

論文審査の結果の要旨

氏名 エゴダハ ゲダラ ワセナ グナワルダナ
Egodaha Gedara Wasana Gunawardana

本研究は下水処理水中に出現する細菌群集とその経時的な変動について明らかにしようとしたものである。分子生物学的手法の発展によって、下水処理プロセス中で水質浄化に寄与する微生物群についての研究は大きく前進しつつあるが、それに比べると、下水処理水中の微生物群集に関する研究は非常に限られている。しかし、処理水の水質を向上させるために、また、下水処理水の再利用を行いやすくするために、処理水中の微生物群集についての理解を深める事は重要である。

また、本研究において著者は下水処理水を $0.2\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターによりろ過したろ液をそのまま鋳型とし、16SrRNA 遺伝子を対象として PCR 反応を行うと、増幅産物が得られる事を見いだした。著者はろ液に含まれる DNA を遊離 DNA (free DNA) とよび、その挙動についても検討した。

本論文は全七章で構成されている。第一章（序章）、第二章（文献レビュー）に続き、第三章では活性汚泥や処理水中からの DNA の抽出方法について検討した。第三章で導入した手法を用いて、第四章では実験室活性汚泥リアクターについて、また、第五章では二つの実下水処理場について、活性汚泥および処理水中の細菌群集構造とその変動を解析した。第六章では第四章、第五章で分析したのと同じ試料について、遊離 DNA の挙動を解析した。第七章では論文全体の総括と、今後の展望が述べられている。

第三章では、簡易かつ再現性良く DNA を抽出することができる技術として、近年開発された超音波破碎・希釈法の適用可能性について、最適な試料の希釈倍率や PCR 反応のサイクル数、再現性について検討している。PCR 反応の対象部位は 16SrRNA 遺伝子の部分塩基配列である。試料を超音波破碎した後、適宜希釈して PCR 反応液中における鋳型 DNA の濃度を $1\sim 10\mu\text{g/L}$ 程度前後とし 30 サイクル PCR 反応を行う事で、再現性良く良好な PCR 反応産物を得ることができたとしている。

第四章では実験室活性汚泥リアクターを運転し、活性汚泥と処理水中の細菌群集構造を 16SrRNA 部分塩基配列を対象とする PCR/T-RFLP 法（PCR 反応の後に末端標識制限酵素切断断片多型解析を行う方法）で検討した。両者に共通したピークが見られたものの、その強度は大きく異なっていた。処理水に出現しやすい傾向のある細菌群、活性汚泥から抜け出てくる傾向の小さい細菌群が存在する事が明らかになった。

第五章では、実下水処理場について活性汚泥と処理水中の細菌群集の変動を一年間にわたって調査した。また、一部の月では平日 5 日連続での試料採取・分析を行った。実験室リアクターの場合と同様、処理水に出てきやすい細菌群、あるいはその逆の細菌群が存在する事がわかった。また、通年で周期的に変動するような傾向がある事、特に処理水については数日間のうちにも大きく変動する場合がある事が明らかになった。また、汚泥を数時間放置し再混合すると、上清中の浮遊物質が増えるだ

けでなく、一部の微生物群が上清中に増加することがわかった。

第六章では、処理水ろ液中の遊離 DNA の挙動を第四章・第五章で検討したと同じ試料について検討した。処理水を 0.2 μ m のメンブレンフィルターでろ過し、そのろ液を直接 PCR 反応の鋳型としたところ、PCR 反応産物を得ることができた。その構成や挙動を PCR/T-RFLP 法で分析したところ、処理水や活性汚泥と共通する細菌群の遺伝子も検出されたが、その組成はいずれとも大きく異なっていた。遊離 DNA がどのように生成しているのかはわからないが、微生物群集構造の変動に関連する可能性もある。

第七章では以上の結果を総括し、また、今後の展開の方向について述べている。明らかにすることができた主な事柄は、処理水中の細菌群集構造は活性汚泥のそれとは異なる事、経年的な変動をすること、汚泥をしばらく静置し再懸濁したのちに上清を得ると、上清中の細菌群集構造が変化すること、処理水のろ液には PCR 反応の鋳型となる 16SrRNA 遺伝子またはその断片が存在すること、またその構成は活性汚泥や処理水のそれとも異なる事、の 6 点である。処理水の水質を向上させるために、処理水に出てきやすい細菌群の特性を調査する必要がある事を述べるとともに、遊離 DNA の起源を明らかにする事で、活性汚泥の微生物生態系について新たな知見が得られる可能性があるとしている。

本研究から、今まであまり検討された事なかった下水処理に関連する微生物世界について、新たな側面が浮かび上がってきたといえる。

なお、本論文 3 章および 4 章は共著論文として公表されているが、論文提出者が主体となっていなかったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上より、博士（環境学）の学位を授与できると認める。