

モバイル型リアルタイム PCR 装置を活用したバイオオグメンテーション工法における 投入細菌数のモニタリング

株式会社照屋土建	正会員	○崎原 健吾, 照屋 正悟
沖縄工業高等専門学校	正会員	田邊 俊朗, 宮里 真珠
沖縄県環境科学センター	非会員	古家 克彦, 吉川 大介
大鏡建設株式会社	非会員	山入端 豊

1. 序論

バイオオグメンテーションで効率良く浄化を進めるために重要なのは汚染土壌に投入した微生物の菌数をモニタリングし、微生物投入のタイミングを計ることである。ところが従来の方法では、汚染現場で土壌試料を採取しても、研究室等に持ち込み後に生菌数測定のための培養を行うため日数が掛かっており、汚染現場での微生物投入のタイミングを逸することも多いと考えられる。

そこで本研究では、浄化工事現場において実施可能であり、微生物投入のタイミングを逸することのない、できるだけ迅速な投入細菌の生菌数をモニタリング方法について検討したので報告する。

2. 材料と実験方法

2.1 投入菌株の培養と土壌試料の採取

模擬汚染土壌の浄化およびモニタリング用の試験菌には、これまでに筆者らが単離してきた C 重油分解性細菌(菌株番号 19G)を用いた。菌体の培養には、C 重油分解細菌用最少培地を用いた。19G 株の培養には油脂が必要であった為、0.5%のオリーブオイルを添加した。19G 株グリセロールストック液を最少培地に 1%となるよう植菌し、30℃, 120 rpm で3日間振盪培養したものを種菌液とした。最少培地に種菌液を 1%となるよう植菌し、30℃, 120 rpm で3日間振盪培養したものを浄化剤とした。浄化剤を汚染土壌 1.0 m³ (1.8 t) に対して 20 L 投入し攪拌した。

浄化剤の投入は1週間に1回、計4週間行い、投入終了後4週間は細菌数の増減を確認するモニタリング期間として設定した。模擬汚染土壌は、週に2回程度攪拌し、散水を行い、週に1回試料を採取した。

2.2 模擬汚染土壌からの全 RNA 抽出

模擬汚染土壌試料からの全 RNA 抽出には、Biomeme 社製 Homogenization Sample Collection Kit と M1 Sample Prep cartridge for RNA を使用した。また、検量線作成のため、C 重油を添加していない島尻マーグとジャーガルの混合土を用意し、各混合土 250 mg に 19G 株培養液を段階的に添加した。各試料に市販スキムミルク 150 mg を添加し全 RNA 抽出を行った。

2.3 モバイルリアルタイム PCR による菌数測定

抽出した全 RNA を鋳型とし、TaqMan[®]プローブ方によるリアルタイム RT-PCR で 19G 株の 16SrRNA 遺伝子を検出した。19G 株は全ゲノム解析とアノテーションを終えており、明らかになった 16SrRNA 遺伝子の塩基配列からリアルタイム RT-PCR のプライマー・プローブを作製した。逆転写反応および qPCR には、日本ジェネティクス製 FastGene Scriptase II および KAPA 3G Plant polymerase をそれぞれ用いた。

2.5 模擬汚染土壌試料の TPH 濃度測定

実証試験場より採取してきた模擬汚染土壌は、土壌中に残留する C 重油の TPH 濃度を測定した。TPH 濃度測定法は、環境省の油汚染対策ガイドラインに示されている溶媒抽出 GC-FID 法に従った。

3. 実験結果・考察

3.1 工事現場を想定した全 RNA 抽出と C_T 値-19G 菌数検量線の作成

浄化工事現場での作業を想定し、操作が簡便な Biomeme 社製 RNA 抽出キットで模擬汚染土壌試料と検量線作成のため、C 重油を添加していない島尻マーグとジャーガルの混合土に 19G 株培養液を添加した標準試料からの全

キーワード バイオレメディエーション, モニタリング, リアルタイム PCR, 重油汚染

連絡先 〒905-2192 沖縄県名護市字辺野古 905 番地 TEL 0980-55-4003

RNA 抽出を試みた．市販スキムミルクを添加することでリアルタイム RT-PCR に必要となる十分量の RNA を抽出することが出来た．(表-1)

表-2 で示す抽出した RNA を鋳型としてモバイルリアルタイム PCR 装置でリアルタイム RT-PCR を行い，19G 株の 16SrRNA 遺伝子を検出した．混合土に添加した 19G 株培養液の割合およびそこに含まれる 19G 菌数と，測定で得られた C_T 値より作成した C_T 値-19G 菌数検量線を図-1 に示す．

