

令和元年5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12624

研究課題名（和文）1,4-ジオキサン分解菌と特異的活性化剤を活用した汚染地下水の生物浄化技術の開発

研究課題名（英文）Bioremediation of 1,4-dioxane-contaminated groundwater using 1,4-dioxane-degrading bacteria and their specific stimulants

研究代表者

池 道彦（IKE, Michihiko）

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：40222856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、1,4-ジオキサン汚染地下水の効率的な浄化を達成するバイオレメディエーション技術の基礎を確立することを目指し、環境中において1,4-ジオキサン分解菌の浄化活性を特異的に維持する活性化剤の探索を試みた。その結果、ジエチレングリコールが既知の1,4-ジオキサン分解菌の特異的増殖基質であること、また、テトラヒドロフランが多様な微生物群の共存下で1,4-ジオキサン分解菌を集積し分解能を向上させるために有効な基質であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各地で地下水汚染が顕在化しつつある1,4-ジオキサンに対する実用的な浄化技術の開発は喫緊の課題である。本研究では、効率的かつ低コストな新たな浄化技術になり得ると期待される分解菌を活用したバイオレメディエーションに着目し、1,4-ジオキサン分解菌の特異的増殖及び環境中からの集積に有望な炭素源を見出すことができた。本研究の成果は、1,4-ジオキサン分解菌の生物学的特性の理解深化や環境中における1,4-ジオキサン分解菌の合理的制御法の確立に資する基礎的知見であり、学術的にも社会的にも重要な意義を有している。

研究成果の概要（英文）：This study attempted to explore specific stimulants for 1,4-dioxane-degrading bacteria present in the environment, as a fundamental study for developing efficient bioremediation technology for 1,4-dioxane-contaminated groundwater. The results obtained in this study clarified that diethylene glycol is a specific growth substrate for known 1,4-dioxane-degrading bacterial strains, and that tetrahydrofuran can enrich 1,4-dioxane-degrading bacteria among diverse environmental bacteria and resultantly enhance the 1,4-dioxane-degrading ability.

研究分野：生物環境工学

キーワード：1,4-ジオキサン バイオレメディエーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1,4-ジオキサンは、主に有機合成反応溶剤として、化学工業等において広く使用されている環状エーテル化合物である。また、エチレンオキサイドやエチレングリコール、界面活性剤の製造過程において非意図的かつ不可避免的に生成される副産物でもある。一方、1,4-ジオキサンは、生物に対して急性毒性および慢性毒性を有する上、国際がん研究機関 (IARC) においてグループ 2B に分類され、ヒトに対する発がん性が疑われている。さらに、物理化学的に極めて安定であることから加水分解や光分解を受けず、また、一般的に生物難分解性であることから、一度環境中に放出されると長期にわたり水相部に残留する可能性がある。そのため、2003 年には世界保健機関 (WHO) により飲料水水質ガイドラインが設定され、日本では、2004 年に水道水質基準 (0.05 mg/L)、2009 年に水質環境基準および地下水環境基準 (0.05 mg/L) がそれぞれ定められたが、廃棄物最終処分場の浸出水や産業廃棄物不法投棄現場の地下水において汚染が顕在化しており、その汚染の浄化が重要な課題である。

しかし、1,4-ジオキサンは極めて安定な物性を有するために現存する浄化技術のほとんどが除去効果を示さない。また、オゾン処理等の複数の酸化処理を組み合わせた促進酸化法において唯一明確な除去効果が認められているが、非常に高コストかつ高エネルギー消費である上、フミン質等の被酸化物質が共存する地下水においては、酸化剤が無効消費されるため、除去効率が大幅に低下してしまう。これらのことから、現状では現実的に適用可能な浄化技術がなく、除去効果と経済性の両面で有効な、新たな浄化技術の開発が急務である。

他方、近年では、一般的に生物難分解性とされる 1,4-ジオキサンを分解可能な微生物が国内外で複数分離され、1,4-ジオキサンの生分解経路や分解に関与する遺伝子・酵素も徐々に明らかにされてきている。これらの新たな知見から、1,4-ジオキサン分解菌を活用したバイオレメディエーションが低コストかつ効率的な浄化技術になり得ると期待されている。一般に、バイオレメディエーションを達成するためには、多種多様な土着微生物が存在する環境下において浄化微生物を特異的に制御し、浄化活性を維持することが最も重要なポイントとなるが、現状では 1,4-ジオキサン分解菌の特異的活性化については検討例がみられない。

### 2. 研究の目的

上で述べた背景から、本研究では、1,4-ジオキサン汚染の効率的な浄化を達成するバイオレメディエーション技術の基礎を確立することを目指し、環境中において 1,4-ジオキサン分解菌の浄化活性を特異的に維持する活性化剤の探索することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 1,4-ジオキサン分解菌の炭素源資化性の評価

