

平成24年度環境研究総合推進費
課題番号 5B-1201

1,4-ジオキサン汚染地下水の 生物浄化可能性の評価診断 ツールの開発と浄化戦略の実証 (平成24-26年度)

累積予算額 115,601,000円

研究代表者 池 道彦(大阪大学大学院工学研究科)

研究体制

サブテーマ(1) 担当:大阪大学 (池 道彦)

1,4-ジオキサン汚染地下水の各種バイオレメディエーション技術の基盤の確立

サブテーマ(2) 担当:北里大学 (清 和成・井上大介)

汚染サイトに適したバイオレメディエーション技術の選択に資する診断ツールの開発

サブテーマ(3) 担当:大成建設 (斎藤祐二・山本哲史)

実証サイトにおける診断ツールとバイオレメディエーション技術の有効性の検証

背景：1,4-ジオキサン汚染対策技術の欠如

水質・地下水環境基準(平成21年設定): 0.05 mg/L

生物学的処理法

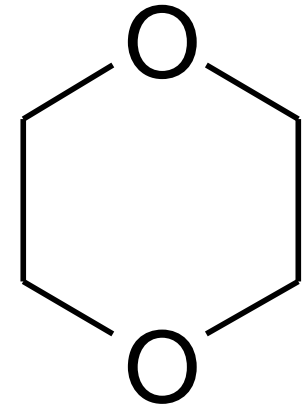
- 活性汚泥法 浄化効果 小

物理学的処理法

- 活性炭吸着法 浄化効果 小
- 凝集沈殿法 浄化効果 小

化学的処理法

- オゾン酸化法 浄化効果はあるが、高コスト
- 促進酸化法(AOP) 浄化効果は高いが、高コスト
(オゾン/H₂O₂など)

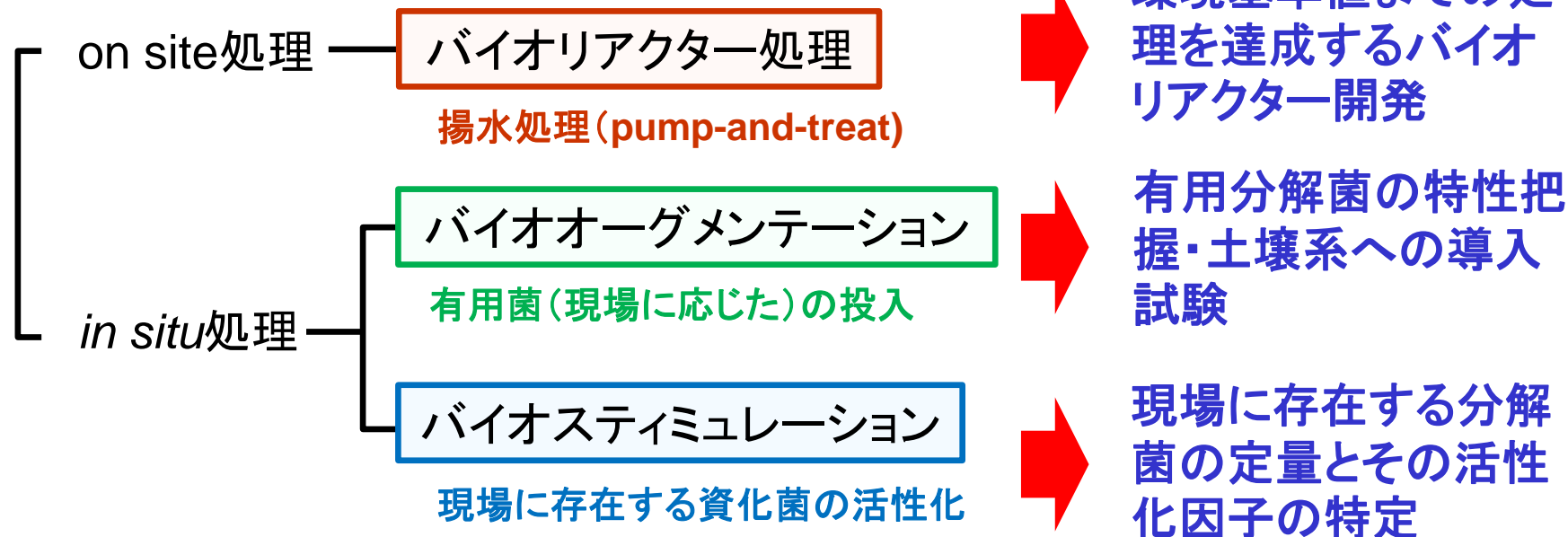


1,4-ジオキサン

コストと効果の両面で1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化に有効かつ現実的なオプションはない

研究目標：1,4-ジオキサン生物浄化技術の開発

・生物浄化技術の開発



・診断ツールの開発 (サイトにあった浄化技術の選択)

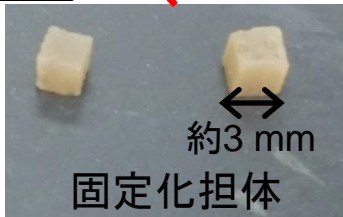
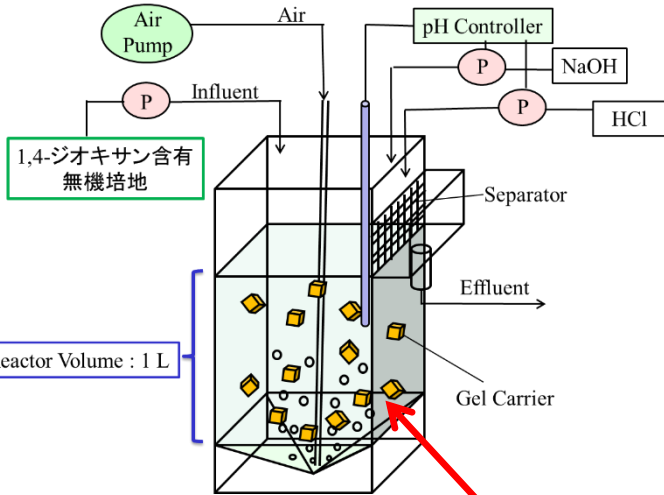
特異的遺伝子モニタリング

