

審査の結果の要旨

氏名 馮 欣

本研究は、「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とジシクロヘキシルアミン分解細菌の解析と分離」と題して、7つの章から論文を構成している。

第1章では、研究の背景と目的、および論文の構成を述べている。

第2章では、水溶性切削油剤の成分組成や切削油廃液処理の現状に関連した既存の研究について詳細に整理している。また、好熱性細菌の特性、高濃度有機廃液などに適用事例のある高温接触酸化法の特徴やその処理特性に関する文献整理を行っている。

第3章では、水溶性切削油廃液の組成分析結果を示すとともに、廃液に含まれる成分のうち難分解性物質であるジシクロヘキシルアミン (DCHA) の特性を整理している。また、木片を担体とした高温接触酸化処理実験における化学分析方法と微生物解析手法を説明している。そして、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基礎実験を行い、廃液の微生物分解の確認とともに処理効率に影響する含水率の適正範囲を調べる実験を行い、木片 150g に対して 2 日 1 回の 20ml 廃液添加条件や最適含水率 50% の調整方法など運転管理条件の設定を行っている。

第4章では、高温接触酸化リアクターを長期運転し、ウォームアップ運転の効果、油分減少率の増加過程における微生物群集解析を行った結果を示している。まず、廃液油分の 6~7 割を分解除去できること、GC-MS により定量分析可能な 10 成分のうち、カルボン酸類と p-t-ブチル安息香酸の減少率がほぼ 100% であること、DCHA は運転期間が長くなるにつれ減少率が上昇するものの 80% 程度に留まり他の成分より除去が明らかに悪いことなどを明らかにしている。

また、PCR-DGGE 法による微生物群集解析結果から、実験開始 8 日間以上経つとバンドパターンは実験開始前と大きく変わり、p-t-ブチル安息香酸または DCHA の減少率増加に対応して強度を増しているバンドを見出している。またリアクターから回収した木片サンプルを用いて Cloning-Sequencing を行い、配列の相同性検索を行った結果、得られたクローンのほとんどは多くの好気性有孢子細菌が属している *Bacillales* 目の *Bacillus* 属や *Geobacillus* 属に分類されること、PCR-DGGE 結果と照合したところ、7 クローンが Cloning 用試料のバンド位置と一致したことを報告している。

第5章では、第4章の水溶性切削油廃液を添加したリアクター I と比較するために、DCHA を高濃度にした水溶性切削油廃液を添加する実験を行った結果を示している。両実験の PCR-DGGE 結果を比較した結果、DCHA の減少率に大きな違いがないにも関わらず、バンドパターンが違ったことを明らかにしている。このことから、水溶性切削油廃液中の DCHA 濃度が高い時と低い時に DCHA 分解を担う微生物が異なる可能性を指摘している。さらに、高濃度条件下で DCHA 分解に関わっている細菌を反映している想定される二つのバンド見出した上、それらが *Bacillus polygonumi* と *Bacillus sp. BGSC W9A92* の近縁種であることを示している。また、DCHA 水溶液のみを添加したリアクターでの PCR-DGGE 結果から、運転期間が長くなるにつれ明らかに優占

化していた特定のバンドを見出している。

第6章では、DCHA 分解細菌の分離と分離した菌株による DCHA の分解能力について調べた結果をまとめている。分離用試料として DCHA 水溶液のみを添加したリアクターの木片サンプルを用いている。培養には第4章の Cloning-Sequencing 結果に基づいて、リアクター内に存在している細菌の培養に適した培地3種類 (CYC Medium, Yeast Extract Medium, 2×SG Medium)、一般細菌の培養に使われている Nutrient agar と無機塩 MM 培地に水溶性切削油廃液1%を加えた MMM 培地を作成し、あわせて5種類の培地を用いている。60°Cにて平板培養を行った結果、CYC Medium, 2×SG Medium, Nutrient agar から全部で11株を分離している。これらの11株の近縁種は *Bacillus* 属か *Geobacillus* 属かのどちらかに属していることを明らかにしている。DCHA の分解実験を行った結果、11株中4株が試験管での液体培養条件にて DCHA を分解する能力を持っていることを確認している。4株中最も分解能力が高かったのは 2SG53 株であり、*Geobacillus kaue strainBGSC W9A78* の近縁種であったこと、DCHA 濃度 100mg/L の 2×SG Medium 培養液を14日間の DCHA の減少率は71%であったことを報告している。

第7章では、上記の研究成果から導かれる結論と今後の課題や展望が述べられている。

以上の成果では、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い、処理能力と微生物群集の関連性について検討している。特に、水溶性切削油廃液処理の問題点の一つである難分解性物質ジシクロヘキシルアミン (DCHA) に注目し、培養と分子生物学的手法を組み合わせて DCHA の分解細菌の解析と分離を行った。これらの知見は、従来の生物処理方法では困難であった水溶性切削油廃液処理の効率化に役立つだけでなく、難分解性物質である DCHA の分解細菌に関して非常に有用なデータや知見を提供しており、都市環境工学の学術の進展に大きく寄与するものである。

よって、本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。