

遺伝子解析技術を利用した油汚染土壌の バイオレメディエーションの評価方法に関する研究

門倉伸行* 竹田三恵*

油汚染土壌の有力な処理法として、生物処理の実績が増えつつあるが、より確実な処理を行うためには分解に寄与する微生物の動態をリアルタイムに把握することが重要である。従来、土壌中の細菌を計測する手法としては培養による方法が一般に用いられてきたが、培養期間が長く、さらに環境中の90%以上の細菌が培養困難であることなど、分解微生物の全容を解明するには不十分な情報しか得られなかった。本論文では、近年研究開発の著しい遺伝子解析技術¹⁾を利用した微生物動態解析手法¹⁾により、リアルタイムに、正確な情報を現場にフィードバックさせる方法の紹介を行う。また、油汚染土壌の生物処理の評価に適用した結果、土壌中の分解微生物の性状把握や菌相変化の確認に適用できることが示された。

キーワード：遺伝子解析技術、微生物群集解析、生物処理、油汚染土壌、PCR-DGGE 法

1. はじめに

近年、日本国内における土壌・地下水汚染は、重金属や揮発性有機化合物による汚染のみならず、ガソリンや重油等の油による土壌汚染が顕在化してきている。

現在、油による土壌・地下水汚染に対する国内の法規制は、油の一成分であるベンゼンの環境基準のみが定まっている状況である。平成14年5月に成立、平成15年2月に施行された「土壌汚染対策法」においては、油分の基準が規定されなかったものの、「土壌環境保全対策の制度の在り方に関する検討会」における中間取りまとめにおいて、油分に対する早期の基準化が指摘されており、今後法体系の整備とともに油汚染対策が進むことが予想される。

油汚染土壌の処理方法は、欧米では安価な処理法として微生物の浄化能力を活用した生物処理(バイオレメディエーション)が中心となっており、国内でも実績が増えつつある。しかし、その一方で生物を利用するため環境条件や汚染物質の種類が複雑で、条件設定が処理効率に大きく影響を与える。したがって、より確実な処理を行うためには、処理サイトにおいて微生物がどのように働いているか、分解微生物の存在確認とともにその性状把握が重要となってくる(Fig. 1)。

これまで、土壌中の細菌を計測する手法としては培養法が一般的に用いられてきたが、この方法では培養期間に1ヶ月以上を要することもあり、測定結果をリアルタイムに反映することが困難であった。また、環境中に存在する細菌の90%以上が培養困難とされているため、培養法で把握できる群集はごく一部に過ぎないという欠点もある²⁾。

* 技術研究所 環境技術研究部

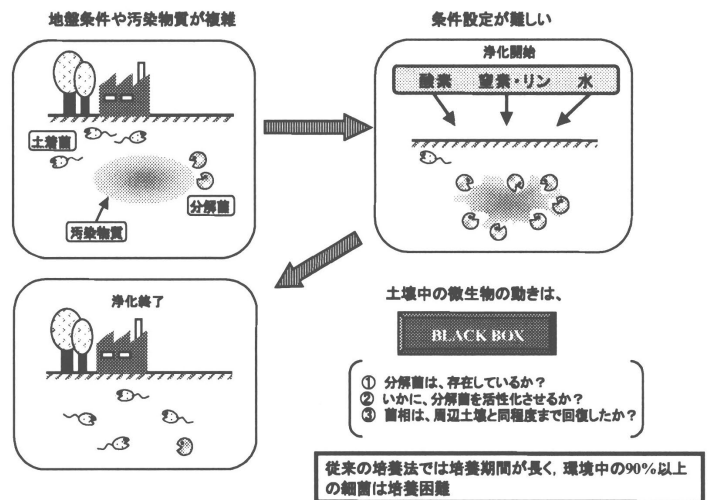


Fig. 1 汚染土壌の生物処理

分解微生物の全容を解明することが不可能であり、しかも解明に時間がかかりリアルタイムに現場へフィードバックすることができなかった。そこで、近年培養によらない群集解析の手法として分子生物学的手法¹⁾が注目を集めている。

分子生物学的手法は、微量のサンプルからその環境中に存在する微生物の遺伝子を培養過程を経ずに検出でき、微生物の検出や特定を容易に行える手法である。本論文では、遺伝子解析技術を利用した微生物動態解析の手法や油汚染土壌の生物処理評価に適用した事例について解説する³⁾。

