

3P-103 酸化亜鉛ナノ粒子が微生物生態系に及ぼす変化

○渡邊 一史, 佐藤 成朗, 栗山 雄太, 野村 俊之, 徳本 勇人
(大阪大院・工・化工)
tokumoto@chemeng.osakafu-u.ac.jp

酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO-NP) は広く市販品に使用される一方、微生物に対する毒性があるとされる。そのため、ZnO-NP が土壌中へ放出されると、微生物生態系に変化が生じると考えられる。本研究では、嫌気性微生物が共生する消化発酵汚泥を生態系モデルとして用い、この菌叢が生産する発酵ガスである水素・メタン・二酸化炭素量を測定し、ZnO-NP による生態系変化の解析を行った。培養実験の炭素源には炭水化物を用いた。まず汚泥を体積比 10% で培地中へ植菌し、そこへ ZnO-NP を最終濃度 50 mg/L となるように投与した。その結果、培養 1 日目の水素発生量が対照の 2 倍となった。しかし、このとき優勢となった微生物に対し、2 回の集積培養を行い、この集積菌を体積比 10%、ZnO-NP を最終濃度 50 mg/L で投与して培養実験を行うと、全ての発酵ガスの発生が見られなくなった。この結果より、集積された菌叢は、ZnO-NP により増殖を抑制されているのではないかとすることが示唆された。ここで、同様の性状を持つと思われる土壌微生物の中から、*Clostridium butyricum* を選択し検討を加えた。その結果、ZnO-NP を最終濃度 25 mg/L となるように投与すると、培養後の増殖が抑制されることがわかった。他の土壌微生物では、大腸菌が 276 mg/L、ブドウ球菌が 81 mg/L で増殖が抑制されるとの報告があることから、本研究の結果と合わせて、土壌中の微生物は ZnO-NP の投与濃度に依存して増殖を抑制されるのではないかとすることが示唆された。以上より、土壌微生物は ZnO-NP が存在すると増殖を抑制されやすく、ZnO-NP が環境中に放出されると土壌中の微生物生態系が変化すると考えられる。

Changes of Microbial Ecosystem by Zinc Oxide Nanoparticles

○Kazushi Watanabe, Nario Sato, Yuta Kuriyama, Toshiyuki Nomura,
Hayato Tokumoto
(Dept. Chem. Eng., Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

Key words Nanoparticles, ecotoxicity, microbial community

3P-105 次世代 DNA シーケンサーを用いた混合培養系中の *Dehalococcoides* 属細菌のゲノム解析

○武知 文音¹, 養王田 正文¹, 北嶋 瑞樹¹, 岩本 めぐみ^{1,2},
福田 智美², 田村 紀義², 佐藤 万仁³, 照屋 邦子³, 保日 奈子³,
下地 真紀子³, 中野 和真³, 新崎 文香³, 城間 安紀乃³,
青山 みさ子³, 寺林 靖宣³, 照屋 盛実⁴, 平野 隆⁵
(¹農工大院・工・生命工, ²PaGE Science, ³沖縄総合科学研,
⁴沖縄県工技セ, ⁵沖縄科技振興セ)
ayane_takechi@yoylab.tuat.ac.jp

Dehalococcoides 属細菌は、有機塩素化合物を最終電子受容体とするエネルギー生産と共役した嫌気的代謝系を有する微生物の中で、唯一クロロエテン類をエテンまで完全に脱塩素化する能力があり、バイオレメディエーションによる浄化において重要な役割を担っている。しかし、*Dehalococcoides* 属細菌は単離培養が困難であることから、その研究は余り進んでいない。これまで、我々は、トリクロロエテンで汚染された地下水からシスジクロロエテンを完全に脱塩素化する種々の細菌混合培養系を構築し、そのメタゲノムを次世代シーケンサー SOLiD 3 で解析することで、新規 *Dehalococcoides* 属細菌の存在とその特徴を明らかにしてきた。本研究では、SOLiD 3 に加え、5500 SOLiD、Ion torrent PGM 及び PacBio RS で得られたデータを用いて、混合培養系中の *Dehalococcoides* 属細菌のゲノム解析を行ったので、報告する。

Genome Analysis of *Dehalococcoides* sp. in mixed bacterial culture by Next Generation Sequencers

○Ayane Takechi¹, Masafumi Yohda¹, Mizuki Kitajima¹, Megumi Iwamoto^{1,2},
Tomomi Fukuda², Noriyoshi Tamura², Kazuhito Satou³, Kuniko Teruya³,
Hinako Tamotsu³, Maiko Shimoi³, Kazuma Nakano³, Ayaka Arasaki³,
Akino Shiroma³, Misako Aoyama³, Yasunobu Terabayashi³, Morimi Teruya⁴,
Takashi Hirano⁵
(¹Biotechnol. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²PaGE Science,
³ORIS, ⁴Okinawa Ind. Technol. Center, ⁵Okinawa Sci. Technol. Promo. Ctr.)

