

学 位 論 文 内 容 の 要 旨	
学位論文題目	A study on effective use of pressurized carbon dioxide for inactivation of pathogens as a novel disinfection method for ballast water (加圧二酸化炭素を効果的に利用したバラスト水中の病原微生物の新規殺菌方法に関する研究)
氏 名	DANG THI THANH LOC
<p>バラスト水は船舶の海洋における操作安定性のために恒常的に使われている。しかしながら、バラスト水に由来する外来生物の越境が問題となり、現在深刻な環境問題の1つとして認識されている。それゆえに、バラスト水の殺菌は外来生物の世界における広範な侵入を防ぐために重要な役割を果たす。また、有害な副生成物を生じない高度な殺菌技術の開発が求められている。この論文では、液膜生成装置を利用した1 Mpa以下の加圧二酸化炭素 (PCD) による海水の殺菌に関して述べる。</p> <p>PCD による殺菌実験に用いるモデル微生物として大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)、腸球菌 (<i>Enterococcus sp.</i>)、ビブリオ菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>) を選定し、様々な圧力、温度、装置有効容積 (WVR) について実験を行った。加えて、タンパク質と核酸について細胞からの溶出量を測定した。PCD による殺菌処理前後の細胞の様子を SEM により観察した。PCD による殺菌処理はすべての細菌に有効であったが、腸球菌 (<i>Enterococcus sp.</i>) は大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) やビブリオ菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>) に比較して、高い抵抗性を示した。腸球菌 (<i>Enterococcus sp.</i>初期菌数 $5-6 \log_{10}$ CFU mL⁻¹) について 4.1 log の殺菌効果を得るためには、圧力が 0.7 MPa、WVR が 70%、水温が $20 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$、処理時間が 25 分間必要であった。一方で、大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) とビブリオ菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>) に関しては、同じ設定条件でそれぞれ 10 分間、3 分間で完全な殺菌が可能であった。細胞内物質の溶出は処理中に生じており、大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)、腸球菌 (<i>Enterococcus sp.</i>)、ビブリオ菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>) の SEM による観察で PCD 処理後にその形態的变化が生じていたことが確認された。以上のことは、PCD による殺菌がバラスト水中の病原性微生物の殺菌に有効である可能性を示すものと考えられる。</p> <p>PCD の殺菌能力を増幅させるために、圧力サイクルに注目した。大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)、腸球菌 (<i>Enterococcus sp.</i>) の殺菌において、圧力サイクルの頻度 (何回装置内を通過するか) とその程度 (装置内に入る前後の圧力差) がキーとなることが示された。この結果は、圧力サイクルと殺菌効率との強い関係 ($p < 0.001$) を示している。線形回帰分析の結果から、このモデルによって約 91% の大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) の殺菌効率を説明できる ($p < 0.001$) ことが示唆された。おおよそ 5.3 log の大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) を 5 分間で PCD (ガスとして 100% の CO₂ を用い、0.7 MPa の圧力、20°C の水温、70% の WVR の条件下で、圧力サイクルの頻度が 18 サイクル、その際の圧力差 $\Delta P = 0.12$ MPa) により完全に殺菌できた。腸球菌 (<i>Enterococcus sp.</i>) の殺菌の場合は、線形回帰分析の結果から、このモデルによって (25% CO₂ + 75% N₂) をガスとして用いた場合に 93%、(50% CO₂ + 50% N₂) をガスとして用いた場合に 85%、(100% CO₂) をガスとして用いた場合に 89% の殺菌が可能であることが示唆された。理想的な条件下 (圧力が 0.9 MPa、圧力差 $\Delta P = 0.14$ MPa、70% の WVR、水温 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$) において、100% CO₂ を用いた PCD 処理 (圧力サイクルの頻度が 70 サイクル、処理時間 20 分間) により、5.2 log の腸球菌 (<i>Enterococcus sp.</i>) の完全殺菌が可能であった。腸球菌 (<i>Enterococcus sp.</i>) の PCD 処理による殺菌は、1 次反応にしたがうことがわかった。100% の CO₂ を用いた場合の PCD</p>	

