

学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

学位論文題目

(Dissertation Title)

APPLICATION OF MARINE BACTERIA FOR PHOSPHORUS REMOVAL FROM
SALINE WASTEWATER

(塩分含有廃水からのリン除去のための海洋バクテリアの利活用)

氏 名(Name)

RAFITAH HASANAH

Biological phosphorus removal (BPR) was first used at a few water resource recovery facilities in the late 1960s. A common element in EBPR implementation is the presence of an anaerobic tank (no nitrate and oxygen) before the aeration tank. In the next aerobic phase, these bacteria can accumulate large amounts of polyphosphate in their cells and phosphorus removal is said to be increased. The group of microorganisms that are largely responsible for P removal are known as the polyphosphate accumulating organisms (PAOs).

One of the options to remove phosphorus is to utilize bacteria from nature, besides being easy to obtain and inexpensive. The application of bacteria from sediment and seawater was able to reduce phosphorus in wastewater. In this study, for screening salt-tolerant phosphorus accumulating organisms (PAOs) and investigating the P release and uptake of the organisms in saline wastewater. The samples used were sediment and seawater from Yamaguchi Bay, Yamaguchi, Japan. Sediment and seawater added 150 mL of artificial saline wastewater with media (anaerobic media). The samples were then cultured and given feed media every three hours day at 25 °C and shaken at 140 rpm. The hydraulic retention time of the cultivation was 16 h and 8 h under anaerobic and aerobic conditions, respectively. 10 sponges made of polyurethane with dimensions of 2 cm were put in Erlenmeyer flasks and was used as a bio-carrier surface for microorganisms to adhere to. Water was passed over the sponge surface to acclimatize the microorganisms growing outside the sponge as well as within its pores, ensuring sufficient growth surface. The cultivation duration was 112 days. Batch experiments were conducted over 98 days in solutions with a salinity of 3.5% and P concentrations of 1, 5, 10, and 20 mg-P/L. The P-uptake ability of microorganisms increased by increasing P concentration from 1 to 20 mg-P/L. A high P removal percentage with an average of 85% was obtained at 10 mg-P/L after day 56. The uptake and release of P were observed in saline wastewater, signifying that salt tolerant PAOs could grow in the saline solution. Bacterial screening by isolation and sequence analysis using 16S rRNA demonstrated that two cultivated strains, TR1 and MA3, had high similarity with *Bacillus* sp. and *Thioclava* sp. EIOx9, respectively. The colony morphology analysis showed that the colonies of TR1 were rod-shaped, milky-colored, round, shiny-viscous, smooth with a defined margin, while colonies of MA3 were cream-colored with smooth

surfaces and raised aspect. The TR1 was gram-stain-positive with approximately 6-10 μm long and 1.2 μm wide cells, and MA3 was gram-stain-negative with about 0.9 μm long and 0.5 μm wide cells. The results demonstrated the involvement of *Bacillus* sp., and *Thioclava* sp. in the release and uptake of P, owing to their ability to grow in saline wastewater.

Furthermore, *Bacillus* sp. (TR1) and *Thioclava* sp. (MA3) were assessed for their abiotic adaptability and phosphorus removal efficiency in saline wastewater. The effects of abiotic factors such as carbon source, pH, temperature, and salinity on bacterial growth were examined through a series of batch experiments. Both bacteria used carbon sources such as glucose, sucrose, and CH_3COONa for their growth. The pH study indicated that *Bacillus* sp. (TR1) preferred the pH range of 6–8 and *Thioclava* sp. (MA3) preferred the pH range of 6–9. *Bacillus* sp. favorably multiplied in the temperature range of 25–40 $^\circ\text{C}$, while 25–35 $^\circ\text{C}$ was preferred by *Thioclava* sp. Salinity range of 0%–10% was favorable for TR1, with optimum growth observed at 3.5%–5%, and *Thioclava* sp. (MA3) preferred the salinity range of 1%–10% with optimal growth at 4% but was absent in non-saline water. *Bacillus* sp. and bacterial combination (TR1 and MA3) showed similar values for phosphorus removal efficiency (100%) at 1.0 mg-P/L total P compared to *Thioclava* sp. (38.2%). The initial phosphorus concentration of 2.5 mg-P / L showed a slightly higher 72.35% P removal efficiency compared to the individual strains. However, phosphorus removal did not increase, but showed a downward trend with increasing at initial phosphorus. The combination possibly built a synergistic activity between the individual strains to remove phosphorus. The results demonstrated that when used individually, *Bacillus* sp. showed a reasonably high phosphorus removal ability than *Thioclava* sp., and exhibited good synergy when used in combination to remove phosphorus from saline wastewater.