技術の選択に資する診断ツールの開発

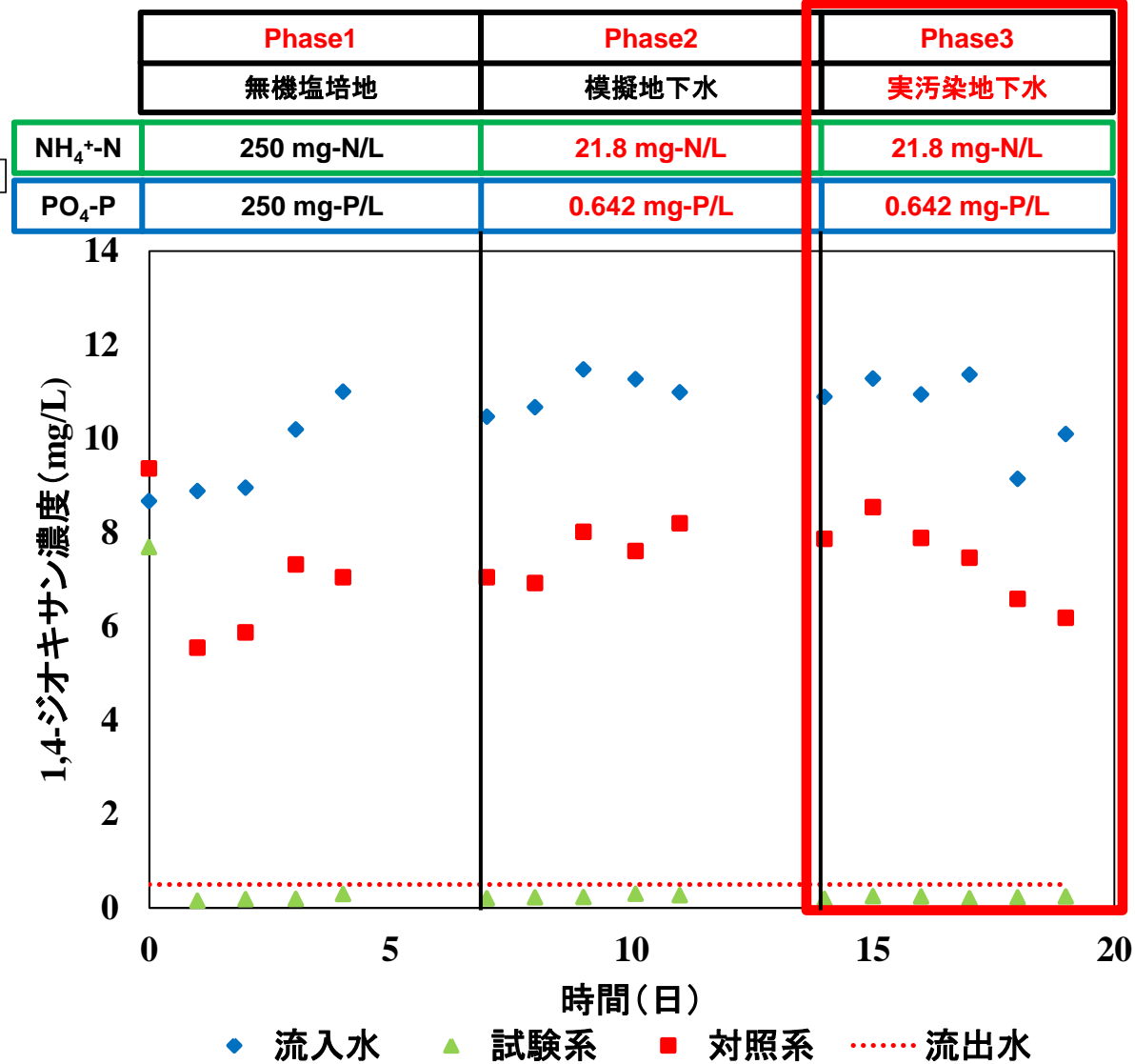
1,4-ジオキサンのバイレメ技術の開発と体系化

- 国内外の1,4-ジオキサン汚染問題の解決
- 1,4-ジオキサン汚染による健康被害の未然防止

On Site 処理 固定化D17株を用いたラボスケールリアクター



運転条件	
運転温度	28 °C
曝気	1 L/min
培養容量	1 L
HRT	0.5day



実汚染地下水中の1,4-ジオキサンを阻害なく連続的に分解
 (モデル系では200日を超える安定した処理に成功)

On Site 処理 生物浄化実証試験サイトの選定

H11年: 不法投棄発覚

燃え殻、廃油、汚泥などの廃棄物

H16年: 廃棄物の撤去開始

廃棄物選別施設の建設

H20年: 土壌・地下水浄化開始 (VOC)

ホットソイル工法、揚水曝気など

H22年: 1,4-ジオキサンの検出

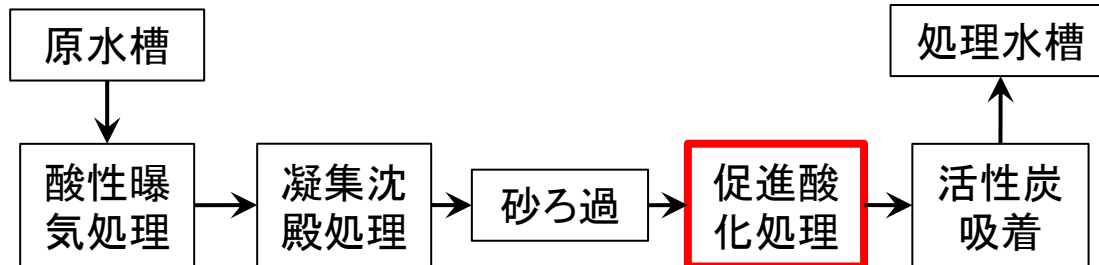
(D地区: 0.09~1.1ppm)

H25年: AOPを含めた一連の水処理施設を

導入・運転(200m³/日)



