

論文 / 著書情報
Article / Book Information

論題(和文)	白色不朽菌を用いた土壌スラリー内難分解性物質ビスフェノールAの除去反応に及ぼす反応器，反応条件の影響
Title(English)	Effects of Reactor and Reaction Condition on Bioremoval of Xenobiotics Bisphenol A in Soil Slurry by White-Rot Basidiomycete
著者(和文)	浅見和広, 上島功裕, 太田口和久
Authors(English)	Kazuhiro ASAMI, Katsuhiko Ueshima, kazuhisa ohtaguchi
出典(和文)	化学工学論文集, Vol. 39, No. 3, p. 132-137
Citation(English)	, Vol. 39, No. 3, p. 132-137
発行日 / Pub. date	2013, 3

白色腐朽菌を用いた土壌スラリー内難分解性物質ビスフェノールAの除去反応に及ぼす反応器, 反応条件の影響†

浅見 和広^{1††}・上島 功裕²・太田口 和久¹

¹ 東京工業大学大学院理工学研究科 化学工学専攻, 〒152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1

² 神奈川県企業庁水道水質センター, 〒253-0106 神奈川県高座郡寒川町宮山4058

キーワード: 白色腐朽菌, 生物除去反応器, 土壌汚染難分解性物質

本研究では土壌スラリー内難分解性物質のモデル物質としてビスフェノールA (BPA) を選定し, 白色腐朽菌による生物除去反応実験を振盪フラスコ, ローラーボトル反応器, 気泡塔を用いて行った。土壌スラリーを作るのにはある一定値の土壌水分比が必要であった。その値は最大土壌水分保持量以上であることが示唆された。反応器として振盪フラスコを用いてBPAの生物除去反応を行った結果, その除去率は24hにおいて0.97 ($n=2$) であった。既往の固相生物除去反応に比べて, およそ30倍の時間短縮が見られた。振盪フラスコ内に土壌スラリーが確認される場合, 振盪速度 (60, 100 rpm) に関わらず, 24hのBPA除去率は 0.98 ± 0.01 となった。ローラーボトル反応器は振盪フラスコに比べて低速回転で生物除去反応を十分に進めることが可能であり, 12hにおいて残留BPAは検出されなかった。気泡塔での生物除去反応では, 土壌スラリー量, 通気量を同一にしても反応器の形状によって除去反応速度に違いが生じた。反応器の性状は, 酸素供給の差ではなくスラリーの混合状態に影響したと考える。

緒 言

化学産業は, 人々の生活を支え豊かにするために, これまでに1,000万種以上の化学物質を合成し, 産業, 社会へと貢献してきた。合成女性ホルモンのDES (diethylstilbestrol) は天然女性ホルモンとは異なりステロイド構造を欠くがエストロゲン作用を有し, アメリカでは流産予防薬として服用されていた。我が国では, 雄牛の肉に注射すると去勢時同様柔らかい肉が獲得できるため使用されていた。しかし, 1971年にアメリカでDES服用女性から誕生した女兒の30–90%が陰嚕発症につながり, 他の癌発症例も多く報告 (McLachlan, 2001) され現在では使用禁止に至っている。DESのほか, 合成樹脂関連物質であるビスフェノール-A (4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane, (BPA)), フタル酸ジエチルヘキシル (di(2-ethylhexyl)phthalate), ノニルフェノール, 合成防腐剤AF2 (トフロン) など多くの物質が外因性内分泌攪乱物質として登録または疑われている。

難分解性を有する有機化学物質は環境中で長期にわたり残留し, その疎水性のため, 水環境より土壌に存在することが知られている。そのため, 土壌汚染に対する修復方法の開発が急を要している。汚染土壌の修復技術は, 3種類に大別される。物理的, 化学的, 生物的修復方法である。中でも生物修復 (バイオレメディエーション) 技術は, 低コスト性 (Perelo, 2010), 汚染物質の無機化手段 (Bolliger *et al.*, 1999) として注目されている。生物修復技術では, 生分解反応を行う場に注目すると, 2つの処理技術

に分類される。第1の原位置生物処理技術では生物修復の特徴の一つである反応条件の穏やかなことを利用し, 汚染サイトで直接生分解反応を実施する。そのため, 低コストで修復可能となる。物理的, 化学的方法とは異なり, 原位置での生物修復の一つの利点となる。第2は, 汚染サイトから土を取り出し, 装置や反応器を利用して修復する技術である。反応条件を生物に適したものに制御可能であり, 第1の技術よりも比較的早く修復することができる (Alexander, 1999)。また, 原位置では処理できない高濃度汚染や疎水性の高い汚染物質を扱うことができる (Compeau *et al.*, 1991)。