1,4-ジオキサン分解菌を特異的に活性化する炭素源を見出すため、まず、7 種類の 1,4-ジオキサン分解菌 (*Mycobacterium* sp. D6、*Mycobacterium* sp. D11、*Pseudonocardia* sp. D17、*Pseudonocardia* sp. N23、*Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190、*Rhodococcus* sp. T1、*Rhodococcus aetherivorans* JCM 14343) を用いて、13 種類の炭素源 (1,4-ジオキサン、グリオキシル酸、グリコール酸、グリオキサール、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、1,4-ブタンジオール、1-ブタノール、フェノール、テトラヒドロフラン、グルコース、酢酸) の資化性を調査した。これらは、一般的に微生物に利用されやすい炭素源 (グルコース、酢酸) の他、1,4-ジオキサン分解の中間代謝物とその関連物質、1,4-ジオキサンの構造類似物質などを含んでいる。前培養した各 1,4-ジオキサン分解菌を、各炭素源を添加した無機塩培地に接種し、7 日間の回転振盪培養による菌体乾燥重量 (TSS) の増加と溶存有機性炭素 (DOC) 濃度の減少に基づき、炭素源の資化性を評価した。また、1,4-ジオキサン分解菌による炭素源資化性の特徴を明らかにするための比較対照として、幅広い炭素源を資化可能な活性汚泥を用いた。

また、特異的増殖基質となり得ることが見出された炭素源を対象として、それらで培養した *Mycobacterium* sp. D6 及び *Pseudonocardia* sp. D17 を用い、1,4-ジオキサンで培養した菌体との 1,4-ジオキサン分解活性の比較により、特異的増殖基質の 1,4-ジオキサン分解活性に対する効果を検討した。

#### (2) 環境中の 1,4-ジオキサン分解菌の集積・優占化に利用可能な炭素源の探索

1,4-ジオキサン分解が環状エーテル結合を開裂する特殊な分解経路で行われることに着目し、6 種類の炭素源 (1,4-ジオキサン、テトラヒドロフラン、1,3,5-トリオキサン、エチレングリコール、ジエチレングリコール、1,4-ブタンジオール) を用いて、環境中に生息する 1,4-ジオキサン分解菌の集積・優占化の可能性について検討した。ここでは、廃棄物最終処分場の浸出水処理施設から採取した懸濁物質、及び都市下水処理場の活性汚泥を接種源として用いた。各炭素源を添加した無機塩培地に接種源を投入して連続回分式で集積培養を行い、集積中の培養液を用いて 1,4-ジオキサン分解試験を実施することにより、1,4-ジオキサン分解菌の集積状況を評価した。さらに、16S rRNA 遺伝子及び可溶性鉄 (II) モノオキシゲナーゼ (SDIMO) 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析を行い、集積過程における全細菌群及び SDIMO 保有細菌群の構成の遷移を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 1,4-ジオキサン分解菌の特異的増殖基質

7種類の1,4-ジオキサン分解菌及び活性汚泥による炭素源13種の資化性を表1に示す。検討した13種の炭素源の内、グリオキシル酸、グリコール酸、エチレングリコール、フェノール、1,4-ブタンジオール、1-ブタノール、グルコース、及び酢酸は、活性汚泥により資化されることが確認されたことから、環境微生物により非特異的に資化されるものと考えられた。一方、ジエチレングリコールは、*P. dioxanivorans* CB1190、*R. aetherivorans* JCM 14343には資化されなかったが、他の1,4-ジオキサン分解菌はすべて資化することができ、特に *Mycobacterium* sp. D6と *Pseudonocardia* sp. D17において良好な増殖が確認された。また、トリエチレングリコール及びグリオキサールは、それぞれ *Mycobacterium* sp. D11及び *R. aetherivorans* JCM 14343でのみ資化が認められ、他の1,4-ジオキサン分解菌及び活性汚泥には資化されなかった。以上の結果から、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール及びグリオキサールにより1,4-ジオキサン分解菌の特異的増殖が可能であり、中でもジエチレングリコールが多様な1,4-ジオキサン分解菌の特異的増殖に有効であることが見出された。

そこで、次に、ジエチレングリコール及び1,4-ジオキサンで培養した *Mycobacterium* sp. D6及び *Pseudonocardia* sp. D17による1,4-ジオキサン分解活性について検討した。その結果、いずれの菌株においても、ジエチレングリコールで培養した場合にも1,4-ジオキサンを分解可能であったが、1,4-ジオキサンで培養した場合に比べて分解が遅かった。このことから、ジエチレングリコールによって特異的増殖させた1,4-ジオキサン分解菌の分解酵素の誘導・活性化について、さらなる検討が必要であると考えられた。

