

## 論文の内容の要旨

論文題目 水道水源湖沼における溶存有機物の動態と生物学的応答の指標化に関する研究

氏名 春日 郁朗

水道水源として重要な湖沼やダム湖（以下、水道水源湖沼）では、富栄養化の進行に伴い、増加する溶存有機物（Dissolved Organic Matter：DOM）が水道原水の水質に様々な悪影響を及ぼしている。従来の DOM 評価には、COD などの包括的な指標が用いられてきたが、多様な起源と特性を有する水道水源湖沼 DOM の評価には限界がある。詳細な化学分析を駆使するアプローチも試みられているが、雑多な成分から構成される低濃度の DOM を濃縮・分画等せずに特性評価することは困難である。

更に、DOM の評価に関する重要な課題として、生物学的な視点の不足が挙げられる。水道水源湖沼の DOM の特性やその動態を理解するためには、発生源から湖沼への流入・滞留過程における生物学的な分解・変換作用を無視することはできない。しかし、従来の生物学的な視点による DOM 評価も、BOD や BDOC などの包括的な評価に留まっており、起源の異なる DOM に対して、湖沼内のどのような細菌群が分解に関与し、DOM 特性がどのように変化するのかについては不明な点が多い。また、各地の湖沼で増加している難分解性溶存有機物（Refractory DOM：RDOM）の起源や実体、生成過程の解明にも、生物学的視点に基づいた知見が不可欠である。

そこで、本論文では、DOM 評価の新たな指標として、起源の異なる DOM に対する湖沼細菌群集の生物学的応答に着目した。特定の細菌群がある起源の DOM に対して優先的に応答したり、生分解過程の特定の段階で RDOM の生成に関与したりするのであれば、これらの生物学的応答と DOM の動態との関係を応用することで、生物学的視点から水道水源湖沼における DOM の特性評価を行うことができると考えられる。

生物学的応答を評価するために、起源の異なる DOM を個別に水道水源湖沼水に添加したマイクロコズム実験を行った。真正細菌の 16S ribosomal RNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE や単離を通して、応答する細菌群を特定した。更に、単離株の基質利用特性試験を行い、添加 DOM と基質利用特性との関係を探った。また、芳香族化合物の好気分解に関与する catechol 1,2-dioxygenase, catechol 2,3-dioxygenase をコードする機能遺伝子（C12O 遺伝子, C23O 遺伝子）にも着目し、機能遺伝子レベルから生物学的応答を評価した。一方、生分解の進行に伴う添加 DOM の特性変化については、蛍光特性、消毒副生成物生成能など多角的な化学分析を用いて評価し、PCR-DGGE のバンドパターンや C23O 遺伝子構成の変化との対応を考察した。

まず、印旛沼流域の DOM の特性を把握するために、印旛沼に流入する異なる河川水などの DOM を多角的な化学分析によって解析した。その結果、東部流入河川と西部流入河川では DOM 特性に差異があることが示され、DOM 特性と流域特性が密接に関係していることが明らかになった。また、湖沼 DOM の起源として特定の河川の寄与が示された。各

流入河川水について生分解実験を行ったところ、生分解に伴って SUVA 値が湖沼 DOM の値に近づくと共に、DOC あたりの THMFP が増加する（特に臭素付加型の THMFP の収率が増加）傾向が示された。

流入河川水 DOM を化学分析した結果を踏まえ、異なる流入河川水の DOM や印旛沼沿岸のアシから調製したアシ腐植質などを湖沼水に個別に添加したマイクロコズム実験 (Run 1) を行い、細菌群集の応答を PCR-DGGE, 単離, catechol dioxygenase 遺伝子から評価した。

PCR-DGGE の解析からは、異なる流入河川水 DOM を添加した系列において、培養 1,2 日後に  $\beta$ -*Proteobacteria* の *Aquaspirillum* 属や *Methylophilus* 属の配列に近縁なバンドの強度が強くなる傾向が確認され、この時期の外來性 DOM に応答する細菌群には共通性があることが示唆された。また、アシ腐植質を添加した系列では、 $\beta$ -*Proteobacteria* の *Comamonadaceae* 科の細菌群や  $\gamma$ -*Proteobacteria* の *Acinetobacter* 属の配列に近縁なバンドが特異的に現れ、DOM の種類によって湖沼細菌群集の応答に差異があることが示された。