不法投棄現場の外観



VOC除去

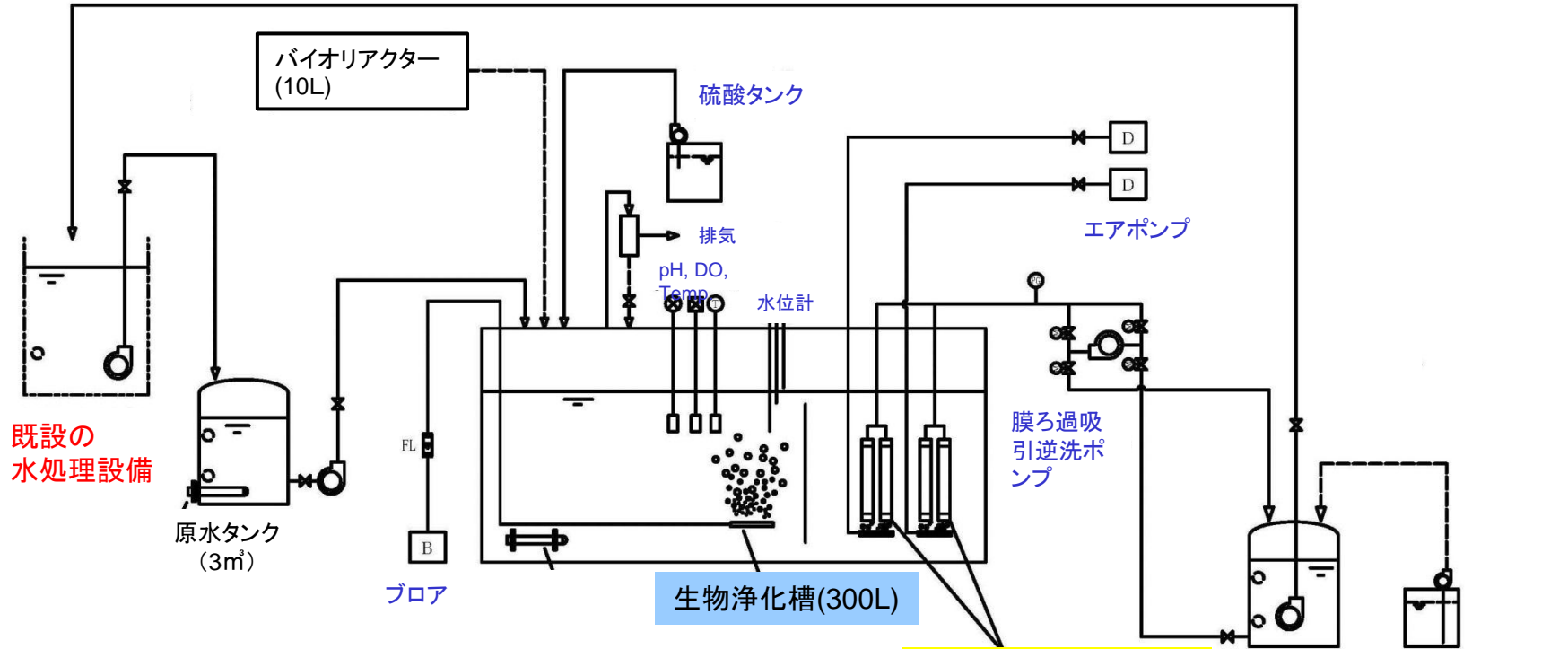
重金属除去

現在の浄化スキーム: AOP(オゾン+H₂O₂)



岩手・青森県境不法投棄現場をon siteバイオリアクター処理
の実証現場に選定

On Site 処理 実証設備のフロー (MBR)



膜ユニット (8本/2組)
300~600L/日

処理水タンク
(3m³)

次亜塩素酸
Na (10L)

菌の漏出対策

【試験内容】

- バッチ処理での予備的評価 (H25)
- 連続処理による実証

H25: 短期運転、H26: 長期運転

生物浄化槽

浄化槽内

膜ユニット

On Site 処理 現場実証試験成績(長期連続運転)

