

内分泌攪乱化学物質の生物処理システムの開発と 廃棄物処分場浸出水処理への応用

大阪大学大学院薬学研究科 永瀬裕康

1. 目的

近年、内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）による環境汚染が社会的な問題となっている。特に、ビスフェノールA、フタル酸エステル等が河川・湖沼・海洋等の水系環境中から高い頻度で検出されているが、その主要な発生源の一つとして、廃棄物処分場からの浸出水が注目されている（図1）。浸出水は廃棄物処分場内に雨水や地下水が浸入することにより発生する排水であり、この浸出水を介した有害有機物質による周辺環境の汚染が懸念されている。一般に浸出水の組成は、処分された廃棄物の種類やその廃棄物処分場の使用期間により大きく変動する。処分場の使用期間の経過に伴い浸出水中の生物的酸素要求量(BOD)は減少し、難分解性有機物質が炭素成分の多くを占めるようになる。

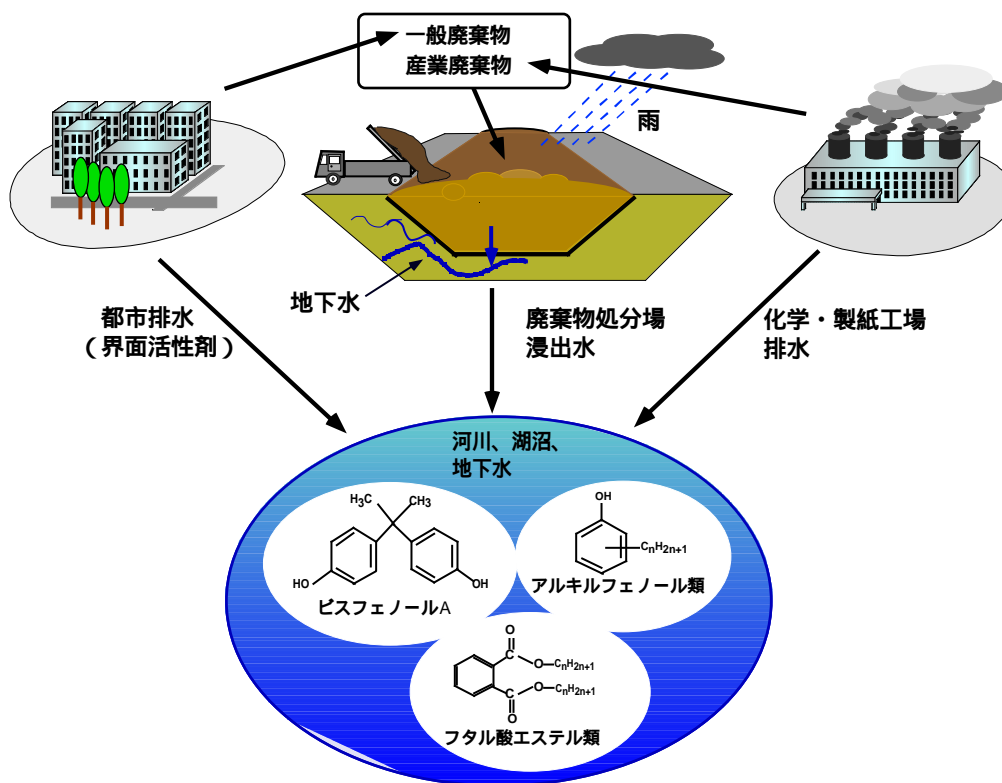


図1 環境中で検出される環境ホルモンとその排出源

また、浸出水に含まれる有害有機物質に関しては、特に廃プラスチックや焼却灰を含む廃棄物処分場から排出される浸出水に多くの内分泌攪乱化学物質が含まれていることが報告されている。その中でも特にビスフェノールAは 0.005 - 74 μM という非常に高い濃度で検出されており、早急な対策が求められている。

微生物を利用した排水処理には、これまで細菌や真菌類等が主に用いられてきた。これらは従属栄養微生物であるため、その活性を維持するためには栄養源として多量の有機物が必要である。しかし、廃棄物処分場の浸出水にはこれらの微生物が利用可能な有機物をあまり含まないものが多く、浸出水処理に利用するには増殖基質を添加する必要がある。一方、微細藻類は太陽光をエネルギー源、 CO_2 を炭素源として、光合成により独立栄養的に増殖することが

