

技術論文

# 統計解析および微生物特性に基づくコークス炉排水中チオシアン酸イオン (SCN<sup>-</sup>) 処理技術の開発

## Development of Thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) Treatment Technology for Coke-Oven Wastewater Based on Statistical Analysis and Microbial Characteristics

堀 込 知 佳\*      福 島 寿 和      山 口 正 裕  
Chika HORIKOMI      Toshikazu FUKUSHIMA      Masahiro YAMAGUCHI  
道 中 敦 子      山 田 果 歩      鎌 形 洋 一  
Atsuko MICHINAKA      Kaho YAMADA      Yoichi KAMAGATA

### 抄 録

コークス炉から生成される排水中の COD (Chemical Oxygen Demand : 化学的酸素要求量) は、活性汚泥法により微生物分解処理されている。しかし、COD 成分の一つであるチオシアン (SCN<sup>-</sup>) の分解に関する基礎的知見は乏しい。そこで本研究ではまず、これまでに開発した統計解析手法により、複雑な微生物群集からチオシアン分解に寄与する重要微生物を同定した。次に単離したチオシアン分解微生物を用いて分解特性を解明した。さらに、これらの知見に基づき、分解促進に寄与する薬剤開発およびその効果検証を行った。これら三段階の開発アプローチにより、チオシアン分解微生物の理解が深化するとともに、処理性能向上に資する薬剤の有効性が示唆された。

### Abstract

Coke-oven wastewater contains chemical oxygen demand (COD), which is treated by microbial degradation using the activated sludge process. However, fundamental knowledge regarding the degradation of thiocyanate (SCN<sup>-</sup>), which is one of the COD components, remains limited. In this study, microorganisms potentially contributing to thiocyanate degradation were first identified from complex microbial communities using a previously developed statistical analysis method. Subsequently, the degradation characteristics were elucidated using thiocyanate-degrading microorganisms isolated from activated sludge. Furthermore, based on these findings, a chemical agent aimed at promoting thiocyanate degradation was developed, and its effectiveness was evaluated. Through this three-stage development approach, understanding of thiocyanate-degrading microorganisms was advanced, and the potential effectiveness of a chemical agent for improving thiocyanate treatment performance was demonstrated.

## 1. 緒 言

製鉄工程において、鉄鉱石中の酸化鉄を還元するために用いられるコークスは、石炭をコークス炉で乾留することにより製造される。この製造工程で発生する排水は“安水”と呼ばれ、一般に、安水スチル(蒸留塔)によるアンモニア除去と活性汚泥法による COD (Chemical Oxygen Demand : 化学的酸素要求量) 成分の除去を組み合わせたプロセスで処理される。代表的なフローの一例を図 1 に示す。活性汚泥法は微生物による有機物の酸化・分解を利用した生物学的な水処理法であり、下水や各種産業排水の処理方法とし

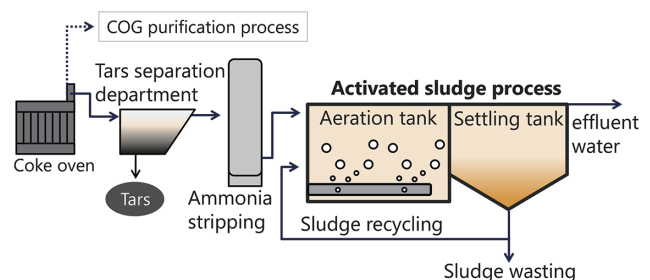


図 1 代表的な安水処理フロー  
Coke oven wastewater treatment process

\* 日鉄環境(株) 技術本部 技術研究室 マネジャー 千葉県木更津市潮浜 2-1-38 〒 292-0838

て長い歴史と実績を持っている。

安水中の主要な COD 成分としてフェノールおよびチオシアン酸イオン (SCN<sup>-</sup>, 以下“SCN”) があるが、これら 2 成分は異なる微生物によって分解される。フェノールは有機物でありその分解菌は従属栄養性でエネルギー獲得効率が高く増殖速度も速いものに対して、SCN は無機物でありその分解菌は独立栄養性の性質を持つものが多い<sup>2,3)</sup>。このため、何らかの要因により処理効率が低下した場合、回復にも時間を要する可能性がある。すなわち、安定した安水処理のためには SCN 分解を担う微生物群の維持や処理活性の安定化が重要である。しかし、安水活性汚泥中で SCN を分解している微生物の種類やその生理的特性は十分に解明されていない。そこで本報では、これまで未知であった SCN 分解に寄与する重要微生物を特定し、その分解特性を解明した。さらに、得られた知見に基づき、SCN 分解微生物による SCN 処理性能の安定化・向上に資する薬剤開発を試みた。

