

研究課題名 = 焼却灰中のダイオキシン類を対象とした微生物分解技術の開発に関する研究

研究期間 (西暦) = 2001-2003

代表研究者名 = 古市 徹 (北海道大学大学院工学研究科)

共同研究者名 = 谷川 昇 (北海道大学大学院工学研究科)、石井一英 (北海道大学大学院工学研究科)、惣田 昱夫 (神奈川県環境科学センター)、塩山昌彦 ((株)クボタ)、岡村和夫 (清水建設(株))、峠 和男 ((株)大林組)、伊 順子 ((株)環境管理センター)、笹井 裕 (東和科学(株))、郷田浩志 (東和科学(株))、西村和子 (千葉大学真菌医学研究センター)、亀井克彦 (千葉大学真菌医学研究センター)

研究目的 =

本研究の目的は、解体焼却炉周辺土壤中のダイオキシン類 (以下、DXNs) と不適正最終処分場の焼却灰中の DXNs の微生物分解処理技術の開発である。具体的には、DXNs を含む焼却灰の実態調査を通して、焼却灰中の DXNs による環境汚染の可能性と修復ニーズを明らかにする。 -1 それら DXNs 汚染物のバイオリクター処理または -2 静置 (原位置攪拌も含む) 処理の各プロセスについて、DXNs を効率的に分解処理できる条件を明確にする。DXNs 微生物分解メカニズムを明らかにするために、DXNs 分解経路を推定し、分解に関与する酵素の精製を試みる。環境省及び経産省の微生物安全性に関するガイドラインを参考に、本研究で扱う微生物の安全性評価を行う。最後に、具体的に濃度レベルや汚染形態が異なる DXNs 汚染現場を想定し、本プロジェクトで開発した微生物処理技術の位置づけや適用性を明らかにする。

研究方法 =

焼却施設や最終処分場の統計資料や過去の DXNs 分析資料、そして実汚染現場の実測データを参考にし、焼却灰中 DXNs による汚染の可能性について検討した。

-1 能勢町の汚染土壤中の DXNs、及び焼却灰の中でも特に濃度の高い飛灰中の DXNs を対象に、本プロジェクトで同定した DXNs 分解菌 *Pseudallescheria boydii* (以下、*P. boydii*) 北大株によるバイオリクター処理条件の検討を行った。まず、バイオリクターの攪拌条件、飛灰中の塩類による *P. boydii* 北大株の増殖阻害条件を明らかにした上で、対象物の前処理方法を検討した。また、微生物処理後土壤中の残存 DXNs の溶媒 (エタノール、イソプロパノール、クエン酸) 抽出による後処理を検討した。そして、容量 5L のバイオリクターを用いて、能勢町の汚染土壌及び 2 種類の飛灰混じり土壌の *P. boydii* 北大株による DXNs 分解実験を行い、前処理及び後処理も含めた処理プロセスにおける DXNs 処理効率を明らかにした。

-2 静置 (原位置攪拌) 処理を想定し、標準砂に、無塩素ダイオキシン類、または有塩素ダイオキシン類 (1 価及び 2 価) を添加し、含水率を約 10%、30 の条件で静置して、フラスコレベルでの *P. boydii* 北大株による DXNs 分解実験を行った。特に、グルコースや窒素、リンなどの栄養添加物の有無による分解特性の把握を行った。

P. boydii 北大株の DXNs 分解は、脱塩素プロセスと開環を伴う酸化プロセスからなると想定されたことから、酸化分解による分解代謝物の検出を試みた (過去の研究により、OCDD (8 価) から HpCDD (7 価) への脱塩素反応は確認している)。また、*P. boydii* 北大株による 2,3,7,8-TCDD の分解機構を把握するた

めに、*P. boydii* 北大株の生菌、菌体外酵素、菌体内膜酵素による分解実験を行った。さらに、DXNs 分解に関与する酸化酵素及び脱塩素酵素の精製を試みた。

