

廃水処理施設における 1,4-ジオキサン分解菌の挙動と活性促進因子の探索

産業廃棄物処分場跡地の廃水処理施設から単離された 1,4-ジオキサン分解菌について

村山力則 佐藤 哲 中村淳子 小林貴司

難分解性である 1,4-ジオキサンを効率良く処理している廃水処理施設において、1,4-ジオキサン分解能を有する菌の単離を検討した。集積培養後に単離した菌は、実際の廃水処理に大きく寄与していると考えられるマイコバクテリウム属であった。単離した菌の 1,4-ジオキサン分解能を検討したところ、単独では 1,4-ジオキサンを資化することができず、テトラヒドロフランまたはエタノールとの共存下において 1,4-ジオキサン分解能が発現したため、共代謝により 1,4-ジオキサンを分解する菌と考えられた。

1. はじめに

1,4-ジオキサンは、環境中で難分解性であり、水にも溶剤にも無制限に溶解する¹⁾ため、一般的な廃水処理施設では処理できない^{2,3)}とされていた。ところが、県内の埋立処分場跡地の廃水処理施設では、自然発生した 1,4-ジオキサン分解菌により、非常に効率良く処理されていることがわかり、その処理状況や生物処理槽の細菌叢について、いくつかの報告を行ってきた⁴⁾。細菌叢の解析結果からは、1,4-ジオキサン分解菌のうちマイコバクテリウム属の優占度が常に高く、この菌属が実際の廃水処理に大きく寄与している可能性が高いという結果も得られている。

生物処理槽での 1,4-ジオキサン分解機構を解明し、より安定した処理を実現するために、1,4-ジオキサン分解菌の単離はこれまでも何度か試みてきた。しかし、1,4-ジオキサン分解菌の成長が非常に遅いことや菌を単離すると 1,4-ジオキサン分解能が発現が安定しない等の問題があり、安定した単離・培養をすることができなかった。いくつかの検討を重ねた結果、実際の廃水処理に大きく寄与していると考えられるマイコバクテリウム属について、安定した単離・培養方法を見いだすことができたので、その内容を報告する。

2. 方法

2.1 試薬

富栄養培地には YM (Yeast extract and Malt

extract: YM) 培地を、無機培地には AMS (Ammonium Mineral Salts: AMS) 培地⁵⁾を使用した。寒天培地には Bacto Agar (Difco) 及び Agar, noble (Difco) を使用した。また 1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン (THF)、エタノールは和光純薬工業製の特級を用いた。1,4-ジオキサン分解能を比較した菌 *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190 (以下 CB1190 株) は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研 BRC より提供されたものを用いた。

2.2 試験方法

2.2.1 集積培養と 1,4-ジオキサン分解菌の単離

集積培養は、300 mL バッフル付き三角フラスコ内の AMS 培地 100 mL に、遠沈洗浄した活性汚泥を添加、炭素源として 1,4-ジオキサンを 50 mg/L 及び THF を 0.05% となるように添加し、30℃、250 rpm の好気条件下で約 1 カ月振とうすることで行った。

寒天培地での培養は、1,4-ジオキサン 50 mg/L、THF 0.05% となるように調製したシャーレ上の AMS 寒天培地に、集積培養した液を 10⁻⁴ 倍に希釈し塗布、30℃で約 1 カ月静置することで行った。単離後の培養は、出現した単独コロニーを採取し、YM 寒天培地上で行った。

2.2.2 PCR と相同性検索による菌種同定

単離した菌からの DNA 抽出には QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン)、PCR には GoTaq (プロメガ)、およびサーマルサイクラー (パ

イオラッド)を使用した。PCRの際、16S リボソーム RNA 遺伝子増幅には 127F と 1492R のプライマーセット⁶⁾、*rpoB* 遺伝子増幅には、Myco_rpoB_F: 5'-CGACCACTTCGGGCAACCG-3' と Myco_rpoB_R: 5'-TCGATCGGGCACATCCGG-3' のプライマーセットを用いた。増幅した DNA は電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン)を用いて精製し、DNA シークエンスで得られたリボソーム 16S 遺伝子と *rpoB* 遺伝子の塩基配列から菌種の同定を行った。

