

## 自然環境下に放出された特定細菌の挙動解析

### Analysis of Foreign Bacteria Introduced into the Natural Environment

中 村 寛 治  
KANJI NAKAMURA

東北学院大学工学部環境建設工学科 〒985-8537 宮城県多賀城市中央 1-13-1  
TEL: 022-368-7045 FAX: 022-368-7070  
E-mail: knaka@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

Department of Civil and Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Tohoku Gakuin University, 1-13-1 Chuo,  
Tagajyo, Miyagi 985-8537, Japan

キーワード：環境影響評価, 特定細菌, 捕食, 原生動物, 18S rRNA gene, T-RFLP

Key words: Environmental assesment, foreign bacterium, grazing, protozoan, 18S rRNA gene, T-RFLP

(原稿受付 2010年10月22日/原稿受理 2010年11月11日)

#### 1. はじめに

土壌汚染分野では、微生物を利用した浄化、バイオレメディエーションが進められている。バイオレメディエーションでは微生物は開放系で利用され、人との接触機会が増すため、安全性の確保に向けて慎重な取り扱いが求められる。バイオレメディエーションには大きく分けて2種類の方法がある。1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1種類は、特定の微生物を土壌に注入して処理を行うバイオオーグメンテーションである。前者では土着微生物が利用されるため、浄化作業によって自然生態系が著しく破壊されるという危険性は小さいと考えられている。しかしながら、後者では外来の特定微生物が、土壌・地下水に注入されるため、自然生態系に及ぼす影響を評価することが求められ、経済産業省と環境省が2005年3月30日に告示した「微生物によるバイオレメディエーション利用指針」<sup>1)</sup>の中に生態系への影響評価の項目が存在する。

本研究では、複数の特定細菌を利用して、室内規模の回分実験による環境影響評価を検討した。影響を受ける自然生態系としては、一般的な自然環境である河川水および地下水を選択し、そこに生息する細菌群集への影響を Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) 法で評価した。また、添加細菌の減少に寄与していると考えられる細菌捕食性の原生動物についても解析を行った。

#### 2. 河川細菌群集への影響

本実験では、影響を受ける環境水として宮城県仙台市内を流れる広瀬川の中流域にある開成橋で2006年11月

8日に採水した河川水(採水温10.9°C, pH 7.1, TOC 1.5 mg/L)を利用した。本河川水の微生物群集は中流域から比較的安定しており<sup>4)</sup>, 評価の検討には適していると判断した。実験手法は、既報の論文<sup>6)</sup>に示すとおりで、河川水中の全菌数を蛍光顕微鏡にて直接計測した後、その全菌数(1.1×10<sup>6</sup> cells/mL)に対して、特定細菌として利用したグラム陰性細菌 *Cupriavidus necator* KT1 株(以下、KT1 株)を1%, 10%, 50%の割合で添加した。サンプルは新品のプラスチックチューブ(FALCON 社製, 50 mL ポリプロピレンコンカルチューブ)に50 mL ずつ分注し、密栓をした。分注サンプルは、1系列につき、5本用意し、20°Cで静置培養、実験開始後0, 5, 10, 20, 30日目に1本ずつ開封し、微生物群集の解析を行った。密栓したチューブには約10 mLの気相部分があり、試験期間中、好氣的条件(溶存酸素濃度6 mg/L以上)が維持された。KT1 株は、千葉県内にあるトリクロロエチレン(TCE)汚染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>3)</sup>。

蛍光標識プライマーでPCR増幅した16S rRNA 遺伝子を基に細菌群集構造のT-RFLP解析を行い、図1に示すT-RFプロファイルを得た。図中のAは無添加の対照系、Bは1%添加系、Cは10%添加系、Dは50%添加系である。C、Dでは添加されたKT1株の初期ピーク(202 bases)を確認できたが、Bでは小さすぎて確認できない。また、C、DでのKT1株ピークは5日目にはほとんど認識できないレベル(1%以下)にまで低下した。5日目での全てのT-RFプロファイルは極めて似ており、細菌群集の相似性が維持されつつ、KT1株のみが特異的に減少した事がわかる。その後、相似性は経過日数と共に小さくなった。

