



Title	Pseudonocardia sp. N23の1,4-ジオキサン分解特性及び産業排水処理への応用に関する研究
Author(s)	山本, 哲史
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/69592">https://doi.org/10.18910/69592</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

*Pseudonocardia* sp. N23 の  
1, 4-ジオキサン分解特性及び産業排水処理への  
応用に関する研究

山本 哲史

2018 年 1 月

大阪大学大学院 工学研究科  
環境・エネルギー工学専攻



## 目次

---

緒論	1
第1章 1, 4-ジオキサン含有排水の処理技術に関する既往研究	6
第1節 緒言	
第2節 既往の排水処理技術による 1,4-ジオキサンの処理性能	
第3節 1,4-ジオキサン分解菌とその分解関与遺伝子群に関する既往研究	
第4節 1,4-ジオキサン分解菌を用いた生物学的処理に関する既往研究	
第5節 要約	
第2章 1, 4-ジオキサン分解菌の単離と特徴付け	17
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験結果及び考察	
第4節 要約	
第3章 <i>Pseudonocardia</i> sp. N23 の 1, 4-ジオキサン分解特性	32
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験結果及び考察	
第4節 要約	
第4章 <i>Pseudonocardia</i> sp. N23 を用いた排水処理技術の確立	44
第1節 緒言	
第2節 実験材料及び方法	
第3節 実験結果及び考察	
第4節 要約	
総括並びに結論	57
参考文献	60
謝辞	66
本論文に関する報文	67



## 緒論

---

1,4-ジオキサン（DX）は、酸素原子を対称位に含む環状エーテル物質であり（図 0-1）、抽出・反応溶媒や洗浄剤として様々な工業用途に使用されている。その製造国は、主に米国、ドイツや日本などの先進国であり、1991 年における全世界の推定生産量は 10000～20000t に上る（NICNAS, 1998）。一方で、DX は、エチレンオキサイド（EO）、エチレングリコール（EG）、ポリエチレンテレフタレート（PET）及びアルキルエーテルサルフェート（AES）などの化成品の製造過程において非意図的に生成し（Popoola, 1991; 細見, 2011）、その発生量は年間約 2t となると試算されている（NICNAS, 1998）。

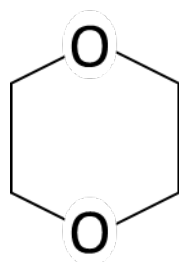


図 0-1 DX の化学構造

DX の物理化学的特性を表 0-1 に示す。DX は、各種有機溶剤だけでなく、水に対しても溶解し易い化学物質である。その蒸気圧及びヘンリー定数（25℃）は、身近な有機溶媒であるエタノール（59 mmHg,  $5.2 \times 10^{-6}$  atm $\times$ m<sup>3</sup>/mol）と比べて低く、また、沸点が水と同程度であることから、水に溶解した DX は大気中に揮発しにくい。また、オクタノール/水分配係数及び土壌吸着定数は低い値であるため、高い親水性を示し、土壌等の固体への吸着・濃縮はほとんど生じないものと考えられる。さらに、DX は、加水分解や生物分解を受けにくいことから、水に溶解した状態では安定的な化学物質であることが報告されている（EC, 2002; 中西ら, 2005）。これらの物理化学的特性から、DX が自然環境中に放出されると、水環境に広く拡散し長期的に残留するものと考えられる。実際に、国内外における河川や地下水、埋立処分場の浸出水等から DX が検出されており（Lesage *et al.*, 1990; Yasuhara *et al.*, 2003; 西野ら, 2008; Mohr, 2010, Stepien *et al.*, 2014）、これらの中には、地下水を通じて数 km 先まで DX が拡散した報告事例もある。

表 0-1 DX の物理化学的特性

項目	数値	参考文献
分子量	88.1 g/mol	日本産業衛生学会, 2015
融点	12°C	EC, 2002
沸点	101°C	EC, 2002
蒸気圧 (25°C)	37 mmHg	日本産業衛生学会, 2015
ヘンリー定数 (25°C)	$4.80 \times 10^{-6} \text{ atm} \times \text{m}^3/\text{mol}$	中西ら, 2005; Sander, 2015
オクタノール/水分配係数 (Log $K_{ow}$ )	-0.42 - -0.27	中西ら, 2005
土壌吸着定数 (Log $K_{oc}$ )	0.54	Stepien <i>et al.</i> , 2014

DX によるヒトや生物に対する有害性としては、急性及び慢性毒性が認められている。さらに、DX を含む飲水をラット等に投与した動物試験の結果、確実に発がん性を示すことが示され(中西ら, 2005)、国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer: IARC) により、ヒトに対しても発がん性を示す可能性のあるグループ 2B に分類されている (IARC, 2012)。このため、世界保健機関 (World Health Organization: WHO) は、2003 年に DX を飲料水水質ガイドラインに追加した (ガイドライン値: 0.05 mg/L)。また、これを受けて、我が国でも 2004 年に水道水質基準項目、2009 年に水質環境基準項目に追加された (いずれも基準値 0.05 mg/L)。さらに、2012 年には、汚染原因となり得る事業所排水に対して DX の一律排水基準 (基準値 0.5 mg/L) が定められたが、経済的かつ高効率な処理技術が未確立であることから、特定の業種においては暫定排水基準が設けられた (表 0-2)。一部の業種では、暫定基準の適用期間を終了し一律排水基準に移行しているが、EO 及び EG 製造業においては現在も暫定排水基準 (6 mg/L) が適用されている。

表 0-2 DX の暫定排水基準値と適用期間

業種	暫定基準値	適用期間
感光性樹脂製造業	200 mg/L	2015 年 5 月 24 日 (適用期間終了)
EO・EG 製造業	6 mg/L	2018 年 5 月 24 日
PET 製造業	2 mg/L	2014 年 5 月 24 日 (適用期間終了)
下水道業	25 mg/L	2015 年 5 月 24 日 (適用期間終了)

我が国では、有害化学物質における環境中への排出量を把握するために、「特定化学物質の環境中への排出量の把握等及び管理の改善促進に関する法律 (PRTR 法)」が 1991 年に制度化され、特定の事業所ごとに対象となる化学物質の排出量を集計している。DX は、2001

年度から対象物質に追加され、2015 年度における環境中への排出・移動量の合計は 772t と推計されている（経済産業省, 2017）。表 0-3 に主な業種における DX の排出量及び移動量を示す。DX の排出量及び移動量は、化学工業が最も高く、また、医薬品製造業や飲料品製造業においても高い値を示している。また、Abe（1999）や庄司と安部（2001）の既往研究では、これらの業種における排水中の DX 濃度を調査した結果として、一部の事業では、約 100 mg/L の DX を含む産業排水が発生していることが示されている。さらに、DX 含有排水には、1,3-ジオキソラン等の多様な環状エーテル物質や EG、微量の界面活性剤を含有することが明らかとなっていることから（Adams *et al.*, 1994; 庄司と安部, 2001; Kim *et al.*, 2016）、これらの共存物質存在下においても安定的に DX を除去できる排水処理技術の確立が求められる。

表 0-3 2015 年度における各業種からの DX 排出・移動量※（単位：t）

業種	(A) 排出量 <sup>1)</sup>	(B) 移動量 <sup>2)</sup>	(A) + (B)
化学工業	46.1	626.3	672.4
医薬品製造業	3.1	30.6	33.7
食料品製造業	0.0	30.2	30.2
下水道業	12.8	0.0	12.8
金属製品製造業	6.7	4.7	11.4
繊維工業	5.1	1.5	6.6
電気機械器具製造業	0.5	0.8	1.3
プラスチック製品製造業	1.3	0.2	1.5
パルプ・紙・紙加工品製造業	1.1	0.0	1.1
合計	76.7	694.3	771.0

※年間 1t 以上の DX を排出する業種における集計値

- 1) 大気及び水域への排出量の合計（土壌及び埋立への排出量は排出は 0 t）
- 2) 下水道及び廃棄物への移動量の合計

既往研究において様々な DX の分解・除去技術の検討がなされているが、現状では、DX 含有排水の処理に実用可能な手法の確立には至っていない。上述のとおり、DX は、水との親和性が高く、揮発性及び生分解性が低いため、従来の主要な排水処理手法である活性汚泥法、曝気法及び凝集沈殿法では除去することができない（McGuire *et al.*, 1978; 稲森ら, 1999; 庄司と安部, 2001; 牧野ら, 2005）。また、一般的に上水処理に用いられる活性炭吸着法や逆浸透膜法では、一定の除去効果が確認されているものの、低濃度の DX 排水では処理効率が低いことから（森田, 2004; 久保と藤田, 2005; Fukuhara *et al.*, 2011）、実用的な手法とは言い難い。また、オゾンや過酸化水素等の複数の酸化剤を用いる促進酸化法（Advanced Oxidation



Processes : AOP) は、処理に有効であるとされているが (Stefan *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2006; Kishimoto *et al.*, 2008)、基本的に極めて高コストで、エネルギー消費も大きいという問題がある。さらに、AOP は、DX 含有排水中に他の有機物が共存する場合には処理性能が大幅に低下する等 (Adams *et al.*, 1994; Kosaka *et al.*, 2000)、必ずしも現実的な選択肢となっているとは言えない。

上述したように DX は、生物分解しにくい物質であると位置づけられ、我が国における「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律 (化審法)」に基づく好気的生分解度試験においてもその分解率が 0%であったことから ((独) 製品評価技術基盤機構)、微生物による分解は期待できないものと考えられていた。しかしながら、近年になって DX を単一炭素源として増殖する微生物 (DX 資化菌) がいくつか報告され (Parales *et al.*, 1994; Mahendra and Alvarez-Cohen., 2006; Kim *et al.*, 2009; Sei *et al.*, 2013a, Pugazhendi *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2014; Matsui *et al.*, 2016, Inoue *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016)、これらの分解菌を活用した生物学的処理の可能性が見出されつつある。生物学的処理は、一般的に物理化学的処理に比べ低コストであり、また生物反応は化学反応に比べて特異的であるため、他の有機物の共存下でも十分な処理効果が発揮される可能性があることから、DX 含有排水の処理に現実的な選択肢となり得るものと考えられる。

DX 資化菌には、分解酵素の誘導に必要な誘導型資化菌と、分解酵素を常に生産している構成型資化菌が存在する (Sei *et al.*, 2013a)。特に誘導型資化菌である *Afipia* sp. D1 は、既報告の分解菌の中で最も優れた分解能力 (最大比分解速度 : 2.63 mg-DX/mg-proten/h) を有している (Sei *et al.*, 2013a)。しかしながら、誘導型資化菌は、DX が数 mg/L の比較的低濃度になると分解酵素の誘導がされなくなり、分解が停止する可能性が報告されており (Isaka *et al.*, 2016a,b)、流入負荷が低い、あるいは変動する排水の処理には不向きである。一方、構成型資化菌は、DX 含有排水の流入負荷変動や間欠的な流入に対して対応可能であるとともに、誘導型資化菌が対応できない低濃度域の DX でも分解可能であると考えられており (Isaka *et al.*, 2016b, 池と黒田, 2017)、排水処理により適した生物触媒といえる。これまでに構成型資化菌としては、*Mycobacterium* sp. D6、*Pseudonocardia* sp. D17 及び *Xanthobacter flavus* DT8 の 3 菌株が報告されているが (Sei *et al.* 2013a; Chen *et al.*, 2016)、それらの DX の分解能力は、*Afipia* sp. D1 の最大比分解速度の 40%未満にとどまる。また、既往の構成型資化菌は、限られた pH 域及び温度域においてのみ高い DX 分解速度を示し、これらの至適域以外ではその活性は著しく低下することも知られている (Jin *et al.*, 2012; Sei *et al.*, 2013a)。このため、広範囲の pH 域及び温度域において、より高い DX 分解活性を維持できる構成型資化菌の獲得が求められる。

具体的な生物学的処理法として構成型資化菌である *Pseudonocardia* sp. D17 を用いた生物学的処理法が検討され、その有効性が示されているが、これらの既往研究では、汚染物質として DX のみを含む模擬排水、あるいは活性汚泥処理によって共存物質を除去した排水を用いており (Isaka *et al.*, 2016a-c; 池と黒田, 2017)、環状エーテル物質や EG が共存する実際

の DX 含有排水への適用性を検討した研究は見られない。従って、実用的生物学的処理法の確立に向けては、各種製造業により排出される、様々な化学物質が含まれる実排水であっても安定的に DX を分解できる処理手法について検討する必要がある。

以上の背景から、本研究では、既往の DX 資化菌よりも優れた分解特性を有する構成型資化菌を単離し、共存物質を含む DX 含有実排水に対する効果的な生物学的処理システムを構築することを目的とした。本論文は、緒論、4 章からなる本論、総括並びに結論で構成されている。第 1 章では、DX 含有排水の処理技術に関する既往研究を概観し、その問題点を明示するとともに、本研究と直接関連する DX 資化菌及びそれらを用いた生物学的処理法に関する既往研究を整理した。第 2 章では、新たな DX 分解菌の単離を行うとともに、単離した分解菌に対して生理学的及び系統学的特徴付けを行った。第 3 章では、第 2 章にて単離した分解菌の DX 分解特性を詳細に調査し、既往の DX 資化菌に対する優位性を明らかにした。第 4 章では、多様な有機物が共存する DX 含有排水の代表例として、EO・EG を製造する化成品製造工場排水を対象として、単離菌株を用いた処理システムの開発を行った。最後に、これらの研究成果と今後の展望を総括並びに結論で取りまとめた。

## 第1章 1,4-ジオキサン含有排水の処理技術に関する既往研究

---

### 第1節 緒言

緒論において述べたように、1,4-ジオキサン（DX）は、水との親和性が高く、揮発性、固体への吸着性、加水分解性及び生物分解性がいずれも低いことから、従来の排水処理技術では十分な処理効果を得ることができない。本章では、既往の排水処理技術による DX 処理性能について概観するとともに、本研究と直接関連する DX 分解菌やその分解関与遺伝子群、並びに既存の分解菌を用いた生物処理技術の既往研究を整理することにより、DX 含有排水の処理技術の課題を明らかにした。

### 第2節 既往の排水処理技術による 1,4-ジオキサンの処理性能

従来の様々な排水処理技術による DX 除去性能、並びに問題点について以下に概説する。

#### 2.1 活性汚泥法

化審法に基づく活性汚泥を用いた好氣的生分解度試験では、DX の分解度は 2 週間で 0% であり（（独）製品評価技術基盤機構）、活性汚泥法での処理は期待しにくいとされ、一部の下水処理場では、受け入れる排水に 0.5 mg/L 未満の DX が含まれているため、実規模の活性汚泥処理での除去性能が報告されている。牧野ら（2005）は、茨城県内の下水処理場の活性汚泥処理プロセス（水理学的滞留時間（Hydraulic Retention Time: HRT）：22 時間）における DX の物質収支を評価した結果、微生物による分解率は 8.4%であったことを報告している。また、庄司と安部（2001）の報告によると、国内の 4 箇所の下水処理場における DX 除去率は最大で 25%であり、活性汚泥処理では DX の除去は困難であると考察している。さらに、高濃度の DX 排水（DX 濃度：26-98 mg/L）が発生する化学工場では、活性汚泥処理による DX の除去が認められたものの、汚泥への DX の吸着による寄与が示唆されており、微生物による分解性能は明らかとなっていない（Abe, 1999）。以上の既往研究から、下排水処理の主流である活性汚泥法による DX の分解は期待できないものと考えられる。

#### 2.2 活性炭吸着法

活性炭吸着法は、多孔性の活性炭を用いて排水中の汚染物質を吸着作用により除去する手法である。DX は、その物理化学的特性により、固体等に吸着しにくいとされ、市販の粉末状及び粒状活性炭を用いた DX の吸着試験における除去率は最大でも 30%程度である（久保と藤田, 2005）。一方で、これらの活性炭よりも汚染物質の吸着能力が高いとされる繊維状活性炭の開発が行われており、比較的高い吸着能力を有するものが見出されている（杉浦と河野, 2010; 山本ら, 2017）。しかしながら、1000 mg/L の DX を含む実排水の活性炭吸着処理

では、30 mg/L の DX が処理水中に残存しており、一律排水基準値（0.5 mg/L）を達成できる処理性能は得られていない（杉浦と河野, 2010）。さらに活性炭吸着法では、使用済みの活性炭を高頻度で交換する必要があり、その交換・処分費用が高額となる可能性がある。活性炭の種類によっては、使用済みの活性炭を熱処理により再生できるが、再生する場合には膨大なエネルギーを必要とするため実用的な手法とは言えない。

### 2.3 膜分離法

膜分離法は、膜の細孔径と汚染物質の分子サイズの違いにより、溶液中の汚染物質を分離する手法である。森田（2004）は、80 mg/L の DX 排水を用いて逆浸透膜（Reverse Osmosis: RO）による分離性能の評価を行った結果、排水に含まれる DX の 90% を分離できることを明らかにした。しかしながら、一律排水基準値（0.5 mg/L）を達成するには、RO 膜を多段に連結する必要があり、低濃度の DX を含む排水に対しては分離効率が低くなることが報告されている。また、一般的に膜分離法は、膜の目詰まりの原因となる懸濁物質を事前に除去する必要があることから（五ノ井ら, 2011）、全体の処理システムが大規模になるといった課題が挙げられる。

### 2.4 化学的処理法

様々な難分解性化学物質の分解に有効な手法として、紫外線（UV）照射により発生するヒドロキシラジカルやオゾンなどの強力な酸化剤を用いた化学的処理が挙げられる。UV 照射やオゾンによる DX の酸化処理では、分解率はそれぞれ、100% 及び 60% であったが、溶存性有機炭素濃度（Dissolved Organic Carbon: DOC）の低減はほとんど認められなかった（高橋ら, 2013）。一方で、オゾンや過酸化水素、UV 照射を複数組み合わせた促進酸化処理（AOP）により、DX を無機化できることが報告されている（Adams *et al.*, 1994; Stefan and Bolton, 1998; Kim *et al.*, 2006）。Stefan と Bolton（1998）は、UV/過酸化水素での AOP により、約 80 mg/L の DX を試験開始から 7 分後には完全に分解することができ、40 分後には DOC を数 mg/L まで低減できると報告している。しかしながら、AOP での処理は、排水にフミン酸やメタノール、1,3-ジオキソランなどの有機物が共存すると、処理性能が著しく低下するという課題が明らかとされている（Adams *et al.*, 1994; 小坂ら, 1999）。また、一般的に AOP は、イニシャルコストが高額であるうえ、電気使用料や薬剤費用などのランニングコストも高いことが実用にとっての重大な障壁とされている。また、危険物である薬剤の管理や作業環境の安全管理などの運用面の課題も挙げられる。

### 2.5 その他の処理法

ベンゼンや塩素系有機化合物などの揮発性有機化合物の除去効果が高いとされる曝気法では、揮発性の低い DX の除去率は 3% 未満であり（McGuire *et al.*, 1978）、曝気による DX の除去は期待できない。また、塩化鉄等を用いた凝集沈殿法、砂ろ過処理や浮上分離では、

DX は全く除去できないことが報告されている (McGuire *et al.*, 1978; 稲森ら, 1999; 庄司と阿部, 2001)。一方で、蒸留法によって DX を濃縮・分離することは可能であるが、その沸点が 101°C と水と同程度であることから、加熱に必要な重油を多量に使用するだけでなく、蒸留後の高濃度 DX 濃縮液を廃棄物として処分する必要がある、ランニングコストが高額となる。さらに、大規模な排水処理に対応するためには、その設備が大型になることから、イニシャルコストの観点からも実用的な処理技術とはいえない。

以上のように、従来の処理技術による DX 含有排水の処理には、実効性及び実用性における課題が多く、現実的ではないため、低コスト・低エネルギー消費で一律排水基準を達成することのできる処理技術の開発が必要である。

### 第3節 1,4-ジオキサン分解菌とその分解関与遺伝子群に関する既往研究

#### 3.1 DX 分解菌

DX 分解菌を分離する試みは、古くは 60 年以上前に遡るが、100 mg/L 以上の DX を含む排水に 1 年間暴露させた下水汚泥からも、DX を分解できる微生物は発見されなかった (Mills and Stack, 1954)。しかしながら、近年、一部の自然環境中において、DX を分解できる微生物が存在することが明らかとなり、その分離に成功した事例が報告されるようになってきた。DX 分解菌には、テトラヒドロフラン (THF) やメタン、プロパン及びトルエンといった一次基質の添加により DX を分解できる共代謝菌と、DX を単一炭素源として分解及び増殖できる資化菌が存在することが確認されており (Mahendra and Alvarez-Cohen, 2006; Sei *et al.*, 2013a, b)、生物学的排水処理に適用する分解菌としては、一次基質の添加が不要である DX 資化菌が有望である。そこで、本節ではこれまでに発見された DX 資化菌について概説する。なお、DX 資化菌には、DX 等により分解酵素が生産される誘導型資化菌と、分解酵素の誘導を必要しない構成型資化菌が存在している。

##### (1) 誘導型資化菌

##### 1. *Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190

Parales ら (1994) は、DX に汚染された汚泥から DX 分解菌 (*Pseudonocardia dioxanivorans* CB1190) の単離に世界で初めて成功した。*P. dioxanivorans* CB1190 は、pH 5.0-8.0 及び 14-42°C にて DX を分解することが可能であり、その増殖は pH 6.0 及び 30°C において最も高いことが明らかとなっている (Parales *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2010)。また、*P. dioxanivorans* CB1190 は、DX を二酸化炭素まで分解・無機化でき (Parales *et al.*, 1994)、その比分解速度及び細胞収率は、それぞれ、 $0.19 \pm 0.007$  mg-DX/mg-protein/h (DX 初期濃度 : 50 mg/L) 及び 0.01-0.09 mg-protein/mg-DX であることが報告されている (Parales *et al.*, 1994; Kelley *et al.* 2001; Mahendra and Alvarez-Cohen, 2006)。さらに、*P. dioxanivorans* CB1190 は、THF 及び DX の添加により、DX 分解酵素が誘導されることが報告されている (Kelley *et al.*, 2001)。

