

総説論文

トリクロロエチレン汚染現場の浄化における分子生物学的手法の利用

Molecular biology techniques used in bioremediation of a trichloroethylene-contaminated site

中村 寛治*, 石田 浩昭, 飯泉 太郎

KANJI NAKAMURA, HIROAKI ISHIDA and TARO IIZUMI

栗田工業(株)技術開発センター 〒243-0124 神奈川県厚木市森の里若宮7-1

* TEL: 046-270-2120 FAX: 046-270-2159

* E-mail: kanji.nakamura@kurita.co.jp

Corporate Research and Development Center, Kurita Water Industries Ltd., 7-1 Wakamiya,
Morinosato, Atsugi-city, Kanagawa, 243-0124, Japan

キーワード: バイオレメディエーション, トリクロロエチレン, 16S rDNA, クローン

Key words: Bioremediation, Trichloroethylene, 16S rDNA, Clone

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においては、反応槽内は種々の微生物が混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かかる上、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な要因と考えられる。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 を標的とした Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)³⁾ 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)⁸⁾ や Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)⁹⁾ などの分析技術の発達により、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、生物学的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、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。

RITE (財団法人 地球環境産業技術研究機構) 土壌浄化プロジェクトでは、トリクロロエチレン (TCE) 汚染の浄化を目的に、メタンを利用したバイオスティミュレーション (土着細菌の活性化)、および TCE 分解菌を直接注入するバイオオーグメンテーションを行った。また、前述の問題に対応すべく、出現微生物の詳細な解析も実施した。

バイオスティミュレーションでは TCE で汚染されている汚染現場にメタンを注入して 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¹³⁾。誘導される MMO には soluble の MMO (sMMO) と particulate の MMO (pMMO) がある²⁾ が、主として sMMO によって TCE 分解が起きる¹³⁾。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¹¹⁾、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 による解析を検討した。

また、バイオオーグメンテーションでは、汚染現場より単離した、TCE 分解能を有するフェノール酸化細菌 *Ralstonia eutropha* KT-1¹²⁾ を TCE 汚染サイトに直接注入したが、本菌株の地下水中で挙動を把握するため、Real-Time PCR 装置を利用した特定細菌の定量検出を検討した。標的 DNA は repetitive extragenic palindromic (REP) sequence からデザインされたプライマーを用いる REP-PCR¹⁾ により合成される DNA 断片とした。REP-PCR により合成される DNA 断片は、簡便に得られ、特定の菌株をサザンブロットにより検出するための標的 DNA として有効であることが、すでに現場試験で

確認されている。

これら 2 種類の現場実験で得られた結果を基に、分子生物学的な分析技術のプロセス管理手法としての有効性を述べる。

2. RITE 土壌浄化プロジェクト

RITE 土壌浄化プロジェクトは、微生物の機能を利用して難分解性の環境汚染物質を効率的に分解する土壌・地下水浄化技術を開発することを目的に平成 7 年度より開始され、平成 12 年度まで 6 年にわたって実施された。具体的には、対象物質として汚染例が多い TCE を選択、最終的には実際の汚染現場（千葉県君津市内）を使って地下水飽和帯に対する原位置バイオレメディエーションの現場実証試験を行った。RITE のホームページでも紹介されたプロジェクトの概念図を図 1 に示す。本図は、メタン注入によるバイオスティミュレーションの概略を表しており、炭素源（メタン）・栄養塩・空気（実際には酸素が利用された）の供給、および増殖した TCE 分解微生物による浄化の様子が示されている。この他、図中には分解メカニズムの解析、遺伝子を利用した微生物のモニタリング、微生物探索などが行われることが示されている。微生物探索は、バイオグメンテーションに利用する細菌の探索のため行われ、最終的に汚染現場由来の細菌、*R. eutropha* KT-1 が選出された。本菌株はフェノールおよびトルエンの誘導により TCE 分解能を発現する。室内実験による詳細な検討を行った後、TCE 分解のため本菌は汚染現場地下水中に注入され、その地下水中での挙動、土着細菌への影響も調査された。このように、本プロジェクトでは、浄化プロセスの実証のみでなく、TCE 分解微生物の探索およびモニタリング、出現微生物の挙動解析など、幅広い分野にわたって研究が進められた。参加企業は、荏原製作所、オルガノ、鹿島建設、栗田工業、清水建設、海洋バイオテクノロジー研究所で、共同研究先として君津市、生命工学工業技術研究所（当時）、大阪大学大学院 薬学研究科も加わった。

