

担子菌を用いた環境修復における界面活性剤の検討

山口宗義・関谷敦（森林総合研究所）・高木和広（農業環境技術研究所）

要旨：我々は、微量でも人体に影響を与えるとされているダイオキシンの分解浄化技術の開発を行っている。現在、試験管レベルで1,3,6,8-TeCDDが分解可能な担子菌*Phlebia brevispora*に注目し、実際に1,3,6,8-TeCDDで汚染された水田土壌の分解浄化方法を検討している。しかし、実際の汚染土壌を未処理にて本菌で処理したところ、分解されにくいことが判明した。生物利用性を上げるため界面活性剤を検討したところ、汚染土壌中の1,3,6,8-TeCDDを1%界面活性剤ソルポール5115にて約28%抽出することができた。抽出を3回繰り返すことで1,3,6,8-TeCDDで約51%、1,3,7,9-TeCDDで約48%、OCDDで約32%抽出可能であった。抽出されたダイオキシンを支持担体（パーライト）に再吸着させたものを本菌で処理したところ、1,3,6,8-TeCDDを約75%分解することに成功した。

キーワード：担子菌、環境修復、界面活性剤、ダイオキシン、土壌、生物利用性

I はじめに

人類によって環境中に放出された化学物質の処理が、昨今問題とされている。とりわけ内分泌攪乱物質（ダイオキシン類等）は、微量でも悪影響をおよぼす(2)とされ、早急な対策が望まれている。近年白色腐朽菌によるダイオキシンやPOPs等の環境汚染物質の分解技術開発が進められている。汚染物質で分解菌が発見されているものはすでに事業として展開されているところもあり、新たな産業需要に応えつつある。しかし、公定法による測定では分解と吸着の区別がつけ難く、その点も視野に入れた、汚染土壌を対象にした「分解」技術における基礎的研究が、各方面で進められているところである。

現在我々は、試験管レベルで1,3,6,8-TeCDが分解可能な担子菌*Phlebia brevispora* (1)に注目し、実際に1,3,6,8-TeCDDで汚染された水田土壌の分解浄化方法を検討している。我々の研究において、本菌によって、人工的に汚染させた土壌では分解し、実際の汚染土壌では分解が困難なことが分かっており、実汚染土壌の生物利用性を上げる工夫が必要である。本研究では、生物利用性を上げるため、界面活性剤による汚染土壌からダイオキシンを抽出する方法、および抽出後の菌によるダイオキシン分解を検討した。

II 材料および方法

供試菌株は「*Phlebia brevispora* TMIC333929」を用いた。界面活性剤には農薬等の分散剤として使用されている各種界面活性剤（エアロール、ペグノール、ソルポール5115、ソルポール5306（東邦化学））を使用した。供試汚染土壌は実験水田圃場の水田土壌（土壌1gあたり1,3,6,8-TeCDD8300pg、1,3,7,9-TeCDD2900pg、

OCDD28000pg含有）を使用した。

1. 各種界面活性剤のダイオキシン抽出効果 5gの供試汚染土壌に0.1%各種界面活性剤溶液（エアロール、ペグノール、ソルポール5115、ソルポール5306）を25ml添加し、25℃100rpmで撹拌した。8000rpmで遠心後上清20mlを採取し、アセトニトリルを20ml添加し撹拌した。8000rpmで遠心後上清を回収し、そのうち25mlをダイオキシン定量分析に供した。25ml試料に内標準物質（13C12-PCDD 17種 2ng）を添加し、試料量の5倍以上の水を加えてジクロロメタンによる振とう抽出を行った。抽出液を脱水し濃縮後、その一部について、多層シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を行い、溶出液を濃縮した。定量は同位体希釈法による高分解能ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計（分解能>10,000）を用いて行った。

2. ソルポール5115のダイオキシン抽出性能 界面活性剤の濃度による抽出の効果を検討するため、5gの供試汚染土壌にソルポール5115を各濃度（0%、0.05%、0.1%、0.3%、0.6%、1%、1.5%、2%）の溶液で25ml添加し、25℃100rpmで撹拌した。8000rpmで遠心後上清20mlを採取し、アセトニトリルを20ml添加し撹拌した。8000rpmで遠心後上清を回収し、そのうち25mlをダイオキシン定量分析に供した。分析法は上述のとおりに行った。

