

(18) バイオスティミュレーションのプロセス管理を目的とした 16S rRNA 遺伝子
による微生物群集構造の解析

Analysis of bacterial populations based on 16S rRNA genes for monitoring and
controlling of a biostimulation process

中村 寛治*・石田 浩昭*・飯泉 太郎*・鈴木 義彦*

Kanji NAKAMURA, Hiroaki ISHIDA, Taro IIZUMI, Yoshihiko SUZUKI

ABSTRACT: A field scale biostimulation experiment was carried out at a contaminated site in Chiba prefecture to degrade trichloroethylene (TCE) in groundwater. Methane was dissolved into pumped-up groundwater, and it was injected again into groundwater to stimulate the co-metabolism of TCE by indigenous methane-utilizing bacteria producing methane monooxygenase. Molecular analyses of bacterial populations in groundwater including methane utilizer were performed to understand the biological process in detail and monitor bacteria developed from the view point of safety. The 16S rRNA gene (rDNA) based analyses, clone and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analyses, were applied. The clone analysis showed that two types of methane-utilizing bacteria that are phylogenetically close to each of *Methylophilus* group and *Methylomonas methanica* subgroup oxidized methane, and thus at least one of them degraded TCE during the biostimulation. Additionally no 16S rDNA clone from a bacterium which possibly causes a disease was not observed. The changes of whole bacterial communities including the methane-utilizing bacteria were successfully detected by T-RFLP analysis showing the effectiveness of the molecular method for the monitoring of the field scale biostimulation process.

KEYWORDS: biostimulation, trichloroethylene, bacterial population, 16S rDNA

1. はじめに

微生物の物質分解あるいは変換機能を利用する生物処理では、反応槽内は様々な微生物が存在する混合微生物系であるが、微生物の種類は極めて多く、それら個々の機能に関しては理解があまり進んでいないが現状である。これは、培養・単離などを主体とする従来型の微生物解析では、非常に手間と時間が掛かる上、単離できなく限られた種類の微生物しか把握することができなかったことが主要因と考えられる。しかしながら、近年の分子生物学の急速な進歩によって、状況は大きく変わってきている。単離できない微生物の挙動さえも、rRNA を標的にした Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) ¹⁾ などの検出法により把握できるようになってきた。さらに、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ²⁾ や Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) ³⁾ などの技術の発達により、微生物群集全体を把握することも可能となり、生物処理プロセスに係わる微生物群集を解析、理解し、プロセス管理に役立てていくことも不可能ではない状況になってきている。

このような状況の中、生物処理の新たな展開先として、土壌浄化分野でのバイオレメディエーションが注目されている。バイオレメディエーションはアメリカでの実用化が進んでおり、石油系物質の処理に関しては、その成功例も数多く報告されている。一方、日本ではバイオレメディエーションの普及はアメリカに比べて遅れているが、

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

その理由の一つとして、未知の微生物を開放系で増殖させることに伴う、微生物への不安が上げられる。それゆえ、分子生物学的な手法を利用し、出現する微生物を明らかにすることは、開放系で利用されるバイオレメディエーション技術の今後の展開には欠かせない要素である。

以上のように、生物処理分野における混合微生物系の最適化（技術的な観点）、および開放系で利用される微生物に関する安全性の確保（安全性の観点）の両観点から、出現する微生物を明らかにし、それらの機能を理解していくことは、非常に大きな意味を有する。

我々は、バイオレメディエーションの一手法であるバイオスティミュレーション（土着細菌の活性化）の実証試験として、トリクロロエチレン（TCE）で汚染されている汚染現場で、メタン注入による TCE のコメタボリズム分解を行った。本手法では、メタン注入により土着のメタン酸化性細菌が増殖すると共に、メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)が誘導され、この MMO によって TCE が分解される⁴⁾。誘導される MMO には soluble の MMO (sMMO) と particulate の MMO (pMMO) がある⁵⁾が、主として sMMO によって TCE 分解が起きる⁴⁾。これまで、McCarty らのグループによって本バイオスティミュレーションは行われているが⁶⁾、その際に出現するメタン酸化性細菌および共存細菌に関してはほとんど解析はされていない。ここでは、メタン注入の際に出現する細菌の 16S rRNA 遺伝子 (rDNA) を基にしたクローン解析および微生物群集構造の T-RFLP による解析結果を軸に、分子生物学的な分析技術のプロセス管理手法としての利用の可能性を検討する。

2. 実験方法および材料

2. 1 実証試験サイト

千葉県内の TCE 汚染サイトに設置されたメタン注入井 IW、揚水井 RW およびその間のモニタリング井 M1、M5 を Fig.1 に示す。このサイトの地下の帯水層は地表から約 1.0 m の深さに水面があり、帯水層の厚みは約 4.5m

であった。帯水層を構成する地層は、粒径が比較的均一な透水性の良い細粒砂層で透水係数は $4 \sim 6 \times 10^{-8}$ cm/s、また、下位の泥質砂岩層は難透水層であり透水係数は 10^{-6} cm/s 程度であった。サイト周辺の自然地下水流は注入井から揚水井とは逆方向で 4 cm/d であった。地下水中の TCE 濃度は約 200 μ g/L であった。また、酸素の供給には純酸素を利用した。