この様な視覚的に把握した細菌群集の変化を統計学的

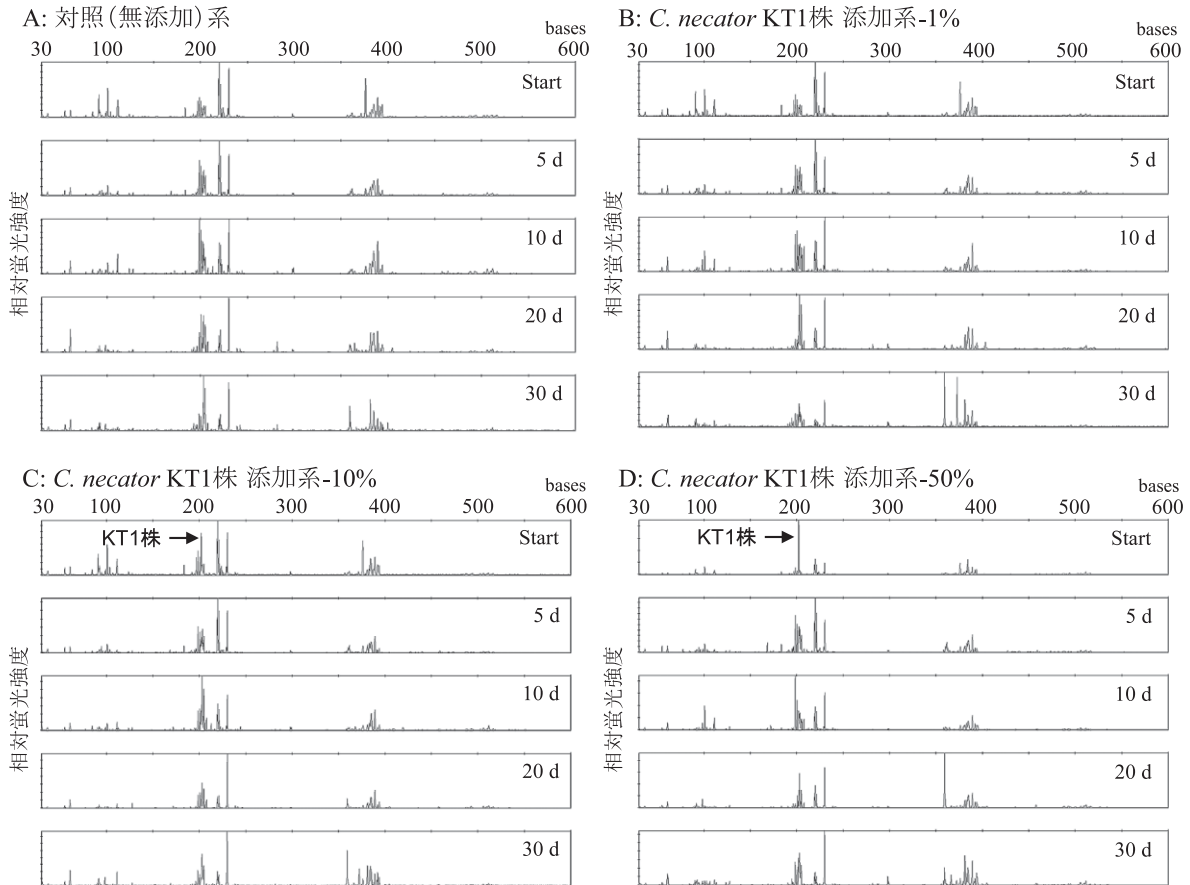


図1. KT1株添加系でのT-RFプロファイルの経時変化。  
(各TR-Fプロファイルは制限酵素 *Bst*UI 切断によるもの。右端の数字は経過日数。)

