

論文審査の結果の要旨

氏名 小田和賢一

本研究は、活性汚泥におけるファージの挙動を明らかにし、この知見を基にファージの溶菌作用による宿主への影響を評価することを目的として行われたものであり、全部で7つの章からなっている。

第1章では研究の背景、目的、論文構成が述べられ、また、第2章では既往の研究が整理されている。

第3章では、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法を活性汚泥中ファージのコミュニティ解析に用いる方法について検討している。PFGE法は海洋中のファージを調べるために利用されたことはあるが、活性汚泥中のファージについては用いられたことがない。検討の結果、海洋で行われるPFGE手順をそのまま活性汚泥に適応したのでは、DNAが部分的に分解されてしまうために十分な分離を得ることは難しかった。DNAをファージ粒子から放出する段階以降のEDTAの濃度を高めることにより、良好な分離を得ることに成功した。

第4章では、PFGE法と直接計数法を用いて活性汚泥におけるファージの濃度と挙動を調査した結果を報告している。直接計数法では、ファージ粒子をSybrGreen Iにより染色し、蛍光顕微鏡下で計数している。実廃水処理場および活性汚泥リアクターから採取した活性汚泥では、ファージ濃度は、1mlあたり 10^8 から 10^9 個であった。また、都市下水、工業廃水、畜産排水を処理する計14箇所の実処理場の活性汚泥をPFGE法により分析したところ、ファージのゲノムサイズは、40kbから200kb以上に分布すること、とりわけ40kbから70kbの範囲に集中することをみだしている。また、実験室活性汚泥リアクター中のバクテリオファージを経時的に解析したところ、長期間安定して存在しているファージもあれば、3日ごとのモニタリング周期の一回だけあらわれるファージも存在することがわかった。

第5章では、迅速かつ簡便なファージのモニタリング手法を確立することを目的とし、高感度蛍光色素PicoGreenによる全ファージのDNA濃度を迅速に定量するモニタリング手法(PicoGreen法)を新規に開発した。手法の正確性はモデルファージを用いた添加試験で確認した。この方法では、試料を75 μ lしか必要とせず、3時間で10試料のファージDNA濃度を定量することができ

た。

第6章では、PicoGreen法を実廃水処理場や実験室リアクターに適応した。その結果、活性汚泥上澄み中のファージDNA濃度は数 ng/ml から数十 ng/ml 程度の範囲で変動し、1日 で2倍程度に増加する様子も捉えられた。観察されたファージの増加から、ファージが活性汚泥中の細菌に及ぼす影響を試算したところ、1日以内に全細菌の2%程度が溶菌された可能性があることがわかった。

第7章では、PFGE法やPicoGreen法を用いて、散発的に発生するバンドの消長をさらに詳細に調査した。二つの回分式活性汚泥リアクターをそれぞれ2ヶ月〜3ヶ月に渡り、ほぼ毎日モニタリングした。このモニタリング期間内に、PFGE法では、生成から消滅までが1日程度以下であるバンドを16回観察した。散発的に見られるPFGEバンドは、ファージによる宿主細菌の溶菌(またはバースト)に起因すると考えられる。そこで、バーストが宿主細菌に与えた影響を試算した。1回のバーストにより1処理サイクルあたり(すなわち6時間あたり)生物反応槽内において平均して 10^8 から 10^9 程度の宿主が溶菌され、 10^{10} 個程度のファージ粒子が放出されたと考えられる。また、活性汚泥内全細菌の0.02%~0.08%が溶菌されていたと考えられる。

また、第7章ではこれら二つのリアクター内に生息する細菌である *Micrococcus phosphovorius* と、それを宿主とするバクテリオファージ(M.p.ファージ)を経時的に観察した。M. phosphovorius は、定量PCR法により定量した。その存在量はリアクター内の全細菌の0.1-2%程度であった。また、M.p.ファージはプラーク法により調べた。いずれのリアクターでもM.p.ファージはいったん 10^8 ~ 10^9 /ml程度まで増加し、その後 10^6 程度にまで減少した。一方、M. phosphovorius の存在量は、M.p.ファージが最も多かった時期でも目立った現象は見られなかった。最もM.p.ファージが多かった時期でも、ファージにより溶菌されたM. phosphovorius の量は2%程度にとどまると試算された。

以上のように、本研究からは活性汚泥中のバクテリオファージが非常にダイナミックな挙動を有していることが明らかになった。また、ファージが活性汚泥中の細菌に及ぼしている影響についても、大まかにではあるが、評価することに成功している。

本論文の第4章は味埜俊、佐藤弘泰、小貫元治、Lee Sang-hyon との、第6章は味埜俊、佐藤弘泰、小貫元治、金井佑樹との、また、第5章と第7章は味埜俊、佐藤弘泰、小貫元治との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士(環境学)の学位を授与できると認める。