

氏名(本籍)	たけだ 武田	みのる 稜(島根県)
学位の種類	博士(農学)	
学位記番号	博甲第969号	
学位授与年月日	平成4年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当	
審査研究科	農学研究科	
学位論文題目	放線菌の産生するバイオフィロキュラントに関する研究	
主査	筑波大学教授	工学博士 中村以正
副査	筑波大学教授	農学博士 中原忠篤
副査	筑波大学助教授	工学博士 国府田悦男
副査	筑波大学教授	農学博士 山口彰

## 論文の要旨

活性汚泥を利用した水処理は、現在、有機性排水の生物学的処理としてもっとも広く普及している。この方法では、活性汚泥が沈降性のよいフロックを形成することが、処理の円滑化の必要条件である。しかし、汚泥の一部が浮上するバルキングと称する異常現象が生ずることがあり、処理に大きな障害となる。その原因として、これまで放線菌の異常増殖が示唆されていた。一方、浮上汚泥から単離された放線菌が微生物の凝集を促進する作用をもつことが見出された。

本研究は、浮上汚泥から単離した放線菌及び別に土壌から単離した放線菌により産生されるバイオフィロキュラントの性状と、凝集作用発現に及ぼす諸因子の影響を実験的に明らかにした。さらに、放線菌の増殖に対する炭素源の影響について検討した。これらの結果より、従来、活性汚泥過程における有害細菌と考えられていた放線菌も、適正な増殖が保持されるならば、むしろ、活性汚泥の凝集性を高める効果のあることがはじめて明らかにされた。

### (1) *Nocardia amarae* YK1の菌体表層蛋白質の凝集促進作用と細胞表層物質の疎水性

*N. amarae*を蒸留水で十分に洗浄して得た細胞洗浄液を乾固し、乾固物を添加した培地で*Escherichia coli*その他の分散性細菌を培養したところ、増殖に伴い細菌細胞の凝集がもたらされた。従って、本菌の細胞表面には細菌の凝集を引き起こす作用を持つ物質の存在が示唆された。本菌の細胞表層は、網目状の構造体によって覆われていることが、電子顕微鏡観察によって判明した。この構造体は0.05-0.1Nの水酸化ナトリウム及び塩酸により溶脱され、それらの溶脱液から二種類の酸性蛋白質と一種類の塩基性蛋白質が回収された。

これらの蛋白質はいずれも単独では中性下で水に溶解したが、混合すると沈澱を生じた。この沈

殿は細胞外構造体の再構成物と考えられた。即ち、細胞外構造体は、これら三種の蛋白質によって構成されると予想された。三種の蛋白質のうち、最も多量に回収される分子量約12,600の酸性蛋白質は、中性下で懸濁粒子の凝集をもたらす作用を有した。その作用はイオン強度や多価カチオンの濃度の上昇によって促進された。しかし、鉄イオンを添加し過ぎると作用は阻害された。蛋白質の添加濃度が高過ぎても凝集は起こらなくなった。

*N. amarae*の増殖に及ぼす種々の炭素源の影響について検討した。本菌は中性脂肪を炭素源として培養すると、気液界面に浮上して急速に増殖し、多量の菌体がえられた。炭化水素を炭素源としたときは、増殖に一週間以上を要した。高級脂肪酸は増殖を阻害した。糖、有機酸などの水溶性炭素源の場合は、菌体は浮上せず、液中に分散して増殖した。また、回収した細胞表層蛋白質を混合することによって再構成した細胞外構造体は、疎水性物質に親和性を示し、細胞表面の疎水性の向上に寄与しているものと考えられた。

## (2) *Rhodococcus erythropolis* S-1の産生する菌体外蛋白質の凝集促進作用と疎水性物質による細胞表面への蛋白質の蓄積

*R. erythropolis*を糖を炭素源とする倍地で培養した後、えられた培養液に硫酸アンモニウムとブタノールを添加すると沈澱が生じた。この沈澱画分には懸濁粒子を凝集させる作用が認められた。これをフロキュラント標品として分析した。培養液をメンブランフィルター(孔径0.22 $\mu$ m)によってろ過すると凝集能が失われたことより、フロキュラントは培養液中で微粒子を形成していることが示された。フロキュラントは、両親媒性溶媒(ピリジンまたはジオキサン)と水の混合液に可溶であることが明らかとなった。この混合液中で、フロキュラントは、 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ の高分子物質となって溶解していた。

フロキュラント標品はSDS-PAGEによって多数のバンドが検出された。即ち、フロキュラントは多種類の蛋白質から成り、水中ではそれらが会合して微粒子を形成するものと考えられた。フロキュラントの作用発現には多価カチオンの添加が不可欠であった。凝集作用はカチオン濃度の上昇により促進された。しかし、鉄イオンの過剰添加は凝集作用を阻害した。また、フロキュラントの過剰添加も凝集を阻害した。

*R. erythropolis*は炭化水素を基質として培養すると、糖を基質とした場合よりも速やかに増殖した。炭化水素培地での培養で、菌体は繊維状のフロックを形成して培養液表面に浮上した。この際、培養液には凝集活性が見出されなかった。菌体フロックを50%のピリジン溶液で洗浄すると、フロックは破壊されて菌体は分散した。その洗浄液に硫酸アンモニウムとブタノールを添加すると沈澱が生じた。これを回収し、SDS-PAGEにより分析した結果、その泳動パターンは、糖を炭素源とした培養で培養液中に拡散したフロキュラントのそれと一致した。従って、炭化水素を炭素源として培養したときには、フロキュラントは細胞表面に蓄積してフロック化をもたらすことが明らかとなった。

以上の研究結果から、放線菌はバイオフィロキュラントを産生し、活性汚泥中の占有率が過剰とならない限り、活性汚泥の凝集性を高める効果のあることを指摘した。また、このフロキュラントは

単純蛋白質であり、従来考えられていた多糖だけではなく、蛋白質もフロキュラントとしての機能を発揮することが明らかとなった。さらに、放線菌の異常増殖の要因及び放線菌細胞の疎水性の役割についても明らかにした。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、従来、活性汚泥法による水処理プロセスにおける異常現象に見出される放線菌が、単純蛋白質から構成されるバイオフィロキュラントを産生すること、及び、これら放線菌の活性汚泥中の占有率が適正であれば、むしろ活性汚泥の凝集性を高める効果があり、プロセス管理上有効であることをはじめて明らかにしたものである。この知見は、学術上のみならず実際の活性汚泥法による水処理プロセスの管理にも有用な示唆を与えるものであり、非常に高く評価できるものである。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。