

3 新規高塩素ダイオキシン類分解菌の分離

(主任研究者 古市 徹 北海道大学大学院工学研究科 教授
研究協力者 中宮邦近 日本食品衛生協会 リサーチレジデント)

3.1 要旨

北海道大学近辺の土壌および汚泥より広くサンプリングを行ったところ、寒天培地中のリグニンを脱色し、ハローを形成するカビを分離した。このカビの同定を行ったところ、分生子を形成する無性世代であり、長期間貧栄養培地で培養を行っても完全世代が明らかにならなかったため、形態的な特徴から *Acremonium sp.* と同定した。本菌株を用いてダイオキシン類の分解試験を行ったところ、全量で約 90% を 2 日間で分解した。この時、4 塩素以上のダイオキシン類個々の異性体に対して等しく 90% 前後を分解しており、分解に対する特異性は見られなかった。

3.2 緒論

ダイオキシン類を分解する微生物が数種類見つかっている。真菌類に属する白色腐朽菌、*Phanerochaete chrysosporium* は塩素の置換数に関係なくダイオキシン類を完全に無機化する(1)。この活性は、天然のプラスチックと言われるリグニンに対する分解活性によるものと考えられている。しかしながらこの活性は弱く、反応に一週間以上かかることが示唆されている。また細菌にもダイオキシン類を分解するものが見つかっている。絶対嫌気性の生育条件下でのみ生育するメタン生成菌は高塩素化のダイオキシン類を脱塩素的に分解する(2)。好気性の *Pseudomonas* 属の細菌にはダイオキシン類の分解活性を持つものが見つかっており、分解できる塩素の置換数は 0 から 3 塩素置換のダイオキシン類である(3)。本研究グループでもより活性の強い新しい微生物が見つかっており *Bacillus* に属する高温菌は 4 塩置換した最も毒性の強いダイオキシン類の一種である 2,3,7,8 位に塩素の置換したジベンゾ-p-ダイオキシンを分解した(4)。また有機溶媒に耐性を持つ細菌、*Pseudomonas sp.* は、世界保健機構(WHO)においてダイオキシン類と同等の毒性を持つことから、ダイオキシン類に加えられたコプラナ PCB を分解した(5)。このように様々なダイオキシン類分解活性を持つ微生物が見つかっており、その応用が期待されている。

本研究プロジェクトにおいて、これらの新しい細菌の高い分解活性を利用するため、低塩素化のダイオキシン類のみに限られる分解活性を補うものとして、高塩素化のダイオキシン類を紫外線(UV)を利用した脱塩素的な反応であらかじめ分解する研究を行い、高塩素化ダイオキシン類の脱塩素化反応を確認している。

応用のステージではダイオキシン類の微生物分解活性の比較対照は物理化学的な反応となる。その用途により、様々な視点より効率を考え、それぞれを使い分けるよう研究を行っているが、更に高い活性、あるいは新しい活性を持つダイオキシン類分解菌を検索すれば、応用の幅が広がることはあらためて示すに及ばないであろう。

今回リグニンを脱色する新規カビを分離し、このカビが高塩素のダイオキシン類を高速に分解することを確認したので報告する。

3.3 実験材料と方法

(1) 培養条件

保存および新規ダイオキシン類分解菌の分離にはリグニン 0.1 g、グルコース 1 g、 K_2HPO_4 0.1 g、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/100 ml、NaCl 0.2 g、 $CaCO_3$ 0.2 g、微量塩類溶液($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.01 g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g) 0.1 ml を 100 ml の蒸留水に溶かし pH を 7.0 に調整した培地を用いた。なお固体培地を作成する場合は精製寒天 1.5%を加えた。培養は 30°C で好氣的に行った。

(2) ダイオキシン類分解試験

5 ml 容のスクリーキャップ付き試験管にダイオキシン類(東和科学の分析済み廃液、4 価から 8 価のミクスチャー)を全量で 2 ng 加え、窒素気流下で乾燥し、これにキャップをし、120°C で 10 min 蒸気滅菌した。これに対し別途滅菌した培地に菌体を一白金耳接種した後、培地 1 ml を 5 ml 容のスクリーキャップ付き試験管に加え、キャップを施し培養を行った。

(3) 分析用サンプルの調整

培養後の培地は凍結乾燥によって乾燥し、次に 300 ml のトルエンを用いて固-液抽出(ソックスレー抽出)を 20 h 行った。なお前処理におけるロスを後に換算するために、環境分析に準じて、 ^{13}C ラベルした 2,3,7,8-TCDD、ISOTOPE LABELED CHLORODIOXIN STANDARDS ED-900 (2,3,7,8-TCDD (^{13}C 12,99%) (Cambridge Isotope Laboratories 社製) を内部標準物質として固-液抽出後に 10 ng 添加した。その後、環境庁の「ダイオキシン類に係わる土壌調査暫定マニュアル」(6)を一部修正して前処理を行った。前処理としては、ソックスレー抽出したトルエン相を 10 ml の容量まで減圧下濃縮し、次に有機化合物の分配処理を行うために硫酸を用い、トルエン相を洗浄した。この洗浄は硫酸相の黄色の着色が肉眼で確認出来なくなるまで行った。硫酸処理後のトルエン相は、蒸留水で 2 度洗浄し、残留する硫酸を除き、さらに無水硫酸ナトリウムでトルエン相を乾燥させ、約 1 ml に濃縮した。これを色素成分の除去を行うためにシリカゲル 3 g を内径 10 mm、長さ 300 mm のカラムクロマト管にヘキサンで湿式充填し、その上に無水硫酸ナトリウムを約 10 mm 積層したカラムクロマトグラフィーにアブライした。試料液 1 ml を静かに移し入れ、ヘキサン 150 ml で滴下速度約 2.5 ml/min (毎秒 1 滴程度) の速度でゆっくり流し溶出した。溶出液は最終的に 100 μ l とし、そのうち 1 μ l を分析に用いた。

(4) GC-MS 分析

GC-MS には TRACE GC 2000、GCQ Plus (ThermoQuest 社製) を用いた。カラムには J&W 社製 DB-5 (0.25 mm \times 30 m) を用いた。GC の条件は 100°C で 1 min の保持の後、250°C まで 30°C/min で昇温し、続いて 310°C まで 5°C/min の昇温した後 310°C で 5 分間保持した。またインジェクションの条件は、温度: 270°C (Splitless) で、キャリアーガスとしてヘリウムを用いその流速は 1.0 ml/min (constant flow) とした。MS 条件はイオン源温度を 200°C とし、トランスファーライン温度を 310°C とした。MS/MS の条件は論文値に従った(7)。本試験によってスパイクしたダイオキシンはほぼ 100%回収された。定量には GC-MS 用ダイオキシン類スタンダード、PCDD/PCDF STANDARD MIXTURES EDF-4931 (Cambridge Isotope Laboratories 社製) を用いた。