3. バイオスティミュレーション実証試験

3.1. 実証現場および実験方法

TCE 分解のため注入される物質としてはメタン、およびフェノール・トルエンのような芳香族があるが、安全を考慮してメタンが選択された。メタン注入を行った現場の井戸配置および運転条件を図 2 に示す。帯水層は地表面から 1～5.5 m の深さであった。メタンは循環された地下水中に溶解し、酸素・窒素・リンと交互に、IW より約 3 ヶ月間（1998 年 9 月 24 日～12 月 21 日）注入した。揚水は RW より行い、M5, M1 で定期的に地下水のサンプリングを行った。地下水サンプル（100 mL）からの DNA の抽出、16S rDNA の PCR 増幅（プライマーは、Bact0011【5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'】および Bact1492【5'-ACGGYTACCTTGTTAGGACTT-3'】⁹⁾）を使用）、16S rDNA クローン取得、は既報の論文⁹⁾に従った。1 サンプルの抽出 DNA について 48 の 16S rDNA クロンを取得、3 種類の制限酵素（*Bst*UI, *Hha*I, *Rsa*I）によりそれぞれ切断した後、アガロース電気泳動により切断パターンを比較した。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。出現頻度が 2 以上の Phylotype に関しては、代表クロンの前方約 500 bases の塩基配列を決定した。得られた塩基配列データはインターネット上で Ribosomal Database Project II (RDP) に送付、近縁種を決定した後、ClustalX により系統解析を行った。また、T-RFLP により微生物群集構造の解析を行った。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が、解析では 6-FAM 側のデータのみを利用した。増幅 DNA は精製し、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。さらに、前述の塩基配列の結果から、その Phylotype が、T-RFLP

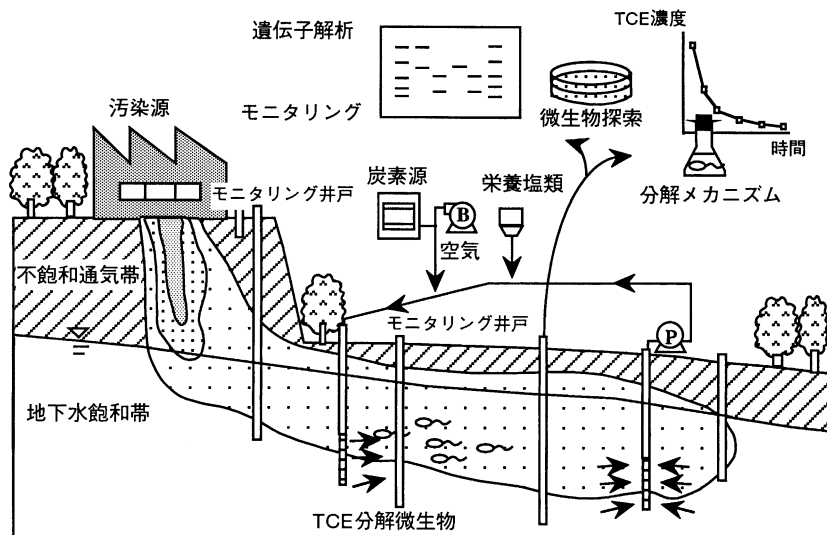


図 1. RITE 土壌浄化プロジェクトの概念図。

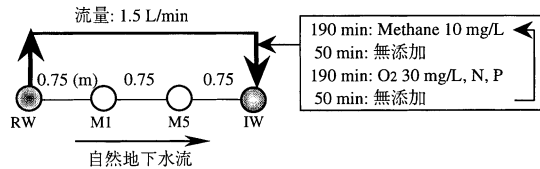


図 2. バイオスティミュレーションの井戸配置および運転条件.