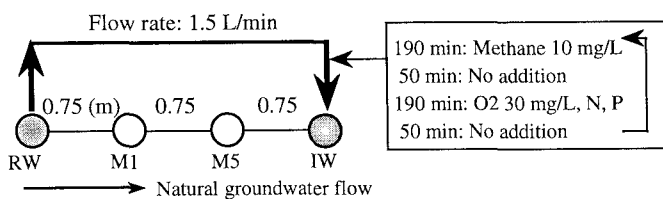


Fig.1 Location of wells and operation conditions

2. 2 バイオスティミュレーションの運転方法およびサンプリング

メタン注入によるバイオスティミュレーションは 1998 年 9 月 24 日から 12 月 21 日まで Fig.1 に示す間欠的な運転方法でメタン (10 mg/L) および酸素 (30 mg/L)・栄養塩 (KNO_3 : 30 mg/L, KH_2PO_4 : 15 mg/L) 供給を行った。メタン注入前後の期間は水循環のみとした。注入および揚水量は 1.5 L/min で一定とし、IW から RW までの滞留時間は約 3 日であった。地下水のサンプリングは IW, M5, M1 で行い、メタン注入約 1.5 ヶ月前の 1998 年 7 月 13 日より開始し、メタン注入終了 41 日後の 1999 年 2 月 1 日まで継続した。IW では注入前の循環地下水をサンプリングした。M5, M1 での地下水サンプリングの際は管頭から 2.3 m の位置から 3.3 m まで採水器（吉野計器製 SY-1K-B 容積 400 mL）を降ろしてサンプリングした。また、付着細菌の解析のため、1 mm 径のガラスビーズをナイロン製のメッシュ袋に入れ、メタン注入開始時に M5 および M1 の管頭から 4 m の位置に吊した。サンプリングした地下水、ガラスビーズは水温で保管し、1 日以内に分析に使用した。地下水温は実験開始当初 20°C であったが、徐々に低下し、実験終了時には 16°C まで低下した。pH は 6~7 の範囲で変動した。

2. 3 地下水中の細菌数の測定

地下水中の全菌数は Ethidium Bromide (EtBr) 染色で、生菌数を 5,6-carboxy-fluorescein diacetate (CFDA) 染色(エステラーゼ活性染色)で、それぞれ別々に計測した。地下水サンプルに 1/3 量の 3X FDA 緩衝液(15% NaCl, 1.5 mM EDTA in 0.3 M リン酸緩衝液, pH 8.5)、および EtBr あるいは CFDA をそれぞれ終濃度 100 mg/L, 150

mg/L なるように添加し、室温で 15 分間染色した。その後 0.2 μ m のフィルター（ミリポア製 GTBP2500）でろ過、細菌をフィルター上に捕捉した上で、B 励起で蛍光顕微鏡(オリンパス製、VANOX-AH2-FL)下で計測した。メタン酸化性細菌数を測定するため、NMS 培地⁷⁾を用いた MPN(3・3・3)法によるメタン酸化性細菌数の測定を行った。地下水サンプル 1 mL を滅菌水で 10 倍の倍率で順次希釈し、各希釈液の 1 mL を 3 本の NMS 培地(4 mL)が入った試験管に接種して真空デシケーターに入れ、高純度メタンガスを気相 30% になるように添加した後、30°C で 1 ヶ月培養した。判定は、試験管の濁度測定で行い、濁りが認められた試験管を陽性として菌数を算出した。

2. 4 DNA の抽出

地下水サンプルからの DNA の抽出の手順は既報の論文⁸⁾に従った。地下水中に生息する細菌から DNA を抽出するため、地下水 100 mL を孔径 0.2 μ m のフィルターでろ過して細菌を収獲した。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、凍結融解、SDS 処理、Bead Beater 処理を行った。抽出 DNA は最終的に 50 μ L の TE に溶解した。ガラスビーズに付着した細菌から DNA を抽出する場合は、ろ過滅菌水に適量のガラスビーズを入れ、超音波で付着細菌を剥離、これを上述のようにフィルターで捕捉し、DNA を抽出した。

2. 5 PCR による 16S rDNA の増幅

前述のように抽出した DNA 溶液 1 μ 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 μ L とし、2.5 U の Ex Taq DNA polymerase(宝酒造製)、200 μ M の dNTP、5'末端をリン酸化したプライマー-Bact0011 および Bact1492⁹⁾ (Table 1) 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 クローンを有する形質転換体の取得

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 pKNA80⁸⁾ のマルチクローニングサイト (MCS) 中の *Sma*I 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 L broth 寒天培地 (Ampicillin 100 μ g/mL を含む) に塗布、37°C で一晩培養した後、形質転換体を得た。

2. 7 16S rDNA クローンの Phylotype による分類

16S rDNA クローンを含む大腸菌は少量を TE に懸濁、95°C で 2 分間熱処理し、1 μ L をテンプレートに PCR 反応を行った。プライマーペアは、MCS の上流および下流の塩基配列からデザインした KNA80f および KNA80r⁸⁾ を利用した。PCR 組成、反応条件は、基本的には 2. 5 の 16S rDNA の増幅の場合と同じであるが、第 2 段階のアニーリング温度を 60°C とした。PCR により合成された DNA 断片は約 1.5 kb であることをアガロース電気泳動により確認した。16S rDNA クローンは 1 サンプルにつき 48 取得した。次に PCR 反応液を 1/100 に希釈、この 1 μ L をテンプレートに、Bact0003 (Table 1) および Bact1492 のプライマーペアを利用し、再び PCR 反応を行った。PCR 反応の組成、条件は 2. 5 の通りである。PCR 反応終了後、その 1 μ L を 3 種類の制限酵素 (*Bst*AI, *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

Table 1 Summary of primers

Used for:	Primer	Sequence (5' to 3')	References
PCR	Bact0011	GTTTGATCCTGGCTCAG	9)
	Bact1492	ACGGYTACCTTGTTAGGACTT	9)
	KNA80f	TTCACCGTCATCACCGAAACG	8)
	KNA80r	CATCCGCCAAACAGCCAAGC	8)
	Bact0003	ATTGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	This study
Sequencing	Bact0003ST	ATTGAAGAGTTTGATCC	This study

Y : C, T

のを同一の Phylotype として分類を行った。

2. 8 16S rDNA の塩基配列決定および系統解析

出現した優占種を解析するため、前項の 16S rDNA クローンで、出現頻度が 2 以上の Phylotype に関しては、プライマーとして Bact0003ST (Table 1) を利用して、代表クローンの前方 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。得られた塩基配列データはインターネット上で Ribosomal Database Project (RDP) に送付、近縁種を決定した後、ClustalX による系統解析を行った。

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

2. 4 で抽出した DNA をテンプレートに、2. 5 で示した 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 (0~550 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。また、内部標準には GeneScan500 ROX (ROX: 6-carboxy-X-rodamine, Perkin-Elmer 製) を利用した。