(5) 試薬

本研究で用いた試薬は、化学実験用の一般試薬を用いた。

3.4 結果と考察

一般にリグニン分解菌はダイオキシン分解活性を有すると言われている、これはリグニンが、グアイアシルもしくはシリンジル骨格等を基本骨格としており、その構造中にはベンゼン環同士をエーテル結合や炭素—炭素の結合によってブリッジを渡した複雑な構造をしており、その構造の中にはダイオキシン類に見られるものが多く存在するからである。そこでこのような複雑な天然化合物を分解する酵素を持つカビであればダイオキシンをも分解するであろうと言うのがそもそもその発想である。またリグニン分解酵素である、リグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼは直接基質であるリグニンに反応せず、メディエーターである、ペラトリルアルコールやマンガンなどを介してリグニンに反応するため、その基質特異性は広い(8)。

そこでダイオキシン分解菌を北海道大学近辺の土壌および汚泥よりリグニンを脱色する活性として広くサンプリングを行ったところ、寒天培地中のリグニンを脱色し、ハローを形成するカビを分離した。分離したカビの顕微鏡写真を Figure 3-1 に示す。このカビの同定を行ったところ、分生子を形成する無性世代であり、長期間貧栄養培地で培養を行っても完全世代が明らかにならなかったため、形態的な特徴から *Acremonium* sp. と同定した (Table 3-1)。本菌株をリグニン 0.1% 含む培地で培養したところ、3 日間でその 85% が脱色された (Figure 3-2)。このことから本菌株を用いてダイオキシン類の分解試験を行ったところ、全量で約 90% を 3 日間で分解した (Table 3-2)。この時 4 塩素以上のダイオキシン類個々の異性体に対しても等しく 90% 前後を分解しており、分解に対する特異性は見られなかった。今後本菌体の応用的な利用が期待できる。

これまでに *Acremonium* sp. と同定されたカビによる、リグニン分解の報告が無く、このことから新規リグニン分解菌である。さらにこのカビはダイオキシン類を分解し、その活性はダイオキシン類の塩素置換数に関係なく、等しく分解を行っている。これまでに報告されている白色腐朽菌では分解に一週間以上かかり、Bumpus (1) らは 2,3,7,8-TCDD を 60 日間で 4% を無機化、また、Valli ら(9)は *P. chrysosporium* により 2,7-DCDD を 27 日間で 50% 分解したと報告している。さらに橘ら(10)が 3 種の木材腐朽菌を用いて、2,7-DCDD を 15、30 日間で 24~85% を分解した。高田ら(11)は、白色腐朽菌の一種を用い 4~8 価の 10 化合物を 2 週間で 50~70% 分解したとの報告がある。さらに、これらの結果から未分解物は毒性の強い 4 塩素置換したダイオキシン類が多いことがわかっている。このことから本分離菌株は等しく分解しており分解活性が優れていることがわかる。



Figure 3-1. Photograph of dioxin-degrading fungi.
Bar; 5 μ m

Table 3-1. Morphological characterization of isolated strain

Septum formation	Yes
Conidia formation	Yes
Spore formation	No
Clamp connection	No

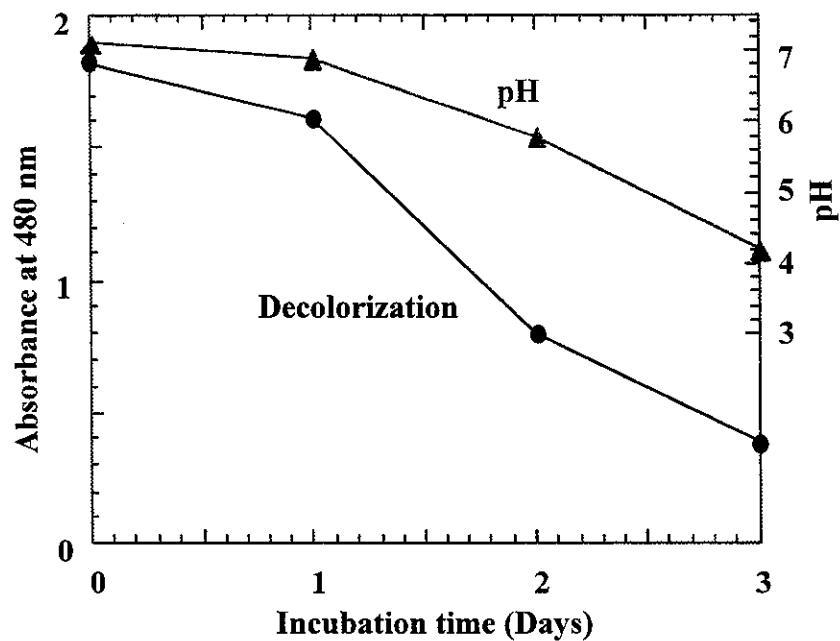


Figure 3-2. Time course of lignin decolorization by *Acremonium* sp.

Table 3-2. Degradation of dioxins by *Acremonium* sp. for 3days

Degradation of dioxins (%)	T4CDD	P5CDD	H6CDD	H7CDD	O8CDD	T4CDF	P5CDF	H6CDF	H7CDF	O8CDF	Total
total dioxins	73	85	79	76	88	81	88	84	84	79	81
TEQ	92	91	82	74	88	99	89	87	77	78	85

参考文献

- 1) Bumpus. J. A et al. : Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus, *Science*, 288, 1434, 1985
- 2) Peter A. et. al.: Bioavailability and transformation of highly chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in anaerobic soils and sediments, *Environ. Sci. Technol.* 29, 2252-2260, 1995
- 3) Armengaud J. et. al.: Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: Catabolic genes dispersed on the genome. *J. Bacteriol.* 180, 3954-3966, 1998
- 4) Nakamiya et. al.: First step toward to the biodegradation of the dioxins by means of a reactor, *Organohalogen compounds*, 40, 535-538 (1999).
- 5) Souda I. et. al.: Isolation of a *Pseudomonas* strain resistant to organic solvents nad capable of degrading coplanar polychlorinated biphenyls. *Biocontrol Science*, 3, 57-62, 1998
- 6) 環境庁水質保全局土壌農薬課, ダイオキシン類に係る土壌調査暫定マニュアル, 1998
- 7) Kemmochi Y.: Rapid PCDD/PCDF screening methods for fly ash with ion trap MS/MS, *Organohalogen compounds*, 40, 160-167 (1999).
- 8) Wariishi H. et. al.: Lignin peroxidase compounds II and III. Spectral and kinetic characterization of reactions with peroxides, *J. Biol. Chem.* 265, 11137-11142, 1990
- 9) Valli K. et al. : Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*, 174, 7, 2131-2137, 1992
- 10) 橘ら : 木材腐朽菌によるバイオレメディエーション (I) ダイオキシン分解能を有する菌のスクリーニングおよび選抜した菌と数種の木材腐朽菌による 2,7-ジクロロベンゼン-p-ダイオキシンの分解, *紙パ技協誌*, 50, 12, 1806-1815, 1996
- 11) Takada S. et al. : Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4323-4328, 1996

