

令和元年度（第14回）秋田県健康環境センター研究発表会抄録

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（平成27～30年度）

産業廃棄物処分場跡地の廃水処理施設の活性汚泥から単離した 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

1. はじめに

1,4-ジオキサンは、水にも溶剤にも無制限に溶解し、かつ難分解性のため、一般的な廃水処理施設では処理できない物質である。ところが、県内の埋立処分場跡地の廃水処理施設では、自然に増殖した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おり、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。このうち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¹⁾。

この特異的に効率良く1,4-ジオキサン処理されている生物処理槽での分解機構を解明するために、分解菌の単離を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-ジオキサンを分解しなくなる等の問題があり、安定した単離・培養をすることができていなかった。今回、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の単離・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 集積培養と1,4-ジオキサン分解菌の単離

炭素源として1,4-ジオキサンとTHF（テトラヒドロフラン）を添加した無機培地に、少量の活性汚泥を懸濁し、集積培養した。菌の増殖を確認後、培養液を無機寒天培地に塗布し、出現した単独コロニーを採取し、有機寒天培地上で単離した。

2.2 単離した菌の1,4-ジオキサン分解能試験

有機寒天培地で前培養した菌を無機培地に植菌し、添加した1,4-ジオキサン濃度の減少速度

により分解能を評価した。1,4-ジオキサン濃度はヘッドスペースGC/MS法により測定した。

3. 結果

3.1 集積培養と1,4-ジオキサン分解菌の単離

はじめに行った集積培養試験では、無機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。次に、Paralesらの報告²⁾を参考にし、1,4-ジオキサンとともにTHFを炭素源とする試験を行った。2週間ほどで培養液が明らかに白濁し、菌の増殖を確認することができた。

菌を単離するため、集積培養一カ月で増殖した菌液を無機寒天培地に塗布し、プレート上で観察を行った。1週間程度で多数の形態が異なるコロニーが確認されたが、1週間で採取可能なコロニーは、すべて1,4-ジオキサン分解菌ではなかった。1,4-ジオキサン分解菌は成長が遅い菌であり、成長の早いその他の菌に埋もれている状態と考えられた。

長期間の培養に対応するため、1,4-ジオキサン以外の炭素源を極力含まないように試薬や試験方法を改良した。その結果、コロニーの数は少なくなり成長の遅い1,4-ジオキサン分解菌を3株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遺伝子のDNA配列は全て一致しており、同じマイコバクテリウム属と考えられた。以降、この単離した1,4-ジオキサン分解菌を*Mycobacterium* sp. C8株とした。

3.3 炭素源を1,4-ジオキサンのみとした分解能試験

単離した*Mycobacterium* sp. C8株と市販されて

いる 1,4-ジオキサン分解菌 *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190 株の 2 種類で 1,4-ジオキサン分解能試験を行い、比較した。その結果を図 1 に示す。CB1190 株では、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 程度であった。一方 *Mycobacterium sp.* C8 株では、分解菌による 1,4-ジオキサンの有意な減少は確認できなかった。

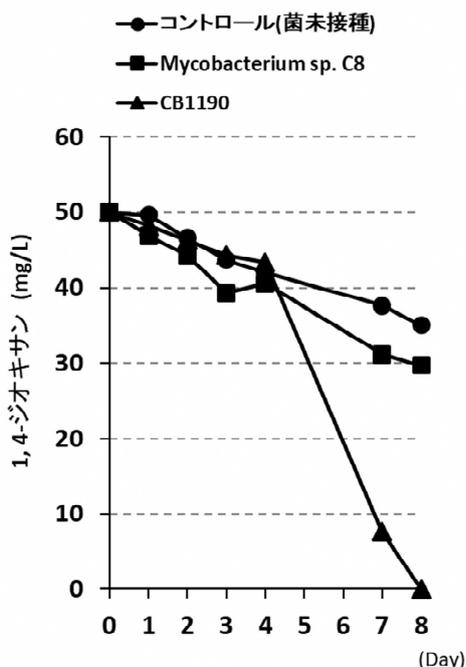


図 1 炭素源を 1,4-ジオキサンのみとした条件での *Mycobacterium sp.* C8 株と B1190 株の 1,4-ジオキサン分解能試験

3.4 活性誘導剤を加えた 1,4-ジオキサン分解能試験

炭素源を 1,4-ジオキサンのみとした試験では *Mycobacterium sp.* C8 株の 1,4-ジオキサン分解能が発現しなかったため、活性を誘導するために THF またはエタノールを活性誘導剤として添加した 1,4-ジオキサン分解能試験を行った。その結果を図 2 に示す。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 日目以降から 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 程度となった。現在、確認できている活性誘導剤のうち、エタノールのほうが THF よりも 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ている。

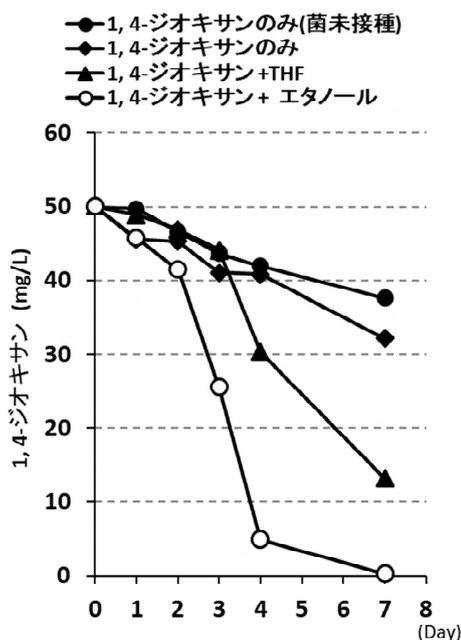


図 2 活性誘導剤を添加した条件での *Mycobacterium sp.* C8 株の 1,4-ジオキサン分解能試験

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いだすことができた。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

- 岡野邦宏, 他: 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.
- Parales RE., et. al.: Degradation of 1, 4-dioxane by an actinomycete in pure culture, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1994, 4527-4530.