に評価するため、多次元尺度法による解析を行い<sup>6)</sup>、図2に示す結果を得た。決定係数RSQ値は0.964、Stress値は0.099であり、解析結果が良好であることを示している。図2では、経過日数毎に4つの系全てを楕円で囲んである。0日目では、50%添加系は多量のKT1株添加によって他の系から大きく離れた。5日目は4つの系が最も近づき、その後、日数の結果に伴って徐々に相似性が失われた。本影響評価を行う場合、全く同じ河川水を培養しても、日数の経過に伴って細菌群集の相似性は徐々に低下することが明らかになっており<sup>6)</sup>、このような自然変化は避けられないものと判断する。

これらの解析データから、KT1株が広瀬川河川水に添加されても、短期間にその数が減少すると共に、土着の細菌群集に与える影響は低いと判断できる。このような回分実験による評価は簡便に、短期間に行うことができ、環境水に特定細菌を添加する際の第1段階の評価として利用可能であると判断できる。

### 3. 地下水細菌群集への影響

前項では、河川水を利用し、土着細菌群集構造への影響を評価した、本項では土壌・地下水浄化を想定し、都内地下水により、同様の評価を行った結果を示す<sup>9)</sup>。

通常、地下水は河川水の様に十分に曝露された状態で存在していない。それゆえ、評価試験で地下水を試

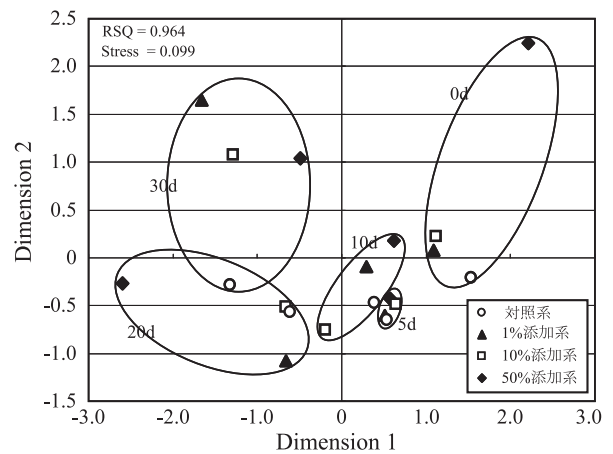


図2. 河川水にKT1株を添加した系の解析。  
(4つの系の、経過日数毎の変動範囲を楕円で示す。)

験容器に移す際、空気さらされ環境が大きく変化し、対照系の微生物群集構造の変化は河川水のそれと比較して著しい。しかしながら、自然変化が著しい場合でも、本評価手法における対照系と添加系の自然変化が同様であれば、評価は可能であると考えた。

東京都内の2ヶ所の井戸(深さ20m)から、それぞれ地下水サンプルGW1(pH 7.37, TOC 5.8 mg/L, 全菌数  $3.0 \times 10^5$  cells/mL)およびGW2(pH 7.68, TOC 1.7 mg/L, 全菌数  $3.0 \times 10^5$  cells/mL)を採水し、前項同様に全

菌数に対して、50%のKT1株およびグラム陽性細菌 *Rhodococcus erythropolis* IAM1399株（以下、IAM1399株）の2種類の細菌をそれぞれ添加し、その挙動および土着細菌群集への影響を評価した。

以下の図3、4に、蛍光標識したプライマーによりPCR増幅した16S rRNA遺伝子の *Bst*UI 切断により得られたT-RFプロファイルを基に、多次元尺度法による解析を行った結果を示す。

地下水GW1にKT1株およびIAM1399株を添加した場合の結果を図3のA、Bにそれぞれ示す。添加された2種類の細菌は5日目(5d)までに速やかに減少した。一方、他の細菌群集は残存し、相似性は回復した。それぞれの系で、一時的に相似性が低下することはあったが、概ね高い相似性は維持され、30日目でも高い相似性が維持された。

