

氏 名	張 弦
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第4236号
学位授与の日付	平成22年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Specific detection and assessment of the physiological activity of an anaerobic benzene degrader, <i>Azoarcus</i> sp. strain DN11 in contaminated underground water (汚染地下水における嫌氣的ベンゼン分解菌 <i>Azoarcus</i> sp. DN11 株の特異的検出と生理活性評価)
論文審査委員	教授 鈴木 信弘 准教授 園田 昌司 教授 金原 和秀 (静岡大学)

学位論文内容の要旨

The physiological activity and cell number are the most important determinants that affect the efficiency of bioremediation of benzene in contaminated underground water with an anaerobic benzene degrader, *Azoarcus* sp. strain DN11. In this study, various methods are applied to assess the physiological activity of the strain under anaerobic condition.

MPN-PCR method was applied to quantify cell concentrations of strain DN11 in environmental samples, which artificially inoculated with strain DN11. As a result, the detection of PCR products did not correlate to the dilution series of underground water samples. The technique was so far successfully applied to many cases, but further consideration on experimental condition should be necessary to apply the technique to the samples.

An enumeration protocol of *Azoarcus* sp. strain DN11 with fluorescent probes was developed. The effect of benzene concentration on the viability of strain DN11 was evaluated with the protocol. Several GFP-labeled strain DN11 were constructed to monitor its activity under anaerobic condition. The result showed that although the aerobic growth of strain DN11 on benzene was rapid, its anaerobic growth would be highly stressful conditions as revealed by this experiment. The possible causes for this decrease in physiological activity were unknown, but techniques for evaluating physiological activity were thus established.

A method to analyze physiological status of a model target bacterium was established. A unique method that enables identification and monitoring of physiological status of individual target bacterial cells was established. The key strategy of this method is the usage of glue, which can immobilize the cells on membrane filters without affecting their viability and microscopic observation. Together with improved FISH procedure, most of cells were labeled with high efficiency. The method enables both identification of target bacteria in a mixture of various bacteria and analysis of its physiological activity.

The method was applied to analyze strain DN11 grown in anaerobic contaminated underground water. At the same time, degradation of benzene was traced. The results suggested that benzene degradation occurred but the energy generated by the degradation was used for survival but not for their growth. The results also suggested that in order to gain cell mass and efficient benzene degradation in anaerobic condition, some more modifications on culture conditions including its composition should be further investigated.

By applying the method described in this study, the physiological activity of a target bacterium in a mixed population can be evaluated, to know whether the inoculated (or introduced) bacterium are efficiently degrading the contaminants in environments. The combined technique can be used in monitoring bacterial cell viability for bioremediation. When their physiological activity is low as found in this study, the bioremediation conditions can be changed to facilitate degradation. The information is very useful for better understanding for actual bioremediation process and will be applied for practical management of bioremediation.

論文審査結果の要旨

8月17日に行われた博士論文発表会での発表ならびに質疑応答を受けて、本論文の学位審査を行った。本論文では、地下水の汚染を処理するバイオレメディエーションでの分解活性の維持をモニタリングするため、生理活性の計測を行う手法の構築を嫌氣的ベンゼン分解菌、*Azoarcus* sp. DN11株を用いて行った。まず、DN11株のベンゼン分解性を解析した結果、一般的な汚染濃度である1mg/lのベンゼンを12週間で分解可能なことを確認した。また、生細菌の計測法を確立し、高濃度のベンゼン存在下では、生存率が著しく減少することを見出した。次に、地下水中でのDN11株のベンゼン分解と生残性を解析するため、生存活性とFluorescence In Situ Hybridization (FISH)法を組み合わせた、新規の解析手法の構築を行った。FISH法は細菌を固定化して行うため、生細菌の計測を行った後に、菌体をメンブラン上に固定してFISHを行う、新規の手法の構築を試みた。様々な試行錯誤の結果、希釈した接着剤を用いることで、菌体のメンブラン上への固定と、効率的なFISH検出法の構築に成功し、地下水環境の複合微生物系の中から、特定の生きた分解菌を計測することを可能にした。次に、実際の地下水サンプルにDN11株を添加し、ベンゼン分解と生残性のモニタリングを行った。その結果、ベンゼンの分解は達成するが、DN11株の総菌数は減少し、生残性も著しく減少することが認められた。この結果は、分解の過程で分解菌が死滅することを示しており、今後、分解活性を維持するには、栄養塩や電子供与体の添加が必要であることを示唆し、モニタリングの重要性を示す結果が得られた。また、本論文で開発した手法の重要性に関して質疑応答を行い、見出した現象の重要性を認識することができた。その結果、行った研究は学位論文として十分価値があると評価された。また、論文で行った研究の周辺分野に関して、質疑応答を行った。学力については、当該分野の知識は十分であり、今後の研究の展開に関して意義ある議論をすることができ、博士号取得者として十分なレベルであることを確認した。論文作成能力に関しては、英語で1編の投稿論文を書いていることから、十分な英語能力を有していることを確認した。以上の結果から、論文は博士（学術）として十分価値があり、学力は博士課程修了者として十分なレベルであるものと判定した。