

課題名 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

課題代表者名 池 道彦（国立大学法人大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻生物圏環
境工学領域 教授）

研究実施期間 平成24～26年度

累計予算額 115,601千円（うち26年度40,460千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード1,4-ジオキサン、バイオレメディエーション、地下水揚水処理、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、1,4-ジオキサン分解菌、ゲノム解析、定量的モニタリングツール

研究体制

- (1)1,4-ジオキサン分解菌の分解活性化因子の特定と浄化戦略の策定（国立大学法人大阪大学）
- (2)1,4-ジオキサン汚染サイトの生物浄化可能性評価診断ツールの開発（学校法人北里研究所北里大学）
- (3)1,4-ジオキサン汚染サイトにおける1,4-ジオキサン浄化実証試験（大成建設株式会社技術センター）

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

1,4-ジオキサンは各種化学・医薬品工業、繊維工業等で汎用されており、PRTR届出データによると日本では年間約60tが公共用水域に排出されている。また、ポリエチレンテレフタレートや界面活性剤製造時の副生成物として非意図的にも排出されている。1,4-ジオキサンは水に任意に混和するが、揮発性、固相への吸着性、光分解性、加水分解性、生分解性がいずれも低く、環境中へ放出されると長期間水環境中に残留しやすい。一方、1,4-ジオキサンは急性、慢性毒性を有する上、発がん性を有する可能性も指摘されており、水環境中での高い残存性から人体への悪影響が懸念されている。

そのため、WHOにより1,4-ジオキサンに係る飲料水水質ガイドライン（2003年：0.05mg/L）が、日本でも水道水質基準（2004年：0.05mg/L）、水環境基準（2009年：0.05mg/L）、排水基準（2012年：0.5mg/L）が定められている。しかし、現実には1,4-ジオキサンは各地の河川水や地下水から数十～数百 $\mu\text{g/L}$ の濃度で検出されており、埋め立て処分場周辺の地下水からは数mg/Lでの検出も報告されている。これらの汚染環境の浄化は喫緊の課題であるが、現状では1,4-ジオキサンは、高エネルギー消費・高コストとなるオゾンと紫外線による促進酸化法（AOP）以外では十分に処理できないことが明らかとなっており、広範囲に渡る土壌や地下水汚染の浄化には現実的な方法はない。

2. 研究開発目的

我々は1,4-ジオキサンの生物分解に関する研究を実施し、多様な環境試料から1,4-ジオキサン分解菌の分離に成功してきた。また、その活用により、低コストの1,4-ジオキサン含有排水処理が可能であることも示してきた。このことから、汚染環境の浄化についても、土着の1,4-ジオキサン分解菌、あるいは我々が単離した高性能の分解菌を活用したバイオスティミュレーション、バイオオーグメンテーション、オンサイト浄化等の技術を確認することは可能であると想起した。一方で、汚染環境における分解菌の存在やその分解能力の情報を収集、診断し、汚染環境の状態に合わせた最も適切な浄化対策技術を選択する必要がある。そこで本研究では、1,4-ジオキサン分解菌を用いた1,4-ジオキサン汚染環境の浄化技術を確認するとともに、1,4-ジオキサン汚染現場の浄化戦略の策定に有用な、浄化促進手法を診断するツールを開発することで、包括的な1,4-ジオキサン浄化技術パッケージを提案することを目的とした。

3. 研究開発の方法

(1) 1,4-ジオキサン分解菌の分解活性化因子の特定と浄化戦略の策定

1) 1,4-ジオキサン分解菌の生理学的・遺伝学的特徴付け

D1株、D6株、D11株、D17株、T1株、T5株の計6株の1,4-ジオキサン分解細菌について、形態観察や炭素源資化能、系統分類などの基本特性の解析、1,4-ジオキサン分解特性の解析、ドラフトゲノム配列の決定などを行い、バイオレメディエーション技術開発の基礎情報を得た。ドラフトゲノム配列の解析は北海道システム・サイエンス社に委託した。

2) バイオリアクターを用いたモデル汚染地下水の浄化試験

1250mL容の完全混合式リアクターを用い、ウォータージャケットにより水温を $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整した。pHコントローラーによりpH7.5を維持した。また、エアポンプにより曝気しDO値が4mg/L以上となるように保つとともに、攪拌を行った。包括固定化した*Pseudonocardia* sp. D17株を充填率が約13%となるように加え、同様のリアクターに固定化したD17株を加えない実験系を対照とした。無機塩培地F(1g/L K_2HPO_4 、1g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、50mg/L NaCl、200mg/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10mg/L FeCl_3 、50mg/L CaCl_2 、pH7.5)の組成を基準として窒素及びリン濃度を様々に調整し、10mg/Lの1,4-ジオキサンを添加したものを模擬汚染地下水として用いた。これを、水理学的滞留時間(HRT)が2~12hとなるように連続的にリアクターに流入させた。原水及び各槽内の1,4-ジオキサン濃度、溶解性有機炭素濃度(DOC)を経日的に測定した。また、固定化担体に含まれる*Pseudonocardia* sp. D17株の生菌数を適宜測定した。

3) バイオリアクターを用いた実汚染地下水の浄化試験

青森・岩手県境不法投棄現場において採取した1,4-ジオキサン汚染地下水について、上記と同様のバイオリアクターを用いて処理を試みた。運転開始後0-7日目(Phase R-I)及び7-14日目(Phase R-II)にはそれぞれ1,4-ジオキサン添加無機塩培地及び模擬汚染地下水を、またPhase R-III(14-19日目)には実汚染地下水に10mg/Lの1,4-ジオキサンを添加し、リアクターに連続的に供給した。Phase R-I~R-IIIを通じて、HRTは6hに設定した。水温 $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、pH7.5、DO 4mg/L以上となるように制御した。原水及び各槽内の1,4-ジオキサン濃度及びDOCを経日的に測定した。また、固定化担体に含まれる*Pseudonocardia* sp. D17株生菌数を適宜測定した。

(2) 1,4-ジオキサン汚染サイトの生物浄化可能性評価診断ツールの開発

1) 既存1,4-ジオキサン分解菌の近縁種の1,4-ジオキサン分解能の評価

既知の1,4-ジオキサン分解菌の系統分類学的位置に着目すると、特に*Pseudonocardia*属と*Rhodococcus*属に分類されるものが多いことが明らかになった。そこで、1,4-ジオキサン分解能が両属の細菌に共通の特性であるのか、あるいは一部の種またはグループに特異的な特性であるのかを明らかにするため、*Pseudonocardia*属から13種、*Rhodococcus*属から12種を代表種として選定し、1,4-ジオキサン資化能およびテトラヒドロフランを一次基質とした共代謝能を調査した。

2) 既存1,4-ジオキサン分解菌のマイクロアレイ発現解析

Mycobacterium sp. D6株および*Pseudonocardia* sp. D17株のドラフトゲノムデータに基づき、全ゲノムを対象としたマイクロアレイを作製した。また、*Pseudonocardia* sp. D17株について、作製したマイクロアレイを用いた発現解析を行い、1,4-ジオキサン分解に関与する遺伝子群の特定を試みた。

3) 1,4-ジオキサン分解菌の定量的モニタリングツールの開発

浄化実証試験で使用する*Pseudonocardia* sp. D17株の挙動をモニタリングするため、同菌株のドラフトゲノムデータおよびマイクロアレイ発現解析の成果を元にして、特異的に定量検出できるreal-time PCRシステムの開発を行った。1,4-ジオキサン分解に関与すると推定された遺伝子群を検出するためのPCRプライマーを設計し、特異性が高いことが確認されたプライマーを対象として、*Pseudonocardia* sp. D17株のゲノムDNAを用いた検出感度の評価を行い、高感度検出が可能なプライマーについて、real-time PCR反応条件の最適化を行った。他方、環境中の1,4-ジオキサン生分解ポテンシャルを評価するツールを開発するため、文献調査と実験的検討を実施した。

(3) 1,4-ジオキサン汚染サイトにおける1,4-ジオキサン浄化実証試験

1) 1,4-ジオキサンの汚染サイトの調査

文献及び公開されている資料等を基に国内外の1,4-ジオキサン汚染について整理した。

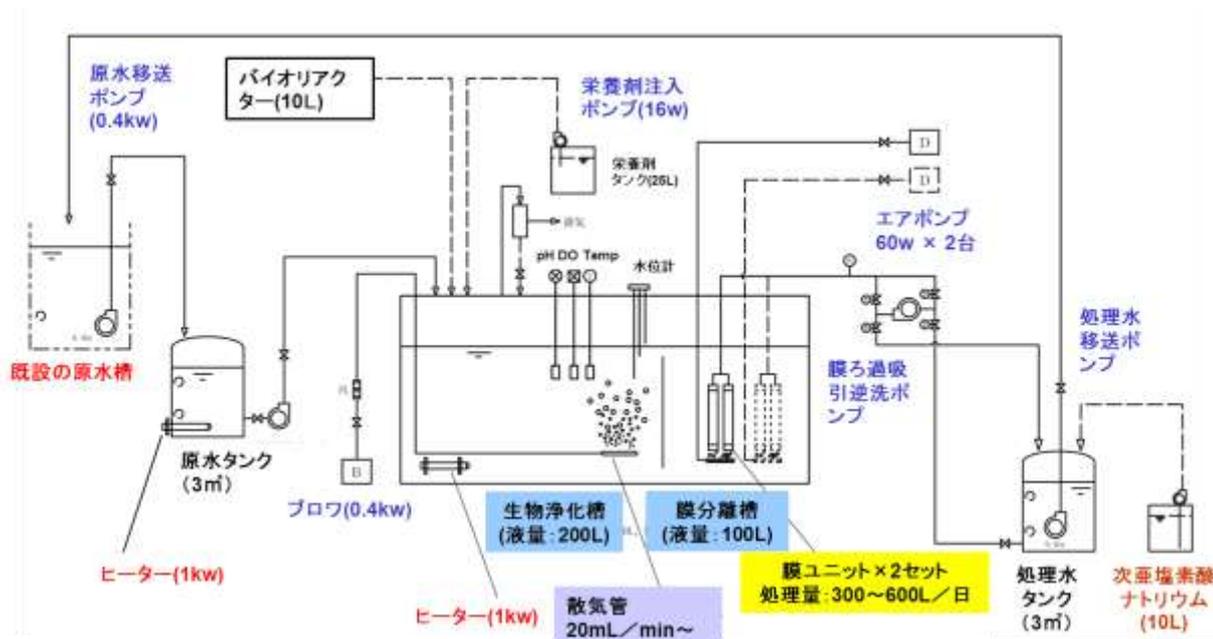


図1 実証設備のフロー図

2) 1,4-ジオキサン浄化実証試験

図1に示した実証試験装置を設計し、岩手・青森県境不法投棄現場の水処理施設建屋内に設置した。既設の原水槽へ揚水した地下水は、一旦原水タンクで貯留された後、生物浄化槽へ送液される。生物浄化槽では、*Pseudonocardia* sp. D17株によって1,4-ジオキサンの分解がなされた後、膜分離ユニットによって地下水のみを処理水タンクに移送し、最終的には水処理施設に返送する。尚、処理水タンクでは、*Pseudonocardia* sp. D17株の漏えい対策として次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理設備を設けている。ヒーターにより水温を20～25℃に保つとともに、ブロフにより曝気を行った。

4. 結果及び考察

(1) 1,4-ジオキサン分解菌の分解活性化因子の特定と浄化戦略の策定

1) 1,4-ジオキサン分解菌の生理学的・遺伝学的特徴付け

我々が単離した1,4-ジオキサン分解菌の生理学的特徴を解析した。系統解析の結果、*Afipia* sp. D1株、*Mycobacterium* sp. D6株、*Mycobacterium* sp. D11株、*Pseudonocardia* sp. D17株、*Rhodococcus* sp. T1株、*Rhodococcus* sp. T5株であるとそれぞれ同定された。つまり、*Afipia* sp. D1株を除く5株全てが *Actinobacteria* 綱に分類され、環境中において *Actinobacteria* 綱細菌は1,4-ジオキサン分解に大きな役割を果たしている可能性が推測された。また、1,4-ジオキサン分解様式として、1,4-ジオキサンの存在によって分解活性が誘導される株（誘導型：*Afipia* sp. D1株、*Mycobacterium* sp. D6株）、1,4-ジオキサンの存在に関わらず分解活性を持つ株（構成型：*Mycobacterium* sp. D11株、*Pseudonocardia* sp. D17株）、テトラヒドロフランの存在によって1,4-ジオキサンの分解活性が誘導される株（共代謝型：*Rhodococcus* sp. T1株、*Rhodococcus* sp. T5株）の3種が存在することが明らかとなった。

また、ドラフトゲノム解析を行い、*Mycobacterium* sp. D6株、*Mycobacterium* sp. D11株、*Pseudonocardia* sp. D17株、*Rhodococcus* sp. T1株、*Rhodococcus* sp. T5株の遺伝学的特徴を調べた。*Pseudonocardia* sp. D17株及び *Rhodococcus* sp. T5株は、既報の分解菌の持つ1,4-ジオキサン分解酵素遺伝子である *thmA* 遺伝子と相溶性の高い遺伝子を持つ一方で、*Mycobacterium* sp. D6株、*Mycobacterium* sp. D11株、及び *Rhodococcus* sp. T1株は *thmA* 遺伝子とは配列が異なる1,4-ジオキサン分解酵素遺伝子を持つことが示唆された。

2) バイオリアクターを用いたモデル汚染地下水の浄化試験

固定化した *Pseudonocardia* sp. D17株を用いてバイオリアクターを構築し、10mg/Lの1,4-ジオキサンを含むモデル汚染地下水の処理を試みた(図2)。その結果、水理的滞留時間(HRT)を12時間に設定した期間(Phase I～II)において、検出限界以下までの1,4-ジオキサン除去を達成した。その後、HRTを6時間から2時間まで段階的に下げたところ、HRT3時間までの範囲(Phase III～V)で、安定して処理を達成した。HRTを2時間

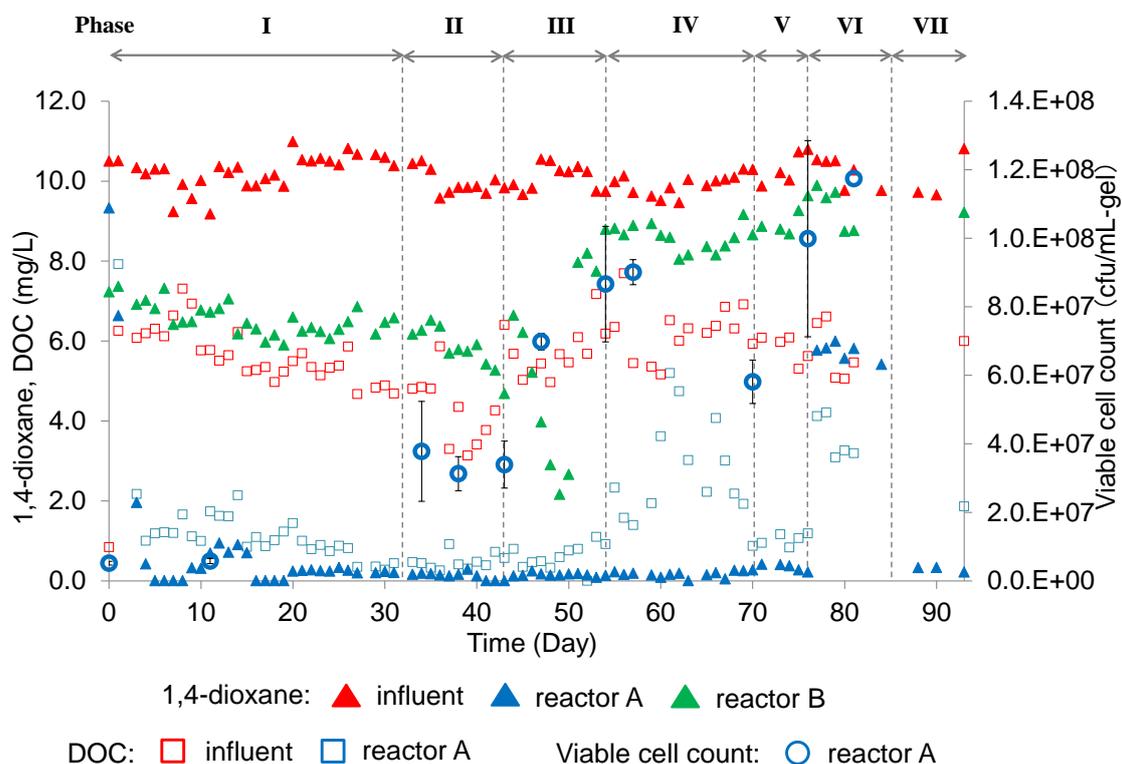


図2 *Pseudonocardia* sp. D17株を用いたバイオリクターによる1,4-ジオキサン分解

にしたところ処理性能は悪化し、1,4-ジオキサンは約5.8mg/L残存したが(Phase VI)、HRTを6時間として負荷を落とすと1,4-ジオキサン処理性能は回復した(Phase VII)。以上より、本リアクターは高速で大量の汚染水を処理可能であり、さらには運転条件を調整することで環境基準値を達成しうる高性能を発揮することが明らかとなった。

3) 模擬汚染土壌—地下水カラムを用いたオーグメンテーション試験

Pseudonocardia sp. D17株を用いたバイオオーグメンテーション法の有効性をスケールアップした実験系で確認するため、模擬汚染土壌—地下水カラムを用いて試験を行った。*Pseudonocardia* sp. D17株を添加した試験系では、1,4-ジオキサン濃度は約5日で検出限界以下にまで減少した。対照系においても1,4-ジオキサン濃度の緩やかな減少が確認されたが、これは揮発によるものと考えられた。従って、本実験系において *Pseudonocardia* sp. D17株は有効に働き、模擬汚染土壌—地下水系に含まれる1,4-ジオキサンを浄化できたものと考えられる。今回のラボスケールの試験系では1,4-ジオキサンの分解が良好に進行したが、実際の汚染現場に適用する際には、酸素の供給不足により1,4-ジオキサン分解の阻害が生じる可能性があるため、エアスパーキング法等との組み合わせなど、適切な酸素供給方法の検討が、実用化に向けての課題であると考えられる。

(2) 1,4-ジオキサン汚染サイトの生物浄化可能性評価診断ツールの開発

1) 既存1,4-ジオキサン分解菌の近縁種の1,4-ジオキサン分解能の評価

既存の1,4-ジオキサン分解菌の多くが分類される *Pseudonocardia* 属および *Rhodococcus* 属における1,4-ジオキサン分解能について網羅的に調査するため、*Pseudonocardia* 属の13種、*Rhodococcus* 属の12種に対して、1,4-ジオキサン資化能と、テトラヒドロフランを一次基質とした1,4-ジオキサン共代謝能を調査した。その結果、25種の中で *P. dioxanivorans* JCM 13855^T と *R. aetherivorans* JCM 14343^T においてのみ、1,4-ジオキサンの資化が観察された。*P. dioxanivorans* JCM 13855^T は元々1,4-ジオキサン資化菌として分離された菌株であるが、*R. aetherivorans* JCM 14343^T についてはメチル *tert*-ブチルエーテルを分解することが知られているものの、1,4-ジオキサン分解能は本研究で初めて確認された。また、これら2種に加えて、*P. acaciae* JCM 16707^T および *P. asaccharolytica* JCM 10410^T においては、テトラヒドロフランと1,4-ジオキサンを同時に添加した場合において、テトラヒドロフラン分解に続く1,4-ジオキサンの分解が観察され、テトラヒドロフランを一次基質に利用して1,4-ジオキサンを共代謝分解することが明らかになった。一方、*Pseudonocardia* 属の8種ではTHF分解は観察されたものの、試験期間中に1,4-ジオキサンの分解は確認されなかった。以上の結果から、①1,4-ジオキサン資化能は *Pseudonocardia* 属、*Rhodococcus* 属に共通の特性ではなく、限られた種または株の特性であること、

② *Pseudonocardia*属の多くの種がテトラヒドロフラン分解能を保有しており、その一部は1,4-ジオキサンの共代謝分解も可能であること、③ *Rhodococcus*属では、テトラヒドロフラン分解能も一部の種あるいは株に特異的な特性であることが示唆された。従って、1,4-ジオキサン分解微生物の検出ツールを開発するためには、16S rRNA遺伝子ではなく、1,4-ジオキサン分解に関与する遺伝子を指標として利用すべきであると考えられた。

2) 既存1,4-ジオキサン分解菌のマイクロアレイ発現解析

Mycobacterium sp. D6株および*Pseudonocardia* sp. D17株の全ゲノムの発現状況を評価するため、それぞれ8211種および7571種のDNAプローブを登録したマイクロアレイを設計した。また、1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化への適用が有望な*Pseudonocardia* sp. D17株について、マイクロアレイ発現解析を行った。その結果、*Pseudonocardia* sp. D17株による1,4-ジオキサンの初発酸化に*thm*遺伝子群が関与していることが示唆され、また、同菌株による1,4-ジオキサン分解が構成的に生じることを遺伝子発現レベルで確認することができた。

3) 1,4-ジオキサン分解菌の定量的モニタリングツールの開発

Pseudonocardia sp. D17株の*thmC*遺伝子をターゲットとして、定量モニタリングツール(real-time PCRシステム)を開発した。本ツールの増幅効率は94.6%~104.7%、検量線のダイナミックレンジは6オーダー、相関係数 r^2 は0.994~0.999であった($n=4$)。また、本ツールによる定量値は濁度および直接検鏡法による定量値と高い相関を有することが示された。これらの結果から、本ツールは浄化過程における定量モニタリングツールとして十分な性能を有すると考えられた。さらに、本ツールの浄化実証試験への適用により、1,4-ジオキサン汚染地下水の安定した浄化に必要な菌数が推定された。

他方、環境中の1,4-ジオキサン分解ポテンシャルを評価し得るモニタリングツールとして、1,4-ジオキサン分解に関与する*thm*遺伝子等が含まれるsoluble di-iron monooxygenase (SDIMO) 遺伝子群を網羅的に検出するPCRシステムが有効であることが明らかになった。

(3) 1,4-ジオキサン汚染サイトにおける1,4-ジオキサン浄化実証試験

1) 1,4-ジオキサンの汚染サイトの調査

諸外国における1,4-ジオキサンの汚染事例について、文献調査を行ったところ、米国やカナダ、スウェーデンにおける事例では、廃棄物や工場排水を汚染源としており、多くの場合、1,4-ジオキサンに加えて、VOCによる複合汚染がみられた。一方、ドイツ、ポーランド及びニュージーランドの事例では、濃度は低いものの河川や表層水から1,4-ジオキサンが検出されている。

一方、日本で公表されている主な1,4-ジオキサンによる地下水汚染サイトは4件あり、いずれも不法投棄を汚染源とする。検出された1,4-ジオキサン最大濃度は環境基準値(0.05mg/L)と比較して高く(0.78~44mg/L)、諸外国における事例と同様に、1,2-ジクロロエタンやベンゼン等の複合汚染がみられた。従って、開発すべき浄化技術は、共存物質による阻害を受けずに、環境基準値付近の濃度から高濃度までの幅広い1,4-ジオキサン汚染に対応できるものであることが望ましいと考えられた。

2) 1,4-ジオキサン浄化実証試験

1,4-ジオキサン浄化実証試験の実施場所として、岩手・青森県境不法投棄現場を選定した。本サイトでは、平成21年に1,4-ジオキサンによる地下水汚染が確認されたため、場内の地下水を揚水することで汚染の拡散防止を図っている。さらに、揚水した地下水は、一旦、既設の原水槽に貯留され、促進酸化処理などの水処理施設にて浄化されている(240m³/日)。

この現場の水処理施設建屋内に、実証試験として、D17株を用いたバイオリアクターを設置し、汚染地下水の処理を試みた。まず、約6mg/Lとなるように1,4-ジオキサンを添加した汚染地下水を、回分式で処理したところ、約40時間で全量の1,4-ジオキサンを浄化することができた。これは、ラボスケールリアクターと同等の結果であり、スケールアップによる著しい浄化性能の低下はないものと考えられた。続いて、バイオリアクターの立ち上げ操作の後、汚染地下水の連続処理を試みた。約0.3mg/Lの1,4-ジオキサンを含む実汚染地下水を流入させたところ、滞留時間12時間または24時間の条件において、4日間の試験期間中1,4-ジオキサン濃度は常に環境基準値以下に保たれた。以上より、実証試験装置として設置したバイオリアクターは、1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化に高い効果を示すことが明らかとなった。

続いて、長期的な連続運転における1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化を試みた(図3)。運転開始から32日目までは、滞留時間を12時間、それ以降は18時間で実施した。運転開始から15日目までは、処理水中の1,4-ジオキサン濃度は、環境基準値以下を示し、その値は定量限界値以下(<0.005mg/L)であった。そこで、運転15日目以降は、試薬の1,4-ジオキサンを地下水に添加したものを原水として試験に用いた。その結果、処理水の1,4-ジオキサン濃度は、日数の経過とともに上昇する傾向が確認された。この1,4-ジオキサン濃度の上昇は、

HRTを12時間から18時間に変更しても改善する傾向が確認できなかったため、新たにD17株の植菌液を生物浄化槽に添加した。これにより、処理水中の1,4-ジオキサン濃度は、速やかに低下し、0.05mg/L以下を示した。処理水中の1,4-ジオキサン濃度が上昇した原因は不明であるが、地下水中の微量元素の不足や過曝気による自己酸化等の要因により、分解菌の活性が低下したものと考えられる。一方、新たな植菌液を追加することで、処理水中の1,4-ジオキサン濃度を0.05mg/L未満に維持できることが確認できた。以上のことから、本生物浄化手法を用いることで、およそ3か月間、環境基準値を達成できることが明らかとなった。

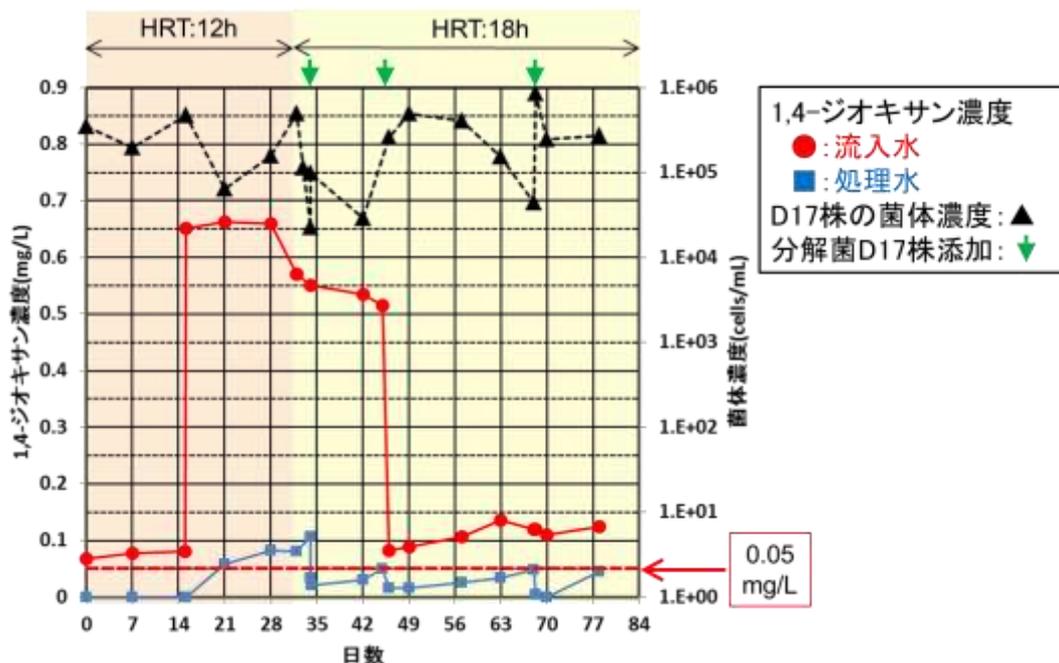


図3 長期運転における流入水及び処理水の1,4-ジオキサン濃度と
Pseudonocardia sp. D17株の菌体濃度の推移

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

これまで1,4-ジオキサン分解菌の報告はわずかであったが、本研究において誘導型分解菌1菌株、構成型分解菌2菌株、共代謝型分解菌2菌株の特徴付けが完了した。これらの菌株は、これまでの報告において最も優れた1,4-ジオキサン分解菌であったCB1190株を上回る能力を持ち、汚染地下水の浄化への適用が有望であることが明らかとなった。また、D17株を用いて構築したバイオリクターは模擬汚染地下水に対して優れた浄化性能を発揮し、10mg/Lという高濃度の1,4-ジオキサン汚染水を環境基準値以下である0.05mg/L以下にまで浄化することが可能であった。これをスケールアップして構築した実証試験設備において、連続バッチ方式、及び連続方式の両方式にて、環境基準値以下の濃度までの1,4-ジオキサン除去を達成した。1,4-ジオキサンに汚染された実環境水の浄化を、低コストでの運転が可能な生物学的処理法で達成したという報告はこれまでになく、本研究はこの分野をリードする成果を挙げていると言える。

また、本研究で考案したジエチレングリコールを用いた培養は、開放系にて*Pseudonocardia* sp. D17を培養できる手法として、バイオレメディエーションを実行する上で画期的なツールである。さらにジエチレングリコールは、*Pseudonocardia* sp. D17だけでなく、環境中の1,4-ジオキサン分解菌を特異的に増殖させることができる基質としての可能性をも有しており、これまでに報告が全くないバイオスティミュレーションを実現する活性化剤としても期待できるものである。

さらに本研究では、我々の取得した5菌株の持つ1,4-ジオキサン分解への関与が推測される遺伝子群を発見し、マイクロアレイ発現解析によりD17株において*thm*遺伝子群が1,4-ジオキサン分解に関わることを強く示唆する結果を得た。また、この知見を利用して開発した*thmC*遺伝子をターゲットとするreal-time PCRシステムによりD17株を特異的かつ高感度に検出することに成功し、実証試験設備に用いたD17株の定量モニタリングツールが開発されたものと言える。さらには、*thm*遺伝子を含むSDIMO遺伝子を標的としたPCRシステムにより、1,4-ジオキサン分解ポテンシャル評価を評価可能であることを見いだした。以上のことから、本研究では、今後のバイオレメディエーション技術の開発ならびに実施において大いに貢献する1,4-ジオキサン分解菌モニタリング技術の基盤が構築できたものと言える。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

これまで、1,4-ジオキサンに汚染に対して、高エネルギー消費・高コストとなるオゾンと紫外線による促進酸化法(AOP)を除いて浄化法が存在せず、特に様々な夾雑物質を含み、処理すべき量も膨大な土壌/地下水汚染については非常に困難であった。本研究において、系統的にも分解様式的にも多様な1,4-ジオキサン分解菌のライブラリを構築することができ、さらに、1,4-ジオキサン汚染環境のオンサイトリアクターあるいはバイオオーグメンテーションによる浄化に有望な数株の1,4-ジオキサン分解菌を提示することができた。特に、D17株については、他の汚染物質が共存する場合でも1,4-ジオキサン分解活性を維持できることが確認され、様々な特性をもつサイトにおける1,4-ジオキサン汚染の浄化に活用することができると考えられる。実際に、青森・岩手県境不法投棄現場に設置した実証設備は、1,4-ジオキサン汚染地下水を用いた試験において高い性能を発揮しており、1,4-ジオキサンによる土壌/地下水汚染の浄化の現実的な対策となりうると期待される。我々の調査だけでも国内において公表されている1,4-ジオキサンによる地下水汚染現場は4ヶ所あり、潜在的にはさらに多くの汚染現場が存在する可能性がある。本研究により現実的な汚染対策技術が開発されれば、公表されている汚染現場の浄化への貢献のみならず、新たな汚染現場の発見と浄化の促進にも貢献できるものと期待される。我々は、学会発表などの学術的な公表のみならず、新聞報道などによる一般向けの情報発信も積極的に行うことで成果の普及に努めており、国内外で発生している1,4-ジオキサン汚染問題の解決と、汚染に伴う健康被害の未然防止に貢献することを目指している。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE and M. IKE: J. Water Environ. Technol., 11, 1, 11–19 (2013)
“Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation”.
- 2) K. SEI, K. MIYAGAKI, T. KAKINOKI, K. FUKUGASAKO, D. INOUE and M. IKE: Biodegradation, 24, 5, 665–674 (2013)
“Isolation and characterization of bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source”.

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE and M. IKE: Water and Environment Technology Conference 2012 (WET2012), Tokyo, Japan (2012)
“Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation”
- 2) 福ヶ迫久仁衛、池道彦、清和成、井坂和一：日本水処理生物学会第49回大会(2012)
「包括固定化分解菌を用いた低濃度1,4-ジオキサンの処理」
- 3) 成田尚宣、福ヶ迫久仁衛、黒田真史、山本哲史、斎藤祐示、池道彦：第65回日本生物工学会大会(2013)
「*Pseudonocardia dioxanivorans* D17による1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化に関する検討」
- 4) 山本哲史、斎藤祐二、池道彦、清和成、井上大介：第16回日本水環境学会シンポジウム(2013)
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化に関する研究」
- 5) K. SAWADA, D. INOUE, T. TSUNODA, M. MORITA, M. IKE, and K. SEI: Water and Environment Technology Conference 2014 (WET2014), Tokyo, Japan (2014)
“Evaluation of the 1,4-dioxane biodegradation potential of *Pseudonocardia* spp. and *Rhodococcus* spp.”
- 6) M. KURODA, K. FUKUGASAKO, T. NARITA, and M. IKE: IWA World Water Congress & Exhibition 2014, Lisbon, Portugal (2014)
“Development of bioreactor using for treatment of 1,4-dioxane-polluted groundwater”

- 7) K. SAWADA, D. INOUE, T. TSUNODA, Y. AOKI, M. KURODA, M. IKE, and K. SEI: 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries (AGRO'2014), Kochi, Japan (2014)
 “Identification of 1,4-dioxane degradation genes of *Pseudonocardia* sp. D17 by microarray expression analysis”
- 8) 井上大介、角田翼、関雅仁、澤田和子、森田雅恵、池道彦、清和成: 第51回環境工学研究フォーラム (2014)
 「*Pseudonocardia*属細菌および*Rhodococcus*属細菌の1,4-ジオキサン分解ポテンシャルの評価」
- 9) 山本哲史、斎藤祐二、井上大介、清和成、黒田真史、池道彦: 第51回環境工学研究フォーラム (2014)
 「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物処理技術」

7. 研究者略歴

課題代表者: 池 道彦

大阪大学大学院工学研究科修了、博士(工学)、現在、大阪大学大学院工学研究科教授

研究分担者

1) 清 和成

大阪大学大学院工学研究科修了、博士(工学)、現在、北里大学医療衛生学部教授

2) 井上 大介

大阪大学大学院工学研究科修了、博士(工学)、現在、北里大学医療衛生学部准教授

3) 斎藤 祐二

東京工業大学大学院工学研究科修了、博士(工学)、現在、大成建設株式会社技術センター
 建築技術研究所次長

4) 山本 哲史

大阪大学大学院工学研究科修了、工学修士、現在、大成建設株式会社技術センター
 建築技術研究所主任

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

(1) 1,4-ジオキサン分解菌の分解活性化因子の特定と浄化戦略の策定

国立大学法人大阪大学

池 道彦

<研究協力者>

国立大学法人大阪大学

黒田 真史

平成24～26年度累計予算額：45,064千円

(うち、平成26年度予算額：13,851千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

1,4-ジオキサンは、各種工業で汎用される化学物質である一方で、水環境への残留性の高さから各地で汚染が問題となっている。本プロジェクトは、現実的な浄化技術が存在しない1,4-ジオキサンによる地下水汚染に対して、1,4-ジオキサン分解菌を用いた生物浄化技術を確立するとともに、1,4-ジオキサン汚染現場の浄化戦略の策定に有用な浄化促進手法を診断するツールを開発することで、包括的な1,4-ジオキサン浄化技術パッケージを提案することを目的としており、特に本課題では、様々な1,4-ジオキサン分解菌の特徴付け、及びそれを基にした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開発を行った。

ドラフトゲノム解析により各分解菌の遺伝学的特徴付けを行ったところ、我々が保有する1,4-ジオキサン分解菌である *Pseudonocardia* sp. D17株及びT5株は、既報の分解菌の持つ1,4-ジオキサン分解酵素遺伝子である *thmA* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を持つ一方で、D6株、D11株、及びT1株は *thmA* 遺伝子とは配列が異なる1,4-ジオキサン分解酵素遺伝子を持つことが示唆された。構成型1,4-ジオキサン分解菌である *Pseudonocardia* sp. D17株を用いて構築したバイオリアクターは、様々な窒素・リン濃度の模擬汚染地下水、及び実際の汚染現場より採取した地下水に対して高い浄化性能を示し、極めて実現性の高い浄化技術であることが示された。また、模擬汚染地下水を用いた土壌カラムリアクターに *Pseudonocardia* sp. D17株を添加したところ1,4-ジオキサンは速やかに分解されたことから、*Pseudonocardia* sp. D17株を用いたバイオオーグメンテーション技術は、有望な浄化技術オプションであることが示唆された。一方、実際の1,4-ジオキサン汚染土壌/地下水試料によるバイオスティミュレーション試験では、40日間の試験期間中に土着微生物による1,4-ジオキサンの分解は認められなかったことから、実現のためには1,4-ジオキサン分解菌の活性化物質のさらなる探索が必要であるものと考えられた。

[キーワード]

1,4-ジオキサン、1,4-ジオキサン分解菌、バイオレメディエーション、ゲノム解析

1. はじめに

1,4-ジオキサンは各種化学・医薬品工業、繊維工業等で汎用されており、PRTR届出データによると日本では年間約60 tが公共用水域に排出されている。また、ポリエチレンテレフタレートや界面活性剤製造時の副生成物として非意図的にも排出されている。1,4-ジオキサンは水に任意に混和するが、揮発性、固相への吸着性、光分解性、加水分解性、生分解性がいずれも低く、環境中へ放出されると長期間水環境中に残留しやすい。一方、1,4-ジオキサンは急性、慢性毒性を有する上、発がん性を有する可能性も指摘されており、水環境中での高い残存性から人体への悪影響が懸念されている。

