

[研究報告]

# バイオレメディエーション技術の活用による難分解性有害化学物質汚染土壌の浄化に関する研究

王効拳 杉崎三男 細野繁雄

## 要 旨

本研究は、有機汚染物による広範囲な土壌汚染に適応する低コストな汚染土壌修復手法を探索することを目的としている。これまで、市販微生物による多環芳香族炭水化合物(PAHs)の分解、有用微生物のスクリーニング、有用植物-微生物の複合浄化システムの構築等に関する研究を行い、以下の結果を得た。(1)6種類の市販微生物製剤を用いたPAHsの分解については、2種類の製剤で浄化効果が見られたが、製剤の値段から、広範囲の汚染処理には処理コストが安価であると考えられない。(2)身近な木材腐朽菌から分離した菌種について、色素を用いたスクリーニングを行った結果、エノキタケ、マイタケ、ブナシメジ及びエリンギの4菌種がRBBR等6種類の合成色素に対して高い分解能力を示した。また、エノキタケは20~30℃における脱色速度が最も高く、接種量10%でも完全に脱色できることから、汚染土壌修復への実用が期待された。(3)有用植物-微生物の複合浄化システムについては、エノキタケの菌液で処理することにより、植物生長の促進及び根圏微生物の増殖が認められた。特に、ペレニアルライグラスとの組合せは、植物の生長、土壌微生物数の増加及びダイオキシン類の除去に最も有効であった。有用植物-微生物の組合せは、広範囲の汚染土壌修復に有望な浄化システムであると考えられる。

キーワード:ファイトレメディエーション、白色腐朽菌、脱色、土壌汚染、ダイオキシン類

## 1 はじめに

ここ数十年間、社会の発展に伴い、様々な無機・有機汚染物質による土壌汚染が世界中に広がって、人の健康及び生活環境を脅かしている。日本でも、近年、多様な有害物質による土壌汚染が顕在化しており、土壌汚染に対処する法制度を強化している。1999年に「ダイオキシン類対策特別措置法」が制定され、土壌環境基準が設定された。さらに、2003年2月には「土壌汚染対策法」が施行され、基準を超過する汚染土壌の修復義務が科せられた。日本では、「土壌の汚染に係る環境基準」の超過事例が平成10年から高い水準で推移してきており<sup>1)</sup>、今後、さらに浄化対象が増加すると予想され、それらに対応できる浄化技術の研究開発が急がれている。

しかし、これまで主に行われてきた掘削除去や有害物質の抽出作業等の物理・化学的手法には、巨額な費用や技術面の問題、処分場の用地確保の問題、二次汚染の懸念及び土壌の生物・化学等機能の破壊等種々の障害があるため、広範囲な土壌修復への適用が限定される<sup>2-4)</sup>。そこで、低コストかつ環境に優しい処理技術として、微生物、植物等

を利用した生物環境修復(バイオレメディエーション、Bioremediation)の技術が注目されている<sup>4-7)</sup>。特に、多様な有害物質による低濃度で広範な土壌汚染の修復には、バイオレメディエーションが最適と考えられている。

バイオレメディエーションは、近年の研究の進歩により、残留農薬、ダイオキシン類など多くの有機化合物を分解する種々の微生物が見い出されており、石油等の有機物質で汚染された土壌の浄化が実施されている<sup>2,7)</sup>。また、植物の吸収、蓄積及び根圏機能等を利用する植物修復(Phytoremediation)は有望な土壌修復技術として活発に研究されている<sup>7)</sup>。しかし、その成果はまだ不十分であり、①複合汚染の場合は対応が困難である、②浄化に長期間を要する、③実験室内の微生物の活性を現実環境中で発揮するのが難しい、などが理由として挙げられる。

バイオレメディエーション、特に植物を利用したファイトレメディエーションは環境浄化手法としてまだ初期段階にあり、修復対象汚染物質及び適用植物種の範囲の拡大、処理能力の向上が必要であるものの、大きな発展の可能性があり、今後、多様な無機及び有機汚染物質を対象に、安全かつ効率的なバイオレメディエーション技術の確立を進めることが重