解析において出現するピーク位置を推測し、T-RFLP の結果との照合を行った。

以上の分子生物学的手法の利用方法を整理すると図 3 に示すようになる。1 サンプルの解析に約 7 日を要する 16S rDNA クローン解析は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。この様な手法の利用、組み合わせによって、微生物群集構造を遅滞なくモニタリングでき、実処理でのプロセス管理への適用が可能となる。

3.2. 実験結果および考察

1) バイオスティミュレーションによる TCE の分解
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) を図 4 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、地下水中でメタン資化性細菌による TCE の分解が行われたと考えられる。

2) 16S rDNA クローンの解析
地下水中から抽出した DNA を基に PCR 合成された 16S rDNA の解析は、メタン注入前 (1998 年 9 月 24 日) および注入後 (1999 年 2 月 1 日) に 1 回ずつ、メタン注入中は 3 回 (1998 年 10 月 19 日, 11 月 24 日, 12 月 21 日) 行

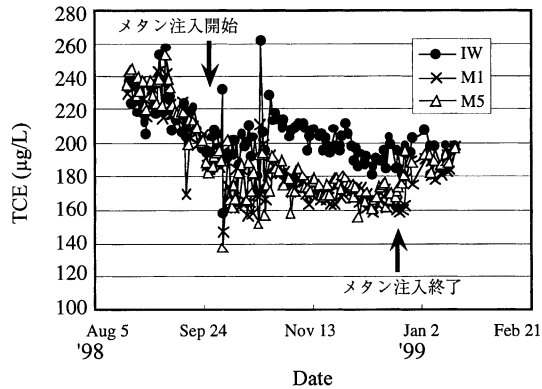


図 4. バイオスティミュレーションにおける TCE の分解.

った。また、付着細菌に関しては井戸中に挿入したガラスビーズへの付着細菌を基に 1 回 (1998 年 12 月 1 日) 解析を行った。塩基配列を決定した 16S rDNA 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、図 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 - サンプル日 (月・日・年) - サンプル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 以上の場合に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①～⑤の記号を付記した。微生物解析の期間中、メタン資化性細菌の近縁種は、*Methylophilus* Group, *Methylophilus methanica* Subgroup, *Methylosinus trichospori-*

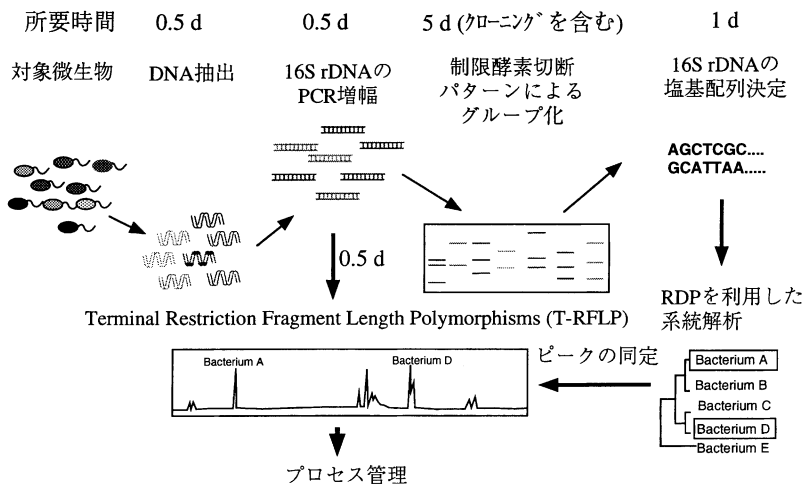


図 3. 分子生物学的手法を利用した微生物分析の流れ.

