

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Microbial community analysis by PCR-DGGE and FISH methods in enhanced biological phosphorus removal processes treating domestic sewage and synthetic wastewater  
(都市下水および合成下水を処理する生物学的リン除去活性汚泥の  
PCR-DGGE法とFISH法を用いた微生物群集解析)

氏 名 李 美 京

窒素・リンなどの栄養塩の流入による閉鎖水域の富栄養化が問題となっており、下水処理における栄養塩除去の必要性が叫ばれている。しかし、栄養塩除去に広く使用されている生物学的リン除去プロセス (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) における効率的な運転管理手法や影響因子、さらにリン除去に関与する微生物群集に関しては依然として明らかになっていない部分が多い。安定な生物学的リン除去を行うためには、処理プロセス内における様々な影響因子とその因子による微生物群集構造の変化に関する研究が必要である。

従来の生物学的リン除去に関する研究は、酢酸あるいはプロピオン酸などの人工下水を基質とした系におけるものが主であり、実験室レベルの人工下水における生物学的リン除去機構はある程度明らかになってきているが、遅分解基質である懸濁性有機物を多く含んでいる実下水におけるリン除去特性については十分に検討されていない。また、リン除去に寄与する微生物群集の解析という点では、分子生物学的手法の開発・発展によりここ数年で新たな知見が蓄積されてきているが、進められてきた研究の多くが人工下水を用いた実験系における微生物群集を対象としており、実下水を用いてその群集構造とリン除去能の変化を調べた例は少ない。近年、分子生物学的手法を用いることによって、*Rhodocyclus* 近縁種が PAO (polyphosphate accumulating organism) として重要な細菌であるという知見が多く得られつつある。しかしながら、様々な有機物を含む実下水を処理する場合に EBPR を担う微生物として *Rhodocyclus* 近縁種が本当に重要であると統一的

に解釈する見解はいまだにない。また、PAO は単一細菌種ではなく複数の種が機能していることも指摘され、その可能性も高いと考えられる。今までの実験が酢酸を使った実験系での知見が多く、また、リン蓄積細菌がポリリン酸を蓄積する際に酢酸が好まれると考えられているが、実際の下水には様々な溶存性有機物や懸濁性有機物(POM)が含まれており、実下水を処理する場合のEBPR における微生物群集構造に関する知見が不足している。

そこで本研究では酢酸と実下水を処理する EBPR におけるリン除去性能および重要な役割を担う微生物及び微生物群集構造の変化を多角的に解析するために、PCR-DGGE 法などの複数の分子生物学的手法を組み合わせる微生物群集を解析した。さらに、リン蓄積細菌として報告されている *Rhodocyclus* 近縁種の探索を行った。

恒温実験室 (20°Cの条件) において、炭素源としてそれぞれ酢酸 (Run-A)、都市下水 (Run-S)を投入してリン除去が安定した活性汚泥処理系を構築した。そして、その時点を初日として、Run-A と Run-S に加えて、都市下水を投入した系の活性汚泥を分取して、都市下水に下水由来の懸濁性有機物(POM)を徐々に添加した処理系 (Run-SP)を 63 日間にわたり運転した。なお、Run-SP に投与した POM は、1 $\mu$ m ナイロンシートを用いて下水処理場の最初沈殿池越流水から回収したものである。

それぞれ異なる有機物を処理する 3 系列の EBPR について、リン摂取やリン含有率などのリン除去性能の評価を行った。酢酸を炭素源とする Run-A は実験期間を通じて安定してリン除去活性が見られた。下水のみの Run-S および下水に POM を添加した Run-SP も、安定なリン除去が見られた。Run-S と Run-SP においては、例外的に 42 日目のみリン吐き出しと取り込みが観察されなかったが、その原因としては、年末年始で平常より流入下水の有機物濃度が低くさらに前日に大雨が降ったために、非常に希釈された下水が流入した結果、一時的に 1 サイクルのリン放出や取り込みが観察されなかったという可能性が考えられた。PAO が摂取可能な有機物が一時的に足りなかったためにリンを吐き出さなかったと考えられる。リアクター運転期間中の汚泥の平均リン含有率は Run-A が 8.3%、Run-S は 5.4%であり、Run-SP は Phase I-5.6%、Phase II-4.8%、Phase III-3.2% である。このようにどの Run においても実験終了時 (63 日目) にはほぼ安定したリン除去能を示していたと考えられる。

