

VII — 4

水生植物マコモ根圏微生物相検索手法の検討

○ 東北工業大学 正会員 小浜 暁子
東北工業大学 正会員 江成 敬次郎

1. はじめに

植生浄化において、根圏微生物は有機物分解・硝化・脱窒などに大きく寄与していると考えられている。また、水生植物は根茎から酸素を溶出しているという報告がいくつかあり、根茎に存在する硝化細菌などの微生物の機能を向上させている可能性も考えられる。したがって、水生植物を水質浄化により効果的に利用するためには、水生植物と根圏微生物の相互関係について明らかにすることが重要である。しかし、根圏微生物の多くは根茎の周囲に形成された生物膜内部や根茎内部に存在しており、そのままでは観察や同定が容易でないこと、また分離培養が困難な微生物が圧倒的に多いといったことから、水生植物の根圏を構成する微生物相やそれらの機能は未解明の部分が多い。

本研究では、水生植物の根圏微生物相検索に適した手法の検討を目的として、水生植物マコモを用い、試料の前処理方法について超音波破碎処理と攪拌機による分散処理を比較し、さらに近年環境中の微生物の検索に利用されてきているPCR-DGGE法およびFISH法の適用を試みた。

2. 方法

2.1 試料

マコモは伊豆沼・内沼環境保全財団から譲渡された根茎を実験室内で発芽させ、約7ヶ月間水耕栽培したものをを用いた。微生物の接種は行わなかったが、栽培期間の経過に伴い、もともと根茎に付着していた、もしくは自然に混入した微生物によってマコモ根茎に生物膜が形成された。マコモ根茎に付着した生物膜を剥離・分散させるため、採取したマコモの根茎を約1cmに切断し、15mlポリプロピレン製チューブに入れ、1×PBS 3mlに懸濁し、表-1に示した4条件で処理を行った。各処理後、3,000rpm、1分間で遠心分離を行い根茎の破片などを沈殿させ、さらに上澄みを1mlエッペンドルフチューブに移し、6,000g、5分間で遠心分離を行い、沈殿物を試料とした。また、試験管ミキサーのダイヤル強度“強”で1分間、攪拌を行った試料をPCR-DGGEに用いた。マコモ根茎付着生物膜の対照として、純粋培養した*Nitrobacter winogradskyi* (NBRC 14297)、*Nitrosomonas europaea* (NBRC14298)、*Bacillus subtilis* (NBRC 3007)を用いた。

表-1 処理方法

No.	処理装置	強度, 時間
①	超音波ホモジナイザー (VCX-500,	100V, 最大振幅40%, 1分
②	SONIX MATERIALS, チップ径3mm)	100V, 最大振幅60%, 1分
③	試験管ミキサー (TTM-1,	ダイヤル“中”, 1分
④	TESTTUBEMIXER, SIBATA)	ダイヤル“強”, 1分

2.2 FISH法

集積した試料1mlをエッペンドルフチューブドゥルフチューブに取り、リゾチームを10μl添加し、2分間反応させた。15,000g、3分間で遠心分離を行い、上澄みを除去し、4%PFAを1ml添加後、攪拌し、4℃で一晩固定した。固定した試料10μlをスライドガラスに滴下し、50%、75%、98%のエタノール系列中で各2分間脱水、風乾後、45℃で一晩、in situ ハイブリダイゼーションに供した。蛍光DNAプローブはEUB338(真正細菌用)、Nso190(Bサブクラスアンモニア酸化細菌全体)、Ntb1169(亜硝酸酸化細菌)を使用した。ハイブリパッファー(0.9MNaCl, 20mM Tris HCl (pH7.2), 0.01% SDS, 20%ホルムアミド)に浸し、45℃で5分、2回洗浄した。その後DAPI溶液、蛍光退色防止剤を各5μl滴下し、光学顕微鏡(Axioplan2 Imaging, Carl Zeiss社製)により観察した。