要である<sup>3,6,7)</sup>。

本研究の目的は、主にPAHs、ダイオキシン類(DXNs)などの有機汚染化学物質を対象とし、バイオレメディエーション技術を活用して低コスト・効率的な汚染土壌の修復手法を探索することにある。具体的な内容は、①高い浄化能力を持つ有用微生物のスクリーニング、②有用微生物の特性及び実環境での適用条件の検討、③有用微生物(群)及び菌根菌接種による有用植物-微生物複合浄化システムの構築、④有用植物-微生物複合浄化システムの効率の改善及び実汚染土壌修復への適応、である。

高い浄化能力を持つ有用微生物については、木材腐朽菌が木材の主成分であるリグニン(強固な芳香族化合物でもある)を容易に分解することが知られており、これらの木材腐朽菌には、DXNs、DDT、PAHs等の有機汚染物質を分解できる菌株がある<sup>8,9)</sup>。特に、*Phanerochaete chrysosporium*などにおいては、欧米諸国で汚染土壌のバイオレメディエーションへの応用も検討されている<sup>10,11)</sup>。しかし、*Phanerochaete chrysosporium*は日本国内では発見されておらず、植物防疫上の問題から、その技術をそのまま日本の環境に適用することは困難である<sup>10,12)</sup>。そこで、本研究では、日本で市販されている微生物製剤及び身近な食用キノコ(木材腐朽菌)から、難分解性有機汚染物質の分解能を有するもののスクリーニングを行った。

また、本研究はバイオレメディエーション(微生物を利用する場合)とファイトレメディエーション(植物を利用する場合)の手法を活用し、植物の根圏に有用微生物を導入して、植物根の生長の促進と根圏機能を強化して有用微生物の増殖を促進させることによって、広範囲に拡散した有害化学物質を持続的に分解できる土壌修復手法を検討した。

本文では、今まで行ってきた研究の内容をまとめて報告する。

## 2 研究方法

### 2.1 市販微生物による有機汚染物質の分解実験

環境修復の適応例がある市販微生物製剤を用い、PAHsの室内分解実験を行った。供試微生物製剤は安全性が確認されたFR、FC、TE(粉体、A社から入手)、PC(粉体、B社から入手)及びBC、BH(液体、C社から入手)の6種である。栄養剤及び必須元素を一定量入れたの40ml容バイアル瓶に、13種のPAHsを5 $\mu$ gずつ添加し、粉体微生物製剤は1.0g、液体微生物製剤については2mlを加えた。バイアル瓶のフタを閉め、30 $^{\circ}$ Cのインキュベータ内に静置培養し、一定期間ごとにバイアル瓶内の全量をヘキササン抽出し、GC/MSを用いてPAHs濃度を測定した。

### 2.2 有用微生物のスクリーニング

エノキタケ等の身近なキノコ(木材腐朽菌)約20種を対象

に、色素の分解・脱色試験を行って、DXNs等の難分解性有機汚染物質を分解する可能性の高い微生物のスクリーニングを実施した。色素の分解・脱色試験は、微生物の酵素活性の評価に用されており、Remazole brilliant blue R (RBBR)、アズールB、Orangell等の色素の分解がリグニン分解酵素の分泌やダイオキシン類、芳香族化合物等の汚染化合物の分解に関連すると報告されている<sup>10,12,13,14)</sup>。

使用した6種の合成色素の構造を図1に示す。固体培地での脱色は、各色素40mg/lを含む寒天平面培地の中央に各試験菌を接種し、30 $^{\circ}$ Cで培養した後に目視により色素の脱色状態を観察した。また、液体培地での脱色は、各色素100mg/lを含む液体培地に微生物を接種し、30 $^{\circ}$ Cで静置培養した後、経時的に培養液を採取して、各色素の極大吸収波長における吸光度の減少により脱色率を算出した。