そのため、WHOにより1,4-ジオキサンに係る飲料水水質ガイドライン（2003年：0.05 mg/L）が、日本でも水道水質基準（2004年：0.05 mg/L）、水環境基準（2009年：0.05 mg/L）、排水基準（2012年：0.5 mg/L）が定められている。しかし、現実には1,4-ジオキサンは各地の河川水や地下水から数十～数百 $\mu\text{g/L}$ の濃度で検出されており、埋め立て処分場周辺の地下水からは数 mg/L での検出も報告されている。これらの汚染環境の浄化は喫緊の課題であるが、現状では1,4-ジオキサンは、高エネルギー消費・高コストとなるオゾンと紫外線による促進酸化法（AOP）以外では十分に処理できないことが明らかとなっており、広範囲に渡る土壌や地下水汚染の浄化には現実的な方法はない。

2. 研究開発目的

我々は1,4-ジオキサンの生物分解に関する研究を実施し、多様な環境試料から1,4-ジオキサン分解菌の分離に成功してきた。また、その活用により、低コストの1,4-ジオキサン含有排水処理が可能であることも示してきた。このことから、汚染環境の浄化についても、土着の1,4-ジオキサン分解菌、あるいは我々が単離した高性能の分解菌を活用したバイオスティミュレーション、バイオオーグメンテーション、オンサイト浄化等の技術を確認することは可能であると考えている。一方で、汚染環境における分解菌の存在やその分解能力の情報を収集、診断し、汚染環境の状態に合わせた最も適切な浄化対策技術を選択する必要がある。そこで、1,4-ジオキサン分解菌を用いた1,4-ジオキサン汚染環境の浄化技術を確認するとともに、1,4-ジオキサン汚染現場の浄化戦略の策定に有用な、浄化促進手法を診断するツールを開発することで、包括的な1,4-ジオキサン浄化技術パッケージを提案することを本プロジェクトの目的とした。サブテーマ（1）においては特に、我々が単離した1,4-ジオキサン分解菌について生理学的・遺伝学的特徴付けを行うとともに、それを基にして1,4-ジオキサン汚染地下水のバイオリクター処理、バイオオーグメンテーション処理、及びバイオスティミュレーション処理の各技術を開発することを主眼を置いた。

3. 研究開発方法

（1）1,4-ジオキサン分解菌の生理学的特徴付け

1,4-ジオキサン分解菌の生理学的特徴付けは全て文献¹⁾に基づいて行った。16S rRNA遺伝子はプライマー27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）及び1392R（5'-ACGGGCGGTGTGTACA-3'）を用いてPCR法により増幅し、塩基配列の決定は北海道システム・サイエンス株式会社に委託した。

(2) 1,4-ジオキサン分解菌の遺伝学的特徴付け

ドラフトゲノム配列情報の取得は北海道システム・サイエンス株式会社に委託した。ゲノム中の遺伝子推定はRAST (<http://rast.nmpdr.org/>) を用いて行った。また、遺伝子機能解析はNCBI blastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて行った。各酵素のマルチプルアラインメントと系統解析はClustalWプログラムを用いて行い、NJplotプログラムを用いて系統樹を描画した。

(3) 1,4-ジオキサン分解活性化因子の検討

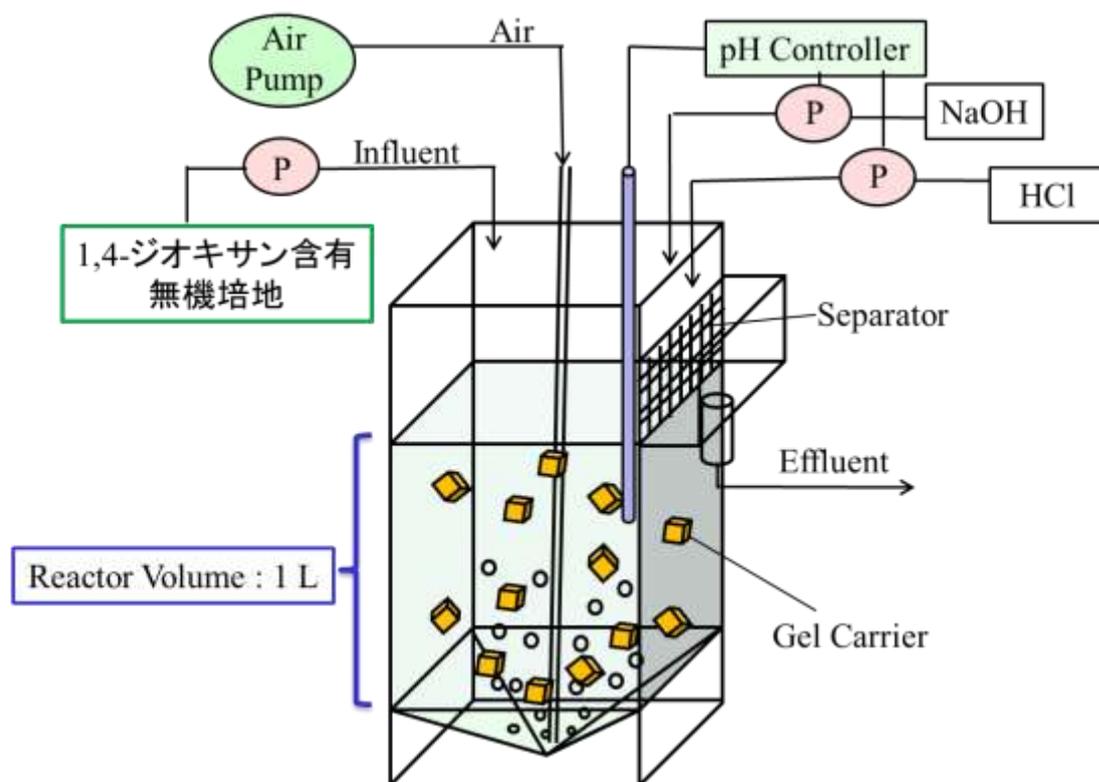
MGY培地 (4 g/L Yeast Extract、10 g/L Malt Extract、4 g/L Glucose、pH 7.3) で培養したD6株及び *Pseudonocardia* sp. D17株菌体を回収し、500 mg/Lの1,4-ジオキサンを含む無機塩培地F (1 g/L K_2HPO_4 、1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 、50 mg/L NaCl、200 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、10 mg/L $FeCl_3$ 、50 mg/L $CaCl_2$ 、pH7.5)、または同培地に5 g/Lの各種添加物 (Glycerol、Ethylene glycol、Glucose、Ethanol、Corn Steep Liquor (CSL)、Casamino acid) をそれぞれ添加したものに菌体を懸濁した。28°Cで好氣的に培養し、培養液中の1,4-ジオキサン濃度を経時的に測定した。

(4) バイオリアクターを用いたモデル汚染地下水の浄化試験

本実験に用いた実験装置を図(1)-1に示す。このリアクターは、1250 mL容の完全混合式リアクター (working volume = 1000 mL) であり、ウォータージャケットにより水温を $28 \pm 1^\circ C$ に調整した。塩酸 (2 mol/L) 及び水酸化ナトリウム (1-2 mol/L) を pH コントローラー (TDP-51, 東興化学研究所) を用いて添加することで pH7.5 を維持した。また、エアポンプにより 0.6-2.0 L/min の範囲で曝気し、DO 値が 4 mg/L 以上となるように保つとともに、攪拌を行った。ポリエチレングリコール担体に包括固定化した *Pseudonocardia* sp. D17 株を充填率が約 13 % となるように加えた (リアクターA)。同様のリアクターに固定化した *Pseudonocardia* sp. D17 株を加えない実験系を対照とした (リアクターB)。

無機塩培地 F の組成を基準として窒素及びリン濃度を様々に調整し、10 mg/L の 1,4-ジオキサンを添加したものを模擬汚染地下水として用いた。これを、水理的滞留時間 (HRT) が 2~12 h となるように連続的にリアクターに流入させた。各 Phase における運転条件を表(1)-1 に示す。オーバーフローより網構造のセパレーターにより固定化担体を分離し、これを処理水とした。

原水及び各槽内の 1,4-ジオキサン濃度、溶解性有機炭素濃度 (DOC) を経日的に測定した。また、固定化担体に含まれる *Pseudonocardia* sp. D17 株生菌数を適宜測定した。



図(1)-1 バイオリアクター模式図

表(1)-1 バイオリクターの各Phaseにおける運転条件

Phase	期間 (day)	HRT (h)	窒素濃度 (mg-N/L)	リン濃度 (mg-P/L)
I	0-32	12	212	172
II	32-43	12	53	43
III	43-54	6	53	43
IV	54-70	4	53	43
V	70-76	3	53	43
VI	76-85	2	53	43
VII	85-93	6	53	43
VIII	93-98	6	1.25	43
XI	98-103	6	0.25	43
X	103-111	6	0.125	43
XI	111-117	6	0.025	43
XII	117-134	6	0.0125	43
XIII	134-139	6	1.25	43
XIV	139-147	6	1.25	1
XV	147-153	6	1.25	0.1
XVI	153-158	6	1.25	0.01

(5) バイオリアクターを用いた実汚染地下水の浄化試験

2013年4月30日に青森・岩手県境不法投棄現場において1,4-ジオキサン汚染地下水を採取した。この実汚染地下水は、水処理設備の原水槽から採取されたものであり、不法投棄現場内全域の井戸から揚水された地下水が合流したものである。この実汚染地下水について、(4)と同様のバイオリアクターを用いて処理を試みた(リアクターA)。同様のリアクターに固定化した *Pseudonocardia* sp. D17株を加えない実験系を対照とした(リアクターB)。運転開始後0-7日目(Phase R-I)及び7-14日目(Phase R-II)にはそれぞれ表(1)-2に組成を示す1,4-ジオキサン添加無機塩培地及び模擬汚染地下水を、またPhase R-III(14-19日目)には表(1)-3に組成を示す実汚染地下水に10 mg/Lの1,4-ジオキサンを添加し、リアクターに連続的に供給した。Phase R-I~R-IIIを通じて、HRTは6 hに設定した。水温 28 ± 1 °C、pH7.5、DO 4 mg/L以上となるように制御した。原水及び各槽内の1,4-ジオキサン濃度及びDOCを経日的に測定した。また、固定化担体に含まれる *Pseudonocardia* sp. D17株生菌数を適宜測定した。

表(1)-2 無機塩培地(Phase R-I)及び模擬汚染地下水(Phase R-II)の組成

項目	無機塩培地 (Phase R-I)	模擬汚染地下水 (Phase R-II)
K ₂ HPO ₄	250 mg/L	0.692 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	250 mg/L	21.8 mg/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	50 mg/L	50 mg/L
FeCl ₃	2.5 mg/L	2.5 mg/L
CaCl ₂	12.5 mg/L	12.5 mg/L
NaCl	12.5 mg/L	12.5 mg/L
1,4-dioxane	10 mg/L	10 mg/L

表(1)-3 実汚染地下水(Phase R-III)の水質

項目	実汚染地下水 (Phase R-III)
pH	7.85
1,4-ジオキサン	186 µ/L
BOD	4.1 mg/L
COD	26 mg/L
SS	24 mg/L
硝酸態窒素	4.80 mg/L
亜硝酸態窒素	0.25 mg/L
アンモニア態窒素	5.95 mg/L
全窒素	18.5 mg/L
リン酸態リン	0.35 mg/L

(6) 実汚染土壌－地下水抽出液を用いたラボスケールのバイオオーグメンテーション試験

単一炭素源として500 mg/Lの1,4-ジオキサンを添加した無機塩平板培地F上に形成した *Pseudonocardia* sp. D17株のコロニー1白金耳を、MGY培地に植菌し、7日間の回転振盪培養（120 rpm, 28 °C）を行った。遠心分離（21,900 × g, 8 min, 4°C）によって集菌した後、生理食塩水（0.85%）で2回洗浄し、*Pseudonocardia* sp. D17株濃縮液（2.5 mg-TSS/mL）を調製した。1 Lの実汚染地下水に実汚染土壌を100 g加え、よく攪拌した後、孔径10.0 μmのメンブレンフィルター（Isopore TCTP, Merck Millipore）を用いてろ過し、固形物を取り除くことで、実汚染土壌－地下水抽出液を調製した。この実汚染土壌－地下水抽出液に表(1)-4の条件で1,4-ジオキサン、添加物（(NH₄)₂SO₄、K₂HPO₄、及びコーンステープリカー（CSL））、及び*Pseudonocardia* sp. D17株濃縮液（1 mL）を添加し、50 mLずつ100 mL容スクリーバイアル瓶に分注した。1,4-ジオキサンおよび各添加物の濃度は表(1)-5に示した。これらの実験系を28 °Cで静置し、1,4-ジオキサン濃度を経日的に測定した。

表(1)-4 実汚染土壌－地下水抽出液における *Pseudonocardia* sp. D17 株
バイオオーグメンテーション試験の実験系

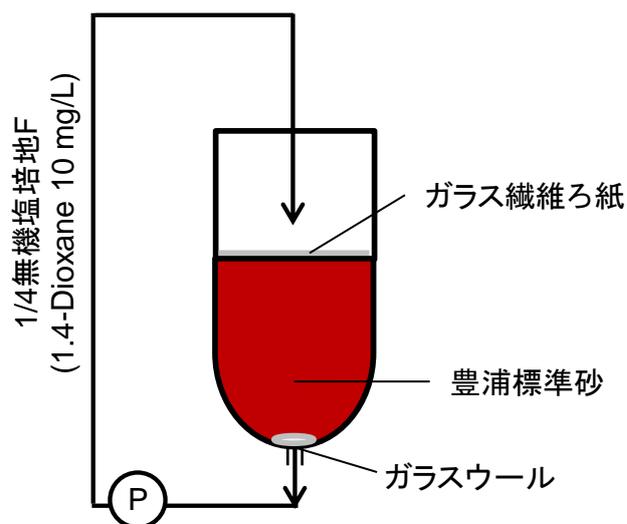
系1	実汚染土壌－地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン	
系2	実汚染土壌－地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン	+ D17
系3	実汚染土壌－地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン + (NH ₄) ₂ SO ₄ + K ₂ HPO ₄	+ D17
系4	実汚染土壌－地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン + (NH ₄) ₂ SO ₄ + K ₂ HPO ₄ + CSL	+ D17

表(1)-5 添加した 1,4-ジオキサンおよび栄養源の濃度

物質名	濃度
1,4-ジオキサン	25 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	12.8 mg/L
K ₂ HPO ₄	0.77 mg/L
CSL	100 mg/L
THF	100 mg/L

(7) 模擬汚染土壌－地下水カラムを用いたバイオオーグメンテーション試験

汚染土壌－地下水系を想定して構築したカラムを用いて1,4-ジオキサン汚染の浄化を試みた。MGY培地で培養したD17株菌体を回収し、1/4無機塩培地F（250 mg/L K₂HPO₄、250 mg/L (NH₄)₂SO₄、12.5 mg/L NaCl、50 mg/L MgSO₄ · 7H₂O、2.5 mg/L FeCl₃、12.5 mg/L CaCl₂、pH7.5）で2回洗浄したものを種菌とした。1,000 mL容のカラム（working volume = 600 mL）にガラスウールで栓をし、豊浦標準砂を表(1)-6で示す条件で充填した。ここに種菌を加え、土壌表面を直径10 cmのグラス繊維ろ紙で覆い、100 mg/Lの1,4-ジオキサンを含む1/4無機塩培地Fを0.3 L加えて、0.3 L/dayの速度で循環させた（試験系）。構築したリアクターの模式図を図(1)-2に示す。同様のリアクターに種菌を加えない実験系を対照系とした。試験は全て、28°Cに保温して行った。ガスクロマトグラフを用いて循環液の1,4-ジオキサン濃度を経日的に測定した。



図(1)-2 土壌カラムリアクター模式図

表(1)-6 土壌充填条件

豊浦標準砂	1.0 kg
吸水量	0.25-0.26 kg
空隙	20 mL
空隙率	3.0%

(8) 土着微生物によるバイオスティミレーション試験

(6) に示したバイオオーグメンテーション試験と同様に調整した実汚染土壌－地下水抽出液を用いて、土着微生物によるバイオスティミレーション試験を行った。また、実汚染土壌－地下水抽出液を孔径0.2 μmのメンブレンフィルター (DISMIC-25CS, ADVANTEC) で濾過することで、含まれる土着微生物を除去し、1,4-ジオキサンを添加したものを対照系とした。実験条件を表(1)-7に示す。各添加物の濃度は表(1)-5の通りである。ガスクロマトグラフを用いて培養液中の1,4-ジオキサン濃度を経日的に測定した。

表(1)-7 汚染土壌－地下水抽出液におけるバイオスティミュレーション試験の実験系

系1	汚染土壌－地下水抽出液 (濾過滅菌) + 1,4-ジオキサン
系2	汚染土壌－地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン
系3	汚染土壌－地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン + (NH ₄) ₂ SO ₄ + K ₂ HPO ₄
系4	汚染土壌－地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン + (NH ₄) ₂ SO ₄ + K ₂ HPO ₄ + CSL
系5	汚染土壌－地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン + (NH ₄) ₂ SO ₄ + K ₂ HPO ₄ + THF

(9) 1,4-ジオキサン濃度及びDOC濃度測定方法

各実験系より採取した1.5 mLのサンプルに、2 mol/Lの塩酸を10 µL添加し、孔径0.45 µmのセルロースアセテート製のメンブレンフィルター (DISMIC, ADVANTEC) により濾過して、1.5 mL容のエッペンドルフチューブ中にて4 °Cの暗所で保存した。この保存したサンプルを、ガスクロマトグラフにより分析し、1,4-ジオキサンの濃度を測定した。分析条件を表(1)-8に示す。

同様に保存したサンプルのうち流入水及び試験系の DOC 濃度を、TOC 計 (TOC-V_{CSH}, Shimadzu) を用いて NPOC 測定法により測定した。

(10) 固定化担体中のD17株の生菌数の測定方法

試験系より固定化担体を4個採取し、生理食塩水 (0.85%) を5 mL添加してホモジナイザー (IWAKI) によりホモジナイズした後、超音波処理 (VCX-130 ; 49.4 W, 20 kHz, 30 s) を施した。得られた分散液を生理食塩水 (0.85%) により希釈して、1,4-ジオキサン (500 mg/L) を含む無機塩平板培地Fへと塗布して希釈平板法により生菌数を計数した。

表(1)-8 ガスクロマトグラフ分析条件

システム構成	GC-2014 (Shimadzu) GC Solution ver 2.4 (Shimadzu) AOC-20i+s
検出器	水素炎イオン化検出器 (FID)
カラム	ガラス製、3.2 φ×2.1m (Shimadzu)
充填剤	Gaskuropack54 (GL-Science)
サンプル注入量	5 µm
キャリアガス	高純度窒素 (>99.999%)
キャリアガス線速度	67 mL/min.
水素ガス圧力	60 kPa
酸素ガス圧力	50 kPa
カラム槽温度	200°C (一定)
注入口温度	200°C
検出器温度	230°C
信号レンジ	10 ⁻¹
溶媒	H ₂ O

4. 結果及び考察

(1) 1,4-ジオキサン分解菌の生理学的特徴付け

これまでの研究において単離した1,4-ジオキサン分解菌の生理学的特徴と16S rRNA遺伝子配列解析を元にした同定結果、及び1,4-ジオキサン分解特性を調べ、表(1)-9にまとめた。D1株を除く5株全てがActinobacteria綱に分類されるものであり、環境中においてActinobacteria綱細菌は1,4-ジオキサン分解に大きな役割を果たしている可能性が推測された。また、1,4-ジオキサン分解様式として、1,4-ジオキサンの存在によって分解活性が誘導される株（誘導型：D1、D6）、1,4-ジオキサンの存在に関わらず分解活性を持つ株（構成型：D11、D17）、テトラヒドロフランの存在によって1,4-ジオキサンの分解活性が誘導される株（共代謝型：T1、T5）の3種が存在することが明らかとなり、現場に存在する菌株の特性に合わせて、その分解能力を引き出す方策を決定すべきことが示唆された。

(2) 1,4-ジオキサン分解菌の遺伝学的特徴付け

D6、D11、D17、T1、T5の各株について、ドラフトゲノム解析が完了しそれぞれ7.4 Mbp、8.6 Mbp、7.3 Mbp、6.0 Mbp、6.2 Mbpの総塩基配列が得られた。各株ともに総解析塩基／予想ゲノムサイズで定義される冗長度は100を超えており、精度の高い配列データが得られたものと考えられた。D6株及びD17株については、ORF予測とアノテーション解析を行い、マイクロアレイプローブ設計に供した。

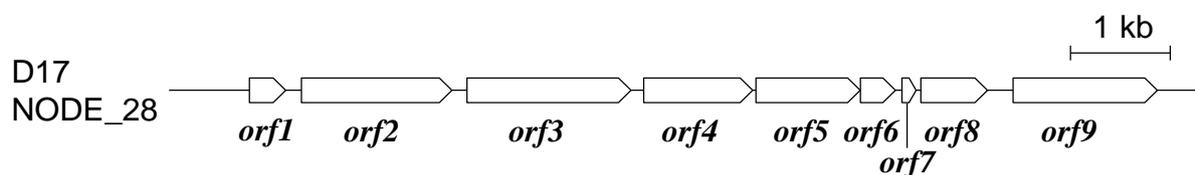
続いて、各1,4-ジオキサン分解菌のドラフトゲノム情報から、1,4-ジオキサン分解酵素遺伝子を探索した。*Pseudonocardia* sp. ENV478において、テトラヒドロフランとの共代謝による1,4-ジオキサン分解に*thm*遺伝子群に関わることが示唆されている²⁾。そこで、ENV478株の*thm*遺伝子群と相対性の高い領域を各分解菌のゲノム情報より探索したところ、*Pseudonocardia* sp. D17及び*Rhodococcus* sp. T5において、*thm*遺伝子群と高い相対性を持つ遺伝子群が見出された。両者はほぼ同様のものであるため、一例としてD17株の同領域の遺伝子配置（図(1)-3）とその相対性検索結果（表(1)-10）を示す。これらの遺伝子のほとんどは、ENV478株のもののみならず、同じく1,4-ジオキサン分解菌として知られる*P. dioxanivorans* CB1190の遺伝子群³⁾とも高い相対性を示しており、1,4-ジオキサン分解に関わる遺伝子であることが強く推測された。

表(1)-9 各種1,4-ジオキサン分解細菌の生理学的特徴と同定結果

	D1	D6	D11	D17	T1	T5
形態	棹状	棹状	棹状	棹状	棹状	棹状
コロニーの色	白色	白色	白色	白色	赤色	赤色
グラム染色	陰性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
運動性	無	無	無	無	無	無
OFテスト	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
カタラーゼ活性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
オキシダーゼ活性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統学的解析	<i>Afipia</i> sp.	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Pseudonocardia</i> sp.	<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Rhodococcus</i> sp.
1,4-ジオキサン分解様式	誘導型	誘導型	構成型	構成型	共代謝型	共代謝型

Mycobacterium sp. D6、*Mycobacterium* sp. D11、及び*Rhodococcus* sp. T1については、上述の方法により *thm* 遺伝子群を見出すことはできなかった。そこで、*thm* 遺伝子群が、soluble di-iron monooxygenase (SDIMO) ファミリー⁴⁾に属していることに着目し、SDIMOファミリーの代表的な酵素の一つであるメタン酸化酵素soluble methane monooxygenase (sMMO) 遺伝子群⁵⁾と相同性の高い領域を、各分解菌のゲノムからRASTを用いて探索した。その結果、D6株、D11株、T1株よりそれぞれ一つずつsMMOをコードする*mmo*遺伝子群が見出され、またD17株からは上述の*thm*遺伝子群の他に、もう一つ*mmo*遺伝子群を持つことが明らかとなった。また、D11株からはさらに、sMMOとは異なり膜結合型であるparticulate methane monooxygenase (pMMO) をコードする*pmo*遺伝子群も見出された。これらの遺伝子群のうち、 α サブユニットをコードする*thmA*、*mmoX*、*pmoA*、及びメタン酸化菌である*Methylococcus capsulatus*の持つ*mmoX*の塩基配列の系統解析を行った(図(1)-4)。D17株、T5株、*P. dioxanivorans* CB1190、及び*Pseudonocardia* sp. ENV478の*thmA*遺伝子は互いに相同性が高く、一つのグループを形成していることが示された。D6株とT1株の*mmoX*は相同性が高く、また、D17株の*mmoX*とも比較的近縁であり、これらが*thmA*とは異なるグループを形成していた。D11株の*mmoX*は他の1,4-ジオキサン分解菌とは異なり、メタン酸化菌の*mmoX*に比較的似ていたが、相同性は高くなく、特異な遺伝子であることが示唆された。また、D11株の持つ*pmoA*は他のいずれの遺伝子とも異なっていた。

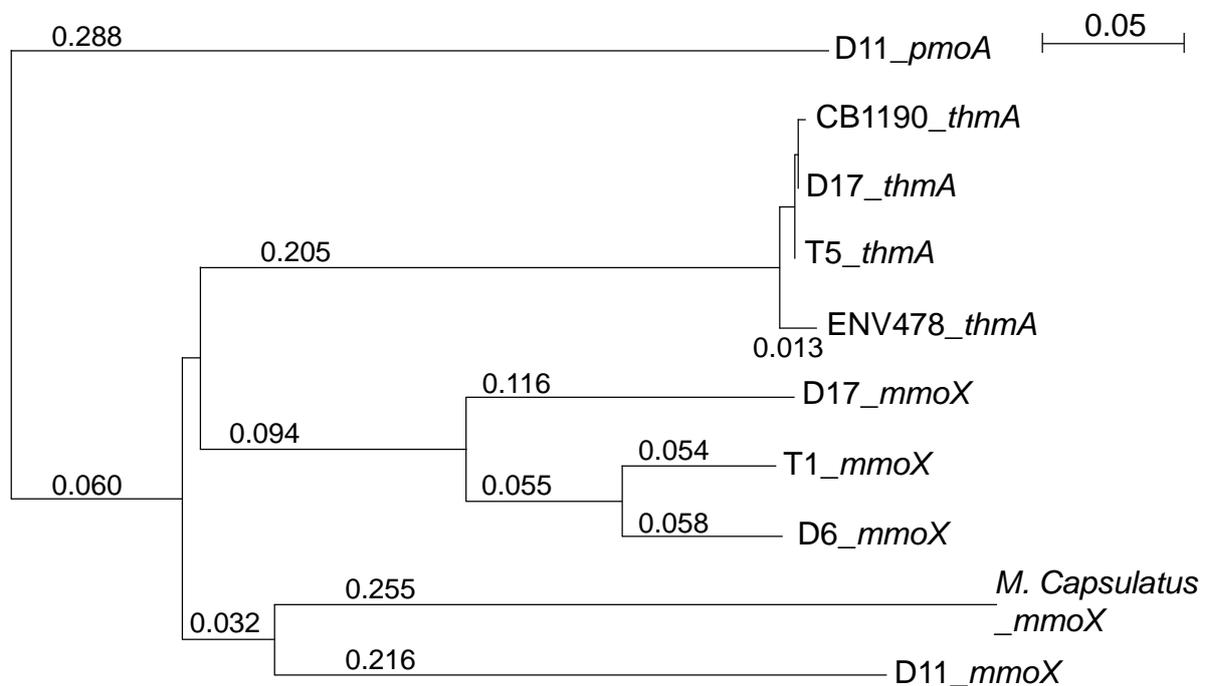
以上より、1,4-ジオキサン分解菌群の持つ1,4-ジオキサン分解遺伝子候補である*thm*、*mmo*、*pmo*を見出すことができ、また、各遺伝子群の多様性とグルーピングが示唆されたものと言える。



図(1)-3 *Pseudonocardia* sp. D17における*thm*遺伝子群を含む領域の遺伝子配置
各ORFは表(1)-10と対応している

表(1)-10 *Pseudonocardia* sp. D17における *thm* 遺伝子群を含む領域の遺伝子相同性検索結果

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

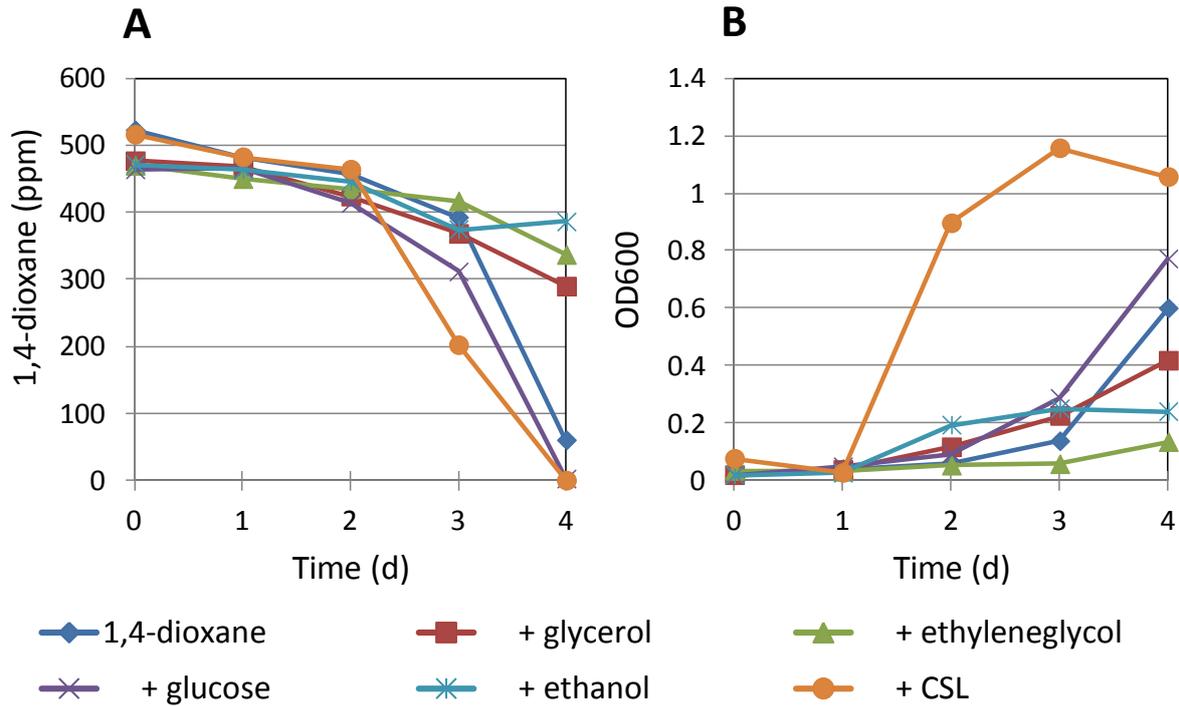
図(1)-4 *thmA*、*mmoX*、及び *pmoA* の塩基配列の系統解析

(3) 1,4-ジオキサン分解活性化因子の検討

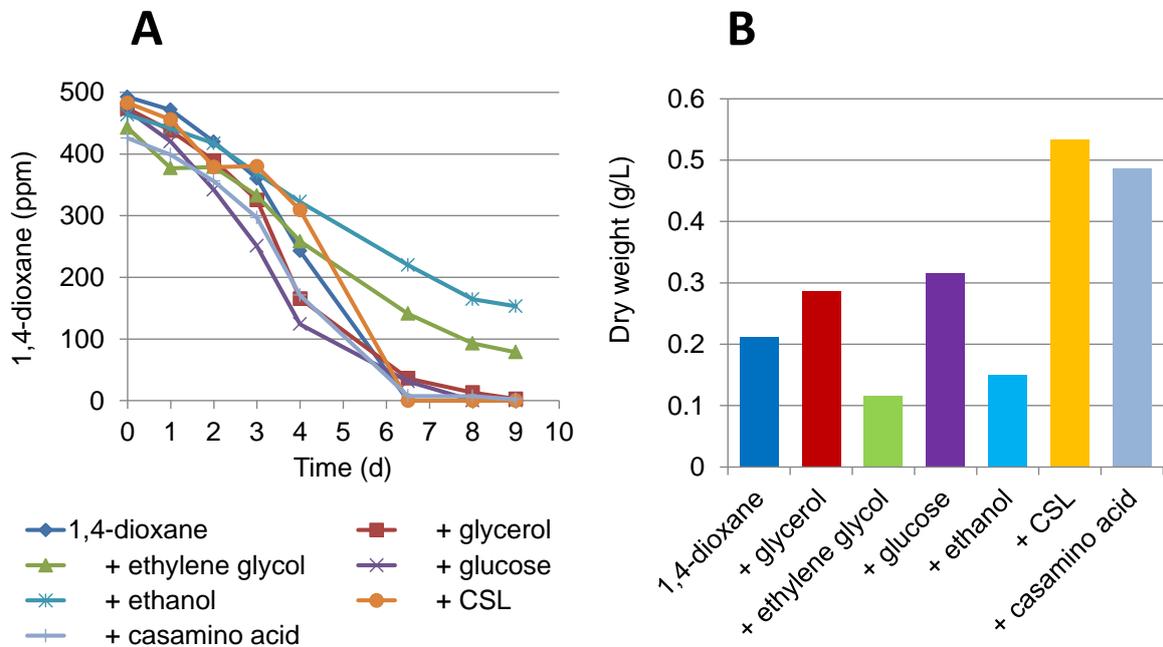
誘導型1,4-ジオキサン分解菌である*Mycobacterium* sp. D6株について、種々の添加物による1,4-ジオキサン分解活性の向上を試みた(図(1)-5)。グリセロール、エチレングリコール、及びエタノールについては、1,4-ジオキサン分解の活性化は見られず、また、1,4-ジオキサンのみを含む場合と比較して菌体の増殖も抑制された。一方、グルコース及びCSLについては、1,4-ジオキサンのみの場合と比較して1,4-ジオキサン分解が良好に進行し、また、菌体の増殖が活発となった。特にCSLを添加した場合に菌体増殖が顕著であった。CSLには微生物にとって利用しやすい有機性窒素源であるアミノ酸が豊富に含まれており、これを利用することで1,4-ジオキサンの資化に伴って効率的に*Mycobacterium* sp. D6株の菌体合成が行われるためと考えられた。

また、構成型の1,4-ジオキサン分解菌である*Pseudonocardia* sp. D17株についても同様に、種々の添加物による1,4-ジオキサン分解活性の向上を試みた(図(1)-6)。エチレングリコール及びエタノールについては、1,4-ジオキサンのみを含む場合と比較して1,4-ジオキサン分解及び菌体の増殖がともに抑制された。一方、グリセロール、グルコース、カザミノ酸については、1,4-ジオキサンのみを含む場合と比較して増殖が促進され、また、1,4-ジオキサン分解も促進された。CSLについては、顕著に増殖を促進したものの、明確な分解促進は生じなかった。これらのうち、グリセロール及びグルコースは*Pseudonocardia* sp. D17株の炭素源となったものと考えられた一方、カザミノ酸及びCSLによる増殖促進はその他の添加物と比較して極めて顕著であり、*Mycobacterium* sp. D6株の場合と同じく、含まれるアミノ酸類が*Pseudonocardia* sp. D17株の菌体合成を補助したのと考えられた。また、CSLが菌体増殖を促進したにも関わらず1,4-ジオキサン分解を促進しなかったことから、CSLに含まれる何らかの成分が1,4-ジオキサン分解酵素遺伝子の発現を抑制した可能性があり、さらなる検討を要するものと考えられる。

以上より、グルコースやグリセロールといった利用しやすい炭素源、あるいはCSLやカザミノ酸といった有機性アミノ酸類は1,4-ジオキサン分解菌の増殖を促進し、結果として1,4-ジオキサンの分解が促進されることが明らかとなった。これは、バイオリクター処理やバイオオーグメンテーションに用いる1,4-ジオキサン分解菌の菌体を確保するための培養の効率化に寄与する知見であると言える。一方、これらの基質は1,4-ジオキサン分解菌以外の様々な微生物の資化し得るため、原位置浄化効率の向上を狙った実際の汚染環境への直接投入には必ずしも有効でないとも考えられることから、1,4-ジオキサン分解菌のみを特異的に増殖させる、あるいは1,4-ジオキサン分解菌の分解活性を特異的に向上させる基質の探索がさらに必要であるものと言える。



図(1)-5 D6株の1,4-ジオキサン分解と菌体増殖の添加物による促進



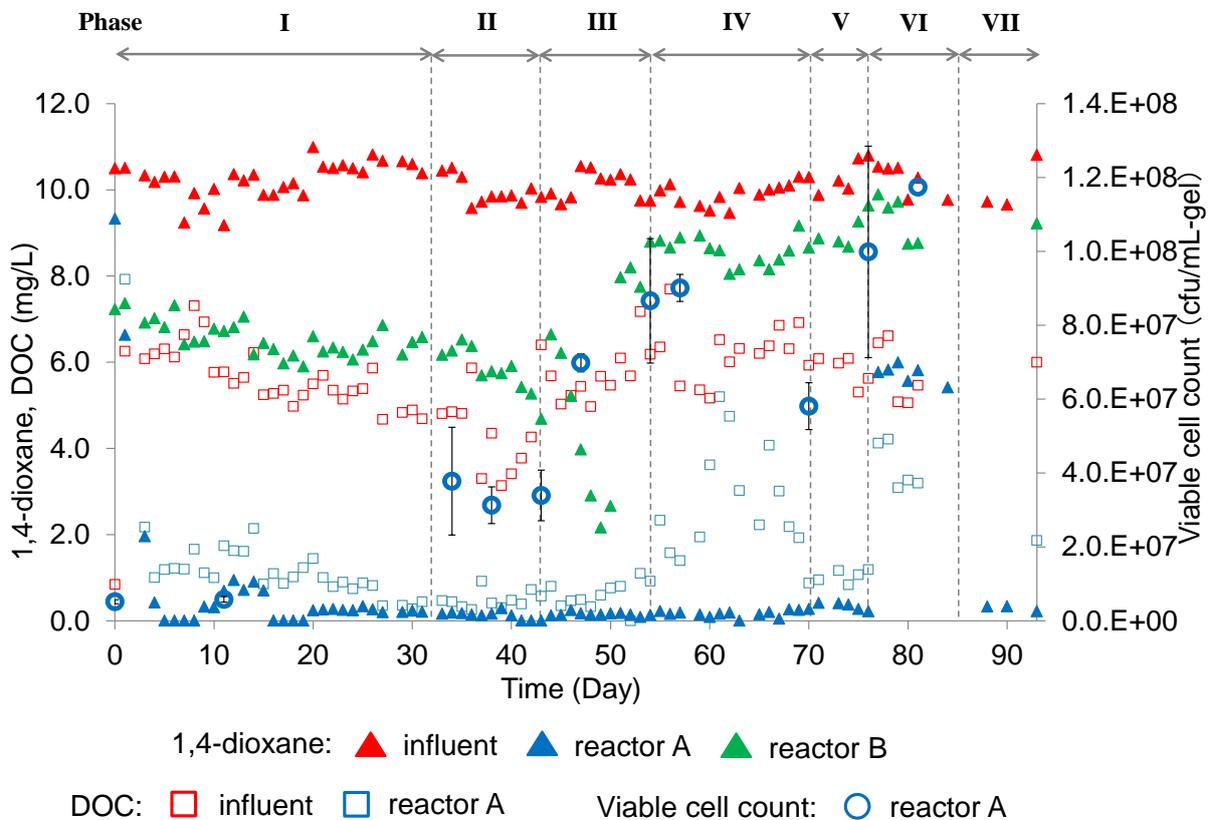
図(1)-6 *Pseudonocardia* sp. D17株の1,4-ジオキサン分解と菌体増殖の添加物による促進

