

キノプロファイルとPCR-DGGEを併用した 汚染修復細菌の特定と微生物群集の挙動解析

國弘忠生^{1*}・藤田昌史²・胡洪嘗³・藤江幸一¹

(受付 2004年2月2日; 改訂 2004年5月27日)

要 旨

混合培養系において化学物質の分解に関与する微生物を特定するために、キノプロファイル法とPCR-DGGE法(PCR-denaturing gradient gel electrophoresis)から得られる微生物の時系列的な数値データとそのときの化学物質の除去速度とを統合し、統計学的に解析する手法を開発した。キノ種については、それぞれの存在比率を求めた。DGGEバンドについては、それぞれの濃度をバンド強度率として定量した。これらは、キノ総量や総バンド強度に対する比率であることから、除去速度は総微生物量あたりの速度とした。それぞれの時系列データは次元が異なることから、標準化を行った。そして、すべての組み合わせのユークリッド距離を求め、Ward法によるクラスター解析を行った。比除去速度付近に位置するバイオマーカーは、分解に関与する微生物のものである可能性がある。この手法を用い生物的に難分解なジメチルホルムアミド(DMF)を含有する廃水の浸漬濾床処理過程におけるDMF分解微生物の追跡を行った。その結果、メチルアミンの分解能を有する *Aminomonas aminovorans*、これまでにDMF分解能に関する報告がされていない *Bacteriovorax stolpii* が本装置内においてDMFの分解に関与している可能性が示された。これにより統計学的に分解菌を特定する本手法の有用性が確かめられた。

キーワード：クラスター解析，ジメチルホルムアミド，浸漬濾床装置，キノプロファイル，微生物群集構造，DGGE。

1. はじめに

生物機能を利用した汚染環境の修復を促進するための最適条件を探索するためには、その場に棲息する微生物群集と汚染物質の分解・資化を担う特定微生物の挙動を定量的に把握するとともに、それらと環境条件との関係を明らかにする必要がある。

しかし、環境中に棲息する微生物は多様な種から構成されているため、それらの構成種を逐一把握することは困難である。特定微生物を追跡する手法として近年多くの研究者らに用いられているFISH法、in situ PCR法、定量PCR法などの遺伝子学的手法は、標的とする微生物種の塩基配列の情報が必要であり、またその情報が得られたとしても、その塩基配列に他の微

¹ 豊橋技術科学大学 エコロジー工学系：〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1

² 山梨大学大学院 医学工学総合研究部：〒400-8511 山梨県甲府市武田 4-3-11

³ 清華大学 環境科学工程系：Beijing 100084, China

* 現 熊本県立大学 環境共生学部：〒862-8502 熊本県熊本市月出 3-1-100

生物種にはない標的微生物種固有の特徴がなければ標的微生物種の特定および正確な定量は不可能である。また、環境条件の変化により汚染物質の分解に関わる微生物種も変化する場合には、原理的に追跡が困難となる。したがって、このような環境中の未知の特定微生物を追跡できる手法が求められる。

未知の微生物群集を解析する手法として、化学分析的な手法であるキノプロファイル法や遺伝子学的な手法である PCR-DGGE 法が提案されている。キノプロファイル法は、化学分析に基づいていることから、定量性に優れた簡易な手法である。しかしながら、混合培養系では、複数の微生物種が同一キノ種を持つことが多いので、微生物種レベルでの解析は困難である。それに対して PCR-DGGE 法は、電気泳動によって分離されたバンドから、その塩基配列を持つ微生物種の特定が可能になる。しかし、1) 微生物からの DNA の抽出効率、2) DNA の抽出率が極端に低いと再現性の低下を招く、3) PCR によるキメラの生成や増幅のバイアス、4) DNA を標的とする際には微生物によりコピー数が異なる、という点に注意する必要がある。また時系列的な DGGE 解析が表現するバンドパターンは、優占する構成微生物種の遷移パターンであることを認識しなければならない。

したがって環境中の未知の特定微生物を追跡するには、個々の微生物群集構造解析手法により得られる結果を正しく解釈し、その信頼性を向上することが求められる。それには複数の手法を相補的に併用して得られた結果について、個々のデータについて解釈するのではなく、全てのデータについて統計学的な処理をすることで客観的且つ総合的に判断する必要がある。

そこで本研究では、キノプロファイル法と PCR-DGGE 法を相補的に併用することによって、汚染物質分解微生物の増殖に伴って変化するキノ種および DGGE バンドを推定し、キノ種と DNA の 2 種のバイオマーカーを指標として汚染物質の分解に関与する微生物種の特定を行う手法の確立を目指した。

この手法を生物学的に難分解な物質であるジメチルホルムアミド (Dimethylformamide; HCON(CH₃)₂, DMF) の浸漬濾床処理過程における微生物群集構造の解析に適用した。

難分解性物質として取り上げたジメチルホルムアミド (DMF) は、無色透明でわずかに粘性のある液体 (融点: -60°C, 沸点: 153°C, 比重: 0.94) であり、水とは任意の割合で混合する。多くの無機物や有機化合物に対する溶解能力が強く、熱的および化学的にも安定であるため、ポリウレタン系人工皮革製造用溶剤、ウレタン繊維とアクリル繊維の紡糸溶剤、医薬や農業などの反応溶剤などに広く利用されている。DMF は 2001 年 4 月に実施された環境汚染物質排出・移動登録 (Pollutant Release and Transfer Register, PRTR) 対象物質に指定されており、第三回経団連 PRTR 調査により公共用水域への排出が最も多い化学物質であると報告されている。DMF はまずジメチルアミン (DMA) と蟻酸に分解され、DMA はモノメチルアミン (MMA) を経てアンモニアを生成する。自動酸素消費量測定装置 (クーロメーター) を用いた生分解性試験から、DMF は馴致された微生物によってほぼ完全に分解されるが、分解速度が遅いことが報告されている。DMF および DMA 分解菌として、*Methylobacterium* sp. TH-15, *Mycobacterium* sp. TH-35 が報告され、それぞれユビキノ (UQ)-10 とメナキノ (MK)-9 (H₂) を有する (Urakami et al. (1990a, 1990b))。