汚染地下水の水質

1,4-ジオキサン	0.06~0.66mg/L
TOC	7.7~9.8 mg/L
無機窒素	9.4~13.2 mg/L
リン酸	0.28~0.34 mg/L

運転条件

運転温度	25 °C
曝気	20 L/min
HRT	12~18h

【凡例】

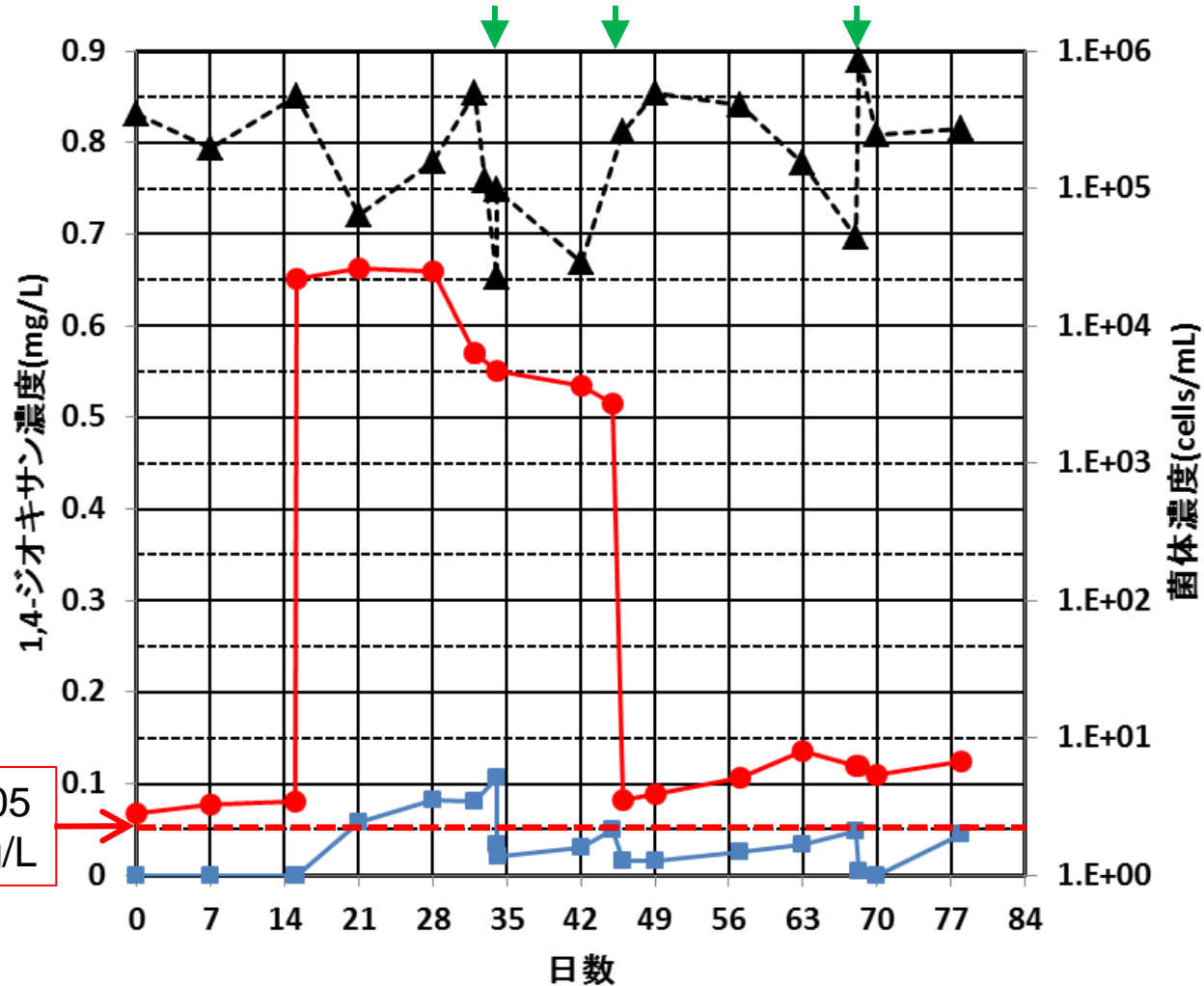
1,4-ジオキサン濃度

● : 汚染地下水

■ : 処理水

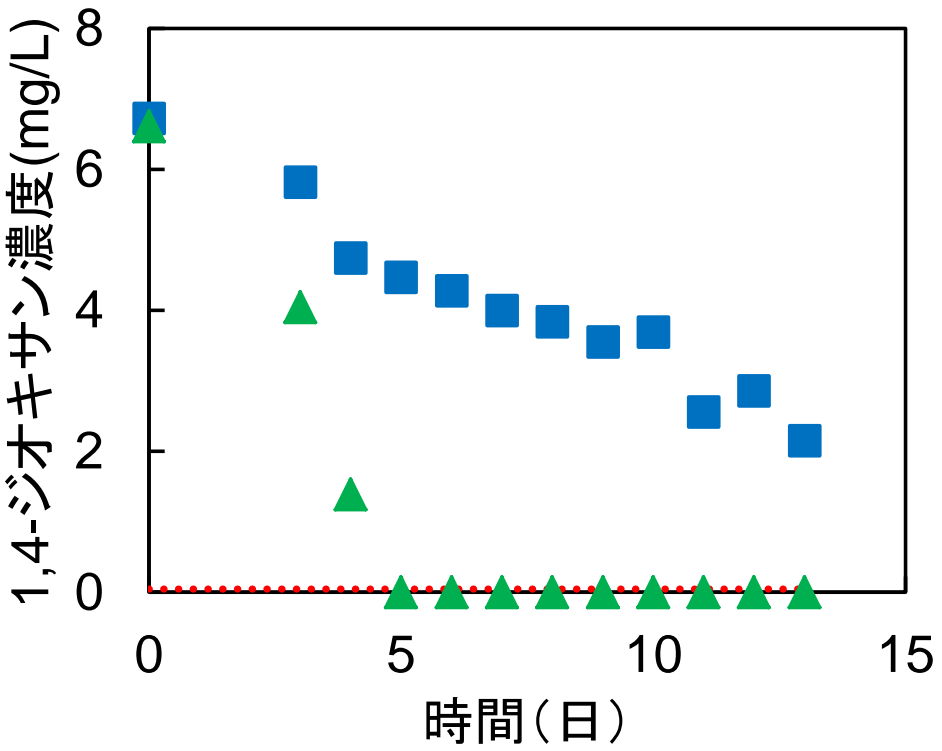
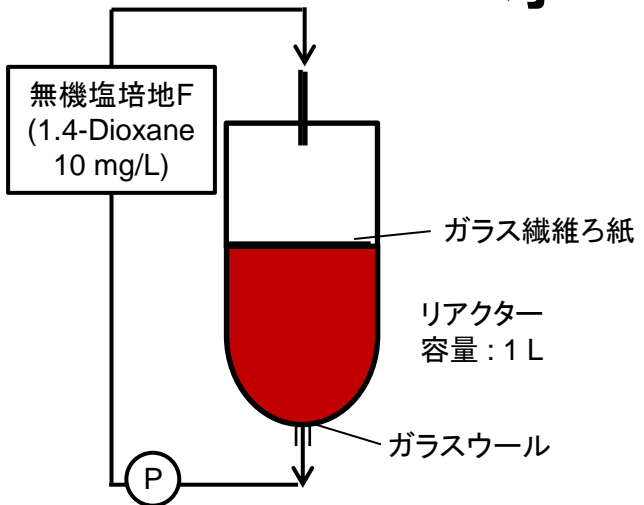
菌体濃度 : ▲

分解菌D17株添加 : ↓



約3か月間、ほぼ環境基準値までの処理を達成
(菌体濃度の維持が課題: 菌体の逐次添加)

バイオオーグメンテーション 土壌(砂)カラムでのバイオ オーグメンテーション試験(D17株)