(4) バイオリアクターを用いたモデル汚染地下水の浄化試験

固定化した*Pseudonocardia* sp. D17株を用いてバイオリアクターを構築し、10 mg/Lの1,4-ジオキサンを含むモデル汚染地下水の処理を試みた(図(1)-7)。

運転開始から3日目において、リアクターAでの1,4-ジオキサン濃度は0.5 mg/L以下となり、対照系であるリアクターBと比較して明確な1,4-ジオキサンの除去が行われた。11日目において処理性能の悪化が確認されたが、曝気量を0.6 L/minから1.0 L/minへと上げると処理性能が回復した(Phase I)。32日目には流入水の窒素及びリン濃度を減少させたが、1,4-ジオキサンの処理性能は保たれ、またアンモニア態窒素の流入が減少したことにより硝化反応が抑えられDO値の回復が確認された(Phase II)。HRTを12時間から段階的に短くしていったところ、HRTが6時間、4時間及び3時間において、試験系の1,4-ジオキサン濃度は定量限界(0.05 mg/L)に近い濃度に保たれた(Phase III-V)。一方、HRTが2時間において、リアクターAにおける1,4-ジオキサン処理性能は悪化し、1,4-ジオキサンは約5.8 mg/L残存した(Phase VI)。その後、HRTを6時間として負荷を落とすと1,4-ジオキサン処理性能は回復した(Phase VII)。

試験系のDOC濃度は、HRTが12時間において、安定時には0.5 mg-C/L以下まで除去可能であり、中間代謝物が蓄積していないことが示唆された(Phase II)。HRTを段階的に短くしていったところ、DOC除去性能はHRTが4時間において不安定となった(Phase IV)。しかし、HRTを3時間とするとDOC除去性能は回復した(Phase V)。理由として、HRTを短くすることで1,4-ジオキサンの



図(1)-7 D17株を用いたバイオリアクターによる1,4-ジオキサン分解 (Phase I~VII)

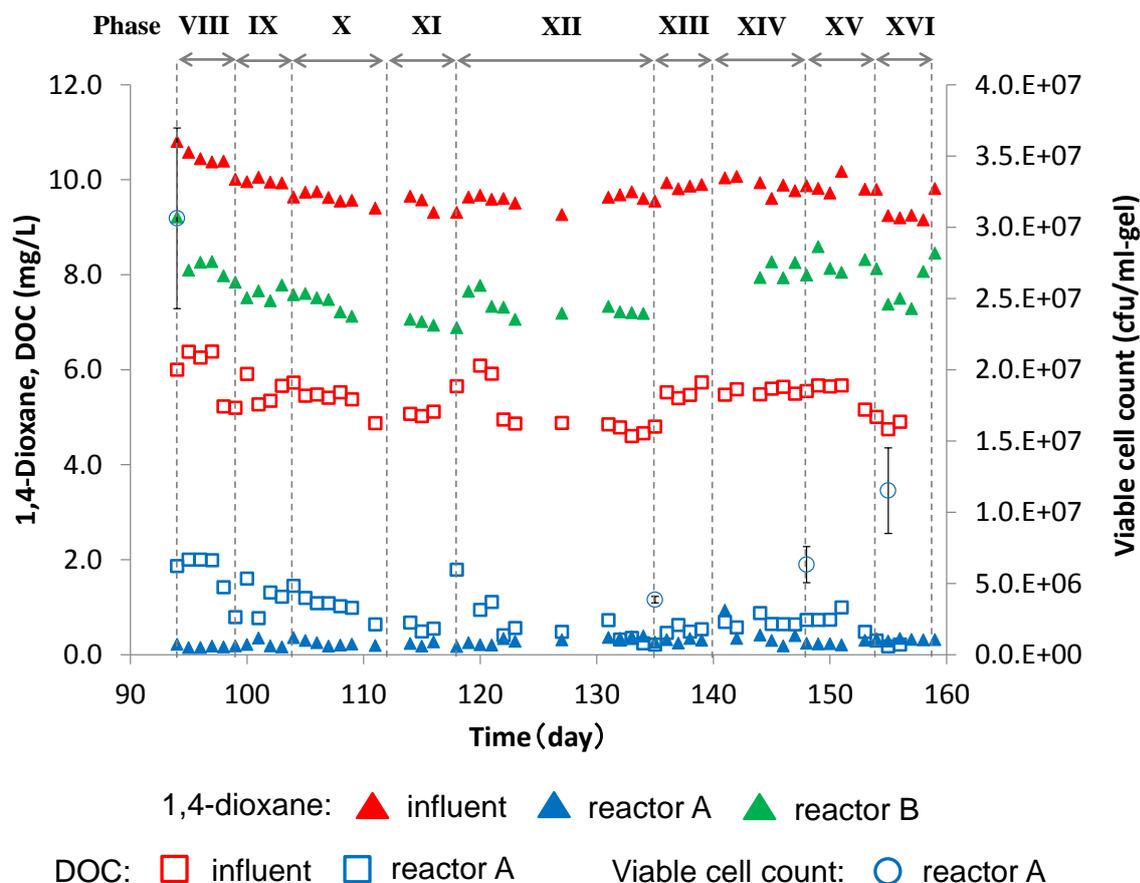
容積負荷量を上げた際に、処理速度が追いつかず分解過程で生じる中間代謝物が蓄積したが、その後、*Pseudonocardia* sp. D17株はこの負荷に対して適応することができたためと考えられた。

続いて、流入水中に含まれるアンモニア態窒素またはリン酸態リンの濃度を段階的に減少させていった時の流入水、リアクターA及びリアクターBの1,4-ジオキサン及びDOC濃度の経時変化を図(1)-8に示す(Phase VIII-XVI)。

模擬汚染水中に含まれるアンモニア態窒素の濃度を1.25 mg/Lから0.0125 mg/Lまで段階的に減少させた時、リアクターAでは明確な1,4-ジオキサンの除去が行われた(Phase VIII-XII)。また、リアクターAにおけるDOC濃度は、2 mg-C/L以下であり、比較的安定してDOCを低濃度まで除去できていた。つまり、中間代謝物の蓄積は見られなかったものと言える。

固定化担体中の*Pseudonocardia* sp. D17株の生菌数について、Phase VIII開始時には 3.1×10^7 cfu/mL-gelであったが、Phase XIIの後には 3.9×10^6 cfu/mL-gelと減少していたことから、添加するアンモニア態窒素の制限により*Pseudonocardia* sp. D17株の細胞合成が制限されたものと考えられた。

続いて、Phase XIII-XVIにおいて、流入水中に含まれるリン酸態リンの濃度を43 mg/Lから0.01 mg/Lまで段階的に減少させた。この時、いずれのリン酸態リン濃度であっても、リアクターAでは明確な1,4-ジオキサンの除去が行われた。DOC濃度は1 mg-C/L以下に保たれ、中間代謝物の蓄積も見られなかったものと言える。また、147日目及び154日目における固定化担体中の生菌



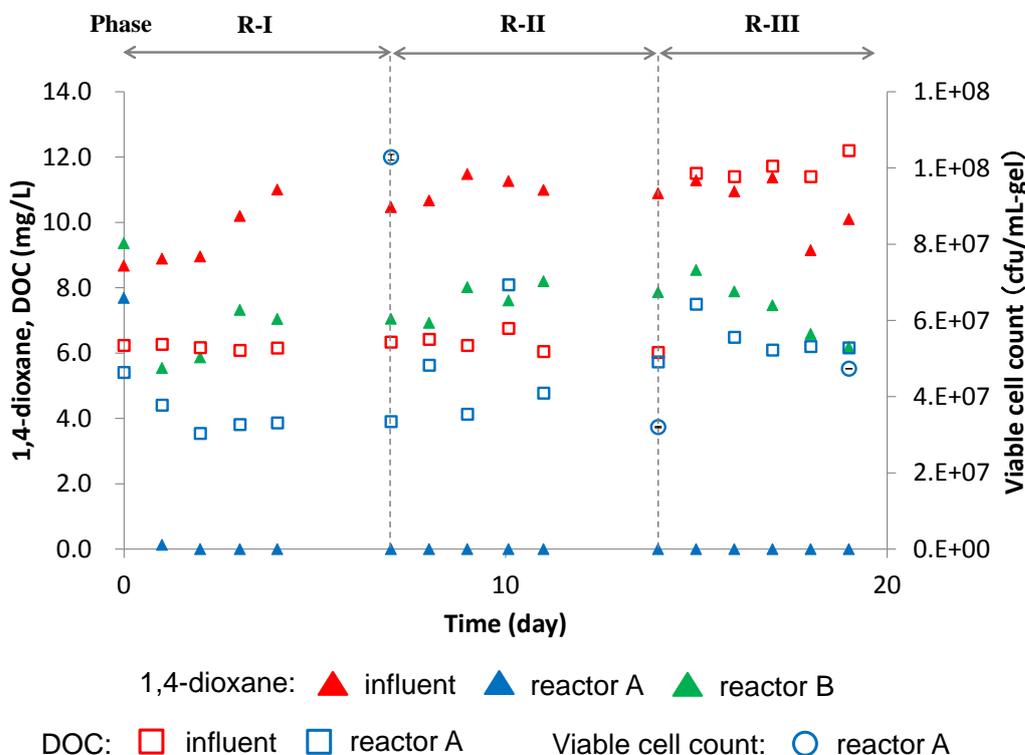
図(1)-8 D17株を用いたバイオリアクターによる1,4-ジオキサン分解 (Phase VIII~XVI)

数は 6.3×10^6 cfu/mL-gel 及び 1.2×10^7 cfu/mL-gel であり、Phase XII 後の 134 日目における 3.9×10^6 cfu/mL-gel と比較して増加していたことから、リン酸態リン濃度 0.01–43 mg/L の範囲で *Pseudonocardia* sp. D17 株の細胞合成は制限されなかったものと考えられた。

以上より、本課題において構築した *Pseudonocardia* sp. D17 株を用いた 1,4-ジオキサン汚染地下水浄化バイオリアクターは高速で大量の汚染水を処理可能であり、また、非常に低濃度の窒素・リンにも対応できることが明らかとなった。以上より、バイオリアクターによる 1,4-ジオキサン除去技術の基礎を確立できたものと考えられる。

(5) バイオリアクターを用いた実汚染地下水の浄化試験

固定化 *Pseudonocardia* sp. D17 株を用いて構築したバイオリアクターを用いて、10 mg/L の 1,4-ジオキサンを添加した実汚染地下水の処理を試みた (図(1)-9)。10 mg/L の 1,4-ジオキサンと、53 mg/L の窒素、45 mg/L のリンを含む模擬汚染地下水を流入させることでリアクターの立ち上げを行ったところ (Phase R-I : 7–14 日目)、運転開始から 1 日目において、試験系での 1,4-ジオキサン濃度は検出限界以下となり、対照系と比較して明確な 1,4-ジオキサンの除去が行われた。その後、模擬汚染地下水 (Phase R-II : 7–14 日目) および実汚染地下水 (Phase R-III : 14–18 日目) へと切り替えた後も、1,4-ジオキサン濃度は検出限界以下に保たれた。DOC 濃度は、試験系において模擬汚染地下水に切り替わった Phase R-II において一時的な上昇が確認されたが、その後は安定し、汚染地下水を用いた Phase R-III では、流入水や対照系に比べて低い値を示した。以上より、構築したバイオリアクターは、実証試験を行う岩手・青森県境不法投棄現場の地下水に対しても高い性能を発揮するものと考えられた。

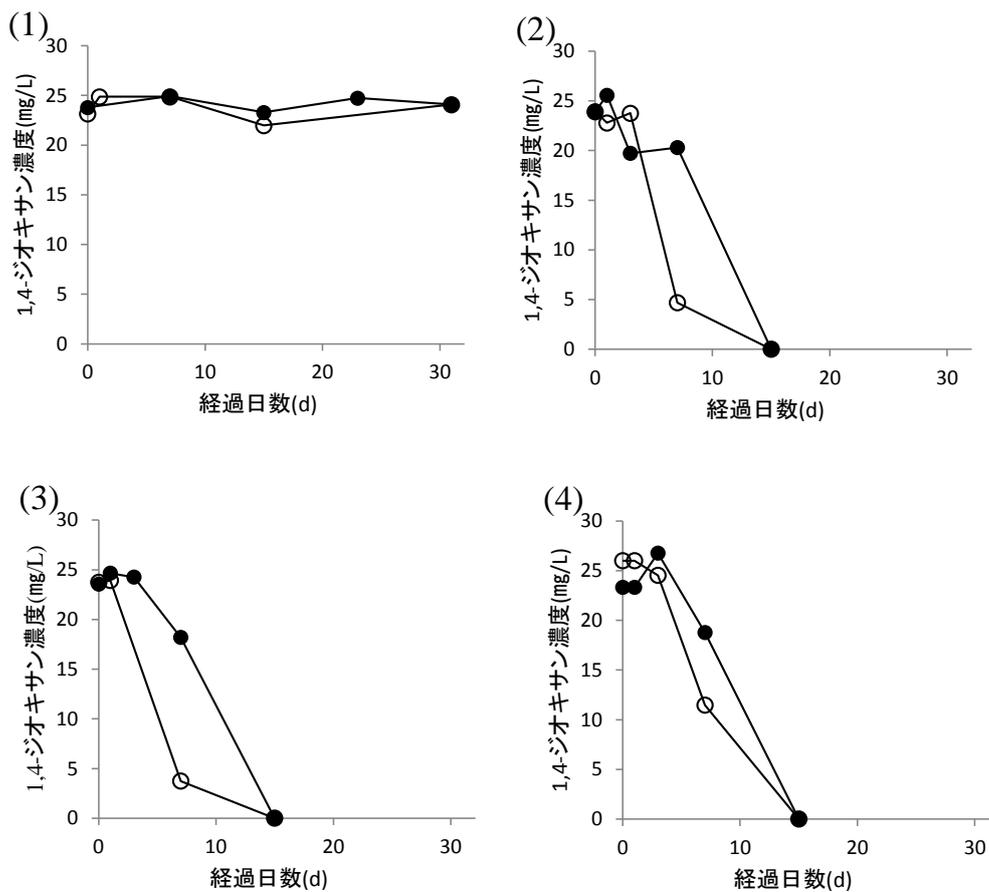


図(1)-9 バイオリアクターを用いた実汚染地下水の浄化試験 (Phase R-I–R-III)

(6) 実汚染土壌－地下水抽出液を用いたラボスケールのバイオオーグメンテーション試験

土着微生物を含む実汚染土壌－地下水抽出液を用いて、1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化に対する *Pseudonocardia* sp. D17株のバイオオーグメンテーションの適用可能性を検討した。試験結果を図(1)-10に示す。*Pseudonocardia* sp. D17株を添加した系2~4では、分解速度に差があるものの、すべて検出限界以下まで分解されたことから、*Pseudonocardia* sp. D17株は実汚染土壌－地下水系においても有効に働くことが示唆された。また、いずれの系においても、土着微生物が存在する場合に1,4-ジオキサンの分解速度がわずかに低下した。この原因として、土着微生物の生育により窒素・リン・酸素などが消費され、*Pseudonocardia* sp. D17株の働きが律速された可能性が考えられる。系2と、系3、系4を比較した場合、無機態の窒素・リンや*Pseudonocardia* sp. D17株の増殖を促進することが示唆されているCSLを添加したことによる1,4-ジオキサンの分解促進は観察されなかったが、これは、本実験系では無機態の窒素・リンやCSLに含まれる有機態窒素などの栄養源ではなく、酸素が1,4-ジオキサンの分解を制限する要因であるためと推測された。

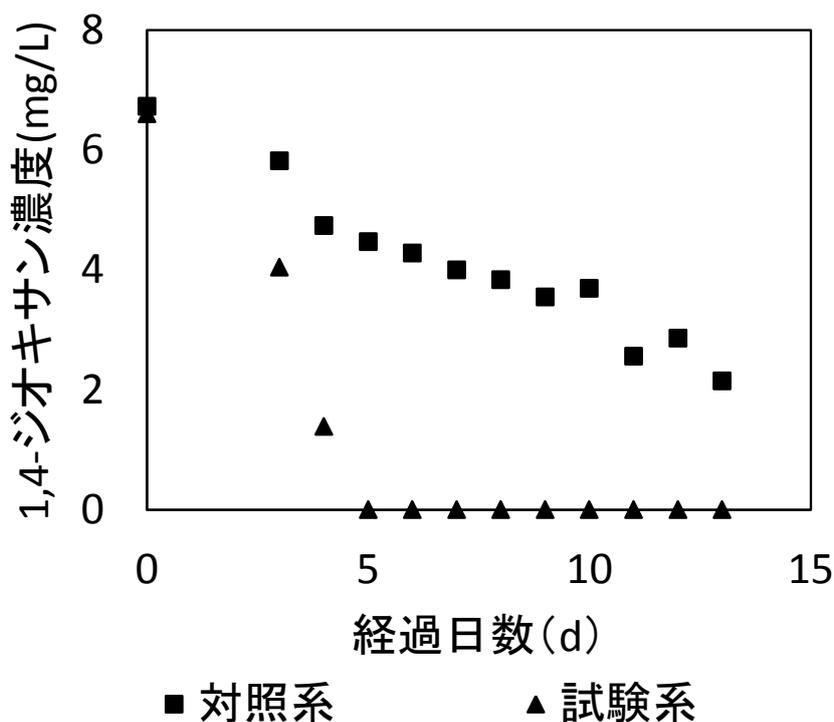
以上の結果から、*Pseudonocardia* sp. D17株によるバイオオーグメンテーション法は1,4-ジオキサンを検出限界以下まで分解できる有効な浄化法であることが示唆された。特に、栄養源を追加することなく浄化を行えることは、栄養源による土壌・地下水の二次汚染のリスクがないことから、本法の利点であると言える。



図(1)-10 実汚染土壌－地下水系抽出液を用いたバイオオーグメンテーション試験
 (1) 系1: 1,4-ジオキサン, (2) 系2: 1,4-ジオキサン+D17株, (3) 系3: 1,4-ジオキサン+N,P+D17株,
 (4) 系4: 1,4-ジオキサン+N,P+CSL+D17株, ●: 土着微生物存在, ○: 土着微生物ろ過滅菌

(7) 模擬汚染土壌－地下水カラムを用いたオーグメンテーション試験

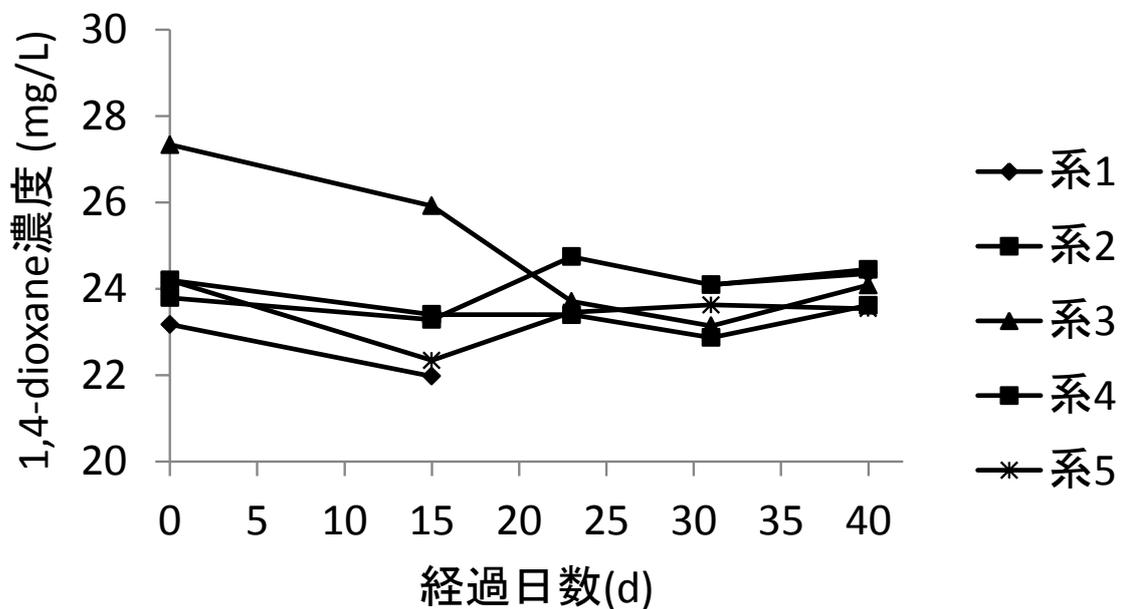
Pseudonocardia sp. D17株を用いたバイオオーグメンテーション法の有効性をスケールアップした実験系で確認するため、模擬汚染土壌－地下水カラムを用いて試験を行った。結果を図(1)-11に示す。*Pseudonocardia* sp. D17株を添加した試験系では、1,4-ジオキサン濃度は約5日で検出限界以下にまで減少した。対照系においても1,4-ジオキサン濃度の緩やかな減少が確認されたが、これは揮発によるものと考えられた。従って、本実験系において*Pseudonocardia* sp. D17株は有効に働き、模擬汚染土壌－地下水系に含まれる1,4-ジオキサンを浄化できたものと考えられる。今回のラボスケールの試験系では1,4-ジオキサンの分解が良好に進行したが、実際の汚染現場に適用する際には、酸素の供給不足により1,4-ジオキサン分解の阻害が生じる可能性があるため、エアスパージング法等との組み合わせなど、適切な酸素供給方法の検討が、実用化に向けての課題であると考えられる。



図(1)-11 模擬汚染土壌－地下水カラムを用いたオーグメンテーション試験

(8) 土着微生物によるバイオスティミュレーション試験

実汚染土壌および地下水に含まれる土着微生物を活用したバイオスティミュレーション法による1,4-ジオキサン浄化の可能性を検討するために、実汚染土壌および地下水の抽出液を調製し、1,4-ジオキサンの分解を試みた。結果を図(1)-12に示す。無機態窒素とリンを添加した系3において若干の1,4-ジオキサン分解が見られたが、その他の実験系では、40日間の試験期間中に土着微生物による1,4-ジオキサンの顕著な分解は確認されなかった。後述のサブテーマ(2)における汚染地下水からの1,4-ジオキサン分解菌集積や汚染土壌からのSDIMO保有菌集積からも示唆される通り、一定数の1,4-ジオキサン分解菌が環境中に存在しており、促進因子の添加などの特定の操作により活性化される可能性があるものであると言えるが、環境中の1,4-ジオキサン分解菌の特性は未だ不明な点が多く、工学的利用に向けた課題は多いと言わざるを得ない。今後は、それらを単離し分解特性に関する知見を集積することで、1,4-ジオキサン分解菌の合理的な活性化方法を明らかにする必要があると考えられる。



図(1)-12 土着微生物によるバイオスティミュレーション試験

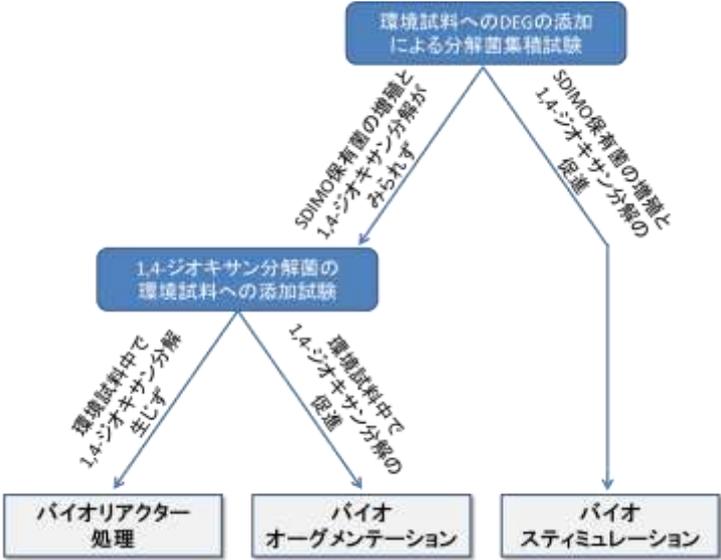
系1: 汚染土壌-地下水抽出液 (濾過滅菌) + 1,4-ジオキサン, 系2: 汚染土壌-地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン, 系3: 汚染土壌-地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + K_2HPO_4 , 系4: 汚染土壌-地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + K_2HPO_4 + CSL, 系5 汚染土壌-地下水抽出液 + 1,4-ジオキサン + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + K_2HPO_4 + THF

(9) 汚染サイトの特性に応じた浄化戦略の選択フローの作成

本研究課題で検討してきた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の三種の浄化技術を、汚染サイトの科学的特性に応じて選択するためのフローを、図(1)-13のように提案できる。サブテーマ(2)で後述するように、ジエチレングリコールの(DEG)添加により1,4-ジオキサン分解菌を含むSDIMO保有菌を汚染サイト環境試料から特異的に集積することができる。この試験により、SDIMO保有菌が増殖され、環境試料中の1,4-ジオキサンが有意に分解されるようであれば、汚染サイトにジエチレングリコール添加によるバイオスティミュレーション法を適用し得るものと判断できる。また、SDIMO保有菌の増殖と、環境試料中の1,4-ジオキサン分解がみられない場合、汚染サイトには土着の1,4-ジオキサン分解微生物が存在しないものと判断されるため、外部で培養した1,4-ジオキサン分解菌の利用が必要であると判断される。

1,4-ジオキサン分解菌が汚染サイト環境で利用できるかを確認するためには、汚染サイト環境試料を用いたラボスケールのバイオオーグメンテーション試験を予め行うことが望ましい。試験において、環境試料中の共存物質やサイトの環境条件の影響を受けず、添加した1,4-ジオキサン分解菌により浄化が達成されるようであれば、汚染サイトにバイオオーグメンテーション法を適用し得るものと判断できる。また、何らかの原因により添加した1,4-ジオキサン分解菌が働かない場合、バイオオーグメンテーション法によるin situ処理は難しいものと判断される。

揚水した汚染地下水をバイオリアクターによって処理する場合、自由にプロセスを構成することが可能であり、1,4-ジオキサン分解菌の能力を最大限に発揮させるための環境条件を整えることも、阻害的に働く共存物質を事前に処理して除くことも可能である。実際にサブテーマ(3)においてバイオリアクター処理を達成していることから、その適用性は非常に広いと言え、汚染サイトの科学的特性に依らずに選択し得る浄化オプションであると言える。他方、浄化技術の選択のためには、汚染サイトの科学的特性のみならず、確保されている予算や工期といった事業特性も非常に重要な要素であり、これらを総合的に検討しなければならないと言える。



図(1)-13 汚染サイトの特性に応じた浄化戦略の選択フロー

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで1,4-ジオキサン分解菌の報告はわずかであったが、本研究において誘導型分解菌が2菌株、構成型分解菌が2菌株、共代謝型分解菌が2菌株の特徴付けが完了した。特にD1株、D6株、D11株、*Pseudonocardia* sp. D17株の4菌株については、これまでの報告において最も優れた1,4-ジオキサン分解菌であったCB1190株⁶⁾を上回る能力を持ち、汚染地下水の浄化への適用が有望であることが明らかとなった。また、*Pseudonocardia* sp. D17株を用いて構築したバイオリアクターは模擬汚染地下水に対して優れた浄化性能を発揮し、10 mg/Lという高濃度の1,4-ジオキサン汚染水を環境基準値以下である0.05 mg/L以下にまで浄化することが可能であった。これは、これまで経済的に困難であった1,4-ジオキサンによる地下水の広範な汚染の浄化の可能性を開くものであると言える。また、1,4-ジオキサン分解菌を用いたバイオオーグメンテーション法による地下水浄化の試みとして、これまでに2例が報告されているが^{7), 8)}、この両者において1,4-ジオキサンの分解には1~4ヶ月の時間を要した。一方、本研究では、模擬汚染地下水中の約10 ppmの1,4-ジオキサンを5日間で検出限界以下にまで分解することに成功しており、初期濃度や実験系の違いのため単純には比較できないものの、我々が開発した*Pseudonocardia* sp. D17株を用いたバイオオーグメンテーションシステムは、これまでの報告と比較して高い性能を持つものであると言える。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

これまで、1,4-ジオキサンによる汚染は高エネルギー消費・高コストとなるオゾンと紫外線による促進酸化法（AOP）を除いて浄化法が存在せず、特に様々な夾雑物質を含み、処理すべき量も膨大な土壌/地下水汚染については非常に困難であった。本研究により、系統学的にも分解様式的にも多様な1,4-ジオキサン分解菌のライブラリを構築することができ、さらに、1,4-ジオキサン汚染環境のオンサイトリアクターあるいはバイオオーグメンテーションによる浄化に有望な数株の1,4-ジオキサン分解菌を提示することができた。また、1,4-ジオキサン分解菌を活性化する因子や、共存汚染物質が1,4-ジオキサン分解に及ぼす影響の一部も明らかにすることができた。今後もこれらの知見集積を進めていくことにより、様々な特性をもつ1,4-ジオキサン汚染環境の浄化に対応できる浄化オプションを整備することができると考えられる。

さらに、上記の知見を基に構築した*Pseudonocardia* sp. D17株を用いたバイオリアクターは、様々な窒素・リン濃度の模擬汚染地下水や実汚染地下水を用いた試験において高い1,4-ジオキサン分解性能を発揮しており、1,4-ジオキサンによる地下水汚染の浄化の現実的な対策となりうると期待される。我々の調査だけでも国内において公表されている1,4-ジオキサンによる地下水汚染現場は4ヶ所あり、潜在的にはさらに多くの汚染現場が存在する可能性がある。本研究により現実的な汚染対策技術が開発されれば、公表されている汚染現場の浄化への貢献のみならず、新たな汚染現場の発見と浄化の促進にも貢献できるものと期待される。我々は、学会発表などの学術的な公表のみならず、新聞報道などによる一般向けの情報発信も積極的に行うことで成果の普及に努めて

おり、国内外で発生している1,4-ジオキサン汚染問題の解決と、汚染に伴う健康被害の未然防止に貢献することを目指している。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE and M. IKE: J. Water Environ. Technol., 11, 1, 11-19 (2013)
“Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation”.
- 2) K. SEI, K. MIYAGAKI, T. KAKINOKI, K. FUKUGASAKO, D. INOUE and M. IKE: Biodegradation, 24, 5, 665-674 (2013)
“Isolation and characterization of bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source”.

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) (株) オフィス東和編：排水汚水処理技術集成 Vol.2、エヌ・ティー・エス社、95-101 (2013)
「第2編 処理技術研究の最前線 第1章 生物処理技術 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:環境浄化技術、13(5), 15-19 (2014)
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化技術」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE and M. IKE: Water and Environment Technology Conference 2012 (WET2012), Tokyo, Japan (2012)
“Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation”
- 2) 福ヶ迫久仁衛、池道彦、清和成、井坂和一：日本水処理生物学会第49回大会(2012)
「包括固定化分解菌を用いた低濃度1,4-ジオキサンの処理」
- 3) 成田尚宣、福ヶ迫久仁衛、黒田真史、山本哲史、斎藤祐二、池道彦：第65回日本生物工学会大会(2013)
「*Pseudonocardia dioxanivorans* D17による1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化に関する検討」

- 4) 山本哲史、斎藤祐二、池道彦、清和成、井上大介：第16回日本水環境学会シンポジウム（2013）
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化に関する研究」
- 5) K. SAWADA, D. INOUE, T. TSUNODA, M. MORITA, M. IKE, and K. SEI : Water and
Environment Technology Conference 2014 (WET2014), Tokyo, Japan (2014)
“Evaluation of the 1,4-dioxane biodegradation potential of *Pseudonocardia* spp. and *Rhodococcus*
spp.”
- 6) M. KURODA, K. FUKUGASAKO, T. NARITA, and M. IKE : IWA World Water Congress &
Exhibition 2014, Lisbon, Portugal (2014)
“Development of bioreactor using for treatment of 1,4-dioxane-polluted groundwater”
- 7) K. SAWADA, D. INOUE, T. TSUNODA, Y. AOKI, M. KURODA, M. IKE, and K. SEI : 9th IWA
International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries (AGRO'2014),
Kochi, Japan (2014)
“Identification of 1,4-dioxane degradation genes of *Pseudonocardia* sp. D17 by microarray
expression analysis”
- 8) 井上大介、角田翼、関雅仁、澤田和子、森田雅恵、池道彦、清和成：第51回環境工学研究フ
ォーラム（2014）
「*Pseudonocardia*属細菌および*Rhodococcus*属細菌の1,4-ジオキサン分解ポテンシャルの評
価」
- 9) 山本哲史、斎藤祐二、井上大介、清和成、黒田真史、池道彦：第51回環境工学研究フ
ォーラム（2014）
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物処理技術」

（3）出願特許

- 1) 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

（4）「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第60回青森・岩手県境不法投棄現場の原状回復対策協議会（主催：岩手県、2014年3月15日、
二戸地区合同庁舎大会議室、一般傍聴者15名）にて実証試験の中間報告
- 2) 2014地球環境保護 土壌・地下水浄化技術展（東京ビッグサイト西ホール、平成26年10月15-
17日、参加者18,877人）にて研究内容の展示・紹介

（5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 岩手日報（2013年5月26日）「県境産廃不法投棄 土壌浄化の進行を確認」
- 2) デーリー東北（2013年5月26日）「県境産廃 N地区順調に汚染浄化」
- 3) 大成建設ホームページ プレスリリース（2013年5月26日）「コストを大幅減、1,4-ジオキサ
ンの生物浄化技術実証試験へ」
- 4) 日経産業新聞（2013年7月11日）「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」

- 5) 日刊建設産業新聞（2013年7月12日）「分解菌で1,4-ジオキサン浄化 CO₂とコスト大幅減」
- 6) 建設通信新聞（2013年7月18日）「ジオキサン汚染の生物浄化技術 効果確認 ランニングコスト AOPの1/10」
- 7) フジサンケイビジネスアイ（2013年7月22日）「生物浄化技術の実証試験」
- 8) 月刊建築技術（2013年10月号、株式会社建築技術）「1,4-ジオキサンの生物浄化技術実証試験へ」
- 9) 建設通信（2014年10月16日、朝刊、3頁）「大成建設バイオ浄化を加速 迅速、安価に無害化」
- 10) 環境新聞（2014年10月21日、5頁）「1,4-ジオキサン 排水処理にも光明」

(6) その他

- 1) WET Excellent Paper Award (K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE and M. IKE : Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation, 2012年6月30日, Japan Society on Water Environment)
- 2) 日本水処理生物学会第49回大会ベストプレゼンテーション賞 (福ヶ迫久仁衛、池道彦、清和成、井坂和一 : 包括固定化分解菌を用いた低濃度1,4-ジオキサンの処理, 2012年11月25日, 日本水処理生物学会)

8. 引用文献

- 1) S.T. COWAN and K.J. STEEL: (1974) Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edition, Cambridge University Press.
- 2) H. MASUDA, K. McCLAY, R.J. STEFFAN, G.J. ZYLSTRA: J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 22, 312–316 (2012) “Biodegradation of Tetrahydrofuran and 1,4-Dioxane by Soluble Diiron Monooxygenase in *Pseudonocardia* sp. Strain ENV478”
- 3) C.M. SALES, S. MAHENDRA, A. GROSTERN, R.E. PARALES, L.A. GOODWIN, T. WOYKE, M. NOLAN, A. LAPIDUS, O. CHERTKOV, G. OVCHINNIKOVA, A. SCZYRBA, L. ALVAREZ-COHEN: J Bacteriol. 193, 4549–4550 (2011) “Genome Sequence of the 1,4-Dioxane-Degrading *Pseudonocardia dioxanivorans* Strain CB1190”
- 4) J.G. LEAHY, P.J. BATCHELOR, S.M. MORCOMB: FEMS Microbiol. Rev. 27, 449–479 (2003) “Evolution of the Soluble Diiron Monooxygenases”
- 5) H. DALTON: Phil. Trans. R. Soc. B 360, 1207–1222 (2005) “The natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria”
- 6) R.E. PARALES, J.E. ADAMUS, N. WHITE, H.D. MAY: Appl. Environ. Microbiol. 60, 4527–4530 (1994) “Degradation of 1,4-dioxane by an Actinomycete in Pure Culture”
- 7) S.L. KELLEY, E.W. AITCHISON, M. DESHPANDE, J.L. SCHNOOR, P.J.J. ALVAREZ: Water Res. 35, 3791–3800 (2001) “Biodegradation of 1,4-dioxane in Planted and Unplanted Soil: Effect of Bioaugmentation with *Amycolata* sp. CB1190”
- 8) M. LI, S. FIORENZA, J.R. CHATHAM, S. MAHENDRA, P.J. ALVAREZ: Water Res. 44, 2894–2900 (2010) “1,4-Dioxane Biodegradation at Low Temperatures in Arctic Groundwater Samples”

(2) 1,4-ジオキサン汚染サイトの生物浄化可能性評価診断ツールの開発

学校法人北里研究所北里大学

清 和成・井上 大介

平成24～26年度累計予算額：38,369千円（うち、平成26年度予算額：12,999千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