## 2. 本 論

本報では、まず統計解析手法を用いて SCN 分解に寄与しうる微生物を同定した (2.1)。次に安水活性汚泥から SCN 分解微生物を単離し (2.2)、その特性を解明した (2.3)。最後に、SCN 分解微生物の特性に基づき SCN 処理性能向上薬剤を開発した (2.4)。

### 2.1 統計解析手法を用いた SCN 分解関連微生物の同定

活性汚泥中の微生物のうち、主に細菌や古細菌が排水中の COD の分解に寄与している。これらの細菌・古細菌が保持する 16S rRNA 遺伝子<sup>\*1</sup> をターゲットに次世代シーケンシングを行うことで、多様な微生物の種類とその相対存在割合を網羅的に把握できる。しかし、活性汚泥は数千種を超える微生物から構成されるため、その中から SCN 分解に寄与する微生物を特定することは困難である。そこで、これまでに開発した統計手法“Lasso+Bootstrap 法”を用いて、SCN 分解に寄与しうる微生物種の同定を試みた<sup>4,5)</sup>。

ここでは、試薬で調整した人工安水を処理するラボスケールリアクター (2.1.1) と、実機の安水処理プロセス (2.1.2) から得た 2 種類のデータを解析し、SCN 分解に寄与しうる微生物種を同定した。

#### 2.1.1 ラボスケールリアクターを用いた SCN 分解に寄与しうる微生物種の同定

実機データを用いた検討に先立ち、まず、既報<sup>4)</sup>において環境条件を制御して運転したラボスケールリアクターか

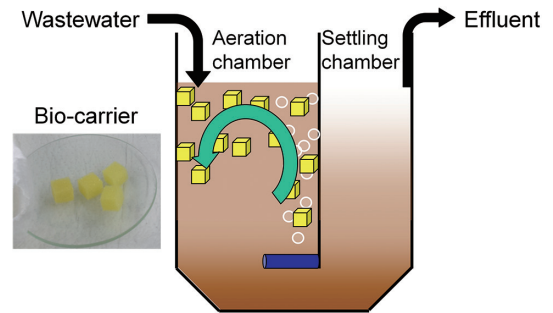


図2 ラボスケールリアクター (流動床担体装置, MBBR) Schematic diagram of laboratory-scale Moving Bed Biofilm Reactor

ら得られた水質と微生物データを解析し SCN 分解に寄与しうる微生物の同定を試みた。

以下にラボスケールリアクターの概要を示す。図2に示す流動床担体装置 (Laboratory-scale Moving Bed Biofilm Reactor, 以下 MBBR) を用いた。運転開始時に、曝気槽の体積比で約 33% のスポンジ担体 (1cm 正立方体) と、実機安水処理プロセスより採取した活性汚泥を微生物の接種源として投入した。実際の安水を模擬し、天然海水:工業用水 = 60:40 となるよう混合した希釈海水に対し COD 源として SCN, チオ硫酸およびフェノールを任意の濃度となるよう添加し、またアンモニア、炭酸塩およびリンを所定濃度で添加した。曝気槽へは酸素の供給とスポンジ担体の旋回のために流量 4L/分 で空気曝気した。水温は 30℃ に制御した。pH は常時測定し、7.5 以上になるよう水酸化ナトリウム溶液を必要に応じて添加した。運転期間中に排水流入速度を意図的に変更し処理負荷を変動させ、微生物群集の構成変化を誘導した。処理水を定期的に採取・分析し、SCN の 1 日当たり処理速度 (mg/L/day) を算出して水質データとして統計解析に供した。微生物データとして、MBBR から定期的に採取したスポンジ担体試料に付着した汚泥を用いた次世代シーケンシング解析により得られた各微生物の相対存在割合を用いた。微生物データ取得の具体的な手順を以下に示す。スポンジ担体に付着した微生物の DNA を Extrap Soil DNA Plus ver.2 を用いて抽出・精製し、得られた DNA から細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子 V4-V5 領域を PCR (Polymerase Chain Reaction) <sup>\*2</sup> で増幅した。増幅産物は MiSeq System (イルミナ社) で塩基配列を決定し、QIIME<sup>6)</sup> <sup>\*3</sup> を用いて 97% 以上の類似性を持つ配列を同一 OTU (Operational Taxonomic Unit) <sup>\*4</sup> とみなし、それらの出現頻度に基づき微生物の相対存在割合 (%) を決定した。SCN 分解に寄与しうる微生物種の同定は、既報<sup>4)</sup>

