

- (36) トリクロロエチレン汚染現場に注入された *Ralstonia eutropha* KT-1 の  
地下水中微生物群集構造への影響評価

Evaluating impacts of *Ralstonia eutropha* KT-1 injected into a trichloroethylene-  
contaminated site on indigenous bacterial populations in groundwater

中村 寛治\*・石田 浩昭\*・飯泉 太郎\*

Kanji NAKAMURA\*, Hiroaki ISHIDA\*, Taro IIZUMI\*

**ABSTRACT:** *Ralstonia eutropha* KT-1 is a bacterium that can grow on phenol or toluene. Strain KT-1 is also able to degrade trichloroethylene (TCE) after the induction with phenol or toluene. Approximately 2 kg (dry weight) of strain KT-1 induced by toluene was injected into groundwater at a TCE-contaminated site to degrade TCE. After the injection process was completed, the groundwater was pumped up for 51 days. Number of phenol-degrading bacteria in the groundwater was monitored by most probable number (MPN) method during that period. Changes of bacterial populations in the groundwater were also analyzed by molecular methods based on 16S rDNA to evaluate impacts of strain KT-1 injected on indigenous bacterial population. Analysis of 16S rDNA clone showed that 68% of clones obtained during the experiment belonged to *Proteobacteria* Alpha or Beta. Terminal restriction fragment length polymorphisms (T-RFLP) analysis of PCR-amplified 16S rDNAs indicated that indigenous bacteria phylogenetically close to *Nitrosomonas* and *Azoarcus* group disappeared from the groundwater after the injection of strain KT-1. However, they were observed again as dominants after 18 days of pumping up. A statistical analysis, multi-dimensional scaling (MDS), was applied to the data of T-RFLP in order to evaluate the changes of bacterial populations. The results showed that indigenous bacterial populations perturbed by strain KT-1 were well restored in 51 days.

**KEYWORDS:** *Ralstonia eutropha*, trichloroethylene, 16S rDNA, clone, T-RFLP

## 1. はじめに

土壌・地下水は、日本はもとより世界各地で種々の物質によって汚染されており、早急な浄化対策が望まれている。有機系の汚染物質は、単環や2環の石油系汚染物質のように微生物によって容易に分解される易分解性物質と、多環芳香族や有機塩素化合物のように微生物によって分解されにくい難分解性物質がある。トリクロロエチレン (TCE) は難分解性の有機塩素化合物の中で汚染事例の多い物質であり、日本の地下水の代表的な汚染物質となっている。TCE で汚染された土壌・地下水は、微生物により浄化することが可能である。本プロセスは、バイオレメディエーションと呼ばれ、大きく分けて二種類の方法がある。一種類は、土着の微生物を活性化させて浄化を行うバイオスティミュレーション、もう一種類は、特定の微生物を土壌に注入し処理を行うバイオオーグメンテーションである。以下に、その概略を述べる。

現在までに、TCE を炭素源に増殖できる微生物は発見されていないが、コメタボリズムを利用して好氣的に生

---

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

物分解可能であることが知られている。TCE のコメタボリズムに利用されるのは、メタン資化性細菌のメタンモノオキシゲナーゼ<sup>1)</sup>、トルエン資化性細菌のトルエンオキシゲナーゼ<sup>2,3)</sup>、フェノール資化性細菌のフェノールヒドロキシラーゼ<sup>4,5)</sup>などである。そこで、これらの細菌を利用した実処理では、メタン、トルエン、フェノール等を汚染サイトに直接注入し、土着細菌を増殖させると共に、酵素を誘導して TCE を分解することが、国内の汚染現場でも試みられている<sup>6)</sup>。このようなバイオスティミュレーションでは、増殖基質の注入によって TCE 分解細菌を土壤中で増殖させることになるが、出現する微生物の中には、TCE 分解に有効でないものも存在するため<sup>6,7)</sup>、注入物質が無駄に消費されてしまうという欠点を有している。これに対して、高い TCE 分解能を有する菌株を、汚染現場に直接注入するバイオオーグメンテーションは、このような問題点を回避できる有効な方法として期待されている。

バイオオーグメンテーションでは注入された特定微生物がその環境中で定着し、長期にわたって分解能力を発揮する場合と、注入する微生物の定着は期待できないが注入後分解酵素（自然微生物の場合は通常注入前に誘導）が一定期間分解を行う場合がある。本研究の対象は後者であり、分解効果を高めるため、多量の TCE 分解微生物が TCE 汚染地下水中に注入された<sup>8)</sup>。バイオオーグメンテーションのような開放系での微生物利用に当たっては、まず利用する微生物が安全であり、もし地下水を通じて人間の口に入ることがあっても問題ないことが保証される必要がある。加えて、地下水中に注入された微生物は、分解反応終了後、速やかにその濃度が減少し、既存の微生物群集に長期にわたって影響を及ぼさないことが、微生物生態系保全の観点から望まれる。

本研究では、日本で初めて実施されたバイオオーグメンテーションの実証試験において、大量の TCE 分解細菌 *Ralstonia eutropha* KT-1 株が注入された TCE 汚染サイトで、地下水中における微生物群集構造の挙動を解析した。これまでの結果では、KT-1 株によって現場地下水中の TCE の分解が確認され、注入直後の KT-1 株の地下水中濃度 約  $10^9$  cell-DNA/mL が 51 日間の揚水によって約  $10^2$  cell-DNA/mL まで速やかに低下することが Real-Time PCR 解析によって確認されている<sup>8)</sup>。ここではさらに、KT-1 株注入が現場地下水中の微生物群集構造に及ぼす影響について、16S rDNA を基にした分子生物学的手法により検討した結果について述べる。微生物群集構造の解析には、Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) を利用した。T-RFLP は 16S rDNA を PCR 増幅する際、5'末端側のプライマーを蛍光標識し、増幅 DNA を制限酵素で切断後キャピラリー電気泳動によって分離、蛍光標識された 5'側断片を検出する手法である<sup>9)</sup>（特に 16S rDNA に限らないが 16S rDNA の利用例が多い）。異なる種類の微生物は異なる長さの 5'側断片を生成するため、検出ピークによって菌種の分離・検出が可能となる。PCR の際のバイアス（16S rDNA コピー数、塩基配列の差異による PCR 増幅効率の違い等）はあるものの、半定量的に微生物の存在量をモニタリングすることが可能であり、メタンを利用したバイオスティミュレーションにおいても有効に利用されている<sup>6)</sup>。また、本研究では T-RFLP のピークデータを統計的に解析するため、多次元尺度法を利用した。多次元尺度法とは対象間の非相関性を評価する統計学的手法である。T-RFLP 同様に微生物群集構造を解析する手法である Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) の解析データが多次元尺度法によって解析され<sup>10,11)</sup>、微生物群集構造の変化を評価する手段として利用され始めている。