3. 結果

3. 1 TCE の分解および細菌数の変化

地下水中の TCE 濃度の経時変化 (1998 年 8 月 20 日~1999 年 1 月 18 日) を Fig.2 に示す。TCE 分解はメタン注入開始後約 2 週間で、明確になり IW から M5 の間で約 30 $\mu\text{g/L}$ の TCE が分解された。TCE の分解はメタン注入時のみ起きており、地下水中でメタン酸化性細菌による TCE の分解が行われたと考えられる。また、モニタリング井戸、M5, M1 での地下水中の全菌数 (EtBr 染色)、生菌数 (CFDA 染色) およびメタン酸化性細菌数の経時変化を Fig.3 (1998 年 7 月 13 日~1999 年 2 月 1 日) に示す。M5, M1 での全菌数および生菌数はメタン注入後もほとんど増加傾向を示さず、測定期間中を通してほぼ一定、同レベルであった。全菌数は約 5×10^6 cells/mL、生菌数は約 10^6 cells/mL であった。一方、MPN 法により測定したメタン酸化性細菌数は、M5, M1 どちらの井戸においても約 2 週間で著しく増加し、メタン注入中は M5 で約 10^4 MPN/mL、M1 で約 5×10^3 MPN/mL となった。メタン注入停止後は両井戸においてメタン酸化性細菌数は緩やかな減少傾向を示した。ここで、メタン注入井に近い M5 ですらメタン

酸化性細菌数は生菌数より低い。メタン酸化性細菌数を測定した MPN 法では、高濃度のメタン存在下で培養、判定を濁度で行ったが、本方法では全てのメタン酸化性細菌を検出することができなかったものと推測される。今後は MPN 法の培養条件の最適化を行っていく必要がある。

3. 2 16S rDNA クローンの解析

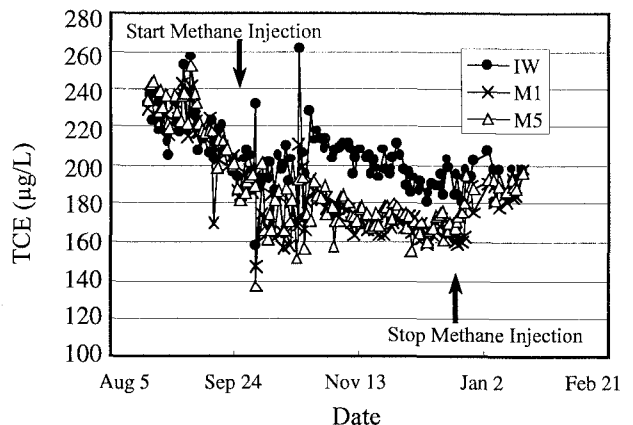


Fig.2 Time course of TCE degradation

16S rDNA クローン取得のため、モニタリング井戸 M5, M1 において、Fig.4 の上向き矢印で示した日(9/24はメタン注入開始前)にサンプリングした地下水を使用した。また、ガラスビーズに付着した細菌の解析は、12月1日に1回行った。各々のサンプルに関して 48 のクローンを取得、それを制限酵素切断パターンにより Phylotype に分類した。出現

した細菌の優占種に焦点を絞って解析するため、クローンの出現頻度が 2 以上の Phylotype に関して、代表クローンの前方 500 bases の塩基配列を決定した。塩基配列を決定したクローンは合計 62 個であった。これらの塩基配列データから RDP により近縁種を決定し、ClustalX により系統解析を行った結果、Fig.5 に示す系統樹が得られた。図中の代表クローン名は、各サンプルにおけるクローン No-サンプリング日(月・日・年)-サンプリング井戸の順に表記してある。付着細菌の場合は att を付記した。RDP のデータベースを利用した解析では、RDP での Similarity Score である S_{ab} 値が 0.6 未満のクローンについては Not Classified とし、0.6 以上の場合は最近縁種を表示した。

右端に、Bacteria の Division を示す。ほとんどの 16S rDNA クローンは *Proteobacteria* に属し、その割合は全体の 66% となった。2 番目に優占度が高かったのは、*Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* で 13% の割合となった。その他 5 種類の Division の細菌が検出されたが、特に優占度が高いものはなかった。また、その出現井戸や期間によってグループ化できるものに関しては、図中に①～⑥の記号を付記した。これらの細菌の特徴をまとめたものを Table 2 に示す。微生物解析の期間中、メタン資化性細菌の近縁種は、*Methylophilus* Group, *Methylomonas methanica* Subgroup, *Methylosinus trichosporium* Subgroup の 3 種類が検出された。*Methylophilus* Group は 2 種類が検出され、②A はメタン注入時、②B はメタン注入前後に検出された。Table 2 の結果から分かるように、②A の *Methylophilus* Group および③の *Methylomonas methanica* Subgroup がメタン注入時に検出され、これらの細菌がメタン分解に係わったと推測される。一方、②B の *Methylophilus* Group は現場に元来存在するメタン資化性細菌と判断できる。⑤の *Methylosinus trichosporium* Subgroup はメタン注入前後に検出されており、後で示す T-RFLP の結果から判断すると、メタンが無い状態で地下水中での優占度が極めて高くなっている。メタン資化性細菌はメタン、メタノール等の C1 化合物しか利用できないことから、⑤は *Methylosinus trichosporium* Subgroup に近縁であるもののメタン資化性細菌でない可能性が高い。その他、M1 で検出された①の *Acidovorax* Group や M5 で検出された④の Not classified α は高い頻度で検出されている。

さらに、次項の T-RFLP 解析で検出されるピークがどの Phylotype (=代表クローン) 由来かを推定するため、PCR で増幅した 16S rDNA 断片を 3 種類の制限酵素 (*Bsa*II, *Hha*I, *Rsa*I) で切断した場合の 5'側断片の長さを、決定されている塩基配列データを基に算出し、その値(理論値)を Table 3 に示した。また、これらの中で、幾つかのクローンについては実測値を求め、理論値の右の括弧内に付記した。塩基配列を決定した 500bases 内に制限サイトを持たないものは、プライマー Bact011 の長さ 17 bases を足して、>517 と表記した。実測値と理論値を比較すると、1～7 bases の差が見られた。これは、Bact0011 を標識した蛍光色素 6-FAM と、内部標準として利用している GeneScan500 ROX の蛍光色素 ROX の電気泳動における移動度の差によるものである。