III 実用化に向けたプロセス化の検討

(主任研究者 古市 徹 北海道大学大学院工学研究科 教授
研究協力者 中宮邦近 日本食品衛生協会 リサーチレジデント
分担研究者 寺尾 康 (株)クボタ環境研究部 課長)

1. 前処理技術の検討

1.1 総括

(1) ダイオキシン類

ダイオキシン類は、一般にポリ塩化ジベンゾパラダイオキシン (Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, PCDDs) とポリ塩化ジベンゾフラン (Polychlorinated dibenzofurans, PCDFs) の総称であり、その異性体の数は 210 種類存在する。

さらに、最近では同等の毒性を持つ類似のハロゲン化合物をダイオキシン類に含める傾向が見られる。特に、PCBs の一種であるコプラナ PCB は、1998 年に WHO (世界保健機構) により新たにダイオキシン類に認定されている。

本研究において抽出対象としたダイオキシン類は、コプラナーPCB を除く、ポリ塩化ジベンゾパラダイオキシンとポリ塩化ジベンゾフランの各異性体であり、また、そのなかでも、毒性等価係数の対象である 4~8 塩化のポリ塩化ジベンゾパラダイオキシンとポリ塩化ジベンゾフランについて抽出効率を求めた。

(2) ダイオキシン類の物理化学的特性(1,2)

ダイオキシン類の溶解度は、水 1 l に対してマイクログラムからナノグラムと非常に低く、塩素数の増加と共に溶解度は小さくなる。

オクタノール/水分配係数は、有機性の環境汚染物質の中でも最高レベルにあり、脂質や油に対して親和性が強いことがわかる。このことから、ダイオキシン類が土壌や底質に分配されやすいことが示唆される。

(3) ダイオキシン類の毒性について(1,3)

ダイオキシン類の毒性は、発ガン性や生殖異常、催奇性などが知られている。210 種類の異性体のうち、最も毒性が強いのが 2,3,7,8-TCDD であり、他の同族体においても 2,3,7,8-の位置に塩素が置換された異性体には、2,3,7,8-TCDD に準ずる毒性があることがわかっている。これらの毒性は、環境分析の分野では、一番毒性の強い 2,3,7,8-TCDD を 1 とした場合の相対的な毒性を示した係数 (毒性等価係数, TEF) により評価されている。そして、実測濃度にこれらの毒性等価係数を乗じ、2,3,7,8-TCDD の量に換算し (毒性等価量, TEQ)、実際の汚染を示す値としている。本研究において TEQ 換算を行う場合は、1997 年に WHO で再評価されたものを用いた。

(4) ダイオキシン類による環境汚染の現状

日本におけるダイオキシン類の発生源は非常に多様であるが、日本では、燃焼工程に由来するものが主であり、それらには、廃棄物 (一般廃棄物、産業廃棄物) 焼却施設、金属精錬施設など

が挙げられ、特に、廃棄物焼却施設は全体の約 90%を占めると推定されている。

ダイオキシン類による環境汚染は前出したように廃棄物焼却処理施設によるものであるが、焼却施設に関しては、平成 9 年の大気汚染防止法及び廃棄物処理法により排出抑制が講じられたので、大気環境中の濃度は今後低減していくものと予想される。しかしながら、すでに大気中に放出されたダイオキシンの地上への沈着、あるいは焼却処理施設の不適切な管理によって引き起こされた土壤汚染、ダイオキシンを含んだ焼却灰（飛灰も含む）の埋立によって引き起こされる表流水、地下水、及び土壤の汚染が、ダイオキシン類が物理科学的に安定な化合物であることから問題とされている。

(5) ダイオキシン類による土壤汚染

環境庁が平成 10 年度に実施した「ダイオキシン類緊急全国一斉調査」(4) (全国 344 地点を対象)によると、平均値が 6.2 pg-TEQ/g、中央値が 2.3 pg-TEQ/g(検出範囲は 0.00067~110 pg-TEQ/g)であった。焼却施設等の発生源周辺では、平均値が 6.8 pg-TEQ/g、中央値が 2.6 pg-TEQ/g (検出範囲は 0.00067~110 pg-TEQ/g)となっており、必ずしも焼却処理施設周辺であるからといって即修復が必要というわけではない。調査の結果については、「ガイドライン値 (1000 pg-TEQ/g) を超える地点はなかった」と評価している。

しかし、上記調査以前の測定事例 (5) では大阪府能勢町の一般廃棄物焼却施設における汚染 (8,500 pg-TEQ/g) など、非常に高濃度の汚染事例も存在し、このような環境基準値を超えるような汚染土壤は即時に修復対策が必要である。また最近では、実測値の大小に関わらず、埼玉県所沢市や茨城県新利根町のように焼却施設周辺の住民に不安を与えていることも考慮すべきである。

最終処分場が起因のダイオキシン汚染については報告例が少ない。しかし、日本における焼却飛灰、焼却灰中に含まれるダイオキシン類濃度は高濃度であり、最終処分場が周辺環境への汚染ポテンシャル (土壤だけでなく、表流水、地下水への影響) を持っていることが分かる。

(6) ダイオキシン類による汚染物質の処理技術

(a) 環境中での分解(6,7)

ダイオキシン類は環境中で非常に安定で、長期間残留すると考えられている。大気、土壤あるいは底質など、いずれの環境中でも物理化学、あるいは、微生物分解を含めたダイオキシン類の分解が起こり得る可能性が示されているが、その速度は非常に遅く、このことから特別な安定な物質であると考えられている。

その一つである環境中での分解に、光による分解がある。光分解の基本的な分解機構は、ダイオキシンが光エネルギーを吸収することによって分子中の塩素原子が活性化されてフリーラジカルとなって離脱する、脱塩素化である。また、液体に溶解しているときには、主に分子中の塩素が液体中の水素原子と置き換わり、脱塩素化される。また、その他の分解としては、自然環境中に存在する微生物による分解挙動が挙げられる。

しかし、これらの分解は自然環境中で起こっていることであり、言うまでもなく光の透過性を持たない土壤に対して、そこに吸着したダイオキシン類の光分解による浄化は望めない。また、実行するまでもなく、直接土壤のダイオキシン類の分解可能性はかなり低い。

(b)既存の処理技術(8,9)

これまでの研究結果などから、ダイオキシン類の処理技術も大きく分けて、①物理化学的処理、②生物学的処理の2つがある。①物理化学的処理としてはUVオゾン酸化技術、超臨界水による分解技術、アルカリ触媒による低温処理技術、加熱脱塩素化などが挙げられるが、いずれも一部実用化され、速く確実な方法であるが、高コスト、原位置処理が困難で、二次汚染の可能性や新たな化石燃料の消費などのデメリットが考えられる。②生物学的処理としては微生物を用いた分解技術が考えられる。これらには、バイオレメディエーションがあり、地下水汚染、土壌汚染などに対する修復方法として注目されるようになり、ダイオキシン類の分解においてもその効果が注目されている。いくつかの研究例が見られるが、いずれも不十分な研究である。