<sup>\*2</sup> PCR: 狙った遺伝子領域を連鎖的にコピーし、解析に必要な量まで増幅させる手法。

<sup>\*3</sup> QIIME: 多様な微生物が混ざったデータから、エラーの除外、菌の種類 (OTU) の分類、グラフ作成までを一括で行う解析ソフトウェア。

<sup>\*4</sup> OTU: 微生物は見た目では種類を判別できないため、DNA 配列が 97% 以上一致したものを“同じ種類”とみなしてまとめた単位。命名されていない微生物も含まれる。

<sup>\*1</sup> 16S rRNA 遺伝子: すべての細菌が持つ共通の遺伝子。菌の種類によって配列が少しずつ異なるため、世界的な標準として微生物の分類に使用される。

に従い Lasso+Bootstrap 法により実施した。

活性汚泥からは 3752 種の微生物が検出されたが、Lasso+Bootstrap 法により 5 種が同定された。同定した 5 種の微生物を用いた線形回帰モデルによる交差検証法の結果、実測の SCN 処理速度と類似した挙動を示し (図 3)、 $R^2$  値は 0.68 と高く、優れたモデルが構築されたと考えられた。

同定された 5 種はいずれも回帰係数が正であり、SCN 分解に寄与しうる可能性がある。このうち 2 種は、*Chromatiales* 目と *Marinicellales* 目に属する微生物であった。*Chromatiales* 目は紅色硫黄細菌に属し、還元型硫黄化合物をエネルギー源として利用することが知られており、一部の種では SCN の分解が報告されている<sup>7,8)</sup>。*Marinicellales* 目は主に海水環境に生息する系統であり、同様に SCN 分解が報告されている<sup>9)</sup>。これらの結果から生物学的にも妥当と考えられる SCN 分解に寄与しうる微生物が同定できた。

### 2.1.2 実機データを用いた SCN 分解に寄与しうる微生物種の同定

続いて、実機データを解析に用いて SCN 分解に寄与しうる微生物種の同定を行った。統計解析には、水質データとして、活性汚泥槽の流入水と処理水の SCN 濃度から 1 週間当たりの SCN 処理量 (kg/週) を算出した。微生物データとして、同設備の活性汚泥を週 1 回サンプリングし、次世代シーケンシング解析により得られた相対存在割合を用いた。

実機活性汚泥中からは 7780 種の微生物が検出されたが、Lasso+Bootstrap 法により同定された微生物は 17 種だった。線形回帰モデルにおける交差検証法の結果、 $R^2$  値は 0.70 と高く、実測の SCN 処理量の値と類似した変動をしていた (図 4)。同定された微生物のうち、正の回帰係数であった微生物は 10 種で、そのうち 3 種類が *Chromatiales* 目に属していた。このように、前項のラボスケールリアクターを用いた検討と同様に、実機安水処理においても *Chromatiales* 目が SCN 分解に重要な役割を果たしていると考えられた。

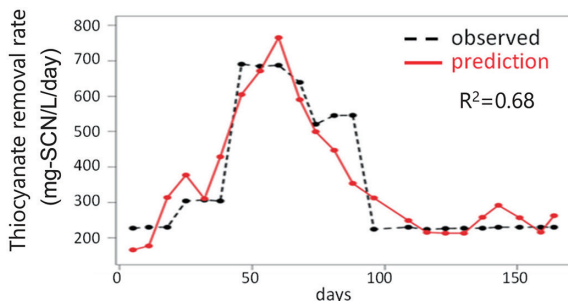


図 3 Lasso+Bootstrap 法により抽出された SCN 分解関連微生物種を用いた線形回帰モデルによる交差検証法の結果 (ラボスケールリアクター)

Results of cross-validation using a linear regression model based on SCN-degradation-related microbial species identified by the Lasso+Bootstrap method (laboratory-scale reactor)

興味深いことに、これまでの複数の報告では安水活性汚泥中の SCN 分解は、主として *Nitrosomonadales* 目 *Thiobacillus* 属の微生物が担っているとされてきた<sup>2)</sup>。しかし、本研究では *Chromatiales* 目に属する異なる微生物による SCN 分解への寄与が示唆され、既報とは異なる新しい知見が得られた。この結果を踏まえ、以降の検討では、当該微生物の特性解明を試みた。

## 2.2 SCN 分解微生物の特性解明

安水処理プロセスにおける SCN 処理性能を向上させるためには、SCN 分解微生物の特性を理解することが不可欠である。そこで本研究では、統計解析により同定された *Chromatiales* 目に属し、SCN 分解能を有する微生物について、単離および生理学的特性の解明を試みた。さらに、得られた単離株が実機安水処理プロセスにどの程度存在しているかについても確認した。

