

させる。このため、現在の農法には取り入れがたい側面があり、根本的に解決する方法の提示が必要である。

都市周辺の農地では臭気の問題から畜産業が行い難くなり、それに伴い地方の畜産が大規模化してきている。流通運搬のコスト削減により、朝、北海道で搾った牛乳が昼には都市部に届くようになった反面、生産により発生した家畜糞尿は道内に積み残されたままとなる。このような飼料自給率が低く、輸入飼料により生産が行われている現状に対し、家畜糞尿を利用した自給率の向上により着目したところである。しかしながら、耕地の開発や人手の確保が制限因子となり、遅々として進展していない現状にある。

農林水産省農業研究センター 1998年8月(No.70)発行の1995年における負荷マニュアル(参考文献1)においても、実際の農業現場では堆肥の広域流通が考えられている。しかしながら、根本的に農家サイドでの偏在化が考慮されていない。これは、実際の農業現場におけるハンドリングの悪い場所へ堆肥の運搬が困難であること、実際に家畜糞尿を撒くことが出来る農家の実態が考慮されていないこと等にもかかわらず耕地が決められているためである。また、家畜糞尿は堆肥化の後に利用されることを想定されてきたが、実際には堆肥化前に直接畑地に撒かれ、耕運の後に作物生産に供されているのが実態である。現在、ほとんどの研究者はコンポスト化の後に再利用されるのが大部分であると誤解しているが、実際の営農の多くは生フンをそのまま用いている場合がほとんどである。

なお、温暖な地方における有機物の分解は早く、耕運という基本的な農業の方法に対して疑問を示す実施例が出始めている。従来人手で行ってきた鋤による耕種法は現在の耕耘機により激しく土壌をかき回すものではなく、作物を植える場所を荒く起こす程度である。すなわち、水田における不耕起直播という方法に似た、畑地の表面を除草のために軽く削るだけの方法である。この方法は当研究での成形ポットや成形ブロック苗の機械化による定植時に重要な要素となる。農家側の理解を得るため、大学内において先に基礎的な実証を行う必要がある。特に、成形ブロックの使用に際しては、置いておくだけという方法が好まれており、耕耘機で土壌の表面を耕運すると同時に苗を落とし込む装置を作ることが普及に対して必須の要素となる。

#### 4.2.3 食料生産に係る社会的問題

浄化槽汚泥は農業利用が可能な有機性廃棄物として有効ではあるが、カリウムやカルシウム、マグネシウムなどの成分が不足している。これは生活排水の性状を考えれば当然のことである。現在の日本社会における食料の殆どは輸入に頼っているとと言っても過言ではなく、和牛や有機農産物の嗜好が増加してきているとはいえ、輸入作物より相対的に若干高い価格で販売されている。消費者としては安価で安全らしきものであればよく、国産、輸入の区別をして購入しているのは極僅かの層である。

各年齢層に農産物や食品素材に対し、アンケートを実施した場合を想定すると、年齢層

が若くなるほど、その知識が欠落していることになると考えられる。

このような現状のなか、農業人口が高齢化し、兼業化が進んでいる現在の農業形態の中で、専業農家では安定した収人が得難いことから、後継者の育成も困難を極めている。これらのことは食料の安全保障を考えることが根本的に出来ない、あるいは考えることにすら思い至らない、という根本的な問題となりつつある。これは今一度食料が危機的な状況になり、大量の餓死者が出るほど行き詰まらなければ気が付けないことなのかも知れない。経済大国という仮面がはずれたときに周辺近隣諸国の興亡に気づき、産業の再構築を図ったところで手遅れである。食料輸入のために輸入超過国になりつつある現状に気づきたいものである。

#### 4. 2. 4 汚泥発生・処理問題の根本原因

汚泥や有機性廃棄物の処理をする上で、何が根本原因であるのかは避けて通れない問題である。我が日本国の人口は原材料と食料を輸入に頼り、工業製品を輸出することで成立してきた。国土の耕地状態は化学肥料に頼ったため荒廃を招き、小麦の輸入増加と稲作の減少が認められる。一方、国土の特質上、畑地からの肥料成分による地下水汚染は急激な勢いで進行しつつある。この様な環境下で食料を輸入に頼り加工貿易を行ってきたはいるが、諸外国への技術流出は激しく、日本国でなければ加工出来ないという状態では無くなっている。

現在、汚泥や有機性廃棄物の農地利用に対しての最大の障害は、農業人口の高齢化と施肥体系に基づく環境汚染型の農法に起因していると言っても過言ではない。また、食生活においては食品工場で加工されたものをそのまま利用する形態が主流となってきている。学校給食、ファーストフードやスーパーマーケット、共働きによる家庭内での食事行動の軽視が根底にあり、画一化された味に慣れ親しんでしまうと、地方色豊かな野菜や果物などを受け入れる余地が無くなり、農産物生産の現場でも僅かな種類の農産物を生産しているのが現状である。

消費者に受け入れられやすく定着しているものとしては、牛肉、豚肉、鶏肉、ホウレンソウ、小松菜、白菜、キャベツ、レタス、春菊、ネギ、ジャガイモ、ニンジン、大根、モヤシ、ナス、キュウリ、トマト、カブ等であろう。この他、カボチャや豆類中国野菜や京野菜など細かく分けると多種多様な物があるが、せいぜい30種程度を取り扱っているに過ぎない。この中で更に詳しく品種や味を質問して、どれだけの人が理解をしているのかは疑問である。安全性、危険性という事よりもきれいに見え、調理や加工が楽で保存が利くものに存在価値があり、カボチャやスイカ、大根の1個売りは敬遠されつつある。また冷凍食品の発達から一次加工が施されたカット済み野菜や調理済み野菜が浸透し、手間のかかるものは生産現場からも敬遠されつつある。

一方、トイレの水洗化により排泄物の利用が汚いというイメージを与えているばかりで

はなく、農学を教授するものでさえ、人糞や家畜糞尿を利用した野菜は汚く、化学肥料による生産が清浄野菜や施設栽培の基礎であり、露地栽培を軽視する傾向にある。化学肥料に頼ったために耕地が脆弱化して硬くなり、表土が流出して畑地が荒廃している現状を認識できないのは、生活の基本がサラリーマンにあり、片手間に農業を営む兼業農家の存在が根本的な問題であろう。農地が荒廃していても、適当に生産をしていればお小遣い程度は稼げるという体制に依存している食糧事情は、砂上の楼閣以上の食糧危機を考えなければならぬが、食料を輸入することで近隣諸国の経済発展に寄与しているという見方もあるため、議論されにくい問題である。

現在の日本における汚泥の処分の問題点は、間違いなく食料輸入に起因している。また、農耕地への利用も生産者側の高齢化と、施肥形態に基づく環境汚染型の農法により、行き詰まっているのが現状である。

#### 4. 2. 5 汚泥や有機性廃棄物の行方

現在、汚泥や有機性廃棄物の行方は産業廃棄物として焼却や埋め立て処分が行われ、一部が再利用されている。この再利用率を上げるためには様々な工夫がなされてはいるが、肥料としての需給を考えていないため受身的な状況下であり、積極的な利用促進を行うに至っていない。

都市部において、汚泥や有機性廃棄物を資源として捉える際には、諸外国で実用化されている超高温水により酸化分解を行ってエネルギーを回収する方法が効率的であるが、国内では種々の問題から実用化に達していない。実用化において、コンパクト化がなされれば、地方でのエネルギー需要の緩和だけでなく、都市部においても巨大な資源である生ゴミ、汚泥、食品カスなどを効率的に利用することが可能な、画期的な方法になるものと考えられる。