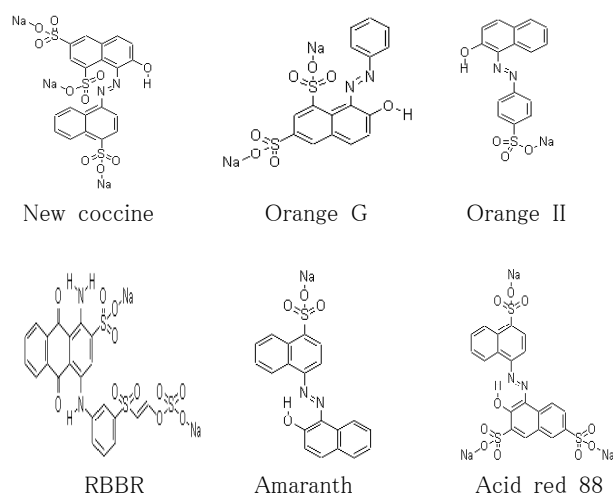


図1 分解対象とした合成色素の分子の構造

### 2.3 微生物活性の影響因子の検討

汚染土壌を効率的に修復するため、環境温度、微生物の濃度及び土壌の存在による分解活性への影響を検討した。2.2のスクリーニングの結果、脱色能力が高いと判断された2種の木材腐朽菌を対象に、new coccine(NC)色素を用い、次の条件で分解試験を行った。(1)培養温度:一週間培養した微生物の菌液5mlにNCを添加し、5、10、20、30、40、50、60 $^{\circ}$ Cで静置培養した。(2)菌液濃度:一週間培養した微生物の菌液(菌濃度約 $1.4 \times 10^8$ /ml)の混合比(10%~100%)を変えた5ml培養液にNCを50 $\mu$ g添加し、30 $^{\circ}$ Cで静置培養した。(3)土壌の存在:NCを含む風乾土壌2gに各濃度レベル(10%~100%)の培養液5ml添加し、30 $^{\circ}$ Cで静置培養した。上記試験の各培養液を経時的に採取し、480nmの吸光度の減少により脱色率を算出した。

### 2.4 有用植物-微生物の複合浄化システムの構築

環境基準を超えるDXNsに汚染された土壌を入れたポットに

ライ麦(RW)、イタリアライグラス(IG)、ペレニアルライグラス(PG)を植え、エノキタケの菌液(EL)及びマイタケの菌床(MS)を接種した。一定期間ごとに、植物の生育量、土壤微生物数を調査した。また、土壤中のDXNs濃度(pg-TEQ/g)については、高速溶媒抽出装置(ASE-200)により土壤中のDXNsを抽出し、抽出液は硫酸処理、硝酸銀シリカゲル、活性炭等カラムクリーンアップ後、HRGC-HRMSにてDXNsを測定した。各処理土壤中のダイオキシン類の経時的な変化により土壤中のダイオキシン類の除去率を算出した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 市販微生物による有機汚染物質の分解

使用した6種類の製剤について、15日間好気培養後のPAHsの残量を図2に示す。対照系(CK)と比べ、PAHsの残量は、FR、FCで大幅に、TEでは若干低下した。BC、BH、PCはほとんど変化がなく、菌による分解効果が見られなかった。

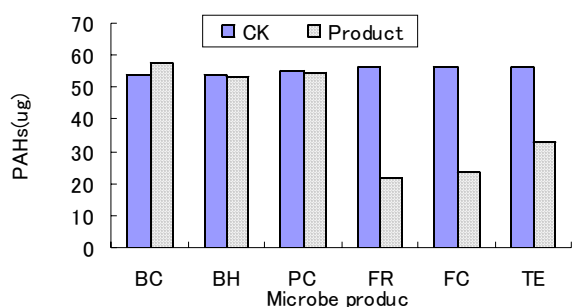


図2 15日後微生物製剤と対照系中PAHsの残留量

図3に示すように、FR、FC及びTEによるPAHsの減少率は試験開始後5日の時点で大きく、以降徐々に上昇し、15日以降はあまり増加しなかった。また、FR、FCの方がTEより分解率はやや高い傾向を見られた。表1に、3製剤ごとに各化合物に対する15日時点での減少率を示す。