### 2.2.1 SCN 分解微生物の単離とその分類

実機安水処理プロセスから採取した活性汚泥を、高濃度のチオシアン酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、人工海水を含む液体培地 (以下 SCN 液体培地) を用いて培養した。

SCN 分解微生物を集積させるため、培地中の SCN 濃度を定期的に測定し、SCN の分解が確認されるたびにその培地を新しい培地に対して 1/5 量になるよう添加して培養を継続した (集積培養)。また、培地に 6 種の微量金属塩類を追加添加したところ、SCN 分解速度が向上した。その後、微量金属塩類を追加した SCN 液体培地を用いて作製した寒天培地に集積培養した汚泥を播種し、30℃で 7 日間培養した。寒天培地上に形成された単一のコロニーを個別にピックアップし、2.5mL の SCN 液体培地で培養して SCN 分解能を評価した。この結果、得られた分離株のうち、YOB001 および YOB005 株の 2 株が SCN 分解能を有することを確認した。

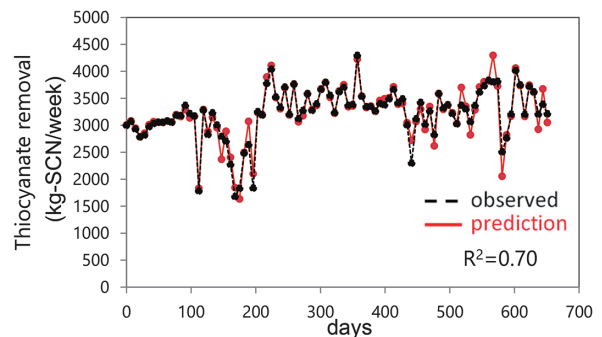


図 4 Lasso+Bootstrap 法により抽出された SCN 分解関連微生物種を用いた線形回帰モデルによる交差検証法の結果 (実安水処理設備)

Results of cross-validation using a linear regression model based on SCN-degradation-related microbial species identified by the Lasso+Bootstrap method (Coke wastewater treatment facilities)

SCN 分解能が確認された 2 株について、16S rRNA 遺伝子解析して種類を同定した。2.1.1 で示した方法で単離株から抽出、精製した DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子 V4-V5 領域の塩基配列を決定した。得られた配列を Greengenes のデータベースと照合して相同性検索 (Blast 検索) を行い、近縁種を予測した。

解析の結果、YOB001 株および YOB005 株はいずれも、2.1.1 項の統計解析において SCN 分解への寄与が示唆された *Chromatiales* 目に属する微生物であることが明らかとなった。

これらの単離株が既報のどの微生物に近縁であるかを明確にするため、系統樹を作成した (図 5)。系統樹は、進化の道筋を家系図のように示したもので、分岐点は共通祖先からの分化を表し (数字は分岐の信頼性)、枝が近接するほど遺伝的に近縁性が強いことを意味する。系統樹には YOB001 株、YOB005 株に加え、既報で安水処理活性汚泥から別途単離した FOKN1 株<sup>10)</sup> (塩基配列がほぼ同一の COW1 株<sup>11)</sup>を含む)、ならびに本研究で次世代シーケンシング解析により安水処理活性汚泥から検出された *Chromatiales* 目に属する微生物 (denovo-番号で表記) を含め、さらに安水処理活性汚泥以外の環境から単離された既報の *Chromatiales* 目の単離株も加えて解析した。その結果、YOB001 株と YOB005 株はいずれも既報の株と同じ *Chromatiales* 目に属するものの、既知株とは異なる系統に位置づけられ、異なる種類の SCN 分解微生物が新たに単離できたことが示された。