まず、本研究で扱う *P. boydii* 北大株の特性を、18S rDNA 解析等に基づき明らかにした。次に、*P. boydii* 北大株の滅菌方法を温度、時間、エタノール濃度の 3 点から検討した。また、免疫抑制されたマウスに *P. boydii* 北大株と他の *P. boydii* 株の胞子を静注して、感染モデルを作成し、マウスの生存率、病理学的所見等により、北大株と他の株との病原性の比較検討を行った。さらに、*P. boydii* 北大株と代表的な病原真菌である *Aspergillus fumigatus* との病原性の比較も行った。加えて、抗真菌剤への長期曝露による耐性誘導性を確認するために、1 週間又は 2 週間の間隔で代表的な抗真菌剤を *P. boydii* 北大株に加え、合計 1~2 ヶ月の曝露試験を行った。

実汚染現場のデータを参考に、焼却場跡地と不適正最終処分場における焼却場由来の DXNs 汚染(100~7,000 pg-TEQ/g)を想定して、本研究で開発した微生物処理の適用性を検討した。特に、DXNs 濃度レベルに応じた微生物処理技術の位置づけを明確にすることとした。

結果と考察=

焼却灰と飛灰の混合灰が埋立てられてきた一般廃棄物最終処分場における、過去の DXNs の測定結果より、混合灰の DXNs 濃度の平均値は約 5ng-TEQ/g であり、埋立基準 (3ng-TEQ/g) を超えている最終処分場の存在が示唆された。また、高濃度 DXNs 汚染事例や汚染機構の検討により、不適切に管理されている焼却施設の敷地や周辺の土壌は、DXNs によって汚染されている可能性が高いことが分かった。さらに、5ng-TEQ/g の混合灰が埋め立てられている最終処分場では、条件によっては、DXNs が溶出して、周辺地下水が環境基準 (1pg-TEQ/L) を越えて汚染される可能性が示唆された。

-1 *P. boydii* 北大株には、培地中塩素イオン濃度 20g/L 以上、そして pH10 以上で、増殖阻害が生じるので、処理プロセスには洗い出し、pH 調整等の前処理が必要であることが分かった。また、溶媒抽出に関しては、イソプロパノールあるいはクエン酸を利用すると 10%強の飛灰中 DXNs が抽出された。さらに、能勢町汚染土壌 (初期濃度: 約 7,300pg-TEQ/g) については、バイオリクター出口で約 60%、後処理としての溶媒 (エタノール) 抽出処理も合わせると 92%の処理が達成できた。また、飛灰混じり土壌 (初期濃度: 約 170pg-TEQ/g、約 2,200pg-TEQ/g の 2 種類) に関しても、リアクター出口でそれぞれ、約 60%、40%の DXNs を処理できた。

-2 静置処理実験の結果、特に栄養源の添加が無くても、*P. boydii* 北大株によって無塩素 DXNs を分解できることを確かめた。しかし、本実験範囲内では、1~2 塩素化 DXNs の顕著な分解は見られなかった。これは、静置状態であったことが原因であると考えられ、適切な切り返し攪拌条件などの検討が必要であることが示唆された。

P. boydii 北大株による DF (ジベンゾフラン) の酸化分解代謝物である 2-OH-DF、及び OH 基の水素がメチル基に置換した化合物を検出した。これより、*P. boydii* 北大株のダイオキシン骨格の酸化分解が示された。生菌による 2,3,7,8-TCDD の分解実験において、ブランクには存在しないピークを確認できたことから、*P. boydii* による 2,3,7,8-TCDD の分解が示唆された。さらに、DD (ジベンゾ-p-ダイオキシン) 及び OCDD 分解酵素の精製可能性を示され、今後、酵素処理を念頭に、DD 及び OCDD 分解酵素の遺伝子解析が行える目処がたった。

18S rDNA 解析及び形態学的観察を行ったところ、本研究で扱った *P. boydii* 北大株の特性は、病原性真菌危険度分類では最も弱いレベル 1 であることが判明した。また、*P. boydii* 北大株は、他の *P. boydii* 株の病原性と同等程度と評価され、通常の手扱で問題の無いことを確かめた。加えて、実汚染現場への使用

