

キノコでダイオキシン類を分解

生活化学課 吉川 大介

1 はじめに

本調査研究は、沖縄県の商工労働部 ものづくり振興課(旧新産業振興課)発注による補助事業、平成 23～26 年度「微生物等を活用した汚染土壌の浄化処理技術開発事業」で得られた成果の一部である。一般財団法人沖縄県環境科学センター、株式会社大鏡建設、照屋土建株式会社の3社で、土壌浄化共同企業体を結成し、国立沖縄工業高等専門学校(田邊俊朗准教授)を微生物単離と培養技術の専門家として迎え技術開発を行った。

沖縄県の土壌汚染の主なターゲットは、米軍基地やその返還跡地等であり、各種燃料の漏洩等による油等の土壌汚染が懸念される。平成 25 年には、返還跡地である沖縄市サッカー場において、ダイオキシン類を含むドラム缶が埋設されているのが発見されている。

これらの土壌汚染対策として、白色腐朽菌が出すリグニン分解酵素がダイオキシン類を分解する性質¹⁾を活用し、生態系と生物多様性に配慮した沖縄県産キノコ(白色腐朽菌)による土壌中のダイオキシン類の分解・除去技術の開発を行った。

2 研究開発

2.1 微生物試料の採取

ダイオキシン類を分解する能力を有する白色腐朽菌の単離を目的として、沖縄本島および離島から島内偏りなく探索し、キノコの子実体を1946個採取した。

平成 24 年 2 月から 7 月にかけて、沖縄本島及び渡航可能な離島 24 島(粟国島、久米島、伊是名島、伊平屋島、北大東島、南大東島、渡嘉敷島、渡名喜島、阿嘉島、慶留間島、座間味島、宮古島、伊良部島、下地島、多良間島、

黒島、与那国島、石垣島、小浜島、竹富島、鳩間島、西表島、波照間島、伊江島)において、二人一組で GPS (GARMIN 製ハンディ GPS モデル GPSMAP60Csx)を用いて現在位置を確認しながら、各島内偏りなく移動し、子実体を採取した。子実体の採取地点の緯度・経度を記録し、得られた GPS データから採取地点と島内を移動した軌跡を記入した地図を作成した(図 1)。採取日数延べ 82 日間、採取地点 1615 地点において、子実体 1946 個を採取した。

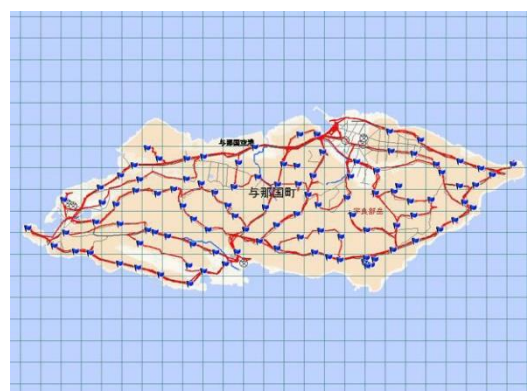


図 1 与那国島の子実体採取地点および移動軌跡

2.2 微生物の単離と上位株の絞り込み

採取した子実体を 5 mm 角から 1 cm 角の大きさに切断し、PDA (potato dextrose agar) プレート培地に植菌した。これを 25 ℃、相対湿度 75 % で 3 日～1 週間培養した。その後、伸長した菌糸を培地ごと 1 cm 角に分離し、新たな PDA 培地に植え替え、同様の条件で培養した。目視で細菌やカビなどのコンタミネーションが無い場合に単離できたとみなし、536 株が単離できた。

単離できた 536 株の菌体のリグニン分解活性を、バーベンダム反応²⁾を用いて測定し、上位株の絞り込みを行った。基本培地を調製し、

基本培地に α -ナフトール50 mMとなるよう添加した。単離した菌体を培地ごと上記の基本培地に植菌した。25℃、相対湿度75%で5日間培養し、分解斑の直径を測定した。培養5日後の分解斑が大きいものほどリグニン分解活性が高い株として、上位7株に絞り込みを行った。

2.3 ダイオキシン類分解能試験

ダイオキシン類分解能の測定では、焼却飛灰を赤土(島尻マージ)と混合した模擬汚染土壌を調製し、これに単離株菌体を加えて、模擬汚染土壌中のダイオキシン類毒性等量を測定した。

木材チップ培地で培養した上位7株を培地ごと10g秤量後、模擬汚染土壌(赤土100g、焼却飛灰2.5g)に混合し4週間培養し、1日に1回容器ごと培地を振って攪拌した。絞り込んだ上位7株のうち、佐手2株と命名した株が最もダイオキシン類毒性当量が減少していたため、佐手2株を最優秀株とした。