なお、本文中にある微生物の生態や遺伝子解析技術に関する専門用語に関しては、参考文献を参照されたい。

2. 遺伝子解析技術を利用した微生物動態解析手法

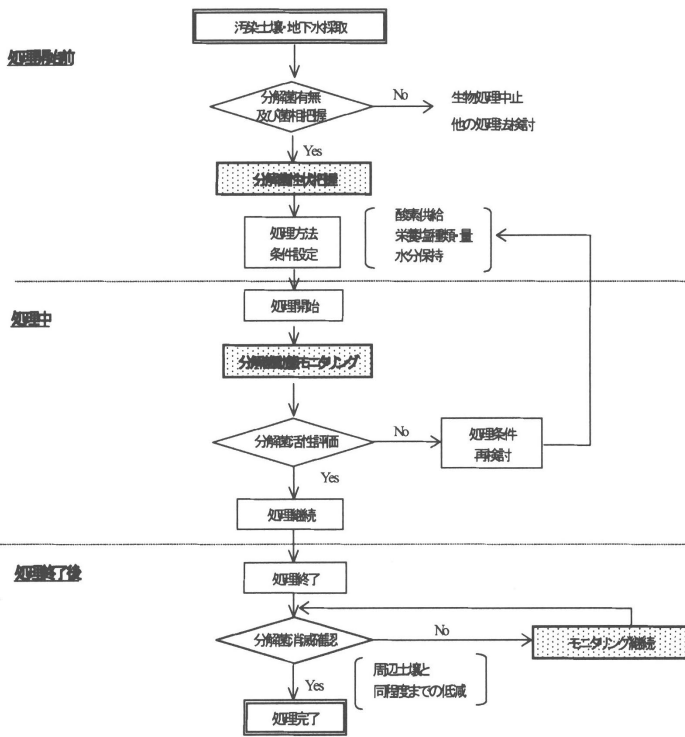


Fig. 2 遺伝子解析技術による生物処理の全体フロー

2.1 遺伝子解析技術の生物処理への適用

遺伝子解析技術を利用した微生物動態解析手法は、培養を経ずに直接核酸を抽出して解析するため、培養困難な菌にも有効とされている。Fig. 2 に遺伝子解析技術の利用による生物処理フローを示す。

本手法を用いることにより、生物処理を開始する前に、対象の土壌や地下水中に汚染物質を分解する菌が存在するかどうかを迅速に把握することができる。また、生物処理期間中には、分解菌の動態をリアルタイムでモニタリングすることにより、菌の活性を維持・向上させるための条件設定に活用できる。さらに、生物処理終了時には、そのサイトの菌相が汚染物質の影響のない状態にまで回復したかどうかの確認にも適用できる。

本手法を用いた分解微生物の性状把握により、分解微生物の活性維持・向上に導くための最適な条件設定が可能となり、生物処理期間の短縮や処理費用の低減につながる事が期待できる。

2.2 微生物群集解析¹⁾の手法

培養によらない微生物群集解析の手法には、大きく分けて化学分類学的手法と分子生物学的手法がある⁴⁾。化学分類学的手法の代表的なものは、キノプロファイル法である。細胞膜に存在する呼吸鎖・光合成電子伝達鎖の必須成分であるキノンの分子種が、微生物種により異なることを

用いて微生物種の存在割合を調べる手法である^{3,4)}。

一方、分子生物学的手法は、微生物の持つ遺伝子情報に基づく手法であり、とくに rRNA 塩基配列¹⁾を利用した手法が注目されている。以下に、代表的な分子生物学的手法の概要を示す。

①DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法⁷⁾

土壌や地下水から抽出した微生物の遺伝子 (16S rRNA 遺伝子¹⁾) の断片を、変性剤に濃度勾配をつけたゲル中で電気泳動することにより、微生物の種毎にバンドを分離することができる。この手法は DNA 断片の塩基配列の違いが、濃度勾配ゲル中での移動度に差を生じさせることを利用したものであり、一塩基の違いも検出可能であるとされている。

②T-RFLP 法⁸⁾

16S rRNA 遺伝子の末端を蛍光標識しておき、これを制限酵素により特定の部位で切断する。切断される部位は塩基配列の違い、すなわち種の違いによって異なってくることから、切断後の断片の長さは種毎に異なる。この断片を電気泳動し、蛍光標識されたバンドのみを検出することで、サンプル中の微生物相の解析が可能となる。

③FISH 法⁹⁾

検出したい微生物群に特異的な配列に基づいて設計したプローブを蛍光標識し、微生物濃縮液と直接反応 (ハイブリダイズ¹⁾) させる。これを蛍光顕微鏡下で観察することにより、目的の配列を持った細胞を検出することができる。

④DNA マイクロアレイ法^{10,11)}

ガラス基板上にサンプルから抽出した DNA 断片またはオリゴヌクレオチドを固定化し、目的の塩基配列より設計した蛍光標識プローブとハイブリダイズさせる。各スポットの蛍光強度を解析装置で測定することにより、プローブ DNA 量を測定することができる。従来のハイブリダイゼーション法を応用したもので、微小空間において膨大な数の遺伝子を同時に、しかも少量のサンプルで解析できる手法である。

これらの手法のように、環境中の微生物の動態を把握するためには、微生物相の構成を全体的につかむための構造解析と、その中で特定の微生物がどのような働きをしているかをみる機能解析の両方が不可欠である。この観点から、上で述べた解析手法を分類してみる。

まず、構造解析の手法として、キノプロファイル法は、微生物種の存在割合を調べる手法であることから、微生物群集の菌相全体の動きを大まかに把握するのに向いている。また、DGGE 法や T-RFLP 法も菌の種毎にバンドパターンが分離することから、構造解析に使われる。ただし、DGGE 法においては、例えば用いるプライマーを酵素タンパク質をコードする遺伝子の配列などに変えることにより、機能解析に利用することも可能となる。