### 2. *Pseudonocardia benzenivorans* B5

*P. benzenivorans* B5 は、1,2,3,5-テトラクロロベンゼン分解菌として、有機塩素系芳香族化合物によって汚染された土壌から単離されたが (Kämpfer and Kroppenstedt, 2004)、Mahendra と Alvarez-Cohen (2006) の研究により DX も資化できることが明らかとなった。*P. benzenivorans* B5 は 25-30°C にて増殖可能であり、グルコースや酵母エキスを含有する栄養培地において高い増殖性を示すことが明らかとなっている。最大比分解速度及び細胞収率は、それぞれ、 $0.1 \pm 0.006$  mg-DX/mg-protein/h 及び  $0.03$  mg-protein/mg-DX であり、効率的な分解を行うとは言えない (Mahendra and Alvarez-Cohen, 2006)。

### 3. *Mycobacterium* sp. PH-06

Kim ら (2009) は、DX に汚染された河川の堆積物から *Mycobacterium* sp. PH-06 を分離した。*Mycobacterium* sp. PH-06 は、pH 7.2 及び 28°C の条件下で 1000 mg/L の DX を 15 日間で 100 mg/L まで分解できるが、その代謝物であるエチレングリコール (EG) が溶液中に蓄積することが明らかとなっている。

### 4. *Afipia* sp. D1

Sei ら (2013a) は、化学工場の排水路土壌から 2 種の誘導型資化菌を単離することに成功した。その一つである *Afipia* sp. D1 は、pH 5.0-10.0、15-35°C にて DX の分解が可能であり、pH 6.5 及び 28°C において高い分解速度を示す。*Afipia* sp. D1 の最大比分解速度及び細胞収率は、 $0.263$  mg-DX/mg-protein/h 及び  $0.185$  mg-protein/mg-DX であり、非常に有効な分解菌と言える。

### 5. *Mycobacterium* sp. D6

*Mycobacterium* sp. D6 は、Sei ら (2013a) が単離した誘導型資化菌の一つであり、*Afipia* sp. D1 と同様の pH 域及び温度帯において DX の分解が可能である。*Mycobacterium* sp. D6 は、pH 8.0 及び 28°C において最も高い DX 分解速度を示す。*Mycobacterium* sp. D6 の最大比分解速度及び細胞収率は、 $0.139$  mg-DX/mg-protein/h 及び  $0.185$  mg-protein/mg-DX である。

### 6. *Acinetobacter baumannii* DD1

Huang ら (2014) は、下水処理場の活性汚泥から *A. baumannii* DD1 を単離した。*A. baumannii* DD1 は、pH 7.0 及び 30°C の条件下にて 100 mg/L の DX を 42 時間以内に完全に分解すること示されている。DX 分解が可能な pH 域や温度域は明らかとされていないが、DX による細胞収率は、 $0.414$  mg-protein/mg-DX であることが報告されている。

### 7. *Rhodococcus aetherivorans* JCM 14343

Inoue ら (2016) は、菌株分譲機関に寄託されている *Pseudonocardia* 属及び *Rhodococcus*

属の各12種の菌株に対してDX分解能を調査した結果、*R. aetherivorans* JCM 14343が資化能を有していることを明らかにした。*R. aetherivorans* JCM 14343は、pH 7.0及び28℃の条件下において20 mg/LのDXを24時間以内に完全に分解することができる。DXによる細胞収率は、0.031 mg-protein/mg-DXであることが明らかとなっている。

### (2) 構成型資化菌

#### 1. *Mycobacterium* sp. D11

Sei ら (2016a) は、(1) の4及び5に示した誘導型資化菌に加え、DX分解酵素の誘導を必要としない構成型資化菌を化学工場の排水路土壌から単離した。その一つである *Mycobacterium* sp. D11 は、pH 5.0-9.0、15-40℃にてDXの分解が可能であり、pH 6.0及び35℃にて最も高い分解速度を示すことが明らかとなっている。*Mycobacterium* sp. D11の最大比分解速度及び細胞収率は、0.052 mg-DX/mg-protein/h及び0.179 mg-protein/mg-DXである。

#### 2. *Pseudonocardia* sp. D17

*Pseudonocardia* sp. D17は、Sei ら (2016a) によって単離された構成型資化菌の一つである。*Pseudonocardia* sp. D17は、pH 5.0-9.0、15-45℃にてDXの分解が可能であり、pH 7.5及び28℃にて最も高い分解速度を示す。また、その最大比分解速度及び細胞収率は、0.096 mg-DX/mg-protein/h及び0.223 mg-protein/mg-DXである。さらに、*Pseudonocardia* sp. D17は、100 mg/LのDXを完全に分解できるだけでなく、1 mg/Lの低濃度DXも0.05 mg/L未満に分解できることが示されている (Sei *et al.*, 2013a; 山本ら, 2017)。

#### 3. *Xanthobacter flavus* DT8

Jin ら (2012) は、医薬工場排水を処理する活性汚泥から *X. flavus* DT8を分離した。*X. flavus* DT8は、pH 4.0-10.0及び20-40℃においてDXの分解が可能であり、pH 7.0及び34℃において最も高い分解速度を示す (Jin *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016)。また、Chen ら (2016) の報告によると、*X. flavus* DT8は、pH 7.0及び30℃の条件下で100 mg/LのDXを48時間以内に完全に分解でき、また、その細胞収率は0.35 mg-protein/mg-DXであることが示されている。しかしながら、*X. flavus* DT8は、DX濃度が300 mg/L以上になると濃度阻害を生じるため、高濃度のDXを分解することはできない (Chen *et al.*, 2016)。また、DX比分解速度は、*P. dioxanivorans* CB1190よりも低いことが報告されているが、具体的な値は示されていない (Chen *et al.*, 2016)。

### (3) その他

#### 1. *Rhodanobacter* sp. AYS5

Pugazhendi ら (2015) は、DX に汚染された汚泥から *Rhodanobacter* sp. AYS5 を分離した。*Rhodanobacter* sp. AYS5 は、100 mg/L の DX を 7 日間で完全に分解でき、さらに二酸化炭素まで無機化できることが報告されている。

#### 2. *Pseudonocardia* sp. RM31

Matsui ら (2016) は、DX に汚染されていない海水試料から、*Pseudonocardia* sp. RM31 を分離した。*Pseudonocardia* sp. RM31 は、pH 6-8 及び 25°C において DX を分解できるが、DX 濃度を 1000 mg/L とした分解試験では、120 時間後でも 600 mg/L の DX が残留することが示されており、完全分解に至らないことが報告されている。

以上の DX 資化菌のうち、その分解特性が詳細に明らかとなっている菌株について表 1-1 にまとめた。これまでに単離された DX 資化菌の多くは、*Pseudonocardia* 属や *Rhodococcus* 属、*Mycobacterium* 属に分類される Actinomycetes (放線菌) である。これらの放線菌は、通常の活性汚泥処理では優占化することはないため、活性汚泥の馴養により DX 分解能を獲得させることは容易ではないと言える。表に見られるように、既存の DX 資化菌は pH が中性域で温度域が 30°C 付近において DX の分解が可能である。また、これらの DX 比分解速度は、0.052-0.263 mg-DX/mg-protein/h であり、中でも誘導型資化菌である *Afipia* sp. D1 が菌体タンパクあたりの分解活性が最も高いことが示されている。一方で、既往研究の DX 分解試験の多くは、DX 濃度が比較的高い条件で (DX 濃度 : 20-1000 mg/L) 評価されていたが、唯一、構成型資化菌である *Pseudonocardia* sp. D17 において、1 mg/L の DX を完全に分解できることが示されている。構成型資化菌は、DX 分解酵素が構成的に発現しているため、低濃度の DX であっても安定的に DX の分解が行えるものと考えられている (清と池, 2011)。このため、生物学的処理手法には構成型資化菌が適しているものと考えられるが、既往の構成型資化菌の比分解速度は、誘導型資化菌よりも低い。また、既往の構成型資化菌は、限られた pH 域及び温度域においてのみ高い DX 分解活性を示し、至適域以外ではその活性が著しく低下することが明らかとなっている (Jin *et al.*, 2012; Sei *et al.*, 2013a)。このため、広範囲の pH 域及び温度域において、より高い DX 分解活性を維持できる構成型資化菌の獲得が求められる。



表 1-1 既往の DX 資化菌における DX 分解特性

分解酵素の 誘導性	菌株	pH	温度 (°C)	DX 比分解速度 (mg-DX/mg-protein/h)	細胞収率 (mg-protein/mg-DX)
誘導性	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	5.0-8.0 (6.0)	14-42 (30)	0.19±0.007	0.01-0.09
	<i>Pseudonocardia benzenivorans</i> B5	NA	NA	0.1±0.006	0.03
	<i>Afipia</i> sp. D1	5.0-10.0 (6.5)	15-35 (28)	0.263	0.185
	<i>Mycobacterium</i> sp. D6	5.0-10.0 (8.0)	15-35 (28)	0.139	0.185
	<i>Acinetobacter baumannii</i> DD1	7.0	30	NA	0.414
構成型	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> JCM 14343	7.0	28	NA	0.031
	<i>Mycobacterium</i> sp. D11	5.0-9.0 (6.0)	15-40 (35)	0.052	0.179
	<i>Pseudonocardia</i> sp. D17	5.0-9.0 (7.5)	15-45 (28)	0.096	0.223
	<i>Xanthobacter flavus</i> DT8	4.0-10.0 (7.0)	25-40 (34)	NA	0.35
	( )内は最適値を示している。NA; データなし。				

### 3. 2 DX の分解経路及び関与遺伝子群

#### (1) DX の代謝経路

*P. dioxanivorans* CB1190 による DX の初発の酸化反応には、酸化還元酵素であるモノオキシゲナーゼが作用していることが示唆されている (Mahendra and Alvarez-Cohen, 2006)。Mahendra ら (2007) は、DX 分解における代謝物を同定し、DX の分解経路を提案している (図 1-1)。DX の分解経路の第一段階においては、モノオキシゲナーゼによる水酸化反応により DX が 2-ヒドロキシ-DX に変換される。その後、自発的な酸化反応及びエーテル結合の開裂反応によって、2-ヒドロキシエトキシアセトアルデヒド、DX-2-オン及び 2-ヒドロキシエトキシ酢酸 (HEAA) が生成することが示されている (図 1-1)。特に、初発の酸化反応に作用するモノオキシゲナーゼは THF モノオキシゲナーゼと命名され、それをコードする *thm* 遺伝子群 (*thmA*DBC) が同定されている (Sales *et al.*, 2013)。さらに、これより下流の代謝経路では、先とは別のモノオキシゲナーゼにより、HEAA に水酸化基が付加されて、グリオキサールや EG、グリコール酸に変換され、最終的にはグリオキシル酸を経由して二酸化炭素に分解されることが明らかとなっている (Mahendra *et al.*, 2007; Sales *et al.*, 2013)。Grostern ら (2012) は、この代謝経路に関与する酵素を明らかとするとともに、グリオキシル酸が、エネルギー獲得の重要な役割を果たす TCA 回路 (tricarboxylic acid cycle) に利用されることを明らかにした。以上のことから、DX における生分解経路は概ね明らかとされているが、*A. baumannii* DD1 では EG よりも上流の代謝経路が異なる可能性が示唆されており (Huang *et al.*, 2014)、これらの分解に関与する代謝酵素の解明が望まれる。

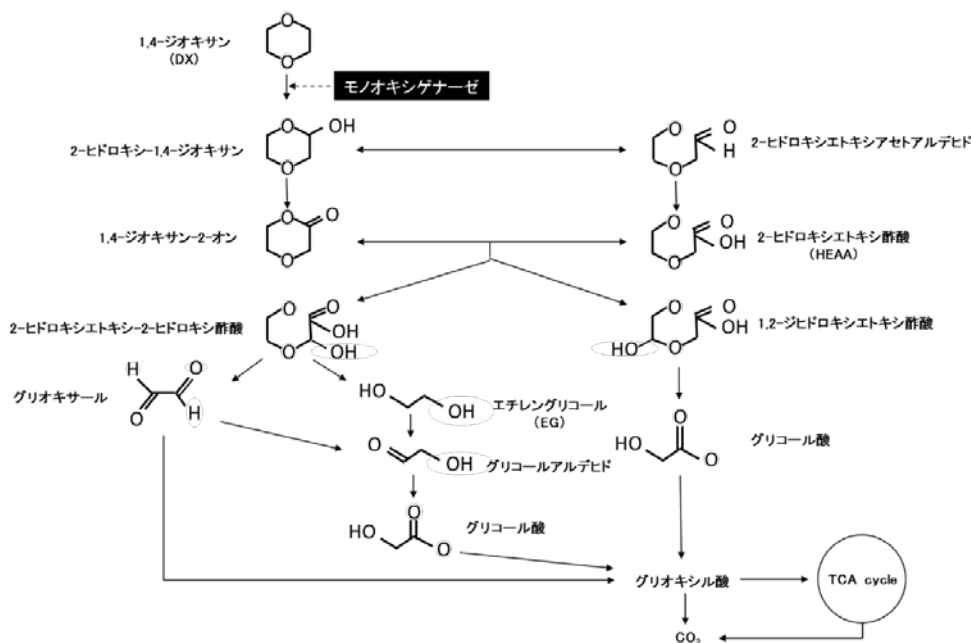


図 1-1 既往研究において提案されている DX 分解経路  
(Mahendra *et al.*, 2007; Grostern *et al.*, 2012; Sales *et al.*, 2013)

## (2) DX 分解に関与する可溶性鉄 (II) モノオキシゲナーゼ

DX の初発の酸化反応に関与する *thm* 遺伝子群は、資化菌の *P. dioxanivorans* CB1190 や *Pseudonocardia* sp. D17、共代謝菌である *P. tetrahydrofuranoxydans* K1 及び *Pseudonocardia* sp. ENV478 において確認されている (Thiemer *et al.*, 2003; Sales *et al.*, 2011, Masuda *et al.*, 2012; 池ら, 2015)。また、この酸化反応には、THF モノオキシゲナーゼだけでなく、プロパン／トルエン／メタンモノオキシゲナーゼといった酵素も関与することが示唆されている (Mahendra and Alvarez-Cohen, 2006)。これらの酵素は、様々な炭化水素類の酸化に関与する可溶性鉄 (II) モノオキシゲナーゼ (soluble di-iron monooxygenase: SDIMO) に分類されることから (Li *et al.*, 2013)、DX 分解に関わる微生物における SDIMO 遺伝子群の解析が行われてきた。Li ら (2013) は、DX に汚染された地下水中の SDIMO 遺伝子群の解析を行い、*thm* 遺伝子と相同性の高い SDIMO 遺伝子群が、広範囲にわたり検出されることを報告している。特に、DX 濃度が高い汚染源のサンプルでは、SDIMO 遺伝子群が高濃度で存在し、分解試験による DX の分解も認められた。Inoue ら (2016) は、3 種の DX 資化菌及び 4 種の DX 共代謝菌に対して SDIMO 遺伝子群の解析を行ったところ、2 種の資化菌 (*P. dioxanivorans* CB1190 及び *Pseudonocardia* sp. D17) と 2 種の共代謝菌 (*R. ruber* T1 及び *R. ruber* T5) の SDIMO 遺伝子群は *thm* 遺伝子群、それ以外の種 (資化菌 : *R. aetherivorans* JCM 14343、共代謝菌 : *P. acacia* JCM16707 と *P. asaccharolytica* JCM10410) の SDIOM 遺伝子は、プロパンモノオキシゲナーゼ (*prm*) 遺伝子群と高い相同性を示すことが明らかとなった。このことから、DX 分解には、*thm* 遺伝子群だけでなく *prm* 遺伝子群も寄与している可能性があると推察している。

## 第4節 1,4-ジオキサン分解菌を用いた生物学的処理法に関する既往研究

DX 分解菌を用いた排水処理において、DX を効率的に分解・除去するためには、処理槽内に DX 分解菌を高濃度で維持することが重要となる。この課題に対し、基材となるポリエチレングリコールに DX 分解菌を包括固定した担体を用いる生物学的処理法の検討がなされている。Isaka ら (2016a, c) は、誘導型資化菌である *Afipia* sp. D1 を包括固定した担体を用いて、DX 排水の連続流入処理を試みている。1-L 容のラボスケールリアクターを用いた DX 模擬排水の処理試験では、原水に含まれる 400 mg/L の DX が約 3 mg/L にまで低減でき、約 40 日間安定的に処理できることが示された (Isaka *et al.* 2016a)。また、120-L 容のパイロットスケール試験においても、570-730 mg/L の DX を主成分とする実排水を処理できること示したが、処理水中の DX 濃度は、1-6 mg/L であり、一律排水基準値 (0.5 mg/L) を達成するには至らなかった (Isaka *et al.* 2016c)。この理由として、*Afipia* sp. D1 の DX 分解酵素が誘導性であるゆえに、DX 濃度が低い条件下では、分解酵素の発現が停止したものと推察している。そこで、Isaka ら (2016b) は、構成型資化菌である *Pseudonocardia* sp. D17 を包括固定して、1-L 容のラボスケールリアクターを用いた DX 模擬排水の連続処理を行ったと

ころ、処理水中の DX 濃度を安定的に 0.5 mg/L 未満まで低減することができた。これらの既往研究から、生物学的処理法に適用する菌株としては、DX をより低濃度化できる構成型資化菌が有望であると考えられている。

これらの一連の既往研究は、DX 含有排水処理における生物学的処理法の有効性を初めて示した事例であるが、その検証は DX を主成分とした模擬排水や実排水を用いたものである。実際の工場排水には、DX だけでなく、1,3-ジオキソランといった環状エーテル物質や EG 等も高濃度で含まれているが (Adams *et al.*, 1994; 庄司と安部, 2001; Kim *et al.*, 2016)、様々な有機物が共存する実排水への適用性は明らかとなっていない。そのため、DX 含有排水に共存する有機物質等の水質性状を調査するとともに、これらの有機物質が DX 分解に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

## 第5節 要約

本章では、既存の排水処理技術による DX の処理性能を整理するとともに、これまでに分離された DX 分解菌、及びそれらを用いた DX 含有排水の生物学的処理に関する既往研究を概観し、以下の知見を得た。

活性汚泥法や曝気法等の従来の排水処理技術では、排水中の DX の除去は期待できず、近年開発されている高性能の活性炭吸着材を用いても、一律排水基準値である 0.5 mg/L 未満を達成できる性能を得ることはできない。また、膜分離法や蒸留法により排水中の DX を濃縮分離できるが、DX の排水性状によって処理効率が左右されるため、適用範囲が限定される。現状では、オゾンや過酸化水素などの酸化剤を併用した AOP が唯一処理に有効とされているが、イニシャル及びランニングコストが高く、エネルギー消費も大きい上、その処理性能は共存する有機物により低下することから、実用性・実効性の高い排水処理技術の確立が求められている。

これまでに報告されている DX 分解菌には、誘導型と構成型の資化菌が存在しており、これらを用いた生物学的処理法の有効性が示されている。特に、構成型資化菌は、DX 濃度にかかわらずその分解性能を発揮できるため、生物学的処理に適した菌株であると考えられる。しかしながら、その分解能力は誘導型資化菌と比べて低く、また、限られた pH 域や温度域においてしか高い分解能力を発揮できないことから、広範囲の pH 域及び温度域において、より高い DX 分解活性を維持できる構成型資化菌の獲得が求められる。また、生物学的処理法での検討は、様々な化学物質が含まれる実排水へは適用されていないため、DX 含有実排水に共存する有機物を調査するとともに、これらの有機物質が DX の分解性能に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

## 第2章 1,4-ジオキサン分解菌の単離と特徴付け

---

### 第1節 緒言

第1章で述べたように1,4-ジオキサン（DX）含有排水の生物学的処理には、構成型資化菌が適しているものと考えられる。しかしながら、既往の構成型資化菌は、誘導型資化菌と比べてDX分解能力が低いことから、効率的にDXを処理できるプロセスを確立するためには、より高い分解能力を有する構成型資化菌を獲得する必要がある。一方で、一般的な河川や土壌等に生息する微生物のDX分解のポテンシャルは、極めて低いことが報告されており（Sei *et al.*, 2010）、DX分解菌は特定の環境にしか生息していないものと考えられる。しかし、微生物による分解を受けにくい難分解性汚染物質であっても、長期にわたり微生物が汚染物質に晒されることでその分解能が活性することが知られており（Bradley *et al.*, 2001）、実際に既往研究において単離されたDX分解菌の多くは、DXに汚染されたもしくはその可能性がある環境試料から分離されている（Parales *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 2012; Sei *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014; Pugazhendi, 2015）。そこで、本章では、新たなDX分解菌を単離することを目的とし、長期にわたりDXに汚染された環境試料からDX分解菌の集積を試み、取得した単離株の特徴付けを行った。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 2.1 供試環境試料

長年にわたりDXに汚染されたサイトから、その汚染地下水（DX濃度：1.3 mg/L）を採水し、DX分解菌の集積培養に用いた。採水した試料の保管は10°C未満で行い、試験に供する際に常温に戻してから使用した。

#### 2.2 供試培地

DX分解菌の集積培養、DX分解試験並びに様々な炭素源の利用性の調査においては、表2-1に示す無機塩培地に所定の炭素源を添加したものを用いた。単離株の前々培養及び前培養には、CGY培地（表2-2）もしくはMGY培地（表2-3）を使用し、必要に応じてDXを500 mg/Lになるように添加した。菌体の短期保存とDX分解菌の分離に使用した固形平板培地には、500 mg/LのDXを含む無機塩培地に、寒天を15g/L加えて固化したものを用いた。

表 2-1 無機塩培地		表 2-2 CGY 培地		表 2-3 MGY 培地	
成分	濃度	成分	濃度	成分	濃度
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1000 mg/L	casitone	5 g/L	Malt extract	10 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1000 mg/L	glycerin	5 g/L	D(+)-glucose	4 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	200 mg/L	yeast extract	1 g/L	yeast extract	4 g/L
FeCl <sub>3</sub>	10 mg/L	pH:7.0		pH:7.3	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50 mg/L				
NaCl	50 mg/L				
pH:7.3					

### 2.3 DX 分解菌の集積培養及び分離

採水した DX 汚染地下水に含まれる懸濁物質を遠心分離により回収し（10000×g、4℃、10 分）、これを無機塩培地 100 mL を含む 300-mL 容のフラスコに接種した。これに単一炭素として DX を 500 mg/L になるように添加し、回転振盪培養を行った。2 週間振盪後の培養液に含まれる懸濁物質を遠心分離により回収し、新たに作成した同組成の培地に再度、懸濁して新たな回分培養を繰り返した。培養期間中は、適宜溶液中の DX 濃度を測定し、その分解を確認した。2 週間ごとの植え継ぎによる集積培養を 3 ヶ月間繰り返し行った後、培養液に含まれる懸濁物質を、DX を含む無機塩平板培地に塗布し、2 週間、静置培養を行った。この培養により平板培地上に形成されたコロニーについて、目視観察により形態が異なるものを選別し、それぞれにナンバリングを行って、DX 分解試験に供した。なお、回転振盪培養の条件は特に記載のない限り、28℃、120 rpm とし、フラスコはシリコセンにて蓋をした。