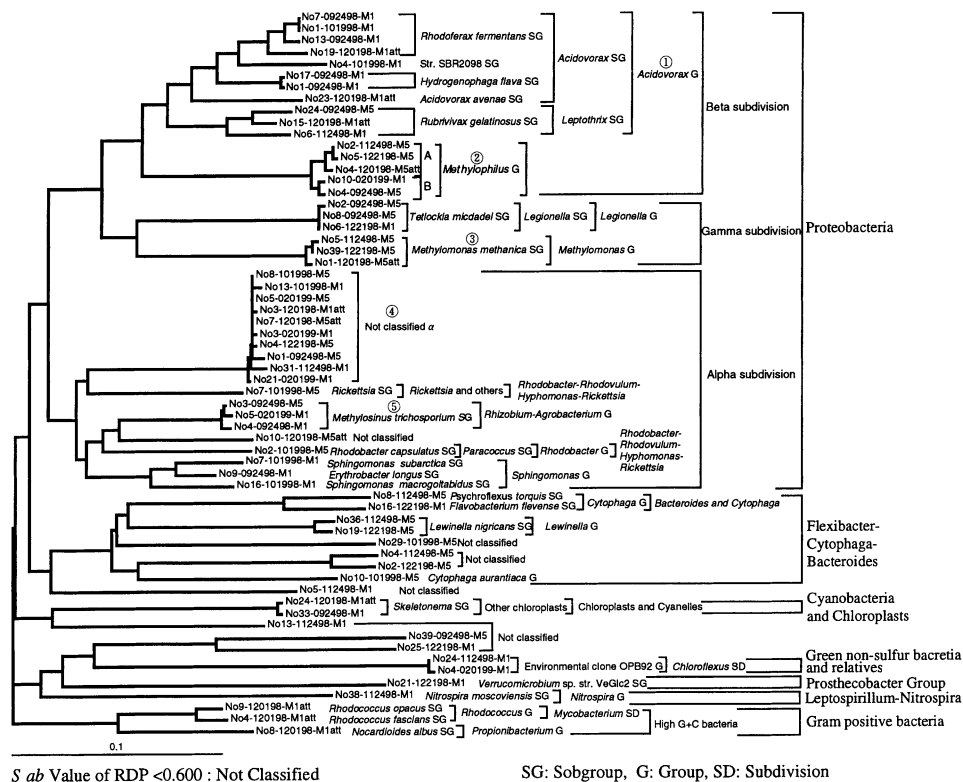


図5. バイオスティミュレーションで取得された 16S rDNA クローンの系統解析結果。

um Subgroup の3種類が検出された。*Methylophilus* Group は24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。検出時期から分かるように、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が、検出された期間がメタン注入期間と関係がないことから、この地域の土着細菌と思われる。また、取得した 16S rDNA クローンの中に病原菌、日和見感染菌等の危険な細菌は見出されなかった。

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 M5 地下水での T-RFLP の結果を図6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 (*Bst*UI, *Hha*I, *Rsa*I) で切断した。また、16S rDNA クローンの塩基配列解析結果から、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(3種類の制限酵素の適用により正確性が増す)。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。M5 地下水で、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(図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、図5に示した 16S rDNA 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。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し、モニタリング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効に活用していけると思われる。

