

P-058

土壌くん蒸処理後の細菌群集構造の DNA 及び RNA レベルにおける変化 –Competitor 利用による土壌からの核酸抽出法を用いて–

○星野(高田)裕子、松本直幸
 (独)農業環境技術研究所 生物環境安全部

〔目的〕 近年土壌から DNA を直接抽出することにより微生物群集を評価する分子生態学的手法が幅広く用いられている。しかし、土壌くん蒸処理後の細菌群集構造の変化を DNA で検出した場合、死菌の DNA を検出している可能性が示唆された⁽¹⁾。土壌中のターンオーバーは DNA に比べ RNA の方が短く、RNA の方がより実際の微生物活性を示すと考えられる。そこで、土壌から直接抽出した DNA 及び RNA を用いて土壌くん蒸処理後の細菌群集構造変化を PCR-DGGE 解析で追跡し、両者の比較を行うことを目的とした。

また、試験に供した農業環境技術研究所の畑土壌は黒ボク土であり、土壌への吸着のために核酸の抽出が非常に困難である。市販の DNA 抽出キット FastPrep kit for soil の抽出バッファーに吸着を競合阻害する物質 (Competitor) としてスキムミルクを添加することで DNA 抽出が可能になった⁽²⁾。今回は、同様に Competitor を利用し RNA の抽出を試みた。

〔方法〕 農環研圃場において、クロルピクリンによるくん蒸処理を行い、土壌表面をポリエチレンシートで被覆した。2 週間後、シートを剥ぎ耕起し 1 週間放置した後、ホウレンソウを播種した。くん蒸処理を行わない区について、同様の作業を行い、コントロール区とした。処理前および、シート剥離直後から 2 ヶ月後まで経時的に土壌を採取した。ビーズ振とうにより土壌から DNA および RNA を抽出し、16S rDNA についての PCR-DGGE あるいは RT-PCR DGGE によりそれぞれ細菌群集構造を解析した。

〔結果・考察〕 スキムミルクを抽出バッファーであるリン酸バッファーに添加し、農環研黒ボク土壌から RNA の抽出を試みたが、抽出液のアガロース電気泳動でリボゾーム RNA のバンドは検出されなかった。そこでより吸着の競合阻害力が強いと考えられる DNA の添加を試みた。土壌 1g あたり 10mg のサケ精子由来 DNA を添加した抽出バッファーで、土壌をビーズ振とう後、酸性フェノール・クロロホルム処理、DNase 処理をした抽出液から土壌由来と考えられるリボゾーム RNA のバンドが検出された。

スキムミルク添加により抽出した DNA 及び DNA 添加により抽出した RNA を用いて 16S rDNA PCR-DGGE 解析を行った。コントロール区において DNA と RNA を用いた場合で DGGE パターンに大きな違いは見られなかったが、クロルピクリン処理直後のサンプルで両者に大きな違いが見られた。さらに、クロルピクリン処理前後のパターンの変化は RNA の方が大きかった。DNA による PCR-DGGE では、処理直後において死滅した菌の DNA を評価していると考えられた。

(1) 星野(高田)裕子・松本直幸、第 19 回日本微生物生態学会講演要旨集 p.126 (2003)

(2) Y. T. Hoshino and N. Matsumoto, Microb. Environ. 19:13-19(2004)

星野(高田)裕子 E-mail:yuko422@affrc.go.jp