次に、FISH 法と DNA マイクロアレイ法は、目的とする遺伝子の存在を直接観察する手法であることから、サン

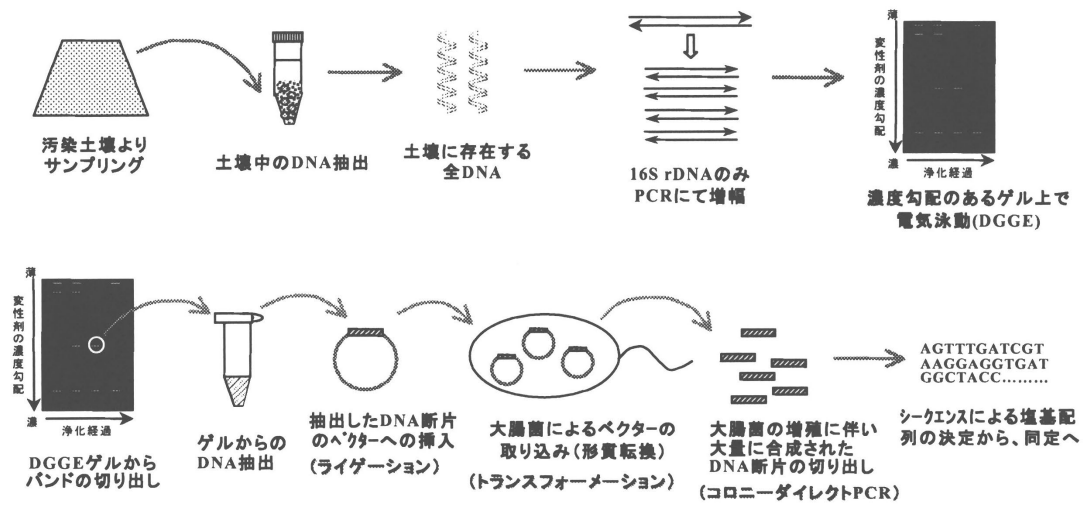


Fig. 3 DGGE 法と塩基配列決定までの流れ¹⁴⁾

ル中の微生物の機能解析に向いている。例えば、汚染物質分解酵素遺伝子をプローブとした場合、その遺伝子の存在を確認することができる。

このように、どの手法も万能ではなく、単一の手法では限界も多い。微生物群集をより確実に、より正確に把握するためには、複数の手法を組み合わせる用いる必要がある。

2. 3 DGGE 法による微生物群集解析

本論文では、油汚染土壌の生物処理における微生物の群集解析として、DGGE 法の適用を試みた。DGGE 法を微生物群集の解析に最初に応用したのは Muzer ら¹²⁾であるが、それ以来種々の環境における微生物群集構造を、培養に頼らず把握する有力な手法として利用されている¹³⁾。Fig. 3 に、DGGE 法による群集解析と、バンドの切り出しによる塩基配列決定までの流れを示す。

DGGE 法は、環境試料(土壌や地下水等)より抽出・調整した遺伝子(DNA)断片を DNA 変性剤を加えたポリアクリルアミドを用いた電気泳動により分離する手法である。DGGE 法を用いることで、その環境試料中の微生物の種類(電気泳動上の種類)と量(相対値)を知ることができる。しかし、DGGE 法ですべての遺伝子が観察できるわけではなく、微生物群集の主要な微生物のみである。また、微生物菌体からの DNA の抽出効率の差や PCR¹⁾の定量性の問題など、定量的な解析が難しい等の欠点も持っている¹⁴⁾。

手法の流れは、まず、土壌や地下水あるいは市販製剤などのサンプルから、直接微生物の DNA を抽出し、これを PCR 反応により増幅する。PCR とは、微量な DNA を短時間で大量に増やすための技術である。得られた PCR 産物の中には様々な微生物の DNA が混在しているが、変性剤¹⁾に濃度勾配をつけたゲル中で電気泳動することにより、微生物の種または属毎に DNA を分離することができる。電気泳動の結果はバンドパターンとして可視化されているため、サンプル中にどれだけの種類の微生物が存在するかを、容易に判断することができる。また、このバンドを切り出して DNA を抽出し、ベクターに組み込んで大腸菌に形質転換す

る。そしてこの大腸菌を培養して大量に得られた DNA 断片の塩基配列をシーケンサー¹⁾で解析することにより、属～種レベルでの同定を行う。

さらに、ある汚染物質に対する分解微生物といった特定の微生物群の存在を確認したいときは、汚染物質の分解微生物の遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行うことにより、分解微生物の DNA のみを増幅させることができる。これを DGGE に供することにより、それらの微生物群を選択的に解析することもできる。なお、解析に要する時間としては、電気泳動の結果までが 2-3 日、バンド切り出しから塩基配列決定までは約 2 日である。従来の培養期間が 1 ヶ月以上かかることとの比較、さらには生物処理の期間が通常数ヶ月以上はかかること、等との比較の中で、リアルタイムでの結果の反映が可能と考えている。

3. 汚染土壌の生物処理評価への適用

油汚染土壌の生物処理に対する評価事例として、模擬汚染土壌と実汚染土壌の生物処理に DGGE 法を適用した結果を示す。

3. 1 模擬汚染土壌浄化実験

3. 1. 1 実験方法

実験に用いた土壌は砂質シルト系の畑地土壌で、これに各々 A 重油、C 重油を 10,000mg/kg ずつ添加し 5 ヶ月間処理を行った。これは、油分解菌の培養・増殖を目的に、本実験とは別に実施したものである。これに新たに A 重油、C 重油を添加し初期濃度を約 8,000mg/kg とし、さらに窒素・リンなどの栄養塩を添加して浄化実験に供した。室温にて 4 ヶ月間処理し、攪拌は月 1 回、散水は適宜行った。

