

# 土壤微生物集積ツール“鏟”の開発と応用

2019 年 1 月

吉本 拓矢

# 土壤微生物集積ツール“鏟”の開発と応用

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生命産業科学専攻  
博士（農学）学位論文

吉本 拓矢

## 要約

環境中の 99%以上の微生物は現在の技術で培養することができない VBNC (viable but non-culturable) 細菌であることが知られている。VBNC という概念は、環境サンプルを顕微鏡を用い直接係数した微生物数と比較し、寒天プレート等の培養操作で増殖してくる微生物数が極めて少ないことから提唱された概念であり、120 年以上前から今日まで続く微生物学の常識となっている。これまで、この未利用である 99%以上の微生物を利用可能とするため、新規培養技術の開発が進められており、近年、新規培養技術の一つである、*in situ* 培養法が注目を集めている。本技術は、環境サンプルから単離した微生物細胞を、当該環境で培養を行うというユニークな技術であり、一部の VBNC 細菌においても培養が可能になる、平板培養法におけるコロニー獲得率が高まるといった報告がある。

一方、*in situ* 培養は通常の単離培養よりも工程が増えるため、効率的なスクリーニングのためにはマンパワーや機械による自動化プロセス等を必要とする側面もある。そこで、本研究においては *in situ* 培養の利点は残しつつも、より簡易的な単離培養を行うためのツールとして、土壌微生物をターゲットとした、新規土壌微生物集積法を考案し、鏝（やじり）と名付けたツールの開発・検証を行った。

鏝は土壌由来の粘土を元に作られており、土壌への埋設を容易にするために、円錐状に成型されている。さらに、微生物の集積を可能とするために、鏝型の内部を空洞にすることで試料の添加を可能とした。鏝を土壌に埋設し、上から培地等の試料を添加することで、鏝の周囲のみが試料の影響を受け微生物が *in situ* で増殖または、試料に引き寄せられ、周囲に住み着くというモデルとなっている。本鏝は極めてシンプルな作りをしており、誰にでも容易に扱うことができるという特徴を持つ。

まず、鏝の微生物集積における有効性を示すため、ラード試料とし、油脂分解菌の集積を実施した。ラードを直接土壌に添加した実験区と比較し、鏝を用いた実験区では、鏝周辺土壌に多種類の微生物が集積されていることを T-RFLP 解析により示した。また、各サンプルについて従来法（平板培養）で二次培養を行ったところ、寒天プレート上でラードの分解が確認できたコロニー数は、鏝（*in situ* 培養）で最大約 14%、土壌に直接ラードを添加した系で約 11%、土壌そのものでは約 3%と、鏝を用いることで多種類かつ多量の油脂分解菌を集積可能であることが示唆された。

次に、本鍬は、土壤微生物集積のみならず、効率的なバイオレメディエーションに向けた予備調査にも応用可能と考え、これを検証した。バイオレメディエーションは微生物の代謝活動を利用して環境汚染物質を分解し、汚染された場所を浄化するのに有効な技術として広く使用されている。しかし、より効果的なバイオレメディエーションを実施するためには、対象となる環境にどのような微生物が存在し、環境汚染物質を分解するのかを事前に検証する必要がある。伝統的にこれらの研究は、フラスコスケール、または実サイトでの検証がなされてきたが、フラスコスケールでは実際の環境を正しく反映できているかに疑問が残る。また実サイトでの検証は、広大な敷地と多量の汚染物質を必要とするなど課題が多い。一方、鍬を用いることで、少量の環境汚染物質かつ実サイトでの検証が可能となる。

環境汚染物質として、フェノールを用い、鍬の有効性を検証した。フェノールを添加した鍬を土壤に埋設し 2 週間ごとに計 8 週間、鍬周辺土壤のフェノール濃度・微生物叢・phenol monooxygenase 遺伝子量を調査した。フェノール濃度は、鍬埋設後 2 週間目にフェノール濃度が約 300 ppm に達し、十分な汚染区を構築した後、減少することが明らかとなった。また、試験期間を通して鍬から約 3 cm の距離にある土壤においてはフェノールが検出されることはなく、フェノールの浸透範囲は鍬からの距離約 3 cm 未満の限られたスペースにとどまることも明らかとなった。また、土壤からは、フェノール濃度の減少に伴い、フェノールを分解することで知られている *Bacillus* sp. や *Streptomyces* sp. といった菌の優占化が確認できた。さらに、定量 PCR により phenol monooxygenase 遺伝子を定量したところ、phenol monooxygenase 遺伝子は試験期間で約 2 倍以上に増加していた。よって、鍬を用いることで、少量の環境汚染物質、即ち、低コストかつ実サイトでのバイオレメディエーションに向けた事前評価を行えることが示唆された。

## 目次

第1章 序論 .....	1
第1節 微生物と人類の歴史 .....	1
第2節 微生物学の発展 .....	1
第3節 難培養性微生物 .....	3
第4節 メタゲノム技術の発展について .....	4
第5節 新規培養技術の発展について .....	5
第6節 <i>in situ</i> 培養法について .....	6
第7節 本研究の目的 .....	8
第8節 論文の構成 .....	9
第2章 土壌微生物集積ツール 鏝（やじり）の作成と検証 .....	10
第1節 緒言 .....	10
第2節 鏝を用いた土壌微生物集積法の概要 .....	10
第3節 鏝の開発 .....	12
3-1 鏝の必要条件 .....	12
3-2 多孔質構造を有した鏝の作成 .....	12
3-3 鏝のサイズ・重量の測定 .....	14
3-4 鏝が土壌微生物に与える影響の評価 .....	14
3-4-1 鏝からの土壌サンプル回収法 .....	14
3-4-2 全菌数の計測 .....	15
3-4-3 培養可能な微生物数の計測 .....	16
3-4-4 微生物群衆構造解析 .....	16
3-4-5 T-RFLP 法による微生物群衆構造解析 .....	18
3-5 各種土壌における鏝の利用 .....	21
3-5-1 本実験で用いた土壌 .....	23
3-5-2 鏝の埋設と回収 .....	23

3-5-3 T-RFLP 法による微生物群衆構造解析 .....	23
第 4 節 結果 .....	23
4-1 作成した鏝 .....	23
4-2 土壌サンプルの回収量 .....	25
4-3 全菌数の測定 .....	25
4-4 培養可能な微生物数の比較 .....	25
4-5 微生物叢解析結果 .....	26
4-6 各種土壌における微生物叢解析結果 .....	26
第 5 節 考察 .....	26
第 3 章 鏝を用いた土壌微生物集積 .....	31
第 1 節 緒言 .....	31
第 2 節 実験方法 .....	31
2-1 試験区の設定 .....	31
2-2 試験方法 .....	33
2-2-1 サンプルの回収方法 .....	33
2-2-2 T-RFLP 法による微生物群集構造の解析 .....	33
2-2-3 培養法によるラード分解菌の取得割合 .....	34
2-2-4 取得したラード分解菌の T-RFLP 解析 .....	34
第 3 節 結果 .....	34
3-1 T-RFLP 法による微生物叢解析 .....	34
3-2 培養法によるラード分解菌の取得割合 .....	38
3-3 ラード分解菌の T-RFLP 解析 .....	38
第 4 節 考察 .....	38
第 4 章 鏝の改良 .....	42
第 1 節 緒言 .....	42
第 2 節 新型鏝の開発 .....	42

2-1	鏝のサイズ・重量・内容量の測定	42
2-2	試料の添加方法及び、土壌サンプリング方法	43
第3節	鏝に添加した試料の滲出範囲の計測	43
3-1	使用土壌	43
3-2	フェノール添加鏝の埋設	45
3-3	土壌サンプリング法	45
3-4	土壌に滲出したフェノールの定量	45
第4節	新型鏝が土壌微生物に与える影響評価	46
4-1	使用土壌	46
4-2	DNA の抽出	48
4-3	16S rRNA 遺伝子の増幅	48
4-4	DGGE 法による微生物生態解析	48
第5節	集積培養との比較について	50
5-1	試験設計	50
5-2	フェノールの定量	50
第6節	結果	51
6-1	鏝のサイズ・重量・内容量の測定	51
6-2	鏝に添加したフェノールの土壌滲出範囲	51
6-3	DGGE 法による、土壌微生物叢解析	51
6-4	集積培養と比較したフェノール濃度変化	51
第7節	考察	55
第5章	鏝の微生物生態解析への応用	59
第1節	緒言	59
第2節	バイオレメディエーションの備えとしての鏝の応用	59
第3節	実験方法	60
3-1	モデル環境汚染物質の選定	60
3-2	フェノール汚染モデルの作成と微生物生態解析	60

3-2-1 使用土壌 .....	61
3-2-2 フェノール添加鍬の埋設 .....	61
3-2-3 土壌サンプリング .....	61
3-2-4 フェノールの定量 .....	61
3-2-5 DGGE 法による微生物生態解析 .....	63
3-2-6 次世代シーケンサーによる微生物生態解析 .....	64
3-2-7 定量 PCR による phenol monooxygenase 遺伝子の定量 .....	72
第 4 節 結果 .....	75
4-1 フェノール汚染モデルにおける土壌フェノール量の推移 .....	75
4-2 DGGE 法による土壌微生物叢解析 .....	75
4-3 次世代シーケンサー解析結果 .....	79
4-4 定量 PCR 解析結果 .....	84
第 5 節 考察 .....	84
第 6 章 総括 .....	89
引用文献 .....	92
付記 .....	99
謝辞 .....	100



## 第1章 序論

### 第1節 微生物と人類の歴史

微生物とは、肉眼では存在が判別できない極めて小さな生物の総称である。しかしながら、我々人類は、目に見えない存在である微生物を古くから活用し生活を豊かにしてきた。例えば、ワイン、納豆、醤油といった発酵食品や抗生物質などに代表される薬、洗剤に使用される酵素など、その多くは微生物の力を用いて作られたものである。我々と微生物の歴史は有史以前にさかのぼり、例えばコーカサス地方においては、紀元前 6,000 年（新石器時代）にはワイン造りが確認されている<sup>1)</sup>。また、中国の黄河流域ではサンザシ、米、ハチミツなど多種の材料を混ぜ合わせて発酵させた酒が発見されており、こちらは最古の酒として紀元前 7,000 年のものと推定されている<sup>2)</sup>。醤油・味噌などの原形である醬についても、紀元前 1,100 年頃の周王朝初期の記録書『周礼』に記載がある。日本においても紀元前 400～500 年（縄文時代末期）には醬の利用が始まっていたとされており、中国や朝鮮半島から製法が伝えられたヤマト王権の時代に、本格的に作られるようになったとされている。

### 第2節 微生物学の発展

微生物という概念を初めて提唱したのは、イタリアの科学者である Fracastoro と考えられる。古く、病気は何らかの原因によって汚染された空気（瘴気・ミアズマ）に触

れることで発病すると考えられており、これはミアズマ説として 16 世紀に至るまで長く定説とされてきた<sup>3)</sup>。例えばマラリアは今でこそ、ハマダラカ (*Anopheles* spp.) が媒介するマラリア原虫 (*Plasmodium* spp.) が原因であることが明らかとなっているが、古くは瘴気が媒介する病気の代表例とされており、その名前は、古いイタリア語で「悪い空気」という意味の *mal aria* が由来となっている。

一方 Fracastoro は、空気感染を基礎とするミアズマ説では、天然痘やコレラといった感染症の拡大は説明できないと主張し、1546 年、コンタギオン説（接触伝染説）を提唱した<sup>4)</sup>。コンタギオン説においては、病気は瘴気ではなく、生きた伝染性生物 (*contagium vivum, contagium animatum*) との接触によって発病するとしている。さらに、Fracastoro は病気が拡大する理由として、この伝染性生物の移動パターンについて、患者との直接接触による移動以外に、何らかの媒介物を利用した移動、空気移動という 2 つのパターンを主張した。実際に、病原体の存在を突き止めることは叶わなかったため、コンタギオン説はミアズマ説を覆すまでは至らなかったものの、病原体の本体が生物であること、さらに伝染のメカニズムを予想するなど、これは微生物の存在を明確に示唆したと言えるのではないか。

コンタギオン説の提唱から、およそ 150 年後、我々は微生物の“姿”を初めて目にする。17 世紀のオランダ商人、Leeuwenhoek は、単一レンズの顕微鏡を自作し、初めて微生物の存在を観察した<sup>5)</sup>。その後、唾液、歯垢、雨水などを観察する中で、人間の身の回

りには、肉眼では見ることでできない生物が多量に存在することを明らかにした。

発酵や腐敗などの化学変化が微生物の活動によるものであることは、19 世紀にフランスの化学者 Pasteur により実証された<sup>6)</sup>。

微生物を分離・培養する技術は 19 世紀後半に、ドイツの医師 Koch が発明した。Koch は、ペプトン・肉エキスを含んだゼラチン培地を用いて微生物の分離培養に成功し、炭疽菌、結核菌、コレラ菌など種々の微生物を同定した<sup>6)</sup>。

Koch の作り上げた分離培養法は、現代においてもその重要性は変わらず、分離培養法を用い、単一の微生物を分離して利用するというプロセスが広く行われている。

### 第 3 節 難培養性微生物

Koch により、我々は微生物の単離培養技術を得ることになるが、ほどなくして、環境中の 99%以上の微生物は現在の技術で培養することができない、いわゆる VBNC (viable but non-culturable) 微生物である事実と直面する。この概念は、環境サンプルを、顕微鏡を用い直接計数した微生物数と比較し、寒天プレート等の培養操作で増殖してくる微生物数が極めて少ない (Great Plate Count Anomaly) ことから提唱されたものであり<sup>7,8)</sup>、120 年以上前から今日まで続く微生物学の常識となっている。

言い換えれば、現在の成果は環境中の 1%未満の微生物から得られたものであり、培養できない残り 99%の活用可能性が残されていると考えられる<sup>9)</sup>。この 99%以上の環境微生物が難培養性であるという事実は、我々に膨大なる未発掘微生物資源への期待感

を募らせ、これらにアクセス可能な技術の開発を促した。

現在、主に2つのパターンからの技術開発が進められている。1つは分離培養を行わないメタゲノムアプローチであり、もう1つは、分離培養を基本とする新規培養手法の開発である。

#### 第4節 メタゲノム技術の発展について

メタゲノムとは、Handelsman により最初に用いられた用語で<sup>10)</sup>、土壌・海水といった環境サンプル全体から抽出された微生物ゲノムのことを示す。Konishi らは、メタゲノムを「多種多様な微生物が共存する複合微生物系ゲノムの混合体」と意味づけた<sup>11)</sup>。そして、このメタゲノムを有効活用する研究・技術のことをメタゲノミクスと呼び、培養操作を行うことなく環境中の全ての微生物にアクセスできるという特徴を有している。

メタゲノミクスでは、主に2つのアプローチから研究が行われている。1つは、特定環境の生態系を構成する微生物群集とそれらの代謝活動を網羅的に理解しようとする微生物生態解析である<sup>12)</sup>。環境中から抽出したメタゲノムを分子生物学的手法により、ゲノム情報を網羅的に解析することにより行われる。ゲノム情報を網羅的に理解することで、特定の代謝能に関連した遺伝子の有無、難培養微生物のゲノム情報や種々の汚染物質の分解に関わる微生物群集など、様々な情報を得ることが可能となる。

もう一方のアプローチはメタゲノム中に含まれる有用な機能遺伝子の獲得を目指す

メタゲノムスクリーニングである<sup>13)</sup>。すなわち抽出したメタゲノムからライブラリを構築し、遺伝子配列や遺伝子に由来する機能に基づいたスクリーニングを行い、目的とする機能を有する遺伝子の獲得を行うものである。難培養、未培養の微生物がほとんどを占める環境サンプルから構築したメタゲノムライブラリをスクリーニング対象とすることで、これまで見過ごされていた有用遺伝子資源（有用酵素）へのアクセスが可能となる。ゲノム解析技術の発展と比例し、メタゲノミクスは、微生物学において著しい発展を遂げている。

## 第5節 新規培養技術の発展について

新規培養技術の開発については、主に平板培養などの古典的培養法の改良が行われてきた。培地・基質組成・ゲル化剤・培養条件・シグナル物質の添加・培養時間などの工夫を通じて、難培養微生物の培養を可能にしようというアプローチであり、一定の成果を挙げている<sup>14,15,16)</sup>。例えば、ゲル化剤として、寒天の代わりに Gellan gum を用いた培養法は、多くの場合、寒天よりも培養効率が高くなること、また寒天培地ではコロニーを形成しない微生物でも Gellan gum 培地によって容易に培養できることが明らかとなっている<sup>17,18,19)</sup>。

また、近年では、*in situ* 培養法やマイクロ・ナノ成型技術を用いた培養法など、新しいコンセプトに基づいた分離培養技術も発展を見せている<sup>20,21)</sup>。

## 第 6 節 *in situ* 培養法について

人工的な培養環境では増殖できない微生物も、環境中ではいかなる難培養性微生物も増殖するはずである。したがって、実環境中、またはそれを模擬した状態を再現することとで通常の培養方法では培養できない難培養性微生物を獲得できる可能性がある。このようなアイデアに基づいて、実環境を模擬する培養手法(*in situ* 培養法)が考案された。

*in situ* 培養は目的微生物を分離するため通常以下の手順で行われる<sup>22)</sup>。

- ①：環境サンプルより取得した微生物細胞を培養チャンバーに植菌する，
- ②：植菌した微生物がいた環境に植菌済の培養チャンバーを設置し，一定期間 *in situ* 培養を行う，
- ③：一定期間経過後，チャンバー内で生育した菌体を平板培養等の従来法を用いて再植菌し，二次培養を行う。

培養チャンバーとは、栄養や生育因子は通すが、微生物は通過することのできない大きさの膜を有したデバイスであり、内部に培地を充填させて用いる<sup>22,23)</sup>。図 1-1 に培養チャンバーを用いた *in situ* 培養の模式図を示す。

一見、最後の二次培養で微生物が生育してこないと考えられるが、これまでの報告によると、一度 *in situ* 培養を行うことで二次培養時に増殖してくる確率が高まることが明らかとなっている<sup>24,25)</sup>。一般的に *in situ* 培養の効果は以下の 3 点とされている<sup>24,25)</sup>。

- ①：培養効率が低い

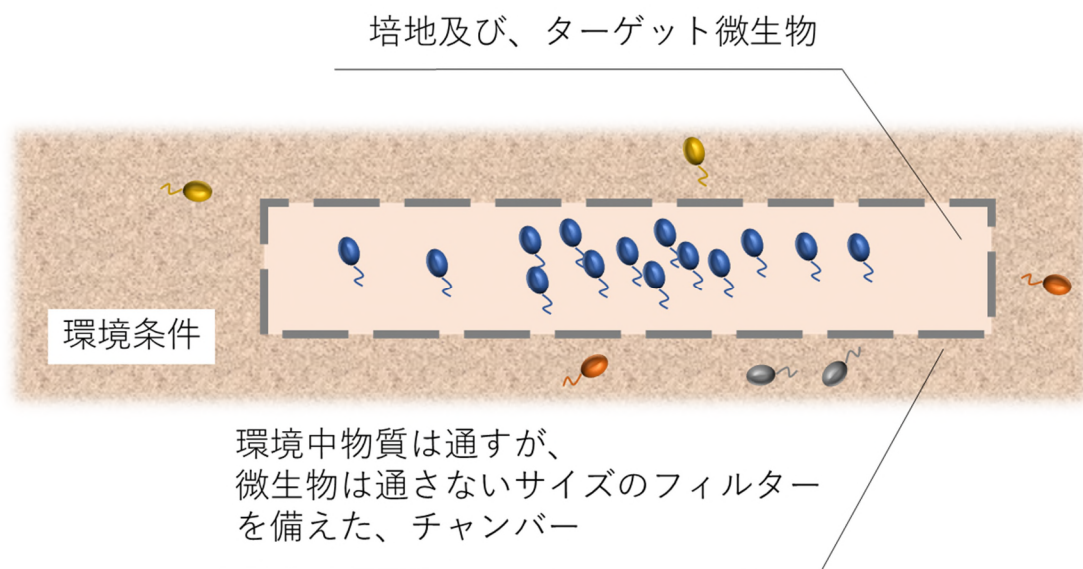


図 1. 培養チャンバーを用いた *in situ* 培養の概要図

*in situ* 培養を行う前と比較し、平板培養法におけるコロニー獲得率が高まる。

②：新規微生物獲得の可能性が高い

*in situ* 培養を行った後に、平板培養を行った場合は、行わなかった場合と比較して、新規性の高い微生物が獲得される割合が高い。

③：平板培養での微生物生理学的性質がユニーク

特定の菌を *in situ* 培養した場合、行わなかった時と比較し、生理学的性質が異なる場合がある。

## 第7節 本研究の目的

*in situ* 培養法は、環境中で微生物を培養させた後、単離を行うという非常にユニークな分離培養技術であり、大きな結果を上げつつある<sup>26)</sup>。しかしながら、本手法は“環境サンプルのスクリーニング”，“サンプルから微生物細胞の分離”，“培養装置への植菌”，“*in situ* での培養”，“培養装置回収”，“微生物単離”，“微生物の評価”という7プロセスを必要とし、古典的な分離培養手法である，“環境サンプルの回収”，“微生物の単離”，“微生物評価”というプロセスと比較し、作業工程が多く、効率化のためにはマンパワーまたは機械等での自動化プロセスを要するという側面も有する。