2.3 単離した菌の 1,4-ジオキサン分解能試験

2.3.1 炭素源を 1,4-ジオキサンのみとした分解能試験

1,4-ジオキサン分解能試験は、集積培養と同様の試験系において、YM 寒天培地で前培養した菌を、AMS 培地 100 mL に OD₆₆₀ が約 0.05 となるように植菌し、炭素源として 1,4-ジオキサンのみを 50 mg/L となるように添加、振とうし、減少する 1,4-ジオキサン濃度を測定することで行った。1,4-ジオキサン濃度の測定は、ヘッドスペース GC/MS 法により行った⁷⁾。

また比較のため、1994 年に 1,4-ジオキサン分解菌として報告された菌株である CB1190 株を同様に前培養し、1,4-ジオキサン分解能試験を行った。

2.3.2 活性誘導剤を加えた 1,4-ジオキサン分解能試験

1,4-ジオキサンとともに、活性を誘導する炭素源として THF またはエタノールを 0.05% となるように添加し、2.3.1 と同様の分解能試験を行った。

3 結果と考察

3.1 集積培養と 1,4-ジオキサン分解菌の単離

図 1 に集積培養における AMS 培地の濁度変化のグラフを示す。最初に行った集積培養試験では、AMS 培地に炭素源として 1,4-ジオキサンのみを加え培養を試みたが、1 カ月経過後も菌の増殖はまったく見られなかった。そこで、Parales らの報告⁵⁾を参考にし、1,4-ジオキサンとともに THF を炭素源として添加したところ、2 週間ほどで培養液が明らかに白濁し、顕微鏡観察下においても菌の増殖を確認することができた。

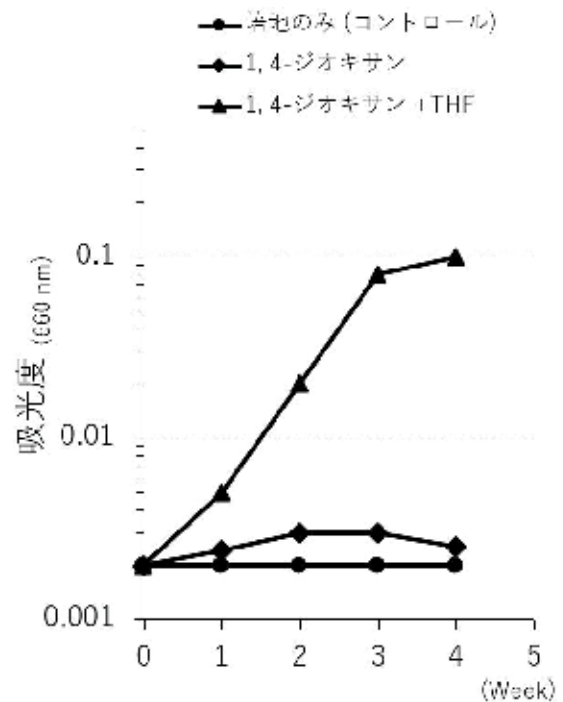


図1 集積培養におけるAMS培地の濁度変化

菌の増殖が確認されたため、集積培養一カ月後の液を 1,4-ジオキサンを含む AMS 寒天培地に塗布し、菌の単離を試みた。プレート上には多数の形態が異なるコロニーが確認されたが、1 週間程度で採取可能なコロニーは、すべて 1,4-ジオキサンを分解する菌ではなかった。本来、寒天培地に含まれる炭素源は、1,4-ジオキサンと THF のみであるが、その他の有機物の影響も疑われたため、寒天培地を純度の高い Agar, Noble に変更した。その結果、長期間の培養が可能となり、1,4-ジオキサンを分解する 3 株を単離することができた。

3.2 単離したジオキサン分解菌の菌種同定

単離した 1,4-ジオキサン分解菌 3 株の 16S リボソーム RNA 遺伝子を BLAST 検索したところ 3 株の DNA 配列は一致しており、GeneBank に登録されているマイコバクテリウム属約 10 種と 99%以上の相同性があった。また、*rpoB* 遺伝子についても BLAST 検索したところ、表 1 に示す 3 種の菌と 99%一致していた。この株の 16S 及び *rpoB* 遺伝子の塩基配列を Genebank へ登録した (Accession No. LC22748 (16S), LC422749 (*rpoB*)). 以降、この株を *Mycobacterium* sp. C8 株と呼ぶ。

