

ノート

環境修復地内に存在する 1,4-ジオキサン分解菌

天野晴貴, 赤地重宏, 新家淳治*

1,4-Dioxane-decomposing Bacterium Existing in an Environmental Remediation Place

Haruki AMANO, Shigehiro AKACHI and Junji NIINOMI

環境修復地に設置された水処理施設内で, 1,4-ジオキサン分解能力を有する微生物の探索を行うため, 同施設生物処理槽から試料を採取した. 試料に 1,4-ジオキサンを添加した検体の集積培養および 1,4-ジオキサン濃度の経時モニタリングを行った. また, 集積培養後の検体を新たな試料とし, 1,4-ジオキサンの他に無機塩類や有機物を添加した検体の集積培養および経時モニタリングを行った.

その結果, 生物処理槽水の 1,4-ジオキサン濃度の減少が確認できたことから, 1,4-ジオキサン分解菌が存在することが示唆された. また, 集積培養を行うことによって分解活性が向上することが確認できた. さらに, 試料に無機塩類を添加すると, 1,4-ジオキサンの分解は促進されたが, 1,4-ジオキサン以外の有機物を添加すると, 見かけ上分解活性は一時的に低下した.

1,4-ジオキサンの濃度減少が確認できた検体から単離した菌の DNA 塩基配列は, *Micromonospora* 属の放線菌等のものと高い相同性を示した.

キーワード: 環境修復地, 1,4-ジオキサン, 集積培養, *Micromonospora*, DNA 塩基配列

はじめに

三重県桑名市内の環境修復現場は, 平成 7 年から平成 8 年頃に廃棄物の不法投棄が行われ, 平成 15 年度から行政代執行による環境修復事業を行っている. その主な内容は, 汚染地下水の拡散防止のための遮水壁設置および地下水浄化のための水処理施設設置である. 平成 21 年に, ヒトに対して発がん性を有する 1,4-ジオキサンが, 地下水水質環境基準を指定されたことから, 同現場の 1,4-ジオキサンのモニタリングを行った. その結果, 遮水壁内外に設置されている観測井戸で地下水基準を超える濃度の 1,4-ジオキサンが検出され, 同物質による汚染が生じていることが確認された. 1,4-ジオキサンは既存の水処理施設における生物処理での浄化が困難であることから, 促進酸化処理施設を追加整備し, 平成 24 年度から 1,4-ジオキサン浄化対策を行っている. 水処理および促進酸化処理に掛かる維

持管理費用は約 4 千万円/年で, これらの処理はある程度長い期間を必要とする. 処理が長期に亘れば, 処理施設は経年劣化し, そのため修繕費用も発生する. また, 遮水壁の劣化は避けられないことから, 汚染拡散防止のための新たな遮水壁を設置しなければならず, 更なる費用が必要となる. このように, 現在行っている環境修復事業は, 事業完了までに多額の費用が見込まれることから, 安全でより安価な浄化対策が望まれる.

近年, 1,4-ジオキサン分解菌の報告事例が数件あり, それらは化学工場の排水路土壌や排水処理汚泥から発見されている¹⁾. しかし, 1,4-ジオキサンに汚染された廃棄物不法投棄現場からの報告事例はほとんどない. 微生物を用いた 1,4-ジオキサン浄化処理が可能となれば, 促進酸化処理を行っている現状の処理に係る費用よりも安価に処理を行うことが見込める. また,

* 公益財団法人 三重県下水道公社

汚染現場に生息している菌を処理に利用できれば、環境への影響もほとんどないと考えられる。今回、廃棄物不法投棄現場での 1,4-ジオキサン分解菌の探索、現場試料を用いた集積培養、集積培養を行った試料中の菌叢の分解能力調査、分解菌の単離および菌種推定を行ったので、その結果を報告する。

方 法

1. 試験スケジュール

本研究の試験スケジュールを図 1 に示す。

2. 試薬

本研究で使用した試薬および調製方法は次のとおりである。

- ・1,4-ジオキサン、塩化鉄(III)(無水)、塩化カルシウムおよび硫酸アンモニウムは関東化学(株)製特級、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム七水和物およびリン酸水素二カリウムは和光純薬工業(株)製特級、寒天は Bacto Agar (Becton Dickinson, USA 社製)。
- ・ソイビーン・カゼインダイジェスト培地(以下、「SCD 培地」という.)は Becton Dickinson, USA 社製のものを処方に従い、用時調製した。
- ・1,4-ジオキサン溶液は 1,4-ジオキサンに滅菌蒸留水を加え、濃度 3,350ppm に調製した。Basal minimum medium 培養液(以下、「BMM 培養液」という.)は K_2HPO_4 1.0g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $FeCl_3$ 0.01g, $NaCl$ 0.05g, $CaCl_2$ 0.05g を蒸留水に溶かし、全量 1L とした。SCD 培養液は滅菌蒸留水 250mL に滅菌済の SCD 培地 2.5mL を加えた。

3. 試料

環境修復現場の遮水壁内外の井戸から揚水された地下水を処理する地下水浄化処理施設の生物処理槽から採水し、これを試料とした。

4. 1,4-ジオキサン分解菌の確認試験

生物処理槽水に存在する菌による 1,4-ジオキサンの分解が起こるか否かを調べるため、図 2 に示した【操作手順 1】により、試料に 1,4-ジオキサン溶液を添加した検体の培養および検体中の 1,4-ジオキサン濃度測定を行った。対照試料として、滅菌蒸留水を用いた。

なお、1,4-ジオキサンの測定は「地下水の水質汚濁に係る環境基準について」(平成 9 年 3

月 13 日付け環境庁告示第 10 号) の別表に定められている方法のうち、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ質量分析法(Agilent Technologies G1888, 5975C および 6890N、カラム Agilent J&W DB-624) により行った。

