

(1) フェノールによるトリクロロエチレンのコメタボリズム  
において出現する微生物群の解析

ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITY DEVELOPED DURING  
CO-METABOLISM OF TRICHLOROETHYLENE WITH PHENOL

中村 寛治\* 鈴木 義彦\* 石田 浩昭\*

Kanji NAKAMURA, Yoshihiko SUZUKI, Hiroaki ISHIDA

**ABSTRACT;** Laboratory scale soil columns were operated to degrade trichloroethylene (TCE) by co-metabolism with phenol. The columns were operated approximately for a year. At the end of the operation effluent and biofilm samples were taken to analyze microbial community by three methods. First, dominant phenol-utilizing strains were isolated from diluted tubes in most-probable-number (MPN) methods. Totally four strains were isolated, and only one strain showed the capability of degrading TCE with phenol induction. Phylogenetic analysis on these four strains was carried out, and each of four strains was found to exist at separated positions in a phylogenetic tree, suggesting the existence of variety of phenol utilizers in the columns. Second, clones of PCR-amplified 16S rDNAs were randomly obtained and analyzed. Both of suspended and attached microbial communities consisted of several dominant types of 16S rDNA occupying approximately 50 % of total 16S rDNA clones. Furthermore, two types of 16S rDNA showed identical phylotypes, which were defined by restriction patterns, among two microbial communities. Third, rapid analysis of total microbial populations was conducted by 5' terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) of 16S rDNAs. Results of T-RFLP analysis well characterized the microbial communities, and made possible to determine a dominant 16S rDNA type in a short time.

**KEYWORDS;** Trichloroethylene, Co-metabolism, Microbial community, 16S rDNA

## 1. はじめに

土壌・地下水汚染は、世界各地、取り分け先進工業国で深刻な環境問題を引き起こしており、早急な対策が求められている。汚染された土壌の処理法には、大きく分けて、物理化学的処理法と生物学的処理法の2種類の方法が存在する。生物学的処理法では、主として微生物が利用されるが、一般的に処理コストが低く、副産物の生成等も少ないため、有望な処理法として研究開発が進められている。このような微生物の利用は、アメリカではすでに実用化段階にあり、様々な汚染物質に対して数多くの適用例が見られるものの、日本では適用例が少ないのが現状である。この理由の一つとして、土壌汚染への微生物の利用が完全な開放系での利用であり、従来の活性汚泥処理のように半閉鎖系ではないことが上げられる。つまり、汚染土壌・地下水を浄化する目的で、微生物を原位置 (*in-situ*) で増殖させた場合、微生物が地下水等を媒体に人間およびその周辺に存在する動植物と接触する機会が半閉鎖系に比べて多くなることが予想され、汚染地域の大部分が居住地域と隣接する日本においては、技術の適用にも慎重さが求められる。それゆえ、出現微生物を明らかにし、微生物に係わる未知の不安要素を取り除いていくことが、今後の重要な課題となってくる。

---

\*栗田工業(株) 技術開発センター (Kurita Water Industries Ltd., Corporate Research and Development Center)

このような課題に対して、生物学的な土壌浄化の際に出現する微生物全体を対象に、遺伝子レベルの解析を行い、その微生物の種類を明らかにする研究が、すでに Fries<sup>1,2)</sup> や, Dojka<sup>3)</sup> らによって行われている。日本においても、現在進行中の財団法人地球環境産業技術研究機構 (RITE) による土壌汚染等修復プロジェクトの中で、バイオレメディエーションにおいて出現する微生物の解析が検討されている。ここでは、本プロジェクトの現場での微生物解析の前段階として行われた、実験室規模のトリクロロエチレン(TCE)の連続分解において出現した微生物群の解析に関して報告する。

## 2. 実験材料および方法

### 2. 1 実験装置

SCHOTT 製の 310 mL 容積の褐色ガラスビンに川砂 (真密度 2.69 g/cm<sup>3</sup>, 空隙率 42 %, 渡良瀬川産) を 280 mL 充填、これを 2 本直列につなぎ、実験用土カラムとし、20±1°Cの定温室で運転した (Fig.1)。実験装置に利用したチューブは全てテフロン製とした。供給水のベースには、必要となる栄養塩を含有する Mineral Salts Basal Medium (MSB)<sup>4)</sup> を蒸留水で 50 倍に希釈した 1/50 MSB (非滅菌) を使用し、これに TCE を 500 µg/L、フェノールを 5 mg/L の濃度になるよう添加、pH 6.8±0.1、流量 25 mL/h で供給した。また、ブランク系カラムとして、栄養塩および TCE のみを供給した土カラムも同時に運転した。供給水中の酸素濃度は飽和濃度にほぼ近い値であった。植種源は厚木市内の河川水である。

### 2. 2 フェノールおよび TCE の測定

フェノール濃度の測定には島津製作所製液体クロマトグラフ System-6A を利用し、カラムは山村化学社製の YMC-Pack ODS-A、移動相は 40%のメタノール溶液、検出器は UV 計(270nm)を用いた。また、TCE の分析は島津製作所製ガスクロマトグラフ 9A により行い、充填剤は Silicone DC-550 を用い、カラム温度は 100°Cに設定、FID 検出器で測定した。