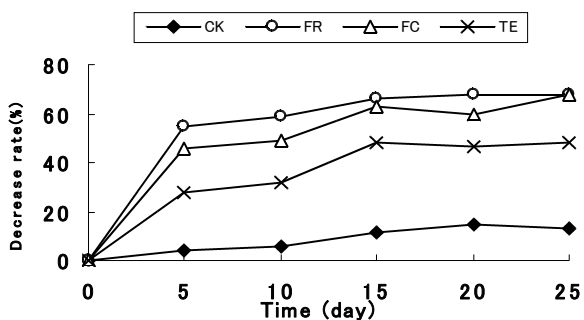


図3 培養期間PAHsの減少動態

#### 3.2 有用微生物のスクリーニング

固体培地での脱色については菌種及び色素による違い

表1 3種の微生物製剤による各PAHs化合物

PAH compound	の減少率			単位:%
	FR	FC	TE	CK
Acenaphthylene(3)	45.4	50.2	49.9	19.1
Fluorene(3)	23.1	43.5	22.5	2.6
Phenanthrene(3)	29.6	19.6	21.7	3.9
Anthracene(3)	48.1	56.5	44.2	30.0
Pyrene(3)	65.3	50.2	28.8	6.7
Benzo(a)anthracene(4)	81.4	73.2	49.4	18.1
Chrysene(4)	78.9	69.7	50.6	11.7
Benzo(b)fluoranthene(4)	88.5	82.8	66.8	18.1
Benzo(k)fluoranthene(5)	86.7	79.8	58.6	2.2
Benzo(a)pyrene(5)	87.9	81.5	67.8	24.4
Dibenzo(ah)anthracene(5)	83.6	76.8	54.7	-0.8
Benzo(ghi)perylene(6)	85.2	79.0	57.5	6.4
Indeno(1,2,3-cd)pyrene(6)	89.6	85.4	80.1	-0.8

\*()内は PAHs の環の数。

が認められた。エノキタケは6種類の色素のうち、NC、Orange II、Acid red 88、RBBRに対して、1~4日間に60~100%を分解した。脱色速度は最も速かった。その他、ブナシメジ及びマイタケの脱色速度も速かった。

液体培地での脱色では、一例として、RBBR色素を用いた脱色試験の結果を図4に、エノキタケによる6種の色素の脱色率を図5に示した。エノキタケ、エリンギ、ブナシメジ及びマイタケは、6種の色素を60~100時間で完全に脱色することができた。なかでも、エノキタケの脱色能が最も高かった。

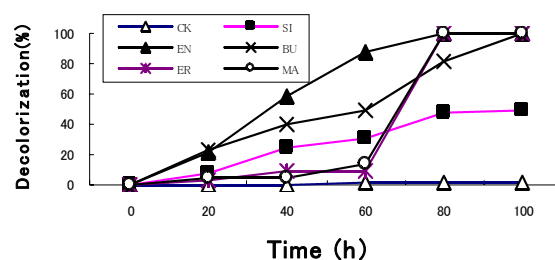


図4 木材腐朽菌によるRBBRの脱色 (CK:対照, SI:シイタケ, EN:エノキ, BR:ブナシメジ, IR:エリンギ, MA:マイタケ)

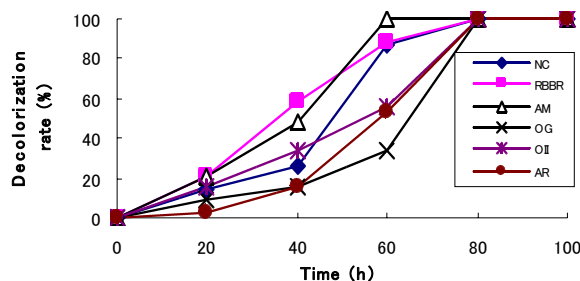


図5 エノキタケによる液体培地で各色素の脱色

#### 3.3 環境因子の微生物活性への影響

菌液濃度の影響については、エノキタケ菌液10%以上、

ブナシメジ菌液30%以上を接種した場合に、60時間の培養で、100%脱色できた(図6、図7)。培養温度の影響については、20~30℃で脱色率が高く、10℃以下、40℃以上では著しく低くなった(図8)。土壌中の脱色率は、両菌種共に液体培地中よりやや低下し(図9)、エノキタケ菌液20%以上、ブナシメジ菌液50%以上を接種しなければ完全な脱色は得られなかった。以上の結果により、エノキタケの脱色能はブナシメジより高いことが判断された。