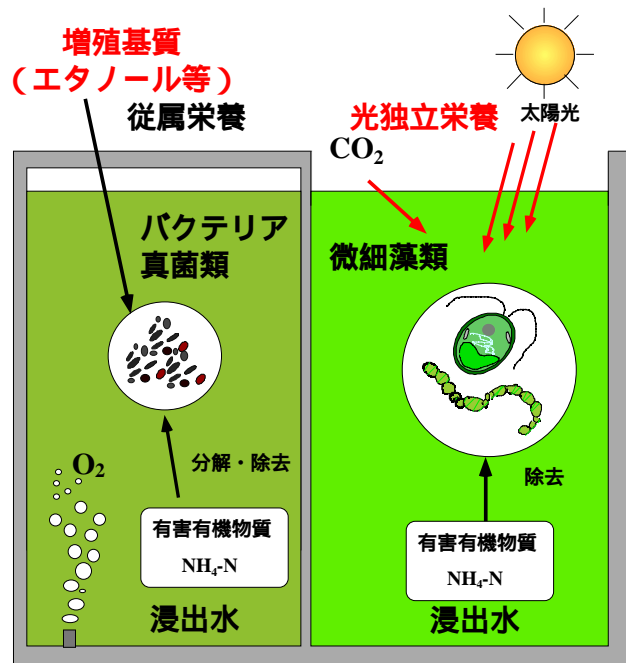


図2 浸出水の生物処理における微細藻類の利点

できるため、有機物をあまり含まない浸出水の処理に適していると考えられる (図2)。これまで我々は微細藻類に着目して内分泌攪乱化学物質の処理について検討を行い、緑藻 *Chlorella fusca* がビスフェノールAの分解能を持つことを新たに見出した。そこで本研究では、浸出水中に含まれる内分泌攪乱化学物質であるビスフェノールA、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類等を、光独立栄養的に増殖できる微細藻類を用いて処理するための基礎技術の確立を目的とし、微細藻類によるビスフェノールA処理条件の検討、種々の内分泌攪乱化学物質処理能力の評価、モデル浸出水を用いた応用に向けた検討を行った。

2. 方法

2.1 ビスフェノールAの処理条件

緑藻 *C. fusca* (IAM C-28) は、200 ml の藻類用培地 (MBM) (表1) を 500 ml の試験管に入れ、27.5%、1% CO_2 を通気して培養を行った。基本条件として、

蛍光灯の光強度 18 W/m²、ビスフェノールA濃度 40 μM を用いた。初期細胞濃度、ビスフェノールA濃度、光強度、光照射周期を変化させ、ビスフェノールA処理に及ぼす影響を調べた。ビスフェノールAの測定は、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて行った。

2.2 浸出水中に含まれる他の内分泌攪乱化学物質の分解

C. fusca を用い、ビスフェノールA以外の内分泌攪乱化学物質として *p-tert*-ブチルフェノール、*p*-ノニルフェノール、フタル酸ジエチルの除去能を調べた。ビスフェノールAと同様の培養条件を用い、HPLC により測定を行った。

2.3 モデル浸出水中のビスフェノールAの処理

微細藻類を用いて浸出水の処理を行うためには、浸出水成分の影響を検討する必要がある。そこで、リン酸、アンモニアについては海外の、その他のイオンについては日本の浸出水の報告を参考に、表1に示すモデル浸出水を作製し、半回分培養によりビスフェノールAの繰り返し処理を行い、長期処理の安定性について検討した。

表1 浸出水、藻類用培地、モデル浸出水の組成

イオン	濃度 (mg/l)		
	浸出水* (日本)	藻類用培地 (MBM)	モデル浸出水
K	8.3 - 1900	181	500
Mg	10.1 - 120	7.4	7.4
Na	59 - 5900	10	3000
Ca	68 - 1500	3	1000
B	0.13 - 83.9	0.5	10
Mn	0.05 - 4.43	0.57	0.57
Zn	0.03 - 0.1	0.05	0.05
Cu	0.07 - 0.1	0.02	0.02
Fe	0.07 - 5.7	0.4	0.4
NO ₃ ⁻	14.7- 51.5	153	20
SO ₄ ²⁻	57.6 - 1463	31	1000
Cl ⁻	49.6 - 10813	20	6000
PO ₄ ³⁻	—	163	4
NH ₄ ⁺ -N	—	—	200

*A. Yasuhara, Waste Manage. Res., 17, 186-197 (1999).