表1 1,4-ジオキサン分解菌及び活性汚泥による炭素源13種の資化性

	CB1190	D17	JCM14343	N23	D6	D11	T1	活性汚泥
1,4-ジオキサン	+	++	+	++	-	+	+	-
グリオキシル酸	-	-	-	+	++	+	+	++
グリコール酸	-	+	-	++	++	+	++	++
グリオキサール	++	-	+	-	-	-	-	-
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	-	-	-	-	-	+	-	-
1,4-ブタンジオール	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
1-ブタノール	++	++	++	++	++	++	++	++
フェノール	+++	-	+++	-	-	-	++	++
テトラヒドロフラン	-	-	-	-	-	-	-	-
グルコース	+	+++	+++	++	+++	++	++	+++
酢酸	+++	++	+++	++	++	++	++	++

+++ : DOC 減少 50mg/L 以上かつ TSS 増加 100mg/L 以上

++ : DOC 減少 25mg/L 以上かつ TSS 増加 50mg/L 以上

+ : DOC 減少 10mg/L 以上かつ TSS 増加 20mg/L 以上

- : DOC 減少 10mg/L 未満または TSS 増加 20mg/L 未満

##### (2) 環境中の1,4-ジオキサン分解菌の集積・優占化に利用可能な炭素源の探索

廃棄物最終処分場浸出水中の懸濁物質を植種源とし、6種類の炭素源を用いて集積培養を実施したところ、1,3,5-トリオキサンでは集積培養終了時まで分解は見られなかったが、エチレングリコール、ジエチレングリコール、1,4-ブタンジオールでは1回目の回分培養、1,4-ジオキサン及びテトラヒドロフランではそれぞれ6回目及び3回目の回分培養から分解が見られるようになり、各炭素源を資化可能な微生物の集積が示唆された。集積過程の培養液を用いて1,4-ジオキサン分解能を評価したところ、エチレングリコール、ジエチレングリコール、1,4-ブタンジオールを用いた集積培養系では、植種源よりも1,4-ジオキサン分解能が低くなることが観察され、1,4-ジオキサン分解能をもたない微生物が優占化することで1,4-ジオキサン分解能の悪化・喪失につながったものと考えられた。一方、1,4-ジオキサンあるいはテトラヒドロフランを用いた集積培養系においては、集積に伴って1,4-ジオキサン分解能が向上することが観察され(図1)、1,4-ジオキサン分解菌の集積・優占化が示唆された。また、SDIMO 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析の結果から、1,4-ジオキサン及びテトラヒドロフランを用いた集積培養系では、特定のSDIMO 遺伝子が顕著に優占化していることが確認された。

そこで、テトラヒドロフランによる1,4-ジオキサン分解菌集積の汎用性を明らかにするため、都市下水処理場より採取した活性汚泥を植種源に用い、同様に集積培養を実施した。その結果、上述の検討と同様に、テトラヒドロフランを用いた集積培養系において1,4-ジオキサン分解能

の向上が観察されたことから、テトラヒドロフランが環境中の1,4-ジオキサン分解菌集積に有効な炭素源であることが示唆された。しかし、活性汚泥集積培養を継続すると、1,4-ジオキサン分解能が低下することが観察された。また、16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスによる微生物叢解析の結果、その時期に1,4-ジオキサン分解能をもたないと推測される細菌群が優占化することが確認された。以上のことから、詳細なメカニズム解明には至らなかったものの、非1,4-ジオキサン分解菌との共生が集積培養系の1,4-ジオキサン分解能の低下につながったものと推察された。すなわち、地下水浄化において想定される複合微生物群集内において1,4-ジオキサン分解能を安定して発揮させるためには、1,4-ジオキサン分解菌の優占化・活性化のみに着目して制御するのではなく、非1,4-ジオキサン分解菌との共生関係も踏まえて制御を行うことが重要であることが示唆された。

