

論文審査の結果の要旨

氏名 新田見 匡

本論文は、排水からの生物学的窒素除去プロセスに関する基礎研究として位置づけられる。排水処理においてもっとも広く利用されている活性汚泥法では、好気条件下でのアンモニアの硝酸への酸化（硝化）と、嫌気条件下での硝酸の窒素ガスへの還元（脱窒）という微生物による酸化還元反応を利用して、排水中の窒素分を大気中へと除去する。その中の脱窒過程に関与する細菌群（脱窒細菌）の群集構造を、近年発展の著しい分子生物学的な手法を用いて解析したものである。

本論文は8章からなる。第1章は「はじめに」であり、本研究の背景を述べている。

第2章は「既往の研究」であり、本研究の前提となる既存の知見についての文献レビューの結果をまとめている。とくに、窒素除去に関わる遺伝子のうち本研究で対象とした亜硝酸還元酵素（*nir*）遺伝子に関する既存の情報を整理し、さらに、細菌群集構造を解析するための分子生物学的手法について本研究で用いたPCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法、および、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を中心に現状を解説している。

第3章は「研究の目的と論文の構成」であり、第1、2章を受けて、活性汚泥中の脱窒細菌群集構造の解析のために *nir* 遺伝子を標的とした手法を確立し、群集構造と活性汚泥プロセスの運転条件との関連を考察するという本研究の目的を記述し、また論文の構成を説明している。

第4章は「脱窒細菌群集解析手法の検討」である。*Nir* 遺伝子には、機能は同じだが構造の全く異なる2種類の遺伝子、*nirK* と *nirS* が存在する。本研究では、*nirS* 遺伝子に対してはDGGE法とT-RFLP法、*nirK* 遺伝子に対しては、T-RFLP法を用いた群集解析手法を新たに確立している。

第5章は「微生物群集解析の実験手法」であり、具体的な実験操作手順について記述している。

第6章は「製鉄所廃水（安水）処理実験プラントの脱窒細菌群集解析」と題し、第4章で確立した手法を用いて、製鉄所排水(安水)を処理する活性汚泥中の脱窒細菌群集の解析をおこなった結果を記述している。ある製鉄所内で運転されていた硝化脱窒型活性汚泥法のパイロットプラントおよび室内実験プラントを対象にして、安水中の特殊な基質(フェノール、チオシアン、チオ硫酸)と各 *nir* 遺伝子との因果関係を示すための解析をおこなった。その結果、脱窒条件下でのみフェノールを分解する単離株について報告のある

Azoarcus, *Thauera* 属の *nirS* 遺伝子に近縁な配列がパイロットプラントにおいて存在することを示した。また、室内プラントの解析では、各基質の添加条件に対応した各 *nir* 遺伝子の変動を検出し、基質と遺伝子の因果関係を定性的に示す詳細な結果をまとめることができた。

第7章は「実験室規模脱窒リアクターの脱窒群集最近群集解析」と題し、酢酸を主な電子供与体とした人工下水を処理する実験室規模の脱窒リアクターの活性汚泥群集解析をおこなった結果を述べている。とくに亜硝酸を電子受容体とする脱窒をおこなう群集の特性を解析した。*nirS* 遺伝子解析において、DGGE 法と T-RFLP 法を併用した結果、T-RFLP 法は系統樹のクラスター単位での解析を行う際に有用であり、DGGE 法はクラスター内の個々の遺伝子解析において有用である結果が得られた。一方 *nirK* 遺伝子解析においては、T-RFLP 法による遺伝子単位での解析が可能であった。また 16SrDNA と *nir* 遺伝子の解析結果からは、*nir* の解析のほうが、群集構造の細部を解析できる可能性を示唆している。さらに、16SrDNA および *nir* 遺伝子の挙動を比較解析した結果として、NO₂-利用能に優れた細菌由来の遺伝子の候補として、多数の配列情報を得ることができた。またその一部は *Thauera*, *Flavobacteria*, *Aquaspirillum* の細菌の遺伝子に近縁であることも分かった。

第8章は「総括」であり、以上の研究から得られた成果をまとめ、今後の展望について記している。

以上、本論文は、これまで系統的な研究の少なかった脱窒細菌の群集構造解析に新たな手法を提案するとともに、製鉄所排水処理プロセスの解析や亜硝酸型の脱窒細菌群集の特性評価にその手法を応用して有用性を示した。その成果は、環境浄化技術としての生物学的窒素除去プロセスの発展と体系化に重要な基礎を与えており、環境学の発展に大きく寄与するものである。

なお、本論文の第4, 6, 7章は、味埜俊、佐藤弘泰、栗栖太、三木理、伊藤公夫、山崎恵美との共同研究であるが、それぞれの分担は明確に定義されており、脱窒細菌群集解析に関わる本論文の内容については基本的に論文提出者が実施し、分析、検証をおこなったものである。論文提出者の寄与は十分であると判断する。

したがって、博士（環境学）の学位を授与できると認める。