3. 1. 2 油汚染浄化結果

油分濃度の分析は、ソックスレー抽出重量法による n-Hex 抽出物質量の測定と、溶媒抽出-IR (赤外分光光度法) 法による TPH (全石油炭化水素濃度) の測定を行った。また油分の組成分析は、イヤトロスキャンを用いた TLC-FID 法により行った。Fig. 4 に組成毎の油分濃度の経

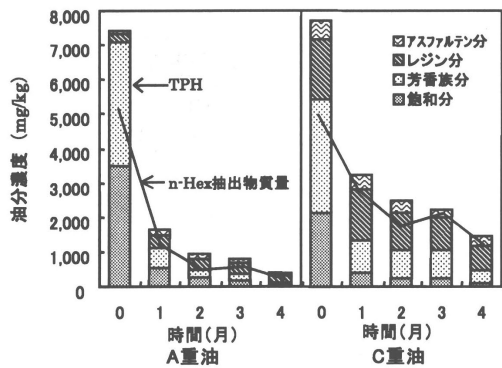


Fig. 4 模擬汚染土壌油分経時変化

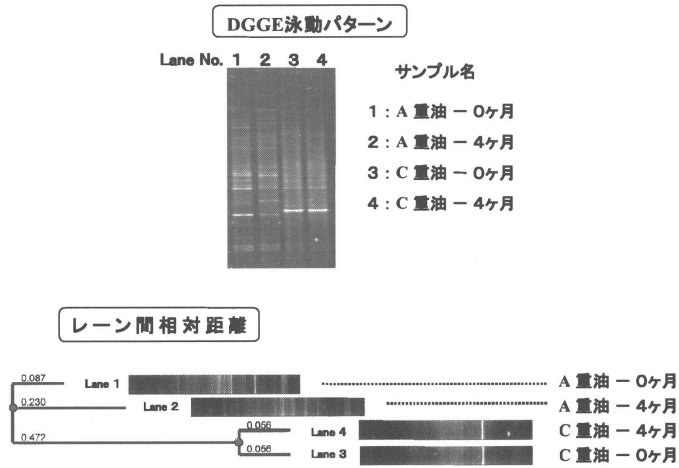


Fig. 5 模擬汚染土壌の DGGE 解析結果

時変化を表す。

A 重油は飽和分や芳香族分などの比較的分解しやすい成分が多かったため、4ヶ月で約95%の分解除去が確認された。またC重油は、レジン分やアスファルテン分といった難分解性成分も多く含まれていたため、A重油と比較し分解率は低くなったが、70~80%の油分除去が認められた。

3. 1. 3 DGGE 法による微生物群集解析結果

Fig. 5 に DGGE 法を用いた解析結果 (上図) を示す。レーン1はA重油を添加した模擬汚染土壌の処理開始時のもので、レーン2はこの土壌を4ヶ月処理したものである。レーン3と4はそれぞれC重油の泳動パターンである。A重油、C重油それぞれの土壌中において数種類のバンドが優占となっていることがわかる。また、特にA重油の処理後にはバンドの数が著しく減少しており、分解菌が優占化したため、菌の多様性が減少したことが確認できる。

さらに、この泳動パターンを画像解析システムに供し、バンドの輝度および位置からレーン間の類似度を算出し、樹形図 (デンドログラム) ¹⁾ に表した (Fig. 5 下図)。図中、線上に示す数値は類似性を表す指標であるユークリッド距離を示している。例えば、あるレーンから別のレーンまでの間の枝の長さが短い (距離が小さい) ほど、それらのレーン同士の類似性が高いことを表している。この図が

らも、C重油を添加した土壌よりA重油を添加したものが、4ヶ月後の菌相の変化が大きいがわかる。また、これら2種類の油を添加した土壌は元々同一の土壌であったことから、汚染油種が異なるだけでその土壌中の菌相が大きく変化することが認められた。

次に、この泳動ゲルから主要なバンド数本を切り出し、菌の同定を試みた。決定した塩基配列をDNAデータバンクのデータと相同性検索を行い、相同性の高かった近縁種も含め、CLUSTAL W ¹⁾ を用いて系統樹の作製を行った。

結果をFig. 6に示す。A重油模擬汚染土壌から採取したクローンを灰色の四角、C重油模擬汚染土壌から採取したものを斜線をひいた四角で表している。分類学的には、取得した配列のほとんどがγ-プロテオバクテリアに属することがわかった。さらに、近縁種には原油分解コンソーシアム構成菌や燃料油汚染サイト採取菌、油汚染ビーチ採取菌等が報告されていたことから、本実験で取得したクローンも、油分解に寄与している菌であることが推察される。

以上のように、DGGE法による解析結果から、油種の異なる油を添加したときの生物処理において、両者の土壌中の菌相が大きく異なってくること、生物処理の過程で分解に寄与している菌相が優占化してくること等の情報が得られた。さらに、生物処理途中で優占してきた菌の同定結果から、それらが油の分解に寄与している菌と類似性が高いことも明らかとなった。さらなるデータの蓄積により、菌相の変化や菌の同定を行うことで生物処理過程の性能評価や事前の適用可能性評価への活用が期待できる。

