

1,4-ジオキサン分解菌の培養と長期保存条件の検討（平成 25～27 年度）

1, 4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥の分解能向上と保存の検討

小林貴司 村山力則 中村淳子

1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥について、分解能の向上と長期保存方法の検討を行った。検討の結果、1,4-ジオキサンを高濃度で付加し、さらにリンを添加することで、1,4-ジオキサン減少速度 0.95 mg/L/day の活性汚泥を 150 mg/L/day まで向上させることができた。活性汚泥の保存については、遠心分離後－85℃の冷凍保存により、活性を維持したまま 1 年半以上の保存が可能であった。

1. はじめに

難分解性であり、水にも溶剤にも無制限に溶解する¹⁾1,4-ジオキサンは、一般的な廃水処理施設では除去が難しいと^{2, 3)}されていたが、県内の埋立処分場跡地の廃水処理施設では、生物処理により効率よく処理されていることがわかってきた⁴⁾。水温が低下する冬季には、処理能力が低下するという問題もあったが、廃水処理施設へ加温設備を整備したことにより、現在は一年を通じて排水基準を満たす処理が可能となっている⁵⁾。しかし、春先になると短期的な処理能力の低下がときおり生じることもあり、より安定した処理を実現するためにも、処理能力が低下した活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能を向上させる手法の構築が必要とされている。

1,4-ジオキサン分解能を向上させる因子の検討を行う中で特に着目したのが、廃水処理施設の流入水中のリン濃度がおおよそ 0.05 mg/L 程度と非常に低濃度な点である。検討では、活性汚泥にリン酸を添加し、1,4-ジオキサン分解能に及ぼす影響を評価した。

また、処理能力が完全に失われる等の不測の事態にも対応できるように、活性汚泥の長期保存方法についても検討を行ったので、その結果について報告する。

2. 方法

2.1 回分式による 1, 4-ジオキサン分解能試験

分解能試験は、表 1 に示す試験系を用い、活性汚泥試料 500 mL に対し 1,4-ジオキサンを添加し攪拌、1,4-ジオキサン濃度を適宜測定し、濃度がほぼ 0 となったところで添加を繰り返す回

分式により行った⁶⁾。

1,4-ジオキサン減少速度は、添加直後と濃度がほぼ 0 となる直前での濃度差を経過時間で除することで算出した。なお、この試験系での 1,4-ジオキサン揮発速度は、濃度 2 mg/L、温度 25℃の条件下でおおよそ 0.012 mg/L/day である。

表 1 1, 4-ジオキサン分解能試験系

2.2 測定方法

攪拌器	トルネード SMT-103(アズワン)
回転数	200 rpm
500mLガラス容器	DURAN社(PPフタにφ1cm程度の穴)
水浴	25℃

1,4-ジオキサン濃度の測定には、ヘッドスペースオートサンプラーTurboMatrix HS-40（パーキンエルマー）および、キャピラリーカラム DB-624（J & W）を取り付けたガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010（島津製作所）を使用した。測定試料は 22 mL バイアルに試料水 10 mL と塩化ナトリウム 3.0 g 及び内標準液として d-1,4-ジオキサンを入れ、アルミキャップで密封することで調製した。表 2 に測定条件を示す^{7,8)}。

表 2 ヘッドスペース－GC/MS 測定条件

ヘッドスペースオートサンプラー TurboMatrix HS-40	
気液平衡温度	60℃
気液平衡時間	30 min
ニードル温度	120℃
トランスファーライン温度	120℃
加圧時間	3 min
インジェクション時間	0.15 min
ガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010	
キャリアーガス	He 120kPa
カラム	DB-624 60m×0.32mm 1.8μm
カラム温度	40℃(1min)－10℃/min－200℃(10min)

2.3 活性汚泥の保存方法の検討

2.3 活性汚泥の保存方法の検討

室温 25℃および冷蔵 5℃に用いる保存試料は、活性汚泥 500 mL を溶液の状態に保存した。冷凍 -85℃に用いる保存試料は、グリセリン濃度を 0%, 30%, 50%とした活性汚泥 500 mL を遠心器 (3000 rpm, 10 min) により沈殿、上澄みを除去した後に冷凍保存した。保存後の試験開始時に、生物処理槽の上澄み液で 500 mL に戻し、試験溶液とした。分解能試験は、活性汚泥 500 mL に 1,4-ジオキサン 1 mg を添加、濃度 2 mg/L とし攪拌を行い、24 時間後の減少速度を算出することで行った。1,4-ジオキサン分解能の保存率は、保存開始時の活性汚泥の減少速度 0.91 mg/L/day を 100%とし、保存後の減少速度と比較することで評価を行った。