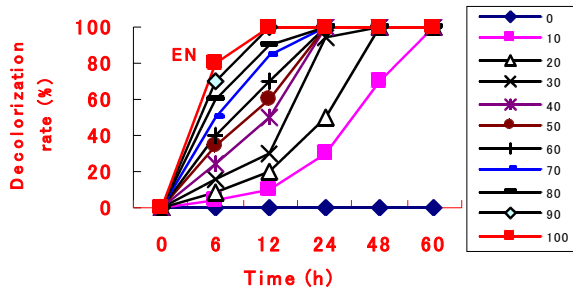


図6 エノキタケ(EN)における異なる接種濃度下での脱色

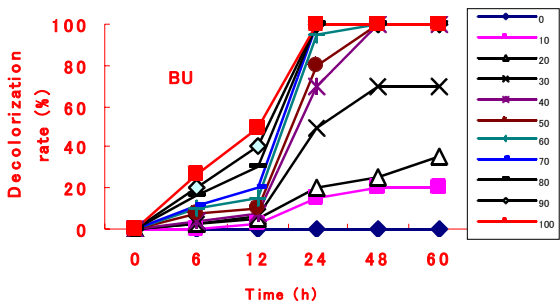


図7 ブナシメジ(BU)における異なる接種濃度下での脱色

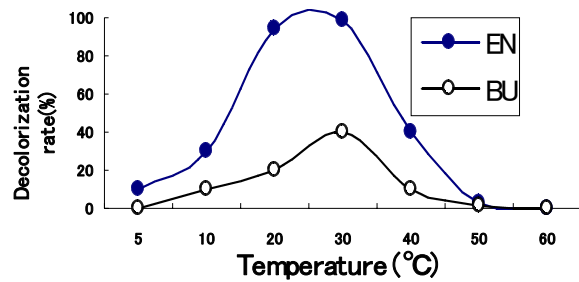


図8 温度による微生物の脱色率への影響

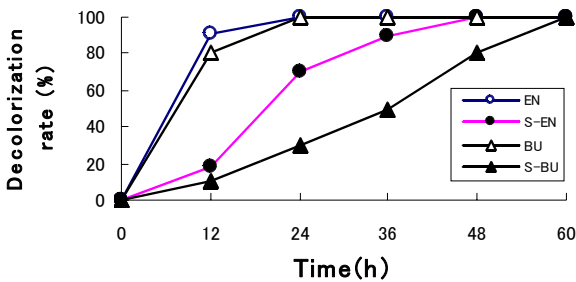


図9 液体及び土壌中での脱色(菌液濃度:100%、Sは土

壤を示す)

### 3. 4 有用植物-微生物の複合浄化システム

#### 3. 4. 1 有用植物-微生物の複合浄化システムにおける植物の生育と微生物の繁殖

ファイトレメディエーションによる汚染土壌修復には植物を健全に育成し、生育量(特に地下部)及び根圏の微生物数を多く得ることが重要である<sup>15,16)</sup>。表2に各処理における40日、80日、120日栽培期間の作物及び土壌微生物数を示す。

MS処理区の土壌微生物数は対照区(CK)と比べて9~40倍に増加したが、植物の生長阻害が認められた。EL処理区はCKと比べ、3種の植物全てにおいて植物重、根重及び土壌微生物数が増加した。EL-PG処理区における120日目の植物重及び根重はCKと比べ、50%増加し、ELの処理による植物生長の促進効果は最も良かった。また、EL処理により、土壌中の微生物数は対照と比べ2~7倍増加した。

#### 3. 4. 2 有用植物-微生物の複合浄化システムにおける土壌中ダイオキシン類の除去

図10に、120日間栽培後の土壌中DXNsの除去率を示す。DXNsの除去率はIG処理を除いて10~41%であり、EL-PG処理の除去率が、最も高かった。また、植物については、PGにおける除去率がRWやIGより高かった。図11に、PG栽培による土壌中DXNs含量の経時的変化を示した。以上の結果、EL-PGの組合せは、汚染土壌中のダイオキシン類を浄化する生物修復手法として有望であることが示唆された。