担子菌の一種である白色腐朽菌は, 通常菌体外に酵素を分泌することで, 土壌を汚染した難分解性有機化合物を分解することできる (Eaton, 1985; Krčmář and Ulrich, 1998; Ueshima *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010)。著者らは以前, モデル実験によって白色腐朽菌による原位置土壌内難分解性物質BPAの生物除去反応は土壌含水率を高めると向上することを観察した (Ueshima *et al.*, 2008)。しかし, 汚染土壌の原位置処理では, 水田のような工夫を導入しない限り土壌含水率はある一定値を超えることが難しく, 土壌含水率操作による活性向上策には限界があると考えられる。長期の生物修復時間を確保できる場合には原位置生物修復操作は魅力に富む手段であるが, 短期修復時間を前提とした場合には, 装置や反応器を利用して修復する技術の可能性を探る必要がある。

汚染物質を資化することができる細菌がローラーボトル回転式反応器やスラリー (泥漿) 攪拌反応器での汚染土壌の生物除去反応に利用されている (Gray *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2000)。白色腐朽菌についても, ローラーボトル回転式反応器や振盪させた100 mL三角フラスコを用いて土壌スラリーを扱った事例が報告

† 2012年6月13日受理, 2012年11月26日掲載決定

DOI: 10.1252/kakoronbunshu.39.132

†† asami.k.aa@m.titech.ac.jp

されている (Zheng and Obbard, 2002; Valentin *et al.*, 2006). 白色腐朽菌から菌体外に出される菌体外酵素は、ラッカーゼなどのオキシダーゼ (Yaver *et al.*, 1996) やマンガンペルオキシダーゼ (Maeda *et al.*, 2001), リグニンペルオキシダーゼ (Schalch *et al.*, 1989) などのペルオキシダーゼがある. これらの酵素は, 菌体外に存在しており, 液体の攪拌により, 汚染物質への接触が促進される. また, ラッカーゼは酸化酵素の一種であり, 酸素を反応で必要とする. そのため, 土壌スラリーを扱う反応器の条件の一つは通気や攪拌翼によってスラリーを十分に通気攪拌混合することであり, 酸化酵素を含む菌体外酵素系においても適していると考ええる.

本研究では, 振盪フラスコ, ローラーボトル反応器, 気泡塔を用い, BPAを土壌スラリー内難分解性物質のモデルとして選択し, その白色腐朽菌による生物除去反応実験を行い, 土壌スラリーを用いた生物修復処理装置の設計に関わる知見を得ることを目的とした.

1. 実験方法

1.1 実験材料

実験では, *Coriolus hirsutus* IF0 4917 (Yoshihara *et al.*, 1988; Asami *et al.*, 2011) を用いた. 保存用寒天培地, 液体培地, 前培養条件は既往の研究 (Ueshima *et al.*, 2008) と同一である. ビスフェノール A (BPA) をモデル汚染物質とした. 土壌は, 1mmメッシュの篩にかけた後に, 1.2に示すように, BPA汚染土壌へと調製した. $W_{w,0}$ は乾燥土壌質量に対する水分質量を表す. 本実験では, 土壌と水相とを混合することで, 液相に固体粒子が懸濁したスラリー状態を形成し固液2相として取り扱っている. 以後, 液体MYG培地に土壌を懸濁させたスラリーを培地添加スラリー, 純水に土壌を懸濁させたスラリーを培地無添加スラリーと呼ぶ. 前報で著者らは乾燥土壌に水分を添加し土壌の含水率を操作した (Ueshima *et al.*, 2008) が, スラリー中の水分量に対しては, 含水率と区別して土壌水分比という用語を使用する. 最大土壌水分保持量は, 土壌の上から水を滴下し, 表面に水分が浮いてくるまでに滴下した水の重量を, 用いた土壌の乾燥重量で割った値として求めた ($n=3$).

1.2 実験装置および条件

1.2.1 フラスコ反応器を用いた生物除去反応 第1の反応器として, 300mL三角フラスコを用いた (Run 1-4). フラスコの振盪には往復振盪機 (トーマス社製 T-22S) を用いた. フラスコ内に乾燥質量5gの土壌を入れ, BPAの濃度を $50\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ とした.

Run 1では, 上記フラスコ内に滅菌した液体MYG培地または純水を土壌水分比の初期値 ($W_{w,0}$) が $6.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ になるように加えた後, 前培養した菌体ペレットを, 乾燥土壌単位質量当たりの菌体湿潤質量の初期値 ($W_{b,0}$) が $0.3\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ となるように植菌した. 三角フラスコは, 25°C , 100rpmで往復振盪し, 残存BPA量の経時変化を測定した.

Run 2では, 初期土壌水分比の効果を調べるために, Run 1と同じBPA汚染土壌を含むフラスコを用い, $W_{w,0}$ を変更し, 生物除去反応実験を行った. $W_{w,0}=0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ となるように純水を加えた. $W_{b,0}=0.3\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ となるように植菌し, 6h , 25°C , 100rpmで往復振盪した後に残存BPA量を測定した.