2.2.2 実機安水処理プロセスにおける単離株の分布

前項にて、安水処理活性汚泥から *Chromatiales* 目に属する SCN 分解微生物、YOB001 および YOB005 株を取得できた。

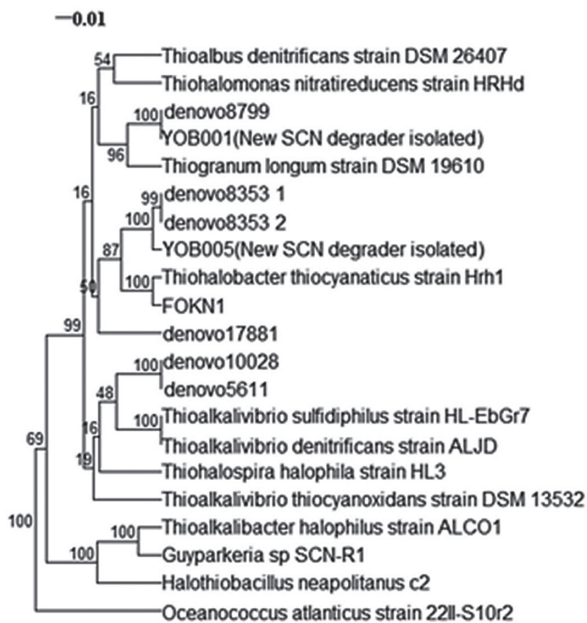


図 5 新規単離株の系統学的位置付け  
Phylogenetic tree of the novel isolated and related species

しかし、単離株が実際の活性汚泥中で優占し、処理を担う種であるとは限らない。微生物の単離株を用いることでの普遍的な課題として、実験室の培養条件下で増殖しやすい特定種が優先的に分離されてしまうことが挙げられる。

その結果、得られた株が実際の排水処理プロセスでは存在割合の低いマイナーな種である場合があり、実際の処理工程における主要な反応や特性を正確に反映できない懸念がある。そこで、今回の単離株が実際の安水処理活性汚泥に優占的に存在しているかどうかを検証するため、実機安水処理プロセス A~G から活性汚泥を採取し、次世代シーケンシング解析により微生物データを取得した。

表 1 に、*Chromatiales* 目に属する微生物群全体および単離株について、それぞれの相対存在割合 (%) を示す。

*Chromatiales* 目はすべての実機安水処理プロセスにおいて 10~35% の割合で検出されており、実機においても主要な SCN 分解微生物群であると考えられた。単離株については、FOKN1 株はいずれからも検出されなかった一方で、本報で単離した YOB001 株、YOB005 株は、7 か所中 4 か所において 1~15% の範囲で検出された。

すなわち、複数の実機安水処理プロセスに共通して優占する *Chromatiales* 目の単離に成功したことになる。今回の単離株と同種の SCN 分解微生物が全国の離れた複数地点で検出されたことは注目に値する。一方で、処理設備 A, C, D では、単離株と同種の菌は検出されなかった。この要因を解明することができれば、実機安水処理において単離株と同種の SCN 分解微生物が SCN 処理を担うための条件を明らかにできる可能性がある。

2.3 全ゲノム解析による単離株の SCN 分解経路の推定

単離株が実機安水処理プロセスでの SCN 分解に寄与する可能性が示唆されたため、YOB001 株の全ゲノム解析により SCN 分解経路を推定した。SCN 分解およびその周辺遺伝子を把握することで、SCN 分解に要求される金属イオンの種類など、分解を促進するための情報が得られる可能性がある。

表 1 実機安水処理プロセスに存在する SCN 分解微生物の存在割合  
Relative abundance of SCN-degrading microorganisms across the seven treatment facilities

Facility	Maximum relative abundance (%)			
	Order <i>Chromatiales</i>	YOB001	YOB005	FOKN1
A	20~25	0	0	0
B	20~25	1~5	10~15	0
C	10~15	0	0	0
D	30~35	0	0	0
E	20~25	1~5	10~15	0
F	15~20	10~15	10~15	0
G	20~25	5~10	0	0

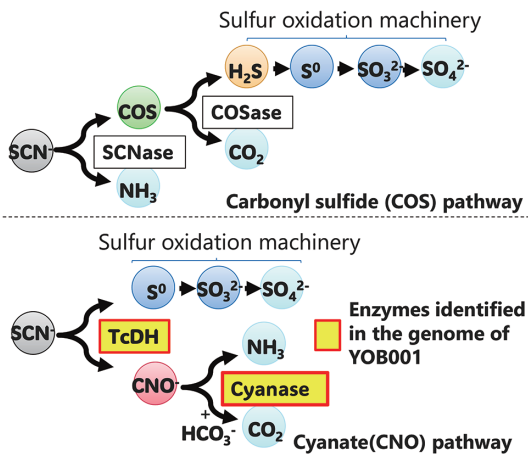


図6 微生物によるSCN分解反応経路と分解酵素  
Microbial thiocyanate (SCN<sup>-</sup>) degradation pathways and enzymes