2. キノプロファイルと PCR-DGGE について

2.1 キノプロファイル

キノは、微生物の呼吸鎖における電子伝達物質の一つであり、ユビキノ (UQ), メナキノ (MK), プラストキノ (PQ), ビタミン (V) K₁ (フィロキノ) 等がある。一般に UQ は主に好気呼吸, MK は主に嫌気呼吸, PQ と VK₁ は光合成に用いられている。それぞれの微生物種が特有なキノ構造をもっており、ある混合微生物系のキノ種の分布 (各キノ分子種

の存在比), すなわちキノプロファイルを測定すれば, その微生物系の構成微生物種を大まかに推測することが可能である. キノン分子種の数には微生物群集構造の多様性, キノン量はそこに棲息する微生物量をそれぞれ反映していると判断できる. 微生物群集に関する詳細な情報を得ることは困難であるが, キノン分析は化学分析であるため再現性・定量性に優れているということ(Hu et al.(2001)), 多くの微生物が一優占キノンを持つためキノ組成の変化は微生物群集構造の変化とみなせるという点で, 微生物群集構造の解析にはキノプロファイル法が有用と考えられる. キノプロファイルの特徴を表す指標には 1)キノンの数(n), 種類, 2)優占キノンの種とその存在比(f_a), 3)キノンの多様性(DQ)と分布の均一性(EQ), 4)UQ と MK のモル比(UQ/MK), 5)キノン量が挙げられる. これらの指標を基に統計処理を行うことで, 環境中の微生物動態に関する様々な知見が得られる.

2.2 PCR-DGGE

DGGE 法による微生物群集構造の解析には, 試料から DNA を抽出し, 16S(18S)rRNA 遺伝子の変領域を PCR 増幅して, その増幅断片を泳動する PCR-DGGE 法が用いられている. PCR-DGGE 法は, 各微生物種由来の DNA 断片を分離できるため, バンド数は微生物種の多様性を反映する. DGGE ゲル上のバンドの位置や本数の比較により, 場所, 培養前後, 時間経過等のサンプル間での微生物群集構造の比較が容易にできるが, 多くの微生物種が存在する試料の場合は, 電気泳動時の各断片の識別限界から, 特定の属・種レベルに限定される. しかし, ある微生物種に特異的な PCR プライマーを用いることで, キノプロファイルでは見ることができない群集構造を可視化することができる. また, DGGE バンド確認後のゲルは, バンドを切り出して塩基配列を解読することで微生物種の特定が行え, 微生物種の性状などの情報を知ることが出来る.

DGGE は上述のように PCR を利用することによる様々なバイアスを有するために, DGGE の結果に影響を与える危険がある. そのため DGGE の結果の解釈については, バンドの有無だけを考慮した定性的な解釈が一般的である. しかし, ある試料中の微生物種の時系列的な解析, つまりゲル上の同じ位置に現れるバンドについては, 同一の種と考えられるため, DNA 抽出効率および増幅効率には再現性があると考えられる. したがって, DGGE により同じ系における微生物群集構造の時系列の変化を解析する場合, ゲル上の同じ位置に現れるバンドについては, その濃淡の変動が該当種の菌体量の変動を反映すると考えられる. 本研究では, DGGE バンドパターンを客観的に評価するために, バンドの濃淡を強度として数値化し, DGGE プロファイルデータを作成した. このようにして作成した DGGE プロファイルデータはキノプロファイルと同様の統計的な解析が行え, 対象系における微生物群集構造の変化に関する知見が得られる.

3. 方法

3.1 装置および運転条件

実験装置の概略を図 1 に示す. この円筒カラム内に生物膜を付着形成させるために充填した担体には直径 8~10 mm のセラミック製発泡状粒子を用いた. 装置有効容積は 2.8 L であり, 充填付着体積は 2.4 L とした. 充填空隙率は 54%であった. 大学内生活廃水処理施設から採取した活性汚泥をグルコース・ペプトン(GP)を主成分とする人工廃水で長期間培養したものを植種し, ここに溶存有機炭素(DOC)500 mg/L の GP 廃水を連続的に供給して担体表面に生物膜を形成させた.

運転条件を表 1 に示す. Run-0 において, 処理水質が安定していることを確認した後, 運転条件を Run-1 に変更し, この日を実験開始 0 日として処理水質および装置内微生物のモニタリ

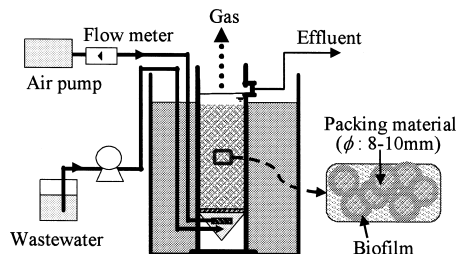


図 1. 装置概略(円筒形カラム: 直径 11 cm, 高さ 60 cm)。

表 1. 運転条件。

Run		Run-0 ^a	Run-1	Run-2
Influent concentration (g-C/m ³)	GP ^b	500	250	0
	DMF ^c	0	250	500
Flow rate (cm ³ /h)		200		
Hydraulic retention time (h)		14		
Volumetric loading (kg-C/m ³ ·d)	DOC	1.2	1.2	1.2
	DMF	0	0.6	1.2
Temperature (°C)		20 ± 2		

^a Cultivation of microbial film in the biofilter

^b The artificial wastewater composed from glucose and peptone (1:1, w/w).

