

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 ラクシミー・ペーガム・シャイラ
(Begum Shaila Luxmy)

本論文は、「Analysis of Microbial Communities and Their Interrelationship in the Membrane Separation Activated Sludge Process (膜分離活性汚泥プロセスにおける微生物群集とその相互関係の解析)」と題し、メンブレンバイオリアクター (MBR) として排水処理に適用されている膜分離活性汚泥 (MSAS: Membrane Separation Activated Sludge) プロセスにおける微生物群集、即ちその構造・役割・相互関係/相互作用、更には異なる環境下での差異を明らかにした研究である。

第1章は「緒論」である。研究の背景を述べた後、本研究の目的と論文の構成を示している。

第2章「文献レビュー」では、膜分離活性汚泥法について、また注目する微生物群について、既往の文献レビューを行っている。

第3章「実験の方法」では、東京都内の下水処理場にパイロットスケールの MBR を4槽設置して実下水を用いて実験を行ったこと、膜は孔径 0.1 μ m の中空糸膜を用いたことなど、実験の概要を述べた後、本研究で用いた2つの分子生物学的手法、in situ 蛍光ハイブリダイゼーション法 (FISH: Fluorescent In Situ Hybridization) と PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (PCR-DGGE: Polymerase Chain Reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 及びシーケンシングによる微生物解析の方法やその他の分析手法についてまとめている。

第4章「膜分離活性汚泥中の細菌群集構造」では、FISH法によって、MBRにおける微生物群集の構造を解析している。用いたオリゴヌクレオチドプローブは、ALF1b (ターゲット: Proteobacteria α)・BET42a (Proteobacteria β)・GAM42a (Proteobacteria γ)・HGC69a (高 G+CDNA のグラム陽性菌)・CF319a (Cytophaga-Flavobacterium) の5種である。また、EUB338 (Eubacteria) プローブも同時に用いた。その結果、EUB プローブとの比より、Proteobacteria の α -、 β -の両サブクラスが MBR において優占している事が明らかになった。また、DGGE法によって MBR と CAS (標準活性汚泥法) との微生物群集をバンドパターンの定量的解析によって比較したところ、MBR における微生物群集は CAS のものとは 0.6 以上の非類似度指標をもって異なることが示された。

第5章「硝化細菌群の解析」では、アンモニア酸化細菌・亜硝酸酸化細菌に特定の様々なオリゴヌクレオチドプローブを用いて、MBR 内の硝化を行う群集の解析を行った。その結果、MBR は *Nitrosomonas* や *Nitrosococcus* などのアンモニア酸化細菌の増殖に非常に適しており *Nitrobacter* も非常に多く観察された。また硝化細菌は様々な形状を見せるクラスターを形成していることを分類して示した。さらに硝化細菌の比率は、小フロックの方が大フロックよりも高くなることを定量的に明らかにした。

第6章「フォーミング原因微生物の解析」では、オリゴヌクレオチドプローブを用いた二重染色を MBR および CAS の泡に適用した。用いたプローブは、*Mycobacterium* プローブ (S-*-Myb-0736-a-A-22) と *Gordona (Nocardia) amarae* プローブ (S-S-G.am-

0192-a-A-18) である。FISH イメージより、CAS のフォーミング微生物 (Myb より同定) の 90%以上が *Gordona amarae* に属している一方、MBR ではその他の分散したフォーミング微生物が観察された。さらに、Eubacteria に対する *Gordona amarae* の比も 3ヶ月間で 35%から 20%に減少した。また DGGE によってフォーミング微生物の群集構造変化がバンドパターンの変化として観察できた。さらに、DGGE バンドを切り出して V3 と V9 部位のシーケンシングを行った。得られたシーケンスは、フォーミング原因微生物として知られる *Mycobacterim*、*Actinomycetes*、*Acinetobacter*、*Planctomyces* と高い相同性を得た。特に、優占的な V9 バンドは *Mycobacterim nonchromogenicum* との 100%類似を得たことなど、フォーミング原因微生物の同定に成功している。

第 7 章「パイロットプラントにおけるフォーミング原因微生物」では、別の下水処理場にある MBR パイロットプラントで発生するフォーミングの形成前後の解析を行った。その結果、泡形成後の試料からは、*Nocardia* spp.、*Microthrix parvicella*、*Nostocoida limicola*、type1851、type0041、type1701、type0675、type021N、type0914 等の形態の様々な糸状菌が観察された。さらに、種特異オリゴヌクレオチドプローブを用いたところ、*Gordona amarae*、type021N、*Sphaerotilus*、*Thiothrix nivea* の存在が確認できた。また、*Microthrix parvicella* が同定できたので、MPA プローブ (*Microthrix parvicella* 特異) と Eub プローブにより、*Microthrix parvicella* 群集の定量を行った。その結果、*Microthrix parvicella* は泡の中で最も優占的であったことが定量的に示された。

第 8 章「MBR 内の捕食生物が細菌やフロックに及ぼす影響」では、捕食者 (原生動物や後生動物の様な高等な生物) と被食者 (主に細菌) の関係を調べたもので、捕食者、特に固着性繊毛類・遊泳性繊毛類の増加に伴い、10 μ m 以下の繊毛類の捕食に適したサイズのフロックならびに 1 μ m 以下の細菌群は大幅に減少した。即ち、MSAS プロセスではこれらの小さな細菌による小さなフロックが極めて良く捕食される状態にあると結論された。

第 9 章「MBR の環境変化と微生物群集と処理成績の変動」では、付着担体導入の効果を調べている。即ち、1つは担体のみを導入し、もう 1つは担体と環形動物 (ミミズ) を導入し、もう 1つは対照として何も導入しなかった。担体のみを導入したリアクターで最も良い炭素・窒素の除去成績を得た。即ち、処理水中の DOC 濃度は最も少なく、NO₃-N 濃度は最も多かった。一方、ミミズを加えたリアクターでは、処理水中の DOC・NH₄-N 共に最も高く (徐々に改善した)、NO₃-N は最も低かった。また、平均フロック径はミミズを投入したリアクターが最も小さかった。さらに DGGE によって、ミミズを投入したリアクターではある種の細菌が時間と共に消滅することが示された。また、MBR における微生物多様性と処理効率に与える pH の影響も調べた。

第 10 章は「結論及び今後の課題」である。

以上要するに、膜分離活性汚泥を対象とし、その微生物群集構造を明らかにするため、分子生物学的手法を駆使し、また高次の微生物生態系も視野にいたった俯瞰的かつ膨大な分析を行ったものであり、今後の膜分離活性汚泥法の工学的設計に極めて貴重な基礎情報を提供している。従って、本論文により得られた知見は都市環境工学の学術の進展に大きく貢献するものである。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。