1,4-ジオキサンは、水環境中における残留性と毒性から、水環境中の重要な汚染化学物質と認識され、近年に各種の基準が定められたが、1,4-ジオキサンによる水環境汚染は既に生じており、その汚染の浄化が喫緊の課題となっている。他方、近年になり、環境中に1,4-ジオキサン分解菌が存在することが明らかにされ、その分解菌を活用することにより、浄化効果と経済性の両面に優れた1,4-ジオキサン汚染浄化技術を開発することが可能であることが見出された。そこで本研究では、1,4-ジオキサン汚染地下水の生物学的浄化（バイオレメディエーション）技術の開発を目指し、汚染現場に適した浄化技術の選択に資する診断ツールを開発することを目的として、各種の検討を実施した。これまでに分離された1,4-ジオキサン分解菌（資化菌および共代謝菌）の多くが *Pseudonocardia* 属と *Rhodococcus* 属に属していることから、両属から25種を選抜し、1,4-ジオキサンの資化能およびテトラヒドロフラン（THF）を一次基質とした共代謝能を調査した結果、①1,4-ジオキサン資化能は両属に共通の特性ではなく、限られた種または株の特性であること、② *Pseudonocardia* 属の多くの種がTHF分解能を保有しており、その一部は1,4-ジオキサンの共代謝分解も可能であること、③ *Rhodococcus* 属では、THF分解能も一部の種あるいは株に特異的な特性であることが明らかになった。また、化学工場敷地内の土壌・水、ならびに1,4-ジオキサン汚染地下水から新規1,4-ジオキサン分解菌の分離を試みた結果、前者から系統分類学的に多様な分解菌が分離され、また、後者からは分解菌を分離することはできなかつたものの、分解菌を集積できることが明らかになった。また、既に分解特性が明らかされている構成型1,4-ジオキサン資化菌 *Pseudonocardia* sp. D17株を対象としたマイクロアレイ発現解析の結果、*thm* 遺伝子群が1,4-ジオキサンの初発酸化に関与することが明らかになった。これらの成果を踏まえ、*thm* 遺伝子が含まれる soluble di-iron monooxygenase 遺伝子を標的としたPCRシステムを、環境中の1,4-ジオキサン分解菌を網羅的に検出し、1,4-ジオキサン生分解ポテンシャルを把握するためのツールとして提案するとともに、1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化実証試験に使用する *Pseudonocardia* sp. D17株をモニタリングするための定量モニタリングツール（real-time PCR法）を開発した。さらに、これらのモニタリングツールの有用性について検討した結果、両ツールの有用性が検証され、分解菌数と浄化の成否との関係を示すことができた。

【キーワード】

1,4-ジオキサン、生物学的浄化（バイオレメディエーション）、1,4-ジオキサン分解菌、資化、共代謝、マイクロアレイ発現解析、定量的モニタリングツール

1. はじめに

1,4-ジオキサンは、セルロース、エステル及びエーテル類に適した合成有機溶剤であり、各種化学工業や医薬品製造業、繊維工業等において汎用されている。また、我々が日常的に使用する界面活性剤（特にアルキルエーテルサルフェート）やポリエチレンテレフタレートの製造時にも不可避的に副生成する。1,4-ジオキサンは、水に任意に混和し、揮発性、固体への吸着性、光分解性、加水分解性、生分解性がいずれも低い物性を有するため、水環境中での残留性が極めて高い。さらに、急性毒性、慢性毒性を有し、発がん性を有する可能性も指摘されており、水環境中における高い残存性から環境汚染に伴う人体への悪影響が懸念されている。

そのため、世界保健機関により1,4-ジオキサンに係る飲料水水質ガイドライン（50 µg/L）が2003年に定められ、国内においても、2004年に水道水質基準（基準値：50 µg/L）、2009年に水質環境基準（50 µg/L）、2012年に排水基準（500 µg/L）が定められた。しかし、埋立処分場浸出水の汚染（数mg/L）や河川水・地下水における基準値超過事例（数十～数百µg/L）、産業廃棄物不法投棄現場における高濃度地下水汚染（最大で数十mg/L）が報告されており、国内外の水環境中において1,4-ジオキサン汚染の発生が明らかにされてきている。このため、1,4-ジオキサン汚染環境の浄化は喫緊の課題であるが、1,4-ジオキサンは極めて安定な物質であり、現状の浄化技術の中では、紫外線やオゾン、過酸化水素を組み合わせた促進酸化法（AOP）が唯一有効であるとされてきた。しかし、AOPは高エネルギー消費・高コストであるため、広範囲にわたる土壌や地下水に対する汚染浄化には不向きである上、実際の汚染環境中で想定される共存物質の存在下では1,4-ジオキサンの除去効率が低下するため¹⁾²⁾、費用対効果はさらに低くなる。このため、浄化効果と経済性の両面から1,4-ジオキサン汚染に有効な浄化技術は存在しない。

他方、我々は、これまでの検討から、一般的には生物難分解性（化審法に基づく好氣的生分解による14日間のBOD分解率0%）と言われている1,4-ジオキサンを分解できる微生物が多様な環境中に存在していることが明らかにし³⁾、また、その分解菌の活用により、低コストの1,4-ジオキサン含有廃水処理が可能であることを示してきた。このため、1,4-ジオキサン汚染環境においても、分解菌の活用による低コストでの浄化が可能であると考えられた。しかし、生物学的浄化（バイオレメディエーション）技術を適用するにあたっては、汚染現場における分解菌の存在状況などを踏まえ、各汚染現場に適した浄化戦略を選択することが必要である。また、浄化過程においても、分解菌の挙動を把握し、状況に応じて浄化促進策を講じる必要性もある。

2. 研究開発目的

上記の背景から、本研究開発事業においては、1,4-ジオキサン分解菌を活用することにより、1,4-ジオキサン汚染地下水を低コストで環境基準値以下まで浄化するための一連の技術群の開発と実証を全体目標とした。この目標を達成するため、本サブテーマにおいては、汚染現場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を開発することを目的とし、以下の5つの検討課題に取り組んだ。

検討1) 既存1,4-ジオキサン分解菌の近縁種の1,4-ジオキサン分解能の評価

検討2) 土壌等より分離した新規1,4-ジオキサン分解菌の特徴づけ

検討3) マイクロアレイ発現解析に基づく、既存1,4-ジオキサン分解菌の分解関与遺伝子群の特定

検討4) 1,4-ジオキサン分解菌の定量的モニタリングツールの開発

検討5) 分解菌挙動と浄化性能を予測するための数値モデルの構築と、開発したモニタリングツールの有用性検証

3. 研究開発方法

1) 既存1,4-ジオキサン分解菌の近縁種の1,4-ジオキサン分解能の評価

我々がこれまでに分離してきた1,4-ジオキサン分解菌、ならびに他の研究グループによってこれまでに報告されている1,4-ジオキサン分解菌を整理したところ、1,4-ジオキサンを資化分解するものと、テトラヒドロフラン (THF) 等を一次基質に利用して共代謝分解するものが存在していた(表(2)-1)。また、既知の分解菌の系統分類学的位置に着目すると、特に*Pseudonocardia*属と*Rhodococcus*属に分類されるものが多いことが明らかになった。そこで、1,4-ジオキサン分解能が*Pseudonocardia*属および*Rhodococcus*属に共通の特性であるのか、あるいは一部の種またはグループに特異的な特性であるのかを明らかにするため、両属に分類される細菌株の1,4-ジオキサン分解能を調査した。なお、1,4-ジオキサンは資化および共代謝によって分解することが知られていることから、本研究では資化およびTHFを一次基質とした共代謝による分解について検討することにした。

表(2)-1 これまでに報告された1,4-ジオキサン分解菌と分解機構

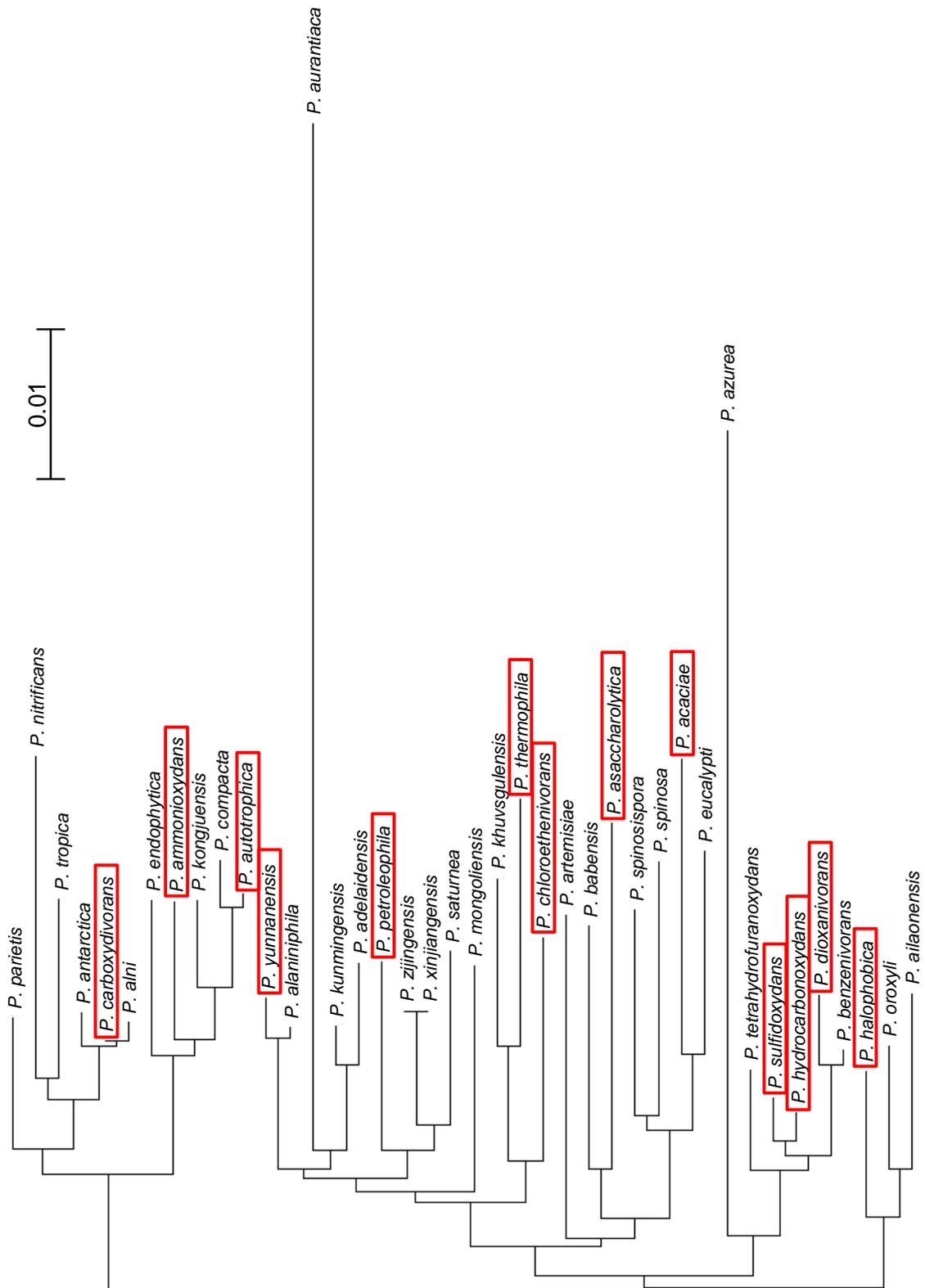
分解機構	菌株	文献
資化	<i>Afipia</i> sp. D1	4)
	<i>Mycobacterium</i> sp. PH-06	5)
	<i>Pseudonocardia benzenivorans</i> B5	6)
	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	7)
	<i>Mycobacterium</i> sp. D6	4)
	<i>Mycobacterium</i> sp. D11	4)
	<i>Pseudonocardia</i> sp. D17	4)
	<i>Rhodococcus ruber</i> 219	8)
共代謝 (THF)	<i>Flavobacterium</i> sp.	9)
	<i>Pseudonocardia</i> sp. ENV478	10)
	<i>Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans</i> K1	11)
	<i>Rhodococcus ruber</i> T1	12)
	<i>Rhodococcus ruber</i> T5	12)
共代謝 (メタン)	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	11)
共代謝 (プロパン)	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	11)
共代謝 (トルエン)	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	11)
	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	11)
	<i>Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans</i> K1	11)
	<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	11)
	<i>Rhodococcus</i> sp. RR1	11)
不明	<i>Pseudonocardia antarctica</i> DVS 5a1	13)

まず、*Pseudonocardia*属および*Rhodococcus*属から代表菌株を選定するため、*Pseudonocardia*属の40種、*Rhodococcus*属の45種を対象とした16S rRNA遺伝子配列に基づく系統解析を行った。*Pseudonocardia*属の系統樹を図(2)-1、*Rhodococcus*属の系統樹を図(2)-2に示す。図(2)-1、図(2)-2の結果に基づき、*Pseudonocardia*属から13種、*Rhodococcus*属から12種を代表種として選定し(表(2)-2)、種ごとの基準株の1,4-ジオキサン分解能を調査することにした。なお、使用する各基準株は(独)理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。

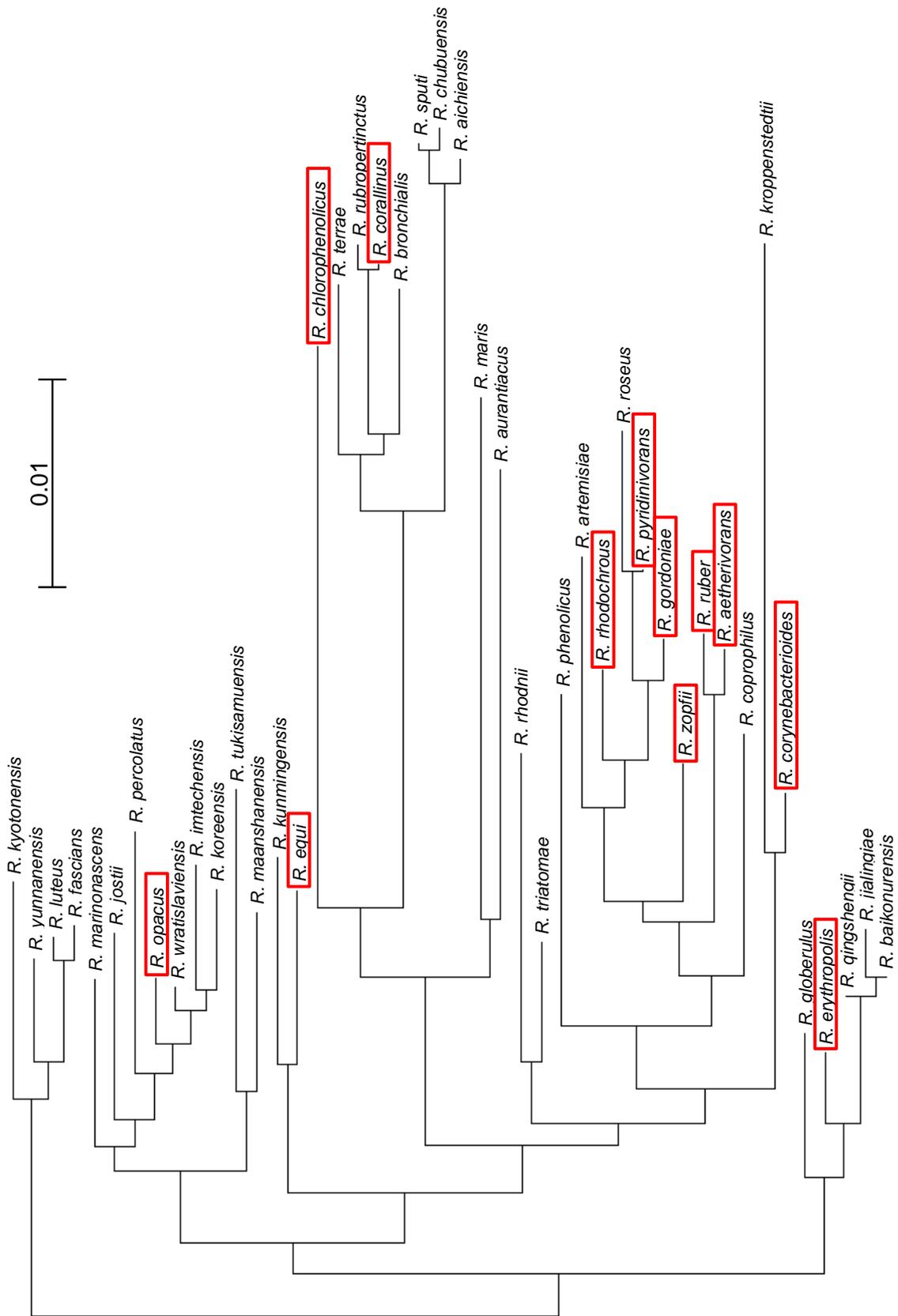
分解試験に使用する各供試菌株は、表(2)-2に示す温度において、MGY培地中で十分量まで培養した後、遠心分離(8,500×g, 4°C, 5分)によって菌体を回収し、滅菌生理食塩水で2回洗浄した。この菌体を、OD₆₀₀(600 nmにおける濁度)が1.0になるように、20 mlの無機塩培地(pH 7.0)⁷⁾を含む50 ml容バイアル瓶に植種した。ここに、資化試験の場合には20 mg/Lあるいは100 mg/Lの1,4-ジオキサン、共代謝試験の場合には20 mg/Lの1,4-ジオキサンと50 mg/LのTHF(一次基質)を添加した。また、供試菌株を植種しないコントロール系も作成した。各バイアル瓶は、28°C、120 rpmで回転振盪培養することにより、分解試験を実施した。なお、分解試験期間は14日間とした。試験期間中は、培養液の一部を経時的に採取し、遠心分離(20,000×g, 4°C, 5分)を行った後、上清を孔径0.45 μmのセルロースアセテートフィルターでろ過し、GC-FID(GC: GC2014(島津製作所)、カラム: ガラスカラム(3.2 mm φ×2.1 m)、充填剤: Gaskuropack 54、キャリアガス: N₂(55 ml/分)、カラム・注入口温度: 200°C、検出器温度: 230°C)を用いて1,4-ジオキサン及びTHFの残存濃度を測定した。

また、供試菌株のうち、1,4-ジオキサン資化能、1,4-ジオキサン共代謝能、あるいはTHF分解能を有することが確認された菌株を対象として、既往研究において1,4-ジオキサン分解に関与することが報告されているsoluble di-iron monooxygenase(SDIMO)のα-subunitをコードする遺伝子(以下、SDIMO遺伝子と称する)のPCR検出を実施した。PCR検出には、Colemanら¹⁴⁾が開発したPCRプライマーを用いた。また、増幅産物は、シーケンス解析を行い、既知のSDIMO遺伝子との相同性を調査した。

さらに、1,4-ジオキサン資化能を有することが明らかになった*R. aetherivorans* JCM 14343を対象として、分解酵素誘導物質の調査を行った。*R. aetherivorans* JCM 14343をMGY培地中で十分量まで培養し、遠心分離により菌体を回収し、滅菌生理食塩水で2回洗浄した後、500 mg/Lの1,4-ジオキサン、THF、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、グリオキシル酸、またはグルコースを含む無機塩培地に植種して1日間培養した。その菌体を回収・洗浄した後、20 mg/Lの1,4-ジオキサンを添加した20 mlの無機塩培地を含む50 ml容バイアル瓶に植種し、分解試験を実施した。



図(2)-1 *Pseudonocardia*属の系統樹 (赤枠が選定した代表種)



図(2)-2 *Rhodococcus* 属の系統樹（赤枠が選定した代表種）

表(2)-2 1,4-ジオキサン分解能の評価に用いた*Pseudonocardia*属、*Rhodococcus*属の基準菌

属	試験菌株	培養温度 (°C)
<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia acaciae</i> JCM16707	37
	<i>Pseudonocardia ammonioxydans</i> JCM12462	28
	<i>Pseudonocardia asaccharolytica</i> JCM10410	28
	<i>Pseudonocardia autotrophica</i> JCM4348	28
	<i>Pseudonocardia carboxydivorans</i> JCM14827	28
	<i>Pseudonocardia chloroethenivorans</i> JCM12679	28
	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> JCM13855	28
	<i>Pseudonocardia halophobica</i> JCM9421	28
	<i>Pseudonocardia hydrocarbonoxydans</i> JCM3392	28
	<i>Pseudonocardia petrolephila</i> JCM3378	28
	<i>Pseudonocardia sulfidoxydans</i> JCM10411	28
	<i>Pseudonocardia thermophile</i> JCM3095	37
	<i>Pseudonocardia yunnanensis</i> JCM9330	28
	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> JCM14343
<i>Rhodococcus chlorophenolicus</i> JCM7439		28
<i>Rhodococcus corallines</i> JCM3199		28
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i> JCM3376		28
<i>Rhodococcus equi</i> JCM1311		28
<i>Rhodococcus erythropolis</i> JCM3201		28
<i>Rhodococcus gordoniae</i> JCM12658		28
<i>Rhodococcus opacus</i> JCM9703		28
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> JCM10940		28
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> JCM3202		28
<i>Rhodococcus ruber</i> JCM3205		28
<i>Rhodococcus zopfii</i> JCM9919		28

2) 土壌等より分離した新規1,4-ジオキサン分解菌の特徴づけ

国内の某化学工場の敷地内より採取した土壌と水を植種源として用い、1,4-ジオキサン分解菌の集積培養を試みた。その結果、集積培養系から10種類の菌株が分離された。そこで、これら10株に対して、生理学的特徴づけと16S rRNA遺伝子配列に基づく系統分類学的特徴づけを行うとともに、1,4-ジオキサン (50 mg/L) を単一炭素源として添加した無機塩培地における増殖の可否に基づいて1,4-ジオキサン分解 (資化) 能を判定した。さらに、1,4-ジオキサン分解能を有することが確認された菌株を対象として、trypticase soy broth (TSB) 培地中における増殖に対するpHの影響の調査、1,4-ジオキサンを単一炭素源として添加した無機塩培地を用いた1,4-ジオキサン濃度の増殖に対する影響の調査を行った。なお、増殖は、菌体濁度 (OD₆₀₀) を経時的に測定することによって評価した。

他方、1,4-ジオキサン汚染サイトの地下水試料を植種源として用いた1,4-ジオキサン分解菌の集積培養も試みた。1,4-ジオキサンを含む無機塩培地に地下水試料中の懸濁物質を植種した後、20℃、

120 rpmで回転振盪培養し、1,4-ジオキサン濃度を継時的に測定した。有意な1,4-ジオキサン分解が確認された後、1,4-ジオキサンの再添加、あるいは新たな無機塩培地への懸濁物質（遠心分離によって回収）の植え継ぎを繰り返すことにより、1,4-ジオキサン分解菌の集積を行った。なお、培養の途中段階において、培養温度を20℃から28℃に変更して温度上昇が集積系内の微生物群による1,4-ジオキサン分解に及ぼす影響を検討した。そして、安定した1,4-ジオキサン分解が確認された後、1,4-ジオキサンを含む無機塩寒天培地に集積系の一部を塗抹した。寒天培地上に出現したコロニーは、1,4-ジオキサンを含む無機塩液体培地で培養し、増殖が観察されたものを再度1,4-ジオキサンを含む無機塩寒天培地に塗抹することで純化を試みた。他方、集積系内における1,4-ジオキサン分解菌の存在を遺伝子レベルで確認するため、上述したColemanら¹⁴⁾が開発したプライマーを用い、SDIMO遺伝子のPCR検出を行った。

3) マイクロアレイ発現解析に基づく、既存1,4-ジオキサン分解菌の分解関与遺伝子群の特定

我々が既に保有している1,4-ジオキサン分解菌（資化菌）のうち、誘導型の資化菌である*Mycobacterium* sp. D6株と構成型の資化菌である*Pseudonocardia* sp. D17株を代表菌株として用い、マイクロアレイ発現解析によって、1,4-ジオキサン分解時における遺伝子発現プロファイルを調査し、その結果に基づき、1,4-ジオキサン分解に関与する遺伝子群の特定を試みた。

まず、マイクロアレイ発現解析に使用する*Mycobacterium* sp. D6株と*Pseudonocardia* sp. D17株について、サブテーマ（1）において解読されたドラフトゲノムデータに基づき、マイクロアレイ上に搭載するDNAプローブの配列を決定し、全ゲノムを対象としたマイクロアレイを作製した。なお、マイクロアレイの作製には、アジレント・テクノロジー社のeArrayシステムを用い、1枚のスライドで8サンプルの解析が可能なフォーマットを用いることとした。

次に、RNA抽出からマイクロアレイデータの処理までのマイクロアレイ発現解析の各工程について検討し、解析方法を最適化した。

マイクロアレイ発現解析を行うための分解試験は、以下の二通り（マイクロアレイ発現解析①、②）で実施した。

マイクロアレイ発現解析①においては、500 mg/Lの1,4-ジオキサンを添加した無機塩培地に*Pseudonocardia* sp. D17株のコロニーを植種し、28℃、120 rpmで回転振盪培養を行った。培養期間中は、培養液中の1,4-ジオキサン濃度を経時的に測定し、有意な分解が観察された時点で新たな無機塩培地（1,4-ジオキサン濃度：500 mg/L）に植え継ぎ、その培養液を用いてマイクロアレイ発現解析を実施した。マイクロアレイ発現解析の結果、シグナルノイズ（S/N）比が150以上となったプローブ（遺伝子）を強発現遺伝子と定義し、データ解析に用いることとした。

マイクロアレイ発現解析②においては、グルコースを単一炭素源として添加した無機塩培地で*Pseudonocardia* sp. D17株を培養した後、100 mg/Lの1,4-ジオキサンあるいはエチレングリコールを含む無機塩培地にOD₆₀₀が0.8になるように植種し、28℃、120 rpmで回転振盪培養を行った。培養期間中は、1,4-ジオキサン濃度あるいはエチレングリコール濃度を経時的に測定し、それらの経時変化を明らかにするとともに、0時間、21時間、および51時間（1,4-ジオキサン添加系のみ）にマイクロアレイ発現解析に用いる試料を採取した。

4) 1,4-ジオキサン分解菌の定量的モニタリングツールの開発

1,4-ジオキサン分解菌のモニタリングツールを開発するための基礎的知見を得るため、1,4-ジオキサン分解菌を含む特定の系統範囲を特異的に検出するPCRシステム、1,4-ジオキサン分解関与遺伝子群、およびそれらの遺伝子群をターゲットにしたPCRシステムについて、既往研究を調査した。

また、サブテーマ（3）の浄化実証試験において1,4-ジオキサン分解菌*Pseudonocardia* sp. D17株の挙動をモニタリングするため、同株を特異的に定量検出できるreal-time PCRシステムの開発を行った。サブテーマ（1）で取得した*Pseudonocardia* sp. D17株のドラフトゲノムデータ、ならびに本サブテーマの検討3)の成果を元にして、real-time PCRシステムの標的とする候補配列を選定し、Primer3プログラム¹⁵⁾¹⁶⁾を用いてreal-time PCRプライマー候補を抽出した。次に、Primer-Blastプログラム¹⁷⁾を用いて、プライマー候補の配列とGenBank登録配列との相同性を検索し、特異性が高いことが明らかになったプライマーを抽出した。ここで抽出された特異性の高いプライマーを対象として、D17株のゲノムDNAを用いた検出感度の評価を行い、高感度検出が可能なプライマーについて、real-time PCR反応条件の最適化を行った。real-time PCR法に使用するスタンダードは以下の手順で作製した。まず、シカジーニアスDNA抽出試薬ST（関東化学）を用い、*Pseudonocardia* sp. D17株のゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAから、開発したプライマーを用いて標的遺伝子の部分配列を増幅し、NucleoSpin PCR and Gel Clean-up（タカラバイオ）を用いて精製した。その後、DynaExpress TA PCR Cloning Kit (pTAC-1) with Jet Competent Cell（バイオダイナミクス研究所）を用いたTAクローニングに供し、PCR産物が挿入されたプラスミドを保有するクローンを選抜して培養し、FastGene Plasmid Mini Kit（日本ジェネティクス）を用いてプラスミドを抽出したものをスタンダードとした。調製したスタンダードは、real-time PCRに供し、増幅効率と検量線の r^2 値を求めた。

5) 分解菌挙動と浄化性能を予測するための数値モデルの構築と、開発したモニタリングツールの有用性検証

検討4)で開発した*Pseudonocardia* sp. D17株の定量モニタリングツールの有用性を明らかにするため、既知濃度の*Pseudonocardia* sp. D17株の培養液からゲノムDNAを抽出し、開発手法による定量を実施した。その定量結果を他の手法で求めた*Pseudonocardia* sp. D17株の濃度と比較し、両者の関係を調べた。また、開発した定量手法をサブテーマ（3）の浄化実証試験に適用し、汚染地下水浄化過程における*Pseudonocardia* sp. D17の挙動解析を行った。そのモニタリング結果に基づき、1,4-ジオキサン汚染の浄化に必要な1,4-ジオキサン分解菌数を推定した。

他方、検討4)で実施した文献調査ならびに他のサブテーマにおける検討の結果から、①ジェチレングリコールが1,4-ジオキサン分解菌の増殖や分解酵素誘導に関与していること、および②SDIMO遺伝子が1,4-ジオキサン微生物分解ポテンシャルを知るためのバイオマーカーとして利用できる可能性が示された。そこで、環境試料中にジェチレングリコールを添加して1,4-ジオキサン分解菌の集積を試み、SDIMO遺伝子を標的としてその集積効果を把握することが可能かを検証した。具体的には、300 ml容三角フラスコに90 mlの無機塩培地と10 gの1,4-ジオキサン汚染土壌を加え、ここにジェチレングリコールを20 g/Lになるように添加して、28°C、120 rpmで回転振盪培養を行った。0日および6日後に5.0 mlを採取し、ISOIL for beads beating（ニッポン・ジーン）を用いて土壌中のDNAを抽出し、MagExtractor -PCR & Gel Clean up-（東洋紡）を用いて精製した。このDNAサ

ンプルに対して、Colemanら¹⁴⁾が開発したプライマーを用いたSDIMO遺伝子のPCR検出を行った後、アガロースゲル電気泳動に供し、SYBR Green I染色と紫外線照射によってPCR増副産物の確認を行った。

4. 結果及び考察

1) 既存1,4-ジオキサン分解菌の近縁種の1,4-ジオキサン分解能の評価

実験に供した*Pseudonocardia*属13種および*Rhodococcus*属12種の代表菌株における1,4-ジオキサン分解能の評価結果を表(2)-3に整理している。25種の内、*P. dioxanivorans* JCM 13855^T株と*R. aetherivorans* JCM 14343^T株の2菌株においてのみ、1,4-ジオキサンの資化が観察された(図(2)-3(A))。このうち、*P. dioxanivorans* JCM 13855^T株(=*P. dioxanivorans* CB1190株)は元々1,4-ジオキサン資化菌として分離された菌株である⁷⁾。他方、*R. aetherivorans* JCM 14343^T株は、メチル*tert*-ブチルエーテルを分解することが知られているが¹⁸⁾、1,4-ジオキサン分解能についてはこれまでに報告がなく、本研究で初めて確認された。同種での1,4-ジオキサン分解についても報告例はない。また、これら2種に加えて、*P. acaciae* JCM 16707^T株および*P. asaccharolytica* JCM 10410^T株においては、THFと1,4-ジオキサンを同時に添加した場合に、THF分解に続く1,4-ジオキサンの分解が観察された(図(2)-3(B))。このことから、これら2種は、THFを一次基質に利用して1,4-ジオキサンを共代謝分解できることが明らかになった。一方、他の*Pseudonocardia*属の8種(*P. autotrophica* JCM 4348^T株、*P. carboxydivorans* JCM 14827^T株、*P. halophobica* JCM 9421^T株、*P. hydrocarbonoxydans* JCM 3392^T株、*P. petroleophila* JCM 3378^T株、*P. sulfidoxydans* JCM 10411^T株、*P. thermophila* JCM 3095^T株、*P. yunnanensis* JCM 9330^T株)においては、THF分解は観察されたものの、試験期間(14日間)内に1,4-ジオキサンの分解は確認されなかった(図(2)-3(C))。以上の結果から、以下のことが示唆された：

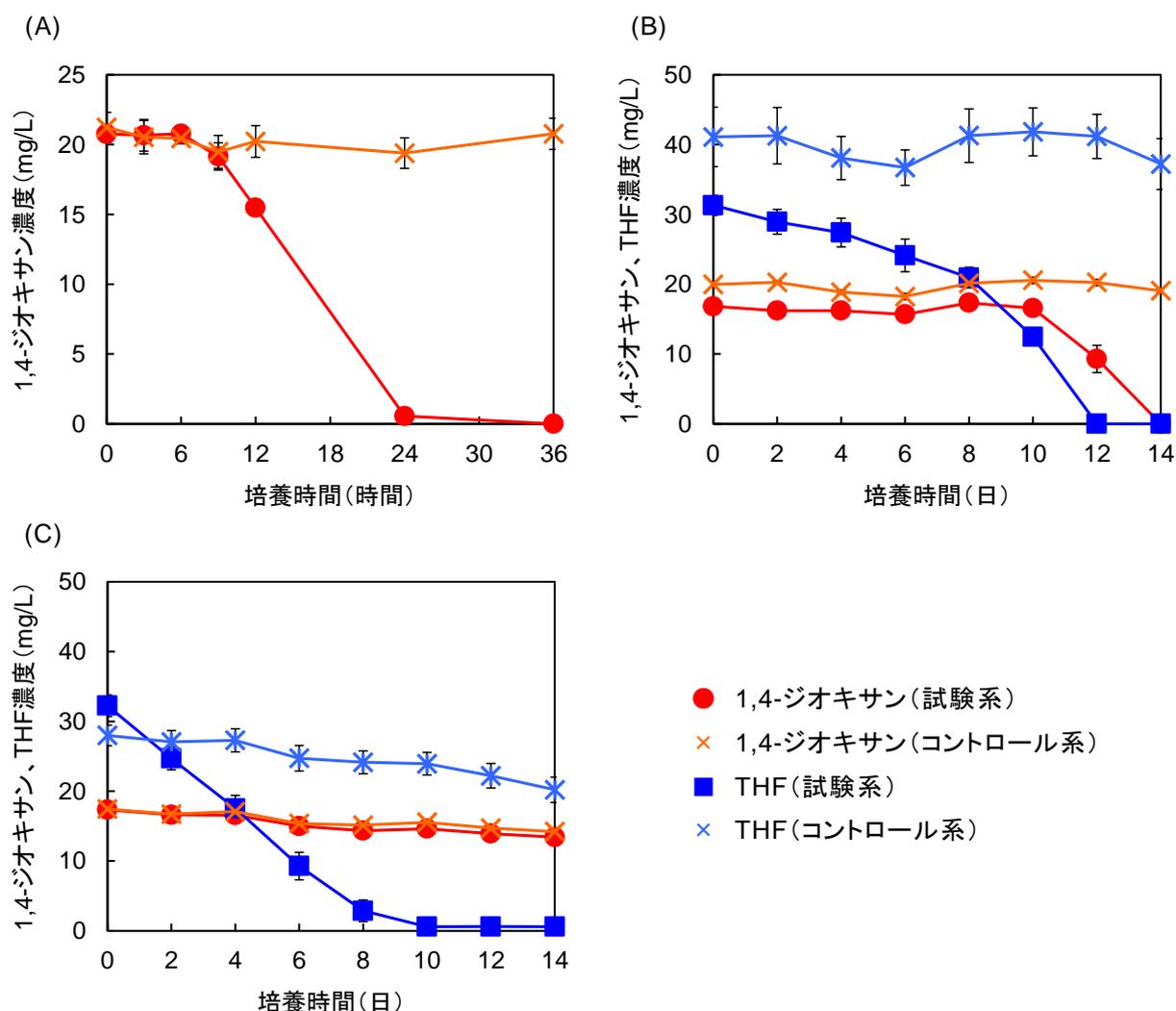
- ① 1,4-ジオキサン資化能は *Pseudonocardia* 属、*Rhodococcus* 属に共通の特性ではなく、限られた種または株の特性である。
- ② *Pseudonocardia* 属の多くの種が THF 分解能を保有しており、その一部は 1,4-ジオキサンの共代謝分解も可能である。
- ③ *Rhodococcus* 属では、THF 分解能も一部の種あるいは株に特異的な特性である。

表(2)-3 *Pseudonocardia*属および*Rhodococcus*属の代表菌株を用いた
1,4-ジオキサン資化試験およびTHFを一次基質とした共代謝試験の結果

供試菌株	資化試験 ^a	共代謝試験 ^b	
		THF	1,4-ジオキサン
<i>P. acaciae</i> JCM 16707 ^T	-	++	++
<i>P. ammonioxydans</i> JCM 12462 ^T	-	-	-
<i>P. asaccharolytica</i> JCM 10410 ^T	-	+ (19%)	+ (55%)
<i>P. autotrophica</i> JCM 4348 ^T	-	+ (25%)	-
<i>P. carboxydivorans</i> JCM 14827 ^T	-	+ (55%)	-
<i>P. chloroethenivorans</i> JCM 12679 ^T	-	-	-
<i>P. dioxanivorans</i> JCM 13855 ^T	+	++++	++++
<i>P. halophobica</i> JCM 9421 ^T	-	+ (2%)	-
<i>P. hydrocarbonoxydans</i> JCM 3392 ^T	-	+ (50%)	-
<i>P. petroleophila</i> JCM 3378 ^T	-	+ (23%)	-
<i>P. sulfidoxydans</i> JCM 10411 ^T	-	+ (8%)	-
<i>P. thermophila</i> JCM 3095 ^T	-	+ (33%)	-
<i>P. yunnanensis</i> JCM 9330 ^T	-	+ (59%)	-
<i>R. aetherivorans</i> JCM 14343 ^T	+	++++	++++
<i>R. chlorophenicus</i> JCM 7439 ^T	-	-	-
<i>R. corallinus</i> JCM 3199 ^T	-	-	-
<i>R. corynebacterioides</i> JCM 3376 ^T	-	-	-
<i>R. equi</i> JCM 1311 ^T	-	-	-
<i>R. erythropolis</i> JCM 3201 ^T	-	-	-
<i>R. gordoniae</i> JCM 12658 ^T	-	-	-
<i>R. opacus</i> JCM 9703 ^T	-	-	-
<i>R. pyridinivorans</i> JCM 10940 ^T	-	-	-
<i>R. rhodochrous</i> JCM 3202 ^T	-	-	-
<i>R. ruber</i> JCM 3205 ^T	-	-	-
<i>R. zopfii</i> JCM 9919 ^T	-	-	-

^a -, 14日以内に分解されず; +, 14日以内に分解.