そこで、本研究では *in situ* 培養の利点は残しつつ、より手軽に微生物を分離培養する手法の開発を目的に、土壌微生物を *in situ* で集積する新規ツール鍬（やじり）を開発し、その検証を行うこととした。



## 第 8 節 論文の構成

本論文の概略を以下に示す。本論文は第 1 章から第 6 章の計 6 章で構成されている。

第 1 章では、序論として本研究の背景と目的および論文の構成を述べた。

第 2 章では、本研究のコアツールである鏝の開発を行った。

第 3 章では、鏝を用いて、土壌微生物の集積を行い、鏝の有効性を評価した。

第 4 章では、鏝の改良を実施した。

第 5 章では、土壌微生物集積以外の鏝の応用法として、バイオレメディエーションの事前検証に着目し、その検証を実施した。

第 6 章では、総括として本研究の成果をまとめ、今後の展望を示した。

## 第2章 土壤微生物集積ツール 鏟（やじり）の作成と検証

### 第1節 緒言

土壤環境における新規微生物集積ツール“鏟”の開発を行い、鏟を用いた土壤微生物集積法を提唱した。土壤にはたった 1g の中に  $10^{10} \sim 10^{11}$  「個」、 $10^3 \sim 10^4$  「種」の微生物が生息しているといわれており<sup>27,28)</sup>、これまで土壤から数多くの有用微生物が単離されている<sup>29,30)</sup>。

### 第2節 鏟を用いた土壤微生物集積法の概要

多孔質構造素材で作成した鏟を用いる、新規土壤微生物集積法を開発した。本手法の概要を図 2-1 に示す。

本鏟は、微生物集積のための試料を持続的に土壤中に供給する担体のようなものである。鏟を土壤に埋設し、試料を添加することにより、試料を利用する微生物が、鏟表面にて増殖する。よって、鏟を用いることで目的とする土壤微生物を *in situ* 培養することが可能あり、培養後の鏟を環境サンプルとしてスクリーニング源とすることで目的微生物の効率的な単離が行えると考えられる。鏟は、“鏟の埋設”、“鏟の回収”、“微生物の単離”、“微生物評価”という簡略化されたプロセスで *in situ* 培養同様の効果が期待できる。

また、鏟は、少量の試料でコンパクトな実験が可能である。そのため環境負荷、ラン

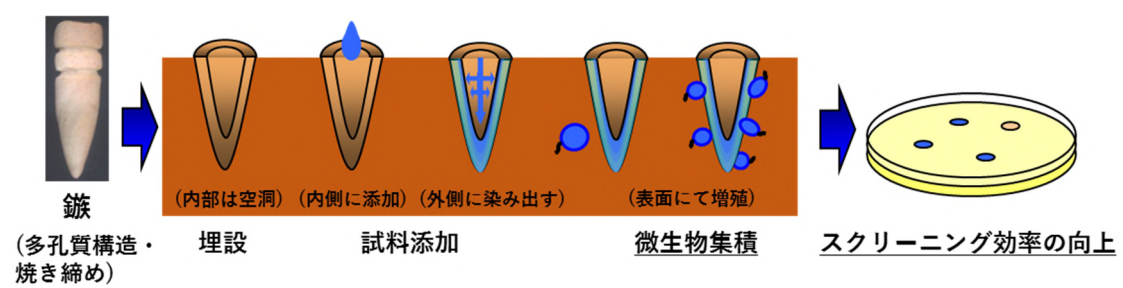


図 2-1 鋳を用いた新規土壌微生物集積法の概略図

ニングコストを最小限に抑えることが可能であると考え、鏝に試料を添加し土壌中に埋設すると、添加された試料は鏝からゆっくりと土壌中に滲出する。その結果、鏝周辺の限られた空間に長期間にわたって試料特異的な空間が構築されるため、倍加時間の長い微生物も集積可能であると考えられる。

### 第3節 鏝の開発

#### 3-1 鏝の必要条件

本研究が提案する鏝は、土壌微生物をターゲットとしたものである。よって、使用する素材による土壌微生物への影響がないということが前提となる。そのため、素材には余計な有機物を含まない、かつ土壌に近い組成・物理構造を持つことが望ましい。さらに、土壌に埋設する前に乾熱滅菌を行うことが可能ならば、素材由来の微生物による影響も取り除くことができる。

#### 3-2 多孔質構造を有した鏝の作成

そこで本研究では、陶磁器などの作製に用いられる土壌由来の粘土を使用することにした。形状は土壌に埋設する際に、容易に埋め込められるよう、円錐状の鏝型に成形し、より多くの微生物を回収するために、成形した素材表面に溝や穴をいれることで土壌と接する表面積を広げた。さらに、その素材に染み込ませた試料を資化する微生物の培養を可能とするために、鏝型の内部を空洞にすることで試料の添加を可能と

した。

また、微生物の住処として定着しやすくするため、「焼き締め」という手法を用いた。通常、陶磁器の作製には作品の素地に釉薬を掛けて表面の多孔質構造を覆うガラス質の層を形成させる。このガラス質の層は液体を通さないため、内部に添加した試料は土壌中に滲出せず、微生物の集積には利用できない。一方、焼き締めでは釉薬を掛けずに固く焼き上げるため、素材表面の多孔質構造を維持することができる。

原材料は、陶芸機材の総合メーカーである丸二陶料株式会社製の木節粘土を使用した<sup>31)</sup>。この木節粘土は、花崗岩の風化により生成された粘土が炭化した木片等の有機物と一緒に流され堆積してできた粘土である。その特徴として、灰色や褐色の外観色を呈し、粒子が細かく、他の粘土に比べ可塑性および乾燥強度の高さを備えている。まず、鋳を作製するに当たり「土揉み・土練り」という粘土を練ることで成形しやすくさせる工程で、粘土と一緒にコーヒー粕を練り混ぜた。それは粘土を窯で焼く「焼成」の際にコーヒー粕が燃えてなくなる現象を利用し、細かいコーヒー粕のなくなった部分がより多孔質な構造を形成させることができるためである。土壌微生物は菌株により土壌中における住み場所が異なることが示唆されているため<sup>32)</sup>、コーヒー等を用いてさまざまな大きさの多孔質構造を構築することは有意義であると考え。次に、円錐状の鋳型に成形し、成形した素材表面に穴や溝をいれ、試料添加用にその内部を空洞にした。焼成は十分に乾燥させた粘土を酸化状態で約 1,250°C の高温で焼き上

げた。

### 3-3 鋤のサイズ・重量の測定

作製した鋤の中から無作為に 5 本の鋤を選び、それぞれのサイズ（高さ・外径・内径・深さ・幅）および重量を測定した。その結果より鋤の表面積（細孔を含まない）を求め、1 g 当たりの表面積を算出した。また、デジタルマイクロスコープ（KEYENCE）を用いて鋤表面の拡大写真を撮影した。加えて、蒸留水を鋤に添加し、試料の染み出し具合を確認した。

### 3-4 鋤が土壌微生物に与える影響の評価

鋤を土壌環境に用いるためには、鋤自体が土壌微生物に影響をおよぼさないことを示す必要がある。そこで、鋤を土壌に埋設し、鋤表層の微生物叢、全菌数、培養可能な微生物数を調べることにした。これらのいずれもが土壌単体と同様の傾向を示せば、鋤自体が土壌環境に与える影響は少ないと考えられる。

#### 3-4-1 鋤からの土壌サンプル回収法

土壌は、茨城県つくば市水田より採取した土壌を用いた。作成した鋤を土壌に埋設し、24 時間後土壌より引き抜き、鋤表面に付着している土を軽く払った。回収した鋤を 50 mL の遠沈菅に入れ、10 mL の生理食塩水を加えた後、超音波破碎機

（Microson™ Ultrasonic Cell disruptor）に、出力 6, 1 min の条件で供し、鋤表層から

微生物および、鏝に組み込まれた土壌を分離した。分離後のサンプルは 6,000×g, 10min, 室温にて遠心分離を行い、上清を廃棄した。残った沈殿を鏝から回収したサンプルとした。

### 3-4-2 全菌数の計測

鏝より回収したサンプルと土壌サンプル間に微生物数の差が存在するのかどうかを検証するため、それぞれの全微生物数を直検法的一种である臭化ブロマイド (EtBr) 染色法を用いて測定した。

実際の操作は Someya の手法に従った<sup>33)</sup>。まず、有効直径 15.0 mm の吸引濾過器にメンブランフィルター（孔径 3.0-5.0 μm, ADVANTEC）とポリカーボネートフィルター（孔径 0.2 μm, ADVANTEC）を順に載せ、その上にファンネルをセットした。ポリカーボネートフィルターは、試料粒子を均一に分散させるために予め 100 μg / mL の Poly-L-lysine（Takara）水溶液に一晩浸し、親水化処理をしたものを乾燥させた後に使用した。

そして、ファンネルに除菌水を 1 mL 程度加えてから土壌および鏝サンプル希釈懸濁液を 50 μL-200 μL 加え、フィルターホルダー全体を軽く振ってよく混合させた後、吸引してフィルター上に試料を捕集した。フィルター上に EB 溶液（100 μg / mL, 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2）を数滴加え、室温で 3 min 染色した。吸引濾過でファンネル内の染色液を取り除き、スライドガラス上にイマージョンオイル（OLYMPUS）を一滴落

とし、そこに染色したポリカーボネートフィルターを載せた。その上にイマージョンオイルをさらに一滴載せてカバーガラスで封入し、100 g 程度のゴム栓をカバーガラスの上に 1min 置き、カバーガラスをスライドガラスに圧着させた。このプレパラートを蛍光顕微鏡にセットし、B 励起下 (450~490 nm)、接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 100 倍の計 1,000 倍にて細菌の計数を行った。検鏡は 1 試料あたり 3 枚のプレパラートを作製し、落射型蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50) を用いた。

細菌数の計数には接眼レンズに 5×5 グリッド (50×50 μm) を用いてオレンジ色の蛍光を発する細菌を計算した。一視野当たり 30 個以上の細菌数となる条件下で、プレパラート 1 枚につき 10 視野を計測し、3 枚のプレパラートの平均値を求めた。顕微鏡視野当たりの菌数から試料中の菌数を計算する方法を図 2-2 に示す。なお、使用した器具および Poly-L-lysine 水溶液、EtBr 溶液は除菌したものを用いた。

### 3-4-3 培養可能な微生物数の計測

鏝および土壌より採取したサンプルを、適宜希釈し、NB 培地 (Difco Laboratories) に 100 μL ずつ塗布した。塗布後、30°C で 5 日間培養を行い、培地上に出現した細菌コロニーを全て計測した。また、培養法によって測定した細菌数も直検法と同様に、鏝サンプルおよび土壌 1 g 中に存在する細菌数 (cells/g dry matter) で表した。

### 3-4-4 微生物群衆構造解析



試料中の全細菌数N (cells/g 乾土) は

$$N = \frac{\text{方形枠内の平均菌数 (cells)} \times \text{有効濾過面積 (mm}^2\text{)} \times \text{生土重}}{\text{方形枠内の面積 (mm}^2\text{)} \times \text{土壌希釈液の量 (mL)} \times \text{土壌希釈率} \times \text{乾土重}}$$

で表される

ここで、有効濾過面積の直径=15.0 mm

方形枠一辺の長さは

対物レンズ (倍率)	× 10	× 20	× 40	× 100
一辺サイズ (μm)	80	40	20	8

これから、概算係数\*を得る

Grid	倍率		
	× 10	× 40	× 100
5 × 5	8.0 × 10 <sup>2</sup>	1.24 × 10 <sup>4</sup>	8.0 × 10 <sup>4</sup>
10 × 10	2.0 × 10 <sup>2</sup>	3.2 × 10 <sup>3</sup>	2.0 × 10 <sup>4</sup>

\* 概算係数 = 有効濾過面積 (mm<sup>2</sup>) / 方形枠内の面積 (mm<sup>2</sup>)

$$N = \frac{\text{方形枠内の平均菌数 (cells)} \times \text{生土重}}{\text{土壌希釈液の量 (mL)} \times \text{土壌希釈率} \times \text{乾土重}}$$

液体試料の場合、試料中の全細菌数N (cells / mL) は

$$N = \frac{\text{方形枠内の平均菌数 (cells)}}{\text{試料希釈液の量 (mL)} \times \text{試料希釈率}}$$

図 2-2 顕微鏡視野当たりの菌数から、試料中の全菌数の換算式

鍬が土壌微生物生態に与える影響を評価するために、土壌に鍬を埋設・回収した後、微生物叢を T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 法を用いて調べた<sup>34)</sup>。

### 3-4-5 T-RFLP 法による微生物群集構造解析

#### (1) DNA の抽出

本研究では DNA 抽出に FastDNA® SPIN Kit For Soil (MP Biomedicals) を用いた。本キットは 500 mg までの土壌や活性汚泥などの環境サンプルから短時間で効率よく DNA を回収でき、広く用いられている。本法は、専用のホモジナイズ装置が必要であるが、フェノールやクロロホルムなどの有機溶剤が不要であり、比較的抽出が難しいとされているグラム陽性細菌の DNA の回収も可能である。

実際の操作は付属のマニュアルを一部改変して行った。その操作方法を以下に示す。試料 500 mg を、シリカ製およびセラミック製のビーズ (キット付属) が予め納められている Lysing Matrix E Tubes (キット付属) に採取した。次いで Sodium Phosphate Buffer (キット付属) 978  $\mu$ L, MT Buffer (キット付属) 122  $\mu$ L を加えた。このチューブを FastPrep Instrument (BIO101 Inc, Vista, CA, 現 MP Biomedicals) を用いて 6.0 m/s で 40 sec 間処理した後、1,4,000  $\times g$  で 30 sec, 室温で遠心分離を行い、得られた上清を新しい 1.5 mL 容エッペンドルフチューブに移した。

このチューブに Protein Precipitation Solution (キット付属) を 250  $\mu$ L 加え、10 回

上下に混合した。次いで  $14,000\times g$ , 5 min, 室温で遠心分離し, 得られた上清を 1.5 mL 容エッペンドルフチューブ 2 本に移した。これに Binding Matrix (キット付属) を 500  $\mu\text{L}$  ずつ加えて 2 min 転倒混合した。室温で 3 min 静置した後, 上清 250  $\mu\text{L}$  を捨て, 残液とビーズをピペッティングで攪拌した後, 300  $\mu\text{L}$  を Catch Tube (キット付属) にセットした SPIN Filter (キット付属) に移した。このチューブを  $14,000\times g$ , 1 min, 室温で遠心分離し, Catch Tube を空にした。この作業を残液がなくなるまで繰り返した。次いで SEWS-M (キット付属) を 500  $\mu\text{L}$  加え, 穏やかに攪拌し,  $14,000\times g$ , 1 min, 室温で遠心分離した。Catch Tube を空にし,  $14,000\times g$  で 2 min, 室温で遠心分離した。SPIN Filter を新しい Catch Tube に移し, 室温で 5 min 放置した。これに DES (FastDNA Spin Kit for Soil) を 30  $\mu\text{L}$  加え, タッピングによりビーズと馴染ませた後,  $14,000\times g$  で 1 min, 室温で遠心分離し, Catch Tube に落ちた液を全 DNA 溶液とした。

## (2) PCR

(1) にて抽出した DNA を鋳型として, 16S rRNA 遺伝子の増幅を行った。プライマーは真正細菌の 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたプライマー 10F の 5'末端に C を付加し, BODIPY<sup>®</sup>修飾を施した蛍光プライマー, Q10F および 907R を用いた<sup>35,36</sup>。BODIPY<sup>®</sup>修飾プライマーの作成は J-Bio 21 (株) に依頼した。PCR 反応は Ex Taq(Takara) を用いて行った。表 2-1 にプライマーの塩基配列を示し, 反応溶液の組成と PCR 条件

表 2-1 T-RFLP 解析用プライマー

プライマー	塩基配列
Q10F	5'-(BODIPY)-CAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
907R	5'-CCGTCAATTCCTTTTRAGTTT -3'

表 2-2 T-RFLP 解析用 PCR 反応溶液組成

試薬名	添加量 (μL)
Template DNA	x (50 ng)
Q10F primer	0.5
907R primer	0.5
× 10 PCR buffer (With MgCl <sub>2</sub> )	3.0
2.5 mM dNTPs	3.0
<i>Ex Taq</i> polymerase	0.5
DDW	22.5-x
Total	30

を表 2-2 および表 2-3 に示す.

得られた PCR 産物の精製には MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) を用い, 付属のマニュアルに従い行った.

### (3) 制限酵素での切断

制限酵素処理で使用する制限酵素には, 4 塩基認識でプライマーに認識部位を持たない *Hha* I (Takara) を用いた. 反応組成を表 2-4 に示す. 反応は 37°C で 2 時間行った. 酵素反応後, QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製を行い, 酵素反応を止めた. 手法は, 付属のマニュアルに従った.

### (4) シーケンサーを用いた電気泳動

制限酵素処理によって得られた DNA 断片 (T-RFs) の解析は, ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) の GeneScan モードにより行った. 制限酵素処理済の PCR 産物 2  $\mu$ L, Hi-Di formamide 15  $\mu$ L, スタンダードサイズマーカー (GeneScan-500 Liz size standard, Applied Biosystems) 0.1  $\mu$ L の混合液を作成した. 混合液を 95°C で 2min 熱処理することで, DNA を完全に 1 本鎖にした後, 直ちに氷冷し, 1 本鎖を保ったまま ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer に供した. ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer の操作は付属のマニュアルに従った. 測定データの解析にはソフトウェア GeneMapper (Applied Biosystems) を用いた.