### 2.4 取得コロニーの DX 分解試験

300-mL 容フラスコに分注した 500 mg/L の DX を含む CGY 培地 100 mL に、平板培地上に形成されたコロニーを一白金耳に接種して 7 日間の培養を行った（前々培養）。さらに、この培養液 10 mL を同組成の培地に植え継ぎ、7 日間の培養（前培養）を行い、得られた培養液の菌体を遠心分離により回収した。この菌体を、炭素源を含まない無機塩培地を用いて 2 回洗浄した後、所定の菌体濃度になるように無機塩培地に懸濁し、これを植菌液として DX 分解試験を以下の通り行い、有望な分解菌を選別した。すなわち、100-mL 容フラスコに所定濃度の DX を含む無機塩培地 19 mL と植菌液 1 mL を加え、回転振盪培養を行うことで DX 分解試験とした。培養期間中は、適宜、培養液をサンプリングし、溶液中の DX 濃度を測定した。初期菌体濃度は 200-300 mg-dry cell/L とした。

## 2.5 単離株の生理学的特性及び系統学的解析

CGY 培地により 7 日間培養した DX 分解菌を用いて以下の試験を行った。

### (1) 生理学的特性

単離株に対して光学顕微鏡観察、グラム染色試験及びカタラーゼ試験を Cowan and Steel による方法 (Cowan and Steel, 1974) に準じて調査し、生理学的特徴付けとした。

### (2) 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

菌体を含む培養液をナノパーコレータ (孔径: 0.6  $\mu\text{m}$ 、日本電子 (株)) 上に滴下し、0.85% 塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液 (pH 7.2) にて 2 回洗浄した後、2% グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝溶液を用いて固定化处理 (25°C、2 時間) を行った。その後、固定化した試料を 50-99.5% エタノール溶液により脱水し、臨界点乾燥装置 (JCPD-5、日本電子 (株)) を用いて乾燥を行った。乾燥後の試料は、イオンスパッタリング装置 (JFC-1100、日本電子 (株)) により金コーティングを施したものを SEM (JSM-5610LV、日本電子 (株)) にて観察し、単離菌の細胞形態を詳細に観察した。

### (3) 16S rRNA 塩基配列に基づいた系統学的解析

proteinase K を用いた Wilson (1987) による方法に準じて単離株の全 DNA 抽出を行い、8F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')及び 1429R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')プライマー (Turner *et al.*, 1999) を用いて 16S rRNA の増幅を行った。PCR 反応条件は、94°C で 10 分保持した後、変性 (94°C、1 分)、アニーリング (58°C、1 分)、伸長 (72°C、10 分) を 35 サイクル行った後、72°C で 2 分間保持した。得られた増幅産物をテンプレートとし、キャピラリーDNA シーケンサー (ABI PRISM 310、Applied Biosystems) を用いて 16S rRNA 塩基配列を解析した。決定した塩基配列を BLAST search program により NCBI データベースに登録されている塩基配列と比較するとともに、相同性の高い配列を GenBank から得た。系統樹の作成には、CLUSTAL W (Eddy, 1995) によるマルチプルアライメント解析の結果に基づき TreeView X (Page, 1996) を用いた。

## 2.6 様々な炭素源の利用性

本試験に使用する植菌液は、2.4 における前々培養及び前培養に用いる培地を MGY 培地に変更して調製した。50-mL 容バイアルビンに所定濃度の炭素源を含む無機塩培地 15 mL 及び植菌液 5 mL を加えて培養を行った (初期菌体濃度: 52 mg/L)。培養 7 日間後において溶液中の乾燥菌体重量を測定し、各炭素源の利用性を評価した。炭素源としては、DX に加え、テトラヒドロフラン (THF)、エチレングリコール (EG)、ジエチレングリコール (DEG)、トリエチレングリコール (TEG)、1,4-ブタンジオール、グリオキシル酸、グリコール酸、フェノール、グルコース及び酢酸を用い、試験開始の各物質の濃度は 100 mg-C/L とした。



### 2.7 次世代シーケンス解析及びアノテーション

分離株の全 DNA の抽出は 2.5 (3) に記載した方法で行った。分離株のゲノム DNA のシーケンスライブラリーは、TruSeq Nano DNA LT library preparation kit (Illumina 社) を用いて作成した。このライブラリーを次世代シーケンサー (HiSeq 2500 system、Illumina 社) を用いて、101 bp ごとにペアエンド解析を行い、2275 bp のリードデータを得た。さらに、Cutadapt program version 1.1 及び Trimmomatic program version 0.32 を用いて、得られたリードのアダプター配列と低 QV (Quality Value) 領域を取り除いた後、Velvet program version 1.2.08 によるアセンブルを行うことでドラフトゲノム配列を得た。このドラフトゲノム配列に対して Rapid Annotation using Subsystems Technology (RAST) パイプラインによりアノテーションを行った。また、特定の遺伝子配列との相同性を比較する際には、NCBI blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて行った。なお、単離株のドラフトゲノム配列及びアノテーション情報は、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録した (Accession No. BEGX01000001-BEGX01000173)。

### 2.8 分析

水質分析には、メンブレンフィルター (孔径: 0.45 $\mu$ m、材質: セルロースアセテート、Advantec) により懸濁物質を除去したろ液を用いた。DX の測定は、ヘッドスペースガスクロマトグラフィー質量分析装置 (HS-GC/MS) を用い、表 2-4 に示した分析条件に準じて行った。溶存有機性炭素濃度 (Dissolved Organic Carbon: DOC) の測定には、全有機性炭素分析装置 (multi N/C 2100、Analytik Jena AG) を用いた。乾燥菌体重量 (濃度として) は、ガラス繊維濾紙 GF/B (粒子保持能 1.0  $\mu$ m、Whatman) を用いて試料をろ過し、105°C にて 2 時間乾燥した後の重量から、ろ過前のフィルター重量を差し引いて求めた。

表 2-4 HS-GC/MS の分析条件

システム	GC/MS	QP2010plus (島津製作所)	
	HS サンプラー	Turbo matrix40 (PerkinElmer 社)	
GC	カラム	Rtx-624 capillary column (Restek 社) 60 m × 0.32 mm、膜厚 : 1.8 μm	
	オーブン温度	40°C (5 分保持) → 20°C / 分 → 230°C (5 分保持)	
	注入口温度	200°C	
	キャリアガス	ヘリウム (2.42 mL / 分)	
	インターフェイス温度	200°C	
MS	イオン源温度	230°C	
	イオン化方式	EI	
	イオン化電圧	0.7 kV	
	測定モード	SIM	
	選択イオン ( $m/z$ )	1,4-ジオキサン : 88.0 / 58.0	
HS	(ターゲット / 確認イオン)	1,4-ジオキサン d <sub>8</sub> (内部標準) : 96.0 / 64.0	
	サンプル量	10 mL + NaCl 3g (20-ml 容バイアル)	
	モード	ループ	
	オーブン温度	70°C	
	保温時間	30 分	
	加圧時間	1 分	
	注入時間	0.15 分	
	ニードル温度	100°C	
	トランファーライン温度	150°C	

## 第3節 実験結果及び考察

## 3.1 DX 分解菌の集積培養及び分離

## (1) DX 分解菌の集積培養

DX 汚染地下水に含まれる懸濁物質を植種源とした集積培養を3ヶ月間行った。比較として、植種源を添加していない実験系（コントロール）も同様の操作で振盪し、DX の物理的、化学的变化を調べた。図2-1 に集積培養における DX 濃度の経日変化を示す。植種源を添加していないコントロール系では、培地交換を1回のみ行ったが、DX 濃度がおそらくは揮発により幾分か減少した。一方で、無機塩培地の交換を合計6回行った集積培養系では、培養開始から14日目には DX 濃度はコントロール系と同程度であったものの、14日以降からは、コントロール系よりもやや低い値を示すようになった。また、培養28日、42日及び56日目の DX 濃度は250-300 mg/L を示し、コントロール系を比較して有意な DX 濃度の低減が確認できた。さらに、培養56日目以降では、集積培養系において、顕著な DX 濃度のより迅速な除去が確認されるようになり、84日目及び96日目では DX は定量下限値未満（< 0.05 mg/L）にまで完全に除去されるようになった。また、培養96日目の培養液には、粒状の懸濁物質が多数存在していることが確認され、菌体の増殖が生じていることが示唆された。これらのことから、本集積培養によって、DX を分解し、増殖することのできる微生物が集積されているものと考えられた。

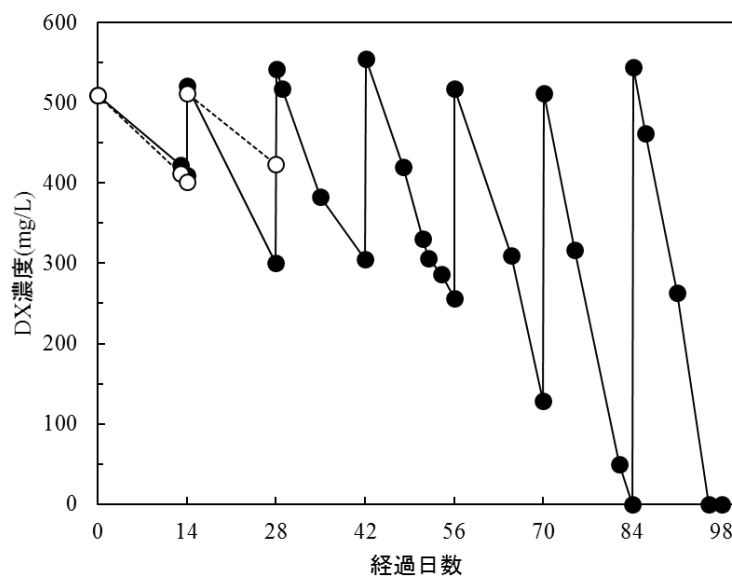


図2-1 集積培養における DX 濃度の経日変化 (n=1)

●：集積培養系（植種源有り）、○：コントロール（植種源無し）

## (2) DX 分解菌の単離と DX 分解性能

(1) で得られた DX 分解微生物の集積系から分解菌の単離を試みた。当初、分解菌の分離は、集積系の懸濁物を 0.85% の生理食塩水にて段階的に希釈し、これを平板培地に塗布する手順で行った。この手法により平板培地上に複数のコロニーは形成されたが、これらのコロニーは、DX の分解能力を有していなかった (データ不掲載)。この理由としては、集積系の懸濁物が粒状になっていたことから、段階希釈の際に懸濁物中に存在する細菌細胞を均一に分散することができず、有望な分解菌を平板上にうまく塗布できなかったためであるとも推察された。そこで、集積系で得られた粒状の懸濁物質を白金耳にて複数個、採取し、それをコンラージ棒により直接平板上に塗布することによって、分解菌の単離を試みた。その結果、平板上に形状の異なる合計 29 株のコロニーが形成され、これらを N1 から N29 と命名した。

合計 29 個のコロニーを DX 含有 CGY 培地にそれぞれ接種して培養を行った。この培養において、N2、N8、及び N11 の 3 コロニーでは、菌体の増殖が確認できず、一方、N12-N22、及び N24~N28 は単一株のコロニーではなく、カビによる明らかなコンタミネーションが生じた。そのため、これらのコロニーは DX 分解能の評価を行わなかった。結果として DX を含む CGY 培地において単一菌での増殖が確認された他の 11 コロニーに対して DX 分解試験を行った。比較として、菌を接種しない無菌系を作製し対照 (コントロール) とした。図 2-2 に培養 6 日目における各コロニーによる DX 除去率を示す。コントロール系においては、培養 6 日の DX 除去率は 9.2% を示したが、これは、揮発によるものであると推察される。一方、コロニーを接種した実験では、N23 の DX 除去率が最も高く、その値は 76.6% であった。また、N23 以外の DX 除去率は、7.9-20.0% であり、無菌系の除去率と同程度であったことから、有望な分解菌を含んでいないものと考えられた。以上の結果から、試験した単離 29 のコロニーのうち、唯一明確な DX の除去が確認できた N23 を以降の研究対象とした。平板培養や顕微鏡観察の結果から、N23 は純粋菌により形成されたものであることが確認されたことから、これを DX 分解菌の単離株とみなし、N23 株と命名した。

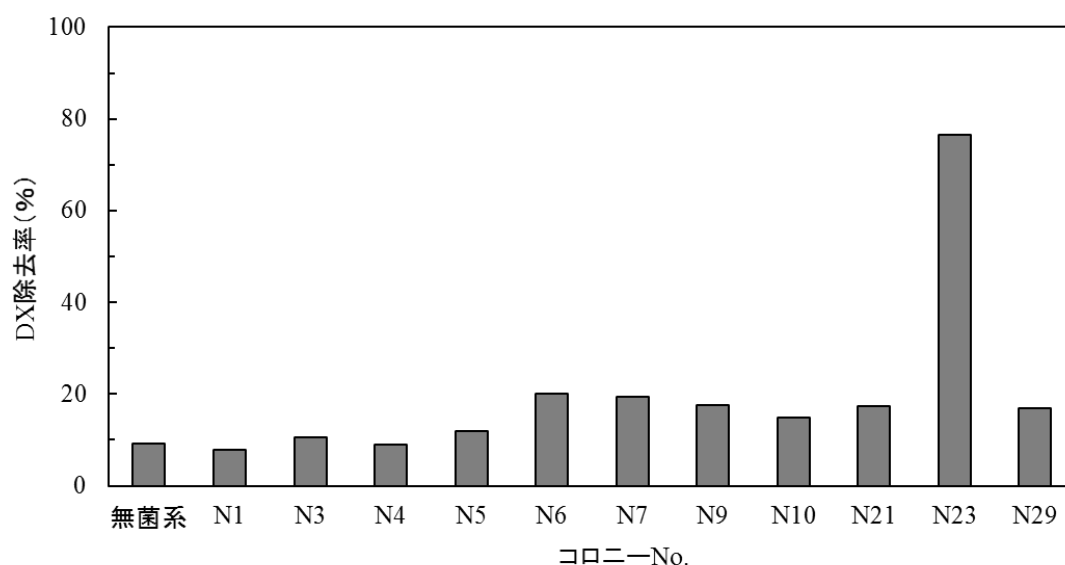


図 2-2 培養 6 日目における各コロニーによる DX 除去能力 (n=1)

DX 初期濃度 : 500 mg/L, 初期菌体濃度 : 200-300 mg-dry cell/L

### (3) N23 株の DX 分解能の確認

単離した N23 株による DX 分解能を確認することを目的として、DX 分解試験を行った。ここでの分解試験では、1000 mg/L の DX を含む無機塩培地に初期菌体濃度が 200 mg-dry cell/L になるように N23 株を植菌し試験を開始した。図 2-3 に N23 株を用いた DX 分解試験の結果を示す。DX 濃度は、実験開始から速やかに低下し、試験開始から 108 時間後には 5.1 mg/L を示した。また、DOC 濃度も時間の経過とともに減少する傾向が確認され、DX が完全分解されていることが示唆された。一方、乾燥菌体重量も DX 分解に伴い上昇する傾向が確認されたことから、N23 株は、DX を単一炭素源として増殖できる資化菌であることが明らかとなった。しかし、菌体濃度は、47 時間後以降には DX 分解が継続して生じていたにも関わらず、有意な菌体濃度の増加は認められなくなった。本分解試験においては、試験終了後にフラスコ内壁に凝集した N23 株の細胞が付着していたことから、試験後半においては凝集・付着した菌体を正確に計測することができず、乾燥菌体重量が過小評価されていたとも考えられる。

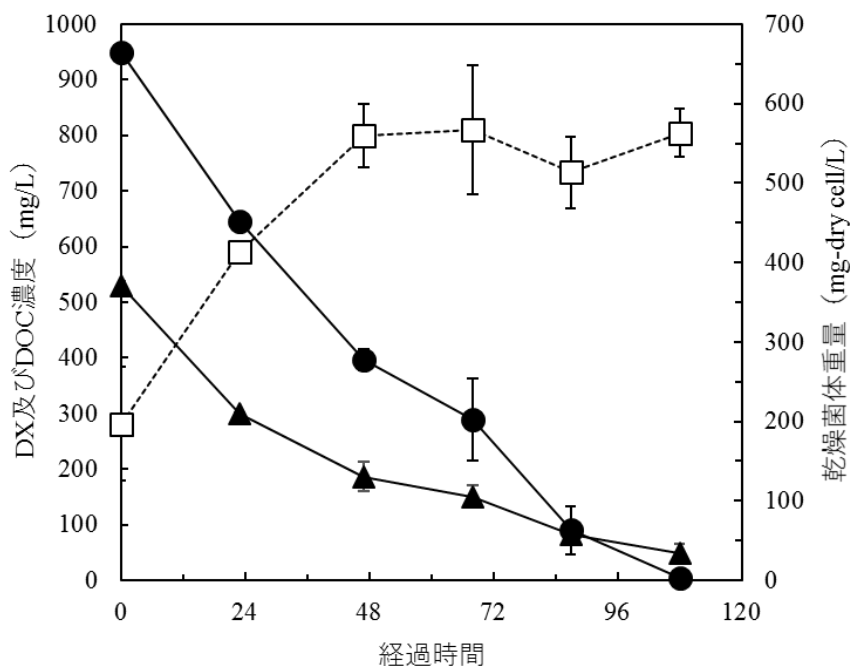


図 2-3 N23 株による DX 分解試験 (n=3)

初期菌体濃度：200 mg-dry cell/L、●：DX、▲：DOC 濃度、□：乾燥菌体重量

### 3.2 N23 株の生理学的特性及び系統学的解析

DX 資化菌として単離された N23 株の分類学的同定を行うために、生理学的特性試験及び系統学的解析を行った。N23 株は、DX を含む無機塩平板培地において白色のコロニーを形成し (図 2-4)、運動性は無く、グラム染色及びカタラーゼ活性は陽性を示した。図 2-5 及び図 2-6 に N23 株の 16S rRNA 塩基配列とそれに基づいて作成した系統樹上の位置付けをそれぞれ示す。N23 株の 16S rRNA 遺伝子配列を相同検索に供した結果、*Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* K1 (AJ249200) と 99.9% の相同性を示した。*P. tetrahydrofuranoxydans* K1 は、共代謝により DX を分解できる菌株として報告されているが (Mahendra and Alvarez-Cohen, 2006)、DX 資化菌である N23 株とは DX の分解特性が異なっている。このことから、N23 株は *P. tetrahydrofuranoxydans* の近縁種としては初めて DX の資化性能を有する菌株であるともいえる。さらに、SEM を用いて N23 株の細胞を観察したところ、長さ幅がそれぞれ約 13 $\mu$ m、0.8-0.16 $\mu$ m の菌糸状であり、それらが凝集している様子が示された (図 2-7)。このような菌体の凝集は、*Pseudonocardia* 属の他の種でも確認されている (Mahendra and Alvarez-Cohen, 2005; Kämpfer et al. 2006)。以上の生理学的特性及び系統学的解析から、N23 株を *P. tetrahydrofuranoxydans* の近縁種に属するが、既存株とは細部において異なることから、*Pseudonocardia* sp. N23 株と命名した。



図 2-4 DX を含む無機塩平板上に生育した N23 株

GACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCTTTCGGGGTA  
CACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTGCCCTCAGCTCTGGGATAAGC  
CTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTCTCATCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGT  
TTTTCGGCTGGGGATGGGCCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAA  
GGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG  
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACG  
CAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCCAGGGACG  
AAGCGCAAGTGACGGTACCTGGATAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCG  
TCTGTGCGCTCGGTCTGTGAAAACCTGCAGCTTAACTGTGGGCTTGCGGTTCGATACGGGC  
ATGACTGGAGTTCGGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT  
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCGGATACTGACGCTGAGGAG  
CGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGG  
GTGCTAGGTGTGGGGGCCATTCCACGGTCTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCACCCC  
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAA  
GCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGGTTTGACATG  
CACCAGACATCCCTAGAGATAGGGCTTCCCTTGTGGTTGGTGTGCAGGTGGTGCATGGCT  
GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTT  
CCATGTTGCCAGCGCGTTATGGCGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAG  
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTAC  
AATGGCAAGTACAGAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTTGTC  
TCAGTTCGGATCGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGAGTCGCTAGTAATCGCA  
GATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCGCCCGTCACGTCA  
CGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGACGGCCTAACCCGTGAGGGAGGGAGTTGTGCGAA  
GGTGGGACTGGCGATTGGGACG