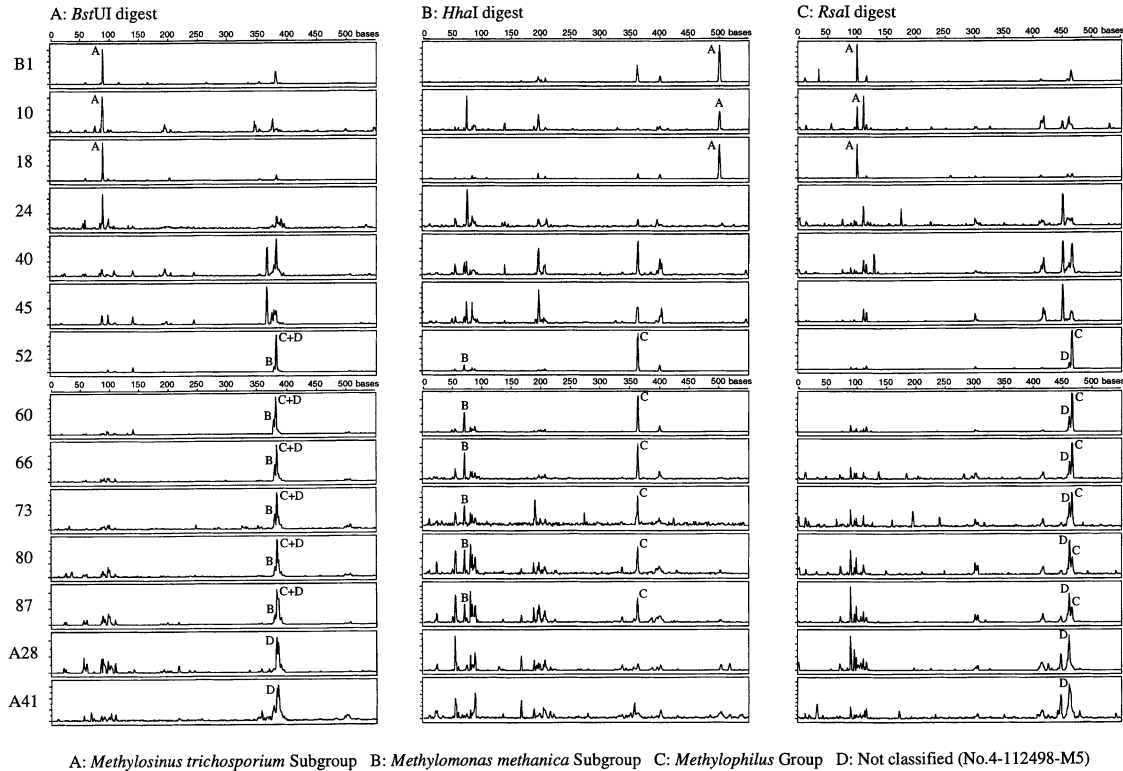


図 6. M5 地下水の抽出 DNA から増幅された 16S rDNA の T-RFLP 解析結果。
(左端の数字 B1 はメタン注入前日を表す。A28, A41 はそれぞれメタン注入停止後28日目, 41日目を表す。その他はメタン注入後の経過日数。)

4. バイオオーグメンテーション実証試験

4.1. 利用細菌の決定および審査

現場に注入する TCE 分解菌の選出, および注入に関しては慎重に進められた。まず, 利用細菌の候補としてメタン資化性細菌およびフェノール(あるいはトルエン)資化性細菌を数株選出した。それら菌株の TCE 分解能を室内実験により評価したところ, フェノール資化性細菌の方が優れていたため, フェノール資化性細菌を利用することとした。フェノール資化性細菌は, 現場より単離された菌株および外部から単離された菌株を保有していたが, 微生物生態系への影響度がより少ないであろうとの判断から, 現場単離株の中で安全かつ比較的 TCE 分解能の高い (TCE 分解速度, TCE 分解能の安定性等を評価) *R. eutropha* KT-1 を選出した。本菌株は, フェノールおよびトルエンを分解する酵素が TCE を分解する。*R. eutropha* は, 土壌, 水より一般的に分離される細菌であり, 病原性の報告はない。また, 国立感染症研究所のバイオセーフティレベル⁹⁾では1に分類され, 安全な細菌であると判断した。

本菌株は, 平成1998年5月に改正された「組換え DNA 技術工業化指針」に基づいて, 審査が行われた。新しい指針では, 従来の(準)閉鎖系利用の第一種利用に加え, 環境浄化分野等を対象とした開放系利用の第二種が追加された。本来は組換え体を対象とした指針であるが, 当面は組換え体でない自然微生物の利用に際しても指針が適用されることになっている。具体的に, 本件では, 工業化計画の安全性確認を求める申請書を指針に

従って作成, 必要な説明資料と共に提出し, 化学品審議会組換え DNA 部会の下に設置された第二種利用分科会にて審議が行われた。本審議会では, 利用細菌はもとより, TCE 分解による代謝産物や処理プロセスに関しても審査が行われ¹²⁾, KT-1 株の利用実施計画について平成1999年5月に公式な安全確認書を取得した。

