

## 論文の内容の要旨

論文題目 活性汚泥の有効利用に関する研究

氏 名 齋 木 祐 子

活性汚泥処理により発生する余剰汚泥は主たる産業廃棄物の一つであり、環境保護の観点からその低減化や、有効利用化が重要な課題となっている。本研究では、余剰汚泥をバイオマスとしての、また微生物資源としての2つの観点からとらえ、それぞれにおける有効利用の可能性を検討した。

本論文前半の第二章、第三章では、余剰汚泥をバイオマスとしてとらえ、その潜在的エネルギーを効率的にメタンエネルギーに変換するため、高速メタン発酵法である上向流嫌気汚泥床法(UASB法)を余剰汚泥に適用する方法を検討した。ここでまず解決すべき重要な課題は、余剰汚泥中の固形有機物を予めメタン発酵性の良い物質へ効率的に変換する方法を確立することである。そこで、第二章では可溶化法として自己消化に着目し、その条件の最適化と、残渣分離を含めた処理の連続化及びスケールアップの方法を検討した。その結果、自己消化により、1~4日間で余剰汚泥の20%~40%が可能であることがわかった。また、最大の可溶化率を与える自己消化条件は、固形分濃度1%前後の汚泥に対し、NaOHを最終濃度で0.1N添加し、60℃で嫌気条件下で4日間保持するものであった。また、本方法で可溶化を行うと、生成した有機酸や炭酸ガスによって懸濁液は中性~弱酸性となり、炭酸ガスが気化し、汚泥残渣は反応槽上部に浮上濃縮し、遠心分離などを行わずに容易に清澄な可溶化液を得ることが

できた。さらに可溶化液は嫌気消化における中間生成物と同じ低級脂肪酸を主生成物とし、メタン発酵性も良好であることが確認できた。また、上向流の筒型の反応槽を採用することで、前述の浮上分離の特性を生かしつつ同様な可溶化率を再現する 50L の連続装置にスケールアップすることに成功した。本方法により余剰汚泥の可溶化と、UASB 法を用いたメタン発酵を行うと、全体の処理時間は 1~4 日程度である。従来の嫌気消化法は減容化率が 40~60% と本方法より若干良好であるが、処理時間は 30 日程度である。従って、本法は余剰汚泥からメタン回収を行うための方法としては大幅な処理時間の短縮化とそれに伴う処理コストの低減を可能とするものでといえる。

第三章では、メタン発酵工程における課題の解決に取り組んだ。UASB 法は、メタン菌などが自己固定化したグラニューール汚泥を用いる、画期的な高速メタン発酵法である。しかし、実用化されてから比較的時間が浅く、グラニューール汚泥の微生物相に関する知見も少ない。また、実運転においてはグラニューール汚泥が浮上し、リアクターから流失するトラブルが多いことが問題となっている。ここでは、まずビール排水を処理するグラニューール汚泥に FISH 法を適用し、その微生物相解析を行い、処理正常時と異状時の微生物相を比較した。その結果、安定な処理を行っているグラニューール汚泥は表層から厚さ 200  $\mu$  m 以内の比較的表面近くでメタン菌が活発化しており、その他の菌群は比較的検出量が少ない、というきわめてシンプルな微生物相をしていることが推測された。有機物がメタン変換されるまでの数段に渡る分解反応は、メタン発酵槽へ流入する前までに行われていることが示唆された。これに対し、グラニューール内部にガスを包含する浮上グラニューール汚泥は、メタン菌が表面付近のみならず内部でも活発化している場合と、表面に厚い真性細菌の層が形成される場合があり、両者とも発生したメタンガスが放出されにくいためにグラニューール汚泥が浮上していることが示唆された。10 基のリアクターのグラニューール汚泥を対象とした 1 年に渡る長期観察の結果もこれらの推論を支持した。このような微生物相の変化が生じる要因を検討したところ、前者については高濃度排水を流入させることでメタン菌活動領域の肥厚化とグラニューール汚泥の浮上が再現することが分かった。後者については要因はより複合的であると考えられた。当初は未分解の基質がグラニューール汚泥に接触することによりそれを分解する細菌層がグラニューール汚泥表面で発達すると予想していたが、実際はそれだけでは浮上が再現するような細菌層は形成されなかった。本研究では未分解基質 (glucose) の流入かつ微量の酸素添加で細菌層形成を再現したが、それ以外にもこのような微生物相変化が生じる要因がある可能性があるため、今後より詳細な検討が必要である。しかしながら、これらの結果は、今までブラックボックスとされてきたグラニューール汚泥の機能と構造面において新規の知見をあたえ、また、実設備における安定運転の方法も提示するものであり、余剰汚泥のメタン発酵のみならず、排水の UASB 処理の安定化にも寄与すると考えられる。