### 2. 3 細菌数の計測

計測対象は土カラム流出水中の浮遊細菌および後述する操作によって土カラムより剥離した付着細菌とした。土カラム流出水の適量を滅菌済のプラスチックチューブに集め、トミー製超音波破砕機 UD-201 (40 W, 30 秒) で分散処理を行い、これを浮遊細菌数測定のためのサンプルとした。付着細菌を採取するため、土カラムの液相部分、約 30 mL を取り除き、濾過滅菌した 1/50 MSB と置換、5 分間手に持って激しく攪拌し、付着細菌を液中に剥離させた。本操作によって直列につないだ 2 つの土カラムから得られた付着菌懸濁液は混合し、上記のように超音波処理を行い、付着細菌数測定のためのサンプルとした。

全菌数および生菌数を把握するため、上記の浮遊細菌および付着細菌測定用サンプルを一定量濾過し、細菌をフィルター上に補足した上で、全菌数を 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色<sup>5)</sup>により、生菌数を 5,6-carboxy

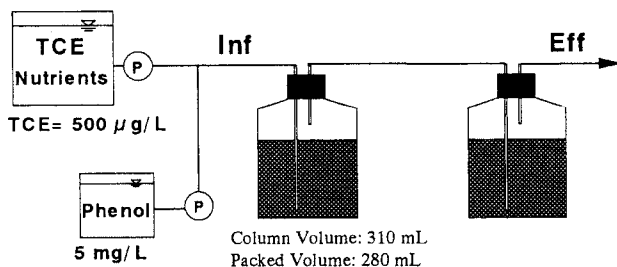


Fig. 1 Experimental apparatus

fluorescein diacetate (CFDA) 染色 (エステラーゼ活性染色)<sup>9)</sup> により測定した。計測には蛍光顕微鏡 (オリンパス社製、VANOX-AH2-FL) を使用し、DAPI 染色の場合は U 励起で、CFDA 染色の場合は B 励起で観察した。Colony Forming Unit (CFU) はサンプルを 1/50 MSB で希釈後、R2A 寒天培地 (Difco 社製) に塗布し、30°C で 1 週間培養、コロニーを形成させ、計測した。さらに、必要に応じて、フェノール資化細菌数および従属栄養細菌数を MPN 法 (5-5-5) により測定した。フェノール資化細菌数の測定は 5 mg/L のフェノールを含有する 1/50 MSB により (以下、Phenol MPN とする)、従属栄養細菌数の測定には、M-R2A 培地<sup>9)</sup> を利用した (以下、M-R2A MPN とする)。

## 2. 4 DNA の抽出

DNA 抽出は基本的には Zhou らの方法<sup>7)</sup> に従い、Bead Beater 処理を補足した。浮遊細菌から DNA を抽出するため、土カラム流出水 50 mL を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルター (MILLIPORE 製, GTBP2500) で濾過、このフィルターを 2 mL 容のエッペンドルフチューブに入れた。さらにそのチューブに BIOSPEC-CSC 社製 Zirconia/Silica Beads (直径 0.1 mm) 1 mL および Extraction Buffer (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM sodium EDTA [pH 8.0], 100 mM sodium phosphate [pH 8.0], 1.5 M NaCl) 1 mL を加え、細胞破砕機 Bead Beater (BIOSPEC-CSC 社製、Mini-Bead-Beater-8) でダイヤル Homogenize にて 2 分間処理した。次に凍結融解を 3 回繰り返した後、10  $\mu\text{L}$  の Proteinase K (10 mg/ml) を加え、37°C にて 30 分間保温した。この液に、250  $\mu\text{L}$  の 10% SDS 溶液を加え、65°C で 2 時間保温、再び上記の Bead Beater 処理を行った。その後 8000  $\times g$  にて室温で 10 分間遠心分離し、上清を採取した。上清はクロロホルム抽出し、等量のイソプロパノールを添加後、室温で 60 分間静置、8000  $\times g$  にて室温で 20 分間遠心分離し、DNA を沈殿させた。沈殿は 70% エタノールで洗浄後、乾燥させ、50  $\mu\text{L}$  の滅菌蒸留水に溶解した。また、付着細菌から DNA を抽出するため、前項で調製した付着細菌数測定用サンプル 0.5 mL に等量の Extraction Buffer を加え Bead Beater で処理、その後の操作は浮遊細菌の場合と同様に行った。