図 2-5 N23 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列

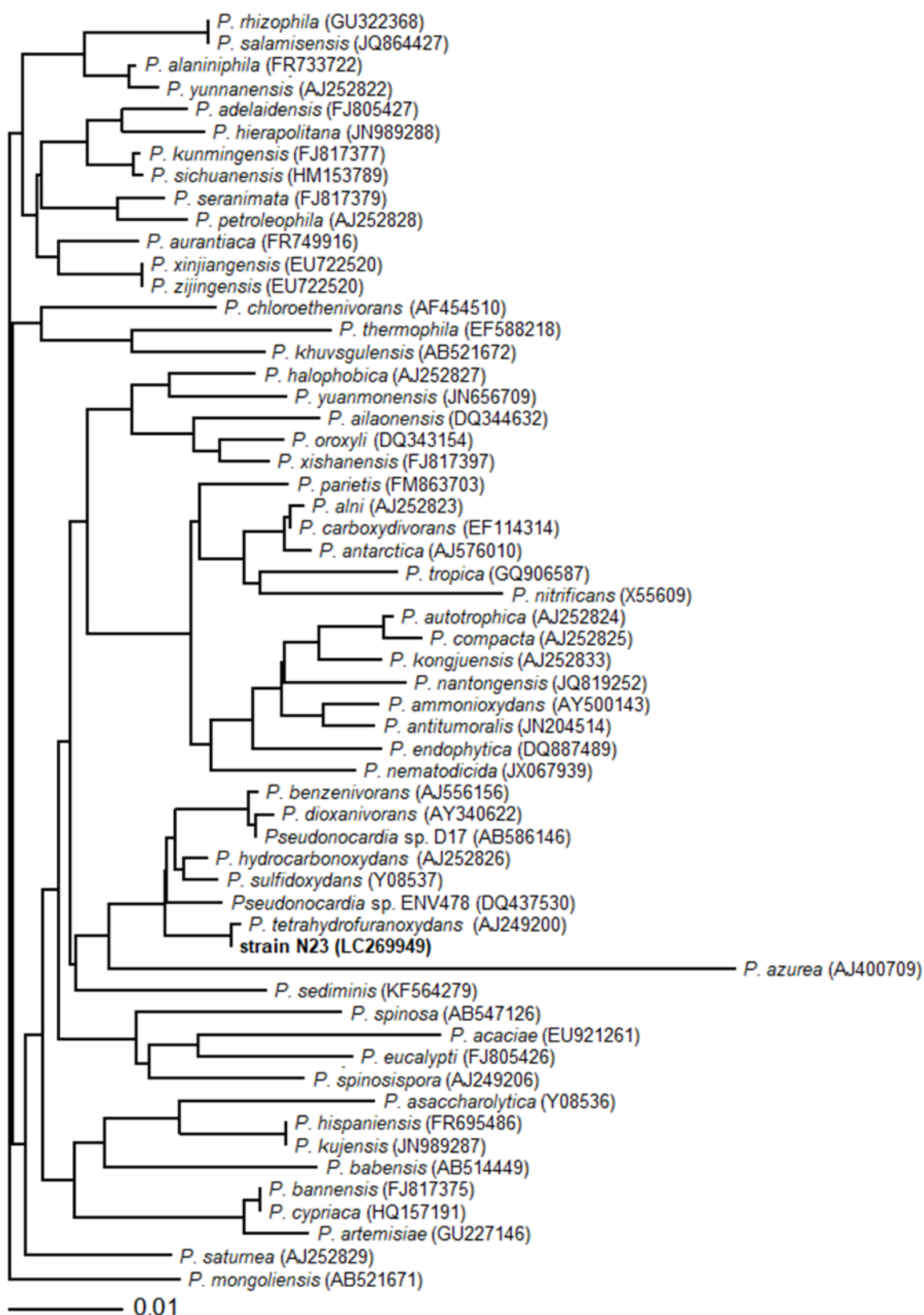


図 2-6 *Pseudonocardia* spp. の 16S rRNA 塩基配列に基づく系統樹における N23 株の位置付け



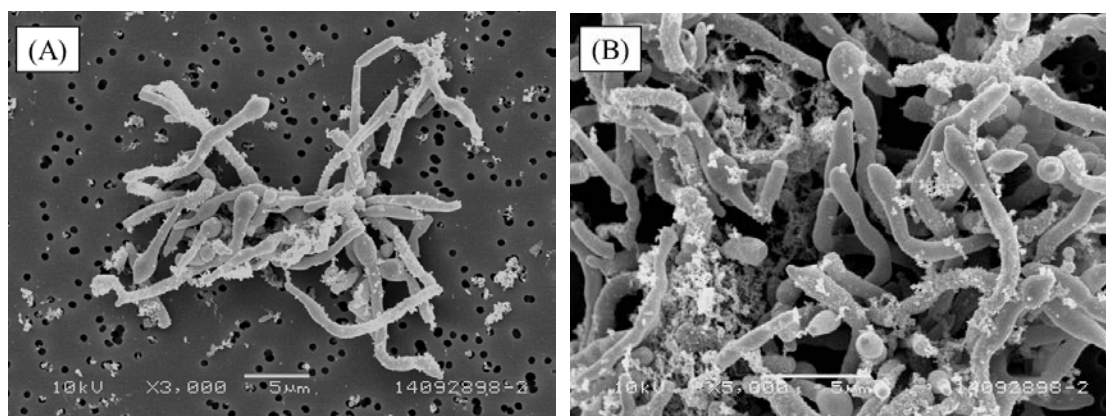
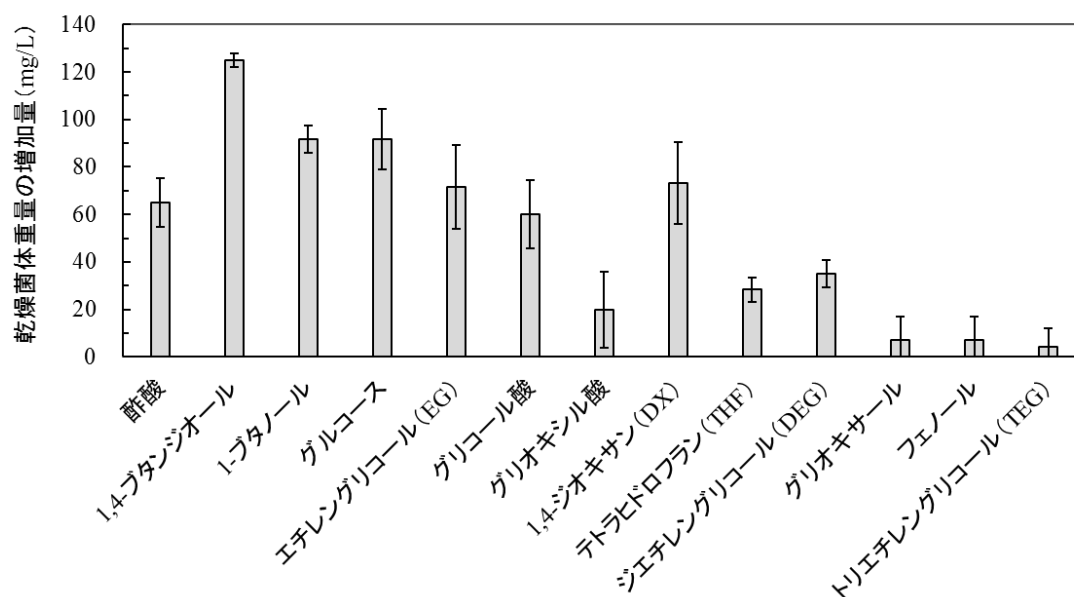


図 2-7 N23 株の SEM 画像

(A) : 3000 倍、(B) : 5000 倍

### 3.3 *Pseudonocardia* sp. N23 の炭素源利用性

*Pseudonocardia* sp. N23 の 11 種の炭素源に対する利用性を調査した。本試験では、各有機物を単一炭素源とした無機塩培地を用いた培養を 7 日間行い、乾燥菌体重量の増加量を測定することにより、それらの利用性を評価した。各炭素源を用いた 7 日間の培養での菌体増殖を図 2-8 に示す。一般的に微生物に利用されやすい炭素源である酢酸、1,4-ブタンジオール、1-ブタノール及びグルコースは、*Pseudonocardia* sp. N23 も増殖に利用することができ、約 80-120 mg/L の高い菌体濃度が示された。また、DX に加え、その中間代謝物として報告されている EG、グリコール酸及びグリオキシル酸 (Groster *et al.*, 2012)、DX と類似の化学構造を有する THF、及び DEG も、*Pseudonocardia* sp. N23 の増殖基質となることが確認できた。特に EG や DEG は、DX 含有排水に高濃度に含まれていることから (Popoole, 1991; Kim *et al.*, 2016)、*Pseudonocardia* sp. N23 を用いた排水処理において、増殖基質となり得る可能性がある。一方、*Pseudonocardia* sp. N23 は、フェノールやトリエチレングリコール、グリオキサールを炭素源として利用できないことが示された。グリオキサールは、DX の中間代謝物の一つであるため (Groster *et al.*, 2012)、*Pseudonocardia* sp. N23 が分解できる可能性があるものと予想していたが、ここでの結果は矛盾するものとなった。グリオキサールは、高濃度で用いた場合には、微生物の増殖を阻害することが明らかとなっていることから (Gerike and Gode, 1990)、本試験での濃度では *Pseudonocardia* sp. N23 の増殖を阻害したものとも考えられる。

図 2-8 *Pseudonocardia* sp. N23 による各炭素源の利用性 (n=3)

初期菌体濃度：52 mg/L、炭素源の初期濃度：100 mg-C/L

### 3.4 *Pseudonocardia* sp. N23 のドラフトゲノム解析

遺伝子レベルにて *Pseudonocardia* sp. N23 の特徴付けを行うことを目的として、ゲノム DNA 塩基配列のドラフト解析を行った。この解析において *Pseudonocardia* sp. N23 のゲノム配列は 173 個の contig で構成され、全ゲノム長は 6542330 bp、GC 含量は 72.5%であった。RAST パイプラインによるアノテーションの結果、6230 個のコードされているタンパク質があり、tRNA 遺伝子及び rRNA 遺伝子の数は、それぞれ 46 個及び 3 個であった。

第 1 章で述べたように、DX 分解における初発の酸化反応には、THF モノオキシゲナーゼをコードする *thm* 遺伝子群 (*thmADBC*) が関与することが明らかにされている (Sales *et al.*, 2013)。そこで、既往の DX 資化菌である *P. dioxanivorans* CB1190 の *thm* 遺伝子群を *Pseudonocardia* sp. N23 のゲノム情報から探索したところ、高い相同性を示す配列が存在することが見出された (表 2-1)。各領域における塩基配列の相同性は 96-98%と高いものの、*thmB* 及び *thmC* のサイズは、*P. dioxanivorans* CB1190 の配列よりも小さいことが明らかとなっており、両菌株の DX 分解酵素やその遺伝子の類似性と相違については、今後さらなる解析や実験による検証により検討していく必要がある。一方、Groster *et al.* (2012) によって示された代謝経路では、DX はグリコール酸やグリオキシル酸を経由して完全分解することが示されているが、*Pseudonocardia* sp. N23 のゲノム情報においてもこれらの代謝物の酸化反応に寄与する遺伝子群を特定できた。また、KEEG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) を用いた解析によって一連の代謝経路にてグリオキシル酸及びグリコール酸を分解できることも予測され (データ不掲載)、3.3 での試験結果を裏付けるものとなっている。

表 2-1 *thm* 遺伝子群の各領域における既往の DX 資化菌との比較

<i>P. dioxanivorans</i> CB1190					<i>Pseudonocardia</i> sp. N23				
Gene name	ID	Start	End	Length (bp)	ID	Start	End	Length (bp)	Identity (%)
<i>thmA</i>	Psed_6976	31123	32760	1638	Peg_6084	6338	4854	1485	98
<i>thmD</i>	Psed_6977	32884	33972	1089	Peg_6083	4760	3648	1119	96
<i>thmB</i>	Psed_6978	34003	35043	1041	Peg_6082	2720	2577	144	98
<i>thmC</i>	Psed_6979	35043	35396	354	Peg_6081	2466	2224	243	98

### 第4節 要約

本章では、DX 汚染地下水から DX 分解菌の集積及び単離を行い、単離した菌株の特徴付けを行った。その結果、3 ヶ月にわたる集積培養により DX 分解菌の集積系を構築でき、その懸濁液から N23 株を単離することに成功した。N23 株は、生理学的特性及び系統学的解析により *Pseudonocardia* 属に属することが明らかとなった。また、DX 分解試験により、*Pseudonocardia* sp. N23 は、DX を単一炭素源として増殖可能な資化菌であること示され、ドラフトゲノム解析によって DX の酸化に寄与する *thm* 遺伝子群を有していることを明らかになった。また、DX 分解の中間代謝物であるグリオキシル酸やグリコール酸を増殖基質として利用できることも、資化試験及びゲノム解析から確認された。

## 第3章 *Pseudonocardia* sp. N23 の 1,4-ジオキサン分解特性

---

### 第1節 緒言

第2章において 1,4-ジオキサン (DX) 資化菌である *Pseudonocardia* sp. N23 を単離することに成功したが、これが真に排水処理への適用に有望な菌株であることを確認するためには、その DX 分解特性を詳細に検討する必要がある。特に、本研究では分解酵素を構成的に生産することができ、既往の菌株に比べて高い分解能力を有する有望な分解菌の取得を目指しており、それらの観点から *Pseudonocardia* sp. N23 の特徴を確認する必要がある。そこで、本章では、*Pseudonocardia* sp. N23 の DX 分解特性を把握することを目的として、まず、分解酵素の誘導性を調べ構成型資化菌であることを確認した。次いで、DX 分解能力を評価するため、分解の動力学的パラメータを調査するとともに、pH・温度の環境因子が DX 分解に及ぼす影響についても調査し、既存菌株との比較を行った。また、DX 含有排水には、DX の他に 1,3-ジオキソラン (DOL) や 2-メチル-1,3-ジオキソラン (MDOL) といった多様な環状エーテル物質が含有することが明らかとなっており (Adams *et al.*, 1994)、*Pseudonocardia* sp. N23 による DX 分解への阻害影響も懸念されるため、環状エーテル物質の共存下における *Pseudonocardia* sp. N23 の DX 分解特性についても調べた。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 2.1 供試培地

本章で使用した培地の基本的組成は第2章の第2節 2.2 に準じた。

#### 2.2 供試菌株及び植菌液の作成

本章では、第2章で単離した DX 資化菌 *Pseudonocardia* sp. N23 に加え、既往の誘導型資化菌である *P. dioxanivorans* CB1190 (Kelley *et al.*, 2001) を用い比較した。*P. dioxanivorans* CB1190 は、(独) 理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料研究室 (JCM) より分譲された菌株を用いた。これらの植菌液の作成は、特に記載のない限り第2章の第2節 2.4 に記載した手順にて作成し、所定の乾燥菌体重量もしくは菌体タンパク質濃度になるように調製した。それぞれの測定方法は、第2章の第2節 2.8 並びに、Meyers ら (1998) の方法に準じた。

#### 2.3 DX 及び環状エーテル物質の分解試験

100-mL 容フラスコに所定濃度の DX、あるいは他の環状エーテル物質を含む無機塩培地 19 mL と植菌液 1 mL を加え、28°C、120 rpm にて回転振盪培養を行った。特に記載のない

限り、本分解試験を基本手順とし、以下の項目の評価を行った。なお、DX 以外の環境エーテル物質として、ここでは DOL 及び MDOL を用いた (図 3-1)。

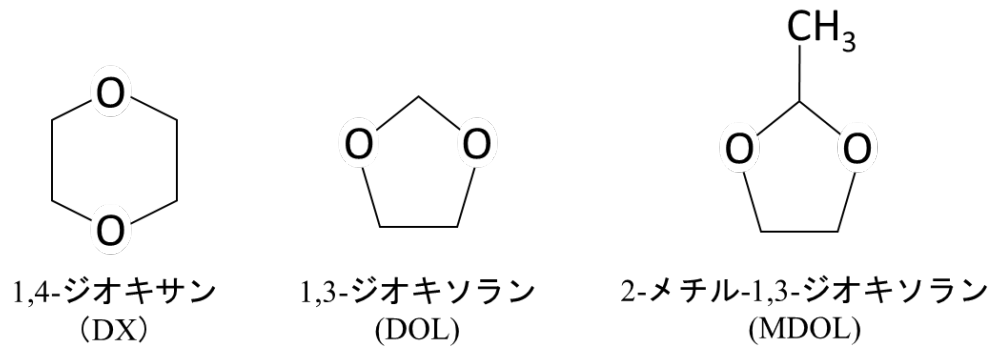


図 3-1 DX と試験に用いた環状エーテル物質の化学構造

#### (1) DX 分解酵素の誘導性の調査

第2章の第2節 2.4 に記載した前培養において、DX を添加して培養した菌体（誘導菌体）、DX を添加せずに培養した菌体（非誘導菌体）を用いて、各植菌液を調製した。分解試験は、10 mg/L の DX を含む無機塩培地に菌体濃度が 10 mg-protein/L となるように各植菌液を添加して行った。試験期間は 72 時間以内とし、溶液中の DX を適宜測定した。

#### (2) DX 資化菌の動力的パラメータの調査

分解菌による DX および DOL の比分解速度は、異なる初期濃度で DX もしくは DOL を含む無機塩培地を用いた分解試験によって調べた。試験期間は 8 時間以内とし、溶液中の環状エーテル物質濃度を適宜測定した。比分解速度は、環状エーテル物質の残存濃度が直線的に低下している期間の減少速度から、無菌系での環状エーテル物質の減少速度（揮発速度）を差し引き、実験開始時の菌体タンパク量で除することにより算出した。環状エーテル物質の初期濃度と比分解速度の間には Monod 式(式1)で表現される関係があることを確認し、回帰曲線を求めて動力的パラメータを決定した。DX 分解による細胞収率を調査する際には、100-1000 mg/L の DX を含む無機塩培地を用いて分解試験を行い、試験開始 6 時間後における DX 分解量と菌体タンパクの増加量から細胞収率を算出した。上記の分解試験の初期菌体濃度は 100-300 mg-protein/L とした。

$$k = k_{\max} \times S / (K_s + S) \cdots \cdots \text{(式 1)}$$

$k$  : 比分解速度、 $S$  : 基質濃度、 $k_{\max}$  : 最大比分解速度、 $K_s$  : 半飽和定数

## (3) 環境因子が DX 分解に及ぼす影響の評価

500 mg/L の DX を含む無機塩培地に菌体濃度が 200-300 mg-dry cell/L になるように植菌液を添加して分解試験を行った。試験期間は 24 時間以内とし、DX 濃度を適宜測定した。試験期間中における DX 濃度の減少速度から無菌系での減少速度（揮発速度）を差し引くことによって、体積あたりの DX 分解速度を算出した。pH の影響を調査する際には、pH を 3-8 に調整した無機塩培地を用い、また、温度の影響を調査する際には、培養温度を 20-45°C に維持して分解試験を行った。

## (4) 環状エーテル物質共存下における DX 分解試験

DX、DOL 及び MDOL をそれぞれ 10 mg/L 含む無機塩培地に菌体濃度が 200 mg-dry cell/L になるように植菌液を添加して分解試験を行った。試験期間は 7 時間以内とし、環状エーテル物質濃度を適宜測定した。

## 2.7 分析

水質分析には、第2章の第2節 2.8 に記載した方法で得たろ液を用いた。溶液中の環状エーテル物質濃度の測定は、HS-GC/MS を用いて、第2章の第2節 2.8 にて記載した方法に準じて行った。MS における DOL 及び MDOL の選択イオンの設定は、表 3-1 に示した条件で行った。

表 3-1 環状エーテル物質の定量のための選択イオン（単位： $m/z$ ）

化学物質	ターゲットイオン	確認イオン
DOL	73.0	74.0
MDOL	73.0	58.0

## 第3節 実験結果及び考察

## 3.1 DX 分解酵素の誘導性

既往研究より DX 分解菌は、その分解酵素の誘導の有無から誘導型及び構成型資化菌に分類される (Sei *et al.*, 2013)。そこで、*Pseudonocardia* sp. N23 の DX 分解酵素の誘導の有無を調べるため、CGY 培地を用いた前培養において DX を添加して培養した菌体 (誘導系) と DX を添加せずに培養した菌体 (非誘導系) を用いて DX の分解プロファイルと比較した。また、誘導型資化菌であることが知られている *P. dioxanivorans* CB1190 も同様の手順で試験を行い比較した。*P. dioxanivorans* CB1190 では、誘導系において試験開始から速やかな DX 濃度の低減が確認されたが、非誘導系では、分解傾向は誘導系よりも緩やかであり、48 時間以降においても 0.5 mg/L の DX が残存したことから (図 3-2(a))、分解酵素が誘導されることが確認された。これに対し、*Pseudonocardia* sp. N23 を用いた試験では、誘導系及び非誘導系での DX 分解速度に差はなく、何れも試験開始直後から速やかな分解が生じ、試験 14 時間後には DX 濃度が定量下限未満 ( $< 0.05$  mg/L) にまで低下した (図 3-2(b))。このように、*Pseudonocardia* sp. N23 は、前培養における DX による誘導の有無に関わらず、高い DX 分解能を発揮し、また、低濃度の DX を完全に分解できることが示されたことから、本研究で目的としていた構成型の DX 分解菌であることが示された。

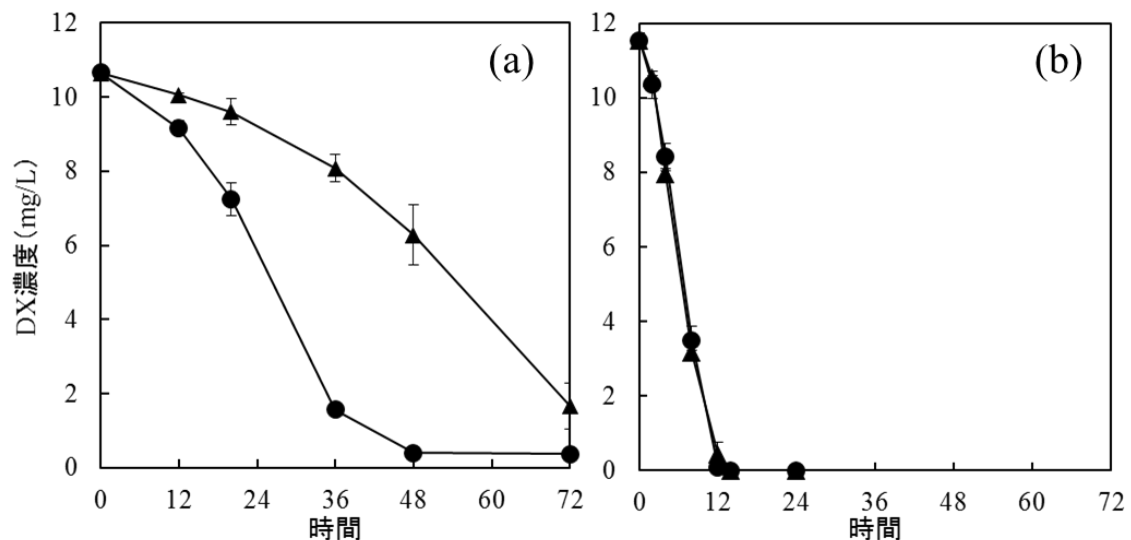


図 3-2 DX 分解酵素の誘導性 (n=2)

(a): *P. dioxanivorans* CB1190、(b): *Pseudonocardia* sp. N23

● : DX を含む CGY 培地で培養した菌体 (誘導系)

▲ : DX を含まない CGY 培地で培養した菌体 (非誘導系)