## 2. 実験方法および材料

### 2. 1 細菌の注入

*R. eutropha* KT-1 株は、千葉県内にある TCE 汚染サイト（本研究でバイオオーグメンテーションを行うサイト）より単離されたフェノールおよびトルエンを資化できる細菌であり、これらの基質で誘導された酵素によって TCE を分解することができる<sup>12)</sup>。本研究ではこの KT-1 株をトルエン誘導により TCE 分解酵素を誘導した上で地下水中に注入した。KT-1 株の培養および現場におけるトルエン誘導の詳細は既報の論文に記述したとおりである<sup>8)</sup>。あらかじめ、外部で大量培養を行い、その凍結菌体を現場に持ち込み、トルエンによる酵素誘導を行った後、現場実験に使用した。誘導された菌体は、最終的に脱塩素水道水 700 L に懸濁した (OD<sub>600</sub>=11.2)。この懸濁液を脱

塩素水道水で希釈することによって  $OD_{600}=1.0$  (300 mg-dry weight/L) に調整しながら、後述する注入/揚水井戸 AR2 から地下水中に 10 L/min の流量で 11 時間注入を行った。注入された菌体量は乾燥重量で 1.98 kg であった。その後、注入菌体をさらに広い範囲に分散させるため脱塩素水道水のみを同じ流量で 5 時間注入した。注入細菌の回収のため、注入作業終了直後に、注入を行った井戸から 3 L/min の流量で揚水を行った。総注入量は 9.6 m<sup>3</sup>、揚水量は実験終了までの 51 日間で 220 m<sup>3</sup> となった。

## 2. 2 注入サイトおよび地下水サンプリング

注入/揚水井 AR2 およびその周囲のモニタリング井 AM2, AM3, AM4, AM5 を Fig.1 に示す。このサイトの地下の帯水層は地表から約 9.5 m の深さに水面があり、帯水層の厚みは約 10 m である。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  $4\sim6\times10^{-3}$  cm/s である。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 程度である。注入操作終了後、AR2 での地下水位は 3.7 m 上昇、揚水後地下水位は急激に低下し、自然地下水位から約 1 m 下の水位で安定した。サイト周辺の自然地下水流は AM2 から AM4 の方向に流れ、流速は 5 ~ 10 cm/d であった。

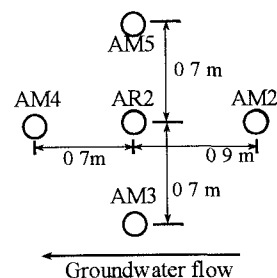


Fig.1 Location of wells

地下水サンプリングは KT-1 株注入前に 2 回行った。揚水後は、1 時間後 (2000 年 2 月 6 日) を開始点とし、その後は定期的に 2000 年 3 月 28 日まで 51 日間継続した。地下水をサンプリングした井戸は、Fig.1 に示す 5 つの井戸の内、AR2, AM2, AM3, AM4 の 4 ヶ所、および AR2 から AM5 の方向に約 20 m 離れたブランク井戸 BW1 の合計 5 ヶ所とした。AR2 では揚水地下水をサンプリングし、その他の井戸では地下 13.5 m から 14.5 m まで採水器 (吉野計器製 SY-IK-B 型 容積 400 mL) を降ろしてサンプリングした。サンプリングした地下水は氷温で保管し、1 日以内に微生物分析に使用した。地下水温は注入時に 22°C まで上昇したが、その後は自然地下水温に近づき、 $17\pm1^{\circ}\text{C}$  で推移した。試験期間中、地下水 pH は  $6.3\pm0.2$ 、溶存酸素は 0.7 mg/L 以上となった。

## 2. 3 Most Probable Number (MPN) 法によるフェノール資化性細菌の解析

フェノール資化性細菌数は MPN 法 (3-3-3) により測定した (以下 Phenol-MPN 法)。測定に利用した液体培地は Mineral Salts Basal Medium (MSB)<sup>13)</sup> を蒸留水で 50 倍に希釈した 1/50 MSB にフェノールを 5 mg/L の濃度になるよう添加したものとした。本培地 4 mL に適宜希釈したサンプル地下水 1 mL を加え、25°C で 2 週間培養、培地中のフェノール濃度が 0.5 mg/L 以下に低下した試験管を陽性と判断した。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、フェノール資化性細菌の優占種の挙動を把握するため、最大希釈域の試験管から Difco 製 R2A 寒天培地を利用して優占細菌を単離、コロニー形態により分類した後、フェノール資化性を調べた。単離されたフェノール資化性細菌をその時点での優占種とした。単離した優占種からは後述する 2. 4 に従って DNA を抽出、16S rDNA を PCR 増幅した。前方 500 bases の塩基配列を Table 1 のプライマー Bact0011 を利用して決定した。DNA の伸長反応には BigDye Terminator Kit (アプライドバイオシステムズ製) を用い、配列決定には ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ製) を使用した。実験条件は添付のマニュアルに従った。得られた塩基配列データはインターネット上で Ribosomal Database Project II (RDP) に送付、近縁種を決定した。