5. 集積培養

5. 1 生物処理槽水菌叢の集積培養

生物処理槽水中の 1,4-ジオキサン分解菌を増殖および菌の分解活性を向上させるため次のとおり集積培養を行った。

上記「4. 1,4-ジオキサン分解菌の確認試験」で検体の 1,4-ジオキサン濃度が低下してほぼ分解されたら、検体に滅菌蒸留水を加えて全量 1L とし、1,4-ジオキサン溶液を添加する。引き続き図 2 に示した【操作手順 1】を繰り返し行った。また、対照試料については、【操作手順 1】の 1,4-ジオキサン濃度および吸光度測定を行った。

以下、【操作手順 1】を繰り返して集積培養した検体を「生物処理槽集積水」とする。

5. 2 BMM 培養液を用いた集積培養

無機塩類の存在が集積培養に及ぼす影響を調べるため、次の操作を行った。

上記「5.1 生物処理槽水菌叢の集積培養」で得られた生物処理槽集積水から図 3 に示した【操作手順 2】により濃縮物(以下、「濃縮菌叢 A」という.)を作成した。次に、微生物が生育するための必須栄養素である無機塩類を必要最小限度含む BMM 培養液²⁾を作成した。濃縮菌叢 A および BMM 培養液を用いて図 4 に示した【操作手順 3】を行った。また、対照として、濃縮物を添加せずに【操作手順 3】の 1,4-ジオキサン濃度測定を行った。

以下、【操作手順 3】を繰り返して集積培養した検体を「BMM 集積水」とする。

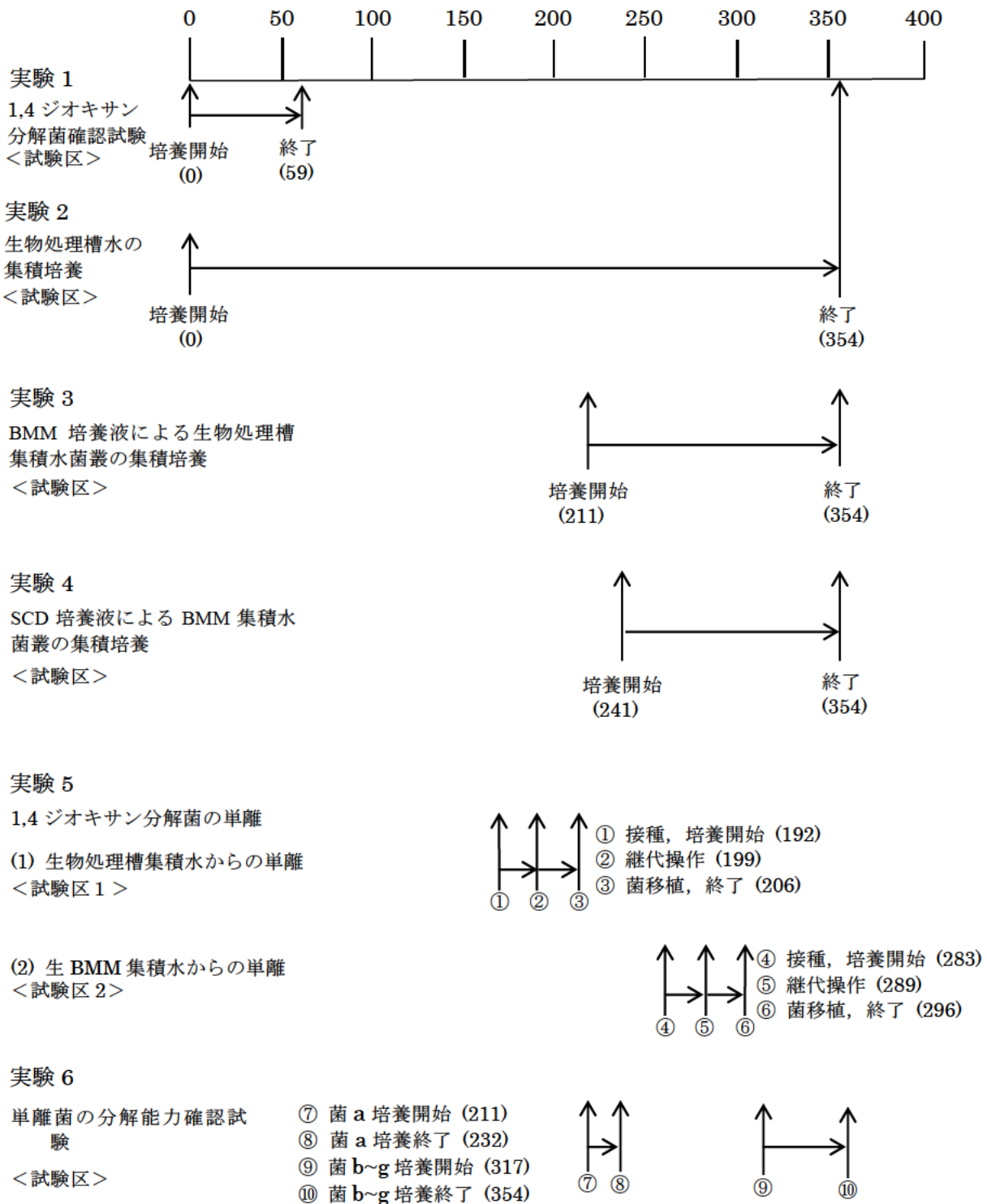
なお、遠心分離に用いた生物処理槽集積水は、【操作手順 1】の培養開始後 211 日目のものである。