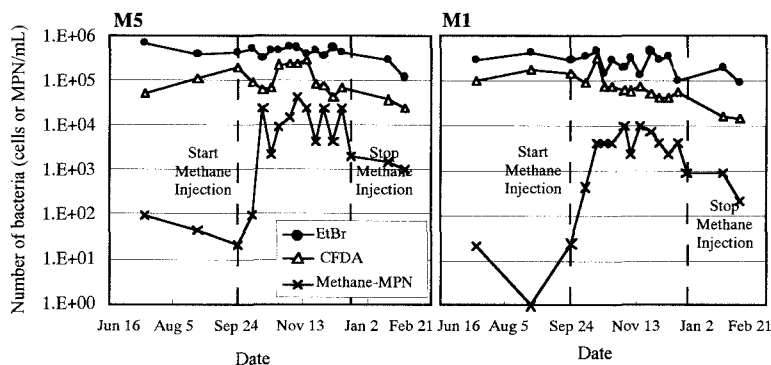


Fig.3 Change of number of bacteria in groundwater at M5 and M1

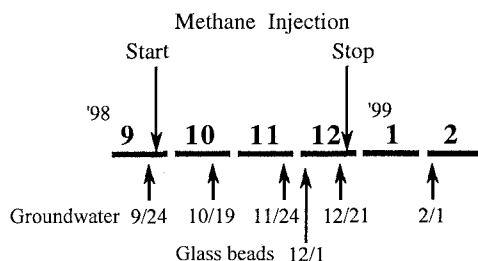
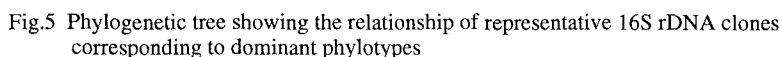


Fig.4 Samples used for 16S rDNA clone analysis



	Well observed	Time observed	Place observed	Possible characteristics
① <i>Acidovorax</i> Group	Mainly M1	Before and during methane injection	Groundwater and glass bead surface	Bacteria originally existed around M1
②A <i>Methylophilus</i> Group	M5	During methane injection	Groundwater and glass bead surface	Methane-utilizing bacteria increased after methane injection
②B <i>Methylophilus</i> Group	M5 and M1	Before and after methane injection	Groundwater	Methane-utilizing bacteria originally existed around M1 and M5
③ <i>Methylomonas methanica</i> Subgroup	M5	During methane injection	Groundwater and glass bead surface	Methane-utilizing bacteria increased after methane injection
④ Not classified α	M5 and M1	Before, during and after methane injection	Groundwater	Bacteria originally existed around M1 and M5
⑤ <i>Methylosinus trichosporium</i> Subgroup	M5 and M1	Before and after methane injection	Groundwater	Bacteria originally existed around M1 and M5
⑥ High G+C bacteria	M1	During methane injection	Glass bead surface	Bacteria increased on the surface of glass beads at M1 during methane injection

- 180 -

Table 3 Expected (and observed) lengths of 5' terminal restriction fragments of representative 16S rDNA clones corresponding to dominant phylotypes

		No of Clone	Bst UI	Hha I	Rae I bases
<i>Rhodococcus fermentans</i>	SG	No7-092498-M1	10	202	204 426
		No1-101998-M1	14	202	204 426
		No13-092498-M1	4	202 (200)	204 (201) 426 (422)
		No19-120198-M1att	3	202	204 426
Str. SBR2098	SG	No4-101998-M1	4	202 (200)	204 (202) 426 (423)
<i>Hydrogenophaga flava</i>	SG	No17-092498-M1	4	200	202 424
		No1-092498-M1	2	200	202 424
<i>Acidovorax avenae</i>	SG	No23-120198-M1att	2	384	202 424
<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	SG	No24-092498-M5	3	64	202 468
		No15-120198-M1att	2	64	>517 467
		No6-112498-M1	2	202	204 470
<i>Methylophilus</i>	G	No2-112498-M5	3	388 (385)	366 (365) 472 (467)
		No5-122198-M5	2	388 (385)	366 (365) 472 (467)
		No4-120198-M5att	3	388	366 472
		No10-020199-M1	2	388	366 472
		No4-092498-M5	3	388	366 472
<i>Tetlockia micdadei</i>	SG	No2-092498-M5	4	167	210 >517
		No8-092498-M5	2	167	210 >517
		No6-122198-M1	2	167	210 >517
<i>Methylomonas methanica</i>	SG	No5-112498-M5	8	384 (381)	76 (71) >517 (>517)
		No39-122198-M5	3	384 (381)	76 (71) >517 (>517)
		No1-120198-M5att	9	384	76 >517
Not classified α		No8-101998-M5	10	94	>517 105
		No13-101998-M1	5	94	>517 105
		No5-020199-M5	8	94	>517 105
		No3-120198-M1att	9	94	>517 105
		No7-120198-M5att	6	94	>517 105
		No3-020199-M1	6	94	>517 105
		No4-122198-M5	9	94	>517 105
		No1-092498-M5	6	94	>517 105
		No31-112498-M1	4	94	>517 105
		No21-020199-M1	2	94	>517 105
<i>Rickettsia</i>	SG	No7-101998-M5	3	211	>517 132
<i>Methylosinus trichosporium</i>	SG	No3-092498-M5	12	94 (90)	510 (503) 105 (101)
		No5-020199-M1	9	94	510 105
		No4-092498-M1	5	94 (90)	510 (503) 105 (101)
	NC	No10-120198-M5att	2	96	340 423
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	SG	No2-101998-M5	2	92	58 103
<i>Sphingomonas subarctica</i>	SG	No7-101998-M1	4	94	79 419
<i>Erythrobacter longus</i>	SG	No9-092498-M1	2	94	79 419
<i>Sphingomonas macroglabridus</i>	SG	No16-101998-M1	4	94	79 115
<i>Psychroflexus torquis</i>	SG	No8-112498-M5	4	104	89 305
<i>Flavobacterium flevense</i>	SG	No16-122198-M1	2	104	89 305
<i>Levinella nigricans</i>	SG	No36-112498-M5	2	100	85 103
		No19-122198-M5	3	100	85 103
	NC	No29-101998-M5	2	395	213 115
NC (shown as a peak in T-RFLP)					
		No4-112498-M5	2	389 (385)	>517 (>517) 467 (463)
	NC	No2-122198-M5	2	389 (385)	93 (89) 467 (462)
<i>Cytophaga aurantiaca</i>	G	No10-101998-M5	2	389	91 307
	NC	No5-112498-M1	2	110	>517 121
<i>Skeletonema</i>	SG	No24-120198-M1att	2	362	>517 55
		No33-092498-M1	2	362	>517 55
	NC	No13-112498-M1	2	94	>517 423
	NC	No39-092498-M5	2	360	>517 101
	NC	No25-122198-M1	2	>517	>517 99
Environmental clone OPB92					
	G	No24-112498-M1	2	377	58 464
		No4-020199-M1	2	377	58 464
<i>Verrucomicrobium sp. str. VeGlc2</i>	SG	No21-122198-M1	2	242	226 >517
<i>Nitrospira moscoviciensis</i>	SG	No38-112498-M1	2	34	34 183
<i>Rhodococcus opacus</i>	SG	No9-120198-M1att	4	218	437 75
<i>Rhodococcus fascians</i>	SG	No4-120198-M1att	2	218	>517 75
<i>Nocardioideus albus</i>	SG	No8-120198-M1att	2	220	439 77