## 2. 5 PCR による 16S rDNA の増幅

前述のように抽出した DNA 溶液 (DNA が高濃度の場合は希釈液を使用) 1  $\mu\text{L}$  をテンプレートに 16S rDNA を PCR 増幅した。PCR 増幅の反応液の全容量は 100  $\mu\text{L}$  とし、2.5 U の Ex Taq DNA polymerase (宝酒造製)、200  $\mu\text{M}$  の dNTP、5'末端をリン酸化した Bact0011 (5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3') および Bact1492 (5'-ACGG C/T TACC TTGTTAGGACTT-3')<sup>9)</sup> をそれぞれ 20 pmol 使用した。その他の反応液組成は添付のマニュアルに従った。PCR 反応は、Pre-heating; 94°C, 2 分 に続き、第 1 段階; 94°C, 20 秒、第 2 段階; 55°C, 30 秒、第 3 段階; 72°C, 2 分 を 30 サイクル繰り返し、Post extension; 72°C, 7 分 を行った。本反応には、Perkin-Elmer 製 GeneAmp PCR System 2400 を利用した。

## 2. 6 PCR 増幅された 16S rDNA からのクローン取得

PCR 増幅産物をアガロース電気泳動にかけ、目的である 16S rDNA (約 1.5 kb) 断片を含む部分を切り出し、Gene Elute Agarose Spin Column (SPELCO 製) で精製した。この断片を T4 DNA polymerase (東洋紡製) にて 37°C で 5 分間保温し、平滑末端化を行った。次に本断片をプラスミド pKNA80 (ファルマシア製 pTrc99A<sup>9)</sup> の *NsiI* サイトから *NcoI* サイト [*lacI<sup>r</sup>* および *trc* プロモーター] ままでを削除し、T4 DNA polymerase で上記の通り平滑末端処理した後、セルフライゲーションしたもの) のマルチクローニングサイト中の *SmaI* サイトに挿入した。ライゲーション反応には Ligation high (東洋紡製) を使用し、16°C にて一晩反応させた。その後、大腸菌に形質転換させ Luria-Bertani (LB) 寒天培地 (Ampicillin 100  $\mu\text{g/mL}$  を含む) に塗布、37°C で一晩培養した後、クローンを取得した。

## 2. 7 16S rDNA クローンの Phylotype による分類

16S rDNA クローンを含むプラスミドを抽出し、この希釈液をテンプレートに、Bact0011 および Bact1492 のプライマーペア（5'末端はリン酸化されていない）を利用し、再び PCR 反応を行った。PCR 反応の組成、条件は前述の通りである。PCR 反応終了後、その 1  $\mu$ L を 3 種類の制限酵素（*Bst*UI, *Hha*I, *Rsa*I）によりそれぞれ切断し、アガロース電気泳動を行い、切断パターンを比較して 3 種類が全て同じパターンを示すものを同一の Phylotype として分類を行った<sup>10)</sup>。

## 2. 8 16S rDNA の塩基配列決定および系統解析

前項の 16S rDNA クローンで、出現頻度が 2 以上のクローンに関しては、プライマーとして Bact0011 を利用して前方約 500 bases の塩基配列を決定した。DNA の伸長反応には BigDye Terminator Kit (Perkin-Elmer 製) を用い、配列決定には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer 製) を使用した。また、2 種類の MPN 法 (Phenol MPN, M-R2A MPN) において最大希釈および一段階前の希釈のチューブから R2A 寒天培地を利用して単離された優占菌株で、フェノール資化能を有する菌株に関しても、16S rDNA の全塩基配列を決定した (DNA 抽出法および 16S rDNA 増幅法は前述の通り)。この際利用したプライマーは、Bact0011、Bact1492 の他に、すでに報告されている 6 種類 (530f, 926f, 1406f, 342r, 685r1 & r2 & r3 の mix, 1100r)<sup>11)</sup> を、使用した。得られた塩基配列データはインターネット上で Ribosomal Database Project に送付、近縁種を決定した。また、近縁種の塩基配列を含む全塩基配列データを利用して ClustalX により系統解析を行った。

## 2. 9 Terminal - Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)による解析

2. 4 で抽出した浮遊細菌および付着細菌由来の DNA をテンプレートに、上述した PCR 反応条件により PCR 反応を行った。この際、プライマーは Bact0011 の 5'末端を 6-carboxyfluorescein (6-FAM) で標識したもの、および Bact1492 の 5'末端を 4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) で標識したものを使用した (Perkin-Elmer 社に依頼合成)。PCR 増幅産物はアガロース電気泳動にかけ、目的である 16S rDNA (約 1.5 kb) 断片を含む部分を切り出し、Gene Elute Agarose Spin Column で精製した。その後、エタノール沈殿により DNA を回収し、少量の滅菌蒸留水に溶解させ、適量を制限酵素 (*Bst*UI, *Hha*I, *Rsa*I) で切断した。切断した 16S rDNA は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer により Gene Scan モードで解析し、T-RFLP (0~500 bases の範囲) の Electropherogram を得た。T-RFLP の Electropherogram は 16S rDNA の 5'末端および 3'末端に関して得られたが、本研究では 5'末端の 6-FAM による解析結果のみを利用した。