Run 3では, Run 1と同じBPA汚染土壌を含むフラスコを用い, 滅菌した純水を用いて水分調整した. $W_{w,0}=6.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ となるよう

に調製し, $W_{b,0}=0.0025\text{--}1.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ と変化させて除去反応を開始し, 6h , 25°C , 100rpmでフラスコを往復振盪した後に残存BPA量を測定した.

Run 4では, $W_{w,0}=6.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $W_{b,0}=0.3\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ に条件設定し, Run 1と同じBPA汚染土壌を含むフラスコを用い, 往復振盪速度を0, 30, 60, 100rpmと変化させ, 残存BPA量の経時変化を測定した.

1.2.2 ローラーボトル反応器を用いた生物除去反応 第2の反応器として, ローラーボトル反応装置を使用した. ロールチューブ作製器 (三紳工業株式会社製 RT-3) を用いて200mLガラスボトル (直径50mm) を回転させた. ガラスボトルの水平な壁面の長さは, 85 mmであった. 実験の間はシリコン栓でフタをした. Run 5では, 乾燥土壌は5gとして, BPA濃度は $50\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ とした. $W_{w,0}=6.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $W_{b,0}=0.3\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ とし, 反応開始後6hの時点で新たに $0.3\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ を植菌する場合と植菌しない場合を実験した. $W_{w,0}=6.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 回転速度100rpm, 25°C の条件で生物除去反応を行った.

1.2.3 気泡塔式反応器を用いた生物除去反応 第3の反応器として, 気泡塔式反応器を用いた. 反応器として, ガラス円筒製気泡塔BC1 (塔径, 26mm; 容量, 110mL), BC2 (塔径, 50mm; 容量, 200mL) を用いた. Run 6では, 乾燥土壌は5gとし, BPA濃度は $50\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ とし, $W_{w,0}=6.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $W_{b,0}=0.3\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ とした. 植菌後, 25°C で通気培養しながら生物除去反応を行った. 通気に単孔ノズル (直径, 5mm) を使用し, 容器断面の中央に置いた. ノズル口は底面から高さ2.0mmに設置した. 通気流量は $1.2\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ とした. ガス空塔速度は, 通気流量と容器断面積から求めた結果, BC1が $3.78\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$, BC2が $1.02\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ であった.

1.3 分析方法

白色腐朽菌を用いてBPA除去反応を実施後, 反応器内の土壌スラリーから残留BPAを抽出した. まず, 土壌スラリーに450 μL の塩酸を加えてpHを下げ, ここに25mLの酢酸エチルを加えた. 三角フラスコとBC2ガラス容器の場合, 100rpmで10min振盪した. BC1ガラス容器の場合, 手動による攪拌を5min行った. 次に超音波装置 (ElmaT460/H, 振動数35kHz) に入れ, 10min超音波抽出を行った. 手動攪拌と超音波抽出の操作を2回繰り返した. その後, スラリーを5,000gで10min遠心分離した. 得られた上澄み液をさらに遠心分離した. 2度目に得られた上澄み液を分液ロートに移した. 分液ロートに少量の塩化ナトリウムを加え, 10min混合させ, 有機相のみを集めた. この操作を3回繰り返した. 集めた有機相は, ロータリエバポレータで蒸発させた. 得られたBPAは, 前報 (Ueshima *et al.*, 2008) と同じ条件で高速液体クロマトグラフィ測定を行った. 三角フラスコ, BC1ガラス容器, BC2ガラス容器から抽出可能であったBPA量は, 44.6, 42.6, $46.2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n=2$) であった. Run 1-6のすべての測定結果について2回の平均値を算出した.

2. 実験結果および考察

2.1 フラスコ反応器を用いた生物除去反応の特性解析

Figure 1に培地添加スラリー, 培地無添加スラリー中のBPA濃度の経時変化を示した (Run 1). BPA生物除去反応速度の初期値は, 培地添加, 無添加スラリーでそれぞれ $31.5, 32.3\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ であった. 白色腐朽菌は初期BPAの70%を最初の1hで除去した. 6h以降の除去反応は緩やかであった. 24hでのBPAの除去率は, スラリー中への培地添加の有無に関係なく, 約0.97 ($n=2$) で

あった。Figure 1より測定した24hの範囲において除去率は培地添加の影響を受けないことがわかる。このことから、以下の実験では滅菌した純水によって土壌水分比を調整することにした。この経時変化を見ると、BPAの除去反応は次式で示す不可逆1次反応に従っているように見受けられる。

$$\frac{dc_{\text{BPA}}}{dt} = -kc_{\text{BPA}} \quad (1)$$

ここで、 c_{BPA} は乾燥土壌単位質量当たりのBPA質量、 k は反応速度定数を表す。Figure 1の実験結果に対しEq. (1)を用いて解析すると、 k は 1.04h^{-1} であった。図中の破線は、Eq. (1)の計算線を示す。反応後期において除去反応速度が低下しており、実測値は1次反応式の計算線と一致しなかった。BPAの固体粒子への強固な吸着、酵素の失活などが関連していると考えられるが、詳細は明らかでない。