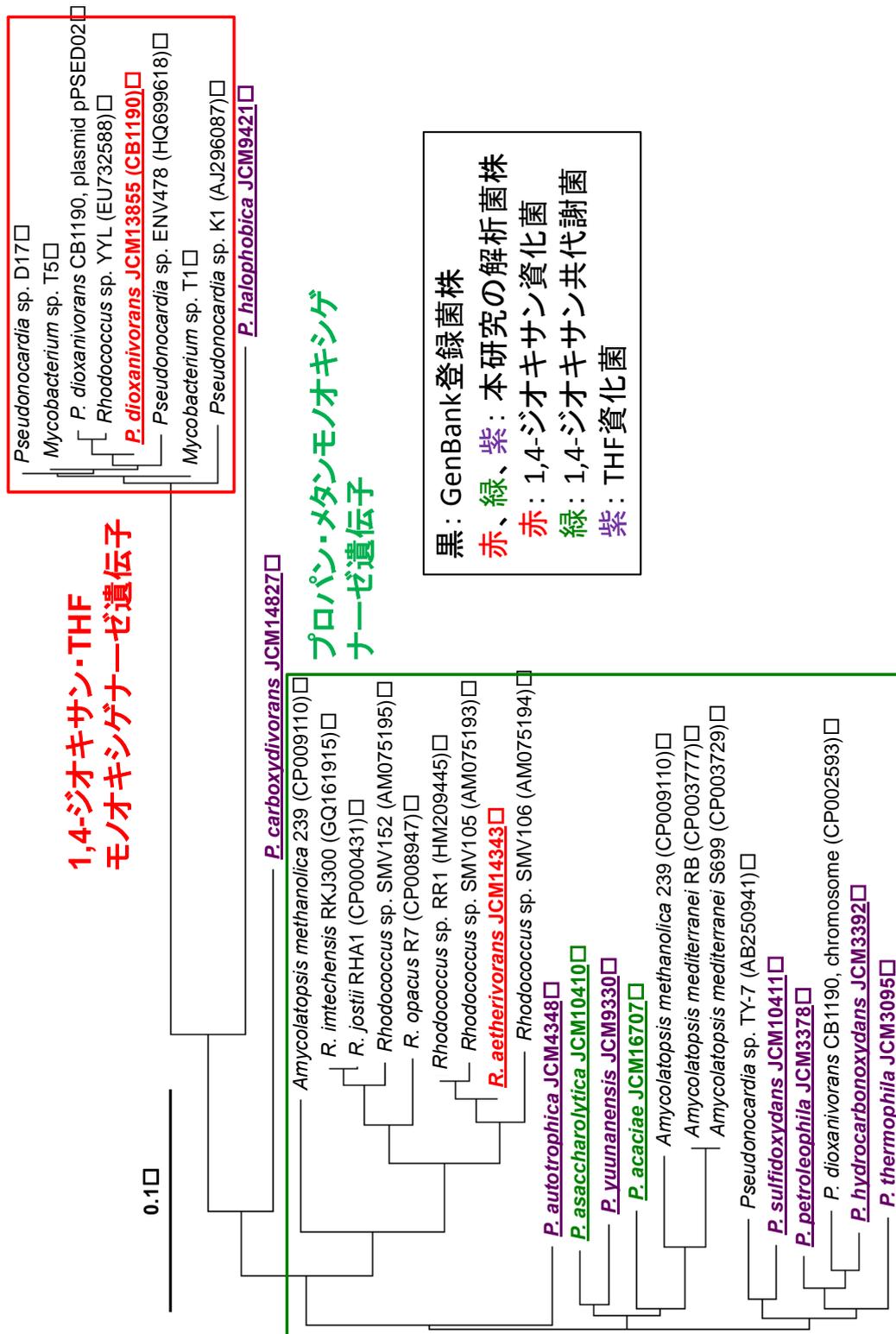
^b -, 14日以内に分解されず; +, 分解されたが14日後に一部残存 (14日後の残存率); ++, 14日以内に残存率0%; +++, 7日以内に残存率0%; +++++, 3日以内に残存率0%.



図(2)-3 1,4-ジオキサンを資化する菌 (A)、THFを一次基質として1,4-ジオキサンを共代謝する菌 (B)、THFは分解するが1,4-ジオキサンは共代謝しない菌 (C)における分解挙動の代表例

A : *P. aetherivorans* JCM 14343^T, B : *P. acaciae* JCM 16707^T, C : *P. halophobica* JCM 9421^T

次に、1,4-ジオキサン分解能あるいはTHF分解能が確認された12種について、SDIMO遺伝子のPCR検出を試みた。その結果、全ての種においてPCR産物が得られた。そこで、PCR産物のシーケンス解析を行い、GenBankに登録されたSDIMO遺伝子との比較を行った。本研究で解析した菌株および既知のSDIMO遺伝子の系統解析の結果を図(2)-4に示す。*P. dioxanivorans* JCM 13855^T株のSDIMO遺伝子は、既に解読されている同株の該当配列に一致し、1,4-ジオキサン・THFモノオキシゲナーゼ遺伝子に分類された。他方、本研究において新たに1,4-ジオキサン資化能が確認された*R. aetherivorans* JCM 14343^T株、1,4-ジオキサン共代謝能を有する2種、ならびにTHF分解能を有する種の内6種のSDIMO遺伝子は、プロパン・メタンモノオキシゲナーゼ遺伝子に分類された。また、THF分解能を有する*P. halophobica* JCM 9421^T株および*P. carboxydivorans* JCM 14827^T株のSDIMO遺伝子はどちらのグループとも相同性が低いことが明らかになった。



図(2)-4 本研究でTHF・1,4-ジオキサン分解能を有することが明らかになった12種の菌株のSDIMO遺伝子配列と既知のSDIMO遺伝子配列の系統分類学的関係

2) 土壌等より分離した新規1,4-ジオキサン分解菌の特徴づけ

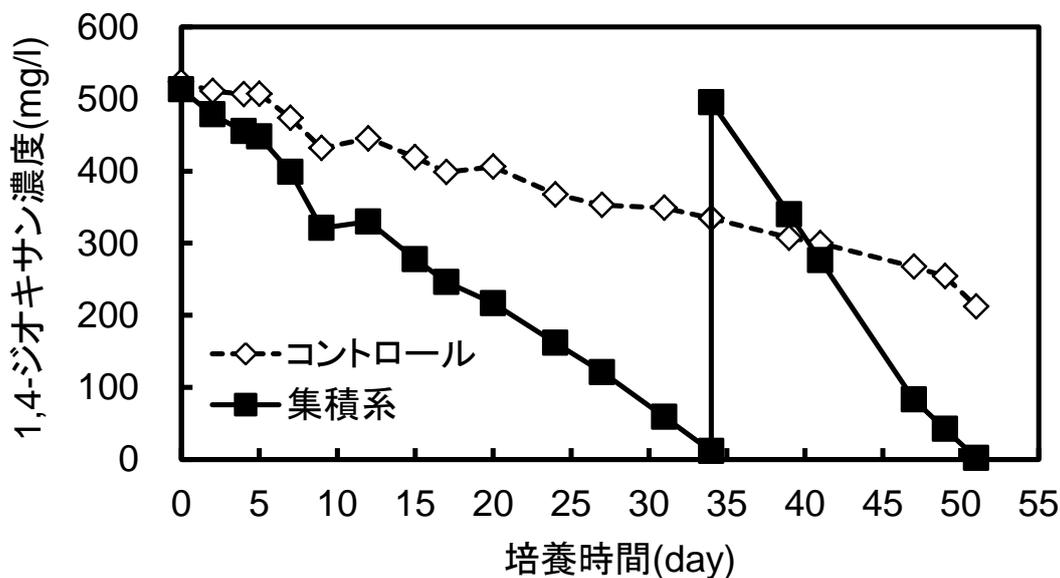
化学工場敷地内の土壌・水を植種源とする集積培養系から分離された10菌株の系統分類学的特徴づけ、および1,4-ジオキサン分解（資化）能判定の結果を表(2)-4に整理した。10菌株のうち、A2株、A3株、A4株、A6株、B1株、B2株、B3株、B6株の8菌株が1,4-ジオキサン資化能を有することが確認された。これら8菌株は、グラム陽性の*Arthrobacter*属（A4株）、*Microbacterium*属（A2株、B1株）、*Mycobacterium*属（B6株）、*Rhodococcus*属（B2株、B3株）、およびグラム陰性の*Bosea*属（A3株）に分類され（A6株はグラム陽性菌であるが、16S rRNA遺伝子配列に基づく系統学的解析は終了していない）、系統学的に非常に多様であった。特に、*Arthrobacter*属、*Microbacterium*属、および*Bosea*属については、これまでに1,4-ジオキサン分解菌の報告はなく、本研究が初めての発見である。

1,4-ジオキサン資化能を有することが確認された8菌株の増殖に対するpH、1,4-ジオキサン濃度の影響について検討した。TSB培地を用いてpHの影響について評価した結果、ほとんどの菌株がpH5～9で生育可能であることが確認され、B6株はpH6、A4株、B1株、B2株はpH7、A2株、A3株、A6株、B3株はpH8において比増殖速度が最大値を示した（表(2)-4）。また、無機塩培地を用いて1,4-ジオキサン濃度の影響について検討した結果、いずれの菌株においても、100 mg/Lまでの濃度では増殖可能であることが明らかになった。

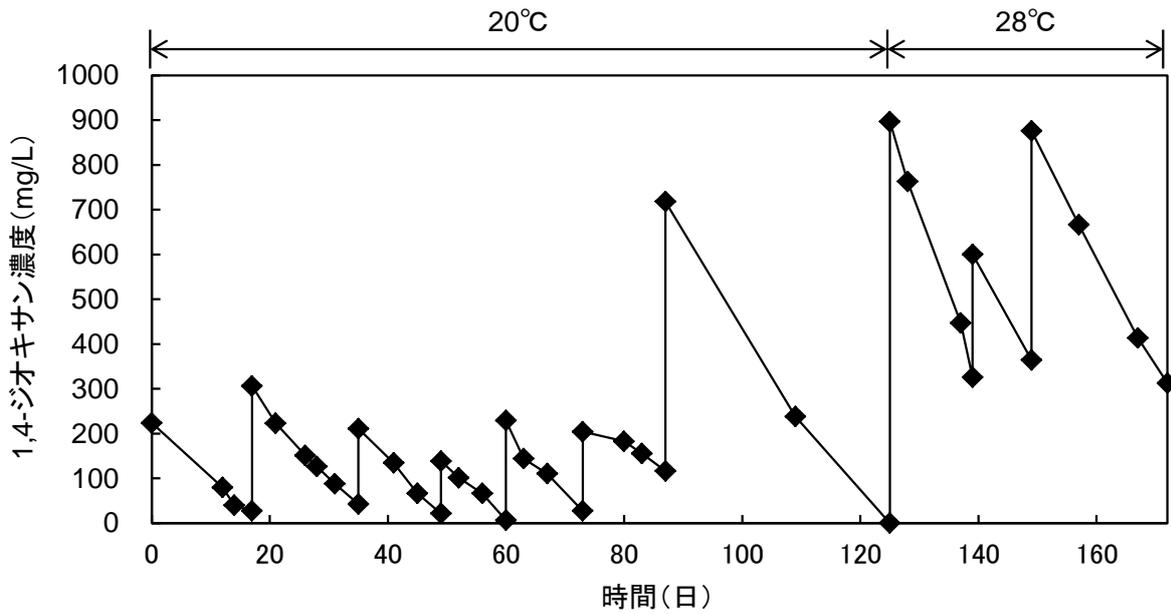
表(2)-4 化学工場敷地内の土壌・水新たに分離した10菌株の生理学的・系統分類学的特徴
および1,4-ジオキサン分解（資化）能

菌株	16S rRNA遺伝子配列に基づく近縁種	1,4-ジオキサン 分解能 (50 mg/L)	増殖可能pH域 (最適pH)
A2	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i> (98.4%)	+	4～10 (8)
A3	<i>Bosea thiooxidans</i> (97.6%)	+	5～9 (8)
A4	<i>Arthrobacter boritolerans</i> (98.8%)	+	4～10 (7)
A5	<i>Microbacterium nematophilum</i> (97.6%)	—	試験せず
A6	—	+	4～10 (8)
B1	<i>Microbacterium nematophilum</i> (96.8%)	+	4～10 (7)
B2	<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> (98.0%)	+	6～9 (7)
B3	<i>Rhodococcus artherivorans</i> (99.2%)	+	5～10 (8)
B6	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> 、 <i>Mycobacterium phocaicum</i> 、 <i>Mycobacterium ratisbonense</i> (97.9%)	+	5～10 (6)
C1	<i>Pseudomonas acephalitica</i> (98.4%)	—	試験せず

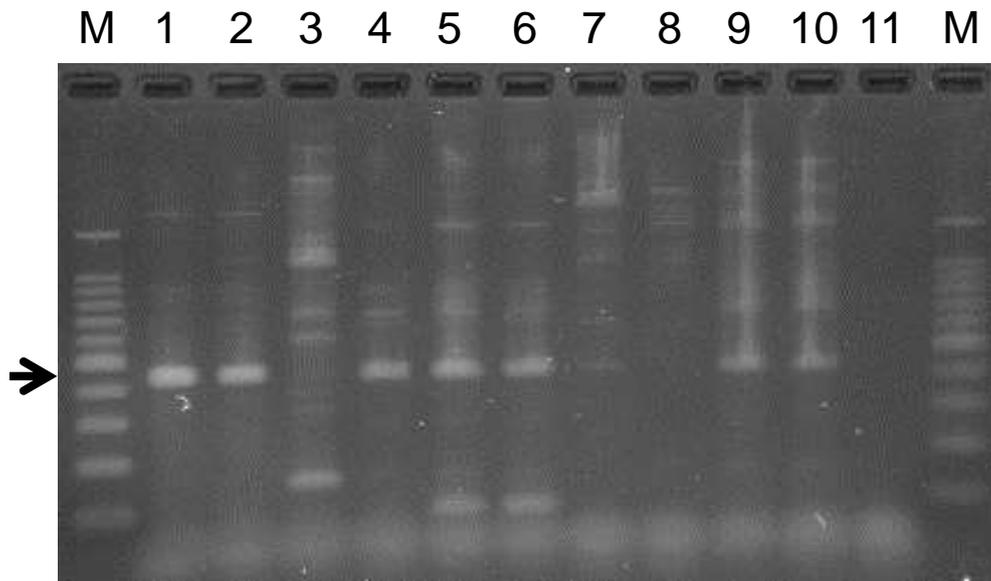
他方、1,4-ジオキサン汚染サイトより採取した地下水試料中の懸濁物質を用いて1,4-ジオキサンの分解を試みた結果、有意な分解が観察されたことから、1,4-ジオキサン分解菌の集積を実施した。その結果、約1年後には、図(2)-5に示すように、かなり高い分解能を有する集積系を構築することができた。また、約18ヶ月経過以降の集積系における1,4-ジオキサン分解挙動を図(2)-6に示しているが、培養温度を20℃に設定していた時点では分解速度は11.5-15.5 mg/L/日であったのに対し、28℃に変更して培養を継続した結果、分解速度は24 mg/L/日程度まで上昇することが観察された。そこで、1,4-ジオキサン分解菌が十分量まで集積されたと考えられたため、集積系からの1,4-ジオキサン分解菌の分離を試みた。その結果、寒天培地上に複数のコロニーが出現したため、純化を進めたが、分解能を示す単一のコロニーを取得することが困難であった。そのため、集積系に1,4-ジオキサン分解菌が本当に集積されているかを確認するため、植種源と集積系からDNAを抽出し、他の検討から1,4-ジオキサン分解に関与することが示唆されたSDIMO遺伝子のPCR検出を試みた。その結果、SDIMO遺伝子は、植種源では検出下限値付近の少数しか存在しなかったが、集積系においては常に検出されたことから、1,4-ジオキサン分解菌が集積されたことが確認された(図(2)-7)。それにも関わらず1,4-ジオキサン分解菌を分離することができなかつたのは、集積系内に存在(優占)する1,4-ジオキサン分解菌がアミノ酸やビタミン等の何らかの栄養を要求する、または他の微生物と共生条件下でのみ生育し得る菌であり、純粋培養が困難な菌であるか、あるいは近年多くの報告例がある人工培地での培養が困難な菌であるものと考えられた。



図(2)-5 汚染地下水より構築した集積系による1,4-ジオキサン分解 (約1年後)



図(2)-6 汚染地下水より構築した集積系による1,4-ジオキサン分解（約18ヶ月後以降）



図(2)-7 既存1,4-ジオキサン分解菌および集積系におけるSDIMO遺伝子のPCR検出結果
 レーンM, 100 bp DNAラダー；レーン1, *Afipia* sp. D1株；レーン2, *Mycobacterium* sp. D6株；レーン3, *Mycobacterium* sp. D11株；レーン4, *Pseudonocardia* sp. D17株；レーン5, *Rhodococcus ruber* T1株；レーン6, *Rhodococcus ruber* T5株；レーン7-8, 地下水試料；レーン9-10, 集積系；レーン11, 陰性コントロール（DNAなし）。矢印はSDIMO遺伝子の増幅産物の位置を示す

3) マイクロアレイ発現解析に基づく、既存1,4-ジオキサン分解菌の分解関与遺伝子群の特定

サブテーマ（1）で取得した既存1,4-ジオキサン分解菌 *Mycobacterium* sp. D6株および *Pseudonocardia* sp. D17株のドラフトゲノムデータからオープンリーディングフレーム（ORF）を予測し、BLAST検索（BLASTP）によってアノテーションが付いたORFを抽出し、アジレント・テクノロジー社のeArrayシステムを用いて、DNAプローブの設計を行った。その結果、D6株では8211配列、D17株では7571配列のプローブを設計することができた。そこで、同社の8x15Kフォーマット（スライド1枚で8サンプルを解析可能）を用い、実験に用いるカスタムDNAアレイを作製した。

次に、解析方法の最適化を試みた結果、表(2)-5の手順により、良好な解析が可能であることが確認されたため、本手順によりマイクロアレイ発現解析を行うことに決定した。

最適化した解析方法を用いて、マイクロアレイ発現解析①を実施した。本検討では、*Pseudonocardia* sp. D17株を用いた1,4-ジオキサン分解試験の結果、1,4-ジオキサン濃度が6日後に約40%低下し、7日後に約60%低下した。そこで、7日後の培養液の一部を1,4-ジオキサンを添加した新たな無機塩培地に植え継ぎ、その培養液を用いてマイクロアレイ発現解析を実施することとした。その結果、マイクロアレイに搭載された7511プローブの内、285プローブのS/N比が150以上となり、強発現したものと判定された。この285プローブの中で175プローブがblastp検索により機能推定されたため、それらの元になった175遺伝子を対象として1,4-ジオキサン分解メカニズムの推定を試みた。既に報告されている誘導型1,4-ジオキサン資化菌 *P. dioxanivorans* CB1190株の全ゲノム解析および1,4-ジオキサン分解関与遺伝子群推定の結果と比較したところ、175遺伝子の内の152遺伝子が *P. dioxanivorans* CB1190株にも共通して存在しており、さらに、表(2)-6に示している19遺伝子が *P. dioxanivorans* CB1190株による1,4-ジオキサン分解においても強発現することが明らかにされている¹⁹⁾。*P. dioxanivorans* CB1190株では、*thm*遺伝子群が1,4-ジオキサンから2-ヒドロキシ-1,4-ジオキサンおよび2-ヒドロキシエトキシアセトアルデヒドへの初発酸化反応を担っていることが報告されているが¹⁹⁾、表(2)-6に示した19遺伝子にも *thm*遺伝子群が複数含まれていた。

表(2)-5 最適化されたマイクロアレイ発現解析方法

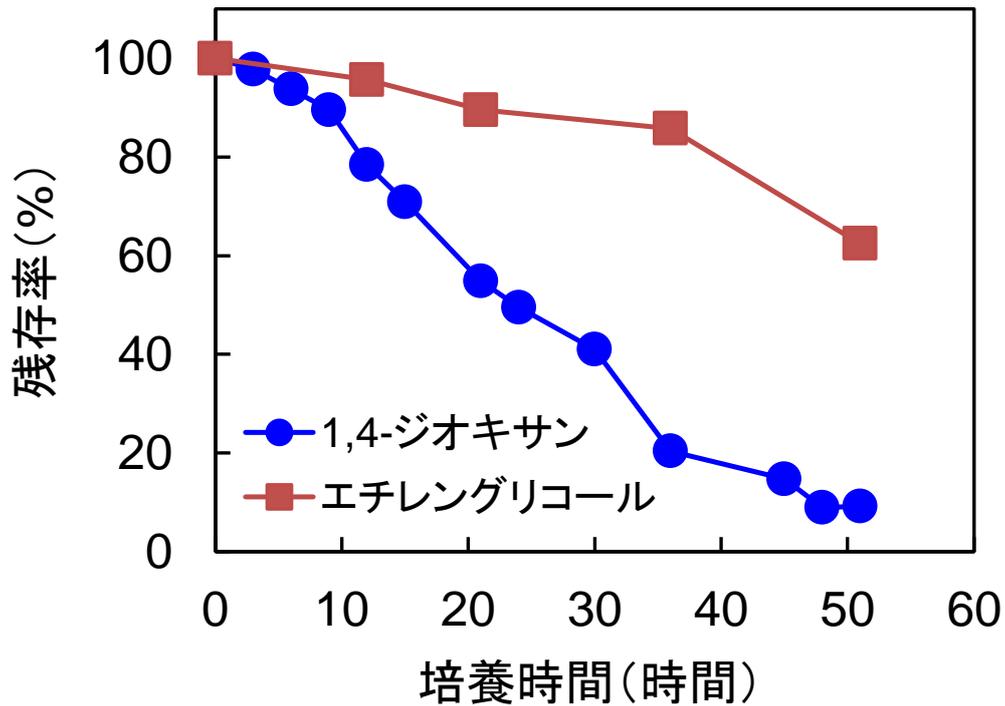
工程	使用キット・装置・条件
① 全 RNA 抽出、DNA の除去	RNAspin Miniキット（GEヘルスケア）
② rRNA の除去	RiboMinus Transcriptome Isolation Kit（Bacteria） （Life Technologies）
③ Poly A の付加	<i>E. coli</i> Poly (A) polymerase（New England BioLabs）
④ Cy3 ラベル化 cRNA の合成	Low Input Quick Amp Labeling Kit（Agilent）
⑤ ラベル化 cRNA の精製	RNeasy Mini Kit（Qiagen）
⑥ ハイブリダイゼーション	65°C、16時間、暗所
⑦ アレイスライド洗浄	Gene Expression Wash Buffer（Agilent）
⑧ スキャン・数値化	GenePix 4000B（フィルジェン）、スキャン感度：PMT580

Pseudonocardia sp. D17株のゲノム上には *thmA* 遺伝子（コードする酵素：soluble di-iron monooxygenase alpha subunit）が2つ、*thmD* 遺伝子（コードする酵素：ferredoxin-NAD(+) reductase）が7つ、*thmB* 遺伝子（コードする酵素：methane/phenol/toluene hydroxylase）が4つ、*thmC* 遺伝子（コードする酵素：monooxygenase component MmoB/DmpM）が4つ存在しており、ゲノム上での位置を見てみると、それらの中でクラスターを形成しているものが2組存在していた（*thmADBC*；プローブID：0861～0864および6260～6263）。これらの中で、プローブID：0861～0864が全て強発現していることが観察されたため、それらに該当する *thm* クラスターが1,4-ジオキサン分解時に強発現していることが示唆された。すなわち、*Pseudonocardia* sp. D17株においても、既に報告されている誘導型1,4-ジオキサン分解菌 *P. dioxanivorans* CB1190株と同様に、*thm* クラスターが1,4-ジオキサンの初発酸化に関与していることが示唆された。他方、*P. dioxanivorans* CB1190株は誘導型の1,4-ジオキサン資化菌であるのに対して、我々が保有する *Pseudonocardia* sp. D17株は構成型の1,4-ジオキサン資化菌であり、分解様式が異なっている。そこで、両菌株における遺伝子発現の相違点について調査を行った。その結果、*P. dioxanivorans* CB1190株では、*thm* 遺伝子群の近傍に存在し、GntRファミリーの転写調節因子をコードすると推定される遺伝子が *thm* 遺伝子群と同程度発現しているのに対して、*Pseudonocardia* sp. D17株においては同遺伝子のS/N比は僅か（2.875）であり、*thm* 遺伝子群に比べて発現量が非常に小さいことが観察された。また、*Pseudonocardia* sp. D17株のゲノム解析結果から、この遺伝子の上流に別の制御因子をコードすることが推定される遺伝子（*carR*）も存在していた。これらのことから、詳細については更なる検討が必要であるものの、制御因子における差異が *P. dioxanivorans* CB1190株と *Pseudonocardia* sp. D17株での分解様式の差異につながっている可能性が考えられた。

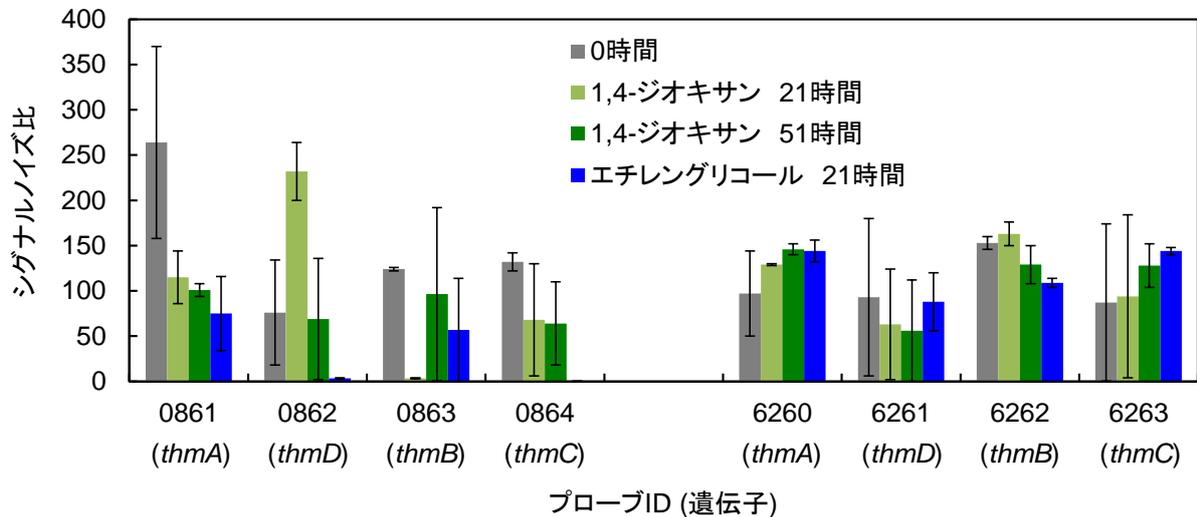
1,4-ジオキサン分解過程における *Pseudonocardia* sp. D17株の遺伝子発現状況について更なる知見を得るため、マイクロアレイ発現解析②を実施した。その結果、グルコースで前培養した *Pseudonocardia* sp. D17株は、1,4-ジオキサンおよびエチレングリコールに対して、図(2)-8の分解挙動を示した。そこで、0時間（1,4-ジオキサン曝露前）、21時間後（1,4-ジオキサンを約50%、エチレングリコールを約10%分解した時点）、51時間後（1,4-ジオキサンを90%分解した時点）の培養液からRNAを抽出し、マイクロアレイ発現解析を行った。マイクロアレイ発現解析①において1,4-ジオキサン分解に関与することが明らかになった *thm* クラスターに着目して、発現量の時間変化および基質の違いによる発現量の差異を調べることにした。なお、マイクロアレイ発現解析①ではプローブID：0861～0864のみが強発現することが観察されたが、ここでは、プローブID：0861～0864と6260～6263の両方について調査することにした。マイクロアレイ発現解析の結果を図(2)-9に示す。わずかに例外は含まれているものの、全ての調査遺伝子において、分解基質の種類（1,4-ジオキサン／エチレングリコール）や1,4-ジオキサンへの曝露の有無、1,4-ジオキサン分解状況に関係なく、発現量は類似していた。この結果は *Pseudonocardia* sp. D17株による1,4-ジオキサン分解が構成的に生じていることを示すものと考えられた。すなわち、本発現解析の結果から、*Pseudonocardia* sp. D17株が構成型1,4-ジオキサン分解菌であることが遺伝子発現レベルで確認することができた。

表(2)-6 マイクロアレイ発現解析①における *Pseudonocardia* sp. D17株による
1,4-ジオキサン分解時に強発現したプローブ (遺伝子)

プローブID	シグナルノイズ比	推定タンパク質	遺伝子名
0368	2214	Transglycosylase associated protein	
6516	1672	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	
2755	682	Transcription factor WhiB	
0820	504	NLP/P60 protein	
5968	498	IstB domain-containing protein ATP-binding protein	
7537	468	Nitrilotriacetate monooxygenase FMN-dependent oxidoreductase	
0864	372	Monooxygenase component MmoB/DmpM	<i>thmC</i>
0863	286	Methane/phenol/toluene hydroxylase	<i>thmB</i>
5884	276	Ferredoxin--NAD(+) reductase	<i>thmD</i>
0859	218	Ethyl tert-butyl ether degradation EthD	
4108	212	Amidase	
0860	194	Betaine-aldehyde dehydrogenase	
0862	186	Ferredoxin--NAD(+) reductase	<i>thmD</i>
0861	184	Soluble di-iron monooxygenase alpha subunit	<i>thmA</i>
7547	178	Regulatory protein ArsR	
5815	168	D-lactate dehydrogenase	
5650	156	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	
2857	152	Hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase	
6262	152	Methane/phenol/toluene hydroxylase	<i>thmB</i>



図(2)-8 グルコースで前培養した*Pseudonocardia* sp. D17株による1,4-ジオキサンおよびエチレングリコールの分解挙動



図(2)-9 マイクロアレイ発現解析②における、*Pseudonocardia* sp. D17株による1,4-ジオキサンおよびエチレングリコールの分解前および分解中の*thm*遺伝子群の発現状況

4) 1,4-ジオキサン分解菌の定量的モニタリングツールの開発

1,4-ジオキサン分解菌のモニタリングツール（real-time PCR法）を開発するため、まず初めに文献調査により関連情報の収集を行った。特定の系統分類に属する細菌群のみを特異的に検出するPCRシステムとして、*Pseudonocardia*属の16S rRNA遺伝子を特異的に検出するものが存在したが²⁰⁾、検討1)の結果から、1,4-ジオキサン分解能は*Pseudonocardia*属細菌に共通する性質ではないことが明らかになったことから、同PCRシステムは1,4-ジオキサン分解菌のモニタリングツールには利用できないものと判断された。そこで、1,4-ジオキサンの分解に関与する遺伝子群を検出するPCRシステムについて調査を行った。検討3)のマイクロアレイ発現解析の結果から、1,4-ジオキサンの分解にはSDIMO遺伝子が関与していることが明らかになったため、SDIMO遺伝子に対するPCRシステムを調査したところ、SDIMO遺伝子に含まれる可溶性メタン／プロパン／トルエン等のモノオキシゲナーゼ遺伝子を標的とするもの²¹⁾と、より幅広いSDIMO遺伝子まで検出可能なもの¹⁴⁾が存在することが明らかになった。環境中の1,4-ジオキサン生分解ポテンシャルや1,4-ジオキサン分解菌の多様性のモニタリングを行うためには、関連する遺伝子を網羅的に検出することが望ましい。そこで、Colemanらが開発した幅広いSDIMO遺伝子を網羅的に検出できるPCRシステム（SDIMO遺伝子網羅的検出システム）¹⁴⁾が、環境中の1,4-ジオキサン分解菌および1,4-ジオキサン生分解ポテンシャルのモニタリングツールとして有用であると考えられた。

他方、サブテーマ（3）の浄化実証試験において使用する*Pseudonocardia* sp. D17株の挙動を特異的かつ定量的に解析するためのモニタリングツールの開発を試みた。検討3)のマイクロアレイ発現解析の結果から、*Pseudonocardia* sp. D17株による1,4-ジオキサンの初発酸化反応には*thm*遺伝子群（*thmADBC*）が関与していることが示唆されており、また、1,4-ジオキサン分解メカニズムが詳細に調査されている*P. dioxanivorans* CB1190株において、グリオキシル酸分解経路が1,4-ジオキサン分解の下流反応を担っていることが報告されている¹⁹⁾。そこで、*thm*遺伝子群およびグリオキシル酸分解関与遺伝子群を対象として定量モニタリングツール（real-time PCRシステム）を開発することとした。

Pseudonocardia sp. D17株のドラフトゲノムデータから*thm*遺伝子群およびグリオキシル酸分解関与遺伝子群の塩基配列を特定し、研究開発方法に記した手順に従って各候補遺伝子配列を検出対象としたreal-time PCRプライマーの設計して、特異性の検証ならびに検出感度に関する実験的検討を行った結果、表(2)-7に示している monooxygenase component MmoB/DmpM をコードすると推定される *thmC* 遺伝子を検出対象としたPCRプライマーが*Pseudonocardia* sp. D17株を最も特異的かつ高感度に検出可能であることが明らかになった。ただし、Primer-Blast検索の結果から、ここで開発したPCRプライマーにおいても、*Pseudonocardia* sp. D17株に加えて、THF分解菌である*Pseudonocardia* sp. ENV478株、*Rhodococcus* sp. YYL株、*Pseudonocardia* sp. K1株、1,4-ジオキサン分解菌である*P. dioxanivorans* CB1190株の*thm*遺伝子を同時に検出する可能性が明らかになった。このため、環境試料への適用においては、バックグラウンドでのPCR増幅が起こらないことを事前に確認しておく必要があると考えられた。

表(2)-7 *Pseudonocardia* sp. D17株の定量モニタリングのためのreal-time PCRシステム

標的遺伝子	<i>thmC</i> 遺伝子 (NODE_28_length_17400_cov_346.055328_154 [9758 - 9375] (reverse sense))
フォワードプライマー配列	5'-TGATTATGTGGGGCTGGTTATG-3'
リバースプライマー配列	5'-CGAGGAAAGTTGTGTTTCGTGATG-3'
増幅断片長	107 bp
Real-time PCR反応条件	95°C 1分×1サイクル {95°C 30秒、62°C 30秒、72°C 30秒} ×32サイクル 融解曲線作成 60-95°C

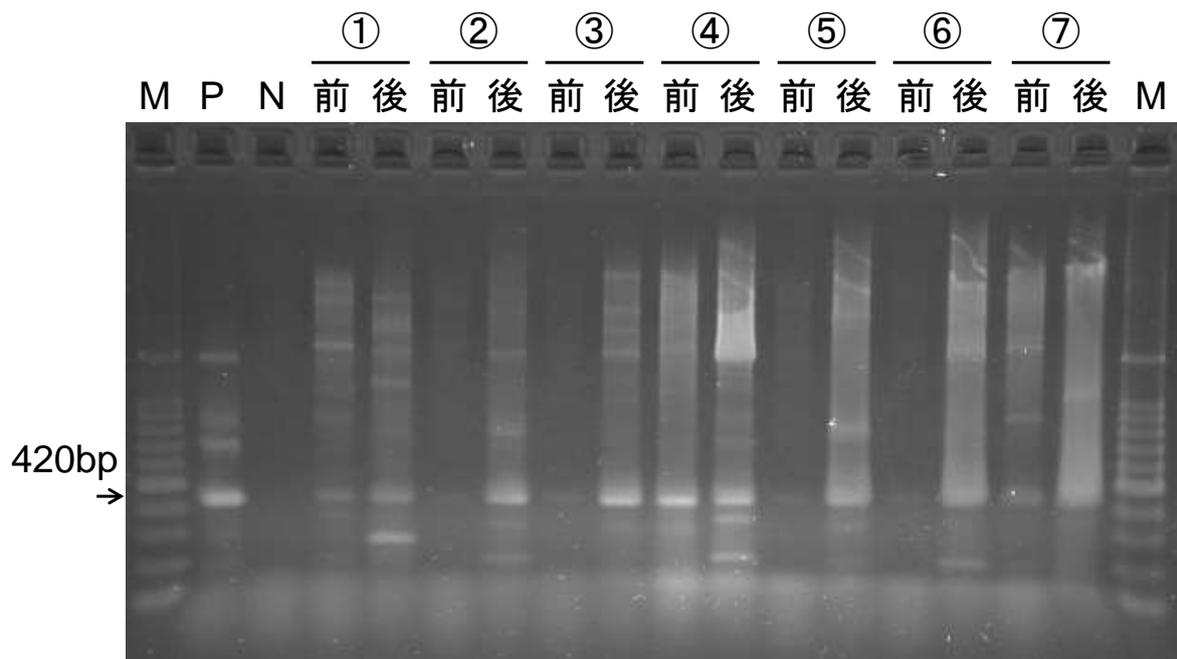
また、開発したPCRプライマーを用いたreal-time PCRの条件について実験的検討を行った結果、表(2)-7に示す条件において、最も特異的かつ高感度に定量化能であることが明らかになった。そこで、real-time PCRによる定量解析に使用するスタンダード (*Pseudonocardia* sp. D17株ゲノムから得られたPCR増幅産物をプラスミドpTAC-1に挿入したもの) を調製し、増幅効率等について検討した。その結果、増幅効率は94.6%~104.7%、検量線のダイナミックレンジは6オーダー、相関係数 r^2 は0.994~0.999であり (n=4)、定量モニタリングツールとして十分な性能を有すると判断された。そこで、サブテーマ (3) で実施する浄化実証試験における*Pseudonocardia* sp. D17株の挙動解析には、ここで開発したPCRプライマーとスタンダードを用いたreal-time PCRを使用することとした。

