

## 論文内容の要旨

**論文題目** 分子生物学的手法及び分離培養法を用いた鉄鋼排水処理活性汚泥中の嫌氣的フェノール分解細菌の解明  
Molecular and culture-dependent analyses of anaerobic phenol-degrading bacteria in activated sludge treating synthetic steel industry wastewater

**氏名** 末岡 一男

**キーワード**：嫌氣的フェノール分解細菌、好氣的フェノール分解細菌、RNA-SIP 法、平板培養法、人工安水処理活性汚泥

本研究では鉄鋼排水である安水を処理する活性汚泥を対象とした。鉄の生産において、鉄鉱石の還元剤や燃料として使用されるコークスは石炭を乾留して製造され、この時に安水が生じる。安水には高濃度のフェノール・アンモニアが含まれ、安水の主成分である。

通常、安水処理は物理化学的処理法と生物学的処理法を組み合わせで行なわれる。物理化学的処理法ではアンモニアストリッピング法によりアンモニアが除去される。生物学的処理法では、海水で 2-3 倍に希釈したのち標準活性汚泥法によってフェノールやチオシアン酸塩などが除去される。但し、アンモニアストリッピング法は、エネルギーやコスト面での負担が大きいという欠点があるため、アンモニアの除去をエネルギーやコスト面で負担の少ない生物学的処理法で行うことを検討した。つまり、アンモニアと有機物の同時除去が行える硝化液循環型硝化脱窒プロセスの適用である。本プロセスは下水処理を中心に適用されているが、安水処理においてはまだ本格的には導入されておらず検討段階である。

これまで、著者の研究室では、安水処理硝化脱窒プロセスの処理性能の裏づけ及び主要な微生物叢の解明を目的として、実験室規模の安水処理硝化脱窒プロセスを対象に、分子生物学的手法による微生物群集構造解析と分離培養法による微生物の分離が行われてきた。これらの研究から、安水処理に関わっている細菌の遺伝子情報やそれらが持つ生理学的特徴の一面が明らかになってきた。一方、本プロセスでは運転期間を通じて安水の主要有機物成分であるフェノールが脱窒反応に伴い嫌氣的に分解されており、フェノールを嫌氣的

に分解する細菌（フェノールを電子供与体、硝酸塩を電子受容体として生体エネルギーを得て、フェノールを摂取・同化している細菌（以下、嫌氣的フェノール分解細菌））が主要な役割を担っていると考えられた。しかし、これまでの研究からは嫌氣的フェノール分解細菌に関する知見は得られなかった。

そこで、本研究では、本プロセス内で主要な役割を担うと考えられる嫌氣的フェノール分解細菌を特定することを試みた。まず、嫌氣的フェノール分解細菌の系統学的位置を特定するために、安定同位体元素を利用した手法である **stable isotope probing (SIP)** 法を適用した。一方、SIP 法では遺伝子情報を得ることはできるものの、それ以上の情報を得ることは困難である。嫌氣的フェノール分解細菌の生理学的特徴を知るには、分離培養法によって分離株を獲得し調査するしか方法がない。そこで、分離培養法を用いて嫌氣的フェノール分解細菌を分離・培養することを試みた。

こうして、本研究では嫌氣的フェノール分解細菌を SIP 法と分離培養法で特定することを試みた。SIP 法にはその対象を RNA とする RNA-SIP 法を、分離培養法には近年改善が試みられている平板培養法を用いた。本研究の目的は以下の 4 点とした。

- （目的 1）：実験室規模の人工安水処理硝化脱窒プロセスを対象として、そこに生息する嫌氣的フェノール分解細菌を RNA-SIP 法によって特定する
- （目的 2）：（目的 1）と比較をするために、好氣的フェノール分解細菌を RNA-SIP 法によって特定する
- （目的 3）：実験室規模の人工安水処理硝化脱窒プロセスを対象として、そこに生息する嫌氣的フェノール分解細菌を平板培養法によって分離・培養する
- （目的 4）：（目的 1）から（目的 3）で得られた結果を比較し、RNA-SIP 法で捉えた細菌が平板培養法で分離されているかを確認する

次に本論文の各章の構成を説明する。本論文は全 8 章から構成される。第 1 章の「研究の背景と目的」では、本研究の背景と目的および論文の構成を説明した。第 2 章の「既往の知見」では、安水処理・フェノール分解細菌・分子生物学的手法と分離培養法に関する既往の知見を紹介した。第 3 章の「研究手法」では、活性汚泥に関する情報、RNA-SIP 法・平板培養法・水質分析法の実験手順を説明した。第 4 章から第 7 章では結果を述べ、第 8 章の「総括」では、本論文の研究成果を簡潔にまとめ、今後の展望を述べた。以下、第 4 章から第 7 章について各章ごとに説明する。

第 4 章は「嫌氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定」と題し、嫌氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定を行った。汚泥に  $^{13}\text{C}$  標識フェノールまたは非標識フェノールを与え硝酸塩存在下で嫌気培養を行い、以後の RNA-SIP 法の分子生物学の実験に供した。結果、汚泥 B では *Azoarcus*, *Microbulbifer*, *Pelagiobacter*, *Pseudomonas*, *Thauera* 属に近縁な細菌が特定され、汚泥 C では *Marinobacter*, *Pelagiobacter* 属に近縁

