

Title	変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法による地下水中の細菌 群集構造解析
Author(s)	岩本, 朋忠
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169330
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

P7402

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法による 地下水中の細菌群集構造解析

岩本朋忠

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法による

地下水中の細菌群集構造解析

# 岩本 朋 忠

-

目次

緒論		1
本論		
第一章 地下水中の約 変性剤濃度の	田菌群集の多様性を解析するための 内配ゲル電気泳動法の条件検討	4
第二章 バイオレメラ 地下水中の約	ディエーション実証試験における 田菌群集構造の変化	10
第三章 バイオレメデ 地下水中のメ	*ィエーション実証試験における タン資化菌の挙動	23
総括		31
結論		33
謝辞		34
引用文献		35

# Abbreviations

A.T.	atmospheric temperature
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
DO	dissolved oxygen
EC	electric conductivity
PI	propidium iodide
W.T.	water temperature

#### 緒論

人間活動の増大に伴い,大量の生活排水,工場廃水,畜産排水,肥料・農薬等が 河川や地下水をはじめとする陸水中に流入し,深刻な水質汚濁を引き起こしている. 水は全ての生命活動の源となるだけに,その汚染の拡大防止,修復は人類の緊急課 題である. そのためには,工学的な対応のみならず,人為的な負荷の生態系への影 響を評価し,根本的な解決を図らなければならない.

生態系の根幹部を構成する細菌は,分解者として有機化合物を無機化する役割を 果たしていると同時に,腐食連鎖の第一次生産者として上位の生物に栄養源として 利用されており<sup>(1)</sup>,物質循環において中心的な役割を担っている. その世代交代時 間は短く,多様な機能を持っていることから<sup>(2-4)</sup>,環境変化に速やかに応答した群集 を形成する. また,その変化は上位の生態系に影響を及ぼす.したがって,人為的 負荷に対する細菌群集の応答は,生態系への影響を早期に見出すための優れた生物 指標となる.

群集の種構成の変化パターンを示すのに、種多様性が生態学において広く用いら れている. 種多様性は一般に、種の豊かさと均等性に基づいて評価される<sup>(5)</sup>. 例 えば、河川では有機物汚染の進行に伴い、水生生物の多様性は低下し、イトミミズ 科に代表される特定の種により優占されることが知られている<sup>(6)</sup>. 環境負荷の細菌 群集への撹乱を評価するにあたっても、細菌群集の多様性の変化を解析することが 有効になると考えられる. しかしながら、自然環境中の細菌の大部分は培養できな い<sup>(7-10)</sup>という手法的な制約や細菌の種の同定は容易ではないという問題から、環境負 荷に対する細菌群集の多様性の変化については十分な解析がなされていない.

培養操作に依存することなく自然環境中の細菌群集構造を解析するに当たっては, 細菌群集を多様な遺伝子の集合体として捉え,個々の遺伝子を解析するというアプ ローチが有効である. 種々の遺伝子情報の中でも16S rDNAは,変異領域と保存領 域が確認されており,特定の種間での保存性が高いことから<sup>(11)</sup>,系統分類および進 化系統の指標分子として広く利用されている. したがって,自然環境中の細菌の16S rDNAを標的とすることで,培養操作に依存することなく,細菌群集構造の解析が可 能となる. 代表的な手法として,環境試料中の細菌から抽出したDNAの16S rDNA をPCR増幅したのち,クローンライブラリーを作成し,塩基配列を決定するという 方法が土壌や水圏サンプルの細菌群集構造解析に広く用いられている<sup>(12-18)</sup>. 本手法

を用いることで,群集を構成する細菌の種 属に関する情報を得ることができ,細 菌群集構造の詳細な解析が可能となるが,1つの環境サンプルの解析に多くの労力と 時間を要することから,細菌群集の多様性の変化を継続的にモニタリングするには 適当な手法とは言えない.そこで,簡便に細菌群集の多様性の変化をモニタリング する手法として,変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法,(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE法)が注目されている<sup>(19-26)</sup>.DGGE法で得られる各バンドの 輝度は個々の種の存在量を,バンドの数は種の数を反映していると考えられる<sup>(27)</sup>.し たがって,本手法では,種の同定を行うことなく細菌群集の多様性の変化をゲル上 のバンドパターンの変化として解析できる.また,環境試料から得られる複雑なバ ンドパターンから,多様性指数の算出<sup>(27)</sup>やバンドパターンの類似性評価<sup>(28-30)</sup>を行う ことで,細菌群集の多様性の変化を客観的に評価することが可能である.さらに, 機能遺伝子を標的とすることで,特定の機能を持つ細菌の多様性解析も可能となる <sup>(31,32)</sup>.本研究では,環境負荷の地下水中の細菌群集に対する撹乱を,継続的にモニ タリングできる手法として,DGGE法に着目した.

地下水中には、多種多様な細菌が存在するので、その多様性の解析にDGGE法を適 用するにあたっては、適切な泳動条件を検討する必要がある. そのためには、変性 剤濃度勾配の設定と泳動時間の決定が重要となる. そこでまず、標準株、地下水サ ンプル、および河川水サンプルを用いて、地下水中の細菌群集構造の解析に適した DGGE泳動条件を検討した.

次に、千葉県君津市で行われたバイオレメディエーション実証試験現場地下水中の細菌群集の多様性の変化をDGGE法によりモニタリングし、処理の細菌群集への撹乱について検討した.バイオレメディエーションとは微生物の持つ物質分解能力を利用して、汚染した環境を修復する技術である.汚染現場でのバイオレメディエーションの運用にあたっては、技術の有効性を微生物学的側面から評価すること、および実施に伴う環境への影響評価を行うことが重要となる.そのためには、まず汚染物質の分解に関与する特定の微生物をモニタリングする必要があるとともに、現場の微生物群集構造の変化を解析する必要がある.しかしながら、自然環境中の細菌の大部分は培養できないという手法上の制約から、バイオレメディエーションにおける微生物の寄与については、ブラックボックスとして扱われてきた.そのために効率的な浄化が見られない場合の原因解明や解決策について、浄化の中心的役割を担う微生物面からの検討ができないという問題がある.また、微生物群集に対す

 $\mathbf{2}$ 

る影響について理解されていないため、バイオレメディエーションの生態系への負 荷を客観的に評価・確認することが難しいという問題も抱えている.

そこで本研究では、DGGE法を用いてバイオレメディエーション実証試験現場地下 水中の細菌群集の多様性の変化をモニタリングし、処理の細菌群集への撹乱につい ての知見を得た.

バイオレメディエーションにおいて、微生物が浄化の中心的役割を担っているに もかかわらず、その寄与の解明についての研究は始まったばかりである。 バイオレ メディエーション技術の有効性を微生物面から評価するためには、まず汚染物質分 解菌の挙動についての理解を深めなければならない.

そこで,バイオレメディエーション実証試験現場の地下水試料に対して,メタン 資化菌を標的とするプライマー<sup>(33-35)</sup>を用いたDGGE解析を行い,処理による分解菌 の挙動を解析した.

# 第一章 地下水中の細菌群集の多様性を解析するための変性剤濃度勾配 ゲル電気泳動法の条件検討

環境負荷による地下水中の細菌群集への撹乱を、その多様性の変化から評価する 上で、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE 法)は有効な手法であると考えられる. 地下水中には、多種多様な細菌が存在し、DGGE のバンドパターンは複雑になるこ とから、その適用にあたっては、用いるプライマーにより得られる PCR 産物の分離 条件を検討しなければならない. そのためには、解析する DNA 断片の 2 本鎖から 1 本鎖への解離度を求め、適切な変性剤濃度勾配の設定が必要となる. また、複数 の DNA 断片の分離度を最大にするためには、全ての DNA 断片のゲル上での泳動が 完了する泳動時間を決定する必要がある. そこで、本研究では、地下水中の細菌群 集構造解析に DGGE 法を適用するための条件検討を行った.

#### 材料および方法

#### 採水地点

地下水は,千葉県君津市久留里市場の2本の井戸より深度約4mの地点から,採水器(井戸用採水器 形式;SY-IK-B,400 ml容,吉野計器)を用いて,1997年12月24日に採取した.河川水は大阪府内を流れる神崎川の神崎橋より1997年10月27日,猪名川の桑津より1997年12月10日に表層水を採取した.河川水,地下水の採取時に採水現場で測定した気温,水温,pH,EC,DOをTable1に示した.

#### 細菌株

DGGE の条件検討にあたっては, Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055, Escherichia coli K-12 W3110, ならびに Flavobacterium johnsoniae ATCC 17061 を用いた. これらの菌株は LB 培地(1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl [pH 7.9])中で定常期まで培養し、実験に用いた.

#### **DNA 抽出**

試料 1.5 ml を 4℃, 15,000 x g, 45 分間遠心し, 細菌を沈殿させ回収した.

遠心後の上清を別のチューブに移し,再び4℃,15,000 x g,45 分間遠心し,再度細菌の回収を行った. それぞれの沈殿を25µ1の滅菌水で懸濁し,液体窒素による凍結,室温での融解を3回繰り返したのち,懸濁液を1本のチューブにまとめた.

