

# 河川水中に添加されたバチルス属細菌の挙動解析

東北学院大学 工学部 学生会員 ○須藤真志・高野智博  
東北学院大学 工学部 正会員 中村寛治

## 1. 背景および目的

バチルス属細菌は、有機物分解を促進する目的で、河川や活性汚泥等に添加される細菌として良く知られている。しかしながら、このような特定微生物が環境中に放出された場合、どのような挙動を取るのかについてはほとんど分かっていない。

そこで我々は、広瀬川河川中にバチルス属細菌を添加し、それらがどのような挙動を取るのかを調査した。具体的には、本細菌が河川中に生息する原生動物によって、捕食されるか否かを検討し、出現した原生動物の系統学的な位置付けを明らかにした。

## 2. 実験材料および方法

### 2-1 利用河川水

バチルス属細菌を添加するために利用した河川水は、2008年10月18日に図-1に示すサンプリングポイント(Sp) 8箇所にて採水した。(Sp1 作並源流、Sp2 相生橋、Sp3 熊ヶ根駅付近、Sp4 苦地橋、Sp5 開成橋、Sp6 生瀬橋、Sp7 大橋、Sp8 宮沢橋)



図-1 広瀬川サンプリングポイント場所

### 2-2 添加細菌の種類

添加バチルス属細菌は明治製菓製のBN菌(以下BN菌)とした。培養にはLB培地(Difco社製 Tryptone 10 g, Difco社製 Yeast extract 5 g, NaCl 5 g, 蒸留水 1 L中, pH 7.0)を利用し、200 rpm、30°Cで一晩振とう培養を行った。その後、ろ過滅菌(MILLIPORE社製、マイレクス、孔径0.22 μm)した河川水(図-1のSp1よ

り採水)で2回洗浄(11,100×g, 5 min, 4°Cで集菌し、上澄みを捨てる)し、最終的に滅菌河川水に懸濁、一晩200 rpm、20°Cで振とう培養し、使用した。

### 2-3 捕食実験

BN菌を利用した捕食実験では前項で用意した細菌0.25 mLを試験管に入れ、4.75 mLの河川水(Sp1~8)を添加、180 rpm、20°Cで振とう培養を行った。600 nmでの吸光度を測定し、値が初期値(0.200に設定)の20%以下になった時点で、捕食者の顕微鏡観察を行い、その後、DNAを抽出した。

### 2-4 DNA抽出法

DNAの抽出手順は既報の論文に従った<sup>1)</sup>。河川水を孔径0.2 μmのフィルターでろ過し、微生物を収穫した。このフィルターを2 mLのエピENDORフチューブに入れ、凍結融解、SDS処理、ビーズにより破碎処理を行った。抽出したDNAは最終的に50 μLのTEに溶解した。

### 2-5 T-RFLP解析

サンプルから抽出したDNAを基にプライマーとしてM-Euk-82fF(5'-AAACTCGCGAATGGCTCAT-3', 5'末端6-FAM標識)、M-MedlinBN(5'-ATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3', 5'末端6-FAM標識)を用いての18S rRNA遺伝子をPCR増幅した。反応条件は前熱処理(94°C, 1分)の後、第1段階(94°C, 20秒)、第2段階(58°C, 30秒)、第3段階(72°C, 1分40秒)を30サイクル繰り返し、後伸長反応(72°C, 7分)を行った。プライマー除去後、PCR産物を制限酵素(*Bst* U I)で切断し、脱塩処理を行った。その後、ABI PRISM 3130 Genetic AnalyzerによりGene Mapperモードで解析し、Terminal Restriction Fragment(T-RF)のピークデータを取得した。

### 2-6 18S rRNA 遺伝子の取得および解析

T-RFLP解析の後、前項と同様のプライマー(蛍光標識はなし)およびPCR条件で18S rRNA遺伝子を増幅し、その塩基配列を決定した。解析対象の18S rRNA遺伝子はT-RFLP解析で最大のピークを示したものとした。得られた塩基配列データはインターネット上でNational Center for Biotechnology Information(NCBI)に送付、

キーワード バチルス属細菌 18S rRNA 遺伝子 原生動物

連絡先 中村 寛治 (宮城県多賀城市中央1-13-1) 022(368)7045

近縁種を決定し、加えて DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にて Clustal W による系統解析を行った。

### 3. 実験結果および考察

#### 3-1 捕食実験中の吸光度変化

BN菌の濃度を表す 600nmでの吸光度 ( $A_{600}$ ) が初期値 (0.200) の 20%以下になるまでの経時変化は図-2 の通りである。3 日目までの Sp でも初期値の 20%以下の値となった。