## 3. 実験結果および考察

### 3. 1 浮遊および付着細菌数

Fig. 1 に示した土カラムは、フェノールを添加しないブランク系およびフェノール添加系の 2 系列を約 1 年間 (341 日間) 運転した。この際、56 日目から運転終了時までのブランク系の平均流入、流出 TCE 濃度 (2 週間に一度測定) はそれぞれ 551  $\mu$ g/L、518  $\mu$ g/L となった。一方、フェノール添加系では 5 mg/L の添加フェノールは完全に分解され (50  $\mu$ g/L 以下)、平均流入、流出 TCE 濃度はそれぞれ 568  $\mu$ g/L、452  $\mu$ g/L となった。これらの結果から、5 mg/L のフェノール添加によって、約 80  $\mu$ g/L の TCE が分解されたことになる。次に、ブランク系およびフェ

ノール添加系の流出水中の浮遊細菌数を定期的に測定した結果を Fig. 2 に示す。両方の系において、全菌数 (DAPI 染色)は  $10^6$ cells/mL オーダー、生菌数(CFDA 染色)は  $10^5$ cells/mL オーダー、CFU は  $10^4$ cells/mL オーダーで試験期間中ほぼ一定であった。フェノール添加系では 5 mg/L のフェノールが添加されているにも拘わらず、測定した細菌数の項目に関しては、著しい増加は見られなかった。

カラム運転最終日に測定した、浮遊および付着細菌数（土の間隙体積当たりで算出）の測定結果を Fig. 3 に示す。浮遊細菌数に関しては DAPI 染色、CFDA 染色、CFU、M-R2A MPN の項目ではブランク系とフェノール添加系でほとんど差がなかった。しかしながら、Phenol MPN はフェノール添加系で約 2 オーダー高く、フェノール資化細菌が優占的に生息していたことが確認できた。また、付着細菌数は、土の間隙当たりの菌濃度で、浮遊細菌の約 100 倍の細菌が生息していることが分かったが、この場合もブランク系とフェノール添加系で著しい差があったのは Phenol MPN だけであり、浮遊細菌の場合と同じ傾向を示した。さらに、DAPI 染色、CFDA 染色、CFU の比率 (DAPI 染色に対して CFDA 染色は約 1/10、CFDA 染色に対して CFU は約 1/10) も、付着細菌、浮遊細菌でほとんど同じ傾向を示した。

ブランク系では浮遊細菌、付着細菌いずれの場合も、CFDA 染色による測定値と M-R2A MPN の値がほぼ同等の値を示していることから、M-R2A MPN によって大部分の生菌を捉えていると推測される。また、フェノール添加系でも Phenol MPN および M-R2A MPN の値が CFDA 染色の値と比較して、同等あるいはそれ以上を示しており、両 MPN 法によって生菌の大部分を把握できていると推測される。しかしながら、ここで得られた 4 種類のサンプルに対する CFDA の値はすべて M-R2A MPN より低いことから、CFDA 染色の条件が最適でないことも考えられ、今後の課題としたい。

### 3. 2 MPN 法によって単離された優占菌株

前項で示した通り、フェノール添加系では Phenol および M-R2A MPN によって生菌をほとんど把握できていることが明らかとなった。そこで、フェノール添加系の運転最終日に測定された 2 種類の MPN 法の最大希釈、およびその一段階前の希釈の陽性試験管より、R2A 寒天培地を利用して優占菌株の単離を試みた。単離した菌株は、そのフェノール資化性を調べ、フェノール資化能を有する菌株のみを解析対象とした。単離された 9 株を Table 1 に示す。付着細菌からは 7 株が単離できたが、浮遊細菌からは 2 株しか単離できなかった。これらの菌株が同一

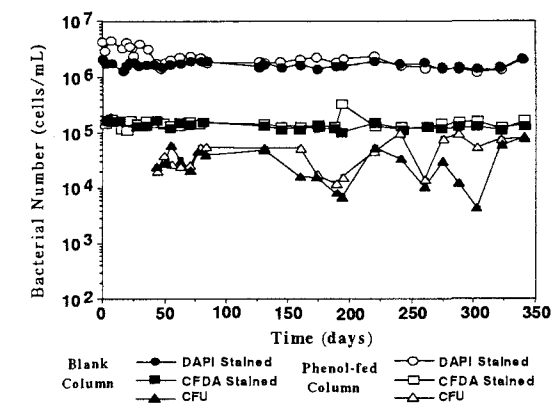


Fig. 2 Change of bacterial number

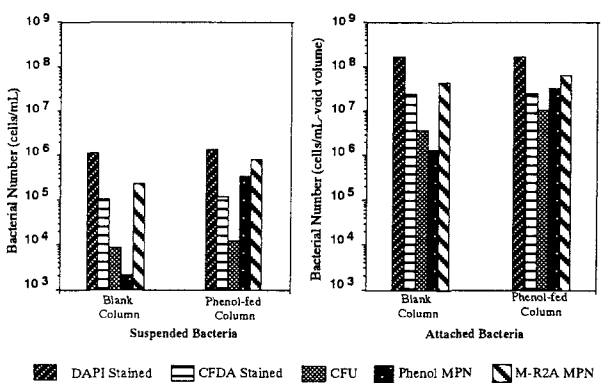


Fig. 3 Suspended and attached bacterial numbers

の菌株由来か否かを確認するために、REP-PCR<sup>12)</sup>による DNA フィンガープリントを作成、比較した結果、Table 1 の右端に示すように、4 種類の菌株であることが明らかとなった。この結果に示すように、浮遊細菌から得られた 2 種類の菌株は、どちらも付着細菌としても生息していたことが明らかとなった。また、これら 4 種類の菌株の TCE 分解能をフェノール誘導後に評価した結果、Strain 3 のみが TCE 分解能を有し、他の菌株は TCE 分解能を有していないことが明らかとなった。この結果から、TCE 分解能を有するフェノール資化細菌の存在割合が低いものと推察できる。