^c dimethylformamide

ングを開始した。実験期間における曝気用空気の流量は毎分 1 L とし、溶存酸素濃度を 4 mg/L 以上に維持した。

3.2 分析方法

3.2.1 溶存有機炭素濃度(DOC)とジメチルホルムアミド(DMF)

細孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過した試料を DOC および DMF の測定に供した。DOC 測定には、全有機炭素計(TOC-V_E, Shimadzu 社)を用いた。流入および処理水中の DMF 濃度の測定には、FID 検出器付きガスクロマトグラフ(GC-14B, Shimadzu 社)を用いた。カラムは PEG6000+KOH を使用した。キャリアガス(窒素)流量は 60 mL/min, 注入口温度 200°C, 検出器温度 200°C, カラム温度 140°C, に設定し、試料の注入量は 10 μL であった。試料水は細孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過して測定に供した。

3.2.2 微生物保持濃度

装置内微生物は、担体に付着しているものを付着微生物、カラム内の液体に懸濁しているものを浮遊微生物として、それぞれ分析に供した。試料の採取は以下に行った。

カラム内の液体を静かに抜き取り、懸濁液と担体とに分けた。遠沈管に生物膜の付着した担体を任意の個数採取し、担体から生物膜を剥離しやすくするために 0.03 M ピロリン酸ナトリウム溶液 50 mL を加えて 10 分間、手で激しく混合し、回収した溶液中に懸濁したものを付着微生物とした。また、カラム内の懸濁液の総体積を測定した後、ここから任意量の微生物懸濁液を採取し、これを浮遊微生物とした。

装置内微生物保持濃度の測定は、ガラス繊維濾紙法により行った。直径 47 mm の GF/C ガラス繊維濾紙(Whatman 社)を用いて任意量の試料を吸引ろ過し、110°C で 24 時間乾燥して濾紙上の残留物の質量を測定した。さらにその濾紙の 600°C での強熱減量分から試料中の付着および浮遊微生物量を決定した。

装置内の全付着微生物量は、採取した担体の体積および測定したその担体の付着微生物量と装置の担体充填体積から算出した。装置内の全浮遊微生物量は、採取した懸濁液の体積とその微生物量および装置内の液体の総体積から算出した。装置内の全付着微生物量と装置内の全浮遊微生物量をカラム有効容積で割ることで装置容積あたりの微生物保持濃度(X)を求めた。

3.2.3 菌体キノ

菌体キノの測定は Hu et al. (2001) の方法に従って分析した。すなわち、微生物試料からクロロホルム・メタノール混合液(2:1, v/v, C-M 溶液)によりキノを抽出した。抽出したキノをヘキサソール再抽出した後、Sep-Pak plus silica[®] (Waters 社)を用いて、UQ と MK を分離、精製した。フォトダイオードアレイ検出器付きの高速液体クロマトグラフ(SPD-M10Avp, Shimadzu 社)を用い、逆相分配型の ODS カラム(島津デュボン製, ZORBAX-ODS ϕ 4.6 mm \times 250 mm)を使用し、移動相にはメタノール・ジイソプロピルエーテル(9:2, v/v)を用い、流量を 1 mL/min とし、カラム温度を 35°C とした。キノの定量には、定量標準物質として UQ-10 を用いた。各キノの定量のために吸収極大波長の検出面積を用い、UQ と MK でそれぞれ 275 nm, 270 nm に設定した。分子種の同定は、種々の微生物から抽出した既知の UQ, MK などの混合液の溶出時間との比較と、スペクトルの確認によって行った。

3.2.4 DNA 抽出

DNA 抽出は Zhou et al. (1996) の方法を元に改良し、以下の手順で行った。

1.5 mL マイクロチューブに分析試料を 1 mL 加え、遠心分離(8,000 \times g, 10 min)した後、0.05 M ピロリン酸ナトリウム溶液(pH 7.0)で洗浄し上清を捨て、すぐに使用しない場合は 0.05 M ピロリン酸ナトリウム溶液に再懸濁して -20°C で保存した。DNA 抽出緩衝液(1.5 M NaCl, 1% 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB), 0.1 M Tris-HCl(pH 8.0), 0.1 M EDTA(pH 8.0), 0.1 M リン酸緩衝液(pH 8.0))を 145 μ L, 20% SDS を 10 μ L 加えた。5 分間ボルテックスミキサーで攪拌し、10 分間ウォーターバスで約 65°C に移し細胞壁膜を溶かすと共に核酸を分解しうる酵素類を変性させた。1000 μ L の C-M 溶液(2:1, v/v)を加え、5 分間ボルテックスミキサーで攪拌し、10 分間放置後に再度 5 分間攪拌した。C-M 溶液は、*Mycobacterium* 属細菌などの溶菌処理が困難な細菌からの DNA 抽出に用いられている(Mve-Obiang, et al. (2001))。そのため、この操作によってグラム陰性細菌からの DNA 抽出率が向上すると考えられる。その後、遠心(14,000 \times g, 10 min)して上清を回収し新しいチューブに回収した。水層 1 に対して 1.2~1.4 倍のイソプロパノールを入れて混合し、室温で 90 分放置した。遠心(14,000 \times g, 15 min)して上清を捨て、2 倍体積の 99.5% エタノールを加えた後に、遠心(14,000 \times g, 15 min, 4°C)して上清を捨て、2 倍体積の 70% エタノールを加えて遠心(14,000 \times g, 15 min, 4°C)して上清を捨てた。DNA ペレットを真空乾燥デシケータ内で残存エタノールを揮発させ、この DNA ペレットを TE buffer(10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA(pH 8.0))50 μ L に溶かし、これを溶菌液(cell lysate)とした。

紫外可視分光光度計(V-550, Jasco 製)を用い A_{260} を測定し、DNA 濃度を算出した。 A_{260} が 1 のとき、DNA 濃度は 50 μ g/mL として算出した(Crecchio and Stotzky (1998))。

3.2.5 PCR

真正細菌の 16S rDNA V3 領域を増幅するために、PCR プライマーとして GC-341f(5'-(GC

clamp) CCTACGGGAGGCAGCAG-3' および 517r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') を用い、PCR を行った。DNA ポリメラーゼには AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 社) を用いた。2.5 U/reaction Taq Polymerase, 1×buffer, 0.2 mM dNTP, 3.5 mM MgCl₂ solution, 100 μg/mL Bovine serum albumin special quality for molecular biology solution (Roche Applied Science Biochemicals 社), 0.25 μM 各プライマー, テンプレート DNA (50 ng) という組成の PCR 反応溶液を調整し, 94°C : 9 min → (94°C : 1 min - 65°C : 1 min - 72°C : 1 min) → 3 cycle 毎にアニーリング温度を 1°C 下げて 60°C で 20 cycle (全体で 35 cycle) → 72°C : 10 min の温度条件下で PCR を行った。