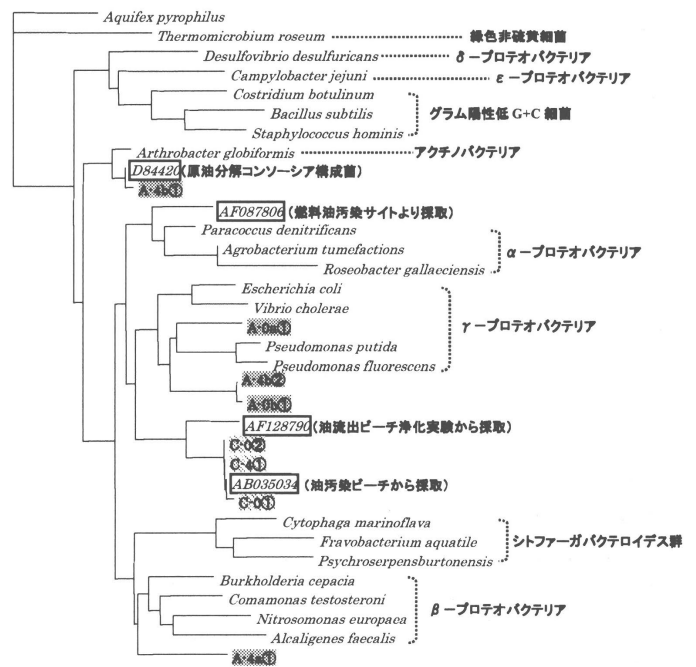


Fig. 6 模擬汚染土壌の系統樹

3. 2 実汚染土壌浄化実験 I

3. 2. 1 実験方法

実験に用いたサンプルは、C重油系の油で実汚染され数十年経過した砂質土 (D₅₀=0.3mm) を、磨砕処理により油分濃度を約 3,000mg/kg にまで低下させた土壌を用いた。原土壌に関しては、油分濃度(TPH)が約 40,000mg/kg, また高沸点の難分解成分が多いため、別途実施した生物処理実験では、処理効果はきわめて低いことを確認している¹⁵⁾。

実験条件をTable 1に示す。栄養塩は全ケースに添加し、土壌の保水性を高めるためにケース1~4には市販の堆肥を添加した。ケース2にはさらにこの土壌から集積培養した油分解菌の培養体、ケース3には市販の製剤を添加し、ケース4は堆肥の影響を減らすため、滅菌した後添加した。ケース5は比較のため、堆肥の添加および攪拌混合をしないケースとした。

Table 1 実汚染土壌 I 実験条件

	栄養塩	堆肥	微生物	攪拌	散水
Case1	○	○	土着菌	○	噴霧+攪拌時
Case2	○	○	培養菌	○	噴霧+攪拌時
Case3	○	○	市販製剤	○	噴霧+攪拌時
Case4	○	○(滅菌)	土着菌	○	噴霧+攪拌時
Case5	○	×	土着菌	×	噴霧のみ

3. 2. 2 油汚染浄化結果

Fig. 7 に生物処理結果を示す。油分濃度(TPH)は、ケース5を除いた各ケースで順調に減少し、3ヶ月後には飽和分で90%以上、芳香族分でも85%以上の分解除去が確認された。とくに、市販製剤を添加したケース3において早い時期からの分解が認められた。

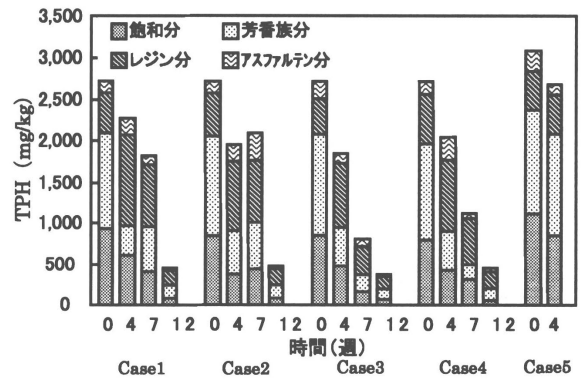


Fig. 7 実汚染土壌 I 油分濃度経時変化

3. 2. 3 DGGE 法による微生物群集解析結果

解析結果をFig. 8に示す。レーン1はサンプル土壌に堆肥を添加した処理開始前のもの。レーン2~6はそれぞれケース1~5の3ヶ月処理後のものである。すべてのレーンにそれぞれ優占となるバンド数本が認められる。

この泳動パターンをデンドログラムに表すと、図の下のようなになる。比較的類似性の高いのは、堆肥を添加した処理前土壌と堆肥入り処理後のケース1、堆肥と培養菌入り処理後のケース2であった。次にこれらと類似性の高かったのは、滅菌した堆肥を入れたケース4、さらに離れて製剤を添加したケース3、そして最も類似性が低かったのは堆肥を添加せずに処理したケース5であった。

以上のことから、生物処理に堆肥や製剤を添加することで土壌の菌相が大きく変化することが DGGE 法で把握でき、新たな菌の投入による処理の評価にも本手法が活用できることがわかった。

