

## 審査の結果の要旨

氏名 春日 郁朗

湖沼やダム湖などにおいては富栄養化の進行に起因して溶存有機物 (Dissolved Organic Matter : DOM) の増加が見られ、水道原水の水質として様々な障害の原因となっている。多様な起源と特性を有する湖沼水中の DOM の評価のために、詳細な化学分析による解析も試みられているものの、多様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。

また、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。そして、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、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。

本論文は、上記の背景のもと、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を目的として、起源の異なる DOM に対する湖沼細菌群集の生物学的応答と DOM の動態に着目した研究の成果をまとめたものである。

本研究は、「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」と題して、9つの章から構成されている。

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、溶存有機物に関する既存の研究をとりまとめて示している。

第3章では、千葉県印旛沼を対象とした、調査方法とマイクロゾム実験方法を説明している。さらに、化学分析方法、分子生物学的手法、細菌群集構造や遺伝子の解析法を取りまとめている。

第4章では、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結果が示されている。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、DOM 特性と流域特性が密接に関係していることなどを明らかにしている。また、湖沼 DOM の起源としての各流入河川水について生分解実験を行い、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) 傾向を示すことを明らかにした。

第5章と第6章では、異なる流入河川水の DOM やアシ腐植質などを湖沼水に個別に添加したマイクロゾム実験 (Run 1) を行い、それぞれの添加有機物に対する細菌群集の応答を、真正細菌の 16S ribosomal RNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE、単離と単離株の基質利用特性試験、catechol dioxygenase 遺伝子組成から調べている。まず、生分解の進行に伴う添加 DOM の特性変化について、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た上で、PCR-DGGE の解析から、流入河川水 DOM を添加した系列において、 $\beta$ -*Proteobacteria* の *Aquaspirillum* 属や *Methylophilus* 属の配列に近縁なバンドの強度が培養 1,2 日後に強くなることや、外来性 DOM に応答する細菌群には共通性があることを明らかにした。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を示した。

特に第6章では、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) に着目して, 生物学的応答を評価している. 培養から 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結果, 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, それらは, 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) が存在したことを新たに見出している. この 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ことを示した. これらのことから, 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している.

第 7 章と第 8 章では, 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たマイクロコズム実験 (Run 2) に関する, DOM の動態と湖沼細菌群集の応答との関係性を評価している.

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群集構造に収束する傾向があること, 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培養初期に特異的に現れることを示している.

特に第 8 章では, Catechol dioxygenase 遺伝子のクローンライブラリーの結果を解析・整理している. 培養 2 日後に, 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すこと, 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ことから, 生分解に伴う DOM の安定化と Cluster X に属する C23O 配列の優占化の関係を再確認した. 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 配列が優占しており, クローンライブラリーの組成や PCR-DGGE のバンドパターン変化が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あることを示した.

また, 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* 属が応答することを示している.

第 9 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.

このように本論文は, 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を明らかにしている. そして, 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を示し, その手法も確立している. これらの研究成果は, 水道水源における溶存有機物の特性評価や水質問題の対策検討におい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分野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.