The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Changes of microbial community structure in river biofilms during biodegradation processes of chemical compounds
Author(s)	Ruben, Alonso Araya Valencia
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43364
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【20】

氏　　名	Ruben Alonso Araya valencia（るーべん あろんそ あらや ばれんしあ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学 位 記 番 号	第　16973　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学 位 論 文 名	Changes of microbial community structure in river biofilms during biodegradation processes of chemical compounds（化学物質生分解過程における河川バイオフィルム中の細菌群集構造変化）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　那須　正夫 （副査） 教 授　田中　慶一　　教 授　西原　　力　　教 授　宮本　和久

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や公害などの問題を引き起こしている。化学物質を安全に使用するためには、生物に対する毒性のほか、環境中における分解性についても十分に評価しておく必要がある。

化学物質の生分解過程においては、微生物が重要な役割を担っている。そこで、化学物質の生分解試験法では、活性汚泥をはじめとする様々な微生物源が使用されている。河川の特定地点における化学物質生分解性を評価するための試験法である River die-away 法では、その地点で採取した表層水が微生物源として使用される。しかし、河川の生態系においては、多くの有機物が川床や岩石の表面に付着している微生物よりなるバイオフィルムで分解されていることを考える必要がある。

本研究では工業地域を流れる河川より採取した表層水およびバイオフィルムを対象として、各々の微生物の現存量や生理活性、微生物群集構造の違いを明らかにした。さらに、モデル系を用いて、化学物質生分解能の違いを評価するとともに、生分解過程における微生物群集構造の変化を解析した。微生物現存量の測定には核酸結合性の蛍光染色剤である DAPI を、呼吸活性を持つ微生物数の測定には細胞の呼吸により赤色蛍光物質に還元される CTC を用い、蛍光顕微鏡下で直接計数した。細菌群集構造の解析は16SrRNA を対象として、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）法により個体レベルで、また rDNA を対象として、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法により群集レベルで行った。

大阪府下の神崎川（十八条大橋）にポリカーボネート板を8月、10月、12月に沈め、1、3、7、14日目に表面に生じたバイオフィルムを採取した。同時に表層水を採取し、各々の生理活性および微生物群集構造の違いを評価した。全菌数に占める呼吸活性を示した細菌の割合は、表層水で12%、バイオフィルムで20%であり、季節を問わず、バイオフィルムにおいて表層水よりも高い割合の細菌が呼吸活性を示した。FISH 法により真正細菌を検出可能な EUB プローブとハイブリダイズした細菌は、表層水で全細菌の55%、バイオフィルムで73%であった。すなわち、活発にタンパク質合成を行っている細菌の割合もバイオフィルムにおいて高く、表層水に比べバイオフィルムの細菌が高い生理活性を有していることをシングルセルレベルで明らかにした。いずれの試料においても、優占種は *β-Proteobacteria* および *Cytophaga-Flavobacterium* グループの細菌であった。*β-Proteobacteria* グループの細菌は汚染物質の分解に深く関与していることが知られており、また表層水に比べバイオフィルムにおいて生理活性を有する細菌の

割合が高かったことから、河川中においてはバイオフィルムの細菌が汚染物質の分解に大きな役割を果たしていることが確かめられた。また、DGGE法により得られたバンドパターンを多次元尺度法により解析することにより、バイオフィルムの形成にともなう細菌群集構造の変化を明確に表すことが可能であった。

次に、化学物質の生分解におけるバイオフィルムの役割を評価するために、モデル系を用いた実験を行った。アニリンおよびN－メチルアニリンを供試物質とし、人工河川水に添加した。神崎川（十八条大橋）で採取した表層水およびバイオフィルムを微生物源として、12時間の明暗周期で2週間振とうし、1、3、7、10日目にサンプリングを行った。各試料における化学物質分解率をTOCメーターで測定するとともに、細菌のDNAを抽出し、DGGE法によりrDNAを指標として細菌群集構造の変化を追跡した。その結果、易分解性物質であるアニリンはいずれの微生物源においても3日目に70%以上が分解されたのに対し、難分解性物質であるN－メチルアニリンはバイオフィルムでのみ分解された。したがって、河川中における難分解性化学物質の分解には、バイオフィルムがより大きな役割を果たしていることが明らかとなった。またDGGE法により得られたバンドパターンを多次元尺度法により解析した結果、化学物質生分解にともなって細菌群集が大きく変化することを確認した。

以上の結果より、河川においては表層水よりもバイオフィルムの微生物が化学物質の生分解に深く関与していることを確認した。これまでRiver-die away法においては、微生物源として河川表層水のみが用いられていたが、今回の研究により河川における化学物質の運命予測において、バイオフィルムを考慮する必要のあることがわかった。

論文審査の結果の要旨

環境中の化学物質の生分解に、バイオフィルムの果たす役割は大きい。本研究は、都市近郊河川のバイオフィルムを対象に、そこに生息する細菌の現存量及び生理活性を蛍光染色法を用いて明かにするとともに、その群集構造を蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法及び変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法により解析したものである。さらに化学物質の生分解における細菌群集構造の変化を調べた。

その結果、浮遊細菌と比較して、バイオフィルム中の細菌は高い割合で生理活性を示し、汚染物質の分解に深く関与していることを示した。またバイオフィルムは、形成開始後3日から7日以内にその細菌群集構造が安定することを明かにした。さらに易分解性化学物質は、表層水、バイオフィルムのいずれの細菌によっても分解されたのに対し、表層水中の細菌が分解できない化学物質であっても、バイオフィルム中の微生物は分解できたことから、河川における難分解性化学物質の生分解にバイオフィルムが重要な役割を果たしていることが明かとなった。

今回得られた成果は、化学物質の生分解におけるバイオフィルムの重要性を示すものであるとともに、環境中における化学物質の運命予測や安全性評価に役立つ新たな試験法の開発にもつながるものであり、博士（薬学）の学位論文に値するものと判断する。