

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 齋木 祐子

本論文は、活性汚泥処理で発生する余剰汚泥がバイオマスとして、また微生物資源として有効利用できる可能性に着目し、余剰汚泥からのメタン回収システムの構築を試みたほか、難分解性物質である carbazole (CAR) の新規分解菌の単離を試み、その初発酸化遺伝子を単離、解析するとともに、根粒菌にて発現させることで、有効なダイオキシン浄化法の開発を試みたものであり、全六章から構成される。

第一章では、余剰汚泥の利用に関する現在までの知見のほか、活性汚泥由来菌の多様な分解性と有用性について詳しく述べている。

第二章では、余剰汚泥から上向流嫌気汚泥床法 (UASB 法) によりメタン回収を行うための前処理方法として余剰汚泥の可溶化方法を検討している。その結果、余剰汚泥に 0.01N の NaOH を添加した上で 60°C、嫌気条件で保持し可溶化を促すことが、生成物質のメタン発酵への適合性および処理の採算性から最適であり、余剰汚泥からのメタン回収の高速化が図れる可能性を示している。

第三章では、UASB 法の処理主体であるグラニュール汚泥の微生物相を fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法により検討している。その結果、メタン発酵が正常に行われた時のグラニュール汚泥は表層から 200 μ m までの領域に *Methanosaeta* 属メタン菌が活性化しており、その他の菌群は比較的検出量が少ないことを見いだしている。一方、グラニュール内部にガスを包含して浮上する異常時のグラニュール汚泥は、メタン菌がグラニュール内部でも活性化している場合と、表面に細菌層が形成されている場合があり、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ル汚泥が浮上していると推定している。また、このような微生物相の変化が生じる要因としては、高濃度排水の流入と glucose など未分解基質の流入の影響が大きいことを明らかにし、UASB 法の安定化に寄与する知見を得ている。

第四章では、活性汚泥の微生物資源としての活用の見地から、新規 CAR 分解菌 KA1 株を単離し、その属を *Sphingomonas* 属と同定し、実験室レベルで土壤に添加した 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin 及び 2,3-dichlorodibenzo-*p*-dioxin を 7 日間でそれぞれ 96%、70% 分解した結果を得ている。また、巨大プラスミド上にコードされている CAR 分解系遺伝子の単離、解析を行い、それらが operon 構造を有すること、既知の CAR 分解菌 *Pseudomonas resinovorans* CA10 株とはアミノ酸レベルで 60% の相同性を有する初発酸化酵素遺伝子をコードしていることを示している。また、本解析中に公開された、*Sphingomonas* sp. GTIN11 株の CAR operon は、KA1 株と同一の CAR operon の *carR* に IS が挿入して生じたものであると推定している。

第五章では、*carAa* を広宿主域ベクター pBBR1MCS-2 を用いて根粒菌 *Rhizobium tropici* IAM14206 株

に導入することにより PBK3-*IS* 株を構築し、得られた菌株が *carAa* 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 CAR 1,9a-dioxygenase 活性を構成的に発現することを示している。さらに、豆科植物の siratro に接種した PBK3-*IS* 株は、水耕系、土壌系においてその根表面で増殖し、モデル汚染物質として添加した dibenzofuran を 3 日間でそれぞれ 48%、52% 分解した結果を得ている。また非滅菌土壌中における挙動も検討し、環境中では浄化のために投入した菌の競合性が問題となることを指摘している。

第六章では本研究で得られた成果をまとめ、活性汚泥の有効利用の今後の可能性について概説している。

以上、本論文は、余剰汚泥の効率的なメタン発酵システムの構築、及び余剰汚泥を構成する微生物の環境浄化への適用等、微生物学を基礎とした複数の見地から活性汚泥の有効利用法を検討し、当該分野に新知見を与えたものとして学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと判断した。