

DNAによる各種環境中の微生物量の評価

広島大学工学部 正員 ○今岡 務
荏原インフィルコ(株) 三好 慶
広島大学工学部 正員 寺西 靖治

1. はじめに 水圏あるいは土壌圏など各種環境中での汚濁物質の挙動には、多くの生物が関わっており、微生物はその主たる構成者である。したがって、微生物存在量の把握ならびに変動量の評価は、これらの環境の状態と各種要因との相互関連を正しく理解するには必要不可欠な情報と考えられる。しかしながら、このような環境試料、とくに土壌や底泥などは多くの夾雑物を含み、SSや強熱減量のような指標を生物量の指標として用いることは困難である。本研究では、このような微生物の定量的指標として生物固有の物質であり、細胞核当りの量の変化も小さいDNAに着目し、各種環境試料での測定を試みた。

2. 実験方法

(1) DNA測定法 DNAの測定に当っては試料中からの抽出が必要であるが、多くの夾雑物を含む環境試料の場合、それらを除去する前処理が大きな問題となる。本研究では、次の3種のDNA測定法に着目し、検討を行った。①PCA法：金子¹⁾が活性汚泥中のDNA測定に用いたエタノール、過塩素酸(PCA)による方法であり、全核酸として抽出し、Burton法(ジフェニルアミンによるDNA中のデオキシリボースの呈色反応)によってDNAのみを定量する。②細胞抽出法：ポリビニルピロリドン(PVPP)、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用いてフミン質のような夾雑物の除去と菌体画分の抽出を行った後、DNAをエタノール沈殿させる方法(Steffanら²⁾による方法)。③直接溶解法：Ogramら³⁾の方法にSteffanらが改良(PVPPの添加操作)を加えたもので、SDSおよびPVPPによる前処理の後、フェノール-クロロホルム-イソミチルアルコールで抽出する方法。PCA法と直接溶解法の操作手順を、表-1および2に示す。

(2) 試料 試料としては、土壌および水域底泥に着目した。土壌試料はマサ土であるが、ここでは廃棄物埋立地浸出水などの汚水散布(20mm/日)が約3ヶ月間なされた芝草植栽土壌カラムから採取したものをを用いた。また、底泥試料としては広島城内堀底泥(1991年10月4日採取)とわが国での最汚濁河川域の一つである油ヶ

表-1 PCA法の操作手順

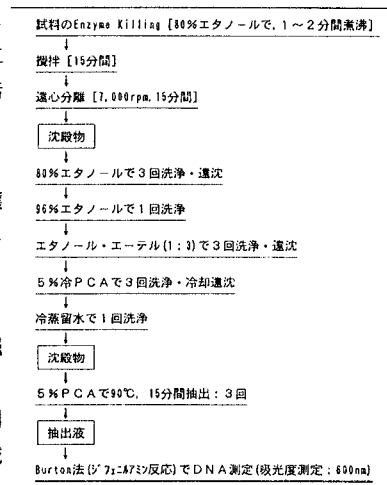
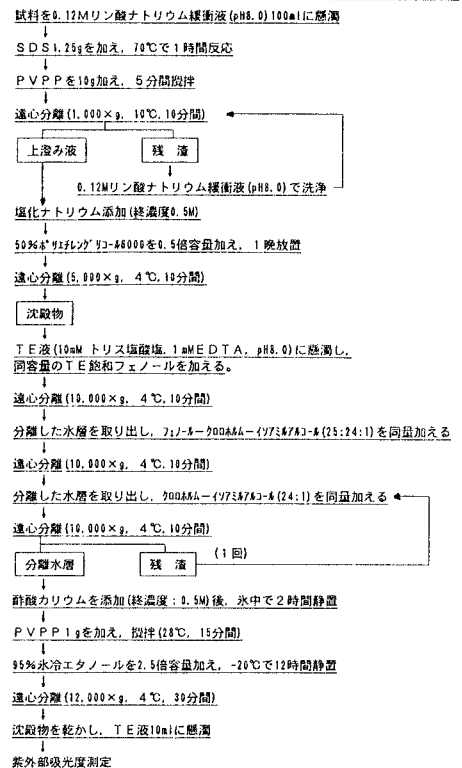


表-2 直接溶解法の操作手順



淵(愛知県碧南市:1991年10月8日採取)の底泥を対象とし、さらにばっ気などによりこれらの有機底泥の質的改善を実験的に試みた処理後の試料も測定に供した。また、廃棄物埋立地浸出水を用いた光合成細菌(*Rhodospseudomonas capsulata*)培養液についても分析を実施し、測定法の検討の材料とした。

