

論文の内容の要旨

論文題目 高温接触酸化法による水溶性切削油廃液処理における微生物群集解析とジシクロヘキシルアミン分解細菌の解析と分離

氏名 馮 欣

水溶性切削油剤とは、自動車工場などの金属加工工程に使われている潤滑油の一種である。日本国内において年間約 5 万トンの水溶性切削油剤の原液が使用されている（1997 年度）。水溶性切削油剤の原液は 30～50 倍に希釈されてから使用されるため、年間 150～250 万トンの水溶性切削油剤希釈液が使われている計算となり、その大部分は廃液として処理されている。水溶性切削油廃液従来の処理法として、焼却、エマルジョン破壊、凝集沈殿、生物処理及び UF 膜が挙げられる。しかし、水溶性切削油廃液は含油廃水であるために、生物処理では低負荷で処理しなければならず、処理費用が高い。さらに水溶性切削油廃液に含まれている界面活性剤、錆止め剤と防錆剤などは活性汚泥中の微生物活性を阻害し、難分解性物質が分解されず放流先の水系に悪影響を及ぼす恐れがある。したがって、より良い処理法の開発が望まれている。

高温接触酸化法とは高温好気条件下で好熱性細菌より有機物を分解する処理システムである。好気好熱性細菌の有機物分解速度および自己分解速度が速いことから、汚泥の発生量が少ない。また廃液を固体担体に吸収させ処理を行うため、廃液と酸素の接触面積が大きくなり、十分な酸素供給が保証できる。また高温好気条件下で、水分が水蒸気となり系外に排出されるため、処理水も出ない。さらに高温処理であるため、病原菌を死滅させることも可能である。

水溶性切削油廃液処理への高温接触酸化法の適用に関する研究（馮ら、2004）を行った結果、処理が可能であることが判明した。本研究ではさらに高温接触酸化法による水溶性切削油廃液処理における微生物群集解析を行い、処理能力と微生物群集の関連性について検討した。また水溶性切削油廃液処理の問題点の一つは難分解性物質の処理であるため、本研究では水溶性切削油廃液に含まれている難分解性物質ジシクロヘキシルアミン（DCHA）に注目し、DCHA の分解細菌の解析と分離を行った。

第 4 章では高温接触酸化法による水溶性切削油廃液処理の処理能力を調べると同時に、微生物群集解析を行い、処理能力と微生物群集の関連性について考察した。高温接触酸化法により水溶性切削油廃液の処理実験を行った結果、廃液油分の 6～7 割を除去することができた。廃液各成分の減少率を調べた結果、同定できた 7 成分の内に DCHA を除いた他の 6 成分であるドデカン二酸、パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸と p-t-

ブチル安息香酸の減少率は運転期間が長くなるにつれてほぼ 100%に達した。DCHA に関しては運転期間が長くなるに従って、減少率が上昇したとはいえ、最大 80%であった。DCHA の除去は他の成分より明らかに悪かった。また水溶性切削油廃液を投入し始める前に、易分解性有機物を投入して 6 日間通気 (Warm-up 運転) を行なった場合、運転開始直後から高い油分減少率を達成することができた。

PCR-DGGE 法により微生物群集構造を解析した結果、運転期間中に優占種の入れ替わりが見られた。Warm-up 運転が行なわれた場合、実験初期においてはコンポストと酵母エキスを分解する微生物が優占的にリアクターに存在していたと思われる。運転開始後、微生物群集は徐々に廃液処理に適する菌相に変化したと考えられた。