3 系列の汚泥サンプルについて視覚的に微生物群集構造を解析するため、グループ特異的なプローブおよび PAOmix プローブ (*Rhodocyclus* 近縁種の検出用)を用いて FISH 法による微生物群集構造解析を行った。そして、高濃度 DAPI によるポリリン酸染色および FISH 法を組み合わせることで、新たな PAO の探索を行った。

系内に優占化した微生物群を調べるために、細菌全体を蛍光染色できる EUBmix プローブと各微生物群 ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - *Proteobacteria*, CF, HGC グループ) を蛍光染色できるプローブを組み合わせる FISH 法を用いて

群集解析を実施した。その結果、3系列とも *Proteobacteria*  $\beta$ 群が最も優占した結果が観察された。次に、近年 EBPR を担う有力な PAO とされてきている *Rhodocyclus* 近縁種が Run-A は平均 60%であり、Run-S および Run-SP にも平均 10%以上優占していることが視覚的に確認できた。高濃度 DAPI 染色を用いて細胞内のポリリン酸グラニューールを染色した結果、Run-A で検出された *Rhodocyclus* 近縁種はほとんどポリリン酸グラニューールを蓄積された細菌であることが確認された。しかし、一方で Run-S および Run-SP においては *Rhodocyclus* 近縁種がポリリン酸を蓄積していることが観察されるとともに、PAOmix プローブでは染色されず高濃度 DAPI 染色で染色された他の細菌が存在することが明らかとなった。これは、*Rhodocyclus* 近縁種だけでなく、その他の細菌もリン除去を担っている可能性が示唆するものと判断した。そこで、さらに各グループに特異的なプローブを用いた FISH 法および高濃度 DAPI 染色を用いて新たな PAO の探索を行った。Run-S においては HGC 群で蛍光を発し、Run-SP においては *Proteobacteria*  $\gamma$ 群で蛍光を発し、また、ポリリン酸を蓄積している細菌が存在することが確認された。

PCR-DGGE および cloning sequencing 法を用いて 3 系列の汚泥サンプルから検出されたバンドの 16S rDNA の V3 領域を含む約 200bp の塩基配列解読を行った。Run-A で検出された 11 本のバンド中で特にバンド A-2 は *Rhodocyclus* 近縁種の塩基配列に最も類似していた。Run-S で検出された 22 個バンドの中で塩基配列解読に成功したものは 15 本であった。バンド S-3、S-7 および S-9 は *Proteobacteria*  $\beta$ 群に属する菌であり、バンド S-5、S-6 および S-16 は *Proteobacteria*  $\delta$ 群に属する菌であった。バンド S-10 および S-14 は *Proteobacteria*  $\gamma$ 群に属する菌であり、バンド S-12 および S-22 は HGC 群に属することが分かった。Run-SP で検出された 21 本のバンドの中で塩基配列解読に成功したものは 12 本であった。バンド SP-3、SP-7、SP-9、SP-11 および SP-14 は *Proteobacteria*  $\beta$ 群に属する菌であり、バンド SP-18 は *Proteobacteria*  $\gamma$ 群に属する菌で、SP-13 および SP-15 は HGC に属する菌であった。Run-S および Run-SP で検出された DNA バンドの中で塩基配列解析に成功したバンドには *Rhodocyclus* 近縁種は見つからなかった。しかし、FISH を用いて微生物群集構造を解析した結果、Run-S および Run-SP には *Rhodocyclus* 近縁種が平均 10%以上優占していることが視覚的に確認できた。