5. 3 SCD 培養液を用いた集積培養

1,4-ジオキサン以外の有機物の存在が集積培養に及ぼす影響を調べるため、次の操作を行った。

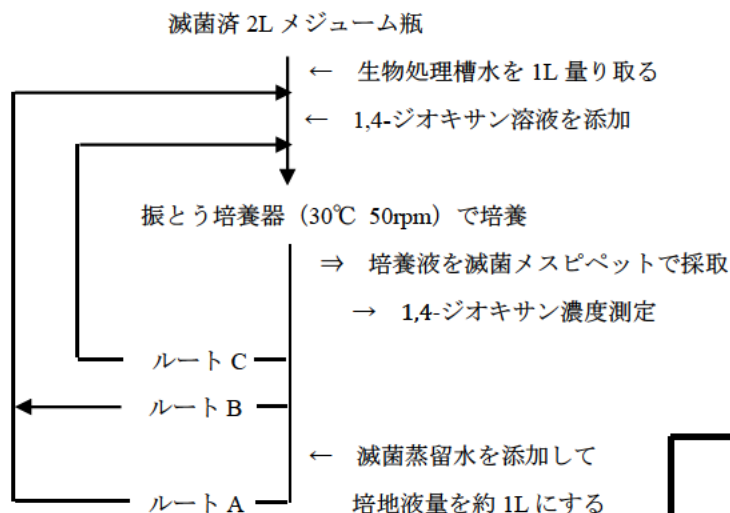
上記「5.2 BMM 培養液を用いた集積培養」で得られた BMM 集積水から【操作手順 2】により濃縮物(以下、「濃縮菌叢 B」という.)を作成した。濃縮菌叢 B を用いて、図 5 に示した【操

生物処理槽水培養日数



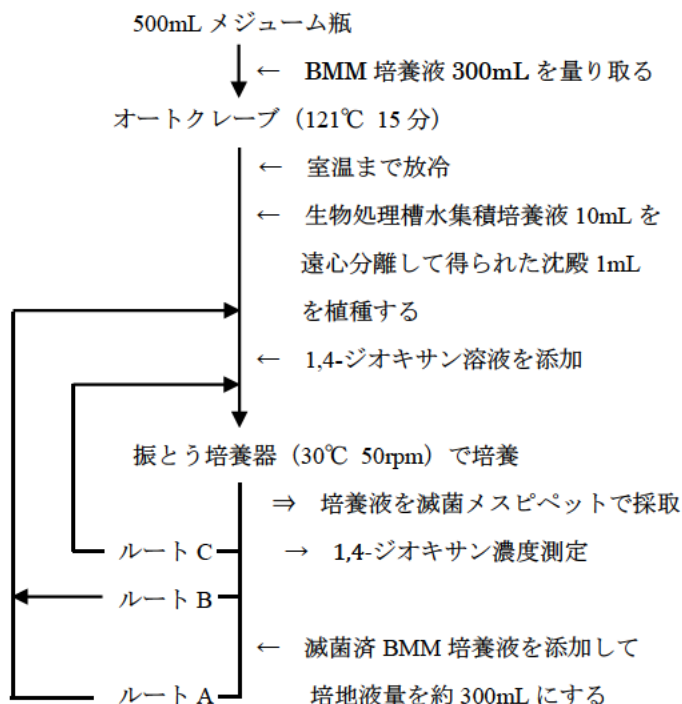
() 内は生物処理槽水の培養を開始してからの経過日数

図 1 1,4 - ジオキサ分解菌の存否, 集積培養および単離試験スケジュール



ルート A 実施日：59 日，115 日，136 日および 154 日
 ルート B 実施日：157 日，164 日，172 日，178 日および 184 日
 ルート C 実施日：0 日および上記以外の日
 ※日数は操作開始日を 0 日とした培養経過日を表す

図 2 【操作手順 1】生物処理槽水集積培養



ルート A 実施日：14 日，22 日，30 日および 35 日
 ルート B 実施日：41 日，48 日，54 日，63 日および 69 日
 ルート C 実施日：0 日および上記以外の日
 ※日数は操作開始日を 0 日とした培養経過日を表す

図 4 【操作手順 3】BMM 集積培養

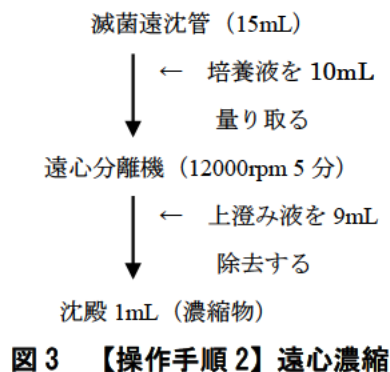
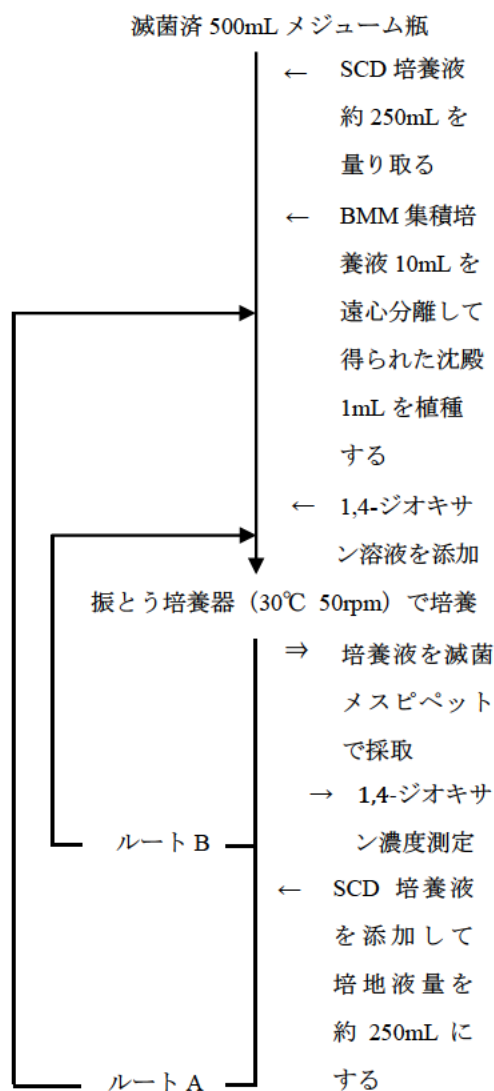