次に 4 種類の菌株の 16S rDNA を PCR 合成し、その全塩基配列を決定、Ribosomal Database Project (RDP) にアクセスし、近縁種を決定した。これら近縁種のデータおよび 4 種類の単離菌株の 16S rDNA の塩基配列データを利用して行った系統解析の結果を Fig. 4 に示す。アンダーラインを引いた菌株 (*Burkholderia cepacia* G4<sup>13)</sup> [旧名 *Pseudomonas cepacia* G4], *Ralstonia* sp. KN1<sup>14)</sup> [旧名 *Pseudomonas* sp. KN1]) は、フェノール資化性の TCE 分解能を有する菌株であるが、TCE 分解能を有する Strain 3 はこれらの菌株と系統的に近い株であることが明らかとなった。他の 3 株は Strain 3 とは系統的に異なり、かつそれぞれも系統的な位置が離れており、多様なフェノール資化細菌が優占菌として存在していることが明らかとなった。

### 3. 3 16S rDNA クローンの解析

カラム運転最終日に、フェノール添加系から採取した流出水および付着細菌懸濁液から DNA を抽出、これをテンプレートに 16S rDNA を PCR 合成し、16S rDNA クローンを得た。フェノール添加系の流出水（浮遊細菌）および付着細菌から得られた 16S rDNA クローンの Restriction Pattern (Phylotype) ごとの出現頻度を

Table 1 Isolated strains from MPN tubes

|                    |            | Strain | Gram Stain | Isolated Tube    | New Strain Name |
|--------------------|------------|--------|------------|------------------|-----------------|
| Suspended Bacteria | Phenol MPN | PS1    | -          | 2nd most diluted | Strain 1        |
|                    | M-R2A MPN  | HS4    | -          | Most diluted     | Strain 2        |
| Attached Bacteria  | Phenol MPN | PA4    | -          | 2nd most diluted | Strain 1        |
|                    |            | PA5    | -          | 2nd most diluted | Strain 1        |
|                    |            | PA6    | -          | 2nd most diluted | Strain 3        |
|                    |            | PA7    | +          | Most diluted     | Strain 4        |
|                    | M-R2A MPN  | HA2    | +          | Most diluted     | Strain 4        |
|                    |            | HA3    | -          | Most diluted     | Strain 3        |
|                    |            | HA4    | -          | Most diluted     | Strain 2        |