リアクター運転開始 28 日後と 60 日後のサンプルを用いて Cloning-Sequencing を行った結果、28 日後のサンプルから 95 クローン、60 日後のサンプルから 94 クローンが得られた。得られたクローンについて相同性検索を行なった結果、28 日後のサンプルから得られた 95 クローン中 54%が *Bacillus* 属の近縁種であった。一方、60 日後のサンプルから得られた 94 クローン中 72%が *Bacillus* 属の近縁種であった。また *Bacillus* 属細菌以外に、今まで高温接触酸化法による廃棄物・廃水処理の研究例で報告されたことがない *Cohnella* 属、*Tuberibacillus* 属細菌などもリアクター内に存在していた。各サンプルのクローンにおいて 99%以上の相同性をもつものを一つの OTU (Operational Taxonomic Unit) とみなし、28 日後から 15 個の OTU、60 日後から 21 個の OTU が得られた。28 日後のサンプルから最も検出される頻度が高かった OTU28-3 (48%) は *Bacillus thermozeamaize* の近縁種であった。60 日後のサンプルから得られた OTU 60-6 は最も検出頻度が高く (43%)、*Bacillus thermoamylovorans* の近縁種であった。

第 5 章では水溶性切削油廃液中に含まれている難分解性物質 DCHA に注目し、高濃度 DCHA の水溶性切削油廃液と DCHA 水溶液をそれぞれ作成し実験に用いた。高濃度 DCHA 廃液の添加による他成分の処理効率の変化は見られなかった。また高濃度 DCHA の水溶性切削油廃液を添加したリアクターにおいても、DCHA 水溶液を添加したリアクターにおいても、DCHA の減少率は元の水溶性切削油廃液を添加したリアクターとほぼ変わらなかった。

ただし、高濃度 DCHA の水溶性切削油廃液を添加したリアクターと元の水溶性切削油廃液を添加したリアクター、また高濃度 DCHA の水溶性切削油廃液を添加したリアクターと DCHA 水溶液を添加したリアクターの PCR-DGGE 結果を比較すると、DCHA の減少率が変わらなかったにもかかわらず、バンドパターンには違いが見られた。このことから高濃度と低濃度の場合、優占的に DCHA の除去に関わる微生物が異なる可能性が示唆された。高濃度 DCHA の除去に関わっている可能性のある細菌として *Bacillus polygonumi* と *Bacillus sp. BGSC W9A92* の近縁種が挙げられた。

第 6 章では本実験系のサンプルを用いて DCHA 分解細菌の分離を試みた。普通寒天培地と、第 4 章で作成したクローンライブラリーを参考に選定した *Tuberibacillus calidus* と

Geobacillus caldoxylosilyticus の培養に適する培地を用いて、11 菌株を分離することができた。シーケンシングによりそれぞれの配列を決定した。11 菌株は系統上では *Bacillus* 属または *Geobacillus* 属の近縁種であった。

分離できた菌株についてさらに DCHA の分解能力を調べた結果、CYC12、2SG53、2SG54 と 2SG56 株の 4 株は DCHA 分解能力を持っていた。培養を行った結果、DCHA の分解能力が最も高かったのは 2SG53 株であり、14 日間で添加した DCHA の 71% が分解された。14 日後の OD を調べた結果、OD が高い菌株の DCHA 分解率も高かった。

DCHA の分解能力を持っている 4 菌株を同定するため、16SrDNA の全長配列を調べた。2SG53 株は *Geobacillus kaue* strain BGSC W9A78 の近縁種（相同性 98%）であった。2SG56 株は *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 との相同性は 100% であった。2SG54 と CYC12 両株の相同性は 99% であり、両方とも *Bacillus smithii* の近縁種（相同性 99%）であった。

本研究では高温接触酸化法による水溶性切削油廃液処理における微生物群集解析を行なった結果、処理に関わっている細菌は主に *Bacillus* 属かその近縁種であった。廃液中の難分解性物質 DCHA の濃度変化に対する微生物応答を調べた結果、高濃度と低濃度の場合、優占的に DCHA 分解に関わる微生物が異なることが示唆された。DCHA 分解細菌を 4 株分離することができた。16SrDNA の全長配列を調べた結果、4 菌株はそれぞれ *Geobacillus kaue* strain BGSC W9A78、*Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 及び *Bacillus smithii* の近縁種であった。