

氏名 (本籍)	CUI GUANGYU (中華人民共和国)
学位の種類	博士 (工学)
学位授与番号	甲第547号
学位授与日付	平成31年3月25日
専攻	生産開発システム工学専攻
学位論文題目	Fate and behavior of antibiotic resistance genes and their relations with microbial profiles during vermicomposting of excess activated sludge (余剰活性汚泥のミミズ堆肥過程における抗生物質耐性遺伝子の挙動と微生物群集との関連性の解明)
学位論文審査委員	(主査) 教授 玉川 一郎 (副査) 教授 李 富生 准教授 山田 俊郎

論文内容の要旨

生物学的汚水処理法の主流である活性汚泥法を採用している都市下水処理場から大量の余剰活性汚泥が発生している。その減容化・減量化・安定化のために、日本を含む多くの工業先進国では、脱水処理後に焼却して処分する方法が主に利用されているが、資源循環型社会の形成をはかるため、炭化や発酵など有機資源として利用できる方法が強く推奨されるようになってきている。堆肥化は好気性微生物の働きによって生ゴミなどの有機廃棄物を安定化し、その最終産物を肥料または土壌改良材として利用する方法であるため、余剰活性汚泥の処理問題が顕在化している多くの途上国にとって特に有用と考えられる。微生物のみによる堆肥化に比べて、ミミズを介した堆肥化は有機物の分解と無機化がミミズと微生物の両者の関与によって行われるため、処理時間の短縮や栄養塩流失の低減などの効果が期待できる。

ミミズを介した堆肥化技術を余剰活性汚泥の処理に適用する際に重要な学術的研究の着眼点の1つとして、余剰活性汚泥から頻りに検出される病原微生物、特に最近では人や動物の病気の治療や予防に使われている様々な抗生物質に起因する抗生物質耐性菌または耐性遺伝子(Antibiotic Resistance Genes)が余剰活性汚泥の堆肥化過程において抑えられるか、あるいは伝播されるかについて明らかにし、その上で関わる主な機構を解明し、適した堆肥化条件を提案することが挙げられる。本論文における研究は、この着眼点に対応した知見を得ることを目的とし、活性汚泥法を採用しているある都市下水処理場から採取した活性汚泥を対象にした異なるミミズの個体密度と異なる堆肥化温度におけるミミズを介した堆肥化実験、ミミズの腸内消化実験、リアルタイム PCR による耐性遺伝子の定量、次世代シーケンサーによる微生物群集構造の解析、並びにコピアソン相関分析などの統計分析手法に基づいたデータ解析により、余剰活性汚泥のミミズ堆肥化過程における抗生物質耐性遺伝子の挙動を検討し、微生物群集との関連性の解明を試みたものである。本研究の主な成果は以下の通りである。

余剰活性汚泥のミミズ堆肥化過程における抗生物質耐性遺伝子の挙動について、3種類のミミズ個体密度(427, 854, 1281 earthworms/kg dry)における堆肥化実験をそれぞれ行い、余剰活性汚泥から頻りに検出されるキノロン系抗生物質耐性遺伝子 *qnrA* と *qnrS*, 及び耐性遺伝子の水平伝播のマーカになるインテグラーゼ遺伝子 *int11* に対する定量と解析の結果から、ミミズを介した堆肥化によりキノロン系抗生物質耐性遺伝子とインテグラーゼ遺伝子が減少すること; 堆肥化処理終了時におけるこれらの遺伝子の減少度はミミズの個体密度を高めることによって増大されること; キノロン系抗生物質耐性遺伝子の挙動は堆肥化過程における細菌の多様性の変化よりも細菌の密度と活性の変化に強く関連していることが明らかになった。

次に、堆肥化温度の影響から余剰活性汚泥のミミズ堆肥化過程における抗生物質耐性遺伝子の挙動を追及した検討については、堆肥化温度をそれぞれ 15, 20, 25°C としたミミズによる余剰活性汚泥の堆肥化実験を行い、キノロン系抗生物質耐性遺伝子 2 種類 (*qnrA*, *qnrS*), テトラサイクリン系抗生物質耐性遺伝子 3 種類 (*tetG*, *tetM*, *tetX*), スルホンアミド系抗生物質耐性遺伝子 1 種類 (*sulI*), インテグラーゼ遺伝子 *int11* に対する定量と解析の結果から、ミミズの成長と活性に適した今回検討の温度範囲 (15-25°C) において、有機物含有量や窒素の形態などの指標からみた堆肥化の効果は堆肥化温度の高い方で高い傾向を呈しているが、耐性遺伝子の減少からみた堆肥化温度の影響は顕著ではないこと; 検討対象となった全ての耐性遺伝子の中に、ミミズを介した堆肥化は *qnrA*, *qnrS*, *tetM* の 3 種類の耐性遺伝子に対して消滅効果が高いこと; 堆肥化処理終了時における堆肥化産物中の *qnrA*, *qnrS*, *tetG* の濃度上昇は主に硝化反応の進行とそれに伴う硝酸性窒素の生成量の増加と関連していることが明らかになった。

