

氏名(本籍)	えび え よし たか 蛭江美孝(神奈川県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第3359号		
学位授与年月日	平成16年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	生物学的窒素除去プロセスにおける硝化細菌群の微生物生態解析		
主査	筑波大学教授	工学博士	松村正利
副査	筑波大学教授	工学博士	田中秀夫
副査	筑波大学教授	農学博士	内山裕夫
副査	筑波大学教授	農学博士	前川孝昭

論文の内容の要旨

生物学的窒素除去プロセスにおいては、硝化反応を担うアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌の増殖・活性を高く保つことが重要である。従って、処理施設の設計・管理やプロセスの高度効率化等を図る上では、水量、水質の急激な負荷変動等に伴う硝化細菌群の活性低下、個体数減少を迅速に評価する手法の開発は極めて重要である。しかしながら、通常の培養技術ではほとんどの環境微生物が培養困難であることから、従来の培養に基づく解析では極めて不十分であることが指摘されている。本研究ではこのような点を鑑み、硝化反応を適切に制御するための微生物生態学的知見を得る上で必要な反応槽内における硝化細菌群の微生物生態に対する解析技術の確立とその適用を図った。すなわち、環境条件・運転操作条件が硝化細菌群の個体数、群集構造および機能活性等に及ぼす影響について、培養を介さず、迅速に解析可能な手法を確立し、機能活性に基づいた群集構造解析について実験的検討を行った。得られた成果を以下に示す。

生活系排水を処理する高度合併処理浄化槽内における硝化細菌群の占有率の変遷とアンモニア酸化細菌群の群集構造について、FISH法、PCR-DGGE法等の分子生物学的手法を用いて解析した。その結果、硝化細菌群が全真正細菌に対して占める割合(占有率)は硝化反応の進行に伴って増減した。しかし、その後の負荷変動や処理水質悪化時には占有率に大きな変動が無く、個々の細菌の活性の変動および群集構造の変遷による優占種の交代があったと推察され、微生物群集構造の変遷や特定の機能活性の評価解析が必要不可欠であることが示唆された。

そこで、アンモニア酸化活性の指標としてアンモニア酸化酵素遺伝子(*amoA* gene)の転写活性に着目し、その評価技術の確立を目的として実験的検討を行った。RT-PCR法により複合微生物系においても*amoA* mRNAの検出・定量が可能なこと、さらにDGGE法と組み合わせ、*amoA* mRNAおよび*amoA* geneの双方についてDGGE解析を行うことで、反応槽内で高いアンモニア酸化活性を示す細菌と、活性の低い細菌の微生物群集を評価することができた。実生活排水処理装置である浄化槽に対して適用した結果、槽内で検出したアンモニア酸化細菌群の全てが同時にアンモニア酸化活性を示しているわけではないことが示唆され、環境条件の変化に伴うアンモニア酸化細菌の機能活性発現に基づいた微生物群集構造の評価が重要であると考えられた。さらに、有機物負荷変動に伴うアンモニア酸化細菌の活性応答を*amoA* mRNAに基づいて評

価した結果、負荷上昇前後において、転写された *amoA* mRNA に基づく DGGE バンドパターンが異なり、アンモニア酸化細菌の種によって有機物負荷上昇の影響が異なることが明らかとなった。

このように、環境変化に対する活性応答が菌種によって異なることが示唆されたことから、室内連続実験によるアンモニア酸化活性発現のモニタリング解析を行った。運転開始初期においては、硝化反応の安定化に伴い、活性を示すアンモニア酸化細菌群の多様性が変化し、アンモニア酸化反応への寄与率の変化が確認できた。また、水量と濃度という異なる負荷の上げ方で人為的に流入負荷を増加させた場合、アンモニア酸化細菌の活性には、濃度負荷よりも水量負荷がより大きな影響を与える事が示唆され、「負荷の上げ方」によって活性を担うアンモニア酸化細菌の群集構造が異なることが明らかとなった。これらの結果より、本手法を用いたモニタリングは、処理プロセスにおける機能活性をも判定出来る微生物解析手法として有用であると考えられた。

また、本研究で得られた *amoA* mRNA の塩基配列はいずれも *Nitrosomonas* 属に帰属され、反応槽内ではこれらの細菌群がアンモニア酸化反応に大きく寄与していると考えられるが、基準菌株とは系統的に異なるクラスターを形成した。これは、従来の培養に基づく解析が実環境を十分に反映していないことの現れである。今後はさらに、実際の処理プロセスで見出された高い転写活性を有する *amoA* 遺伝子について、諸環境因子に対する機能活性応答の詳細な解析を定量的に進めることが必要である。また、窒素除去プロセスにかかわる他の機能遺伝子についても同時解析を行うことで、プロセスの更なる改善が可能になるものと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、富栄養化の制限因子である窒素の生物学的除去プロセスにおいて重要な硝化反応を担う微生物群を対象とし、プロセスの効率的、安定的制御技術の確立に資する微生物生態解析技術の確立とその適用を図ったものである。

本論文では、環境中の多くの微生物が現在の培養技術では十分に解析できないことから、16S rRNA 遺伝子や機能遺伝子に基づいた解析を導入し、生活系排水処理施設の反応槽内における微生物群集構造の変遷や特定の機能活性の評価解析が必要不可欠であることを示した。この問題に対し、アンモニア酸化酵素遺伝子の転写活性に着目し、アンモニア酸化活性の指標として RT-PCR 法による *amoA* mRNA の検出を行い、さらに DGGE 法と組み合わせることにより、アンモニア酸化活性に基づく群集構造解析を行った。その結果、反応槽内で高いアンモニア酸化活性を示す細菌と、活性の低い細菌の微生物群集を評価することが可能となった。この評価技術を用い、室内実験リアクターで連続モニタリングを行った結果、同一の負荷条件であっても「負荷の上げ方（高濃度で低水量の場合と低濃度で高水量の場合）」によって高活性を発揮するアンモニア酸化細菌群の種類が異なることが示唆された。また、転写された mRNA から得られた塩基配列が基準菌株と異なるクラスターを形成することが明らかとなり、従来の培養に基づく解析が十分でないことが改めて確認された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。