## 2. 4 DNA の抽出および 16S rDNA の PCR 増幅

地下水サンプルからの DNA の抽出は既報の論文<sup>7)</sup> に従った。地下水中の細菌をフィルターに補足する場合は、100 mL の地下水を使用した。菌体注入直後は菌体濃度が高すぎてフィルター上への捕捉ができなかったため、2

mL の地下水を遠心分離 (8000×g, 15 min, 4℃) で処理し、沈殿した菌体から同様に DNA を抽出した。抽出した DNA は乾燥後 50 μL の TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) に溶解した。その後、不純物を取り除くためファルマシア製

Table 1 Summary of primers

| Used for:  | Primer/Probe | Sequence (5' to 3')       | References |
|------------|--------------|---------------------------|------------|
| PCR        | Bact0011     | GTTTGATCCTGGCTCAG         | 14)        |
|            | Bact1492     | ACGGYTACCTTGTTAGGACTT     | 14)        |
|            | KNA80f       | TTCACCGTCATACCGAAACG      | 7)         |
|            | KNA80r       | CATCCGCCAAAACAGCCAAGC     | 7)         |
|            | Bact0003     | ATTGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 6)         |
| Sequencing | Bact0003ST   | ATTGAAGAGTTTGATCC         | 6)         |

Y: C, T

MicroSpin-S300HR で精製を行った。精製 DNA 溶液 (DNA 濃度が高い場合は適宜希釈) 1 μL 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 μL とし、2.5 U の Ex Taq DNA polymerase (宝酒造製)、200 μM の dNTP、5'末端をリン酸化したプライマー Bact0011 および Bact1492<sup>14)</sup> をそれぞれ 20 pmol 使用した (Table 1)。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℃, 2 分に続き、第 1 段階: 94℃, 20 秒、第 2 段階: 55℃, 30 秒、第 3 段階: 72℃, 2 分を 30 サイクル繰り返し、Post extension: 72℃, 7 分を行った。本反応には、アプライドバイオシステムズ製 GeneAmp PCR System 2400 を利用した。

## 2. 5 16S rDNA クローンの取得および分類

PCR 増幅産物をアガロース電気泳動にて分離、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℃ 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<sup>7)</sup> 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℃ にて一晚反応させた。その後、大腸菌に形質転換させ L broth 寒天培地 (Ampicillin 100 μg/mL を含む) に塗布、37℃ で一晚培養した後、形質転換体を得た。16S rDNA クローンを含む大腸菌は少量を TE に懸濁、95℃ で 2 分間熱処理し、1 μL 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 KNA80r<sup>7)</sup> を利用した。PCR 組成、反応条件は、基本的には 2. 4 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℃ とした。PCR により合成された DNA 断片は約 1.5 kbp 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 μL 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. 4 の通りである。PCR 反応終了後、その 1 μL を 3 種類の制限酵素 (*Bsa*DI, *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。16S rDNA クローンの出現頻度が 2 以上の優占的な *Phylotype* について塩基配列の解析を行った。塩基配列の決定に関しては、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 2. 3 に示すように決定した。得られた塩基配列データは 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。この時、RDP の近似性を示す *SD\_value* が 0.6 以上の場合は最も高い値を示す Subgroup、Group、あるいは Assemblage を最近縁種として名前を付け、*SD\_value* が 0.6 未満は Unclassified とした。

## 2. 6 T-RFLP による解析

2. 4 で抽出した DNA をテンプレートに、2. 4 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 4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX) で標識したもの、および Bact1492 の 5'末端を 6-carboxyfluorescein (6-FAM) で標識したものを使用した (アプライドバイオシステムズ社に依頼合成)。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 HEX 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, アプライドバイオシステムズ製) を利用した。

T-RFLP で得られた Electropherogram のピークは、16S rDNA 塩基配列の結果および 5'側断片長の実測結果と照合し、出現ピークがどの微生物由来であるか同定を行った。また、SPSS 10.0 J for Windows (SPSS Japan) を利用して、多次元尺度法による非相対度解析を *Bst*UI 切断によって得られた T-RFLP の Electropherogram を基に行った。17 bases の Bact0011 より大きい 18~517 bases の範囲で、Electropherogram のピークデータは 1 base 刻み (四捨五入) でピーク面積割合 (%) により整理した。つまり、各々のピーク面積値は総合計面積値で除し、ピーク面積割合を算出した。1つのデータに関してピーク面積割合の合計は 100% となる。この際、ピーク面積が 1% 以下のものに関しては解析対象外とした。Electropherogram A と Electropherogram B の非相対度 (距離) は以下のように表される。

$$D_{AB} = \sqrt{\sum_{i=1}^P (A_i - B_i)^2}$$

ここで、 $D_{AB}$  : Electropherogram A, B の距離、 $P$  : ピークの種類合計 (ここでは 18 から 517 bases までの 500 種類)、 $A_i$  : Electropherogram A の  $i$  (1~500 まで) 番目のピーク面積割合、 $B_i$  : Electropherogram B の  $i$  (1~500 まで) 番目のピーク面積割合である。また、ピークが検出されない場合は  $A_i$  や  $B_i$  の値は 0 として処理する。この計算によって複数の Electropherogram の距離行列が作成される。その後距離行列データを SPSS 10.0 J で解析し、非相対度の 2 次元プロットを作成した。

### 3. 結果

#### 3. 1 MPN 法によるフェノール資化性細菌の解析

Phenol-MPN 法で測定した現場地下水中のフェノール資化性細菌数の経時変化を Fig.2 に示す。微生物の注入を完了した直後に揚水を始め、1 時間経過した後にサンプリングを行い、これを開始点 (図中 X 軸の 0) とした。微生物注入の 3 および 12 日前にもフェノール資化性細菌数を計測しているが、その範囲は  $10^2 \sim 10^4$  MPN/mL であり、これがサイト内の地下水中に元来生息するフェノール資化性細菌数であると判断できる。地下水中の全菌数は約  $2 \times 10^6$  cells/mL であることがこれまでの調査から明らかになっており<sup>8)</sup>、フェノール資化性細菌の割合は 0.05~5% となる。KT-1 株を注入するとフェノール資

