

ダイオキシン類汚染土壌の嫌気性微生物を利用した分解処理技術の開発

Development of the Anaerobic Bioremediation Techniques for Soil Contaminated with Dioxins

梶 俊 郎 (はた としろう)

東京大学受託研究員 水環境制御研究センター

桑 野 玲 子 (くわの れいこ)

土木研究所 主任研究員

栗 栖 太 (くりす ふとし)

東京大学講師 水環境制御研究センター

矢 木 修 身 (やぎ おさみ)

東京大学教授 水環境制御研究センター

1. はじめに

平成11年に公布されたダイオキシン類対策特別措置法では、多塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン (PCDDs)、多塩素化ジベンゾフラン (PCDFs) およびコプラナー PCB (Co-PCBs) をダイオキシン類と定義している。

ダイオキシン類は、微量でも非常に強い毒性を持つこととともに、生殖機能、甲状腺機能、および免疫機能への影響も疑われている。そのため、ダイオキシン類に汚染された土壌の対策では汚染物質の拡散を防ぎつつ安全に処理するとともに、作業員を含めた住民の健康確保が強く求められている。

著者らは、ダイオキシン類に汚染された土壌を安全に処理する技術としてバイオレメディエーション技術に着目した。修復工法として、現位置微生物の活性を高めることで分解を促進するバイオスティミュレーション技術を選定した。本論文では、提案する修復工法の概要を説明し、実汚染土を用いて行った室内評価試験の結果から、提案する技術の有効性について報告する。

2. ダイオキシン類の微生物分解

ダイオキシン類を対象とした微生物分解では、ジオキシゲナーゼによる好氣的酸化分解および還元的脱塩素反応による低塩素化が知られている。ジオキシゲナーゼを使った好気分解は、高塩素化ダイオキシン類の分解が困難とされる。還元的脱塩素反応では、高塩素化ダイオキシン類の低塩素化に伴って、一時的に毒性の高い中間生成物が蓄積する可能性が指摘されている。本件では、毒性等量 (TEQ 値) の低下を目的とした処理を行うため、毒性等価係数 (TEF) を持つダイオキシン類を低塩素化できる還元的脱塩素反応に着目することとした。還元的脱塩素反応は、主にダイオキシン類および PCB 類に汚染された湖沼や河川の底泥から得られた複合微生物群集により報告されている¹⁾。近年、クロロベンゼンの脱塩素化細菌として知られていた *Dehalococcoides* sp. CBDB1 株が PCDDs の脱塩素化能を持つことが報告された²⁾。CBDB1 株の脱塩素化速度は非常に遅いが、人為的に環境を整えることで、脱塩素化を促進することができれば現位置で安全に処理する効果が期待できる。

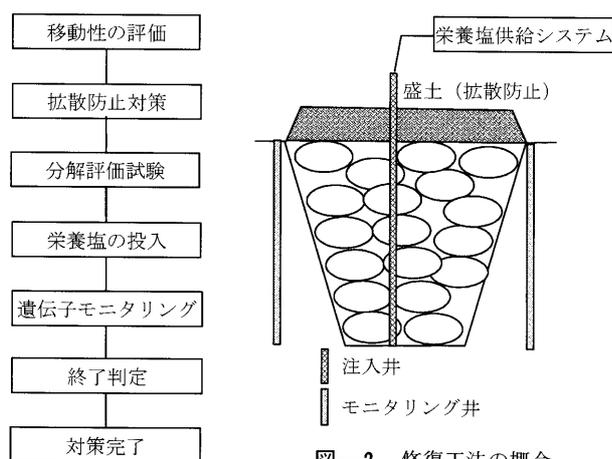


図-1 修復工法の手順

図-2 修復工法概念

3. 修復工法の概要

提案する修復工法の手順を図-1に、修復システムの概念図を図-2に示す。

対策の実施に先立って、ダイオキシン類の移動性評価を行う。地下水位が高い、もしくは透水係数が高い等によりダイオキシン類の移動性が高く、人の健康を害する可能性が高いと判断される場合には、事前に拡散防止対策を実施する。次に、栄養塩類と炭素源の組み合わせに関する分解評価試験を行う。この際、ダイオキシン類濃度の推移とともに、微生物群集解析と分解微生物 (*Dehalococcoides* sp. CBDB1 株) を対象とした遺伝子モニタリングを実施する。

これにより、ダイオキシン類の還元的脱塩素反応に適した条件が整っているかどうかを土壌微生物から精度良く評価することが可能となる。その後、評価試験の結果を踏まえて選定した栄養塩類と炭素源の組み合わせを用いて、栄養塩供給システムにより地盤内に注入することで浄化を行う。浄化期間中は、土壌もしくは地下水のサンプルから DNA を抽出し、微生物群集と、分解微生物を遺伝子情報に基づいてモニタリングする。これにより、ダイオキシン類の分析に比べて安価で、しかも短時間に対象地盤を評価することが可能となる。