NC: Not Classified
G: Group
SG: Subgroup

類が全く同じ長さの 5 断片を生成することが明らかとなった。次に、2 つ以上の Subgroup あるいは Group が全く同じ長さの 5 断片を生成する場合は、表の右端をグレーの棒で結んだところ、3 組がこれに該当した。以上の結果から、1 つあるいは 2 つの Subgroup, Group は T-RFLP において全く同じ位置で検出でき、追跡が可能であることが明らかとなった。しかしながら、Not classified α と *Methylosinus trichosporium* Subgroup は *Bsa*JI, *Rsa*I では全く同じ位置で検出され、*Hha*I では *Methylosinus trichosporium* Subgroup のみが検出されるため、Not classified α がわずかに含まれていても検出することが出来ない。それゆえ、このような場合にはさらに制限酵素を増やして T-RFLP 解析を行う必要がある。

3. 3 T-RFLP による微生物群集構造の解析

微生物群集構造解析のために行った T-RFLP の結果を、M5 については Fig.6 に、M1 については Fig.7 に示す。T-RFLP 解析では、1 つのサンプルに関して 3 種類の制限酵素 (*Bsa*JI, *Hha*I, *Rsa*I) で切断し、Table 3 の予想出現位置との照合を行い、出現ピークがどの細菌由来であるか特定を行った。解析は、メタン注入開始前日 (図中左端の B1) から、メタン注入停止後 41 日目 (A41) まで行った。縦軸は蛍光強度によって測定されるピークの大きさを示すが、サンプル毎の DNA 量をそろえていないため、同一データ内でのピークの相対的な比較に利用した。横軸は DNA 断片の大きさを bases で表示してある。

M5 (Fig.6) では、開始前日からメタン注入 18 日目で、出現している A のピークは、その出現位置から *Methylosinus trichosporium* Subgroup と同定された。同様に、ピーク B は *Methylomonas methanica* Subgroup、ピーク C は *Methylophilus* Group、ピーク D は Not classified (No.4-112498-M5) として同定された。ピーク A はメタン注入前に地下水中に存在した優占種と推測される。ピーク B および C はメタン注入後出現し (Fig.6 *Hha*I digest 参照)、メタン注入停止後は検出されていないことから、注入メタンを分解したメタン資化性細菌と推察される。ピーク D はメタン資化性細菌と同じ時期に検出され始めているが、メタン注入停止後も継続して検出されていることから、メタン資化能がないと推測される。他にも数多くのピークが検出されているが、Table 3 のクローンと一致するものは見出せなかった。しかしながら、各ピークを同定できなくても、同一データ内でのピークの相対的高さは連続的に増加あるいは減少しており、出現微生物が徐々に変化している様子を明確に捉えることが出来ている。

M1 (Fig.7) では、メタン注入前に、M5 でも見られた A の *Methylosinus trichosporium* Subgroup が検出され、M5 と同様に 18 日目まで出現している。24 日目からはピーク E の *Rhodoferrax fermentans* Subgroup or Str. SBR2098 Subgroup が検出されており、これは 66 日目まで継続して検出されている。しかしながら、メタン注入中、M5 で観察されたメタン資化性細菌のピークは M1 では全く観察されなかった。また、M1 では、メタン注入停止後、メタン注入前に検出された A の *Methylosinus trichosporium* Subgroup が再び検出された。

3. 4 メタンの連続注入における出現メタン資化性細菌の解析

メタン注入を間欠で行った場合は、前述のように約 15% の TCE が分解された。しかしながら、その後、同じサイト内で約 3 m 離れた別の井戸でメタン供給を連続的に行った実験を行ったところ、TCE 分解率は約 6% まで低下した。連続注入の場合、注入井でメタン資化性細菌を含む生物膜が形成され、その部分でほとんどのメタンが消費された。そこで、生物膜を採取し、T-RFLP 解析を行ったところ、*Methylophilus* Group 由来のピークのみが観察され、*Methylomonas methanica* Subgroup 由来のピークは全く検出されなかった。それゆえ、メタンを供給した場合は *Methylophilus* Group のみが優先的に生物膜内で増殖し、その結果 TCE 分解率が低下してしまうことが考えられた。

この仮説を証明するため、Fig.1 に示す井戸を再度使って、同じ運転条件で 63 日間メタンを間欠的に注入した後、メタンと酸素・栄養塩を同時に連続注入する方式に変更し (1 日当たりのメタン・栄養塩供給量は同じ)、運転を 34 日間継続した。管頭から 3~4 m の部分に形成された生物膜サンプルを定期的に取得し、T-RFLP 解析を行った。また、出現ピークがどの細菌由来であるかを決定する目的で補足的に 16S rDNA クローンの取得・解析も行った。