界面活性剤の抽出回数による抽出量の効果を検討するため、5gの供試汚染土壌にソルポール5115を1%濃度にて25ml添加し、25℃100rpmで撹拌した。8000rpmで遠心後上清20mlを採取し、アセトニトリルを20ml添加し撹拌した。8000rpmで遠心後上清を全量回収し、そのうち25mlをダイオキシン定量分析に供した。残渣土壌

Muneyoshi YAMAGUCHI, Atsushi SEKIYA (For. and Forest Prod. Res. Inst., 305-8687 Ibaraki, Japan)

Effect of surfactants using a basidiomycete fungi in POPs contaminated soil

に再度1%ソルポール5115溶液を25ml添加し、同様に攪拌、上清回収を行い、同様にダイオキシンの定量を行った。これを3回繰り返して行った。

3. 抽出されたダイオキシンの菌による分解 50gの供試汚染土壌に1%界面活性剤ソルポール5115溶液を250ml加え24時間25℃100rpmで攪拌した。8000rpmで遠心後上清を採取し同量のアセトニトリルを添加し攪拌、上清を回収した。これに支持担体としてパーライト5gを加え、0.1%界面活性剤濃度になるよう蒸留水を添加し、24時間攪拌した（パーライトにダイオキシンを吸着）。

吸着されたパーライト5gにKirk-HN培地を6ml添加し滅菌後、供試菌株を植菌し1ヶ月培養した。また、植菌後滅菌したものを対照とした。培養終了後、アセトンを10ml添加しホモジナイザーで粉碎した。次に内標準物質（13C12-PCDD 17種 2ng）を加えて10分間超音波抽出を行った後、ガラス繊維濾紙（0.5μm孔径）にて濾過をした。残渣については風乾後ソックスレー抽出を行い、濾液についてはジクロロメタンによる振とう抽出を行った。抽出液を合わせて定容し、その一部について、多層シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を行い、溶出液を濃縮した。定量は同位体希釈法による高分解能ガスクロマトグラフ-高分解能質量分析計（分解能>10,000）を用いて行った。

Ⅲ 結果および考察

1. 各種界面活性剤のダイオキシン抽出効果 各種界面活性剤の1,3,6,8-TeCDD, 1,3,7,9-TeCDDの抽出効果を示す（図-1）。

今回の界面活性剤の中ではソルポール5115が抽出効率が良いと判断し、以降の実験はソルポール5115を界面活性剤に使用した。

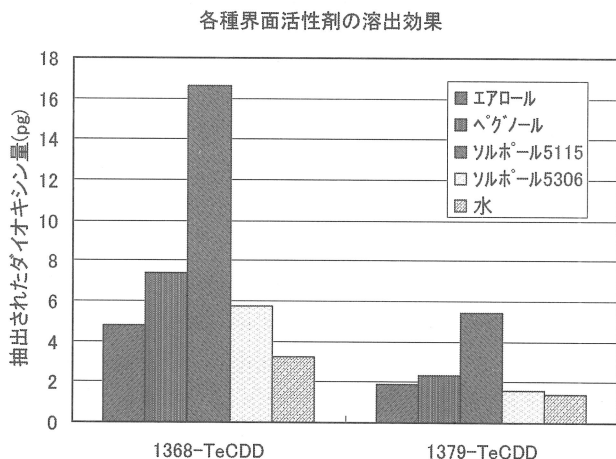


図-1 各種界面活性剤の溶出効果

2. ソルポール5115のダイオキシン抽出性能 界面活性剤ソルポール5115の各濃度における1,3,6,8-TeCDD,

1,3,7,9-TeCDDおよびOCDDの汚染土壌からの抽出率を示す（図-2）。

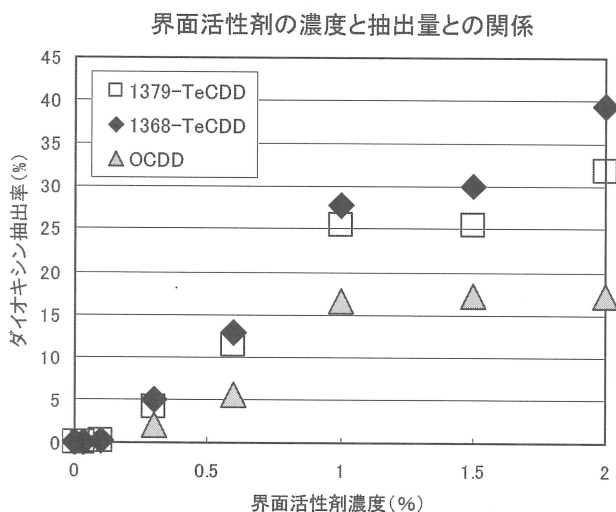


図-2 界面活性剤の濃度と抽出量

1%濃度で土壌中の1,3,6,8-TeCDDの約28%, 1,3,7,9-TeCDDで約25%, OCDDで約16%抽出できることが分かった。また、界面活性剤の濃度上昇に伴い、汚染土壌中のダイオキシン抽出率が上昇した。1%濃度以上では抽出効率の急激な上昇はなく、1%濃度で十分な抽出効果を示すことが分かった。