最後に、ミミズの腸内における消化の影響について、腸内洗浄を行った後のミミズによる余剰活性汚泥の摂取と排泄を繰り返した実験を行い、生菌内における *qnrA*, *qnrS*, *tetG*, *tetM*, *tetX*, *sul* の各種耐性遺伝子に対するリアルタイム PCR による定量結果と微生物群集構造に対する次世代シーケンサーによる解析結果から、ミミズを介した余剰活性汚泥の堆肥化過程における抗生物質耐性遺伝子の挙動は主に遊離態で汚泥中に分布している抗生物質耐性遺伝子の水平伝播に依存するものであること；ミミズ腸内の消化過程において、余剰活性汚泥中の生菌の密度が減少し、耐性遺伝子の宿主となる細菌種の減少により耐性遺伝子の拡散が抑制されていることが明らかになるとともに、今回検討した抗生物質耐性遺伝子の主な宿主は *Acidobacteria* の細菌門に属す細菌であることが耐性遺伝子と細菌群集の関連性に対するピアソン相関分析結果から示唆された。

論文審査結果の要旨

本論文は、余剰活性汚泥のミミズ堆肥化過程における抗生物質耐性遺伝子の挙動と微生物群集との関連性について詳細に検討し、ミミズを介した余剰活性汚泥の安定化と資源化の処理に有用な知見を多数見出しており、学術と応用の両面において環境工学分野への寄与が大きいと評価されることから、博士(工学)の学位論文に適合しているものと判定した。

最終試験結果の要旨

学位審査委員会は、提出論文の基礎となる発表論文(査読付論文 3 編)の内容を確認し、1 月 29 日(火)に開催された学位論文公聴会における論文提出者との質疑応答、その後の口頭試問などに基づき慎重に審査した結果、最終試験に合格と判定した。

発表論文 (論文名, 著者, 掲載誌名, 巻号, ページ)

1. Guangyu Cui, Fusheng Li, Shuailei Li, Sartaj Ahmad Bhat, Yasushi Ishiguro, Yongfen Wei, Toshiro Yamada, Xiaoyong Fu, Kui Huang, Changes of quinolone resistance genes and their relations with microbial profiles during vermicomposting of municipal excess sludge, *Science of the Total Environment*, 644, 494-502, 2018.
2. Kui Huang, Hui Xia, Ying Wu, Jingyang Chen, Guangyu Cui, Fusheng Li, Yongzhi Chen, Nan Wu, Effects of earthworms on the fate of tetracycline and fluoroquinolone resistance genes of sewage sludge during vermicomposting, *Bioresource Technology*, 259, 32-39, 2018.
3. 石黒泰, 崔广宇, 藤澤智成, 安福克人, 奥村信哉, 玉川貴文, Joni Aldilla Fajri, 李富生, 合併処理浄化槽における微粒子および細菌の変動と処理水槽内水中の残存有機物, 土木学会論文集G(環境), Vol.74, No.7. III_415-III_422, 2018.

参考論文

1. Kui Huang, Hui Xia, Jingyang Chen, Ying Wu, Guangyu Cui, Fusheng Li, Effects of earthworms on changes of microbial characteristics during vermicomposting of municipal sludge, *Acta Scientiae Circumstantiae*, 38(8), 3146-3152, 2018.
2. Xiaoyong Fu, Gaosheng Zhang, Xuemin Chen, Guangyu Cui, Fusheng Li, Danni Xu, Shan Zhang, Nitrification process and its influencing factors in vermicomposting of sewage sludge, *Acta Scientiae Circumstantiae*, 37(8), 3010-3015, 2017.
3. Kui Huang, Hui Xia, Guangyu Cui, Fusheng Li, Effects of earthworms on nitrification and ammonia oxidizers in vermicomposting systems for recycling of fruit and vegetable wastes, *Science of the Total Environment*, 578, 337-345, 2017.
4. Joni Aldilla Fajri, Tomonari Fujisawa, Yenni Trianda, Yasushi Ishiguro, Guangyu Cui, Fusheng Li, Toshiro Yamada, Effect of Aeration Rates on Removals of Organic Carbon and Nitrogen in Small Onsite Wastewater Treatment System (Johkasou), in MATEC Web of Conferences, Vol. 147, p. 04008, EDP Sciences, 2017.
5. Kui Huang, Hui Xia, Fusheng Li, Yongfen Wei, Guangyu Cui, Xiaoyong Fu, Xuemin Chen, Optimal growth condition of earthworms and their vermicompost features during recycling of five different fresh fruit and vegetable wastes, *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 13569-13575, 2016.