図 3 【操作手順 2】遠心濃縮



ルート A 実施日：29 日および 40 日
 ルート B 実施日：0 日および上記以外の日

図 5 【操作手順 4】SCD 集積培養

作手順 4】を行った。

以下、【操作手順 4】を繰り返して集積培養した検体を「SCD 集積水」とする。

なお、遠心分離に用いた BMM 集積水は、【操作手順 3】の培養開始後 30 日目のものである。

6. 吸光度測定

生物処理槽水の濁度を調べるため、図 2 に示した【操作手順 1】の 1,4-ジオキサン濃度測定に併せて、検体を 600nm で測定した。

なお測定は、島津紫外可視分光光度計 UV-1800 により行った。

7. 分解菌の単離

7. 1 単離用培地作成

集積培養液から 1,4-ジオキサン分解菌を単離するための寒天培地を、図 6 に示した【操作手順 5】により作成した²⁾。

以下、【操作手順 5】により作成した寒天培地を「単離用培地」とする。

7. 2 集積培養液からの分解菌単離

生物処理槽集積水および BMM 集積水から 1,4-ジオキサン分解菌を単離するため以下の操作を行った。

生物処理槽集積水については、【操作手順 1】により 182 日間集積培養を行った検体を用いて、図 7 に示した【操作手順 6】により濃縮物（以下、「濃縮物 A」という。）を作成した。濃縮物 A を単離用培地にコンラージ棒で塗布し、37°C のふらん器で培養を行い、単離用培地に細菌塊（以下、「コロニー」という。）が形成されているか確認した。

BMM 集積水については、【操作手順 3】により 71 日間集積培養を行った検体を用いて、【操作手順 6】により濃縮物（以下、「濃縮物 B」という。）を作成した。濃縮物を単離用培地にコンラージ棒で塗布し、37°C のふらん器で培養を行い、単離用培地にコロニーが形成されているか確認した。

上記のふらん器で培養した単離用培地に生じたコロニーを別の新しい単離用培地に釣菌し、37°C のふらん器で培養を行い、コロニーが継代培養できるか調べた。

継代培養ができたコロニーを用いて、図 8 に示した【操作手順 7】を行い、培養液の 1,4-ジオキサン濃度測定等を行った。

以下、生物処理槽集積水から単離した菌の培養操作を「第 1 培養」、BMM 集積水から単離し

た菌の培養操作を「第 2 培養」とする。なお、培養液の 1,4-ジオキサン濃度の減少が分解によるものであることを確認するため、対照として、コロニーを釣菌せずに【操作手順 7】の 1,4-ジオキサン濃度測定を行った。

8. 単離菌の菌種推定

コロニーの菌種推定に必要な DNA 塩基配列データを得るため、次の作業を行った。

上記「7.2 集積培養液からの分解菌単離」で継代培養によって形成されたコロニーの菌株から DNA を抽出した後、16S rDNA を増幅した³⁾。この増幅遺伝子を精製した後、DNA シーケンサーを用いて遺伝子解析を行った。

得られたシーケンスデータを、相同性検索プログラム BLAST⁴⁾を用いてデータベースと照合し、分解菌の菌種を推定した。

9. 検鏡

9. 1 暗視野検鏡

生物処理槽集積水、BMM 集積水、SCD 集積水、第 1 培養の培養液および第 2 培養の培養液を遠心分離（10,000G、5 分）で約 10 倍に濃縮し、濃縮物 500 μ L を暗視野コンデンサーを装着した生物顕微鏡（OLYMPUS BX50）にて検鏡を行い、微生物の状況を確認した。

9. 2 グラム染色法検鏡

上記「9.1 暗視野検鏡」と同じ試料をグラム染色して検鏡を行い、グラム陽性菌および陰性菌の有無を確認した。

結果および考察

1. 1,4-ジオキサン分解菌存在の確認

【操作手順 1】で行った、検体および対照の 1,4-ジオキサン濃度の測定結果を図 9 に示す。

【操作手順 1】の培養開始時には検体中の 1,4-ジオキサン濃度は 5.5mg/L であったが、【操作手順 1】の培養開始から 59 日目には 0.36mg/L まで減少した。一方で、対照中の 1,4-ジオキサン濃度に変化は認められなかった。これらの結果から、試料（生物処理槽水）中には、1,4-ジオキサンを生分解した微生物が存在すると思われる。

2. 集積培養

2. 1 生物処理槽水の集積培養

図 9 で、【操作手順 1】の培養開始から 115 日目の検体中の 1,4-ジオキサン濃度は 0.1mg/L で、培養 115 日間で 5.4mg/L 減少した。また、【操作

