

B-44 寒冷地のDGGEによる微生物群集構造解析 及び2,4-Dの分解

○佐藤 優騎¹・河田 絢子¹・阿部 雄樹¹・張 俗喆^{1*}・菊池 慎太郎¹

¹室蘭工業大学大学院工学研究科応用理化学系専攻（〒050-8585 室蘭市水元町27番1号）

* E-mail: ychang@mmm.muroran-it.ac.jp

1. はじめに

現在、土壤汚染が深刻な社会問題となっており、平成15年2月には日本でも初めて土壤汚染対策法が施行され、定められた有害物質の厳重な処理や管理が求められるようになっている。この対策として微生物を利用して土壤の浄化を行うバイオレメディエーションが注目されている。しかし、常寒冷地でのバイオレメディエーションに関しては十分な成果が得られていない¹⁾。この技術の実用化のためには、汚染現場に内在する既存微生物と新しく混入した微生物との相関関係を明らかにすると同時に、インサイトバイオレメディエーション技術の最大の課題とされている低温での汚染物質の持続的な処理技術の確報が何より優先されなければならない。そこで、本研究では南極土壤（非汚染地域）中の微生物群集構造をポリメラーゼ連鎖反応—変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（PCR-DGGE法）を用いて解析し、寒冷地における群集構造について検討を行った。他方、北海道の某低温域由来の土壤に2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）をモデル汚染物質として供した上、さらに2,4-Dの分解能を有する菌（*Cupriavidus* sp. Y1株）を汚染土壤に導入し、群集構造の変動並びに分解について検討した。

2. 実験材料及び方法

(1) 土壤試料調製とDNA抽出

a) 南極土壤

南極土壤は4℃の培養条件においてMY (mineral salt medium and yeast extract) 培地に複数のアルキルフェノール類やテトラクロロエチレン（PCE）等の有機塩素化合物を加えて好気集積培養および嫌気集積培養を行った。これらの南極土壤、好気集積培養液および嫌気集積培養液の3つの試料からFast DNA[®] SPIN Kit for Soil

(Q-Bio Gene)を用いてDNAを抽出した。方法は同社のプロトコルに従った。

b) 北海道由来の環境試料（土壤）

環境試料は2,4-Dを土壤に混合させ、最終濃度が10 mg/kg-土壤になるように作製し、分解活性を誘導するために前培養を行ったY1株の前培養液（0.32 mg/mL protein）を接種し、暗所で静置培養した。前培養は無機塩培地（mineral salt medium）にエネルギー源および炭素源としてペプトン1000 mg/Lおよび2,4-D 200 mg/L、窒素源として酵母エキス500 mg/Lを加えたものを使用した。Y1株の接種前、接種直後及び7日培養後の3つの土壤試料からDNAを抽出した。

(2) PCR反応

抽出したDNAを鋳型としてPCR反応を行った。滅菌水：34.5 μ L, 10 $\times$ PCR buffer：5 μ L, 10 mM dNTP mix：1.5 μ L, 4 μ M 341FGCprimer：3 μ L, 4 μ M 518Rprimer：3 μ L, DNA Taq polymerase：1 μ L, 鋳型DNA：1 μ L, BSA：1 μ Lを混合し、TP-240 Thermal Cycler (Takara)で94℃10分の熱変性後、94℃1分間、53℃1分間、72℃1分間のサイクルを繰り返し、72℃10分間の伸長反応を行った。以上のPCR反応では、一般土壤細菌用のプライマーを用いて16S rDNAの177bp領域のDNAを増幅した。

(3) DGGE解析

10%ポリアクリルアミドゲル（変性剤濃度35～65%）電気泳動をDCode system (BioRad社)を用いて行いPCR産物を分離した。泳動終了後、ポリアクリルアミドゲルをSYBR Goldで30分間染色した。さらに、得られたバンドの純度を上げるために、5回DGGEを繰り返し純粋なバンドを得た。そのバンドの同定を行うためにシーケンス解析及びBLAST検索を行った。