著者らは以前、滅菌土壌の含水率を液体MYG培地または純水で調節する固相反応実験を行った (Ueshima *et al.*, 2008)。ここではMYG培地添加は生物除去反応を促進することを観察したが、ここでは促進効果は確認できなかった。スラリー程度の水分が存在する環境では、振盪、気泡攪乱による菌体とBPA分子との接触頻度は高いため、24h以内での生物除去反応は、前培養菌体が保持していた酵素が主導しており、菌体増殖によって新たに生成、追加された酵素の役割は高くはないことが推論できる。また、固相反応では菌体の動きが著しく制限されるため、BPA分子と酵素との接触頻度は菌糸の伸長速度に大きく依存し、培地添加の効果が顕著に表れたと推測できる (Ueshima *et al.*, 2008)。約97%の除去率に到達するために必要な時間は、既報の結果 (Ueshima *et al.*, 2008) に比べて、およそ30倍早まった。これは、土壌スラリーを生じることによって、土壌、菌体、酵素、BPAの移動性が向上したためと考えられる。

Run 1より、スラリー状態にすることによってBPA生物除去反応が促進されたことがわかった。スラリーを作るためには、水分量のコントロールが必要である。そこで、土壌水分比 $W_{w,0}$ の影響を調べた (Run 2)。Figure 2には $W_{w,0}=0-10.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ における6hのBPA除去率 $x_{\text{BPA}}(6)$ を示す。 $W_{w,0}\geq 2.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ において、BPA除去率は一定であった。この範囲において、フラスコ内にスラリーが確認された。スラリー内において、汚染物質と菌体や酵素の接触が十分に行われていたと考える。 $W_{w,0}=0.5\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ の場合、土壌と水分との混合状態は、スラリーというよりも湿った状態の土壌であった。このときの除去率は $W_{w,0}\geq 2.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ の結果と比べて小さかった。中間領域の $W_{w,0}=1.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ の場合、土壌の表面に液体が生じ、自由水が存在した。自由水が現れ始める土壌水分比 ($W_{w,0}=1.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) は、土壌保持水分量の最大値 $0.910\pm 0.020\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n=2$) とおおむね一致していた。土壌に保持できなくなった水分が自由水として現れ、菌体ペレットからの菌糸断片や菌体外酵素を移動させる役割を担うと仮定すると、この自由水の存在が除去率向上の主因となったと考える。

Figure 3には、植菌量 $W_{B,0}$ が $x_{\text{BPA}}(6)$ に及ぼす影響を検討したRun 3の結果を示す。初期水分比 $W_{w,0}=6.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ としたため土壌はスラリー状態である。植菌量が高いと除去率が高いことから、反応中に新たに増殖した菌体が保持する酵素と比較し、植菌した菌体が保持する酵素の役割が大きいことが確認できた。 $W_{B,0}=0.0025-0.3\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ において、BPA除去活性をもった菌体の植菌量を増加させるに伴い除去率が高まった。 $W_{B,0}=0.3-$

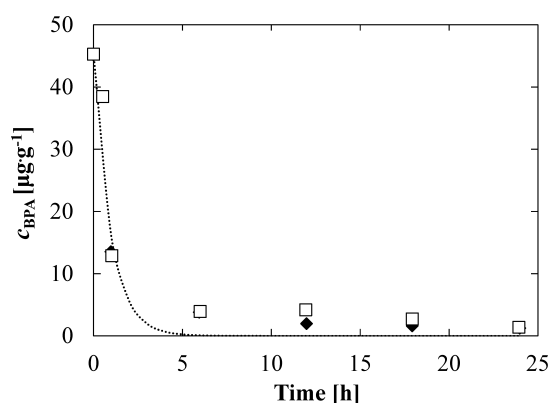


Fig. 1 The time courses of bisphenol A concentration in the slurry of MYG medium (◆) and the distilled water(□) (Run 1)

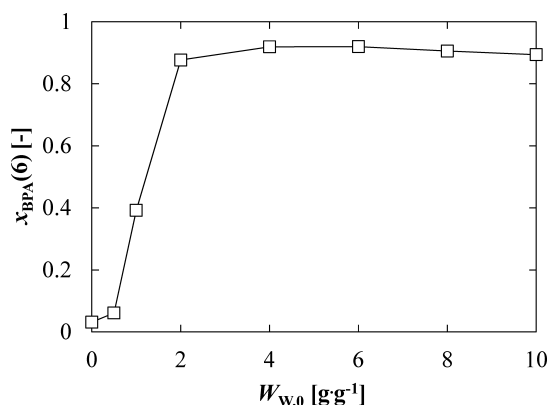


Fig. 2 The effect of $W_{w,0}$ on the BPA removal for 6 h (Run 2)