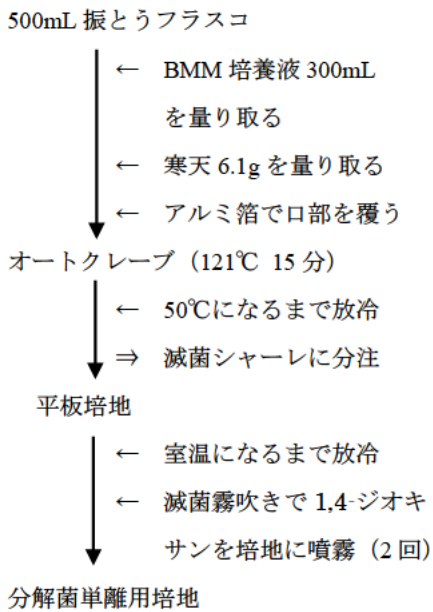


図6 【操作手順5】単離用培地作成

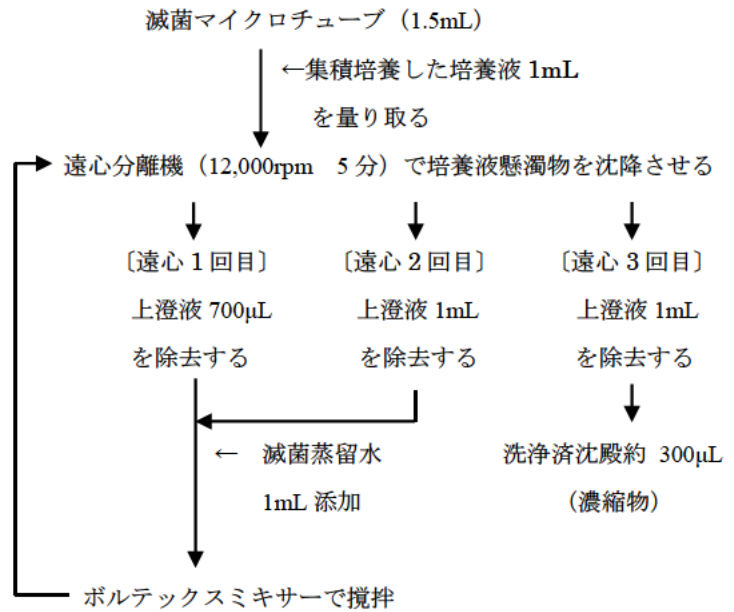
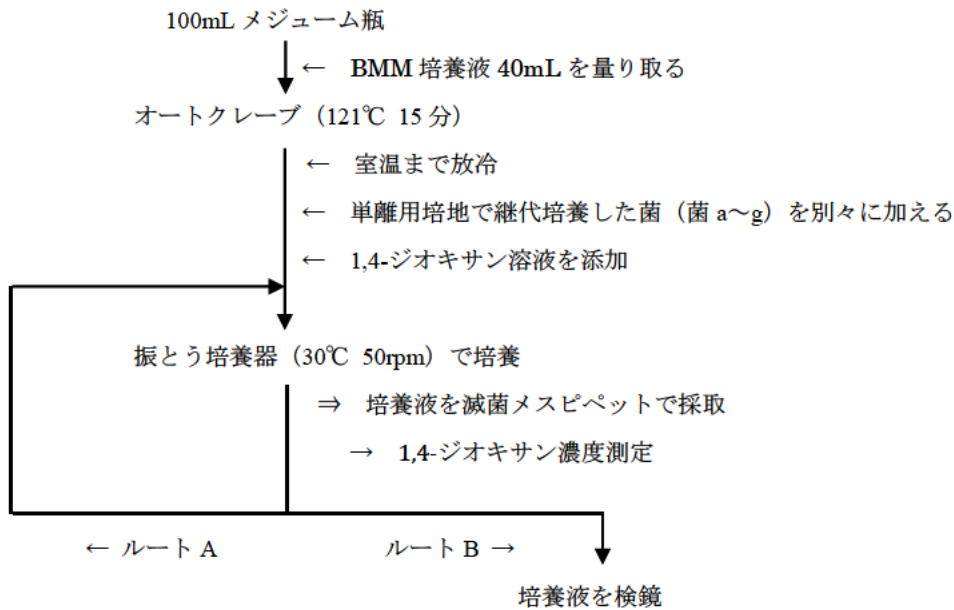


図7 【操作手順6】遠心濃縮・洗浄



ルート A 実施日 :

菌 a については, 0 日, 5 日, 9 日および 14 日

菌 b~g については, 0 日, 12 日, 20 日および 29 日

ルート B 実施日 :

菌 a については, 21 日

菌 b~g については, 37 日目

※日数は操作開始日を 0 日とした培養経過日を表す

図8 【操作手順7】単離菌 BMM 培養

手順 1】の培養開始から 164 日目の検体中の 1,4-ジオキサン濃度は 5.6mg/L, 【操作手順 1】開始から 172 日目は 0.3mg/L であり, 培養 8 日間で濃度が 5.3mg/L 減少した. 一方, 対照中の 1,4-ジオキサン濃度に大きな変化は認められなかった. これらの結果から, 【操作手順 1】の培養開始から約半年で検体中の 1,4-ジオキサン濃度の減少速度は約 7 倍になった. 減少速度が速くなったことから, 集積培養により試料 (生物処理槽水) 中の 1,4-ジオキサン分解菌が増殖した, または, 菌叢の分解活性が高まったと考えられた.

2. 2 BMM 培養液を用いた集積培養

【操作手順 3】で行った, 検体および対照の 1,4-ジオキサン濃度の測定結果を図 10 に示す.

【操作手順 3】の培養開始時には検体中の 1,4-ジオキサン濃度は 5.1mg/L, 【操作手順 3】の培養開始から 14 日目には 0.1mg/L で, 培養 14 日間で 5mg/L 減少した. また, 【操作手順 3】の培養開始から 14 日目の検体に 1,4-ジオキサン溶液を添加した後の濃度は 5.8mg/L, 【操作手順 3】の培養開始から 22 日目は 0.1mg/L であり, 培養 7 日間で濃度が 5.7mg/L 減少した. 一方, 対照中の 1,4-ジオキサン濃度に変化は認められなかった. これらの結果から, 【操作手順 3】の培養開始から 3 週間で検体中の 1,4-ジオキサン濃度の減少速度は約 2 倍になった.