3 系列の汚泥サンプルの FISH 結果から、ポリリン酸グラニューールを蓄積された *Rhodocyclus* 近縁種、HGC 群および *Proteobacteria*  $\gamma$ 群に属する近縁種を探すため、3 系列の 63 日目の汚泥サンプルから抽出した rDNA を PCR-cloning-sequencing 法により解析した。さらに、PCR-DGGE 法を用いて検出されたバンドの塩基配列解読に成功したバンドのうち、*Rhodocyclus* 近縁種、HGC 群および *Proteobacteria*  $\gamma$ 群に属する塩基配列を最も近い塩基配列をもつバンド(A-2,S-12, S-22 および SP-18) に注目した。Cloning 結果、Run-A から 40clone、Run-S から 105clone、Run-SP から 155clone を採取して、約 200bp まで partial DNA sequence を行った。解読した塩基配列によって clone library を作成した。

酢酸基質で運転した Run-A では非常にシンプルなグループの clone library が作成できて、*Proteobacteria*  $\gamma$ 群および *Proteobacteria*  $\beta$ 群が優占した菌群であり、リン蓄積細菌の一つで報告された *Rhodocyclus* 近縁種は 3clone が回収された。都市下水を流入した Run-S の clone library では *Proteobacteria*  $\gamma$ 群および *Proteobacteria*  $\beta$ 群が優占した菌群であり、*Proteobacteria*  $\beta$ 群に属する clone の中で *Rhodocyclus* 近縁種に最も近い塩基配列を持つ 3clone が回収された。しかし、HGC 群に近縁している clone は出来なかった。Run-SP の clone library では Cytophagaes 群、*Proteobacteria*  $\gamma$ 群、*Proteobacteria*  $\beta$ 群が優占した菌群であり、*Proteobacteria*  $\gamma$ 群に属するバンド SP-18 と同じ塩基配列を持つ clone が回収された。さらに、*Rhodocyclus* 近縁種と最も近い塩基配列を持つ 1clone が回収された。

Run-SP の FISH 結果からポリリン酸グラニュールを蓄積した *Proteobacteria*  $\gamma$ 群に着目して、*Proteobacteria*  $\gamma$ 群に属するバンド SP-18 および clone library 情報から RNA プローブを設計し FISH 法を用いて新規 PAO を定量的・空間的に把握した。

採集した clone からバンド SP-18 の塩基配列と最も近い塩基配列を持つ 2clone を選んだ。ARB プログラムを用いてバンド SP-18 を目的種とする PAO と想定される新たな *Proteobacteria*  $\gamma$ 群に特異的に反応するプローブ (GAM61, 181, 805 and 805b) を設計した。確実にバンド SP-18 と類似のシーケンスを有する微生物を安定的に検出するために、4 つのプローブを混合 (GAMPAOmix) して用いて、63 日目の Run-SP サンプルの PAO と想定される新規の *Proteobacteria*  $\gamma$ 群を検出した結果、全菌に対して 13±14 %の菌が検出された。さらに、GAMPAOmix プローブに検出される菌群がリン蓄積しているかどうかを高濃度 DAPI 染色で確認した。その結果、すべてではないものの、一部この新規 *Proteobacteria*  $\gamma$ 群がポリリン酸を蓄積していることが確認できた。GAMPAOmix プローブにより検出される菌の中にポリリン酸を蓄積する能力を持つものが観察されたことから、様々な有機物を含む実下水を処理する EBPR の活性汚泥には、*Rhodocyclus* 近縁種とは全く異なる新規の PAO が *Proteobacteria*  $\gamma$ 群に存在しており、その一つとして GAMPAOmix プローブにより検出される可能性が高いと考えられる。しかしながら、今回設計した GAMPAOmix プローブのこの新規 PAO 検出の選択性は必ずしも高くないため、今後さらに 2clone(SP-C47 および SP-C122)の他に *Proteobacteria*  $\gamma$ 群に属する clone (SP-18 と同じ塩基配列を持つ 18clone)に注目して詳細な検討する必要がある。

本研究では、都市下水を処理する生物学的リン除去プロセス (EBPR) には *Rhodocyclus* 近縁種だけでなく、その他の細菌 (HGC グループおよび *Proteobacteria*  $\gamma$ 群) もリン除去を担っている結果を得た。そこで、二つのグループに注目して full scale EBPR のリン蓄積細菌および微生物群集を深く解析する必要がある。さらに、本研究で設計した GAMPAOmix を用いて full scale EBPR の汚泥サンプルを調べる必要がある。