A. Yasuhara, J. Chromatogr. A, 774, 321-332 (1997).

K. Yamada, J. Japan Soc. Water Environ., 22, 40-45 (1999).

3. 結果

3.1 処理条件の検討

最初に、*C. fusca* によるビスフェノールA除去に対する初期細胞濃度の影響を調べた。連続明条件下において細胞濃度を 0.07 から 1.2 g dry wt./l まで変化させたところ、培養液からの除去速度は細胞濃度と共に増加したが、増加の割合は 0.3 g dry wt./l 以上では低くなった。一方、屋外培養池では培養できる細胞濃度には限界がある。そこで、本研究では、良好な除去と細胞増殖が見られた約 0.3 g dry wt./l の初期細胞濃度を以下の検討に用いた。この条件でビスフェノールAの処理を行った場合の代表的な結果を図3に示す。

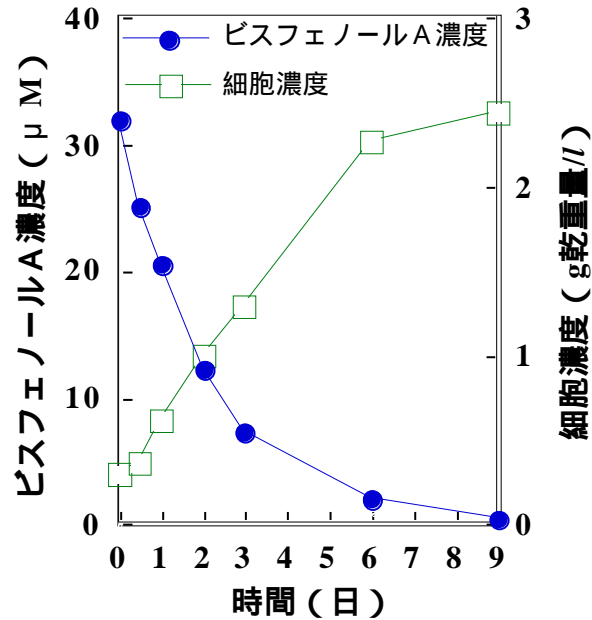


図3 *C. fusca* によるビスフェノールAの除去

次に、BPA 除去能に対するその濃度の影響を調べた結果、本株は 168 時間の培養において 80 μM までのビスフェノールAを 95%以上除去することができた。さらに、光強度がビスフェノールA除去能に与える影響について検討した結果、細胞の増殖速度が低い 2 W/m²の弱光条件下においても良好なビスフェノールA除去能を示した。しかし、暗条件では細胞の増殖は観察されず、ビスフェノールA除去能も大きく減少した。このことから *C. fusca* によりビスフェノールA除去を効率よく行うためには光照射が必要であり、ビスフェノールAの除去に光合成の関与が示唆された。一方、屋外培養池を用いた処理を考慮した場合、微細藻類によるビスフェノールA処理は昼夜の明暗周期条件下において行わなければならない。そこで、8 時間明と 16 時間暗の明暗周期条件下でのビスフェノールAの除去能を調べた結果、168 時間の培養においてビスフェノールAを 90%除去することができ、連続明条件より低いものの良好な除去能を示した。

また、微細藻類は脂溶性有機物質を蓄積する性質を持つことが知られている。そこで、明と暗各条件においてビスフェノールA除去を行った場合の、培地中と *C. fusca* 細胞内のビスフェノールA残存量を調べた (表2)。その結果、明暗

両条件において、培養 24 時間と 72 時間での培地中と細胞内のビスフェノール A 残存量の合計は、培地中の初期ビスフェノール A 量より小さかった。ビスフェノール A の培地中からの物理的・化学的消失はないので、本株はビスフェノール A を細胞内に取り込んだ後、分解していると考えられる。

表 2 培地中と細胞内の残存量から計算したビスフェノール A の分解量

光条件	時間 (hr)	ビスフェノール A 量 ($\mu\text{mol/culture}$)		
		残存量		分解量
		培地中	細胞内	
明	0	1.74	-	-
	24	1.18	0.11	0.45
	72	0.43	0.07	1.24
暗	0	1.82	-	-
	24	1.63	0.06	0.13
	72	1.46	0.06	0.30