Table 1. Physico-chemical characteristics of river water and groundwater

Sampling stations	Sampling date	A.T. (℃)	<b>₩.Т</b> . (℃)	pН	EC (µ S/cm)	DO (mg/l)
Kanzakibashi	Oct. 27, '97	16.0	17.6	7.7	1600	7.7
Kuwazu	Dec. 10, '97	7.5	11.5	7.9	220	6.3
Kimitsu-C	Dec. 24, '97	3.1	13.5	7.0	213	3.4
Kimitsu-M5	Dec. 24, '97	3.2	12.8	7.1	279	1.7

A.T., atmospheric temperature; W.T., water temperature; EC, electric conductivity; DO, dissolved oxygen.

<u>プライマー</u>

当研究室で設計した真正細菌の 16S rDNA に特異性を示す neo EUB プライマー を用いた. また, DGGE 解析を行うために, 933 f プライマーの 5'末端に GC クラ ンプを負荷した. プライマーおよび GC クランプの塩基配列を Table 2 に示した.

Table 2. Primer sequences and positions

Primer	Positions <sup>a</sup>	Sequence
neo EUB 933f-GC-clamp	933 - 955	5'-GC-clamp-GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG-3'
neo EUB 1387r	1368 - 1387	5'-GCCCGGGAACGTATTCACCG-3'

<sup>a</sup>The numbers used for the position are the numbers in the corresponding *E. coli* sequence.

#### PCR

PCR 反応液の組成は、  $3.0 \text{ mM MgCl}_2$ , 0.2 mM dNTPs, neo EUB プライマー各 0.4 mM, 耐熱性 DNA Taq ポリメラーゼ(パーキンエルマ)1.25U とした. アニーリング温度を 各サイクル毎に 0.5Cずつ減少させるタッチダウン PCR を行った. 反応条件は、 95C 9分間で hot start し、 94C 1分(denaturation)、 65Cから 55Cまで各サイクル毎に 0.5C ずつ減少させ1分(primer annealing), 72℃3分(primer extension)を20サイクル行っ たのち, 94℃1分(denaturation) 55℃1分(primer annealing) 72℃3分(primer extension)を10サイクル, 72℃7分(final extension step)で行った.

#### **DGGE**

グラディエントフォーマーを用いて、アクリルアミド総濃度 6.5%(アクリルアミ ド:ビスアクリルアミド=37.5:1)で、変性剤濃度に直線勾配ができるようにポリ アクリルアミドゲルを作製した. 40% ホルムアミドと7M 尿素を含む溶液を変性 剤濃度 100%としている. 泳動後のゲルは、SYBER Gold (Molecular Probe)を用いて 20 分間染色したのち、FluorImager (Molecular Dynamics)で 488 nm アルゴンレーザー を用いてスキャンし、デジタルイメージを得た.

#### 結果および考察

淡水中に多く存在することが報告されている<sup>(36-39)</sup>Acinetobacter calcoaceticus. Flavobacterium johnsoniae および、し尿汚染の指標菌である Escherichia coli を用いて 変性剤濃度勾配の検討を行った. Acinetobacter calcoaceticus および Escherichia coli は、ともにプロテオバクテリアの y サブクラスに属しており、16S rDNA の塩基配列 に基づく系統解析上,比較的近いグループに分類されている.一方,Flavobacterium johnsoniae は, Acinetobacter calcoaceticus および Escherichia coli とは離れたグループ に分類されている. 系統的に近い細菌と、離れた細菌の組み合わせとして、これら 3株を用いた. Acinetobacter calcoaceticus, Escherichia coli, Flavobacterium johnsoniae から PCR 増幅して得た 16S rDNA 断片の解離度を求めるために、泳動方向と垂直方 向に 40%から 80%の変性剤濃度勾配をもつゲルを用いて,55℃,100V で 3 時間泳動 を行った(Fig.1). いずれの DNA 断片も変性剤濃度勾配により, S 字型の泳動パター ンを示した. 変性剤濃度 45%では、いずれの DNA 断片も、その塩基長に応じた泳 動を示しており,2 本鎖構造が完全に維持されているものと考えられる. 変性剤濃 度勾配が 50%以上になると、泳動距離に違いが現れ、部分的な 1 本鎖への解離が進 んでいることを示している. 変性剤濃度約 55%以上で, Flavobacterium johnsoniae の泳動はほとんど停止していることから,GC クランプ以外の全ての配列が1本鎖に 解離したことが分かった. Acinetobacter calcoaceticus, Escherichia coli では,約60-65% で泳動が停止した. したがって、今回用いたプライマーから得られる 16S rDNA 断

片の DGGE 解析には,これら3株 が完全な2本鎖構造を維持する変 性剤濃度である45%から,ターゲ ット配列の全てが解離する濃度で ある65%の変性剤濃度勾配をもつ ゲルが適当であると考えた.

次に,泳動方向と平行方向に45% から 65%の変性剤濃度勾配を持つ ゲルを用いて,泳動時間の検討を 行った(Fig.2). *Escherichia coli*, 地下水(Kimitsu-M5), さらに,地 下水との比較のための河川水 (Kuwazu)より抽出した DNA から PCR 増幅して得た 16S rDNA 断片 を一定時間毎にアプライし,泳動 時間とバンドパターンの変化を追



Fig. 1. Perpendicular DGGE separation pattern of a mixture of PCR-amplified 16S rDNA fragment from *A. calcoaceticus* (Ac), *E. coli* (Ec), and *F. johnsoniae* (Fj).

跡した. *Escherichia coli* では 10 時間, 地下水, 河川水サンプルでは 12 時間で全 DNA 断片の泳動がほぼ完了した. 以上のことから, 本プライマーを用いた地下水試料の DGGE 解析条件としては, 55℃, 100V, 変性剤濃度勾配 45%から 65%で 12 時間泳 動が適当であることがわかった.

環境中の細菌の解析に分子生物学的手法を適用するにあたっては、DNA の抽出効率ならびに再現性を十分考慮しなければならない. Gillan ら<sup>(40)</sup>は、バイオフィルムの細菌群集構造解析において、DNA 抽出法の違いによる DGGE バンドパターンの違いを比較し、凍結・融解法が有効であると報告している. そこで、地下水および河川水試料中の細菌からの DNA 抽出に凍結・融解法を用いて、その再現性を確認した.河川水(Kanzakibashi)、地下水(Kimitsu-C, Kimitsu-M5)試料を用いて、細菌の回収、DNA 抽出および PCR を各試料 3 回繰り返し、DGGE 解析を行った結果を Fig.3 に示した. いずれのサンプルにおいても、同様のバンドパターンがみられ、今回用いた、細菌の回収法および DNA 抽出法の高い再現性が確認された.



Fig. 2. Time travel experiment of DGGE separation pattern of PCR amplified 16S rDNA from *E. coli*, groundwater sample (Kimitsu-M5), and river water sample (Kuwazu). The time course of the experiments is indicated above the lanes in hours.

自然環境中の細菌群集構造解 析への DGGE 法の適用は, Muyzer らによって, 1993 年にはじめて 報告された<sup>(19)</sup>. 約 200bp の 16S rDNA 断片を増幅するプライマー を用いることで, バイオフィル ムの細菌群集構造を DGGE のバ ンドパターンとして解析してい る. しかしながら, 彼等の用い たプライマーでは, 標的とする 塩基長が短すぎるため十分な解 析ができず, より長い領域を標 的としたプライマーを用いる必 要性が報告された<sup>(41)</sup>. そこで



Fig. 3. DGGE analysis of triplicate samples taken from (a), Kanzakibashi; (b) Kimitsu-M5; (c) Kimitsu-C. Condition for DGGE is 55°C, 100V, 12h.

今回, DGGE 法の地下水試料への適用を検討するにあたっては, 当研究室において 新たに設計した, 真正細菌の 16S rDNA に特異性を示すユニバーサルプライマーを 用いた.

DGGE 法は,細菌群集の多様性の変化をバンドパターンの変化として捉えること のできる優れた手法である. しかしながら,菌種により 16S rDNA のコピー数が異 なる<sup>(42)</sup>, PCR 増幅によるバイアス<sup>(43,44)</sup>がかかる,さらに,存在量が全細菌数の 1% 以下であるマイナーな細菌についてはバンドとして検出できない<sup>(45)</sup>などの問題から, DGGE バンドパターンは細菌群集構造を忠実に表現したものではないという点に注 意しなければならない. 同一地点において細菌群集の多様性の連続的な変化を解析 する場合には,これらの問題が全てのサンプルに一様に影響することから,DGGE 解析結果は元の細菌群集の多様性の変化をよく反映したものであると考えることが できる. 一方,異なる地点で得た DGGE 解析結果から細菌群集の多様性の違いを述 べる場合には,上述の問題点について十分に考慮する必要がある.