論文

表-1 試験土の物性

項目	単位	測定値	試験方法
ダイオキシン類濃度	Pg-TEQ/g	28 000	—
水素イオン濃度	—	7.4 (23.8°C)	土質試験法 -4.1
含水率	%	27.3	土質試験法 -4.1
強熱減量	%	4.3	土質試験法 -4.1
酸化還元電位	mV	328	下水道試験法 -2.3.5(1997)

表-2 試験区一覧

試験区名	炭素源	炭素源濃度	培養条件
1	酢酸	1 000ppm	30°C 120rpm
2	乳酸	1 000ppm	30°C 120rpm
3	糖蜜	1 000ppm	30°C 120rpm

4. 室内評価試験

3. に示す修復工法の適用に先立って、室内評価試験による効果の確認を実施した。ダイオキシン類に汚染されたサイトで採取した土壌サンプルを用い、栄養塩類と炭素源により構成される培地を添加した培養バッチ試験を実施した。土壌と培地それぞれ15gずつを等量混合し、バイアル瓶中に密栓した条件で培養を行った。試験土の物性を表-1に、試験区の設定と培養条件を表-2に示す。培養期間は3カ月とし、1カ月後と3カ月後それぞれのサンプルからDNAモニタリング用に2.0g取りわけた残り全量からの抽出によりダイオキシン類濃度を求めることとした。DNAモニタリング試験では、土壌抽出DNAをもとにPCR-DGGE法による微生物群集解析と、*Dehalococcoides* sp. CBDB1株を特異的に検出するプライマーを用いたPCR法による検出を行った。

5. 試験結果および考察

5.1 ダイオキシン類濃度の推移

試験期間中のTEQ値の推移を図-3に示す。1カ月後には、酢酸試験区において顕著なTEQ値の低下が確認された。3カ月後では、乳酸試験区の濃度低下は認められなかったが、酢酸試験区および糖蜜試験区で濃度低下が確認された。濃度低下が確認された酢酸試験区における、TEF値を持つPCDDsの変化率を図-4に示す。高塩素化ダイオキシン類の低塩素化が確認された。1,3,6,8および1,3,7,9-T₄CDDは速やかに分解されるものの、最も毒性の高い2,3,7,8-T₄CDDが1カ月後に一時的に蓄積する傾向が示された。3カ月後には分解が進んでいることから、長期的には2,3,7,8-T₄CDDの蓄積を抑えながら分解が進むと考えられる。

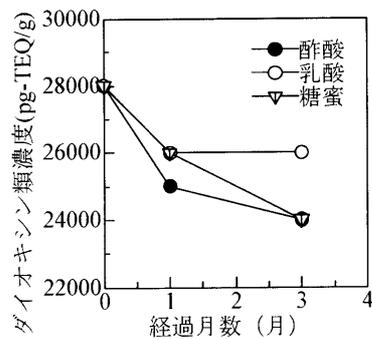


図-3 ダイオキシン類濃度 (TEQ 値) の推移

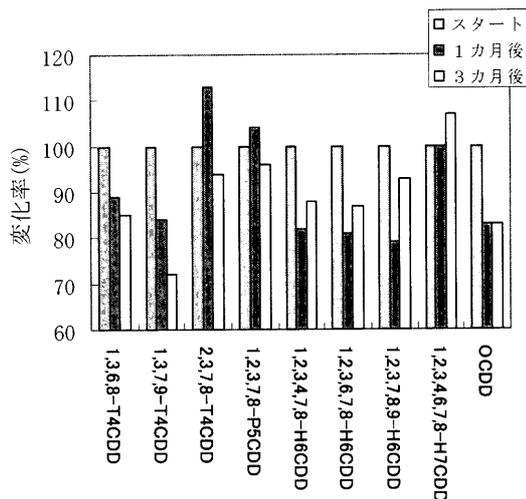


図-4 酢酸試験区のPCDDs変化率

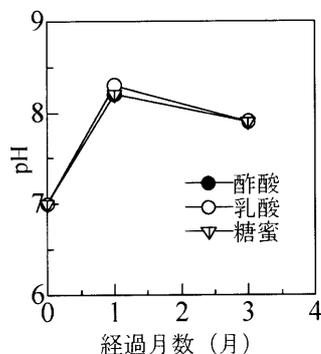


図-5 土壌 pH の推移

5.2 土壌 pH の推移

試験開始から3カ月間の各試験区における土壌 pH の推移を図-5に示す。試験開始から1カ月にかけて pH が上昇し、その後も pH=8.0付近で安定して推移する傾向が示された。以上より、今回用いた培地は長期にわたって土壌 pH を維持する効果が確認された。

5.3 微生物群集構造の推移

DNAモニタリング用に採取した2.0gの土壌から抽出したDNAを鋳型として、ユニバーサルプライマー (GC-341f, 534r) を用いた微生物群集解析 (PCR-DGGE法) を実施した。解析結果を図-6に示す。培養試験開始前と比べて、検出されるバンドの顕著な増加が認められることから、土壌微生物の増殖が確認された。