佐手2株のダイオキシン類分解能を図2に示す試験装置を用い測定した。佐手2株菌体10g、模擬汚染土壌(赤土100g、焼却飛灰2.5g)を混合し、未処理区(コントロール)と対照株および佐手2株で装置を組み、10週間後のダイオキシン類毒性当量を測定した。(図3)。佐手2株は、コントロールに比べダイオキシン類毒性当量が160 pg-TEQ/g減少した。

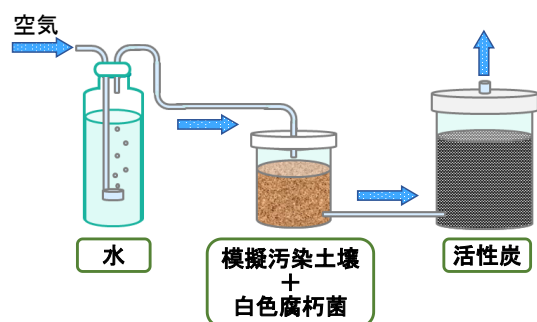


図2 試験装置

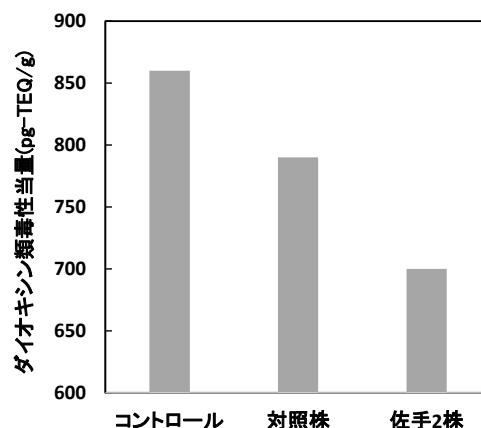


図3 ダイオキシン類分解能試験結果

2.4 安全性の確認

佐手2株の哺乳類に対する影響を、OECD毒性試験ガイドライン420 急性経口毒性試験－固定用量法のガイドラインに従いマウスを用いて確認した。

試験に供する菌体破砕液は、単離株をYM液体培地で1週間振とう培養し、吸引ろ過によって菌体のみを回収し、マルチビーズショッカー多検体細胞破砕機を用いて菌体を破砕し作成した。

マウスは、体重測定を行ったのち、菌体破砕液300 mg/kgを経口投与し、30分、1時間、2時間、24時間後に経過観察を行った。その後14日間は、1日1回の経過観察及び3日に1回の体重測定を行い、急性毒性・目視による異常行動の有無・体重の著しい増減を調査した。

パールダニオを用いて佐手2株の魚類に対する影響も確認した。菌体破砕液はマウスと同様のものを使用した。パールダニオは、7Lの水中に10匹飼育し、菌体破砕液を最終濃度100 mg/Lとなるよう水中に添加した。3時間後、6時間後、24時間後、36時間後、48時間後、72時間後、96時間後に経過観察を行い、菌体に急性毒性が無いか調査した。

佐手2株は、マウスおよびパールダニオについて、安全性が確認された。

2.5 菌種の同定

安全かつダイオキシン類分解能の高いものとして、佐手2株を選抜した。佐手2株は、遺伝子解析の結果、マラスミエルス・パルミボラス isolate Bangi3など10種以上のマラスミエルス・パルミボラスに99 %の高い相同性を示した。佐手2株は、和名シロホウライタケ、学名マラスミエルス・パルミボラスと同定された。

2.6 実証試験

実証試験では、糸満市に実証試験場を建設(図4)し、佐手2株を用いたダイオキシン類汚染土壌の浄化工法の検討を行った。

実証試験場は、20の試験槽を備え、それぞれトン単位の土を使用して条件を様々に変更しながら最適な工法を検討できる設備である。沖縄県環境科学センター、大鏡建設、照屋土建の3社は、実証試験場に各社一名を派遣し、それぞれの得意分野である調査・コンサルタント(沖縄県環境科学センター)、設計(大鏡建設)、施工(照屋土建)の技術交流を行い、キノコでダイオキシン類を分解するバイオレメディエーション技術の開発と技術習得を目的とした人材育成も行った。



図4 実証試験場

実証試験に必要な菌体量を確保する為、菌体の大量培養方法を確立した。佐手2株をブナ木粉、小麦ふすまおよび水を含む培地上に

広げて接種し、LED(波長470 nm付近の青色光:580から600 Lux(約1500 μ W))照射下、25℃、相対湿度75%で2週間培養した(図5)。培養後は、佐手2株の菌糸が十分に生育し、培地が真っ白になるほどであった。このLED照射下の培養により佐手2株の菌糸の成長速度は、これを照射しない通常の培養と比較して、1.5~2倍となった。