4.2. 証現場および実験方法

現場試験を行ったサイトの井戸配置図は図7に示す通りである。この区域の地下水中の TCE 濃度は数百 $\mu\text{g/L}$

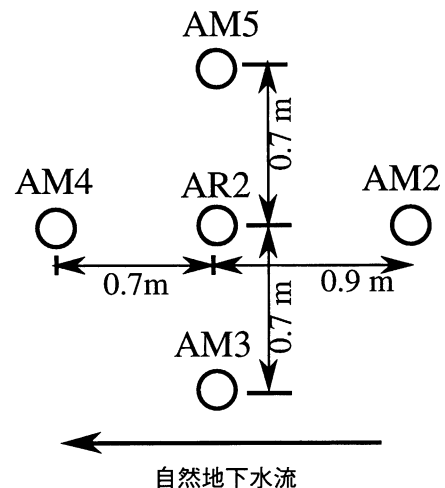


図 7. バイオオーグメンテーションの井戸配置。

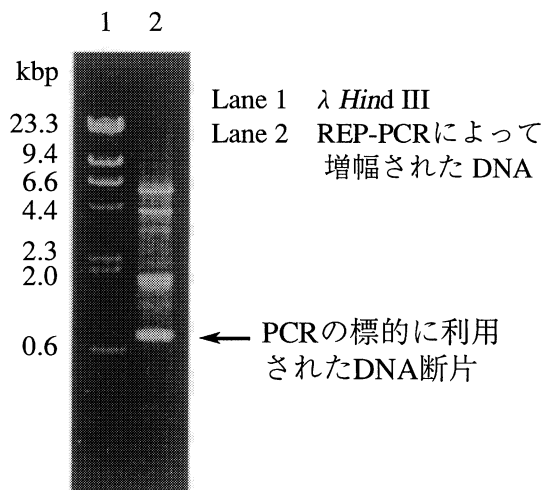


図8. REP-PCR 合成 DNA のアガロース電気泳動.

のレベル、地下水面は地表から約 9.5 m の深さにあり、帯水層の厚みは約 10 m であった。バイオオーグメンテーション実験に利用した *R. eutropha* KT-1 は試験に際しトルエンで TCE 分解酵素の誘導を行った。準備された 700 L の菌体懸濁液 ($OD_{600}=11$) 700 L は、脱塩素水道水で約11倍に希釈した後、10 L/min の流量で AR2 より11時間かけて注入した。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、AR2 から 3 L/min の流量で揚水を行った。総注入量は 9.6 m³、揚水量は実験終了までの51日間で 220 m³ となった。地下水中の KT-1 株検出のため、Real-Time PCR (ロシュ・ダイアグノスティック製 LightCycler を使用) による定量検出を、AR2 および周辺のモニタリング井戸 (AM2, AM3, AM4) の地下水を対象に行った。標的 DNA は repetitive extragenic palindromic (REP) sequence からデザインされたプライマーを用いる REP-PCR により合成された DNA 断片 (図8) の内、800 bp の断片とし、DNA 塩基配列を決定した上で、プライマー、ハイブリダイゼーションプローブのデザインを行った。REP-PCR 合成 DNA は非常に特異性が高く、株レベルの検出に利用できることが知られている⁷⁾。その他の実験条件の詳細は既報の論文⁹⁾ を参照されたい。

4.3. 実験結果および考察

1) バイオオーグメンテーションによる TCE の分解

バイオオーグメンテーション実験で、KT-1 株を注入した井戸 AR2 で観察された TCE の濃度変化を図9に示す (X 軸の0点は揚水開始時)。注入水にはトレーサーとして Br を添加、その濃度も同時にイオンクロマトによって測定した。図9には KT-1 株の注入に先立って行われたブランク試験 (KT-1 株の菌懸濁液の代わりに同量の脱塩素水道水を注入) の結果も表示した。トレーサーとして加えられた Br はブランク試験と KT-1 注入試験においてほぼ同じ挙動を示しているが、TCE 濃度の上昇は、KT-1 株を注入した場合には著しく遅い。このことから、注入された KT-1 株により、現場地下水中

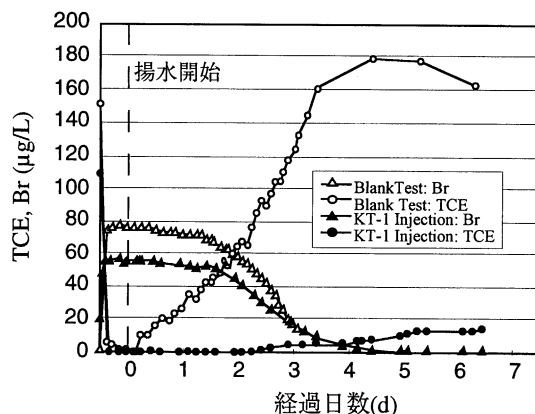


図9. 注入/揚水井戸 AR2 での TCE および Br 濃度変化.