## 3.2 DX 分解の動力的パラメータ

初期濃度の異なる DX を含む無機塩培地を用いて、*Pseudonocardia* sp. N23 の菌体タンパク質あたりの比分解速度を求め、*P. dioxanivorans* CB1190 と比較した。図 3-3 に両株の試験における DX 初期濃度と比分解速度の関係を示した。両菌株における DX 比分解速度は、基質の DX 濃度が高くなるに従って増加したが、高濃度域においては比分解速度がほぼ一定となる典型的な Monod 式によって表されることが明らかとなった。そこで、Monod 式の変形式である Hanes-Woolf プロット (Purich, 2010; Santos *et al.*, 2014) に基づいて最大比分解速度 ( $k_{\max}$ ) 及び半飽和定数 ( $K_s$ ) を求めたところ、*Pseudonocardia* sp. N23 に対しては、0.230 mg-DX/mg-protein/h 及び 79.9 mg/L、*P. dioxanivorans* CB1190 に対しては、0.083 mg-DX/mg-protein/h 及び 91.8 mg/L と推算された。

また、*Pseudonocardia* sp. N23 の細胞収率を求める分解試験において得られた、DX 分解量と菌体増殖量 (タンパク質量) の関係を図 3-4 にまとめた。その結果、DX の分解量と比例した菌体増殖が確認され ( $r^2=0.998$ )、この関係式より *Pseudonocardia* sp. N23 の細胞収率を 0.323 mg-protein/mg-DX と算定した。

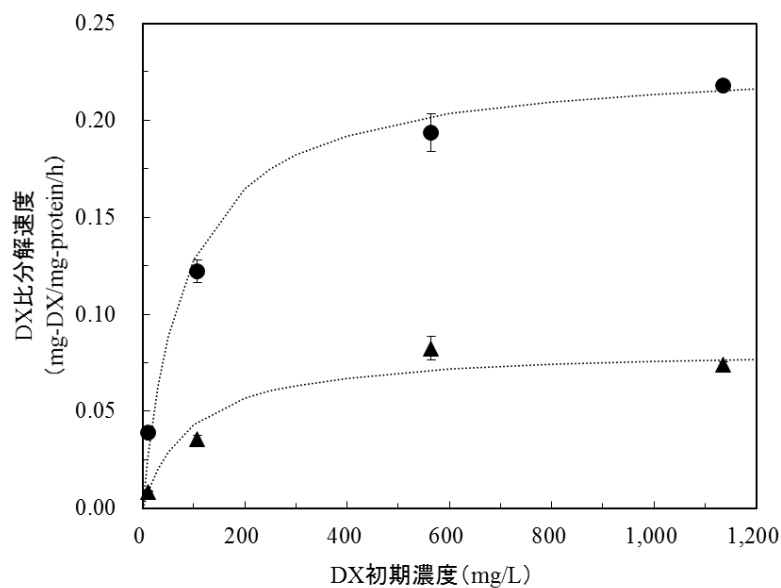


図 3-3 異なる DX 初期濃度における DX 比分解速度 (n=2)

● : *Pseudonocardia* sp. N23 (初期菌体濃度 : 128 mg-protein/L)

▲ : *P. dioxanivorans* CB1190 (初期菌体濃度 : 206 mg-prtein/L)

曲線 : Monod 式による回帰曲線

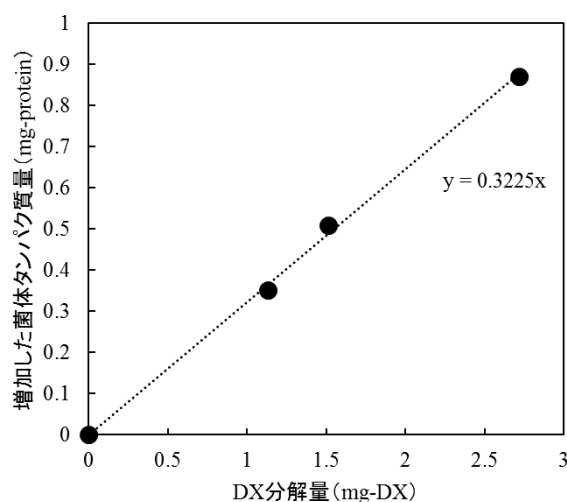


図 3-4 *Pseudonocardia* sp. N23 における DX 分解量と増加した菌体タンパク質量の関係 (n=3)

ここで求めた *Pseudonocardia* sp. N23、及び既往の DX 資化菌の動力的パラメータを表 3-2 に比較して示した。*Pseudonocardia* sp. N23 の  $k_{\max}$  値は、誘導型資化菌 *Afipia* sp. D1 よりも低いものの、構成型資化菌の中で最も高いことが明らかとなった。また、構成型資化菌である *X. flavus* DT8 は、*Pseudonocardia* sp. N23 より細胞収率は僅かに高いが、DX 比分解速度は低いことが明らかとなり、また 300 mg/L 以上の高濃度 DX を分解できないことから (Chen *et al*, 2016)、*Pseudonocardia* sp. N23 に勝る分解菌であるとは言えない。以上のことから、*Pseudonocardia* sp. N23 は、最大比分解速度と細胞収率がともに既往の分解菌と比べて高いレベルにあり、非常に効率的に DX を資化できる有望な分解菌であることが明らかとなった。

表 3-2 既往の資化菌における DX 分解の動力学的パラメータ

分解酵素の 誘導性	菌株	細胞収率 (mg-protein/mg-DX)	最大比分解速度 ( $k_{\max}$ ) (mg-DX/mg-protein/h)	半飽和定数 ( $K_s$ ) (mg/L)
誘導型	<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	0.01-0.09 <sup>a</sup>	0.083 <sup>b</sup>	91.8 <sup>b</sup>
	<i>Afipia</i> sp. D1	0.185 <sup>c</sup>	0.263 <sup>c</sup>	25.8 <sup>c</sup>
	<i>Mycobacterium</i> sp. D6	0.185 <sup>c</sup>	0.139 <sup>c</sup>	25.6 <sup>c</sup>
	<i>Mycobacterium</i> sp. D11	0.179 <sup>c</sup>	0.052 <sup>c</sup>	69.8 <sup>c</sup>
	<i>Pseudonocardia</i> sp. D17	0.223 <sup>c</sup>	0.096 <sup>c</sup>	59.7 <sup>c</sup>
構成型	<i>Xanthobacter flavus</i> DT8	0.35 <sup>d</sup>	< 0.083 <sup>d</sup>	17.5 <sup>d</sup>
	<i>Pseudonocardia</i> sp. N23	0.323 <sup>b</sup>	0.230 <sup>b</sup>	79.9 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: Parales *et al.*, 1994; Kelley *et al.* 2001; Mahendra and Alvarez-Cohen, 2006

<sup>b</sup>: 本研究

<sup>c</sup>: Sei *et al.*, 2013

<sup>d</sup>: Chen *et al.*, 2016 ; *X. flavus* DT8 の  $k_{\max}$  は、*P. dioxanivorans* CB1190 よりも低いことが報告されている。

### 3.3 環境因子が DX 分解に及ぼす影響

第1章において述べたように既往の DX 資化菌は、中性域かつ 30°C において高い分解活性を示すことが明らかとなっているが、実排水の処理においてはこれらの環境要因が変動することも想定されるため、これらが *Pseudonocardia* sp. N23 の DX 分解に及ぼす影響を調査した。図 3-5 に異なる pH 及び温度における DX 分解速度を示す。*Pseudonocardia* sp. N23 は、pH 3.1-8.2 において DX を分解することが可能であり、その分解速度は pH 7.0 において最も高い値を示した（図 3-5(a)）。特に、pH 3.8 での DX 分解速度は、至適 pH（7.0）での値の 83% であり、酸性域においても高い分解活性を維持できることが明らかとなった。また、温度の影響の検討では、*Pseudonocardia* sp. N23 は、40°C 以上では DX を分解できないものの、20-35°C において DX 分解できることが示された。*Pseudonocardia* sp. N23 の至適温度は、25-30°C であり、比較的低温となる 20°C であっても至適温度の 76% の分解活性を維持できることが明らかとなった（図 3-5(b)）。

既往の DX 資化菌は、pH 3-10、14-42°C において DX 分解でき、その分解活性は pH 6-8、25-35°C にて高い値を示すが、酸性条件下では著しく低下することが明らかとなっている（Parales *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2010; Sei *et al.*, 2013; Matsui *et al.*, 2016）。具体的な事例として、既往の構成型資化菌中で比較的高い比分解速度を示す *Pseudonocardia* sp. D17 では、pH 5.0 の分解活性は、至適 pH の 50% に低下してしまうことが知られている（Sei *et al.*, 2013）。以上の結果から、*Pseudonocardia* sp. N23 は、幅広い pH 域及び温度域における DX 分解が可能であり、特に、pH 5.0 の酸性条件下でも高い分解活性を維持できるという特殊性を有することが示された。この酸性条件下での高い分解活性のメカニズムについては、本試験の結果からは明らかにできないため、今後の検討が必要である。

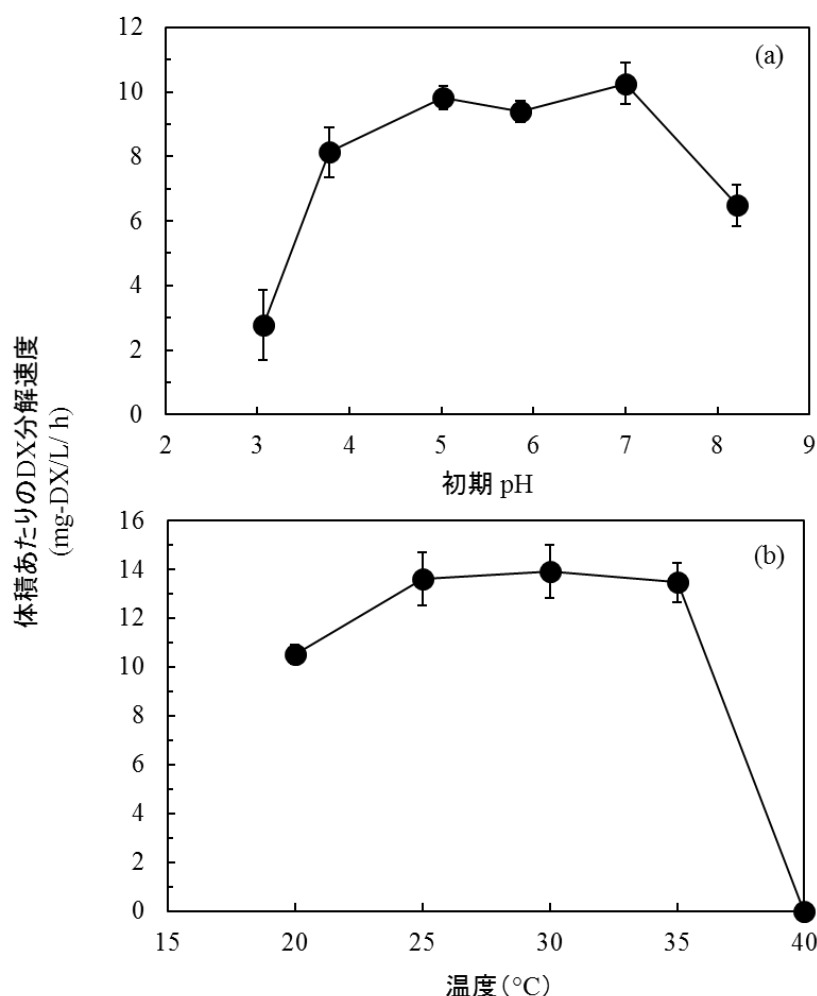


図 3-5 pH 及び温度が DX 分解に及ぼす影響 (n=3)

(a) : 初期菌体濃度 : 213 mg-dry cell/L、(b) : 初期菌体濃度 : 314 mg-dry cell/L

### 3.4 環状エーテル物質の共存下における DX 分解

DX 含有排水には、DX の他に、エチレングリコール (EG) や各種環状エーテル物質が含まれていることが明らかとなっているが (Adams *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2016)、このうち、EG は *Pseudonocardia* sp. N23 とって良好な増殖基質になり得ることが明らかとなっている (第2章参照)。従って、EG の共存は *Pseudonocardia* sp. N23 の菌体量を増加させることによって、DX 分解にプラスの影響を与えるものと考えられる。一方、DOL や MDOL などの環状エーテル物質は、DX と構造が類似していることから (図 3-1)、DX 分解酵素に対する基質の競合が生じること等により、DX 分解にマイナスの効果をもたらす可能性がある。そこで、DX、DOL、及び MDOL が共存する場合の *Pseudonocardia* sp. N23 による各物質の分解挙動について検討した。

図 3-6 に示すように、DX 以外の環状エーテル物質も *Pseudonocardia* sp. N23 により分解されることが明らかとなったが、DX と他の環状エーテル物質では分解傾向が異なった。

DOL 及び MDOL 濃度は、実験開始時から急激に低下し、実験終了時である 7 時間後には定量下限値未満 ( $<0.05$  mg/L) に達した。一方、実験開始直後の DX 濃度の低下は緩やかであり、DOL 及び MDOL 濃度がそれぞれ 2.8 mg/L 及び 4.0 mg/L にまで低下した 4 時間以降に濃度低下が早まり、7 時間後には定量下限値未満に達した。

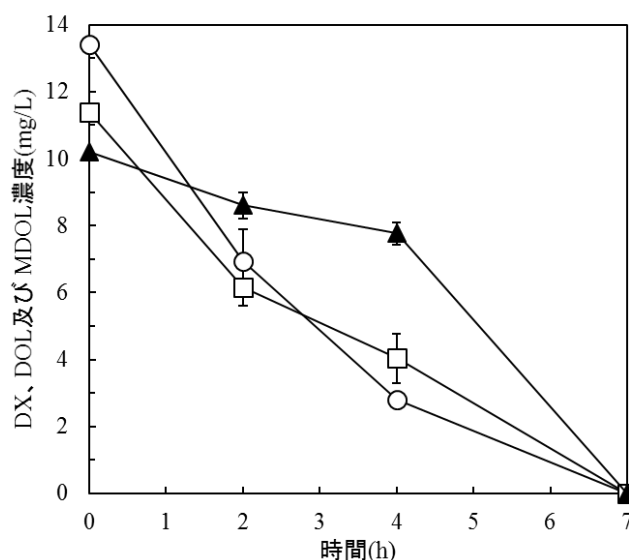


図 3-6 各種環状エーテル物質存在下における *Pseudonocardia* sp. N23 による DX 分解  
(n=3)

▲ : DX、○ : DOL、□ : MDOL

初期菌体濃度 : 200 mg-dry cell/L

既往研究では、DX 分解酵素によって環状エーテル物質の一つであるテトラヒドロフラン (THF) が分解されること (Sales *et al.*, 2013) や、THF 分解酵素によって DX が分解されること (Masuda *et al.*, 2012) が報告されており、DX と THF は DX 分解菌が保有する同一酵素によって分解され得るものと推察されている。本研究で検討した DOL や MDOL も、DX や THF と類似の構造を有することから、*Pseudonocardia* sp. N23 による DX 分解酵素によって分解されたものとも考えられる。また、DX よりも DOL と MDOL の分解が優先的に進行したことから、*Pseudonocardia* sp. N23 が有する DX 分解酵素は、DX よりも DOL 及び MDOL に対して親和性が高いことが考えられた。そこで、*Pseudonocardia* sp. N23 による DOL 分解の動力学パラメータの決定を試みた。*Pseudonocardia* sp. N23 における DOL の初期濃度と比分解速度の関係を図 3-7 に示す。3.2 で検討した DX 比分解速度と同様に、DOL 比分解速度は Monod 式に従うことが示されたことから、Hanes-Woolf プロットに基づいて  $k_{\max}$  及び  $K_s$  を算出し、DX の動力学パラメータと比較したところ、DOL の  $k_{\max}$  及び  $K_s$  は、DX の値よりも低いことが明らかとなった (表 3-3)。すなわち、*Pseudonocardia* sp. N23 は高濃度域においては DOL よりも DX を高速度で分解するが、低濃度域では DX よりも効率的に DOL

を分解することが示唆された。図 3-6 に示した各種環状エーテル物質共存下での分解プロファイルにおける優先的な DOL 及び MDOL の分解は、分解酵素の高い親和性によるものであり、拮抗的に DX の分解が阻害されたものと解釈することができる。

以上のことから、*Pseudonocardia* sp. N23 は DOL 及び MDOL の共存下でも DX を分解することは可能であるが、拮抗阻害により DX 分解は遅延するものといえる。従って、DOL 等の環境エーテル物質の共存により DX 処理に明らかな悪影響が生じる場合には、予め DX 以外の環状エーテル物質を除去するための前処理が必要であると考えられた。

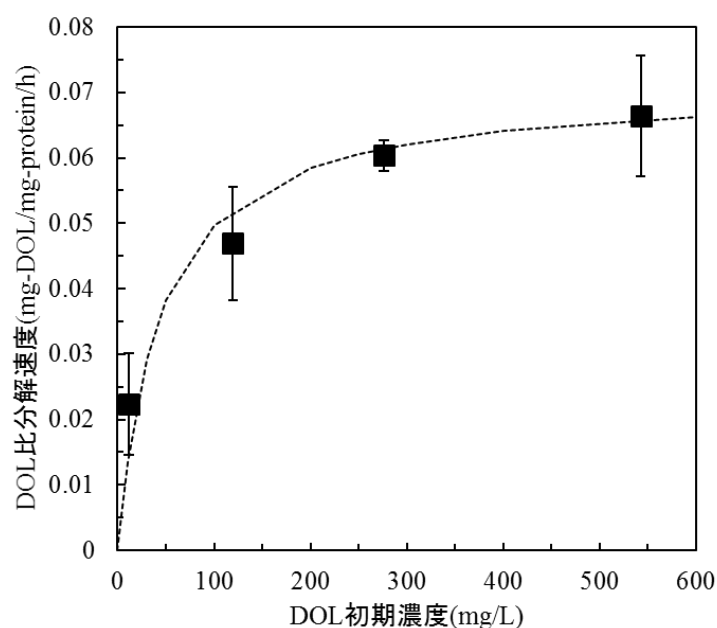


図 3-7 DOL 初期濃度と DOL 比分解速度の関係 (n=2)

曲線：Monod 式による回帰曲線

初期菌体濃度：200 mg-protein/L

表 3-3 *Pseudonocardia* sp. N23 おける DX 及び DOL 分解の動力学パラメータ

環状エーテル物質	最大比分解速度 ( $k_{\max}$ )	半飽和定数 ( $K_s$ )
DX	0.230 mg-DX/mg-protein/h	79.9 mg/L
DOL	0.071 mg-DOL/mg-protein/h	42.8 mg/L

#### 第4節 要約

本章では、*Pseudonocardia* sp. N23 の DX 分解特性を把握することを目的として種々の検討を行った。その結果、*Pseudonocardia* sp. N23 は、構成型の DX 分解酵素を有していることが示され、また、DX 比分解速度は、既存の構成型資化菌の中で最も高い値を示す効率的な分解菌であることが明らかとなった。*Pseudonocardia* sp. N23 は、広範囲の pH 域及び温度域において DX を分解ができ、特に酸性条件下においても高い DX 分解活性を維持できることが示された。DX 含有排水に共存するとされる DOL や MOL に対しても *Pseudonocardia* sp. N23 は分解能を示すが、これらの分解は DX 分解酵素によって行われているものと考えられた。さらに、この分解酵素は、DX よりも DOL や MDOL といった環状エーテル物質に対して高い親和性を示すことが明らかになったことから、環状エーテル物質の共存下では基質の競合が生じることによって DX の分解が遅延することが示唆された。



## 第4章 *Pseudonocardia* sp. N23 を用いた排水処理技術の確立

### 第1節 緒言

第3章において *Pseudonocardia* sp. N23 は、1,4-ジオキサン（DX）含有排水の生物学的処理に有効であるとされる構成型資化菌であり、既往の構成型資化菌と比べて、より高い DX 比分解速度を示すとともに、広範囲の pH 域及び温度域においても高い分解活性を維持できることが示された。さらに、*Pseudonocardia* sp. N23 は、DX 含有排水に共存するエチレングリコール（EG）や環状エーテル物質も分解できることから、多様な有機成分が共存する DX 含有排水を処理できる可能性がある。そこで、本章では、DX 含有排水を例として、エチレンオキサイド（EO）及び EG を製造する化成品製造工場排水に対して、*Pseudonocardia* sp. N23 を用いた排水処理システムの確立を試みた。

### 第2節 実験材料及び方法

#### 2.1 供試培地及び供試排水

本章で使用した培地の基本的組成は第2章の第2節 2.2 に準じた。試験に用いた模擬排水は、水道水を用いて作成した無機塩培地に DX 終濃度が 1000 mg/L になるように添加して作成した。一方、実排水には、国内の化成品製造工場（A 事業所）にて EO・EG 製造工程から採取した DX 含有排水を用い、無機塩培地に準じた組成の栄養塩類を添加して処理実験に供した。表 4-1 に実排水に含まれる各有機成分の濃度を示す。供試排水の pH は 5.0 あるいは 7.0 に調整した。

表 4-1 実排水における各種成分の濃度

項目	濃度
1,4-ジオキサン（DX）	18.2-19.5 mg/L
1,3-ジオキソラン（DOL）	117.2-152.4 mg/L
2-メチル-1,3-ジオキソラン（MDOL）	8.1-10.4 mg/L
2-クロロメチル-1,3-ジオキソラン（CMDOL）	10.3-13.3 mg/L
エチレングリコール（EG）	2.8-3.1 g/L
溶存有機性炭素（DOC）	1284-1298 mg/L

## 2.2 供試菌株及び植菌液の作成

本章では、構成型 DX 資化菌である *Pseudonocardia* sp. N23 を用いた。試験に用いる植菌液は、第2章の第2節 2.4 における前々培養及び前培養に用いる培地を MGY 培地に変更して調製した。

## 2.3 ラボスケールリアクターを用いた排水処理試験

1.2-L 容の円筒型のリアクターを 28°C の恒温室内に設置し、供試排水及び *Pseudonocardia* sp. N23 植菌液を添加して液量を 1 L に調整した（初期菌体濃度：840-1300 mg-dry cell/L）。その後、1 L/min で通気を行い、下記に示す連続回分試験及び連続流入試験を開始した。