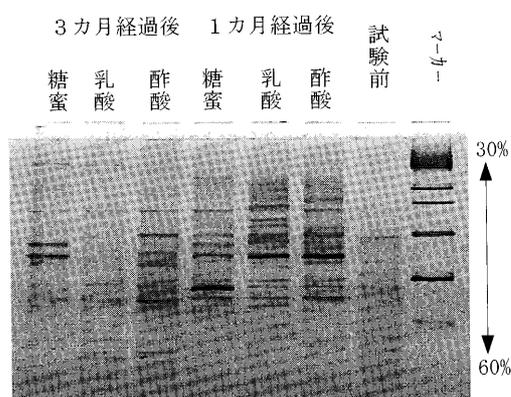


図-6 PCR-DGGE 法による微生物群集モニタリング結果

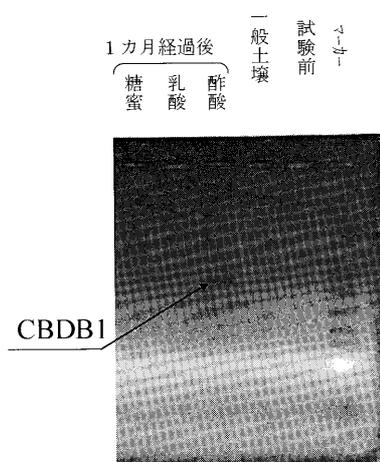


図-7 CBDB1 株のモニタリング結果

1カ月後と3カ月後の比較から、微生物相のシフトが確認された。ダイオキシン類濃度の低下が認められなかった3カ月後の乳酸試験区は、酢酸および糖蜜試験区と比べて検出されるバンド数が少ないことが確認された。この原因については今後検討を進めたい。

5.4 *Dehalococcoides* sp. CBDB1 株の推移

DNA モニタリング用に採取した2.0 gの土壌から抽出したDNAを用いて、*Dehalococcoides* sp. CBDB1株の検出を行った。検出にあたっては、ユニバーサルプライマー (fd1, rP2) で増幅したPCR産物を鋳型とし、CBDB1株を特異的に検出するプライマー (DET730, 1350) によるNested PCR法を用いた²⁾。

1カ月後のサンプルを用いた解析結果を図-7に示す。3試験区の中で最もダイオキシン類濃度が低下した酢酸添加区において、CBDB1株を特異的に検出するプライマーで検出できる菌が検出された。試験前土壌では検出されていないことから、酢酸を添加した条件で培養したことによって検出可能なレベルまで増殖したと考えられる。CBDB1株が検出されていない乳酸および糖蜜試験区においても、TEQ濃度の低下が認められていることから、乳酸および糖蜜試験区ではCBDB1株以外の微生物が分解に寄与している可能性が示された。こちらにつ

いては、さらなる研究が必要である。

5.5 考察

以下、試験区毎に考察することとする。

酢酸を添加した場合、1カ月で3000 pg-TEQ/gの低下が認められるとともに、*Dehalococcoides* sp. CBDB1株の増殖が確認された。以上より、酢酸の添加がダイオキシン類の分解促進に有効であると考えられる。

乳酸を添加した場合、1カ月から3カ月にかけてTEQ濃度の低下を確認することができなかった。微生物群集構造解析の結果から、対象土壌内に生育する微生物種の多様性が減少していることが確認された。この原因については、今後検討を進めたい。

糖蜜を添加した場合、3カ月かけてゆっくりと分解が進むことが確認された。微生物群集構造の解析から、3カ月後のサンプルにおいて集積が進んでいることが確認されており、共代謝などにより長期的にゆっくりとした分解能力を維持する可能性が示されたと考えられる。

6. まとめ

ダイオキシン類に汚染された土壌を対象とし、バイオスティミュレーションの実施に先立って室内試験による効果の検証を行った。本論文の主要な結論は以下のとおりである。

- (1) ダイオキシン類に汚染された土壌にすでに生息している微生物の活性を高めることでTEQ濃度を低下させる効果が得られる。
- (2) 栄養塩類を含む培地に炭素源 (酢酸, 乳酸および糖蜜) を1000 ppmの濃度で添加することにより、3カ月間で最大4000 pg-TEQ/gの濃度低下を確認することができた。
- (3) 対象土壌から抽出したDNAを用いて、微生物群集の推移をモニタリングすることで土壌微生物の状況を評価することが可能となる。
- (4) 栄養塩類を含む培地に酢酸を1000 ppmの濃度で添加して培養することで、PCDDsの脱塩素化能を持つ*Dehalococcoides* sp. CBDB1株の増殖を促進する効果を確認することができた。

謝辞

本研究の遂行にあたって、(株)土木研究所 小橋秀俊 席研究員および森啓年研究員に有益な助言をいただいた。文末ながら謝意を表させていただきます。

参考文献

- 1) Andrei L. B. et al.: Microbial Dechlorination of Historically Present and Freshly Spiked Chlorinated Dioxins and Diversity of Dioxin-Dechlorinating Populations, AEM, pp. 4556~4562, 1996.
- 2) Michael B, et al.: Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium, Nature, pp. 357~360, 2003.

(原稿受理 2004.4.28)