分別収集にいくらコストをかけても生活の利便性にはつながらない。このため収集後に再分別が必要となり、結果的にリサイクルの効率を落としている。特に生ゴミと可燃物、不燃物の仕分けは徹底しにくく、生ゴミの解決が求められている。

小地域や村落では農業利用や熱エネルギーとしての利用に限定されるが、町や市の領域になると幅が出てくる。生ゴミや汚泥、剪定カスや食品工場、様々な有機物資源が集まることで良質のコンポストやエネルギー需要に寄与することが出来る。メタン発酵やゴミ発電は、ある程度の規模で行うことで経済効果が発生する。大都市においては、収集運搬の簡素化が第一の課題であろう。この場合、一義的にエネルギー変換に集中することで多くの益を見いだすことが出来る。現在の大都市におけるコンポスト化の構想はナンセンスであり、地方や都市の程度に応じた総合的な廃棄物とエネルギー、そして農業資材等への有機性廃棄物と分解性廃棄物の総合的な対策指針を作成する時期に来ているものと思われる。

#### 4.3 苗ポットの製作と課題

現在までの、汚泥の肥効とポットの現状は参考文献2に示した。また、現在までに写真4-1から4-7に示す粒状ペレット、苗ポット、ブロック苗床、角型くい等といった、各用途に応じた成形物を完成させるに至っている。

小麦や澱粉の利用で苗ポット等の成形を行ってきたが、現在の豊富な食環境下の日本では、劣化小麦や工業用澱粉が余っているものの、やはり食料に適用できうるものを利用するには限度とイメージの問題が生じる。そのため、バインダーとして粘着物質を含むおからカスの利用を検討した。その結果、水分含量が高く発酵させ難いおからを成形することで、納豆菌による発酵を可能にすることが出来た。そこで試験板による成形を試みたところ、同等のものが得られたので成形に必要なおから発酵物を得るための工業的発酵法を検討するに至っている。

また、農業に利用する上で育苗培土の価格は高く、セルやプラグ苗やソイルブロックに似たブロック状の苗の作成が出来るような成形加工の方法を模索している。

#### 参考文献

- 1) 農林水産省農業研究センター, 1998, No.70, p.8-9
- 2) 小川人士, 1998, 汚泥の有効利用の展望と課題, 月刊生活排水, Nov., p.27-49