### （1）連続回分試験

*Pseudonocardia* sp. N23 は、増殖とともに菌体が凝集する特性があるため、沈降分離により容易に菌体回収が可能であることが明らかとなったことから（図 4-1）、図 4-2(a)に示すリアクターを用いて、連続回分モードで処理試験を行った。連続回分処理では、1 サイクルの時間を 8 時間あるいは 24 時間とし、一定時間の好気処理を行った。その後、30 分間の通気停止により菌体を沈殿させ、リアクター側面から 0.6-0.9 L の上澄み（処理水）を引き抜き、リアクター上部より新たな供試排水を投入した。この操作により、*Pseudonocardia* sp. N23 菌体は十分に沈降し、澄明な処理水が得られていた。回分処理での水理学的滞留時間（HRT）は、13.3-34.5 時間とした。リアクター内には pH センサーを設置し、1 N 塩酸あるいは 2 N 水酸化ナトリウム水溶液を自動滴下して pH 5.0±0.2 あるいは pH 7.0±0.2 に制御した。試験期間中の水質分析として、各サイクルにおける DX、DOL、MDOL、CMDOL、EG 及び DOC の濃度変化を調べた。また、試験期間中には、リアクター内の *Pseudonocardia* sp. N23 を含む微生物を適宜引き抜き、リアクター内の菌体の乾燥重量の定量を行うとともに、real-time PCR により *Pseudonocardia* sp. N23 の挙動をモニタリングした。

### （2）連続流入試験

上述と同様の円筒型リアクターを用い、立ち上げ運転として回分処理を 8 時間実施した後、連続流入処理に切り替えた（図 4-2(b)）。HRT が 13.3 時間となるように供試排水を連続通水し、カラム内に設置した円筒管（内径：1.5 cm）の上部からポンプにて処理水を排出した。連続処理試験ではリアクター内からの微生物の流出を防止するために、円筒管内部にウレタン製のスポンジを厚さ 2.0 cm 程度充填した。リアクター内の pH は、1 N 塩酸あるいは 2 N 水酸化ナトリウム水溶液を自動滴下して pH 7.0 ± 0.2 に制御した。試験中は、適宜、処理水中の DX、DOL、MDOL 及び CMDOL の濃度測定、及びリアクター内の乾燥菌体重量の測定、real-time PCR による *Pseudonocardia* sp. N23 のモニタリングを行った。



図 4-1 *Pseudonocardia* sp. N23 の沈降分離性

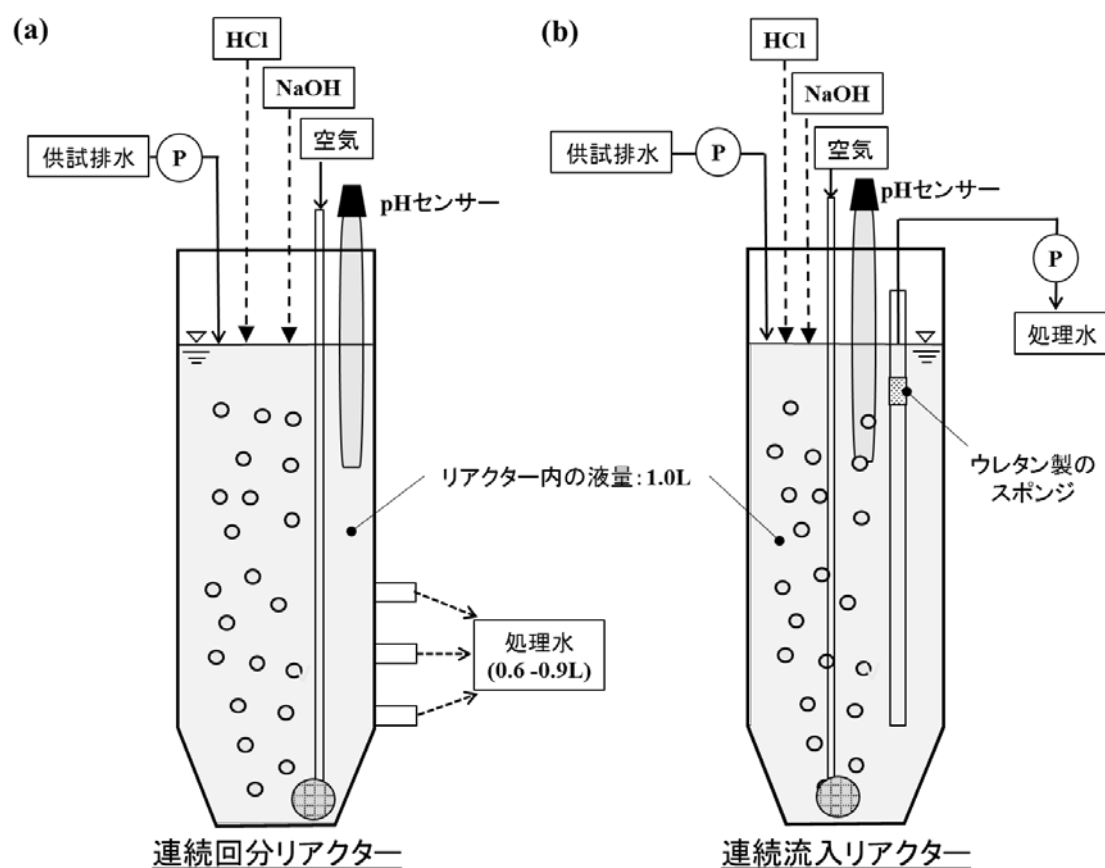


図 4-2 連続回分リアクター(a)及び連続流入リアクター(b)の模式図

## 2.4 分析

水質分析には、第2章の第2節2.8に記載した方法で得たろ液を用いた。溶液中の環状エーテル物質濃度の測定は、HS-GC/MSを用いて、第2章の第2節2.8にて記載した方法に準じて行った。MSにおけるCMDOLの選択イオンの設定は、ターゲットイオンを73.0 m/z、確認イオンを57.0 m/zとした。EGは、高速液体クロマトグラフィー（Alliance 2695 HPLC system、Waters）を用いて Isern ら（2013）の測定条件に準じて測定した。溶存有機性炭素（DOC）濃度の測定は、第2章の第2節2.8に準じた。

リアクター内の乾燥菌体重量（濃度として）の測定は、第2章の第2節2.8に記載した方法に準じて行った。この乾燥菌体重量は *Pseudonocardia* sp. N23 を含めたリアクター内の全微生物量を表す指標であり、コンタミネーションによって生じる雑菌等を含むものとなる。また、DX分解の初発酸化に関与すると考えられる *thmC* 遺伝子を real-time PCR により定量することによる *Pseudonocardia* sp. N23 のモニタリングも実施した。ここで、試料中の DNA は、FastDNA SPIN Kit for Soil（MP Biomedicals）を用いて抽出した後、MagExtractor -PCR & Gel Clean up-（東洋紡）を用いて精製し、real-time PCR に供した。Real-time PCR は、*thmC* 遺伝子を特異的に検出可能なフォワードプライマー *thm-F*（5'-TGATTATGTGGGGCTGGTTATG-3'）とリバースプライマー *thm-R*（5'-CGAGGAAAGTTGTGTTCGTGATG-3'）を用い、PikoReal リアルタイム PCR システム（サーモフィッシャーサイエンティフィック）により、95℃、1 分の後、95℃、30 秒の熱変性、62℃、30 秒のアニーリング、72℃、30 秒の伸長を 32 サイクル行う温度プロファイルで実行した（n=3）。定量に使用する検量線は、上記プライマーを用いて *Pseudonocardia* sp. N23 ゲノム内の標的部位を PCR 増幅し、得られた増幅産物をプラスミド pTAC-1（バイオダイナミクス研究所）に挿入して作製したスタンダード DNA を用いて作成した。別途行ったラボスケールリアクター内の微生物の観察には、試料にアクリジンオレンジ染色を施し（須藤, 1988）、蛍光顕微鏡（BX-50, オリンパス）を用い、デジタルカメラ（DS-5060L, オリンパス）により撮影を行った。

## 第3節 実験結果及び考察

### 3.1 異なる処理方式における性能比較

排水処理方式として連続回分処理及び連続流入処理を選定し、実排水を用いて *Pseudonocardia* sp. N23 による DX 処理性能の比較を行った。表 4-1 に示したように、DX を含めた主要成分の濃度は試験期間中大きな変動はなかった。

#### （1）回分処理における環状エーテル物質の分解の確認

連続回分処理並びに連続流入処理での運転を行う前に、立ち上げ運転としてそれぞれのリアクターにおいて 1 サイクルの回分処理を行い、実排水における DX の分解性能を評価

した。立ち上げ運転の回分処理は、リアクター系内の pH を  $7.0 \pm 0.2$  に制御して実施した。その結果、両リアクターでの各環状エーテル物質の分解傾向は、概ね同様であったため、両リアクターで得られたデータを平均し、グラフ化したものを図 4-3 に示した。実験開始から 3 時間後においては、DOL の分解が優先的に進行し、DX、MDOL 及び CMDOL 濃度の低下は緩やかであった。その後、6 時間後にかけて、DX を含む全ての環状エーテル物質の明確な濃度低下が確認され、7.5 時間後には、全ての環状エーテル物質の濃度が定量下限値未満 ( $< 0.05 \text{ mg/L}$ ) に達した。以上の結果から、先の試験と同様に環状エーテル物質による DX の分解遅延は確認されたものの、DX 濃度を一律排水基準値 ( $0.5 \text{ mg/L}$ ) 未満まで低減できることが示された。

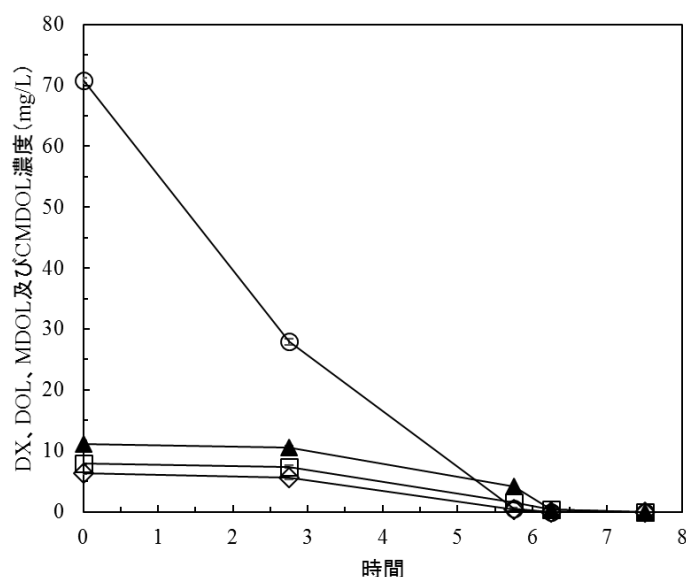


図 4-3 *Pseudonocardia* sp. N23 による実排水中の DX 及び各種環状エーテル物質の分解  
(立ち上げ運転における回分処理) (n=2)

▲ : DX, ○ : DOL, □ : MDOL, ◇ : CMDOL、初期菌体濃度 :  $890 \pm 50 \text{ mg-dry cell/L}$

## (2) 連続回分処理及び連続流入処理の DX 分解性能の比較

(1) の立ち上げ運転が終了した後、それぞれのリアクターにおいて、連続回分処理及び連続流入処理を行った。各処理方式では、リアクター内の pH を  $7.0 \pm 0.2$  に制御し、13.3 時間の HRT にて運転を行った。

図 4-4(a)、(b)は、立ち上げ運転期間を含めた連続回分処理、及び連続流入処理における各種環状エーテル物質の濃度推移をそれぞれ示している。連続回分処理では、いずれのサイクルにおいても、DX、DOL、MDOL 及び CMDOL は 8 時間以内に定量下限値未満 ( $< 0.05 \text{ mg/L}$ ) に達し、継続的な処理が可能であることが確認された (図 4-4(a))。一方、連続流入処理に切り替えると、立ち上げ運転と同様の HRT で運転にもかかわらず、処理水中の各種環状エ

ーテル物質濃度は、時間経過とともに上昇し、明確な DX の分解を確認することができなくなった (図 4-4(b))。しかし、24 時間以降から DOL 濃度の上昇は緩やかになったため、*Pseudonocardia* sp. N23 による DOL の分解はわずかながら進行していたものとも考えられる。ここで、図 4-5 に試験期間中の *thmC* 遺伝子のコピー数及び乾燥菌体重量の変化を示す。*thmC* 遺伝子のコピー数は、実験開始時から顕著な低下は確認されず、両処理システムにおいて  $1.0 \times 10^5$  copies/mL 以上に保たれていた。また、リアクター内の乾燥菌体重量は、時間の経過とともに増加したが、処理方式の違いによる顕著な差は確認できなかった。なお、両処理方式における乾燥菌体重量の上昇は、*Pseudonocardia* sp. N23 だけでなく、他の微生物の増殖も寄与しているものと推察される。

以上の試験結果から、連続回分処理において、他の環状エーテル物質の共存下で DX を効率的に分解できることが示された。2 つの処理方式における *thmC* 遺伝子のコピー数は運転期間を通して同程度であったにもかかわらず、連続流入処理で DX 分解が進行しなかった理由としては、*Pseudonocardia* sp. N23 が、DX よりも DOL を優先して分解するという特性によるものと考えられる (図 4-3)。第 3 章においては、*Pseudonocardia* sp. N23 による DOL 分解は Monod 式に従い、DOL が低濃度の場合には高い分解速度を発揮できないことが明らかになっていることから、連続流入処理への切り替えによって、直後にリアクター中の DOL 濃度が低くなり、*Pseudonocardia* sp. N23 による DOL 分解能が低下して、未分解の DOL 等が蓄積するようになった結果 DX の分解も阻害されたものと推察された。これに対し、DOL が蓄積し、ある程度高濃度となった運転 24 時間以降では、DOL の分解が進行しているものと考えられるが、その分解は回分処理と比較して緩やかであり、立ち上げの回分処理で見られた効率的な環状エーテル物質の除去能の回復は認められなかった。この阻害要因やメカニズムについては更なる検討が必要である。連続流入処理とは異なり、連続回分処理では、排水の入れ替え直後 (各サイクルの開始直後) は DOL 等が高濃度になるため、DX の分解を拮抗的に阻害する他の環状エーテル物質が効率的に処理され、その後、DX も効率的に分解されたものと考えられた。以上のことから、*Pseudonocardia* sp. N23 を用いた DX 含有排水の処理には、各種環状エーテル物質の分解速度を高く維持できる連続回分処理が有効であることが明らかとなった。

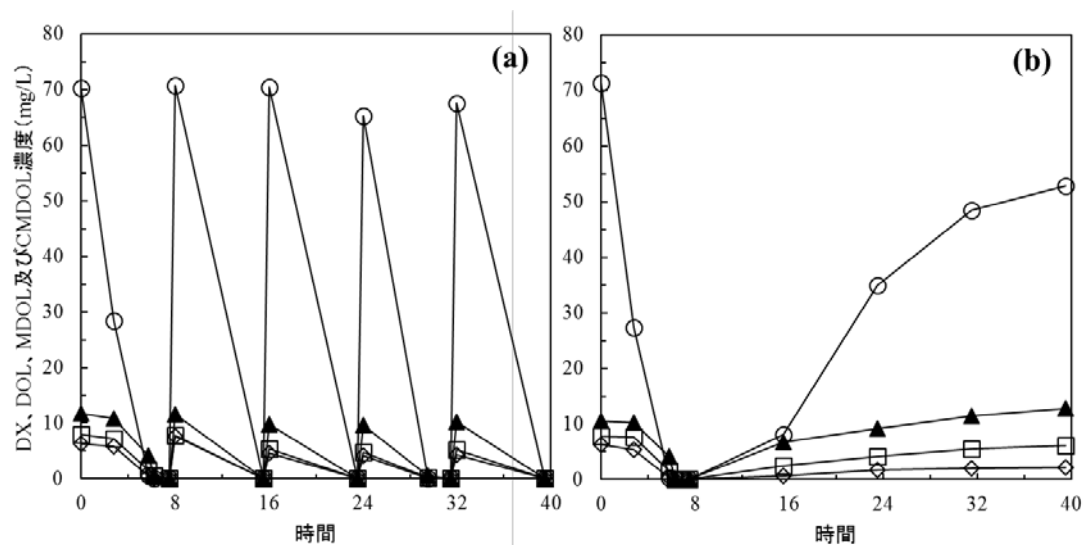


図 4-4 実排水を用いた連続回分処理(a)及び連続流入処理(b)における各種環状エーテル物質濃度の推移 (n=1)

▲ : DX, ○ : DOL, □ : MDOL, ◇ : CMDOL

初期菌体濃度 : (a) 840 mg-dry cell /L, (b) 940 mg-dry cell/L

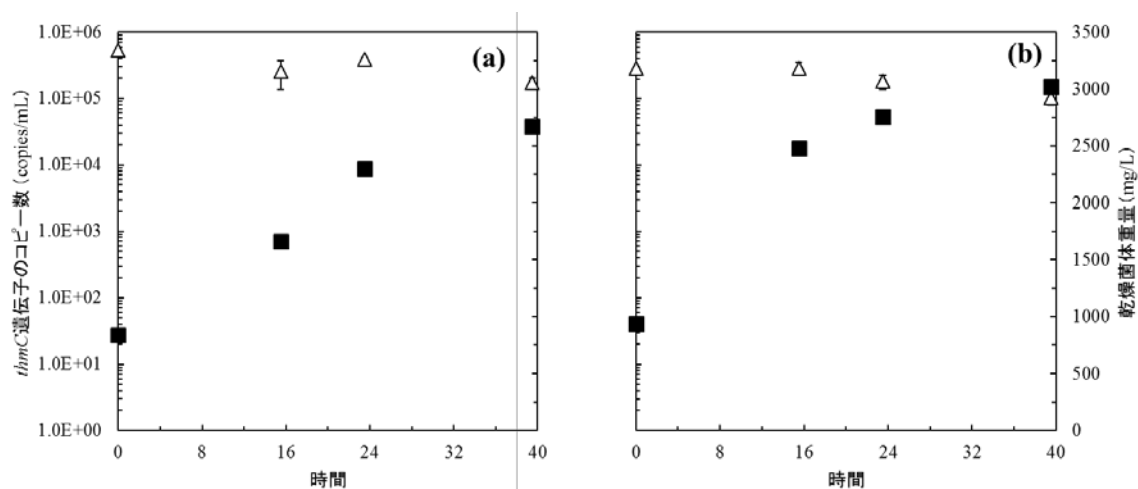


図 4-5 連続回分処理(a)及び連続流入処理(b)における

*thmC* 遺伝子のコピー数及び乾燥菌体重量の推移

△ : *thmC* 遺伝子のコピー数 (n=3) , ■ : 乾燥菌体重量 (n=1)

### 3.2 pH が DX 分解に及ぼす影響

3.1 の試験は2日間の試験であり、長期的な処理性能は確認できていないことから、pH を  $7.0 \pm 0.2$  に制御した状態で実排水の連続回分処理を5日間継続したところ、時間経過とともに DX 処理性能が低下することが確認された（データ不掲載）。この予備検討においては、目視ではあるものの、*Pseudonocardia* sp. N23 以外の微生物の増殖が観察されたことから、処理性能の低下は、実排水中に高濃度に含まれる EG を資化する微生物の増殖により、リアクター内の、*Pseudonocardia* sp. N23 が減少したことが原因であると推察された。ここで、pH 5 以下の酸性条件下では EG の生分解が生じにくいとの報告があり（今枝ら, 1999）、第3章において明らかになったように *Pseudonocardia* sp. N23 は pH 3.8 においても高い DX 分解活性を維持できることから、pH を酸性に制御することで EG 資化菌の増殖を防止し、*Pseudonocardia* sp. N23 による安定的かつ効率的な DX 分解を持続できる可能性が考えられた。そこで、リアクター内 pH を酸性域に保ち *Pseudonocardia* sp. N23 による連続回分処理を行った。

#### （1）模擬排水を用いた酸性条件下での連続回分処理

酸性 pH 下において *Pseudonocardia* sp. N23 による継続的な DX 処理が可能であることを確認するため、1000 mg/L の高濃度 DX を含む模擬排水を用い、pH を  $5.0 \pm 0.2$  に制御して連続回分処理（24 時間サイクル）を実施し、pH を  $7.0 \pm 0.2$  で制御した対照系と比較した。なお、本試験では、*Pseudonocardia* sp. N23 の初期菌体量を 1300 mg-dry cell/L とし、HRT を 34.5 時間に設定して運転を行った。図 4-6 に両 pH での連続回分処理における DX 処理性能を示す。いずれの pH においても、運転開始1日目には DX が残存したものの、2日目以降は24時間以内に定量下限値未満（ $< 0.05$  mg/L）に達し、8日間の運転期間では処理性能の低下は観察されなかった。各 pH 制御系における DX 濃度の経時変化を比較してみると、pH 5.0 に制御した実験系の DX 分解速度は、*Pseudonocardia* sp. N23 の DX 分解速度の pH 依存性（第3章 図 3-5 参照）を反映して、対照系よりもやや遅かったが、24 時間以内には一律排水基準値（0.5 mg/L）未満まで DX を分解できることが示された（図 4-6）。したがって、酸性条件下では分解速度が僅かに低下するものの、継続的に十分な処理が達成できることが確認された。



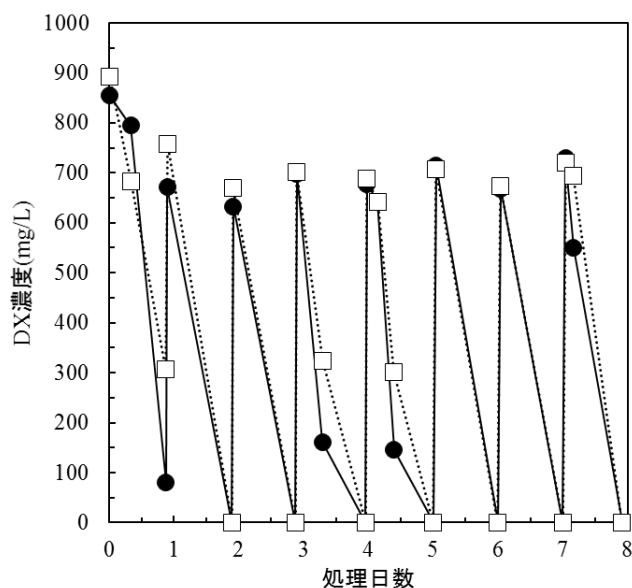


図 4-6 pH が *Pseudonocardia* sp. N23 の DX 分解に及ぼす影響  
(模擬排水を用いた連続回分処理) (n=1)