5) 分解菌挙動と浄化性能を予測するための数値モデルの構築と、開発したモニタリングツールの有用性検証

1,4-ジオキサン分解菌を網羅的に検出するためのモニタリングツールとして選出したSDIMO遺伝子網羅的検出システム¹⁴⁾の有用性について検証した。他のサブテーマにおいて、ジエチレングリコールが1,4-ジオキサン分解菌の選択的増殖に有効である可能性が示された。そこで、1,4-ジオキサン汚染サイトより土壌試料 (調査サイトでは1,4-ジオキサン汚染の自然浄化はほぼ生じていないことから、1,4-ジオキサン分解に関与するSDIMO遺伝子を保有する微生物はわずかしかな存在しないと想定される) を採取し、ジエチレングリコールを添加した無機塩培地中で土壌を培養して、その培養による1,4-ジオキサン分解菌の増殖を上記のSDIMO遺伝子網羅的検出システムによって評価することができるかを調査した。7種類の土壌試料における培養開始時および6日間培養後のSDIMO遺伝子の検出結果を図(2)-10に示す。培養開始時でもSDIMO遺伝子由来する420 bpのPCR増幅産物が検出されたが、一部の試料を除いてバンド輝度が非常に低かった。他方、ジエチレングリコールを添加して6日間培養した結果、全ての土壌試料において培養開始時よりもバンド輝度が高くなることが観察された。以上の結果から、予想通り、調査した土壌試料中にはSDIMO遺伝子保有菌はごく僅かしかな存在していないが、ジエチレングリコールを用いた培養により、ごく僅かなSDIMO遺伝子保有菌が増殖することが確認され、本研究で用いたSDIMO遺伝子網羅的検出システムは、1,4-ジオキサン分解菌のモニタリングツールとして有用であることが示された。そこで、汚染土壌中に存在するSDIMO遺伝子の多様性を把握するため、ジエチレングリコールで培養していない元の土壌試料中のSDIMO遺伝子を次世代シーケンス解析に供した結果、各試料から約54000

～78000程度の配列を取得することができた。

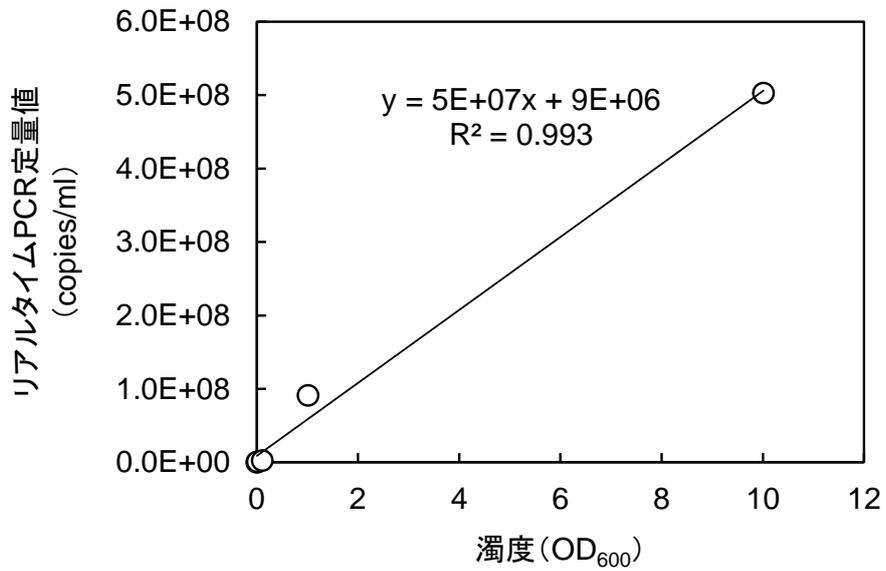
他方、上記の検討4)において開発した*Pseudonocardia* sp. D17株の定量モニタリング手法（real-time PCR法）の有用性を明らかにするため、同手法による定量値と、濁度（OD₆₀₀測定値）およびアクリジンオレンジを用いた直接計数法による定量値との関係について調査した。その結果、real-time PCR法による定量値は、濁度の測定結果および直接計数法による定量値のいずれに対しても高い相関を有することが明らかになり（図(2)-11）、定量モニタリング手法として有用であることが示唆された。real-time PCR法による定量値は直接計数法の定量値よりも1オーダー低くなったが、これはDNA抽出効率等による影響であると考えられた。しかし、現在使用しているDNAテンプレート調製法は事前検討において最もDNA抽出効率の高い方法であることから、real-time PCR法の定量値の向上は容易ではないと判断された。このため、real-time PCR法による定量値と図(2)-11(B)に示されている相関関係を基にして菌体濃度に換算する方法が現実的であると考えられた。これを踏まえてサブテーマ（3）において実施した浄化実証試験における浄化の成否と*Pseudonocardia* sp. D17株の菌体濃度との関係について検討した結果、バイオリアクターを用いた処理の場合、10⁵ cells/mlオーダーでも浄化は可能であるが、より安定した浄化を達成するためには10⁶ cells/ml以上の必要であるものと推察された。



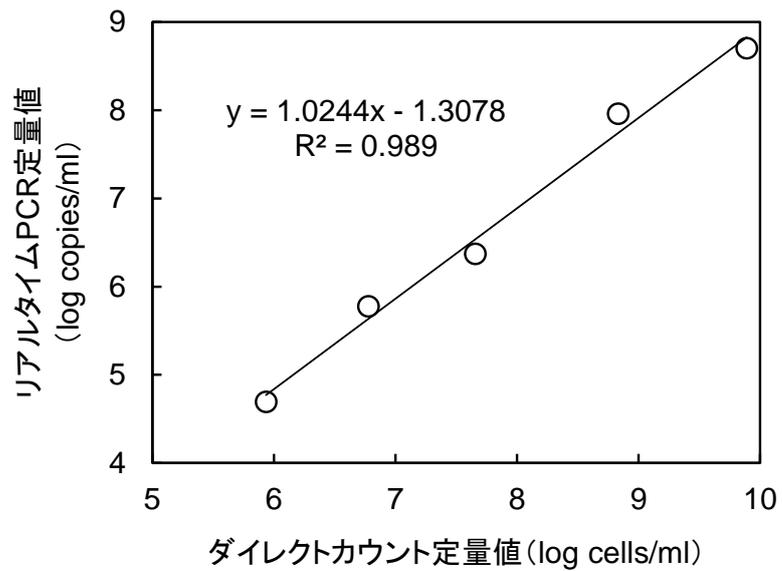
図(2)-10 ジエチレングリコールを用いた培養前後における
7種類の土壌試料中のSDIMO遺伝子の検出結果

レーンM, 100 bp DNA ladder ; レーンP, 陽性コントロール (*Pseudonocardia* sp. D17株) ;
N, 陰性コントロール (DNAなし) ; 前, 培養前 ; 後, 培養6日後

(A)



(B)



図(2)-11 異なる手法を用いた *Pseudonocardia* sp. D17株の定量結果の相関関係
A, 濁度と real-time PCR 定量値の関係 ; B, 直接計数と real-time PCR 定量値の関係

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1,4-ジオキサン生分解に関する既往研究では、環境試料より1,4-ジオキサン分解菌（資化菌および共代謝菌）が分離され、その分離特性等の特徴づけが行われてきた。本研究でも、複数の環境試料から新規1,4-ジオキサン分解菌の探索を試み、分解菌ライブラリを拡充するとともに、系統分類学的に多様な細菌が1,4-ジオキサンを分解できる可能性を示した。また、これまでに分離された1,4-ジオキサン分解菌が多く含まれている系統分類に着目して、*Pseudonocardia*属および*Rhodococcus*属に分類される細菌の1,4-ジオキサン分解（資化、共代謝）能を網羅的に調査し、両属の1,4-ジオキサン分解（資化、共代謝）能について新規の知見を得ることができた。

他方、1,4-ジオキサンの生分解機構の分子レベルでの解明は、世界でもごく僅かな分解菌でしか試みられてこなかったが、本研究により、構成型1,4-ジオキサン資化菌*Pseudonocardia* sp. D17株による1,4-ジオキサンの初発酸化に*thm*クラスターが関与することを強く示唆する結果が得られ、同菌株による1,4-ジオキサン分解機構の解明に向けて重要な知見を得ることができた。また、この知見を利用して、*Pseudonocardia* sp. D17株の*thmC*遺伝子を標的とするreal-time PCRシステムをデザインし、浄化実証試験における同菌株の挙動を特異的かつ高感度に定量モニタリングするツールを開発することができた。これまでの知見から、本定量モニタリングツールに使用した*thmC*遺伝子は1,4-ジオキサン分解菌が一般的に保持しているものと考えられるため、使用するPCRプライマー配列の微調整や反応条件の変更等により、*Pseudonocardia* sp. D17株以外の1,4-ジオキサン分解菌の検出にも応用することも可能である。

さらに、*thm*遺伝子を含むSDIMO遺伝子を標的としたPCRシステムにより、環境中の1,4-ジオキサン分解ポテンシャルをある程度評価可能であることを明らかにし、汚染現場に応じ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のある程度達成することができた。

以上のことから、本研究では、今後のバイオレメディエーション技術の開発ならびに実施において大いに貢献する1,4-ジオキサン分解菌モニタリング技術の基盤が構築できたものと言える。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究により、系統分類学的にも分解様式的にも多様な1,4-ジオキサン分解菌のライブラリを構築することができた。また、汚染現場の1,4-ジオキサン生分解性ポテンシャルの評価、ならびに浄化過程における分解菌の挙動把握に必要となるモニタリングツールを整備することができた。これらの成果と、他のサブテーマで得られた成果を併せて、多様な汚染現場に対応可能な、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を整備することができた。本汚染対策技術パッケージは、国内で既に発生している、あるいは今後発見される1,4-ジオキサン汚染環境の迅速かつ適切な浄化を強力に支援するものであり、1,4-ジオキサン汚染問題にかかる環境政策に大いに貢献し得ると考えられる。

なお、本研究の成果を1,4-ジオキサン汚染問題の解決に速やかにつなげていくため、本研究により得られた成果の学術雑誌への論文の公表、国内および海外の学会における発表、ならびに報道等を活用した一般向けの発表を積極的に進め、広く情報発信に努めてきた。今後も、得られた研究成果の早期公表によって、成果の広報と普及に努めていく予定である。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE and M. IKE: J. Water Environ. Technol., 11, 1, 11-19 (2013)

“Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation”

- 2) K. SEI, K. MIYAGAKI, T. KAKINOKI, K. FUKUGASAKO, D. INOUE and M. IKE: Biodegradation, 24, 5, 665-674 (2013)

“Isolation and characterization of bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source”

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) (株) オフィス東和編：排水汚水処理技術集成 Vol.2、エヌ・ティー・エス社、95-101 (2013)
「第2編 処理技術研究の最前線 第1章 生物処理技術 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:環境浄化技術、13(5), 15-19 (2014)
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化技術」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE and M. IKE: Water and Environment Technology Conference 2012 (WET2012), Tokyo, Japan (2012)
“Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation”
- 2) 福ヶ迫久仁衛、池道彦、清和成、井坂和一：日本水処理生物学会第49回大会(2012)
「包括固定化分解菌を用いた低濃度1,4-ジオキサンの処理」

- 3) 山本哲史、斎藤祐二、池道彦、清和成、井上大介：第16回日本水環境学会シンポジウム（2013）
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化に関する研究」
- 4) K. SAWADA, D. INOUE, T. TSUNODA, M. MORITA, M. IKE, and K. SEI : Water and Environment Technology Conference 2014 (WET2014), Tokyo, Japan (2014)
“Evaluation of the 1,4-dioxane biodegradation potential of *Pseudonocardia* spp. and *Rhodococcus* spp.”
- 5) K. SAWADA, D. INOUE, T. TSUNODA, Y. AOKI, M. KURODA, M. IKE, and K. SEI : 9th IWA International Symposium on Waste Management Problems in Agro-Industries (AGRO'2014), Kochi, Japan (2014)
“Identification of 1,4-dioxane degradation genes of *Pseudonocardia* sp. D17 by microarray expression analysis”
- 6) 井上大介、角田翼、関雅仁、澤田和子、森田雅恵、池道彦、清和成：第51回環境工学研究フォーラム（2014）
「*Pseudonocardia*属細菌および*Rhodococcus*属細菌の1,4-ジオキサン分解ポテンシャルの評価」
- 8) 山本哲史、斎藤祐二、井上大介、清和成、黒田真史、池道彦：第51回環境工学研究フォーラム（2014）
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物処理技術」

(3) 出願特許

- 1) 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

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第60回青森・岩手県境不法投棄現場の原状回復対策協議会（主催：岩手県、2014年3月15日、二戸地区合同庁舎大会議室、一般傍聴者15名）にて実証試験の中間報告
- 2) 2014地球環境保護 土壌・地下水浄化技術展（東京ビッグサイト西ホール、平成26年10月15-17日、参加者18,877人）にて研究内容の展示・紹介

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 岩手日報（2013年5月26日）「県境産廃不法投棄 土壌浄化の進行を確認」
- 2) デーリー東北（2013年5月26日）「県境産廃 N地区順調に汚染浄化」
- 3) 大成建設ホームページ プレスリリース（2013年5月26日）「コストを大幅減、1,4-ジオキサンの生物浄化技術実証試験へ」
- 4) 日経産業新聞（2013年7月11日）「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」
- 5) 日刊建設産業新聞（2013年7月12日）「分解菌で1,4-ジオキサン浄化 CO₂とコスト大幅減」
- 6) 建設通信新聞（2013年7月18日）「ジオキサン汚染の生物浄化技術 効果確認 ランニングコスト AOPの1/10」
- 7) フジサンケイビジネスアイ（2013年7月22日）「生物浄化技術の実証試験」

- 8) 月刊建築技術（2013年10月号、株式会社建築技術）「1,4-ジオキサンの生物浄化技術実証試験へ」
- 9) 建設通信（2014年10月16日、朝刊、3頁）「大成建設バイオ浄化を加速 迅速、安価に無害化」
- 10) 環境新聞（2014年10月21日、5頁）「1,4-ジオキサン 排水処理にも光明」

(6) その他

- 1) WET Excellent Paper Award (K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE and M. IKE: Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation, 2012年6月30日, Japan Society on Water Environment)
- 2) 日本水処理生物学会第49回大会ベストプレゼンテーション賞 (福ヶ迫久仁衛、池道彦、清和成、井坂和一 : 包括固定化分解菌を用いた低濃度1,4-ジオキサンの処理, 2012年11月25日, 日本水処理生物学会)
- 3) 日本水環境学会 平成25年 論文奨励賞 (廣瀬賞) (清和成 : Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation, 2014年6月10日, 日本水環境学会)

8. 引用文献

- 1) C.D. ADAMS, P.A. SCANLAN, N.D. SECRIST: Environ. Sci. Technol. 28, 11, 1812-1818 (1994) "Oxidation and biodegradability enhancement of 1,4-dioxane using hydrogen peroxide and ozone"
- 2) K. KOSAKA, H. YAMADA, S. MATSUI, K. SHISHIDA: Water Sci. Technol. 42, 7-8, 353-361 (2000) "The effects of the co-existing compounds on the decomposition of micropollutants using the ozone/hydrogen peroxide process"
- 3) K. SEI, T. KAKINOKI, D. INOUE, S. SODA, M. FUJITA, M. IKE: Biodegradation, 21, 4, 585-591 (2010) "Evaluation of the biodegradation potential of 1,4-dioxane in river, soil and activated sludge samples"
- 4) K. SEI, K. MIYAGAKI, T. KAKINOKI, K. FUKUGASAKO, D. INOUE, M. IKE: Biodegradation, 24, 5, 665-674 (2013) "Isolation and characterization of bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source"
- 5) Y.-M. KIM, J.-R. JEON, K. MURUGESAN, E.-J. KIM, Y.-S. CHANG: Biodegradation, 20, 4, 511-519 (2009) "Biodegradation of 1,4-dioxane and transformation of related cyclic compounds by a newly isolated *Mycobacterium* sp. PH-06"
- 6) P. KÄMPFER, R.M. KROPPESTEDT: Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 3, 749-751 (2004) "*Pseudonocardia benzenivorans* sp. nov."
- 7) R.E. PARALES, J.E. ADAMUS, N. WHITE, H.D. MAY: Appl. Environ. Microbiol. 60, 12, 4527-4530 (1994) "Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture"
- 8) D. BERNHARDT, H. DIEKMANN: Appl. Microbiol. Biotechnol., 36, 1, 120-123 (1991) "Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain"
- 9) B. SUN, K. KO, J.A. RAMSAY: Biodegradation, 22, 3, 651-659 (2011) "Biodegradation of 1,4-dioxane by a *Flavobacterium*"

- 10) S. VAINBERG, K. McCLAY, H. MASUDA, D. ROOT, C. CONDEE, G.J. ZYLSTRA, R.J. STEFFAN: Appl. Environ. Microbiol., 72, 8, 5218-5224 (2006) "Biodegradation of ether pollutants by *Pseudonocardia* sp. strain ENV478"
- 11) S. MAHENDRA, L. ALVAREZ-COHEN: Environ. Sci. Technol., 40, 17, 5435-5442 (2006) "Kinetics of 1,4-dioxane biodegradation by monooxygenase-expressing bacteria"
- 12) K. SEI, M. OYAMA, T. KAKINOKI, D. INOUE, M. IKE: J. Water Environ. Technol., 11, 1, 11-19 (2013) "Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation"
- 13) M. LI, S. FIORENZA, J.R. CHATHAM, S. MAHENDRA, P.J.J. ALVAREZ: Water Res., 44, 9, 2894-2900 (2010) "1,4-dioxane biodegradation at low temperatures in Arctic groundwater samples"
- 14) N.V. COLEMAN, N.B. BUI, A.J. HOLMES: Environ. Microbiol. 8, 7, 1228-1239 (2006) "Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethene enrichments"
- 15) T. KORESSAAR, M. REMM: Bioinformatics, 23, 10, 1289-1291 (2007) "Enhancements and modifications of primer design program Primer3"
- 16) A. UNTERGASSER, I. CUTCUTACHE, T. KORESSAAR, J. YE, B.C. FAIRCLOTH, M. REMM, S.G. ROZEN: Nucleic Acids Res. 40, 15, e115 (2012) "Primer3 - new capabilities and interfaces"
- 17) J. YE, G. COULOURIS, I. ZARETSKAYA, I. CUTCUTACHE, S. ROZEN, T.L. MADDEN: BMC Bioinformatics, 13, 134 (2012) "Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction"
- 18) M. GOODFELLOW, A.L. JONES, L.A. MALDONADO, J. SALANITRO: Syst. Appl. Microbiol. 27, 1, 61-65 (2004) "*Rhodococcus aetherivorans* sp. nov., a new species that contains methyl *t*-butyl ether-degrading actinomycetes"
- 19) A. GROSTERN, C.M. SALES, W.Q. ZHUANG, O. ERBILGIN, L. ALVAREZ-COHEN: Appl. Environ. Microbiol., 78, 9, 3298-3308 (2012) "Glyoxylate metabolism is a key feature of the metabolic degradation of 1,4-dioxane by *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190"
- 20) R. MORÓN, I. GONZÁLEZ, O. GENILLOUD: Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 1, 149-162 (1999) "New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genera *Pseudonocardia* and *Saccharopolyspora*"
- 21) Y.-H. KIM, K.-H. ENGESSER, S.-J. KIM: Environ. Microbiol., 9, 6, 1497-1510 (2007) "Physiological, numerical and molecular characterization of alkyl ether-utilizing rhodococci"

(3) 1,4-ジオキサン汚染サイトにおける1,4-ジオキサン浄化実証試験

大成建設株式会社技術センター

斎藤 佑二・山本 哲史

平成24～26年度累計予算額：32,168千円（うち、平成26年度予算額：13,610千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

1,4-ジオキサンによる地下水汚染は、我が国だけでなく諸外国においても報告されている。これらの汚染には、1,4-ジオキサンだけでなく、重金属や揮発性有機化合物等による複合汚染を引き起こしている事例が多く見受けられる。本研究で用いる*Pseudonocardia* sp. D17は、これらの複合汚染の環境下においても1,4-ジオキサンを分解できる能力を有していることが明らかとなった。そこで、*Pseudonocardia* sp. D17を用いた生物浄化技術実証試験を岩手・青森県境不法投棄現場にて実施した結果、実汚染地下水を環境基準値(0.05mg/L)未満まで浄化できることが明らかとなった。

一方で、1,4-ジオキサン分解菌を用いた地下水浄化では、安定的な処理を実施するために分解菌の菌体量を保持することが重要である。特に、立ち上げ初期においては、他の微生物も存在する環境下において1,4-ジオキサン分解菌を優先化させる必要がある。そこで、*Pseudonocardia* sp. D17の培養に適した炭素源としてジエチレングリコールを選定し、開放系での培養手法を確立した。この培養手法を用いることにより、地下水揚水処理に必要な1,4-ジオキサン分解菌の菌体を容易に作成できるだけでなく、他の微生物の共存下でもジエチレングリコールを添加することで、特異的に*Pseudonocardia* sp. D17を優先化することが可能である。

以上の検討より、*Pseudonocardia* sp. D17を用いた地下水揚水処理の性能を確認でき、1,4-ジオキサン汚染地下水の新たな浄化手法の可能性を示した。また、ジエチレングリコールを用いた培養手法は、*Pseudonocardia* sp. D17だけでなく、自然環境中に存在している1,4-ジオキサン分解菌を活性化、増殖できる可能性がある。そのため、バイオオーグメンテーションやバイオスティミュレーションといった原位置浄化への適用が期待できる。

[キーワード]

複合地下水汚染、不法投棄現場、促進酸化法、生物浄化、優先化

1. はじめに

大阪大学が保有する*Pseudonocardia* sp. D17は、1,4-ジオキサン分解酵素を常時生産している構成型資化菌である。構成型資化菌は、極低濃度の1,4-ジオキサンも分解可能であると考えられており、環境基準値未満までの浄化が期待できる。そこで、本研究では、*Pseudonocardia* sp. D17を用いた生物浄化技術に関する検討を実施した。

2. 研究開発目的

本研究では、*Pseudonocardia* sp. D17を用いた地下水揚水処理技術の確立を目的として研究を実施した。具体的には、国内外にける1,4-ジオキサン汚染サイトの文献調査を実施することで、汚染

サイトの特徴を整理した。さらに、それらの汚染サイトの特徴を踏まえ、浄化技術の確立に向けた課題を抽出し、実験的な検討を行った。さらに、実汚染サイトにて生物浄化実証装置を設置し、その性能を評価した。

3. 研究開発方法

(1) 1,4-ジオキサン汚染サイトの調査

1) 国内外における1,4-ジオキサン汚染

文献及び公開されている資料等を基に国内外の1,4-ジオキサン汚染について整理した。

2) 実地下水を用いた生物浄化の可能性検討

国内の某汚染サイトにおける1,4-ジオキサン汚染地下水を用いて、生物浄化の可能性の評価を実験的に行った。試験では、汚染サイトにて採水した地下水に栄養塩類を加えてpH7.3に調整した後、*Pseudocardia* sp. D17の植菌液をOD₆₀₀が0.03になるように添加して、28℃にて回転振盪(120 rpm)を行った。サンプリングは適宜行い、溶液中の1,4-ジオキサン濃度をヘッドスペースGC/MSにて測定した。尚、栄養塩類の組成は、無機塩培地Fに準じたが、濃度はその値の1/4とした。

3) 生物浄化実証試験に向けた基礎的情報の取得

1,4-ジオキサンの生物分解において影響を及ぼす可能性のある因子について整理し、フラスコ試験にて実験的に確認した。

a) 共存する汚染物質が1,4-ジオキサン分解に及ぼす影響

重金属などの汚染物質が1,4-ジオキサンの分解に及ぼす影響を調査することを目的として試験を行った。汚染物質には、ヒ素、ホウ素、フッ素、及び鉛を選定し、供試試薬としてヒ酸カリウム、ホウ酸、フッ化ナトリウム及び硝酸鉛を用いた。試験では、1,4-ジオキサン濃度を50 mg/Lとした100 mL無機塩培地Fに所定濃度の汚染物質を添加した後、*Pseudocardia* sp. D17の植菌液をOD₆₀₀が0.03になるように加え、28℃にて回転振盪(120 rpm)を行った。適宜サンプリングを行い、溶液中の1,4-ジオキサン濃度を測定した。

b) 模擬汚染地下水を用いた1,4-ジオキサン分解試験

実環境から採水した汚染地下水に栄養塩類を加えてpH7.3に調整した後、1,4-ジオキサンを添加して模擬汚染地下水(1,4-ジオキサン濃度：10 mg/L)を作成した。ここでの栄養塩類の組成は無機塩培地Fに準じたが、濃度はその値の1/4とした。作成した模擬汚染地下水100 mLに*Pseudocardia* sp. D17の植菌液をOD₆₀₀が0.03になるように加えて、28℃にて回転振盪(120 rpm)を行った。適宜サンプリングを行い、溶液中の1,4-ジオキサン濃度を測定した。

(2) 生物浄化実証試験に関する検討

1) 実汚染地下水への*Pseudocardia* sp. D17の適用評価

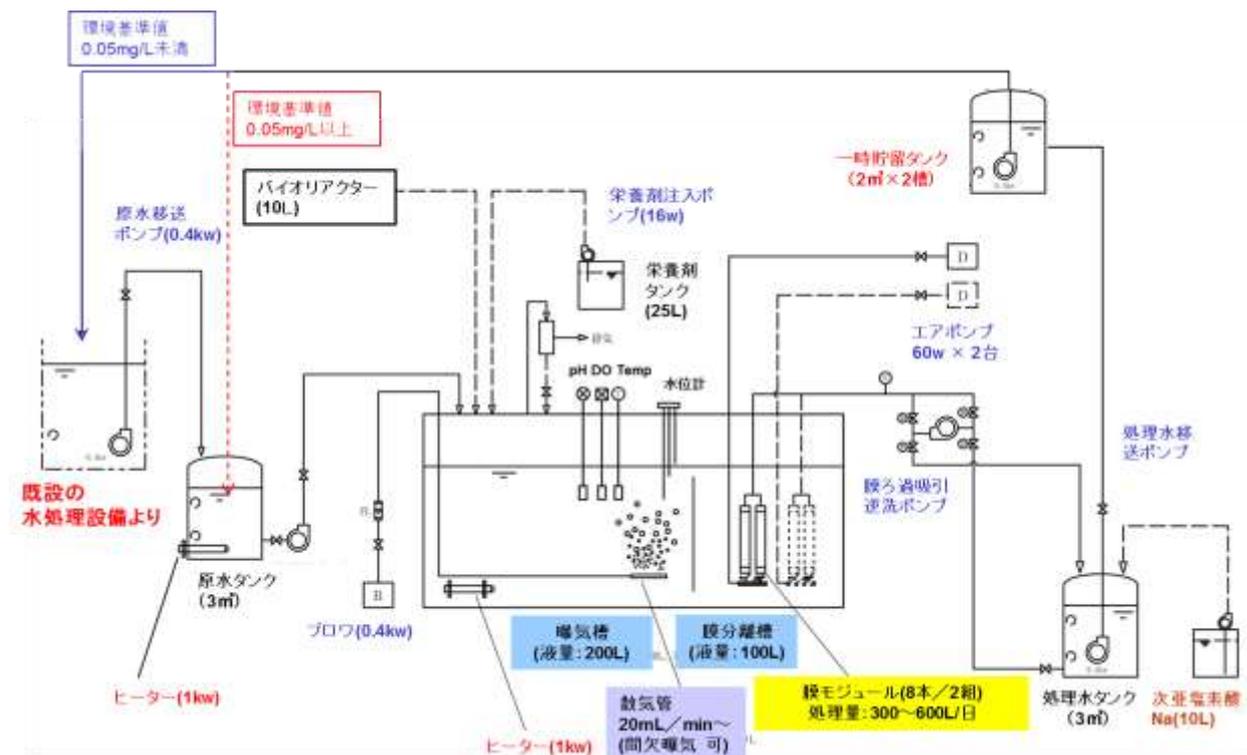
岩手・青森県境不法投棄現場内の実汚染地下水を用いて、*Pseudocardia* sp. D17による分解試験を行った。試験では、水処理施設の原水槽より採取した地下水に栄養塩類を加えてpH7.3に調整した後、*Pseudocardia* sp. D17の植菌液をOD₆₀₀が0.03になるように添加して、28℃にて回転振盪

(120 rpm)を行った。サンプリングは適宜行い、溶液中の1,4-ジオキサン濃度を測定した。尚、栄養塩類の組成は、無機塩培地Fに準じたが、濃度はその値の1/4とした。

2) 生物浄化実証試験

a) 生物浄化実証装置について

岩手・青森県境不法投棄現場の水処理施設建屋内に図(3)-1に示したフローの実証設備を設置し、試験を行った。既設の原水槽へ揚水した地下水は、一旦原水タンクで貯留された後、生物浄化槽へ送液される。生物浄化槽では、*Pseudonocardia* sp. D17によって1,4-ジオキサンの分解がなされた後、膜分離ユニットによって地下水のみを処理水タンクに移送し、一時貯留タンクにて貯留される。貯留された処理水中の1,4-ジオキサン濃度が環境基準値未満(<0.05 mg/L)を達成できた場合、水処理施設に処理槽を移送する一方で、環境基準値以上であった場合は、原水タンクに返送し、再度、原水として用いた。また、*Pseudonocardia* sp. D17の漏えい対策として次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌処理設備を設けている。生物浄化実証装置の外観を図(3)-2に、実証設備主なユニットを図(3)-3に示した。以上の一連の実証装置を用いて実証試験を実施した。



図(3)-1 生物浄化実証試験におけるフロー図



図(3)-2 生物浄化実証装置の外観



浄化槽(液量：300L)



原水・処理水タンク



ポンプ類及び膜ユニット

図(3)-3 実証設備の主なユニット

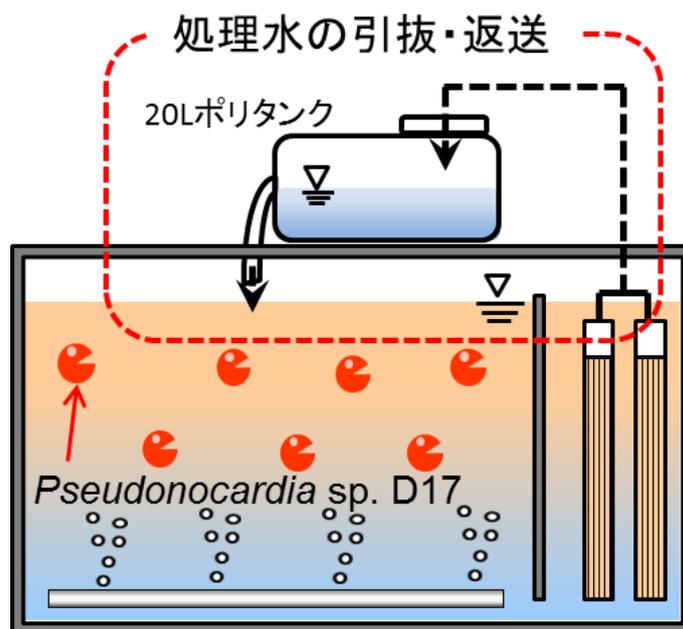
b) スケールアップが浄化性能に及ぼす影響

450L容量の浄化槽に200 kgの地下水及び*Pseudonocardia* sp. D17の植菌液を加え(菌体濃度：26 mg/L)、0.1 vvmにて曝気を行った。その後、1,4-ジオキサン、硫酸アンモニウム及びリン酸水素二カリウムの混合溶液(C : N : P=10 : 2 : 0.1)を所定量添加し、水温を25℃に維持した。この時、膜ユニットにて処理した地下水は、図(3)-4に示すように浄化槽の上に設置したポリタンクに貯留後、浄化槽に返送される(バッチ処理)。試験期間中には、定期的に膜ユニット透過後の処理水を採取し、1,4-ジオキサン濃度を分析した。

一方、上記の実証スケールの浄化試験の比較として、ラボスケールにて同様の試験を実施した。試験では、1 L容量のバイオリアクターに0.65 Lの地下水及び*Pseudonocardia* sp. D17の植菌液を加え(菌体濃度：24 mg/L)、0.15 vvmにて曝気を行った。その後、1,4-ジオキサン、硫酸アンモニウム及びリン酸水素二カリウムの混合溶液(C : N : P=10 : 2 : 0.1)を所定量添加し、水温を25℃に維持した。サンプリングは適宜行い、地下水の1,4-ジオキサン濃度を分析した。

c) 立ち上げ方法の検討

1,4-ジオキサンを炭素源として浄化槽の立ち上げ方法の検討を行った。試験では、前述のバッチ処理での運転を行い、1,4-ジオキサン、硫酸アンモニウム及びリン酸水素二カリウムの混合溶液(C : N : P=10 : 2 : 0.5)を所定量添加した。試験期間中には、混合溶液の添加を合計6回行い、処理水中の1,4-ジオキサン濃度及び全有機炭素濃度をモニタリングするとともに、浄化槽内の菌体濃度を測定した。



図(3)-4 バッチ処理の模式図

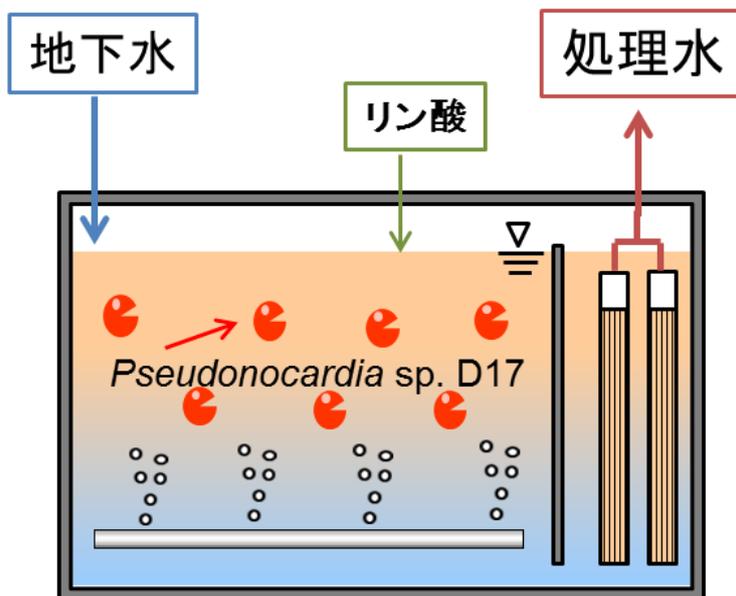
d) 連続処理での浄化性能の調査

連続試験では、c) 立上げ方法の検討の後に生物槽へ100 kgの地下水を加えた後、連続的に地下水を流入させるとともに、膜ユニットより処理水を引き抜いた(図(3)-5)。また、運転期間中は、曝気量を0.07 vvmとし、滞留時間及び水温を変化させて処理を行った。サンプリングは適宜行い、原水及び処理水の1,4-ジオキサン濃度をモニタリングした。尚、栄養塩類としてはリン酸水素二カリウム溶液を用いて、浄化槽内のリン酸濃度を0.05 mg/Lになるように維持した。

e) 長期連続運転における浄化性能の調査

450 L容量の浄化槽に200 kgの実地下水及び*Pseudonocardia* sp. D17の植菌液を加え(菌体濃度：86 mg/L)、実汚染地下水(表(3)-1)を連続的に流入させた。運転は、表(3)-2に示した条件で行い、処理前後の1,4-ジオキサン濃度をモニタリングするとともに、サブテーマ(2)で開発した遺伝子解析手法を用いて浄化槽内の*Pseudonocardia* sp. D17の菌体濃度を測定した。実験期間中には、事前に培養した*Pseudonocardia* sp. D17の植菌液を適宜添加した。なお、添加した植菌液は、以下の手順でラボにて作成した。

10 L容量のバイオリアクターに5 g/LのCSLを含んだ無機塩培地を7.5 L添加し、オートクレーブ処理を行った。その後、1,4-ジオキサン濃度がおよそ3000 mg/Lになるように1,4-ジオキサンを加え、あらかじめ培養した500 mLの培養液(MGY培地、2週間培養)を添加し、28℃にて培養を行った。系内は、pH7.0±0.2にて制御され、2.5 L/minにてエアレーションをしている。適宜、溶液中の1,4-ジオキサン濃度をモニタリングし、1,4-ジオキサン濃度が50 mg/L未満になった場合には、およそ3000 mg/Lの濃度になるように1,4-ジオキサンを添加した。培養は約14日間行い、遠心分離により集菌・洗浄したものを植菌液とした。



図(3)-5 連続処理の模式図

表(3)-1 実地下水の水質(単位：mg/L)

項目	数値
1,4-ジオキサン濃度	0.06～0.66 [※]
無機窒素濃度	9.4～13.2
リン酸	0.28～0.34
全有機炭素濃度	7.7～9.8

※試薬の1,4-ジオキサンを人為的に添加した期間有り

表(3)-2 運転条件

項目	数値
水温	25±0.3℃
pH	7.3±0.2
ばっ気量	20 L/min
滞留時間	12～18時間

(3) *Pseudonocardia* sp. D17の培養方法の検討

1) 培養に用いる炭素源の検討

500 mg/Lの1,4-ジオキサンを含むCGY培地(カシトン：5 g/L、グリセリン：5 g/L、Yeast Extract；1 g/L)を用いて10日間28℃にて回転振盪培養(120 rpm)を行った。培養後、遠心分離機にて集菌・洗浄し、菌体を生理食塩水と混合したものを植菌液とした。

300 mL容量のバフフル付の三角フラスコに無機塩培地F(K_2HPO_4 :1 g/L、 $(NH_4)_2SO_4$:1 g/L、NaCl:50 mg/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:200 mg/L、 $FeCl_3$:10 mg/L、 $CaCl_2$:50 mg/L、pH:7.3)を100 mL加え、オートクレーブで滅菌した。その後、1 g/Lになるようにエチレングリコール、ジエチレングリコールもしくはトリエチレングリコールを添加した後、植菌液を加えて28℃にて回転振盪培養(120 rpm)を9日間行った。培養終了後に吸引濾過にて菌体をろ物として回収し、105℃で一晩乾燥した後、菌体重量を測定し菌体濃度(mg-dry cell/L)を求めた。培養9日目の菌体濃度から初期菌体濃度を差し引いた△菌体濃度により、菌体の増殖性を評価した。