一方、各マイクロコズムから単離した細菌の基質利用特性からは、添加した DOM の特性との関係を確認できなかった。

Catechol dioxygenase 遺伝子の検出を行ったところ、C12O 遺伝子は検出されなかったが、C23O 遺伝子については流入河川水 DOM, アシ腐植質を添加した系列において、培養 1,2 日後から検出された。DOM の添加によって、潜在的に芳香族化合物を meta 開裂する能力を有する細菌群が誘導されたことが示唆された。2 日後、10 日後に検出された C23O 遺伝子のクローンライブラリーを作成したところ、extradiol dioxygenase の配列に共通の特徴を有する非常に多様な配列が得られた。系統解析の結果、これらは extradiol dioxygenase の Subfamily I.2.A, B, C に属する C23O に近縁であった。また、これらの既知のグループとは系統的に異なる Cluster X に属する配列群 (*Ralstonia* sp. KN1 及び *Alcaligenes eutrophus* 335 の C23O に近縁) も多数得られた。2 日後のクローンライブラリーは系列ごとに特徴的な構成だったが、10 日後には Cluster X に属する配列が全体に優占する傾向を示した。Cluster X に属する C23O 配列の優占は、生分解の進行に伴う DOM の安定化と関係していると考えられた。このことから、起源の異なる DOM に対して特定の C23O 遺伝子群が誘導されることが推察され、C23O 遺伝子構成とその遷移に着目することで生物学的視点から DOM の特性・生分解過程を評価できる可能性が示唆された。

続いて行ったマイクロコズム実験 (Run 2) では、生活排水 DOM, 底泥溶出 DOM, 藻類細胞由来 DOM, 藻類体外排出 DOM, カテコールを湖沼水に添加して、印旛沼の滞留時間と同程度の 20 日間の培養を行い、DOM の動態と湖沼細菌群集の応答との関係性を評価した。

20 日間の DOC の減少率は、底泥溶出 DOM を添加した系列と対照系では低かったが、その他の系列では 60~70% に達し、SUVA の値が一定の値に収束する傾向を示した。DOM の蛍光特性を EEMS で分析した結果、生活排水 DOM を添加した系列において、タンパク様物質に由来するとされるピークの相対蛍光強度が DOC と同様の減少傾向を示すなど、各系列に特徴的な変化が検出された。臭化物イオンを段階的に添加した条件で THMFP を測

定したところ、生分解の進行に伴って、全般的に臭素付加性が高まる傾向が確認されたが、DOMの構造変化を明確に示すほどの変化は認められなかった。

PCR-DGGEの解析からは、底泥溶出DOMを添加した系列と対照系では群集構造の変化が小さかったのに対し、その他の系列では培養初期に細菌群集が特異的な応答を示した後、DOMの消費と共に再び類似した構造に収束する傾向が示された。培養2日後には、生活排水を添加した系列で *Sphingomonas* 属の配列に近縁なバンド、藻類由来のDOMを添加した系列では、*Flavobacterium* 属、*Aquaspirillum* 属などの配列に近縁なバンド、カテコールを添加した系列では *Acinetobacter* 属に近縁なバンドなどが特異的に現れた。

Catechol dioxygenase 遺伝子の検出を行ったところ、Run 1 同様、Run 2 でも C12O 遺伝子は検出されなかった。C23O 遺伝子については、対照系を含めた全系列において培養2日後から検出された。培養2日後には、生活排水DOM、藻類細胞由来DOM、藻類体外排出由来DOM、カテコールを添加した系列において、Subfamily I.2.A, B, C に属する C23O 配列がそれぞれ特徴的な優占パターンを示した。10日後、20日後にはこれらの系列間の差異が減少し、Run 1 と同様に Cluster X に属する C23O 配列がすべての系列で優占した。培養後期には DOM 特性が類似する結果が得られており、生分解に伴う DOM の安定化と Cluster X に属する C23O 配列の優占化には対応があった。一方、底泥溶出DOMを添加した系列と対照系では、培養2日後の時点から Cluster X に属する C23O 配列が優占していた。これらの系列では、ライブラリーの組成が類似しているだけでなく、PCR-DGGE のバンドパターン変化も類似していたことから、対照系において誘導された C23O 遺伝子は、底泥由来の難分解性 DOM と関係している可能性が示唆された。実際、湖水のサンプリング時には降雨の影響があり、底泥の巻上げによって、底泥由来の難分解性 DOM の負荷が通常よりも多いことが推測された。

珪藻類や藍藻類が大量発生している時期の印旛沼や諏訪湖表層水では *Sphingomonas* 属が保持する Subfamily I.2.B の C23O に近縁な配列が圧倒的に優占しており、藻類（細胞）由来のDOMには、*Sphingomonas* 属が応答することが示唆された。

以上、起源の異なるDOMに対して湖沼細菌群集が特異的な応答を示し、その応答がDOMの動態と対応して変化することが明らかになった。このことから、PCR-DGGE や C23O 遺伝子構成によって示される生物学的な応答が、水道水源湖沼におけるDOMの動態を評価する指標として有用であることが提示された。