

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	中村 嘉孝
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 石橋 松二郎
	副査 鹿児島大学 准教授 濱中 大介
	副査 琉球大学 准教授 平良 英三
	副査 鹿児島大学 准教授 紙谷 喜則
	副査 佐賀大学 教授 田中 宗浩
審査協力者	印
実施年月日	令和 2年 1月 23日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、令和2年1月23日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	中村 嘉孝
-------------	-------

〔質問1〕 L-DSで、酢酸が生成され、貯まってくることによりメタン生成が阻害されたという説明をしていたが、そのあとの説明がよくわからなかったので、もう一度教えて欲しい。酢酸を分解する菌がL-DSの中で不足していたという結果はあるのか？

〔回答1〕 コロナプロットによると、H-DSはL-DSに比べて古細菌がかなり多いということが分かります。また、このH-DSの古細菌中には、*Methanosarcina*属が96%含まれています。*Methanosarcina*属は、主に酢酸を分解する微生物です。それに比べて、L-DSは、メタン生成古細菌が少なく、かつ*Methanosarcina*属が14%しか含まれていません。つまり、L-DSには酢酸を分解するメタン生成古細菌が圧倒的に少ないことがわかります。このことから、L-DSではあまり酢酸を分解できないと考えました。

〔質問2〕 継代培養をしていき順番に順化していく過程で、L-DSの酢酸を分解する菌が増えてこなかった理由は何か考えられるか？

〔回答2〕 増えてこなかった理由としては、L-DSの中にいる微生物の割合がそのまま維持された状態で継代培養されているので、酢酸を分解する微生物が少ない状態を維持した状態で継代培養されていると考えています。

〔質問3〕 比率が維持されたままで継代培養されているということは、メタン発酵の施設自体、例えば発酵プロセス法などが関係してくると思われるが、その辺りはどうか？例えばメタン発酵には事前に可溶化・酸発酵だとか一槽で全部行う方法などあるが、どのような影響が出ていると感じているか？

〔回答3〕 発酵プロセスについて全てのサンプルの消化液については分析していないが、メタン発酵のメタン生成量でこれを判断しています。

〔質問4〕 メタン生成量の評価でスクリーニングをしたのか？

〔回答4〕 はい。そうです。

〔質問5〕 例えば、酸を生成する微生物群集とメタン生成古細菌がおり、そのバランスが重要だということだが、例えばシーディングの時に意図的にそのバランスを調整することは可能なのか？

〔回答5〕 それも一つ考えられるのですが、以前、メタン発酵プロセスに有用な微生物を添加しても、あまり上手くいかなかったことが報告されています。今回の研究では酢酸生成菌と酢酸利用菌が多く検出されたが、他の様々な微生物のバランスも重要であると考えられるので、意図的にメタン発酵に有用な微生物を組み合わせばよいというわけで

はないと考えます。

〔質問6〕 バランスが良い消化液を見つけてきたら、それを継代培養して保存するということか？

〔回答6〕 作り出すことはなかなか難しいのですが、スクリーニングをして、保存し、それを使うということが最適だと考えます。

〔質問7〕 スクリーニングを行い、メタン生成古細菌が多く含まれている消化液を種汚泥として用いれば、効率が良いという結論と考えるとよいのか？

〔回答7〕 メタン発酵を行うためには、メタン生成古細菌がたくさん含まれていることも大切です。しかし、他の微生物群集とのバランスも大切です。結論としては、微生物群集の割合が大切であると考えます。

〔質問8〕 酸が増えるとメタン生成古細菌が食べる基質が増えてくるのでL-DSのメタン生成古細菌も増えてくると予想されるが、これが増えてこなかった理由は何なのか？

〔回答8〕 L-DSは酢酸を資化するメタン生成古細菌があまり存在していません。その代わり、水素資化性のメタン生成古細菌が存在します。L-DSは水素を資化するメタン生成古細菌が多い状態で発酵プロセスが進んでいくので、酢酸が蓄積します。更に、酢酸が蓄積するとpHが低下してメタン発酵を阻害するため、メタン生成量が低くなったのだと考えます。

〔質問9〕 L-DSの水素資化性メタン生成古細菌を減らして、酢酸資化性メタン生成古細菌を増やしてあげれば、メタン発酵は上手くいく可能性はあるのか？

〔回答9〕 可能性としてはあるかもしれませんが。

〔質問10〕 メタン発酵を行う際に、水素量は測っているのか？

〔回答10〕 測りました。H-DSの方は水素量が高く検出されました。このことから、H-DSに比べてL-DSは水素が良く分解されていることが分かりました。

〔質問11〕 *Salmonella*属細菌の死滅実験について、*Salmonella*属細菌はなぜメタン発酵中に死滅するのか？

〔回答11〕 メタン発酵中に含まれる微生物群集と *Salmonella*属細菌が基質を競合しているからであると考えます。メタン発酵が全く起こっていない区と比較して *Salmonella*属細菌が減少していないことから、これを説明できます。

〔質問12〕 メタン発酵を続けると、*Salmonella*属細菌が完全死滅することはあるのか？

〔回答12〕 今回の実験では完全死滅までには至っていませんが、メタン発酵効率が高ければ死滅傾向にあるという結果は得られました。よって死滅することはあると考えら

れます。

〔質問 1 3〕メタン発酵効率が高くなると *Salmonella* 属細菌はメタン発酵中の基質を全く奪えなくなるということか？

〔回答 1 3〕本研究の結果では、*Salmonella* 属細菌はメタン発酵中の微生物から基質を奪われているので死滅していると考えます。

〔質問 1 4〕*Salmonella* 属細菌が死滅期に入っているからではないのか？また、メタン発酵におけるメタンやCO₂排出による嫌気状態が原因ではないのか？本当に基質の競合が原因なのか？

〔回答 1 4〕これには二つ説明できる理由があります。一つは、*Salmonella* 属細菌は通性嫌気性菌なので、嫌気での死滅はあまり考えられません。もう一つは、対照区やメタン生成が起こっていない区では *Salmonella* 属細菌が死滅していないことです。このことにより、メタン発酵が効率よく起これば、*Salmonella* 属細菌が死滅していくのではないかと考えます。

〔質問 1 5〕死滅傾向である *Salmonella* 属細菌が再び増えることはあり得るのか？

〔回答 1 5〕一度 full growth になってから、基質の競合によって減少しているので、今後はさらに減少すると考えます。

〔質問 1 6〕現場のメタン発酵では *Salmonella* 属細菌の挙動はどうなっているのか？分かっていたら教えてほしい。

〔回答 1 6〕現場での *Salmonella* 属細菌の挙動に関するデータは持っていません。しかしながら、今回の実験では、現場のメタン発酵槽を想定した実験を行っています。

〔質問 1 7〕消化液 A~C の特徴は何なのか？

〔回答 1 7〕実験に用いた消化液 A~C は別々のメタン発酵槽から獲得したものであり、浄化槽汚泥由来、生ごみ廃棄物由来、し尿由来になります。そのうち、消化液 A、B のメタン発酵効率が特に良いということが分かりました。

〔質問 1 8〕メタン生成ポテンシャルの定義はあるのか？

〔回答 1 8〕本研究でのメタン生成ポテンシャルとは、メタン生成の立ち上がりの早さとメタン最大排出量の高さのことを示しています。つまり、H-DS はメタン発酵の立ち上がり早く、かつメタン排出量が高い区のことを指し、逆に L-DS はメタン発酵の立ち上がり遅く、かつメタンの排出量が低い区のことを指しています。