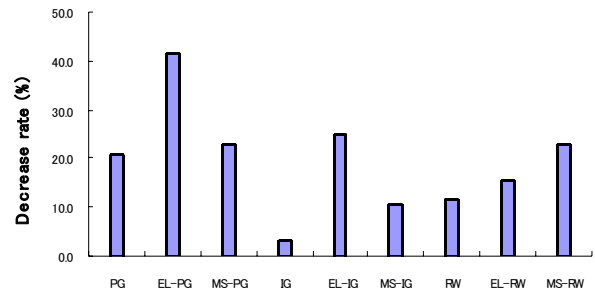


図10 異なる処理における土壌中DXNsの除去率

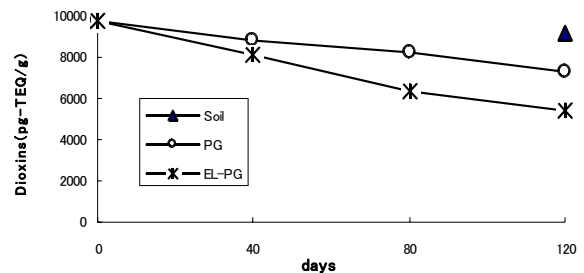


図11 ペレニアルライグラス(PG)栽培及び有用微生物接種による土壌中DXNs含量の変化

表2 異なる処理における植物の生長及び土壌中微生物数

処理	40日目			80日目			120日目		
	植物重 (mg)	根重 (mg)	微生物数 (10 <sup>6</sup> )	植物重 (mg)	根重 (mg)	微生物数 (10 <sup>6</sup> )	植物重 (mg)	根重 (mg)	微生物数 (10 <sup>6</sup> )
PG(CK)	54	18	10	635	305	11	2,300	1,117	14
EL-PG	97	34	21	990	500	27	3,587	1,740	59
MS-PG	44	28	117	277	170	106	780	324	103
IG(CK)	140	50	5	1,515	545	6	2,403	1,320	6
EL-IG	203	61	15	2,095	885	21	2,890	1,660	25
MS-IG	85	30	105	380	151	116	781	324	120
RW(CK)	233	138	2	1,703	640	22	2,277	1,549	12
EL-RW	268	154	14	1,773	680	47	2,597	1,736	55
MS-RW	207	137	90	485	190	201	540	347	188

#### 4 おわりに

本研究は、広範囲な土壌汚染における低コスト、安全、効率的な浄化手法の探索を目標として、有用微生物のスクリーニング、有用植物-微生物の複合浄化システムの構築等に関する研究を行った。これまでの研究で明らかとなったポイントを以下にまとめる。

- (1) 試験した6種類の市販微生物製剤中、2種類の製剤でPAHsに対し分解効果が見られた。しかし、広域的な土壌浄化には大量の製剤を施用する必要があり、製剤の値段(40,000~50,000円/kg)から、処理コストが安価であるとは考えられない。
- (2) 身近なキノコ(木材腐朽菌)から分離した菌種の内、エノキタケ、マイタケ、ブナシメジ及びエリンギの4菌種がRBBR等6種類の合成色素に対して高い分解能力を示し、有機汚染物質を分解できる可能性があると判断された。
- (3) 木材腐朽菌の分解活性と環境因子の関係について、New coccineを用いて検討した。エノキタケは20~30℃での脱色速度が最も高く、接種量が10%でも、New coccineを完全に脱色できたことから、汚染土壌修復への実用が期待される。
- (4) 有用植物-微生物の複合浄化システムについては、エノキタケの菌液で処理することにより、植物生長の促進及び根圏微生物の増殖が認められた。特に、ペレニアアライグラスとエノキタケの組合せは植物の生長及び土壌微生物数の増加が著しく、ダイオキシン類の除去率も最も高かったことから、本組合せは汚染土壌修復には有望な浄化システムであると考えられる。

身近なキノコから分離された4種の微生物は、誘導物質無添加の培養にも拘わらず、高い脱色能を示しており、合成色素以外の汚染物質浄化への応用も期待される。また、有用植物-微生物複合浄化システムは植物の生長及び微生物の繁殖を促進し、土壌中のダイオキシン類の除去率を増加させたことから、種々の有機汚染物質による広域的な土壌汚染処理への応用が期待できる。

今後、構築した有用植物-微生物複合浄化システムにつ

いて、修復効果、最適条件を更に検討するとともに、新たなシステムの構築についても研究する予定である。また、異なる修復システムにおける根圏の生化学的特性についても調査する。将来は、確立した環境修復方法を汚染現場に応用して実用化を目指している。