□ : pH 5.0, ● : pH 7.0、初期菌体濃度 : 1300 mg-dry cell/L

## (2) 実排水を用いた酸性条件下での連続回分処理

(1) の検討により、pH 5.0 の酸性条件下においても *Pseudonocardia* sp. N23 による継続的な DX 分解が可能であることが示された。そこで、EG を含む実排水を用い、pH を  $5.0 \pm 0.2$  に制御して 1 ヶ月間の連続回分処理を実施した。ここでは、*Pseudonocardia* sp. N23 の初期菌体量を 870 mg-dry cell/L とし、HRT を 26.3 時間に設定して運転を開始した。比較対象として、pH を  $7.0 \pm 0.2$  に制御した系も作成し、同様に処理を実施した。

異なる pH に制御した連続回分リアクターによる各排水成分の処理結果を図 4-7 に示す。pH 7.0 に制御した実験系では、実験開始から運転 6 日目までは、DX、他の環状エーテル物質、EG の良好な除去が達成された (図 4-7(a), (b), (c))。しかし、7 日目以降は、EG は継続的に除去されたものの、環状エーテル物質が残存し、特に DX 処理性能が急激に悪化して、9 日目にはほとんど分解されなくなったため、運転を停止した。これに対し、pH 5.0 に制御した実験系では、1 ヶ月の運転期間を通して、DX 及び他の環状エーテル物質の安定した分解が確認され、各サイクルの終了時点における DX 及び他の環状エーテル物質の濃度は常に定量下限値未満 ( $< 0.05$  mg/L) に保たれた (図 4-7(a), (b))。また、排水の主成分である EG は、運転初期には十分に除去されなかったが、4 日目以降は定量下限値未満 ( $< 0.05$  g/L) まで除去されるようになり (図 4-7(c))、DOC の残存濃度も 100 mg/L 未満まで低減した (図 4-7(d))。

ここで、試験期間中における *thmC* 遺伝子のコピー数及びリアクター内の菌体乾燥重量の変化を図 4-8 に示す。また、運転 4 日目に採取したリアクター内の微生物の顕微鏡観察の結

果を図 4-9 に示す。DX 分解性能が安定していた pH 5.0 の実験系では、実験期間中の *thmC* 遺伝子のコピー数は  $3.3 \times 10^5$ - $5.0 \times 10^6$  copies/mL であり、顕著に増減することなく、ほぼ一定に維持されていた (図 4-8(a))。また、リアクター内の菌体の沈降性も終始良好であり、菌体乾燥重量は 10 日目にかけて上昇した後、2800-4200 mg/L で推移した (図 4-8(b))。運転 4 日目に行った顕微鏡観察でも、多少の雑菌の存在は確認されたものの、*Pseudonocardia* sp. N23 と考えられる菌糸の凝集体が多く観察され (図 4-9(a))、リアクター内では *Pseudonocardia* sp. N23 が常に優占し、良好な処理が行われていたものと考えられた。これに対し、pH 7.0 に制御した実験系では、運転 4 日目における顕微鏡観察において、*Pseudonocardia* sp. N23 は確認されたものの、それとは形態の異なるカビや細菌が多数存在していた (図 4-9(b))。また、リアクター内の菌体乾燥重量は、実験開始から 6 日目までに 2450 mg/L に増加したが、この時点で pH 5.0 の系とほぼ同程度であり、その後の増加は認められなくなった (図 4-8(b))。一方、*thmC* 遺伝子のコピー数は、実験開始から 5 日目までは  $10^6$  copies/mL レベルを維持できていたが、6 日目から低下し始めた (図 4-8(a))。これらの結果は、pH 7.0 に制御した実験系においては、*Pseudonocardia* sp. N23 だけでなく、EG を資化する雑菌が増殖し、時間経過とともに優位になることによって *Pseudonocardia* sp. N23 の増殖を阻害し、処理性能が急激に低下したものと推測された。このリアクターでは、運転 7 日目以降に、リアクター内の微生物の沈降性が悪化し、一部の微生物が処理水とともに系外に排出されたため、乾燥菌体重量の急激な低下を引き起こし (図 4-8(b))、9 日目までに *thmC* 遺伝子のコピー数も  $1.0 \times 10^3$  copies/mL まで減少したことから (図 4-8(a))、処理系が維持できなくなり、運転を停止した。この菌体沈降性の悪化は、*Pseudonocardia* sp. N23 とは異なり、沈降性の良くない雑菌が増殖、優占化したことによるものと推測できる。

以上のように、*Pseudonocardia* sp. N23 を用い、pH を 5.0 (酸性条件) に制御した連続回分処理により、DX 分解の阻害要因となり得る他の環状エーテル物質、及び雑菌の増殖要因となり得る高濃度 EG の共存する実排水においても、長期にわたり安定して DX の一律排水基準値 (0.5 mg/L) を達成できることが示された。これは、DX の微生物分解にとって重大な障害となり得る他の有機化合物を含む実排水を対象として、純粋菌を用いた DX 含有排水処理の有効性と実現可能性を世界で初めて示した事例である。ここでは、例として EO・EG 製造工程からの排水を対象として用いたが、他の化成品の製造業においても、DX と他の環状エーテル類を含む類似した組成の産業排水が発生するため、本処理システムを発展させ、より広範な産業排水に対応できる処理技術を確立することも可能であると考えられる。

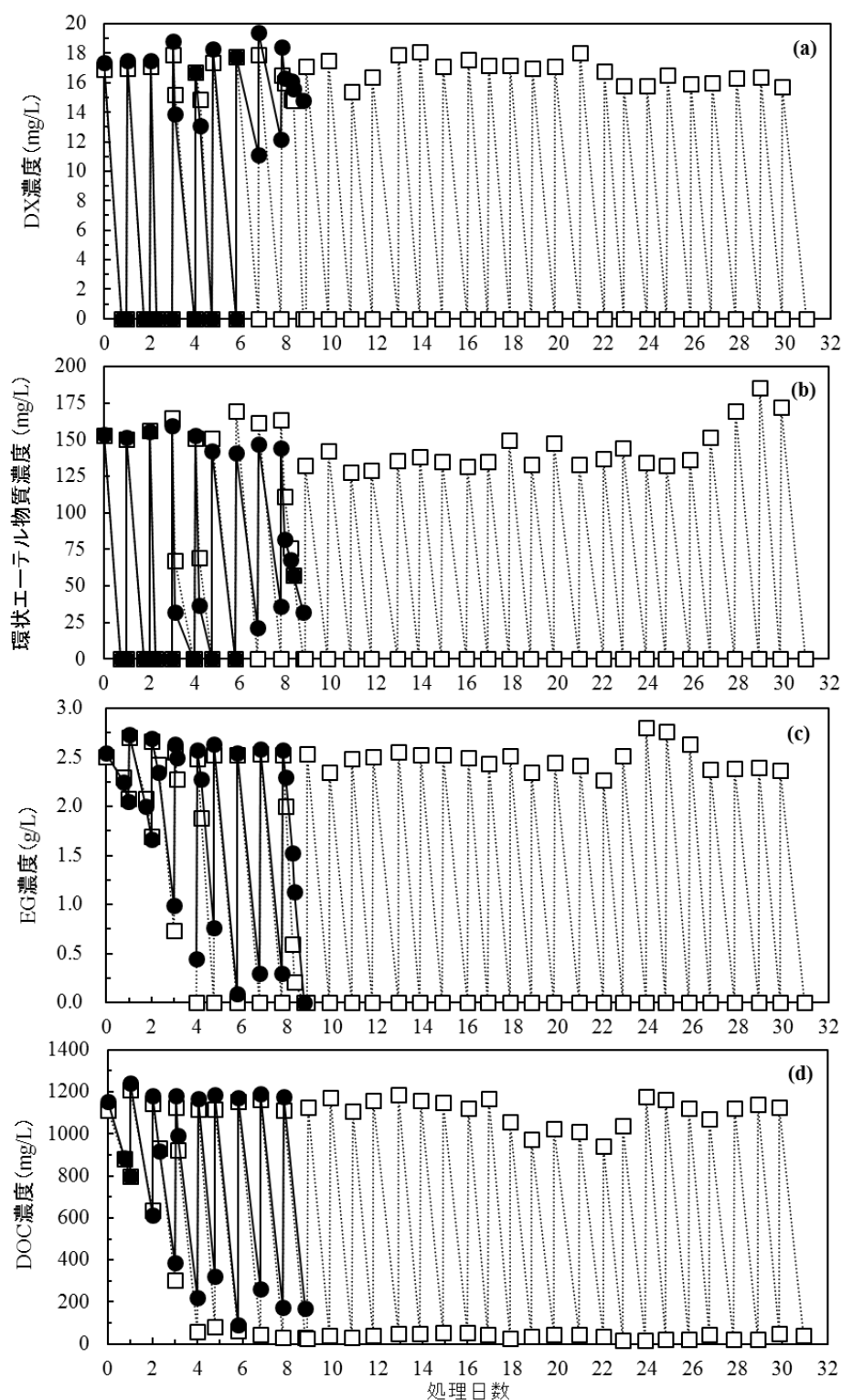


図 4-7 実排水を用いた連続回分処理における各成分の経日変化 (n=1)  
 (a) : DX 濃度, (b) : 環状エーテル物質濃度 (DOL、MDOL 及び CMDOL) ,  
 (c) : EG 濃度, (d) : DOC 濃度  
 □ : pH 5.0, ● : pH 7.0、初期菌体濃度 : 870 mg-dry cell/L

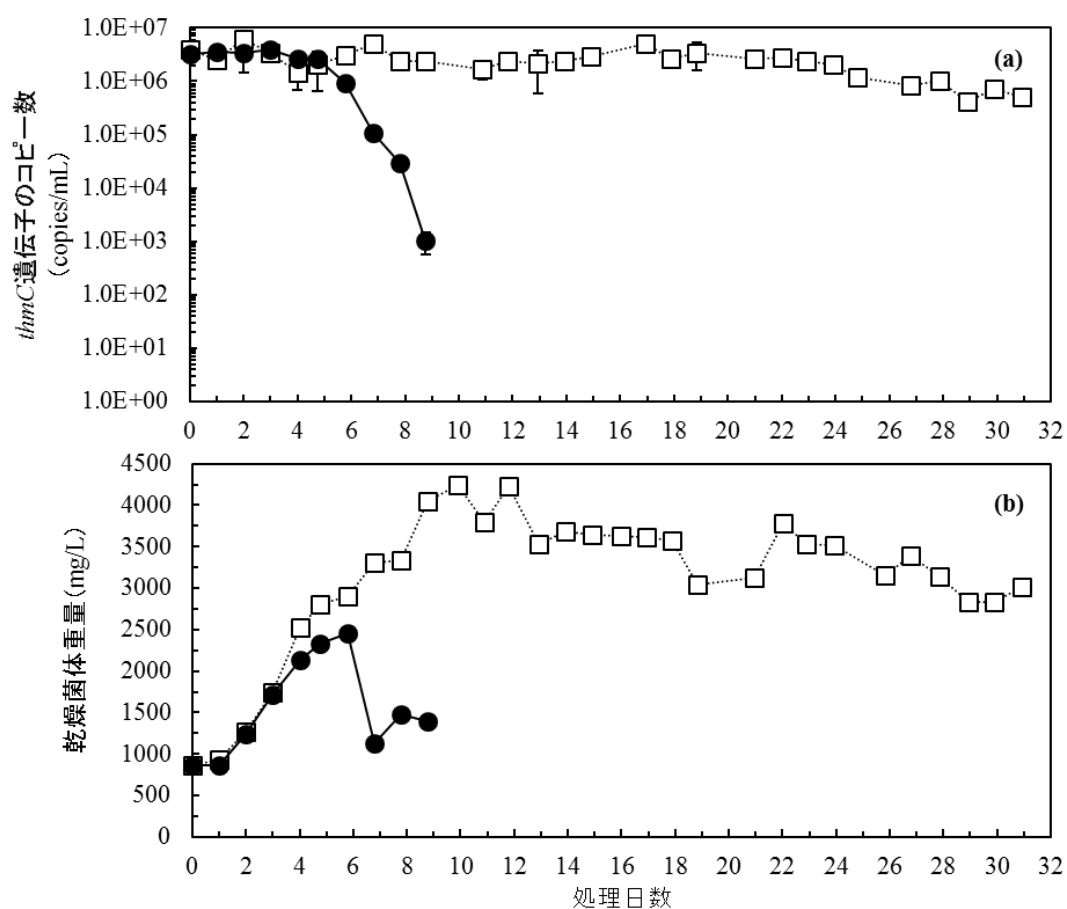


図 4-8 実排水を用いた連続回分処理における *thmC* 遺伝子のコピー数及び乾燥菌体重量の経日変化

(a) : *thmC* 遺伝子のコピー数 ( $n=3$ ), (b) : 乾燥菌体重量 ( $n=1$ )、□ : pH 5.0, ● : pH 7.0

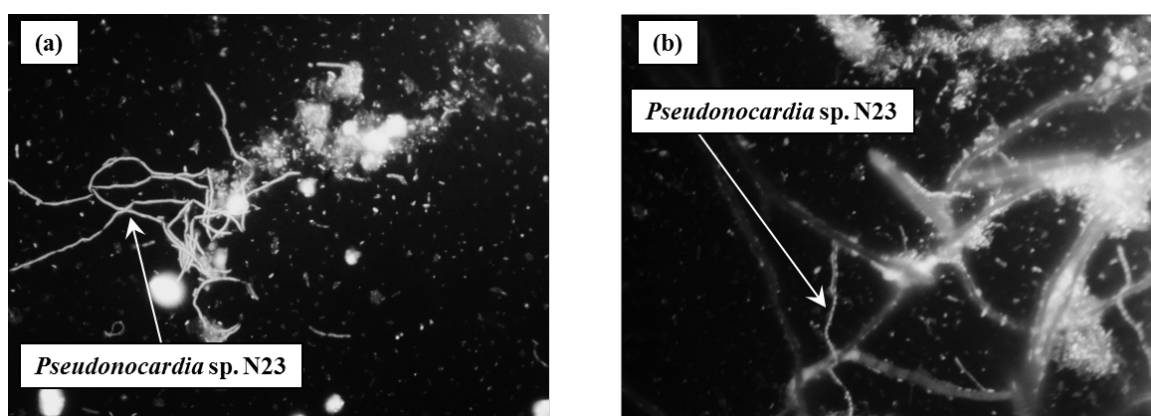


図 4-9 異なる pH 制御での連続回分処理における運転 4 日目の微生物の顕微鏡写真 ( $\times 1000$  倍)

(a) : pH 5.0, (b) : pH 7.0

#### 第4節 要約

本章では、DX 含有排水の例として、EO 及び EG を製造する化成品製造工場排水に対して、*Pseudonocardia* sp. N23 を用いた排水処理システムの確立を試みた。連続回分処理及び連続流入処理の2種類の方式において DX の処理性能を比較した結果、連続回分処理において明確な DX 及び他の環状エーテル物質の分解が認められた。また、pH を中性に制御して連続回分処理を行った場合、DX 含有排水の主成分である EG を資化する雑菌が増殖することにより、*Pseudonocardia* sp. N23 による DX 分解性能が悪化した。一方、pH 5.0 の酸性条件に制御して連続回分処理を行うことにより、EG 資化菌の増殖を抑制することができ、DX の分解と拮抗する他の環状エーテル物質共存下でも *Pseudonocardia* sp. N23 による DX 分解が安定に継続できることが示された。本検討は、DX の微生物分解の障害となり得る他の有機成分を含む実排水を対象として、DX 含有排水の生物学的処理の有効性を初めて示した事例である。

## 総括並びに結論

---

1,4-ジオキサン (DX) は、酸素原子を対称位に含む環状エーテル物質であり、抽出・反応溶媒や洗浄剤として様々な工業用途に使用されているが、エチレンオキサイド (EO) やエチレングリコール (EG) といった化成品の製造過程において副産物として生成することも知られている。また、DX は、国際がん研究機関においてヒトに対して発がん性を示す可能性があるグループ 2B に指定され、その健康被害について懸念されるようになった。このため、我が国では、2004 年に水道水質基準項目、2009 年に水質環境基準項目に追加された (いずれも基準値 0.05 mg/L)。さらに、2012 年には、汚染原因となり得る事業所排水に対して DX の一律排水基準 (基準値 0.5 mg/L) が定められたが、経済的かつ高効率な処理技術が未確立であることから、一部の事業所においては暫定排水基準が設けられた。特に、EO 及び EG 製造業においては現在も暫定排水基準 (6 mg/L) が適用されており、実用的な処理技術の確立が急務となっている。このよう中、近年、新たな DX 含有排水処理技術として、DX 分解菌を活用した処理技術が提案され、生物学的処理の有効性が示唆されているが (清と池, 2011; 池と黒田, 2017)、EO 及び EG 製造業排水のように多様な有機成分を含む DX 含有排水への適用性は未知数であり、今後は実排水の特性も十分考慮した生物処理技術の確立が求められている。

以上のような背景から、本研究では、既往の DX 分解菌よりも優れた分解特性を有する菌株を単離し、多様な有機成分を含む DX 含有実排水に対して有効な生物学的処理システムの構築を目的とした一連の研究を行った。

第 1 章では、既存の排水処理技術による DX の処理性能を整理するとともに、これまでに分離された DX 分解菌、及びそれらを用いた DX 含有排水の生物学的処理に関する既往研究を概観し、以下の知見を得た。

活性汚泥法や曝気法等の従来の排水処理技術では、排水中の DX の除去は期待できず、近年開発されている高性能の活性炭吸着材を用いても、一律排水基準値である 0.5 mg/L 未滿を達成できる性能を得ることはできない。また、膜分離法や蒸留法により排水中の DX を濃縮分離できるが、DX の排水性状によって処理効率が左右されるため、適用範囲が限定される。現状では、オゾンや過酸化水素などの酸化剤を併用した促進酸化法 (AOP) が唯一 DX 含有排水の処理に有効とされているが、イニシャル及びランニングコストが高く、エネルギー消費も大きい上、その処理性能は共存する有機物により低下することから、実用性・実効性の高い排水処理技術の確立が求められている。これらに代わる生物処理に適用することが可能な DX 分解については、近年相次いで報告されるようになってきたが、これまでに報告されている DX 分解菌は、誘導型と構成型の資化菌が存在している。特に、構成型資化菌は、DX 濃度にかかわらずその分解性能を発揮できるため、生物学的処理に適した菌株であ

と考えられている。しかしながら、既存の構成型資化菌の分解能力は概して誘導型資化菌と比べて低く、また、限られた pH 域や温度域においてしか高い分解能力を発揮できないことから、広範囲の pH 域及び温度域において、より高い DX 分解活性を維持できる構成型資化菌の獲得が求められる。また、生物学的処理法での検討は、これまでのところ、様々な化学物質が含まれる実排水に対しては十分に行われていないため、DX を含有する実排水に含まれる共存有機物を調査するとともに、これらの有機物が DX の分解性能に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

第 2 章では、DX 汚染地下水から DX 分解菌の集積及び単離を行い、単離した菌株の特徴付けを行った。その結果、3 ヶ月にわたる集積培養により DX 分解菌の集積系を構築でき、その懸濁液から N23 株を単離することに成功した。N23 株は、生理学的特性及び系統学的解析により *Pseudonocardia* 属に属することが明らかとなった。また、DX 分解試験により、*Pseudonocardia* sp. N23 は、DX を単一炭素源として増殖可能な資化菌であること示され、ドラフトゲノム解析によって DX の酸化に寄与する *thm* 遺伝子群を有していることが明らかになった。また、DX 分解の中間代謝物であるグリオキシル酸やグリコール酸等を増殖基質として利用できることも、資化試験及びゲノム解析から確認された。

第 3 章では、*Pseudonocardia* sp. N23 の DX 分解特性を把握することを目的として種々の検討を行った。その結果、*Pseudonocardia* sp. N23 は、構成型の DX 分解酵素を有していることが示され、また、DX 比分解速度は、既存の構成型資化菌の中で最も高い値を示す効率的な分解菌であることが明らかとなった。*Pseudonocardia* sp. N23 は、広範囲の pH 域及び温度域において DX を分解ができ、特に酸性条件下においても高い DX 分解活性を維持できることが示された。また、*Pseudonocardia* sp. N23 は DX 含有排水に共存するとされる 1,3-ジオキサラン (DOL) や 2-メチル-1,3-ジオキサラン (MOL) に対しても分解能を示すが、これらの分解は DX 分解酵素によって行われているものと考えられた。さらに、この分解酵素は、DX よりも DOL や MDOL といった環状エーテル物質に対して高い親和性を示すことが明らかになったことから、環状エーテル物質の共存下では基質の競合が生じることによって DX の分解が遅延する可能性が示された。

第 4 章では、DX 含有排水の例として、EO 及び EG を製造する化成品製造工場排水に対して、*Pseudonocardia* sp. N23 を用いた排水処理システムの確立を試みた。連続回分処理及び連続流入処理の 2 種類の方式において DX の処理性能を比較した結果、連続回分処理において明確な DX 及び他の環状エーテル物質の分解が認められた。また、pH を中性に制御して連続回分処理を行った場合、DX 含有排水の主成分である EG を資化する雑菌が増殖することにより、長期間の運転では DX 分解性能が悪化し、処理の継続が困難となった。このため、雑菌の増殖を抑制するため pH 5.0 の酸性条件に制御して連続回分処理を行ったとこ

ろ、約 1 ヶ月間の長期運転においても EG 資化菌の増殖を抑制することができ、DX の分解と拮抗する他の環状エーテル物質共存下でも *Pseudonocardia* sp. N23 による DX 分解が安定に継続できることが示された。本検討は、DX の微生物分解の障害となり得る他の有機成分を含む実排水を対象として、DX 含有排水の生物学的処理の有効性を初めて示した事例である。

以上の通り、本研究では、DX 分解性能の高い構成型資化菌 *Pseudonocardia* sp. N23 を用いた連続回分処理システムを適用することにより、多様な有機成分を含む DX 含有排水であっても DX 濃度を安定的に一律排水基準値 0.5 mg/L 未満まで低減できることを実証できた。今回用いたような多様な有機成分を含む排水に対して、既往技術である AOP を適用することは、処理効率やコスト面の弊害から現実的には不可能であるため、DX 含有排水処理技術における種々の課題に対応できる技術としては、本研究において開発した生物学的処理システムが唯一の選択肢となるものと考えられる。

