

## 博士論文概要

バイオフィームは固体表面に付着した細菌が増殖して形成する集合体であり、水中に生息する全細菌のうち 90%がバイオフィーム状で存在すると言われている。現在、自然界の全細菌種のうち分離培養されている細菌は 1%以下であると考えられている。人為的に培養できなければその細菌の性質を調べることは不可能であり、従来はバイオフィームの中身はブラックボックスとして扱われていた。1990 年代以降、主に 16S rRNA を標的とした分子生物学的手法の発達により、培養を介さずに細菌の系統分類に基づいた微生物生理生態解析が可能となった。その結果、バイオフィーム内の微生物生理生態に関する知見が蓄積しつつあるが、バイオフィーム機能の全体像を明らかにした例はほとんどない。特に、自然環境中のバイオフィーム内には多種多様な細菌が存在し相互作用を行う複合微生物系が形成されていることから、バイオフィーム内に存在する細菌の機能を単に足し合わせただけでは、バイオフィーム機能の全体像を明らかにすることは困難である。これは、実験のみで得られるデータは、多くの相互作用が行われているバイオフィーム内での一部の情報を切りとったものに過ぎず、現行の要素還元的な研究手法では限界があること示している。したがって、バイオフィーム複合微生物系全体を一つの複雑なシステムとして捉え、分子生物学で得られた様々な微生物生理生態に関する情報をシミュレーションにより再構築し、バイオフィーム複合微生物系の全体像を明らかにする必要がある。

本論文では、バイオフィーム複合微生物系の全体像を明らかにすることを目的として、分子生物学的手法および数学モデルを併用したバイオフィーム微生物生理生態解析方法論の構築を行った。具体的には、排水からの生物学的窒素除去プロセスで利用されるバイオフィームを対象として、細菌種および排水に含まれる物質種のモデル化を行った。まず、1次元シミュレーションモデルを用いてモデル化事項の妥当性を確認し、つぎに、モデル化事項を多次元モデルに拡張し、分子生物学的手法を併用してバイオフィーム微生物生理生態の解析を行った。

本論文は 6 章より構成されている。以下に各章の概要について述べる。

第 1 章では、排水からの生物学的窒素除去プロセスで形成されるバイオフィームの微生物生理生態解析の現状および微生物生理生態解析に用いられる数学モデルの特徴について、既往の研究動向を整理して本論文の研究背景をまとめるとともに、意義および目的を述べた。

第 2 章では、メンブレンエアレーションバイオフィーム(MAB)を対象としてモデル化を行った。一般的に排水からの生物学的窒素除去は、好気条件下でアンモニアを亜硝酸に酸化しさらに亜硝酸を硝酸に酸化する反応(硝化)、次いで無酸素条件下で硝酸・亜硝酸を窒素ガスに還元する(脱窒) 2つの反応で行われる。MABでは多孔質膜の内側から供給する酸素量を制御することでバイオフィーム内に形成される好気および無酸素環境にて、逐次的に硝化および脱窒反応を起こし、単一バイオフィーム内で窒素除去が可能である。しかしながら、MABの微生物生理生態の複雑さゆえに窒素除去経路について未だ不明確な点が残されている。そこで、MABの微生物生理生態解明を目的とした多次元シミュレーションモデル構築に向けて、1次元モデルを用いてモデル化事項の妥当

性の確認を行った。モデルでは、バイオフィルムを細菌などの固相と溶存物質を含む液相から成るとしており、バイオフィルム内での細菌による基質消費および生成が計算される。細菌の増殖および死滅速度は Monod 式に従って計算され、それに伴った細菌の体積の増加および減少によりバイオフィルム全体が拡張または収縮する。バイオフィルムは厚さ方向に広がりを持つ 1 次元であると仮定しており、各成分はバイオフィルム水平方向で平均化して計算される。細菌種としてアンモニア酸化細菌・亜硝酸酸化細菌・従属栄養細菌(脱窒細菌を含む)および従属栄養細菌が算出する細胞外代謝物(EPS)を、排水に含まれる物質種として酸素・有機物・アンモニア・亜硝酸・硝酸を設定してモデル化を行った。構築したモデルにより解析を行った結果、バイオフィルム底部では多孔質膜内側から供給された酸素をアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌が利用し硝化を行っており、酸素はバイオフィルム底部付近で枯渇していることがわかった。一方、酸素の枯渇により嫌気条件になったバイオフィルム表層では従属栄養細菌の一部である脱窒細菌が、硝化によって生成された亜硝酸・硝酸およびバルク液からの有機物を利用し脱窒を行っており、単一バイオフィルム内で窒素除去が達成されていることを確認した。