2.3 PCR-DGGE法

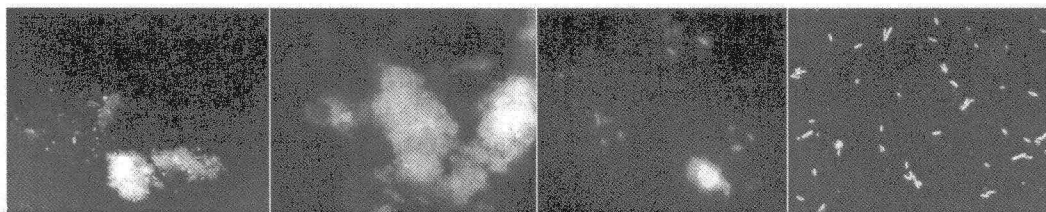
細胞中からのDNAの抽出には2種類の既成のキット(A, B)を用いた。これらはいずれもスピニングカラムを使用したものであった。キットの選択にあたっては、土壌サンプル、水溶サンプルのいずれからでもDNA抽出が可能なおこと、また操作が簡便であることを考慮した。それぞれのキットを用いて細胞から抽出したDNAをPCR-DGGEの試料とした。PCRはプライマーとして341F(GCクランプ付)と907Rを用いた。iCycler™(BIO RAD社)を用い、反応条件は、熱変性(94℃)→アニーリング(55℃)→伸長反応(72℃)の一連の行程を(5分→1分→3分)×1サイクル、(1分→1分→3分)×28サイクル、(1分→1分→10分)×1サイクル、計30サイクル繰り返した。DGGE法はDcode system(BIO RAD社)を用い、石井ら¹⁾の方法に準拠して行った。変性剤濃度勾配を15%～55%に設定した8%ポリアクリルアミドゲル(変性剤100%; 7M尿素, 40%ホルムアミド)を用いて、60℃、200Vで4時間電気泳動を行った。泳動後0.01%エチジウムブロミド溶液中で染色後、UVトランスイルミネ

ーター上に乗せ、励起波長 302nm でポラロイドカメラ GelCam (Polaroid 社)を用い撮影した。

3. 結果および考察

3.1 FISH 法

マコモ根茎付着生物膜を異なる方法により分散処理し、FISH 法により染色した結果を図-1 に示した。超音波破碎を行った①②では、根茎が小さく破碎され、根茎と細菌の判別が困難であった。一方、試験管ミキサーによって攪拌した③、④では、細菌が分散されており、根の破片もみられなかった。強度については、“強”のほうがよく分散されていた。以上のことから、マコモ根茎に付着する生物膜を剥離して観察する場合には、試験管ミキサーによる処理が適していることがわかった。また、③、④において、マコモ根茎付着生物膜中に硝化細菌が存在することが示された。



①超音波破碎振幅 40% ②超音波破碎振幅 60% ③試験管ミキサー“中” ④試験管ミキサー“強”

図-1 分散方法の異なるマコモ根茎付着生物膜 (FISH 法)

3.2 PCR-DGGE 法

2 種類の DNA 抽出キットを用いて抽出された DNA の純度について、いずれのキットにも大きな違いは見られなかった。抽出後、PCR を行った試料を用いて DGGE 法による電気泳動を行い、得られたバンドパターンを図-2 に示した。左端からマコモ根茎付着生物膜 (Biofilm), *Nitrosomonas* (Nso), *Nitrobacter* (Ntb), *Bacillus* (B.sub) のバンドを示した。A, B は使用した抽出キットである。マコモ根茎付着細菌については、いずれの抽出キットについても複数のバンドを確認することができた。微生物相の検索には DNA 抽出キットを用いた DGGE 法が適用可能であること、マコモ根茎生物膜は、少なくとも 7 種類以上の細菌によって構成されていることがわかった。また、マコモ根茎付着生物膜中には *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* とほぼ同じ高さに出現するバンドが得られたことから、マコモ根茎付近に硝化細菌が存在する可能性が示された。

4. まとめ

本研究により、以下のことが明らかになった。

- 1) マコモ根茎付着生物膜を、生物膜の剥離および分散方法を検討した結果、超音波破碎を行うよりも試験管ミキサーによる攪拌の方が FISH 法に適用しやすいことがわかった。
- 2) マコモ根茎付着細菌相を調べるため、2 種類の DNA 抽出キットにより抽出された試料の DNA を用い、PCR-DGGE 法を試みた。変性剤濃度 15%~55% で 200V, 4 時間泳動を行った場合、マコモ根茎の試料においてバンドが複数本確認され、適用可能であることが明らかになった。また、マコモ根茎付近は、数種類の細菌によって構成されていること、さらに、マコモ根茎付近に硝化細菌が存在する可能性が示された。

謝辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金 (若手研究 (B) 課題番号 15710066) により行われたものである。ここに謝意を示す。

参考文献

- 1) 石井浩介, 中川達功, 福井学 (2000) 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用, 日本微生物生態学会誌, Vol5, No.1, pp.59-73

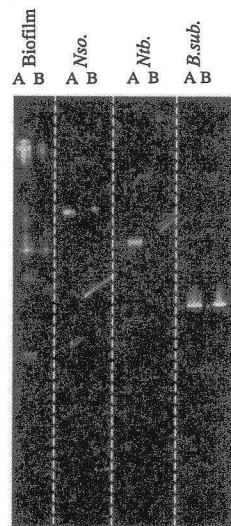


図-2 DGGE バンドパターン