

氏名（本籍）	潘 遠 白（中華人民共和國）
学位の種類	博 士（生物工学）
学位記番号	博 甲 第 6 7 4 4 号
学位授与年月日	平成 2 6 年 1 月 3 1 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	ベンゼン分解に係わる菌叢の安定同位体プローブ法による解析

主査	筑波大学 教授	博士（工学）	野 村 暢 彦
副査	筑波大学 教授	博士（農学）	高 谷 直 樹
副査	筑波大学名誉教授	農学博士	内 山 裕 夫
副査	筑波大学 准教授	博士（学術）	中 島 敏 明

## 論 文 の 要 旨

微生物機能を利用して汚染環境を修復する技術であるバイオレメディエーションには、分解菌を汚染サイトに導入するバイオオーグメンテーションと、栄養塩などを添加して汚染サイトの土着性分解菌を活性化させるバイオスティミュレーションがある。しかし、いずれの方法においても分解効率を上げるためには現場における微生物群集の把握は必要不可欠である。微生物叢は環境によってその群集構造が異なるため、修復対象となる汚染環境において、汚染物の一次的分解者、二次的分解者、およびそれらを取り巻く各種微生物を包括する微生物のネットワークを把握することは、有効なバイオレメディエーションの実施にとって非常に重要である。

世界的な環境汚染物質として石油と揮発性富貴塩素化合物があるが、石油に含まれるベンゼンは石油の精製過程で土壌地下水に漏出し環境問題を引き起こしている。この汚染対策の一つとして微生物分解があるが、これまでに、多くのベンゼン資化分解菌が単離・報告されているものの、ベンゼンの異化的分解菌や分解菌ネットワークについては殆ど未解明である。

本研究では、以上の現状を打開するためにベンゼン資化分解菌のみならずベンゼン異化的分解菌、さらにはベンゼン耐性菌やそれらを包括したベンゼン分解菌ネットワークを明らかにすることを目的とした。このため、ベンゼン資化分解菌を検出する従来 of Stable isotope probing (SIP) 法に加え、新たに構築した SIP for dissimilating bacteria (SIP-D) を組み合わせた統一的解析法を用いてベンゼン分解に関わる菌叢を時系列的に解析した。また、本研究で得られる知見を実際のバイオレメディエーションに応用できるようにするため、実汚染サイトの環境条件を考慮に入れた実験条件下で行った。すなわち、実汚染現場と同等のベンゼン汚染濃度、低炭素源濃度の培地使用、処理現場の気温に一致させた中温条件を設定して行った。

まず、 $^{13}\text{C}$ -ベンゼンを用いた SIP 法によりベンゼンを直接分解する菌として *Hydrogenophaga* sp. や *Rhodococcus* sp. 等のアクチノバクテリア属細菌とベータープロテオバクテリア属細菌を検出した。次いで、 $^{13}\text{C}$ -酢酸とベンゼンの有無による SIP-D 法、および異化分解菌と耐性菌を判別するために RNA SIP-D

法を用いて分解関連菌の解析を行った結果、新たに *Pseudomonas* 属細菌の2株がベンゼン資化分解菌であることを発見し、ベンゼン分解菌の中で最も活性化されていることを明らかにした。このうちの1株はベンゼンを資化するが、環境条件の変化によって異化的にも分解することが明らかとなり、バイオレメディエーションを行う際の有用な知見が得られた。その他、ベンゼン非分解菌等も検出された。以上により、ベンゼン汚染土壌の環境下においてベンゼン資化分解菌の他、異化的分解や、直接分解に関与していないが分解に何らかの影響を与えている非分解菌等を包括した微生物ネットワークを明らかにすることができた。さらに、ベンゼンの好気分解はカテコール開裂（メタ開裂とオルト開裂）を介して行われ、これまで同定された多くのベンゼン資化分解菌はオルト開裂を経由してベンゼン環を開環するが、異化分解菌や非分解菌はメタ開裂を経由することが示された。本研究により、SIP法とSIP-D法は資化菌のみではなく、異化分解菌や非分解菌を特定することができることが示された。この統一的な組み合わせ解析法はより広汎な菌叢解析を可能とし、汚染物質存在下における微生物ネットワークの解析を可能とした。

## 審 査 の 要 旨

バイオレメディエーションは未だ科学的基盤が不十分な環境技術であるため、早急に科学的基盤、特に浄化現場における微生物の生態に関するデータを蓄積する必要がある。本研究は、この課題解決に挑んだものである。石油は揮発性有機塩素化合物と異なり生育炭素源として取り込まれ、分解されることから、その分解に関与する微生物には資化菌、異化分解菌、耐性菌、非分解菌と多種多様存在することが容易に想像される。本研究ではこれら多様な微生物種を明らかにするための手法を模索し、その結果、SIP法、SIP-D法、およびRNA SIP-D法を組み合わせる新たな戦略を立てて検出解析を行った。この方法には新規性があり、また、解析に有効であることも示されたため、高く評価することができる。

以上のように、本研究で得られた成果はバイオレメディエーションの科学的基盤構築に貢献するものであり、当浄化技術の新たな発展に寄与した。

平成25年12月3日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。