小括

地下水中の細菌群集の多様性を解析するための DGGE 法の変性剤濃度勾配を検討 するにあたっては, Acinetobacter calcoaceticus, Escherichia coli, Flavobacterium johnsoniae を用いた. 泳動方向と垂直方向に変性剤濃度勾配を持つゲルを用いて55℃, 100V, 3 時間泳動を行った結果, Flavobacterium johnsoniae で約55 %, Acinetobacter calcoaceticus, Escherichia coli では 60 - 65%で一本鎖に解離することが分かった. ま た, いずれのサンプルも 45%では, 完全な 2 本鎖 DNA 構造を維持することが分かっ た. このことから, 本プライマーを用いた DGGE 解析には, 45 %から 65 %の変性 剤濃度勾配が適当であると考えた. 次に, Escherichia coli, 地下水, 河川水試料を 用いて, 泳動時間の検討を行った. 泳動方向と平行方向に 45 %から 65%の変性剤 濃度勾配をもつゲルを用いて泳動した結果, Escherichia coli では泳動時間 10 時間, 地下水, 河川水試料では泳動時間 12 時間で DNA 断片の泳動がほぼ完了することが 示された. また, 今回用いた細菌回収法および DNA 抽出法の再現性が確認された.

以上のことから,本プライマーを用いた DGGE 法を地下水中の細菌群集構造解析 に適用するにあたっては,変性剤濃度勾配 45 %から 65 %,55℃,100V,12 時間泳 動が適当であると考えられた.

# 第二章 バイオレメディエーション実証試験における地下水中の細菌群 集構造の変化

微生物の持つ多様な化学物質分解能を利用するバイオレメディエーションが,有 害化学物質で汚染された土壌や地下水などを浄化する技術として世界的に注目され ている. 本技術は,現場での運用が可能なことから,環境中に広く拡散した汚染物 質を低コストかつ効率的に除去しうるものとして期待されている. しかしながら, バイオレメディエーションにおいて微生物がその浄化の中心的役割を担っているに もかかわらず,処理における微生物の寄与については手法上の制約から,未だブラ ックボックスとして扱われている. そのため, 効率的な浄化が見られない場合の 原因解明や解決策について,微生物学的な面からの検討ができないという問題があ る. さらに,バイオレメディエーションの生態系への影響を評価する上で必須とな る,微生物に対する影響について理解されていないため,バイオレメディエーショ ンの環境,また生態系への負荷を客観的に評価・確認することが難しいという問題 を抱えている.

そこで、本研究では DGGE 法を用いて、バイオレメディエーション実証試験にお ける細菌群集構造の変化を客観的・定量的に解析し、処理の細菌群集に対する撹乱 についての知見を得た.

#### 材料および方法

バイオレメディエーション実証試験

千葉県君津市久留里市場で行われたバイオレメディエーション実証試験現場周辺 の概況を Fig.4 に,実証試験現場の概要を Fig.5 に示した. Fig.4 中の工場が汚染源 であり,地下水流に沿ってトリクロロエチレン汚染が広がっている. 実証試験現場 の地下水は約 200 $\mu$ g  $\Gamma^1$  のトリクロロエチレン汚染がみられた. 第一帯水層は,地 表面下約 8 から 18m (標高 34 から 44m) に分布し,地下水温度は 15 - 16℃, pH 6 - 7, 溶存酸素濃度は 4 - 6 mg  $\Gamma^1$  である. 原位置バイオレメディエーション実証試験は 1998 年 9 月 25 日より 1999 年 1 月 19 日まで行われた. 揚水井戸から汲み上げた地 下水にメタン,酸素,栄養塩を添加して注入井戸から 1.5 1 min.<sup>-1</sup> の流量で戻すとい う,循環式の方法が用いられた. バイオレメディエーション装置の運転条件は,メ タン(10mg  $\Gamma^1$ ) 190 分注入,水 50 分注入,酸素 30 mg  $\Gamma^1$ と栄養塩(KNO<sub>3</sub> 30 mg  $\Gamma^1$ ,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mg l<sup>-1</sup>) 190 分 注入,水 50 分注入とい うパルス注入であった. 1998年 12月 21 日まで メタン,酸素,栄養塩の 注入を継続したのち. 1999年1月19日まで は、地下水の循環のみを 行った. 採水地点を Fig.5 に示す. サンプリ ング井戸 S1, S2, S3 お よびコントロ ール井戸より 採水器(井戸 Depth below ground surface (m 用採水器 形 式;SY-IK-B, 400 ml 容, 吉 野計器)を用 8 12 いて,地下水 16 500 ml を採取 した. サンプ リングは,実 証試験開始前 日, 実証試験



10 m Fig. 4. Sampling site in Kimitsu city.



Fig. 5. Scheme of the location of sampling well S1, S2, S3, injection well, extraction well, and control well at Kururi test site.

10, 31, 40, 45,

52, 60, 66, 73, 80, 87 日目, および処理終了後 29 日目に行った.

## 細菌数測定

全菌数測定には, PI (propidium iodide; Sigma)を用いた<sup>(46)</sup>. 90℃, 3 分間で熱固定 した試料に対し, PI を終濃度 5µg ml<sup>-1</sup>となるように加え,室温,遮光下で 15 分間 染色した. 蛍光染色した試料を孔径 0.2µm のポリカーボネートフィルター(東洋 濾紙)上に捕集し、プレパラートを作成後、蛍光顕微鏡 AX70(オリンパス)で観察した. 光学フィルターは、M-WIG cube を使用した. 各試料について細菌数が1視野あた り80個以上になるように調整し、1試料当たり30視野以上を計数した.

コロニー形成菌数の測定には、R2A 寒天平板培地<sup>(47)</sup>(酵母エキス, Difco Proteose Peptone No.3, カサミノ酸, グルコース, 可溶性デンプン各 0.5g; ピルビン酸ナトリウム, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 各 0.3g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05g; 寒天 15.0 g  $\Gamma^1$ )を用いた. 各試料を 滅菌蒸留水で段階希釈し, その 100 $\mu$ 1 を R2A 寒天平板培地に塗沫した. 25℃で 1 週間培養したのち, 生じたコロニーを計算した.

#### DNA 抽出, PCR

DNA 抽出および PCR は第一章に示した条件で行った.

#### <u>DGGE 解析</u>

第一章で決定した DGGE 条件を用いた.

#### DGGE バンドパターン解析

SYBER Gold (Molecular Probe)を用いて 20 分間染色したゲルを, FluorImager (Molecular Dynamics)で488 nm アルゴンレーザーを用いてデジタルイメージを得た. デジタルイメージを Image QuaNT(ver.4-2-J)を用いて各バンドの輝度を数値化し,多 様性指数である Shannon index の算出<sup>(27)</sup>とバンドパターンの差異度の算出に用いた.

以下の式に基づき各レーンのバンドパターンより Shannon index を算出した.

#### Pi = ni / N

(ni; 各バンドの輝度, N; 全バンドの輝度の総和)

Shannon index (H) =  $-\Sigma$  Pi log Pi

(Pi; レーン内での各バンドの持つ重要度)

次に,対応するバンドの輝度の違いから各レーン間のバンドパターンの差異度を 求め,計量的多次元尺度法<sup>(48)</sup>を用いて解析することで,各バンドパターンの差異度 を2次元上のプロット間の距離として表現した.解析には,SPSS 9.0J for Windows (SPSS Japan)を用いた.以下にその手順を示す.

(1) レーン内での全バンド輝度に対する各バンド輝度の割合を求める.  

$$Ai = \frac{\nu - \nu A (におけるバンドiの輝度}{\nu - \nu A (におけるバンドの輝度の総和}$$

(i=1~P, P; 泳動距離の異なるバンドの総数, バンドの欠損は0として扱う)

(2) 各レーン間の P 次元空間における差異度を求める.

$$D_{AB} = \sqrt{\sum_{i=1}^{P} (Ai - Bi)^2}$$

**D**<sub>AB</sub>; レーンA, B間のP次元空間における差異度

(3) Stress をできるだけ小さくするように(Xi, Yi)を決定する.

Stress = 
$$\sum_{k=1}^{n(n-1)/2} (\alpha_k^{(P)} - \alpha_k^{(2)})$$
  
 $\alpha_k^{(P)}$ ; P次元空間におけるn個のレーン間の距離  
 $(k = 1 \sim n(n-1)/2)$ 

#### <u>DGGE バンドのシークエンス解析</u>

目的とするバンドを切り出し, Centrilutor (Amicon)を用いて 150V, 3 時間通電し, ゲル切片中の DNA を回収した. 回収した DNA の一部を用いて再び PCR 増幅した のち DGGE 解析を行い,元のバンドの位置と同じ位置であることを確認した. 回収 した DNA が元のバンド由来であることを確認したのち,GC クランプを付加してい ない neo EUB プライマーを用いて,PCR 増幅し,シークエンス解析に用いた. シ ークエンス解析は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PR Applied Biosystems)のプロトコ ールに基づいて行った.

#### 結果および考察

注入井戸から 1.5m 離れたサンプリング井戸 S1, 注入井戸から半径 1m 以内に位置 するサンプリング井戸 S2, S3, および汚染現場の上流部に位置し, バイオレメディ エーション処理の影響を受けないコントロール井戸より採取した地下水試料の全菌 数とコロニー形成菌数を Fig.6 に示した. いずれの地点においても, 全試験期間を



Fig.6. Changes in number of bacteria at four sampling wells. ○, Total direct counts determined by PI staining; ●, Colony forming units on R2A medium.

