

廃棄物処理等科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

研究課題名：ダイオキシン類汚染水質・土壌の浄化バイオリアクター構築のための研究

国庫補助金精算所要額（円）： 47,226,000

研究期間（西暦）： 2003 - 2006

研究年度（西暦）： 2003 - 2006

代表研究者： 高橋 惇（高砂熱学工業株式会社 総合研究所）

共同研究者： 飯山 登（高砂熱学工業株式会社 東京本店 技術部）

共同研究者： 大塚祐一郎（独立行政法人森林総合研究所）

共同研究者： 片山 義博（東京農工大学 大学院 生物システム応用科学教育部）

共同研究者： 亀山 敏治（環テックス株式会社）

共同研究者： 中村 雅哉（独立行政法人森林総合研究所 きのこ微生物研究領域）

共同研究者： 保科 定頼（東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座）

共同研究者： 峯木 茂（東京理科大学 理工学部 応用生物科学科）

共同研究者： 渡辺 一哉（株式会社海洋バイオテクノロジー研究所微生物利用領域）

研究目的：

本研究は、物理化学的浄化手法に比べて低コストで環境調和型の微生物によるダイオキシン類汚染水質・土壌の浄化システムの構築を目指すものである。今までに、毒性が最も高い2,3,7,8-TCDDや2,3,7,8-TCDF等を分解する好気性好熱細菌であるSH2B-J2菌株を獲得・権利化（United States Patent 6,190,903，日米欧に出願中）すると共に、ダイオキシン類浄化処理用バイオリアクターの開発（特開2002-301466）と性能評価を行ってきた。SH2B-J2菌株が高度に塩素化されたダイオキシン類を分解できること、反応初発でダイオキシン類のエーテル結合を開裂することが検証されていることである。しかし、その代謝経路や関与する酵素群の解明はなされていない。現地処理型のダイオキシン類汚染水質・土壌の浄化

システムを実用化するために、0.01 m³ 規模の実証用気泡塔型固定床バイオリアクター、特にヘテロジニアスな汚染土壌のために、独特な前処理装置を試作して、浄化システムとしての能力を評価する。試算では、地処理型の浄化システムとして5 m³/日程度の処理能力が求められる。この目標値を達成するために、酵素培養槽の運転条件を特定するために、実用培地や酸素供給法などの確立を目指す。

研究方法：

SH2B 菌に関する系統発生的な属性およびその性質等の微生物としての基礎的特性を解析する。更に、SH2B 菌体の非病原性、非感染性を確認する。

高度に塩素化されたダイオキシン類を分解する能力を高感度に検出して本研究を効率的に行うために、ダイオキシンアナログの蛍光基質（エーテル部分が開裂すると蛍光を発する基質¹²⁾ 特願 2002-82993）を戦略的に用いる。

ダイオキシン類分解の特徴から分解酵素群の正体を推定した上で、ダイオキシンアナログの蛍光基質と SH2B-J2 菌株の共存培養を TLC 上で行い、濃縮された分解生成物である蛍光スポットを採取して、これらの GC/MS 分析から分解生成物の化学構造を同定する。

¹⁴C に置換された 2,3,7,8-trichlorodibenzo-*p*-dioxin (¹⁴C -TCDD) および 2,3,7,8-trichlorodibenzo-*p*-dioxin を基質として、SH2B-J2 菌株由来の細胞粗酵素との共存培養による分解生成物から、ダイオキシン類の代謝経路を特定する。

SH2B-J2 菌株の密度増加のための菌体固定化法、実用的培地、ならびにその添加方法等の検討を行う。更に、実用化を目指すために、0.01 m³ 規模の気泡塔型培養槽を設計・試作し、装置スケールアップを目的とした所要送気量に関する設計諸元を特定する。

0.01 m³ 規模の気泡塔型培養槽の特性を用いた SH2B-J2 菌株の糖分解特性から、槽内の微生物反応の動特性を説明できるエンジニアリングモデルを構築する。

ダイオキシン類汚染土壌・底質を構成する粒度ごとのダイオキシン類付着濃度の評価からその必要性を検証した上で、処理対象汚染土壌・底質を減容すると同時にダイオキシン類濃度を濃縮する前処理装置を試作する。

前処理装置と気泡塔型培養槽の連動操作により、SH2B-J2 菌株を用いたダイオキシン類汚染土壌・底質の浄化性能を検証する。

経済的有意性の評価から、ダイオキシン類汚染処理ビジネスの可能性を検討する。

結果：

SH2B 菌は、SH2B-J1 菌株、SH2B-J2 菌株、ならびに SH2B-J3 菌株から構成されている。SH2B-J1 菌株にはダイオキシン類の分解能は認められなかったが、SH2B-J2 菌株および SH2B-J3 菌株には分解能が認められた。16S rDNA 配列の解析から、SH2B-J2 菌株は油田から単離される好気性好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* に近縁であることが判明した。4 塩素化以上のダイオキシン類混合液を対象とした細胞膜粗酵素の分解活性には温

度依存性，反応時間依存性，ならびに pH 依存性が認められ，細胞膜粗酵素の重金属耐性に関する MIC の存在を特定した．SH2B-J2 菌株の病理学的安全性を検証し，ダイオキシン類の微生物浄化に適用できる微生物であることを検証した．