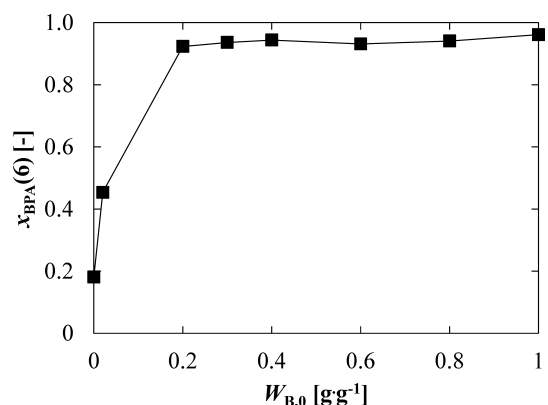


Fig. 3 The effect of $W_{B,0}$ on the BPA removal for 6 h (Run 3)

$1.0\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ では除去率は一定であった。1-6hにおいて、BPA生物除去反応速度は緩やかになるが (Figure 1), $W_{B,0}=0.3\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ は $50\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ のBPAを完全除去するのに十分な量であることが確認できた。 $W_{B,0}=1\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ で96%の除去率に達した。

水に難溶性の難分解性物質は、水相へ小さい移動速度をもつ。固液混合状態を左右するフラスコ振盪速度はBPA分子の水相への移動速度にも影響を及ぼすと考えられる (Riess *et al.*, 2005)。Figure 4に振盪速度を変えた場合のBPA濃度の経時変化を示した (Run 4)。初期速度は100rpmの場合に最も高かった。しかし、24hでは60, 100rpmのBPA除去率は同じであった。振盪速度が0, 30rpmでは、除去反応は緩やかであった。この場合、フラスコ内はスラリー状態ではなく、液体と土壌の2相が明確に分離

された状態が観察された。そのため土壌と流体との混合が十分ではなく酵素とBPAとの接触頻度が低かったと想定する。0rpmでBPA生物除去反応を90h続けた場合、BPAの完全除去は確認できなかった。振盪速度は、スラリーの状態での汚染土壌生物除去反応に重要な役割を果たしていると考えられる。

Run 4の最初の1hのデータに対してEq. (1)を適用し解析した反応速度定数 k の最大値は 1.08 h^{-1} であり、振盪速度100rpmで観察された。白色腐朽菌の一種である*C. hirsutus*がラッカーゼを有し (Shin and Lee, 2000)、白色腐朽菌によるBPA除去反応にはラッカーゼが関与していること (Tsutsumi *et al.*, 2001) や、ラッカーゼの酵素反応に酸素が関与していること (Widsten and Kandelbauer, 2008) などから、本実験において振盪速度100rpmで k 値の最大値が観察された理由として、スラリー中への酸素の物質移動を高めることで、酵素反応に酸素を要求するラッカーゼのBPA除去反応速度が向上したことが考えられる。なお、本研究ではスラリー中の酵素活性を測定していないが、本実験の前培養段階と同じ*C. hirsutus* IF0 4917の培養液にラッカーゼ活性の存在を確認している (Asami *et al.*, 2012投稿中)。スラリー中のラッカーゼ、マンガノペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼなどのリグニン分解酵素活性測定と、各酵素活性とBPA除去反応との関連性については今後の検討課題である。

2.2 ローラーボトル反応器を用いた生物除去反応の特性解析

ローラーボトル反応器を用いて、BPA汚染土壌の生物除去反応を行った (Run 5)。ローラーボトル反応器を利用して、有機化合物による汚染土壌の除去が報告されている (Riess *et al.*, 2005)。Figure 5にRun 5におけるBPA濃度の経時変化を示した。ローラーボトル反応器でのBPA生物除去反応は三角フラスコと同じ傾向を示した。初期除去反応速度は $14.9\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。この値は三角フラスコ内 (100rpm) のものより低かった。振盪フラスコと比較して初期除去反応速度が低下した原因は菌体とBPAの接触頻度が低かったためと考え、6hに新たに初期植菌量と同量の菌体 $0.3\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ を加えた結果、再植菌後3h (培養開始後9h) で再植菌しない場合と比べて除去反応が促進され、培養開始後9–12hで残存BPA量は測定限界以下となった。再植菌しない場合でも培養開始後12h以降、BPAは検出されなかった。

2.3 気泡塔反応器を用いた生物除去反応の特性解析

酸素は、白色不腐朽菌による有機化合物の生物除去反応に影響を与えることが報告されている (Ramsay *et al.*, 2006)。適量の通気を行うことで、酸素を供給するだけでなく、土壌を通気攪拌することができる。Run 6では、反応器BC1, BC2を用いて $1.2\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ の通気をしながらBPA汚染土壌の生物除去反応を行った (Figure 6)。次式で定義されるガスホールドアップ ε_G は反応器BC1では0.094, 反応器BC2ではおよそゼロであった。

$$\varepsilon_G = \frac{H_f - H_L}{H_f} \quad (2)$$

ここで、 H_f は通気時の土壌スラリーの高さ、 H_L は静置時の土壌スラリーの高さである。反応器BC1, BC2における初期除去反応速度は $29.7, 23.8\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ であった。ローラーボトル反応器に比べて、それぞれ1.99, 1.60倍の値であった。つまり、Run 4, 100rpmで最大の k 値が得られたのと同じ理由で、ガス空塔速度が高い程、酸素供給量が増加し、BPA除去速度が大きくなったと考える。この1h目のデータをEq. (1)を用いて解析すると、反応速度定数 k の値は、BC1では 1.23 h^{-1} 、BC2では 0.686 h^{-1} で

