

## 水環境試料からの効率的な DNA 抽出方法の開発およびリアルタイム PCR による細菌数の計測

### Efficient DNA extraction method and estimation of bacterial number by real-time PCR from environmental water samples

# 浅野 貴博 [1]; 佐々木 祥人 [2]; 景山 幸二 [3]; 吉川 英樹 [4]

# Takahiro Asano[1]; Yoshito Sasaki[2]; Koji Kageyama[3]; Hideki Yoshikawa[4]

[1] 原子力機構; [2] 原子力機構・地層処分・核種移行; [3] 岐阜大・流域研セ; [4] 地層処分・原子力機構東海

[1] JAEA; [2] JAEA; [3] RBRC, Gifu Univ.; [4] JAEA Tokai

微生物は地下水・河川・底質・土壌をはじめとするあらゆる環境に存在し、分解者としての物質循環を通じ環境変化・環境改善の一翼を担っている。深部地質環境においても、微生物はその活動に伴い地下水の還元状態の維持などの地層処分システムにおける重要な特性に影響を与えている。近年、微生物影響による酸化還元状態を評価するためのモデル開発がおこなわれており、モデルの入力データとして、深部地質環境における微生物数をより正確に測定することが必要となっている。環境中に生息する微生物の多くは培養不可能あるいは培養困難であるため、従来の培養法による定量では精度が低い。従って、培養不可能あるいは培養困難な微生物も検出できる PCR (Polymerase Chain Reaction) を利用した分子生物学的手法を適用することが重要である。本研究では、地下水中に生息する微生物群の定量化や定量精度の向上を目標とし、リアルタイム PCR による微生物の定量精度向上のための効率的な DNA 抽出方法の検討および検討された手法を用いた水環境試料中の細菌数計測を行った。

水環境試料には、幌延の深地層研究施設における HDB-10 孔の深度約 500m から採水した地下水、河川水 1 および河川水 2 を供試した。また、対照区には、通性嫌気性菌である大腸菌を LB 液体培地で培養して用いた。DNA 抽出では、ビーズ破碎による 2 つの方法 (A 法、B 法) と酵素処理による方法 (C 法) の 3 方法を比較した。DNA 抽出効率、抽出した DNA 溶液の純度・濃度および操作の利便性から評価した。DNA の純度は、分光光度計によってタンパク質等の混入程度を示す OD260/OD280 比と腐植物質等の混入程度を示す OD260/OD230 比を測定することにより求めた。抽出した DNA 濃度の評価は、ドメイン・バクテリアをターゲットとしたリアルタイム PCR における Ct 値により評価した。その結果、いずれの方法も大腸菌では効率的に DNA が抽出できたが、水環境試料では完全には不純物を取り除くことはできなかった。3 つの方法のうち、A 法は抽出される DNA 濃度も高く、細胞破碎から除タンパクまでの工程が少なく比較的短時間で DNA 抽出が可能であった。さらに、DNA 抽出工程の作業ステップ数が少ないため再現性も高く、今回検討した方法の中では最良な方法と考えられた。

水環境試料における細菌数の測定は、リアルタイム PCR によりドメイン・バクテリアの DNA 濃度を測定し、この測定値から大腸菌生菌数に換算する方法で行った。リアルタイム PCR の測定系には、ドメイン・バクテリアに特異性のあるプライマー com1/com2 (Zhou et.al., 2007) を用いた SYBR Green I による蛍光検出系で行った。検量線のための標準試料には、大腸菌から抽出したゲノム DNA の濃度希釈系列を用いた。A 法により抽出した DNA を用いてリアルタイム PCR 測定を行った結果、幌延地下水、河川水 1 および河川水 2 の各水試料 1 L あたりのドメイン・バクテリアの DNA 濃度は、それぞれ 483-700 ng、13696-20000 ng、51824-290800 ng であった。一方、大腸菌を平板培地に塗布して測定した生菌数と抽出される DNA 濃度における相関 ( $y=0.0106x$ ,  $R^2=0.9908$ ) が求められており、この相関をもとに幌延地下水、河川水 1 および河川水 2 における DNA 濃度から大腸菌生菌数に換算すると、各々、 $5.12-7.42 \times 10^3$  cfu/ml、 $1.45-2.12 \times 10^5$  cfu/ml、 $0.55-3.08 \times 10^6$  cfu/ml となった。

以上述べたように、今回、複数の DNA 抽出方法を比較し、DNA の抽出効率の高い方法を選定するとともに、その方法を用い、水環境試料を対象とし DNA 濃度から細菌数を定量する一連の測定方法を確立した。

本報告は、経済産業省委託事業平成 20 年度「処分システム化学影響評価高度化開発」において得られた成果の一部である。

#### 参考文献

Zhou et.al., 2007. (2007). Monitoring of microbiological water quality by real-time PCR. Environmental Technology 28; 545-553.