

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 Lympiyakorn Tawan (りんぴやくん たわん)

本論文は、活性汚泥法による都市下水の処理に際し、窒素除去能を高めることを目的に、活性汚泥中のアンモニア酸化細菌(AOB)群に着目し、8カ所12系列の下水処理場における処理機能と優占 AOB 群の PCR-DGGE (遺伝子増幅変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) 解析、次いで塩基配列を活用した AOB 群の種特異的な計数法の開発、さらに開発した計数法を用いて活性汚泥中の AOB 群の詳細な群集構造と浄化機能の解析、最後にケモスタット連続培養装置を用いて AOB 群集構造に及ぼすアンモニアおよび亜硝酸の影響について検討している。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、及び論文構成について述べている。

第2章では、窒素化合物の代謝、硝化反応の機構についてのこれまでの知見を整理すると共に、AOB に関する遺伝学的知見、形態学的特性、生理学的特性、生化学的特性、アンモニア酸化酵素の遺伝的特性、AOB の種の定性法、数の定量法、活性汚泥中における群集構造、群集構造に及ぼす環境因子の影響及び活性汚泥中の硝化活性等に関しこれまでの知見を詳細に整理し、土壌環境中及び生物膜処理法では多くの知見が得られているが、活性汚泥中では、存在量が少ないため、感度のよい計数法が確立されていないこと、それゆえ AOB の群集構造解析がほとんどなされていないことを記述し、研究の重要性を明らかにしている。

第3章では、調査した下水処理プロセスの装置的特性、水質的特性、またケモスタット装置の紹介、さらに下水処理場の AOB を解析するための活性汚泥から AOB 遺伝子の回収法、PCR-DGGE-シーケンス法、遺伝子をターゲットとする定量的計数法等の分析手法について説明している。

第4章では、活性汚泥中の AOB 群集構造と下水処理システムの 運転条件と処理工程の関係を明らかにするため、嫌気/無酸素/好気法 (A2O)、嫌気/好気法 (AO)、標準法 (AS) による処理工程の異なる 8 処理場の 12 系列の処理施設における AOB の調査をおこなっている。調査は、全ての処理場で、夏 (2001 年 8 月)、秋 (2001 年 11 月)、冬 (2002 年 2 月) の 3 つの異なる季節に活性汚泥を採取し、季節変化の影響を検討している。また、下水活性汚泥中の AOB の群集構造を明らかにするため、活性汚泥から全 DNA を抽出し、16SrDNA の遺伝子配列を PCR 法によって増幅し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)、クローニング、そして塩基配列の解読 (PCR-DGGE-クローニング-シーケンス) を行なっている。その結果、下水処理汚泥中の AOB 群集構造は *Nitrosomonas oligotropha* クラスターの 6a-1 型配列と 6a-5 型配列の細菌、*N. communis* クラスターが優占種であり、比較的アンモニア濃度の高い特殊の排水では *N. europaea* - *Nitrosococcus mobilis* クラスターの細菌によって構成されることを明らかにした。また季節による変動はほとんど認められなかった。*N. communis* は AS 法ではほとんど確認されなかったが、その原因については今後の課題であることを言及している。

第5章では、同定されたこれらの AOB 種を定量するため、real-time PCR による定量法

の開発を検討した。種々の AOB に特異的な各種プライマーの設計を行い、16SrDNA 遺伝子の断片には 6a-5 のみに特異性を示す部位がないことから、6a-3 と 6a-5 同時に特異的な real-time PCR プライマーセットを開発し、計数の最適条件についても検討を加えた、これら、新たに開発した 4 種のプライマーセットは、優れた選択性と再現性を示し、DNA 溶液に全 AOB が 10^5 コピー/ μ l 含まれる場合、特定種の AOB の検出限界は、プライマーセットによって異なるものの 10^2 もしくは 10^3 コピー/ μ l とかなり低濃度の AOB の計数が可能となった。さらに、ケモスタット連続培養装置の活性汚泥から抽出された様々な混合 DNA サンプルにおいても同様に高い選択性と特異性を有することを明らかにした。

第 6 章では、第 5 章で開発した real-time PCR 法を用いて、12 系列のエアレーションタンク中での AOB の種類と数を調べた。活性汚泥中には、全細菌が 10^{12} – 10^{14} cells/L 存在したが、AOB は 10^9 – 10^{11} cells/L の範囲で存在した。下水処理場における流入水の成分、処理工程、運転条件が異なるにも関わらず、全ての系列で 6a-3 型と 6a-5 型の一方もしくは両方の細菌が AOB 群集構造の大部分を占め、アンモニアの酸化の主役を演じていることを明らかにした。

硝化が進行している全ての系列で 6a-1 型の細菌が検出されたが、2 倍の塩化物濃度の排水が流れ込む 1 系列では 6a-1 型の細菌は存在しにくいこと、また 6a-1 株型の細菌は塩分の影響を受けやすいことを示唆した。

第 7 章では、ケモスタット連続培養装置を用いて、アンモニアと亜硝酸イオン濃度の AOB の群集構造と一般細菌数に与える影響を調べた。アンモニア濃度よりもアンモニア負荷が AOB 種の決定に大きく関与していることが明らかとなった。50mg N/d 以下の低アンモニア負荷条件において、*N. oligotropha* クラスタが優占種となっていた。*N. europaea* – *Nc. mobilis* クラスタは 150mg N/d の高アンモニア負荷の条件で優占種となった。一方、*N. oligotropha* クラスタと *N. europaea* – *Nc. mobilis* クラスタは 50mg N/d のアンモニア負荷の条件で共存することを明らかにした。

第 8 章では、AOB の純粋培養が可能となれば、各種の AOB の役割がより明らかになること、また AOB の活性汚泥への定着メカニズムを解明することが窒素除去機能を向上する上で大変有用であることを今後の課題として提示している。

これまで、下水処理場の活性汚泥中の種レベルの AOB のよい計数法が無かったため、下水処理場の活性汚泥中の AOB の種類と変動についてはほとんど不明であった。AOB を対象とした高い特異性と感度を有する real-time PCR 定量法の開発に成功したことにより、各種の下水処理場の活性汚泥中の AOB の種類と数を初めて明らかにすることができた。また、流入水の組成、処理工程、運転条件、及び季節による AOB の種組成と数への影響を明らかにした。これらの知見は排水処理プロセスにおける窒素除去の効率化に大変貴重な知見を提供するものと考えられ、都市環境工学の学術の発展に大きく関与するものである。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。