3. 3 実汚染土壌浄化実験 II

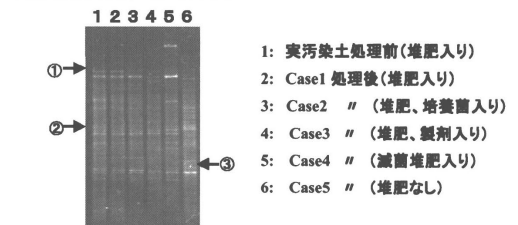
3. 3. 1 実験方法

実験には約 90,000mg/kg という高濃度の潤滑油で実汚染された粘性土壌を用いた。この土壌は難透気性のため、通気性・通水性の向上を目的として現場内の同一油で汚染された砂質土を磨砕処理した砂を混合した。また、油分解菌の添加のため、別途A重油を添加して培養を重ねた分解菌馴養土も添加した。実験条件をTable 2に示す。ケース1と2は5ヶ月間、ケース3と4は4ヶ月間、30℃で処理を行った。攪拌と散水は週1回行った。

3. 3. 2 油汚染浄化結果

油分濃度(TPH)の変化をFig. 9に示す。ケース1は粘性土壌に洗浄した砂質土を約30%混合し通気性を高めたものであり、粘性土壌のみのケース3と比較すると初期濃度

DGGE泳動パターン



- 1: 実汚染土処理前(堆肥入り)
- 2: Case1 処理後(堆肥入り)
- 3: Case2 " (堆肥、培養菌入り)
- 4: Case3 " (堆肥、製剤入り)
- 5: Case4 " (滅菌堆肥入り)
- 6: Case5 " (堆肥なし)

レーン間相対距離

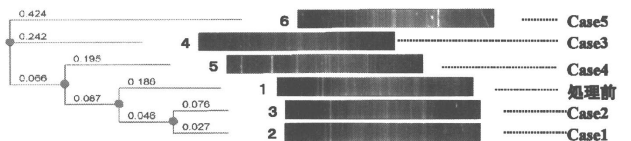


Fig. 8 実汚染土壌 I の DGGE 解析結果

Table 2 実汚染土壌 II 実験条件

	栄養塩 (窒素、リン)	添加材		攪拌+散水
		洗浄土(砂質)	馴養土(砂質シルト)	
Case1	○	○	—	週1回
Case2	○	○	○	週1回
Case3	○	—	—	週1回
Case4	○	—	○	週1回

は低い、明らかに経時的な油分の分解除去が認められる。またケース2はケース1に馴養土を約3%添加し、通気性向上に加え分解菌の投入も同時に行った。その結果、ケース1以上に油分濃度の分解が促進された。一方、粘性土壌に馴養土のみを約3%添加したケース4においては、通気性の向上がないため油分の分解も進んでいない。

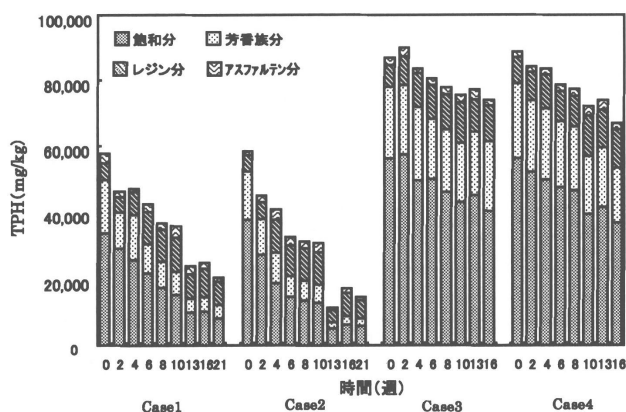
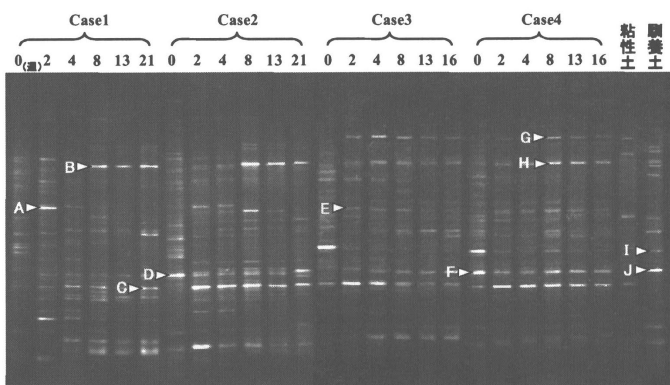


Fig. 9 実汚染土壌II油分濃度経時変化



- A: Case1,2において浄化実験開始後に現れて、8週目以降は消失
- B,H: 全Caseにおいて実験後半に出現
- C: 粘性土を含む全Caseにおいて実験期間中を通して出現
- D,F,J: 馴養土を添加したCaseにおいて実験期間中を通して出現
- G: Case3,4において実験後半に出現

Fig. 10 実汚染土壌IIのDGGE解析結果

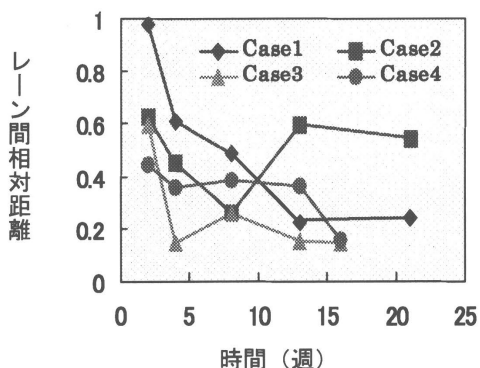


Fig. 11 各ケースにおけるレーン間相対距離の経時変化

3. 3. 3 DGGE 法による微生物群集解析結果

解析結果を Fig. 10 に示す。ここでは、各ケースについてそれぞれ経時的に取得した6個のサンプルを同時に泳動した結果を示す。Fig. 11 には泳動パターンを画像解析したデンドログラム¹⁾をもとに、各ケース毎にレーン間の相対距離、すなわち各試料間のバンドパターンの変化の度合いを算出した結果を経時変化として示した。