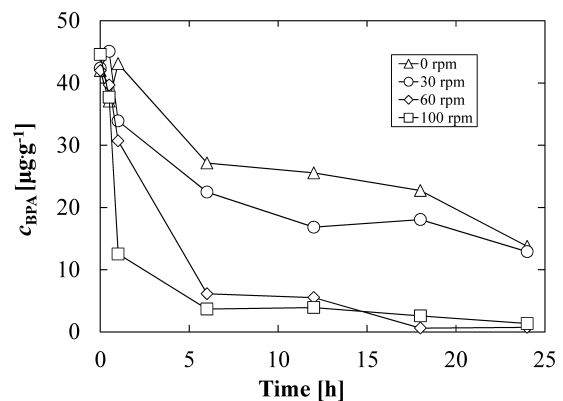


Fig. 4 The effect of shaking speed on the BPA removal in Erlenmeyer flask; 100 rpm (□), 60 rpm (◇), 30 rpm (○), 0 rpm (△) (Run 4)

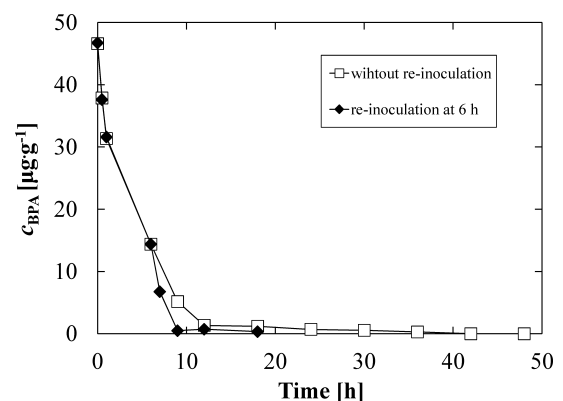


Fig. 5 The time courses of bisphenol A concentration in the roller bottle reactor. The fungal pellets were inoculated at 0 h (□, ◆) and re-inoculated at 6 h (◆) or not re-inoculated (□) (Run 5)

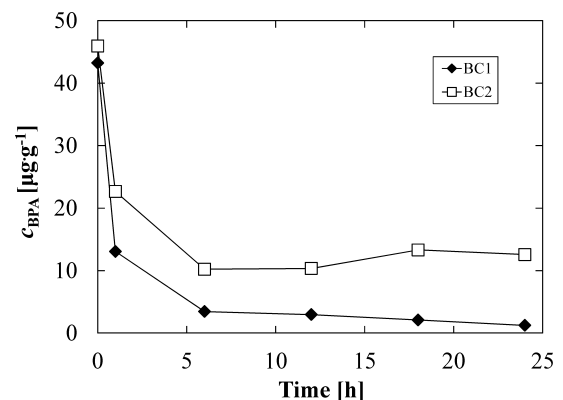


Fig. 6 The time courses of bisphenol A concentration in BC1 (◆) and BC2 (□) (Run 6)

あった。Run 4の振盪速度100rpmで得られた反応速度定数の値 1.08 h^{-1} と比較するとBC1では1.14倍、BC2では0.64倍となっていることがわかる。Figure 6では、1h以降は速度が減少し、24hではRun 5のローラーボトル反応器の方が高いBPA除去率を示している。6h以降、反応器BC2内でBPA濃度にあまり変化は見られなかった。ガス空塔速度が低い反応器BC2においては、反応を開始した0–1hでは、単孔ノズルから生成した気泡は反応器底面にある土壌をまきあげ、スラリー状態を生み出したが、流動化した土壌粒子は徐々にフロックを形成し、6hには水と土壌の

2相を形成しチャネリング状態でガスは上昇していた。単孔ノズルから出た気泡は壁面に集積した土壌を巻き上げることができなくなっているため酸素と汚染土壌との接触頻度は低下し除去反応が抑制されたと思われる。この結果より、酸素供給が行われていても、土壌の攪拌が十分でないために、生物除去反応が進行しなかったことが考えられる。このことは、反応器BC1では24hまでスラリーを形成していたために生物除去反応が進行していたことから示された。また、反応器BC1では、目視による確認だけであるが、土壌スラリーの容量が24hで半分を大きく下回っていた。そのため、それ以降土壌スラリーを形成して実験を行うことは困難であった。気泡塔を用いて、生物除去反応を長時間行うためには、土壌水分比を新たに調整する必要がある。