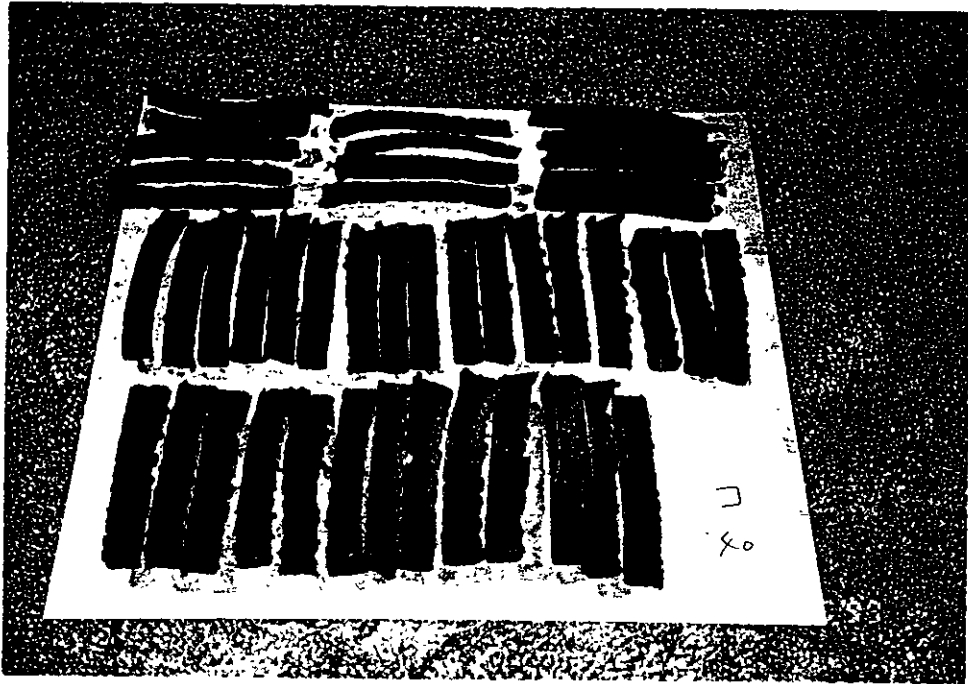


写真4-1 テストピース

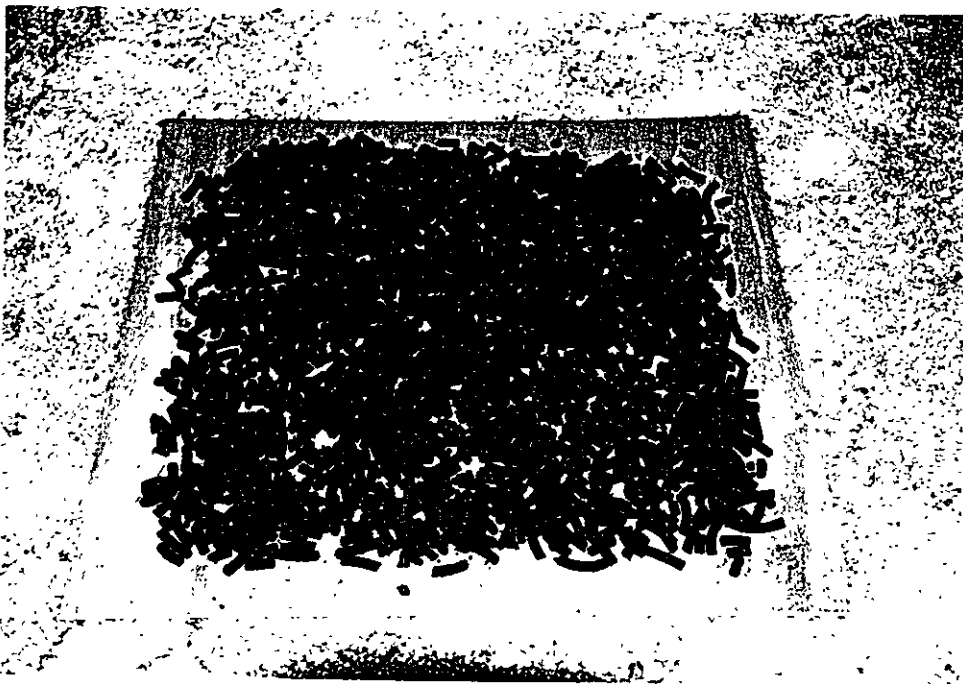


写真4-2 粒状ペレット

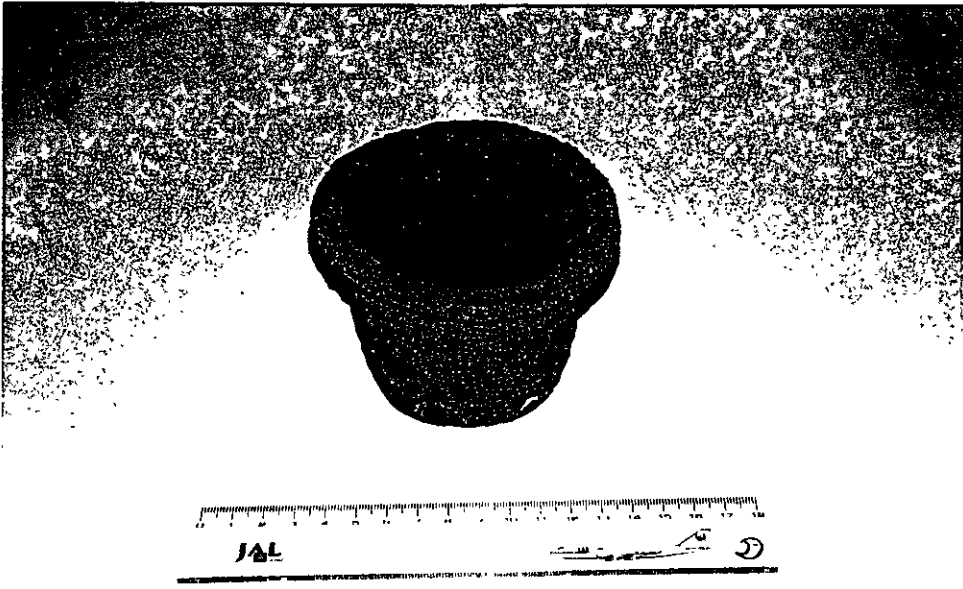


写真4-3 10cm 苗ポット

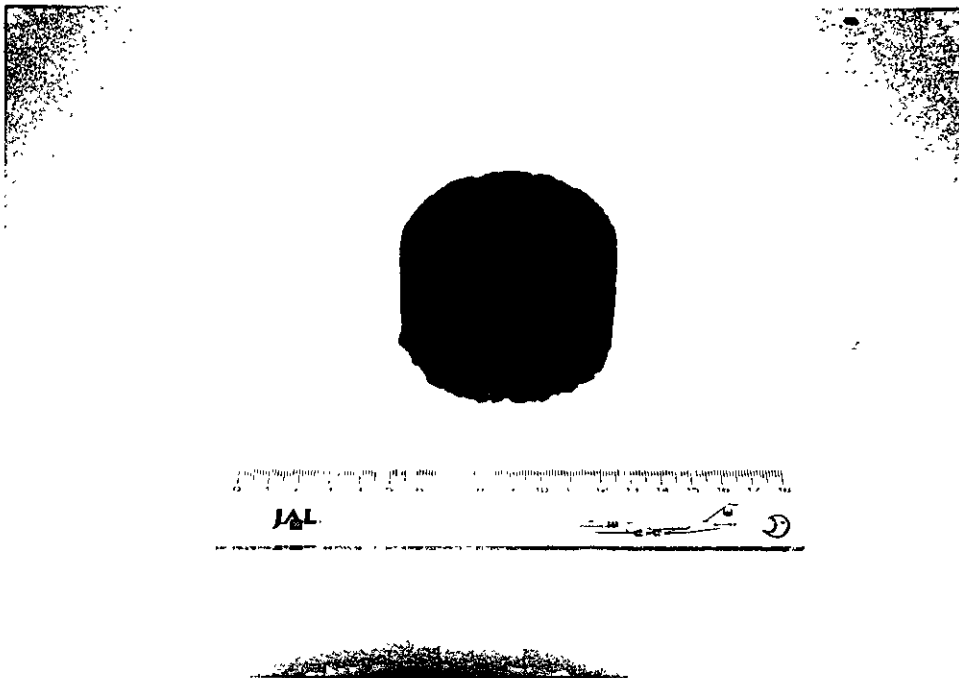


写真4-4 円形ブロック苗床(トマト,キュウリ用)



JAL

22

写真4-5 角型くい



JAL

22

写真4-6 ブロック型苗床



写真4-7 ブロック型基肥



## 第5章 建設材料など他の用途への

### 浄化槽汚泥等の再生技術開発に関する研究

#### 5.1 はじめに

##### 5.1.1 本研究の背景

活性汚泥に生息する微生物のなかにはポリヒドロキシアルカン酸(PHA)、グリコーゲン、ポリリン酸などの高分子物質をエネルギー貯蔵物質として菌体内に蓄積するものがあることは良く知られている。これらのうち、PHAはプラスチックとしての性質を持つポリエステルであり、しかも種々の環境中に生息する微生物により容易に水と炭酸ガスにまで分解されるので、非生分解性の合成プラスチックに代替できる生分解性プラスチック材料として期待される(参考文献)。これらのプラスチックは、排水成分として含まれる有機物あるいはこれら有機物が微生物により代謝されて生成する有機酸を炭素源として生合成されるものであり、基本的にはその合成に新たな原料を必要としない。もし、排水に含まれる有機物、あるいは排水処理過程で生じる余剰汚泥を利用して生分解性プラスチックを効率よく生産できるならば、余剰汚泥の減量を可能にするのは勿論のこと、地球温暖化につながる二酸化炭素の固定化、さらにはプラスチック素材の供給に貢献できる。

最近、浄化槽による排水の高度処理が推進されつつあるが、排水処理に伴って発生する余剰汚泥の処理の問題が新たな環境破壊を引き起こす危険性があり、余剰汚泥の有効利用方法の開発が緊急を要する課題となっている。有害物質を環境中に放出しない、いわゆるゼロエミッションの要求はこの余剰汚泥の処理の分野においても今後益々厳しくなると考えられる。

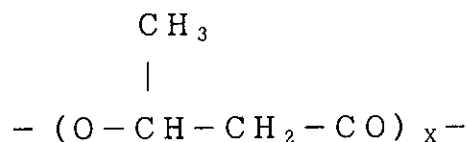
排水に含まれる有機物をPHAに変換する微生物が汚泥中に存在することは、浄化槽に集められた下水や排水に含まれる有機物を混合微生物により資化あるいは最終的に二酸化炭素にまで分解してしまうのではなくて、PHAという有機物に変換、回収できることの可能性を示唆している。排水中の有機物を再生可能な資源としてとらえ、これから生分解性プラスチックPHAを生産するプロセスは、循環型の持続可能(サステイナブル)なプラスチック材料系の構築に貢献できる可能性を持つ。

最近、実験室規模の嫌気好気排水処理実験の過程で高効率でポリヒドロキシアルカノエートを生産できるようになっており、排水処理活性汚泥のような混合環境微生物を利用して生分解性プラスチックを効率的に生産可能なことが示唆される。しかし、これらの実験では、汚泥に含まれる微生物を利用して、外から添加した炭素源化合物をプラスチックに変換しており、汚泥の減量化と有効利用という観点からは疑問が残る。また、この活性汚泥プロセスによりPHAを高効率生産するためには、活性汚泥をかなりの期間にわたり馴養してPHA生産に適した微生物相に変換する必要がある。さらに、活性汚泥中の微生物

相を安定に維持することは簡単ではない。活性汚泥中の微生物相が変化すると、P H A 生産性が変化するばかりでなく、生産される P H A の品質も変化するので好ましいことではない。

微生物の産生する P H A が生分解性プラスチック材料として注目されるようになったのはつい最近のことであり、微生物産生 P H A を工業材料として実用化してゆくためにはその生産プロセスの研究はもとより、構造と物性の解析、応用・利用分野の開発など、今後解決しなければならない多くの検討課題を抱えている。

現在知られている代表的な微生物由来 P H A はポリ (3-ヒドロキシ酪酸)、P(HB)、



である。P(HB) は高結晶性で硬くて脆く、しかも融点付近の温度で速やかに熱分解するので熔融成型、加工が困難であることが欠点であり、物性の改善が望まれている。P(HB) の欠点を改善する方法として HB の共重合体を合成する方法と、P(HB) と異種の高分子材料を組み合わせる複合化する方法の 2 通りの方法が考えられる。