処理（圧力 0.9 MPa、処理時間 3.85 分間）によって最小の D 値が導き出された。この結果は、PCD 処理による殺菌効率を向上させるための有効な方法を提供するものである。

高流量かつ極めて大きな体積を有するバラスト水は国際海事機構（IMO）の定める D-2 規格にしたがって処理されねばならない。しかしながら、船舶の限られた面積の中ではそれを満たす処理施設の設置は難しい。殺菌効率の改善とその処理に要する時間の大幅な削減を目指して、PCD 処理に少量の塩素処理（NaOCl）を組み合わせた殺菌方法を考案した。この方法により人工海水中での腸球菌（*Enterococcus* sp.）の殺菌、さらにはる過後の自然海水中での大腸菌（*Escherichia coli*）、腸球菌（*Enterococcus* sp.）、ビブリオ菌（*Vibrio alginolyticus*）の殺菌実験を行った。実験結果から、この方法により個別に処理を行った場合より極めて大きな殺菌効率を得られた。相乗効果は圧力と CO_2 濃度とに相関があった（ $p < 0.001$ ）。人工海水中での腸球菌（*Enterococcus* sp.）の殺菌において、100%の CO_2 を用いた場合の PCD 処理（圧力 0.3 MPa、70%の WVR、水温 20°C ）に塩素処理（ 0.20 mg L^{-1} ）を組合せることで、完全殺菌（5.2 log reduction）を 4 分間で行うことができた。対照的に、それぞれ単独で処理した場合には 25 分間の処理により 3.7 log reductions と 1.8 log reductions しか得られなかった。一方で、0.3MPa の圧力下における PCD 処理（様々な CO_2 濃度：25% $\text{CO}_2 + 75\% \text{ N}_2$ 、50% $\text{CO}_2 + 50\% \text{ N}_2$ 、75% $\text{CO}_2 + 25\% \text{ N}_2$ 、100% CO_2 ）と塩素処理（ 0.20 mg L^{-1} ）との組合せにより、自然海水中のバクテリアの実質的な増殖能力を削減できた。特筆すべきは、PCD 処理と塩素処理との組合せにより、わずか 3 分で大腸菌（*Escherichia coli*）、腸球菌（*Enterococcus* sp.）、ビブリオ菌（*Vibrio alginolyticus*）のそれぞれについて IMO の設定する D-2 の基準値以下まで殺菌を行うことができたことである。以上より、PCD 処理と塩素処理との組合せ殺菌方法は、バラスト水の殺菌方法として相乗効果を発揮することで十分な性能を有することが示されたと考えられる。

学位論文内容の要旨	
学位論文題目	A study on effective use of pressurized carbon dioxide for inactivation of pathogens as a novel disinfection method for ballast water (加圧二酸化炭素を効果的に利用したバラスト水中の病原微生物の新規殺菌方法に関する研究)
氏名	DANG THI THANH LOC
<p>Ballast water is routinely used onboard ships to adjust the manoeuvrability and stability at ocean but is now widely recognized as a serious environmental issue because of the risk of introducing alien species from ballast water discharge. Therefore, disinfection of ballast water plays an important role in preventing the spread of invasive species worldwide, and advanced water disinfection technologies that do not produce harmful by-products would be highly desirable. This dissertation presents results for the use of pressurized carbon dioxide (PCD) at less than 1.0 MPa and a liquid-film-forming apparatus for disinfection of seawater.</p> <p><i>Escherichia coli</i>, <i>Enterococcus</i> sp., and <i>Vibrio alginolyticus</i> were used as model microorganisms for examining the bactericidal performance of PCD. The sensitivity of three bacterial species to the PCD treatment was examined for various conditions of pressure, temperature, working volume ratio (WVR). Additionally, leakage of proteins and nucleic acids from cells was measured. Cell morphology of untreated cells and cells treated with PCD was assessed using scanning electron microscopy (SEM). PCD treatment affected all the bacterial species; however, <i>Enterococcus</i> sp. exhibited higher resistance to the PCD treatment than did <i>E. coli</i> and <i>V. alginolyticus</i>. Under the experimental treatment conditions (0.7 MPa, 70% WVR, $20 \pm 1.0^\circ\text{C}$, and initial concentration of $5\text{--}6 \log \text{CFU mL}^{-1}$), a treatment period of 25 min. was required to reduce the bacterial load by approximately 4.1 log for <i>Enterococcus</i> sp., whereas, the same treatment conditions completely inactivated <i>E. coli</i> and <i>V. alginolyticus</i> within 10 min and 3 min, respectively. Release of intracellular contents occurred during the treatment process and SEM images of <i>E. coli</i>, <i>Enterococcus</i> sp., and <i>V. alginolyticus</i> revealed that morphological changes had occurred after the treatment with PCD. These data indicated that PCD has potential applications for inactivating pathogens in ballast water.</p> <p>To enhance the bactericidal activity of PCD, effects of sequences involving pressure cycling was employed. The key influences on frequency and magnitude of pressure cycling in enhancing <i>E. coli</i> and <i>Enterococcus</i> sp. inactivation are elucidated. The results revealed strong</p>	

