

論文内容の要旨

論文題目

生物学的リン除去プロセスにおけるポリリン酸蓄積細菌の新規定量手法の確立とその生理・生態学的研究への応用

(Development of Novel Quantitative Methods for Polyphosphate Accumulating Organisms in Enhanced Biological Phosphorus Removal Process and Its Application to Study of Their Ecophysiology)

氏名 福島 寿和

本研究は、廃水処理法の一つである生物学的リン除去 (EBPR; Enhanced Biological Phosphorus Removal) プロセスにおいてリン除去を担っているポリリン酸蓄積細菌 (PAOs : Polyphosphate Accumulating Organisms) の新規定量手法を確立し、その手法を用いて PAOs の生理・生態学的知見を得ることを目的とした。EBPR プロセスはリンの処理性能が不安定な点が最大の課題となっており、この課題を解決するためには PAOs についての知見が必要不可欠である。すなわち、本研究で得られた結果は、EBPR プロセスのより安定した処理性能を実現するために有用な知見となることが期待される。

本論文の構成は以下の通りである。

1 章および 2 章では、EBPR プロセスおよび PAOs に関する既存の研究および課題をまとめ、本研究の位置づけを示した。3 章および 4 章では、PAOs として知られている *Candidatus 'Accumulibacter phosphatis'* (以下、'Accumulibacter' と記す。)、および、*Microlunatus phosphovorius* (以下、*M. phosphovorius* と記す) を対象とする定量 PCR 法を確立した。

つづいて、この定量手法を用いて PAOs の生理・生態学的知見を収集した。5 章では、'Accumulibacter' の好気培養における増殖条件を探索するとともに分離を試みた。6 章では、運転途中で pH を低下させた実験室規模 EBPR リアクター内の 'Accumulibacter' の挙動を解析した。7 章では、6 章で得られたデータを用いて、処理性能と PAOs の存在量を数値モデルによって再現することを試みた。最後に、8 章で、研究成果を整理し、今後の展望を示した。

以下に、3 章から 7 章までの各章でおこなった研究の内容と、その成果をまとめる。

3 章では、定量 PCR 法を用いて 'Accumulibacter' の新規定量手法を確立し、活性汚泥への適用性を検討した。

'Accumulibacter' は主要な PAOs として認識されており、実下水処理場や実験室規模リアクターの汚泥に対して定量的な解析が頻繁におこなわれている。これらの報告の多くでは、FISH 法を用いた定量がおこなわれている。しかしながら、FISH 法は、定量操作に非常に時間がかかるた

め、日変動のような詳細な挙動を把握することには不向きである。そこで、プロセス内の‘Accumulibacter’の挙動を詳細に把握するために、定量 PCR 法による新規定量方法を確立し、その活性汚泥試料への適用性を検討した。

まず、定量 PCR 法によって‘Accumulibacter’の 16S rRNA 遺伝子の定量方法を検討した結果、インターカレーター法によって定量方法を確立することができた。つづいて、活性汚泥中の‘Accumulibacter’を、インターカレーター法および FISH 法によって定量した結果、両手法による定量結果には若干弱いながらも有意な相関関係 ($R^2=0.687$) が認められた。

今回確立したインターカレーター法は、FISH 法よりも迅速且つ高感度に定量可能であった。定量値の再現性については、FISH 法と同等もしくは、若干よいと考えられた。このように、インターカレーター法によって、‘Accumulibacter’を迅速且つ高感度に定量する手法を確立することができた。

4 章では、定量 PCR 法を用いて、*M. phosphovor*us を定量する手法を確立し、活性汚泥への適用性を検討した。

*M. phosphovor*us は PAOs と共通する代謝能を持つ数少ない分離株であるが、EBPR プロセスにおけるリン除去への寄与はあまりわかっていない。これは、*M. phosphovor*us はグラム陽性の細菌であることから、FISH 法による定量が困難なことが一因であった。そこで、本研究では、定量 PCR 法によって *M. phosphovor*us の定量方法を確立し、EBPR プロセスにおけるリン除去への寄与を評価することを目的とした。

定量手法を検討した結果、QPrimer PCR 法によって、*M. phosphovor*us の 16S rRNA 遺伝子の定量方法を確立することができた。つづいて、異なる炭素源を与えて運転した実験室規模 EBPR リアクター内の *M. phosphovor*us を定量し、また、その経時的变化を追跡し、リン除去性能との関連を調べた。この結果、*M. phosphovor*us の存在量はリアクターごとに大きく異なっており、一部のリアクターではリン除去性能と類似した変動を示した。但し、*M. phosphovor*us のリン除去への寄与は最大でも PAOs の数%であると推定され、リン除去への寄与は小さいと考えられた。