SH2B-J2 菌株由来の細胞膜粗酵素にはダイオキシン類の分解活性が認められた．ダイオキシン類の減少速度が初期のダイオキシン濃度に比例して増加する（濃度依存性）を確認した．SH2B-J2 菌株由来の細胞膜粗酵素と蛍光アッセイ基質の反応生成物を GC/MS 法で分析した結果，4-methylumbelliferone が検出された．エーテル開裂は還元的反応であり，質量分析でメルカプツール酸結合体と推定されるピークの存在を確認したことから分解酵素の正体は glutathione-s-transferase (GST) の抱合体である可能性が高い．SH2B-J2 菌株由来の細胞膜粗酵素の酵素は GST である可能性が高い．分解・代謝産物は極性が高いことから，代謝物の分離分画として水層側に注目し，2-プロパノール/酢酸/水を TLC の展開溶媒を特定した．塩素化ダイオキシン自身である ^{14}C -TCDD の TLC 法分析で分解・代謝中間体と思われるスポットが認められた．

ベクター-charamid9-28 で同様に 10~24 kbp のゲノムをシャロミドに挿入して DNA ライブラリーを作製し，プラスミド pUC119 由来の lac プロモーターと共に大腸菌 XL-1 blue に形質転換を行った．蛍光を発する個体の再現は取れなかつたがクローニングおよびスクリーニングの方法がほぼ確立された．二次元電気泳動法によるタンパク質の網羅的解析により，PCDD 分解時に特異的に増えるスポットを見出し，アミノ酸配列解析，Data Base を使用した similarity search から，ダイオキシン類の分解に関わる膜タンパクや GST を取得する技法を確立した．

培地単価の安い実用的な培地として Corn Steep Liquor (CSL) を特定した．CSL は SH2B-J2 菌株がエネルギー源とするリンゴ酸と乳酸を豊富に含有し，K，P，Mg に次いで Ca，Fe，Zn などの金属元素を塩化物や硫酸塩の形で含有している．SH2B-J2 菌株の培養における CSL の最適培地濃度は，0.01% ~ 0.1% の範囲であることを特定した．流加培養法の適用可能性を検討した結果，12 時間ごとに新鮮培養菌株 10^8 個/mL および CSL の 0.1% 水溶液を培地として添加することで，120 時間 10^7 個/mL の生存個数濃度が維持できた．

0.01 m³ 規模の培養槽によるダイオキシン類浄化システムを設計・試作した．65 の清水における培養槽内の気泡流動はスラグ流動域にあり装置内全体の攪拌・混合が認められた．「BOX」型ドラフトチューブに関する通気特性の実験式を得た．スパージャやノズルを用いた散気管と同等の送気量に関する寄与係数を得た．装置スケールアップに用いる（総括容量係数×培養容積）と（送気量）の相関式を得た．2 L 容量のジャー型ファーマンタを用いた流加培養の最適条件から，送気量に関する相関式の妥当性が検証された．送気量と生存個数濃度は比例するが，送気動力あたりの生存個数濃度（培養成績係数と

定義)は低下するため、設計には総括容量係数 20 h^{-1} 以上を採用する。3 方程式からなるエンジニアリングモデルを構築した。0.01 m^3 規模の気泡塔型培養槽を用いた SH2B-J2 菌株の糖分解特性のシミュレーションで、微生物個数濃度の時間変化と良い一致を得たことから、本エンジニアリングモデルの妥当性が検証された。エンジニアリングモデルを用いた感度解析から、基質消費係数は $10^{-9} \sim 10^{-10} [1/\text{h}/\text{個}/\text{mL}]$ 、溶存酸素消費係数は $10^{-10} \sim 10^{-11} [\text{kg}/\text{m}^3\text{h}/\text{個}/\text{mL}]$ の範囲にあること、SH2B-J2 菌株の平均世代時間は 6.9 ~ 7.6 分であることが解明された。微生物増殖阻害に対する基質消費速度の寄与率の感度解析から、SH2B-J2 菌株の増殖阻害を支配する主要因は溶存酸素消費速度であることが解明された。

ダイオキシン類汚染土壌・底質におけるのダイオキシン類の局在性を確認した、ダイオキシンの毒性等量で砂礫に約 5 ~ 8%、シルトに 92 ~ 95% が付着している。ダイオキシン類汚染土壌・底質をスラリー状にして SH2B-J2 菌株との共存培養 (72 時間) を実施した結果、約 30% のダイオキシン類が分解することを確認した。しかし、SH2B-J2 菌株が焼却飛灰中では生育できないこと、汚染土壌の pH を中性に近づけ 6.5 の環境条件下で、理想的には 50% 程度のダイオキシン毒性等量の減少が期待できることを明らかにした。SH2B-J2 菌株のダイオキシン類分解能を保存する担体として Yeast Extract を特定し噴霧乾燥温度が低温ほど高い分解能を確認した。菌抹の添加量依存性から 2,3,7-TCDD の 50 ~ 100 ng/mL の範囲では、培地 1 L あたり 10 g の菌抹の添加濃度で最大の分解活性を示した。少なくとも 10 ヶ月の菌抹保存性が確認された。

ダイオキシン類汚染土壌・底質の浄化処理に関する事業採算性を浄化処理単価 10 万円/トン以下で評価すると、汚染土壌 100 トン ~ 4,000 トンの市場に適用できる可能性を明らかにした。

現地処理型浄化システムの構築を目指した前処理装置と気泡塔型培養槽の連動でダイオキシン類汚染土壌に含まれる重金属イオン濃度の測定を含む生育条件の事前確認の重要性が確認された。摩砕処理で汚染土壌から砂礫とシルトリッチ成分に分級することが、処理対象の汚染土壌の減容に役立つことが確認された。なお、前処理装置および気泡塔型培養槽の連続運転性能を検証した。

以上