correlation between pressure cycling and inactivation efficiency ($p < 0.001$). The results from linear regression analysis suggest that the model can explain about 91% of the *E. coli* inactivation efficiency ($p < 0.001$). Approximately 5.3 log of the *E. coli* load was completely inactivated within 5 min. by using PCD (100% CO₂, at 0.7 MPa, 20°C, 70% WVR) in the process involving pressure cycling ($\Delta P = 0.12$ MPa, 18 cycles). As for *Enterococcus* sp. inactivation, the outcome of linear regression model analysis suggests that the model can explain 93%, 85%, and 89% of the inactivation efficiency of (25% CO₂ + 75% N₂), (50% CO₂ + 50% N₂), and 100% CO₂, respectively. Under identical treatment conditions (pressure = 0.9 MPa, $\Delta P = 0.14$ MPa, 70% WVR, and 20 + 1°C), treatment with PCD (100% CO₂) resulted in complete inactivation 5.2 log of *Enterococcus* sp. after 70 cycles within 20 min. The *Enterococcus* sp. inactivation of PCD followed first-order reaction kinetics. The smallest *D*-value (largest *k*-value) was induced by PCD (100% CO₂) at 0.9 MPa, which was obtained at 3.85 min (0.5988 min^{-1} , $R^2 \geq 0.95$). The findings could provide an effective method for enhanced bactericidal performance of PCD.

High flow rate and large volumes of ballast water need to be treated according to the D-2 standard of the International Maritime Organization (IMO); however, space on a ship for such operations is typically limited. To improve the disinfection efficiency and reduce the treatment time, disinfection using PCD combined with a low-dosage of chlorine (NaOCl) was employed to inactivate of *Enterococcus* sp. in artificial seawater and bacteria (i.e. *E. coli*, enterococci, and vibrios) in natural seawater. Combined PCD/chlorine treatments resulted in greater disinfection efficiency than those for the two individual treatments. Synergy values were correlated with pressure and CO₂ concentrations ($p < 0.001$). As for the disinfection of *Enterococcus* sp. in artificial seawater, combined treatment with PCD (100% CO₂, 0.3 MPa, 70% WVR, and 20°C) and chlorine (0.20 mg L⁻¹) achieved an average synergy value of 4.6 log and complete inactivation (5.2 log reduction) of *Enterococcus* sp. within 4 min. In contrast, when the two individual treatments (PCD and chlorine treatment) were used, only 3.7 and 1.8 log reductions were achieved after 25 min, respectively. On the other hand, combination of 0.3 MPa PCD (various CO₂ supply rates: 25% CO₂ + 75% N₂, 50% CO₂ + 50% N₂, 75% CO₂ + 25% N₂, and 100% CO₂) and chlorine (0.20 mg L⁻¹) substantially reduced bacterial viability in natural seawater. Specifically, the combined PCD/chlorine treatments reduced the number of *E. coli*,

enterococci, and vibrios (include *Vibrio cholerae*) to below the IMO D-2 discharge standard within 3 min. These findings suggest that the combined PCD/chlorine treatment has synergistic benefits and provides a promising method for the disinfection of ballast water.