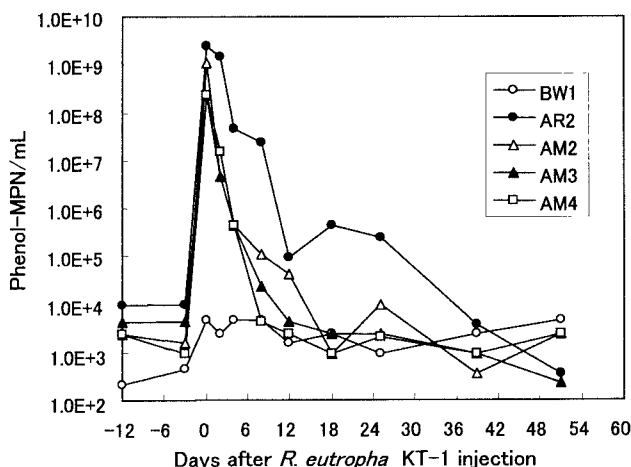


Fig. 2 Change of phenol degrader in groundwater (Phenol degrader was measured by Phenol-MPN method)

化性細菌数は注入井 AR2 および周辺のモニタリング井戸 AM2, AM3, AM4 では  $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$  cells/mL の範囲で上昇した。その後揚水を開始すると、全ての井戸においてフェノール資化性細菌数は速やかに減少し、モニタリング井戸 AM2, AM3, AM4 では 18 日後にほとんど注入開始前のレベルに戻った。注入揚水井戸 AR2 も 39 日後には注入前のレベルとなった。

次に、MPN において最大希釈の陽性試験管から単離されたフェノール資化性細菌の優占種の解析結果を Table 2 に示す。一つの枠内に 2 種類の細菌名が記入されている場合は 2 種類の菌株が優占種として検出されたことを示す。KT-1 株注入前には KT-1 株は全く検出されておらず、コントロール井戸では *Nocardioides albus* Subgroup, *Hydrogenophaga flava* Subgroup のフェノール資化性細菌が、注入域では *Variovorax paradoxus* Subgroup, *Dechlorimonas agitatus* Subgroup のフェノール資化性細菌が検出された。KT-1 株を注入した直後は注入域の全ての井戸で KT-1 株が検出された。注入後 25 日目でモニタリング井戸 AM2, AM3, AM4 では注入前に観察された *D. agitatus* Subgroup の細菌が優占種として検出された。その後、AM4 では、51 日目に再び KT-1 株が検出された。注入井である AR2 では注入後から試験終了の 51 日目まで優占種は KT-1 株であった。コントロール井戸では注入域で観察された *D. agitatus* Subgroup の細菌は観察されず、別のフェノール資化性細菌が観察された。その中には *R. eutropha* Group の細菌もあったが、これらは KT-1 株とは異なる株であることを既報の論文で示した REP-PCR<sup>®</sup> による DNA フィンガープリントの比較により確認した。

Table 2 Dominant phenol-utilizing strains isolated from most-diluted Phenol-MPN tubes

| Days after KT-1 Injection | BW1                                                                             | AR2                                    | AM2                                                          | AM3                                                          | AM4                                                    |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| -12                       | <i>Nocardioides albus</i> SG (0 903)*<br><i>Hydrogenophaga flava</i> SG (0 990) | <i>Variovorax paradoxus</i> SG (1 000) | Not isolated                                                 | <i>Dechlorimonas agitatus</i> SG (0 945)                     | <i>D agitatus</i> SG (0 896)                           |
| 0                         | Not isolated                                                                    | <i>Ralstonia eutropha</i> KT-1         | <i>R eutropha</i> KT-1                                       | <i>R. eutropha</i> KT-1                                      | <i>R eutropha</i> KT-1                                 |
| 12                        | <i>Acidovorax avenae</i> SG (0 942)                                             | <i>R eutropha</i> KT-1                 | <i>R eutropha</i> KT-1                                       | <i>R eutropha</i> KT-1                                       | <i>R eutropha</i> KT-1                                 |
| 25                        | <i>R eutropha</i> G (0 887)<br><i>avenae</i> SG (0 929)                         | <i>R eutropha</i> KT-1                 | <i>D agitatus</i> SG (0 969)                                 | <i>D agitatus</i> SG (0 969)<br><i>D agitatus</i> SG (0 896) | <i>R eutropha</i> KT-1<br><i>D agitatus</i> SG (0 906) |
| 39                        | Not isolated                                                                    | <i>R eutropha</i> KT-1                 | Not isolated                                                 | Not isolated                                                 | <i>D agitatus</i> SG (0 896)                           |
| 51                        | <i>R. eutropha</i> G (0 950)                                                    | <i>R eutropha</i> KT-1                 | <i>D agitatus</i> SG (0 959)<br><i>D agitatus</i> SG (0 969) | Not isolated                                                 | <i>R eutropha</i> KT-1                                 |

G Group, SG Subgroup \* *S\_ab* value of RDP

### 3. 2 16S rDNA クローン解析

16S rDNA クローンの取得、塩基配列の決定および系統樹の作成は、地下水中に出現する微生物の種類を明らかにすると共に、後述の T-RFLP 解析における Electropherogram のピークがどの微生物由来であるかを特定する目的で行った。

16S rDNA クローンの取得は、コントロール井戸である BW1 および AR2、AM2 に関して行った。BW1 では 2000 年 2 月 3 日（経過日数：-3 日目）、2 月 18 日（12 日目）、3 月 2 日（25 日目）、3 月 28 日（51 日目）のサンプルに関して、AR2、AM2 では 2 月 3 日（-3 日目）、2 月 6 日（0 日目）、3 月 2 日（25 日目）、3 月 28 日（51 日目）のサンプルに関してクローン取得を行った。出現頻度が 2 以上の Phylotype に関して、代表 16S rDNA クローンの塩基配列を決定し、系統解析を行った結果を Fig.3 に示す。図中のクローン名は、各サンプルにおけるクローン No-サンプリング日-サンプリング井戸の順に表記してある。