上記「結果および考察 2.1 生物処理槽水の集積培養」に示した結果 (培養開始から約半年で検体中の 1,4-ジオキサン濃度の減少速度は約 7 倍になった.) から, 無機塩類を添加せずに行った【操作手順 1】の培養と比べて, BMM 培養液で集積培養を行うと, 検体中の菌の増殖速度が早まる, または, 菌叢の分解活性がより早く向上すると考えられた.

2. 3 SCD 培養液を用いた集積培養

【操作手順 4】で行った, 検体の 1,4-ジオキサン濃度の測定結果を図 11 に示す. 【操作手順 4】の培養開始時には, 検体中の 1,4-ジオキサン濃度は 5.6mg/L, 【操作手順 4】の培養開始から 29 日目は 0.05mg/L 未満であり, 培養 29 日間で濃度が約 5.6mg/L 減少した. また, 【操作手順 4】の培養開始から 40 日目の検体に 1,4-ジオキサン溶液を添加した後の濃度は 5.8mg/L, 【操作手順 4】の培養開始から 46 日目は 0.2mg/L であり, 培養 6 日間で濃度が 5.6mg/L 減少した.

上記「結果および考察 2.2 BMM 培養液を用いた集積培養」に示した, 1 週間の培養で検体中の 1,4-ジオキサン濃度を約 6mg/L 減少させることができるようになった菌叢を, SCD 培養液で培養すると, 同程度の 1,4-ジオキサン濃度減少を起こすのに約 1 月間を要したことから, 検体中の菌叢の分解活性は低下したと考えられた. その後, さらに培養を続けると, 菌叢の分解活性は回復した.

3. 吸光度測定

【操作手順 1】の 1,4-ジオキサン濃度測定に併せて, 【操作手順 1】の培養開始から 178 日目までの検体の吸光度を測定したが, 変化は認められなかった. また, 【操作手順 1】の吸光度測定を行う際に, 採取した検体を目視で確認したが, 検体の濁度に変化は認められなかった. これらの結果, 集積培養による明確な菌数の増加は確認できなかったことから, 集積培養で 1,4-ジオキサン濃度の減少速度が早まる事象に, 菌の増殖は関与が低いと考えられた.

4. 分解菌の単離

4. 1 集積培養液からの分解菌単離

上記「方法 7.2 集積培養液からの分解菌単離」において, 濃縮物 A を塗布した単離用培地に, 培養 7 日目に, 3 種類のコロニーが形成されていた. これら 3 種のコロニーのうち, 継代培養できたのは 1 種類のみであった. これを「菌 a」とする. また, 濃縮物 B を塗布した単離用培地に, 培養を開始してから 6 日目に, 7 種類のコロニーが形成されていた. これら 7 種のコロニーのうち, 継代培養できたのは 6 種類であった. これらを「菌 b,c,d,e,f,g」とする.

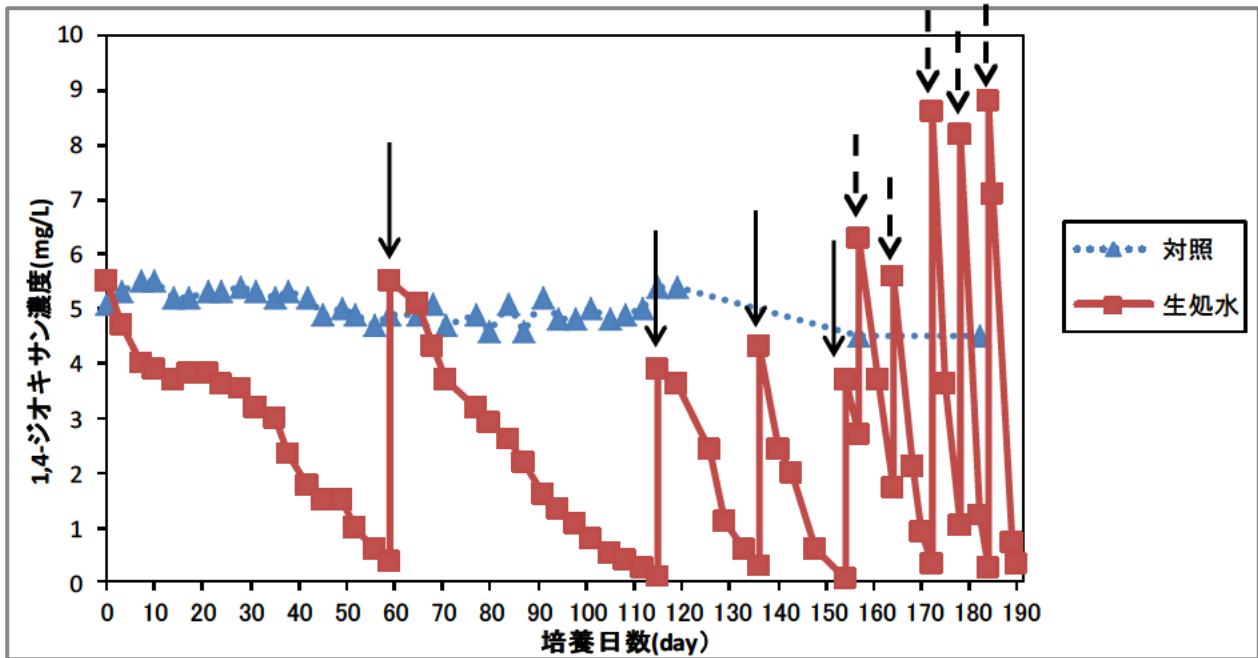
4. 2 単離菌分解能力調査

第 1 培養開始時には, 検体中の 1,4-ジオキサン濃度は 5.8mg/L であったが, 【操作手順 7】開始後 21 日目には 4.7mg/L まで減少した. しかし, それ以降, 検体中の 1,4-ジオキサン濃度は 4.7mg/L から減少しなかった. また, 第 2 培養開始時には, 検体中の 1,4-ジオキサン濃度は約 7mg/L であったが, 【操作手順 7】開始後 37 日目には 5~6mg/L まで減少した. なお, 対照の 1,4-ジオキサン濃度に変化はなかった.