地下水GW2に2種類の菌株を添加した場合の結果は、図4に示すとおりである。先のGW1の場合と異なり、添加した2種類の菌株はどちらも低下することなく、地下水中に残存したことが、T-RFプロファイルから確認できた(データ示さず)。それゆえ、細菌群集構造の相似性は図4のA、Bに示すとおり、10日目まで若干増すものの、概ね全実験期間を通して低かった。

これらの結果から、KT1株およびIAM1399株を、GW1の地下水系に添加しても、添加細菌は短期間に減

少し、土着細菌群集に与える影響は小さいと評価できる。一方、これらの細菌をGW2の地下水系に添加した場合は、添加細菌は長期にわたって残存するため、土着の細菌群集に何らかの影響を与える可能性があることが示唆される。この様に、簡単な回分実験により、前項の河川環境に加えて、地下水環境への添加細菌の影響も同様に評価できる見通しが得られた。

#### 4. 細菌捕食性原生動物の解析

これまでの評価実験から、評価対象の水系によって、添加細菌が速やかに減少する場合と、ほとんど減少しない場合があることが明らかとなった。添加細菌減少は図1に示すように、T-RFプロファイルによって確認できることから、添加細菌(のDNA)そのものが減少していることが分かる。この様に菌体成分が減少する原因としては、原生動物による捕食が考えられる。捕食では、菌体成分全てが減少するためDNAレベルの低下現象と矛盾は無い。

そこで、細菌捕食性の原生動物の存在を調査するために、2.で環境影響評価を行うために使用した広瀬川の開成橋地点の河川水(2.の実験とは採水日が異なる)を利用して、河川水中に細菌捕食性の原生動物が生息しているか否かを検討した<sup>9</sup>。河川水にKT1株を添加し、

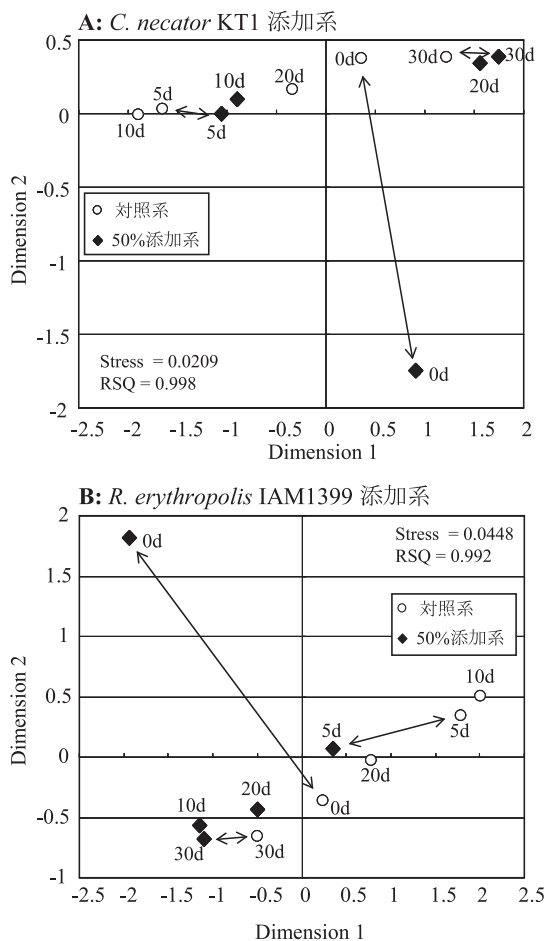


図3. 地下水GW1に細菌を添加した系の解析。(0, 5, 30日目の差異度を矢印で示す。)