土壌充填条件	
砂	1.0 kg
吸水量	0.25-0.26 kg
空隙	20 mL
空隙率	3%

運転条件	
HRT	1日
運転温度	28±1°C
曝気	なし
培地量	0.3 L
循環速度	0.3 L/日

■ 対照系 ▲ 試験系
 環境基準値

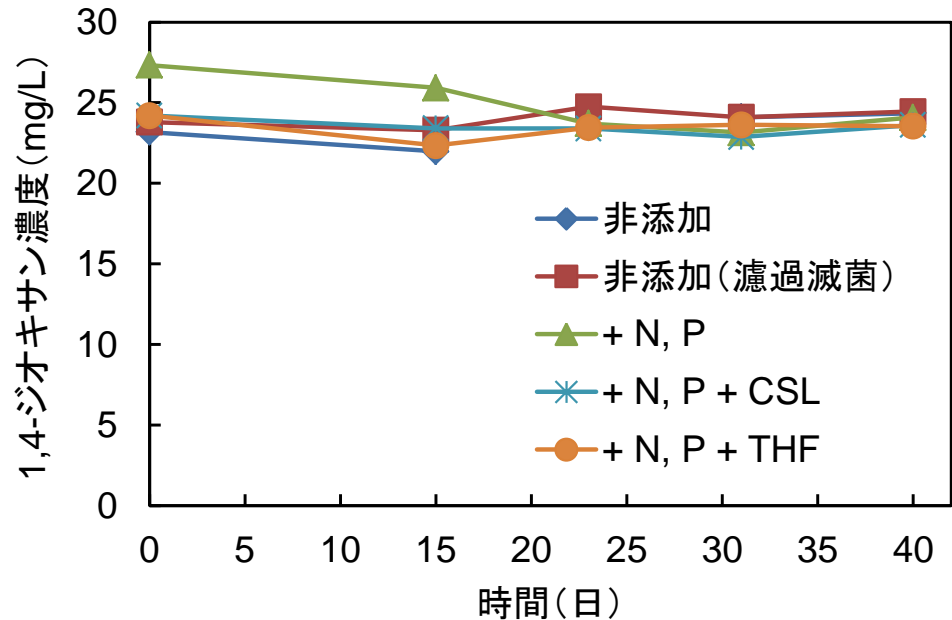
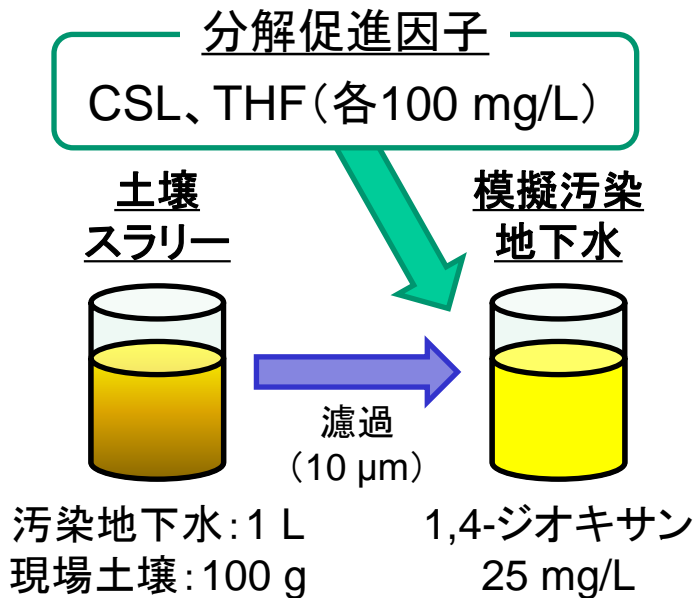
土着微生物共存下で1,4-ジオキサンを速やかに環境基準値以下まで分解

(酸素供給が一つの鍵)

バイオスティミュレーション ボトル試験での試行

既存分解菌の分解促進因子を検索しstimulantとして利用

- コーンステープリカー(CSL)、カザミノ酸等が1,4-ジオキサン分解と増殖に有効(誘導型資化菌D6株、構成型資化菌D17株)
- テトラヒドロフラン(THF)は共代謝分解の既知の一次基質



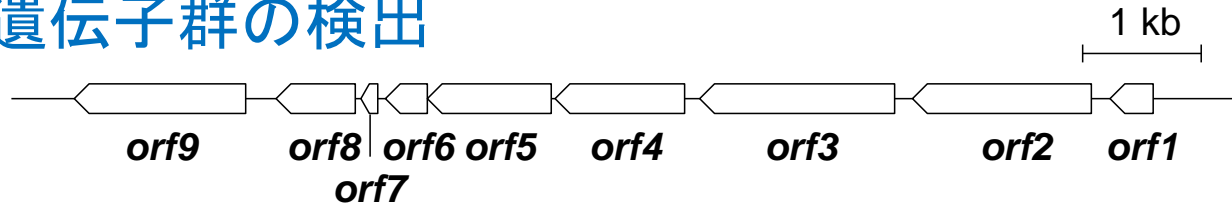
汚染環境中の1,4-ジオキサン分解菌を活性化するには至らず(より有望な分解促進因子の検索の必要性)