最後に、すべてのRunで1hにおける残存BPA量から求めた初期除去反応速度を比較すると、Run 1の2条件、Run 4の100rpm、Run 6のBC1においてほぼ同じ値 ($31.6 \pm 0.94 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) であり、最も大きかった。対照的にRun 5のローラーボトル反応器の初期除去反応速度は小さかったが、残存BPAが検出されなくなる時間は他のRunと比べて一番短く、10h前後であった。Runごとのこのような差はラッカーゼなどの酵素生産性の違いやスラリー攪拌効率の違いによると考えられる。仮にRun 5において白色腐朽菌による酵素生産が促進されBPA除去反応に対して有利に働いているとすると、例えば単にラッカーゼ酵素を添加した場合と比較した利点の一つと言える。今後、実際にラッカーゼ酵素のみの場合と比較してBPA除去反応性を検討していくことが望まれる。

結 言

本研究では反応器内での土壌スラリー状態での白色腐朽菌によるBPA生物除去反応を実施した。反応器として、振盪フラスコ、ローラーボトル反応器、気泡塔を用いた。以下にその結果を要約する。

- (1) 反応器として振盪フラスコを用いた場合、24hでBPA除去率は0.97 ($n=2$) となった。既往の生物除去反応に比べて、およそ30倍の時間短縮が見られた。
- (2) スラリーをつくるのにはある一定値の土壌水分比が必要であることがわかった。その値は、最大土壌水分保持量以上であることが示唆された。
- (3) BPA濃度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ の6hの除去率は初期植菌湿潤質量 $0.3 \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 以上で90%に達し、 $1.0 \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ で96%に達した。
- (4) 振盪フラスコ内に土壌スラリーが確認される場合、振盪速度に関わらず、24hの除去率は一定の値となった。
- (5) ローラーボトル反応器は、振盪フラスコに比べて、低速回転で生物除去反応を十分に進めることが可能性であった。BPA濃度 $50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ の反応開始12hの短時間で除去率はほぼ100%に達したことから全Runの中で最も優れた処理法であった。
- (6) 気泡塔での生物除去反応では、土壌スラリー量、通気量を同一にしても反応器の形状によって除去反応速度に違いが生じた。反応器の性状は、酸素供給の差ではなく、スラリーの混合状態に影響したと考える。

Nomenclature

H_f	= liquid height with aeration	$[\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$
H_L	= liquid height without aeration	$[\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$

k	= BPA removal rate constant	$[\text{h}^{-1}]$
$W_{B,0}$	= initial weight ratio of biomass and soil	$[\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$
$W_{W,0}$	= initial weight ratio of liquid and soil	$[\text{g} \cdot \text{g}^{-1}]$
$x_{\text{BPA}}(6)$	= conversion of BPA at 6h	$[-]$
ε_G	= gas hold-up	$[-]$

Literature Cited

- Alexander, M.; "Bioremediation Technologies, Ex Situ and Bioreactors," Biodegradation and Bioremediation, 2nd ed., pp. 325-376, Academic Press, US (1999)
- Asami, K., H. Nemori, K. Ueshima and K. Ohtaguchi; "Study of the Effect of Methyl Group on Phenolic Xenobiotics Biodegradation by White-Rot Basidiomycete," *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **37**, 344-347 (2011)
- Asami, K., A. Furuichi, K. Ueshima and K. Ohtaguchi; "Study of BPA Removal Mechanism by Liquid Culture of White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*," *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, (2012), submitted
- Bolliger, C., P. Höhener, D. Hunkeler, K. Häberli and J. Zeyer; "Intrinsic Bioremediation of a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer and Assessment of Mineralization Based on Stable Carbon Isotopes," *Biodegradation*, **10**, 201-217 (1999)
- Compeau, G. C., W. D. Mahaffey and L. Patras; "Full Scale Bioremediation of Contaminated Soil and Water," *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*, G. S. Sayler, R. Fox and J. W. Blackburn, eds., pp. 91-109, Plenum Press, US (1991)
- Eaton, D. C.; "Mineralization of Polychlorinated Biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: A Ligninolytic Fungus," *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 194-196 (1985)
- Gray, R. M., D. K. Banerjee, P. M. Fedorak, A. Hashimoto, J. H. Masliyah and M. A. Pickard; "Biological Remediation of Anthracene-Contaminated Soil in Rotating Bioreactors," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 933-940 (1994)
- Krčmář, P. and R. Ulrich; "Degradation of Polychlorinated Biphenyl Mixtures by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*," *Folia Microbiol. (Praha)*, **43**, 79-84 (1998)
- Maeda, Y., S. Kajiwaru and K. Ohtaguchi; "Manganese Peroxidase Gene of the Perennial Mushroom *Elfvigia applanata*: Cloning and Evaluation of its Relationship with Lignin Degradation," *Biotechnol. Lett.*, **23**, 103-109 (2001)
- McLachlan, J. A.; "Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us about Endocrine Disrupting Chemicals," *Endocr. Rev.*, **22**, 319-341 (2001)
- Perelo, L. W.; "Review: In situ and Bioremediation of Organic Pollutants in Aquatic Sediments," *J. Hazard. Mater.*, **177**, 81-89 (2010)
- Ramsay, J., M. Shin, S. Wong and C. Goode; "Amaranth Decoloration by *Trametes Versicolor* in a Rotating Biological Contacting Reactor," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 791-795 (2006)
- Riess, R., M. Nemati, J. Headley and G. Hill; "Improved Mass Transfer and Biodegradation Rates of Naphthalene Particles Using a Novel Bead Mill Bioreactor," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **80**, 662-668 (2005)
- Schalch, H., J. Gaskell, T. L. Smith and D. Cullen; "Molecular Cloning and Sequences Of Lignin Peroxidase Genes of *Phanerochaete chrysosporium*," *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2743-2747 (1989)
- Shin, K.-S. and Y.-J. Lee; "Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*," *Arch. Biochem. Biophys.*, **384**, 109-115 (2000)
- Tsutsumi, Y., T. Haneda and T. Nishida; "Removal of Estrogenic Activities of Bisphenol A and Nonylphenol by Oxidative Enzymes from Lignin-Degrading Basidiomycetes," *Chemosphere*, **42**, 271-276 (2001)
- Ueshima, K., K. Asami and K. Ohtaguchi; "Kinetics of the Growth of White-Rot Fungus *Coriolus hirsutus* in Soil for Bioremediation," *J. Chem. Eng. Jpn.*, **41**, 100-107 (2008)
- Valentin, L., G. Feijoo, M. T. Moreira and J. M. Lema; "Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Forest and Salt Marsh Soils by White-Rot Fungi," *J. Biodegrad. Biodeg.*, **58**, 15-21 (2006)
- Widsten, P. and A. Kandelbauer; "Laccase Applications in the Forest Prod-

