

# 論文審査の結果の要旨

氏名 蘇 涛

下水処理に用いられる活性汚泥中には多種多様な微生物が存在している。その微生物相を決定する因子として、流入下水の水質や処理施設の構造や運転条件などをあげることができる。一方、微生物学の世界ではバクテリオファージなど細菌を宿主とするウイルスや、細菌が微量に生産する生理活性物質もまた微生物の活性や微生物相に影響を与えることが知られるようになってきている。活性汚泥中の微生物生態系においてもこうした微生物生態系に内在する因子が微生物相に影響を与え、ひいては水処理の成績に影響を与えることが考えられるが、そうした観点からの研究は未だ限られている。

本研究は活性汚泥からエタノールを用いて得た粗抽出液中の化学物質（以下粗抽出物とよぶ）を添加して活性汚泥を培養することで、活性汚泥中の細菌相が受ける影響を検討したものである。影響の有無を検討するための実験条件を確立し、さらに、培養中の有機物負荷量の影響、影響が現れるまでの時間、用量反応関係、同一の粗抽出物への様々な活性汚泥の反応、といった検討をおこない、さらに次世代シーケンサーを用いて影響を受けた細菌群を特定した。エタノールにより抽出された化学物質が実際の活性汚泥微生物生態系においてどのような影響を与えているのかは今後の研究を待たなければならないが、微生物相を制御する技術につながる可能性があり、新たな視点を開いた研究である。

論文は全7章からなり、第1章は序論、第2章は文献レビューである。

第3章は続く第4章、第5章の実験に共通する実験方法を述べている。大まかには次のような手法である。エタノールを用いてさまざまな活性汚泥試料から粗抽出物のエタノール溶液を得る。同エタノール溶液を96穴マイクロプレートのウェルに注入しエタノールを蒸発除去させる。また、対照として純エタノールを同様にウェルに注入し、蒸発除去する。粗抽出物を添加したウェルと対

照のウェルに活性汚泥と増殖のための基質を添加し培養する。培養前および培養後の細菌群集構造を、16S rRNA 分子の部分塩基配列を逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法により増幅し、さらにその増幅産物について制限酵素切断断片多型 (RFLP) 法によって分析し、粗抽出物を添加して培養したウェルと対照系のウェルの細菌相の違いを解析する。なお、再現性を確認するため、同一条件のウェルを複数設ける。

第 4 章では、活性汚泥のウェルへの投入時の前処理法についての検討、および、基質添加量や培養時間などの条件を大まかに絞り込むために行われた実験の結果が報告されている。また、著者が運転した実験室活性汚泥装置の運転開始後 137 日目の活性汚泥から、細菌相に強く影響を与える粗抽出物 (E137) を得た。

第 5 章では、E137 を中心に用い、反応時間、用量反応関係、E137 が実験室活性汚泥と実下水処理に用いられている活性汚泥に与える影響について比較した。また、様々な活性汚泥から得た粗抽出物を実下水処理活性汚泥に添加し、粗抽出物間の影響の違いについても検討した。RT-PCR/RFLP 法により得られる多型が変化するまでに要した培養時間はわずか 2 時間程度であり、粗抽出物中に存在する化学物質は一般的な活性汚泥の汚泥滞留時間と比較し顕著に短い時間で細菌相を変化させた。また、用量反応関係は概ねシグモイド型であったが、一部、用量が多すぎると反応が低下する事例も見られた。E137 はそれが抽出された実験室活性汚泥よりも実下水処理活性汚泥の微生物相を大きく変化させた。また、実下水処理活性汚泥からの粗抽出物、実験室活性汚泥からの粗抽出物、いずれも微生物相を変化させたが、主成分分析を行ったところその変化の方向は異なっていた。

第 6 章では第 5 章の実験の一部について RT-PCR 産物を次世代シーケンサーを用いて解析することで、粗抽出物の添加により影響を受けた細菌群を特定することを試みた。粗抽出物の添加により *Sphingomonas* 綱は概ねみな減少し、*Pseudomonadales* 目、*Aeromonadales* 目が増加した。また、*Flavobacterium* 属などで、近縁であっても操作定義種 (OTU) ごとに異なる方向に変動する場合も見られた。大きく増減した OTU について塩基配列から制限酵素断片長を予測すると、5 章で行った RFLP の結果と概ね一致していた。

以上の結果に基づき第 7 章において結論を述べている。

なお、本論文第 5 章の一部は佐藤弘泰、味埜俊との共同研究であるが、論文提出者が主体となっ  
て行なったものであり、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。

以上 1950 字