(7) 本研究の目的

前出したように、ダイオキシン類による環境汚染の現状を考えると主に修復対象とすべきは、不慮の事故などと、廃棄物焼却処理由縁、つまり、焼却施設周辺土壌と最終処分場の浸出水などがあると考えられる。

修復技術においては、汚染濃度が高濃度あるいは低濃度、汚染状況が広範囲、小規模などの汚染状況によって選択すべきだと考えられる。既存の処理技術は、物理化学的処理方法が主で、これらはコストが高いなどから小規模、高濃度の汚染に限られ、これにより、現時点のダイオキシン汚染から、実用化になかなか結びつかない技術も存在する。

ここで、バイオレメディエーション技術のメリットを考えたとき、土壌汚染などの広範囲・低濃度のダイオキシン汚染の改善には、この技術が有効であると考えられる。しかし逆に、高濃度に汚染され、迅速な修復対策が必要とされる場合は、バイオレメディエーションのデメリットである、分解速度の不確かさ、遅さが障害となると考えられる。

そこで、バイオレメディエーションのみでダイオキシン類を浄化するのは現時点では非常に困難なので物理化学的処理技術も組み合わせることによって、あらゆる汚染場に対し対処可能な、出来るだけ迅速、かつ、低コストの実用的なダイオキシン類処理プロセスを構築することが望まれる。

汚染された浸出水は、そのままUV照射やバイオリクターによる無害化の対象となるが、土壌の場合は直接的な処理は難しい。例えば、土壌を対象としたUV照射では、深さ数センチ程度しか光が届かないため、それ以上深い地点の汚染に対する原位置処理は困難であり切り換えしが必要となるが、それを行っても完全なUV処理は難しい。また、土壌を移動して処理する場合においても、汚染土壌を薄く広げるための場が必要となる。いずれの場合にしろ大量の土壌を短時間に処理することは非常に困難であり、不完全な結果を導く可能性が高い。また、土壌をそのままバイオリクターに充填すると、リアクター内の膜がつまるなどの問題が生じてくる。そこで、汚染土壌に含まれるダイオキシン類の液相への移行が必要である。これにより得られた抽出物は、UV照射による分解、バイオリクターにおける分解に還元することができ、これらの分解技術と密接につながるものとして非常に重要である。

これまで、ダイオキシン類を固相(またはスラリー相)から液相へ抽出するといった研究では、公定法でも用いられているようなトルエンによるソックスレー抽出や、その他ベンゼンなどの溶

媒を用いたソックスレー抽出、また、高温、高圧条件下での溶媒抽出法(10)、あるいは、超音波を用いた抽出法(11)などが行われているが、これらは、回収率が高いものの、装置上一回に抽出できる土壌の量が少ない。また、使用している溶媒は、揮発性、毒性が非常に高く、その後の処理を含めて考えると非常に扱いづらく、さらにこれらの装置、溶媒はコストも高い。

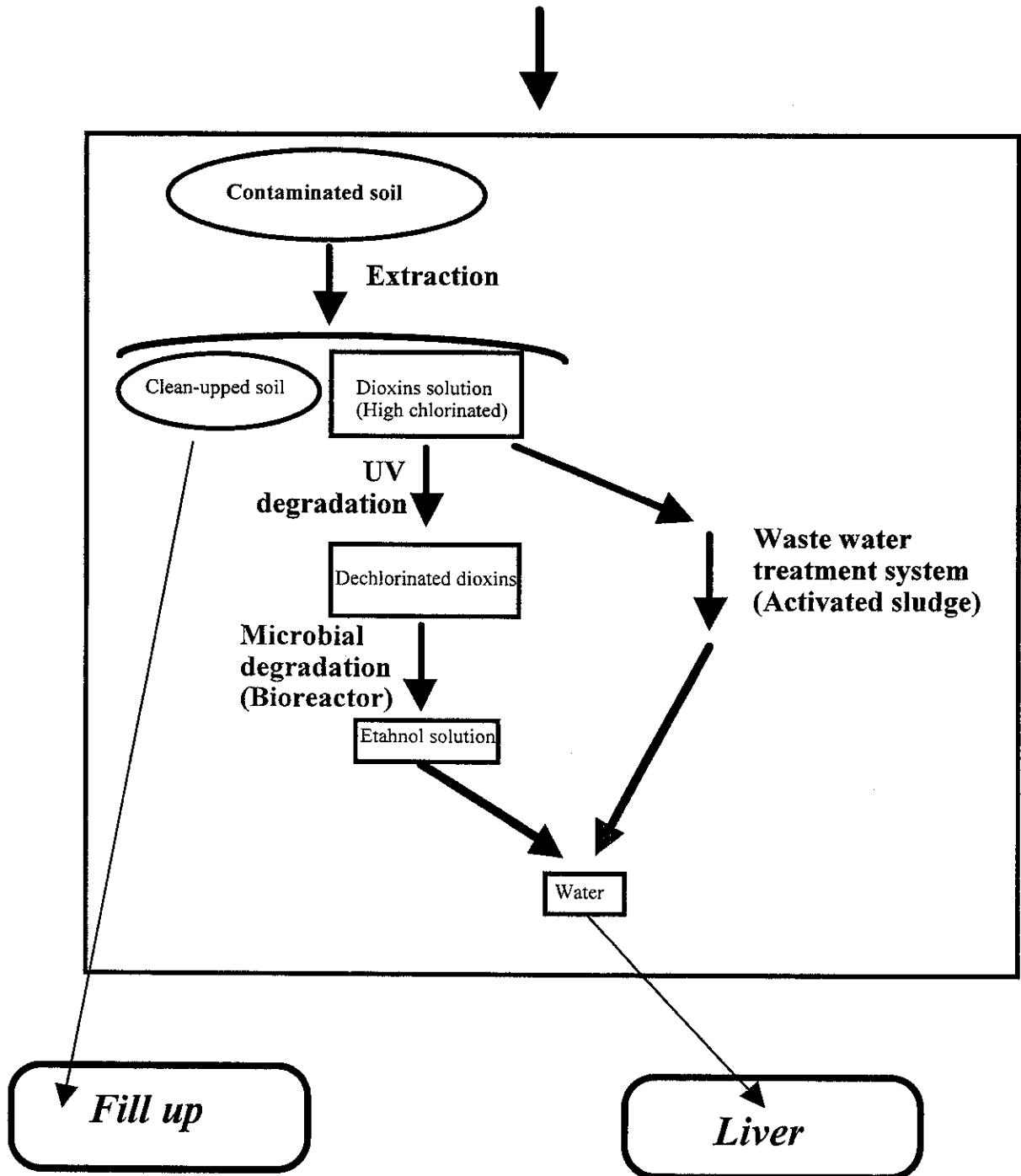
上記のような背景のもと、本研究では実用化を念頭に置いて一回で大量の土壌を比較的簡単な方法、装置で、そして、毒性、コストがあまり高くない溶媒を用いて、効率的にダイオキシン類を抽出する方法を選択する。またこの土壌から抽出したダイオキシン類の処理方法として、UV分解を行い、そして分解後の微量ダイオキシン類を含む排水の処理方法として、活性汚泥を用いた処理方法等を用い、その組み合わせ技術による環境修復の可能性を提案するため、