(様式 9 号)

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

氏 名	Rafitah Hasanah
審査委員	主 査： 今 井 剛
	副 査： 関 根 雅 彦
	副 査： 新 苗 正 和
	副 査： 樋 口 隆 哉
	副 査： 通 阪 栄 一
論文題目	APPLICATION OF MARINE BACTERIA FOR PHOSPHORUS REMOVAL FROM SALINE WASTEWATER (塩分含有廃水からのリン除去のための海洋バクテリアの利活用)
<p>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</p> <p>現在、富栄養化の問題は世界的にも重要な課題となっており、排水中からのリン除去が必要とされている。排水からのリン除去については、これまでにいくつかの技術、化学的な沈殿法や物理化学的な吸着法、生物学的なリン除去法などが開発されてきた。生物学的なリン除去法 (EBPR) は 1960 年代に開発され、嫌気状態と好気状態とを繰り返すことによって通常よりも多くの (数倍の) リンをその細胞内に取り込み菌が優占してくることを利用したものである。これらの菌はリン蓄積細菌 (PAOs) として知られている。</p> <p>今後塩分含有排水を含む広い範囲の排水中からのリン除去が必要とされているが、これまで知られているリン蓄積細菌 (PAOs) は淡水性のものがほとんどであり、海水程度の塩分を含む廃水 (食品工場などに代表される産業廃水) からリンを除去・回収できる PAOs はほとんど知られておらず、実用化に至っていない。そこで、本研究は、海水程度の塩分濃度下においてもリンの除去・回収が可能な PAOs を探索 (スクリーニング) し、それを同定するとともに最適な培養条件を実験的に把握することを目的とし、将来的にはその実用化を目指す。</p> <p>山口湾の砂浜から採取してきた砂および海水を植種源として、150mL の人工海水をベースに必要な栄養源を含む基質を嫌気用と好気用でそれぞれ作成し、嫌気 16 時間、好気 8 時間で繰り返し培養を行った (温度は 25°C, 振とう速度 140rpm, 嫌気・好気に切り替えるたびに基質を入れ替えた)。なお、10 個の 2 cm 角ポリウレタン製スポンジを微生物の吸着担体として三角フラスコにインストールした。以上の条件で 112 日間の培養を行った。</p> <p>培養終了後に得られた混合培養系の菌叢 (まだ単離は行っていない) を用いて回分的にリン除去試験を 98 日間行った結果、3.5% の塩分濃度条件下で 1mg/L の低濃度から 20mg/L の比較的高濃度までのリン除去 (1, 5, 10, 20mg/L の各条件において実施) が可能であることが明らかとなった。最も高い除去率が得られたのはリン濃度 10mg/L の条件で、85% の除去率</p>	

(様式 9 号)

であった。この実験結果から海水程度の塩分濃度下におけるリン除去が可能であることが明らかとなり、耐塩性 PAOs の存在の可能性が示された。そこで、この菌叢を対象にスクリーニングを行い、2 種類の耐塩性リン蓄積細菌が単離された。分子生物学的な手法 (16S rRNA) によりこれらの菌はそれぞれ TR1 と MA3 であり *Bacillus* sp. と *Thioclava* sp. EIOx9 に高い相同性があることが確認された。形態学的にこれらの菌は桿型で乳白色、グラム陽性でおよそ $6-10\mu\text{m} \times 1.2\mu\text{m}$ のサイズ (TR1)、やや黄色がかった乳白色で表面が滑らかな形状、グラム陰性で $0.9\mu\text{m} \times 0.5\mu\text{m}$ のサイズ (MA3) であることが確認された。

これらの菌の特徴を把握するための実験、すなわち炭素源 (グルコース、スクロース、酢酸ナトリウム)、pH、温度、塩分濃度を変化させた増殖実験 (回分実験) を行った。実験結果から TR1 は pH6-8、温度 25-40°C、塩分濃度 3.5-5%、MA3 は pH6-9、温度 25-35°C、塩分濃度 4% が増殖に適した条件であった。リン除去性能について、これらの菌を単独で、あるいは混合して用いることにより、1mg/L の低濃度から 20mg/L の比較的高濃度までのリン除去が可能かどうかの実験を行った。実験結果から、これらの菌は海水程度以上の塩分耐性が認められ、これまでにない塩分耐性を持つリン蓄積細菌であることが明らかとなった。また、リン濃度が 10mg/L を超える場合には、リン除去能が低下したが、リンの排水基準は日間平均 8mg/L であるため、これを満たすポリッシュアップのためのリン除去法としては有用であると考えられる。

公聴会 (オンラインで開催) には国内外から 34 名の参加があり、活発な質疑応答がなされた。公聴会での主な質問内容は、①リンを細菌が体内に取り込むのはわかったが、それをどのようにプロセス外に取り出すのか、また 2 種類の単離した細菌を組み合わせる理由はその相乗作用を見込んでのことか、②単離した細菌を使った実験ではその濃度がかなり低かったように見受けられるがその理由はなぜか、③細菌のポピュレーションを吸光度で測定しているが、実際の排水処理施設では微生物濃度が高くその方法では測定できないため、実プロセスにどのように適用/コントロールすることを想定しているのか、④混合培養系の実験時に細菌の保持のためにスポンジ担体を用いているが、その場合は微生物濃度を測るのが難しいのではないかと、など多数であった。

以上のいずれの質問に対しても発表者からの確で具体的な回答がなされた。

以上より、本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性ともに非常に優れ、博士 (学術) の学位論文に十分値するものと判断した。

論文内容および審査会、公聴会での質疑に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記の通りである (関連論文: 2 編)。

- 1) Rafitah Hasanah, Tsuyoshi Imai, Ariyo Kanno, Takaya Higuchi, Masahiko Sekine, Koichi Yamamoto, SCREENING MICROORGANISMS FOR PHOSPHORUS REMOVAL IN SALINE WASTEWATER, *Pollution Research*, 40(2), 526-534, 2021.
- 2) Rafitah Hasanah, Tsuyoshi Imai, Effect of abiotic factors on *Bacillus* sp. and *Thioclava* sp. for phosphorus removal from saline wastewater, *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 掲載決定