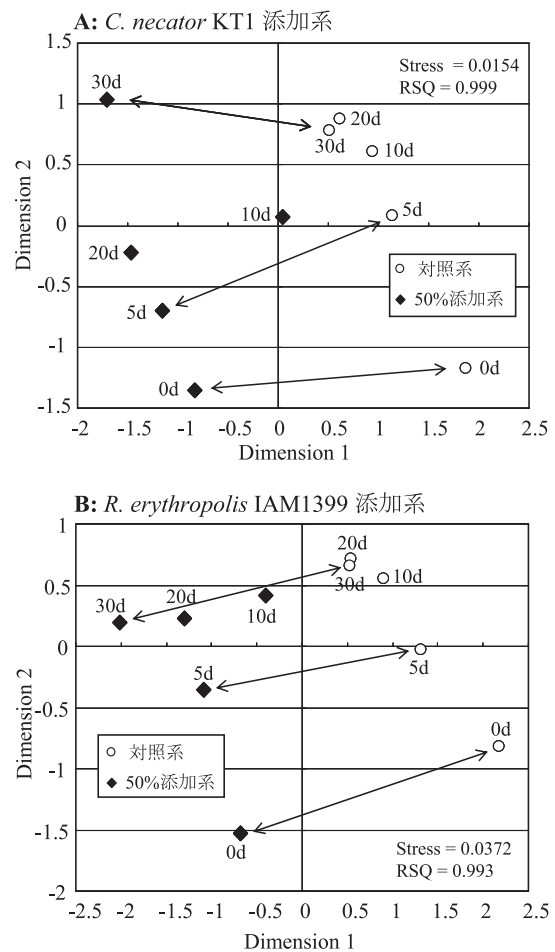


図4. 地下水GW2に細菌を添加した系の解析。(0, 5, 30日目の差異度を矢印で示す。)

600 nm での吸光度  $A_{600}$  で  $0.2$  ( $6.2 \times 10^8$  cells/mL) に調整した KT1 株添加河川水 5 mL を試験管に入れ、 $20^\circ\text{C}$ 、 $180$  rpm で培養、吸光度の経時変化を図 5 に示すように測定した。培養を開始して 3 日目には吸光度は急激に低下し、顕微鏡により図中に示す 1 種類の原生動物、鞭毛虫、が数多く観察された。また、本実験で、KT1 株添加前、および捕食後のサンプルから抽出した DNA を基に 18S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、図 6 に示すように T-RFLP 解析を行った。KT1 株を添加する前の河川水は複数のピークが観察されたが、捕食後のサンプルでは、1 種類の原生動物の増殖、優占化によって、ピークは 1 本 (342 bases の位置) となった。本 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した所、(Accession Number: AB455149)、Chrysophyceae (黄金色藻綱) 中の Unclassified Chrysophyceae と位置付けられている、*Spumella-like flagellate* JBC07 株<sup>2)</sup> (Accession Number: AY651097) と配列は 100% 一致した。

広瀬川河川水中には本原生動物が生息しており、添加された KT1 株を捕食したと考えられる。また、広瀬川河川水や地下水を使って行った環境影響評価試験では T-RF プロファイルの中の添加細菌のピーク減少が 5 日目で起きているが、本捕食実験での添加 KT1 株の著しい減少が 3 日目で観察されたことと、時間的に矛盾は無い。さらに詳細な解析による証明が必要であるが、環境影響評価試験における添加細菌の減少の理由として、細菌捕食性の原生動物の存在が示唆された。

本実験で観察された捕食現象が、使用した KT1 株での特異的な現象ではないことを確認するために、*Bacillus subtilis* 168, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, IAM1399 株、および市販の微生物製剤から単離された 2 種の *Bacillus* 属細菌を使って同様の試験を行った<sup>5,7)</sup>。その結果、他の細菌種でも吸光度 (= 細菌数) の低下と、

それに対応する原生動物の増加が観察され、KT1 株での特別な現象ではないことが確認された。

## 5. ま と め

これまでの実験結果から、簡単な回分試験によって、河川水や地下水等の自然環境水に特定細菌を添加した場合の影響評価を行うことが可能であることが示唆された。

環境影響評価については、様々な意見があり、全ての意見に対応できるような具体的な手法は、残念ながら存在しない。土壌・地下水浄化に適用する処理手法、細菌種、場所、範囲によっては、さらに詳細な評価を行う必要がある場合も想定される。本研究の手法は、あくまで第 1 段階の影響評価として、客観的な判断データを得ることが可能であることを示しているに過ぎず、継続的に改良を重ねる必要があることは明白である。