1. ダイオキシン類汚染土壌の溶媒抽出処理方法
2. 土壌から抽出後ダイオキシン類のUVによる分解の可能性
3. UV分解後のダイオキシン類の活性汚泥による分解処理

の検討を行う。またこれらの現時点において予想しうる分解処理能力から、十分に組み合わせ技術によって処理の実現が可能であると思われるが、実験研究の発展によっては単独で十分な処理が可能になることが期待されたため、考察においてその可能性の検討を行い新たに組み合わせ技術の提案を行った。

以上をまとめて、現時点で考えられる処理プロセスの概念図表す。

Contaminated soil Contaminated water



Early strategy for degradation of dioxins by microorganisms-using methods.

1.2 ダイオキシン類汚染土壌の溶媒抽出処理方法

1.2.1 要旨

ダイオキシン類に汚染された土壌を浄化するため、有機溶媒を用いた土壌の洗浄方法の検討を行った。土壌には能勢町のダイオキシン汚染土壌を用い、有機溶媒には、エタノール、メタノール、アセトン、さらに界面活性剤であるトリトン X-100 を使用して抽出効率を評価した。室温で10分間攪拌し、その溶媒相のダイオキシン濃度と、土壌中に残ったダイオキシンの比から抽出率算出した。その結果、エタノールなど有機溶媒は40%前後のダイオキシン類を全量で土壌より抽出できることがわかった、この時トリトン X-100 による抽出率は10%以下であった。これより、アセトン、メタノールはエタノールに比べて毒性が強いことから、抽出溶媒をエタノールに固定して以後の最適条件の決定実験を行った。次に抽出効率を向上させるため、攪拌時間を変化させて抽出を行ったところ、攪拌開始後1分ですでに50%のダイオキシンは土壌から抽出されており、その後、抽出率は大幅に落ち込んだ。これより効果的な攪拌時間は1分と決定した。さらに攪拌時間を1分に固定した条件下で、抽出温度の影響を調べた。抽出温度を変化させたところ、エタノールの沸点である68.3°Cで80%近いダイオキシン類がメタノール層に抽出された。最後に実用的な使用を考えた場合、土壌中の水の存在を考慮する必要があるため、エタノールと水の混合比の影響を見た。エタノール水の比を変化させて、68.3°Cで抽出を行ったところ、エタノール濃度80%で土壌中のダイオキシン類はほぼ100%抽出され、抽出には水が存在していた方が有利であることが示唆された。以上の結果から、最適な抽出条件は、エタノール濃度80%、攪拌時間1分、温度68.7°Cであった。

1.2.2 結論

溶媒を用いダイオキシンを土壌から抽出する方法は、環境分析等において分析を行う行程で実際に使われていることから汚染土壌の洗浄そして環境修復といった大規模な設定においても有効な方法と思われる(12)。しかしながら、環境分析等で用いられている手法をそのまま実際の環境修復に用いるには幾つかの弊害がある。それは実汚染土壌の汚染は微量でかつ多量の土壌の処理が必要であるため、実際の使用を目的とするためには、16時間かかる環境分析での処理時間を短縮し、ソックスレー抽出器にかわる手法を考え、さらに多くの汚染土壌を扱えるように工夫しなくてはならない。また抽出に用いるトルエンは極めて毒性が強く、また高価であるため、なにがしかの安価で毒性の低い溶媒あるいは界面活性剤を選定する必要がある。

ダイオキシン類による汚染土壌の修復を目的とした溶媒抽出技術の開発に関する報告は私たちの知る限り存在しない。わずかに界面活性剤については、いくつかの種類が実用化されているが、既存の研究では陰イオン界面活性剤の一種である、直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (linear alkylbenzene sulfonate, LAS) を一定濃度で加えたものと、純粋な水とを用いて土壌などを対象としたダイオキシン類のカラム溶出に関する研究などが行われている(13)。LASを用いた結果、純水でのダイオキシン類の溶解度を超える濃度が溶出されていることが示されたが、6塩化以上のダイオキシン類は顕著に溶出されているが、TEQ換算に重要な毒性の高い4および5塩化のダイオキシン類がほとんど溶出されていない。

1.2.3 実験材料と方法

(1) 土壌試料

実験で用いる試料は大阪府能勢町の焼却処理施設「豊能郡美化センター」周辺の土壌である。土壌を約 20cm 程度掘削して混合された状態のものを使用した。サンプルはあらかじめ乾燥機にて乾燥させ(20 h、110°C)。土壌から石や木の葉などの大きな夾雑物を取り除き、さらに粒径を調節するため 2 mm メッシュ以下のふるいにかけた。研究期間中、数度土壌の含水率を測定し、1%前後の状態が保たれていることを確認した。土壌の性質は、強熱減量から約 20%が有機成分であると思われた。

(2) 液相抽出実験 (装置 : Figure 1-1)

抽出にはダイオキシン類の吸着を防ぐためテフロンチューブ (50 ml 容) を用いた。容器内で土壌と溶媒が十分に攪拌されるように、加える溶媒全量で 40 ml 程度を限界と肉眼で確認したため、重量体積比を 10%と固定した。次にテフロンチューブに試料である汚染土壌と溶媒を加え、回転振とう器、ROTATOR RT-50 (株タイテック社製) にセットし、27 rpm/min の回転速度で振とう操作を行った。振とう後、遠心機、日立高速冷却遠心機 CR21F (HITACHI 社製) を用いて 3,000 rpm/min、10 min、4°Cの条件で遠心分離を行った。液相を取り分ける際に、固相を混入させないために、液相、固相の境界ぎりぎりまでは分取せず、メスシリンダーで液量を把握し、分析時に固相に残った液相に含まれているダイオキシン類の補正を行った。固相は、ソックスレー法を用いてダイオキシン類を抽出するため、容器のまま 110°C、20 h 乾燥させた。