Fig. 11 より、全体的な菌相の遷移としては、ケース2を除いて時間経過とともにレーン間の相対距離、すなわち

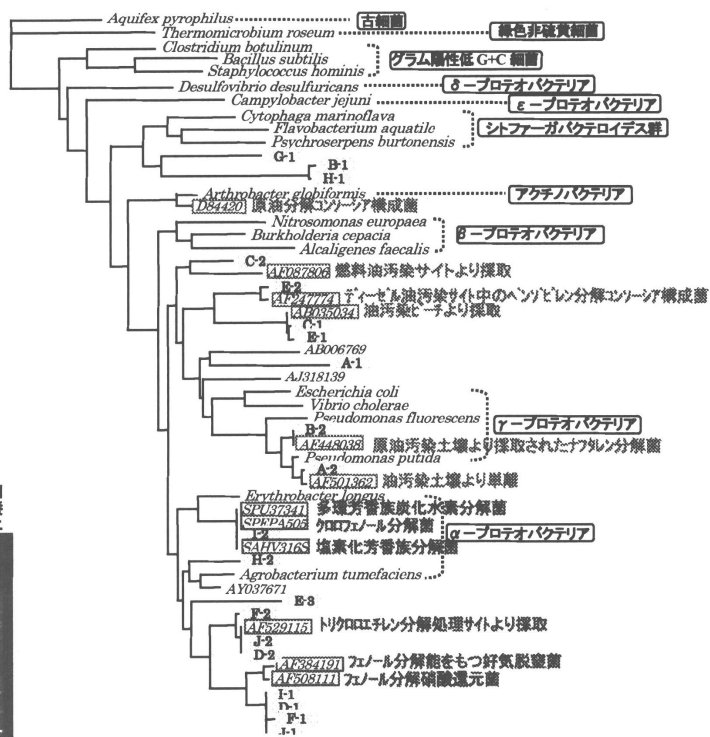


Fig. 12 実汚染土壌IIから取得したクローンの系統樹

変化の度合いが小さくなっていった。つまり、実験開始直後に菌相が大きく変化し、その後時間経過とともに菌相が次第に安定していくことが確認された。

Fig. 10 には、特徴的なA~Jの10本のバンドについてバンドの出現状況を示している。バンドAはケース1,2において実験開始後2週間で現れて8週目以降は消失している。また、バンドBとHについては全ケースにおいて実験後半に出現している。バンドCについては、粘性土を含む全ケースにおいて実験期間中を通して出現している。バンドD,F,Jは、馴養土を添加したケースにおいて実験期間中を通して出現している。

これらの10本のバンドについて、泳動ゲルから切り出して塩基配列を決定、類似菌とともに系統樹に表わした。Fig. 12 に結果を示す。

比較的処理の後半に出現してくるバンドA,B,Hは、類似性の高い菌に油分解にかかわるような菌が見られなかったことから、直接油の分解に関与している可能性は低いと推察される。次に、全実験ケースに出現するバンドCについては、類似菌として燃料油汚染サイトより採取した菌、ディーゼル油汚染サイト中のベンゾピレン分解コンソシア構成菌や油汚染ビーチより採取した菌などと高い同性を示した。このことから、バンドCは油の分解に主として働いている菌である可能性が高いと考えられる。馴養土を添加したケースに出現するバンドD,F,Jの類似菌としては、トリクロエチレン分解処理サイトより採取した菌、フェノール分解能をもつ好気脱窒菌、フェノール分解硝酸還元菌などが見られる。また、少し離れて多環芳香属炭化水素分解菌やクロフェノール分解菌、塩素化芳香

属分解菌などの報告もある。以上のことから、これらの菌は油の成分の中で比較的難分解なものを分解するのに主体的な役割を果たしている菌と推測することができる。

4. まとめ

模擬油汚染土壌ならびに実油汚染土壌を用いて生物処理を行い、処理期間中の土壌中の分解菌の挙動を微生物動態解析手法の一つである PCR-DGGE 法で解析した結果、以下のことが確認された。

模擬汚染土壌を用いた解析結果では、

- ① 同じ土壌に油種の異なる油を添加した場合、油種によって土壌中の菌相が大きく変化することが確かめられた。
- ② 処理期間中、優占的に出現した分解菌の同定の結果、 γ -プロテオバクテリアに属し、近縁種には油分解菌が存在することがわかった。