### 5. 1. 2 本研究の目的

本研究の目的は、浄化槽排水処理過程で発生する汚泥を利用する生分解性プラスチック生産を実用化してゆくための基礎的研究として、

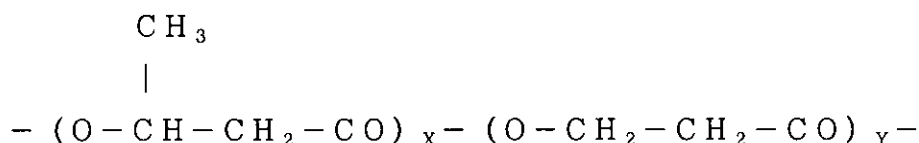
- (a) 浄化槽汚泥を原料とする P H A 生産プロセス
- (b) 微生物により高品質 P H A を生産するための微生物培養条件

の検討を行うことである。

微生物による P H A の生産では、微生物の増殖を制限する条件を設定しないと高効率での P H A 生産を達成できないことが多い。現在、高効率 P H A 生産菌として実用化されている水素細菌 *Alcaligenes eutrophus* の場合には、増殖を制限するために窒素源を制限して培養を行っている。しかし、浄化槽汚泥から P H A を生産使用とする場合、窒素源化合物を除去することは非現実的である。一方、窒素源存在下で *Alcaligenes latus* は増殖しながら P H A を高効率で産生することが最近わかった。そこで本研究では *A. latus* 株を使用して、浄化槽汚泥からの生分解性プラスチックの直接生産を検討した。

私どもは、微生物により生合成した共重合 P H A は広い単量体組成分布を持つことを従来の研究で明らかにしてきた。共重合体の固体構造と物性は単量体組成に大きく依存するので、組成分布があることは共重合体の性質が不均一になることを意味する。したがって組成分布が生じる原因を明らかにし、組成分布を持たない、均一性状の共重合体の合成条

件を検討することは重要である。ここでは、*A. latus*による3-ヒドロキシ酪酸-3-ヒドロキシプロピオン酸共重合体、P(HB-co-HP)、



の合成について、培養時のpH値と酸素濃度が単量体組成分布に及ぼす影響を検討した。

## 5.2 浄化槽汚泥からの生分解性プラスチックの直接合成

### 5.2.1 実験

浄化槽汚泥試料として、日本環境整備教育センターより提供された嫌気性ろ床清掃汚泥、中規模長時間曝気余剰汚泥、及び屎尿処理施設反応タンク汚泥の3種を使用した。常法により滅菌処理した汚泥試料に、凍結保存状態から解凍した*A. latus*菌体(ATCC29713)を接種し、坂口フラスコ(500ml×10本)による振とう培養を、設定温度30°C、初期pH7.0にて48時間行った。培養終了後、菌体を遠心分離、凍結乾燥したうえで常法によりPHAをクロロホルム抽出した。培養中のpH値の調節はしなかった。

### 5.2.2 結果と考察

昨年度の実験では、浄化槽汚泥をそのまま使用して*A. latus*の培養を行ったがPHAの生合成を確認することはできなかった。原因はいまだに不明であるが、本年度の研究では、汚泥に含まれる有機物からのPHA生産の可能性の実証を目的とし、PHA生産菌が容易に資化できると考えられる水溶性有機物からのPHA生産を検討することとした。そこで、浄化槽汚泥を濾紙にて濾過して不溶物を除去し、濾液のみを以下の培養に使用した。坂口フラスコによる振とう培養、及びジャーファーマンターによる培養のいずれの場合においても、数時間の誘導期間の経過後に菌体の増殖が認められた。しかし、熱クロロホルム抽出によってはPHAは回収されなかった。すなわち検出可能量のPHAは産生されていないことが分かった。

PHAの生産を確認できなかった原因を知るために、汚泥に含まれる水溶性有機物の全濃度(TOC)を全有機体炭素計(島津TOC-5000A)により測定した。結果を表5-1に示す。表5-1から、汚泥濾液に含まれる水溶性有機物の濃度(TOC値)は100ppm以下であり、PHA生産実験で通常使用している有機物炭素源の濃度(数千ppm以上)に比べて1~2けた以上も小さい。嫌気性ろ床清掃汚泥については、水流アスピレータによる減圧下で10倍濃縮した汚泥サンプルも調製した。注目すべきことは、10倍濃縮後のTOC値が10倍にはなっておらず、期待値の半分強程度になっていることである。汚泥濾液に含まれる水溶

性有機物のかなりの部分が減圧濃縮操作の過程で留去されるもの、例えば低級アルコール、低級脂肪酸あるいはこれらの誘導体などの揮発性有機物であると推定される。一方、減圧濃縮操作の過程で留去されずに残った水溶性有機物は不揮発性有機物、例えば、低分子量多糖などが考えられる。

表 5 - 1 浄化槽汚泥の濾過液の全有機体炭素濃度 (TOC)

汚泥サンプル	TOC (ppm)
嫌気性ろ床清掃汚泥 (濾過)	51
嫌気性ろ床清掃汚泥 (10倍濃縮後、濾過)	279
中規模長時間曝気余剰汚泥 (濾過)	5
尿尿処理施設反応タンク汚泥 (濾過)	77

*A. eutrophus*、*A. latus* などの単菌を使用した研究によれば、PHAを効率良く生産するための炭素源化合物は酢酸を初めとする低級脂肪酸とブドウ糖やショ糖などの低分子量炭水化物である。今回の実験で使用した浄化槽汚泥の液状部分については含有される有機物の分析をしていないので、PHAが産生されなかった原因を詳細に議論することはできないが、浄化槽汚泥の液状部分にはPHA生産の炭素源として適した有望な有機物が含まれていること、しかしPHAが産生されなかったのは有機物濃度が低すぎたことが第一の理由であると今回の実験から推定した。今後の検討課題として、最適菌体の選択と汚泥性状の調整が考えられる。

### 5.3 PHA共重合体の単量体組成に対する培養条件の影響

#### 5.3.1 実験

ミネラル塩水溶液 [蒸留水 1L 中 :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、8.6g :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.5g :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.0g :  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g : クエン酸鉄(III)アンモニウム、60mg : この他に微量の B、Co、Zn、Mo、Ni、Cu 無機塩を含む] とスクロース及び 3-ヒドロキシプロピオン酸 (HP) から成る混合炭素源を含む滅菌処理培地に *A. latus* 菌体 (ATCC29713) を接種し、坂口フラスコによる振とう培養、及びジャーファーメンターによる培養を、設定温度 30°C、初期設定 pH6.0~8.0 にて 28~50 時間行った。培養終了後、菌体を遠心分離、凍結乾燥したうえで常法により PHA をクロロホルム抽出した。生成する P(HB-co-HP) の単量体単位組成は 270MHz  $^1\text{H-NMR}$  (日本電子 JEOL GSX270) により決定した。

#### 5.3.2 結果と考察

昨年度の研究において、水素細菌 *A. latus* によりスクロース/3-ヒドロキシプロピオン酸混合炭素源から合成されるプラスチック、P(HB-co-HP)、の単量体単位組成は培地の pH 値に強く依存すること、培地の pH 値を培養中は一定になるように制御した条件で、pH 値

が 8.0 から 6.0 に低下するにつれて、生成 P(HB-co-HP) に導入される HP 単位の組成は大きく増加し、また組成分布は大きくなることを既に明らかにした。