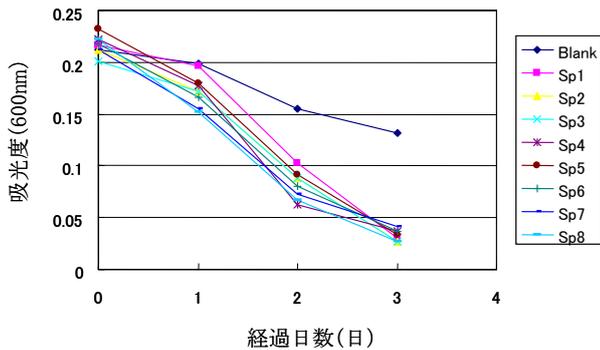


図-2 吸光度 (600nm) の変化

#### 3-2 T-RFLP 解析結果

$A_{600}$  の値が低下したサンプルより抽出した DNA を基に、図-3 の T-RFLP 解析結果を得た。各 Sp で最大値を示す出現ピーク位置が異なるため、Sp によって主たる捕食者が異なると推察された。しかしながら、どの Sp でもピーク出現位置が 335~345 bases の間に見られたため、捕食者は系統的に近縁であることが予想された。

#### 3-3 近縁種の決定および系統解析結果

NCBI による解析結果から、Sp1 の捕食者 (Sp1-Euk) , Sp2-Euk, Sp5-Euk は *Stramenopiles*, *Ochromonadaceae*, Sp7-Euk, Sp3-Euk, Sp6-Euk は *Stramenopiles*, *Chrysophyceae* に近縁な原生動物であることが明らかになった。図-4 の系統樹に示すとおり、全ての捕食者は極めて近縁な関係にある。さらに、本原生動物は過去 *Ralstonia eutropha* KT1 株を捕食した原生動物<sup>1)</sup>とも近縁であった。

### 4. 結論

1. 広瀬川上流作並地区から下流宮沢橋の 8ヶ所のサンプリングポイント全ての河川水に捕食性原生動物が存在し、BN 菌は捕食された。
2. 捕食原生動物から DNA を抽出し、18S rRNA 遺伝子を増幅させ、系統解析を行った結果、最優占化した原生動物は、ストラメノパイル (*Stramenopiles*)

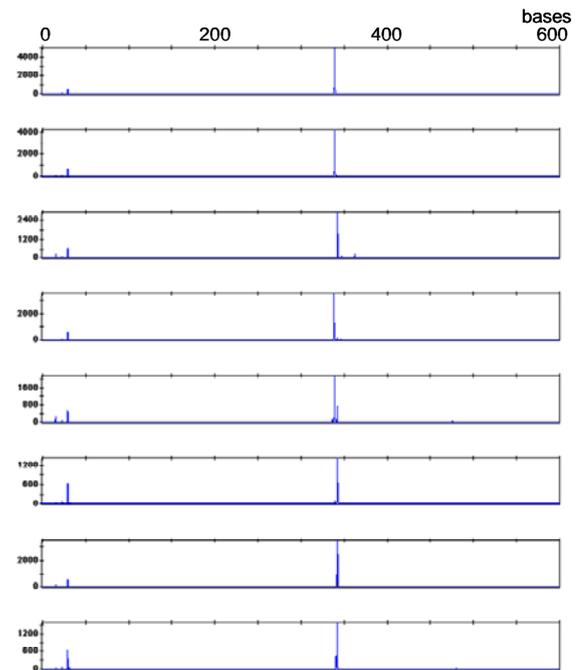


図-3 T-RFLP 解析結果 (Sp1~Sp8)

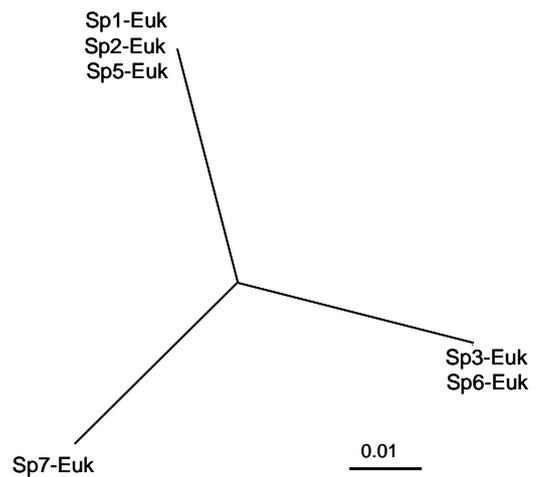


図-4 BN 菌の捕食者の系統解析結果 (Sp1-Euk:Sp1 の捕食者, その他同様に各 Sp での捕食者)

の *Ochromonadaceae* と標記された種類の原生動物であることが分かった。

3. 今回観察された捕食原生動物は、過去、グラム陰性である *Ralstonia eutropha* KT1 株を捕食させた場合に観察されたものと極めて近縁であった。つまり広瀬川に異なる微生物を添加しても同じような原生動物に捕食されると考えられる。

#### (参考文献)

- 1) 中村寛治ほか;環境工学研究論文集 Vol. 45, 2008