3. 結果及び考察

3.1 回分式による 1,4-ジオキサンの減少傾向

図 1 に 1,4-ジオキサン濃度が 2 mg/L となるように定期的に 1,4-ジオキサンの添加を繰り返した回分試験での濃度減少とその減少速度を示す。水処理施設で採取した活性汚泥 500 mL に 1,4-ジオキサン 1 mg を添加、濃度 2 mg/L とし、25℃で攪拌を開始すると、その濃度は速やかに減少し、およそ 2 日程度で 0 となる。

濃度が 0 となる直前の定量値から、その減少速度を算出すると添加 1 回目の減少速度は

1.5 mg/L/day であり、2 回目は 1.4 mg/L/day とほぼ同じ減少速度を示した。その後、濃度を 0 の状態にし、5 日経過後に再び添加したところ、添加直後～32 時間はほとんど減少しない状態となり、添加 48 時間後には再び減少を始めるがその減少速度は 0.67 mg/L/day と遅くなった。その後、濃度が 0 の状態とならないように添加を繰り返すと、減少速度は 0.75～1.0 mg/L/day とほぼ同様の速度で減少を繰り返す結果となったことから、活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能を維持するためには、1,4-ジオキサンを継続して供給し続ける必要があると考えられた。

3.2 高濃度 1,4-ジオキサン添加による減少速度の増加

図 2 に 1,4-ジオキサン添加量を徐々に増やした場合の 1,4-ジオキサン濃度の減少の様子を示す。2 mg/L の 1,4-ジオキサンを定期的に添加する試験では、活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能は、同様の減少速度を維持する結果となったが、図 2 のように添加する 1,4-ジオキサン濃度を 2, 20, 100 mg/L と濃くすると、徐々にその減少速度は速くなった。試験開始時に減少速度 1.1 mg/L/day であった汚泥が 77 日後には 13 mg/L/day と分解能が 12 倍増加しており、これは活性汚泥に含まれる 1,4-ジオキサン分解菌の増殖によるものと考えられた^{9～13)}。