第 3 章では、第 2 章で行ったモデル化事項を基に、MAB を対象として分子生物学的手法および多次元モデルを併用して微生物生理生態の解明を行った。フローセル内で形成された MAB に対して、微小電極を用いて溶存酸素濃度分布を解析した結果、約 2000 $\mu\text{m}$ の厚みを有する MAB 内にて多孔質膜から供給された酸素が約 400-500 $\mu\text{m}$  で完全に消費され、好気部位・無酸素部位の形成が確認された。また、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法による微生物空間分布解析の結果より、好気部位にはアンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌が、無酸素部位には脱窒細菌を含むその他の細菌が存在していることを確認した。多次元モデル構築には Individual-based Model (IbM)を用いた。IbM では、細菌をある一定の大きさを持つ粒子として表現しており、個々の粒子の増殖・死滅・分裂を計算することによって多次元でのシミュレーションが可能になる。これに加え、細菌による基質の消費・生成のマスバランス、および基質の系内への拡散を拡散方程式により解き、両者を合わせることでシミュレーション結果が得られる。多次元モデルにより MAB のシミュレーションを行った結果、アンモニア酸化細菌は EPS の存在によってクラスター状に集塊し、ニッチを形成していることが明らかとなった。また、酸素濃度分布について実験値と定量的に相関が見られた。さらに、アンモニア酸化細菌および亜硝酸酸化細菌の微生物空間分布についても実験値と定性的に相関が見られた。これらの結果より、本多次元モデルは実際の微生物生理生態を再現可能であることが示された。

第 4 章では、排水中のアンモニアを高速に除去できる硝化グラニュールを対象としてモデル化を行った。一般に、硝化細菌は増殖速度が遅いため、汚泥滞留時間の短い活性汚泥法では十分な増殖ができない。これに対して、上向流好気性流動床リアクターに高濃度のアンモニアを含有する完全無機性模擬廃水を供給することにより形成される硝化グラニュールは、沈降性が高いために硝化細菌を槽内に大量に保持可能である。しかしながら、硝化グラニュールの微生物生理生態は未だ不明な点が多い。そこで、硝化グラニュールの微生物生理生態解明を目的とした多次元シミュレーションモデル構築に向けて、1 次元モデルを用いてモデル化事項の妥当性の確認を行った。細菌

種としてアンモニア酸化細菌・亜硝酸酸化細菌を、排水に含まれる物質種として酸素・アンモニア・亜硝酸・硝酸を設定してモデル化を行った。構築したモデルにより解析を行った結果、実験データと整合性をとるためには、硝化細菌由来の有機物、およびその有機物を消費可能な従属栄養細菌(脱窒細菌を含む)を考慮する必要があることが明らかとなった。

第5章では、第4章で明らかになったモデル化事項を基に、硝化グラニュールを対象として、分子生物学的手法および多次元モデルを併用して微生物生理生態の解明を行った。上向流好気性流動床リアクターを用いて形成させた平均直径が1600 $\mu\text{m}$ 程度の硝化グラニュールを対象として、16S rRNAに基づく群集構造解析、アンモニア酸化細菌・亜硝酸酸化細菌・各種従属栄養細菌をターゲットにしたFISH法および微小電極を併用した微生物生理生態および活性の空間分布解析を行った。一方、多次元モデルはIbMに基づいて構築した。硝化細菌由来の3種類の有機物を定義し、それぞれの有機物を消費可能な従属栄養細菌3種類を仮定してモデル化を行った。実験による微生物生理生態解析の結果、グラニュール内部で硝化細菌以外にも多様な従属栄養細菌が空間特性を持って存在し、硝化細菌由来の有機物を消費していることが示唆された。また、硝化細菌は主にグラニュールの表層付近の好気部位に存在し、内部の無酸素部位には従属栄養細菌が存在していることが明らかになった。シミュレーションモデルを用いて解析したところ、FISH法による細菌分布結果と相関性の高い結果が得られた。したがって、本モデルで仮定した細菌の増殖特性が妥当であったといえる。以上より、分子生物学的手法と数学モデルを併用して解析することで、微生物生理生態に関する新たな知見が得られることを示した。

第6章では、本論文の総括および展望を記述した。

以上、本論文ではバイオフィーム複合微生物系の全体像を明らかにすることを目的として、分子生物学的手法および数学モデルを併用したバイオフィーム微生物生理生態解析方法論の構築を行った。本方法論は、自然界に存在する様々なバイオフィームの微生物生理生態解析にも適用可能であり、その寄与は大きいと期待される。