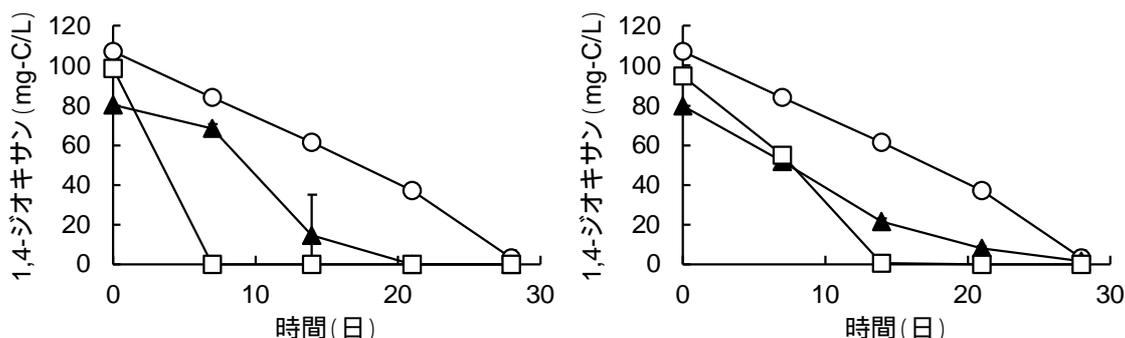


図1 廃棄物最終処分場浸出水の懸濁物質を植種源とし、1,4-ジオキサン(左)及びテトラヒドロフラン(右)を炭素源として集積した微生物群集による1,4-ジオキサン分解。凡例：○, 植種源；□, 回分培養4回目；▲, 回分培養8回目。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Norifumi Yamamoto, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Yuji Saito, Michihiko Ike. Field test of on-site treatment of 1,4-dioxane-contaminated groundwater using *Pseudonocardia* sp. D17. *Journal of Water and Environment Technology*, 査読有, 16, 256-268 (2018).  
DOI: 10.2965/jwet.18-033

### 〔学会発表〕(計 12 件)

好川拓実, 奥村拓也, 井上大介, 矢吹芳教, 大福高史, 池道彦. 固定化担体法を用いた1,4-ジオキサン含有浸出水の生物学的処理に関する基礎的検討. 第53回日本水環境学会年会 (2019)

Daisuke Inoue, Kazuki Hisada, Takuya Okumura, Yoshinori Yabuki, Gen Yoshida, Masashi Kuroda, Michihiko Ike. Exploring carbon sources that enable enrichment of 1,4-dioxane-degrading bacteria in landfill leachate. The 10th Annual Conference of the Challenges in Environmental Science and Engineering (2018)

井上大介, 奥村拓也, 矢吹芳教, 吉田弦, 黒田真史, 池道彦. 最終処分場浸出水からの1,4-ジオキサン分解菌の集積および集積系の微生物叢の解析. 日本水処理生物学会第55回大会 (2018)

奥村拓也, 久田一輝, 矢吹芳教, 吉田弦, 井上大介, 池道彦. 環状・直鎖状エーテルおよびそれらの中間代謝物を用いた廃棄物最終処分場浸出水中の1,4-ジオキサン分解菌の集積. 第29回廃棄物資源循環学会研究発表会 (2018)

大久保忠相, 井上大介, 山本哲史, 黒田真史, 池道彦. 排水中の有機共存物質が *Pseudonocardia* sp. N23 株の1,4-ジオキサン分解に与える影響の評価. 第70回日本生物工学会大会 (2018)

Norifumi Yamamoto, Daisuke Inoue, Kazunari Sei, Yuji Saito, Michihiko Ike. Field test of on-site treatment of 1,4-dioxane-contaminated groundwater by bioreactor using *Pseudonocardia* sp. D17. *Water and Environment Technology Conference 2018* (2018)

奥村拓也, 久田一輝, 井上大介, 矢吹芳教, 吉田弦, 黒田真史, 池道彦. 担体を用いた埋立処分場浸出水中の1,4-ジオキサン分解菌の集積. 第52回日本水環境学会年会 (2018)

久田一輝, 奥村拓也, 井上大介, 黒田真史, 池道彦. 1,4-ジオキサン含有浸出水のバイオスティミュレーション技術の検討. 日本水処理生物学会第54回大会 (2017)

Kazuki Hisada, Masatoshi Nakazawa, Keito Koike, Takuya Okumura, Masashi Kuroda, Daisuke Inoue, Norifumi Yamamoto, Michihiko Ike. Effects of coexistence of other

organic chemicals on biodegradation of 1,4-dioxane by three different 1,4-dioxane-degrading bacteria. The 10th Advanced Engineering Technology for Environment and Energy-Environment, Energy and Sustainable Development (2017)  
奥村拓也, 矢吹芳教, 吉田弦, 黒田真史, 池道彦. 埋立処分場浸出水プロセスからの 1,4-ジオキサン分解微生物の探索. 第 17 回環境技術学会年次大会 (2017)  
久田一輝, 小池至人, 黒田真史, 山本哲史, 井上大介, 清和成, 池道彦. ジエチレングリコールによる 1,4-ジオキサン分解細菌の特異的培養. 第 51 回日本水環境学会年会 (2017)  
小池至人, 久田一輝, 黒田真史, 池道彦, 角田翼, 井上大介, 清和成, 山本哲史. 1,4-ジオキサン分解細菌の炭素資化能評価. 第 68 回日本生物工学会大会 (2016)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：惣田 訓

ローマ字氏名：(SODA, Satoshi)

所属研究機関名：立命館大学

部局名：理工学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 30322176

研究分担者氏名：井上 大介

ローマ字氏名：(INOUE, Daisuke)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 70448091

研究分担者氏名：黒田 真史

ローマ字氏名：(Kuroda, Masashi)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 20511786