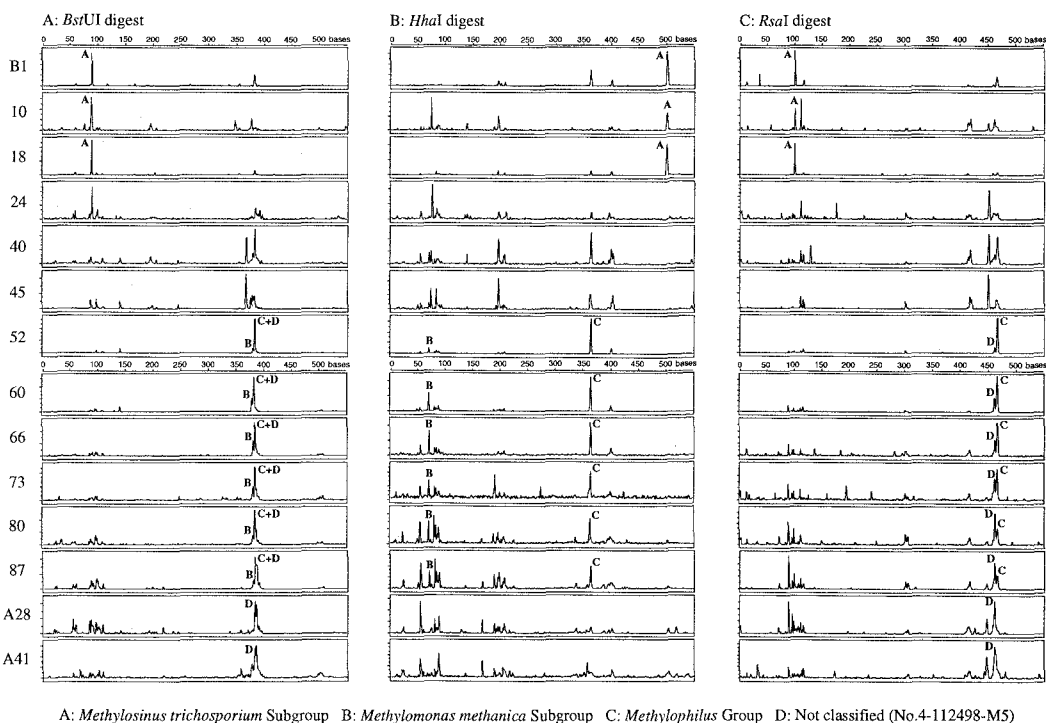


Fig.6 Electropherograms of 5' T-RFLPs of *Bst*UI, *Hha*I, and *Rsa*I digested 16S rDNA amplified from M5 groundwater

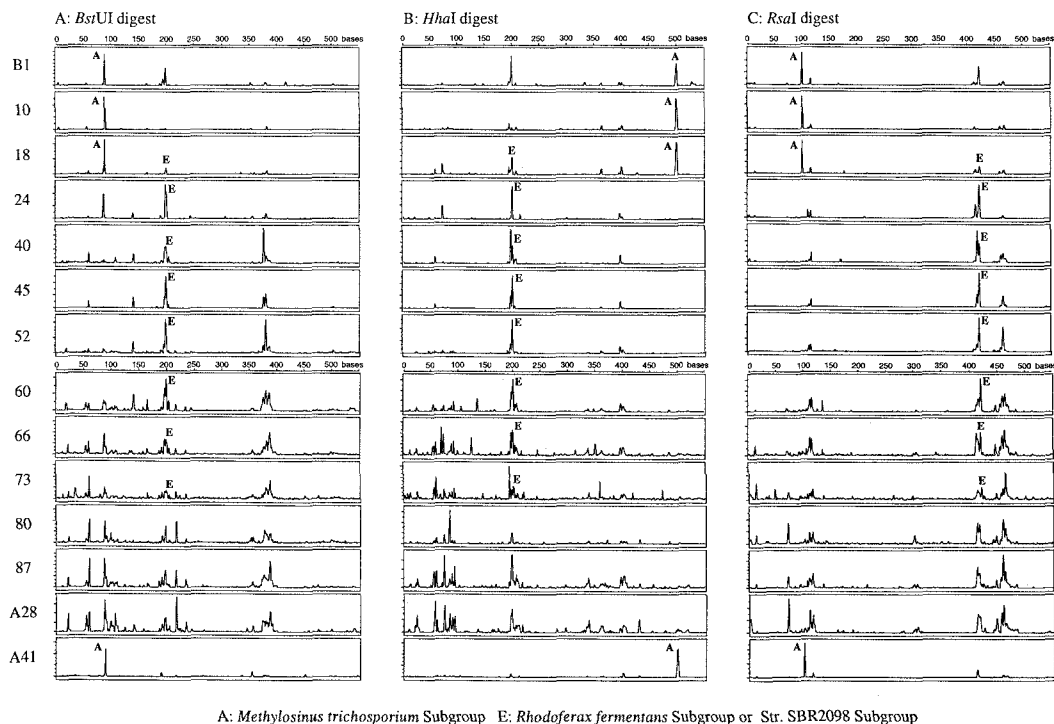


Fig.7 Electropherograms of 5' T-RFLPs of *Bst*UI, *Hha*I, and *Rsa*I digested 16S rDNA amplified from M1 groundwater

T-RFLP の解析結果を Fig.8 に示す。初期の2回のサンプリング（運転開始後 17 日間）では、200 bases 付近（Fig.8 *Bst*UI digest）に大きなピーク F が見られる。これは、7 日目のサンプルからの 16S rDNA クローンの取得、その後の解析結果と照合すると、*Leptothrix discophora* Subgroup 由来のピークであることが分かった。また、35 日目以降に 220 bases 付近（Fig.8 *Bst*UI digest）に新たに、大きなピーク G が形成されているが、これも、35 日目のサンプルの 16S rDNA クローン解析結果と照合すると、*Rhodococcus opacus* Subgroup であることがわかった。*Rhodococcus opacus* Subgroup は、Fig.5 のバイオスティミュレーションの結果でも、M5 で付着菌として検出されており、各制限酵素で生成される 5 断片も全く同じ長さである。これらの結果から、メタン、栄養塩の交互パルス供給を行った場合、優占種として初期に出現するのが、*Leptothrix discophora* Subgroup、その後、*Rhodococcus opacus* Subgroup へと変遷していくことが明らかとなった。これら 2 種類の微生物は、どちらもメタン資化能は報告されていない。それゆえ、栄養塩が供給される際に共存する地下水中の有機物によって増殖した微生物であると予想できる。

