

環境水から単離した 1,4-ジオキサン分解菌の分解性能

(株)大林組 正会員 鈴木 達也, 中部大学 野口 泰良, 中部大学 澤入 駿哉
 (株)大林組 正会員 森 一星, 中部大学 宮田 茂
 中部大学 福田 雅夫 (株)大林組 正会員 ○大島 義徳

1. はじめに

1,4-ジオキサン (以下 DOX) は, 水道に関わる水質基準項目, 地下水環境基準が定められており, 土壤汚染対策法の対象である特定有害物質への追加が検討されている. DOX は, 幅広い業種で使われてきた溶剤で, 地下水汚染事例が報告されており, 今後は地下水などの DOX 汚染浄化の需要が高まることが予想される.

地下水中の DOX 浄化方法には, 化学的酸化手法などが用いられるが, 地下水によっては, 競合物質が存在することなどにより薬剤使用量が増えて高コストになる場合がある. 一方, 生物的浄化手法は, 一般的に化学的酸化手法よりも低コストとされるものの, DOX は難分解性物質であり, 生物処理に利用できる菌の報告は少ない.

そこで, 筆者らは新たな DOX 分解菌の取得を目指した結果, 環境水から単離した. 本報告では, 単離した DOX 分解菌について, 菌種同定および DOX 分解活性を検討した結果について述べる.

2. 菌種同定

2-1. 目的

取得した DOX 分解菌 (以下, 3e 株) の性状を推定することを目的として, 16SrDNA 配列から同定した.

2-2. 試験方法

単離した 3e 株を R2A 平板培地 (ダイゴ) で生育させて, 得られた 3 つのコロニーからゲノム DNA を抽出した. 抽出した DNA を鋳型として 16SrRNA 遺伝子を PCR で増幅し, 増幅断片の配列を DNA シークエンサーで解読した. プライマー配列は表 1 に示す通り, 16SrRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅することのできるものを使用した. また, 解析には米国国立生物工学情報センターのデータベースにおける BLAST プログラムによる相同性検索を使用した.

2-3. 結果と考察

取得菌株の 1 つのコロニーの塩基配列は, *Rhodococcus ruber* の基準株である DSM43338 株と 100% (1371/1371) の相同性を示した. 残り 2 つのコロニーの塩基配列は, DSM43338 株といずれも 99.93% (1371/1372) の相同性を示した. これにより, 取得菌株は, *R. ruber* に属する株であると推定された (図 1).

また, *R. ruber* について NITE の微生物有害情報リストを用い, 感染症法 (特定病原体), 国立感染症研究所, 日本細菌学会, DSMZ (ドイツ微生物細胞培養コレクション), 家畜伝染病予防法, 植物防疫法, カルタヘナ法 (実験分類), 外為法における有害性記載事項を確認した結果, 有害性に関する情報は存在しなかった. 人体への悪影響を与える可能性が低い菌と考えられる.

3. DOX 分解性能の把握

3-1. 目的

3e 株の基本的な DOX 分解性能を明らかにする.

3-2. 試験方法

表 1 使用したプライマー

プライマー名	配列 (5'-3')
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	TACGGHTACCTTGTACGACTT

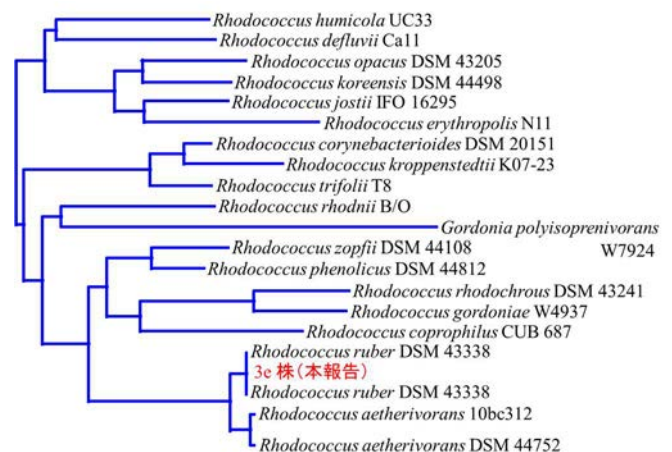


図 1 3e 株近縁種の系統樹

キーワード バイオレメディエーション, 1,4-ジオキサン, *Rhodococcus*, 土壤・地下水汚染, 排水処理
 連絡先 〒204-8558 東京都清瀬市下清戸 4-640 (株)大林組 技術研究所 TEL042-495-1111

表2 DOX 分解性能の把握 培養条件

項目		内容	備考
培地	前培養	LB培地	栄養培地
	DOX分解試験	BSM培地	ジオキサン唯一炭素源
培養温度		30℃	
振とう条件		100rpm	ロータリー振とう

50mL 容量スクリービンに滅菌済み LB 培地 10mL と取得菌株のシングルコロニーを入れ、十分量の酸素を充填して振とう培養した。培地に十分な濁りを確認した後、菌体を滅菌済み生理食塩水で2回繰り返し洗浄し、DOX が唯一炭素源環境となるように制限培地と DOX を加えて振とう培養した (表 2)。その後、定期的にガスクロマトグラフ質量分析計 ((株) 島津製作所 QP-2010 Ultra) で DOX 濃度を測定した。