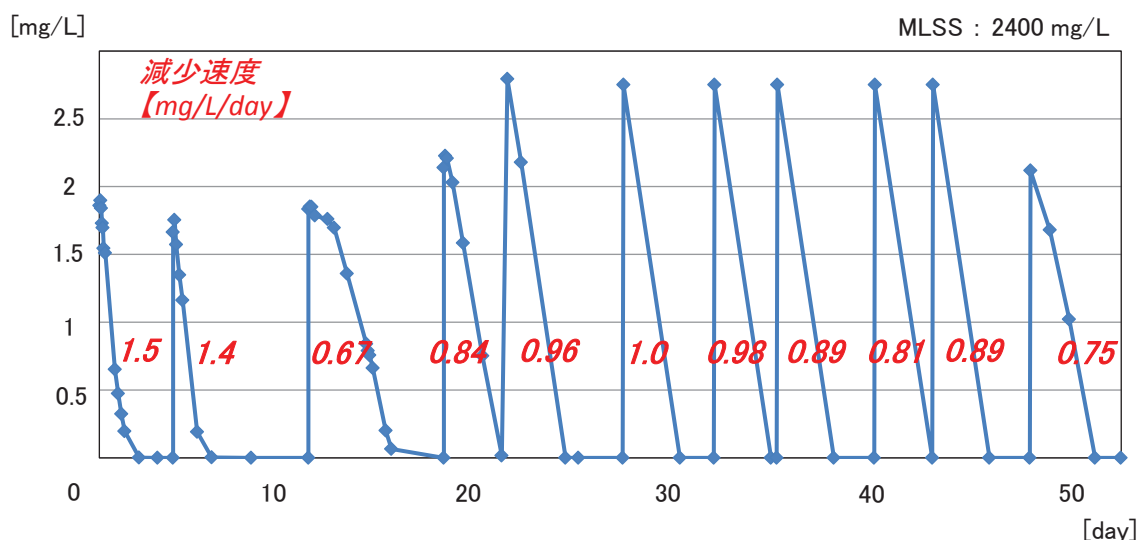


図 1 回分式による 1,4-ジオキサン濃度 2 mg/L での減少傾向と減少速度の推移

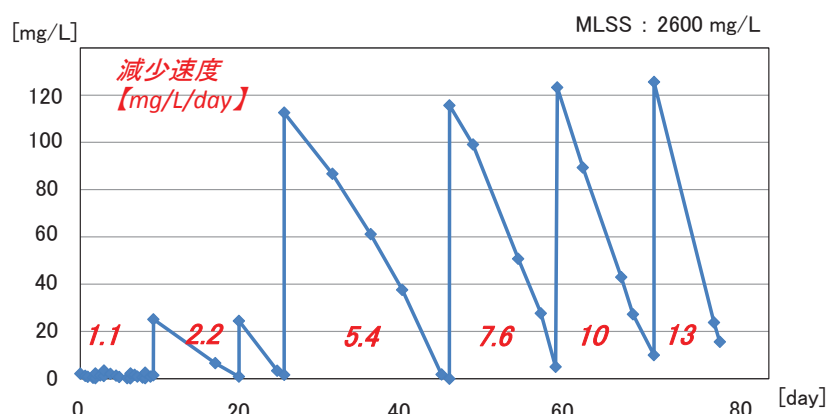


図2 添加する1,4-ジオキサン量を増やした場合の減少傾向と減少速度の推移

3.3 リン酸添加による効果

図3に活性汚泥にリン酸を添加した系で、回分式により1,4-ジオキサン濃度を2 mg/Lとした場合の減少速度の推移を示す。リン濃度 0 g/Lの試験系は、リン酸を添加せずに1,4-ジオキサン 1 mgの定期的な添加の繰り返しのため、図1とほぼ同様の状態である。1日目の減少速度 1.1 mg/L/dayであったものが12日後にも 1.3 mg/L/dayとほぼ同じ値を示し、図1と同様に分解能をほぼ一定に維持する結果を示した。

一方、リン酸を添加した系での12日後の減少速度は、およそリン濃度が濃いほど減少速度の増加が大きく、リン濃度 0.44 g/Lの系で最大値

4.2 mg/L/dayを示した。12日間で分解能が約4倍増加したことになる。

表3にリン酸添加後のpHの変化を示す。試験開始時にリン酸を添加するとpHは低下し、リン濃度 0.44 g/L, 0.57 g/LのpHは4以下であった。リン濃度 0.44 g/L, 0.57 g/Lの試験開始時の減少速度は顕著に遅くなっており、pH4以下で1,4-ジオキサン分解菌は急激に活性が低下するものと考えられた。その後、リン濃度 0.44 g/Lの系は、1日間でpH4以上となつてから活性を取り戻し、今回の試験系の中では、最大値を示すほど減少速度が増加する結果となった。

