

論文内容の要旨

活性汚泥法による有機物除去過程でのポリヒドロキシアルカン酸(PHA)の生成とそれに関与する微生物群の分子生物学的同定

(Occurrence of Polyhydroxyalkanoate (PHA) in Activated Sludge during The Removal of Organic Pollutants and Molecular Identification of PHA-accumulating Organisms)

氏名 押木 守

本研究では、活性汚泥が蓄積する有機性一時貯蔵物質であるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)に注目し、活性汚泥による有機物除去への PHA 蓄積の寄与およびそれに関与する微生物群に関して知見を収集した。活性汚泥プロセスにおいて有機物除去は中心的役割を担う生物反応であり、その除去機構に関して知見を収集することは意義深い。そして、PHA を蓄積する微生物群に関する知見は、活性汚泥による PHA 蓄積を理解・制御するために有用な情報になると期待される。

本論文の構成は以下の通りである。

第一章および第二章では、活性汚泥による PHA 蓄積に関して既存の研究および課題を整理し、本研究の位置付けを示した。

第三章では、活性汚泥による有機物除去の過程で PHA が蓄積され、有機物除去機構として PHA 蓄積が寄与した割合を実下水処理プロセスで調査した。

第四章では、3 つのテーマに取り組んだ。1) 有機物除去への PHA 蓄積の寄与を詳細に評価する、2) 有機物の間欠投与が PHA 蓄積を促進する理由を検討する、3) PHA 蓄積を促進させることで有機物除去に必要な酸素量を低減でき、活性汚泥に固定される有機物量が増加することについて検討を行なった。

第五章では、PHA 蓄積に関与した微生物群に関して、微生物学的知見を収集した。

最後に第六章において、研究成果を整理し、今後の展望を示した。

以下に、第三章～五章までの各章で行なった研究の内容と成果をまとめる。

第三章では実下水処理プロセスにおいて、PHA の蓄積量および有機物除去へ PHA 蓄積が寄与した割合を調査した。嫌気好気法、標準法など運転法の異なる計 14 種の実下水処理プロセスにおいて調査した結果、それら全てから PHA が検出され、活性汚泥プロセスにおいて PHA が一般的に蓄積されていることが確かめられた。PHA の蓄積量としてはおおむね乾燥汚泥重量あたり 0.1～1%程度であった。

続いて、溶存態有機物の除去へ PHA 蓄積が寄与した割合を”寄与率”から評価した。その結果、溶存態有機物除去における PHA 蓄積の寄与率は、-17%～100%以上であった。算出された寄与率は、二箇所のプロセスを除けば正の値であり、実下水に含まれる溶存態有機物の除去へ PHA 蓄積が寄与していたことが確認された。また、算出された寄与率はしばしば 10%を超え、無視できない量の溶存態有機物が PHA 蓄積を介して除去される場面があった。実下水処理プロセスにおいて生ずる時間的・空間的変動を考慮せずに算出した寄与率ではあるが、有機物除去機構として PHA 蓄積が重要な役割を担う場面があることを確認した。

第四章では、有機物として酢酸を間欠的または連続的に投与する実験室リアクター(間欠投与型および連続投与型)を運転し、馴致された活性汚泥に酢酸を投与した回分培養を実施した。そして、酢酸消費、PHA 蓄積および酸素消費をモニタリングした。さらに、酢酸を摂取した細菌と PHA を蓄積した細菌をそれぞれ検出し、定量した。4-4-1 節ではこれら一連の実験を実施し、データの収集を行なった。4-4-2～4 節では実験データから次のような考察を行なった。

4-4-2 節では、酢酸摂取への PHA 蓄積の寄与について考察し、有機物除去機構としての寄与を調べた。ここでは、PHA 蓄積の寄与率を第三章よりも信頼性高く算出するために、ATP の供給に消費された酢酸等を考慮して、計算を行なった。そして、投与した酢酸の 7 割(間欠投与型)または 4 割(連続投与型)が PHA 蓄積を介して摂取されたことが寄与率から明らかとなり、有機物除去機構として PHA 蓄積が大きく寄与したことを確認した。これは、有機物除去機構として PHA 蓄積が重要な役割を担う場面があるという第三章の結論を裏付ける結果だった。第三章および 4-4-2 節から、活性汚泥による有機物除去機構として PHA 蓄積が重要な役目を果たす場面があることを確認した。これらの知見は活性汚泥による有機物除去機構を理解するための学術的知見として役立てられることが期待される。

4-4-3 節では、間欠投与型の方が連続投与型よりも PHA 蓄積の寄与率が高かった原因を考察した。間欠投与型では PHA 蓄積細菌が酢酸投与に素早く応答し、他の細菌より多く

の酢酸を摂取していたことが、物質収支および単位細胞当たりの酢酸摂取速度から判明した。そして、間欠投与型では PHA 蓄積細菌が優占しており、全体の 3~4 割を占めた。これらのことから、間欠投与型では PHA 蓄積細菌がより多くの酢酸を摂取することで優占化し、結果的に PHA 蓄積の寄与率が高まったと考えられた。有機物を間欠投与することで PHA 蓄積が促進されることは従来から知られていたが、その理由をここで提示することができた。間欠投与によって PHA 蓄積が促進されるという知見は、PHA 蓄積を利用する廃水処理プロセスを検討する際に有用となるであろう。