Key words *Dehalococcoides*, Next Generation Sequencers, genome

3P-104 農業用生分解性マルチフィルムへの酵素による分解促進処理が土壌真菌相へ与える影響

○山下 (鯨島) 結香^{1,2}, 渡部 貴志^{1,3}, 小坂橋 基夫¹, 吉田 重信¹,
藤井 毅¹, 北本 宏子¹
(¹農環研, ²JSPS-RPD, ³JSPS-PD)
kitamoto@affrc.go.jp

農業用マルチフィルム (マルチ) は、作物栽培過程で、保温、雑草防除などのために畑を被覆するフィルムである。現在普及が図られている生分解性マルチ (生ブラマルチ) は、畑土壌中に鋤き込むと土壌微生物に完全分解される。ところが、生ブラマルチの分解は環境条件に依存するため、分解が不十分で、鋤き込みが難しい場合がある。そこで我々は、生ブラマルチの分解を促進する酵素の処理で、使用済みマルチの強度を急速劣化できることを示した¹⁾。

この処理法の実用化のために、酵素処理した生ブラマルチを畑土壌中に鋤き込んだ後、土壌真菌相に与える影響を実験室で検討した。圃場から採った土壌に生ブラマルチ断片を埋設し、埋設箇所の土壌を経時的に採集した。各土壌 DNA を抽出後、PCR-DGGE 法により土壌真菌相の解析を行った結果、真菌相は生ブラマルチ埋設により速やかに変化した。無処理の生ブラマルチ埋設土壌では半年後も菌相が変化したままだったのに対し、酵素処理した生ブラマルチ埋設土壌の真菌相は、半年以内にほぼ埋設前の状態に戻った。このことから、土壌真菌相は生ブラマルチ埋設によって影響を受けるものの、酵素を用いた生ブラマルチの分解促進処理により、土壌真菌相へ与える影響を軽減する効果が期待できる。

¹⁾ 山下 (鯨島) ら: 日本農芸化学会 2013 年度大会 講演要旨集 3C32p09 (2013)

The effect of enzymatic acceleration treatment for biodegradation of mulch film on soil fungal flora

○Yuka Sameshima-Yamashita^{1,2}, Takashi Watanabe^{1,3}, Motoo Koitabashi¹,
Shigenobu Yoshida¹, Takeshi Fujii¹, Hiroko Kitamoto¹
(¹NIAES, ²JSPS-RPD, ³JSPS-PD)

Key words biodegradable plastic, PCR-DGGE, esterase

3P-106 テトラクロロエチレン脱塩素化微生物コンソーシアの集積培養及び菌叢解析

○野島 良太¹, 武知 文音¹, 福田 智美², 西村 実³, 養王田 正文¹
(農工大院・工・生命工, ²PaGE Science, ³アイ・エス・ソリューション)
ryota.nojima@yohda.net

土壌・地下水汚染の主要な原因物質であるクロロエテン類の除去法として、嫌気性微生物による分解を利用したバイオレメディエーションが注目されている。中でも、外部で培養した微生物を汚染土壌に添加するバイオオーグメンテーションは、高い浄化効果が期待される汚染除去法である。そこで本研究では、安全で効率的にテトラクロロエチレン (PCE) を分解できる培養系の構築を目的とし、PCE 汚染土壌よりコンソーシアを採取して集積培養を行った。その結果、PCE からシスジクロロエチレン (*cis*-DCE) への分解と、それに伴うメタン発酵が見られた。メタン発酵阻害剤 (BES) を加えて培養を行ったところ、PCE の分解能に影響は見られなかったことから、PCE と BES を添加して集積培養を続けた。その結果、700 μM の PCE を *cis*-DCE へ 7 日間という短い期間で分解できる培養系が構築された。

更に、構築された培養系の菌叢解析を目的とし、コンソーシアより抽出したゲノム DNA の 16S rRNA 遺伝子解析を行った結果、11 種類の菌が同定された。同定された菌のうち *Geobacter* が持つ脱塩素化酵素遺伝子がゲノム DNA 中に存在していたため、real-time PCR による定量を行ったところ、培養に伴い遺伝子量が減少していることが示唆された。しかし培養系が持つクロロエテン類分解能は変化しなかったため、*Dehalobacter* が分解に寄与していると考え検証している。本発表においてはその現状も併せて報告する。

Enrichment culture and microbial flora analysis of the tetrachloroethylene reductive-dechlorinating bacterium

○Ryota Nojima¹, Ayane Takechi¹, Tomomi Fukuda², Minoru Nishimura³,
Yohda Masafumi¹
(¹Biotechnol. Life Sci., Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., ²PaGE Science, ³In Situ Solution)

Key words bioremediation, microbial flora