通じて全菌数はコロニー形成菌数に比べて約10倍高い値を示した. このことから, バイオレメディエーション処理現場地下水においても,通常の方法では,培養困難 な細菌が多く存在することが確認された. また,実証試験中,全菌数,コロニー形 成菌数の変化に一定の傾向は見られなかった.

S1, S2, S3, およびコントロール井戸から採取した地下水サンプルを用いた DGGE 解析結果を Fig.7 に示した. 全てのサンプルにおいて多数のバンドが見られ, 多種 多様な細菌の存在を示した. S1, S2, S3 において, メタン注入処理後にバンドパ ターンの大きな変化が見られた. 一方, コントロール井戸では, 全試験期間を 通じて, 比較的安定したバンドパターンが示された.



Fig. 7. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments from sampling well S1, S2, S3, and control well. The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1 day,one day before the start of treatment; A29 days, 29 days after the end of treatment.

DGGE バンドパターンの変化を客観的に示した方法として、Eichner ら<sup>(27)</sup>が報告し た多様性指数の算出と Van Hannen ら<sup>(30)</sup>による非計量的多次元尺度法を用いた類似性 評価がある. Eichner らは活性汚泥サンプルより得た DGGE バンドの輝度と数に基 づいて多様性指数の 1 つである Shannon index を算出した. 細菌群集の多様性の量 的変化を解析できる優れた手法であるが、変化の内容すなわち質的な変化を知るこ とができないため、Shannon index は同じであるが細菌群集構造は異なる2つの群集 を区別することができない. Van Hannen らは湖水マイクロコズム試料を用いて得た DGGE バンドパターンの比較において、泳動距離が一致したバンドの数に基づく類 似度を算出し、非計量的多次元尺度法を用いて解析することで、バンドパターンの 類似度を 2 次元上のプロット間の距離として表現した. サンプル間の類似性を容易 に知ることのできる優れた手法である. しかしながら, バンドパターンの類似度の 算出において各バンドの輝度を考慮に入れていないため、個々の種の存在量の変化 による細菌群集の違いを結果に反映することができない. そこで本実験では, DGGE バンドパターンを、デジタルイメージとして取り込み、各バンドの輝度を数値化し たのち, Shannon index の算出と類似性評価を同時に行い,細菌群集の多様性の変化 を量的・質的に解析した. バンドパターンの類似性評価にあたっては、各バンドの 輝度を用いることで、個々の種の存在量の違いを反映した差異度を算出し、計量的 多次元尺度法による解析を行った.

Shannon index を算出した結果 を Fig.8 に示した. S2, S3 で処 理 10 日目に Shannon index はそ れぞれ 1.10 から 0.89, 1.33 から 1.13 へと減少し,多様性の急激 な減少が示された. しかしなが ら,その多様性は,処理 31 日目 には元のレベルに回復し,その 後も高い多様性を維持した. 一 方,S1 においては,処理直後の 急激な減少は見られず,処理前 と同様もしくは,やや高い多様



Fig. 8. Shannon index of the DGGE banding pattern from Fig. 7. ●, S1; □, S2, ■, S3; ○, control.

性が示された. この違いの理由としては, S1 は, 注入井戸から最も離れた地点に 位置しており, S2, S3 に比べて処理の影響が弱かったためではないかと推察される.

メタン注入停止後のサンプルでは,S3 において減少する傾向がみられたが、S1. S2 の多様性はほとんど変化が見られなかった. バイオレメディエーション処理停 止後の細菌群集の多様性の変化を調べるためには、さらに、長期間にわたるモニタ リングが必要であると思われる. コントロールでは, 実証試験期間中 Shannon index は 1.03 から 1.21 の間で変動しており,一定の傾向は認められなかった. また,そ の変動の大きさは、処理区のサンプルに比べて小さいものであった. 本結果から. バイオレメディエーション実証試験現場の地下水では、処理により一時的に細菌群 集の多様性は減少するものの、短期間のうちに回復し、処理開始前とほぼ同じレベ ルを維持することが示された. このことは、バイオレメディエーションは、細菌群 集の極端な単純化,すなわち不可逆的な多様性の減少を引き起こすものではないこ とを示している. Macnaughton ら<sup>(49)</sup>は、海岸部でのオイル汚染をシミュレートした バイオレメディエーション実証試験から、バイオレメディエーション処理により、 現場の細菌群集の多様性が高まることを報告している. 一般には,強いストレスを 受けた環境中の細菌群集の多様性は減少することが知られている<sup>(50-52)</sup>. しかしなが ら、バイオレメディエーションでは、基質とともに、酸素および栄養塩の注入を行 っていることから、分解菌以外の一般細菌の生育が同時に促され、その結果、多様 性の高い細菌群集が形成されたのではないかと考えられる.

Shannon index の結果からは、急激な多様性の増減、および回復を確認できるもの の、その質的変化については知ることができない. そこで、細菌群集の多様性の質 的な変化を解析するために、各レーン間のバンドパターンの差異度を求め、多次元 尺度法を用いて解析し、細菌群集構造の類似性を 2 次元上のプロット間の距離とし て示した(Fig. 9). S2、S3 では、メタン注入処理 10 日目、31 日目、40 日目、45 日 目とバンドパターンは大きく変化したのち、破線円内に示した類似性の高いグルー プへと収束する傾向が見られた. したがって、S2、S3 での細菌群集は処理後 45 日 目まで大きく撹乱され、その後、比較的安定した群集構造を形成するものと考えら れる. また、最終的に形成された細菌群集構造は、処理開始前の構造とは大きく異 なっていることが分かった. S1 においても変化に遅れが見られたものの、60 日目 以降で類似性の高いグループへと収束した. S1 におけるこの細菌群集の反応の遅 れは、S1 が注入井戸から最も離れた地点に位置しているためであると推察される.





Fig. 9. Two-dimensional plot of multidimensional scaling stimulus scores for DGGE banding pattern from Fig. 7. B1, one day before the start of treatment; D10, D31, D40, D45, D52, D60, D66, D73, D80, D87 are 10, 31, 40, 45, 52, 60, 66, 73, 80, 87 days after the start of treatment; A29, 29 days after the end of treatment.

図中のX軸,Y軸に示した数字はデータをプロットするために用いたものであり, 異なる figure 間での距離の比較に用いることはできない. 異なる井戸間での細菌群 集構造の変化の大きさを比較するためには,同一ゲル上で DGGE 泳動し,多次元尺 度法で解析する必要がある. そこで,処理区における群集構造の変動がコントロー ルでみられる自然の状態での変動に比べて大きいことを確認するために,S2 とコン トロールから得たサンプルを同一ゲル上で DGGE 解析した. 得られた DGGE バン ドパターンを Fig.10 に,その差異度を求め多次元尺度法で解析した結果を Fig.11 に 示した. Fig.11 の結果は,コントロール井戸でのデータのばらつきは S2 でのばら つきに比べて小さいことを示した. したがって,処理区で見られた細菌群集構造の 変化は,バイオレメディエーションにより引き起こされたものであるといえる.

以上、多様性指数とバンドパターンの類似性を評価した結果から、バイオレメデ

ィエーション実証試験現場の地下水中の 細菌群集構造は、処理開始後一時的に大 きく撹乱されたのち、処理に伴い、多様 性が高くかつ安定した群集が形成される ことが分かった. 多様性が高く安定し た細菌群集は、外乱に対する適応性が高 いと考えられている<sup>(5)</sup>. したがって、本 結果は、バイオレメディエーションによ り変化した細菌群集構造は、環境に適応 したものであり、多様性の観点からは、 健全な状態にあることを示しているもの と考えられる.

実証試験期間中,各サンプリング井戸 において毎日測定されたトリクロロエチ レン濃度の結果をTable 3 に示した<sup>(53)</sup>.処 理開始後 1 ヶ月間は,トリクロロエチレ

ン濃度に大きな変動が見られ た. この期間は,細菌群集構 造が大きく撹乱された期間で もある. 一方,細菌群集構造 が比較的安定した,45 日目以 降では,トリクロロエチレン 濃度も安定していることが示 されている. 実証試験期間中, 注入井戸より注入された地下 水中のトリクロロエチレン濃 度は,192±10  $\mu$ gl<sup>-1</sup>であった. このことから,本実証試験現 場では,処理45 日目以降,約 10-15%のトリクロロエチレン



Fig. 10. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments from samplingwell S2 and control well. The time course of the experiments is indicated above he lanes in days. B1, one day before the start of treatment.