有害有機物質の微生物分解において、その分解生成物が親物質よりも高い毒性を持ってしまう場合がある。そこで、次に *C. fusca* によるビスフェノール A の分解により内分泌攪乱作用を有する新たな物質が生成されるかどうかについて調べるため、培養液中のエストロゲン様活性を酵母ツーハイブリッド法を用いて測定した。その結果、ビスフェノール A の減少に伴った培養液中エストロゲン様活性の減少が観察され、本株によるビスフェノール A の除去ではエストロゲン様活性を持つ物質が培養液内に残らないことが示された。以上の結果から、本株が屋外培養池を用いたビスフェノール A の処理に利用できる可能性が示された。

さらに、ビスフェノール A 以外の内分泌攪乱化学物質として、廃棄物処分場浸出水中においてビスフェノール A の次に多く含まれる *p-tert*-ブチルフェノール、代表的なアルキルフェノール類の *p*-ノニルフェノール、フタル酸エステル類のひとつであるフタル酸ジエチルに対する *C. fusca* の除去能を調べた。その結果、これらの物質も良好に除去できることが明らかとなり、*C. fusca* が浸出水中の内分泌攪乱化学物質の処理に利用できる可能性が示された。

3.2 浸出水中のビスフェノール A の処理

光独立栄養条件下における *C. fusca* の高いビスフェノール A 除去能は、BOD

が低い浸出水中の有害有機物質処理を行う上で非常に有利である。先の検討において、本株が日本の浸出水中ビスフェノールAの最大検出濃度より高い 80 μ M までのビスフェノールAに対して、高い除去能を有することを確認した。そこで、実際の浸出水中ビスフェノールA処理への *C. fusca* の利用を目指して、本株のビスフェノールA除去能に与える浸出水成分の影響を調べた。最終的には実浸出水を用いた総合的な評価が必要であるが、その入手が困難であったため、我々はモデル浸出水の作製を試みた。無機塩類組成に関する日本の浸出水のいくつかの報告を参考にし、表1のようなモデル浸出水を作製した。

まず、回分培養により、モデル浸出水中からのビスフェノールAの除去について調べた結果、本株は藻類用培地を用いた場合と同様に高い除去能を示した。

次に、実際に浸出水の処理を行うためには、長期間安定にビスフェノールAを除去する必要がある。そこで、半回分培養によりモデル浸出水中のビスフェノールAの繰り返し処理についての検討を行った。その結果、4周期の間ビスフェノールAを良好に処理することができた(図4)。バイオマス生産を目的とした微細藻類の屋外大量培養システムは既に実用化されており、同様のシステムを浸出水の処理にも用いることができると考えられる。微細藻類の培養に適した温暖な東南アジアの発展途上国では、廃棄物処分場の浸出水が未処理のまま河川に放流されている例もある。今後の微細藻類を用いた浸出水処理の実用化を期待する。

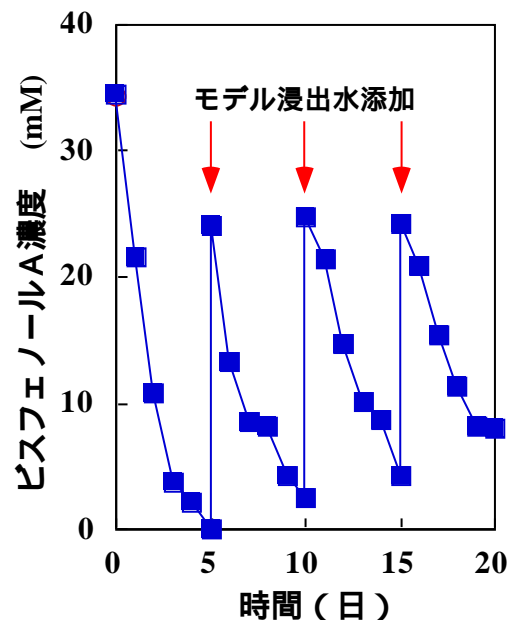


図4 モデル浸出水の繰り返し処理

4. 謝辞

本研究の遂行にあたり資金面で助成をいただいたエスプレック地球環境研究・技術基金に感謝致します。また、実験に際し有益なご助言をいただいた大阪大学大学院薬学研究科微生物制御学分野の宮本和久教授、平田収正助教授、実験協力者の廣岡孝志博士、広重優二君、内田耕太郎君に感謝致します。