3-3. 結果

培養時間経過ごとの測定 DOX 濃度を図 2 に示す。DOX の初期濃度 10mg/L および 20mg/L の場合で検証を行い、10mg/L の DOX は 1 時間後、20mg/L の DOX は 2 時間後にそれぞれ測定検出下限値 (0.001mg/L) 未満まで分解した。

4. 高濃度 DOX 分解の限界把握

4-1. 目的

排水処理などへの応用のため、高濃度 DOX の分解性能を把握する。

4-2. 試験方法

200mL 容量三角フラスコに滅菌済み LB 培地 30mL と取得菌株シングルコロニーを入れ、2 日間振とう培養した。培養液を 50mL の遠沈管に移し、13,500rpm, 4℃, 5 分間遠心して菌体を回収し、各濃度の DOX と 20 mg/L のブタンジオール (BD) を唯一炭素源として添加した W 培地に懸濁して OD600=1.0 に調整した (表 3)。BD はジオキサン分解菌がよく資化し分解が速い物質で単離の際にも利用した物質である。DOX は終濃度 100 mg/L, 500 mg/L, 1,000 mg/L で用いた。20 mL バイアル瓶に懸濁液を 1mL ずつ分注して密封した。30℃で 24 時間及び 48 時間の培養を 3 連で行った後、ガスクロマトグラフィー (Agilent 社 7890A) により DOX 濃度を測定した。

4-3. 結果

100mg/L の DOX は 24 時間後に検出下限値 (0.001mg/L) 未満まで分解され、500mg/L の DOX は 48 時間で 41% が分解された。1,000mg/L の DOX では 48 時間までは分解が見られなかった (図 3)。500mg/L まで良好な分解を示したことから、排水処理などにも応用できる可能性が示唆された。

5. まとめ

環境水中から単離した DOX 分解菌は、*R. ruber* に属する株と推定された。10mg/L の DOX を 1 時間以内に検出下限値未満に分解した。これは過去の同種の分解菌よりも速い分解であった。500mg/L と高濃度模擬汚染水も分解し、排水処理にも対応できる可能性が示唆された。今後は地下水や汚染土壌を対象とした分解特性の把握、効率的な培養方法などを明確にし、地下水など環境浄化に活用したい。

参考文献

1) Bernhardt D, Diekmann H, Applied Microbiology Biotechnology No.36, p120-123 (1991)

表3 高濃度 DOX の分解能力 培養条件

項目		内容	備考
培地	前培養	LB培地	栄養培地
	DOX分解試験	W培地	ジオキサン唯一炭素源
培養温度		30℃	
振とう条件		220rpm	ロータリー振とう

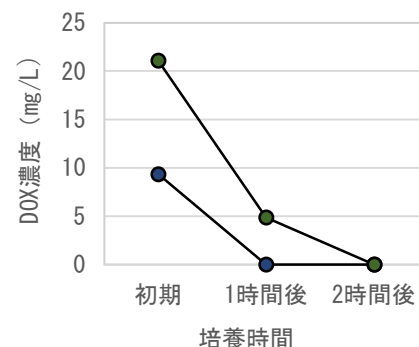


図2 培養時間ごとの DOX 濃度

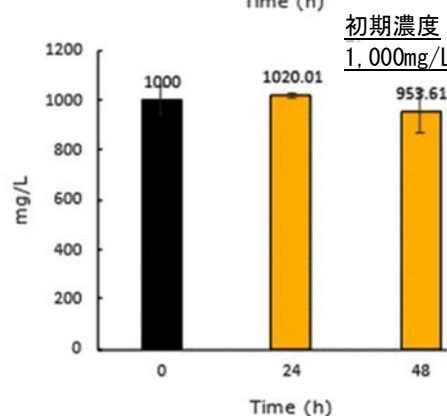
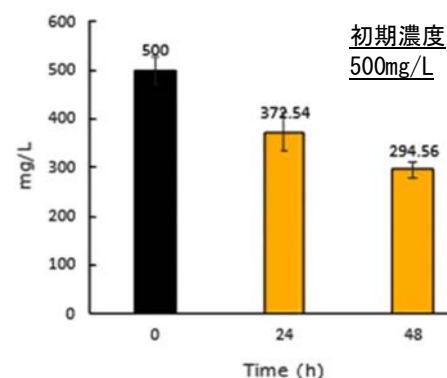
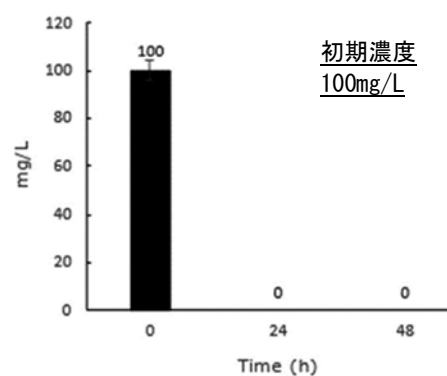


図3 高濃 DOX の濃度変化