Fig. 11. Two-dimensional plot of multidimensional scaling stimulus scores for DGGE banding pattern from Fig. 10. ○, sampling well S2; ●, control well; B1, one day before the start of treatment; D10, D31, D60, D87 are 10, 31, 60, 87 days after the start of treatment.

days of operation	S1 (µg1 <sup>-1</sup> )	S2 (µg Г <sup>1</sup> )	S3 (µg[ <sup>-1</sup> )
1 - 15 (n = 15)	$178 \pm 16^{*}$	$174 \pm 16$	$180 \pm 17$
16 - 30 (n = 15)	177 ± 17	$173 \pm 14$	$175 \pm 14$
31 - 45 (n = 15)	178 ± 6	$178 \pm 6$	179 ± 10
46 - 60 (n = 15)	169 ± 4	166 ± 4	166 ± 4
61- 87 (n = 27)	167 ± 5	$165 \pm 7$	$170 \pm 6$

Table 3. Concentration of trichloroethylene during field experiment

\* Values, Means  $\pm$  SD.

が安定して除去されたも のと考えられる. これ らの結果は,効率的なト リクロロエチレン除去へ の細菌群集構造の多様性 およびその安定性の関与 を示すものである.

今回の実証試験では, メタン資化菌の増殖を目 的として,現場地下水へ のメタンの注入が行われ た. そこで,本処理に よるメタン資化菌と優占 種との関係を調べた.サ ンプリング井戸 S2 で得 た DGGE 泳動後のゲル より,強い輝度を持つ 9 本のバンド(Fig.12)すな わち,優占種として存在



Fig. 12. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments from sampling well, S2. The numbered allows refer to the excised and sequenced bands. The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1 day, one day before the start of tretment. A29 days, 29 days after the end of treatment.

する細菌の 16S rDNA に由来するバンドを切り出し、その塩基配列を決定したのち、 FASTA を用いて GeneBank 上の全塩基配列に対するホモロジー検索を行った. ホモ

Band No.	% Similarity	Closest relative	Taxonomic description
1	93	Agrobacterium sanguineum	α - Proteobacteria
2	87	Aquaspirillum delicatum	eta - Proteobacteria
3	92	Acidovorax delafieldii	eta - Proteobacteria
4	96	Methylobacter psychrophilus	γ - Proteobacteria
5	87	Methylobacterium sp. GK118	α - Proteobacteria
6	85	Methylocystis sp. EB1	α - Proteobacteria
7	70	Uncultured ACE-27	not classified
8	84	Unidentified BD5-13	not classified
9	90	Unidentified BD5-13	not classified

Table 4. Sequence similarities of the excised bacterial bands that appear in Fig. 12.

ロジー検索の結果を Table 4 に示した. 処理 10 日目に優占種として存在した細菌に 由来するバンド 4 の塩基配列は、タイプ I のメタン資化菌である Methylobacter *psychrophilus* (54)と 96%の相同性を示した. このことから,現場では本菌が、メタン 注入に速やかに反応して増殖したものと考えられる. バイオレメディエーション実 証試験期間中の細菌群集構造の変化をモニタリングした DGGE 解析結果では、この バンドは処理 31 日目以降消失しており、本菌が一時的に優占種となるものの定着し なかったことを示した.処理 31 日目以降存在したバンド 5,6 の塩基配列は,タイ プ Ⅱ のメタン資化菌と比較的高い相同性を示した. それぞれ, バンド 5 は Methylobacterium GK118株<sup>(55)</sup>と87%, バンド6はMethylocystis EB1株<sup>(56)</sup>と85%の相 同性を示した.処理前のサンプルのみで存在したバンド1から3は、それぞれ、プ ロテオバクテリアの α サブクラスあるいは β サブクラスに属する細菌に由来するも のと考えられる. また,処理 10 日目を除く全てのサンプルで存在したバンド 8,9 の塩基配列は、BD5-13株と比較的高い相同性を示した. 本株は、深海の底泥サン プルよりクローニングされたものである. メタン注入処理にともない出現したバン ド7の塩基配列については,現在のところ相同性の高いものは見つからなかった.本 結果から、実証試験現場地下水中へのメタン注入により一時的にタイプⅠのメタン 資化菌が優占種となり、その後、タイプ II のメタン資化菌を含む複数の細菌が優占 種として存在することが示された.

以上,DGGE バンドパターンから Shannon index の算出および類似性評価を行うこ とで,環境負荷の細菌群集への影響を客観的・定量的に解析することが可能となっ た. また,強い輝度を示すバンドの塩基配列を決定することで,優占種の解析が可 能であることが示された. 細菌群集の多様性の変化を指標とした環境影響評価に寄 与するものと期待される.

小括

DGGE 法を用いてバイオレメディエーション実証試験における現場地下水中の細 菌群集の多様性の変化を解析した. また,強い輝度を示すバンドの塩基配列を決定 し,実証試験期間中,優占種として存在した細菌の 16S rDNA 塩基配列に基づく系 統解析を行った.

DGGE バンドパターンより算出した Shannon index から,メタン注入処理により現 場地下水中の細菌群集の多様性は,一時的に減少するものの,処理に伴い多様性は 高まり安定した状態になることが分かった. また,バンドパターンの差異度を多次 元尺度法を用いて解析したところ,メタン注入処理に伴い細菌群集構造は大きく変 化したのち,処理 45 から 60 日目以降で安定することが分かった. さらに,効率的 なトリクロロエチレン除去への細菌群集構造の多様性および安定性の関与が示され た.一方,処理の影響を受けないコントロール井戸では,全試験期間を通じて比較 的安定した細菌群集構造が維持された.

強い輝度を示すバンドの塩基配列を決定し,優占種の解析を行ったところ,メタン注入処理開始直後にタイプ I のメタン資化菌が優占種となり,その後,タイプ Ⅱ のメタン資化菌を含む複数の細菌が優占種となることが示された.

本実験より,DGGE 法を用いることで,環境負荷の細菌群集への影響を,そのバンドパターンの変化から客観的・定量的に評価できることが示された.

# 第三章 バイオレメディエーション実証試験における地下水中の

## メタン資化菌の挙動

バイオレメディエーションの実施における汚染物質分解菌の挙動を把握すること により,バイオレメディエーションはより確かな技術となる. しかしながら,その 挙動については手法的制約からほとんど理解されておらず,効率的な浄化が見られ ない場合の原因解明や解決策を微生物学的側面から検討することができないという 問題がある.

そこで本研究では、メタン資化菌を標的とする3種類のプライマーを用いて DGGE 解析を行いバイオレメディエーション実証試験現場におけるメタン資化菌の挙動を 解析した.

#### 材料および方法

#### <u>細菌株</u>

実験には, Aeromonas hydrophila ATCC 7966, Escherichia coli K12 W3110, Flavobacterium breve GIFU 3159, Methylomonas sp. KSW III, Methylomonas sp. KSW III, Methylocystis sp. M, Methylosinus trichosporium OB3b を用いた.

#### 地下水試料

第二章で示したサンプリング井戸 S2 より,処理開始1日前,10日目,24日目,31 日目,40日目,45日目,52日目,60日目,66日目,73日目に採取した地下水を用いた.

#### **DNA** 抽出

200 ml の地下水サンプルを孔径 0.2  $\mu$ m のポリカーボネートフィルターを用いて 濾過し, 細菌をフィルター上に捕集した.フィルターを遠心管(15 ml 容)に移し sodium-EDTA 緩衝液(1 mM EDTA-2Na, 20 mM sodium acetate, pH 5.5)を1 ml 加え て液体窒素で凍結したのち, 室温で融解した. Tris-EDTA で平衡化した Phenolcholoroform-isoamylalcohol (25:24:1) 6 ml と 25% SDS(sodium dodecyl sulfate)60  $\mu$ 1 を加え, 60 ℃で5 分間振とうしたのち, 水上で3 分間放置した. 3,500 x g, 5 分 間遠心後, 水層を別の遠心管に移し, 2.5 倍量の 100% ethanol と 2 M sodium acetate (pH 5.2) 250 µ1を加え-20 ℃で3時間以上静置したのち, 3,500 xg, 1時間遠心後, 上 清を捨てた. 70% ethanol で沈殿を洗浄したのち, 沈殿を乾燥させ 50µ1 のろ過滅菌 水で懸濁した.

#### PCR プライマー

本実験で使用したプライマーの塩基配列を Table 5 に示した. タイプ I のメタン資 化菌の 16S rDNA に特異的なプライマーを独自に設計し, MI F, MI R とした. タイ プ II のメタン資化菌の 16S rDNA に特異的なプライマーを独自に設計し, MII F, MII R とした. *mmoX* 遺伝子の検出には, Miguez ら<sup>(33)</sup>が設計した mmoX 531, Shigematsu ら<sup>(34)</sup>が設計した mmoX 901 および McDonald ら<sup>(35)</sup>が設計した mmoX 1403 を用いた.