DX に係る環境規制を行っている国には、我が国だけでなく、韓国や米国が挙げられる。また、EU 諸国においても工場排水由来の DX による河川等の汚染が確認されており (Stepien *et al.*, 2014)、DX 処理は国際的な課題であるといえる。このような国内外における DX 排水処理ニーズに対応するためにも、本開発技術の早急な実用化が望まれるが、実用化に向けて残された課題としては、①DX 分解菌の大量培養、及び②スケールアップによる処理の実証が挙げられる。大量培養については、別途実施している研究において 10 m<sup>3</sup> スケールでの *Pseudonocardia* sp. N23 の大量培養に成功しており、また、培養した分解菌を長期的に保存できる製剤化手法も確立できつつある。さらに、開発処理システムの最適化及び長期性能を目的としたパイロットスケールでの検証も進めており、スケールアップの見通しも立ってきている。これらの実証研究を早急に完了させ、DX 処理の問題を抱える事業所に適用することで、工場での持続的な安定操業が可能となるだけでなく、DX による環境汚染を未然に防止できるものと考えている。



## 参考文献

- Abe, A.:** Distribution of 1,4-dioxane in relation to possible sources in the water environment., *Sci. Total Environ.*, **227**, 41–47 (1999)
- Adams, C. D., Scanlan, P. A. and Secrist, N. D.:** Oxidation and biodegradability enhancement of 1,4-dioxane using hydrogen peroxide and ozone, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 1812–1818 (1994)
- Bradley, P. M., Landmeyer, J. E. and Chapelle, F.H.:** Widespread potential for microbial MTBE degradation in surface-water sediments, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 358–652 (2001)
- Chen, D. Z., Jin, X. J., Chen, J., Ye, J. X., Jiang, N. X. and Chen, J. M.:** Intermediates and substrate interaction of 1,4-dioxane degradation by the effective metabolizer *Xanthobacter flavus* DT8, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **106** 133–140 (2016)
- Cowan, S. T. and Steel, K. J.:** Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edn, Cambridge University Press, Cambridge (1974)
- Eddy, S. R.:** Multiple alignment using hidden Markov models., pp. 114–120, In: Rawlings, C., Clark, D., Altman, R., Hunter, L., Lengauer, T. and Wodak, S. (Eds.), Proceedings of the Third International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology., AAAI Press, Menlo Park (1995)
- European Commission (EC):** European union risk assessment report: 1,4-Dioxane, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg (2002)
- Fukuhara, T., Iwasaki, S., Hasegawa, T., Ishihara, K., Fujiwara, M. and Abe, I.:** Absorption of 1,4-dioxane from aqueous solution onto various activated carbons, *J. Water Environ. Technol.*, **9**, 249–258 (2011)
- Gerike, P. and Gode, P.:** The biodegradability and inhibitory threshold concentration of some disinfectants, *Chemosphere*, **21**, 799–812 (1990)
- Groster, A., Sales, C. M., Zhuang, W. Q., Erbilgin, O. and Alvarez-Cohen, L.:** Glyoxylate metabolism is a key feature of the metabolic degradation of 1,4-dioxane by *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190., *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 3298–3308 (2012)
- Huang, H., Shen, D., Li, N., Shan, D., Shentu, J. and Zhou, Y.:** Biodegradation of 1,4-dioxane by a novel strain and its biodegradation pathway, *Water Air Soil Pollut.*, **225**, 2135 1–11 (2014)
- Inoue, D., Tsunoda, T., Sawada, K., Yamamoto, N., Saito, Y., Sei, K. and Ike, M.:** 1,4-Dioxane degradation potential of members of the genera *Pseudonocardia* and *Rhodococcus*, *Biodegradation*, **27**, 277–286 (2016)
- International Agency for Research on Cancer (IARC):** IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, pp. 589–602, Lyon (1999).
- Isaka, K., Udagawa, M., Kimura, Y., Sei, K. and Ike, M.:** Biological wastewater treatment of 1,4-

- dioxane using polyethylene glycol gel carriers entrapping *Afipia* sp. D1, *J. Biosci. Bioeng.*, **121**, 203–208 (2016a)
- Isaka, K., Udagawa, M., Kimura, Y., Sei, K. and Ike, M.:** Biological 1,4-dioxane wastewater treatment by immobilized *Pseudonocardia* sp. D17 on lower 1,4-dioxane concentration, *J. Water Environ. Technol.*, **14**, 289–301 (2016b)
- Isaka, K., Udagawa, M., Sei, K. and Ike M.:** Pilot test of biological removal of 1,4-dioxane from a chemical factory wastewater by gel carrier entrapping *Afipia* sp. strain D1, *J. Hazard. Mater.*, **304**, 251–258 (2016c)
- Isern, N. G., Xue, J., Rao, J. V., Cort, J. R. and Ahring, B. K.:** Novel monosaccharide fermentation products in *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* identified using NMR spectroscopy, *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 1–11 (2013)
- Jin, X. J., Chen, D. Z., Zhu, R. Y., Chen, J. and Chen, J. M.:** Characteristics of 1, 4-dioxane degradation by *Xanthobacter flavus* DT8, *Environ. Sci.*, **33**, 1657–1662 (2012)
- Kelley, S. L., Aitchison, E. W., Deshpande, M., Schnoor, J. L. and Alvarez, P. J.:** Biodegradation of 1,4-dioxane in planted and unplanted soil: effect of bioaugmentation with *Amycolata* sp. CB1190, *Water Res.*, **35**, 3791–3800 (2001)
- Kim, C. G., Seo, H. J. and Lee, B. R.:** Decomposition of 1,4-dioxane by advanced oxidation and biochemical process., *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, **41**, 599–611 (2006)
- Kim, N. G., Yim, K. J., Kim, C. S., Song, D. K., Okuyama, K., Han, M. H., Kim, Y. H., Lee, S. E. and Kim, T. O.:** High production of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> by reducing PET waste water using a non-diaphragm-based electrochemical method, *Sci. Rep.*, **6**, 20512 1–9 (2016)
- Kim, Y. M., Jeon, J. R., Murugesan, K., Kim, E. J. and Chang, Y. S.:** Biodegradation of 1,4-dioxane and transformation of related cyclic compounds by a newly isolated *Mycobacterium* sp. PH-06, *Biodegradation*, **20**, 511–519 (2009)
- Kishimoto, N., Nakagawa, T., Asano, M., Abe, M., Yamada, M. and Ono, Y.:** Ozonation combined with electrolysis of 1,4-dioxane using a two-compartment electrolytic flow cell with solid electrolyte., *Water Res.*, **42**, 379–385 (2008)
- Kosaka, K., Yamada, H., Matsui, S. and Shishida, K.:** The effect of the co-existing compounds on the decomposition of micropollutants using the ozone/hydrogen peroxide process., *Water Sci. Technol.*, **42**, 353–361 (2000)
- Kämpfer, P. and Kroppenstedt, R. M.:** *Pseudonocardia benzenivorans* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 749–751 (2004)
- Kämpfer, P., Kohlweyer, U., Thieme, B. and Andreesen, J. R.:** *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 1535–1538 (2006)
- Lesage, S., Jackson, R. E., Priddle, M. W. and Riemann, P. G.:** Occurrence and fate of organic

- solvent residues in anoxic groundwater at the Gloucester Landfill, Canada, *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 559–566 (1990)
- Li, M., Fiorenza, S., Chatham, J. R., Mahendra, S. and Alvarez, P. J.:** 1,4-Dioxane biodegradation at low temperatures in Arctic groundwater samples., *Water. Res.*, **44**, 2894–2900 (2010).
- Li, M., Mathieu, J., Yang, Y., Fiorenza, S., Deng, Y., He, Z., Zhou, J. and Alvarez, P. J.:** Widespread distribution of soluble di-iron monooxygenase (SDIMO) genes in Arctic groundwater impacted by 1,4-dioxane, *Environ. Sci. Technol.*, **47**, 9950–9958 (2013)
- Mahendra, S. and Alvarez-Cohen, L.:** Kinetics of 1,4-dioxane biodegradation by monooxygenase-expressing bacteria, *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 5435–5442 (2006)
- Mahendra, S. and Alvarez-Cohen, L.:** *Pseudonocardia dioxanivorans* sp. nov., a novel actinomycete that grows on 1,4-dioxane., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 593–598 (2005)
- Mahendra, S., Petzold, C. J., Baidoo, E. E., Keasling, J. D. and Alvarez-Cohen, L.:** Identification of the intermediates of in vivo oxidation of 1,4-dioxane by monooxygenase-containing bacteria, *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 7730–7736 (2007)
- Masuda, H., McClay, K., Steffan, R. J. and Zylstra, G. J.:** Biodegradation of tetrahydrofuran and 1,4-dioxane by soluble diiron monooxygenase in *Pseudonocardia* sp. strain ENV478, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 312–316 (2012)
- Matsui, R., Takagi, K., Sakakibara, F., Abe, T. and Shiiba, K.:** Identification and characterization of 1,4-dioxane-degrading microbe separated from surface seawater by the seawater-charcoal perfusion apparatus, *Biodegradation*, **27**, 155–163 (2016)
- McGuire, M. J., Suffet, I. H. and Radziul, J. V.:** Assessment of unit processes for the removal of trace organic compounds from drinking water, *J. Am. Water Works Assoc.*, **70**, 565–572 (1978)
- Meyers, P. R., Bourn, W. R., Steyn, L. M., van Helden, P. D., Beyers, A. D. and Brown, G. D.:** Novel method for rapid measurement of growth of mycobacteria in detergent-free media, *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2752–2754 (1998)
- Mills, E. T. and Stack, V. T.:** Biological oxidation of synthetic organic chemicals, *Proceedings of the eighth Industrial Waste Conference*, Purdue University, **83**:492 (1954)
- Mohr, T. K. G.:** Chapter 8 Case Studies of 1,4-dioxane releases, treatment, and drinking water contamination, pp. 369–417, In Mohr, T. K. G., with chapters by Stickney, J. A. and DiGuseppi, W. H., *Environmental Investigation and Remediation: 1,4-Dioxane and other Solvent Stabilizers*, CRC Press, Boca Raton (2010)
- National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme (NICNAS):** 1,4-Dioxane, Priority Existing Chemical No.7, Full Public Report, Commonwealth of Australia (1998)
- Page, R. D. M.:** TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers., *Comput. Appl. Biosci.*, **12**, 357–358 (1996)
- Parales, R. E., Adamus, J. E., White, N. and May, H. D.:** Degradation of 1,4-dioxane by an

- actinomycete in pure culture, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4527–4530 (1994)
- Popoola, A. V.:** Mechanism of the reaction involving the formation of dioxane byproduct during the production of poly(ethylene terephthalate), *J. Appl. Polym. Sci.*, **43**, 1875–1877 (1991)
- Pugazhendi, A., Banu, J. R., Dhavamani, J. and Yeom, I. T.:** Biodegradation of 1,4-dioxane by *Rhodanobacter* AYS5 and the role of additional substrates, *Ann. Microbiol.*, **65**, 2201–2208, (2015)
- Purich, D. L.:** Chapter 5–Initial-rate kinetics of one-substrate enzyme-catalyzed reactions, pp.287–334, In: *Enzyme kinetics: catalysis & control; a reference of theory and best-practice methods*, Elsevier/Academic Press, Amsterdam (2010)
- Sales, C. M., Grostern, A., Parales, J. V., Parales, R. E. and Alvarez-Cohen, L.:** Oxidation of the cyclic ethers 1,4-dioxane and tetrahydrofuran by a monooxygenase in two *Pseudonocardia* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 7702–7708 (2013)
- Sales, C. M., Mahendra, S., Grostern, A., Parales, R. E., Goodwin, L. A., Woyke, T., Nolan, M., Lapidus, A., Chertkov, O., Ovchinnikova, G., Sczyrba, A. and Alvarez-Cohen, L.:** Genome sequence of the 1,4-dioxane-degrading *Pseudonocardia dioxanivorans* strain CB1190, *J. Bacteriol.*, **193**, 4549–4550 (2011)
- Sander, R.:** Compilation of Henry’s law constants (version 4.0) for water as solvent, *Atmos. Chem. Phys.*, **15**, 4399–4981 (2015)
- Santos, R. C. A., Araújo, K. B., Zubiolo, C., Soares, C. M. F, Lima, A. S. and Santana, L. C. L. A.:** Microbial lipase obtained from the fermentation of pumpkin seeds: Immobilization potential of hydrophobic matrices, *Acta Sci. Technol.*, **36**, 193–201 (2014).
- Sei, K., Kakinoki, T., Inoue D., Soda, S., Fujita, M. and Ike, M.:** Evaluation of the biodegradation potential of 1,4-dioxane in river, soil and activated sludge samples, *Biodegradation*, **21**, 585–591 (2010)
- Sei, K., Miyagaki, K., Kakinoki, T., Fukugasako, K., Inoue, D. and Ike, M.:** Isolation and characterization of bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source, *Biodegradation*, **24**, 665–674 (2013a)
- Sei, K., Oyama, M., Kakinoki, T., Inoue, D. and Ike, M.:** Isolation and characterization of tetrahydrofuran-degrading bacteria for 1,4-dioxane-containing wastewater treatment by co-metabolic degradation, *J. Water Environ. Technol.*, **11**, 11–19 (2013b)
- Stefan, M. I. and Bolton, J. R.:** Mechanism of the degradation of 1,4-dioxane in dilute aqueous solution using the UV/Hydrogen peroxide process., *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1588–1595 (1998)
- Stepien, D. K., Diehl, P., Helm, J., Thoms, A. and Püttmann, W.:** Fate of 1,4-dioxane in the aquatic environment: From sewage to drinking water, *Water Res.*, **48** 406–419 (2014)
- Thierner, B., Andreesen, J. R. and Schröder, T.:** Cloning and characterization of a gene cluster involved in tetrahydrofuran degradation in *Pseudonocardia* sp. strain K1, *Arch. Microbiol.*, **179**, 266–277 (2003)

- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. and Palmer, J. D.: Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis., *J. Eukaryot. Microbiol.*, **46**, 327–338 (1999)
- Wilson, K.: Preparation of genomic DNA from bacteria., pp. 2.4.1–2.4.5, In: Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., New York (1987)
- Yasuhara, A., Tanaka, Y., Tanabe, A., Kawata, K. and Katami, T.: Elution of 1,4-dioxane from waste landfill sites., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **71**, 641–647 (2003)
- 池道彦, 黒田真史, 清和成, 井上大介, 斎藤祐二, 山本哲史: 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, 平成 26 年度 環境研究総合推進費終了成果報告書(5B-1201) (2015)
- 池道彦, 黒田真史: 固定化担体を用いた 1,4-ジオキサンの分解処理, *用水と廃水*, **59**, 542–547 (2017)
- 稲森悠平, 井坂和一, 鈴木智, 須藤隆一: 廃棄物埋立地浸出水等に含有される微量化学物質ジベンゾフラン、1,4-ジオキサンなどの高度処理, *用水と廃水*, **41**, 48–51 (1999)
- 今枝孝夫, 徳弘健郎, 平井正名: LLC の微生物分解システム, *豊田中央研究所R&D レビュー*, **34**, 23–30 (1999)
- 久保正弘, 藤田準二: 活性炭による 1,4-ジオキサン除去, *香川県環境保健センター所報*, **4**, 188–190 (2005)
- 経済産業省: 平成 27 年度 特定化学物質の環境への排出量の把握等及び管理の改善の促進に関する法律 (化学物質排出把握管理促進法) に基づく届出排出量及び移動量並びに届出外排出量の集計結果について, 届出排出量及び移動量の対象化学物質別集計結果 (2017) [http://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/law/prtr/h27kohyo/02pdf/1-1.pdf](http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/law/prtr/h27kohyo/02pdf/1-1.pdf) (2017.11.16 閲覧)
- 五ノ井浩二, 和泉航, 伏見和夫, 秋元孝仁, 井上宗士: ゼオライト分離膜を用いた 1,4-ジオキサン廃液脱水処理, *用水と廃水*, **53**, 561–567 (2011)
- 小坂浩司, 山田春美, 宍田健一, 松井三郎: オゾン／過酸化水素処理による微量汚染物質の分解における共存物質の質的・量的影響, *水環境学会誌*, **22**, 888–895 (1999)
- 庄司成敬, 安部明美: 1,4-ジオキサン及び界面活性剤の事業所からの排出実態, *用水と廃水*, **43**, 1045–1052 (2001)
- 須藤隆一: 環境微生物実験法, pp. 81–103, (株)講談社, 東京 (1988)
- 杉浦勉, 河野大樹: 活性炭繊維を用いた 1,4-ジオキサン含有排水処理, *用水と廃水*, **52**, 866–870 (2010)
- 清和成, 池道彦: 1,4-ジオキサン分解菌を用いた汚染地下水の生物処理・浄化の可能性, *用水と廃水*, **53**, 555–560 (2011)
- (独)製品評価技術基盤機構: 化審法データベース,

- [http://www.safe.nite.go.jp/jcheck/detail.action?cno=123-91-1&mno=5-0839&request\\_locale=ja](http://www.safe.nite.go.jp/jcheck/detail.action?cno=123-91-1&mno=5-0839&request_locale=ja)  
(2017 年 7 月 14 日閲覧)
- 高橋信行, 鳥居久倫, 柴田真吾, 田坂真哉, 米谷純: オゾンを用いた促進酸化処理による 1,4-ジオキサンの分解: 分解性向上における紫外線照射強度および過酸化水素添加量の影響, *工業用水*, **617**, 71-77 (2013)
- 中西準子, 牧野良次, 川崎一, 岸本充生, 蒲生昌志: 詳細リスク評価書シリーズ 2 1,4-ジオキサン, 丸善株式会社, 東京 (2005)
- 西野貴裕, 大野正彦, 佐々木裕子, 磯部慶, 鐘江宏, 村上治, 鈴木規之, 中杉修身: 都内河川における 1,4-ジオキサンの動態, *環境化学*, **18**, 333-340 (2008)
- 日本産業衛生学会: 許容濃度等の勧告(2015 年度), *産業衛生学雑誌*, **57**, 178-182, (2015)
- 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**, 211-215 (2005)
- 細見正明: 1,4-ジオキサンの水質規制の動向, *用水と廃水*, **53**, 535-541 (2011)
- 森田実幸: 膜分離法によるジオキサン含有排水の高次処理, *科学と工業*, **78**, 146-151 (2004)
- 山本哲史, 斎藤祐二, 河内昭典, 澤田重明, 菅原一臣, 内田充洋: 1,4-ジオキサン処理方法, *公開特許公報*, 特開 2017-12957 (2017)
- 山本哲史, 斎藤祐二, 黒田真史, 井上大介, 清和成, 池道彦: 1,4-ジオキサン汚染土壌・地下水の生物浄化技術, *大成建設技術センター報*, **50**, 51-1-51-6 (2017)

## 謝辞

---

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、終始御懇篤なる御指導と御助言を賜りました、大阪大学大学院 工学研究科 教授 池道彦 博士に、心より感謝の意を表します。

本論文の査読並びに御校閲を賜り、その完成に多くの貴重な御助言を賜りました大阪大学大学院 工学研究科 教授 東海明宏 博士、並びに本研究の全般にわたり丁寧な御指導と貴重な御助言を賜り、本論文の査読並びに御校閲を賜りました同 准教授 井上大介 博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究について、有益な御助言と御援助を賜りました北里大学 医療衛生学部 教授 清和成 博士、大阪大学大学院 工学研究科 助教 黒田真史 博士、並びに同 技官 山岡ゆり子 氏に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、常に暖かい励ましと御指導・御助言を賜りました大成建設株式会社 斎藤祐二 博士、同 瀧寛則 博士、並びに同 古田篤史 氏に心より感謝致します。また、本研究活動に御尽力いただきました北里大学 研究員 澤田和子 博士、大成有楽不動産株式会社 松村邦弘 氏、並びに同 沖田紀子 氏に厚く御礼申し上げます。

本研究活動において直接、間接の御協力、御支援いただきました大阪大学大学院 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の諸兄姉に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究活動において、終始多大なる支援を賜りました両親、そして本研学生活に理解を示し、時には大量の分析用アルミキャップの作成に協力いただきました妻 真子並びに子供達に心より感謝します。

## 本論文に関する報文

---

### 投稿論文

- (1) **Inoue, D., Tsunoda, T., Sawada, K., Yamamoto, N., Saito, Y., Sei, K. and Ike, M.:** 1,4-Dioxane degradation potential of members of the genera *Pseudonocardia* and *Rhodococcus*, *Biodegradation*, **27**, 277–286 (2016)
- (2) **Yamamoto, N., Inoue, D., Kuroda, M. and Ike, M.:** Draft genome sequence of *Pseudonocardia* sp. strain N23, a 1,4-dioxane-degrading bacterium, *Genome Announc.*, **5**, e01249-17 (2017)
- (3) 山本哲史, 井上大介, 黒田真史, 瀧寛則, 清和成, 斎藤祐二, 池道彦: 1,4-ジオキサン分解菌 *Pseudonocardia* sp. N23 を用いた化成品製造工業排水処理システムの開発, *用水と廃水*, **60**, 139–150 (2018)
- (4) **Yamamoto, N., Saito, Y., Inoue, D., Sei, K. and Ike, M.:** Characterization of newly isolated *Pseudonocardia* sp. N23 with high 1,4-dioxane-degrading ability, *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2018)

### 総説

- (1) 山本哲史, 斎藤祐二: 1,4-ジオキサンの生物処理技術, *環境管理*, **51**, 37-41 (2015)
- (2) 山本哲史, 斎藤祐二, 黒田真史, 井上大介, 清和成, 池道彦: 1,4-ジオキサン汚染土壌・地下水の生物浄化技術, *大成建設技術センター報*, **50**, 51-1–51-6 (2017)
- (3) 池道彦, 井上大介, 黒田真史, 山本哲史: 1,4-ジオキサン汚染地下水の生物浄化技術, *科学と工業*, 投稿中

### 国際会議等発表

- (1) **Kuroda, M., Fukugasako, K., Nakazawa, M., Hisada, K., Koike, K., Yamamoto N., Inoue, D. and Ike, M.:** Development of bioreactor using *Pseudonocardia* sp. D17 for treatment of wastewater containing 1,4-dioxane, The 14th International Symposium on Persistent Toxic Substances (2017)
- (2) **Inoue, D. Tsunoda, T., Yamamoto, N., Ike, M. and Sei, K.:** 1,4-Dioxane degradation characteristics of *Rhodococcus aetherivorans* JCM 14343, The 10th International Conference on Challenges in Environmental Science & Engineering (2017)