本年度も引き続き P(HB-co-HP) の産生に対する培地 pH の効果を調べた。図 5-1 は、スクロース (15g/l) / 3-ヒドロキシプロピオン酸 (3g/l) 混合炭素源を使用し、培地の初期 pH を 7.0 に設定し、培養中の pH は調整せずに 50 時間まで *A. latus* をファーメンター培養した結果を示す。先ず培地の pH 値の変化に注目すると、培養開始とともに低下し、約 20 時間後には最低値 6.2 に達した後、徐々に上昇し、50 時間後にはほぼ初期値に戻っている。培地 pH 値は培養中に約 1.0pH 単位と大きく変化することがわかった。

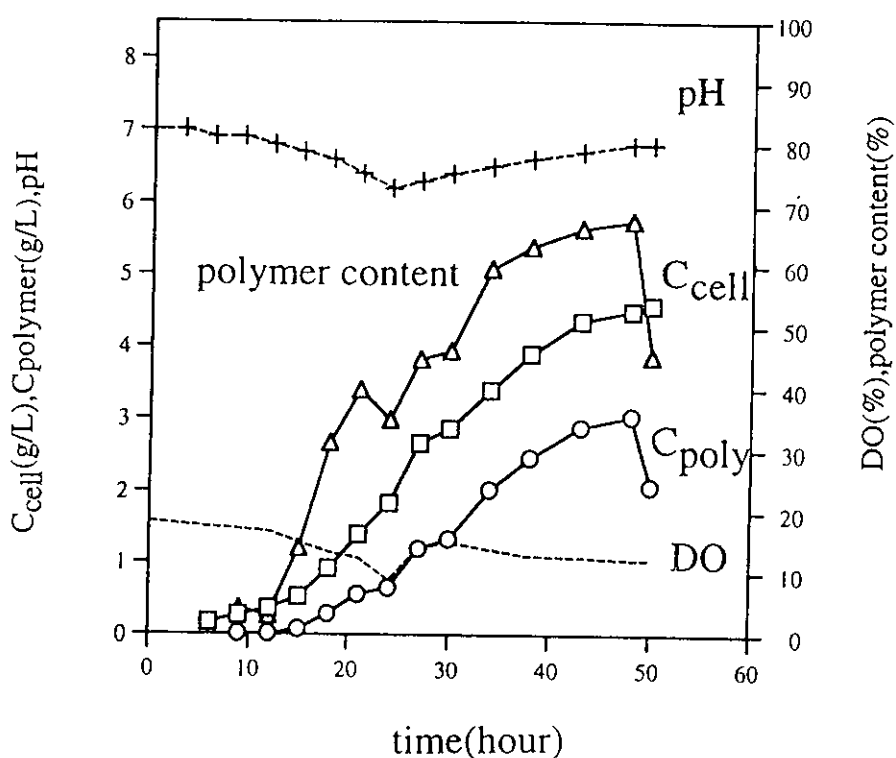


図 5-1 スクロース (15g/l) / 3-ヒドロキシプロピオン酸 (3g/l) 混合炭素源を使用し、30°C、初期設定 pH7.0 にて *A. latus* を培養した時の培地の pH 値と溶存酸素濃度 (DO, %)、菌体重量 (乾燥重量 C<sub>cell</sub>, g/l)、菌体中のポリマー組成 (重量%)、及びポリマー収量 (C<sub>poly</sub>, g/l) の時間変化

図 5-1 には培養時間の経過にともなう溶存酸素濃度 (DO) の変化も示した。DO の変化は菌体の炭素源資化活動に対応し、DO 値が低下している期間は活発な資化が起きていると考えられる。図 5-1 によると、DO 値は培養開始後徐々に低下し、約 25 時間で極小値に達した後、上昇に転じ、約 30 時間後には初期値に戻る。この DO 値の時間変化が pH 値の

変化とほぼ連動していることは注目される。

菌体重量（乾燥）及び菌体に含まれるポリマー量は培養開始後約 10 時間までの誘導期にはほとんど変化しないが、その後いずれも急上昇している。菌の増殖とともにポリマーを蓄積していることがわかる。50 時間後には菌体重量とポリマー量は減少している。これは培地の炭素源が消費し尽くされたためと考えられる。

図 5-2 には、図 5-1 で示した条件にて培養を行ったときに生成する P(HB-co-HP) の HP 単位組成の時間依存性を示す。培養時間の経過とともに HP 組成が単調増加しており、時間経過とともに HP 組成の高いポリマー鎖が新規合成されることがわかる。

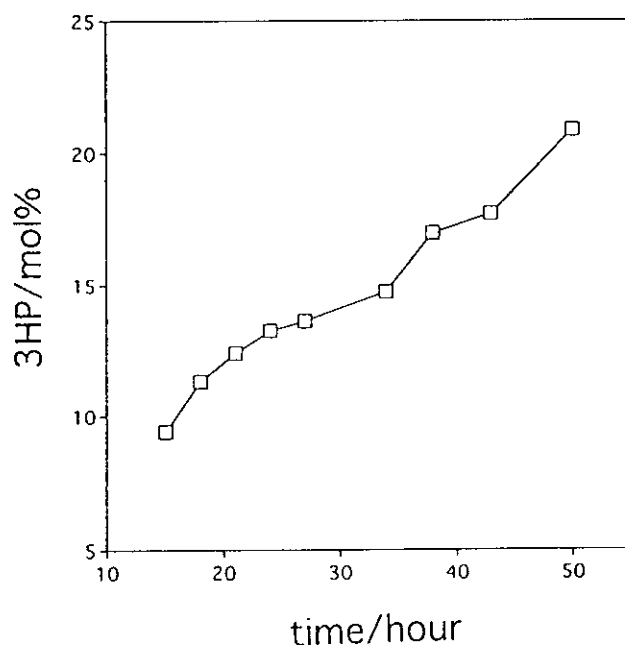


図 5-2 図 5-1 に示した培養により生成する P(HB-co-HP) の HP 単位組成の時間依存性

図 5-2 の結果から、培養時間の経過とともに、生成 P(HB-co-HP) の HP 単位組成が増加するばかりでなく、組成分布も広がると考えられる。この予測を確認した実験結果を図 5-3 に示す。これは、図 5-1 に示した条件で行った実験において、培養時間 30 時間後、及び 50 時間後に採取した P(HB-co-HP) の組成分布である。

分別前の HP 組成と分別後の分布幅はそれぞれ (a) 30 時間後で 13 モル%と 11.6~15.9 モル%、(b) 50 時間後で 19 モル%と 15.1~24.9 モル%であり、予測したとおり培養時間の経過とともに、HP 単位組成が増加し、組成分布が広がっている。図 5-1 から培地の pH と DO が培養中に変化することがわかったので、これらが P(HB-co-HP) の HP 単位組成に及ぼす影響を検討した。