一方、本論文後半では、活性汚泥を微生物資源としてとらえ、その利用の可能性を検討した。人類の

産業活動に伴い、もともと自然界に存在しなかった xenobiotics に対しても次々と分解菌が見いだされるのは、微生物が高密度に生息し、DNA 分子のやりとりが可能な“進化”の場があるからに他ならない。そのような場には、例えば活性汚泥や微生物膜などが考えられるが、実際に菌が新たな分解能を獲得するまでにどのようなことが起こっているかは仮説段階のものも多く、個々の事例の丹念な解析による知見の集積が重要である。第四章では、新規 carbazole (CAR) 分解菌、*Sphingomonas* 属 KA1 株を食品工場の排水処理汚泥から単離し、比較的単一な排水を処理する汚泥においても特殊な能力を示す微生物が取得しうることを示した。また、KA1 株は土壌に添加した 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin や 2,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin を 7 日間でそれぞれ 96%、70% 分解し、これらの菌の応用上の有用性も示された。本菌株の CAR 分解遺伝子群の解析を行った結果、CAR の初発酸化酵素の terminal oxygenase である CarAa の一部とメタ開裂酵素のコンポーネントである CarBa の一部の推定アミノ酸配列は CA10 株由来の CarAa 及び CarBa とそれぞれ 61%、40% の相同性を示した。また、CA10 株において CarAa への電子伝達の一部を担っている CarAd に相当する遺伝子配列は見いだせなかった。それまでに知られていた CAR 分解遺伝子は、推定アミノ酸配列が CA10 株ものと 90% 以上の高い相同性を示すものと、*Sphingomonas* sp. CB3 株のように全く相同性がないものであり、その中間的な遺伝子が見出されたのは微生物が CAR 分解系を獲得するまでの進化過程を考察する上で有用である。また、KA1 株の CAR operon 解析中に公開された *Sphingomonas* sp. GTIN11 株 [Kilbane II et al., 2002] の CAR operon は CarR の部分を除いて KA1 株と同一の推定アミノ酸配列を有していた。GTIN11 株の *carR* は IS の挿入によって破壊されており、CAR 分解系酵素が構成的に発現していた。地理的に隔離された分離源から共通性の高い operon を有する菌が分離されたことも興味深い。分解系遺伝子の進化においてトランスポゾンを含む IS の与える影響は大きいと考えられる。

第五章では、*Sphingomonas* sp. KA1 株の CAR 初発酸化遺伝子 *carAa* を根粒菌 *Rhizobium tropici* IAM14206 株中で発現させ、環境浄化への応用の可能性を検討した。得られた組換え菌 PBK3-*IS* 株は *carA* 単一の導入であるにも関わらず宿主内に存在する何らかの電子伝達系の相補により強い CARDO 活性を構成的に示し、反応開始後 1 時間における dibenzofuran の分解量は 5.9  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{OD}_{560}=1.5$ ) であった。また naphthalene や biphenyl などの多環芳香族化合物の分解活性を有していることも明らかとなった。豆科の siratro に接種した組換え菌は、水耕系、土壌系においてその根表面で増殖し、3 日間で dibenzofuran をそれぞれ 48%、52% 分解した。また、根粒中でも根表面と同様に活性の発現が認められた。一方、PBK3-*IS* 株を siratro に接種し非滅菌畑土壌中で生育させた場合、2 週間後の siratro 根表面におけるこれらの菌の割合はにおいて 2-13% であった。このように rhizoremediation は微生物の分解能を環境中で安定維持・発現するために有効な手法であるが、非滅菌土壌中では投入した菌の競合性

が問題となる可能性が示された。

本論文では、活性汚泥のバイオマスとしての実用的な利用方法を提案した。また、より高度な利用法を追求し、新たな環境対応型技術につなげるために、活性汚泥を汚染物質分解菌の分離源として利用する可能性も示すことができた。今後、活性汚泥を単なる廃棄物ととらえず、多くの可能性を有した微生物集合体として積極活用していくことで、さらに環境汚染物質の分解能の獲得機構に関する知見が得られ、最終的な環境浄化につなげていくことが可能となると期待される。