微生物によるチオシアン酸の分解には、関与する酵素と中間生成物が異なる二つの主要経路が報告されている。既存文献をもとに改編した概略を図6に示す。一つは片山らにより報告がされたカルボニルスルフィド (COS) 経路であり、*Thiobacillus thioparus* がSCNを分解する際に用いる経路である<sup>2,12)</sup>。本経路ではチオシアン酸加水分解酵素 (SCNase) によりSCN<sup>-</sup>がカルボニルスルフィド (COS) とアンモニア (NH<sub>3</sub>) に分解される。生成したCOSは菌体内のCOS加水分解酵素 (COSase) により速やかに加水分解され、二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) と硫化水素 (H<sub>2</sub>S) となる。硫化水素は硫酸化経路へ取り込まれて最終的に硫酸 (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) まで酸化される。

もう一つはSorokinらが、高塩・強アルカリ湖から単離された*Thioalkalivibrio paradoxus*の解析を通じて解明したシアナ酸 (CNO<sup>-</sup>) 経路である<sup>7,8)</sup>。本経路ではSCN<sup>-</sup>がthiocyanate dehydrogenase (TcDH) 酵素によって酸化的に切断されシアナ酸 (CNO<sup>-</sup>) と硫黄 (S<sup>0</sup>) が生成する。生成したシアナ酸は、シアナーゼ (cyanase) 酵素により重炭酸イオンを共基質として使用して加水分解され、二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) とアンモニア (NH<sub>3</sub>) へと変換されると考えられている。

YOB001株の全ゲノム解析では、抽出したゲノムDNAを供試材料とし、次世代シーケンシングにより全遺伝子配列を決定した。得られた配列からcontig配列<sup>\*5</sup>を構築した後、Prokka<sup>\*6</sup>を用いてアノテーション<sup>13)</sup>、\*7を実施し、既報のSCN分解関連酵素配列との同源性検索を行った。その結果、YOB001からはCOS経路に関わる酵素遺伝子は検出されず、TcDHおよびシアナーゼ遺伝子を有することが判明した。これより、YOB001はシアナ酸経路を介してSCNを分解する菌であると考えられる。なお、FOKN1お

\*5 contig (コンティグ) 配列: 断片的に読み取られたDNAデータを、パズルのように連結して復元した配列のかたまり。

\*6 Prokka: アノテーションを自動で行うための代表的なソフトウェア。

\*7 アノテーション: 解読されたDNA配列に対し、データベースと照らし合わせて、名前や機能などの情報を付け加える工程。

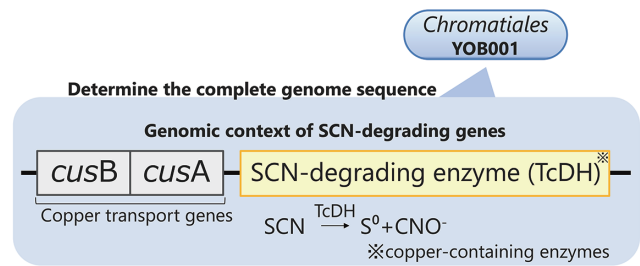


図7 YOB001株のSCN分解酵素遺伝子周辺の構成  
Genomic context gene arrangement of the SCN-degrading enzyme gene

よびCOW1の遺伝子配列は既報論文で公開されており、これら2株についてもシアナ酸経路によるSCN分解が報告されている<sup>11)</sup>。

周辺遺伝子の構成を図7に示す。TcDH分解酵素遺伝子の前方には銅輸送に関与する遺伝子 (CusA・CusB) が存在した。この構成はTsallagovらより報告された、*Chromatiales* 目の*Thiohalobacter thiocyanaticus* HRh1<sup>r</sup>が持つ遺伝子構成と類似している<sup>14)</sup>。TcDH酵素は活性中心に銅を有することが報告されており、YOB001のTcDHも銅を補因子として利用している可能性が示唆された。

## 2.4 SCN処理向上薬剤の開発

微生物の代謝においては、多くの分解酵素が機能発現に特定の金属イオンを補因子として必要とすることが知られている。2.2.1項で述べたSCN分解微生物の集積培養過程では、6種の金属イオン (Zn, Co, Mo, Mn, Cu, Se) の添加によりSCN分解が促進されることが確認された。また、2.3節の全ゲノム解析により得られた単離株の遺伝子情報からは、上述6種にも含まれる銅イオンを必要とする可能性が示唆された。そこで本研究では、SCN分解性能の向上に最も寄与する金属イオンを特定し、SCN処理向上薬剤として有効になり得るかを検証した。