## 3-5 各種土壌における鋤の利用

表 2-3 PCR 反应条件

temperature	time	
95°C	2 min	
95°C	30 sec	
54°C	45 sec	20cycles
72°C	90 sec	
72°C	5 min	
4°C	forever	

表 2-4 制限酵素反应组成

試薬名	添加量 (μL)
PCR産物	2.0
× 10 Buffer	5.0
<i>Hha</i> I	1.0
DDW	12.0
Total	20.0

鍬を土壤微生物集積ツールとして活用するためにはいくつかの解決すべき課題が存在するが、その1つは鍬が土壤の種類を問わず使用できることと考えられる。世界にはさまざまな土質の土壤があり、本手法を広く普及させるためには、その全てに利用可能であることが望ましい。そこで、日本の代表的な土壤3種において、鍬が土壤微生物生態に影響を与えないことを T-RFLP 法にて確認した。

#### 3-5-1 本実験で用いた土壤

国内の一般的な土壤として、黒ボク土、褐色森林土、灰色低地土の3種を試験用土壤として用いた。土壤はいずれも茨城県つくば市より採取した。

#### 3-5-2 鍬の埋設と回収

各種土壤に鍬を埋設し、24 時間後に土壤および鍬を回収した。鍬は 3-4-1 に記載の方法に従いサンプルを回収した。

#### 3-5-3 T-RFLP 法による微生物群衆構造解析

3-4-4 および 3-4-5 に記載の方法で、鍬の土壤への埋設・回収および T-RFLP による微生物叢解析を実施した。

### 第4節 結果

#### 4-1 作成した鍬

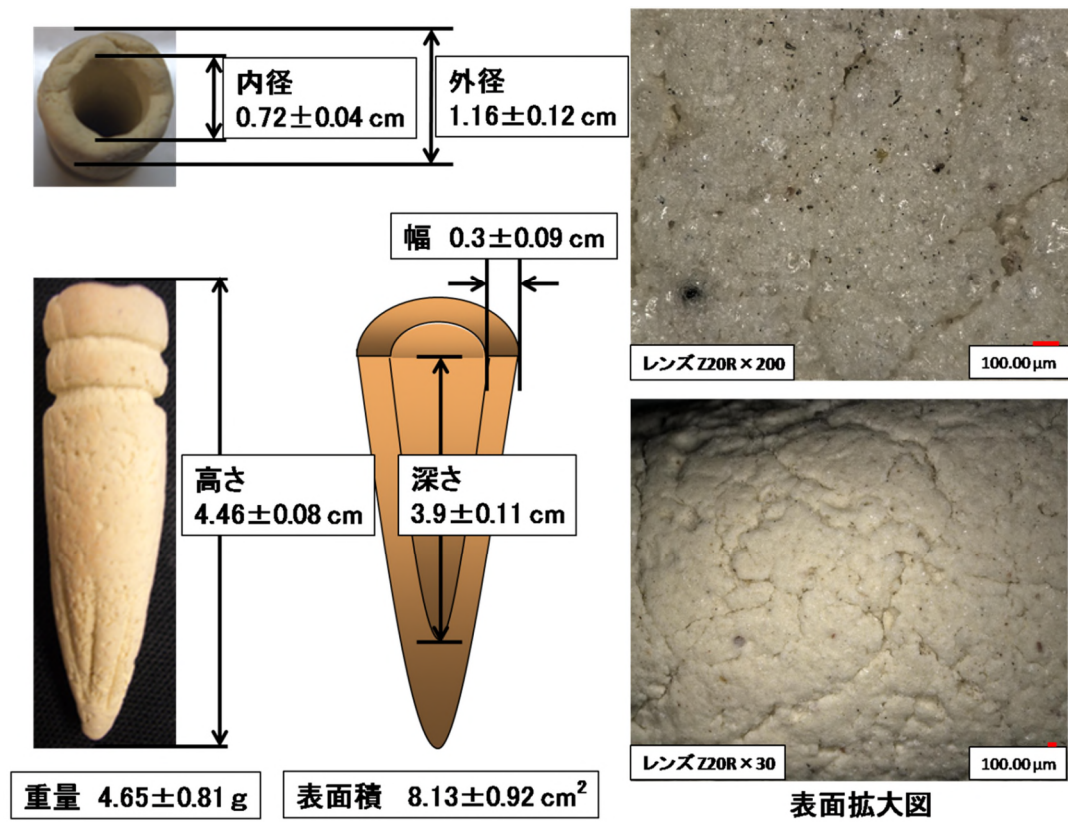


図 2-3 鏃の詳細



作製した鏝と鏝表面の拡大写真，サイズ，重量および表面積を図 2-3 に示す．1 g 当たりの細孔を含まない鏝の表面積を算出した結果， $1.76 \pm 0.11 \text{ cm}^2/\text{g}$  であった．また，ひとつひとつ手造りであるため，各鏝には多少のバラつきがあった（図 2-3）．サイズのバラつきに比べると各鏝の間で重量と表面積の差が大きかった．鏝表面の拡大写真から表面には細かい割れ目のような溝があり，細かい凹凸が形成されていた（図 2-3）．試料の染み出し具合も，手造りゆえの差が見られた（Data Not Shown）．

#### 4-2 土壌サンプルの回収量

土壌に埋設した鏝 1 本あたりのサンプル回収量は，およそ 0.2 g（wet matter）であった．

#### 4-3 全菌数の測定

鏝中の微生物数をサンプル 1 g 中に存在する微生物数（cells/g dry matter）で表し，破碎処理の有無によって回収できる細菌数を比較した．その結果を表 2-5 に示す．この結果より，土壌中と鏝サンプルの微生物数はほぼ等しくなることが示された．EtBr 染色法によって得られる全細菌数は土壌では  $7.8 \times 10^8$ - $9.3 \times 10^9$ （平均  $3.7 \times 10^9$ ）cells/g dry matter，鏝では  $5.5 \times 10^8$ ~ $8.2 \times 10^9$ （平均  $1.2 \times 10^9$ ）cells/g dry matter であった．

#### 4-4 培養可能な微生物数の比較

NB 培地上に生育してきたコロニー数は、土壌では  $2.2 \times 10^7$  -  $4.4 \times 10^7$  (平均  $2.5 \times 10^7$ ) cells / g dry matter, 鍬では  $9.0 \times 10^6$  ~  $2.2 \times 10^7$  (平均  $1.0 \times 10^7$ ) cells / g dry matter であり, こちらも土壌と鍬サンプルの両方に大きな差は見られなかった。結果を表 2-5 に示す。

#### 4-5 微生物叢解析結果

T-RFLP 解析より, 鍬より回収したサンプルは土壌と同様の微生物叢を示すことが明らかとなった。得られた T-RFLP プロファイルを図 2-4 に示す。T-RFLP プロファイルの 1 つのピークはおよそ 1 種類の微生物種を示しており, ピーク長が高いものほど当該環境における存在量が多いことを示す。

#### 4-6 各種土壌における微生物叢解析結果

T-RFLP プロファイルを図 2-5-図 2-7 に示す。用いた全ての土壌で, 鍬は土壌と同様の微生物叢を示した。

### 第 5 節 考察

本章では, 土壌環境での微生物集積を可能とする, 新たな研究ツールとして鍬を作製した。また, 作製した鍬のサイズや重量等を測定した。

鍬の各サイズの誤差は小さかったものの, 重量および表面積においては最大値と最小値の差が大きい。そのため, 極端に大きさの異なる鍬の使用には注意が必要であ

表 2-5 直検法と培養法における土壌と鏝の比較

	直検法 (EtBr染色法) 全微生物 (cells/g dry matter)	培養法 (培養5日目) NB培地コロニー数 (cfu/g dry matter)
土壌	$3.7 \times 10^9$	$2.5 \times 10^7$
鏝	$1.2 \times 10^9$	$1.0 \times 10^7$

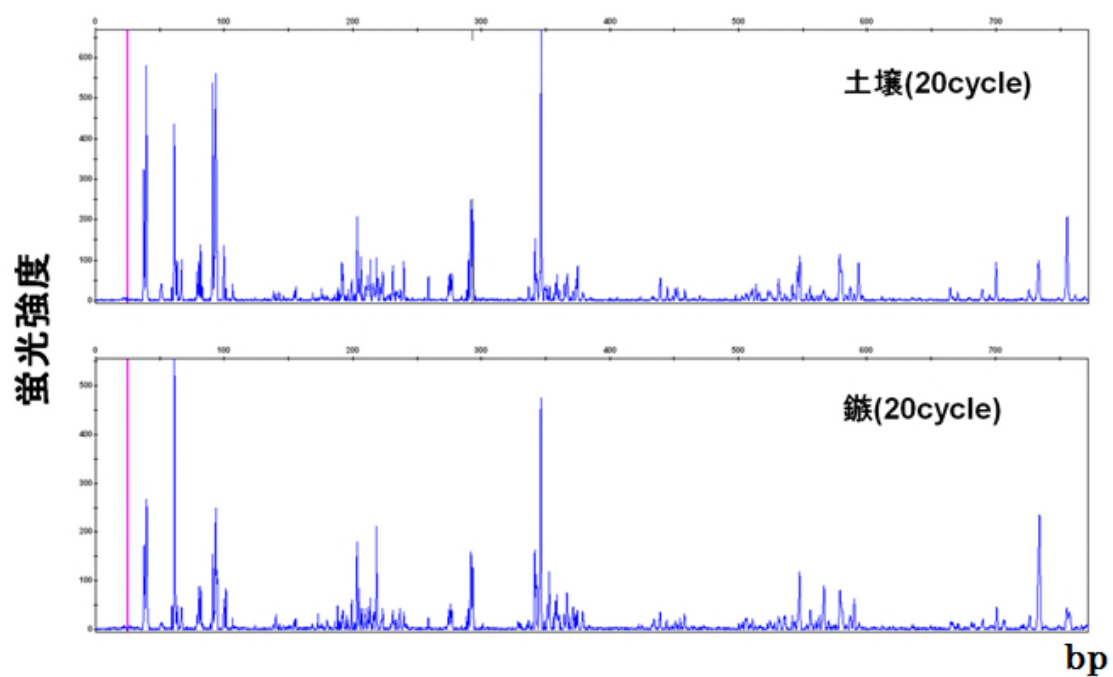


図 2-4 土壌および鍬の T-RFLP プロファイル  
(cycle は PCR の cycle 数を示す)

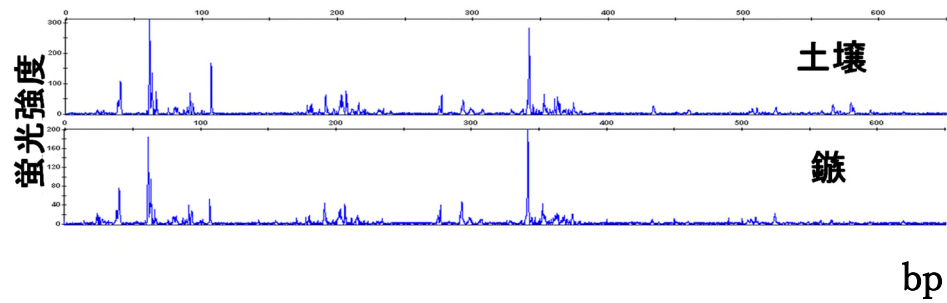


図 2-5 黒ボク土壌および鉄の T-RFLP プロファイル

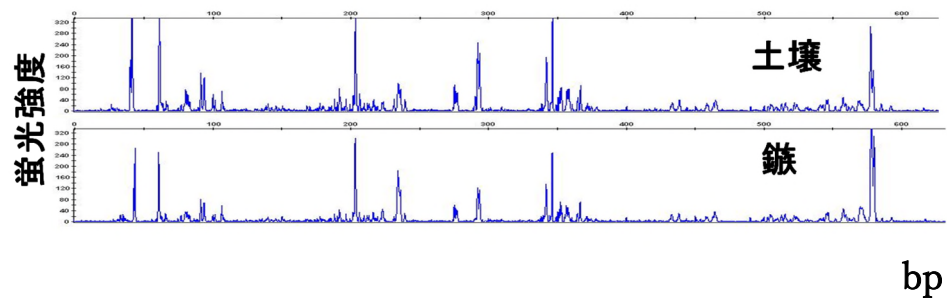


図 2-6 褐色森林土壌および鉄の T-RFLP プロファイル

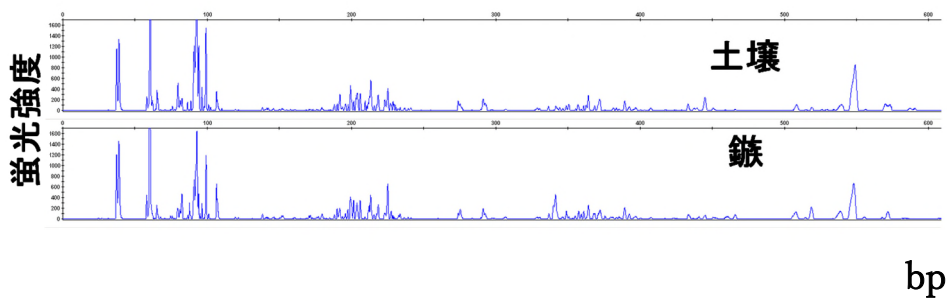


図 2-7 灰色低地土壌および鉄の T-RFLP プロファイル

る。また、鍬表面の拡大写真から非常に細かい凹凸が確認できた。このことから土揉み・土練りの段階でコーヒー粕を練り込んだこと、釉薬を使用せずに焼き上げたことによる表面の多孔質化が示唆された。

実験の安定化のためには、鍬間の試料の滲出速度は非常に重要と考える。そこで、使用前に、蒸留水等を添加し染み出し速度が等しい鍬を用いることが必要である。

一般的に土壌を含めた環境中の微生物は直検法では  $10^8 \sim 10^{10}$  cells/g, 培養法では  $10^7$  cells/g 程度の検出が報告されている<sup>37)</sup>。本章で用いた土壌においても同様の傾向を示した。一方、鍬中の微生物においても、直検法では  $10^9$  cells/g, 培養法では  $10^7$  cells/g と土壌と等しい結果が得られた。よって、鍬の埋設方法および、鍬サンプル回収方法には問題がないことが示された。各結果とも鍬サンプルにおいて微生物数がやや少ない値を示すのは、回収時に生理食塩水に晒すなどの操作を行ったため、一定の微生物ロスが発生したためと考えている。

T-RFLP プロファイルから、鍬サンプル中の微生物叢と土壌中の微生物叢はほぼ等しいことが各種土壌において示された。

以上の結果より、鍬自体が土壌微生物に与える影響は少なく、鍬は土壌環境に適用可能であることが明らかとなった。

### 第3章 鋤を用いた土壌微生物集積

#### 第1節 緒言

本章では、鋤を用いた土壌微生物集積を行い、その効果を検証した。鋤を用いた土壌微生物集積は、従来から広く行われている試料を環境中に加えて特定微生物の集積を試みる集積培養法<sup>38)</sup>にコンセプトが類似している。よって、集積培養法との差異も同時に示す必要があると考え、これを実証した。

#### 第2節 実験方法

土壌は、第2章と同じつくば市水田土壌を用いた。また、鋤に添加する試料として、ラード（純製プリマラード プリマハム）を選択した。ラードは環境中の微生物によりたやすく分解を受ける易分解性物質であり、多くの菌がラードを用いて増殖すると考えられる。よって本章で行う検証には最適であると考えた。図3-1に本章の実験概要を示す。

##### 2-1 試験区の設定

以下、①-③の試験区を用意し、実験を行った。

- ①： 土壌（コントロール）
- ②： 土壌に直接ラードを散布したもの（ラード区、集積培養）
- ③： 土壌に鋤を埋設し、ラードを添加したもの（鋤区）

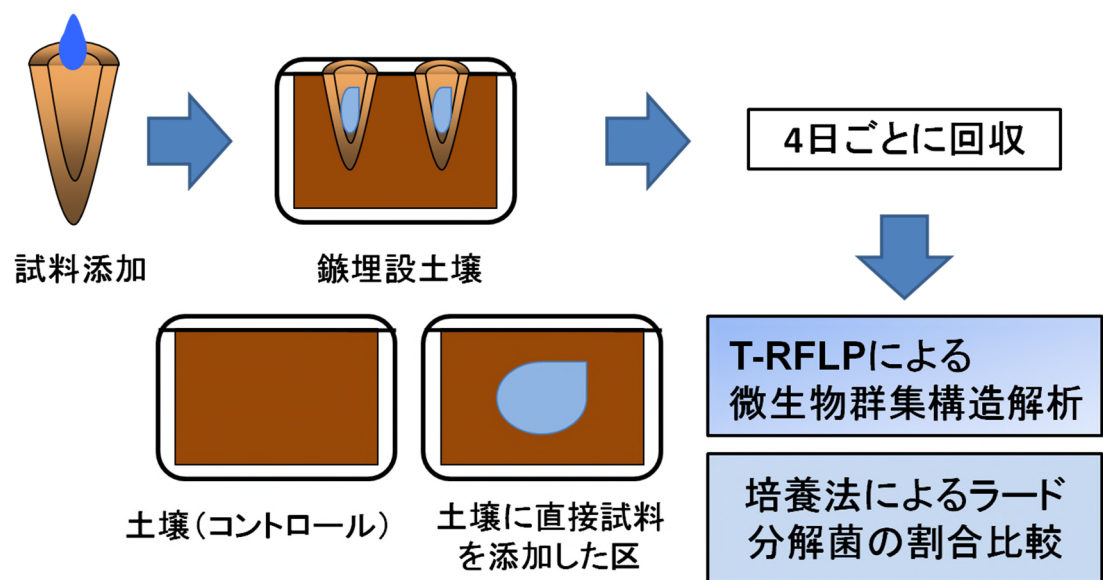


図 3-1 鍬の有効性評価



## 2-2 試験方法

評価手法としては、微生物叢および分解菌に注目した。鍬にラードを添加し、環境中に埋設することにより、鍬表面に試料特異的な微生物が培養されるのであれば、鍬より回収したサンプルの微生物叢が特異的に変化するはずである。また、鍬で多くのラード分解菌が *in situ* 培養されれば、平板培養法における分解菌の出現割合も向上すると考えられる。よって上記 2 点の評価対象をラード区およびコントロールと比較し、鍬区における優位性が確認できれば、鍬を用いた土壤微生物集積法の有効性を示すことができると考えた。微生物叢の変化は、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした T-RFLP 解析にて評価し、平板培養における分解菌の出現割合についてはラードを重層させた平板培地を用い、ラードを分解したハロー形成を指標に分解菌数をカウントした。

### 2-2-1 サンプルの回収方法

コントロールおよびラード区では、直接土壌を回収した。鍬区では第 2 章 3-4-1 に記載の方法に従った。サンプリングは 4 日ごとに実施した。

### 2-2-2 T-RFLP 法による微生物群集構造の解析

DNA の抽出、T-RFLP 法による微生物叢解析は、第 2 章 3-4-5 に記載の方法で行った。

### 2-2-3 培養法によるラード分解菌の取得割合

NB 寒天培地に下記に示す方法で調整した 1 %ラードエマルジョンを重層させ、各サンプルの希釈液を植菌した。30 °Cで 5 日間静置培養後、ラードを分解したハローを形成した菌体をラード分解菌としてその割合を求めた。

培養に用いるラードエマルジョンは次のように作成した。終濃度 1%になるようにラードを蒸留水に溶かし、100 ppm の plysurf A210G を加え、15,000×g, 10 min, 室温でホモジナイズすることでエマルジョン化を行った。エマルジョン化したラードに終濃度 1.5 %になるように寒天を加え、オートクレーブにて滅菌を行った。

### 2-2-4 取得したラード分解菌の T-RFLP 解析

試験区ごとに実験期間中に取得したラード分解菌を全てまとめて、T-RFLP 解析に供した。DNA の抽出および T-RFLP 法による微生物叢解析は、第 2 章 3-4-5 に記載の方法で行った。

## 第 3 節 結果

### 3-1 T-RFLP 法による微生物叢解析

実験開始後 4-20 日における、T-RFLP プロファイルを図 3-2-図 3-4 に示す。コントロールでは、実験期間内に細菌叢の変化は確認されなかった（図 3-2）。ラード区では 4 日と 8 日においてラード添加による微生物叢の変化が確認できた（図 3-3）。