2) ジエチレングリコール濃度が*Pseudonocardia* sp. D17の増殖に及ぼす影響

300 mL容量のバフフル付の三角フラスコに、1～30 g/Lのジエチレングリコールを含む無機塩培地Fを100 mL加え、事前にMGY培地で培養した*Pseudonocardia* sp. D17を植菌して(初期菌体濃度：111 mg-dry cell/L、28℃にて7日間、回転振盪培養(120 rpm)を行った(n=2)。培養終了後、吸引濾過にて菌体をろ物として回収し、1)と同様の手順にて菌体濃度(mg-dry cell/L)を求めた。培養7日目の菌体濃度から初期菌体濃度を差し引いた△菌体濃度により、菌体の増殖性を評価した。なお、比較として、ジエチレングリコールの代わりにエチレングリコールを用いた試験も同様の手順で行った。

3) ジエチレングリコールを用いた培養方法における1,4-ジオキサン分解活性

1,4-ジオキサンを含む実地下水(pH:7.38、1,4-ジオキサン濃度：0.16 mg/L、リン酸イオン濃度：0.08 mg/L、全窒素(TN)濃度：36.5 mg/L、全有機炭素(TOC)濃度：11 mg/L、化学的酸素要量(COD):33 mg/L)に硫酸アンモニウム及びリン酸水素二カリウムをそれぞれ1 g/Lになるように添加した後、ジエチレングリコールを20 g/Lになるように加えて培養液を作成した。この培養液650 mLを1 L容量のリアクターに加え、事前に作成した*Pseudonocardia* sp. D17の植菌液を添加し(初期菌体濃度：157 mg-dry cell/L)、28°Cにて6日間培養した。培養中は、pH7.0に制御しながら、0.65 L/minのエアレーションを行った。また、植菌液には、MGY培地を用いて培養(28°C、14日間)した*Pseudonocardia* sp. D17を無機塩培地にて所定の菌体濃度になるように作成したものを用いた。培養期間中には24時間毎にサンプリングを行い、1,4-ジオキサン分解活性の測定試験に供した。一方、比較として、ジエチレングリコールの代わりにグルコースを用いて培養した実験系も同様に行った。

1,4-ジオキサン分解活性の測定試験では、100 mL容量のバツフル付の三角フラスコに、100 mg/Lの1,4-ジオキサンを含む無機塩培地19 mLと、サンプリングした培養液1 mLを加え、28°Cにて回転振盪培養(120 rpm)を24時間行った。その後、溶液中の1,4-ジオキサン濃度をヘッドスペースGC/MSにて測定した。また、培養液を添加しないブランク系も同様の手順にて試験を実施し、次の式にて、1,4-ジオキサンの分解活性を求めた。

$$1,4\text{-ジオキサン分解活性 (mg-1,4-Dioxane /mL-培養液)} = (C_0 - C_{24}) \times 20 \text{ mL} / 1000 \text{ mL}$$

C_0 (mg/L) : 培養液を添加していないブランク系を24時間回転振盪培養した後の1,4-ジオキサン濃度

C_{24} (mg/L) : 培養液を添加した系を24時間回転振盪培養した後の1,4-ジオキサン濃度

4) 10 Lスケールでのジエチレングリコールを用いた*Pseudonocardia* sp. D17の培養

1,4-ジオキサンを含む実地下水に硫酸アンモニウム及びリン酸水素二カリウムをそれぞれ1 g/Lになるように添加した後、10 g/Lになるようにジエチレングリコールを加えて培養液を作成した。この培養液8 Lを10 L容量のリアクターに加え、事前に培養・作成した*Pseudonocardia* sp. D17の植菌液を添加して(菌体濃度43.2 mg-dry cell/L)、4 L/minにてエアレーションを行いながら、28°Cにて9日間培養した。また、培養4日目に、5 g/Lになるようにコーンステープリカーを添加した。なお、培養期間中は、系内を200 rpmにて攪拌し、pH7.0±0.2に制御した。培養開始してから1、2、3、4、5、7及び9日目に培養液のサンプリングを行い、3)の方法に準じて1,4-ジオキサン分解活性を測定するとともに、ジエチレングリコール濃度をHPLCにて測定した。また、培養開始直後と、培養開始してから4日目と9日目には、150 mLの培養液をサンプリングし、メスシリンダーにて正確に100 mL秤取った後、吸引濾過にて菌体をすべて回収・洗浄し、105°Cで一晩乾燥した。なお、4日目のサンプリングは、コーンステープリカーを添加する直前に行った。その後、乾燥重量を測定し、菌体濃度として算出した。

4. 結果及び考察

(1) 1,4-ジオキサン汚染サイトの調査

1) 国外における1,4-ジオキサン汚染

国外における1,4-ジオキサンによる地下水汚染の主な事例を表(3)-3及び表(3)-4に示した。インディアナ州、コロラド州及びカリフォルニア州の事例では、1,4-ジオキサンに加え塩素系有機溶剤も汚染物質として検出されている。これらのサイトでは、塩素系有機溶剤による汚染は汚染源周辺に留まっているのに対し、親水性の性質を有する1,4-ジオキサンは、汚染源から数km離れた地点でも検出されており、広範囲に汚染が広がっていることが特徴である。このような事例は、カナダ及びスウェーデンにおいても報告されている。一方、ドイツ、ポーランド及びニュージーランドの事例では、濃度は低いものの河川や表層水から1,4-ジオキサンが検出されている。特にポーランドのオーデル川では、1,4-ジオキサンがおよそ500 kmにわたり検出されており、その濃度は下流に従って高くなる傾向であることが報告されている⁵⁾。

以上のように、海外における1,4-ジオキサンの汚染を調査した結果、地下水だけでなく、河川等での汚染事例が明らかとなった。これらのような水環境の汚染は、飲料水を通じて人の健康を損なう恐れがあるため、汚染の拡散防止や浄化など適切な対策が必要である。

表(3)-3 米国における1,4-ジオキサンによる汚染事例

場所	Seymour Recycling Corporation ¹⁾	Lowry Landfill ^{2), 3)}	Solvent Service Inc. ¹⁾	Pall/Gelman Sciences Inc. ¹⁾
	インディアナ州 (ジャクソン郡)	コロラド州 (アラパホ郡)	カリフォルニア州 (サンノゼ)	ミシガン州 (アナーバ)
汚染原因	廃棄化学物質の保管・処理場からの漏えい	廃棄物処分場からの浸出	溶媒再利用施設から漏えい	セルロースフィルターを製造する工場排水由来
1,4-ジオキサンによる地下水汚染の範囲	汚染源から約1.2 km先まで拡散	汚染源から約4.6 km先まで拡散	汚染源から約0.3 km先まで拡散	東西約3.7 kmにわたり拡散
1,4-ジオキサン濃度(最大値)	2,300 µg/L (1990年時点)	230 µg/L	34,000 µg/L	221,000 µg/L
共存する有機化学物質	1,1,2-トリクロロエタン, シエンカタンソ, テトラクロロエチレン, トリクロロエチレン	1,1-ジクロロエタン等	トリクロロエチレン, 塩化ビニルモノマー, 1,1-ジクロロエチレン, テトラヒドロフラン, アセトン, cis-1,2-ジクロロエチレン	—

表(3)-4 諸外国における1,4-ジオキサンによる汚染事例

場所	Gloucester処分場の地下水 ⁴⁾	マイン川、ライン川及びオーデル川 ⁵⁾	表層水 ⁶⁾	埋立処分場浸出水 ⁷⁾
	カナダ オンタリオ州	ドイツ、 ポーランド	ニュージーランド ドレンテ州	スウェーデン ヨーデボリ
汚染原因	廃棄物	下水処理場等の放流水	-	廃棄物
1,4-ジオキサン濃度(最大値)	2000 µg/L	オーデル川：2.2 µg/L ライン川：0.86 µg/L マイン川：0.86 µg/L	10 µg/L	36 µg/L
共存する有機化学物質	ベンゼン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、トリクロロメタン、1,1-ジクロロエタン、トリクロロエタン、ジクロロエタン	-	-	ベンゼン、エチルベンゼン、キシレン等

2) 国内における1,4-ジオキサン汚染

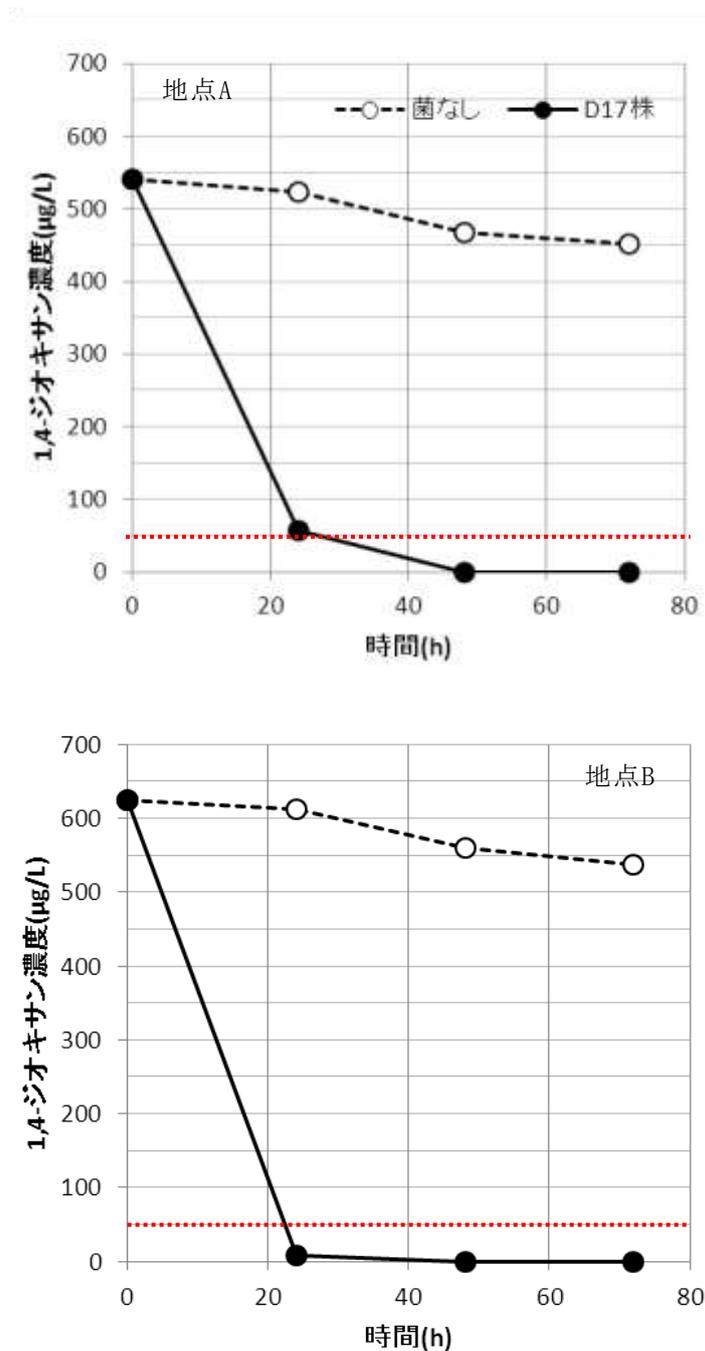
我が国で公表されている主な1,4-ジオキサンによる地下水汚染サイトについて表(3)-5にまとめた。これらの汚染サイトにおける1,4-ジオキサン濃度(最大値)は、環境基準値の0.05 mg/Lと比べると比較的高い値である。また、1,4-ジオキサンの他に、ヒ素や鉛などの重金属、1,2-ジクロロエタンなどの塩素系有機溶剤やベンゼンなども環境基準値を超過している。これらの汚染事例の他には、神奈川県寒川町内の地下水において環境基準値を超過した報告がなされているが¹³⁾、汚染原因は未だ特定できていない。

表(3)-5 国内における主な1,4-ジオキサンによる地下水汚染サイト

	旧能代産業廃棄物センター ^{8), 9)}	青森・岩手県境不法投棄現場 ¹⁰⁾	三重県桑名市五反田地内不法投棄事案 ¹¹⁾	新河岸川河川敷(埼玉県) ¹²⁾
敷地面積	約18万m ²	27万m ²	2,906m ²	約15,000m ²
汚染原因	不法投棄	不法投棄	不法投棄	不法投棄
1,4-ジオキサン濃度(最大値)	44 mg/L (H23年12月時点)	26 mg/L (H22年8月時点)	27 mg/L (H22年1月～H23年6月)	0.78 mg/L (H22年9月時点)
その他の環境基準超過項目	ヒ素、鉛、1,2-ジクロロエタン、塩化ビニルモノマー、ベンゼン	ベンゼン、塩化ビニルモノマー、ジクロロメタン、1,2-ジクロロエタン、ホウ素、鉛、フッ素、総水銀	ジクロロメタン、ベンゼン、塩化ビニルモノマー、鉛、ヒ素、ホウ素、フッ素、	塩化ビニルモノマー、硝酸性窒素、亜硝酸性窒素

3) 実地下水を用いた生物浄化の可能性検討

1,4-ジオキサン汚染サイト内における異なる2地点(地点A、地点B)から採取した地下水を用いて1,4-ジオキサン分解試験を行った。尚、採水した地下水の1,4-ジオキサン濃度は、地点A: 588 µg/L、地点B: 655 µg/Lであった。*Pseudonocardia* sp. D17を植種した系での1,4-ジオキサン濃度は、24時間後には57 µg/L(地点A)及び8 µg/L(地点B)を示し、それ以降、1,4-ジオキサンは検出されなかった(図(3)-6)。一方、菌を植種しないコントロール系では、試験期間中には著しい濃度の低下は確認されなかった。以上のことから、*Pseudonocardia* sp. D17を用いて1,4-ジオキサンの濃度を環境基準値(50 µg/L)以下まで低減できることが明らかとなった。また、本試験の結果より、本サイトにおける1,4-ジオキサン汚染地下水を生物分解にて浄化できる可能性が示された。



図(3)-6 実汚染地下水を用いた*Pseudonocardia* sp. D17による1,4-ジオキサン分解試験
(.....環境基準値：50 µg/L)

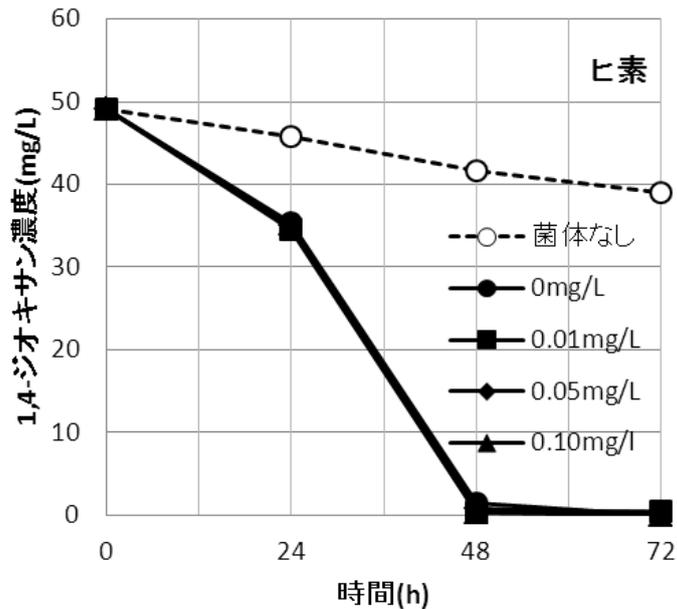
4) 生物浄化実証試験に向けた基礎的情報の取得

a) 共存する汚染物質が1,4-ジオキサン分解に及ぼす影響

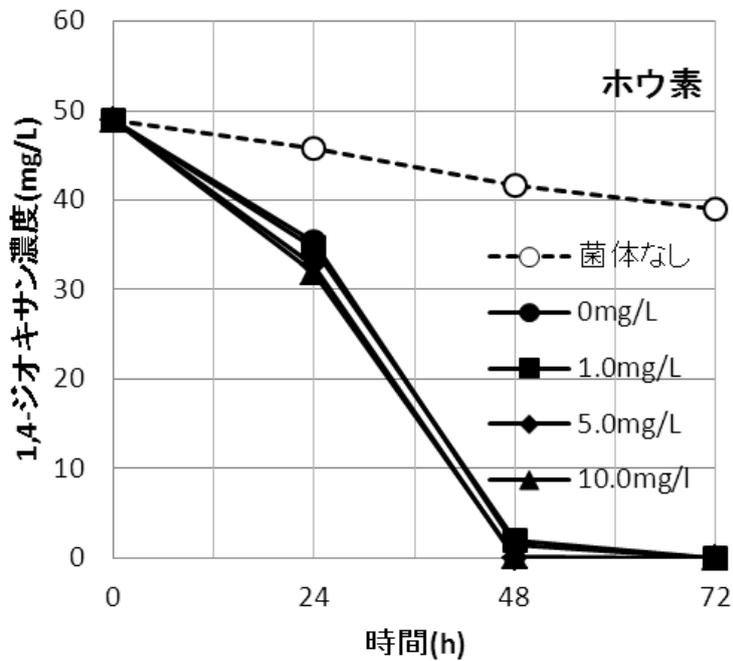
1,4-ジオキサン汚染サイトの調査より、その汚染地下水には他の汚染物質が共存しているケースが確認された。そこで、共存する汚染物質が1,4-ジオキサンの分解に及ぼす影響を調査することを目的として試験を行った。検討する汚染物質としては、ヒ素、ホウ素、フッ素及び鉛を選定し、

その濃度は、地下水環境基準値、基準値の5倍及び基準値の10倍とした。尚、比較として汚染物質を添加していない系（0 mg/L系）も同様に試験を行った。

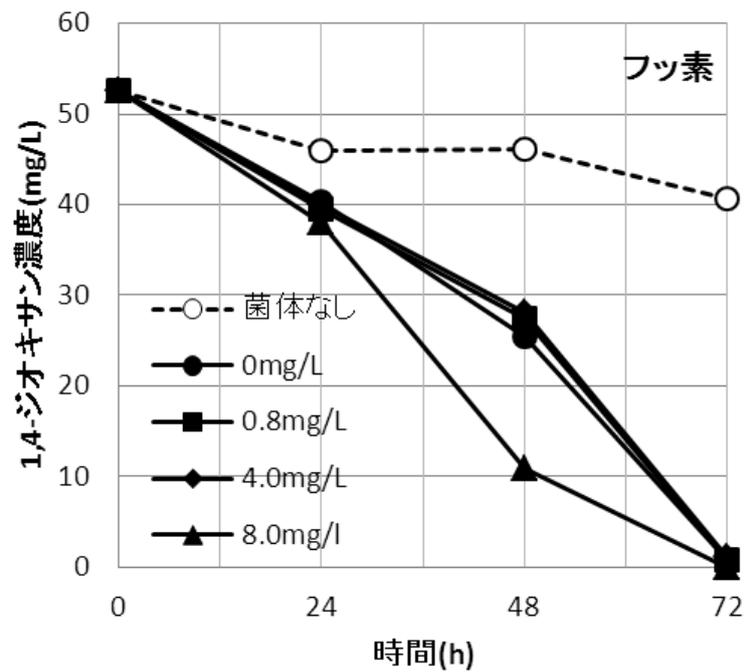
その結果、ヒ素、ホウ素、フッ素及び鉛の汚染物質を添加した系では、各物質の添加濃度に伴う著しい1,4ジオキサン分解の阻害は見られなかった（図(3)-7,8,9,10）。以上のことから、今回試験したヒ素、ホウ素、フッ素及び鉛において環境基準値の10倍濃度までの範囲では、*Pseudonocardia* sp. D17による1,4-ジオキサン分解を阻害することはないことが明らかとなった。



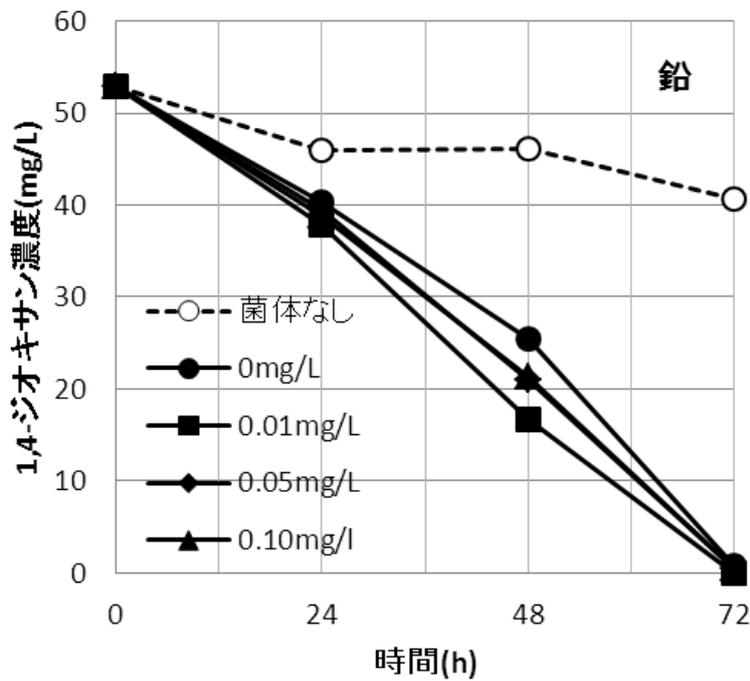
図(3)-7 ヒ素の存在下における1,4-ジオキサンの分解



図(3)-8 ホウ素の存在下における1,4-ジオキサンの分解



図(3)-9 フッ素の存在下における1,4-ジオキサンの分解



図(3)-10 鉛の存在下における1,4-ジオキサンの分解

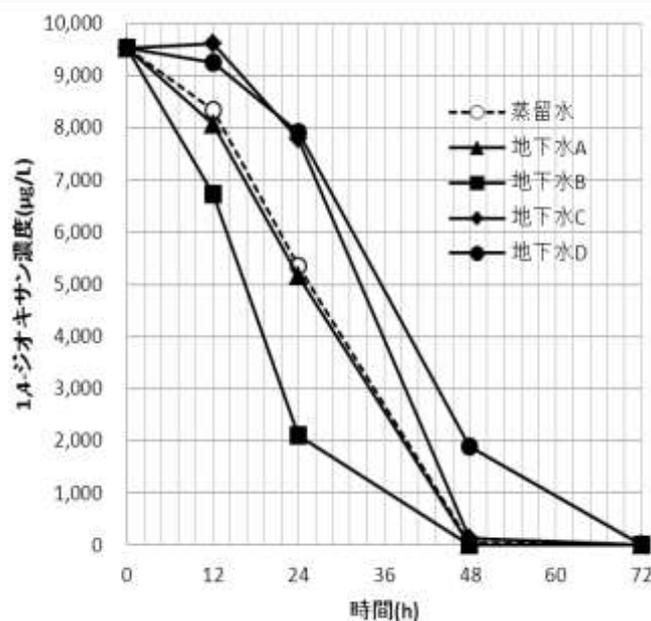
b) 模擬汚染地下水を用いた1,4-ジオキサン分解試験

1,4-ジオキサンによる地下水汚染には、重金属、ベンゼンなどの揮発性有機化合物による複合汚染が確認された。そこで、ベンゼン等に汚染された実汚染地下水を4か所から採取し(表(3)-6)、これらに対して1,4-ジオキサンを加えて作成した模擬汚染地下水を用いて *Pseudonocardia* sp. D17に

よる1,4-ジオキサン分解試験を行った。また、比較として汚染地下水の代わりに蒸留水を用いた試験も同様に行った。その結果、地下水A及びBの実験系における1,4-ジオキサン濃度は、蒸留水を用いた実験系よりも低い値もしくは同程度の値を示した（図(3)-11）。このことから、表(3)-6に示した地下水A及びBの汚染物質の濃度においては、1,4-ジオキサンの分解が阻害されないことが示唆された。一方で、地下水C及びDでは、時間の経過とともに1,4-ジオキサン濃度の低下が確認されたが、試験初期（12時間後及び24時間後）における1,4-ジオキサン濃度は、蒸留水系と比べて高い値を示した。これは、共存する汚染物質によって*Pseudonocardia* sp. D17による1,4-ジオキサン分解が阻害されたものと考えられる。地下水C及びDでは、ベンゼン、キシレン、トルエン及びエチルベンゼンなどの芳香族化合物を含んでおり、これらの物質が1,4-ジオキサン分解に悪影響を及ぼしているものと考えられる。

表(3)-6 採取した地下水における汚染物質とその濃度

	地下水A	地下水B	地下水C	地下水D
地下水環境基準における規制物質の濃度 (mg/L)	ベンゼン：0.022 フッ素：0.18 ホウ素：0.2	1,2-ジクロロエチレン：2.0 トリクロロエチレン：0.004 フッ素：0.1	鉛：0.015 ヒ素：0.002 ベンゼン：54 フッ素：0.1 ホウ素：0.2	ヒ素：0.003 ベンゼン：1.5 フッ素：0.88 ホウ素：0.1
その他共存する化学物質		—	キシレン	トルエン エチルベンゼン



図(3)-11 模擬汚染地下水における1,4-ジオキサン分解

(2) 生物浄化実証試験に関する検討

岩手・青森県境不法投棄現場(図(3)-12)では、平成21年に1,4-ジオキサンによる地下水汚染が確認されたため、岩手・青森県境に矢板を設置し(図(3)-13)、地下水の拡散を防止するとともに、場内の地下水を揚水している。さらに、揚水した地下水は、一旦、既設の原水槽に貯留され、水処理施設にて促進酸化処理などの浄化されている(240m³/日)¹⁴⁾。本研究では、既設の原水槽の揚水地下水を一部用いて実証試験計画し、種々の検討を行った。



図(3)-12 岩手・青森県境不法投棄現場の外観



図(3)-13 岩手・青森県境の矢板

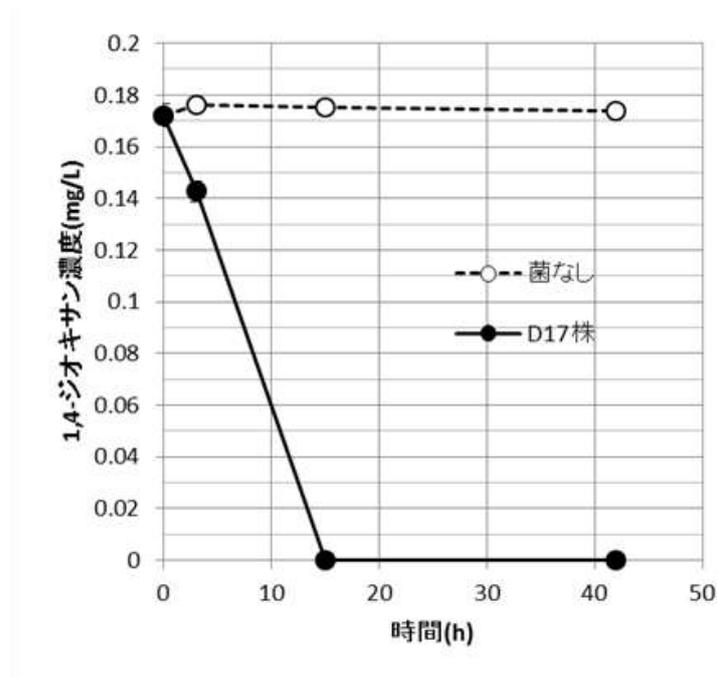
1) 実汚染地下水への*Pseudonocardia* sp. D17の適用評価

原水槽から地下水を採取し、水質分析を実施した。その結果、1,4-ジオキサン濃度は、0.161～0.186 mg/Lを示した(表(3)-7)。また、微生物の栄養源となる窒素(硝酸態窒素とアンモニア態窒素)及びリン酸も検出された。なお、BODは、2.3～4.1 mg/Lと比較的低濃度であった。

原水槽より採取した地下水(2013.4.30.採水)を用いて*Pseudonocardia* sp. D17による分解試験を行った。その結果、*Pseudonocardia* sp. D17による1,4-ジオキサン濃度の低減が確認され、試験開始15時間後の1,4-ジオキサン濃度は、環境基準値未満であった(図(3)-14)。これらのことから、*Pseudonocardia* sp. D17を用いて原水槽の地下水を浄化できることが示された。

表(3)-7 水処理施設の原水槽における地下水の水質

採水日		2013.4.30	2013.9.6
pH	—	7.51～7.85	7.38
1,4-ジオキサン	mg/L	0.171～0.186	0.161
硝酸態窒素	mg/L	4.8～4.9	3.4
アンモニア態窒素	mg/L	6.0～6.6	10.8
リン酸イオン	mg/L	0.11～0.35	0.08
全有機炭素量(TOC)	mg/L	8.17～8.54	11.00
生物化学的酸素要求量(BOD)	mg/L	2.3～4.1	-
化学的酸素要求量(COD)	mg/L	26～28.5	33
全窒素濃度(TN)	mg/L	18.5～19.4	36.5

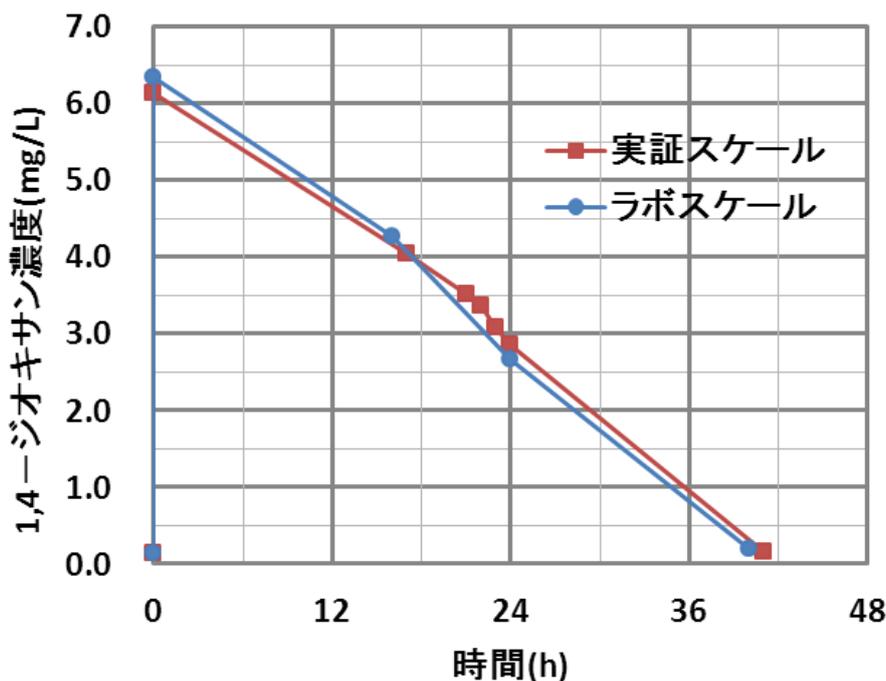


図(3)-14 *Pseudonocardia* sp. D17による1,4-ジオキサン分解(2013.4.30.採水)

2) 生物浄化実証試験

a) スケールアップが浄化性能に及ぼす影響

実証設備へのスケールアップが浄化性能に及ぼす影響を調査するために、ラボ及び実証スケールにて分解試験を行った。その結果、どちらの実験系においても、時間の経過とともに1,4-ジオキサン濃度は、減少し、スケールの違いによる顕著な差は確認できなかった(図(3)-15)。そのため、スケールアップによる著しい浄化性能の低下はないものと考えられた。



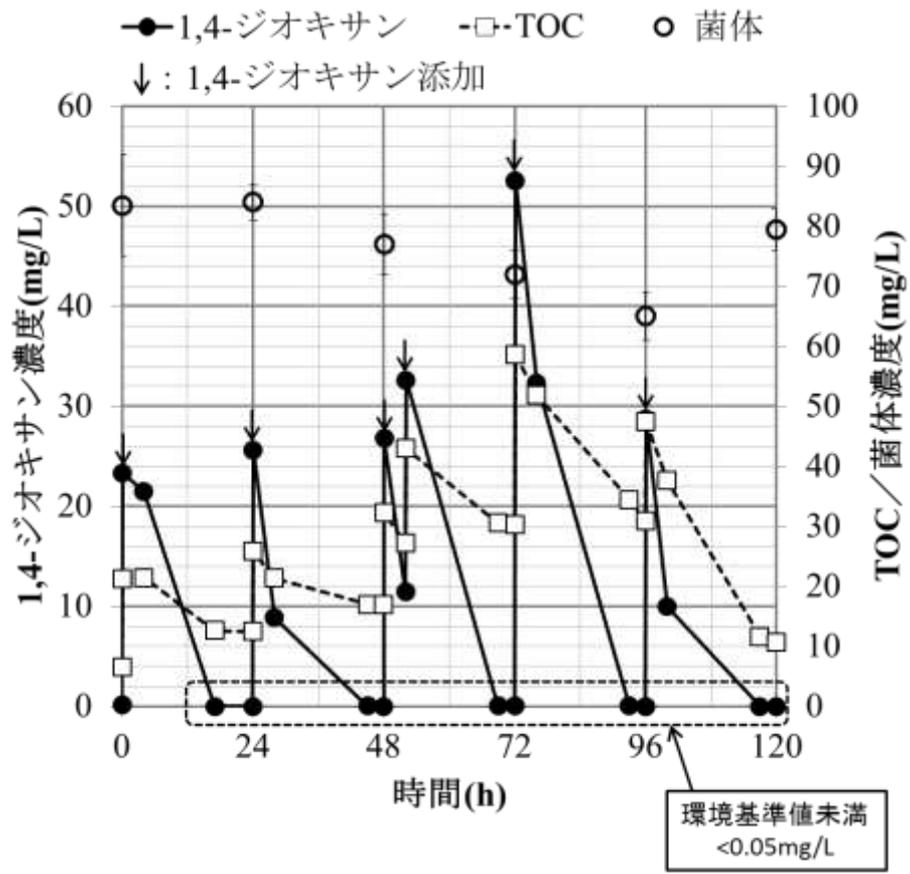
図(3)-15 ラボ及び実証スケールにおける1,4-ジオキサン分解試験

b) 立上げ方法の検討

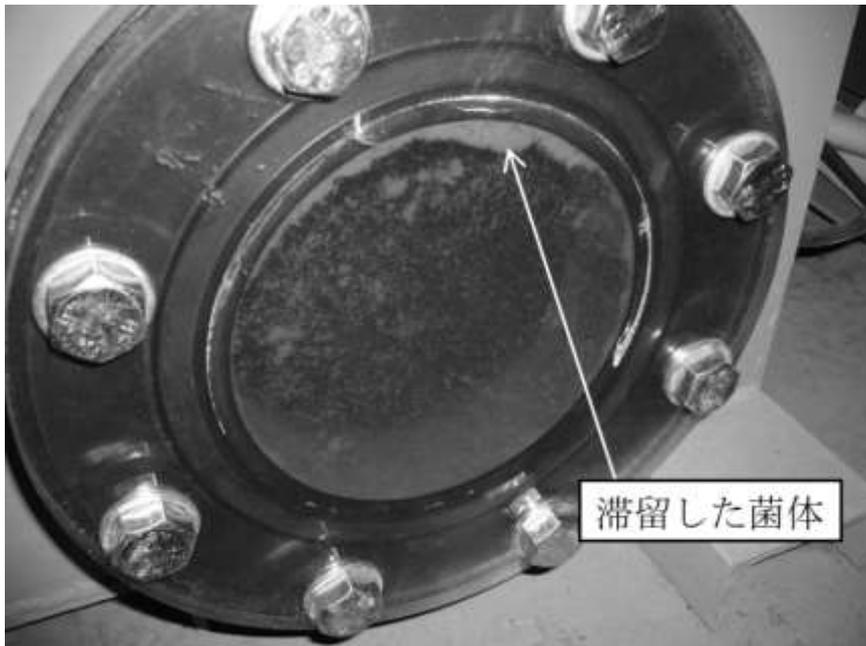
1,4-ジオキサンを炭素源として生物浄化槽の立ち上げを行った。その結果、試験期間中の1,4-ジオキサン濃度は、添加直後から速やかに低下し、その値は環境基準値未満であった(図(3)-16)。また、全有機炭素(TOC)濃度は、1,4-ジオキサンと同様に減少する傾向であったことから、1,4-ジオキサンの中間代謝物は過剰に残留することなく、速やかに分解されていることが示唆された。

一方、菌体濃度は、運転期間中、ほぼ同程度を示し、増加の傾向が確認できなかった。しかしながら、試験期間中ののぞき窓には、時間の経過とともに汚泥の蓄積が確認された(図(3)-17)。このことから、1,4-ジオキサンの分解に伴って*Pseudonocardia* sp. D17は増殖しているものの、菌体が槽内の隅やのぞき窓周辺に滞留したために、正確な菌体濃度を計測できなかったものと考えられる。