の TCE が効果的に分解されたことが分かる。

2) Real-Time PCR による KT-1 株の検出

次に KT-1 株の検出結果を図10に示す。KT-1 株を注入する前、サンプリングを行った全ての井戸において KT-1 株は全く検出されなかった。KT-1 株注入後は全ての井戸において菌数は 10^8 cell-DNA/mL レベルに増加、揚水後は速やかに減少した。減少速度は井戸によって異なり、最も早く減少したのは AM4 で、続いて、AM3, AR2 となった。AM2 は揚水開始後4日目までは順調に低下傾向を示したが、その後減少速度は著しく低下した。また、揚水開始後51日目の最終的な到達菌濃度は、減少が停滞傾向にあった AM2 で検出限界 (21 cell-DNA/mL) 以下であったが、その他の井戸では検出され、 $10^2 \sim 10^3$ cell-DNA/mL であった。この結果から、注入された KT-1 株の濃度は 10^2 cell-DNA/mL レベルまでは急速に低下するが、そのレベルで停滞傾向を示すことが分かった。

このように、REP-PCR により増幅される DNA 断片中の塩基配列からデザインしたプライマーを利用する Real-Time PCR により、対象微生物の高感度な検出が可能であることが明らかとなった。PCR により特定の分解能を有する細菌を検出しようとする場合、分解遺伝子を標的にするのが一般的な方法である。しかしながら、そのためには、あらかじめ分解遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した後、すでに報告されている分

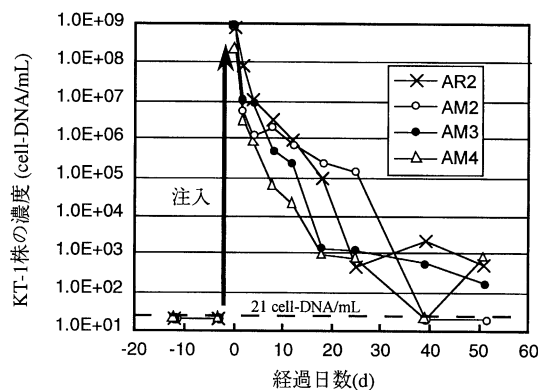


図10. 地下水中の KT-1 株の濃度変化.

解遺伝子と塩基配列を比較し、プローブを作成することになる。一方、REP-PCR ではこの様な特定の遺伝子の取得、および他の遺伝子との比較を行う必要がなく、簡便である。それゆえ、分解遺伝子などの情報が全くない菌株にも利用が可能である。本試験では、地下水に注入された約 10^9 cell-DNA/mL の細菌が、 10^2 cell-DNA/mL レベルまでは速やかに減少する過程を現場で初めて明らかにでき、その意義は大きい。この残存レベルが高いか否かは、さらに議論の必要があるが、少なくとも 21 cell-DNA/mL の検出限界を有する検出法の利用に目処がついたことにより、今後はバイオオーグメンテーションを管理可能なプロセスとして利用していけると考えられる。

3) T-RFLP 解析による微生物生態系影響評価

バイオスティミュレーションの場合と同様に行われた AR2 地下水の T-RFLP 解析結果を図11に示す。解析は KT-1 株注入前に 2 回行い (図中左端の B12, B3), KT-1 株注入後は51日目まで行った。これらの結果は、同時に行った 16S rDNA クローン解析の結果と照合し、それぞれのピークがどのような細菌由来であるかを決定した。KT-1 株注入前に優占種であった E の β Subdivision, *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group (2 Group は系統的に近縁でピークで区別できなかった) は KT-1 注入後は検出されなくなるが18日後には再び優占種となっていることが分かる。また、F の未同定微生物 (RDP の系統解析で近縁種が見出せなかった) は KT-1 株注入後18日目と初めて検出され、39, 51日目と検出された。ここには示していないが、AM2, AM3, AM4 でも同様の T-RFLP 解析を行った。AR2 の結果と同様に、KT-1 株注入前に優占種であった A の *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group