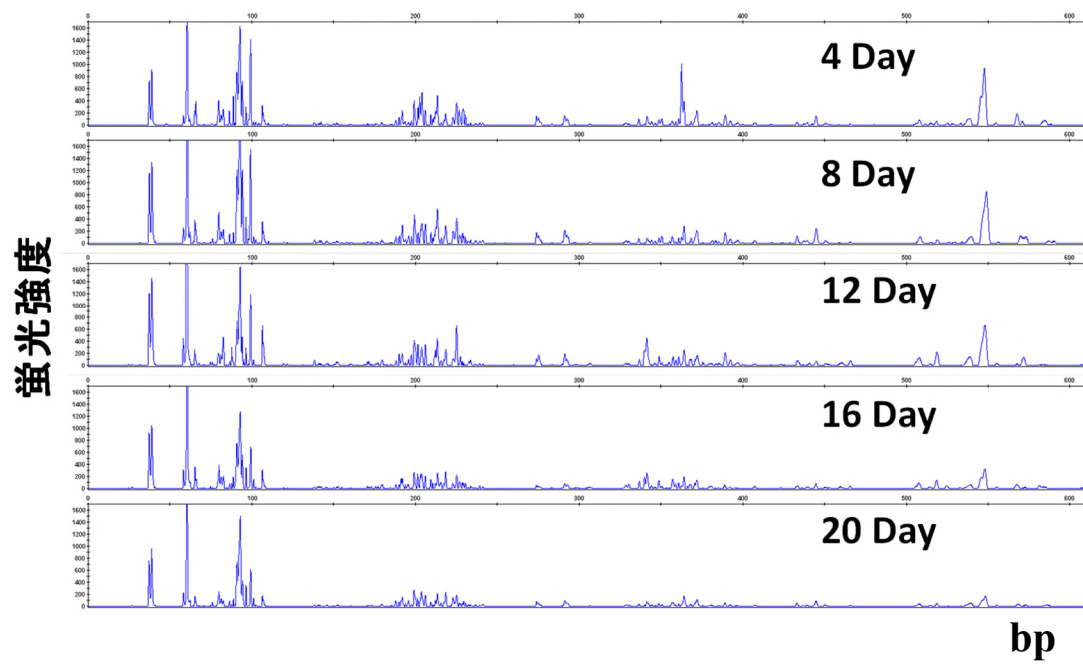


図 3-2 コントロール（土壌）における T-RFLP プロファイルの推移

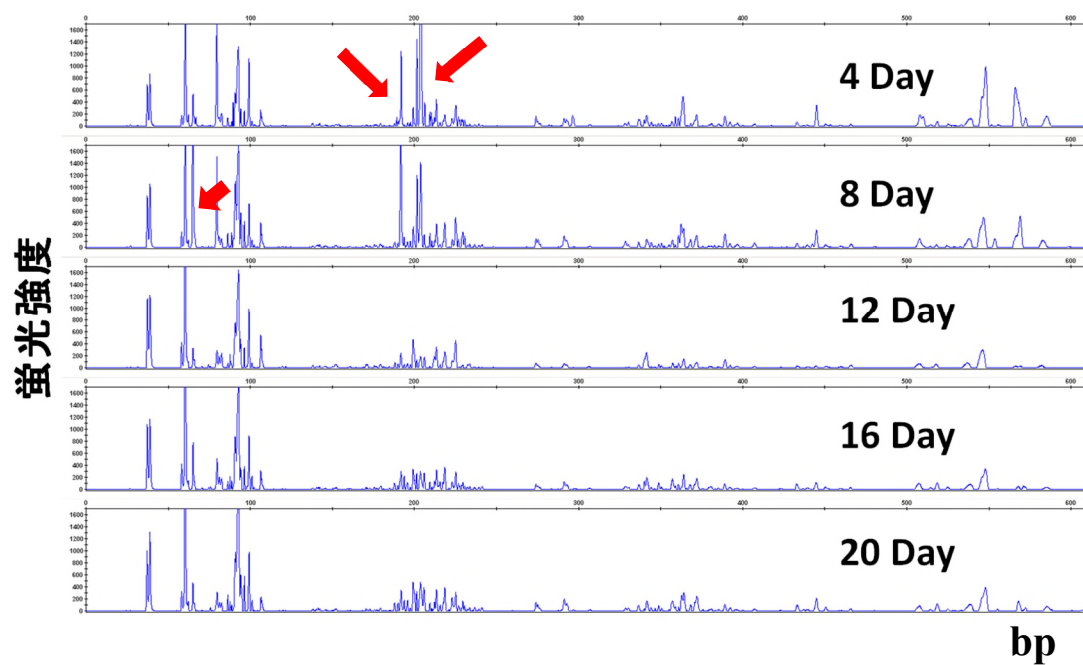


図 3-3 ラード区における T-RFLP プロファイルの推移  
 (コントロールと異なるすなわちラードの影響により発生したと考えられる  
 微生物ピークを图中赤矢印で示した.)

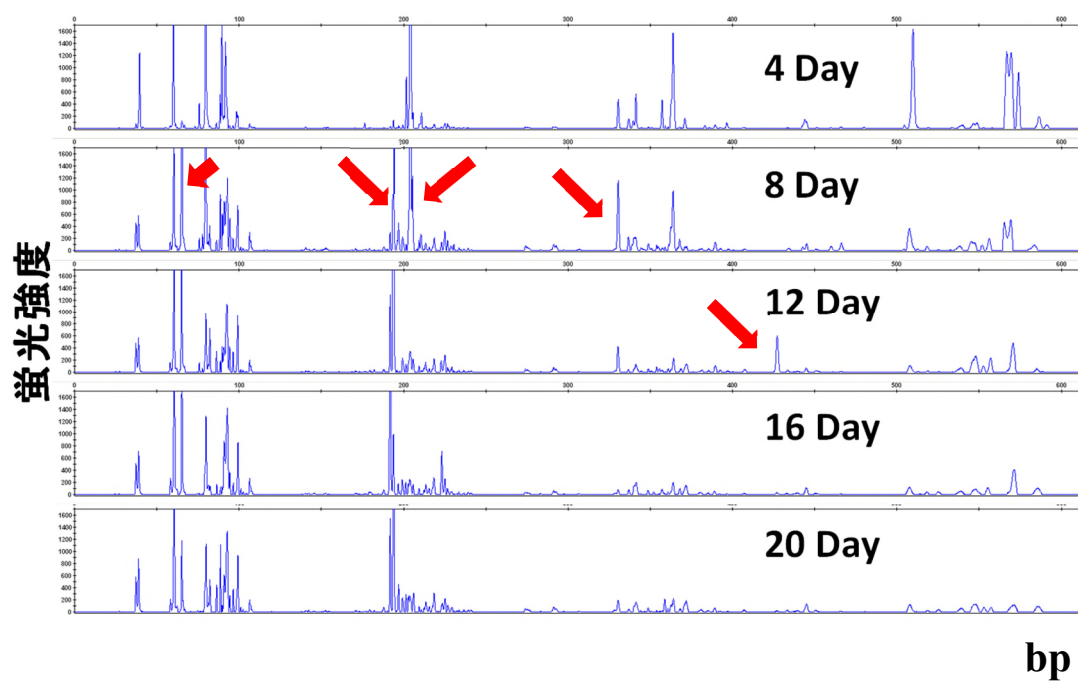


図 3-4 鍍区における T-RFLP プロファイルの推移  
 (コントロールと異なるすなわちラードの影響により発生したと考えられる  
 微生物ピークを図中赤矢印で示した。)

また、12 日以降はコントロールと同様のプロファイルを示した。鍍区においても、コントロールとは異なったプロファイルを示した（図 3-4）。すなわち、ラードに応答した微生物が集積されていることが示唆された。また、鍍区のみに出現する微生物ピークも確認できた。

### 3-2 培養法によるラード分解菌の取得割合

ラード分解菌の取得割合を図 3-5 に示す。鍍区においてより多くの分解菌の培養が可能であることが示された（図 3-5）。

### 3-3 ラード分解菌の T-RFLP 解析

ラード分解菌の T-RFLP プロファイルを図 3-6 に示す。コントロールとラード区では獲得したラード分解菌の微生物叢は同一の傾向を示したが、鍍区では、両区に比較して多種多様な分解菌が確認された。ただし、コントロールとラード区のみで確認された分解菌も存在した。

## 第 4 節 考察

鍍を用いることで、微生物叢に変化が生じることが確認された。すなわち、目的微生物の集積すなわち *in situ* 培養が行えたことが示唆された。また、平板培養法においてもその効果が確認できた。T-RFLP 解析でラード区に比べ鍍区で数多くのピークが確認できた理由としては、土壤環境にラードを直接添加することで、ラードは速やかに

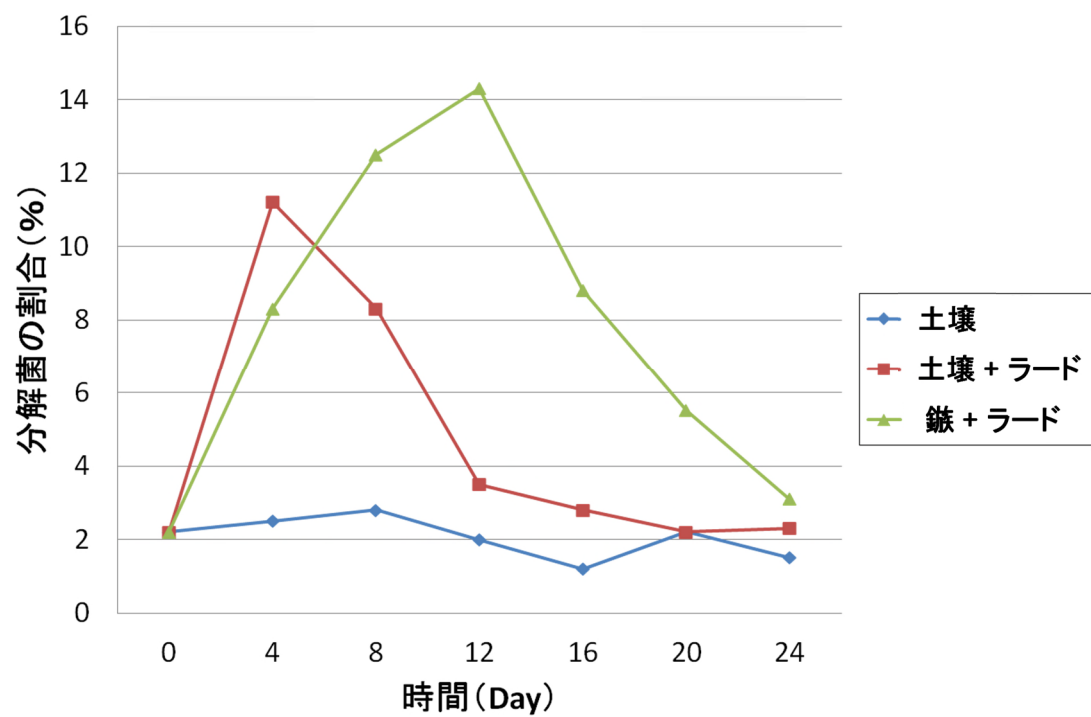


図 3-5 平板培養法における，ラード分解菌の取得割合

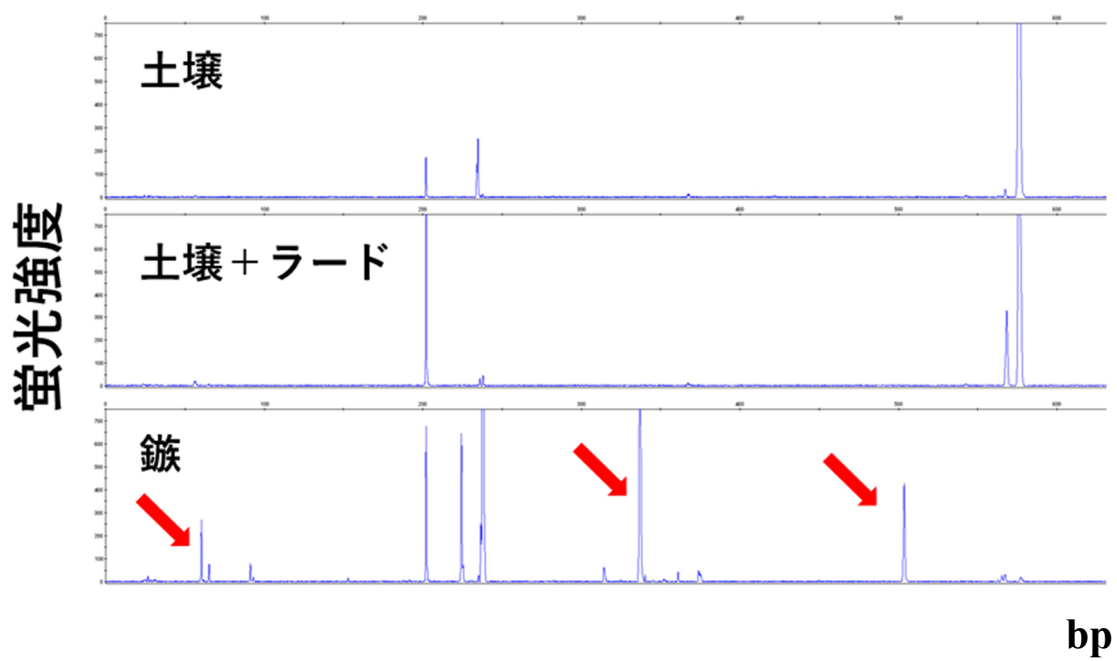


図 3-6 取得されたラード分解菌の T-RFLP プロファイル  
(赤矢印は、鏝を用いた場合に主に観測された微生物ピークを示す)



拡散・分解されてしまうが、鏝区では試料は毛細管現象により徐々に内側から鏝表面に染み出していくため、倍化時間の長い微生物等も集積できることが理由であると考えている。これは、12日のT-RFLPプロファイルにおいて、鏝区のみがコントロールと比較し特異的なピークが出現していることが支持している。また、鏝の特異的なピークは、環境常在菌の鏝への定着性や付着性、菌の運動性が大きく関わっていると考えられる。

培養法による優位性は、上記の理由に加え、ラード区ではラードが染み出した土壤のみを回収するのは非常に困難であるため、通常の土壤も多量に混ざってしまった為であると考えられる。一方、鏝区では試料の拡散は鏝表面で抑えられるため、確実に目的微生物を含むサンプルを回収することができる。鏝区において、ラード区やコントロールと比較し、異なった分解菌が出現したことは、*in situ* 培養の効果であると考えている。

よって、鏝を用いることで、*in situ* 培養の効果を兼ね備えつつ、簡易な単離培養が可能であることが示唆された。

## 第4章 鍬の改良

### 第1節 緒言

前章までにおいて、鍬を用いた土壌微生物集積の効果が示唆されたが、実験を通じて鍬はいくつかの改善すべき点を抱えていることが明らかとなった。以下、鍬の課題点を記載する。

- ①：先端が円錐型であり、添加した試料が主に鍬の下部より土壌環境に滲出する。
- ②：コーヒー粕を練りこんだ焼成や、穴や溝の成型により、製造上の手間が増え大量生産に適さない。

よって、本章では、これら課題を解決すべく、新型鍬の開発を行った。

### 第2節 新型鍬の開発

新型鍬については、旧型に対して、以下、①-③について変更を行った。

- ①：形状を円錐型から、円筒形に改めた。
- ②：周辺土壌に一樣に試料が滲出するよう、末端は半球状とした。
- ③：型を用いた製造を可能とするため、コーヒー粕の練りこみや、溝や穴の成型をやめた。

焼締め等、その他製法・原材料は、第2章に記載の鍬との変更点はない。

#### 2-1 鍬のサイズ・重量・内容量の測定

作製した鍬の中から無作為に 5 本の鍬を選び、それぞれのサイズ（高さ・外径・内径・深さ・厚さ）、重量、内容量を測定した。サイズの測定にはノギスを用いた。

## 2-2 試料の添加方法、および土壌サンプリング方法

前章までに用いた鍬は、表面に溝や穴を有していたため、サンプリングにおいて鍬そのものを回収することが可能であった。しかし、新型鍬は溝等の加工を行っていないため、鍬そのものから得られる土壌サンプル量は微量である。よって、添加した試料が鍬より滲出する範囲を計測し、その範囲の土壌をサンプリングすることとした。また、鍬に添加した試料を鍬全体から均一に滲出させるために、直接試料を添加する形から、珪藻土に含ませた試料を、鍬に添加する方法に変更した。珪藻土を用いることで、試料が鍬内部に均一に接触し、鍬全体から満遍なく滲出するのではないかと考えられる。

## 第 3 節 鍬に添加した試料の滲出範囲の計測

鍬に添加した試料の土壌拡滲出範囲および、珪藻土を用いる添加法を検証するために、フェノール（和光純薬工業）を試料として用い、鍬に添加したフェノールの土壌滲出範囲を明らかにすることとした。実験の概要を図 4-1 に示す。

### 3-1 使用土壌

茨城県つくば市の畑より採取した土壌を、2 mm メッシュの篩にかけ、通過分を実験に使用した。篩を通過した土壌 1.2 kg を 121 °C、20 分の条件でオートクレーブし、こ



図 4-1 鏝に添加した物質の滲出範囲の調査

れを3回繰り返した。オートクレーブ後の土壌を、縦210 mm×横150 mm×深さ70 mmのプラスチックケースに充填し、本作業を3回繰り返すことで、3つの土壌入りケースを作成した。なお、土壌環境を周辺環境に馴染ませるため、土壌を充填したケースは、25 °Cで2日間静置した後に実験に用いた。

### 3-2 フェノール添加鏝の埋設

鏝1本につき、フェノール333 mg、蒸留水333  $\mu$ L、珪藻土333 mgの混合物を添加したフェノール鏝を12本用意した。用意したフェノール添加鏝を1ケースにつき、4本ずつ等間隔に埋設した。なお、試験は室温を25 °Cに保った実験室内で実施し、水分の蒸発を防ぐためアルミホイルでケースに蓋をした。

### 3-3 土壌サンプリング法

1週間ごとに計4週間、各ケースより1本の鏝を選択し、選択した鏝の中心部から、それぞれ、0-0.8 cm、1 cm、3 cmの距離にある土壌をサンプリングした。まず、鏝を周辺の土壌を崩さないようゆっくりと上部に引き上げることで回収した後、内径21 mmのポリプロピレンチューブを用い、鏝の中心部とチューブの中心が同じになるように土壌に突き刺し、チューブ内部の土壌を鏝より0.8 cmの距離にある土壌とした。次いで約1 cmおよび3 cmの距離にある土壌を、スパチュラを用いて回収した。

### 3-4 土壌に滲出したフェノールの定量

サンプリングした土壌から酢酸エチルを用いてフェノールを抽出し、GC-MS によるフェノールの定量を行った。2 g の土壌に 4 mL の酢酸エチル(和光純薬工業)を加え、ボルテックスミキサーでよく攪拌した後、10 min 静置した。上澄に無水硫酸ナトリウム(和光純薬工業)を加え脱水し、ガスクロマトグラフ (TRACE GC 2000 GC instrument, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)、に質量分析計 (FINNIGAN POLARIS Q MS instrument, Thermo Scientific) を接続した GC-MS を用いて、フェノールの量を測定した。フェノール定量条件を、表 4-1 に示す。

#### 第 4 節 新型鍬が土壌微生物に与える影響評価

本章で開発した鍬は、第 2 章の鍬から、原料の変更は行っておらず、また土壌そのものをサンプリングする形に変更したため、基本的には土壌微生物に与える影響はないと考えられる。しかしながら、第 2 章においては鍬埋設後 24 時間のみの細菌叢を解析したため、本章においては、試験期間を 2 週間まで延長し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)<sup>34)</sup>にて細菌叢を評価し、土壌微生物への影響を確かめることとした。

##### 4-1 使用土壌

2 mm の篩を通過したつくば市畑土壌約 1.2 kg を 210 mm×150 mm×70 mm のプラスチックケースに充填し、土壌微生物を実験環境に順応させるため、25 °Cで静置した。2 日後、鍬 5 本を土壌に埋設した。試験期間中は室温を 25 °Cに保った、

表 4-1 フェノール定量における GC-MS 条件

GC	TRACE GC 2000 (Thermo Scientific)
MS	FINNIGAN POLARIS Q mass spectrometry (Thermo Scientific)
Column	DB-1ms column (30 m × 0.25 mm and 0.25 µm film thickness; Agilent Technologies)
Column temperature	100 °C for 3 min, rise from 100 °C to 190 °C in 30 °C/min increments, and finally held at 190 °C for 1 min.
Injection volume	1 µL
Split rate	1:10 at 250 °C
Helium rate	1.5 mL/min
Ion source temperature	225 °C
Transfer line temperature	250 °C
Mass range	50–200 m/z.

#### 4-2 DNA の抽出

0, 1, 3, 7, 14 日目に鍬から 0-0.8 cm の距離にある土壌を本章 3-3 に記載の方法でサンプリングし, 第 2 章 3-4-5 に記載の方法で DNA 抽出を行った. 鍬より 5 cm 以上離れた土壌についても, コントロールとして同様にサンプリングを行い, DNA を抽出した.

#### 4-3 16S rRNA 遺伝子の増幅

抽出した DNA を鋳型として, 16S rRNA 遺伝子の増幅を行った. 表 4-2 にプライマーの塩基配列を示し, 反応溶液の組成と PCR 条件を表 4-3, 表 4-4 に示す.

得られた PCR 産物の精製には MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) を用い, 付属のマニュアルに従い行った.

