

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 藤田昌史

本論文は、嫌気好気活性汚泥による生物学的リン除去に着目して、実下水を用いた回分式活性汚泥プロセスの処理実験を行い、脱リン機能の発現や低下過程における活性汚泥中の微生物群集構造変化を解析し、ポリリン酸蓄積細菌の指標をキノプロファイルや PCR-DGGE バンドから検索を行った研究論文である。また、生物学的リン除去活性の遷移過程の実験結果に対して、IWA 活性汚泥モデル (ASM2d) を基礎にした回分式活性汚泥処理モデルを適用することにより、モデルの有効性や限界点及び標準的なモデル係数値の妥当性も検討している。論文は、8 章より構成されている。

第 1 章では、研究の背景と目的、および論文構成を述べている。

第 2 章では、回分式活性汚泥法やそのモデル化、活性汚泥による生物学的リン除去に関連した従来の基礎的な知見や、活性汚泥中の微生物群集の解析手法に関する文献調査結果を整理している。そして、主にキノプロファイル法や PCR-DGGE 法による解析結果例とその評価方法について詳説するとともに、IWA ASM2d の構造や特長を説明しながら、回分式処理に適用する際に留意すべき点を整理している。

第 3 章では、活性汚泥の生物学的リン除去活性の評価方法と活性データに基づく動力学的なポリリン酸蓄積細菌濃度推定手法を説明している。また、本研究で適用した微生物群集解析手法であるキノプロファイル法や PCR-DGGE 法の分析手順を整理している。さらに、活性汚泥処理モデル計算における入力データとして必須となる流入下水の組成濃度を酸素消費速度データから推定する方法の手順を示している。

第 4 章では、PCR-DGGE 法により得られたバンド強度データを統計的に解析するためのデータ処理について検討を行っている。まず、ノイズバンドを判定する閾値の検討を行い、取り出されたバンドデータを用いた多次元尺度構成法やクラスター解析のあり方を論じている。さらに、時系列バンドデータと動力学的に推定されたポリリン酸蓄積細菌濃度の変化との関連づけを行うために、バンド強度を標準化することを提案している。また、本研究では適用していないものの、PCR-DGGE データとキノプロファイルデータを統合して重回帰分析することにより、定量性の低いバンド強度データに微生物量の情報を補完的に付加して、バンドに対応する微生物種の存在量を統計学的に推定する手法を理論的に検討している。

第 5 章では、標準活性汚泥を種汚泥として、酢酸を添加した実下水を用いて嫌気好気運転処理することで生物学的リン除去機能を発現させるスタートアップ実験、その後生物学的リン除去が安定した状態から酢酸添加をストップしたり、硝酸塩を強制添加してリン除去活性の低下を追跡する実験を行った結果をまとめている。実験期間内の処理水質特性だけでなく、汚泥のリン放出能から推定したポリリン酸蓄積細菌濃度、汚泥のリン含有量、キノプロファイル変化を詳細に調べている。特に、実下水の流入水質が日々変化することから、対照系を含み、リン除去活性の影響因子を変化させた同時 4 系列処理実験を行ったケースでは、38 日間にわたる

処理特性データを詳細に入手して、リン除去活性の変化を流入水質データや運転条件との相互関係から考察している。

経時的なキノプロファイルや DGGE バンドパターン変化をもとに非類似度を計算したり、多次元尺度構成法によって経時的な微生物群集構造変化を定量的に評価している。その結果、わずかに群集構造が変化しているものの、すべての実験系において明確な群集組成変化が起こったとは判断できないレベルであると評価している。

第6章では、複雑な混合培養系である活性汚泥中に存在するポリリン酸蓄積細菌の指標となりうるキノ種や DGGE バンドを検索することを試みている。まず、処理実験における生物学的リン除去活性の変化過程とキノプロファイルの変化過程を相互比較することにより、リン除去活性関連するリン除去速度の増加と連動して増加するキノ種として MK-7 と MK-8 (H4) を見出している（ここで、 n 個のイソプレン側鎖を持つメナキノンを MK- n と表現、側鎖上の水素飽和度 x の違いにより、MK- n (H x)）。また、シヨ糖密度溶液を利用した汚泥の比重の違いを利用して、高リン含有汚泥を分画する手法を嫌気好気活性汚泥に適用して、同様に高リン含有汚泥が MK-7 と MK-8 (H4) を含むことを確認した。しかしながら、生物学的リン除去を安定させたのち、除去能を低下させた実験では、これらのキノ種の減少傾向を明確には捉えることができなかと判断している。

ポリリン酸蓄積細菌推定濃度の変化と DGGE バンド強度率変化との類似性を評価するためにユークリッド距離を求めたところ、二つの酢酸添加実験系において4つのバンドが共通して当該細菌濃度の変化と類似性が高いと認めることができた。そのうち、ひとつは最近酢酸培養系で生物学的リン除去機能を有する微生物としてほぼ同定されてきている *Rhodocyclus spp.* とされるバンドであった。しかし、このバンドはもう一つのバンドとともに、酢酸添加停止系や硝酸塩強制添加系でのポリリン酸蓄積細菌推定濃度の変化とは類似性が見られなかった。同時運転4系列で共通して類似性のある一バンドを見つけている。このバンドの塩基配列は未分析であるものの、リン除去機能と類似性のある数バンドを発見した点は非常に評価できる。

第7章では、人工下水と都市実下水による嫌気好気処理実験データを対象に、IWA ASM2d を基礎とした回分処理モデルでのリン除去活性の再現性について検討を行なっている。そして、人工下水組成に合わせた動力学定数を与えることで、非正常な処理過程をかなりの精度で再現できることを示した。同時に、実下水の実験に関しては ASM2d で標準値として提案されている動力学定数では、微生物の死滅プロセスや懸濁性有機物の加水分解プロセスの再現性が低いために、ポリリン酸蓄積細菌の動態を表現することができず、その結果として生物学的なリン除去特性が再現できないことを示唆している。

第8章では、上記の研究成果から導かれる結論に加え、本研究の最終的な目標である微生物群集解析データと活性汚泥モデルとをリンクさせ、微生物組成の動態も定量的に評価するための今後の課題や展望が述べられている。

以上の成果は、嫌気好気回分式活性汚泥の生物学的脱リン機能に着目して、微生物群集構造を解析する手法としてキノプロファイル法と PCR-DGGE 法を組み合わせ適用し、その手法の有効性と限界を定量的に評価している。そして、群集解析データの数学的な評価方法を検討しただけでなく、微生物動態を再現可能な処理モデル開発を目指す上で貴重な知見を提供しており、都市環境工学の学術の進展に大きく寄与するものである。

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。