3. 実験結果および考察

(1) DNA測定法の比較・検討 油ヶ淵底泥などを試料として、3種の方法によりDNA含有量を測定した結果を表-3にまとめた。また、細胞抽出法と直接溶解法による油ヶ淵底泥試料からの抽出液の紫外外部吸収スペクトルをDNA標準液(*Salmon Sperm*:50mg/l)とともに図-1に示した。いずれの試料においても、PCA法によるDNA測定値が最も大きく、細胞抽出法では極めて小さい値となった。DNAは260nmに吸収極大をもち、 $OD_{260}/OD_{280} < 1.7$ の場合はタンパク質の、 $OD_{260}/OD_{230} < 2$ の場合はフミン質の混入の疑いがあるとされる。細胞抽出法は、純度の高いDNAの回収を目的に提案されたものであるが、 OD_{260} の値そのものが小さく、他の方法より多量の試料を要すると言え、それが難点となろう。一方、直接溶解法の場合、吸収スペクトルの測定結果からは夾雑物の除去は達成できたものと判断できるが、吸収極大にずれが見られる傾向があったため、今後さらに検討が必要であると考えられた。

(2) 試料中のDNA量とその変動について 表-4に底泥処理実験でのDNAの変化をPCA法によって測定した結果をまとめた。有機底泥(ヘドロ)の強熱減量は、ばっ気による好気状態化のみでは減少せず、底泥中の有機物はかなり難分解性が強いと判断される。DNAの増加量も小さく、このような有機物の好気性捕食者は本底泥中にはあまり自生していないことを示す結果と言える。また、光合成細菌の増殖は間接的にはあろうが、底質の改善に寄与するものと推測された。また表-5に示すように、2次処理水散布カラムに比較して、最下部を除き、浸出水散布カラムでのDNA量がかなり高く、微生物活動が活発であったことを示唆した。これは、浸出水散布カラムでのCODと窒素の総散布負荷が、それぞれ56.3g/m²、96.8g/m²と、2次処理水散布カラムでの負荷よりCODで3.7倍、窒素で2.0倍と大きく上回っていたことを反映している結果と考えられた。今後、測定方法の簡略化や生物種との対応の検討が図られれば、DNAはより有効な環境指標と成り得ると考えられる。

表-3 各測定法によるDNA測定値

試料	単位	PCA法	細胞抽出法	直接溶解法
油ヶ淵底泥 ¹⁾	μg/g	461.5	6.7	156.9
2次処理水散布土壌 ²⁾	μg/g	58.3	1.5	24.3
光合成細菌懸濁液	μg/ml	6.6	1.3	6.3

1) エックマン採泥器で採取した表層泥
2) 芝草植栽カラム土(マサ土:深さ5~13cm)

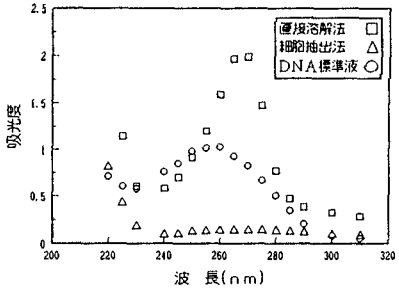


図-1 油ヶ淵底泥試料の紫外外部吸収特性

表-4 処理底泥のDNA量変化

試料	処理条件	DNA (μg/g)	強熱減量 (%)
油ヶ淵	攪拌のみ	初期値	486.5
		14日目	688.8
	攪拌+ばっ気	初期値	501.9
		14日目	672.7
	攪拌+ばっ気+光合成細菌接種	初期値	461.5
		14日目	1210.2
広島城	攪拌+ばっ気+光合成細菌接種	初期値	96.5
		14日目	818.4

表-5 芝草植栽カラム土のDNA分布

試料	深さ(cm)	DNA (μg/g)
下水2次処理水散布カラム	5~13	58.3
	13~21	73.7
	21~29	68.6
	29~37	85.3
	37~45	235.9
廃棄物埋立地浸出水散布カラム	5~13	254.2
	13~21	231.0
	21~29	139.8
	29~37	240.0
	37~45	206.4
カラム充填土(マサ土:初期値)		125.0

[参考文献] 1) 金子光美他:工業用水, No. 102, pp. 7~13, 1967. 2) Steffan R. J. et al: Appl. and Environ. Microbiol., Vol. 54, pp. 2908-2915, 1988. 3) 微生物研究法懇談会編:微生物学実験法, 講談社, p. 260, 1977. 4) Ogram A. et al: J. Microbiol. Methods, Vol. 7, pp. 57-66, 1987.