3. 結果及び考察

(1) 南極土壌の群集構造

PCR産物をDGGEにより解析すると数本のバンドが得られた(図1)。その結果、図1のプロファイルのようにバンドaは*Syntrophus buswellii* DM-2株の16S rDNA塩基配列と89%の相同性を示し、バンドbは*Pseudomonas koreensis*株(相同性98%)、バンドc, d, eは*Pseudomonas gessardii*株と完全に一致した(相同性100%)。バンドf, g, h, i, jについてはDNA濃度が薄いため解析不可能であった。一方、南極土壌の場合一般土壌に比べ群集構造が多様ではなかったことから、寒冷地では一般土壌に比べて分解能を有する一般細菌の存在可能性が極めて低いと考えられる(データ省略)。従って、寒冷地でのバイオレメディエーションの際は、より多様な菌群が増殖できる環境作りや、外部から開発した分解微生物を直接投入する(パイオオーグメンテーション)など、より多角的な検討が必要になると考えられる。よって、北海道の某低温域由来の土壌に2,4-Dをモデル汚染物質として供した上、さらに2,4-Dの分解能を有する菌を土壌(汚染土壌)に導入し、群集構造の変動並びに分解について検討した。

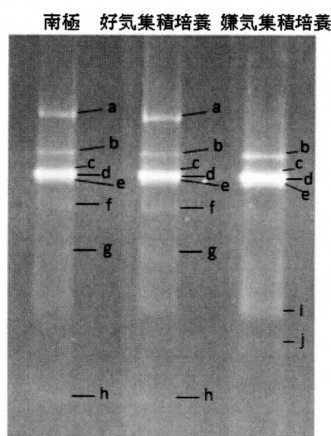


図1. 南極土壌のDGGE解析結果

(2) 模擬土壌中の2,4-D分解および群集構造

Y1株およびY1株以外の菌が土壌中の2,4-D分解に与える影響について検討した。模擬汚染土壌にY1株の培養液を接種し、各日数経過後、土壌中の残留2,4-D濃度およびPCR-DGGE解析について評価した。その結果、Y1株を接種しなかった土壌でも2,4-Dの分解が確認できたが、Y1株を供した土壌の方が2,4-Dの分解速度においてより効果的であることがわかった(図2)。

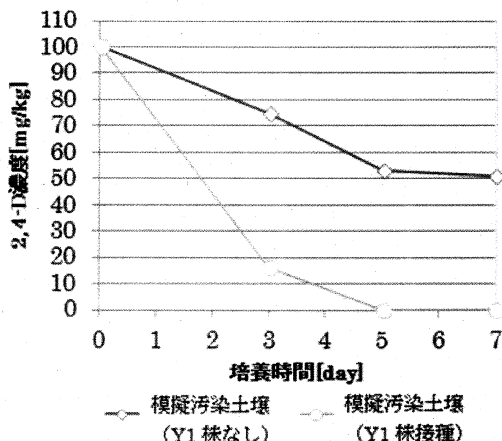


図2. Y1株による2,4-D分解能の比較

一方、PCR-DGGE解析の結果、7日後の泳動バンドでは0日目の土壌試料とは相違な新たな4本のバンド(g, h, i, j)が見られた(図3)。これらのバンドは図2の結果から考察すると、2,4-Dを炭素源として利用しうる優先種が増殖したことで、菌体濃度が高まり可視化されたと考えられる。以上の結果は、環境土壌中にはY1株以外にも分解能を有する微生物が存在し、Y1株と競合することなく、効果的に2,4-Dを分解できることを示唆するものである。今後、常低温条件での評価をさらに行う予定である。

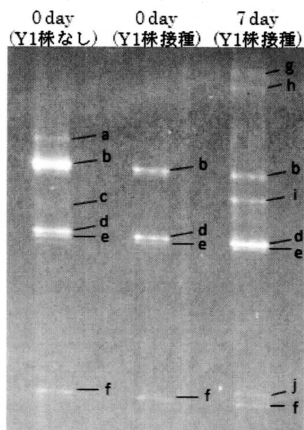


図3. 模擬汚染土壌 (Y1株接種) DGGE解析結果

参考文献

1. Margesin R, Moertelmaier C, Mair J, (2013). Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains, Int. Biodeter. Biodegr. 84: 185-191.