5. 単離菌の菌種推定

単離菌 a~g の相同性検索結果を表 1 に示す.

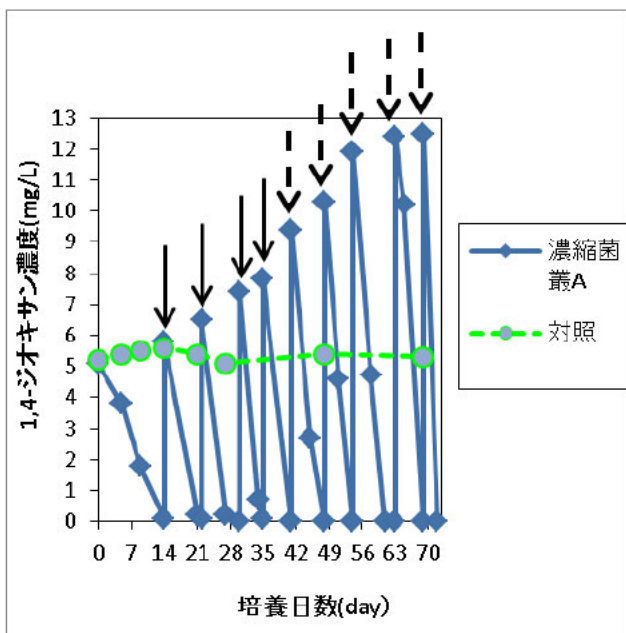
単離菌の DNA 塩基配列は, *Micromonospora* 属の放線菌, *Streptomyces* 属の放線菌および



矢印（実線）：1,4-ジオキサン溶液添加

矢印（破線）：滅菌蒸留水添加および1,4-ジオキサン溶液添加

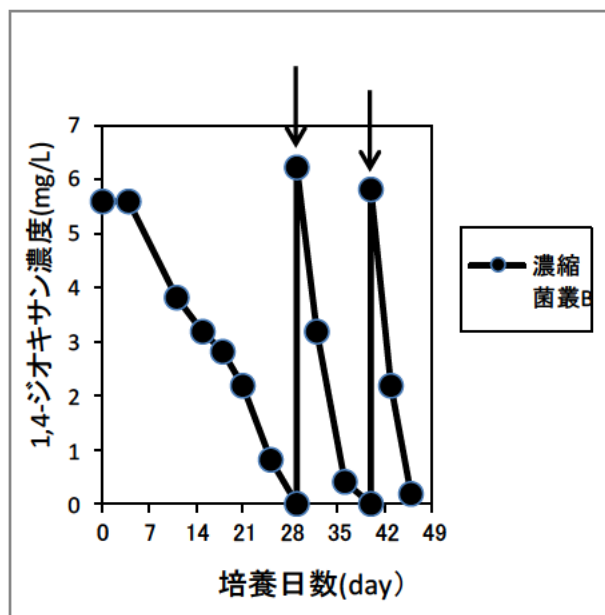
図9 生物処理槽水の1,4-ジオキサン濃度経時モニタリング結果



矢印（実線）：1,4-ジオキサン溶液添加

矢印（破線）：滅菌 BMM 添加および1,4-ジオキサン溶液添加

図10 BMM 集積水の1,4-ジオキサン濃度経時モニタリング結果



矢印（実線）：1,4-ジオキサン溶液添加

図11 SCD 集積水の1,4-ジオキサン濃度経時モニタリング結果

Phyllobacterium 属の桿菌の DNA 塩基配列データと高い相同性を示した。

6. 検鏡

【操作手順 1】の培養開始から 192 日目の生物処理槽集積水（以下、「検体 1」という。）の暗視野検鏡結果を写真 1 に示す。検体 1 を暗視野顕微鏡で検鏡したところ、放線菌、桿菌、らせん菌および原虫の存在を確認した（放線菌以外の写真省略）。また、【操作手順 1】の培養開始から 283 日目の生物処理槽集積水中の菌叢をグラム染色して検鏡した結果、グラム陽性および陰性の菌を確認した（写真省略）。

【操作手順 3】の培養開始から 71 日目の BMM 集積水（以下、「検体 2」という。）の菌叢をグラム染色した後に検鏡した結果を写真 2 に示す。検体 2 を暗視野顕微鏡で検鏡したところ、放線菌および桿菌の存在を確認した（写真省略）。また、検体 2 の菌叢をグラム染色して検鏡した結果、グラム陽性および陰性の菌を確認した（グラム陰性菌の写真省略）。

【操作手順 4】の培養開始から 45 日目の SCD 集積水（以下、「検体 3」という。）を暗視野顕微鏡で検鏡したところ、放線菌および桿菌の存在を確認した（写真省略）。また、検体 3 の菌叢をグラム染色して検鏡した結果、グラム陽性および陰性の菌を確認した（写真省略）。

第 1 培養を開始してから 22 日目の培養液（以下、「検体 4」という。）を暗視野顕微鏡で検鏡したが菌の存在を確認できなかった（写真省略）。また、検体 4 をグラム染色しても菌の存在を確認できなかった。これらの結果と、第 1 培養 21 日までしか濃度減少が認められなかったことから、1,4-ジオキサンの分解が途中で止まったのは、分解を継続するための物質（例えば BMM 培養液を構成する無機塩類）が消失し、菌が死滅、または、休眠したと考えられた。