モニタリング 1,4-ジオキサン分解関連遺伝子群の特定

分解菌のドラフトゲノム解析

誘導型資化菌D6、構成型資化菌D11、D17、共代謝分解菌T1、T5のゲノムのほぼ全長データを取得

分解関連遺伝子群の検出



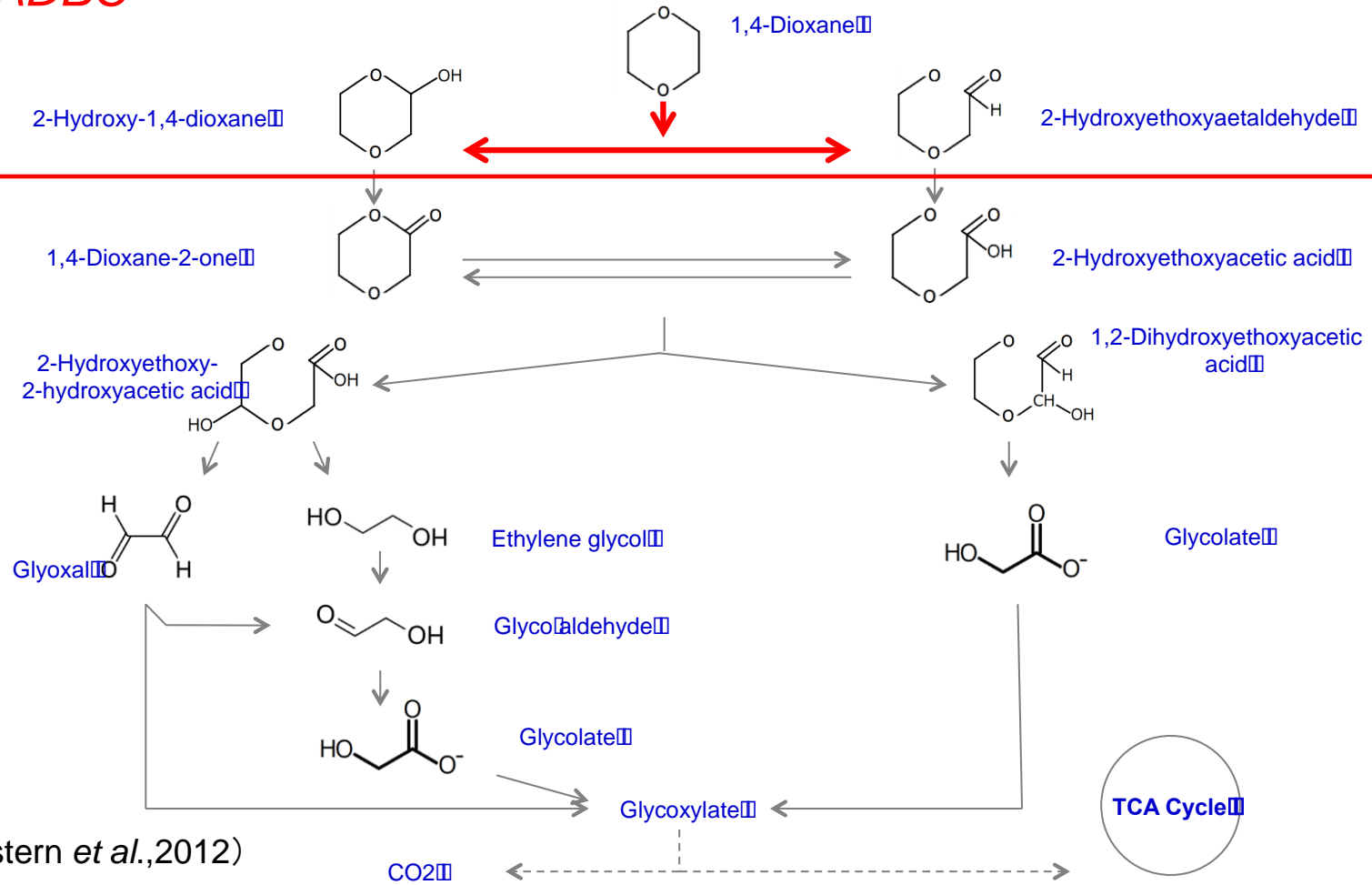
Gene	start	end	Putative function of gene product	origin	%identity
<i>orf9</i>	8202	6766	Aldehyde dehydrogenase	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	99%
<i>orf8</i>	9121	8459	Hypothetical protein	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	99%
<i>orf7</i>	9310	9170	Hypothetical protein	<i>Pseudonocardia</i> sp. K1	86%
<i>orf6</i>	9725	9375	ThmC, tetrahydrofuran monooxygenase coupling protein	<i>Rhodococcus</i> sp. YYL	100%
<i>orf5</i>	10765	9728	methane/phenol/toluene hydroxylase	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	99%
<i>orf4</i>	11884	10799	Ferredoxin--NAD(+) reductase	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	100%
<i>orf3</i>	13645	12011	alpha-subunit of multicomponent tetrahydrofuran monooxygenase	<i>Pseudonocardia</i> sp. K1	99%
<i>orf2</i>	15296	13797	Betaine-aldehyde dehydrogenase	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	100%
<i>orf1</i>	15814	15452	hypothetical protein	<i>Pseudonocardia</i> sp. ENV478	99%

