

マイクロコズムにおけるテトラクロロエチレン分解微生物群への SIP-D 法の適用性

○鈴木 雄大、山崎 詳平、森澤 貴之、皆川 匠、野村 暢彦、中島 敏明、内山 裕夫

筑波大・院・生命環境

Key Word : SIP, reductive dechlorination, dissimilation, tetrachloroethylene

【背景・目的】バイオレメディエーションの効率化には、分解に関与する難培養性も含めた微生物の詳細な解析が必要である。汚染物質の同化分解微生物群の特定には、難培養微生物も含めて解析できる Stable Isotope Probing (SIP)法という強力なツールが存在する。一方、異化分解微生物群の特定には適応できない。そこで当研究室では、異化分解微生物群集の培養非依存的解析手法として Stable Isotope Probing for Dissimilation (SIP-D)法を構築し、既知の異化分解菌を用いた有効性実験の結果により、SIP-D 法は異化分解微生物の培養非依存的解析手法として有効であることを示した。SIP-D 法では異化分解微生物を含めた全ての微生物を標識炭素源で標識する。そこで本研究は、用いる標識炭素源の違いが解析結果に与える影響と、分解菌を標識する際に最適な炭素源を探索する事を目的とした。【方法】異化分解微生物を含む環境サンプルとして、多様な菌が存在すると考えられる蓮田土壌を実験に用いた。PCE(テトラクロロエチレン)添加、無添加のそれぞれの系に、標識炭素源として ^{13}C -フマル酸と ^{13}C -酢酸をそれぞれ添加した。【結果と考察】培養 7 日後に全 DNA を抽出して、CsCl 密度勾配超遠心分離に供し ^{13}C -DNA の存在推定領域を DGGE により解析した。PCE 添加、無添加の DGGE プロファイルの比較から ^{13}C -フマル酸、 ^{13}C -酢酸それぞれの添加系について PCE 分解菌を特定する事が出来た。また、炭素源の違いにより生じる結果を比較し、SIP-D 法を以後広く適応する際に最適な炭素源を検討した。今後は、今回使用していない炭素源を用いて同様な検討を重ね、SIP-D 法を更に完成度の高い解析手法として確立する予定である。

e-mail : s0921169@u.tsukuba.ac.jp

SIP-D 法の適用範囲に関する検討

○皆川 匠、山崎 詳平、鈴木 雄大、野村 暢彦、中島 敏明、内山 裕夫

筑波大学院・生命環境

Key Word : SIP, dissimilation, reductive dechlorination, tetrachloroethylene

【目的】当研究室では異化分解菌を特定できる改変 SIP 法 (Stable Isotope Probing for Dissimilation (SIP-D))法を構築した。先行研究により SIP-D 法を用いて“偏性脱ハロゲン呼吸細菌”である *Dehalococcoides ethanogenes* 195 をコンソーシア中から検出することが出来、その有効性が示された。しかし、PCE 分解細菌には他の呼吸経路を併せ持つ“脱ハロゲン呼吸細菌”や分解時にエネルギー獲得を行わない“共代謝分解菌”も存在する。これらの細菌に対する SIP-D 法の適用性については分かっていない。そこで、SIP-D 法が“脱ハロゲン呼吸細菌”と“共代謝分解菌”の検出にも適用できるのかについて調査し、適用範囲を明らかにする。【方法】“脱ハロゲン呼吸細菌”として *Desulfitobacterium* sp.Y51 株を、“共代謝分解菌”として *Clostridium* sp. KYT-1 株を実験に用いた。蓮田マイクロコズムにそれぞれ菌株を導入し、模擬環境を作成した。次に、それぞれについて PCE の添加、非添加の系を作成し、 ^{13}C -生育炭素源を加え静置培養した。培養後、土壌から全 DNA を抽出し、CsCl 密度勾配超遠心分離に供し ^{13}C -DNA を含むと推測される画分を PCR-DGGE 法に供した。DGGE プロファイルの比較により分解菌の特定を行い、適用可能であるかを判断した。【結果】“脱ハロゲン呼吸細菌”の系では、DGGE プロファイルから PCE 分解菌由来と推測される DNA が特定され、シーケンス解析により *Desulfitobacterium* sp.Y51 株由来と同定された。一方、“共代謝分解菌”の系については現在検討を進めている。

e-mail : pascal0719@gmail.com