63 日目のサンプリングの後、メタン注入は、連続に切り替えられたが、生物膜の微生物構成はピーク G の *Rhodococcus opacus* Subgroup が主体であった。しかしながら、380 bases 付近（Fig.8 *Bst*UI digest）に新たにピークが出現してきている。3 種類の制限酵素でのピーク位置から、これは *Methylophilus* Group のものであると断定し、16S rDNA クローン解析からもこれを確認した。

以上のように、仮説通りメタン連続供給によって形成される生物膜は、*Methylophilus* Group のメタン資化性細菌が主体となり *Methylomonas methanica* Subgroup の増殖は抑えられることが明らかとなった。また、本実験では TCE 濃度の測定も行われ、TCE 分解率の変動の追跡を試みたが、試験期間中の地下水 TCE 濃度の変動が著しく、Fig.2 に示した結果のように TCE 分解率を求めることはできなかった。

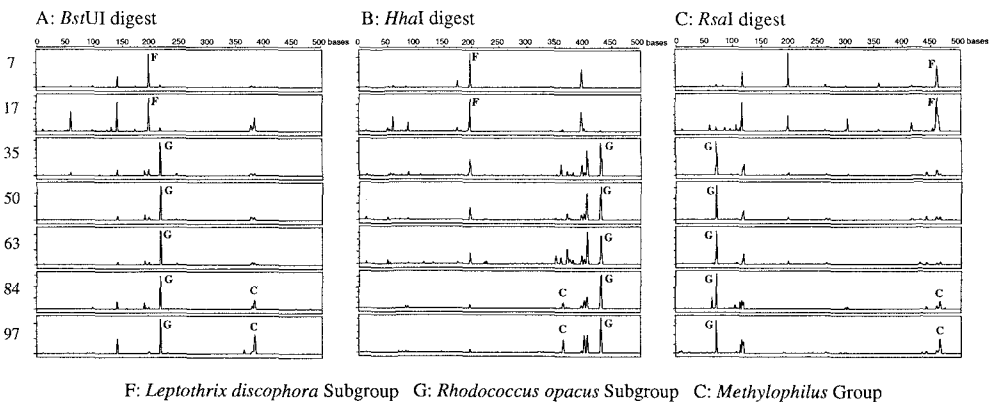


Fig.8 Electropherograms of 5' T-RFLPs of *Bst*UI, *Hha*I, and *Rsa*I digested 16S rDNA amplified from IW biofilm

4. 考察

TCE 汚染現場の地下水にメタンを直接供給することによって地下水中の TCE 約 200 $\mu\text{g/L}$ を 170 $\mu\text{g/L}$ まで分解できることが明らかとなった。また、メタン注入によって地下水中のメタン資化性細菌数が増加した時期と TCE 分解が顕著になった時期が同じであることから、従来からの知見通りメタン資化性細菌が TCE 分解に寄与していたと考えられる。現場では TCE が約 170 $\mu\text{g/L}$ まで分解されたが、環境基準は 30 $\mu\text{g/L}$ であり、TCE を環境基準まで低下させるには、さらに多くの地点からメタンを供給することが必要となる。

本研究では、地下水中出现する細菌を明らかにするため、16S rDNA を基にした解析として、16S rDNA クローン解析および T-RFLP 解析を行った。16S rDNA クローン解析では出現微生物を明らかにすると共に、得られた塩基配列の結果から、Table 3 に示す様に、T-RFLP 解析における各クローンの出現位置の特定を試みた。この際使用した 3 種類の制限酵素 (*Bst*UI, *Hha*I, *Rsa*I) は、Moyer らの研究で RDP データベース上の 16S rRNA を RFLP で区別する場合に有効な酵素として上げられている¹⁰。本実験で行った T-RFLP 解析（約 500 bases ま

での範囲)においては2 baseの長さの違いを識別することが可能であり、上記3種類の酵素によって生成される5'末端の長さが、系統的に同じグループ(Table 3のSubgroupあるいはGroup)である場合は同じ長さに、異なるグループでは2 base以上の差を有することが、T-RFLPを利用できるか否かの判断基準となる。Table 3に示された5'末端の長さを比較すると、同じグループでは同じ長さの5'断片が生成され、異なるグループでは2 base以上の長さの差が、いずれかの酵素で出ることが分かる(非常に近い場合は2つのグループで同じ長さの断片が生成される)。本研究では、このSubgroupあるいはGroupレベルの区別により、出現したメタン酸化性細菌の挙動を推定することが可能であった。さらに解像度を上げるためには、制限酵素の種類を増やすことが必要となる。

しかしながら、16S rDNA クローン塩基配列の結果から、T-RFLPで特定できたピークは、相対的に大きなピークに限られており、多くのピークは特定できていない。このように、16S rDNA クローンとして得られているにも拘わらずT-RFLPで検出されない理由としては、クローニングの際のバイアス(得られやすいクローンと得られにくいクローンがある)が考えられる。それゆえ、より多くのピークを特定するためには、今回塩基配列を決定した優占種の16S rDNA クローン以外についても塩基配列決定を行っていく必要がある。ただ、非常に多くのピークが出現した場合、それら全てを正確に特定することは極めて難しく、現時点では相対的に優占度の高い細菌の特定、追跡に利用するのが妥当と思われる。

実証試験では、16S rDNA クローンおよびT-RFLPの解析から、メタンを注入することによって、*Methylophilus* Group および *Methylomonas methanica* Subgroup の2種類のメタン酸化性細菌が増殖したことが明らかとなった。*Methylomonas methanica* は現場地下水からすでに3株が単離されており¹⁴⁾、TCE分解能も確認されている。しかしながら、*Methylophilus* GroupでTCE分解能を有するものはこれまでに報告がない。それゆえ、本研究で検出された *Methylomonas methanica* Subgroup はTCE分解に寄与し、*Methylophilus* Group はTCE分解に関与しなかった可能性が高い。また、メタンを連続注入した場合、TCE分解率の著しい低下が観察され、注入井に形成された生物膜には *Methylophilus* Group のメタン酸化性細菌しか検出できなかったことから、*Methylophilus* Group のTCE分解への関与が低いと推定される。さらに、16S rDNAのクローン解析では病原菌、日和見感染菌等の危険な細菌は検出されなかった。