D17株、T5株：1,4-ジオキサン分解への関与が報告されている*thm*遺伝子群が存在 ⇒ **分解菌モニタリングへの活用の可能性**

D6、D11、T1株：既知の分解関連遺伝子群は存在せず ⇒ **新規分解遺伝子の存在を示唆**

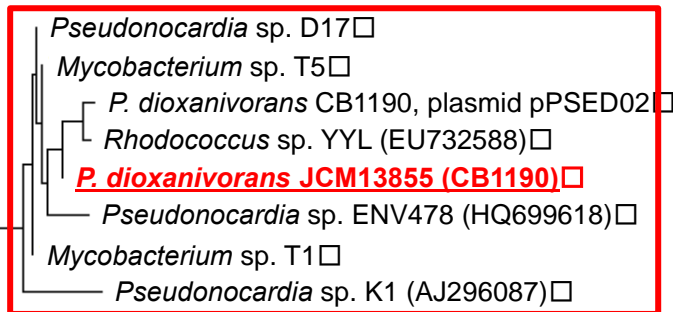
モニタリング 分解菌のマーカとしての *thmADBC*

thmADBC

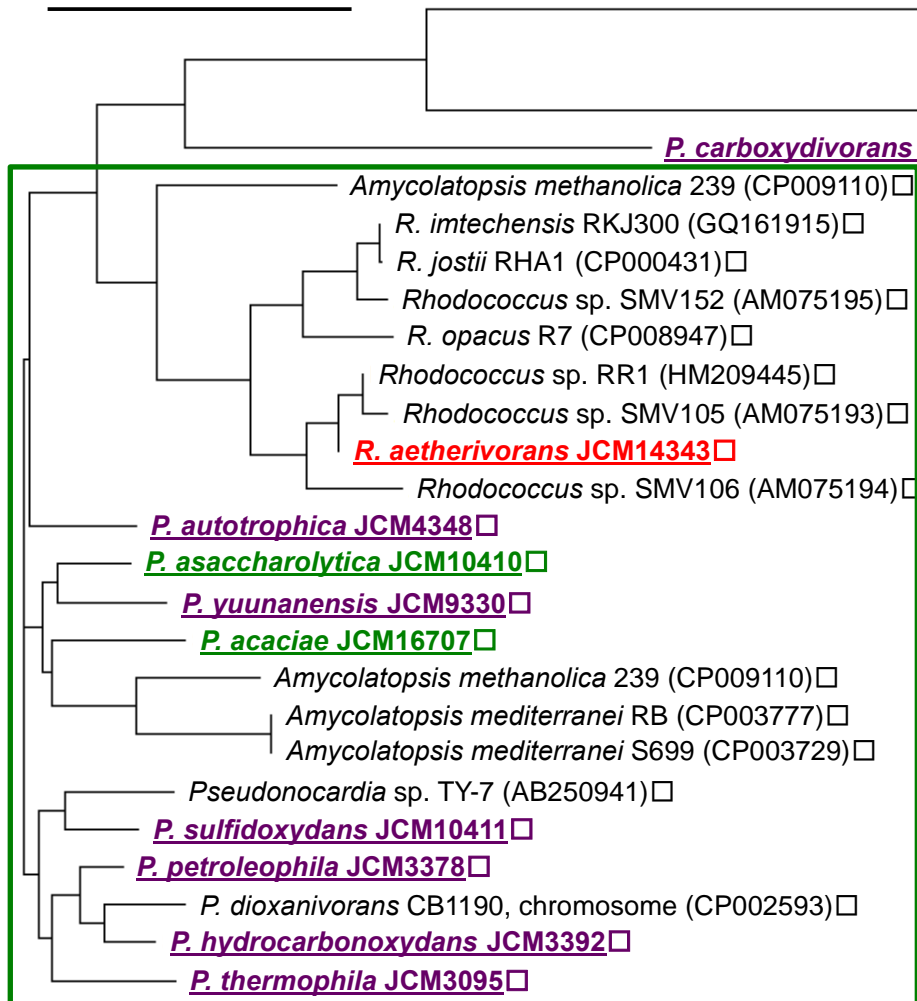


唯一の既知の1,4-ジオキサン分解遺伝子 *thmADBC* が他の菌株による分解にも関与することを確認 (マイクロアレイ解析)

1,4-ジオキサン・THF
モノオキシゲナーゼ遺伝子



0.1□



プロパン・メタンモノオキシゲ
ナーゼ遺伝子

黒： GenBank登録菌株
 赤、緑、紫： 本研究の解析菌株
 赤： 1,4-ジオキサン資化菌
 緑： 1,4-ジオキサン共代謝菌
 紫： THF資化菌

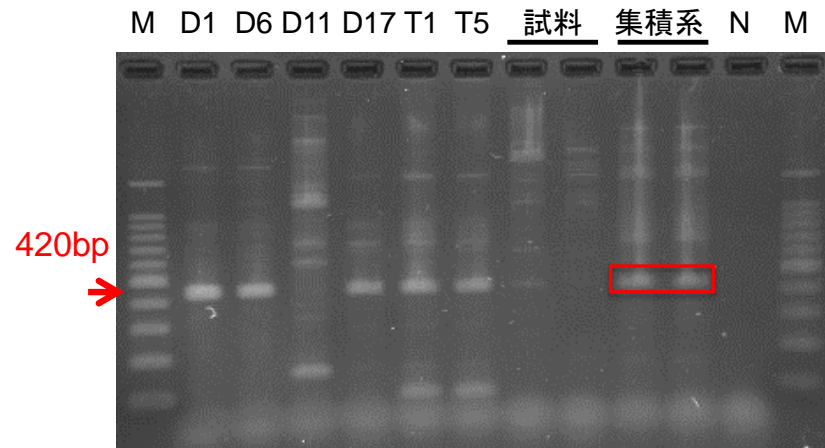
1,4-ジオキサン分解関与遺伝子は、
thm遺伝子を含む、可溶性鉄(II)モノ
オキシゲナーゼ(SDIMO)遺伝子
群に広く分布

⇒ 生物浄化可能性診断への活用

モニタリング 分解菌モニタリング法の開発

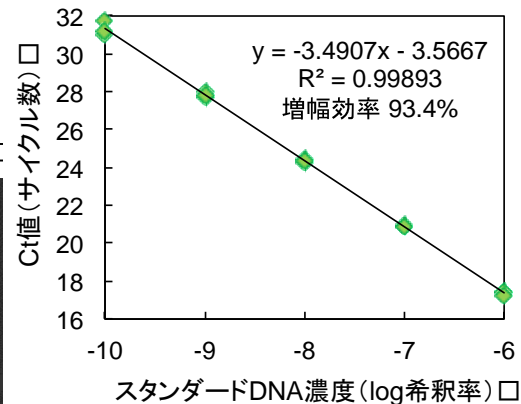
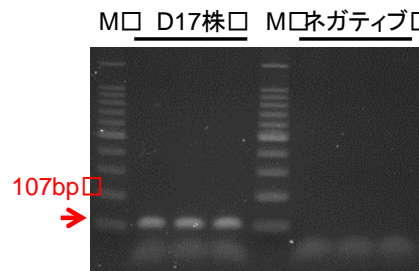
1,4-ジオキサン分解関与遺伝子群の網羅的検出手法

- 解析手法: nested PCR法(＋クローニング／次世代シーケンス)
- 標的遺伝子: **SDIMO遺伝子α**
 - 新規分解菌の特徴づけ、汚染現場の分解ポテンシャル診断



D17株の特異的定量手法

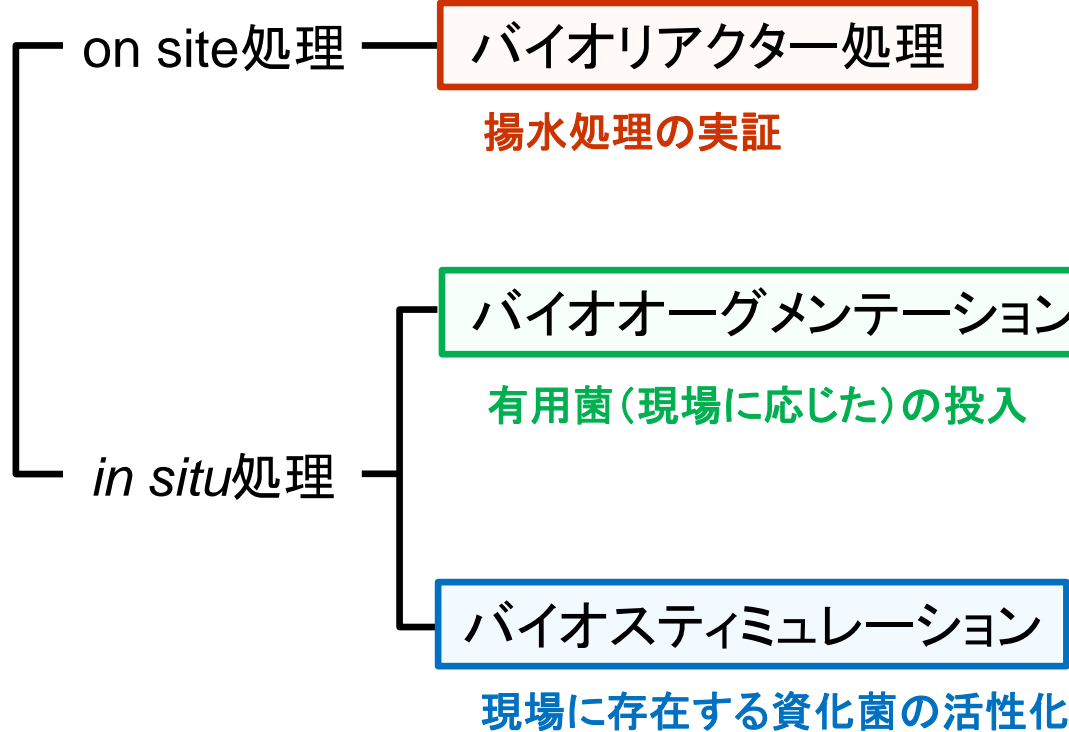
- 解析手法: Real-time PCR法
- 標的遺伝子: **thmC遺伝子**
 - 浄化実証試験における使用菌株の挙動解析



