

氏名(本籍)	おくぬきすぐる 奥貫優(東京都)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第4346号		
学位授与年月日	平成19年3月23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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	廃水処理に用いられる生物学的リン除去システムにおける細菌群集構造とリン除去能力に関する研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	内山裕夫
副査	筑波大学教授	工学博士	向高祐邦
副査	筑波大学教授(併任)	工学博士	中村和憲
副査	筑波大学助教授	農学博士	青柳秀紀

論文の内容の要旨

生物学的リン除去システムは、運転コストが低いがリン除去能力が不安定である。システムを担うほとんどの微生物が純粋培養困難な事により、それらの微生物学的知見の不足が一因となって、リン除去能力の不安定な原因は分かっていない。活性汚泥のリン除去能力とその群集構造の関係を考察した多くの研究では、ある1時点におけるリン除去能力の異なる系の群集構造を比較するのみであったが、実処理規模の廃水処理は連続的に行われている途中で、そのリン除去能力が低下する事がある。本研究ではシステムのリン除去能力低下原因を明らかにする事を目的として、汚泥のリン除去能力と群集構造の200日を越える連続的な変化を解析した。

まず始めに、試料採取期間中にシステムの処理水のリン濃度が増加し、リン除去能力の低下が生じた。また汚泥の群集構造を分子生態学的手法を用いて解析した結果、リン除去能力の低下の直前と直後では群集構造がほとんど同じである事が示唆された。汚泥内のポリリン酸を染色する事で、リン除去を主に担うと考えられているポリリン酸蓄積細菌の汚泥に占める割合が、リン除去能力の低下開始の直後に低下した事が示された。しかしながら実験室規模システムでは、リン除去能力の低下直後まで、嫌気期間における汚泥からのリン放出量が増加した事から、リン除去能力の低下直前にポリリン酸蓄積細菌が減少したのではなく、その代謝状態が変化した事で細胞内のポリリン酸が加水分解され、DAPIで染色されない状態になっていた可能性が示された。これらの結果から、リン除去能力の低下は群集構造の変化によって起こるのではなく、群集構造の変化なしにポリリン酸蓄積細菌の代謝が何らかの原因で変化して、引き起こされたと考えられた。また、今回観察されたリン除去能力の低下期間中、嫌気期間において汚泥が溶存有機物を取り込まなかった事が示唆され、これまで報告されているどのリン除去能力の低下機構とも一致しない、全く新しい現象を見出した。

以上の事から、リン除去能力の低下原因を考察するためには、ポリリン酸蓄積細菌の代謝状態について解析する必要性が明確にされた。

次に、ポリリン酸蓄積細菌の代謝状態が変化した原因を明らかにするための基礎検討を行った。汚泥のような複合微生物系に含まれる特定の細胞の代謝状態を把握するための手段として、FISHとマイクロオート

ラジオグラフィーを組み合わせる手法が挙げられる。この手法を行うためにはポリリン酸蓄積細菌の系統学的な知見が不可欠である事から、その16S rDNA配列の獲得を試みた。染色によりポリリン酸の蓄積が示唆されるマイクロブロックを、ポリリン酸蓄積細菌の候補とし、生物学的リン除去汚泥からマイクロマニピュレーションにより分離した。マイクロブロック中の16S rDNAを鋳型としてNested-PCRを行い、得られたPCR産物のクローニング、配列解析の後、得られたクローン配列を含む系統樹を作成した。その結果、対象とした実処理場の生物学的リン除去汚泥に含まれていたポリリン酸蓄積細菌が、これまで報告のある*Betaproteobacteria*や*Actinobacteria*以外にも幅広い系統群に分布する可能性が示された。

今後は、得られた配列をもとに作成したプローブをFISH法に用いて、生物学的リン除去システムにおける各ポリリン酸蓄積細菌を個別に標識し、マイクロオートラジオグラフィーやDAPI染色と組み合わせる事で、標識される各細菌種の代謝状態に影響を与える因子が検討可能になると考えられ、本法により生物学的リン除去システムのリン除去能力の安定化に貢献しうるデータを得られると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、運転コストが低い事から有力な廃水処理システムとなりうる生物学的リン除去システムの欠点である、不安定なリン除去能力の低下原因を解明する事を目的とした研究である。生物学的リン除去システムのリン除去能力と群集構造の関連性を論じるこれまでの研究の多くは、リン除去能力の異なる複数の系の、ある時点における群集構造を比較し、差の見られる特定の細菌群に注目していたのに対し、本研究では同一の系のリン除去能力と群集構造を連続的に解析する事により、両者の変化から有意の関連性を見出す事を試みた。200日以上連続的な廃水処理の結果、群集構造の変化なしにリン除去能力の変化が引き起こされた事が示された。またリン除去能力の変化は特定の細菌群の代謝状態の変化によって引き起こされた可能性も示された。更に溶存有機物濃度の変化から、本研究で観察されたリン除去能力の低下は、これまで報告されているどのリン除去能力低下機構とも合致しない、全く新規な現象である事を確認した。これらの結果を受けて、生物学的リン除去システムのリン除去能力の低下原因について考察するには、汚泥中のポリリン酸蓄積細菌の代謝状態を把握する必要性が高いと考えられた。しかしながら現在、ポリリン酸蓄積細菌を種毎に標識するために必要なその系統学的知見が不足している。したがって著者は純粋培養困難なポリリン酸蓄積細菌をマイクロマニピュレーションにより汚泥から分離し、細胞ごと核酸増幅の鋳型として用いる事で、その16S rDNA配列を解析する事を可能とする、新規な手法を開発した。今後、本手法により得られる系統学的知見により、各ポリリン酸蓄積細菌を複合微生物系で標識し、それぞれの種にとって最適な条件を検討する事で、生物学的リン除去システムのリン除去能力の安定化に役立つデータが得られるだろう。これまで生物学的リン除去システムの不安定性の原因は長い間多くの研究者により検討が行われてきたが、ほとんど明らかになっていなかった。そのような状態を本研究は打破するきっかけとなりうる成果を本研究は生み出ししており、その独創性と新規性は十分に評価できる。

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。