#### 4-4 DGGE 法による微生物生態解析

得られた PCR 産物に, 等量の 2×Dye Solution (0.5% Bromophenol Blue, 0.5% Xylene cyanol 70% Glycerol) を添加し, DGGE に供した. DGGE ゲルのアクリルアミド濃度は 8 % (w/v) とし, 変性剤濃度勾配を 30-60 %にして作成した. なお, 7M 尿素および 40 %ホルムアミドを含む溶液を 100%変性剤とした. 電気泳動には, D-Code Universal Mutation Detection System (BIO-RAD Laboratories Inc.) を用い, 60°C, 36 V で 18 時間泳動を行った.



表 4-2 DGGE 解析用プライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
357F	5'-(GC-clamp)CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
518R	5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'
GC-clamp	5'-CGCCCGCCGCGCCCGCCGCC CGTCCCGCCGCCCCGCCCCG -3'

表 4-3 DGGE 解析用 PCR 溶液の組成

試薬	添加量 (μL)
MilliQ-water	2.2
Master Mix	10
GC Enhancer	0.8
357F GC (2 pmol/μL)	3.0
907R (2 pmol/μL)	3.0
Template	1.0
Total	20

表 4-4 DGGE 解析 PCR 条件

temperature	time
95°C	10 min
95°C	30 sec
49°C	30 sec 30cycles
72°C	15 sec
72°C	7 min
4°C	forever

## 第 5 節 集積培養との比較について

第 2 章のラードを用いた試験によって、集積培養とは異なる微生物挙動を示すことが明らかとなった。この理由を第 2 章においては、鍬を用いることで、長期間試料が土壤環境に暴露されることでさまざまな微生物が集積されることによるものと考察を行った。そこで、実際に鍬が長期間にわたって試料を土壤環境に暴露させることが可能であることを証明するため、フェノールを添加した鍬と、フェノールを土壤に直接添加した場合とで、それぞれ土壤中のフェノール濃度を比較した。

### 5-1 試験設計

土壤は、つくば市畑土壤を 2 mm メッシュの篩にかけ、通過分を実験に使用した。鍬 1 本につき、フェノール 333 mg、蒸留水 333  $\mu$ L、珪藻土 333 mg の混合物を添加したフェノール添加鍬を 21 本用意した。作製したフェノール鍬を土壤に埋設したものを鍬区とした。比較のため土壤にフェノールを直接添加することで 500 ppm フェノール漉き込み土壤を作製し、これをフェノール漉き込み区とした。また、コントロールとして土壤のみの系も用意した。試験開始より 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28 日目にそれぞれ鍬から 0-0.8 cm の距離にある土壤をサンプリングした。実験は 3 連で行った。

### 5-2 フェノールの定量

フェノールの定量は本章 3-4 に記載の方法に従い実施した。値は 3 連の平均値（ $\pm$

SD) を算出した。

## 第 6 節 結果

### 6-1 鍬のサイズ・重量・内容量の測定

実際の鍬の写真を図 4-2 に示す。また、鍬のサイズ、重量、内容量を測定した結果を表 4-5 に示す。ひとつひとつ手造りであるため、鍬のサイズ、重量、内容量には多少のバラつきがみられたが、前章までに用いた鍬に対し、その差は小さいものであった。

### 6-2 鍬に添加したフェノールの土壌滲出範囲

GC-MS によるフェノールの測定結果を図 4-3 に示す。試験期間を通して鍬から約 3 cm の距離にある土壌においてはフェノールが検出されることはなく、フェノールの滲出範囲は鍬からの距離約 3 cm 未満の限られたスペースにとどまることが明らかとなった。また、鍬埋設後 7 日目には周辺土壌においてフェノールが検出されたことから、鍬に添加したフェノールの一部は 7 日以内に周辺土壌へ滲出することも明らかとなった。

### 6-3 DGGE 法による土壌微生物叢解析

DGGE 法による土壌微生物叢解析結果を図 4-4 に示す。試験期間を通して、鍬周辺土壌と土壌は同一の細菌叢を示した。

### 6-4 集積培養と比較したフェノール濃度変化

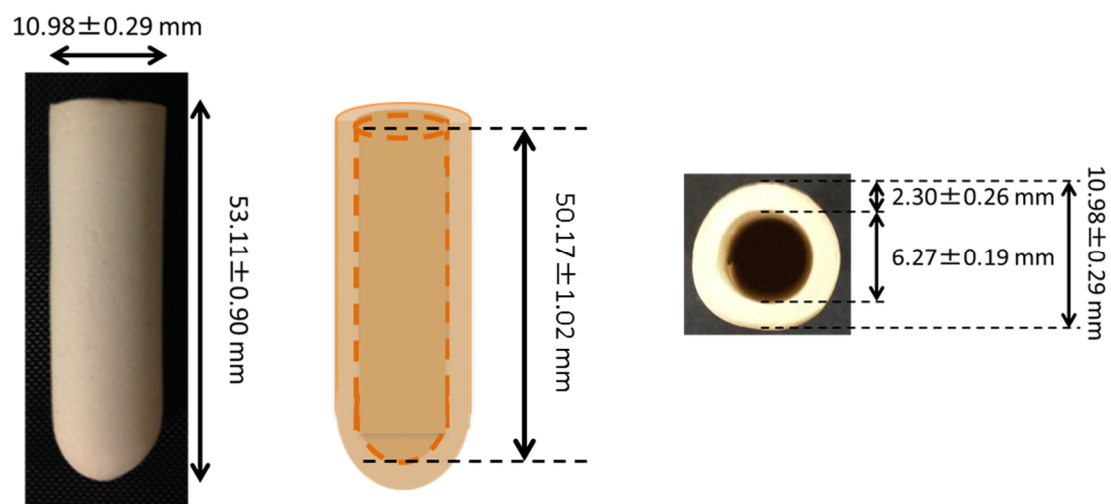


図 4-2 新型鍬の詳細

表 4-5 新型鍬の計測結果

	鍬 1	鍬 2	鍬 3	鍬 4	鍬 5	平均	標準偏差	最大値と 最小値の差
内径(mm)	6.48	6.12	6.35	6.28	6.13	6.27	0.153	0.37
外径(mm)	11.02	10.77	11.35	10.88	10.88	10.98	0.225	0.58
深さ(mm)	51.10	50.38	49.20	49.07	51.08	50.17	0.987	2.03
長さ(mm)	53.87	53.07	52.07	52.87	53.70	53.11	0.719	1.80
厚さ(mm)	2.38	2.32	2.52	2.00	2.30	2.30	0.190	0.52
重量(g)	6.94	6.85	6.80	6.95	7.00	6.91	0.080	0.20
内容量(mL)	1.6	1.6	1.9	1.6	1.4	1.62	0.179	0.50

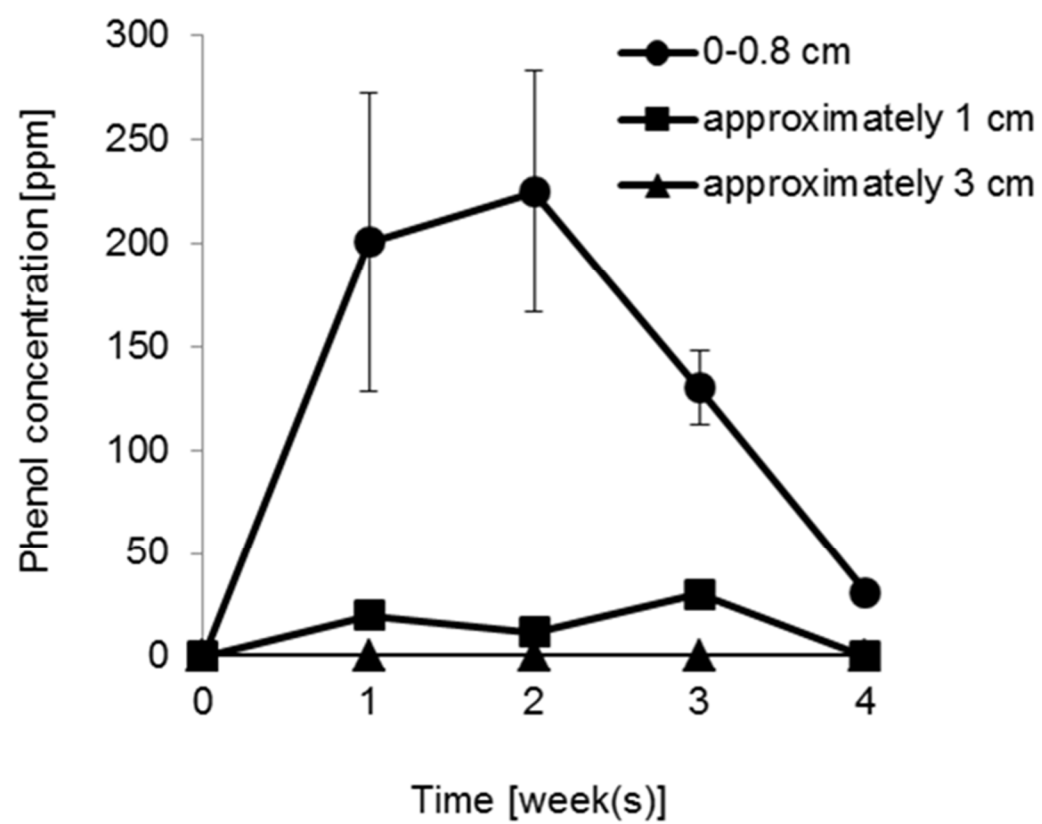


図 4-3 鍬に添加したフェノールの滲出範囲

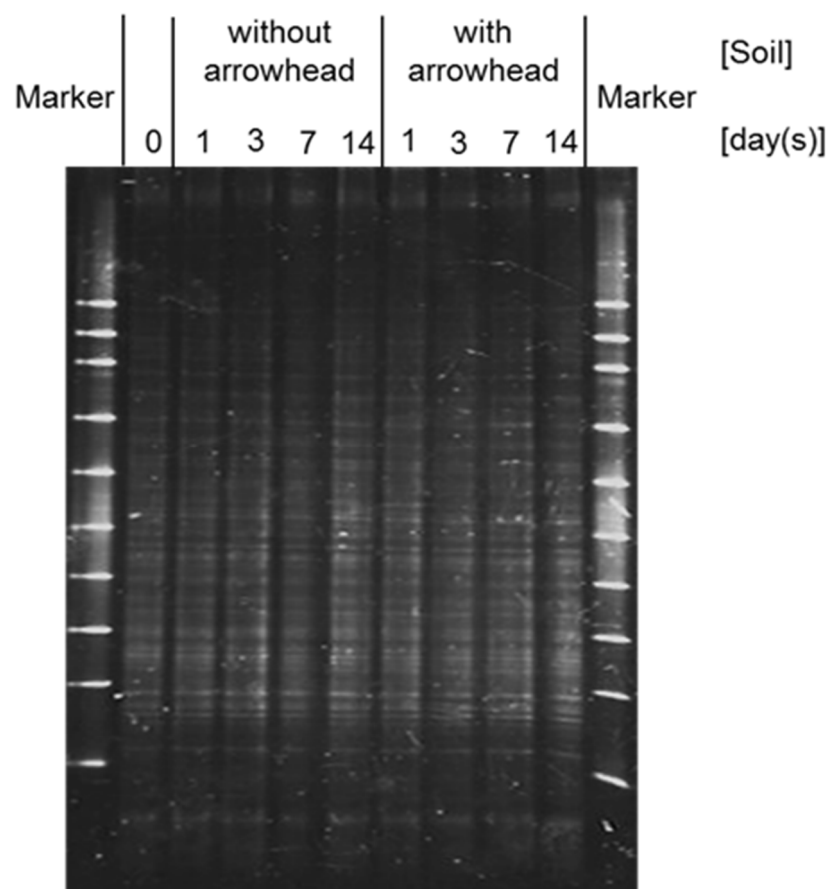


図 4-4 土壌と新型鋤周辺土壌の DGGE 解析

各試験系における土壤中フェノール濃度の経時変化を図 4-5 に示す。コントロール  
土壌ではすべてのサンプルにおいてフェノール濃度は検出限界以下であった。フェノール  
澆き込み区では時間の経過に伴い濃度が減少し、14 日目でほぼゼロとなった。鍬区  
では 28 日目までフェノールが検出された。

## 第 7 節 考察

本章では、第 2 章において作成した鍬の改良を実施した。改良により、各鍬のサイズ、  
重量、内容量といったバラツキが抑えられ、また、型を用いた製造が可能になったこと  
からより実用的なツールになったと考えられる。

しかしながら、本鍬によっても試料の滲出量・速度は安定しなかった。図 4-6 に 4 本  
のフェノール添加鍬を用いて、土壌に埋設後 3 日目の鍬周辺 0.8cm 圏内のフェノール  
濃度と、DGGE による細菌叢解析結果を示す。4 本の鍬間でフェノールの滲出速度は異  
なっていたが、細菌叢自体は同一の結果を示した。よって、鍬は定量的な実験よりも主  
に定性的な実験に用いられることが望ましいと考えられる。

図 4-3 において滅菌土壌を用いたにも関わらず土壌中のフェノール量が経時的に減  
少しているが、これは土壌の滅菌が不完全であったため、残存した微生物による、フェ  
ノールの分解が生じたためと考える。実際に、本土壌希釈液を NB 培地に塗布したとこ  
ろ、 $1.2 \times 10^3$  cfu/土壌 g 程度のコロニーが発生した (Data Not Shown)。

また、鍬より土壌に滲出する試料はおおむね鍬から 3cm 以内に収まっていた。これ

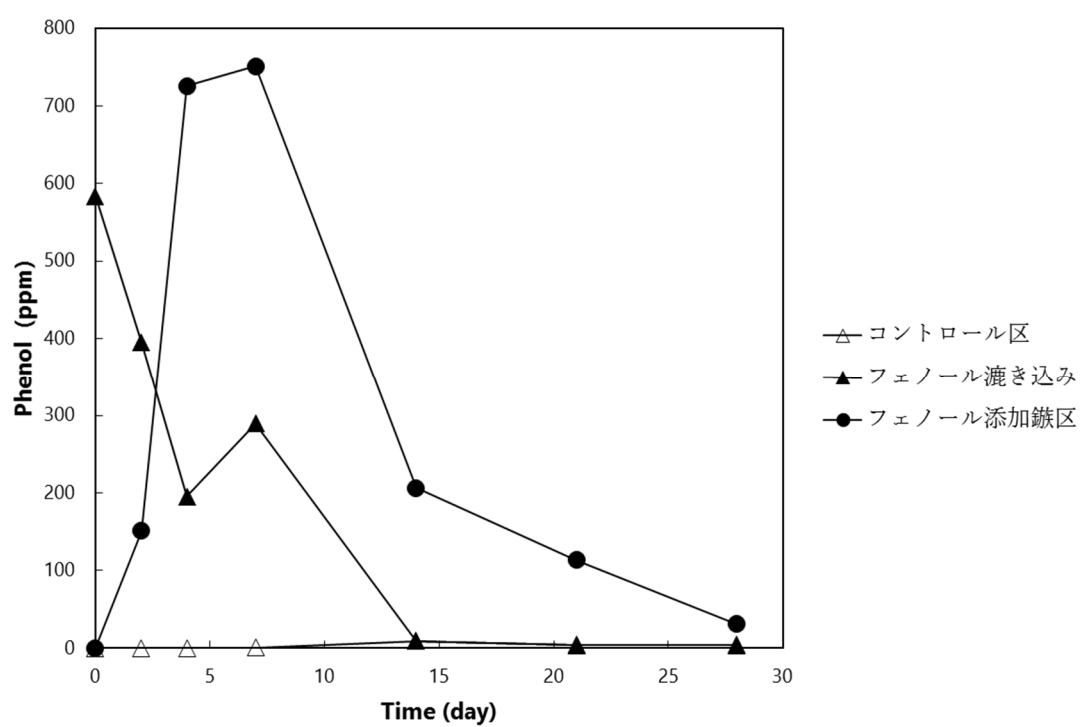


図 4-5 集積培養と鉄のフェノール濃度変化の違い



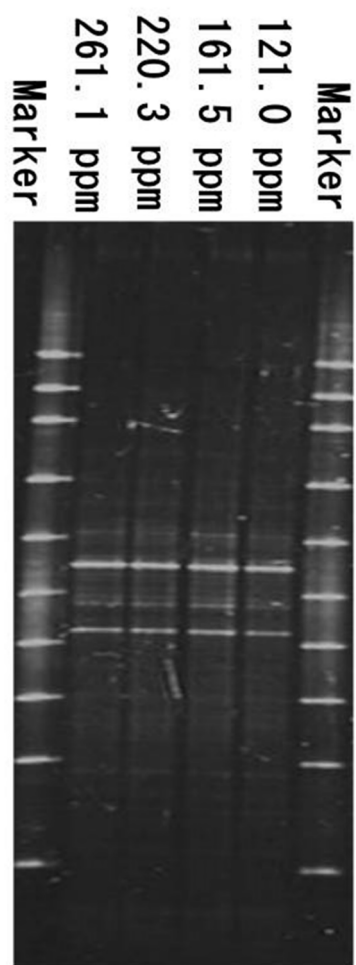


図 4-6 鉄の個体差（滲出速度差）による土壌微生物への影響

は、非常に興味深い結果であり、鍬を用いることで微生物集積が低環境負荷で実施可能であることを意味している。本事象は、土壌特性、試料特性、そして分解菌の有無や数に左右されると考える。他の物質においてもフェノール同等の結果を見せるのかについては、今後さまざまな土壌タイプや試料を用いて確認する必要がある。

## 第5章 鏝の微生物生態解析への応用

### 第1節 緒言

当初、鏝は新規土壌微生物集積ツールとして開発された。しかしながら、前章までに観察された鏝の特性を鑑みると、定性的な微生物生体解析のツールとしても応用可能であると考えられる。よって、本章では土壌微生物集積以外の鏝の応用方法として微生物生態解析、主に効果的なバイオレメディエーションに向けた備えとして、鏝の応用を試みた。

### 第2節 バイオレメディエーションの備えとしての鏝の応用

近年、さまざまな化学物質で汚染された環境の修復技術として、低環境負荷、低コストといった利点を有するバイオレメディエーションが注目を集めている。

バイオレメディエーションは本来、汚染事故が起きた際に実施されるものであるが、事故の際は、より効率的かつ迅速な実施が求められるため、事前検証を行い有事に備える必要がある。すなわち、予め汚染が想定される物質を用いて、当該環境における汚染物質分解菌の挙動とそれを取り巻く微生物生態系の解析を行い、汚染物質の分解メカニズムを事前に推定し、環境修復マニュアル等を策定することが求められている<sup>39,40,41)</sup>。そのため、これまで実験環境に汚染物質を添加した系で汚染物質分解のモニタリングや生態系影響評価が行われ、数多くの知見が得られている<sup>42,43,44,45,46,47)</sup>。

しかしながら、これらの知見の多くは、実験室レベルで得られたものであり、得られたデータが実環境中の生態系でも再現されることは稀である<sup>44)</sup>。そこで、実環境中で汚染物質を人為的に散布する実験も行われているが、広大な土地が必要となり、また、コスト面や環境への負荷も問題視されている<sup>48,49,50,51)</sup>。よって、環境への負荷を最小限にしつつ、かつ実環境に近い実験系の構築が必要とされている。

鏝は、前章までの結果から、*in situ* かつ低環境負荷の土壌微生物実験が可能であることが示されている。すなわち、鏝に環境汚染物質を添加することで、疑似的な汚染環境を作り上げることができ、当該土壌における環境汚染物質の微生物分解メカズムを知ることができると考え、これを実証することとした。

### 第3節 実験方法

#### 3-1 モデル環境汚染物質の選定

本実験に用いるモデル環境汚染物質は、物質的な安定性があること、これまでに分解菌・分解酵素の報告があり、実際に微生物による分解が期待できるものであることが望ましい。本実験においては、上記観点に加え、汚染物質の環境影響評価的側面を考慮し、第4章においても用いられたフェノールをモデル物質として選択した。

#### 3-2 フェノール汚染モデルの構築と微生物生態解析

鏝を用いて、フェノール汚染モデルを構築し、経時的な、フェノールの減少および微

生物生態の推移を確認することとした。実験の概要を図 5-1 に示す

### 3-2-1 使用土壌

茨城県つくば市の畑より採取した土壌を、2 mm メッシュの篩にかけ、通過分を実験に使用した。通過した土壌 1.2 kg を縦 210 mm×横 150 mm×深さ 70 mm のプラスチックケースに充填し、25℃で 2 日間静置した。