な細菌が特定された。これらの内、汚泥 B の *Azoarcus* 属に近縁な細菌と汚泥 C の *Marinobacter*, *Pelagiobacter* 属に近縁な細菌は、嫌氣的にフェノールを直接同化していると考えられた。一方、その他の細菌は、嫌氣的にフェノールを直接同化している可能性とフェノールの代謝産物を同化している可能性が残された。

第 5 章は「好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定」と題し、好氣的フェノール分解細菌の RNA-SIP 法による特定を行った。汚泥に  $^{13}\text{C}$  標識フェノールまたは非標識フェノールを与え好気培養を行い、以後の RNA-SIP 法の分子生物学的実験に供した。結果、汚泥 A では *Propionibacterium*, *Halomonas*, *Marinobacterium*, *Thauera* 属に近縁な細菌が特定され、汚泥 C では *Citreimonas*, *Halomonas*, *Microbispora*, *Propionibacterium*, *Rhodobacter* に近縁な細菌が特定された。これらの内、汚泥 C の *Halomonas* 属に近縁な細菌以外は、好氣的にフェノールを直接同化していると考えられた。一方、汚泥 C の *Halomonas* 属に近縁な細菌は、好氣的にフェノールを直接同化している可能性とフェノールの代謝産物を同化している可能性が残された。

第 6 章は「嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 —汚泥 A と汚泥 B—」と題し、平板培養法に使用する基質濃度と固化剤の種類に着目して、培養条件の違いが得られる分離株の違いに与える影響を評価し、嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件を絞り込んだ。固化剤にはカラギーナン・ゲランガム・寒天 A (精製度が高い)・寒天 B (精製度が低い) の 4 種類を用い、基質となるフェノール濃度には約 10, 100, 500 (mg/L) の 3 種類を用いた。これらを組み合わせた全 12 通りの培養条件において、硝酸塩存在下で嫌気培養を行い、CFU (colony forming unit) 値) の推移・コロニーの形態的特徴の多様性・分離株の系統学的位置の 3 項目から評価した。結果、嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件としては、「フェノール濃度を低濃度 (約 10 mg liter<sup>-1</sup>) または中濃度 (約 100 mg liter<sup>-1</sup>) にし」、「固化剤にはカラギーナンまたはゲランガムを用いる」ことが重要であるとわかった。また、汚泥 B から嫌氣的フェノール分解細菌を分離し、16S rRNA 遺伝子を解読し、第 4 章と第 5 章で特定された細菌が分離されているかを調べた。結果、第 4 章で汚泥 B 中の嫌氣的フェノール分解細菌として特定された細菌 (*Azoarcus* 属に近縁な細菌) の分離に成功し、全部で 24 株分離された。

第 7 章は「嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養 —汚泥 C—」と題し、第 6 章で結論された嫌氣的フェノール分解細菌を捉えやすい平板培養条件を基本的に用いて、さらに海水を含む培地の使用を検討した。海水を加えたのは、硝化脱窒プロセスの流入水には海水が含まれており、その環境を模倣した培地にするためであった。フェノール濃度は約 10, 100 (mg/L) とした。一方、固化剤については、海水を含む固体培地を作成する場合、ゲランガムを使用することが困難であるとわかった。そのため、固化剤にはカラギーナンを用い比較対象として寒天 A も用いた。こうして、海水を含む固体培地を用いて、嫌氣的フェノール分解細菌の分離・培養を試み汚泥 C から 152 株を分離した。得られた分離株が嫌氣的フェノール分解能を有するか否かを判断するためには、フェノールと硝酸塩を用いて液体

培養を行い各成分の利用性を確認する必要があるが、本研究ではこれを行わなかった。そのため、文献情報からの嫌氣的フェノール分解能を推測するだけに留まった。

また、第 5 章で汚泥 A 中と汚泥 C 中の好氣的フェノール分解細菌または好氣的フェノール分解細菌に関与する細菌と特定された細菌 (*Halomonas* 属に近縁な細菌) の分離に成功し、全部で 4 株分離された。さらに、第 5 章で汚泥 A 中の好氣的フェノール分解細菌と特定された細菌 (*Marinobacterium* 属に近縁な細菌) の分離にも成功し、1 株分離された。

以上、第 4 章と第 5 章において (目的 1) と (目的 2) が達成された。第 6 章と第 7 章において (目的 3) の一部と (目的 4) が達成された。(目的 3) を達成するためには、汚泥 B と汚泥 C から得られた分離株のフェノール分解能を調査する必要がある。これは今後の課題とした。

本研究の大きな成果のひとつは、人工安水処理活性汚泥内で機能的に重要な役割を担っていると考えられた *Azoarcus* 属に近縁な細菌の分離に成功したことであった。この株の生理学的特徴を調査し、安水処理プロセス内での挙動とプロセスの処理状況との関連付けを行うことを今後の課題とした。また、本研究を通して、これまでに嫌氣的または好氣的フェノール分解細菌としての報告がない細菌が RNA-SIP 法によって特定され、かつ、それらの中には系統学的にも新規な細菌が含まれていることが解明された。これも本研究のもうひとつの大きな成果である。