

氏名(本籍)	^{かわほらさき} 川原崎	^{まもる} 守(茨城県)
学位の種類	博士(農学)	
学位記番号	博甲第2,046号	
学位授与年月日	平成11年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	廃水処理における生物学的リン除去システムを構成する微生物個体群の解析	
主査	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 中原忠篤
副査	筑波大学教授	Ph.D.(理学) 多比良和誠
副査	筑波大学教授	農学博士 前川孝昭

論文の内容の要旨

排水処理において生物学的リン除去に主要な役割を果たしている細菌として、リン除去システム中の活性汚泥より高頻度で単離される *Acinetobacter* 属細菌を中心として数多くの報告がある。しかしながら、実際のリン除去システム中でのリンや有機物の取り込み、放出パターンとそれら細菌の挙動が一致しないことからリン除去に主要な役割を果たしている細菌は現在に至るまで明らかになっていない。そのためシステムの設計は経験的なものにならざるを得ず、システムの不安定性の一因ともなっている。本研究ではリン除去に主要な役割を果たしている細菌を明らかにすることを目的とした。まず第一に、中村等により単離され、菌体乾重量の15%もの多量のリンを蓄積する能力を持ち、リン除去に主要な役割を果たしているリン蓄積細菌の候補の一つであると考えられている *Microlunatus phosphovorus* のリン蓄積条件について検討を行った。その結果、本菌のリン取り込み能は菌の増殖段階に影響され、対数増殖期の細胞はリン取り込み能力を持つものの、静止期後期の細胞はリン取り込み能を喪失することを明らかにした。また、本菌は菌体内に有機物を取り込む能力を持ち、取り込んだ有機物により引き続きリン取り込みが促進されることを明らかにし、リン除去に主要な役割を果たしているリン蓄積細菌に必要とされる条件を良く満たしていることを示した。次に、*M. phosphovorus* の活性汚泥中での存在量を明らかにするため、*M. phosphovorus* の16S rRNA 配列に基づいて特異的な蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブをデザインした。また、解析の対象として研究室で嫌気・好気条件を付与することにより明確な生物学的リン除去を示すリアクターを構築した。リアクターが良好なリン除去を示してから2ヶ月後にリアクター中の汚泥を採取し、上でデザインした蛍光オリゴヌクレオチドプローブを用いてFluorescent In Situ Hybridization手法を用いて解析した結果、*M. phosphovorus* の存在比は全菌数の3%と小さいことが明らかになった。さらに各種細菌系統群に特異的な蛍光オリゴヌクレオチドプローブとポリリン酸に染色性がある蛍光色素DAPIによる二重染色を行い、プローブからの蛍光とDAPIの蛍光を画像解析により重ね合わせることにより、この活性汚泥系でリン除去に関与しているのは主としてグラム陽性高G+C含量の細菌(*M. phosphovorus*もその一種である)と *Proteobacteria* の α subclass に属する細菌であることを明らかにした。また、実処理施設である霞ヶ浦浄化センターにおいて生物学的リン除去法の一つである A_2O 法で運転している下水処理汚泥を同様の手法で解析した結果、リンを蓄積していると考えられるのは実験室汚泥と同じくグラム陽性高G+C含量の細菌と *Proteobacteria* の α subclass に属する細菌であることを示した。最後に研究室の嫌気・好気リン除去汚泥中に存在するリン除去細菌をDAPI染色し、フローサイトメーターを用いて黄色の蛍光を発生する細菌の分離を試みた結果、リン蓄積細菌と考えられる細菌のみが分離されることを明らかにした。これら細菌の16Sr RNAを解析した結果、非常

に多様な細菌群が検出された。

Proteobacteria と α subclass に属する細菌の数が最も多く、*Proteobacteria* の γ subclass に属する細菌の数がそれに次いでいた。これらの細菌に特異的な蛍光標識プローブを作成し、DAPI との二重染色を行うことにより本汚泥中に存在する主要なリン蓄積細菌が明らかになり、より安定したシステム設計が可能となると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、廃水処理における生物学的リン除去システムにおいてリン除去に関与している微生物を明らかにする目的で、システム中に存在する微生物群を解析したものである。従来、リン除去に関与している細菌としては *Acinetobacter* 属細菌を中心に多くの報告があるが、それら細菌の特性が実際のリン除去システムにおいて観察されるものと一致しないことから、それら細菌がリン除去に果たしている役割については疑問視されている。本研究では、近年、微生物群集解析において多用されるようになってきた蛍光標識 DNA プローブを用いた Fluorescent In Situ Hybridization 法を、生物学的リン除去を明確に示す微生物群集に適用したのみならず、ポリリン酸特異的染色剤 DAPI との二重染色を行い、実際にポリリン酸を蓄積し、リンを除去している細菌群を明確にする手法を開発した。その手法を用いて検討した結果、それら細菌はグラム陽性高 G+C 含量の細菌と *Proteobacteria* の α subclass に属する細菌であることを明らかにした。さらに、フローサイトメトリーをリン蓄積細菌の分離に適用することにより、DAPI 染色されポリリン酸蓄積細菌と考えられる細菌の分離に成功し、それらの 16S rRNA を解析することにより、リン蓄積細菌の系統解析を行った。

以上得られた研究成果は、いずれも初めての試みで得られたもので、本研究の独創性を示すものであり、また本研究の成果は今後、生物学的リン除去システム運転の改善につながるものが期待できるものである。さらに今回用いられた蛍光検出により特定の細菌を分離する手法は、従来分離困難であった細菌の単離法に新しい展望を開くものであり、今後の展開が期待できることから高く評価できる。

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。