を想定し、*P. boydii* 北大株の胞子の滅菌法を検討した結果、70 15 分以上の温度条件で全ての胞子が殺菌されることを確認し、さらに、耐性誘導の有無については、8 週間の連続曝露条件においても耐性獲得は見られないことを確かめた。

本研究で開発を行った *P. boydii* 北大株を用いたバイオリアクター処理技術の実汚染現場への適用性を検討した結果、DXNs 濃度レベルが、数千 pg-TEQ/g の焼却場由来の土壌・焼却灰については、撤去 - バイオリアクター処理することにより、環境基準値(1,000 pg-TEQ/g)以下、或いは埋立基準値(3,000 pg-TEQ/g)以下にまで処理できることを示した。また、日処理量 2m³ の時のコストは約 7.6 万円/m³ と推算され、現状の溶融や焼却処理よりも有利な条件であると考えられた。しかし、他の脱ハロゲン反応を利用した化学的処理等と同程度の処理コストということを考慮すると、さらに処理コストの低減化を講じる必要がある。一方、要調査基準 (250 pg-TEQ) 以上、環境基準値 (1,000 pg-TEQ/g) 以下の土壌・焼却灰については、静置 (原位置攪拌) 処理の可能性が実験から推察され、実汚染現場への適用性に関しても処理コストが 3 ~ 7.5 万円/m³ であれば、微生物処理の十分な需要があると評価された。

結論=

DXNs を含む焼却灰を野積み保管する等の不適切な管理によって焼却炉敷地内やその周辺の土壌汚染が生じる可能性があること、そして混合灰を受け入れてきた不適正最終処分場及びその周辺地下水が汚染されている可能性があることを指摘した。

-1 含水率 70%、培地塩類濃度 20g-Cl/L 以下、培地 pH 10 以下、30 の条件で、*P. boydii* 北大株を用いた 48 ~ 96 時間のバイオリアクター運転により、飛灰混じり土壌 (初期濃度: 約 170pg-TEQ/g、約 2,200pg-TEQ/g の 2 種類) については約 40 ~ 60%、能勢町の汚染土壌 (初期濃度: 約 7,300pg-TEQ/g) については、溶媒抽出処理も含めたトータルプロセスで 92% の DXNs 処理効率を得ることができた。

-2 *P. boydii* 北大株を用いた静置実験では、無塩素体であるジベンゾフラン(DF)、ピフェニル、ジベンゾ-p-ダイオキシンの減少を確認した。これより、静置した状態であっても、これらの汚染物質を分解除去できる可能性を示した。

P. boydii 北大株の DF の分解中間生成物を検出できたことから、*P. boydii* 北大株の DF の酸化分解反応の存在が、ほぼ確認された。また、2,3,7,8-TCDD 分解酵素が菌体膜に存在する可能性、DXNs 分解に関与する DD 及び OCDD 分解酵素の精製可能性を示すことができた。

本研究で扱う *P. boydii* 北大株は、病原性真菌危険度分類では最も弱いレベル 1 であることが判明した。また、70 15 分間で、胞子の殺菌ができること、また坑真菌剤の長期曝露による耐性誘導性は無いことを確かめた。以上より、汚染土壌・焼却灰の処理プロセスを構築する際に、*P. boydii* 北大株によるリスクを制御できることが示唆された。

焼却場跡地及び不適正最終処分場への、DXNs 微生物分解処理の適用性を検討した結果、数千 pg-TEQ/g の焼却場由来の土壌・焼却灰に対して、撤去して、*P. boydii* 北大株を用いたバイオリアクターにより、環境基準値(1,000 pg-TEQ/g)以下、或いは埋立基準値(3,000 pg-TEQ/g)以下にまで処理できることを示した。また、低濃度レベル (1,000 pg-TEQ/g 以下) の土壌・焼却灰に対する静置処理の可能性を示すことができた。

以上より、汚染土壌及び焼却灰中の DXNs の微生物 (*Pseudallescheria boydii* 北大株) を用いた処理プロセスを提案し、特にバイオリアクターに関しては、環境基準値以下、或いは埋立基準値以下にまで処理するための運転条件を示すことができた。さらに、本研究で開発した微生物処理プロセスが、実際の DXNs 汚染現場へ適用できることを示した。