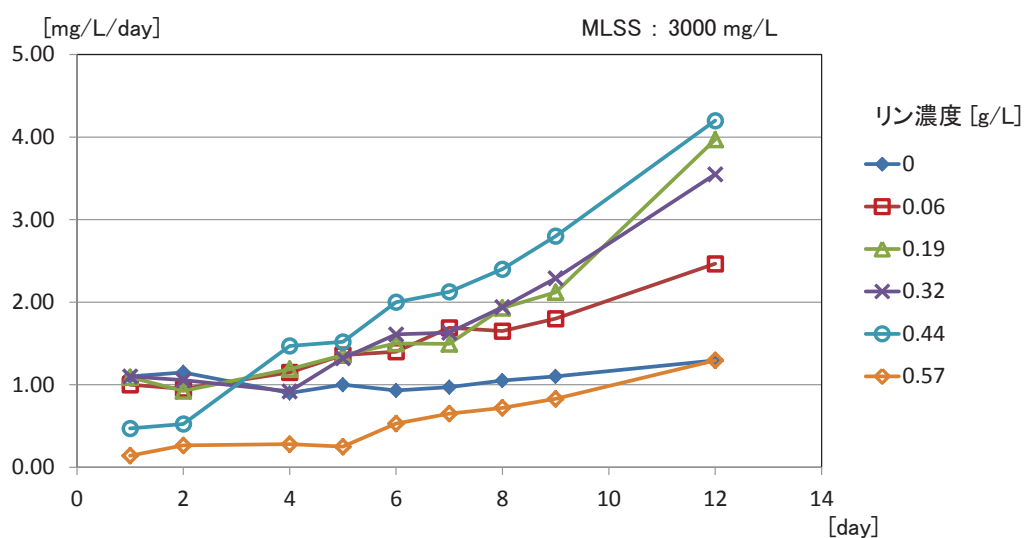


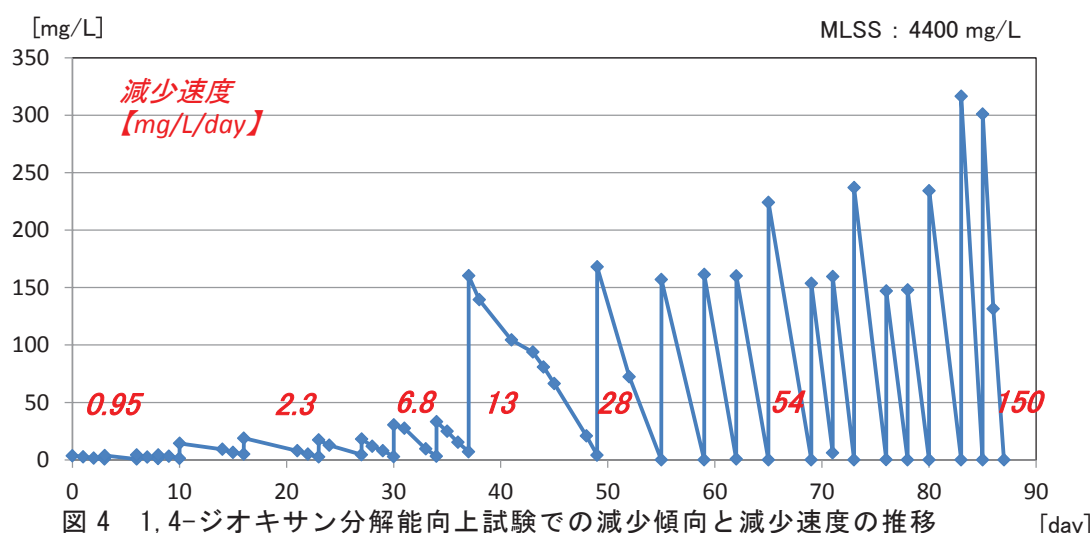
図3 リン濃度の違いによる1,4-ジオキサン減少速度の推移

表3 リン酸添加後のpH変化

リン濃度 [g/L]	0	1	2	4	5	6	7	8	9	12
0	7.6	7.8	7.8	7.8	8.0	8.0	8.2	8.0	8.2	8.1
0.06	6.1	6.7	6.8	6.8	7.0	7.0	7.1	7.0	7.1	7.1
0.19	4.9	5.7	5.9	6.1	6.3	6.4	6.4	6.5	6.5	6.5
0.32	4.0	5.2	5.6	5.7	5.9	6.0	6.0	6.0	6.1	6.2
0.44	3.4	4.4	4.6	4.8	5.2	5.3	5.3	5.4	5.5	5.6
0.57	3.2	3.5	3.7	4.1	4.5	4.7	4.7	4.8	4.8	5.0

3.4 活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能向上の検討

1,4-ジオキサン分解能を向上させる因子である高濃度 1,4-ジオキサンの添加およびリン添加を同時に行い、1,4-ジオキサン分解能向上の検討を行った。リン濃度は 0.32 g/L とした。図 4 に活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能向上試験での減少の様子を示す。



3.5 活性汚泥保存条件の検討

表 4 に室温 25℃と冷蔵 5℃で保存した活性汚泥の 1,4-ジオキサン分解能の保存率を示す。

室温 25℃で保存した活性汚泥の保存率は、4 日後で 63%と 1,4-ジオキサン分解能の低下が速く、12 日後には 13%まで低下した。冷蔵 5℃の保存では、7 日後に保存率 91%と 1,4-ジオキサン分解能の低下は遅くなっているが、28 日後には 13%まで低下しており、長期の保存はできなかった。

表 5 に冷凍 -85℃で保存した活性汚泥の

図 2 と同様に添加する 1,4-ジオキサン濃度を 2, 20, 150, 300 mg/L と濃くすると、徐々にその減少速度は速くなった。リン濃度を 0.32 g/L とし、試験を行ったため、図 2 に比べ減少速度の増加が速く、試験開始時に減少速度 0.95 mg/L/day であった汚泥が 87 日後には 150 mg/L/day となり、分解能を 157 倍まで増加することができた。

1,4-ジオキサン分解能の保存率を示す。

冷凍 -85℃で保存した活性汚泥は、グリセリンの有無に関わらず、560 日間の保存期間を経ても保存率 92～104%を維持しており、容易に長期保存できることがわかった。冷凍による脱水を防ぐために添加したグリセリンが必要ない結果となったが、グリセリン濃度に応じて、活性汚泥の性状は、脱水作用により泥状から砂状へと変化しているため、保存試験を継続して行い、グリセリンの必要性を評価する予定である。

