

審査の結果の要旨

氏名 李 美京

本論文は、酢酸と実下水を処理する嫌気好気活性汚泥プロセスにおけるリン除去性能および重要な役割を担う微生物の群集構造変化を多角的に解析するために、複数の分子生物学的分析手法(PCR-DGGE, Cloning Sequencing および FISH)を用いた研究を行ったものである。そして、リン蓄積細菌として報告されている *RhodocycIus* 近縁種が都市下水を処理する活性汚泥中に存在するかどうかの確認と新規のリン酸蓄積細菌の探索に関する研究成果をまとめている。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、および論文の構成を述べている。

第2章では、既存の研究として、嫌気好気活性汚泥プロセスにおけるリン除去性能の概説、活性汚泥中の微生物群集構造解析に用いられてきている種々な分子生物学的手法、過去のリン蓄積細菌の探索結果、さらには下水中の有機物組成やその特性についての内容を整理している。

第3章では、嫌気好気回分式活性汚泥法の実験装置及びその運転条件、実験装置への流入原水について説明している。また、水質と汚泥の分析法、活性汚泥の微生物群集構造を解析する分子生物学的手法の手順及びポリリン酸染色手順などを記述している。

第4章では、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 20°Cの条件において構築した結果と、Run-S 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)を運転した実験結果を示している。なお、Run-SP に投与した POM は、1 μ m ナイロンシートを用いて最初沈殿池越流水から回収したものである。そして、Run-A だけでなく、都市下水を処理する Run-S でも安定なリン除去が見られたこと、さらに POM 添加率を増加させた Run-SP でも実験終了時 (63 日目) まで安定したリン除去能を示したことを報告している。

第5章では、3つの異なる流入水を処理する生物学的リン除去 (EBPR) 活性汚泥の微生物群集構造を解析するため、各微生物群 (α -、 β -、 γ -Proteobacteria, CF, HGC グループ) に特異的なプローブや *RhodocycIus* 近縁種検出用の PAOmix プローブを用いた FISH 法の適用と、FISH 法と併せて高濃度 DAPI によるポリリン酸グラニューールの同時染色を行っている。その結果、3系列とも β -Proteobacteria 群が最も優占していること、Run-A では PAOmix プローブで検出される *RhodocycIus* 近縁種のほとんどはポリリン酸の蓄積が見られた一方で、Run-S および Run-SP においては *RhodocycIus* 近縁種だけでなく、PAOmix プローブでは染色されずポリリン酸を蓄積している細菌が存在すること、を明らかにしている。そこで、各微生物群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 の探索を行ったところ、Run-S においては HGC 群で、Run-SP においては γ -Proteobacteria 群で、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。

第6章では、処理が安定した Run-A, Run-S, Run-SP の3系列における DGGE バンド数は、それぞれ 11, 19, 16 本となり、検出バンドの泳動位置から判断して、3系列に共通のバンドが3本、Run-A と Run-S のみの共通バンドが1本、Run-A と Run-SP のみの共通バンドが1本、Run-S および Run-SP のみの共通バンドは11本であったことを示している。この結果から酢酸を処理する系列は都市下水を処理する系列と大きく異なる微生物群集構造を持つこと、都市下水に POM を添加することによって、微生物群集構造の大きな変化は見られないことを報告している。

検出されたバンドの 16S rDNA の V3 領域の塩基配列解析を行ったところ、Run-S および Run-SP で塩基配列解析に成功したバンドには *Rhodocycylus* 近縁種は見つからなかった。また、共通バンドの解析塩基配列を比較した結果、必ずしも同一の塩基配列が得られるとは限らないケースもあり、バンド位置のみに基づいて微生物群集構造解析を行うことに留意が必要であることが確認された。

第7章では、Run-SP で検出された γ -Proteobacteria に属する新規 PAO と考えられる細菌を定量的に把握するために、FISH プローブの作成を行っている。Run-SP サンプルから採集した 155clone に 357fGC および 518r プライマーを用いた PCR-DGGE を適用することで、DGGE で唯一 γ -Proteobacteria に属するバンド SP-18 に対応する clone を見出し、約 1.5kbp の塩基配列を解析した。そして、ARB プログラムを用いて SP-18 に対応する特異的な塩基配列を4種類設計し、バンド SP-18 に相当する微生物を確実に検出するためにこの4種類を混合したプローブ (GAMPA0mix) を作成した。そのプローブの特異性を検討するために、Ribosomal Database Project II のプローブチェックを行うとともに、GAMPA0mix プローブでは検出されないはずの純菌を用いてホルムアルデヒド濃度条件を段階的に変えて negative control を行った。その結果、低濃度では非特異的結合が観察されたため、実際の活性汚泥への適用では 35% の濃度条件を採用する必要があることを明らかにしている。

Run-SP 試料に対して、GAMPA0mix プローブを用いた FISH 法を適用した結果、全菌に対して 13-14% の菌が検出された。さらに、高濃度 DAPI で同時染色した結果、このプローブにより検出される細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、都市下水を処理する EBPR 活性汚泥には、*Rhodocycylus* 近縁種とは全く異なる新規の PAO が γ -Proteobacteria に存在しており、特異性は高くないものの GAMPA0mix プローブにより検出できることを示している。

第8章では、上記の研究成果から導かれる結論と今後の課題や展望が述べられている。

以上の成果は、酢酸という人工下水だけではなく、実際の都市下水を用いた処理実験を長期間行い、PCR-DGGE 法、Cloning Sequencing および FISH 法、さらには高濃度 DAPI 法を用いて活性汚泥中の微生物群集構造を比較したものである。そして、従来 PAO として報告されている *Rhodocycylus* 近縁種以外に新規の PAO が存在する可能性を示すだけでなく、新規 PAO を検出する DNA プローブの試作・適用を行って検出に成功している点は高く評価できる。これらの成果は、実下水処理場において生物学的脱リンに寄与する細菌群を調べたり、生物学的リン除去機能を評価したり、さらには安定した処理運転法を検討する上で非常に有用なデータや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。