次に、実汚染土壌を用いた解析結果では、

- ① 生物処理に堆肥や微生物製剤を添加することで、土壌の菌相が大きく変化することが本法で把握でき、新たな菌の投入による処理の評価に適用できることが確認できた。
- ② 生物処理期間中の経時的な菌相変化を解析した結果、処理の初期段階では菌相変化が大きかったが、時間経過とともに菌相が安定してくることが明らかとなった。
- ③ 泳動ゲルから特徴的なバンドを切り出して同定した結果、処理期間中に優占している菌は以下の3種類に大別されると推察された。
 - a) 飽和炭化水素分解菌（比較的低温の油を分解する）
 - b) 芳香族系炭化水素分解菌（比較的難分解性の油を分解する）
 - c) 油分解には無関係に土壌中に存在する（油を栄養源とせず、逆に阻害もされない）

5. 今後の展開

生物処理への遺伝子解析技術適用の目的は、汚染土壌の生物処理を確実に実施するための活性度評価である。本論文では、遺伝子解析技術を利用した微生物動態解析の手法とともに DGGE 法を油汚染土壌の生物処理評価に適用した事例について紹介した。まだ、解析データが少ないものの、土壌中に存在する分解菌の性状把握、生物処理過程や終了後の菌相変化の確認に適用できることが示唆された。

種々の微生物動態解析手法の中でも、DGGE による手法は菌相がバンドパターンとして可視化されるため、構造の特徴を把握しやすく、また各バンドの配列の解読により群集を構成する微生物の推定も可能であり、生物処理評価手

法として有力な手法の一つといえる。ただし、増幅効率の違いに由来するバイアス、ゲノムサイズ、16S rRNA のコピー数の影響等、PCR が有する問題がそのまま DGGE にも影響を与える。¹⁵⁾ また、ここに紹介した微生物群集解析の手法の多くはまだ開発途上であり、いずれにしろ単独の手法だけでは不十分である。先に述べた構造解析と機能解析の組み合わせや従来技術である培養法を含めた複数の手法による多角的な解析が必要である。

今後、様々なサンプルを用いて解析を行い、生物活性と環境条件との関係についてデータの蓄積を重ね、汚染土壌の生物処理の性能評価へ活用できるように努めたいと考えている。

謝辞

遺伝子学的解析手法について、流通経済大学中原忠篤教授（元筑波大学教授）殿、野村暢彦講師殿、研究室の学生の方々に多大なるご指導およびご協力をいただきました。ここに厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) 日本微生物生態学会，微生物の生態 18 —微生物生態学のための新たな展開とその手法—，学会出版センター，1992
- 2) Amann, R. I. et al., "Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation", *Microbiol. Rev.*, 59, pp. 143-169, 1995
- 3) 門倉伸行ほか，遺伝子解析技術利用による油汚染土壌の生物処理評価，*ECO INDUSTRY*, Vol. 7, NO. 12, pp. 32-43, 2002
- 4) 栗栖太ほか，食用油を添加した高温接触酸化処理における FISH 法・キノプロファイル法・PCR-DGGE 法を用いた微生物群集の解析，*土木学会論文集*, No. 636/VII-13, pp. 23-33, 1999
- 5) 駒形和夫，微生物の化学分類実験法，学会出版センター，pp. 143-155, 1982
- 6) Hiraishi A. "Isoprenoid Quinones as Biomarkers of Microbial Populations in the Environment", *J. Biosci. Bioeng.*, 88, pp. 449-460, 1999
- 7) Muyzer, G. "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems", *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, pp. 317-322, 1999
- 8) Wen-Tso Liu et al., "Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, pp. 4516-4522, 1997
- 9) DeLong EF et al., "Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells", *Science*, 10:243(4896), pp. 1360-1363, 1989

- 10) Jack S. et al., "Direct Detection of 16S rRNA in Soil Extracts by Using Oligonucleotide Microarrays", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, pp. 4708-4716, 2001
- 11) Liyou WU et al., "Development and Evaluation of Functional Gene Arrays for Detection of Selected Genes in the Environment", *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, pp. 5780-5790, 2001
- 12) Muyzer, G. et al., "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, pp. 695-700, 1993
- 13) 石井浩介ほか, 微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用, *Microb. and Environ.*, 15, pp. 59-73, 2000
- 14) 地盤環境技術研究会, 土壌汚染対策技術, 日科技連, pp. 305-310, 2003
- 15) 土路生ほか, 高濃度重油汚染土壌の生物処理, 熊谷組技術研究報告, No. 60, pp. 33-38, 2001
- 16) 春日郁朗ほか, PCR-DGGE による津久井湖における藻類を含む微生物群集構造の季節変動解析, *水環境学会誌*, 24, pp. 856-864, 2001
- J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research.*, 22(22), 4673-4680 (1994)

A Study on Method of Evaluating Bioremediation of Oil Contaminated Soil which uses Gene Analysis Technique

Nobuyuki KADOKURA, Mie TAKEDA

Abstract

Results of the bioremediation are increasing as a method of processing the oil contaminated soil. It is important to understand the movement of the microorganism which contributes to biological decomposition in real time to execute more certain processing. In a past culture method, the culture period is long, and the bacillus of 90% or more on an environmental inside is culturing difficult. This paper introduces the method of in real time feeding back accurate information by the movement analytical method of the microorganism which uses the gene analysis technique. As the results of gene analysis of the microorganism in bioremediation process, it was shown that it was applicable in the properties grasp of the decomposition microorganism in the soil and the confirmation of the bacterium phase change.

Keywords: gene analysis, movement analytical method of the microorganism, bioremediation, oil contaminated soil, PCR-DGGE method