は KT-1 株注入後は検出されなくなるが、約 2 週間後には再び優占種となった。以上のように、どの井戸でも注入前に優占種であった E の *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group は KT-1 注入後は一端検出されなくなるが、その後の揚水に伴って再び優占種として出現することが明らかとなった。それゆえ、バイオオーグメンテーションによる微生物生態系への影響は短期的かつ可逆的であり、致命的なダメージを与えていないことが示唆された。

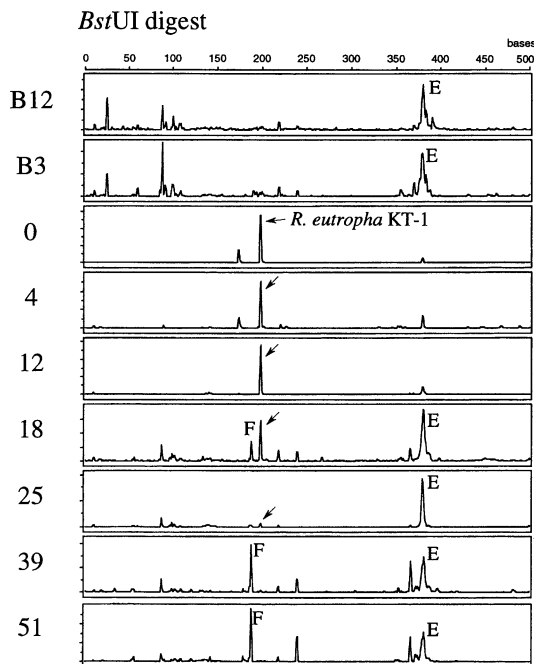
5. おわりに

本プロジェクトを通して、バイオレメディエーション (バイオスティミュレーションおよびバイオオーグメンテーション) の TCE 分解における有効性を現場試験を通して実証することができた。また、処理プロセスに比べて研究の進展が遅れている出現微生物解析に関しても、16S rDNA を基にした解析手法の現場適用の目処が立ち、処理に関与する微生物について貴重な情報が得られた。さらに、注入微生物の検出に関しては、Real-Time PCR の利用により極めて高感度での追跡が可能となった。今後は、このような分子生物学的手法を利用した解析が継続して行われることにより、微生物を使用する際の未知の不安が徐々に低減され、開放系での有効利用がますます盛んにな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。

文 献

- 1) 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. 58: 2180-2187.
- 2) 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. 130: 3327-3333.
- 3) DeLong, F.E., G.S. Wickham, and N.R. Pace. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for identification of single cells. Science. 243: 1360-1363.
- 4) 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. 63: 2397-2402.
- 5) 国立感染症研究所. 原体等安全管理規定 (平成11年4月1日 一部改正).
- 6) 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. 63: 4516-4522.
- 7) Matheson, V.G., J. Munakata-Marr, G.D. Hopkins, P.L. McCarty, J.M. Tiedje, and L.J. Forney. 1997. A novel means to develop strains-specific DNA probes for detecting bacteria in the environment. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2863-2869.
- 8) Muyzer, G, A.C.D. Wall, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing



E: *Nitrosomonas* or *Azoarcus* Group, F: Not classified

図11. AR2 地下水の抽出 DNA から増幅された 16S rDNA の T-RFLP 解析結果。

(左端の数字 B12, B3 は注入12日前, 3 日前を表す. その他は注入後の経過日数. 矢印は KT-1 株を示す.)

- gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.
- 9) 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資化細菌 *Ralstonia eutropha* KT-1 株の PCR による定量検出. 環境工学研究論文集. 37: 267-278.
 - 10) 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. 38: 175-186.
 - 11) Semprini, L., P.V. Roberts, G.D. Hopkins, and P.L. McCarty. 1990. A field evaluation of in-situ biodegradation of chlorinated ethenes. Part2. Results of biostimulation and biotransformation experiments. Ground Water. 28: 715-727.
 - 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. 29: 380-385.
 - 13) Tsien, H.C., G.A. Brusseau, R.S. Hanson, and L.P. Wackett. 1989. Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. Appl. Environ. Microbiol. 55: 3155-3161.