汚染現場の生物浄化可能性の診断(浄化技術選択)と有望な分解菌に対する挙動理解に資するモニタリング法を整備

本研究の達成状況

・浄化技術の開発



実汚染地下水中の
1,4-ジオキサンの連
続処理に成功

環境基準値を満た
す処理の可能性を
確認

特定基質による分
解菌の選択的活性
化の可能性を提示

・診断ツールの開発

特異的遺伝子モニタリング

高精度の定量モニタ
リング法を確立

1,4-ジオキサン分解菌を利用した地下水浄化技術のイメージ

特異的遺伝子モニタリング (生物浄化可能性診断)

分解菌導入 不可

土着分解菌なし
分解菌導入 可

土着分解菌あり

バイオリアクター処理

バイオオーグメンテーション

バイオスティミュレーション

(有望な分解菌の地中導入)

(土着分解菌の活性化)

処理水

分解菌

活性化
因子

抽出
井



汚染地下水

汚染地下水

汚染地下水

特異的遺伝子モニタリング (浄化中の分解菌挙動診断)

本研究により得られた主な成果

【科学的意義】

- 系統分類学的、分解様式的に多様な1,4-ジオキサン分解菌の生理学的特性および分解特性の解明
- 複数の分解菌のゲノムレベルでの理解と分解関連遺伝子の特定
- 各種浄化技術の開発(On siteリアクターは現場実証)

【環境政策への貢献】

多様な汚染現場特性に対応可能な、低コストで環境基準値を達成できる1,4-ジオキサン汚染対策技術パッケージの整備

- 汚染現場の特徴を整理したデータベース
- 系統分類学的、分解様式的に多様な分解菌のライブラリ
- 生物浄化の各種オプションの基盤
- 浄化技術選択に資する生物浄化可能性診断ツール



国内外で発生している1,4-ジオキサン汚染の早期浄化と汚染に伴う健康被害の未然防止に貢献

研究開発に係る情報発信

・2014地球環境保護 土壌・地下水浄化技術展

開催日：平成26年10月15-17日

開催場所：東京ビッグサイト 西ホール

*ポスター、ミニセミナー(3回/日)による研究内容紹介

・岩手県 原状回復対策協議会

開催日：平成25年5月25日、平成26年3月15日

開催場所：二戸地区合同庁舎大会議室

*実証試験計画、試験結果を報告

・新聞等による報道

➤ 実証試験

新聞報道：2件(岩手日報、デーリー東北)

Webニュース：1件(デーリー東北)

➤ 1,4-ジオキサン汚染の生物浄化

新聞報道：7件

(日経産業新聞、建設通信新聞、日刊建設産業新聞、日刊建設工業新聞、フジサンケイビジネスイ、建設通信、環境新聞)



展示ポスター

大成建設と大阪大学、北里大学は、地下水汚染中の有機塩素化合物を浄化する技術を開発した。分解菌を入れた反応槽で汚染水を処理する。実験は、9月に岩手・青森県境で実証試験を始める。

大成建設と大阪大学、北里大学は、地下水汚染中の有機塩素化合物を浄化する技術を開発した。分解菌を入れた反応槽で汚染水を処理する。実験は、9月に岩手・青森県境で実証試験を始める。

は、鉛やヒ素、ベンゼンなどを含む水溶液でも働くといい。

従来の処理技術は、工場排水の中に過酸化水素水を大量に入れ、紫外線などを照射。その中に分解速度が速く、一定量

分解すると働きが止まる。分解菌を入れて、環境基準値を満たしていた。ただ、この方法だと年間数億円もの運営コストがかかる上、様々な有害物質が混ざると処理ができません。

H25年7月11日
日経産業・朝刊

汚染水浄化コスト1/10

大成建設など 岩手・青森県境で実証

研究業績

● 学術論文(査読付き)

1. Sei K., Oyama M., Kakinoki T., Inoue D. and Ike M.: Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation, *J. Water Environ. Technol.*, 11 (1), 11–19 (2013)
2. Sei K., Miyagaki K., Kakinoki T., Fukugasako K., Inoue D. and Ike M.: Isolation and characterization of bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source, *Biodegradation*, 24(5), 665–674 (2013).

● 総説

1. (株)オフィス東和編:排水污水处理技術集成Vol.2, エヌ・ティー・エス社, 95-101 (2013)
「第2編 第1章 第2節 1,4-ジオキサン分解菌を用いた汚染水の生物処理・浄化技術の可能性(執筆担当:清和成、池道彦)」
2. 山本哲史, 斎藤祐二, 井上大介, 清和成, 黒田真史, 池道彦: 1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化技術, 環境浄化技術, 13(5), 15–19 (2014)
3. 山本哲史, 斎藤祐二: 1,4-ジオキサンの生物処理技術, 環境管理, 2015年1月号 (2015)

● 特許

- ・1,4-ジオキサン分解菌の培養方法に関する特許を出願中

● 学会発表

- ・国際会議:4件
- ・国内学会:5件

● 受賞

- ・WET Excellent Paper Award (2012)
- ・第49回日本水処理生物学会大会ベストプレゼンテーション賞 (2012)
- ・日本水環境学会論文奨励賞(廣瀬賞) (2013)