PCR 終了後, 重層したミネラルオイルをピペットで取り除き, 吸光度測定により DNA 濃度を確認した。DGGE に供試するまで -20°C で保存した。

3.2.6 DGGE

DGGE には D-code system (Bio-Rad 社) を用い, 同社のプロトコルに準拠した。6% アクリルアミド中の変性剤の濃度勾配は 35~60% (ここで変性剤 100% とは, 7M 尿素, 40% ホルムアミドに相当する) に設定し, 60°C, 130 V, 4 時間の条件で PCR 産物の電気泳動を行った。

泳動終了後, VistraGreen (Amersham-Pharmashia 社) を用いてゲルを 30 分間染色し, 染色後に暗所で観察し, 写真撮影を行った。

3.2.7 塩基配列解読

目的のバンドをフナ・ゲルチップ II (フナコシ) で切り出し, 滅菌水を入れて洗浄を 3 回繰り返す, ゲルを残して水を取り除き, 使用時まで凍結保存 (-20°C) した。回収した DNA を含むゲルを PCR 反応液に入れて, PCR を行った。得られた PCR 産物に対して再度 DGGE を行い (サンプル DNA 量は 5 μg), 単一性を確認した。この PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製した後にシークエンスを行った。

シークエンス反応には SequiTherm™ EXCEL II Long Read™ cycle sequencing Kit-ALF™ (Epicentre, Wisconsin, USA) と Cy-5 標識シークエンスプライマーを用いてサイクルシークエンス反応を行った。シークエンサーには ALF DNA sequencer (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を使用し, 塩基配列を決定した。

解読した塩基配列については, DDBJ ホームページ (DNA Data Bank of Japan: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>) 上の検索項目の中から相同性検索プログラム BLAST を選択し, データベースは GenBank を用いて既知種の中から相同性の高い配列を検索した。

3.3 解析方法

3.3.1 微生物量あたりの DOC と DMF 除去速度

微生物量あたりの DOC および DMF 除去速度 $-\nu_{\text{DOC}}$, $-\nu_{\text{DMF}}$ は, 以下の式により求めた。

$$(3.1) \quad -\nu = \frac{(C_i - C_e) \cdot Q}{V} \cdot \frac{1}{X}$$

ここで, C_i と C_e はそれぞれ流入濃度と流出濃度を表し, Q と V はそれぞれ流量と装置有効容積を表す。

3.3.2 キノンおよび DGGE バンドパターンの数値化

キノンの定量は, UQ と MK のモル分子吸光係数がそれぞれ $14.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $17.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ と側鎖数に関係なく一定なため, ピーク面積から濃度を算出した。

DGGE バンドパターンの数値化は, バンドのピクセル強度を読み取ることで行った。DGGE の画像をスキャナで PC に jpeg ファイルとして取り込み, 画像解析ソフトウェア WinROOF (MITANI 社) を用い全レーンのバンドピークとバックグラウンドの強度を読み取った。次に全

レーンについて同じ位置のバンドを同定し、上から全レーン共通のバンド番号を付け、バンドが無い位置の相対強度には 0 を割り当てた。

サンプル i 、つまり DGGE ゲル上のレーン i におけるバンド k のバンド強度を $H_{k,i}$ とすると、バンド強度率 $P_{k,i}$ はレーンの総数が N 、検出されたバンドの総数が L のとき (3.2) 式によりバンド強度率のマトリクスが得られる。

$$(3.2) \quad P_{k,i} = \frac{H_{k,i}}{\sum_{k=1}^L H_{k,i}}$$

3.3.3 標準化とマトリクス表示

環境中で汚染物質の除去を担う微生物の特定を行うために、汚染物質の分解速度の経時変化と類似した変化を示すキノン種および DGGE バンドの特定をクラスター解析により行う。その方法を以下に示す。

分解速度データ、キノンプロファイルと DGGE バンドの関係を定量的にクラスター解析を行う上で、キノンや DGGE、分解速度の時系列の変化の傾向を一様に取り扱うには、それぞれの単位が対象間の類似度に影響しうるため、単位の影響を除く必要がある。例えば、第一属性の数値の範囲が第二属性の数値の範囲よりもずっと大きいならば、対象間の類似度を決定する際に、第一属性の方が大きな重みを持つ。したがって、任意の影響を回避するためには、分解速度、キノン種、DGGE バンドを無次元単位で計算し直すことによって、標準化 (standardization) する必要がある。標準化すれば、各属性は全体の類似性に一層一様に寄与ようになる。標準化により算出された結果は、数値の量的な側面は反映されないものの、質的な側面は表現される。

標準化関数として、最も一般的な (3.3) 式を用いる。

$$(3.3) \quad Z_{j,i} = \frac{P_{j,i} - \bar{P}_j}{S_j} \quad \bar{P}_j = \frac{\sum_{i=1}^N P_{j,i}}{N}, \quad S_j = \left[\frac{\sum_{i=1}^N (P_{j,i} - \bar{P}_j)^2}{N-1} \right]^{1/2}$$

標準化することでバンド強度率マトリクスから、標準化バンド強度率マトリクスが得られる。このとき、標準化マトリクスの行の平均値 \bar{Z}_k は、 $\bar{Z}_k = 0$ となり、標準偏差 S'_k は $S'_k = 1$ となる。

3.3.4 非類似度

分解速度、キノン種と DGGE バンドのそれぞれのユークリッド距離を算出すれば、任意の対象と類似した挙動を示す分解速度、キノン種と DGGE バンドを客観的に判断することができる。これにより時系列での変化の傾向が類似している対象同士をクラスターに結合することができる。