### 2.4.1 単離株を用いたSCN分解に必要な成分の探索

2.2.1項でSCN分解促進効果のあった6種類のうちの金属イオンがSCN分解に重要かを検証した。培養用試験管に2.2.1項で使用したSCN液体培地と集積培養した汚泥を入れ、表2に示す金属元素換算濃度 (mg-Metal/L) となるように金属塩を添加した。金属塩は硫酸亜鉛 (ZnSO<sub>4</sub>)、硫酸コバルト (II) (CoSO<sub>4</sub>)、モリブデン酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>)、塩化マンガン (II) (MnCl<sub>2</sub>)、亜セレン酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>)、硫酸銅 (II) (CuSO<sub>4</sub>) を用いた。これら全6種類添加条件といずれか1種を除いた条件を作成し、それぞれ30℃で5日間好氣的に振とう培養を行った。培養後に液中のSCN濃度を測定し、初期濃度に対するSCN分解割合 (%) を算出した。結果は表2の右欄に示す。

試験条件のうち銅イオンを除外した系 (No.6) が最も低いSCN分解割合を示した。この結果より、SCNの分解に

表2 各微量金属イオンが SCN 分解に与える影響  
Effect of trace metals on SCN degradation

No.	Metal concentration (mg-Metal/L)						SCN degradation rate (%)
	Zn	Co	Mo	Mn	Se	Cu	
1	0	0.003	0.003	0.05	0.001	0.001	76
2	0.005	0	0.003	0.05	0.001	0.001	74
3	0.005	0.003	0	0.05	0.001	0.001	67
4	0.005	0.003	0.003	0	0.001	0.001	76
5	0.005	0.003	0.003	0.05	0	0.001	75
6	0.005	0.003	0.003	0.05	0.001	0	46
7	0.005	0.003	0.003	0.05	0.001	0.001	66

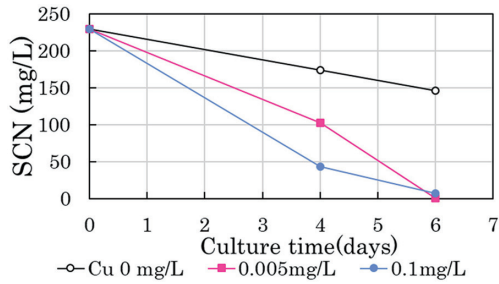


図8 銅イオンによる SCN 分解能力向上効果 (YOB001)  
Effect of copper ion on SCN Degradation by YOB001

重要な金属イオンは銅イオンであることを特定した。

続いて添加する銅イオン濃度が SCN 分解に与える影響を調べた。それぞれ 0, 0.005, 0.1 mg-Cu/L の異なる銅濃度に調整した SCN 液体培地を用い、YOB001 株を接種した。30℃, 6 日間, 好気条件で培養し、その期間における培養液中の SCN 濃度変化を測定した。その結果、銅添加により SCN の分解速度が向上することが明らかとなった (図 8)。

以上の結果から、YOB001 株の遺伝子解析により SCN 分解酵素の補因子として示唆された銅が、SCN 分解に必要なことが培養試験により検証された。

#### 2.4.2 活性汚泥を用いた SCN 処理向上薬剤としての検証

前項のラボ試験により銅の有効性が示されたが、これらの結果は単離株および人工排水という限定的な条件下で得られたものである。実際の安水処理プロセスでは多種多様な微生物が混在する活性汚泥により、組成が複雑な安水が処理されている。そのような実環境においても同様の効果が得られるか、また SCN 処理向上薬剤として実用化可能か検証するため、実機の流入安水と安水活性汚泥を用いた評価を行った。

500 mL の振とうフラスコに、最終的な汚泥濃度が 4000 mg-MLSS (Mixed Liquor Suspended Solids)/L となるように実安水処理設備の安水と活性汚泥を合計 100 mL になるように調製した。これらの試料に銅イオン (塩化第二銅) を 0, 0.1, 0.5, 1 mg-Cu/L の各濃度で添加し、30℃・好気条件下

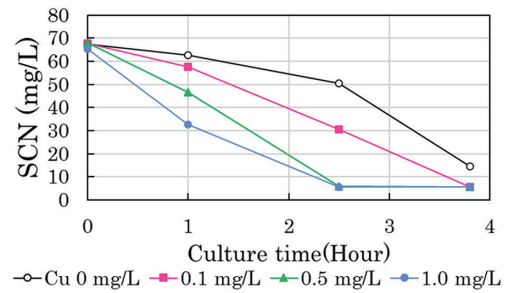


図9 銅イオンによる SCN 分解能力向上効果 (活性汚泥)  
Effect of copper ion addition on SCN degradation by activated sludge

