

審査の結果の要旨

氏名 臧凱賽

本研究は、「Phylogenetic identification of estrone-degrading bacteria in activated sludge using microautoradiography-fluorescence *in situ* hybridization」と題して、8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、環境中におけるエストロン (E1) やエストラジオールなどのエストロゲン物質に起因する環境問題や活性汚泥法におけるエストロゲン除去について整理している。また、過去に報告されている活性汚泥中や土壌中の E1 分解細菌の分類整理をしている。

第3章では、都市下水処理場から採取した活性汚泥、化学分析手法や培養実験方法を説明している。また、細菌群の系統学的分類のための手法としてのマイクロオートラジオグラフィー蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (MAR-FISH) 法の原理や、エストロンのような微量汚染物質の分解に関与する細菌の同定への適用性を説明している。

第4章では、E1 分解細菌である *Rhodococcus sp.* ED7 と *Sphingomonas sp.* ED8 を対象に、MAR-FISH 法によりエストロンを代謝していることを検出できるかどうかの確認している。また、比較的疎水性の高いエストロンを対象としていることから、MAR-FISH 法を適用する上で、細菌に付着した余剰な標識エストロンの洗浄方法を検討した結果、超音波処理を含めた改良洗浄方法を提案している。

第5章では、異なる活性汚泥を対象に、エストロンを添加する分解培養実験を実施して E1 分解速度やその特性をまず把握している。そして、重水素で標識したエストロンを分解している活性汚泥に対し、 α 、 β 、 γ -proteobacteria など8種類の細菌群に特異的なプローブを利用した MAR-FISH 法を適用することにより、どの細菌群にエストロン分解に関与する細菌が存在するかの確認を行った。その結果、活性汚泥中の約1-2%の細菌群がエストロン分解に関与していること、添加直後(6時間培養)では β -及び γ -proteobacteria が、その後(10時間培養) α -proteobacteria や *Chloroflexi* 門に属する細菌が標識されていることが判明していることを報告している。特に、培養初期により多く標識が観察された β -proteobacteria が、最も重要な E1 分解細菌を含んでいること、次いで γ -proteobacteria、さらに重水素で標識した硫酸抱合体エストロンを投与した試験で検出された α -proteobacteria も E1 分解細菌として重要な細菌を含んでいること考察している。

第6章では、E1 分解細菌のうち、最も重要と想定された β -proteobacteria に含まれるエストロン分解細菌の絞り込みを行うことを試みている。階層的に特異的なプローブを利用した MAR-FISH 法を繰り返し行うことにより、エストロン分解に関与している細菌群を探索した結果を示している。まず、 β -proteobacteria 内を階層的にとらえる既存のプローブを用い、MAR 陽性の細菌を包含する一群を、*Burkholderiales* 目に含まれる *Comamonadaceae* 科、および *Incertae sedis* 群の一群であると絞り込んだ。次に、活性汚泥から β -proteobacteria のクローンライブラリを179クローン分作成し、上記グループに属するクローンを得た。そして、最終的に *Sphaerotilus* 属近縁の9クローンを

含む SHA1036 と SHA822 プローブを新たに設計し、そのプローブにより、活性汚泥中の β -proteobacteria に属する MAR 陽性の細菌のうち 98%を実験的に検出できることを示している。したがって、このプローブが活性汚泥中の E1 分解細菌を評価できる手法に発展できるものと結論付けている。また、これらの分解細菌の形態は、鎖状あるいは分散した状態で存在する桿菌であったことも観察している。

第 7 章では、6 章で設計した *Sphaerotilus* 属近縁 E1 分解細菌を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブを用い、重水素で標識したエストロンおよびその硫酸抱合体を添加した 3 種の活性汚泥を対象に、エストロン分解に寄与している細菌における *Sphaerotilus* 近縁 E1 分解細菌の割合を調べている。その結果、それぞれ 60%、80%および 78%を占めていることを実験的に示している。高濃度のエストロン添加条件であるものの、この *Sphaerotilus* 近縁 E1 分解細菌が活性汚泥プロセスにおいてエストロン分解に深く寄与していることを示唆する知見を得ている。

第 8 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、活性汚泥処理におけるエストロン分解に関わる微生物群集に関する知見を提供しただけでなく、エストロン分解に関与していると想定される微生物を検出できる配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計し、その有用性を示している。また、MAR-FISH 法と 16S rRNA 遺伝子ライブラリー検索を組み合わせることで、階層的に特異的な FISH プローブを設計して、特定の物質を分解する細菌を絞り込む手順を提示するなど、複合微生物系の群集解析手法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。