Primer	Positions <sup>a</sup>	Sequence
MI-f-GC-clamp	423 - 442	5'-GC-clamp-GGGTTGTAAAGCACTTTCAA-3'
MI-r	984 - 1001	5'-CTGGATGTCAAGGGTAGG-3'
MII-f-GC-clamp	437 - 455	5'-TTTCGCCAGGGACGATAAT-3'
MII-r	973 - 995	5'-GTCAAAAGCTGGTAAGGTTCTGA-3'
mmoX 531	531 - 560	5'-CGGTCCGCTGTGGAAGGGCATGAAGCGCGT-3'
mmoX 901-GC-clamp	901 - 926	5'-GC-clamp-TGGGTSAARACSTGGAACCGCTGGGT-3
mmoX 1403	1381 - 1403	5'-TGGCACTCGTAGCGCTCCGGCTC-3'

Table 5. Primer sequences and positions

## <u>PCR</u>

PCR 反応液の組成は、いずれのプライマーを用いた場合も、3.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs、プライマー各 0.4mM、耐熱性 DNA Taq ポリメラーゼ(パーキンエルマ)1.25U とした. MI F、MI R を用いた PCR 反応条件は、95°C 9分間 (hot start)、94°C 1分 (denaturation)、51°C 1分 (primer annealing)、72°C 3分 (primer extension)を35 サイ クル、72°C 7分 (final extension)で行った. MII F、MII R を用いた PCR 反応条件は、95°C 9分間 (hot start)、94°C 1分(denaturation)、53°C 1分 (primer annealing)、72°C

3 分 (primer extension)を 38 サイクル, 72℃ 7 分 (final extension)で行った.

*mmoX* 遺伝子の増幅には semi-nested PCR 法を用いた. 1st PCR を 95℃ 9分間 hot start, 94℃ 1分(denaturation), 65℃ 1分(primer annealing), 72℃ 3分(primer extension) を 30 サイクル, 72℃ 7分(final extension step)で行った. 1 st PCR 後の反応液 0.5  $\mu$ 1 を 2 nd PCR に用いた. 2 nd PCR では, touch down PCR を行った. 反応条件は, 95℃ 9 分間で hot start し, 94℃ 1分(denaturation), 67℃から 57℃まで各サイクル毎に 0.5℃ ずつ減少させ 1分(primer annealing), 72℃ 3分(primer extension)を 20 サイクル行っ たのち, 94℃ 1分(denaturation) 57℃ 1分(primer annealing) 72℃ 3分(primer extension)を 10 サイクル, 72℃ 7分(final extension step)で行った.

#### <u>DGGE</u>

MIF, MIR プライマーを用いて PCR 増幅した 16S rDNA 断片および MIIF, MIIR プライマーを用いて PCR 増幅した 16S rDNA 断片の解析には,変性剤濃度勾配 45% から 65%のポリアクリルアミドゲル (総アクリルアミド濃度 6.5%, アクリルアミド: ビスアクリルアミド=37.5:1)を用いて 55°C, 100V で 12 時間泳動した. *mmoX* 遺 伝子の PCR 増幅産物の解析には変性剤濃度勾配 40%から 80%のポリアクリルアミド ゲル (総アクリルアミド濃度 6.5%, アクリルアミド:ビスアクリルアミド=37.5:1) を用いて 55°C, 100V で 12 時間泳動した.

#### DGGE バンドのシークエンス解析

目的とするバンドを切り出し, Centrilutor (Amicon)を用いて 150V, 3 時間通電し, ゲル切片中の DNA を回収した. 回収した DNA の一部を用いて,再び PCR 増幅し たのち DGGE 解析を行い,元のバンドの位置と同じ位置であることを確認した. 回 収した DNA が元のバンド由来であることを確認したのち,GC クランプを付加して いないプライマーを用いて,PCR 増幅した. 16S rDNA 断片は,そのままシークエ ンス解析に用いた. *mmoX* 遺伝子断片は,TA cloning kit (Invitrongen)を用いてクロー ニングを行い,得られたクローンよりプラスミドを抽出し,シークエンス解析に用 いた. シークエンス解析は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PR Applied Biosystems) のプロトコールに基づいて行った.

#### 結果および考察

メタン資化菌はホルムアル デヒドの代謝経路や膜構造の 違いなどの特徴により、タイ プIとIIに分類される<sup>(57)</sup>.ま た、可溶性メタンモノオキシ ゲナーゼを持つ一部のメタン 資化菌はトリクロロエチレン を共代謝的に分解できること が知られている(58-61). そこ で,本実験では,第二章で述 べたバイオレメディエーショ ン実証試験現場におけるメタ ン資化菌の挙動を各タイプ別 に追跡するために、タイプ I のメタン資化菌の 16S rDNA に特異的なプライマーとタイ プⅡのメタン資化菌の 16S rDNA に特異的なプライマー を独自に設計し, DGGE 法に また, トリクロロ 用いた. エチレン分解能を持つメタン 資化菌の挙動を追跡するため に既知のプライマーを組み合 わせた semi-nested PCR を行 い, DGGE 法による解析を行 った.

今回用いたプライマーの特 異性を Fig.13 に示した. 実 験に用いた4株のメタン資化



Fig. 13. PCR amplification of methanotroph DNA with type I methanotroph 16S rDNA specific primers (A), type II methanotroph 16S rDNA specific primers (B), and *mmoX* specific primers (C). Lane 1 contained pHY size marker. Lane 2 to 9 contained PCR products obtained after amplification of methanotroph and non-methanotroph DNA template. Lane 9 contained no template DNA. Lane2, *Methylomonas* sp. KSPIII; lane 3, *Methylomonas* sp. KSW III; lane 4, *Methylocystis* sp. M; lane 5, *Methylosinus trichosporium* OB3b; lane 6, *Aeromonas hydrophila*; lane 7, *Escherichia coli*; lane 8, *Flavobacterium breve*. 菌はいずれも可溶性メタンモノオキシゲナーゼを持つメタン資化菌である. 各プラ イマーが標的とする細菌でのみ PCR 増幅が見られ, 今回のプライマーの特異性が確 認された.

タイプI およびタイプ II のメタン資化菌を標的とした DGGE 解析結果を Fig.14 に 示した. 試料には,第二章で述べたサンプリング井戸 S2 から採取した地下水を用 いた. いずれの結果も単純なバンドパターンを示しており,特定の種のみが優占種 として存在することが分かった. タイプI のメタン資化菌を標的とした DGGE 解析 結果では,メタン注入 10 日目に強い輝度を持つバンド1 が一時的に出現し,その後 消失した. 一方,タイプ II を標的とした結果では,処理 31 日目にバンド 2 が出現 しその後強い輝度を示した. 本結果はバイオレメディエーションにより,まずタイ プ I のメタン資化菌が増殖し,その後タイプ II のメタン資化菌が優占種として存在 したことを示しており,第二章で得た結果と一致した.



Fig. 14. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA fragments generated with primers specific for type I methanotrophs (A) and for type II methanotrophs (B) from sampling well S2 groundwater. The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1 day, one day before the start of treatment.

バンド1,2を切り出し、塩基配列を決定したのち、ホモロジー検索を行った.メ タン注入処理直後に増加したバンド1の塩基配列は、Methylobacter psychrophilus お よび Methylobacter T20 株と98%の相同性を示したことから、バンド1の由来となる 菌は Methylobacter 属であると考えられる.また、バンド2の塩基配列は、Methylocystis M 株<sup>(62)</sup>、Methylocystis EB1株、およびLR1株<sup>(63)</sup>と98%の相同性を示したことから、 バンド2の由来となる菌は Methylocystis 属であると考えられる. Methylocystis 属の メタン資化菌は可溶性メタンモノオキシゲナーゼを持っており、トリクロロエチレ ンを共代謝的に分解することが知られている<sup>(64)</sup>. したがって、バンド2の由来とな る細菌は、トリクロロエチレン分解能を持っているものと考えられる. また、その 出現時期は、第二章で示されたトリクロロエチレン除去が安定化した時期と一致す ることから、本菌は効率的なトリクロロエチレン除去に寄与しているものと推察さ れる. 一方、Methylobacter 属については、現在までのところメタンモノオキシゲナ ーゼを持つ菌の存在は報告されていない.

次に, mmoX 遺伝子を標的とし た DGGE 解析結果を Fig.15 に示し た. バンド1はメタン注入処理開 始前から処理 66 日目まで強い輝度 を持って存在した. 処理 31 日目 からはバンド1に加えバンド2も 強い輝度を持って存在し,処理 73 日目にはバンド2のみが強い輝度 を持つバンドとして存在した. こ のことから、本実証試験における、 可溶性メタンモノオキシゲナーゼ を持つメタン資化菌の優占種の変 化が示された. 次に, バンド1,2 を切り出し,塩基配列を決定した のち、ホモロジー検索を行った. バ ンド1の塩基配列は、タイプ Iの メタン資化菌である Methylococcucs



Fig. 15. DGGE analysis of PCR-amplified mmoX gene fragments generated with DNA from sampling well S2 groundwater. The time course of the experiments is indicated above the lanes in days. B1 day, one day before the start of treatment. capsulatus bath 株<sup>(65)</sup>の mmoX 遺伝子と 90%の相同性を示した. バンド2の塩基配列 は、タイプ II のメタン資化菌である LR1 株の mmoX 遺伝子と 95%の相同性を示し、 16S rDNA を標的とした解析結果と一致した. より正確な系統解析のためには、そ れぞれのバンドの由来となる細菌の 16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析が必要 である. しかしながら、現在までに報告されている mmoX 遺伝子の配列に基づく系 統解析は、16S rDNA に基づく系統解析を良く反映していることから、バンド1の由 来となる細菌はタイプ I のメタン資化菌、バンド2の由来となる細菌はタイプ II の メタン資化菌に属するものと考えられる. 以上のことから、バイオレメディエーシ ョン処理の初期の段階でのトリクロロエチレン除去に関与したのは、処理前から優 占種として存在したタイプ I のメタン資化菌であるものと推察される. その後、タ イプ II のメタン資化菌が増殖し、より安定したトリクロロエチレン除去に関与した ものと考えられる.