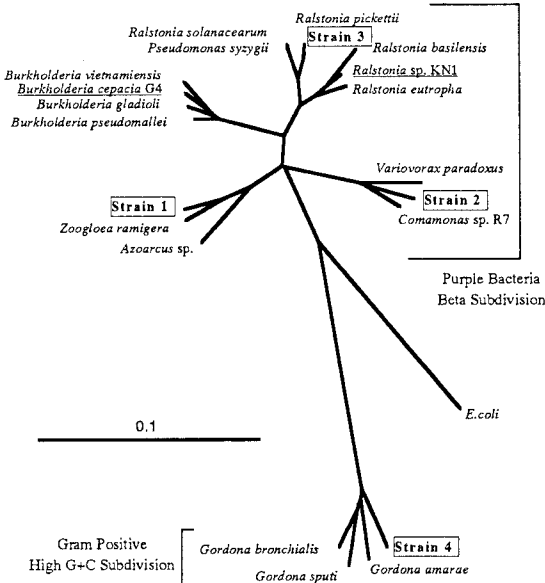


Fig. 4 Phylogenetic analysis of MPN-isolated strains

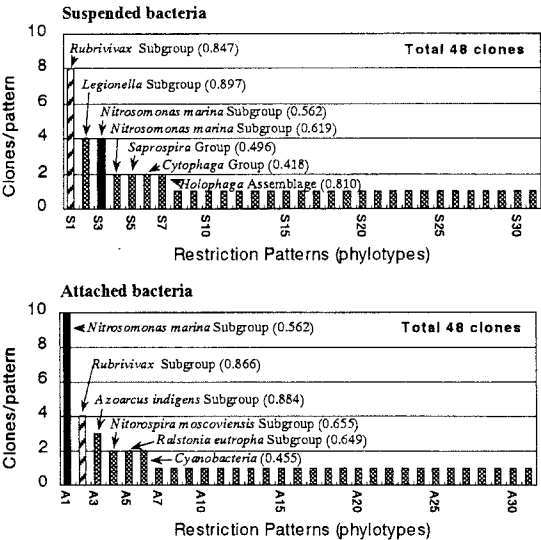


Fig. 5 Frequency distribution of 16S rDNA phylotypes

Fig. 5 に示す。また、クローンが 2 つ以上得られた Phylotype に関しては、16S rDNA の前方の 500 bases の塩基配列を決定し、前項と同様に、RDP を利用し、近縁種を決定、その最近縁 (RDP での Similarity Score の値が最も高いもの) の Group を図中に示した (図中の Group 名に続く数値は RDP の Similarity Score)。出現頻度分布は、浮遊細菌、付着細菌ともに同様の傾向を示し、出現頻度が 2 以上の優占種は浮遊細菌で 7 種類、付着細菌で 6 種類が得られた。また、得られた全ての Restriction Pattern を比較した結果、優占種に属する 2 種類 (S1 と A2, S3 と A1) が全く同一の Phylotype を示すことが分かった。この結果から、優占種は浮遊細菌と付着細菌で共通する種あるいは株が存在していることが示唆された。さらに、出現頻度が 2 以上の S1~S7, A1~A6 の系統解析の結果を Fig. 6 に示す。RDP による近縁種の推定結果より、S1 および A2 はフェノール資化性細菌として報告が多い *Comamonas* 属に近縁であることが分かり、これらはフェノール資化能を有している菌株由来である可能性が示された。S3 および A1 の近縁種は Purple bacteria の Beta Subdivision の *Nitrosomonas marina* Subgroup となったが、Similarity Score が 0.562 と低い。加えて、Purple bacteria の Alpha Subdivision の 7 種類の Subgroup と 0.526~0.546 の Similarity Score を示した。このように、特定の Subgroup に高い Similarity Score を示しておらず、これまでに報告例のない細菌由来であると考えられ、機能も推定できない。また、S4 の近縁種も *Nitrosomonas marina* Subgroup となったが、Fig. 6 に示すように、S3 と S4 は系統樹での位置が全く異なっており、それぞれは近縁関係にはない。これら S3, S4, A1 を含め、他の Phylotype の近縁種には、これまでにフェノール資化性があると報告されている種類の細菌は含まれておらず、フェノール資化能を持たない菌株由来である可能性が大きい。また、共通の優占種以外は、浮遊細菌と付着細菌由来の 16S rDNA はそれぞれ系統的位置が全く異なっており、類似性は見られなかった。

次に得られた全ての Phylotype を前項の MPN 法によって得られた優占菌株と比較した結果、S1 および A2 は Strain 2 と同じ Phylotype を有することが分かり、ClustalX による系統解析でも近縁種であることが示された。それゆえ、S1 および A2 は、Strain 2 あるいはそれと極めて近縁な菌株由来であると推定できる。このように、16S rDNA クローンの優占種と MPN 法で単離された優占種との間に共通性が見られたことから、16S rDNA クローンを取得することによって、優占種を把握することが、ある程度可能であることが示唆された。

16S rDNA クローンを取得する場合、①DNA 抽出、②PCR 増幅、③クローニングの各ステップでバイアスがかかることが予想される。①の DNA 抽出は、これまでの研究によってかなり改善されており、グラム陽性菌を含め大部分の細菌から均一に DNA が抽出されるようになってきている。本研究で適用した方法は、Zhou らの方法を基本にしているが、Zhou らの報告<sup>7)</sup>では土壤中に添加したグラム陰性菌の 92~99% から DNA が回収できている。また、土壤中に元来生息する細菌の溶菌率も、測定した 5 サンプルで、各々 79%, 92%, 80%, 67%, 26% となっており、回収率は概ね高い。しかしながら、②、③の PCR 増幅、クローニングのステップでのバイアスがどの程度かは現在のところ明らかになっていない。本研究では、MPN 法で優占であった 1 菌株 (Strain 2) が 16S rDNA クローンの出現頻度の高い Phylotype と一致した。MPN 法にも培養、単離において、バイアスがかかり、R2A 培

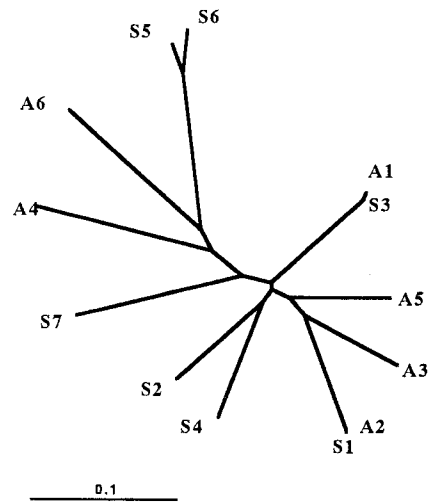


Fig. 6 Phylogenetic analysis of 16S rDNA clones

地で増殖できる細菌しか単離できていないが、両方法で優占種と認められた菌株は、実際に優占種として存在している可能性は高い。将来的には、2つの方法を適用することによって、MPN法で得られた菌株を利用してその機能を調べると共に、その 16S rDNA の配列および 16S rDNA クローンから、プローブをデザインし、Fluorescent in situ hybridization (FISH)により cell レベルで対象菌の優占度、挙動をさらに詳しく調査していく必要がある。