#### 文 献

- 1) 籾木義郎(2005) 土壌環境保全の現状と今後の課題, 環境技術, 34(1), 39-45.
- 2) Salt, D. E., Smith, R. D. and Raskin, I.(1998)Phytoremediation, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio., 49, 643-668.
- 3) Begonia, M. T., Begonia, G. B., Butler, A. D., Griffin, A. D. and Young, C.(2003) Chemically-Enhanced Phytoextraction of Cadmium-contaminated soils using wheat (*Triticum aestivum* L.), Bull. Environ. Contam. Toxicol., 71, 648-654.
- 4) 石崎絃三, 横田祐司, 星野保, 奥谷猛(2003)土壌汚染物質の植生による高度処理技術に関する研究, 環境保全研究成果集, 2001(2), 47.1-47.29.
- 5) Lelie, A. V. D., Schwitzguebel, J. P., Glass, D. J., Vangronsveld, J. and Baker, A. A.(2001)Assessing phytoremediation progress in the United States and Europe, Environ. Sci. Technol., 35(21), 446-452.
- 6) Anderson, T. A. (1993) Bioremediation in the rhizosphere, **Environ. Sci. Technol.**, 27(13), 2630-2635.
- 7) 王効挙, 李法雲, 杉崎三男(2004)ファイトレメディエーションによる汚染土壌修復の現状と展望, 全国環境研会誌, 29(2), 85-94.
- 8) Minussi, R. C., De Moraes, S. G. and Pastore, G. M.(2001) Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rotfungi in a solid medium: possible role of siderophores, Lett. Appl. Microbiol., 33(1), 21-25.
- 9) Sato, A., Watanabe, Y., Nugroho, N.B., Chrisnayanti, E., Natusion, U.J. and Nishida, H. (2003) Screening for dioxin-degradating basidiomycetes from temperate and tropical forests, World J. Microbiol. Biotechnol., 19(7), 763-766.
- 10) 桑原正章, 伊藤弘道, 平野多江子, 渡辺隆司, 本田与一(199

- 9)きのこによる有毒化合物の分解・脱塩素機構の解明とそのバイオレメディエーションへの応用, 環境科学総合研究所年報, 18, 113-120.
- 11) Lamar, R.T. and Evans, J.W. (1993) Solid-phase treatment of a pentachlorophenol contaminated soil using lignin-degrading fungi, Environ. Sci. Technol., 27, 2566-2571.
- 12) 山口宗義, 関谷敦(2003) 生物機能の解明と新素材の開発に向けた研究環境修復の実用化に向けて担子菌をダイオキシン類の分解に使う, 森林総合研究所研究成果選集, Vol. 2002, 58-59.
- 13) Verma, P. and Madamwar, D.(2003)Decolourization of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*, World J. Microbiol. Biotechnol., 19(6), 615-618.
- 14) Okino, L. K, Fabris, C. and Bononi, V. L. R(2000) Lignolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes, World J. Microbiol. Biotechnol., 16(8/9), 889-893.
- 15) Huang, X. D, El-Alawi, Y., Penrose, D. M., Glick, B. R. and Greenberg, B.M. (2004) Responses of three grass species to creosote during phytoremediation, Environmental Pollution, 130, 453-463.
- 16) Kirk, J. L., Klironomos, J. N., Lee, N. and Trevors, J. T. (2005) The effect of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil, Environmental Pollution, 133, 455-465.

## **Study on Enhancing Remediation of Soils Contaminated by Toxic Substances with Application of Bioremediation Technologies**

**Xiaoju WANG, Mitsuo SUGISAKI and Shigeo HOSONO**

### **Abstract**

This research was carried out to develop low-cost methods for remediation of soils widely contaminated by organic pollutants. We have so far conducted several experiments on decomposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by using commercial microbe products, screening white-rot fungi with high decomposing capacity to organic pollutants, and developing plant-microbe combined remediation systems. The following results were obtained: 1) within the six selected commercial microbe products, two of them showed purification effect on PAHs. However, considering the cost of the products, it is not a low-cost method for using in remediation of large-ranging contaminated soils. 2) Decolorization capacity of some Japanese commercial mushroom to several sythetic dyes was evaluated, Enokitake (*Flammulina velutipes*), Eringi(*Pleurotus eryngii*), Bunashimeji (*Hypsizigus marmoreus*,) and Maitake(*Grifola frondosa*) showed higher decolorization capacity than other fungi. Enokitake showed the highest decolorizaton ability, and complete decolorization of new coccine was achieved in the soil solution containing 10% of Enokitake cultural medium. This suggests Enokitake is possibly suitable for using in soil bioremediation. 3) In the plant-microbe remediation systems, the growth of plant and soil microbes was promoted in the treatments with Enokitake cultural medium. The combination of perennial ryegrass and enokitake produced the highest increase in plant biomass and in number of rhizosphere microorganisms, and the highest removal rate of soil dioxins. Therefore, the combination of plant-microbe systems is considered as a promising technology for remediation of wide-ranging contaminated soils.

**Key words:** Phytoremediation, white-rot fungi, decolorization, soil contamination, dioxins