

氏名(本籍)	呼	和(中国)
学位の種類	博	士(環境学)
学位記番号	博	甲第5774号
学位授与年月日	平成	23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
審査研究科	生命環境科学研究科	
学位論文題目	微生物を用いた抱水クロラール汚染環境の修復に関する研究	
主査	筑波大学教授	農学博士 内山裕夫
副査	筑波大学教授	博士(農学) 張振亜
副査	筑波大学准教授	博士(工学) 野村暢彦
副査	筑波大学准教授	博士(学術) 中島敏明

### 論文の内容の要旨

人口増加と都市化の急速な進展及び農工業の近代化に伴い、有機塩素化合物による環境汚染は日増しに深刻化している。汚染有機塩素化合物の一つであるクロラールは、主にある種の農薬及び医薬品の合成用中間体として用いられる。また、畑の灌漑水などを通じて広く土壌や地下水の汚染を引き起こしている。[0] 抱水クロラールに汚染された土壌を化学的、物理学的に修復する技術はあるが、コストが高く、二次汚染を引き起こすことがあり、抜本的な汚染解消には至らない。そこで本研究では、生物学的環境修復技術であるバイオレメディエーションの一つであるバイオオーギュメンテーションを対象とし、浄化に用いるための抱水クロラール分解菌のスクリーニング・単離同定を行った。さらに、得られた分解菌の分解効率および模擬抱水クロラール汚染土壌を用いた実用化への適用性について検討を加えた。

まず、各種土壌の潜在的抱水クロラール分解能の評価を行った。0.3 mM 抱水クロラール条件下で集積培養を繰り返した結果、川砂、水田土壌および蓮田土壌は顕著な生分解能を有していることが明らかとなり、分解菌の分離源として適していることが示された。この3種の土壌から分解能を有す140株を単離し、さらに各菌株の分解活性を比較することにより高分解能を示した20株を選抜した。次いで、PCR-RFLPを用いてそれらの類似性検討を行った結果、6グループに分類されたため、各グループから1株、計6菌株について抱水クロラールを唯一炭素源とした分解試験、および他の炭素源も共存させた分解試験を行った。2菌株は抱水クロラールの分解に伴って増殖したため、抱水クロラールを生育炭素源として資化することによって分解されることが示唆された。一方、他の4株は共代謝によって分解することが示唆された。これら細菌の16S rRNA 遺伝子の塩基配列解読を行った結果、資化的分解菌は *Pseudomonas fulva*、*Bacterium* W132B.99 に、共代謝的分解菌は *Arthrobacter nicotinovorans*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Arthrobacter* sp.、*Oerskovia paurometabola* にそれぞれ高い相同性を示した。6株の抱水クロラール分解上限濃度は3mM～6mMの間にあり、*P. fulva* が最近縁種である資化的分解菌 LF54 株は1mM 抱水クロラールを40hで検出限界(<0.01 mM)以下にまで分解し、CO<sub>2</sub>を最後分解産物とする完全無機化を行うことが明らかとなった。一方、*Arthrobacter* 属の共代謝的分解菌である RS20 株は抱水クロラールをトリクロロエタノールまで還元し、検出された各種分解産物の時系列変化から両菌株の抱水クロラール分解経路が想定された。さらに、両菌株の

実用性を評価するため模擬汚染土壌マイクロコズム試験を行い、0.3 mmol/kgの抱水クロラールはLF54とRS20株のいずれにおいても5日間で検出限界 (<0.01mM) 以下までに分解されることが明らかにされた。この結果、LF54とRS20株はバイオオーギュメンテーションに利用可能であることが示唆された。

以上により、これまで知見の乏しかったクロラール汚染に対するバイオレメディエーション適用の可能性が示され、環境修復対策を考える上で重要な知見を与えるものである。本成果は、今後、汚染現場で有効な修復技術を設計していく上で貴重な知見になるものと期待される。

## 審査の結果の要旨

環境汚染現場をバイオレメディエーションで修復する際、まず有効な分解活性を有する微生物の存在が大前提となるが、著者は自然環境中に抱水クロラールを分解する微生物が存在し、且つ、実汚染濃度に対応し得る十分な分解活性を有することを明らかにし、得られた分解菌の実用性が示唆された。この可能性は、模擬汚染土壌マイクロコズムを用いた分解試験によってより現実的なものとなり、実用化に向けた今後の発展が期待される。一方、単離した菌株には抱水クロラールを生育炭素源として利用することによって分解するものが含まれている。これまでに単離された分解菌の多くは、汚染化合物を共代謝によって分解するため、その利用に際しては生育炭素源等を添加する必要がある、更なる二次汚染を生じる可能性がある。著者が単離に成功した資化的分解菌は、汚染化合物そのものを分解しつつ生育するため、上記のような懸念を排除することができ、浄化に望まれる分解微生物と言えよう。また、抱水クロラールの様な有機塩素系化合物に対する資化的分解菌の単離例は少なく、そのエネルギー獲得様式の解明が期待され、今後の学術的な発展が期待される。

以上のように、本論文の著者はオーソドックスな実験技法を用いながら着実に研究を進めた結果、バイオレメディエーションの活用に貢献可能な新規な菌株の取得に成功し、また、その菌株を用いた新たなエネルギー代謝研究の道を築き、高く評価出来る。

よって、著者は博士（環境学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。