### 3-2-2 フェノール添加鍬の埋設

鍬 1 本につき、フェノール 333 mg, 蒸留水 333  $\mu$ L, 珪藻土 333 mg の混合物を添加したフェノール添加鍬を 4 本用意した。用意したフェノール添加鍬を 3-2-1 の土壌ケースに等間隔に埋設した。なお、実験期間中は室温を 25 °C に保ち、水分の蒸発を防ぐためアルミホイルでケースに蓋をした。

### 3-2-3 土壌サンプリング

鍬埋設直後の土壌を 0 週とし、2 週間ずつ計 8 週間、土壌サンプリングを実施した。2 週間ごとに 1 本の鍬を選択し、選択した鍬からそれぞれ、0-0.8 cm の距離にある土壌をサンプリングした。サンプリングは、第 4 章 3-2-3 に記載方法に従い行った。また、コントロールとして、選択した鍬より 5cm 以上離れた土壌を同様に、ポリプロピレンチューブを用いて回収した。

### 3-2-4 フェノールの定量



図 5-1 鏝を用いたフェノール汚染土壌の微生物生態解析フロー

フェノール添加鍍区の土壌および、コントロール土壌より、酢酸エチルを用いてフェノールを抽出し、GC-MS によるフェノール濃度の測定を行った。GC-MS での測定は、第 4 章 3-4 に記載の方法に従った。

### 3-2-5 DGGE 法による微生物生態解析

サンプリングした土壌から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした DGGE 解析を実施した。DNA の抽出は 2 章 3-4-5、プライマーおよび DGGE 解析については、第 4 章 4-3、4-4 に記載の方法に従った。また、フェノールの影響を大きく受けた細菌を特定するため、DGGE 後のゲルよりフェノール鍍土壌に特徴的なバンドを切り出し、DNA 抽出を行った後、シーケンス解析により微生物種を同定した。

#### (1) DGGE バンドの 16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたシーケンス解析

DGGE 後のゲルを目視で確認したうえで、コントロールと比較しフェノール鍍に特徴的なバンドを切り出し、Qiagen Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA をゲルから抽出した。抽出は付属のマニュアルに従った。得られた生成物を鋳型に MicroSeq® 500 16S rDNA PCR Kit (Applied Biosystems) を用いた、16S rRNA 遺伝子の、Top500 領域をターゲットとした PCR を実施し、得られた PCR 産物について MicroSeq® 500 16S rDNA Sequencing Kit (Applied Biosystems) と、Applied Biosystems™ 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いたダイレクトシーケンスにより、塩基配列を決定した。一連の操作は Applied Biosystems のプロトコルに従った。決定された塩基

配列は、BLAST を用いて、DNA 塩基配列データベース（GenBank / DDBJ / EMBL）に対して既知の微生物の 16S rDNA 配列との相同性検索を行い、近縁種と推定される微生物を同定した。なお、得られた塩基配列は、GeneBank に登録した（登録番号 AB933322-AB933327）。

### 3-2-6 次世代シーケンサーによる微生物生態解析

フェノール添加鍍区の DNA については、次世代シーケンサー(NGS) Miseq (Illumina) を用いた細菌叢解析<sup>52)</sup>を PCR-DGGE とあわせて実施した。

#### (1) 16S rRNA 遺伝子の増幅

PCR によって 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域(約 460 bp)の増幅を行った<sup>53)</sup>。DNA ポリメラーゼには正確性と伸長性の高い KAPA HiFi DNA Polymerase（日本ジェネティクス）を用いた。表 5-1 にプライマーの塩基配列を示し、反応溶液の組成と PCR 条件を表 5-2 および表 5-3 に示す。増幅産物に AMPure Beads XP（Beckman A63880）16  $\mu$ L をボルテックスしてから加え、ピペッティングして室温で 5min インキュベートした。AMPure Beads XP は磁性を帯びた DNA 吸着ビーズで、DNA の精製に利用可能である。マグネットスタンドに溶液をセットし、静置することで溶液中からビーズを回収し、上清を廃棄した。さらに 80% EtOH によりビーズを洗浄した。この操作を 2 回繰り返した。チューブの蓋を開け、室温で 5min 静置して、ビーズを乾燥させた。チューブをマグネットスタンドからはずし、pH 8.5 10 mM Tris-HCl 42.5  $\mu$ L を添加し、ピペッティ



表 5-1 NGS 解析用プライマー

プライマー	塩基配列
341 F*	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN- CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
805 R *	5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN- GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

\*シーケンス解析時における品質向上を目的に、0-5塩基の異なる長さのランダム配列が挿入された混合プライマーを使用した（NNNNN）。  
赤色の領域は16S rRNA遺伝子特異的プライマーの配列，緑色の領域はIndex付加PCRに必要な領域(オーバーハング領域)。

表 5-2 NGS 解析用 PCR 溶液の組成

試薬名	添加量 (μL)
Template DNA (5 ng/μL)	2.5
341F Primer (1 μM)	5.0
805R Primer (1 μM)	5.0
2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5
Total	25

表 5-3 NGS 解析における 16S rRNA 遺伝子増幅 PCR 条件

temperature	time	
95°C	3 min	
95°C	30 sec	25cycles
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
72°C	5 min	
4°C	forever	

ングを行い，室温で 2min インキュベートした．

マグネットスタンドを用いてビーズを回収し，上清の精製増幅産物を新しい PCR チューブに回収した．回収した溶液をアガロースゲル電気泳動によって目的配列が増幅されていることを確認した．

## (2) index 付加 PCR

次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) は多数の DNA 断片を同時並列的に解析するシーケンサーであり，複数のサンプルを同時にシーケンス解析することが可能である．MiSeq では個々の配列がどのサンプルに由来するものであるかを区別するため，増幅産物の末端に既知である index 配列の付加を行う．index 配列は Illumina 社によって既定されており，12 種類の index 1 と 8 種類の index 2 の二つの組み合わせによって，計 96 種類のサンプルを区別して同時にシーケンス解析することが出来る．表 5-4 にインデックス付加 PCR におけるプライマーの塩基配列を示し，反応溶液の組成と PCR 条件を表 5-5 および表 5-6 に示す．

増幅産物に AMpure Beads XP (Beckman A63880) 28  $\mu$ L をボルテックスしてから加え，ピペッティングして室温で 5min インキュベートした．マグネットスタンドに溶液をセットし，静置することで溶液中からビーズを回収し，上清を廃棄した．さらに 80% EtOH によりビーズを洗浄した．この操作を 2 回繰り返した．チューブの蓋を空け，室温で 5min 静置することでビーズを乾燥させた．チューブをマグネットスタンドからは

表 5-4 NGS 解析用 Index 付与プライマー

プライマー	塩基配列
Index F	5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2- ACACTCTTTCCCTACACGACGC-3'
Index R	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-Index1- GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3'

表 5-5 NGS 解析用 Index 付与 PCR 溶液の組成

試薬名	添加量 ( $\mu$ L)
PCR産物(2 ng/ $\mu$ L)	2.0
Index F Primer (10 $\mu$ M)	5.0
Index R Primer (10 $\mu$ M)	5.0
2 $\times$ KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5
DDW	0.5
Total	25

表 5-6 NGS 解析 Index 付与 PCR 条件

temperature	time
94°C	2 min
94°C	30 sec
55°C	30 sec
72°C	30 sec
72°C	5 min
4°C	forever

ずし、pH 8.5 10 mM Tris-HCl 27.5  $\mu$ L を添加し、ピペッティングして室温で 2min インキュベートした。マグネットスタンドを用いてビーズを回収し、上清の精製増幅産物を新しい PCR チューブに回収した。その後、アガロースゲル電気泳動によって目的配列が増幅されていることを確認した。

### (3) ライブラリの作成

Index 付与後の PCR 産物 MilliQ 水を用いて 10 倍希釈し、1  $\mu$ L を Bioanaluzer(Agilent) の 1,000kit を用いて解析することでライブラリの塩基長を確認した。また、Qubit Fluorometer (original model, Thermo Fisher Scientific) および Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA 濃度を定量した。得られた塩基長と DNA 濃度から、各 PCR 産物のモル濃度を算出した。算出式を、図 5-2 に示す。算出したモル濃度から、DNA 濃度が 4 nM となるよう MilliQ 水を用いて希釈し、それらを 1 つにまとめ、ライブラリサンプルとした。

### (4) MiSeq を用いた 16S rRNA 遺伝子解析

MiSeq を用いて 16S rRNA 遺伝子の解析を行った。ライブラリサンプル 5  $\mu$ L に 0.2 M NaOH 5  $\mu$ L を添加し、室温で 5min インキュベートした。このサンプルを氷上に移し、HT1 Buffer 990  $\mu$ L を添加して 20 pM 変性ライブラリを調製した。90  $\mu$ L の変性ライブラリを等量の変性 PhiX ライブラリと混合し、96°C、2min インキュベートしてさらに熱変性させた。氷上で 5min インキュベートした後、反応液 600  $\mu$ L を MiSeq Reagent kit

$$\text{DNAコピー数 (pmol)} = \frac{\text{DNA量 (}\mu\text{g)}}{660 \times \text{DNA断片の塩基数}}$$

図 5-2 PCR 産物のモル濃度算出式

v2 500 cycle 試薬カートリッジに添加した。フローセル、試薬カートリッジ、バッファーボトルを MiSeq にセットして、シーケンス解析を開始した。なお、シーケンス結果は、DDBJ Sequenced Read Archive に登録した（登録番号 DRX121990–DRX121994）。

#### （5）RSV の抽出

次世代シーケンサーから出力されたデータをもとに微生物群集構造解析を行った。群衆構造解析には、無償の統計解析ソフトウェアである R version 3.4.3 (<http://www.r-project.org/>) と、Jeff らによって開発された微生物群集解析ツールを統合したパイプラインソフトウェア Mac QIIME<sup>54)</sup>を用いた。また、R 用パッケージとして、Biocinductor より、"dada2", "phyloseq", "DECIPHER", "phangorn", "ShortRead", "QuasR"の各ライブラリを利用した。

まず、QusR ライブラリを用い、抽出されたシーケンスデータから、5'末端のプライマー由来領域並びに、3 末端の最後の 1 塩基を除去した。Miseq でのシーケンスにおいて、5 末端はプライマー由来の配列となっており、本領域は本来の生物の持つ 16S rRNA の配列でないことがあるため、除去することが望ましい。また、各リードの最後の 1 塩基 (3 末端) はクオリティが保証されていないので、除去した。続いて ShortRead ライブラリを用い、Short read, Long read 等のリードを除去し、Forward, Reverse の両塩基が存在するリードのみを抽出した。

最後に、DADA2 を用い、シーケンスクオリティに基づくフィルタリングを実施（関

値を Quality score 20 未満と設定) し, RSV を推定した.

#### (6) DADA2

これまで、微生物群衆解析には、OUT (operational taxonomic unit) が主に用いられてきたが、本研究では、Cahhahan らによって開発された DADA2 アルゴリズム<sup>55)</sup>を用い、得られたリードの分類を行った。DADA2 では、OTU の代わりに RSV (Ribosomal Sequence Variant) の推定を実施する。OTU では、一定の閾値の元、似た配列を同様の配列とするが、RSV ではシーケンスのエラー率を計算し、元のシーケンスからエラーを除くという手法をとり、OTU では同一とされるリードも分類することが可能など、より高い正確性を有する。

#### (7) 微生物種の同定

推定した RSV に対して、SILVA reference files (release 128)<sup>56)</sup>を用い、生物種の同定を実施した。同定された生物種から、真核生物・葉緑体・ミトコンドリア由来と分類された RSV を除き、さらに、平均出現頻度 1%未満の RSV を除去した後、Genus レベルで描写を行った。

#### (8) $\alpha$ 多様性解析

真核生物・葉緑体・ミトコンドリア由来と分類された RSV を除いた後の RSV に対して、試験期間中の細菌叢の変化をとらえるために、Shanon<sup>57,58)</sup>、Simpson<sup>59)</sup>、InvSimpson<sup>59)</sup>をそれぞれ用いて、 $\alpha$  多様性解析を実施した。

### 3-2-7 定量 PCR による Phenol monooxygenase 遺伝子の定量

フェノール鍍土壌におけるフェノールの減少が、実際にフェノール分解菌が関与していることを示すために、phenol monooxygenase 遺伝子<sup>60)</sup>を対象とした Real-time PCR を実施した。

3-2-5 で抽出したフェノール鍍区 DNA を鋳型として、phenol monooxygenase 遺伝子の増幅を行った。phenol monooxygenase は phenol hydroxylase と呼ばれ、フェノール代謝系で最初に作用する酵素である。フェノール代謝系の概略を図 5-3 に示す。プライマーには phenol monooxygenase 遺伝子特異的なプライマーとしての報告がある PHE-F および PHE-R を用いた<sup>61)</sup>。使用したプライマーの配列を表 5-7 に示す。このプライマーは phenol monooxygenase の  $\alpha$  サブユニットをコードする領域に特異的に結合する。この領域は二価鉄のバインディングサイト、ダイマーの形成時の結合部位、および活性中心を含むユニットである。このプライマーを用いて PCR を行った際の増幅産物は約 206 bp となる。

Real-time PCR は Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics) と蛍光試薬 FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて行った<sup>39)</sup>。反応液組成、および反応条件を表 5-8、表 5-9 に示す。スタンダードには *Comamonas testosteroni* より抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR 増幅産物を用いた。反応終了後、分析データを Light Cycler Software Version 3.5 (Roche Diagnostics) を用いて解析した。また、phenol



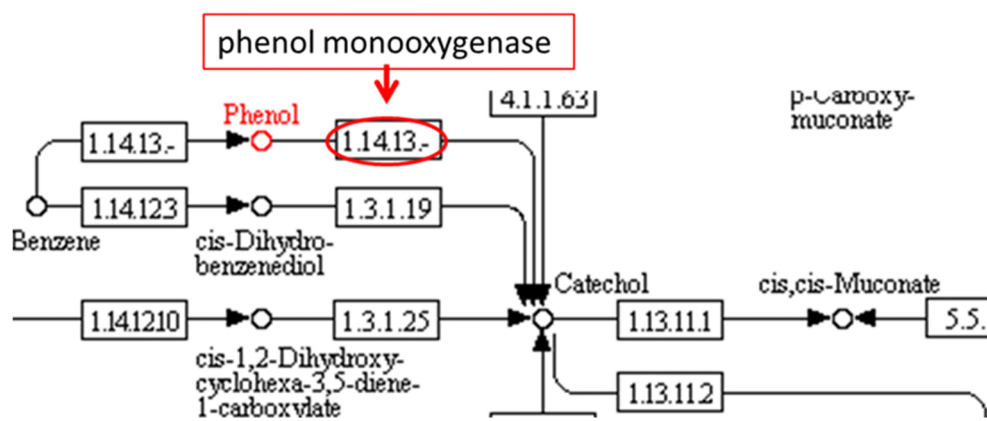


図 5-3 フェノール代謝経路

(KEGG : [http://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight\\_pathway?scale=1.0&map=map00362&keyword=phenol](http://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map00362&keyword=phenol) より)

表 5-7 real-time PCR 用プライマー

プライマー	塩基配列
PHE F	5'-GTGCTGACSAAYCTGYTGTTTC-3'
PHR R	5'-CGCCAGAACCAYTTRTC-3'
357 F	5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3'
518 R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

表 5-8 real-time PCR 用 PCR 溶液の組成

試薬名	添加量 (μL)
Template DNA	5.0
PHE or 16S Forward Primer (2 pmol / μL)	3.0
PHE or 16S Reverse Primer (2 pmol / μL)	3.0
Solution 1	4.0
Solution 2 (DDW)	5.0
Total	20

表 5-9 real-time PCR 条件

Program	temperature (°C)	time	Slope(°C/sec.)	Acquisition mode
denaturing	94	10 min	20	none
PCR	94	5 sec	20	none
	49	5 sec	20	none
	72	8 sec	20	none
	88	1 sec	20	single
acquisition	95	0 sec	20	none
melting curve analysis	65	15 sec	20	none
	95	0 sec	0.1	continuous

monooxygenase 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子のコピー数をそれぞれ測定し、図 5-4 に記載の計算式より各サンプル中における全菌数に対する phenol monooxygenase 遺伝子の存在比を求めた。

## 第 4 節 結果

### 4-1 フェノール汚染モデルにおける土壌フェノール量の推移

GC-MS によるフェノール濃度の測定結果を図 5-5 に示す。コントロール土壌では試験期間を通してフェノールが検出されることはなかったのに対し、フェノール鍬土壌では鍬埋設後 2 週間目のフェノール濃度が約 300 ppm であり、その後は減少し、6 週で検出限界以下となった。よって、鍬に添加したフェノールが周辺土壌へ浸透し、フェノール分解菌によって、分解されたと推測される。また、回収した鍬の臭いを確認したところ、4 週目にはフェノールの臭いが確認されたが、6 週目は臭いが感じられなかったことから、鍬に添加したフェノールは約 1 ヶ月をかけて周辺土壌へ浸透したと考えられる。

### 4-2 DGGE 法による土壌微生物叢解析

DGGE による微生物生態解析結果を図 5-6 に示す。コントロール土壌では試験期間を通して微生物叢がほとんど変化することはなかったのに対し、フェノール添加鍬土壌では微生物叢に変化が見られた。鍬周辺土壌にフェノールの存在が確認された 2 週目に

$$\text{全細菌に対する phenol monooxygenase 遺伝子の存在比} = \frac{\text{phenol monooxygenase 遺伝子のコピー数}}{\text{16S rRNA 遺伝子のコピー数}}$$