(3) 分析用サンプルの調整

液相は 50 ml のトルエンに対して液-液抽出し、固相は 300 ml のトルエンを用いて固-液抽出 (ソックスレー抽出) を 20 h 行った。なお、前処理におけるロスを後に換算するために、環境分析に準じて、13C でラベルした 2,3,7,8-TCDD、ISOTOPE LABELED CHLORODIOXIN STANDARDS ED-900 (2,3,7,8-TCDD (13C12,99%) (Cambridge Isotope Laboratories 社製) を内部標準物質として、液-液、固-液抽出後に 10 ng 添加した。その後、環境庁の「ダイオキシン類に係わる土壌調査暫定マニュアル」(12)を一部修正して前処理を行った。前処理としては、液-液及びソックスレー抽出したトルエン相を 10 ml の容量まで減圧下濃縮し、次に有機化合物の分配処理を行うために硫酸を用い、トルエン相を洗浄した。この洗浄は硫酸相の黄色の着色が肉眼で確認出来なくなるまで行った。硫酸処理後のトルエン相は、蒸留水で 2 度洗浄し、残留する硫酸を除き、さらに無水硫酸ナトリウムでトルエン相を乾燥させ、約 1 ml に濃縮した。これを色素成分の除去を行うためにシリカゲル 3 g を内径 10 mm、長さ 300 mm のカラムクロマト管にヘキサンで湿式充填し、その上に無水硫酸ナトリウムを約 10 mm 積層したカラムクロマトグラフィーにアブライした。試料液 1 ml を静かに移し入れ、ヘキサン 150 ml で滴下速度約 2.5 ml/min (毎秒 1 滴程度) の速度でゆっくり流し溶出した。溶出液は最終的に 100 μ l とし、そのうち 1 μ l を分析に用いた。

(4) GC-MS 分析

GC-MS には TRACE GC 2000、GCQ Plus (ThermoQuest 社製) を用いた。カラムには J&W 社製 DB-5

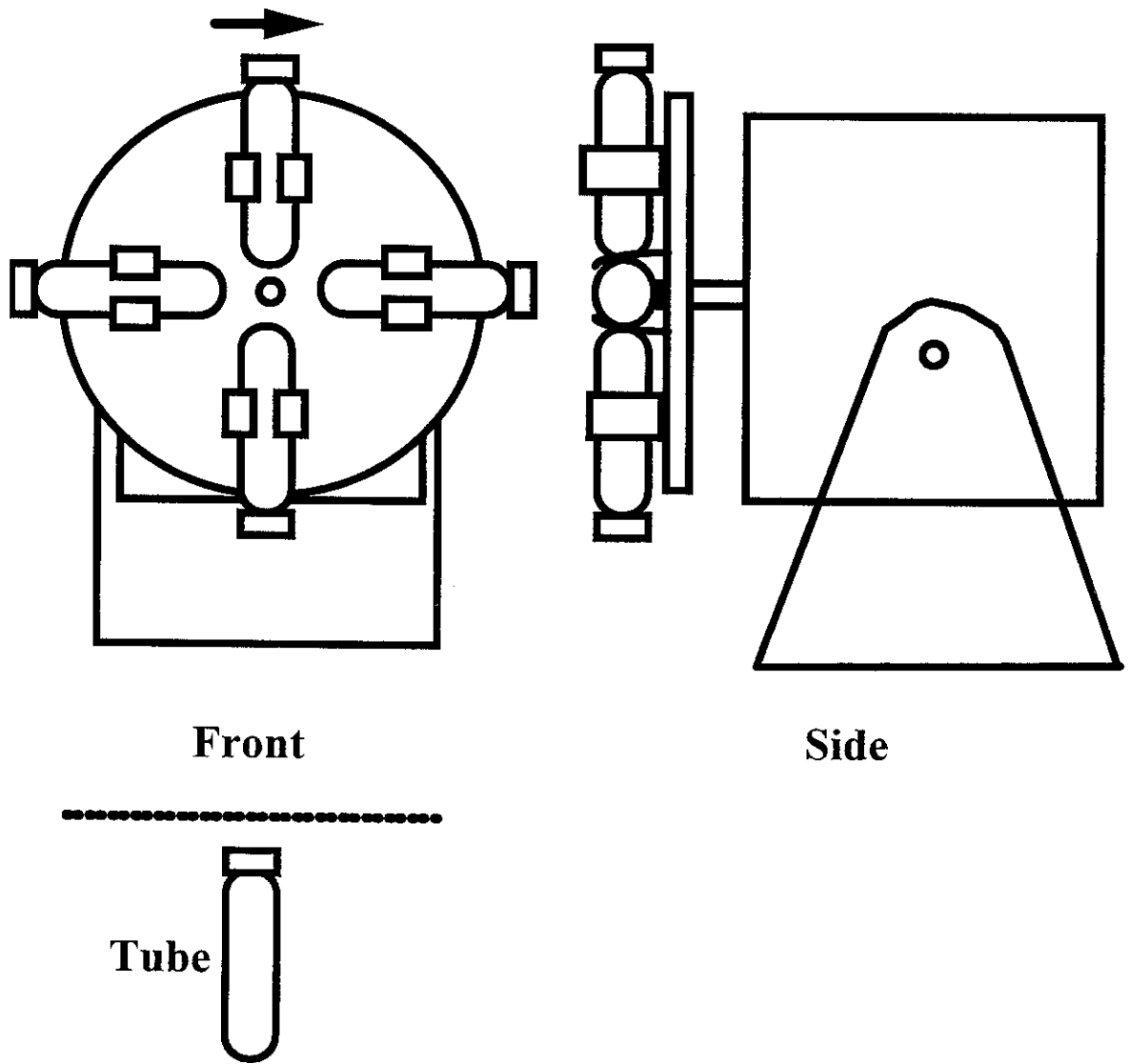


Figure 1-1. Soil agitation apparatus.

(0.25 mm×30 m) を用いた。GC の条件は 100°C で 1 min の保持の後、250°C まで 30°C/min で昇温し、続いて 310°C まで 5 °C/min の昇温した後 310°C で 5 分間保持した。またインジェクションの条件は、温度:270°C(Splitless)で、キャリアーガスとしてヘリウムを用いその流速は 1.0 ml/min (constant flow)とした。MS 条件はイオン源温度を 200°C としトランスファーライン温度を 310°C とした。MS/MS の条件は論文値に従った(14)。本試験によってスパイクしたダイオキシンはほぼ 100%回収された。

(5) 試薬

本研究で用いた試薬は、化学実験用の一般試薬を用いた。

1.2.4 結果と考察

(1) 液相抽出に用いる溶媒の選定

溶媒選定実験をするに先立って、まず選定試験に使用する溶媒を決定した。トルエン等の極性の低い、かつ毒性の高い物質は実際の応用的使用では抽出後の土壌中に残った有機溶媒の環境に与える毒性や、作業中の作業員の健康管理を考えると実用化に向かないため、水溶性の極性の高い物質の使用を考えた。そこでエタノール、メタノール、アセトンなどの比較的毒性の低い溶媒を使用することにした。また界面活性剤としては LAS ではなく工業的によく使用される非イオン系の界面活性剤で、ダイオキシン類のイムノアッセイ試験キットの分散媒としても用いられているトリトン X-100 を使用した。

また実際の使用を考えると、スケールアップ時に再度装置の検討をする必要があるので、現時点では最も簡略化された装置を用いることにし、密封したテフロンチューブを回転振とうさせるものを用いた。