図5 大量培養状況

実証試験では、焼却飛灰と赤土(国頭マージ)を混合した模擬汚染土壌約3tを調製し、これに約30kgの培地に培養した佐手2株を加えて、模擬汚染土壌中のダイオキシン類毒性等量を測定した。菌体約30kgのうち約22kgは模擬汚染土壌に十分に混合し、約8kgは土壌表面に散布した。日常管理は、攪拌混合はせずに散水による水分調整のみを行った。

実証試験では、125日で65%のダイオキシン類毒性当量の減少が確認された(図6)。

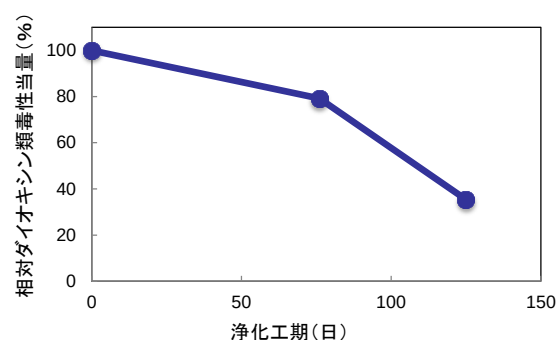


図6 実証試験結果

3 大地クリアの設立

沖縄県環境科学センター、大鏡建設、照屋土建の3社は、土壤浄化技術の事業化に向けて、開発した技術および既存の技術を組み合わせて土壤浄化工事を実施する体制作りを進めている。体制作りの一環として、土壤浄化業務(工事)を獲得し施工することを目的とし、平成26年11月に新会社「株式会社 大地クリア」を設立した。

4 特許の取得

大地クリアでは、本調査研究の結果から、「芳香族塩素化合物分解剤およびこれを用いた芳香族塩素化合物の分解方法」として特許(第6524213号)を取得した(図7)。

また、今回発見された佐手2株(マラスミエルス・パルミボラス sate 2 (Marasmiellus palmivorus sate2))については、平成26年12月19日付で独立行政法人製品評価技術基盤機構の特許微生物寄託センターにNITE BP-01984として国際寄託されている。

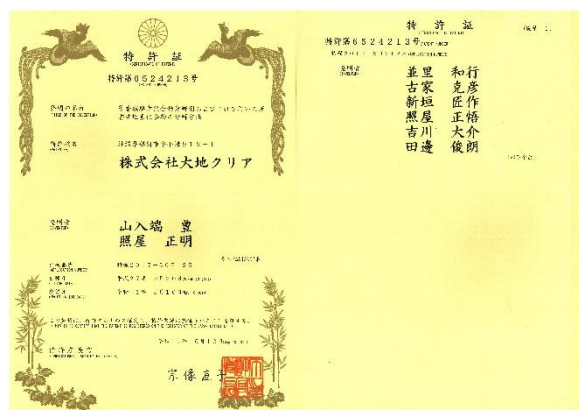


図7 特許証

5 まとめ

本調査研究では、白色腐朽菌による土壌中のダイオキシン類の分解・除去技術の開発を行った。

沖縄県内からダイオキシン類分解能を有する佐手2株を単離・選抜した。佐手2株は、

マラスミエルス・パルミボラスと同定され、マウスおよびパールダニオについて、安全性が確認された。佐手2株の大量培養法を確立し、約3tの模擬汚染土壌において、ダイオキシン類毒性等量の減少を確認することができた。「芳香族塩素化合物分解剤およびこれを用いた芳香族塩素化合物の分解方法」として特許(第6524213号)を取得した。

6 おわりに

本調査研究において特許を取得したことで直ちに土壤汚染の浄化事業を行えるわけではない。技術的には分解速度をさらに加速させ、同時に浄化工法を確立し、実績を積み重ねることが必要である。本調査研究が、「県産の微生物を活用した浄化技術」として広く周知され、沖縄県内の汚染土壌を浄化し、環境問題解決の一助になればと考える。

7 謝辞

本調査研究に協力頂いた 沖縄高専准教授 田邊俊朗先生、大鏡建設専務取締役 山入端豊氏、照屋土建常務取締役 照屋正悟氏に感謝する。本調査研究は、平成23～26年度「微生物等を活用した汚染土壌の浄化処理技術開発事業」の補助を受けたものである。

8 参考文献

- 1) 橘燦郎、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、p.63-68(2010)
- 2) Chroma, L., Demnerova, K., Mackova, M., Macek, T., Decolorization of RBBR by plant cells and correlation with the transformation of PCBs, Chemosphere, Vol. 49, p.739-748(2002))