右端に、Bacteria の Division を示す。ほとんどの 16S rDNA クローンは *Proteobacteria* の Alpha あるいは Beta Subdivision に属する微生物であった。Beta Subdivision の中で 2 月 6 日（経過日数：0 日目）の KT-1 株注入日に AM2, AR2 で検出された *Ralstonia eutropha* Group のクローンは注入された KT-1 株である。その他は Gram positive bacteria、*Proteobacteria* の *Epsilon* Subdivision、*Cyanobacteria* and *Chloroplasts*、*Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides* の 4 種類の細菌が検出され、分類できないものも観察された。

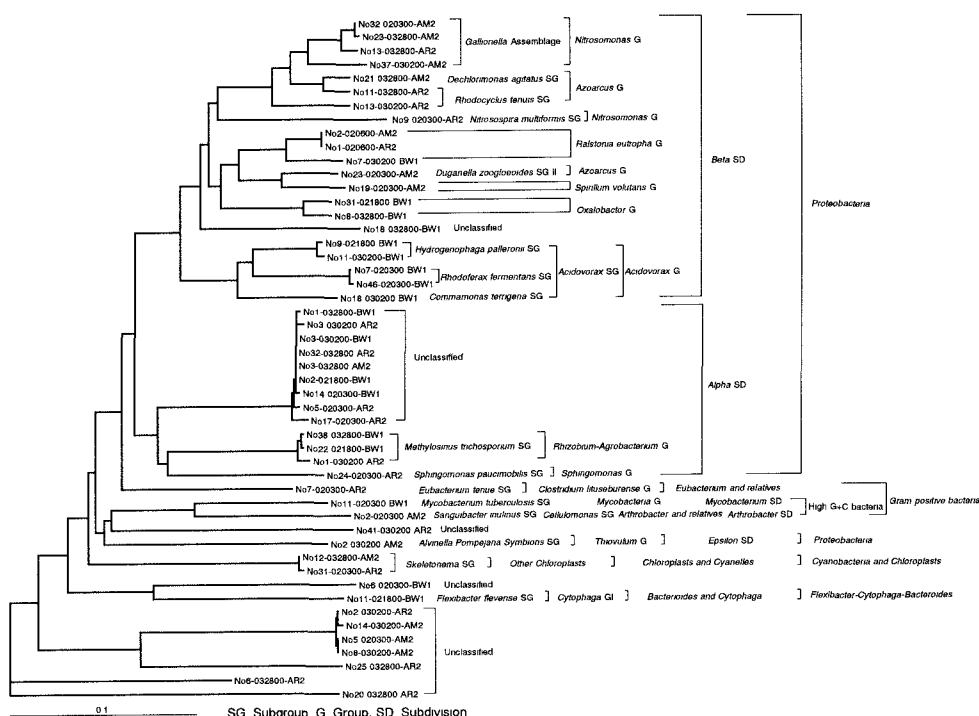


Fig.3 Phylogenetic tree showing the relationship of representative 16S rDNA clones corresponding to dominant phylotypes (Each clone shows number, date of sampling and well)

### 3. 3 T-RFLP 解析

T-RFLP 解析で検出されるピークが、前項で解析されたどの 16S rDNA クローン由来かを推定するため、PCR 増幅した 16S rDNA を 3 種類の制限酵素 (*Bst*UI, *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た。ほとんどのクローンは、既報のバイオスティミュレーションの結果<sup>⑧</sup>と同様に Fig.3 の系統樹に示す最小単位の Subgroup あるいは Group ごとに特異的な断片の長さを有していた (2 つの近縁な Subgroup や Group が同じ 5'側断片長を持つ場合も希にある)。しかしながら、系統樹 (Fig. 3) の上から 4 種類の細菌、*Gallionella* Assemblage, *D. agitated* Subgroup, *Rhodocyclus tenuis* Subgroup, *Nitrosospira multififormis* Subgroup に関しては、極めて似た長さの 5'側断片が生成されることが分かった。その長さは *Bst*UI 切断では 380~385 bases、*Hha*I 切断では 361~364 bases あるいはサイト無し、*Rsa*I 切断では 463~469 bases で例外的に 115 bases で、明確に区別するのは困難であった。それゆえ、後述の T-RFLP 解析では、これらの範囲で検出されたピークをまとめ、*Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group として整理することとした。

BW1、AR2、AM2 を対象に行った T-RFLP 解析の結果を Fig.4 に示す。縦軸はピークの大きさを示すが、サンプル毎の泳動にかかる 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。本図に示すのは PCR 増幅した 16S rDNA の *Bst*UI 切断によって得られた Electropherogram である。ここには示していないが、ピークが前項のどの 16S rDNA クローン由来であるかを、より正確に決定するため、*Hha*I および *Rsa*I で切断した 16S rDNA の Electropherogram の解析も行った。

コントロール井戸である BW1 の T-RFLP 解析の結果を Fig.4A に示す。解析期間を通して A の *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group および C の *H. palleronii* Subgroup が優占種として存在し、B の未同定微生物は KT-1 株注入

前に、D の *Oxalobacter* Group は注入後 25 日以降に検出された。Fig.4B に示す AR2 の結果では KT-1 株注入前に優占種であった A の *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group は KT-1 注入直後には検出されなくなるが 18 日後には再び優占種となった。また、F の未同定微生物は KT-1 株注入後 18 日目初めて検出され、39、51 日目と検出された。Fig.4C に示す AM2 の結果では、AR2 と同様に KT-1 株注入前に優占種であった A の *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group は KT-1 注入後には検出されなくなるが 12 日後には再び優占種となった。この様に注入域では注入前に存在した *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group が KT-1 注入後は一旦検出されなくなるものの、約 2 週間で再び検出された。それゆえ、KT-1 株注入が現場地下水中の微生物群集構造へ与える影響は可逆的なものであると推測できる。