上記の手順により標準化した Z に基づき (3.4) 式によりユークリッド距離を算出すれば、対象間の類似性を統計学的に判断することができる。

$$(3.4) \quad D_j = \sqrt{\sum_{i=1}^N (Z_{j,i} - Z_{r_j})^2}$$

ユークリッド距離は (3.4) 式に示されているように、両者の差の平方根が累積されるため、算出されたユークリッド距離の値が高いほど両者の類似性は低く、逆に値が低いほど両者の類似性は高くなる。

3.3.5 クラスタ解析

汚染物質の分解に関する微生物種は、比除去速度とキノン種の時系列の変化に類似した変化を示す DGGE バンドの DNA と同じ配列を有する微生物種と考えられる。そのような DGGE バンドを客観的且つ総合的に選定するために、似通った変数のグループ化を行うための手法であるクラスタ解析を利用した。

本研究ではクラスタの結合方法に Ward 法を用いた。クラスタの結合方法とは、類似している対象同士をまとめる方法だが、これは二つのクラスタ間の距離(非類似度)をどのように決めるのか、ということである。Ward 法は、新たに統合されるクラスタ内の平方和を最も小さくするという基準でクラスタを形成していく。この方法は、小さいクラスタを作りやすい傾向にあるため、本研究では結合方法に Ward 法を利用した(3.5)式で与えられる。

$$(3.5) \quad Z_{wt} = \frac{N_u + N_t}{N_w + N_t} Z_{ut} + \frac{N_v + N_t}{N_w + N_t} Z_{vt} - \frac{N_t}{N_w + N_t} Z_{uv}$$

クラスタ u とクラスタ v からクラスタ w をつくる時、クラスタ w と任意のクラスタ t との非類似度を Z_{wt} とした。クラスタ u 及びクラスタ v の任意のクラスタ t との非類似度は Z_{ut} , Z_{vt} とした。クラスタ u とクラスタ v の非類似度を Z_{uv} とした。 N_u , N_v , N_w , N_t はそれぞれのグループに含まれる対象の数である。解析には、統計解析ソフト StatPartner/V4 フルパック for Excel(O-ha 社)を用いた。

4. 結果と考察

4.1 DMF, DOC 除去率の経日変化

流入水の DOC 濃度と流出水の DOC および DMF 濃度の経日変化を図 2 に示す。流出水中 DOC および DMF 濃度は、Run-0 から Run-1 移行後 5 日目にはそれぞれ約 290 mg/L, 約 530 mg/L まで上昇した。DMF の分子量の約半分が炭素であることから DMF はほとんど分解されずに GP のみ分解されたと見なせる。実験開始 25 日から 32 日にかけて流出水中の DOC と DMF 濃度は急激に減少した。

DMF および DOC 除去率の経日変化を図 3 に示す。Run-0 において DOC 除去率は約 90% であったが、DMF 供給開始直後(Run-1)では約 50% まで低下した。25 日頃までは DOC と DMF の除去率は、それぞれ約 50, 約 10% と供給直後から変化は見られなかったが、32 日目以降にそれぞれ 90% 前後まで急激に上昇した。運転条件を Run-2 に移行した直後、DOC の除去率が

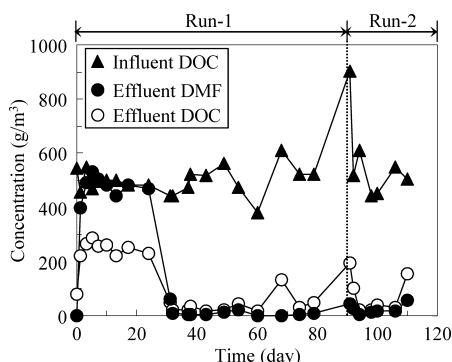


図 2. 流入水の DOC 濃度, 流出水の DOC と DMF 濃度の経日変化。

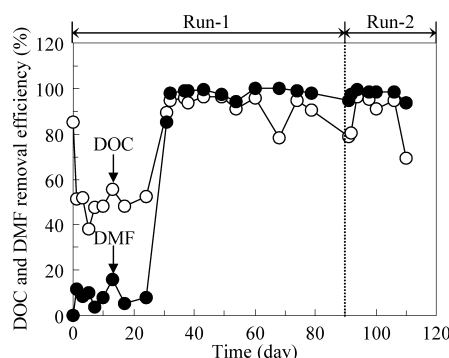


図 3. DOC と DMF 除去率の経日変化。

80%程度まで低下したものの、DMF の除去率は約 90%以上と安定していた。この時に処理水中に DMF 中間代謝物であるジメチルアミン、モノメチルアミンなどが検出されたことから、DOC 除去率の低下は DMF 中間代謝物によるものと考えられる。

4.2 装置内微生物量と比 DMF 除去速度の変化

装置内の付着および浮遊微生物量の経日変化を図 4 に示す。DMF の分解が始まった 30 日頃より付着および浮遊微生物量の増加が見られる。DMF のみを供給する Run-2 移行後に微生物量は減少したが、DMF の除去率は約 90%以上と安定していた。Run-2 移行後に DOC 除去率が 80%程度まで低下したことからも、装置内の GP を基質として生育していた微生物が廃水組成の変化に耐えられず流出していると判断できる。

装置内微生物の中で浮遊微生物の占める割合が Run-1 では 15%程度であったのに対し、Run-2 では約 5%以下まで減少した。Run-2 移行後も DMF 除去率が 90%以上と安定していたことと、装置内で付着微生物に比べて浮遊微生物の割合は約 5%以下であることから、本装置内では DMF の除去は主に付着微生物が担っていると考えられる。

DOC および DMF の比除去速度 $-\nu_{DOC}$ 、 $-\nu_{DMF}$ の経日変化を図 5 に示す。DMF 供給開始直前の $-\nu_{DOC}$ は、約 0.14 mg-C/mg-MLVSS-day であったが、供給開始 1 日目には 0.08 mg-C/mg-MLVSS-day 程度まで減少し、その後 DMF 除去率が 90%以上になった 30 日以降には 0.13 mg-C/mg-MLVSS-day 程度まで上昇した。この結果は DMF 分解微生物の増殖に伴い装置内の微生物中の DMF 分解微生物の割合が増加したためと考えられる。 $-\nu_{DOC}$ は DMF 供給開始 50 日目には低下し、60 日目には 0.05 mg-C/mg-MLVSS-day 程度まで低下した。Run-1 における $-\nu_{DMF}$ の最大値は、0.06 mg-C/mg-MLVSS-day であり、その際の装置内微生物量は 5300 g/m³であった。