表-1 標準試料からの RNA 抽出量

19G 株 培養液 (%)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
RNA 濃度 (ng/μL)	5.0	3.9	3.9	4.8	4.2	4.5

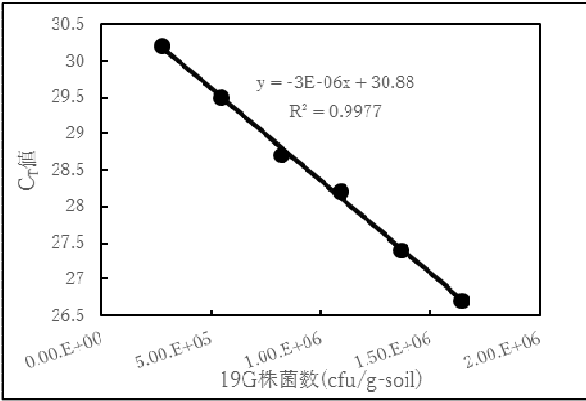


図-1 C_T 値-19G 菌数検量線

3.2 模擬汚染土壌試料の菌数定量

モバイルリアルタイム PCR 装置で測定した模擬汚染土壌中の 19G 株菌数定量データを図-2 に示す．模擬汚染土壌中の C 重油の TPH 濃度測定の結果を図-3 に示す．

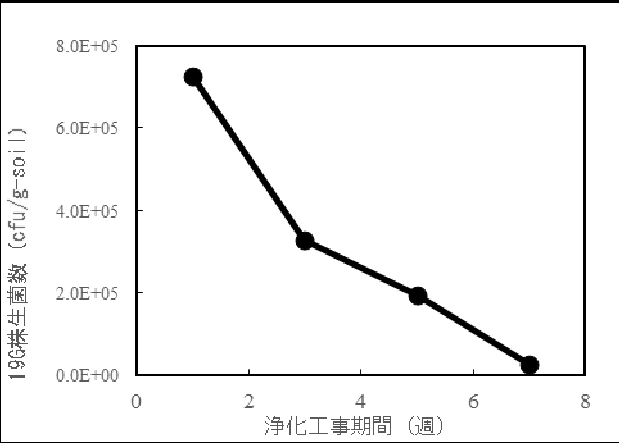


図-2 模擬汚染土壌中の生菌数モニタリング

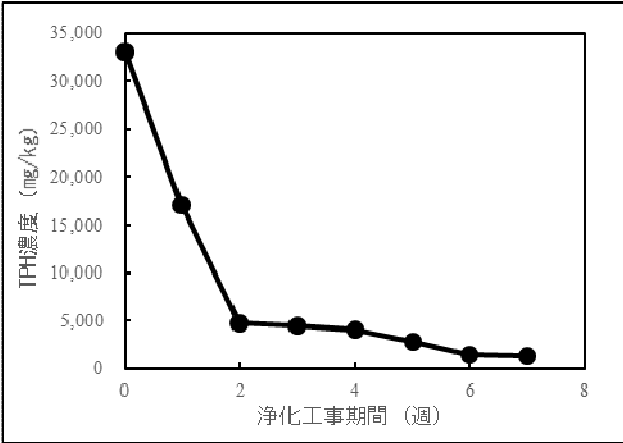


図-3 模擬汚染土壌中の TPH 濃度推移

これらの結果から，実証試験初期は，土壌中の栄養分と C 重油の含有量が多く 19G 株にとって生育環境が良いと考えられ，多くの 19G 株が存在していることが分かった．ここから C 重油の分解が進むにつれて，土壌中の栄養分の枯渇，細菌の炭素源となる C 重油が少なくなり，細菌数が減っていったと考えられる．

4. まとめ

重油分解細菌によるバイオレメディエーション工法における土壌中の細菌数のモニタリングとして，実際の汚染現場を想定し実証試験期間中における土壌中の細菌数の定量を行った．RNA の現場抽出の検討では，カートリッジタイプの抽出キットを使用することで，操作が簡単で時間短縮につながり目的量の RNA を抽出することができた．細菌数のモニタリングについては，モバイルリアルタイム PCR 装置を使用して検量線の作成を行い，模擬汚染土壌の細菌数の定量を行うことができた．操作が非常に簡単で 1 回の測定は約 25 分と短く，RNA 抽出キットと組み合わせると約 30 分で RNA 抽出からリアルタイム PCR まで行うことができる．実際の汚染現場で投入細菌の菌数定量まで行うことができれば，微生物投入のタイミング等，迅速な判断が可能となる．さらなる条件等の検討が必要であるがモバイルリアルタイム PCR を用いた細菌の菌数のモニタリングは可能であると考えられる．