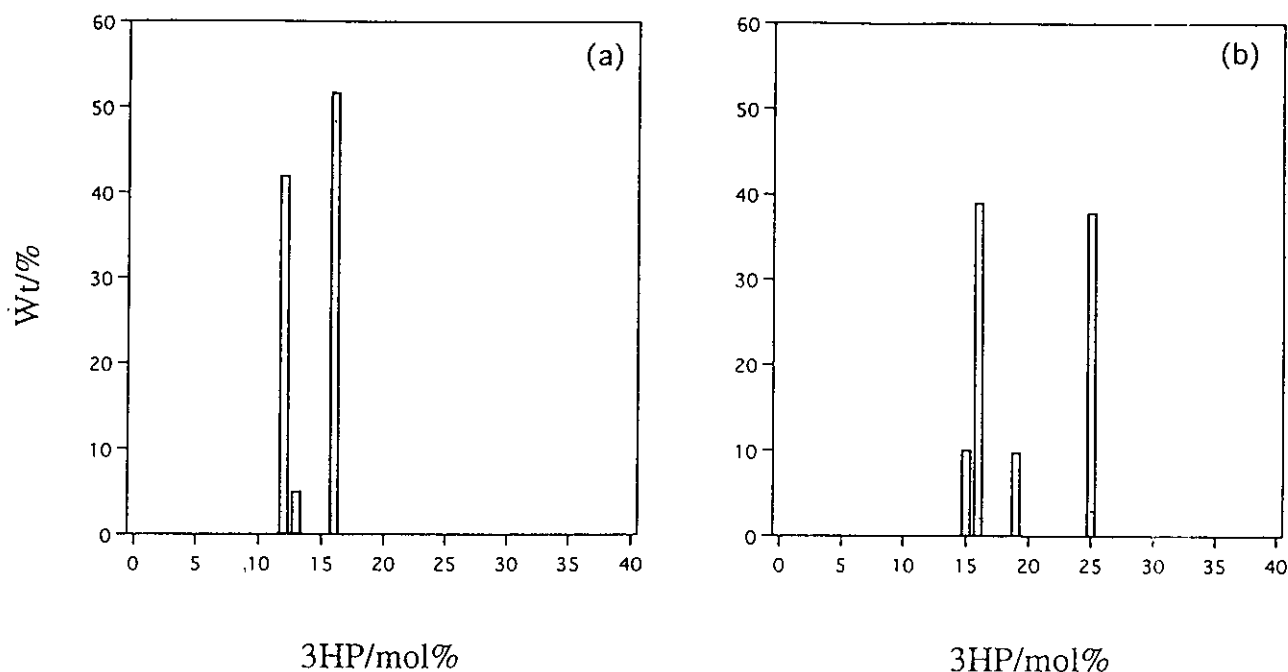


図 5 - 3 図 5 - 1 に示した培養において、30 時間後 (a) 及び 50 時間後 (b) に採取した P(HB-co-HP) の HP 組成の分布

表 5 - 2 には培地の pH 値を 6.5 に維持し、D0 値を 5、10、15% に制御したときの培養結果を示す。

表 5 - 2 から D0 値が 3 倍変化しても生成する P(HB-co-HP) の HP 組成がほとんど変化せず、したがって検討した D0 値の範囲では、溶存酸素量は P(HB-co-HP) の HP 組成にほとんど影響を及ぼさないことがわかった。

表 5 - 2 培地の溶存酸素濃度 (D0) の影響 (温度 30°C、pH6.5、培養時間 42 時間)

D0 (%)	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリマー組成 (%)	ポリマー中の HP 組成 (モル%)
5	7.6	4.6	19.3
10	7.2	6.7	18.8
15	5.7	6.2	20.2

培地の pH 値が P(HB-co-HP) の HP 組成とその分布に及ぼす影響については、昨年度の研究においても検討し、一部の結果は既に報告した。図 5 - 4 には図 5 - 1 に示したのと同様の培養を、初期設定 pH 値 6.5 にて、培養中は pH 一定に制御 (a)、及び pH 制御せず (b) に行って得た P(HB-co-HP) の HP 組成分布を示す。

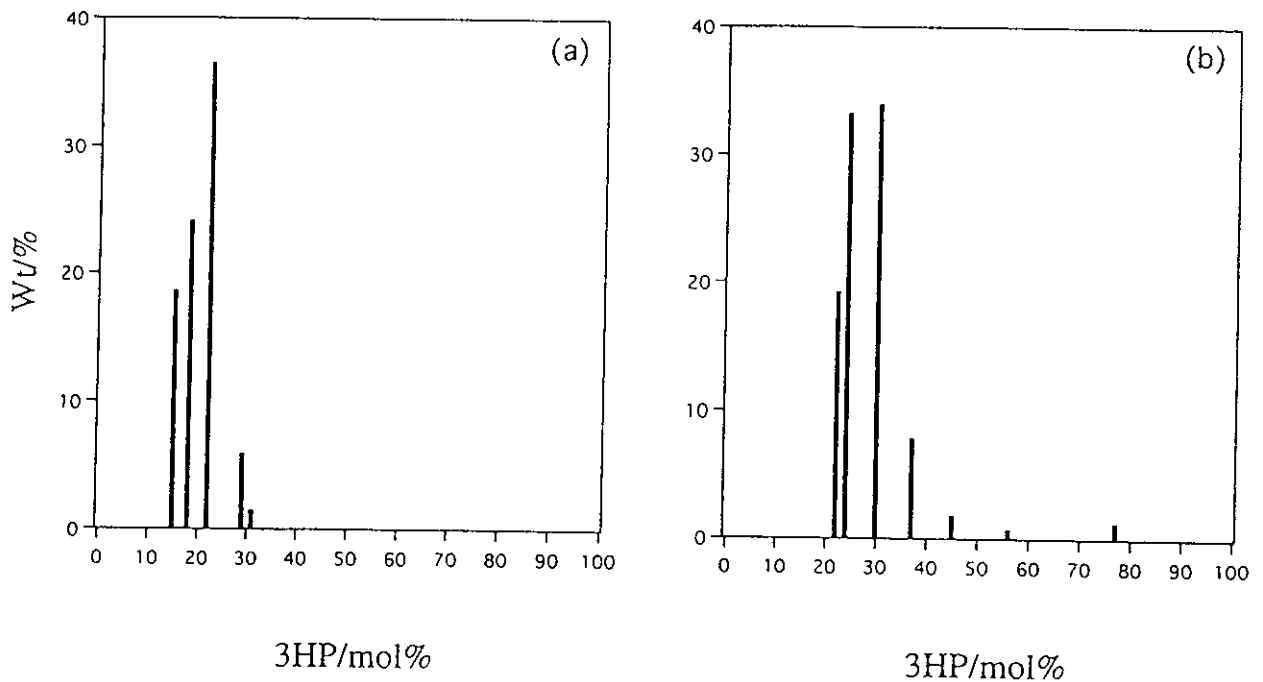


図5-4 スクロース (15g/l) /3 ヒドロキシプロピオン酸 (3g/l) 混合炭素源を使用して 30°C、初期設定 pH6.5 とし、(a) 培養中は pH 一定、及び (b) pH 値を制御せずに *A. latus* を培養した時の生成 P(HB-co-HP) の HP 組成分布

分別前の HP 組成と分別後の分布幅はそれぞれ (a) pH 6.5 にて一定とした培養では 23.0 モル%と 15.1~31.4 モル%、(b) pH 無制御の培養では 29.8 モル%と 20.0~77.2 モル%であった。pH 値を制御せずの培養では、生成する P(HB-co-HP) の HP 組成が著しく増加するとともに組成分布は大幅に広がることからわかる。しかし、pH 6.5 にて一定とした培養でも HP 組成分布の幅は約 16 モル%であり、これは図5-3 に示した初期設定 pH 7.0 で pH を制御せずに培養を行った場合の分布幅 4~10 モル%に比べて大きい。この結果は、単純に pH 値のみで組成分布を説明できないことを示す。しかし、培地の pH 値を制御することにより、HP 組成の異なる、したがって物性の異なる、また組成分布の狭い、したがって物性の均一性の高い共重合ポリエステルを生合成できることがわかった。