4.3 装置内の微生物群集構造の変化

DMF の供給を開始してからの付着微生物のキノプロファイルの変化を表 2 に示す。DMF 供給開始直後には付着および浮遊微生物共に優占キノ種は UQ-8 であった。前述したように、25 日から 30 日にかけて比 DMF 除去速度が急激に増加していたが、この間に存在比率が顕著に増加したキノ種は、MK-7、MK-8(H₂)および MK-9(H₂)であった。しかしながら、MK-7 は 40 日以降に存在比率が減少し続けたことから、DMF の分解に関与しているとは考えにくい。一方、MK-8(H₂)は、この間に 3 倍程度存在比率が増加していた。また、MK-9(H₂)は 20 日以前には検出されていなかったものの、30 日で初めて検出された。そして、50 日目、60 日目には、それまで優占していた UQ-8 に替わり、優占種となった。また、MK-9(H₂)の割合が上昇

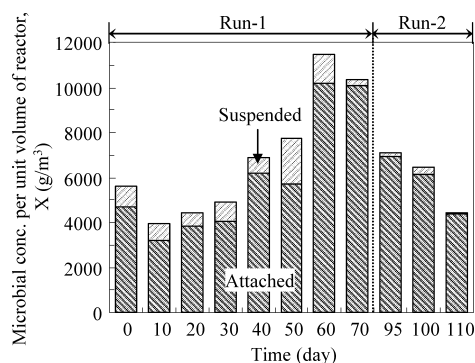


図 4. 装置内の浮遊および付着微生物量の経日変化。

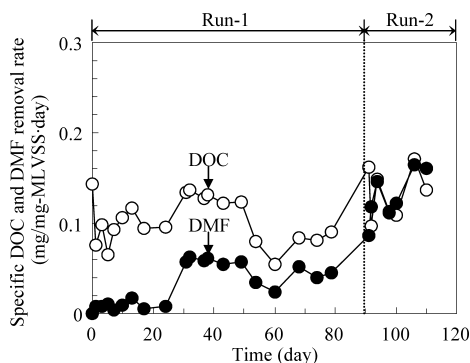


図 5. DOC と DMF の比除去速度の経日変化。

表 2. キノンプロファイルの経日変化.

Time (day)	Run-1							Run-2		
	0	10	20	30	40	50	60	95	100	110
Quinone composition (-)										
UQ-7	0.023	0.051	0.021	0.028	-	0.018	0.012	0.009	0.014	0.016
UQ-8	<u>0.443</u>	<u>0.420</u>	<u>0.461</u>	<u>0.335</u>	<u>0.284</u>	0.249	0.251	<u>0.301</u>	0.280	<u>0.345</u>
UQ-9	0.061	0.050	0.047	0.052	0.060	0.041	0.033	0.044	0.036	0.027
UQ-10	0.130	0.155	0.166	0.130	0.112	0.088	0.086	0.064	0.053	0.048
UQ-11	0.005	0.007	0.015	0.018	0.014	0.002	-	0.003	0.005	-
UQ-9(H ₂)	0.009	0.015	0.024	0.014	-	-	-	-	-	-
UQ-10(H ₂)	0.044	0.042	0.037	0.036	0.026	0.016	0.008	0.003	0.004	-
MK-6	0.085	0.073	0.039	0.042	0.012	0.017	0.005	0.013	0.013	0.021
MK-7	0.079	0.073	0.053	0.073	0.052	0.023	0.010	0.019	0.016	0.018
MK-8	0.021	0.021	0.025	0.038	0.017	0.023	0.017	0.022	0.015	0.027
MK-9	^a	-	-	-	0.007	0.009	0.007	0.018	0.024	0.017
MK-10	-	-	0.008	0.005	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001
MK-7(H ₂)	-	0.015	0.011	-	0.002	0.006	0.002	0.002	0.005	0.003
MK-8(H ₂)	0.011	0.010	0.019	0.059	0.152	0.196	0.234	0.202	0.203	0.189
MK-9(H ₂)	-	-	-	0.083	0.235	<u>0.290</u>	<u>0.311</u>	0.281	<u>0.318</u>	0.283
MK-10(H ₂)	-	-	-	-	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001
MK-8(H ₄)	0.046	0.040	0.043	0.034	0.012	0.008	0.004	0.003	0.001	0.003
MK-9(H ₄)	-	-	-	0.010	-	-	-	-	0.002	-
MK-10(H ₄)	0.005	0.001	0.004	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	-
MK-11(H ₄)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MK-11(H ₆)	0.015	0.017	0.015	0.010	0.006	0.006	0.011	0.010	0.002	-
MK-9(H ₁₀)	0.009	0.010	0.014	0.020	0.006	0.003	0.005	0.003	0.007	-
VK1	0.013	-	-	0.010	0.001	-	-	-	-	-
Total	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Quinone concentration (g/m ³)										
	866	509	406	553	1401	1240	2677	2389	1793	1245

^a -: not detected., ^b under line: dominant quinone species

したことはこれまでの報告(胡 他(1992))と一致する結果であった。したがって、MK-8(H₂)またはMK-9(H₂)を持つ微生物がDMF分解に関与していることが推測される。DMFのみを供給するRun-2移行後に、DMF供給量がRun-1に比べて2倍になっているにも関わらずDMF分解微生物が有すると推測されたMK-8(H₂)とMK-9(H₂)の存在比にあまり変化は見られなかった。また100日目を除きUQ-8が優占していた。装置内の微生物量は減少し、DMF分解微生物が有すると推測されたMK-8(H₂)とMK-9(H₂)の存在比に変化が見られないのに対し、比DMF分解速度は一定になっていることから、DMF分解微生物のDMF分解活性が上昇したと推測される。