表1 単離された1,4-ジオキサン分解菌と最も相同性が高かった既知の*Mycobacterium*属

菌株	由来	文献
<i>Mycobacterium</i> sp. Djl-10	カルペンダジム分解菌	8)
<i>Mycobacterium tokaiense</i>	ネクロシス肉芽腫病原菌	9)
<i>Mycobacterium murale</i>	非結核性抗酸菌	10)

3.3 炭素源を1,4-ジオキサンのみとした分解能試験

図2に炭素源を1,4-ジオキサンのみとした条件での*Mycobacterium* sp. C8株とCB1190株の1,4-ジオキサン分解能試験結果を示す。CB1190株の系では、4日目以降に1,4-ジオキサンの減少が確認され、分解能は10 mg/L/day程度となった。一方*Mycobacterium* sp. C8株の系の減少は、揮発性確認のためのコントロール（菌未接種）と同程度であり、分解菌による1,4-ジオキサンの減少は確認できなかった。CB1190株は1,4-ジオキサンを分解し炭素源とできる資化菌として知られているが、*Mycobacterium* sp. C8株は炭素源を1,4-ジオキサンのみとした条件では、分解能を発現することができなかった。

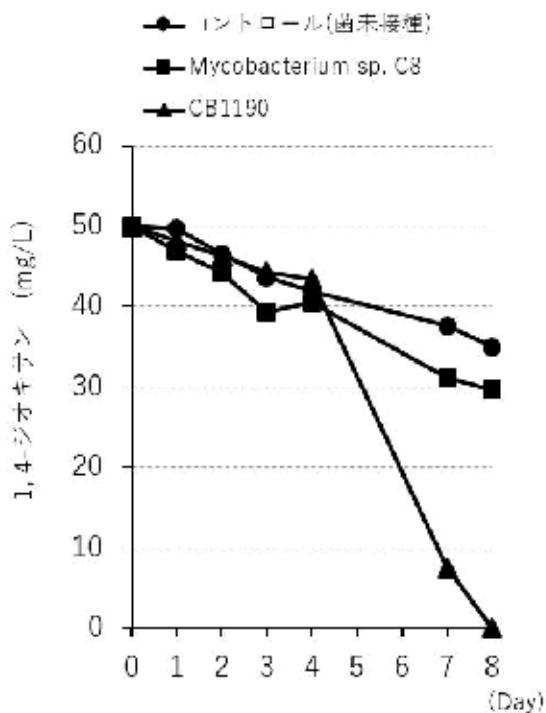


図2 炭素源を1,4-ジオキサンのみとした条件での*Mycobacterium* sp. C8株とCB1190株の1,4-ジオキサン分解能試験

3.4 活性誘導剤を加えた1,4-ジオキサン分解能試験

図3に活性誘導剤を添加した条件での*Mycobacterium* sp. C8株の1,4-ジオキサン分解能試験結果を示す。THFを添加した系では、3日目以降に1,4-ジオキサンの減少が確認され、分解能は8 mg/L/day程度となった。エタノールを添加した系では、2日目以降に1,4-ジオキサンの減少が確認され、分解能は最大20 mg/L/day程度となっており、THFよりもエタノールのほうが1,4-ジオキサン活性を促進する効果が高いという結果を示した。