学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

(博士後期課程博士用)

山口大学大学院理工学研究科

報告番号	理工博甲 第 724 号	氏名	DANG THI THANH LOC
最終試験担当者	主 査 今 井 剛 審 査 委 員 関 根 雅 彦 審 査 委 員 新 苗 正 和 審 査 委 員 樋 口 隆 哉 審 査 委 員 通 阪 栄 一		
【論文題目】 A study on effective use of pressurized carbon dioxide for inactivation of pathogens as a novel disinfection method for ballast water (加圧二酸化炭素を効果的に利用したバラスト水中の病原微生物の新規殺菌方法に関する研究)			
【論文審査の結果及び最終試験の結果】 バラスト水は船舶の海洋における操作安定性のために恒常的に使われている。しかしながら、バラスト水に由来する外来生物の越境が問題となり、現在深刻な環境問題の1つとして認識されている。それゆえに、バラスト水の殺菌は外来生物の世界における広範な侵入を防ぐために重要な役割を果たす。また、有害な副生成物を生じない高度な殺菌技術の開発が求められている。そこで、本研究では液膜生成装置を利用した1 MPa以下の加圧二酸化炭素(PCD)による海水の新規殺菌方法の開発を行い、その有効性を検討した。 本論文の構成と内容は以下の通りである。 第1章では、研究の背景、目的および論文の構成について述べている。 第2章では、従来の研究についてまとめた。 第3章では、PCDによる殺菌実験に用いるモデル微生物として大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)、腸球菌 (<i>Enterococcus</i> sp.)、ビブリオ菌 (<i>Vibrio alginolyticus</i>) を選定し、様々な圧力、温度、装置有効容積(WVR)について実験を行った。加えて、タンパク質と核酸について細胞からの溶出量を測定した。PCDによる殺菌処理前後の細胞の様子をSEMにより観察した。PCDによる殺菌処理はすべての細菌に有効であったが、腸球菌は大腸菌やビブリオ菌に比較して、高い抵抗性を示した。腸球菌について4.1 logの殺菌効果を得るためには、圧力が0.7 MPa、WVRが70%、水温が20 ± 1.0°C、処理時間が25分間必要であった。一方で、大腸菌とビブリオ菌に関しては、同じ設定条件でそれぞれ10分間、3分間で完全な殺菌が可能であった。細胞内物質の溶出は処理中に生じており、大腸菌、腸球菌、ビブリオ菌のSEMによる観察でPCD処理後にその形態的变化が生じていたことが確認された。以上のことは、PCDによる殺菌がバラスト水中の病原性微生物の殺菌に有効である可能性を示すものと考えられる。 第4章では、PCDの殺菌能力を増幅させるために、圧力サイクルに注目した。大腸菌、腸球菌の殺菌において、圧力サイクルの頻度(何回装置内を通過するか)とその程度(装置内に入る前後の圧力差)がキーとなることが示された。約5.3 logの大腸菌を5分間のPCD処理(ガスとして100%のCO ₂ を用い、0.7MPaの圧力、20°Cの水温、70%のWVRの条件下で、圧力サイクルの頻度が18サイクル、その際の圧力差ΔP=			

0.12 MPa) により完全に殺菌できた。腸球菌の殺菌の場合は、20 分間の PCD 処理 (ガスとして 100%の CO₂を用い、圧力が 0.9 MPa, 水温 20 ± 1°C, 70% の WVR, 圧力サイクルの頻度が 70 サイクル, その際の圧力差 ΔP = 0.14 MPa) により完全殺菌が可能であった。