次に界面活性剤の抽出回数による抽出量の効果を示す（図-3）。

抽出回数を重ねるにつれて、回収できるダイオキシンは減少していくものの、3回の抽出で1,3,6,8-TeCDDで約51%, 1,3,7,9-TeCDDで約48%, OCDDで約32%の抽出が可能であることが分かった。

3. 抽出されたダイオキシンの菌による分解 汚染土壌から界面活性剤ソルポール5115にて抽出し、再度パーライトに再吸着させたダイオキシン（1,3,6,8-TeCDD, 1,3,7,9-TeCDD）の*Phlebia brevispora*による減少結果を示す（図-4）。

最適条件で抽出し、支持担体（パーライト）に再吸着させたダイオキシンの分解試験では、*Phlebia brevispora*により、1,3,6,8-TeCDDを約75%減少することに成功した。亀井ら(1)の報告によると、上述と同様の実験方法と対照区との比較で1,3,6,8-TeCDDの減少と中間代謝物の確認を行っていることから、本実験のダイオキシン減少は、分解によるものと考えられる。

Ⅳ おわりに

汚染土壌のダイオキシン類は強度に吸着してはいるが、界面活性剤を選択することで土壌から抽出することができ、抽出されたダイオキシンは*Phlebia brevispora*によって分解可能であることが分かった。微生物利用性を、

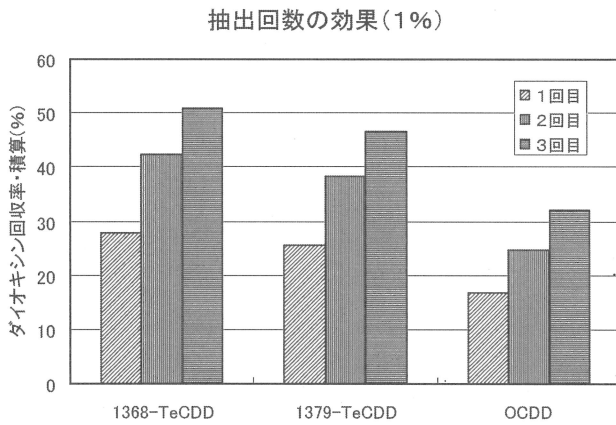


図-3 抽出回数の効果

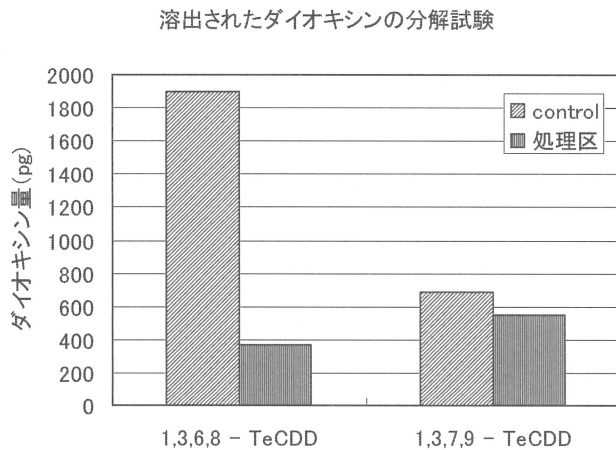


図-4 抽出・移行されたダイオキシンの分解試験

今回示したような前処理を行うことによって向上させることにより、バイオレメディエーションを成功させる一つの要素になりうることを示された。

今後の課題としては、界面活性剤の濃度を下げた条件でのさらなる抽出効率の上昇、および再吸着させる支持担体の選定が考えられる。

引用文献

- (1) Ichiro KAMEI, Hiroto SUHARA, Ryuichiro KONDO (2005) Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-p-dioxin, Appl Microbiol Biotechnol69 : 358-366
- (2) Theo COLBOM (1996) Our Stolen Future, 466pp., 翔泳社.