- ucts Industry: A review," *Enzyme Microb. Technol.*, **42**, 293–307 (2008)
- Yaver, D. S. and E. J. Golightly; "Cloning and Characterization of Three Laccase Genes from the White-Rot Basidiomycete *Trametes villosa*: Genomic Organization of The Laccase Gene Family," *Gene*, **181**, 95–102 (1996)
- Yoshihara, K., T. Umezawa, T. Higuchi and M. Nishiyama; "Degradation of a Non-Phenolic Beta-O-4 Lignin Substructure Model Compound by *Coriolus hirsutus*," *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2345–2346 (1988)
- Zhang, C., J. B. Hughes, S. F. Nishino and J. C. Spain; "Slurry-Phase Biological Treatment of 2,4-Dinitrotoluene and 2,6-Dinitrotoluene: Role of Bioaugmentation and Effects of High Dinitrotoluene Concentrations," *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 2810–2816 (2000)
- Zhao, Y., X. Yi, M. Li, L. Liua and W. Ma; "Biodegradation Kinetics of DDT in Soil under Different Environmental Conditions by Laccase Extract from White Rot Fungi," *Chin. J. Chem. Eng.*, **18**, 486–492 (2010)
- Zheng, Z. and J. P. Obbard; "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Soil by Surfactant Solubilization and *Phanerochaete chrysosporium* Oxidation," *J. Environ. Qual.*, **31**, 1842–1847 (2002)

Effects of Reactor and Reaction Condition on Bioremoval of Xenobiotics Bisphenol A in Soil Slurry by White-Rot Basidiomycete

Kazuhiro ASAMI¹, Katsuhiko UESHIMA² and Kazuhisa OHTAGUCHI¹

¹ Department of Chemical Engineering, Tokyo Institute of Technology, 12-1 Ookayama-2, Meguro-Ku, Tokyo 152-8552, Japan

² Center for water quality, Enterprise Agency of Kanagawa Prefectural Government, 4058 Miyayama, Samukawa-Machi, Kouza-Gun, Kanagawa 253-0106, Japan

Keywords: White-Rot Basidiomycete, Bioremoval Reactor, Xenobiotics in Soil Slurry

In this report, bisphenol A (BPA) was selected as a model xenobiotic compound in soil slurry, and the bioremoval of BPA by white rot fungi in shaking flask, roller bottle reactor and bubble column reactor were studied. The initial weight ratio of liquid and soil over some level is found to be necessary to form soil slurry. The threshold of the ratio for soil slurry forming seems to be the maximum moisture content of soil. In shaking flask, the removal ratio of BPA was 0.97 ($n=2$) in 24 h. The period for achieving this ratio was shortened about 30 times in comparison to our previous experiment in solid state. In case that the soil slurry was observed in shaking flask, the removal ratios of BPA at 24 h were constant (0.98 ± 0.01) and independent to shaking speeds (60, 100 rpm). The roller bottle reactor could achieve effective bioremoval reaction in lower rotation speed comparing with shaking flask, and the removal ratio reached almost 1 at 12 h. In bubble column reactor, the differences in BPA removal rates were observed among bubble columns with different shape. The shape of reactor seems to affect the mixing state of soil slurry rather than oxygen supply.

~~~~~