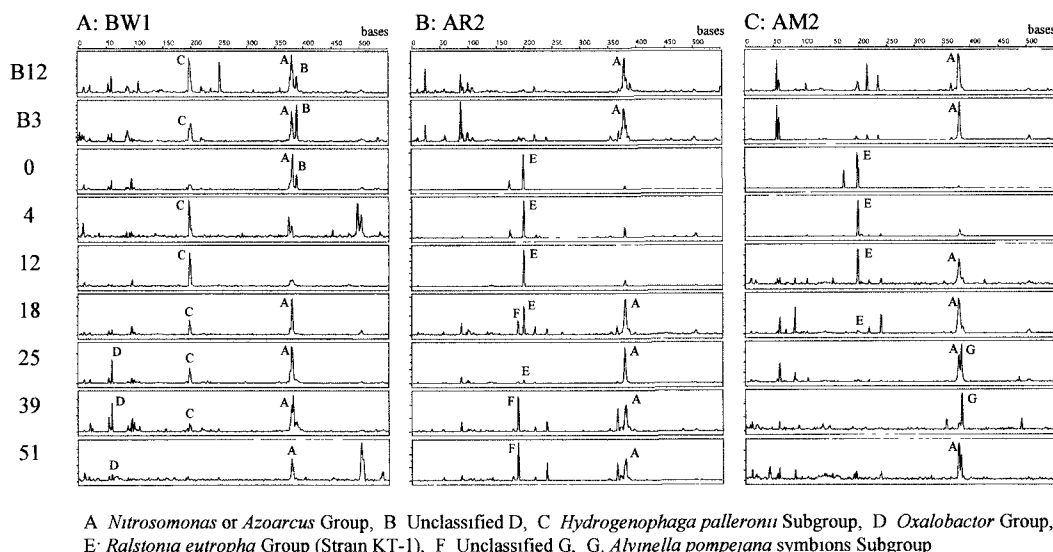


Fig. 4 Electropherograms of 5'T-RFLPs of *Bst*UI digested 16S rDNA amplified from BW1, AR2 and AM2 groundwaters (B3 and B12: 3 and 12 days before the KT-1 injection, 0: Just after the KT-1 injection, Other numbers: Days after the KT-1 injection. )

### 3. 4 多次元尺度法による統計解析

KT-1 株が現場地下水中の微生物群集構造へ与える影響をさらに詳細に評価する目的で、T-RFLP で得られた Electropherogram (*Bst*UI 切断) をピーク毎の面積値で整理し、多次元尺度法による解析を行った。ここで、*Bst*UI 切断を選択したのは、Fig.3 に示した 16S rDNA クローンの全てが、T-RFLP 解析範囲の 18~517 bases の間に *Bst*UI サイトを持っていたためである。解析対象は、コントロール井戸 BW1、注入/揚水井戸 AR2 およびモニタリング井戸 AM2 とした。BW1 のピークは 75 種類、AR2 のピークは 71 種類、AM2 のピークは 66 種類得られた。これらのデータをそれぞれ多次元尺度法により解析した結果、Fig.5A、5B および 5C に示す非相対度の 2 次元プロットの結果が得られた。AR2 の結果では、注入直後の 0 日目でプロットは、注入 3 日前および 12 日目の B3、B12 から大きく離れるものの、その後変化を重ね、39、51 日目では B3、B12 に近い位置に戻っている (Fig.5B)。また、AM2 の結果でも注入直後の 0 日目でプロットは大きく移動するものの、その後徐々に変化し、51 日目では B12 と近くなっている (Fig.5C)。このように、注入域の地下水中の微生物群集構造は、KT-1 株の注入によって大きな変化を受けるが、徐々に元の微生物群集構造に近い状態へ回復することが示された。同様に、コントロール井戸である BW1 の結果も Fig.5A に示す。BW1 でも 2 次元のプロット位置は常に変化しており、自然の微生物群

集構造が常に変化していることが分かる。

次に、AR2、AM2 で観察された変化が BW1 での変化に比べて大きなものであるか否かを評価するため、BW1、AR2、AM2 のデータをまとめて多次元尺度法による解析を行い、同一 2 次元平面上で比較した。合計のピークは 149 種類となった。結果を Fig.5D に示す。本結果でも、KT-1 株の注入域である AR2、AM2 の変化のパターンは Fig.5A、5B の変化パターンと非常によく似ており、3 つの井戸のデータをまとめて解析を行っても、個々の解析の変化パターンは保持されることが分かった。また、AR2、AM2 の変動域は BW1 のそれより著しく大きく、KT-1 株注入によってもたらされる変化は、自然の変化より大きなものであることが理解できる。さらに、AR2 の B12、B3、39、51 日目および AM2 の B12、51 日目は BW1 での変動域 (= 自然変動域) 内の狭い範囲に集まっている。それゆえ、この地域の典型的な微生物群集構造にもたらされた KT-1 株注入による変化は、徐々に解消され、最終的には初期に近い状態へ戻ったと解釈できる。