付着微生物のDGGEのバンドパターンを図6に示す。DGGEバンド強度に基づいて、DGGEによって馴致過程のそれぞれのサンプル中に少なくとも7~17のバンドが現れた。Run-1とRun-2ではバンドはそれぞれ13~17, 7~16現れた。Run-1においてDMF除去率が90%以上になった30日以降に、新たにB21, B27が現れた。Run-2移行後に微生物量の減少に伴い、95日のバンド数は16であったが110日には7まで減少していた。Run-2移行後の比DMF分解速

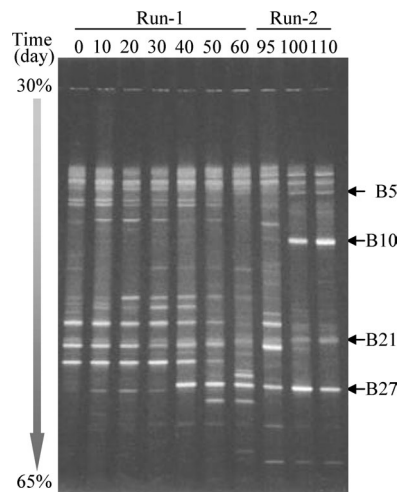


図 6. 付着微生物の DGGE バンドパターンの変化.

表 3. 標準化マトリクス.

Time	1	2	...	<i>i</i>	...	<i>N</i>	1	2	...	<i>i</i>	...	<i>N</i>
Removal rate (-v)	P_{r1}	P_{r2}	...	P_{ri}	...	P_{rN}	Z_{r1}	Z_{r2}	...	Z_{ri}	...	Z_{rN}
Quinone mole fraction (-)												
Quinone species 1	$P_{1,1}$	$P_{1,2}$...	$P_{1,i}$...	$P_{1,N}$	$Z_{1,1}$	$Z_{1,2}$...	$Z_{1,i}$...	$Z_{1,N}$
Quinone species 2	$P_{2,1}$	$P_{2,2}$...	$P_{2,i}$...	$P_{2,N}$	$Z_{2,1}$	$Z_{2,2}$...	$Z_{2,i}$...	$Z_{2,N}$
:	:	:	...	:	...	:	:	:	...	:	...	:
Quinone species <i>j</i>	$P_{j,1}$	$P_{j,2}$...	$P_{j,i}$...	$P_{j,N}$	$Z_{j,1}$	$Z_{j,2}$...	$Z_{j,i}$...	$Z_{j,N}$
:	:	:	...	:	...	:	:	:	...	:	...	:
Quinone species <i>K</i>	$P_{K,1}$	$P_{K,2}$...	$P_{K,i}$...	$P_{K,N}$	$Z_{K,1}$	$Z_{K,2}$...	$Z_{K,i}$...	$Z_{K,N}$
DGGE band intensity (-)												
Band 1	$P_{K+1,1}$	$P_{K+1,2}$...	$P_{K+1,i}$...	$P_{K+1,N}$	$Z_{K+1,1}$	$Z_{K+1,2}$...	$Z_{K+1,i}$...	$Z_{K+1,N}$
Band 2	$P_{K+2,1}$	$P_{K+2,2}$...	$P_{K+2,i}$...	$P_{K+2,N}$	$Z_{K+2,1}$	$Z_{K+2,2}$...	$Z_{K+2,i}$...	$Z_{K+2,N}$
:	:	:	...	:	...	:	:	:	...	:	...	:
Band <i>L</i>	$P_{L,1}$	$P_{L,2}$...	$P_{L,i}$...	$P_{L,N}$	$Z_{L,1}$	$Z_{L,2}$...	$Z_{L,i}$...	$Z_{L,N}$

度の上昇に伴い新たに B5, B10 が現れた.

4.4 DMF 分解菌の特定

表 3 に示したマトリクスをもとに, クラスタ解析を行った結果を図 7 に示す. 算出した非類似度の値が低いほど両者の類似性は高いことを意味する.

比 DMF 分解速度と同じクラスターに連結されたのは MK-9 であった. DMF 分解に関与する微生物のキノ種である可能性があるが, その存在比率が非常に小さいことから, 本装置内で DMF の分解を担っている主要な微生物のものであるとは考えにくい.

前述で DMF 分解に関与する微生物が有すると推測された MK- ξ (H₂) と MK- η (H₂) は, 同一のクラスターに含まれており, 比 DMF 分解速度とも近いクラスターに分類された. したがっ

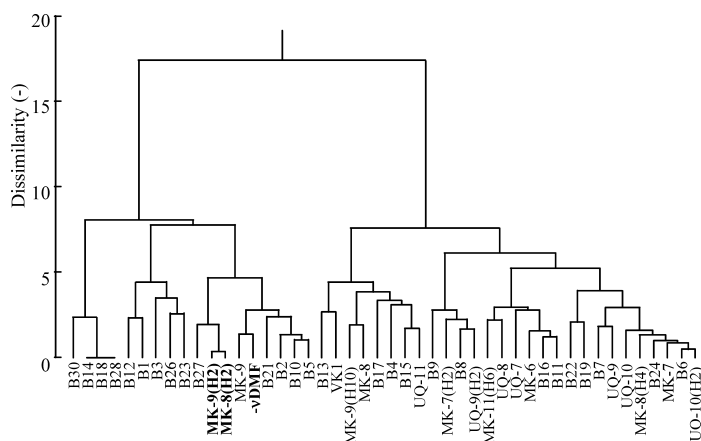


図 7. 比 DMF 分解速度とキノン種に対応した挙動を示す DGGE バンドのグループ化 . (B : DGGE バンドを表す.)

表 4. DGGE バンドの相同性検索結果 .