#### 5.4 まとめ

水素細菌 *A. latus* の培養により、浄化槽汚泥に含まれる炭素源から生分解性プラスチックを直接生産することを目的として、本年度は汚泥中の水溶性有機物からのプラスチックの生合成を検討した。3種の浄化槽汚泥サンプルを使用した。いずれの場合にもプラスチックの生合成は達成できなかった。原因として、汚泥中の水溶性有機物の濃度が低すぎ



ることが考えられた。

水素細菌 *A. latus* により、スクロース/3-ヒドロキシプロピオン酸混合炭素源から共重合ポリエステル、P(HB-co-HP) を合成した。培地の pH 値と溶存酸素濃度は培養中に大きく変化した。生成する P(HB-co-HP) の HP 単量体単位組成とその分布は、培地 pH に強く依存するが、DO への依存性は小さいことがわかった。培地の pH 値は培養中一定になるように制御すると組成分布は小さくなることがわかった。

[参考文献：総説]

(1)Y.Inoue:Solid-State Structure and Properties of Bacterial Copolyesters;  
J.Molecular Structure, vol.441,119(1998)

(2)Y.Inoue:"Biodegradable Polymers", in "Solid-State NMR of Polymers", Ed. by I.Ando  
and T.Asakura, Elsevier, Amsterdam, 1998.

(3)A.Cao,K.Kasuya,H.Abe,Y.Doï,Y.Inoue:"Studies on comonomer compositional  
distribution of the bacterial poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic  
acid)s and crystal and thermal characteristics of their fractionated component  
copolyesters ";Polymer vol.39 No.20,Elsevier Science Ltd,1998

## 第6章 浄化槽汚泥ファージに関する研究

### 6.1 はじめに

浄化槽汚泥の中には腸内細菌を始め様々な細菌が存在し、それらに感染する多種多様なファージが共存している。これらファージは、浄化槽汚泥を形成する微生物生態系において、各菌体のポピュレーションのコントロールや遺伝子の伝播などを通じ、汚泥を形成する微生物叢のダイナミックな変動に深く関わっているものと考えられている。しかし、これらファージが汚泥の微生物学的特性の変動にどのように関与しているかの知見はほとんど得られていない。また、汚泥から新規ファージをスクリーニングすることは比較的容易にでき、それらの遺伝子構造を解析することにより、今までにない活性を持った新規酵素の探索が期待できる。

また、糞便性大腸菌群と大腸菌ファージの間には明確な相関関係が見られ、衛生指標細菌やウイルスの代替指標としてバクテリオファージを用いることが出来ると考えられる。浄化槽汚泥内に存在する個々の衛生指標細菌数を測定することは難しいが、各種衛生指標細菌に特異的に感染するファージ濃度を分析することは比較的簡便に出来る。したがって、浄化槽汚泥中の各種細菌に対するファージ濃度の変化を解析することにより、それらファージの宿主である衛生指標細菌の浄化槽汚泥内での消長を推定することが可能となる。さらに、ファージ濃度を指標に用いることにより、より衛生的な汚泥の処理方法を検討することも期待出来る。

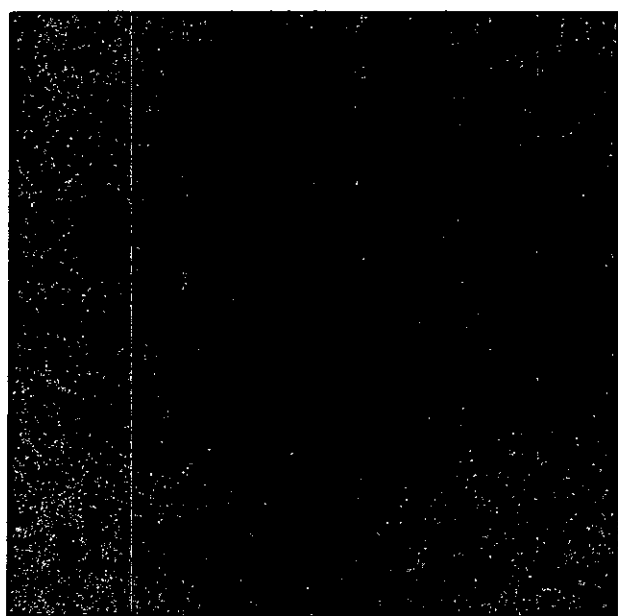
本年度は、上記観点からし尿及び浄化槽汚泥中に存在するファージ濃度を10種の衛生指標細菌を用い解析し、それらの汚泥内存在形態及び経時的变化を測定した。さらに、グラム陽性細菌であるバチルスに感染するファージから、新規溶菌酵素をコードする遺伝子のクローニングを行った。

### 6.2 浄化槽汚泥からのファージの検出

衛生指標細菌として大腸菌2種、シュードモナス2種、バチルス2種、マイクロコッカス2種及びスタヒロコッカス2種を用い、各菌種に感染するファージをプラークアッセイ法により検出した。使用した汚泥は、長時間ばっ気方式の汚泥濃縮槽の汚泥（以下、濃縮槽汚泥とする）と汲取りし尿及び浄化槽汚泥をし尿処理施設へ搬入する前に一時的に貯留しておくためのタンクから採取した汚泥（以下、貯留槽汚泥とする）の2種類である。

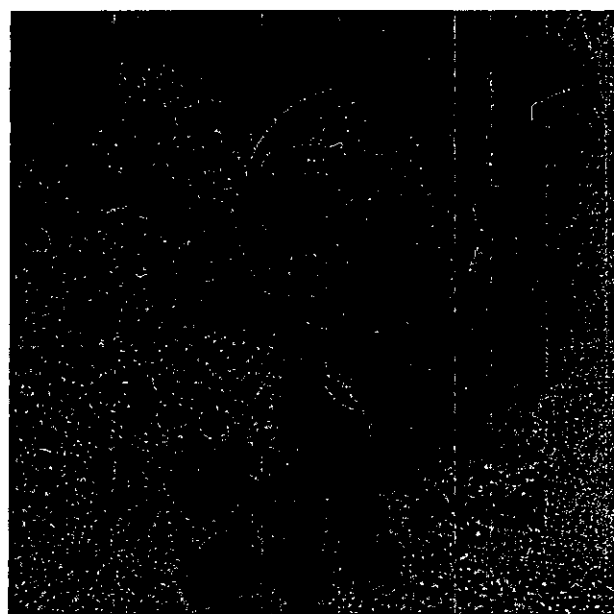
自然界に存在するファージやウイルスの多くは懸濁固形物に吸着された状態で存在していることが報告されている。そこでまず最初に、両汚泥の固形分の割合と微生物叢の特徴を解析した。汚泥検体を充分攪拌した後、その1mLを分取し、12,000rpm、10分間の遠心により沈殿した画分を懸濁固形物と定義したところ、固形懸濁物割合は濃縮槽汚泥が20.5%、貯留槽汚泥が2.1%であった。両汚泥の光学顕微鏡による観察結果を図6-1に

示す。濃縮槽汚泥は一般の家庭排水処理場などに用いられている活性汚泥を形成する微生物叢に近似しており、数十～数百 $\mu\text{m}$ の大きさを持ったフロックの中に *Vorticella* や *Philodina* など多種類の原生動物が観察されたことから、比較的安定な生物叢から構成されているものと考えられた。一方、貯留槽汚泥には 10  $\mu\text{m}$ 以上のフロックはほとんど存在せず、様々な細菌や遊離の原生動物が見られた。