### 3. 4 T-RFLP による微生物群集構造の解析

上述のように、16S rDNA クローンを取得することによって、微生物群の解析を行うことができるが、この解析法では、16S rDNA クローンの取得、解析に多大な時間が必要となる。それゆえ、バイオレメディエーション時に頻繁、迅速に微生物群を解析する手法として適切とは言えない。そこで、微生物群集構造をより簡便に解析する手法として T-RFLP の適用を検討した。

前項で利用した流出水（浮遊細菌）および付着細菌由来の DNA 抽出液をテンプレートに、蛍光色素でラベルしたプライマーペア（Bact0011, Bact1492）を利用し 16S rDNA を PCR 増幅した。こ

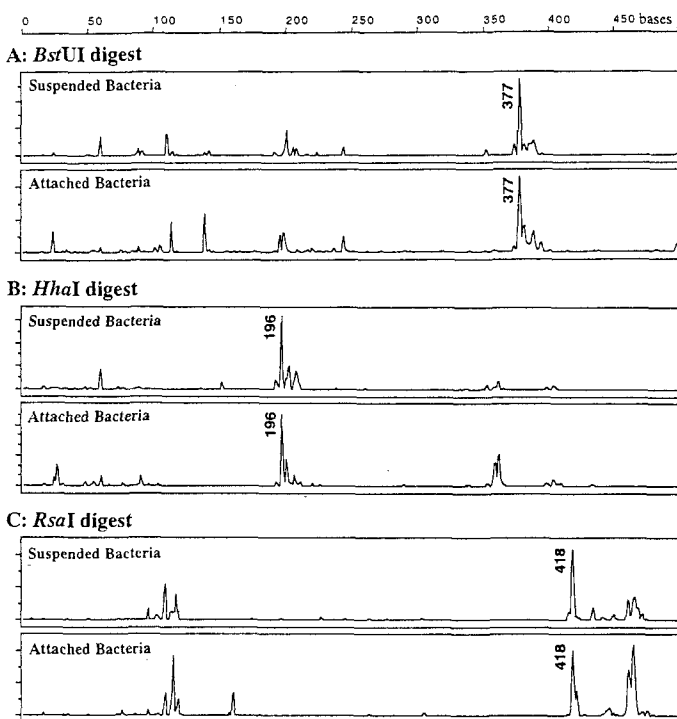


Fig. 7 Electropherograms of 5' T-RFLPs of PCR-amplified 16S rDNAs

Table 2 Theoretical length of 5' fragment produced by restriction digestion

| Name of phylotype  |    | No of Clone | Length of 5' Fragment (bases) |              |              |
|--------------------|----|-------------|-------------------------------|--------------|--------------|
| Suspended Bacteria |    |             | <i>Bst</i> UI                 | <i>Hha</i> I | <i>Rsa</i> I |
| S1                 | 8  |             | 382                           | 202          | 422          |
| S2                 | 4  |             | 110                           | 210          | >500         |
| S3                 | 4  |             | 92                            | >500         | 103          |
| S4                 | 2  |             | 206                           | 210          | >500         |
| S5                 | 2  |             | 390                           | >500         | 109          |
| S6                 | 2  |             | 390                           | >500         | 109          |
| S7                 | 2  |             | 90                            | 356          | 469          |
| Attached Bacteria  |    |             |                               |              |              |
| A1                 | 11 |             | 92                            | >500         | 103          |
| A2                 | 4  |             | 382                           | 202          | 422          |
| A3                 | 3  |             | 201                           | 365          | 115          |
| A4                 | 2  |             | 32                            | 36           | 161          |
| A5                 | 2  |             | 209                           | 213          | 477          |
| A6                 | 2  |             | 105                           | 92           | >500         |

の 16S rDNA を精製後、制限酵素 *Bst*UI、*Hha*I、*Rsa*I でそれぞれ切断し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer により Gene Scan モードで解析した結果を Fig. 7 に示す。*Bst*UI による切断結果 A では、浮遊細菌の場合、377 bases の位置に大きなピークが観察されている。次に、このピークがどの 16S rDNA 由来であるかを推定するため、Fig. 5 において出現頻度が 2 以上であったクローンを *Bst*UI、*Hha*I、*Rsa*I それぞれで切断した場合、どの大きさ (DNA 塩基配列のデータからの理論値) のラベル化断片が得られるかを整理したものを Table 2 に示した。浮遊細菌の *Bst*UI 切断のカラムを見ると、S1 は 382 bases の大きさの断片を生成することが分かる。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer では、理論値から約 5 bases 小さく測定されることがこれまでの実験から分かっており、377 bases の位置に出現したピークは S1 由来と判断できる。もしこの判断が正しいとするなら、*Hha*I、*Rsa*I の切断により S1 由来のピークが、そ

