

論文内容の要旨

論文題目

Ecophysiological study of bacterial groups involved in Enhanced Biological Phosphorus Removal Processes by using FISH-MAR technique

(生物学的りん除去プロセスに関与する細菌群集の FISH-MAR 法を用いた生態生理学的研究)

氏名 アデリーン チュア セ メイ **Adeline Chua Seak May**

生物学的りん除去プロセスは、微生物の力を借りてリンを除去する技術であり、多くの自治体において採用されている生物学的りん除去の効率や安定性に影響を与える因子を解明し、さらに良好なりん除去技術を確立するために、生物学的りん除去に関する詳細な知見が必要である。しかし、多くの研究がなされているにもかかわらず、生物学的りん除去に関わる微生物学的な因子は十分には解明されていない。今日では、培養によらない分子生物学的手法が発展してきたことにより、生物学的りん除去に関与する 2 種類の細菌を、同定したり、あるいは定量したりすることが可能になった。それら二種の細菌とは、りん除去に寄与するポリリン酸蓄積細菌 (PAO) と、炭素源について PAO と競合関係にあり、りん除去に寄与しないグリコーゲン蓄積細菌 (GAO) である。しかし、PAO と GAO の生理生態は、両細菌群とも純菌系では培養できないために、よくわかっていない。

本研究では、生物学的りん除去に関連する細菌群の生理生態を明らかにするために、*in situ* 蛍光遺伝子プローブ法 (FISH 法) と、マイクロオートラジオグラフィ法 (MAR 法) を導入

した。これらは、複合群集中の細菌を培養を経ずに同定でき、また、それら細菌の活性や基質利用特性を調べることができる新しい技術である。本研究では、最もよく知られている PAO である *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (以下、Accumulibacter とよぶ)、および、やはり最もよく知られている GAO である GB 近縁と言われる *γ-Proteobacteria* 群に属する (以下 GB bacteria) のそれぞれについて、FISH-MAR 法により、嫌気条件下での嫌気条件下での基質摂取特性について検討した。

本研究では、最初に、実験室で運転された生物学的リン除去プロセスに対して FISH-MAR 法を適用した。馴致された汚泥において全細菌中で Accumulibacter が占めた割合は、基質が酢酸とグルタミン酸からなる場合は 30%、酢酸とプロピオン酸の場合は 18%、また、酢酸のみの場合は 25% だった。酢酸基質で、かつ、長い水理学的滞留時間 (48 時間) で運転され、リン除去を行わない生物学的リン除去汚泥は、 α -proteobacteria に属する四連球菌様の微生物 (TF0) が優占していた。FISH-MAR 法を用いることで、Accumulibacter と TF0 が生物学的リン除去プロセスに導入された有機基質を嫌気条件下で摂取・利用していることが、明確に示された。FISH-MAR 法を用いることで、一つ一つの細菌細胞のレベルで、分離培養されていない細菌の活性を明らかにすることができ、この方法が生理生態を解明するために非常に有用であることがわかった。

ついで、六つの実規模、および一つのパイロットスケールの生物学的リン除去プロセス中の Accumulibacter と GB bacteria の生理生態を調べるために、FISH-MAR 法を適用した。FISH 法により、これらの PAO および GAO は調査した処理プロセスに広く存在していることがわかった。これらの細菌が全細菌に占めた割合は、Accumulibacter については 7-17%、また、GB bacteria については 4-9% だった。FISH-MAR 法により調べたところ、実処理場の Accumulibacter は、幅広い基質を利用することがわかった。すなわち、酢酸やプロピオン酸のような低級脂肪酸だけでなく、リンゴ酸やピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、アミノ酸混合物も利用した。GB bacteria も Accumulibacter に似たような性質を持っていた。これらの GAO は、酢酸、プロピオン酸、アミノ酸混合物、および、グルコースを

同化した。Accumulibacter も GB bacteria も、グリシン、セリン、グリセロール、パルミチン酸、オレイン酸、エタノールのような有機物は利用しなかった。この実験において、実処理場汚泥の嫌気性発酵の能力を評価したところ、無視できる程度であった。そこで、ここで MAR 法で陽性として検出された場合、その基質は直接摂取・同化されたと判断された。

実規模の生物学的リン除去プロセスにおいてわずかにしか存在しない揮発性脂肪酸を共に利用することから、Accumulibacter と GB bacteria が炭素源をめぐって競合関係にあることが確認された。その一方、Accumulibacter は GB bacteria よりも効率よくグルタミン酸やアスパラギン酸を利用できることがわかった。また、GB がグルコースを有機基質として利用できるのに対し、Accumulibacter はグルコースは摂取しなかった。アスパラギン酸、グルタミン酸、グルコースについては両者の利用性は異なっており、この違いが実規模生物学的リン除去プロセス中でこれらの細菌群が共存できる理由であると考えられる。また、MAR 陽性細菌をおおまかに定量したところ、放射性標識された酢酸、プロピオン酸、アミノ酸混合物を嫌氣的に摂取した細菌のうち、Accumulibacter と GB bacteria は 50%にも満たないことがわかった。すなわち他の、未だ同定されていない細菌が生物学的リン除去プロセスにおける嫌気条件での有機基質摂取において競合に関わっている。

FISH-MARに加え、実規模生物学的リン除去プロセス中のこれら未知の細菌を同定するために、DNAを対象とした安定同位体標識法を導入した。SIP法により、 *β -Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes*, and *δ -Proteobacteria* のそれぞれの群の細菌が実規模生物学的リン除去プロセスでの嫌氣的酢酸摂取に関与している可能性があることがわかった。Accumulibacterは、DNA-SIP法でも嫌気条件で酢酸を利用する細菌の候補としてあげられたが、GB bacteriaは検出されなかった。DNA-SIP法の限界として、標識炭素の導入の程度や、標識炭素により標識されたDNAの量が、実規模生物学的リン除去プロセスのような非常に多様な細菌群からなる系を解析する際に問題となることがわかった。FISH-MAR法、およびSIP法それぞれの限界が示され、その欠点を補うようにいかにこれらの

手法を組み合わせればよいか、議論した。

本研究では、実規模プラント中に存在するAccumulibacterとGB bacteriaを対象としてFISH-MAR法を適用し、これら細菌群の生理生態について詳しい検討を行った。AccumulibacterおよびGB bacteriaの双方が利用することのできる、あるいはできない基質の種類について、新しい知見がもたらされ、これら細菌群の有機基質に関する競合関係についてもわかってきた。本研究では、実規模下水処理場を対象としたことで、生物学的リン除去プロセス中の細菌群集に関してより現実的な知見をえることができた。最後に、FISH-MAR法は、生物学的リン除去に関与する細菌群集の生理生態を探るために、最もよい技術の一つであることがわかった。