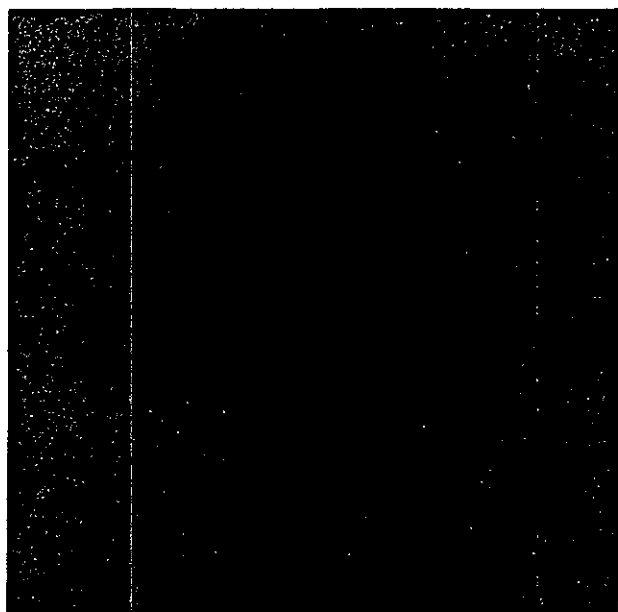
A 濃縮槽汚泥

100  $\mu\text{m}$



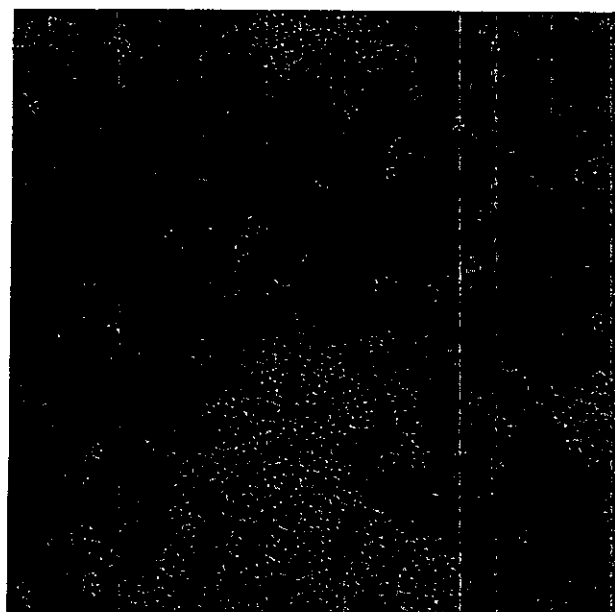
B 濃縮槽汚泥

50  $\mu\text{m}$



C 貯留槽汚泥

100  $\mu\text{m}$



D 貯留槽汚泥

50  $\mu\text{m}$

図 6 - 1 浄化槽汚泥の顕微鏡観察

各汚泥の上清 (12,000rpm, 10min, 4°C遠心分離後) と固形懸濁物中のファージ濃度をそれぞれ測定した。上清中のファージ濃度は遠心分離により得られた上清を 0.45 mmのフィルターにより浮遊細菌を除き、ブランクアッセイ法により行った。固形懸濁物中に存在するファージ量は、遠心分離により得られた沈殿物に溶出液 (1%NaCl, 0.1%ほう酸緩衝液 pH10)を遠心分離前の検体汚泥相当量加え、充分攪拌後室温に 3 時間放置し、その上清 (12,000rpm, 10min, 4°C遠心分離後) から 0.45 mmのフィルターにより浮遊細菌を除き、ブランクアッセイ法により測定した。実験は試料採取後 3 日間冷暗所保存後に行い、さらに両汚泥を嫌気条件下、暗所、室温で 8 日間 (合計 11 日間) 放置後のブランクアッセイもあわせて行った。試料採取 3 日後の結果を表 6-1 に、11 日後の結果を表 6-2 にそれぞれ示す。

表 6-1 浄化槽汚泥中のファージ濃度とその経時的変化(試料採取 3 日後)

単位: PFU / ml

宿主細菌名	濃縮槽汚泥		貯留槽汚泥	
	上清	固形懸濁物	上清	固形懸濁物
<i>E</i> <sup>*1</sup> . <i>coli</i> JM109	0×10 <sup>1</sup>	8.75×10 <sup>4</sup>	1.92×10 <sup>4</sup>	0×10 <sup>1</sup>
<i>E. coli</i> JA300	0×10 <sup>1</sup>	2.45×10 <sup>3</sup>	4.2 ×10 <sup>3</sup>	3×10 <sup>1</sup>
<i>P</i> <sup>*2</sup> . <i>aeruginosa</i> (PAO1)	0×10 <sup>1</sup>	6.1 ×10 <sup>3</sup>	6.4 ×10 <sup>1</sup>	0×10 <sup>1</sup>
<i>P. putida</i> (Ppy101)	0×10 <sup>1</sup>	4 ×10 <sup>1</sup>	1.0 ×10 <sup>2</sup>	0×10 <sup>1</sup>
<i>B</i> <sup>*3</sup> . <i>amyloliquefaciens</i> (IAM1521)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0×10 <sup>1</sup>
<i>B. cereus</i> (IAM1029)	0×10 <sup>1</sup>	2 ×10 <sup>1</sup>	1.0 ×10 <sup>2</sup>	0×10 <sup>1</sup>
<i>M</i> <sup>*4</sup> . <i>luteus</i> (IAM1056)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0×10 <sup>1</sup>
<i>M. roseus</i> (IAM12147)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0×10 <sup>1</sup>
<i>S</i> <sup>*5</sup> . <i>aureus</i> (IAM1011)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0×10 <sup>1</sup>
<i>S. epidermidis</i> (IAM1296)	0×10 <sup>1</sup>	1 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0×10 <sup>1</sup>

\*1: *Escherichia*, \*2: *Pseudomonas*, \*3: *Bacillus*, \*4: *Micrococcus*, \*5: *Staphylococcus*

表 6-2 浄化槽汚泥中のファージ濃度とその経時的変化量(試料採取 11 日後)

単位: PFU / ml

宿主細菌名	濃縮槽汚泥		貯留槽汚泥	
	上清	固形懸濁物	上清	固形懸濁物
<i>E</i> <sup>*1</sup> . <i>coli</i> JM109	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	1.71×10 <sup>4</sup>	3.26×10 <sup>3</sup>
<i>E. coli</i> JA300	0×10 <sup>1</sup>	1.0×10 <sup>1</sup>	2.8 ×10 <sup>3</sup>	3.4 ×10 <sup>2</sup>
<i>P</i> <sup>*2</sup> . <i>aeruginosa</i> (PAO1)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	3.2 ×10 <sup>3</sup>	3.9 ×10 <sup>3</sup>
<i>P. putida</i> (Ppy101)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	4 ×10 <sup>1</sup>	1.6 ×10 <sup>2</sup>
<i>B</i> <sup>*3</sup> . <i>amyloliquefaciens</i> (IAM1521)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>
<i>B. cereus</i> (IAM1029)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>
<i>M</i> <sup>*4</sup> . <i>luteus</i> (IAM1056)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>
<i>M. roseus</i> (IAM12147)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>
<i>S</i> <sup>*5</sup> . <i>aureus</i> (IAM1011)	0×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>
<i>S. epidermidis</i> (IAM1296)	2×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>	0 ×10 <sup>1</sup>

\*1: *Escherichia*, \*2: *Pseudomonas*, \*3: *Bacillus*, \*4: *Micrococcus*, \*5: *Staphylococcus*