次に、M5とM1での微生物群集構造全体を示すT-RFLPの結果(Fig. 6, 7)を比較すると、メタン注入前からメタン注入18日目まではピークAの *Methylosinus trichosporium* Subgroup が両方のモニタリング井戸で優占種として検出されているが、24日目からはそれぞれの微生物群集は全く異なり、M5で観察されたメタン酸化性細菌のピークはM1では全く観察されていない。M1はM5と75 cmしか離れておらず、滞留時間にして1日程度であるが、この僅かな距離の中で、メタン注入時に出現微生物が大きく変化したことは興味深い。メタン注入前はM1, M5共にピークAの *Methylosinus trichosporium* Subgroup が優占種として存在したことから、水中に有機物等、微生物の増殖に係わる物質が存在する場合は、出現微生物は常に変化するが、自然地下水のように、有機物など、微生物を増殖させる物質がほとんど消費されている場合は、出現微生物は比較的安定している可能性がある。また、M1では、メタン注入停止後、メタン注入前に優占種として検出されたピークAの *Methylosinus trichosporium* Subgroup が再び優占種として検出されている。それゆえ、メタン注入によってM1地下水の微生物生態系に与えた影響は可逆的なものであると考えることができる。

さらに、3. 4の追実験でのT-RFLP解析結果から、メタン連続供給によって形成される生物膜は、*Methylophilus* Groupのメタン酸化性細菌が主体となり *Methylomonas methanica* Subgroupの増殖は抑えられることが確認できた。本来の目的であった、生物膜での *Methylophilus* Groupの優占化とTCE分解率の低下の関係は、地下水中のTCE濃度の変化が著しく証明できなかったが、微生物解析の結果が、より効率的なプロセスの運転方法を考える判断材料として利用できた意義は大きい。従来利用されてきた培養を主体とする微生物分析技術では、培養できるごく限られた種類の微生物しか把握することができないため、このような解析は不可能である。その意味で、従来法と比較して次元の異なる解析力を持つ分子生物学的手法の利用価値は高い。

ここで示した微生物分析法の内、16S rDNA クローンの解析は非常に手間がかかるため、それ単一では生物処理プロセスへの適用は極めて難しい。それゆえ、非常に簡便・迅速であるT-RFLP解析との組み合わせが理想的である。本研究での16S rDNA クローン解析とT-RFLP解析の関係を整理するとFig. 9のようになる。解析に約7

日を要する 16S rDNA クローン解析はあくまで基礎データの収集のために行うもので、ある程度の基礎データが蓄積されれば、頻繁に行う必要はない。日々の微生物群集の挙動把握は T-RFLP が主体となる。T-RFLP ではサンプル入手から約 2 日 (1 日も可能) で解析結果を得ることができるため、遅れることなく微生物群集の状態を把握することが可能である。また、得られた結果はコンピュータに蓄積可能なデータであり、異なった時期に得られた個々の解析データを何時でも比較することができる。このように、本解析手法の汎用性は極めて高い。

最後に、本論文で検討した 16S rDNA クローンおよび T-RFLP 解析では、DNA 抽出、PCR 増幅、クローニングの各工程でバイアスの影響があるため、実際に起きている現象の一部分しか捉えていない可能性があり、結果の解釈には注意を要する。しかしながら、それを考慮しても、従来とは次元の異なる解析結果を得られる分子生物学的手法の重要性は高い。今後、多くの生物処理プロセスで適用され、新しい技術革新へとつながることを期待したい。

※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) DeLong, F. E., G. S. Wickham, and N. R. Pace. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for identification of single cells. *Science*, Vol. 243, p.1360-1363.
- 2) Muyzer, G. A. C. D. Wall and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 59, p.695-700.
- 3) Liu, W., T. L. Marsh, H. Cheng, and L. J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, p.4516-4522.
- 4) T sien, H. C., G. A. Brusseau, R. S. Hanson, and L. P. Wackett. 1989. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 55, p.3155-3161.
- 5) Burrows, K. J., A. Cornish, D. Scott, and I. J. Higgins. 1984. Substrate specificities of the soluble and particulate methane mono-oxygenases of *Methylosinus trichosporium* OB3b. *J. General Microbiol.*, Vol. 130, p.3327-3333.
- 6) Semprini, L., P. V. Roberts, G. D. Hopkins, and P. L. McCarty. 1990. A field evaluation of in-situ biodegradation of chlorinated ethenes. Part 2. Results of biostimulation and biotransformation experiments. *Ground Water*, Vol. 28, p.715-727
- 7) Fogel, M. M., A. R. Taddeo, and S. Fogel. 1986. Biodegradation of chlorinated ethane by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 51, p.720-724.
- 8) 中村寛治, 鈴木義彦, 石田浩昭. 1999. 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. *環境工学研究論文集*, Vol.36, p.1-10.
- 9) Guschin, D. Y., B. K. Mobarry, D. Proudnikov, D. A. Stahl, B. E. Rittmann, and A. D. Mirzabekov. 1997. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 63, p.2397-2402.
- 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, p.2501-2507.
- 11) Hanada, S., T. Shigematsu, K. Shibuya, M. Eguchi, T. Hasegawa, F. Suda, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. 1998. Phylogenetic analysis of trichloroethylene-degrading bacteria newly isolated from soil polluted with this contaminant. *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 86, p.539-544

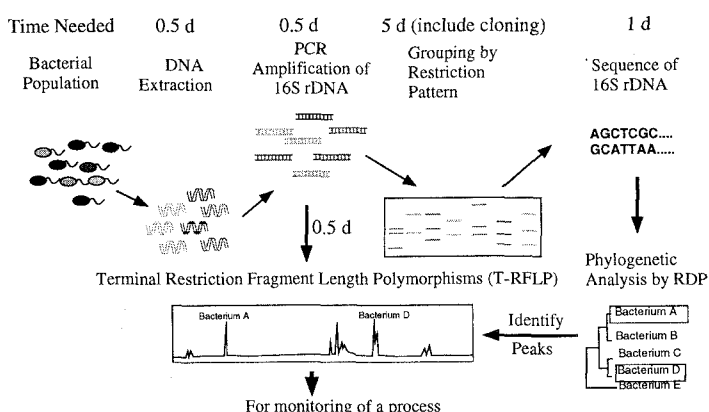


Fig.9 Scheme of 16S rDNA based analysis