



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Studies on Morphology, Phylogenetic Analysis and Degradation Abilities of Bacteria Isolated from Activated Sludge( 内容の要旨 )
Author(s)	VASUDEVAN, AJITHKUMAR. P.
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第265号
Issue Date	2002-03-13
Type	博士論文
Version	
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2606">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2606</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本国籍)	VASUDEVAN AJITHKUMAR.P. (インド)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第265号
学位授与年月日	平成14年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学位論文題目	Studies on Morphology, Phylogenetic Analysis and Degradation Abilities of Bacteria Isolated from Activated Sludge (活性汚泥から単離された細菌類の生態学的、系統進化解析及び分解性に関する研究)
審査委員会	主査 信州大学 教授 入江 鏡 三 副査 岐阜大学 教授 高見澤 一 裕 副査 静岡大学 教授 朴 龍 洙 副査 信州大学 教授 柴 田 久 夫

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

活性汚泥法は80年間以上使われ研究されてきた。この研究では活性汚泥微生物の重要な構成員である糸状細菌と4-nonylphenol分解性菌株について取り扱っている。この論文の大部分は新規糸状性 *Bacillus* 属菌株に関する事項からなる。この菌株、NAF001株は合併処理施設の汚泥改質処理槽槽内懸濁水から単離され、filament状栄養細胞に生育する。NAF001株は個々の filament が結合して、極端に長い filament 状栄養細胞を形成する。好気性、内生孢子形成性から *Bacillus* 属菌株と推定された。NAF001株は孢子的他に興味有る耐熱性顆粒、SLRC (spore like resting cell) を形成する。SLRC は出芽して生育し、*Leucothrix* の形成する gonidia 様糸状体を形成する。gonidia 様糸状体から SLRC が放出され出芽し、生育して gonidia 様糸状体を形成する。一方、SLRC から出芽して生育した短い filament は、filament 状栄養細胞と結合すると filament 状栄養細胞に生育する。NAF001株はこの様な複雑な life cycle を有する。NAF001株は、16S rDNA の系統解析、脂肪酸やキノプロファイル、DNA-DNA ハイブリダイゼーションから *Bacillus* 属細菌の新種であることが判り、*Bacillus funiculus* と命名した。この新種のメンバーとして、NAF002株を単離している。NAF002

株には SLRC の形成や出芽は見られない。標準株 NAF001<sup>r</sup> は JCM 11201<sup>r</sup>、CIP 107128<sup>r</sup> に相当する。NAF001 株はエチル、プロピル、ブチルアルコールや SDS を唯一の炭素源として生育できる。NAF001 株にとって、細胞同士の結合が生育のために重要であることが判った。又、*Bacillus* 属細菌で出芽して生育する例は知られていない。

この研究で、第 2 の単離菌株 (INA06 株) が phenol と 4-nonylphenol による活性汚泥からの濃縮化によって単離された。幾つかの 4-nonylphenol 異性体が魚等の雄の雌化を引き起こすと言われていて、活性汚泥細菌による分解性の評価が求められている。INA06 株は *Pseudomonas* 属細菌で、phenol の存在下直鎖型 4-nonylphenol を共代謝的に分解して生育できる。16S rDNA 分析で INA06 株は *P.veronii* と近縁と判明した。この菌株は phenol、p-クレゾール、4-プロピルフェノール、4-アミルフェノール、4-ヘキシルフェノールを唯一の炭素源として利用できる。INA06 株を用いて、4-nonylphenol の水酸化と、引き続く 4-nonylcatechol の o-開裂と m-開裂によるフェノール環の開裂を確認した。此までに、難分解性化合物である 4-nonylphenol の分解として、共代謝経路は知られていない。自然界に phenol 分解性菌株はより多く存在するので、4-nonylphenol の分解について可能性が開かれたと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

活性汚泥法は 1914 年に開発され、80 年以上にわたって各種汚水の生物処理工程に適用されている。一方、活性汚泥からこれまでに数多くの新規な菌株が単離されていて、活性汚泥が細菌の研究対象としても有用であることが知られている。当研究室では 1991 年から効率的、且つ無臭処理に関する活性汚泥細菌相の解明について研究を行って来ている。この研究は活性汚泥から単離した菌株に関する研究から成っている。

第 1 章は活性汚泥から単離された新規糸状性菌株 (NAF001 株) の同定に関する研究から成っている。NAF001 株は *Bacillus* 属細菌で、栄養細胞が孢子を形成して休眠状態をとる。孢子は発芽して 2 個以上の細胞が結合して filament 状に生育し、多数の filament 状栄養細胞が結合して長い糸状体に生育する。NAF001 株は更に、孢子以外の休眠細胞 (SLRC と命名した) を形成し、これらは出芽して短い糸状体を形成して、gonidia 様糸状体に生育する。gonidia 様糸状体は SLRC を放出して出芽し、gonidia 様糸状体に生育する。SLRC から生じた短い糸状体は栄養細胞と結合すると filament 状栄養細胞へと生育する。NAF001 株はこのような複雑な生活環と形態をとる。Ajithkumar さんはまず、NAF001 の生化学的性質の解明、G+C 含量測定、岐阜大学高見沢教授のご指導で 16S rDNA 塩基配列の解明を行い NAF001 株が新規 *Bacillus* 属細菌であることを明らかにしている。更に、16S rDNA 塩基配列から系統的位を明らかにしている。この位置から、幾つかの近縁の *Bacillus* 属菌株との DNA-DNA hybridization を行い、NAF001 株が *Bacillus* 属細菌の新種である事を確認している。更に、quinone 類や脂肪酸の分析を行

って *Bacillus* 属細菌であることを再確認している。又、variant、NAF002 株を単離している。以上の結果に基づいて、NAF001 株を *Bacillus funiculus*<sup>T</sup> NAF001 と命名している。*B.funiculus*<sup>T</sup> NAF001 株は SDS 分解性を示すことを見出している。上記の研究を緻密な計画の基に行っており、評価に値する研究と考えられる。

第2章では、考案した汚濁物分解性の高い下水処理実験プラント活性汚泥から、phenol と 4-nonylphenol による誘導によって、直鎖型 4-nonylphenol 分解性菌株 (INA06 株) の単離に関する研究を記述している。生化学的性質、16S rDNA 塩基配列解析から、INA06 株が *Pseudomonas veronii* に近い菌株であることを明らかにしている。種の確定には至っていない。INA06 株は phenol、p-cresol、4-propylphenol、4-amyphenol、4-hexylphenol を炭素源として利用でき、phenol の存在下直鎖型 4-nonylphenol を共代謝する事を見出している。代謝中間体として 4-nonylcatechol を確認し、酵素を抽出して、o-開裂と m-開裂の両方の開裂の可能性を示唆し、GC-MS から分解代謝物の一部の構造を推定している。4-nonylphenol は外因性内分泌攪乱物質の 1 員と考えられていて、4-nonylphenol 分解菌株は現在 2 株のみ知られている。この研究では 3 株目を発見し、しかも共代謝による分解を起こす例を初めて見出している。これらの研究は高く評価できる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる論文

- 1) A novel filamentous *Bacillus* sp., strain NAF001, forming endospores and budding cells, *Microbiology*, 147, 1415-1423 (2001).
- 2) Proposal of *Bacillus funiculus* sp. nov, for novel filamentous activated sludge isolate, *IJSEM* (2002), 印刷中.