図 5-4 phenol monooxygenase 遺伝子の存在比算出式

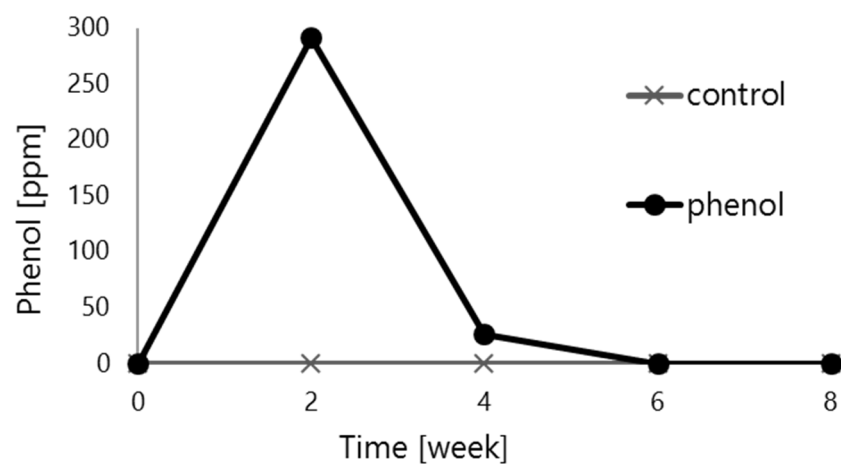


図 5-5 試験期間中における土壌中フェノール濃度の推移

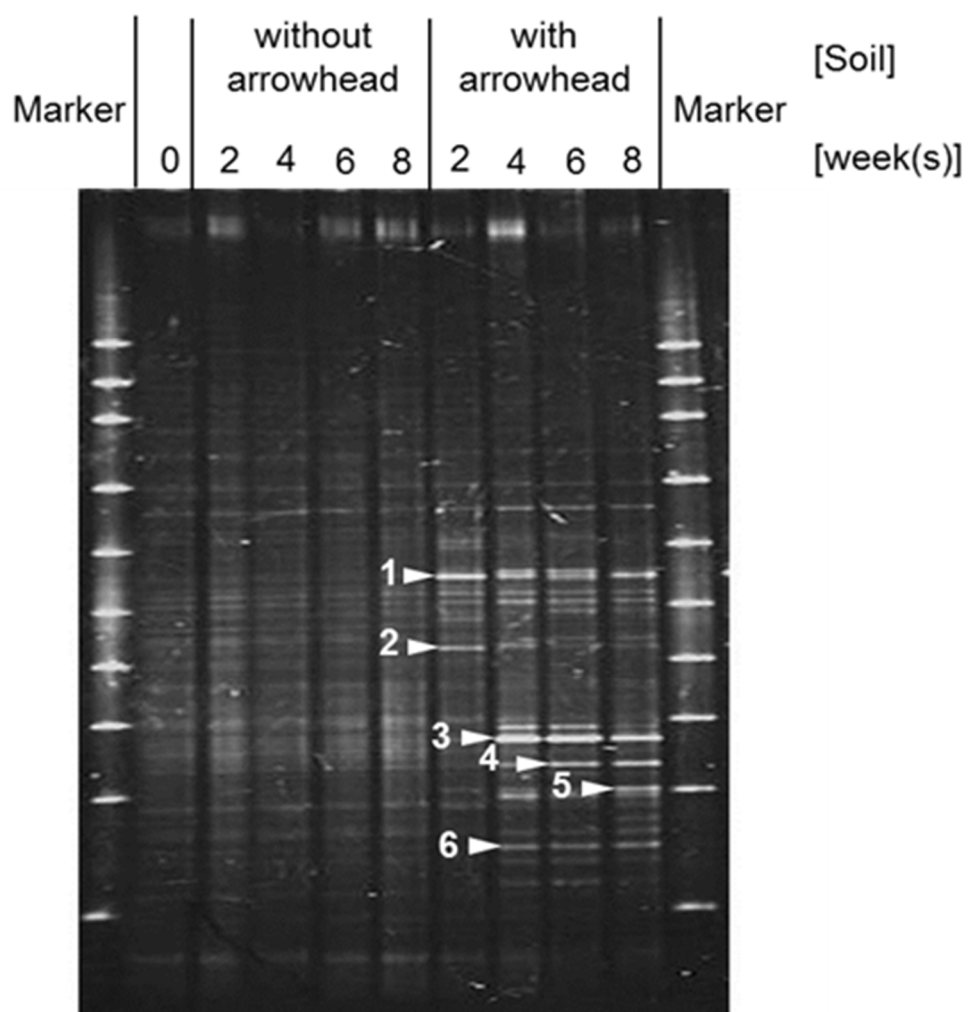


図 5-6 DGGE 解析による土壤微生物の推移

は、微生物叢がコントロール区と比較して大きく異なっていたことから、鍬に添加したフェノールが土壌微生物に影響を与えていることが明らかとなった。鍬に添加したフェノールの影響を大きく受けた細菌を特定するため、コントロール区と比較してフェノール鍬区に特徴的な DGGE バンド（図 5-6 の 1-6）の切り出しを行い、得られた配列データの相同性検索（BLAST）を行った。その結果、バンド 1 および 2 は *Bacillus* sp. と、3 および 4 は *Streptomyces* sp. と、5 は *Amycolatopsis* sp. と、6 は *Actinoallomurus* sp. とそれぞれ高い相同性を示した。これらの細菌のうち、*Bacillus* sp. および *Streptomyces* sp. はそれぞれカテコールのメタおよびオルト開裂を介してフェノールを分解することが知られている<sup>62,63)</sup>。従って、これらの細菌が実験系において優占化し、フェノールの分解に寄与したと推測される。

#### 4-3 次世代シーケンサー解析結果

次世代シーケンサーでの解析結果を図 5-7～図 5-10 に示す。次世代シーケンサーの結果は PCR-DGGE の結果同様に、フェノールの減少と連動して、*Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Amycolatopsis* sp., *Actinoallomurus* sp. の優占化を示した。また、同様にフェノール分解の報告がある、*Cupriavidus* sp.<sup>64)</sup> も 6～8 週のサンプルにおいて検出された。

また、 $\alpha$  多様性解析の結果から、フェノールが残存していた 6 週目までにおいて、フェノール分解菌の優占化に起因し、細菌叢の多様性が失われていたが、8 週目において

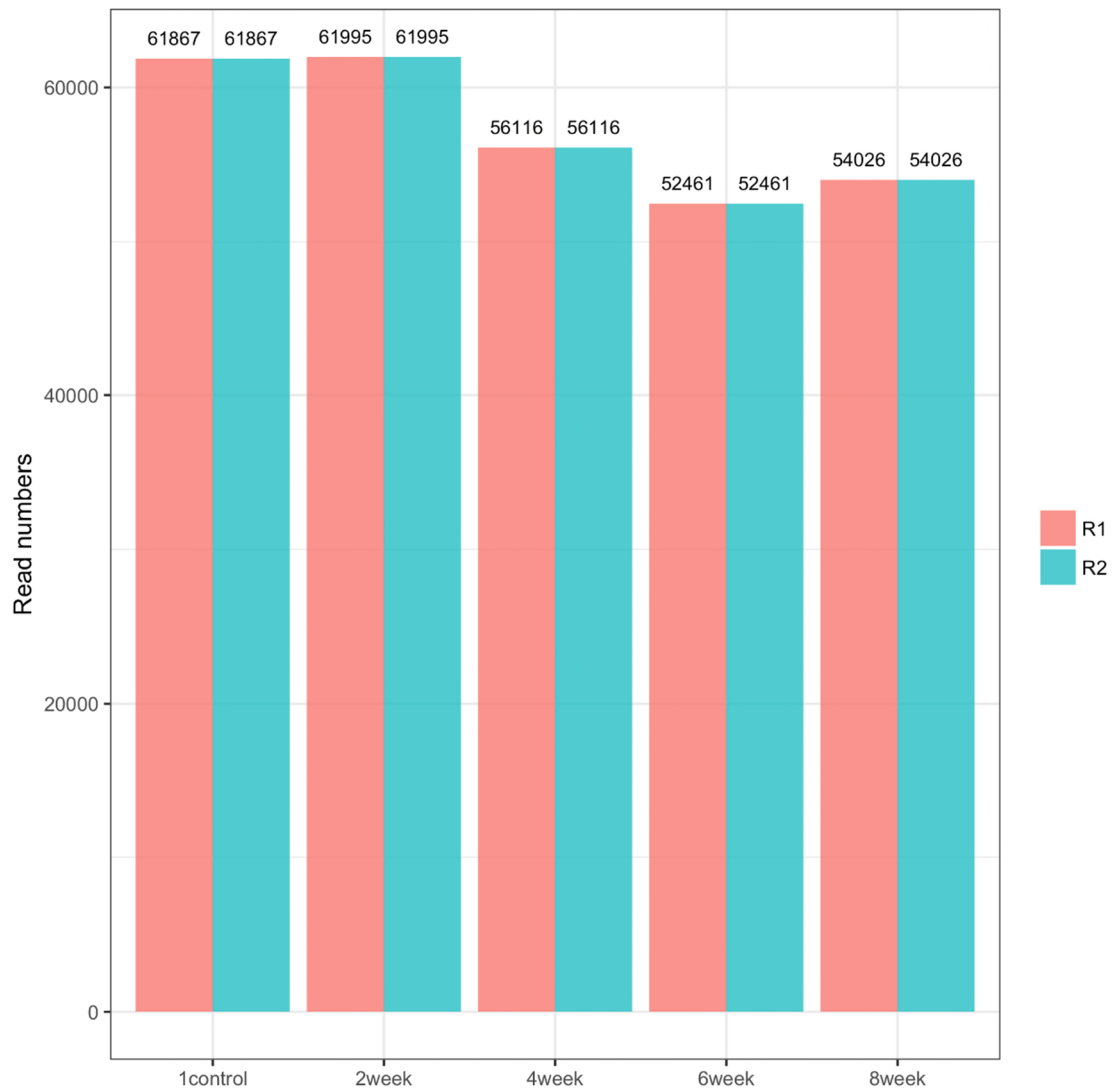


図 5-7 次世代シーケンサー解析における総リード数



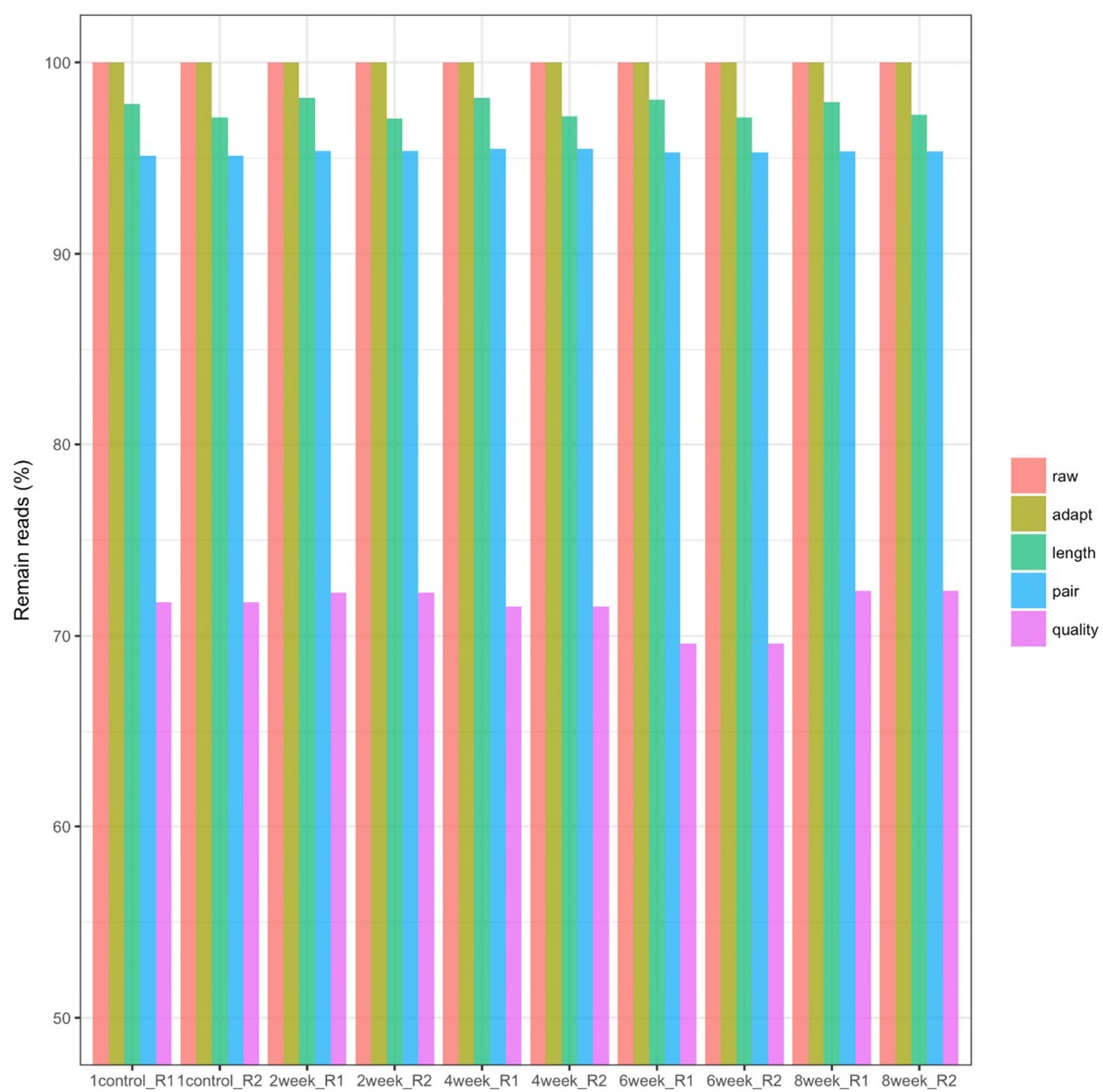


図 5-8 総リードから Quality フィルタリングまでのリード数の推移

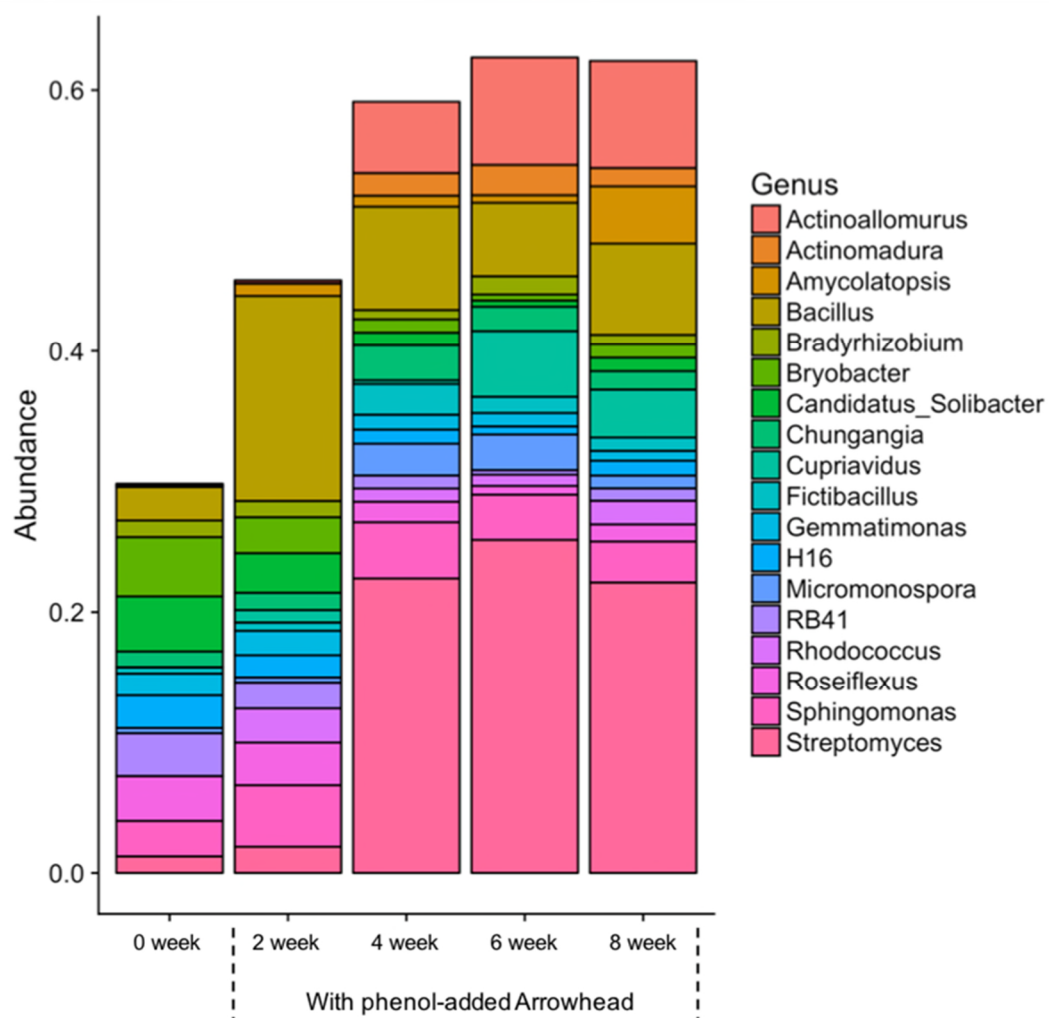


図 5-9 微生物叢の推移（属レベル）

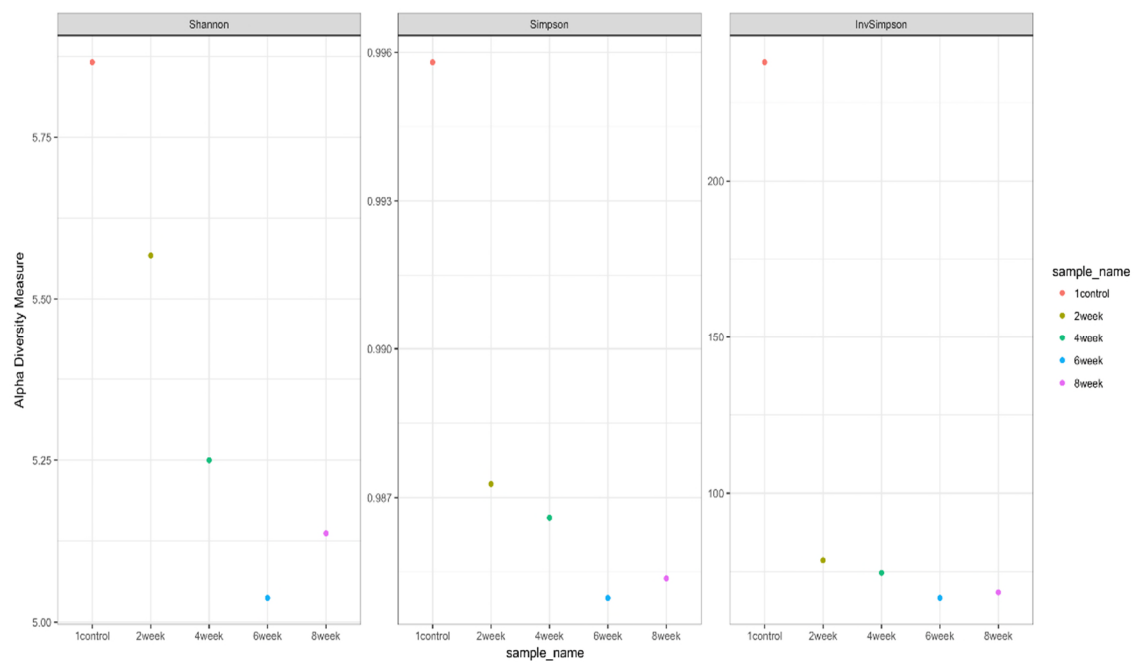


図 5-10  $\alpha$  多様性解析結果

は、多様性が回復し始めていた。

#### 4-4 定量 PCR 解析結果

16s rRNA 遺伝子（全細菌数想定）に対する phenol monooxygenase 遺伝子の存在比の経時変化を図 5-11 に示す。全細菌数に対する phenol monooxygenase 遺伝子の存在比は、コントロール土壌では実験期間を通じてほとんど変化しなかった。対してフェノール鍍土壌では実験開始 2 週間で遺伝子量が増加した後、4 週目で減少し、6 週間目には実験開始時の約 2 倍まで増加した。よって、フェノールの分解は細菌によるものと推定可能である。

#### 第 5 節 考察

本章の実験により、鍍を用いることで、環境負荷の少なく、簡便でコスト効率が良い、生態解析が行えることが示唆された。

従来バイオレメディエーションの予備検討として実施されてきた、*in situ* 現場試験では、広大な圃場（土壌量換算で 1-5,000 トン）を必要とし<sup>65,66)</sup>、環境汚染物質の使用量も非常に多いことが課題とされていた。対照的に鍍では、非常に省スペースでの試験が行える。本実験において、鍍は 333 mg のフェノールで 300 ppm の汚染区を作り出していたが、これまでの *in situ* 現場試験においては、最低でも 300 g のフェノールが必要となる。また、土壌汚染は鍍のように、徐々に徐々に汚染が進行し、長期間に亘って

