

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Response of River Water Bacterial Communities to Organic Chemical Compounds   |
| Author(s)    | Welikala, Nihal   |
| Citation     | 大阪大学, 1997, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/40138">https://hdl.handle.net/11094/40138</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |   |              |
|------------|---|--------------|
| 氏名         | ウェリカラ<br>Welikala   | ニハル<br>Nihal |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(薬学)  |              |
| 学位記番号      | 第 13081 号   |              |
| 学位授与年月日    | 平成9年3月25日   |              |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科応用薬学専攻   |              |
| 学位論文名      | Response of River Water Bacterial Communities to Organic Chemical Compounds<br>(河川水中の細菌の化学物質に対する応答) |              |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 那須 正夫<br><br>(副査)<br>教授 溝口 正 教授 宮本 和久 教授 西原 力  |              |

## 論文内容の要旨

現在、様々な種類の化学物質が世界各国で合成され、利用されている。その多くは我々がより快適な生活を営むために必要不可欠であるが、一部の化学物質の過度の使用は環境汚染などの問題を引き起こしている。ここで、環境中に放出された化学物質の多くは生分解作用によって無機化されるため、環境保全のためには環境中における化学物質の生分解性を評価することが重要である。同時に化学物質が既存の生態系に与える影響を明らかにしておかなければならない。

この化学物質の生分解過程においては微生物が重要な働きをするが、環境中に生息する微生物の多くは培養が困難であるため、これまでの培養に依存した方法のみでは環境中に放出された化学物質に対する微生物の応答を知るには限界がある。今回、私は化学物質の生分解性試験法である阪大法ならびにTOC 阪大法の試験系を河川環境のモデル系とし、化学物質に対する河川水中の微生物群集の応答を細菌数、アニリン分解菌数、細菌の活性および細菌群集構造の変化から解析した。細菌数としては全菌数ならびに寒天平板培地法による従属栄養細菌数を測定した。また蛍光染色剤CTC やCFDAを用いて細菌の呼吸活性、エステラーゼ活性をシングルセルレベルで測定した。さらに16S rRNAを指標としてコロニーハイブリダイゼーション法を用いて培養可能な細菌群集構造、HNPP/Fast Red TR - 蛍光in situ ハイブリダイゼーション法を用いて培養困難な細菌も含めた細菌群集構造を解析した。なお、研究には環境の異なる4地点から採取した河川水を用いた。箕面川の高山、滝上は汚染が進んでいない地点であるのに対し、猪名川の桑津、寝屋川の北橋は汚染が進んでいる。

TOC 阪大法は河川水中での化学物質の生分解性を評価するためのriver die-away法の一つである。この方法は簡便かつ迅速であり、評価対象の河川から採取した微生物による化学物質の完全分解を測定する。そこで、TOC 阪大法を用いて5種の化学物質の生分解性を評価した。その結果、アニリンとp-クレゾールは高山、北橋のどちらの地点においても易分解性であると評価された。逆にN-メチルアニリンは試料水採取地点の違いにかかわらずほとんど分解されず、難分解性であると評価され、これらの結果は従来の生分解試験法である阪大法、MITI法と同じであった。しかしながら、ヘキサメチレンジアミンならびにo-トルイジンは試料水採取地点によって生分解性が大きく変化し、汚染の進んだ地点では易分解性を示したのに対し、汚染の見られない地点では難分解性を示した。したがって、TOC 阪大法を用いることにより河川環境における化学物質の生分解性を地点特異的に評価できることがわかった。

次にアニリンをモデル化合物、TOC 阪大法の試験系を河川環境のモデル系として、河川細菌の中で特に培養可能

な群集について化学物質に対する応答を見た。その結果、河川水中の細菌群集によるアニリンの生分解曲線は試験系内の細菌数ならびに培養可能なアニリン分解菌の増減と相関していた。また、汚染の進んだ地点から採取した試料に比べて汚染の進んでいない地点から採取した試料ではアニリンの添加による細菌数の大きな変化が見られ、これは汚染の進んだ地点の細菌群集がすでに化学物質に適応している可能性を示唆するものであった。また、アニリン生分解過程における培養可能な細菌群集ならびにアニリン分解細菌群集の変化をコロニーハイブリダイゼーション法により解析した結果、アニリンの生分解が盛んな時期では*Burkholderia*, *Pseudomonas* rRNAⅢ型および*Alcaligenes* に属する細菌が優先種となった。

さらにアニリンをモデル化合物、阪大法ならびにTOC 阪大法の系を河川のモデル系として、アニリン生分解にともなう細菌数やその活性の変化を測定し、さらにHNPP/Fast Red TR - 蛍光in situ ハイブリダイゼーション法を用いて培養困難な細菌も含めた細菌群集構造の変化を解析した。阪大法の系ではアニリン以外に炭素源を加えているため、細菌の増殖が盛んであり、速やかにアニリンを生分解した。しかしながら、アニリンが単一炭素源であるTOC 阪大法の系ではアニリン生分解過程での細菌数やその活性には大きな変化はなかった。したがって、より貧栄養な環境では流入した化学物質の生分解に時間がかかる可能性が示された。また細菌を培養することなく特定の核酸配列を指標として検出するHNPP/Fast Red TR - 蛍光in situ ハイブリダイゼーション法を用いることによって、従来のコロニーハイブリダイゼーション法に比べて多くの細菌を分類することができた。その結果、アニリン以外の炭素源の有無にかかわらずアニリンの生分解が盛んな時期には*Pseudomonas* rRNA I 型および*Acinetobacter* に属する細菌が優先種となった。また、*Burkholderia*, *Pseudomonas* rRNAⅢ型および*Alcaligenes* に属する細菌はアニリン以外に炭素源がある場合に優先種となった。*Flavobacterium*および*Cytophaga* に属する細菌はアニリンの生分解が盛んな時期には減少した。

以上の結果より、TOC 阪大法を用いることにより河川環境における化学物質の生分解性を地点特異的に評価できることがわかった。また、TOC 阪大法の実験系と全菌数計測法、活性染色法、HNPP/Fast Red TR - 蛍光in situ ハイブリダイゼーション法を組み合わせるにより、環境中に放出された化学物質がそこに生息する微生物に与える影響を評価できることがわかった。さらにその評価結果より、アニリンの生分解にはアニリン以外の炭素源の有無にかかわらず*Pseudomonas* rRNA I 型および*Acinetobacter* に属する細菌が関与し、アニリン以外に炭素源がある場合には*Burkholderia*, *Pseudomonas* rRNAⅢ型および*Alcaligenes* に属する細菌も関与する可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究はアニリンをモデル化合物として、培養法ならびにriver die-away法を用いて化学物質の生分解にともなう細菌活性の変化を個体レベルで検討し、さらにその群集構造を16S rRNAの配列をもとにした細菌のグループ特異的遺伝子プローブを用いたHNPP/Fast Red TR - 蛍光in situ ハイブリダイゼーション法により解析し、化学物質の微生物生態系に対する影響を定量的に明らかにしたものである。その結果、化学物質の分解にともない特定の細菌群が優占となり、分解の終了とともに再び群集構造は大きく変化することを示した。またその変化は河川の環境により大きく異なることを明らかにしている。自然環境中の細菌の多くは通常の方法では培養が難しく、このような手法が環境中に放出された化学物質の微生物群集に与える影響を客観的に評価できることを示すものである。このような新しい手法は環境中での化学物質の生分解に中心的な役割を果たしている細菌の動態を明らかにするための基礎となるものであり、その成果は化学物質の環境中での運命予測にも貢献することより、博士（薬学）の学位論文に値するものと判断する。