また、本研究では、添加細菌の残存に細菌捕食性の原生動物が関与している可能性が示唆された。本現象を詳細に解析するため、我々は定量 PCR 等の分子生物学的な手法の適用を試みると共に<sup>7)</sup>、原生動物を単離して、捕食現象の解析を開始したところである<sup>8)</sup>。今後は、添加細菌と原生動物に関する詳細なデータを取得し、自然界に放出された特定細菌の挙動に、どの様な種類の原生動物が、どの様な機構によって関わりを持っているのかを調査し、さらなる評価手法の改良に取り組んでいきたい。

## 謝 辞

本研究は、経済産業省、平成 19 年度環境対応技術開発等 (バイオインダストリー安全対策調査) 事業、および平成 22 年度科学研究費基盤研究 B 課題番号 22360216 の助成を受けて実施したものである。

## 文 献

- 1) 微生物によるバイオレメディエーション利用指針、経済産業省及び環境省。2005 年 3 月 30 日告示。
- 2) Boenigk, J., K. Pfandl, P. Stadler, and A. Chatzinotas. 2005. High diversity of the 'Spumella-like' flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions. *Environ. Microbiol.* 7: 685–697.
- 3) Hanada, S., T. Shigematsu, K. Shibuya, M. Eguchi, T. Hasegawa, Y. Suda, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. 1998. Phylogenetic analysis of trichloroethylene-degrading strains newly isolated from the polluted soil with the contaminant. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 539–544.
- 4) 中村寛治, 濱谷美希, 相澤瑛美, 阿部晋太郎, 川口 猛. 2008. 広瀬川河川中に生息する細菌群集構造の季節変動. *環境工学研究論文集.* 45: 415–422.
- 5) 中村寛治. 2009. 平成 20 年度環境対応技術開発等 (バイオインダストリー安産対策調査) 報告書. 89–116.
- 6) 榎 あや, 奥山加代子, 中村寛治. 2008. 特定細菌放出に伴う土着細菌群集への影響: 評価手法の検討. *環境工学研究論文集.* 45: 203–210.
- 7) 須藤真志, 高野智博, 中村寛治. 2009. *Bacillus* 属細菌を捕食する河川中の原生動物の解析. *環境工学研究論文集.* 46: 511–519.
- 8) 須藤真志, 中村寛治. 2010. 広瀬川河川水からの *Bacillus* 属細菌捕食性原生動物の単離および解析. *環境工学研究論文集.* 47: 85–91.

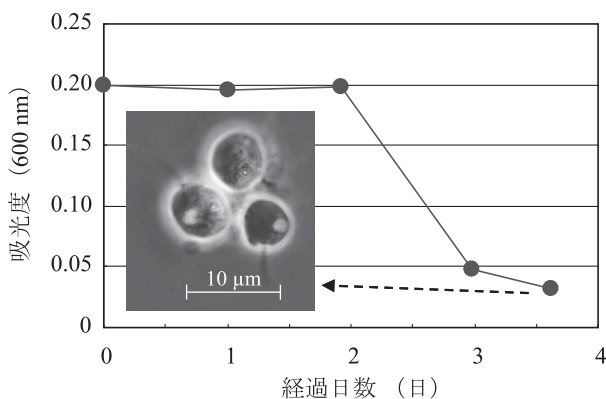


図 5. KT 株添加河川水の吸光度変化。  
(図中の写真は観察された原生動物。)

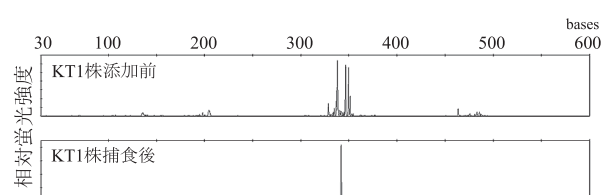


図 6. 捕食前後の 18S rRNA 遺伝子 T-RF プロファイル変化。