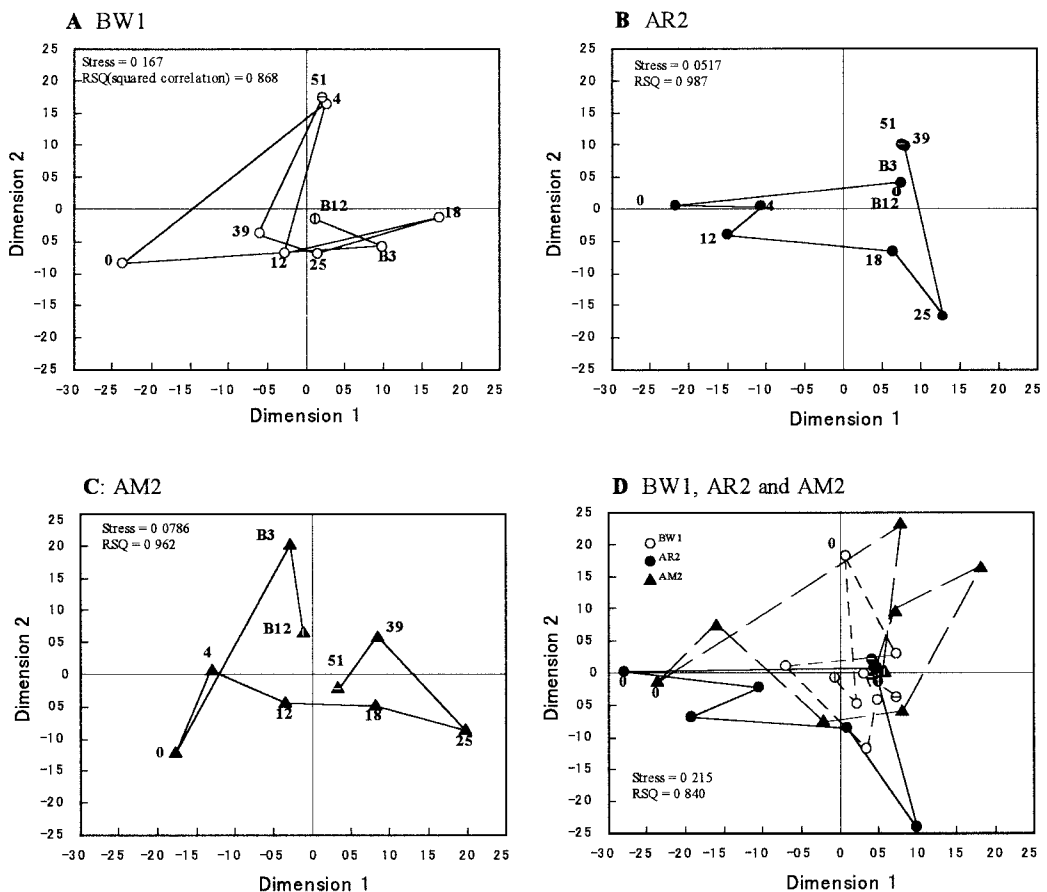


Fig 5 Multi-dimensional scaling analyses based on T-RFLP electropherograms  
(B3 and B12 3 and 12 days before the KT-1 injection, 0: Just after the KT-1 injection,  
Other numbers: Days after the KT-1 injection Vertical lines in the legends show the  
day B12 Horizontal lines in the legends show the day 51 )

#### 4. 考察

本研究では *R. eutropha* KT-1 株が TCE 汚染現場地下水中に注入された際の、微生物群集構造への影響に関し、て評価を行った。Fig.2 に示した Phenol-MPN の測定結果より、KT-1 株が注入井周辺に均一に注入され、その後の揚水によって回収された過程を捉えることができた。地下水中のフェノール資化性細菌数は KT-1 株注入によって著しく増加したが、周辺井戸 AM2, AM3, AM4 では 18 日目、注入井戸 AR2 でも 39 日目に元のレベルに戻り、速やかに正常レベルに復元されることが分かった。また、Phenol-MPN の最大希釈の陽性試験管から単離された優占種の解析結果 (Table 2) から、KT-1 株注入前に現場地下水中に優占的に生息していた *V. paradoxus* Subgroup, *D. agitatus* Subgroup のフェノール資化性細菌が、KT-1 株注入後は KT-1 株によって置き換わるものの、揚水後 25 日目で再び *D. agitatus* Subgroup が周辺井戸 AM2, AM3, AM4 で優占種として観察され、既存のフェノール資化性細菌群に戻る兆候を示している。しかしながら、注入揚水井戸 AR2 では 51 日目でも KT-1 株がなお唯一の優占種として観察されており、従来の優占種に戻るためにはさらに揚水が必要と思われる。

16S rDNA クローン解析では 50 種類の Phylotype が得られたが、この内約 60% の 31 種類は 19 の Subgroup, Group, あるいは Assemblage に分類された。残りの約 40% の 19 種類は未分類となり、データベース上に存在する既知の細菌と同一性が低い未知の細菌が多く検出された。これらすべての Phylotype に関する系統解析の結果得られる系統樹は Fig.3 に示す通りであるが、Proteobacteria が 68% で最も出現率が高かった。Proteobacteria は Beta Subdivision と Alpha Subdivision の 2 種類が存在したが、Beta Subdivision の方が数も種類も多く観察された。

T-RFLP 解析で出現するピークを同定する目的で、観察された Phylotype を 3 種類の制限酵素 (*Bst*UI, *Hha*I, *Rsa*I) で切断した場合の 5'側断片の長さを、塩基配列データを基に算出した。以前報告したメタン注入によるバイオスティミュレーションの際の解析結果では、5'側断片の長さは Subgroup あるいは Group ごとに異なり (近縁の 2 つの Subgroup は全く同じ場合もある)、T-RFLP 解析で区別が可能であった<sup>9</sup>。しかしながら、今回の解析では、系統樹で近い位置に存在する *Gallionella* Assemblage, *D. agitatus* Subgroup, *R. tenuis* Subgroup, *N. multiformis* Subgroup に関しては、極めて似た長さの 5'側断片が生成されるため区別することは不可能であり、これら全てを *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group と分類するに止まった。このように、極めて近縁な種類の細菌が複数出現する場合は、個々を明確に区別することは難しく、T-RFLP 適用の限界と考えられる。

