

氏名	たけむら やすゆき 竹村 泰幸
授与学位	博士(工学)
学位授与年月日	平成30年3月27日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科(博士課程) 土木工学専攻
学位論文題目	生物学的廃水・廃棄物処理における微生物動態解明のための 迅速・簡便な新規 rRNA 定量法の開発
指導教員	東北大学教授 李 玉友
論文審査委員	主査 東北大学教授 李 玉友 東北大学教授 西村 修 東北大学准教授 久保田 健吾

論文内容要旨

人口増加、経済発展に伴い、廃水・廃棄物の発生量の増加や質の多様化などの問題が世界的に深刻化しており、適切な廃水・廃棄物処理システムの整備が求められている。近年では多様化している廃水・廃棄物の処理ニーズに合わせた高度処理、高効率化、低コスト化などの研究開発が活発に行われている。我々の研究グループでは特に生物学的処理法に着目してきた。生物学的処理法は、反応槽内に存在する多様な微生物の働きを利用して汚濁物質を分解するため、様々な汚濁物質の分解が可能である。とりわけ嫌気性消化は、省資源・省エネルギー型かつ創エネルギー型のプロセスとして注目されている。また、嫌気性消化は様々な廃水・廃棄物への応用が期待できることから研究が活発に行われている。

一方、生物学的処理法のキープレーヤーである微生物の機能・動態については未解明な点が多い。その理由として、微生物は形態からの識別が困難であること、ほとんどの微生物の分離培養が困難であることが挙げられる。そこで近年では分離培養に依存しない分子生物学的アプローチによって、微生物に関する知見の集積が盛んに行われている。生物学的処理法における微生物についても分子生物学的アプローチによる情報の蓄積が盛んに行われており、それで得られた情報が処理パフォーマンスの向上や運転管理に役立てられることが期待されている。しかしながら、未だ分子生物学的アプローチにより得られた情報が実際の処理プロセスに活かされているとは言い難いのが現状である。その主な理由は、①未だ微生物に関する情報の蓄積が十分でないこと、②迅速・簡便なモニタリング法がないことである。生物学的廃水・廃棄物処理システムの運転に関わる情報を分子生物学的視点から得るには、酸生成や酢酸生成、メタン生成などの機能的役割を担う微生物あるいは阻害的影響を及ぼす微生物グループの推移の評価が重要であると考えられる。例えば、嫌気性消化槽では酢酸資化性メタン生成古細菌や水素資化性メタン生成古細菌のグループ、酢酸生成細菌のグループのモニタリングが運転・運転管理・パフォーマンス向上を図る上で指標になる可能性がある。また、生物学的廃水・廃棄物処理における微生物群集構造の指

標としては、rRNA 遺伝子よりも変遷の様子が大きい rRNA の方が望ましいと考えられる。また、逆転写や PCR など酵素反応を使用する場合には酵素反応による測定結果へのバイアスが懸念される。現在、様々な分子生物学的手法が開発されているが、迅速・簡便でかつ酵素反応を使用しない rRNA 定量法は筆者の知る限りない。

そこで、本研究では嫌気性消化槽内の微生物群集構造に着目し、嫌気性消化槽におけるスタートアップや運転条件がもたらす微生物群集構造への影響を明らかにし、嫌気性消化のパフォーマンスの向上と運転管理にとって有益な情報の蓄積を行うこと、さらに、微生物群の迅速・簡便にモニタリングするための新規 rRNA 定量法を開発することを目的とした。

第 3 章では、下水汚泥を処理する実規模嫌気性消化槽のスタートアップから安定期における微生物群集構造の変遷をモニタリングした。本研究が対象としている消化槽は約 2 年間常温で保管されていた消化汚泥を種汚泥に使用してスタートアップが行われた。本研究ではこのスタートアップから安定期における微生物群集構造の変遷をモニタリングし、HRT の違いが微生物群集構造に及ぼす影響を評価した。スタートアップは HRT を 100 日から 50 日、20-22 日と段階的に負荷を上げていった。徐々に後段の汚泥脱水機能の低下と消化槽内の発泡現象が見られたため、HRT を 27-30 日にして負荷を下げ、連続的な安定運転が行えた。*Bacteria* に関しては、運転開始 17 日後のサンプルでは、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門、*Alphaproteobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱、*Actinobacteria* 門、*Synergistetes* 門など定常期に構成される主要な門に加えて、OP8 門が 8%程度存在していた。安定して運転される頃には *Deltaproteobacteria* 綱、*Bacteroidetes* 門、*Spirochaetes* 門、*Acidobacteria* 門が増加、*Chloroflexi* 門、*Firmicutes* 門、OP8 門などは減少させ、様々な論文で報告されている下水汚泥を処理する群集構造により近い形となった。また、脱水性の低下や発泡現象の原因と考えられている *Candidatus Microthrix parvicella* は 3-5%で検出された。*Archaea* は、全期間を通して *Methanosaeta* 属が最も優占的に存在しており、次いで *Methanomicrobiales* 目、*Methanospirillaceae* 科、*Methanobacteriales* 目の WSA2 科、*Methanoculleus* 属が優占していた。また、HRT が短い期間において、水素資化性メタン生成古細菌の割合が増加する傾向にあった。当該嫌気性消化槽は長期間保存されていた汚泥を植手しており、おそらく基質の枯渇などの影響で、スタートアップ時においては比較的偏った微生物群集構造であった。その後、高負荷を許容していく過程で多様性を獲得していった。また、運転停止前の微生物群集構造解析結果と今回の結果を比較すると、元々優占していたグループが運転の安定とともに増加することが示唆された。すなわち本章では、下水汚泥を処理する実規模嫌気性消化槽の微生物群集構造がスタートアップから徐々に微生物群集構造が変遷していき、安定した処理が可能であった HRT 20-22 日、HRT 27-30 日それぞれで安定した微生物群集構造を形成することが明らかにした。