続いて、5 章・6 章では確立した定量 PCR 法を用いて、‘Accumulibacter’の生理・生態学的知見を収集した。*M. phosphovor*us はリン除去への寄与が小さいと考えられたため、研究の対象としなかった。

5 章では、好気培養における‘Accumulibacter’の増殖条件を探索し、分離を試みた。

上述のように、‘Accumulibacter’は主要な PAOs として考えられているが、いまだ分離されていない。

液体培養での増殖条件を探索した結果、グルコース (500mgC/L) を炭素源として、pH10.0 および 20 °C の条件で培養すると、‘Accumulibacter’が有意に増殖していることが確認された。つづいて、より確実に分離をおこなうために、活性汚泥試料中の‘Accumulibacter’を濃縮する方法を検討した。この結果、Percoll を用いた密度分離法によって濃縮することができた。最後に、密度分離した汚泥を、上述の条件で液体培養することで分離を試みたが、‘Accumulibacter’を分離することはできなかった。

6 章では、運転途中で pH を低下させた実験室規模 EBPR リアクターにおける‘Accumulibacter’の挙動を解析した。

EBPR プロセスの欠点はリンの処理性能が不安定な点であり、リン除去が悪化する要因の一つとして、pH による影響がこれまで報告されている。そこで、運転途中で pH を低下させたリアクターにおける ‘Accumulibacter’ の挙動を調査した。

pH を運転途中で 6.5 ± 0.1 に低下させたリアクターについて、リン除去性能および ‘Accumulibacter’ の変動を把握した結果、‘Accumulibacter’ がリン除去の悪化に先立って減少いく様子が見られた。但し、リン除去の悪化や ‘Accumulibacter’ の減少は pH 低下後すぐに起こるのではなく、リン除去の悪化は pH 低下から 20 ～ 26 日後、‘Accumulibacter’ の減少は 0 ～ 19 日後にみられた。また、運転期間を通して pH を 6.5 ± 0.1 に設定して運転したリアクター (R20) でも良好なリン除去がみられ、‘Accumulibacter’ が増加する様子が見られた。こうした結果から、リアクターの pH を 6.5 ± 0.1 に設定することで、リン除去および ‘Accumulibacter’ の増殖に即座に大きな影響は与えることはないが、運転途中で pH を 6.5 ± 0.1 に下げることで、0 ～ 19 日程度後に ‘Accumulibacter’ が減少し、さらに、それを追ってリン除去が悪化することがわかった。このような変動はこれまでに報告されておらず、定量 PCR 法を用いて詳細に挙動を把握することで初めて得られた知見である。

7 章では、6 章で運転したリアクターにおける処理性能および PAOs のモデル評価をおこなった。

活性汚泥モデルの AMS2 は EBPR プロセスのモデルとして様々な研究がおこなわれているが、PAOs そのものの実プロセス内での挙動を数値モデルによる計算結果と比較した事例はほとんど無い。なぜならば、既存の手法では PAOs を正確且つ高い頻度で定量することが困難なためである。そこで、6 章で運転したリアクターの PAOs の挙動について、定量 PCR 法による定量結果とモデルにより計算した結果を比較し、モデルの有効性および問題点を検討した。なお、本章では ‘Accumulibacter’ を唯一の PAOs と仮定した。

検討に先だって、リアクターの処理性能を正確に再現するために、モデルのキャリブレーションをおこなった。この結果、4 つの反応速度定数および化学量論係数を、標準的な値 (ASM モデルの推奨値) から変更することによって処理性能を再現することができた。

続いて、上述のようにキャリブレーションをおこなったモデルから計算された PAOs の挙動と、実際の挙動を比較した。この結果、実際の挙動をモデルで再現できていなかった。再現できていない理由を検討した結果、運転開始時の PAOs の入力値に問題がある可能性が挙げられ、正しくキャリブレーションをする必要性が考えられた。

このように、‘Accumulibacter’ の実測値を用いることによって、PAOs をモデルによりシミュレートした結果と比較することができ、問題点を明らかにすることができた。

以上、本研究では、定量 PCR 法によって PAOs の新規定量方法を確立することができ、確立した手法を用いて主要な PAOs である ‘Accumulibacter’ の増殖条件や、汚泥内における詳細な挙動等、既存の手法では解析が困難であった生理・生態学的知見を得ることができた。