まず始めに溶媒の選択を行うため抽出条件を以下のように固定した。重量体積比は肉眼によって攪拌が良好に行われている状態でなおかつ、各溶媒のダイオキシン類の溶解率の 1,000 倍前後と推定できる 10% (試料 3.6 g、溶媒 36 ml) とした。また抽出温度は室温(20°C)に固定し、攪拌時間は 10 min とした。使用溶媒はメタノール、エタノール、アセトンそして界面活性剤 (トリトン X-100) 濃度 3 種類 (0.1%、0.01%、0.001%) を用いた。

Figure 1-2 に結果を示した。これら実験結果から、メタノール、エタノール、アセトンによる抽出に差はなく、重量体積比:10%、溶媒温度:室温 (20°C) 抽出時間、10 min、溶媒比 100%の条件で 50%前後が抽出された。

抽出対象が土壌ではないが、抽出方法の差によるダイオキシン類の焼却飛灰からの抽出率を比較した研究(11)においては、ソックスレー抽出 (24 h、トルエン) による結果を 100%とすると、超音波抽出 (1.5 h、68°C、トルエン) で 70%抽出されていることから、この時点において、超音波抽出と比較して、消費エネルギー的にも効率が良い方法であると言える。

ここで抽出溶媒を選択する上でコストや毒性など、また、その後の分解技術への適用性などを総合的に判断するため、まず溶媒の毒性について検討した。化学薬品の文献(15)より、急性毒性や経口毒性、また、溶媒を使用する際の適用法令数などを参考にした。その結果、メタノールは、他の 2 つの溶媒と比較して、とりわけ毒性が高いと判断でき、また、エタノール、アセトンにはあまり差が無かった。次にコストに関しては、化学薬品の文献(15)より検討した。エタノールの

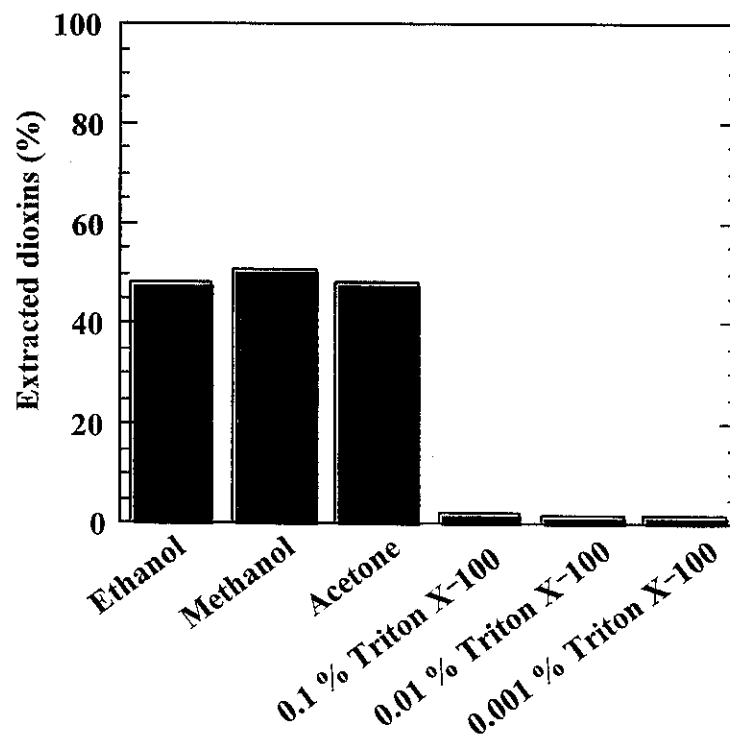


Figure 1-2. Effect of solvent on the extraction of dioxins from contaminated soil.

価格は、アセトン、メタノールよりも変動が大きいですが、コストは高い順にアセトン、エタノール、メタノールとなった。さらに溶媒への抽出後は、UV 照射による処理につなげる可能性も想定しており。具体的には、抽出溶媒を濃縮し、それを水相に添加して UV 照射あるいはバイオリクターに繋げようと考えている。特に UV 照射による分解を行う場合、実用化のためにさらに手間を省くことを考えると、溶媒を濃縮せずに、水相に添加、あるいは溶媒相に直接 UV 照射を行う場合も考えられる。その際、分解に影響する溶媒の UV 透過率を検討した。そこで、メタノール、エタノール、アセトンについて、紫外線領域における透過率を、吸光度に判断した。その結果、メタノール、エタノールは紫外線領域で吸収がほとんどなく、アセトンは完全に吸収され、吸収値が紫外線領域すべてで極大となり、使用した溶媒のうちアセトンのみ、UV を吸収することから、透過率が悪いと判断した。

また、本実験と類似した研究では、ベンゾピレン汚染土壌の浄化に関する研究(16)が行われており、これによると、ベンゾピレン汚染土壌を用い、重量体積比 33%、抽出温度 30°C、抽出時間 24 h で各種溶媒（エタノール、メタノール、アセトニトリル、アセトン、ベンゼン、ジクロロメタン）によりベンゾピレンの溶媒抽出を行ったところ、抽出率はジクロロメタンが一番良く 95%、その他の溶媒においては、80~86%となっており、溶媒による差はあまりないという結果だった。そして、ジクロロメタンは非常に毒性が高く使用が制限されるべきであり、その他の溶媒を比較すると、安全性、経済性の観点から優れていること、抽出能力に差がないことから、エタノールを最適溶媒として選定している。

上記してきた、実験結果とその他の検討項目より総合的に判断して、汚染土壌からダイオキシン類を抽出するために用いる最適溶媒をエタノールと決定し、以後エタノールを用いて抽出条件を検討した。

(2) エタノール抽出における抽出時間の影響

抽出時間を変化させてダイオキシン類全量の抽出率の影響について検討を行った。攪拌開始 1 min で抽出率は直線的に増加し、その後徐々に右肩上がりで増加した(Figure 1-3)。これから、本実験装置によるエタノールと土壌の均一な攪拌が 1 min で十分になされたものと考えられ、その 1 分間に抽出装置の攪拌が制限要因となっていたダイオキシン類はほとんど抽出されたと考えられた。

そこで、抽出時間を 1 min に固定して以後、他のファクターについて抽出率向上の検討を行った。

(3) 抽出温度の検討

ダイオキシン類の土壌からの抽出におけるエタノール温度の影響をみるため、攪拌時のエタノール温度を変化させて抽出を行った。Figure 1-4 より、ダイオキシン類全量に関して、溶媒温度の増加に伴い、抽出率が高くなった。最終的に 78.3°C では、抽出率は 80%前後まで達した。

ダイオキシン類の液相抽出に関する既存の研究では、抽出操作や抽出時間などを比較している論文はあるものの、抽出溶媒の温度を振って他の条件を固定して抽出率を比較しているものは見られない。しかし、単純に考えると溶媒の温度を上げることは熱エネルギーをより加えることであって結果的に疎水性の脱着を起こしやすくしていることは明白である。