第 4 章では、実規模及びラボスケールの嫌気性消化槽において、基質成分の違いや運転条件の違いがもたらす微生物群集構造への影響を評価した。6 基の実規模嫌気性消化槽は生ゴミ、牛糞、尿尿汚泥、生ゴミ+豚糞、豚糞、

下水汚泥を処理し、中温 (35°C) で運転されているものから採取した。ラボスケールリアクターは、鶏糞を中温で処理したリアクターにおける定常段階、阻害段階、回復段階及び、鶏糞を高温 (55°C) で処理したリアクターにおける定常段階、阻害段階及び、コーヒー粕を高温で処理したリアクターから採取した。*Bacteria* の微生物群集構造を門レベルで見ると、実規模、ラボスケール共に *Firmicutes* 門、*Proteobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Chloroflexi* 門が優占していた。特に優占度の高かった *Firmicutes* 門に属する酸生成・酢酸生成細菌については基質の違いによって特色があることが明らかとなった。*Archaea* の微生物群集構造については TS 濃度、COD 濃度が比較的良かった実規模の方では、酢酸資化性の *Methanosaeta* 属、水素資化性の *Methanoculleus* 属、*Methanospirillum* 属が優占し、TS 濃度、COD 濃度が比較的高かったラボスケールの方では酢酸資化性の *Methanosarcina* 属、水素資化性の *Methanoculleus* 属が優占する傾向にあり、高温運転では *Methanothermobacter* 属が優占していた。ラボスケールにおけるメタン生成古細菌についてリアクターの定常段階、回復段階、阻害段階の群集構造を比較すると、定常段階・回復段階では酢酸資化性メタン生成古細菌が、阻害段階では水素資化性メタン生成古細菌が優占する傾向にあり、基質の違いあるいは植種汚泥の違いによって相違はあるものの、属レベルで顕著な違いが見られた。嫌気性消化槽内の微生物群集構造への影響が報告されている基質・運転条件について、その影響度を統計解析により評価したところ、メタン生成古細菌については TS 濃度が最も影響が大きく、次いで COD 濃度、VFA 濃度、温度の影響が大きいことがわかり、酢酸生成細菌については COD 濃度が最も影響が大きく、次いで TS 濃度、COD/N 比の影響が大きいことが明らかとなった。

第 5 章では、分子量分画膜を用いた迅速・簡便な新規 rRNA 定量法を開発した。この新規手法では、蛍光修飾オリゴヌクレオチド DNA プローブと rRNA を交雑させ、交雑物と余剰なプローブを分子量分画膜で分画し、交雑物のみを回収、吸光・蛍光測定により定量を行う方法である。まず、配列特異的 rRNA の検出・定量を行うため、プローブ/RNA 比や交雑温度、交雑時間等の交雑条件の最適化を行い、rRNA との交雑により見かけ上高分子化して分子量分画膜上に捕捉されたプローブ由来の蛍光シグナルを検出することができた。また、交雑の特異性の向上には変性剤として用いた尿素濃度の制御が有効であることが明らかとなり、より簡便な実験工程の構築が可能となった。さらに、蛍光色素を標識しないコンペティタープローブを使用することで 1 塩基ミスマッチの識別も可能であり、本手法では極めて特異性の高い定量が可能であることを実証した。また、RNA 量を吸光度で、標的グループをプローブ由来の蛍光量で定量することによる絶対定量法に応用し、プローブを複数種用いることによるマルチプレックスな定量に成功した。既知量の人工合成 RNA を定量した実験により、定量結果が既知量と高い相関をもつこと、高感度検出が可能であった。したがって、本手法は増幅反応を用いない RNA 定量法としては既往の方法と同等以上の優れた定量性能をもつことが示された。また、嫌気性消化槽など環境サンプルから抽出した RNA についてマルチプレックス定量を実施し、高い再現性をもって定量することに成功した。本手法は、①RNA の抽出から定量までを約 3 時間で行え、②温度制御装置と吸光度計、蛍光分光光度計しか必