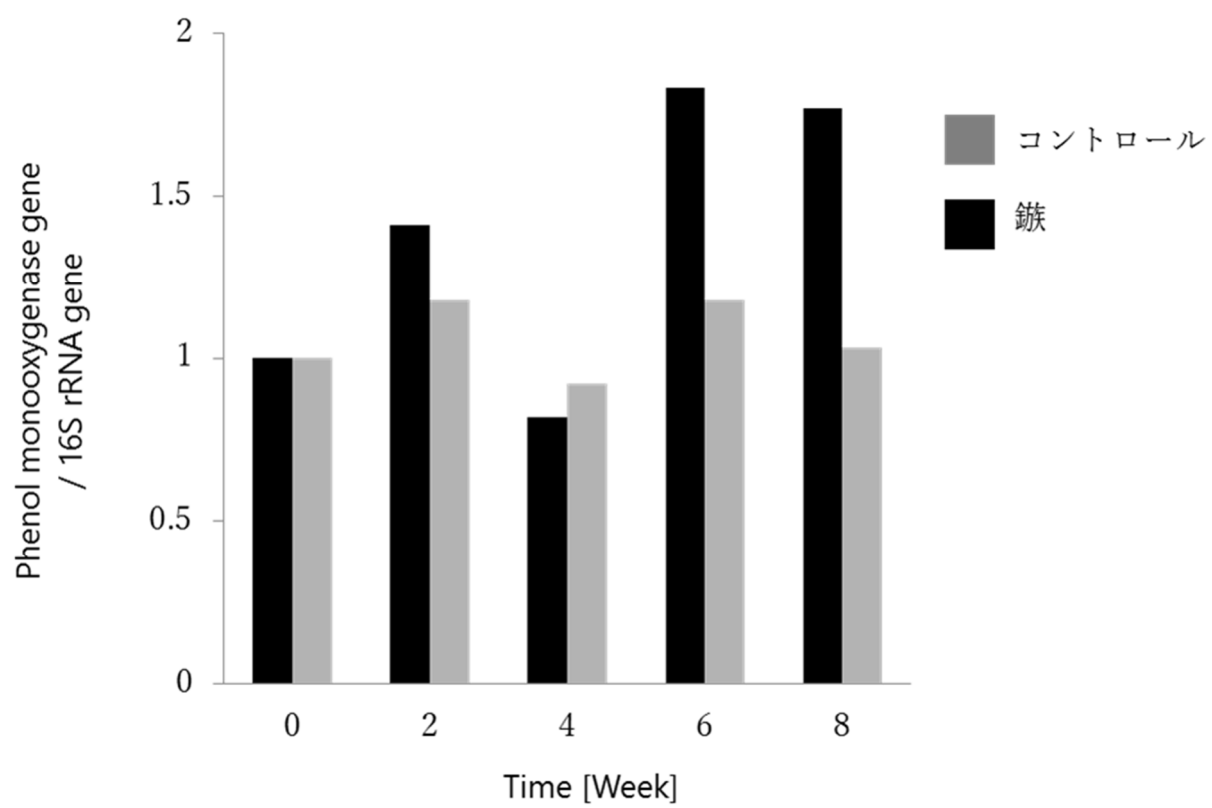


図 5-11 phenol monooxygenase 遺伝子の存在比推移

汚染物質が環境に暴露されるケースも考えられ、鍬を用いてのデータ採取はより有意義なものと考えられる。

real-time PCR に関して、本章で得られた結果を見ると、フェノール鍬区で確認された *Bacillus* 属を中心とするフェノール分解菌の報告がある RSV の存在比は明らかに 2 倍以上に増加している。よって、全ての RSV がフェノール分解遺伝子を有していない可能性を考慮しても、phenol monooxygenase 遺伝子の存在比は 2 倍以上に向上しているはずである。この原因としては遺伝子増幅に用いたプライマーが *Bacillus* 属を代表とするグラム陽性菌の phenol monooxygenase 遺伝子に適していない可能性が考えられる。本研究で用いたプライマーと *Bacillus* 属由来 phenol monooxygenase 遺伝子とをアライメントした結果を図 5-12 に示す。*Bacillus* 属由来 Phenol monooxygenase 遺伝子と本研究で用いたプライマーは配列にミスマッチが多く、本プライマーを用いた PCR では遺伝子を増幅できない可能性が示唆された。本実験で用いたプライマーは *Comamonas* sp.や *Burkholderia* sp.などのグラム陰性菌の phenol monooxygenase 遺伝子をリファレンスとして作成されている<sup>61)</sup>。そのため、本研究で支配的であったグラム陽性菌の phenol monooxygenase 遺伝子をカバー出来ていないと考えられる。また同様に、*Streptomyces* sp.に関しては、phenol monooxygenase 遺伝子の配列が報告されておらず、こちらも今回使用したプライマーによって検出されなかった可能性が高い。フェノールの分解と微生物の関連を正確に評価するためには、これらのグラム陽性菌由

来 phenol monooxygenase 遺伝子情報も加味した，新たなプライマーの設計が必要であると考えられる．

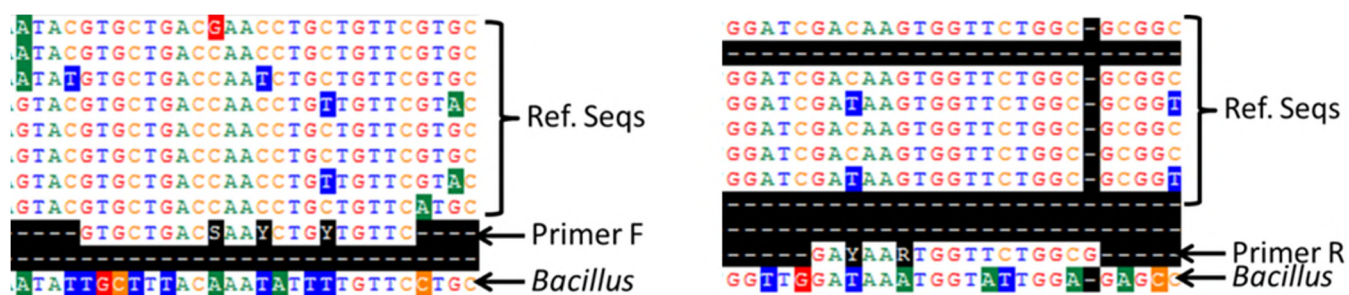


図 5-12 PHE F および PHE R と *Bacillus* 属由来 phenol monooxygenase 遺伝子のアライメント



## 第6章 総括

本研究では、土壤微生物をターゲットとした集積ツールとして、鏝を作成し、鏝を用いた *in situ* 培養の効果の有する新規土壤微生物集積法を提案した。

第2章では、本研究のコアツールである多孔質構造を有した鏝を作成し、鏝を用いる土壤微生物集積法を考案した。加えて、作成した鏝の土壤微生物への影響を評価した。鏝は、直検法、培養法そして T-RFLP 法のいずれにおいても土壤そのものと同様の傾向を示し、鏝が土壤微生物に与える影響は限りなく少ないことが明らかとなった。よって、鏝は土壤環境に用いることが可能と結論づけた。

第3章では、実際に鏝を用いた土壤微生物集積を行った。土壤に埋設した鏝にラードを添加し、T-RFLP 法により鏝表層の細菌群衆構造の推移解析、培養法にてラード分解菌の取得をそれぞれ行い、鏝の有用性を示した。鏝を用いることで、鏝表層の微生物叢は大きく変化し、また、ラード分解菌についてもコントロールや集積培養と比較して取得効率が高く、多種多様な菌が取得できることが明らかとなった。今後、本効果が *in situ* 培養の効果に依存することを追加実験により明らかとする必要がある。

第4章では、生産性や実用性の向上を目的に鏝の改良を実施した。新型鏝では、鏝自体を回収する形から、鏝周辺土壤をサンプリングする形に改めた。鏝に添加した試料は、鏝から約 3cm までの範囲で滲出していることが明らかとなった。これは、環境に高負荷な試料を用いても、大きな環境汚染は引き起こさず *in situ* 試験が行える事を

意味している。よって、物質の制約なく、今後さまざまな試験が行えると考えている。また、鏝では添加した試料は集積培養と比較し長期間環境中に保持されることも明らかにした。本事象が、第3章におけるコントロールや集積培養との差となって表れるのではないかと考えている。

第5章では、土壤微生物集積法以外の鏝の応用として、微生物生態解析への応用を行った。フェノールを汚染物質として、土壤環境においてフェノールが分解され、微生物叢が変化していく様子を確認することができた。よって鏝は土壤微生物集積以外にも、定性的な微生物生態解析において強力なツールになると考えられる。

本研究を通して鏝には4つの特徴があることを実証した。

- ①：*in situ* で土壤微生物集積が行えること
- ②：使用する試料による環境負荷を最小限にできること
- ③：使用する試料の量が従来法より極めて少ないこと
- ④：簡便で誰にでも扱えること

上述した特徴を考えれば、鏝は未だ発展途上ではあるものの、土壤微生物集積を始めとしたさまざまな土壤微生物実験への応用が期待される。一例として、Stable Isotope Probing (SIP) への応用について記述する。

SIP法は、Radajewskiらによって開発された手法<sup>67)</sup>で、様々な化学物質の代謝に関与する微生物を同定するための手法として、広く使用されている。これまでのいくつかの

研究において、実際の現場試験が行われてきたが<sup>68,69)</sup>、SIP 法で用いる安定同位体が高コストであること、環境中への安定同位体の放出は好ましくなくことから、多くは実験室レベルでの試験にとどまっている現状がある。

しかしながら鏝では、添加する試料の量は少なく、また環境汚染リスクも低いことから、SIP 法での現場試験には最適であると考える。

開発当初は、より簡易な *in situ* 培養を実現するための、土壌微生物集積という切り口で研究を進めていたが、今後、さまざまな研究に鏝が活用され、大きな成果を挙げる日もそう遠くないのではないかと期待をしている。

## 引用文献

- 1) McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M.P., Smith, K.E., Hall, G.R., Kvavadze, E., Maghradze, D., Rusishvili, N., Bouby, L., Failla, O., Cola, G., Mariani, L., Boaretto, E., Bacilieri, R., This, P., Wales, N., Lordkipanidze, D., 2017. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 114, E10309-E10318.
- 2) McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C., 2004. Fermented beverage of pre- and protohistoric China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 17593-17598.
- 3) Karamanou, M., Panayiotakopoulos, G., Tsoucalas, G., Kousoulis, A.A., Androutsos, G., 2012. From miasmas to germs: a historical approach to theories of infectious disease transmission. *Infez. Med.* 1, 52-56.
- 4) Nutton, V., 1990. The reception of Fracastoro's theory of contagion: the seed that fell among thorns? *Osiris* 6, 196-234.
- 5) Lane N., 2015. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'concerning little animals'. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20140344.
- 6) Ullmann, A., 2007. Pasteur–Koch: distinctive ways of thinking about infectious diseases. *Microbe* 2, 383-387.
- 7) Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- 8) Staley, J.T., Konopka, A., 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321-346.
- 9) Locey, K.J., Lennon, J.T., 2016. Scaling laws predict global microbial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 113, 5970-5975.
- 10) Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5, 245-249.

- 11) Konishi, T., Kohara, Y., Narumi, A., Saito, H., 2011. Elucidation of microbial distribution of the refuse-derived fuel by metagenomic analysis. *Bullet. Japan Assoc. Fire Sci. Eng.* 61, 53-63 (In Japanese).
- 12) Mayumi, D., Yoshimoto, T., Uchiyama, H., Nomura, N., Nakajima, K.T., 2010. Seasonal change in methanotrophic diversity and populations in a rice field soil assessed by DNA-stable isotope probing and quantitative real-time PCR. *Microbes Environ.* 25, 156-163.
- 13) Berini, F., Casciello, C., Marcone, G.L., Marinelli, F., 2017. Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS Microbiol. Lett.* 364, DOI 10.1093/femsle/fnx211.
- 14) Bruns, A., Cypionka, H., Overmann, J., 2002. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3978-3987.
- 15) Cho, J.C., Giovannoni, S.J., 2004. Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine gammaproteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 432-440.
- 16) Stevenson, B.S., Eichorst, S.A., Wertz, J.T., Schmidt, T.M., Breznak, J.A., 2004. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 4748-4755.
- 17) Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M., Kamagata, Y., 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivationbased techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2162-2169.
- 18) Tamaki, H., Hanada, S., Sekiguchi, Y., Tanaka, Y., Kamagata, Y., 2009. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ. Microbiol.* 11, 1827-1834.
- 19) Nakamura, K., Tamaki, H., Kang, M.S., Mochimaru, H., Lee, S.T., Nakamura, K., Kamagata, Y., 2011. A six-well plate method: less laborious and effective method for cultivation

- of obligate anaerobic microorganisms. *Microbes Environ.* 26, 301-306.
- 20) Aoi, Y., Epstein, S., 2016. New devices for cultivation. *Manual of Environmental Microbiology* Fourth Edition, Yates, M.V., Nakatsu, C.H., Miller, R.V., Pillai, S.D., Eds., ASM Press, pp. 2.1.3-1–2.1.3-8.
  - 21) Tandogan, N., Abadian, P.N., Epstein, S., Aoi, Y., Goluch, E.D., 2014. Isolation of microorganisms using sub-micrometer constrictions. *PLoS ONE* 9, e101429.
  - 22) Bollmann, A., Lewis, K., Epstein, S.S., 2007. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6386–6390.
  - 23) Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E.M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., Epstein, S.S., 2010. Use of Ichip for high-throughput *in situ* cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2445-2450.
  - 24) Aoi, Y., Kinoshita, T., Hata, T., Ohta, H., Obokata, H., Tsuneda, S., 2009. Hollow-fiber membrane chamber as a device for *in situ* environmental cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3826-3833.
  - 25) Bollmann, A., Palumbo, A.V., Lewis, K., Epstein, S.S., 2010. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7413-7419.
  - 26) Aoi, Y., 2016. Innovations in microbial cultivation. *J. Environ. Biotechnol.* 16, 59-64 (in Japanese).
  - 27) Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309, 1387-1390.
  - 28) van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D., van Straalen, N.M., 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11, 296-310.
  - 29) 井上國世監修. 2009, 産業酵素の応用技術と最新動向. シーエムシー出版, 345p.
  - 30) 井上國世監修. 2015, 酵素応用の技術と市場 2015. シーエムシー出版, 279p.

- 31) 丸二陶料株式会社. 2013. No.043-2 陶芸機材総合カタログ 土炎心. 丸二陶料株式会社, 128p.
- 32) Toyota, K., Kimura, M., 1996. Growth of the bacterial wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum* introduced into soil colonized by individual soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 28, 1489-1494.
- 33) Someya, T., 1995. Three-dimensional observation of bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope. *Soil Microorganisms* 46, 61-69.
- 34) Liu, W.T., Marsh, T., Cheng, H., Forney, L.J., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-4522.
- 35) Kurata, S., Kanagawa, T., Yamada, K., Torimura, M., Yokomaku, T., Kamagata, Y., Kurane, R., 2001. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Res.* 29, E34.
- 36) Engelbrektson, A., Kunin, V., Wrighton, K.C., Zvenigorodsky, N., Chen, F., Ochman, H., Hugenholtz, P., 2010. Experimental factors affecting PCR-based estimates of microbial species richness and evenness. *ISME J.* 4, 642-647.
- 37) Rosello-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 39-67.
- 38) Entcheva, P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T., Streit, W.R., 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 89-99.
- 39) Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- 40) Hara, E., Kurihara, M., Nomura, N., Nakajima, T., Uchiyama, H., 2013. Bioremediation field trial of oil-contaminated soil with food-waste compost. *J. JSCE.* 1, 125-132.
- 41) Hara, E., Uchiyama, H., 2013. Degradation of petroleum pollutant materials by fungi.

- Fungi as Bioremediators, Goltapeh, E.M., Danesh, Y.R., Varma, A., Eds., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 117-133.
- 42) Margesin, R., Labbe, D., Shinner, F., Greer, C.W., Whyte, L.G., 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3085-3092.
  - 43) Ringerlberg, D.B., Talley, J.W., Perkins, E.J., Tucker, S.G., Luthy, R.G., Bouwer, E.J., Fredrickson, H.L., 2001. Succession of phenotypic, genotypic and metabolic community characteristics during *in vitro* bioslurry treatment of polycyclic aromatic hydro-car-bon-contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1542-1550.
  - 44) Chikere, C.B., Surridge, K., Okpokwasili, G.C., Cloete, T.E., 2012. Dynamics of indigenous bacterial communities associated with crude oil degradation in soil microcosms during nutri-ent-enhanced bioremediation. *Waste Manag. Res.* 30, 225-236.
  - 45) Goigic-Cvijovic, G.D., Milic, J.S., Solevic, T.M., Beškoski, V.P., Ilic, M.V., Djokić, L.S., Narancic, T., Vrvic, M.M., 2012. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum pol-luted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation* 23, 1-14.
  - 46) Nyssönen, M., Piskonen, R., Itävaara, M., 2006. A targeted real-time PCR assay for studying naphthalene degradation in the environment. *Microb. Ecol.* 52, 533-543.
  - 47) Nyssönen, M., Piskonen, R., Itävaara, M., 2008. Monitoring aromatic hydrocarbon biodegradation by functional marker genes. *Environ. Pollut.* 154, 192-202.
  - 48) Roling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J., Head, I.M., 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutri-ent-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5537-5548.
  - 49) Yang, Y., Tao, S., Zhang, N., Zhang, D.Y., Li, X.Q., 2010. The effect of soil organic matter on fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: A microcosm study. *Environ. Pollut.* 158, 1768-1774.
  - 50) Evans, F.F., Rossado, A.S., Sebastian, G.V., Casella, R., Machado, P.L., Holmström, C., Kjelleberg, S., Elsas, J.D., Seldin, L., 2004. Impact of oil contamination and



- biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49, 295-305.
- 51) Swannell, R.P., Lee, K., McDonagh, M., 1996. Field evaluations of marine oil spill bio-re-mediation. *Microbiol. Rev.* 60, 342-365.
  - 52) Sinclair, L., Osman, O.A., Bertilsson, S., Eiler, A., 2015. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the Illumina platform. *PloS One* 10, e0116955.
  - 53) Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 41, DOI: 10.1093/nar/gks808.
  - 54) Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335-336.
  - 55) Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583.
  - 56) Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188-7196.
  - 57) Shannon, C. E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical J.* 27, 379-423.
  - 58) Shannon, C. E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical J.* 27, 623-656.

- 59) Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688-688.
- 60) Neujahr, H.Y., Gaal, A., 1973. Phenol hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* 35, 386-400.
- 61) Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., Nies, L., 2003. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3350-3358.
- 62) An, H.R., Park, H.H., Kim, E.S., 2001. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 17-22.
- 63) Banerjee, A., Ghoshal, A.K., 2010. Phenol degradation by *Bacillus cereus*: pathway and kinetic modeling. *Bioresour. Technol.* 101, 5501-5507.
- 64) Wei, Y.H., Chen, W.C., Chang, S.M., Chen, B.Y., 2010. Exploring kinetics of phenol biodegradation by *Cupriavidus taiwanensis* 187. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 5065-5076.
- 65) Lors, C., Damidot, D., Ponge, J.F., Périé, F., 2012. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environ. Pollut.* 165, 11-17.
- 66) Rojas-Avelizapa, N.G., Roldán-Carrillo, T., Zegarra-Martínez, H., Muñoz-Colunga, A.M., Fernández-Linares, L.C., 2007. A field trial for an *ex-situ* bioremediation of a drilling mud-polluted site. *Chemosphere* 66, 1595-1600.
- 67) Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R., Murrell, J.C., 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403, 646-649.
- 68) DeRito, C.M., Pumphrey, G.M., Madsen, E.L., 2005. Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenol-degrading soil micro-bial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7858-7865.
- 69) Henneberger, R., Chiri, E., Blees, J., Niemann, H., Lehmann, M.F., Schroth, M.H., 2013. Field-scale labelling and activity quantification of methane-oxidizing bacteria in a land-fill-cover soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 392-401.

## 付記

本研究の一部は、以下雑誌に掲載された。また、本研究は、JSPS 科研費 JP 23658067  
の助成を受けたものである。

Ecological impact evaluation by constructing *in situ* microcosm with porous ceramic  
arrowhead.

Takuya Yoshimoto, Toshiya Shigeno, Daisuke Mayumi, Toshihiro Suzuki, Kyohei  
Mitsuhashi, Akihiro Abe, Toshiaki Nakajima-Kambe

Chemosphere

Volume 219, March 2019, Pages 202-208.

Development of a novel approach for metagenome screening using an arrowhead-  
shaped trap system.

Takuya Yoshimoto, Kyohei Mitsuhashi, Toshiya Shigeno, Nomura Nobuhiko, Uchiyama  
Hiroo, Toshiaki Nakajima-Kambe

Journal of environmental biotechnology

Volume 10, No.2, December 2010, Pages 91-95 (in Japanese).

## 謝辞

本論文は筆者が筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生命産業科学専攻 博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

同専攻教授 中島敏明博士には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その間適切な御助言と御教示を賜りましたことを心から深謝いたします。中島先生は、修士課程卒業後ブランクのある私を温かく迎え入れていただき、本論文の脱稿まで丁寧かつ温かなサポートを戴きました。

本論文の作成にあたり、細部にわたりご指導を戴いた同専攻教授 中村幸治博士、准教授 内海真生博士、准教授 山田小須弥博士に厚く御礼申し上げます。皆様のお陰で本論文をより良いものとすることができました。

本研究の諸実験の遂行にあたり、鏝の提供を賜りました、茂野俊也博士、多くの御教示を賜りました、産業技術総合研究所 原英里博士、眞弓大介博士に深く感謝申し上げます。筑波大学 技官 古川理恵様は、円滑に研究が進むための数多くのサポートを賜りました。また、本研究は私一人の成果ではなく、さまざまな方がバトンを繋いでいただいた結果であります。

最後に、いつでも私を明るく励まし続けてくれた家族に感謝いたします。