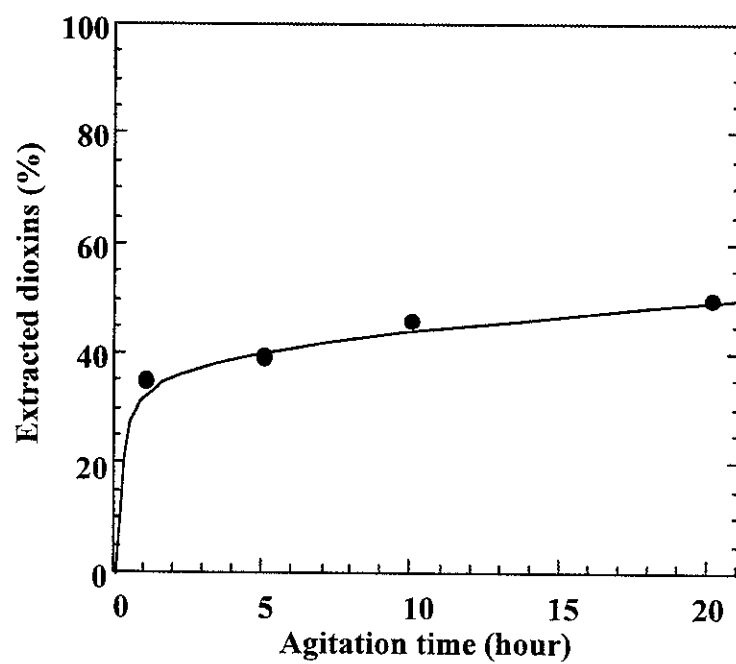


Figure 1-3. Effect of agitation on the extraction of dioxins from contaminated soil

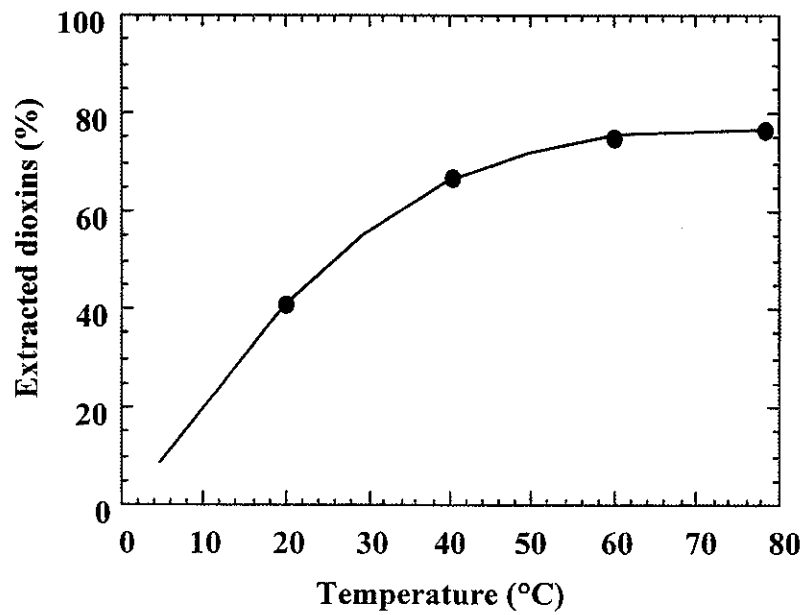


Figure 1-4. Effect of temperature on the extraction of dioxins

抽出に用いる溶媒温度に関しては、実用化の段階では、抽出後のエタノールは熱を加えて気化させ、これを回収することを想定しているため、溶媒に熱を加えることによるエネルギー的なマイナス面は実用化に際して少ないと考えられる。結果、これほどの昇温により、抽出率が格段に上がることを考慮すると、溶媒温度は 78.3°C の条件で抽出を行うのが好ましいと考えられる。

しかし、抽出時間 1 min、溶媒温度 78.3°C の条件では、全ダイオキシン類の抽出率が約 77% となり、汚染が低濃度である場合は、この抽出率で十分かもしれないが、高濃度の汚染の場合は、土壌に残存するダイオキシン類が無視できない。

(4) 水—エタノール比の検討

ダイオキシン類の土壌からの抽出における、水の影響をみるため、水—エタノール濃度を変化させてその影響をみた。Figure 1-5 より、ダイオキシン類全量に関しては、水—エタノール比が 20:80 のときに抽出率が約 96% となっており、それよりも高いあるいは低い比率では抽出率は減少している。また Figure 1-6 より水—エタノール比が 20:80 での TEQ の抽出率は約 99% という結果が得られた。

溶媒比により抽出率が変化することは、フミン物質の影響が非常に大きいと考えられる。既存の研究(17-19)では、フミン物質と有機汚染物質、特に難水溶性の有機化合物がフミン物質との吸着、分配、可溶化などといわれる相互作用により、水溶性が増し、広範に分散する現象などがあり、また、特に疎水性の有機化合物（多環芳香族化合物、ダイオキシン類、PCBs など）が溶存フミン物質との結合により、移動を容易にしていると見られる、としている。これから考えると、多少の水を加えることにより、フミン物質に吸着したダイオキシン類が、液相に抽出されてくる等の効果が考えられる。しかし、溶媒比を小さくすると、もともとのダイオキシン類の性質である、疎水性の影響が大きくなってしまい、抽出されにくくなる。そこで、一番抽出されやすい水—エタノール比が 20:80 であるという結果になったと示唆される。既存の研究では、溶媒比を変化させて、土壌からのダイオキシン類抽出率の変化を追ったものはないが、ポリクロロフェノール (PCP) を対象物質として行われた研究(20)では、本実験の結果とは比率は異なるものの、約 50% のエタノールを用いたときが一番抽出されているという報告もあり、フミン物質のみではないが、これらの極性物質が関与していることが十分に予想される。

今回は、イオン交換水、エタノールの順番に注入し、抽出作業を行ったが、あらかじめ 80% エタノールを作成し、これを用いて抽出し、上記と同様の結果が得られれば、実用化の際の作業はそれほど困難ではない。また逆に、本研究で用いている試料は、1.2.3(1)で述べたとおり乾燥させた状態にあるが、抽出作業の前に汚染土壌の含水率を測定し、水—エタノール比が 20:80 となるように調整すれば、汚染土壌を乾燥させる工程を省くこともできる。

以上の結果、重量体積比、10%、抽出時間、1min、溶媒温度 78.3°C、水—エタノール比が 20:80 の条件で、全ダイオキシン類の約 96%、TEQ の約 99% が溶媒中に抽出された。

これらの実験条件は、いずれも実用化した際の作業としては十分可能である。また、実用化に向けてさらに検討しなくてはならない項目を考えると、大量の土壌を一回にどれだけ抽出が可能か、とすることを検討するために、上記実験条件による抽出率を下げないで、どの程度まで重量体積比を大きくできるかが項目として挙げられるだろう。本方法は非常にシンプルであり、検討