要とせず、③ハイスループレットへの応用が期待できる等の利点を持つ。

本研究で開発した迅速・簡便な新たな rRNA 定量法は酵素反応を用いないため酵素反応由来のバイアスがかかる懸念がなく、RNA を直接定量できる。本手法は、抽出した RNA とプローブを一定温度で反応させて、ろ過・洗浄後に回収して測定するだけであり、抽出から測定までの全工程を 3 時間で行えるため、他の方法と比べて迅速・簡便さに長けている。本手法における定量範囲と定量感度は、分子量分画膜と検出機器に依存するところが大きい。第 5 章で用いた分子量分画膜 (YM-100、Millipore 社) の場合、環境試料から抽出した全 RNA を 2 µg アプライでき、検出機器として NanoDrop 3300 (Thermo Scientific 社) を用いた場合には、良好な定量が行える範囲は 5~100% で、存在量が 1% 程度 (16S rRNA 換算で 5 ng 程度) でも検出できる感度をもつ。本手法の定量範囲・検出感度は増幅反応を用いない定量法と比べて同等以上であると言える。また、NanoDrop 3300 を用いた場合、プローブは蛍光標識の違いによって 3 種類が識別可能であり、本研究では *Bacteria*、*Archaea*、*Methanosaetaceae* の 3 プレックス定量に成功している。したがって、本研究で開発した分子量分画膜を用いた新規 rRNA 定量法は、①指標微生物の増減が明確に把握できるだけの定量性能があり、②様々なオリゴヌクレオチドプローブを用いることができるため、様々な種の微生物の定量が適用可能で、③他の方法に比べて極めて迅速・簡便な方法であるため、微生物動態解明のためのツールとして適切な方法として提案できる。

論文審査結果の要旨

本研究は、生物学的廃水・廃棄物処理プロセスの運転制御に微生物情報を活かすために、様々な運転条件下での微生物情報を蓄積すること、および適切な微生物モニタリング技術を開発することを目的としている。特に、省エネルギーかつ創エネルギー型の処理法である嫌気性消化に着目しており、嫌気性消化槽の運転条件が及ぼす微生物群集構造への影響を明らかにしている。さらに、迅速・簡便な新規 rRNA 定量法を開発し、従来の方々に取って変わる微生物モニタリング技術として提案している。本論文は以下の通り 6 章から構成されている。

第 1 章「序論」では、本研究の背景、研究目的、本論文の構成を述べた。

第 2 章「既往の研究」では、嫌気性消化に関わる微生物群に関するこれまでの知見をまとめた。また、微生物をモニタリングするための分子生物学的手法や、近年の核酸定量技術の動向についてまとめた。

第 3 章「実規模嫌気性消化槽のスタートアップから安定期における微生物群集構造モニタリング」では、約 2 年間運転を停止していた嫌気性消化槽のスタートアップから微生物群集構造をモニタリングした結果、再稼働直後には数種類の微生物群が大部分を占める偏った微生物群集構造が、徐々に多様かつ安定した微生物群集構造に変遷していくことを明らかにした。

第 4 章「実規模及びラボスケール嫌気性消化槽の微生物群集構造への基質・運転条件の影響評価」では、異なる基質を処理する実規模及びラボスケールリアクターから採取した 12 サンプルについて解析した。その結果、酢酸生成細菌の群集構造には COD 濃度が最も強く影響し、次いで TS 濃度、COD/N 比が影響を与えること、酢酸資化性メタン生成古細菌の群集構造には TS 濃度、COD 濃度、VFA 濃度、温度の順で影響を与えることを明らかにした。

第 5 章「分子量分画膜を用いた迅速・簡便な rRNA 定量手法の開発」では、微生物モニタリング指標として rRNA に着目し、rRNA を酵素反応等を用いずに迅速・簡便に定量する方法を開発した。配列特異的 rRNA の検出・定量を行うための交雑条件の最適化においては、温度と尿素濃度による制御が有効であることが明らかにした。さらに、1 塩基ミスマッチの識別が可能であること、マルチプレックス定量が可能であることを実証した。そして、嫌気性消化汚泥中の真正細菌やメタン生成古細菌グループの rRNA を定量することで、本手法が嫌気性消化に関わる微生物群のモニタリングに適用可能であることを示した。

第 6 章「総括」では、本研究を通して得られた結果を総括し、今後の展望について述べている。

以上、要するに、本論文は微生物情報を生物学的処理法の運転制御や処理の向上に活かすことを目指して、嫌気性消化槽の運転条件が微生物群集構造に与える影響の解明と新規微生物モニタリング技術を開発している。その成果は、生物学的処理技術向上のために重要な微生物学的知見を与え、環境工学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。