4-4-4 節では、PHA 蓄積の寄与を促進することで、有機物除去に必要な酸素量を低減できることを確かめた。PHA 蓄積の寄与が高い間欠投与型では、酢酸を摂取する際に消費された酸素量が連続投与型よりも約 2 割少なかった。また、PHA を消費させるための内生呼吸区間を省略することで、内生呼吸のために消費される酸素量を間欠投与型では連続投与型よりも約 8 割削減できた。これらの酸素消費量削減効果を併せて評価すると、間欠投与型では連続投与型の約 1/2~1/3 量の酸素消費で有機物除去を行なえることがわかった。また、投与した有機物量と総酸素消費量から、活性汚泥に固定された有機物量を評価した。間欠投与型の活性汚泥には連続投与型の約 2~5 倍の有機物が固定されたことが間接的に確認された。これらの結果から、PHA 蓄積を介した有機物除去を行なうことで、処理に必要な酸素量を削減でき、活性汚泥が持つ有機物量を増加させることができることが確かめられた。

第五章では、PHA 蓄積に関与した微生物群について、知見を収集した。

1 節では、活性汚泥試料を標準活性汚泥法で稼働する 8 カ所の実下水処理場から採取した。そして、酢酸を投与した回分培養を行ない、活性汚泥に PHA を蓄積させた。活性汚泥試料からそれぞれ異なる PHA の蓄積速度が観察されたが、これは PHA 蓄積に関与した微生物叢の違いがあることを示唆する結果だった。

続いて、PHA 蓄積に関与した微生物群が全菌に占める割合を、DAPI と Nile blue A の二重染色法で調査した。この際に、PHA 蓄積細菌に加えて、Nile blue A で検出されるが DAPI で検出されない”Nile blue A 陽性粒子”を観察した。そして、PHA 蓄積細菌および Nile blue A 陽性粒子は全菌に対してそれぞれ 11~15%、6%~18%を占めた。

さらに 1 節では、FISH 法および逐次 Nile blue A 染色法を用いて PHA 蓄積細菌の種構成を門レベルで解析した。門レベルにおける PHA 蓄積細菌の種構成は試料間で類似しており、優占する PHA 蓄積細菌はいずれの試料でも *α-proteobacteria* または *β-proteobacteria* に属する細菌だった。また、先の Nile blue A 陽性粒子はいずれの FISH プローブでも検出されなかった。回分培養で観察された PHA 蓄積速度と PHA 蓄積に関与した微生物群との相

関を調査した結果、Nile blue A 陽性粒子および α -*proteobacteria* に属する細菌が PHA 蓄積に強く寄与した可能性が示唆された。

2 節では、PHA 蓄積細菌の種構成をより詳細に調査するために FISH プローブを作成し、種構成を属・種レベルで調査した。Percoll を用いた密度分離で回収した試料から 16S rRNA 遺伝子を遺伝子増幅し、クローンライブラリを作成した。そして、 α -*proteobacteria* または β -*proteobacteria* へ帰属されるクローンの全長配列を決定し、FISH プローブを作成した。

新たに作成した FISH プローブを用いて PHA 蓄積細菌の種構成を属・種レベルで解析した結果、 α -*proteobacteria* または β -*proteobacteria* へ帰属される次の PHA 蓄積細菌を同定した; *Accumulibacter*、*Comamonas*、*Dechloromonas*、*Thauera*、*Zoogloea*、*Candidate PHAAO-2*、4、6、7、8、10、11。PHA 蓄積細菌の種構成はこれら複数の細菌種から構成される複雑な構成となっており、その種構成は試料ごとに異なった。すなわち、PHA 蓄積細菌の種構成は門レベルでは類似するものの、属・種レベルでは活性汚泥ごとに異なった。

3 節では、Nile blue A 陽性粒子を同定するための検討を行なった。染色法や観察方法について検討したが、ついに Nile blue A 陽性粒子から核酸染色剤のシグナルを観察することはできなかった。一方、Nile blue A 陽性粒子が PHA と同程度の浮遊密度を持つことが密度勾配遠心分離法で確認された。さらに、Nile blue A 陽性粒子の周囲に細胞様の構造が存在しないことが、電子顕微鏡観察で確認された。これらの結果から、Nile blue A 陽性粒子が細胞外 PHA 顆粒である可能性が示唆された。

五章では一連の解析により、PHA 蓄積に関与する微生物群に関してその全体像を明らかにすることができた。すなわち、活性汚泥における PHA 蓄積細菌および Nile blue A 陽性粒子の存在比を明らかにし、PHA 蓄積細菌の種構成については門レベルでほぼその全容を明らかにすることができた。さらに、属・種レベルでは種構成が活性汚泥試料ごとに異なることも明らかにした。そして、活性汚泥から比較的多く検出された Nile blue A 陽性粒子については、細胞外 PHA 顆粒である可能性が示唆された。

以上、本研究では、活性汚泥による有機物除去機構として PHA 蓄積が寄与することを実証し、有機物除去機構としての重要性を確認した。さらに、PHA 蓄積を促進させるために基質の間欠投与が有効であることを示し、PHA 蓄積を活用することで有機物除去に必要な酸素量を削減できることを確かめた。PHA 蓄積に関与した微生物群については、存在比および種構成について知見を収集することができた。また、細胞外 PHA 顆粒と考えられる Nile blue A 陽性粒子の存在を確認し、その特徴について知見を収集した。