れぞれ 202 bases, 422 bases (Table 2 参照) より約 5 bases 小さな位置に出現するはずである。T-RFLP の結果 (Fig. 7 B,C)によれば、*HhaI*, *RsaI* の切断により 196 bases, 418 bases の位置に大きなピークが検出されており、S1 が存在していることが確認できた。また、付着細菌の T-RFLP の結果でも、同位置にピークが検出されていることが分かるが、これは S1 と同じ Phylotype の A2 由来と判断できる。さらに、これら S1, A2 は Strain 2 の 16S rDNA と同じ Phylotype であることが前項の解析結果から明らかになっており、Strain 2 と同一あるいは近縁種は、MPN 解析、クローン解析、T-RFLP 解析のいずれにおいても優占種として検出されたことになる。また、Strain 2 はフェノール資化性は有するが TCE 分解能はないことから、TCE 分解能持たない菌株が優占となっていたと結論づけることができる。

このように、あらかじめ 16S rDNA クローンの解析結果をデータベースとして所有していれば、T-RFLP で検出されたメジャーなピークに対応する細菌を特定できることが明らかとなった。T-RFLP による解析は、サンプルからの DNA 抽出から、解析結果の取得まで約 2 日で完了し、結果のデータベースとしての蓄積が可能であることから、定期的に微生物群集構造を把握していく手法として有用である。今後は、現場でのバイオレメディエーション時の微生物群集構造の把握に適用していく計画である。

#### 4. まとめ

- (1) フェノール供給による TCE のコメタボリズムにおいて出現する細菌の優占種を MPN 法を利用して決定した。選出された 4 株の優占種の内、TCE 分解能を示したのは、わずかに 1 株のみであり、TCE 分解能を保持しないフェノール資化細菌の方が多く存在することが示唆された。また、MPN 法で単離された TCE 分解能を持たない Strain2 と同一の Phylotype のものが 16S rDNA クローンの解析、T-RFLP 解析のいずれにおいても優占種となっており、TCE 分解能持たない菌株の存在比率が高いことが明らかとなった。
- (2) 流出水 (浮遊細菌) 由来と付着細菌由来の 16S rDNA クローンでは、優占率の高い 2 つタイプが同一の Phylotype (Restriction Pattern)を示し、類似性が見られた。また、T-RFLP 解析においても、浮遊細菌と付着細菌で最も大きなピークが同じ位置で検出されており、類似性が観察された。
- (3) T-RFLP によって全体の微生物群集構造を迅速に解析できる見通しが得られた。また、16S rDNA クローンの解析結果をデータベースとして所有していれば、T-RFLP で検出されたメジャーなピークに対応する細菌を特定できることが明らかとなった

\*本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)により委託を受けた「土壌浄化プロジェクト」の一環として地球環境産業技術研究機構(RITE)により実施したものである。

#### (参考文献)

- 1) Fries, M. R., G. D. Hopkins, P. L. McCarty, L. J. Forney, and J. M. Tiedje. (1997) "Microbial succession during a field evaluation of phenol and toluene as the primary substrates for trichloroethene cometabolism." Appl. Environ. Microbiol., Vol. 63, pp1515-1522.
- 2) Fries, M. R., L. J. Forney, and J. M. Tiedje. (1997) "Phenol- and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which

- successful trichloroethene cometabolism occurred." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, pp1523-1530.
- 3) Dojka, M. A., P. Hugenholtz, S. K. Haack, and N. R. Pace. (1998) "Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 64, pp3869-3877.
  - 4) Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Duodoroff. (1966) "The aerobic pseudomonads: a taxonomic study." *J. Gen. Microbiol.*, Vol. 43, pp159-271.
  - 5) Kepner, R. L., Jr., and J. R. Pratt. (1994) "Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present." *Microbiol. Rev.*, Vol. 58, pp603-615.
  - 6) Lundgren, B. (1981) "Fluorescein diacetate as a stain of metabolically active bacteria in soil." *OIKOS*, Vol. 36, pp17-22.
  - 7) Zhou, Jizhong, M. A. Bruns, and J. M. Tiedje. (1996) "DNA recovery from soil of diverse composition." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, pp316-322.
  - 8) Kane, M. D., L. K. Poulsen, and D. A. Stahl. (1993) "Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences." *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 59, pp682-686.
  - 9) Amann, E., B. Ochs, and K-J Abel. (1988) "Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*." *Gene*, Vol. 69, pp301-315.
  - 10) Moyer, C. L., J. M. Tiedje, Fred C. Dobbs, and D. M. Karl. (1996) "A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, pp2501-2507.
  - 11) Stackebrandt, E. and M. Goodfellow. (1991) "Nucleic acid techniques in bacterial systematics." John Wiley & Sons, p133.
  - 12) de Bruijn, F., J. (1992) "Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 58, pp2180-2187.
  - 13) Nelson, M. J. K., S.O. Montgomery, E. J. O'Neill, and P. H. Pritchard. (1986) "Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate." *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 52, pp383-384.
  - 14) 中村寛治, 宮地有正 (1992) "Phenol Hydroxylase 遺伝子を導入した組換え微生物によるトリクロロエチレンの分解." *環境工学研究論文集*, Vol. 29, pp17-27.