第 5 章では、殺菌効率の改善とその処理に要する時間の大幅な削減を目指して、PCD 処理に少量の塩素処理 (NaOCl) を組み合わせた殺菌方法を考案、検証した。この方法により人工海水中での腸球菌の殺菌、さらにはろ過後の自然海水中での大腸菌、腸球菌、ビブリオ菌の殺菌実験を行った。実験結果から、この PCD 処理と塩素処理との組合せにより極めて大きな殺菌効率を得られた。人工海水中での腸球菌の殺菌において、100%の CO₂を用いた場合の PCD 処理 (圧力 0.3 MPa, 70%の WVR, 水温 20°C) に塩素処理 (0.20 mg L⁻¹) を組合せることで、完全殺菌を 4 分間で行うことができた。さらに、PCD 処理と塩素処理との組合せにより、わずか 3 分で大腸菌、腸球菌、ビブリオ菌のそれぞれについて国際海事機構の設定する基準値以下まで殺菌を行うことができた。

以上より、PCD 処理と塩素処理との組合せ殺菌方法は、バラスト水の殺菌方法として相乗効果を発揮することで十分な性能を有することが示された。

第 6 章の結論では、本論文を総括しその成果と今後の研究課題について述べている。

公聴会には、学内外から 43 名の参加があり、活発な質疑応答がなされた。公聴会での主な質問内容は、①圧力サイクル (Pressure Cycling) とは何か、詳しく説明して欲しい、②バラスト水による被害 (外来生物の越境など) の実例はあるのか、③殺菌の効率を示すのに生残率 (Log 表記) を用いているが、小数点以下 (例えば 5.2 の「2」の部分) については精度があるのか、④高濃度の二酸化炭素による殺菌が、微生物細胞に変異を引き起こすことはないのか、⑤実際にバラスト水の殺菌に適用する場合は連続的に処理を行う必要があると考えられるが、本法で連続処理は可能であるのか、など多数であった。

以上のいずれの質問に対しても発表者からの確で具体的な回答がなされた。

以上より、本研究は独創性、信頼性、有効性、実用性および完成度ともに非常に優れており、博士 (工学) の学位論文に十分値するものと判断した。

論文内容および審査会、公聴会での質疑に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記の通りである (関連論文: 4 編)。

- 1) Dang-Thi Thanh-Loc, Tsuyoshi Imai, Takaya Higuchi, Le-Van Tuan, Vo-Thanh Huy, Disinfection of *Escherichia coli* in seawater using pressurized carbon dioxide, *Journal of Science and Technology – Vietnam Academy of Science and Technology*, Vol. 53, No. 3A, pp. 91-96, 2015.
- 2) Loc T.T. Dang, Tsuyoshi Imai, Tuan V. Le, Satoshi Nishihara, Takaya Higuchi, Mai K.D. Nguyen, Ariyo Kanno, Koichi Yamamoto, and Masahiko Sekine, Effects of pressure and pressure cycling on disinfection of *Enterococcus* sp. in seawater using pressurized carbon dioxide with different content rates, *Journal of Environmental Science and Health, Part A (Toxic/Hazardous Substance & Environmental Engineering)*, Vol. 51, No. 11, pp. 930-937, 2016.
- 3) Thanh-Loc T Dang, Tsuyoshi Imai, Tuan V. Le, Diem-Mai K Nguyen, Takaya Higuchi, Ariyo Kanno, Koichi Yamamoto, and Masahiko Sekine, Synergistic effect of pressurized carbon dioxide and sodium hypochlorite on the inactivation of *Enterococcus* sp. in seawater., *Water Research*, Vol. 106, pp. 204-213, 2016.
- 4) Thanh-Loc Thi Dang, Tsuyoshi Imai, Tuan Van Le, Huy Thanh Vo, Takaya Higuchi, Koichi Yamamoto, Ariyo Kanno and Masahiko Sekine, Disinfection effect of pressurized carbon dioxide on *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. in seawater, *Water Science and Technology: Water Supply*, Vol. 16, No. 6, pp. 1735-1744, 2016.