また T-RFLP の Electropherogram のピークを上記の 5'側断片の長さから同定すると共に、その連続的な変化を調査した。T-RFLP のピークの大きさ (面積) は菌種による DNA 抽出効率や 16SrDNA コピー数の差、塩基配列による PCR 増幅効率の差によって影響を受けるため、ピークの大きさが単純にその菌種の存在比率を必ずしも表していない。しかしながら、同じ菌種の連続的な変動を追跡していくツールとしては非常に有効な手法である。T-RFLP 解析の結果、注入域の AR2, AM2 共に、KT-1 株注入前に優占種であった *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group が注入によって KT-1 株に置き換わるが、AR2 では 18 日目以降、AM2 では 12 日目以降 *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group が再び優占種となることが明らかとなった。それゆえ、KT-1 株注入によって攪乱された微生物群集構造は、その後の揚水によって速やかに元の微生物群集構造へと戻るものと推測できる。これらの回復のプロセスをさらに詳細に調査すべく、T-RFLP の Electropherogram (*Bst*UI 切断) を多次元尺度法で解析し、非相類似度の 2 次元プロットを求めた。その結果、Fig.5B, 5C に示すように、注入揚水井戸 AR2 およびモニタリング井戸 AM2 における微生物群集構造は KT-1 株注入によって一時的に大きな影響を受けるが、その後変化を繰り返し、最終的には元の群集構造に近づくことが明らかとなった。これを、非注入域である BW1 での微生物群集構造変化と比較するため、BW1, AR2 および AM2 での T-RFLP の Electropherogram のデータをまとめ、多次元尺度法により解析した結果、BW1, AR2 および AM2 での微生物群集構造の非相類似度を同一の 2 次元平面で比較できた (Fig.5D)。この結果から、BW1, AR2, AM2 の群集構造は KT-1 株注入前は似ており、KT-1 株の注入によって大きく異なってしまうが、揚水後 51 日目には再び相類似度の高い群集構造となることが分かった。以上、コントロール井戸の BW1 のデータを入れた解析によって、AR2, AM2 での微生物群集構造の変化を BW1 との相対変

化として捉え、最終的には AR2、AM2 の微生物群集構造が BW1 で観察される自然の状態に近くなることを示すことができた。このように、多次元尺度法を適用した対照系（ここでは BW1）との比較により、自然変化がある場合でも微生物群集構造への影響評価を行うことが可能となった。

同じ地域で行なわれたメタン注入によるバイオスティミュレーション実験では、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)法の結果が多次元尺度法で解析され、微生物群集構造の変化が評価されている<sup>10)</sup>。解析対象を DGGE から T-RFLP に変えた本研究でも、微生物群集構造の変化を多次元尺度法により、客観的に評価することができた。このように DNA を対象とした詳細な分析データを、統計的な解析により整理していく手法は、微生物が関わる複雑な現象の解析には極めて有効な手段である。次に、DGGE 法と T-RFLP 法の統計解析への利用に関する差をまとめると、以下ようになる。本研究では BW1、AR2、AM2 での T-RFLP の Electropherogram のピークは 149 種類となったが、この数は通常 DGGE で区別できる DNA のバンド数（約 50）と比較して多く、より解像度の高い解析が T-RFLP によって可能なことが分かる。さらに、DGGE で得られる DNA 断片の移動度は 1 つのゲル内での相対的な比較には利用できるが、別のゲルで得られた移動度との比較はできない。これに対して T-RFLP の Electropherogram データ（5'末端のピーク）は内部標準から計算される絶対的な長さのため、異なる時期や場所で得られたデータを自由に追加することが可能であり、この点が統計解析上の最も大きな利点である。

本試験は日本で初めて行われたバイオオーグメンテーション試験であるが、これまでの研究により注入された現場由来の TCE 分解細菌 *R. eutropha* KT-1 株が湯水に伴って速やかに減少する過程を Real-Time PCR によってモニタリングできている<sup>8)</sup>。本論文では、さらに KT-1 株が現場地下水中の微生物群集構造に与える影響を評価し、一時的に大きな変化はあるものの、変化は可逆的であり、短期間に元に近い状況に回復する過程を示すことができた。この様なモニタリング、統計処理を伴う環境影響評価は DNA 等を標的とした詳細な微生物分析によって初めて可能となり、その重要性は大きい。今後は、バイオオーグメンテーションが安全なプロセスとして社会的にも認知されていくために、さらに多くの現場で事例が集められ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) Tsien, 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.
- 2) Winter, R.B., K.-M. Yen, and B.D. Ensley. 1989. Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Escherichia coli*. Bio/Technology, Vol. 7, p. 282-285.
- 3) Wackett, L.P., and D.T. Gibson. 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *Pseudomonas putida* F1. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 54, p. 1703-1708.
- 4) 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, p. 17-27.
- 5) Fujita, M., M. Ike, J. Hioki, K. Kataoka, and M. Takeo. 1995. Trichloroethylene degradation by genetically engineered bacteria carrying cloned phenol catabolic genes. J. Ferment. Bioeng., Vol. 79, p. 100-106.
- 6) 中村寛治, 石田浩昭, 飯泉太郎, 鈴木義彦. 2001. 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. 環境工学研究論文集, Vol. 38, p. 175-186.
- 7) 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.

- 8) 中村寛治, 石田浩昭, 飯泉太郎, 渋谷勝利, 岡村和夫. 2000. トリクロロエチレン汚染現場に注入されたフェノール酸化細菌 *Ralstonia eutropha* KT-1 株の PCR による定量検出. 環境工学研究論文集, Vol.37, p.267-278.
- 9) 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.
- 10) Iwamoto, T., K. Tani, K. Nakamura, Y. Suzuki, M. Kitagawa, M. Eguchi, and M. Nasu. 2000. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. FEMS Microbiol. Ecol., Vol. 32, p.129-141.
- 11) 春日郁朗, 古米弘明, 中島典之, 有井鈴江. 2001. PCR-DGGE による津久井湖における藻類を含む微生物群集構造の季節変動解析. 水環境学会誌, Vol.24, p.856-864.
- 12) 渋谷勝利, 岡村和夫. 2000. トリクロロエチレンを対象としたバイオオーグメンテーション利用微生物の特性について. 環境技術, Vol.29, p.380-385.
- 13) Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, and M. Duodoroff. 1966. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol., Vol. 43, p.159-271.
- 14) 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.