以上のことから、1,4-ジオキサンを炭素源として、浄化槽の立ち上げが可能であることを確認できた。



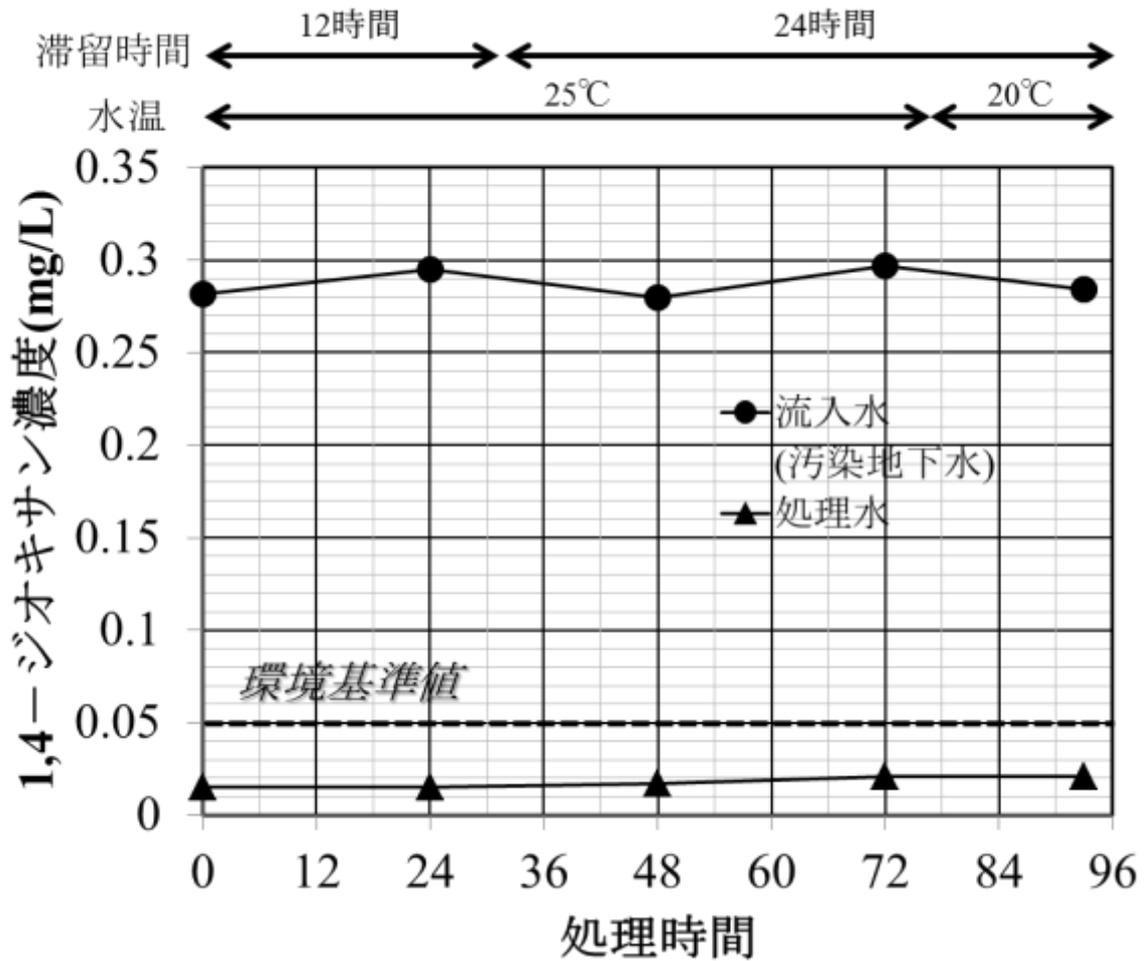
図(3)-16 バッチ処理での1,4-ジオキサン分解試験



図(3)-17 のぞき窓に滞留した汚泥

c) 連続処理での浄化性能の調査

上記の立上げ方法の検討を終了した後、連続処理に切り替えて試験を行った。連続試験は約4日間実施したが、処理水中の1,4-ジオキサン濃度は、常時、環境基準値未満であった(図(3)-18)。また、試験期間では、滞留時間や水温を変化させて実験を行ったが、処理条件の変化による著しい性能の悪化は確認できなかった。以上のことから、連続処理においても *Pseudonocardia* sp. D17による浄化効果を確認できた。



図(3)-18 連続処理での1,4-ジオキサン分解試験

d) 長期連続運転における浄化性能の調査

上記のa)～c)での基礎的な知見を踏まえて、連続運転における長期的な処理性能を確認することを目的として実証試験の運転を行った。本実証試験では、場内全域から揚水した実地下水を一部分岐させたものを試験に用いているが、2014年度における地下水中の1,4-ジオキサン濃度が、2013年度と比べて低減していたため(表(3)-8)、試薬の1,4-ジオキサンを地下水に添加した実験を一時的に行った。その際、処理水の1,4-ジオキサン濃度が環境基準値(0.05 mg/L)を超過していた場合には、既設の水処理施設には返送せず、再度、実証試験の原水タンクに移送し試験に用いた。

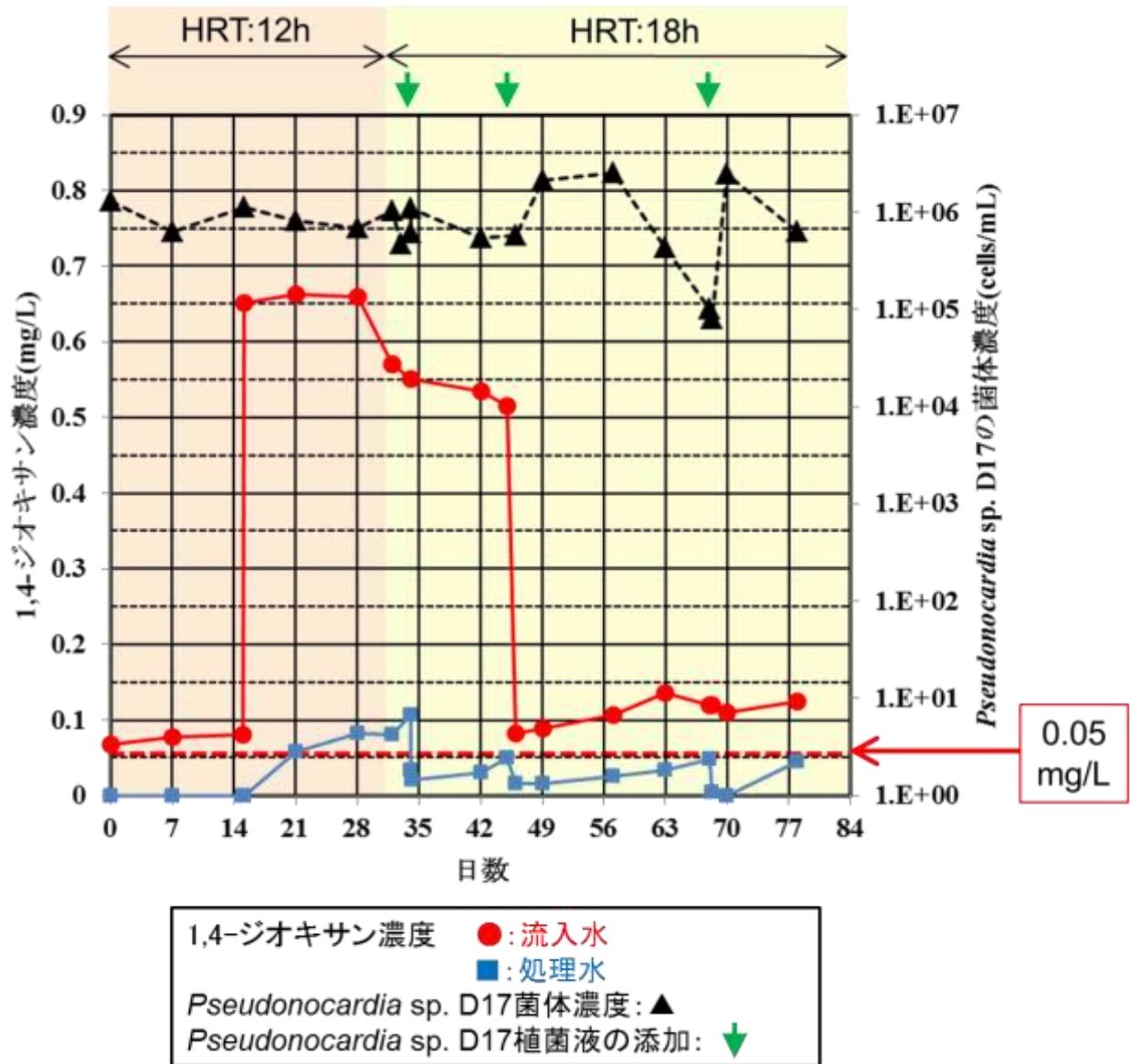
1,4-ジオキサン汚染地下水の長期運転は、2014年9月から11月末まで行った。運転開始から32日目までは、滞留時間(HRT)を12時間、それ以降は18時間で実施し、流入水及び処理水の1,4-ジオキサン濃度、*Pseudonocardia* sp. D17の菌体濃度をモニタリングした。

運転開始から15日目までは、処理水中の1,4-ジオキサン濃度は環境基準値以下を示し、その値は定量限界値(<0.005 mg/L)であった(図(3)-19)。そこで、運転15日目以降は、試薬の1,4-ジオキサンを地下水に添加したものを原水として試験に用いた。その結果、処理水の1,4-ジオキサン濃度は、日数の経過とともに上昇する傾向が確認された。この1,4-ジオキサン濃度の上昇は、HRTを12時間から18時間に変更しても改善する傾向が確認できなかったため、新たに*Pseudonocardia* sp. D17の植菌液を生物浄化槽に添加した。これにより、処理水中の1,4-ジオキサン濃度は、速やかに低下し、0.05 mg/L以下を示した。処理水中の1,4-ジオキサン濃度が上昇した原因は不明であるが、地下水中の微量元素の不足や過曝気による自己酸化等の要因により、分解菌の活性が低下したものと考えられた。一方、新たな植菌液を追加することで、処理水中の1,4-ジオキサン濃度を0.05 mg/L未満に維持できることが確認できた。

以上のことから、本生物浄化手法を用いることで、およそ3か月間、環境基準値を達成できることが明らかとなった。

表(3)-8 試験に用いた地下水中の1,4-ジオキサン濃度

日付	2013年				2014年				
	4/30	9/6	10/13	11/26	7/17	8/7	8/27	9/3	9/10
濃度 mg/L	0.171	0.161	0.235	0.281	0.060	0.060	0.054	0.052	0.051



図(3)-19 長期運転における流入水及び処理水の1,4-ジオキサン濃度と菌体濃度の推移

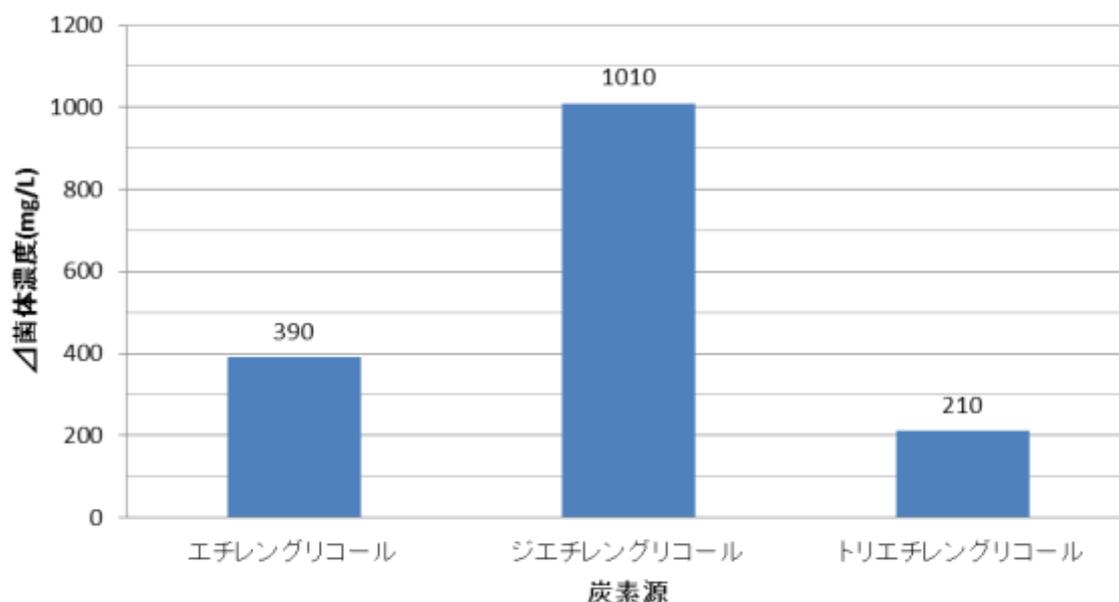
(3) *Pseudonocardia* sp. D17の培養方法の検討

1,4-ジオキサン分解菌を用いた地下水浄化では、安定的な処理を実施するために分解菌の菌体量を高く保持することが重要である。特に、立ち上げ初期においては、他の微生物も存在する環境下において分解菌を優先化させる必要がある。そこで、本項では、1,4-ジオキサン分解菌である *Pseudonocardia* sp. D17の培養に適した炭素源を選定し、開放系での培養手法の検討を行った。

1) 培養に用いる炭素源の検討

1,4-ジオキサンの分解における中間代謝物の一つとしてエチレングリコールが挙げられる。そこで、エチレングリコール、エチレングリコールが二量体化したジエチレングリコール、さらに三量体化したトリエチレングリコールを炭素源として選定し、これらにおける *Pseudonocardia* sp. D17の増殖性を評価した。

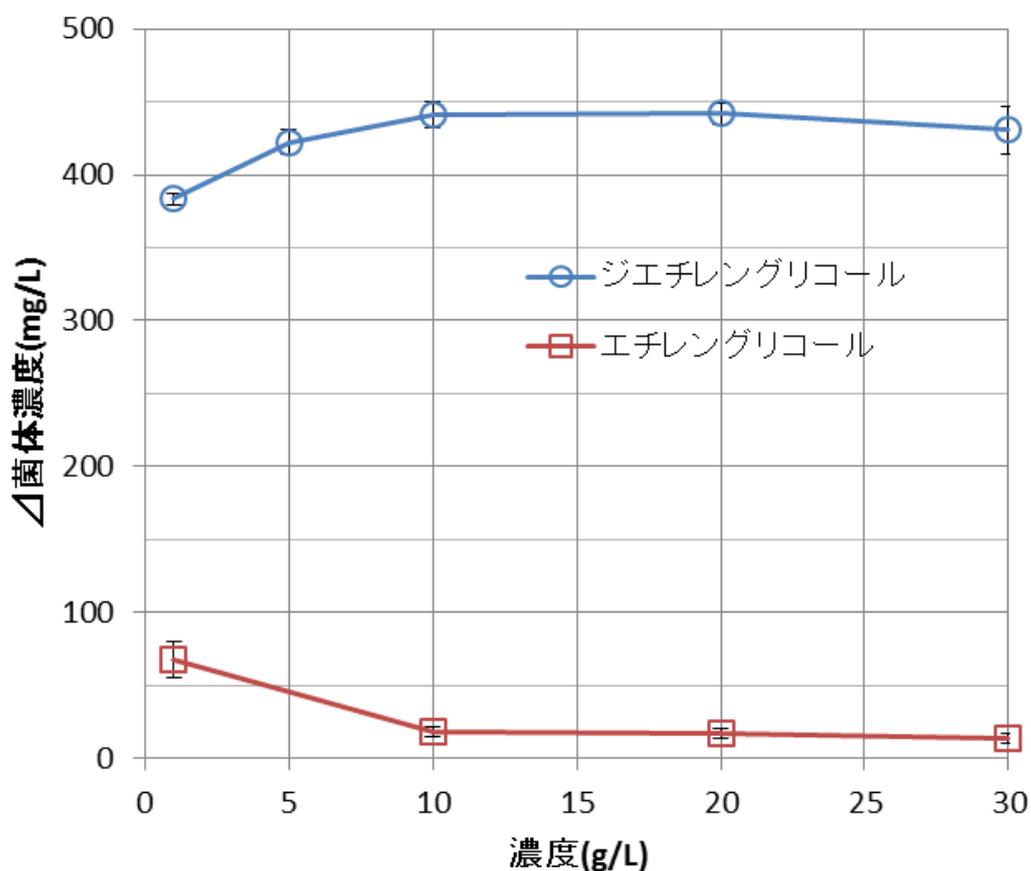
図(3)-20に、9日間の培養によって増加した菌体濃度を示した。その結果、ジエチレングリコールを炭素源とした系において、最も高い増殖性を示し、その値はエチレングリコールの約2.6倍であった。このことから *Pseudonocardia* sp. D17の培養における炭素源としてジエチレングリコールが効果的であることが明らかとなった。



図(3)-20 異なる炭素源における *Pseudonocardia* sp. D17の増殖性(培養9日目)

2) ジエチレングリコール濃度が*Pseudonocardia* sp. D17の増殖に及ぼす影響

先の炭素源の検討から*Pseudonocardia* sp. D17の培養にはジエチレングリコールが効果的であることが明らかとなった。そこで、異なる濃度のジエチレングリコールにて*Pseudonocardia* sp. D17の増殖性を評価した。その結果、10 g/Lまでは、ジエチレングリコール濃度の上昇とともに△菌体濃度が増加する傾向が確認できた(図(3)-16)。また、ジエチレングリコール濃度が10 g/L以上では、同程度の値を示し、ジエチレングリコールによる顕著な増殖阻害は確認できなかった。一方、エチレングリコールでは、濃度の上昇に伴い菌体濃度の低下が確認された。以上のことから*Pseudonocardia* sp. D17は、高濃度のジエチレングリコールが存在する場合でも増殖阻害を生じることなく効率的に炭素源として利用できることが明らかとなった。

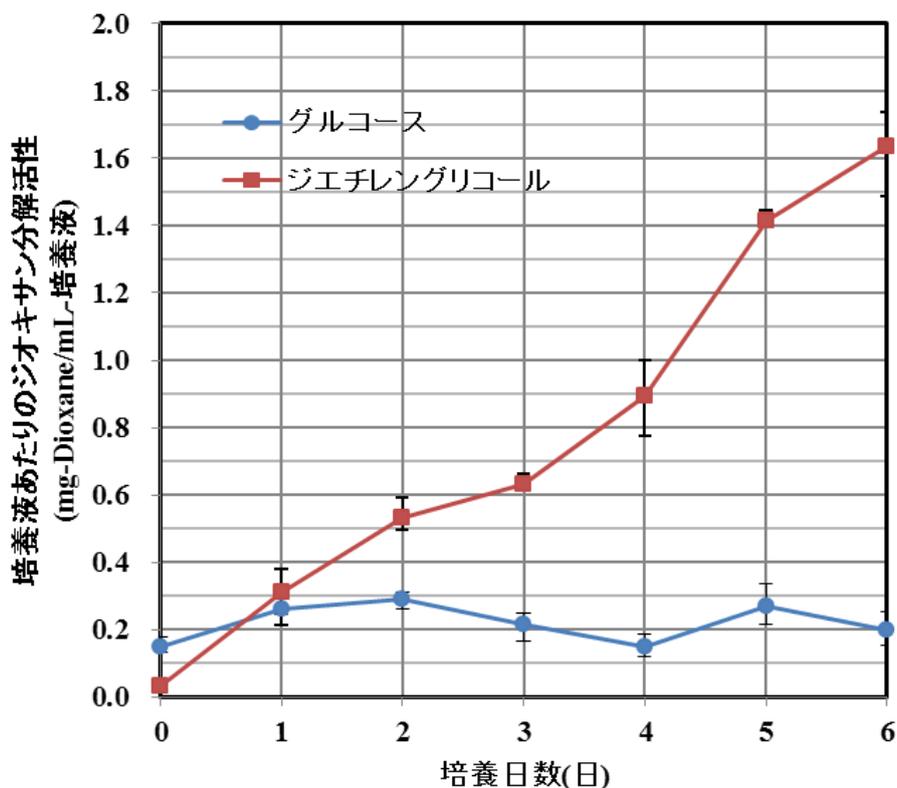


図(3)-21 異なる濃度における*Pseudonocardia* sp. D17の増殖性(培養7日目)

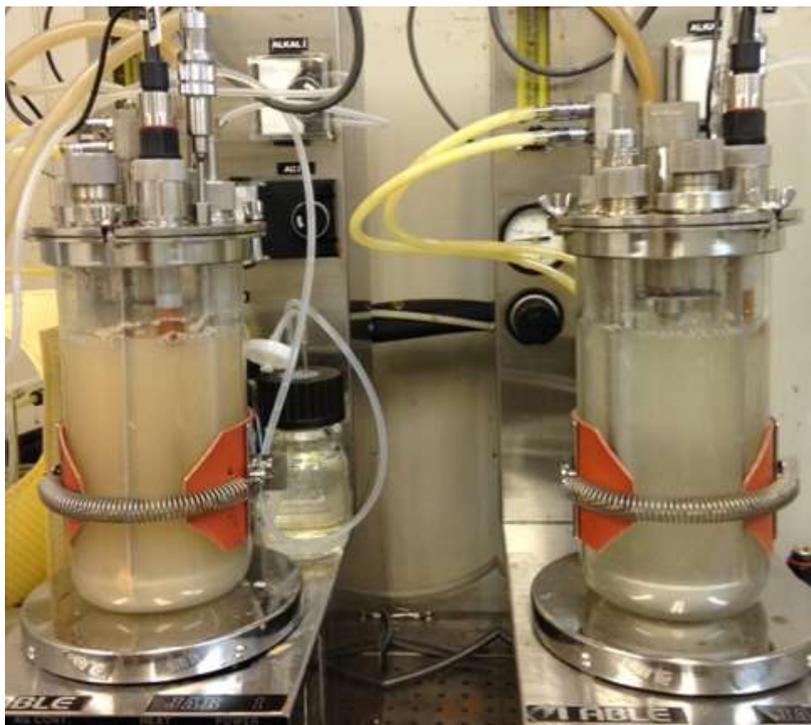
3) ジエチレングリコールを用いた培養方法における1,4-ジオキサン分解活性

これまでの検討から、ジエチレングリコールは*Pseudonocardia* sp. D17の増殖に効果的な炭素源であることが示された。そこで、ジエチレングリコールを用いて開放系での*Pseudonocardia* sp. D17の培養を行った。試験では、1,4-ジオキサンを含んだ実地下水に20 g/Lになるようにジエチレングリコール、または対照系としてグルコースを添加し、*Pseudonocardia* sp. D17を培養するとともに、培養液の1,4-ジオキサン分解活性を測定した。図(3)-22に、培養液の1,4-ジオキサン分解活性の経日変化を示した。尚、1,4-ジオキサン分解活性は、1 mLの培養液が24時間で分解する1,4-ジオキサン重量を示している。

グルコースを用いて培養した系では、培養液中の1,4-ジオキサン分解活性は、培養期間中ほとんど上昇しなかった。このグルコース培養系では、培養3日に既に著しく懸濁していることから(図(3)-23)、1,4-ジオキサン分解活性の停滞は、他の微生物が増殖・優先化したためであると推察された。一方、ジエチレングリコールで培養した系では、日数の経過に伴い培養液中の1,4-ジオキサン分解活性が上昇することが明らかとなった(図(3)-22)。これは、高濃度のジエチレングリコール環境下では他の微生物の増殖が抑制される一方で、高濃度域でも増殖可能な*Pseudonocardia* sp. D17が優先し、結果として1,4-ジオキサン分解活性を高めることができたものと考えられた。以上の結果から、ジエチレングリコールを用いることで、開放系にてジエチレングリコールを培養できることが明らかとなった。



図(3)-22 各培養液における1,4-ジオキサン分解活性の経日変化

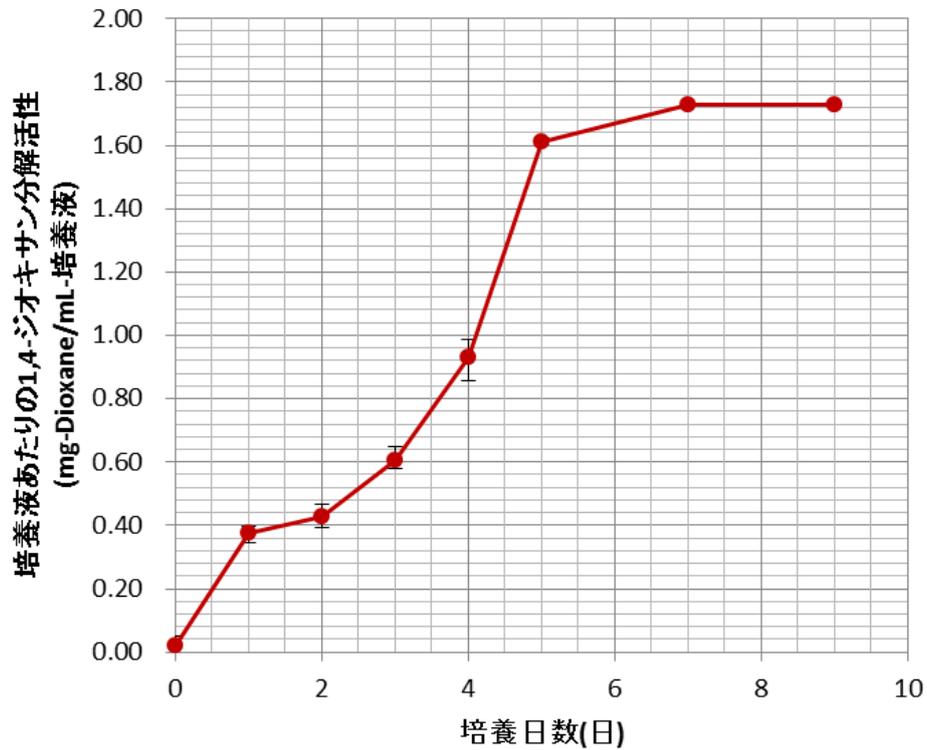


図(3)-23 培養3日目の様子(左：グルコース培養系、右：ジェチレングリコール培養系)

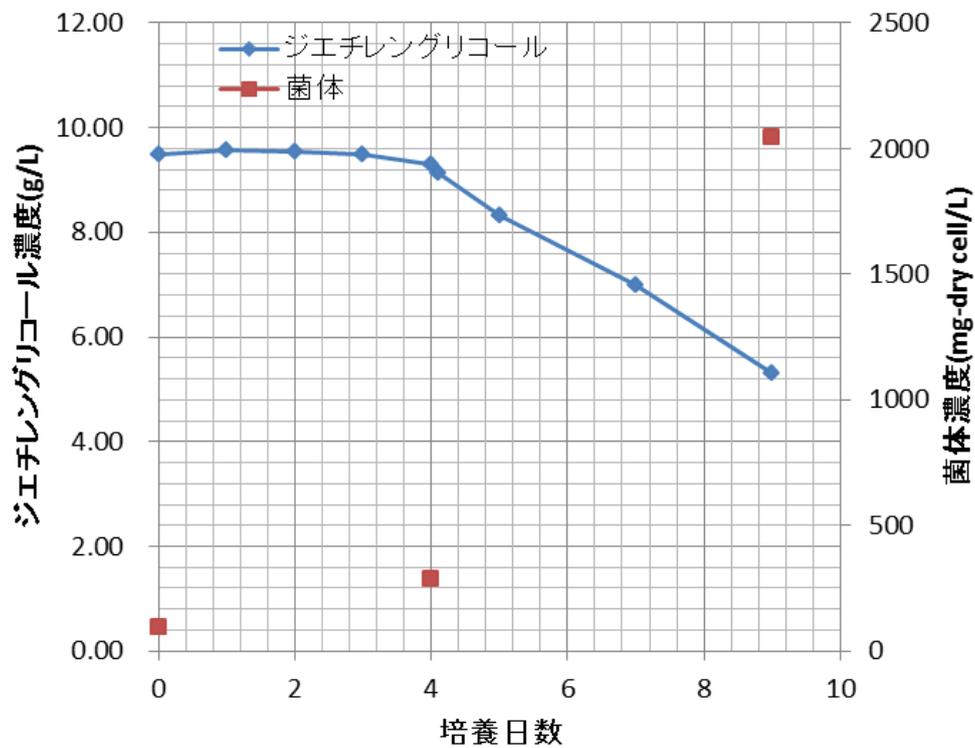
4) 10 Lスケールでのジェチレングリコールを用いた*Pseudonocardia* sp. D17の培養

ジェチレングリコールを炭素源とすることで、開放系でも*Pseudonocardia* sp. D17を優先化できることが示された。そこで、10 Lリアクターにて、ジェチレングリコールを炭素源とした*Pseudonocardia* sp. D17の培養を実施した。また、コーンスティープリカーを添加することで*Pseudonocardia* sp. D17の菌体濃度を高められることがサブテーマ（1）において明らかとなっているため、培養4日に5 g/LになるようにCSLを添加して、培養液中の1,4-ジオキサン分解活性を測定した。

その結果、1,4-ジオキサン分解活性は、日数の経過とともに上昇し、10 Lスケールにおいても*Pseudonocardia* sp. D17を優先化できることが明らかとなった(図(3)-24)。また、培養4日にコーンスティープリカーを添加したところ、分解活性はさらに上昇する傾向が確認できた。しかしながら、培養7日には、1,4-ジオキサンの分解活性値の上限値に達したため、正確な数値が測定できなかったが、日数の経過とともにジェチレングリコール濃度の低下や菌体濃度の増加が確認されたため(図(3)-25)、7日目以降の1,4-ジオキサン分解活性は、さらに高い値であったものと考えられる。



図(3)-24 1,4-ジオキサン分解活性の経日変化(10 Lスケール)
培養4日目にコーンステープリカー添加



図(3)-25 ジェチレングリコール濃度及び菌体濃度の経日変化

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

Pseudonocardia sp. D17を用いて構築したラボスケールバイオリアクターにより、青森・岩手県境不法投棄現場から得られた実汚染地下水中の1,4-ジオキサンの除去を達成するとともに、スケールアップして構築した実証試験設備において、連続バッチ方式、及び連続方式の両方式にて、環境基準値以下の濃度までの1,4-ジオキサン除去を達成した。1,4-ジオキサンの汚染された実環境水の浄化を、低コストでの運転が可能な生物学的処理法で達成したという報告はこれまでになく、本研究はこの分野をリードする成果を挙げていると言える。また、本研究で考案したジエチレングリコールを用いた培養は、開放系にて*Pseudonocardia* sp. D17を培養できる手法として、バイオレメディエーションを実行する上で画期的なツールである。さらにジエチレングリコールは、*Pseudonocardia* sp. D17だけでなく、環境中の1,4-ジオキサン分解菌を特異的に増殖させることができる基質としての可能性をも有しており、これまでに報告が全くないバイオスティミュレーションを実現する活性化剤としても期待できる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究で実施した文献調査ならびに汚染サイトでの実地調査により、国内外の1,4-ジオキサン汚染サイトの特徴(特に共存汚染物質)を明らかにすることができた。1,4-ジオキサンによる汚染は、我が国だけでなく、米国をはじめとした海外においても顕在化しつつある。本研究では、1,4-ジオキサン分解菌を活性化する因子や、共存汚染物質が1,4-ジオキサン分解に及ぼす影響の一部も明らかにすることができた。さらに、1,4-ジオキサン汚染環境のオンサイトリアクターあるいはバイオオーグメンテーションによる浄化に有望な数株の1,4-ジオキサン分解菌を提示することができた。特に、*Pseudonocardia* sp. D17は他の汚染物質が共存する場合でも1,4-ジオキサン分解活性を維持できることが確認され、様々な特性をもつサイトにおける1,4-ジオキサン汚染の浄化に活用することができるものと考えられる。

本研究により得られた成果については、学会発表などの学術的な公表のみならず、新聞報道などによる一般向けの情報発信も積極的に行うことで成果の普及に努めており、国内外で発生している1,4-ジオキサン汚染問題の解決と、汚染に伴う健康被害の未然防止に貢献を期待できるものと考えている。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 山本哲史, 斎藤祐二, 井上大介, 清和成, 黒田真史, 池道彦:環境浄化技術、13(5), 15-19 (2014)
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化技術」
- 2) 山本哲史, 斎藤祐二:環境管理, 2015年1月号 (2015), 51(1), 47-51
「1,4-ジオキサンの生物処理技術」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 成田尚宣、福ヶ迫久仁衛、黒田真史、山本哲史、斎藤祐二、池道彦：第65回日本生物工学会大会（2013）
「*Pseudonocardia dioxanivorans* D17による1,4-ジオキサン汚染地下水の浄化に関する検討」
- 2) 山本哲史、斎藤祐二、池道彦、清和成、井上大介：第16回日本水環境学会シンポジウム（2013）
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化に関する研究」
- 3) 山本哲史、斎藤祐二、井上大介、清和成、黒田真史、池道彦：第51回環境工学研究フォーラム（2014）
「1,4-ジオキサン汚染地下水の生物処理技術」

(3) 出願特許

- 1) 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

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 第60回青森・岩手県境不法投棄現場の原状回復対策協議会（主催：岩手県、2014年3月15日、二戸地区合同庁舎大会議室、一般傍聴者15名）にて実証試験の中間報告
- 2) 2014地球環境保護 土壌・地下水浄化技術展（東京ビッグサイト西ホール、平成26年10月15-17日、参加者18,877人）にて研究内容の展示・紹介

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 岩手日報（2013年5月26日）「県境産廃不法投棄 土壌浄化の進行を確認」
- 2) デーリー東北（2013年5月26日）「県境産廃 N地区順調に汚染浄化」
- 3) 大成建設ホームページ プレスリリース（2013年5月26日）「コストを大幅減、1,4-ジオキサンの生物浄化技術実証試験へ」

- 4) 日経産業新聞（2013年7月11日）「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」
- 5) 日刊建設産業新聞（2013年7月12日）「分解菌で1,4-ジオキサン浄化 CO₂とコスト大幅減」
- 6) 建設通信新聞（2013年7月18日）「ジオキサン汚染の生物浄化技術 効果確認 ランニングコスト AOPの1/10」
- 7) フジサンケイビジネスアイ（2013年7月22日）「生物浄化技術の実証試験」
- 8) 月刊建築技術（2013年10月号、株式会社建築技術）「1,4-ジオキサンの生物浄化技術実証試験へ」
- 9) 建設通信（2014年10月16日、朝刊、3頁）「大成建設バイオ浄化を加速 迅速、安価に無害化」
- 10) 環境新聞（2014年10月21日、5頁）「1,4-ジオキサン 排水処理にも光明」

（6）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) T.K.G. MOHR: (2010) “Environmental investigation and remediation” CRC Press, Boca Raton, 369–384.
- 2) UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: (2008) “1,4-dioxane in shallow groundwater Lowry Landfill superfund site”
- 3) UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: (2012) “Five year review report, third review for Lowry Landfill Superfund Site, Arapahoe country, Colorado”
- 4) S. LESAGE, R.E. JACKSON, M.W. PRIDDLE, and P.G. RIEMANN: Environ. Sci. Technol., 24, 4, 559–566 (1990) “Occurrence and fate of organic solvent residues in anoxic groundwater at the Gloucester Landfill, Canada”
- 5) D. K. STEPIEN, P. DIEHL, J. HELM, A. THOMS, W. PUTTMANN: Water Res., 48, 406–419(2014) “Fate of 1,4-dioxane in the aquatic environment: from sewage to drinking water”
- 6) S. WILBUR, D. JONES, J. F. RISHER, J. CRAWFORD, B. TENCZA, F. LLALOS, G. L. DIAMOND, M. CITRA, M. R. OSIER and L. O. LOCKWOOD: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, 170–177(2012) “Toxicological profile for 1,4-dioxane”
- 7) N Paxéus: Environ. Sci. Technol., 42, 7-8, 323–333(2000) “Organic compounds in municipal landfill leachates”
- 8) 秋田県: 能代産業廃棄物処理センターについて. 秋田県 Wed サイト美の国あきたネット: <http://www.pref.akita.lg.jp/www/contents/1234835998165/index.html>
- 9) 秋田県生活環境部環境整備課: (2012) 能代産業廃棄物処理センター平成 23 年度水質等調査結果.
- 10) 岩手県環境生活部.青森・岩手県境不法投棄現場の原状回復対策協議会: 協議開催資料 http://www.pref.iwate.jp/~hp0315/haikibutu/kaigi/kyougikai/kyougikai_top.htm
- 11) 桑名市五反田事案技術検討専門委員会: (2012) 桑名市五反田事案の環境修復技術に関する報告書.

- 12) 埼玉県 . 新河岸川産業廃棄物処理対策 : 埼玉県ホームページ :
<http://www.pref.saitama.lg.jp/site/sanpaitop/>
- 13) 神奈川県: (2011) 寒川町一之宮及び田端における地下水中の 1,4-ジオキサンの調査結果について. 平成 22 年 4 月 15 日記者発表資料: <http://www.pref.kanagawa.jp/prs/p227453.html>.
- 14) 岩手県 : 第 56 回青森・岩手県境不法投棄現場の原状回復対策 協議会(2013) “資料 2 新水処理施設の設置について”

Development of Treatability Evaluation Tools and Clean-up Technologies for Bioremediation of 1,4-Dioxane Contaminated Groundwater

Principal Investigator: Michihiko IKE

Institution: Osaka University
2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN
Tel: +81-6-6879-7672 / Fax: +81-6-6879-7675
E-mail: ike@see.eng.osaka-u.ac.jp

Cooperated by: Kitasato University, Taisei Corporation

[Abstract]

Key Words: 1,4-Dioxane, Bioremediation, Pump and treat remediation, Bioaugmentation, Biostimulation, 1,4-dioxane-degrading bacteria, Genome analysis, Quantitative monitoring tool

1,4-Dioxane is a chemical used in various industries, however, it is persistent in aquatic environment because of its high solubility and low biodegradability in water. Although the concentration of 1,4-dioxane in aquatic environment is strictly regulated in Japan because of its high toxicity, several cases of groundwater pollution were reported, many of which were in illegal dumping sites. However, no practical technology for the cleanup is known at present in terms of treatment performance and cost. This project aims to develop a package of bioremedial technologies utilizing 1,4-dioxane-degrading bacteria as well as monitoring tools to evaluate the applicability of the developed technologies based on the properties of the contaminated site.

Strain D1, D6, D11, D17, T1, and T5, 1,4-dioxane-degrading bacteria previously isolated by our group, were physiologically and genetically characterized as a basis for the development of bioremediation technologies. Lab-scale bioreactor using a typical degrader *Pseudonocardia* sp. D17 successfully removed 1,4-dioxane in both synthetic groundwater with a wide range of nitrogen and phosphorus concentrations and real groundwater, indicating the bioreactor is applicable to real contamination sites. Bioaugmentation with D17 in a laboratory column system was also proved possible to remove 1,4-dioxane from a model contaminated groundwater in soil.

The draft genome analysis revealed that the bacterial strains D6, D11, D17, T1, and T5, bear several types of genes in the soluble di-iron monooxygenase (SDIMO) family, which are predicted to be involved in 1,4-dioxane degradation. A study on 1,4-dioxane-degrading bacteria enrichment suggested that a PCR system detecting the SDIMO gene can be employed for the diagnosis of biostimulation capability of the contaminated sites. In addition, real-time PCR system targeting the *thmC* gene in strain

D17 specifically quantified the amount of strain D17 in the environmental samples for rational bioaugmentation.

A pilot-scale bioreactor was constructed in an illegal dumping site in the border region between Iwate and Aomori Prefectures. The reactor successfully removed 6 mg/L of 1,4-dioxane in pumped groundwater over 40 hours in batch operation, and 0.3 mg/L of 1,4-dioxane in pumped groundwater in continuous operation. In the long-time continuous operation, the 1,4-dioxane concentration in effluent gradually increased over 34 days along with the decrease of D17 cells. Addition of strain D17 restored the performance, and the reactor stably removed 1,4-dioxane.

In summary, bioremediation technologies and monitoring tools developed in this project will offer new and practical cleanup options for actual contamination sites.