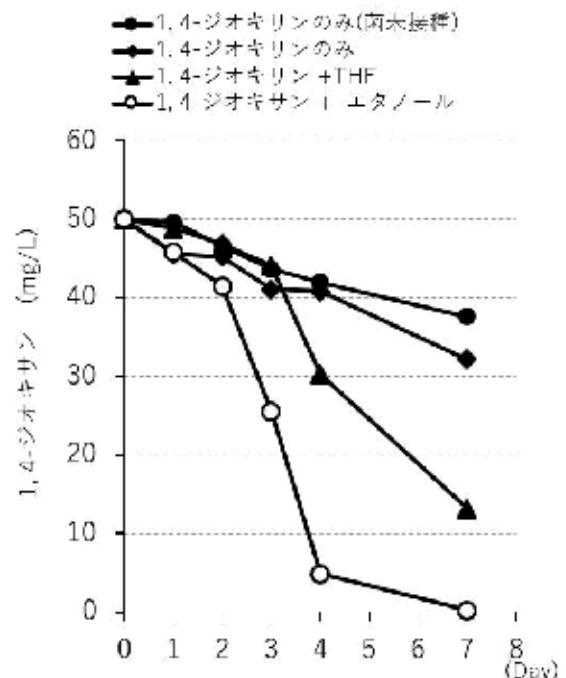


図3 活性誘導剤を添加した条件での*Mycobacterium* sp. C8株の1,4-ジオキサン分解能試験

図4にこの試験での濁度変化のグラフを示す。THFまたはエタノールを添加した系ともに、約3日目で濁度は最大となった。濁度の最大値はTHFよりエタノールの系が大きくなっており、菌体の増加量においてもエタノールのほうが効果は高いという結果が得られた。

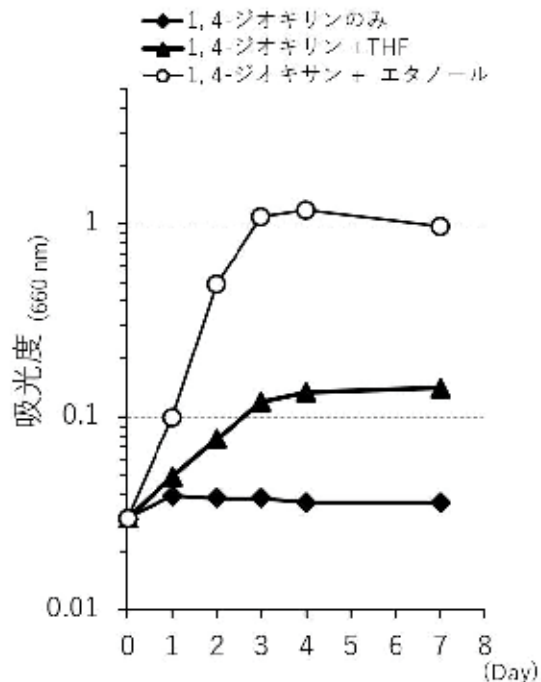


図4 活性誘導剤を添加した1,4-ジオキサン分解能試験における濁度変化

4. まとめ

産業廃棄物処分場跡地から浸出する1,4-ジオキサンを特異的に効率良く処理している廃水処理施設において、実際の廃水処理に大きく寄与していると考えられる *Mycobacterium* sp. C8 株の単離及び単離後の安定した培養方法を見出すことができた。単離した *Mycobacterium* sp. C8 株は、単独で1,4-ジオキサンを資化することができず、THF またはエタノールという他の炭素源を必要としたことから、共代謝により1,4-ジオキサンを分解していると考えられるが、その代謝機構など詳しいことはわかっていない。

今後は、THF、エタノール以外の活性促進物質または逆に分解を阻害する物質等を検討し、*Mycobacterium* sp. C8 株の特性を明らかにすることで、より安定した1,4-ジオキサン廃水処理の実現を目指す予定である。

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) 牧野良次ら: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) 高木総吉ら: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) 岡野邦宏ら: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.
- 5) Parales RE., et. al.: Degradation of 1, 4-dioxane by an actinomycete in pure culture, Appl. Environ. Microbiol., **60**,1994, 4527-4530.
- 6) Lane DJ.: 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E. and Goodfellow M., eds.: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, John Wiley & Sons, New York, 1991, 115-175.
- 7) 小川ら: 新規規制物質 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, **6**, 2010, 77-80.
- 8) Zhang J., et. al.: Complete Genome Sequence of Carbendazim-Degrading *Mycobacterium* sp. Strain djl-10, Genome Announc., **5**, 2017, e01683-16.
- 9) Kondo A., et. al.: Caseous necrotic granuloma in the pituitary stalk due to nontuberculous *Mycobacteria* (*Mycobacterium tokaiense*) infection case report, Neurol. Med. Chir (Tokyo), **46**, 2006, 80-3.
- 10) Vuorio R., et. al.: A new rapidly growing mycobacterial species, *Mycobacterium murale* sp. nov., isolated from the indoor walls of a children's day care centre, Int. J. Syst. Bacteriol., **49**, 1999, 25-35.