)