Band no.	Highest similarity	Homology
B10	<i>Aminomonas aminovorans</i> C2A1	194/199
B21	<i>Bacteriovorax stolpii</i> Uki2	191/197
B27	Uncultured bacterium DSSD13	166/167

て、MK- δ (H₂)とMK- ϵ (H₂)を含有する微生物は、DMF の分解に係わっている可能性が高いと判断される。また、比 DMF 分解速度とこれらのキノン種が分類されたクラスター内に含まれる DGGE バンドは、DMF 分解菌のものである可能性がある。このような DGGE バンドは、B2、B5、B10、B21 および B27 であった。しかしながら、B2 や B5 はバンド強度が明らかに低いことから、DMF 分解に主として関与している微生物のものであるとは考えにくい。B10、B21 および B27 の DNA フラグメントを有する微生物が装置内で DMF の分解に主として関与しているものと判断される。

そこで、見出された 3 種類の DGGE バンドの塩基配列を解読した。結果を表 4 に示す。B10 の *Aminomonas aminovorans* C2A1 株は、低 G+C グラム陽性細菌に属することから、有するキノン種は MK- r ($n \leq 8$) と推測できる (Hiraishi (1999))。B10 の *Aminomonas aminovorans* はメタノールやメチルアミンを資化する細菌であることから、DMF のみを供給する Run-2 に移行してから出現したことから、*Aminomonas aminovorans* は本装置内において DMF 中間代謝物の除去に関与している可能性が示唆された。B21 の *Bacteriovorax stolpii* Uki2 株は、 δ -Proteobacteria 属細菌に属することから、有するキノン種は MK- r ($n \leq 8$)、MK- r (H_x) と推測できる (Hiraishi (1999))。この菌種がこれまでに DMF の分解に関与しているという報告は見当たらなかったが、比 DMF 分解速度と同様の挙動を示すことから DMF の分解に何らかの役割を担っていると考えられる。DMF 分解に関与する微生物が有すると推測された MK- δ (H₂)とMK- ϵ (H₂)と同じクラスターに結合された B27 の Uncultured bacterium が DMF の分解に関与していると推測できる。

目的とする DGGE バンドを選定するにあたり、クラスター結合方法として、Ward 法に加えて、最短距離法および最長距離法も適用してみたが、蛍光強度が比較的低い DGGE バンドを

除きすべて Ward 法と同様の結果であった。

5. おわりに

本研究では、分解速度とキノプロファイルおよび DGGE バンドパターンの経時変化データを用いてクラスター解析を行うことで、分解速度の変化と類似性があるキノ種および DGGE バンドをクラスターに分類することで、分解菌が有するキノ種および DNA フラグメントを客観的に特定する手法を提案した。これにより、特定された DNA フラグメントと相同性の高い菌種を特定し、その菌種の有するキノ種を確認することで分解菌としての可能性を評価することを旨とした。

分解微生物を特定する本手法を生物学的に難分解な物質であるジメチルホルムアミド (DMF) の浸漬濾床処理過程における微生物群集構造の解析に適用し、その有用性を検討した。その結果、DMF 中間代謝物であるメチルアミンを分解する能力を有する *Aminomonas aminovorax*、DMF 分解能の報告例がない *Bacteriovorax stolpii* および Uncultured bacterium が DMF の分解に関与している可能性が示され、本手法が有用であることが示唆された。

微生物生態学に関する研究手法は培養や反応検出に時間を要し多大な労力を要する手法が多いために、簡易且つ迅速に行える手法が求められている。実験により得られるデータ群に対して統計学的手法をより取り入れることで労力を減らすと共に時間を節約し、より多くの有益な情報が得られる事を期待する。

謝 辞

本研究の一部は 21 世紀 COE プログラム「未来社会の生態恒常性工学」により行われたものである。

参 考 文 献

- Crecchio, C. and Stotzky, G. (1998) Binding of DNA on humic acids: Effect on transformation of *Bacillus subtilis* and resistance to DNase, *Soil Biology and Biochemistry*, **30**, 1061–1067.
- Hiraishi, A. (1999) Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **88**, 449–460.
- Hu, H.-Y., Lim, B.-R., Goto, N. and Fujie, K. (2001) Analytical precision and repeatability of respiratory quinones for quantitative study of microbial community structure in environmental samples, *Journal of Microbiological Methods*, **47**, 17–24.
- 胡 洪岩, 中込浩樹, 藤江幸一, 浦野紘平 (1992) 好気性バイオフィルターにおけるジメチルホルムアミドの処理特性と微生物馴致過程の解析, *水環境学会誌*, **15**(10), 726–733.
- Mve-Obiang, A., Mestdagh, M. and Portaels, F. (2001) DNA isolation from chloroform/methanol-treated Mycobacterial cells without lysozyme and proteinase K, *BioTechniques*, **30**, 272–276.
- Urakami, T., Kobayashi, H. and Araki, H. (1990a) Isolation and identification of tetramethylammoniumbiodegrading bacteria, *Journal of Fermentation Bioengineering*, **70**, 41–44.
- Urakami, T., Kobayashi, H. and Araki, H. (1990b) Isolation and identification of N, N-DimethylformamideBiodegrading bacteria, *Journal of Fermentation Bioengineering*, **70**, 45–47.
- Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition, *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 316–322.

Dynamic Analysis of Microbial Community Structure and Identification of Refractory Chemical-decomposing Bacteria by Combination of Quinone-profiling Method and PCR-DGGE Technique

Tadao Kunihiro,¹ Masafumi Fujita,² Hong-Ying Hu³ and Koichi Fujie¹

¹Department of Ecological Engineering, Toyohashi University of Technology

²Department of Civil and Environmental Engineering, University of Yamanashi

³ESPC, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University

A simple method for finding target refractory chemical-degrading bacteria statistically from a mixed culture system was developed by combination of quinone profiling and DGGE banding pattern.

Techniques for identifying degrading bacteria species by applying two kinds of biomarker (16S rRNA and microbial quinone) are still limited. To statistically evaluate the change of DGGE band pattern, a matrix based on DGGE band intensities has been made by digitalizing DGGE band pattern. Refractory chemical-degrading bacteria species were identified by cluster analysis with repeatedly measured data such as specific degradation rate, mole fraction of quinone species and DGGE band intensity. This approach has been applied to analysis of microbial acclimation to dimethylformamide (DMF) in biological wastewater treatment experiments.