で 3.8 時間振とう培養した。経時的に採取した液中の SCN 濃度を測定した。

この結果、銅イオン濃度が高いほど SCN の分解が促進されたが、0.1 mg-Cu/L の低濃度添加でも分解促進効果を確認することができた (図 9)。以上より、銅イオンの添加は安水処理における活性汚泥の SCN 分解能を向上させる有効な手段であると考えられる。ただし、銅は排水規制の対象となる場合があり、活性汚泥に対する毒性や系内への蓄積が懸念される。一方で、今回の検討結果から、0.1 mg-Cu/L という非常に低濃度でも SCN 処理促進効果が認められたことから、これらの懸念に伴うリスクは比較的小さいと考えられる。本成分については、SCN 処理の安定化を目的とした新規処理薬剤としての利用を検討している<sup>15)</sup>。

この薬剤の有効性は、シアン酸経路の酵素に対する補因子作用と考えられ、Tikhonova らの報告でも、シアン酸経路で SCN を分解する *Chromatiales* 目 *Thioalkalivibrio* の培養液に低濃度の銅を添加すると SCN 分解速度が増加することが示されている<sup>16)</sup>。一方で、統計解析において *Chromatiales* 目以外の微生物も SCN 分解関連微生物として抽出されている。これは、別の SCN 分解微生物が優勢となり得ることを示しており、今回とは異なる分解酵素系で SCN が分解されている場合には、銅イオン添加とは異なる対策が必要になる可能性がある。したがって、薬剤を実機安水処理プロセスへ適用する前には、適用先の活性汚泥に存在する *Chromatiales* 目に属する微生物の存在割合の確認や、汚泥を用いた添加効果の確認をすることが望ましい。

### 3. 結 言

本報では、安水処理における SCN 処理性能の安定化および向上を目的として検討を行った。これまで知見が限られていた SCN 分解に関与する微生物について、まず統計解析により分解に寄与する重要微生物を同定し、次いで単離株を用いてその分解機構および要求成分を明らかにした。さらに、これらの知見に基づき、分解促進に寄与する薬剤の開発およびその効果検証を行った。これら三段階のアプローチにより、安水処理における SCN 分解微生物およびその分解機構に関する理解が深化するとともに、処理

性能向上に資する薬剤の有効性が示唆された。今後も同様のアプローチにより、原理・原則に基づく技術開発を継続し、安定的、さらには高度な安水処理の実現に貢献していきたい。

#### 参考文献

- 1) 兼森信幸 ほか：新日鉄住金技報. (405), 130 (2016)
- 2) Felföldi, T. et al.: *Biologia Futura*. 71, 359 (2020)
- 3) Staib, C. et al.: *Biochemical Engineering Journal*. 34, 122 (2007)
- 4) 福島寿和 ほか：日本製鉄技報. (417), 86 (2021)
- 5) 日本特許出願公告 7299485. 2023年6月28日
- 6) Caporaso, J.G. et al.: *Nature Methods*. 7, 335 (2010)
- 7) Sorokin, D. et al.: *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (1), 528 (2001)
- 8) Berben, T. et al.: *Frontiers in Microbiology*. 8, 254 (2017)
- 9) Shoji, T. et al.: *Process Biochemistry*. 49, 1176 (2014)
- 10) Oshiki, M. et al.: *Microbes and Environments*. 34 (4), 402 (2019)
- 11) Miyazaki, K. et al.: *Microbiology Resource Announcements*. 10 (7), e00013 (2021)
- 12) Katayama, Y. et al.: *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*. 8 (2), 141 (1993)
- 13) Seemann, T.: *Bioinformatics*. 30 (14), 2068 (2014)
- 14) Tsallagov, S. et al.: *Frontiers in Microbiology*. 10, Article 898 (2019)
- 15) 日本特許出願公開 2024-154282. 2024年10月30日
- 16) Tikhonova, T. et al.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 117 (10), 5280 (2020)



堀込知佳 Chika HORIKOMI  
日鉄環境(株)  
技術本部 技術研究室 マネージャー  
千葉県木更津市潮浜2-1-38 〒292-0838



道中敦子 Atsuko MICHINAKA  
日鉄環境(株)  
水ソリューション事業本部 水処理薬品事業部  
薬品技術室 室長 博士(環境学)



福島寿和 Toshikazu FUKUSHIMA  
先端技術研究所 環境基盤研究部  
首席主幹研究員 博士(環境学)



山田果歩 Kaho YAMADA  
先端技術研究所 環境基盤研究部  
環境技術研究室 研究第一課 主任研究員



山口正裕 Masahiro YAMAGUCHI  
日鉄環境(株)  
技術本部 技術研究室 課長



鎌形洋一 Yoichi KAMAGATA  
日鉄環境(株)  
アドバイザー 博士(農学)  
(国立研究開発法人産業技術総合研究所  
招聘研究員)