表 4 室温 25℃と冷蔵 5℃での 1,4-ジオキサン分解能の保存率

保存温度	0	4	7	12	21	28	[day]
室温 25℃	100	63	23	13			[%]
冷蔵 5℃	100	97	91	62	23	13	

表 5 冷凍 -85℃での 1,4-ジオキサン分解能の保存率

グリセリン濃度	0	1	7	30	92	182	271	361	455	560	[day]
0%	100	107	98	98	101	100	105	100	99	104	[%]
30%	100	110	110	108	107	121	110	109	121	103	
50%	100	110	100	99	101	105	98	101	91	92	

4. まとめ

1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥に、高濃度の 1,4-ジオキサンを添加し、好気条件下で攪拌することでその分解能は徐々に向上した。さらにリン酸を添加することにより分解能の増加は速まり、87 日間の試験で分解能を 157 倍まで高めることができた。また、活性汚泥の保存の検討では、遠心分離後 -85℃での冷凍保存により、活性をほぼ 100%維持したまま、1 年半以上の保存が可能であることがわかった。これらの検討により、廃水処理施設で不測の事態が生じた際にも、1,4-ジオキサン分解活性を復活させる対応がとれるようになったことになる。実際に平成 24 年 4 月に廃水処理施設の 1,4-ジオキサン除去率が低下した際には、生物処理槽内において 1,4-ジオキサン分解能向上試験を行い、1,4-ジオキサン活性を復活させることに成功しており¹⁴⁾、実効性のある手法であると考えている。

ただし、図 4 のような試験により、高濃度 1,4-ジオキサンで分解能を向上させた活性汚泥の細菌叢を解析すると、1,4-ジオキサン分解菌のうち、*Afipia* 属だけが急激に増加し、実際の廃水処理施設で優占度が高い *Mycobacterium* 属は数倍にしか増加していないことも判明している¹³⁾。今後は、実際の廃水処理施設での処理効率に大きく寄与する 1,4-ジオキサン分解菌を見極め、より効率の良い手法を模索する予定である。

参考文献

- 1) 環境省環境保健部環境リスク評価室：化学物質の環境リスク評価 第 2 巻，2003，150.
- 2) 牧野良次，蒲生昌志，佐藤修之，中西準子：1,4-ジオキサンの下水処理場における除去率について，水環境学会誌，**28**, 3, 2005, 211-215.
- 3) 高木総吉，宮野啓一，小泉義彦，安達史恵，渡邊功，織田肇：大阪府内水道水源および淀川水系における 1,4-ジオキサンレベルの実態調査，環境化学，**16**, 4, 2006, 669-676.
- 4) 小林貴司，小川千春，菅原剛，八柳潤：1,4-ジオキサンを含む埋立処分場浸出水の効率的

な処理に関する検討，第 47 回日本水環境学会講演集，2013，623

- 5) 小林貴司，小川千春，菅原剛，八柳潤：1,4-ジオキサンを含む埋立処分場地下水等の効率的な処理に関する検討，秋田県健康環境センター年報，2012，79-84.
- 6) 小林貴司，岡野邦宏，菅原剛，宮田直幸：1,4-ジオキサン分解能を有する活性汚泥の評価方法の検討，第 48 回日本水環境学会講演集，2014，596
- 7) 小川千春，小林貴司：新規制物質 1,4-ジオキサンの固相抽出及びヘッドスペース分析法の検討，秋田県健康環境センター年報，2010，77-80.
- 8) 小川千春，小林貴司，木口倫：ヘッドスペース GC/MS 法による水中 1,4-ジオキサン分析方法の検討，第 21 回環境化学討論会，2012，697-698.
- 9) Bernhardt D., Diekmann H. : Degradation of dioxane tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 1, 1991, 120-123
- 10) Parales R. E., Adamus J. E., White N., May H. D. : Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture , *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 12, 1994, 4527-4530,
- 11) 三好益美，藤田久雄：1,4-ジオキサンの生物学的処理特性，香川県環境保健センター所報，**8**, 2009, 138-141
- 12) Sei K., Kakinoki T., Inoue D., Soda S., Fujita M., Ike M. : Evaluation of the biodegradation potential of 1,4-dioxane in river , soil and activated sludge samples, *Biodegradation*, **21**, 2010, 585-591
- 13) 岡野邦宏，小林貴司，宮田直幸，尾崎保夫：1,4-ジオキサンを含む埋立浸出水の生物処理における細菌叢解析第 48 回日本水環境学会講演集，2014，66
- 14) 菅原剛，小林貴司，小川千春，八柳潤：1,4-ジオキサン分解能が低下した活性汚泥の処理能力向上の検討，第 23 回環境化学討論会，2014，507-508