第 2 培養を開始してから 37 日目の検体を暗視野顕微鏡で検鏡したところ、単離菌 b~g の検体で菌の存在を確認した。検体中の 1,4-ジオキサン濃度が減少している状況で、菌 b~g をそれぞれ植種した検体中に菌の存在が確認できたことから、b~g の菌は 1,4-ジオキサンを分解していると考えられた。

結 語

三重県桑名市内の環境修復地に設置された水

処理施設内の生物処理槽水を採取して 1,4-ジオキサン溶液を添加したものを検体とし、この検体を恒温槽で振とう培養を行ったところ、検体中の 1,4-ジオキサン濃度が減少した。このことから、検体中で 1,4-ジオキサンの分解が生じていると考えられ 1,4-ジオキサン分解能力を有する微生物の存在が示唆された。また、この検体の菌叢の特徴を調査したところ、次のことが明らかとなった。

- ・集積培養を行うと分解活性が向上する。
- ・無機塩類の存在は、分解活性を高める。
- ・有機物が存在すると、これが優先して利用されるため、1,4-ジオキサンの分解量が減り、分解活性が一時的に低下した。

また、検体から単離した菌の DNA 塩基配列データを解析して相同性検索を行ったところ、*Micromonospora* 属の放線菌、*Streptomyces* 属の

表 1 相同性検索結果

No.	属名	種類	相同性 (%)
菌 a	<i>Micromonospora</i> 属	放線菌	99
菌 b	<i>Streptomyces</i> 属	放線菌	99
菌 c	<i>Micromonospora</i> 属	放線菌	99
菌 d	<i>Micromonospora</i> 属	放線菌	99
菌 e	<i>Micromonospora</i> 属	放線菌	99
菌 f	<i>Micromonospora</i> 属	放線菌	99
菌 g	<i>Phyllobacterium</i> 属	桿菌	96

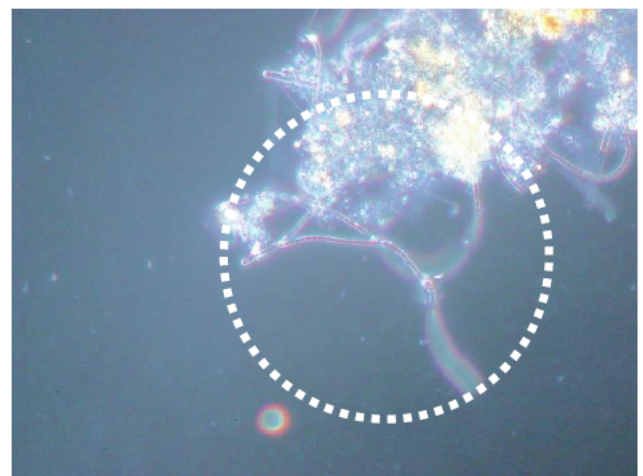


写真 1 生処集積水 暗視野検鏡
 <操作手順 1>開始後 192 日目
 破線白丸内の糸状のものは放線菌と思われる

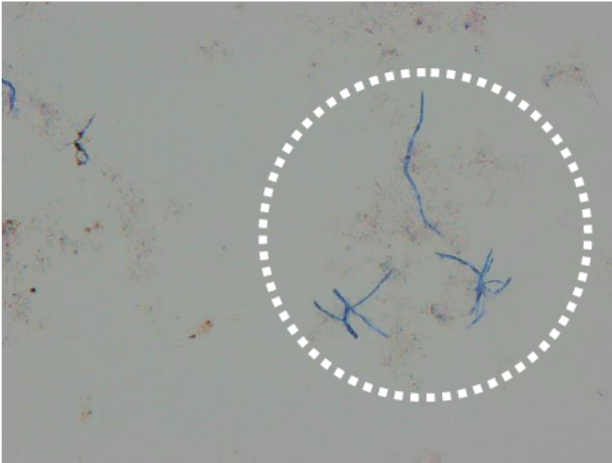


写真2 BMM集積水 グラム染色検鏡
＜操作手順4＞開始後71日目

破線白丸内の糸状染色物はグラム陽性菌

放線菌および *Phyllobacterium* 属の桿菌のものと高い相同性を示した。

単離菌の分解能力調査は継続中であり、今後集積培養が可能か確認したい。

実際の現場で、微生物による1,4-ジオキサン処理が可能かどうかは、集積培養できた単離菌およびBMM集積培養で得られた菌叢が、現場試料（促進酸化処理施設流入水）中の1,4-ジオキサンを分解できるか調査し、促進酸化処理の費用対効果と比較・検討したうえで判断する必

要がある。

謝 辞

本研究は、現場にて試料採取する際に、クボタ環境サービス株式会社桑名KS事業所の職員にご協力を頂いた。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) Kazunari Sei, Takashi Kakinoki, Daisuke Inoue, Satoshi Soda, Masanori Fujita, Michihiko Ike (2010) Evaluation of the biodegradation potential of 1,4-dioxane in river, soil and activated sludge samples, *Biodegradation*, 21:585-591.
- 2) Kazunari Sei, Keiko Miyagaki, Takashi Kakinoki, Kunihiro Fukugasako, Daisuke Inoue, Michihiko Ike (2013) Isolation and characterization bacterial strains that have high ability to degrade 1,4-dioxane as a sole carbon and energy source, *Biodegradation*, 24:665-674.
- 3) 後藤 慶一 (2009) 真菌の分類と同定 2 DNA塩基配列を用いたカビ・酵母の同定, *モダンメディア*, 55巻9号[真菌], 237-242.
- 4) National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>