処理開始前に行われた,培養法に基づく微生物解析では,現場地下水からはタイ プⅡのメタン資化菌のみが検出され,タイプⅠのメタン資化菌は検出されなかった<sup>(56)</sup>. 今回の結果は,培養法では検出されなかったタイプⅠのメタン資化菌の存在を確認 するものであり,培養に依存しない本手法の有効性を示すものであるといえる.

以上の結果から,バイオレメディエーション実証試験現場地下水へのメタン注入 は、タイプⅡのメタン資化菌を優占的に増殖するものであることが示された.

小括

タイプ I メタン資化菌, タイプ II メタン資化菌の 16S rDNA に特異的なプライマ ーを用いた DGGE 解析を行い, バイオレメディエーション実証試験現場地下水中の メタン資化菌の挙動を解析した. また, 可溶性メタンモノオキシゲナーゼをコード している *mmoX* 遺伝子に特異的なプライマーを用いた DGGE 解析を行い, トリクロ ロエチレン分解能を持つメタン資化菌の優占種の変化を追跡した.

タイプ I、タイプ II のメタン資化菌を標的とした DGGE 解析結果からメタン注入 に対してまずタイプ I のメタン資化菌が速やかに増加したのち、タイプ II のメタン 資化菌が増加してくることが分かった. 16S rDNA の塩基配列に基づく系統解析を 行ったところ、メタン注入処理直後に増加した菌は、Methylobacter psychrophilus お よび Methylobacter T20 株と 98%の相同性を示した. また、処理開始 31 日目以降に 増加した菌は、Methylocystis M 株、Methylocystis EB1 株および土壌より単離された LR1

株と98%の相同性を示した.

mmoX 遺伝子を標的とした DGGE 解析の結果から、本実証試験における可溶性メ タンモノオキシゲナーゼを持つメタン資化菌の優占種の変化が示された. mmoX の 塩基配列に基づく系統解析を行ったところ、実証試験開始前から 60 日目まで優占種 として存在した菌はタイプIのメタン資化菌である Methylococcus capsulatus Bath と 90%、31 日目以降優占種として存在した菌は、土壌より単離されたタイプ II のメタ ン資化菌である LR1 株と 95%の相同性を示した. したがって、バイオレメディエ ーション実証試験の初期の段階でのトリクロロエチレン除去に関与したのは、処理 前から優占種として存在したタイプ I のメタン資化菌であるものと考えられる. そ の後、より安定したトリクロロエチレン除去が見られた期間では、タイプ I のメタ ン資化菌に加えて、タイプ II のメタン資化菌の増殖が認められた.

#### 総括

過度な人間活動は,地球規模で見られる水環境汚染を引き起こし,我々人類の生存を脅かしている.河川,地下水などの淡水資源の汚染の拡大防止,修復のために は環境負荷の生態系への影響を的確に評価し,根本的な解決を図らなければならない. そのためには,環境負荷の生態系への影響を速やかに検出する必要がある.

生態系の根幹部を構成する細菌は,世代交代時間が短く,多様な機能を持ってい ることから,環境変化に速やかに応答した群集を形成する. また,その変化は上位 の生態系に影響を及ぼす. したがって,負荷に対する細菌群集の応答は,生態系へ の影響を早期に見出すための,優れた生物指標になり得る.

環境負荷の細菌群集への撹乱を客観的・定量的に評価するにあたっては,細菌群 集の多様性の変化を解析することが有効になると考えられる. しかしながら,自然 環境中の細菌の大部分は培養できないという手法上の制約や細菌の種の同定は容易 ではないという問題から,環境負荷に対する細菌群集の多様性の変化については, 十分な解析がなされていない. そこで本研究では,種の同定を行うことなく細菌群 集の多様性の変化をゲル上のバンドパターンの変化として解析できる,変性剤濃度 勾配ゲル電気泳動(DGGE)法に着目し,環境負荷の地下水中の細菌群集に及ぼす影響 評価に適用した.

地下水中には多種多様な細菌が存在するので、その多様性の解析にDGGE法を適用 するにあたっては泳動条件の最適化を検討する必要がある. そこで、真正細菌の16S rDNAに特異的なプライマーを用いて標準株,地下水,河川水サンプルより得た16S rDNA 断片を分離するための変性剤濃度勾配,および泳動時間の検討を行った. その結果, 地下水中の細菌群集構造の解析には、55 ℃,100 V,変性剤濃度勾配45 %から65 % で12時間泳動が適当であることが示された.

次に,DGE法を用いて,千葉県君津市で行われたバイオレメディエーション実証 試験現場地下水中の細菌群集の多様性の変化をモニタリングし,処理の細菌群集へ の影響について調べた.バイオレメディエーションにおいて微生物が汚染物質の浄 化の中心的役割を担っているにもかかわらず,処理における微生物の寄与について は手法上の制約から,未だブラックボックスとして扱われている.したがって,処 理の微生物群集への影響について理解されていないため,バイオレメディエーショ ンの環境,また,生態系への負荷を客観的に評価・確認することが難しいという問

題を抱えている. DGGE法を用いて,バイオレメディエーション実証試験現場地下水 中の細菌群集の多様性の変化を解析した結果,メタン注入処理により,細菌群集は 一時的に大きく撹乱され,急激な多様性の減少が見られたものの,処理に伴い多様 性は元のレベルに回復し,かつ安定した群集構造が形成されることが分かった. 多 様性が高く,安定した細菌群集は外乱に対する適応性が高いと考えられることから, 本結果は,バイオレメディエーションにより変化した細菌群集構造は,多様性の観 点からは健全な状態にあることを示していると考えられる. また,比較的安定した 細菌群集構造が形成された,処理45日目以降では,約10-15%のトリクロロエチレン が安定して除去されており,汚染物質の除去と細菌群集の多様性および群集構造の 安定性との関係が推察される.

バイオレメディエーションの実施における汚染物質分解菌の挙動を把握すること により、バイオレメディエーションはより確かな技術となる. しかしながら、その 挙動については手法的制約からほとんど理解されておらず、効率的な浄化が見られ ない場合の原因解明や解決策を微生物学的側面から検討することができないという 問題がある. そこで、本バイオレメディエーション実証試験現場におけるメタン資 化菌の挙動を解析するために、タイプIのメタン資化菌の 16S rDNA に特異的なプラ イマー、タイプ II のメタン資化菌の 16S rDNA に特異的なプライマー、および可溶 性メタンモノオキシゲナーゼをコードしている *mmoX* 遺伝子に特異的なプライマー を用いた DGGE 解析を行った. その結果、バイオレメディエーション処理により、 メタン資化菌の優占種はタイプ I からタイプ II のメタン資化菌にシフトすることが 分かった. したがって、バイオレメディエーション処理の初期の段階でのトリクロ ロエチレン除去に関与したのは、処理前から優占種として存在したタイプ I のメタ ン資化菌であり、その後、タイプ II のメタン資化菌が増殖し、より安定したトリク ロロエチレン除去に関与したものと考えられる.

今回の研究により,DGGE バンドパターンから多様性指数の算出と類似性評価お よび強い輝度を持つバンドの塩基配列の決定を行うことで,環境負荷の細菌群集へ の影響を多様性の変化,優占種の変化,および特定の機能を持つ細菌の挙動として 客観的に捉えることが可能となった. 今後,異なるゲル間でのバンドパターンを比 較するための内部標準の使用や,定量的な解析を行うための定量的 PCR の適用を検 討することで,細菌群集の多様性の変化をより詳細に解析できるものと考えられる. 細菌群集を生物指標とした環境影響評価の確立に寄与するものと期待される.

## 結論

- 1. DGGE法を用いることで、地下水中の細菌群集の多様性を解析することが可能と なった.
- DGGEバンドパターンを基準とする多様性指数の算出,類似性評価および塩基配 列決定により,環境負荷の細菌群集への影響を,多様性の変化,優占種の変化お よび特定の機能を持つ細菌の挙動として客観的に捉えることが可能となった.
- バイオレメディエーションにより、細菌群集の多様性は一時的に減少するものの、 処理に伴い多様性は回復し再び安定することが分かった。
- バイオレメディエーションにより細菌群集構造は大きく変化したのち、もとの細 菌群集構造とは異なる、比較的安定した群集構造が形成されることが分かった。
- 5. 地下水へのメタン注入処理により, タイプ Ⅱのメタン資化菌が優占的に増殖する ことが分かった.

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり,終始温かい御指導と御鞭撻を賜りました,大阪大学大学 院薬学研究科教授・恩師 那須正夫先生に篤く御礼申し上げます.

研究途上,終始暖かい御指導を賜りました,大阪大学大学院薬学研究科講師,谷 佳津治先生,大阪大学大学院薬学研究科助手,山口進康先生に感謝します.

