

審査の結果の要旨

氏名 酒井 名朋子

本論文は「メタン生成ベンゼン分解条件下における *Syntrophus* 属類縁菌の関与と挙動の解析」と題し、深刻な社会問題を引き起こす工場跡地や処分場周辺における石油系土壤汚染や地下水汚染の原因有害化学物質の中でベンゼンを対象とし、土壤汚染浄化のための原位置バイオレメディエーションを効率的に進めるために、嫌気性雰囲気の中で特にメタン生成を伴うベンゼン分解系で主要な役割を果たすと考えられる *Syntrophus* 属類縁菌を特定し、そのベンゼン分解における関与と挙動を解析したものである。

第1章は「研究の背景と目的」である。研究の背景と研究目的、及び論文構成等を述べている。

第2章は「既往の研究」である。ベンゼンのバイオレメディエーションに関する知見、ベンゼンの嫌氣的微生物分解に関する知見、本研究で用いた分子生物学的手法に関する知見をまとめている。

第3章は「実験方法」である。以下の各章に共通するベンゼン分解微生物の培養方法、芳香族化合物やメタンの分析方法、微生物解析方法について述べている。

第4章は「メタン生成ベンゼン分解微生物集積培養系においてベンゼン由来炭素を同化する細菌の特定」である。メタン生成ベンゼン分解微生物集積培養系を確立し、この集積培養系に対して、安定同位体(^{13}C)ラベルされたベンゼンを添加し集積系に存在する DNA を抽出し、密度勾配超遠心法にて ^{13}C を同化した微生物由来の ^{13}C -DNA と、それ以外の ^{12}C -DNA を分離した。比重ごとに分画して採取したそれぞれの画分に含まれる DNA に対して、16S rRNA 遺伝子 V3 領域を対象に PCR-DGGE を行った結果、 ^{13}C -DNA を含む重画分に優占して存在するバンドが 2 本あることがわかった。これらのバンドの塩基配列を持つ微生物は、メタン生成条件下でのベンゼンの分解に関与する主要な微生物であり、これらのバンドを精製して、優占する微生物の 16S rRNA 遺伝子 (194bp) の塩基配列を決定した。さらに、重画分に存在する DNA の 16S rRNA 遺伝子全長(およそ 1400bp)の library を作成し、PCR-DGGE において優占したバンドのうちの 1 つの配列を持つ 16S rRNA 遺伝子を得た。この配列は、分離された微生物のうち最近縁の *Syntrophus gentianae* との相同性が 85%と低かったが、*Deltaproteobacteria* 全体の系統樹を作成すると同じクラスタに所属するため、*Syntrophus* 属類縁菌と同定した。

第5章は「*Syntrophus* 属類縁菌の検出方法の検討」である。*Syntrophus* 属類縁菌の特

異的に検出するプライマーおよびプローブを作成した。設計したプライマーを使用し、QPrimer 法を用いて *Syntrophus* 属類縁菌を定量するための検討を行った。BD207f/BD437r を用いてアニーリング温度 63°C で特異的に *Syntrophus* 属類縁菌を定量検出できた。また、FISH 法など、顕微鏡による細菌の検出を行う手法を土壌サンプルに用いるための手法の検討を行った。さらに、*Syntrophus* 属類縁菌を FISH 法により特異的に検出するための検討を行った。Clone FISH を用いたプローブ BD437 のためのハイブリダイゼーション条件の検討では、ホルムアミド濃度 30% で *Syntrophus* 属類縁菌を特異的に検出することができた。

第 6 章は「*Syntrophus* 属類縁菌のメタン生成ベンゼン分解集積培養系における挙動」である。集積培養系内の *Syntrophus* 属類縁菌の定量・検出を行った結果、土壌分解系を 6.3% 含む集積培養系ではおよそ 0.13mM のベンゼンに対して、 $5.1 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^6$ copies/ml の *Syntrophus* 属類縁菌が存在し、Total bacteria の 1~8% 程度の割合で安定してベンゼンを分解した。また、この集積培養系に存在する DNA の 16S rRNA 遺伝子 library を作成した。*Syntrophus* 属類縁菌、*Sedimentibacter* sp. に属する細菌、*Peptococcaceae* に属する細菌の 3 種の配列が、Bacteria の library 内におよそ 20% ずつ、合計で 61% 存在していた。また、この集積培養系に夾雑物除去のための前処理法と FISH 法を適用し、*Syntrophus* 属類縁菌を検出したところ、*Syntrophus* 属類縁菌は桿菌であることがわかった。ベンゼン分解系は、5 回目の 50% 植え継ぎ(土壌分解系を 3.1% 含む)において植え継ぎ後に分解速度が低下し、繰り返しベンゼンを添加すると分解力を失ったが、それは活性のある *Syntrophus* 属類縁菌の存在量が少なくなったためであることが示唆された。

第 7 章は「*Syntrophus* 属類縁菌の単環芳香族炭化水素分解土壌における挙動」である。土壌に嫌気ベンゼン分解の推定中間代謝物として報告のある芳香族 (トルエン、フェノール、安息香酸) を添加して、土壌分解系における *Syntrophus* 属類縁菌の挙動解析を行った。蓮田土壌や河川底泥において、*Syntrophus* 属類縁菌は $1.1 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^6$ copy/mL 存在し、Total Bacteria の 0.00060~0.046% 存在していた。いずれの芳香族分解土壌においても *Syntrophus* 属類縁菌のコピー数は増加せず、これらの芳香族化合物の分解に関与しなかった。また、今回使用した土壌において、ベンゼン以外の芳香族による馴養ではベンゼンの分解を促進する効果が見られなかった。これは、土壌において活性のある *Syntrophus* 属類縁菌が極めて少ないことが理由であると考えられた。

第 8 章は、「結論と今後の展望」である。

以上要するに、本論文は、嫌気性雰囲気の中で特にメタン生成を伴うベンゼン分解系で主要な役割を果たすと考えられる *Syntrophus* 属類縁菌を特定し、その検出法の確立と土壌中での存在量を明らかにし、ベンゼンによる土壌汚染の原位置バイオレメディエーションを効率的に進めるための科学的知見を与えたもので、本研究で得られた知見は、都市環境工学の学術の発展に大きく貢献するものである。

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。