また,本研究にご協力をいただきました,大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解 析学分野の諸氏に御礼申し上げます.

最後に、常日頃より暖かい励ましをくれた妻の夕香里に心から感謝する.

#### 引用文献

- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., and F. Thingstad. Mar. Ecol. Prog. Ser. 10: 257 (1983).
- 2) Belser, L. W. Annu. Rev. Microbiol. 33: 309-333 (1979)
- 3) Wolin, M. J. and T. L. Miller. Geomicrobiol. J. 5: 239-260 (1987)
- 4) Lovley, D. R. Microbiol Rev. 55: 259-287 (1991)
- Atlas, R. M. and R. Bartha. Microbial communities and ecosystems. In *Microbial ecology: Fundamentals and applications, fourth edition*, pp. 173-209. California: Benjamin/Cummings Science Publishing (1998)
- 6) 那須 正夫,山口 進康,牧野 和夫,田窪 芳博,近藤 雅臣.日本微生物 生態学会報 7:1-7 (1992)
- Colwell, R. R., P. R. Brayton, D. J. Grimes, D. B. Roszak, S. A. Huq, and L. M. Palmer. Bio/Technol. 3: 817-820 (1985).
- 8) Nobuyasu, Y., T. Kenzaka, and M. Nasu. *Microbes and Environments*. 12:1-8 (1997)
- 9) 谷佳津治,山本 かおり,山口進康,那須正夫.防菌防黴. 26:415-421 (1998)
- 10) Kawai, M., N. Yamaguchi and M. Nasu. J. Appl. Microbiol. 86:496-504 (1999)
- 11) Woese, C. R., and G. J. Olsen. Syst. Appl. Microbiol 7: 161 (1986)
- 12) Ward, D. M., R. Weller, and M. Bateson. Nature. 345: 63-65 (1990)
- 13) Weller, R., J. W. Weller, and D. M. Ward. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1146-1151 (1991)
- 14) Gray, J. P., and R. P. Herwig. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4049-4059. (1996)
- 15) Liesack, W., and E. Stackebrandt. J. Bacteriol. 174: 5072-5078. (1992)
- Borneman, J., P. W. Skroch, K. M. Osullivan, J. A. Palus, N. G. Rumjanek, J. L. Jansen, J. Nienhuis, and E. W. Triplett. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1935-1943 (1996)
- 17) Giovannoni, S. J., T. B. Britchgi, C. L. Moyer, and K. G. Field. Nature. 344:60-63 (1990)
- Fuhrman, J. A., K. McCallum, and A. A. Davis. Appl. Environ. Microbiol. 59:1294-1302 (1993)
- 19) Muyzer, G., E. C. de Waal, E. C. and A. G. Uitterlinden. Appl. Environ. Microbiol. 59:695-700 (1993)
- 20) Ferris, M. J., G. Muyzer, G. and D. M. Ward. Appl. Environ. Microbiol. 62:340-346 (1996)

- Ferris, M. J., S. C. Nold, N. P. Revsbech, and D. M. Ward. Appl. Environ. Microbiol. 63:1367-1374 (1997)
- 22) Murray, A. E., C. M. Preston, R. Massana, L. T. Taylor, A. Blakis, K. Wu, and E. F. DeLong. Appl. Environ. Microbiol. 64:2585-2595 (1998)
- 23) Rosado, A. S., C. F. Duarte, L. Seldin and J. D. Van Elsas. Appl. Environ. Microbiol.
  64: 2770-2779 (1998)
- Brinkhoff, T., C. M. Santegoeds, K. Sahm, J. Kuever, and G. Muyzer. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4650-4657 (1998)
- Bruns, M. A., J. R. Stephen, G. A. Kowalchuk, J. I. Prosser, and E. A. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2994-3000. (1999)
- Sievert, S. M., T. Brinkhoff, G. Muyzer, W. Ziebis, and J. Kuever. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3834-3842. (1999)
- 27) Eichner, C. A., R. W. Erb, K. N. Timmis, and I. W. Döbler. *Appl. Environ. Microbiol.*65: 102-109 (1999)
- Murray, A. E., J. T. Hollibaugh, and C. Orrego. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2676-2680 (1996)
- 29) Santegoeds, C. M., T. G. Ferdelman, G. Muyzer and D. Beer. Appl. Environ. Microbiol.
  64: 3731-3739 (1998)
- 30) Van Hannen, E. J., G. Zwart, M. P. van Agterveld, H. J. Gons, J. Ebert, and H. J. Laanbroek. Appl. Environ. Microbiol. 65:795-801 (1999)
- 31) Holmes, A. J., N. J. P. Owens, and J. C. Murrell. *Microbiology*.141: 1947-1955 (1995)
- 32) Jeffrey, W. H., S. Nazaret, and T. Barkay. Microb. Ecol. 32: 293-303 (1996)
- 33) MiguezC. B., D. Bourque, J. A. Sealy, C. W. Greer, and D. Groleau. *Microb. Ecol.* 33:21-31 (1997)
- Shigematsu, T., S. Hanada, M. Eguchi, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. Appl. Environ. Microbiol. 65:5198-5206 (1999)
- 35) McDonals, I. R., E. M. Kenna, and J. C. Murrell. Appl. Environ. Microbiol. 61:116-121 (1995)
- 36) 杉田 治男, 店網 秀男, 小橋 二夫, 出口 吉昭. Jap. J. Limol. 43: 27-34 (1982)
- 37) 前田 秋一. Jap. J. Limnol. 41: 163-172 (1980)
- 38) Bruce, L. Can. J. Microbiol. 21: 392-394 (1975)

- 39) Konda, T. Jpn. J. Limno. 46: 247-255 (1985)
- 40) Gillan, D. C., A. G. Speksnijder, G. Zwart, and C. De Ridder. *Appl. Environ. Microbiol.*64: 3464-3472 (1998)
- 41) Muyzer, G., and E. C. de Waal. NATO ASI Series G35: 207-214 (1994)
- 42) Farrelly, V., F. A. Rainey. and E. Stackebrandt. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2798-2801 (1995)
- 43) Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni. Appl. Environ. Microbiol. 62: 625-630 (1996)
- 44) Polz, M. F. and C. M. Cavanaugh. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3724-3730 (1998)
- 45) Muyzer, G. Antonie Van Leeuwenhoek 73: 127-141 (1999)
- 46) 見坂 武彦, 山口 進康, 那須 正夫. 防菌防徽. 27: 223-229 (1999)
- 47) Reasoner D. J., and E. E. Geldreich. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1-7 (1985)
- 48) Steward, A., K. Prandy, and R. Blackburn. Nature. 245:415-417 (1973)
- 49) Macnaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y. Chang, and D. C. White. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3566-3574 (1999)
- Sayler, G. S., T. W. Sherrill, R. E. Perkins, L. M. Mallory, M. O. Shiaris, and D. Petersen. Appl. Environ. Microbiol .44:1118-1129 (1982)
- Atlas, R. M., A. Horowitz, M. I. Krichevsky, and A. K. Bej. *Microbial Ecology*. 22:249-256 (1991)
- 52) Mills, A. L., and L. M. Mallory. *Microbial Ecology*. 14:219-232 (1987)
- 53) 新エネルギー・産業技術総合開発機構. 土壌汚染等修復技術開発報告書 (1999)
- Tourova, T. P., M. V. Omel'chenko, K. V. Fegeding and L. V. Vasiljeva. *Mikrobiologiia*.
   68:568-570 (1999)
- 55) Hiraishi, A. and M. Kaneko. Bull. Jpn. Soc. Microb. Ecol. 9:55-65 (1994)
- 56) Hanada, S., T. Shigematsu, K. Shibuya, M. Eguchi, T. Hasegawa, F. Suda, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. J. Ferment. Bioeng. 86: 539-544 (1998)
- 57) Bowman, J. P., L. I. Sly, P. D. Nichols, and A. C. Hayward. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 735-753.
- Dalton, H., D. D. S. Smith, and S. J. Pilkington, (1990) FEMS Microbiol. Rev. 87:201-207. (1990)
- 59) Lipscomb, J. D. Annu. Rev. Microbiol. 48:371-399. (1994)
- 60) Murrell, J. C. Biodegradation. 5: 145-159 (1994)

- 61) Stainthorpe, A. C., G. P. C. Salmond, H. Dalton, H. and J. C. Murrell, *FEMS Microbiol.* Lett. 70: 211-216 (1990)
- McDonald, I. R., H. Uchiyama, S. Kambe, O. Yagi, and J. C. Murrell. Appl. Environ. Microbiol. 63:1898-1904 (1997)
- Dunfield, P. F., W. Liesack, T. Hanckel, R. Knowles, and R. Conrad. Appl. Environ. Microbiol. 65:1009-1014 (1999)
- 64) Hanson, R. S., and Hanson, T. E. Hanson. Microbiol. Rev. 60:439-471. (1996)
- 65) Stainthorpe, A. C., Y. Lees, G. P. C. Salmond, H. Dalton, and J. C. Murrell. *Gene.* 91:27-34 (1990)

