



Application

モバイル型リアルタイムPCR装置を活用した バイオオーグメンテーション工法における投入細菌数の モニタリング

製品名

M1 SamplePrep Cartridge Kit for RNA (Biomeme, Cat.No.3000536)
モバイルリアルタイムPCR装置 PicoGene® (日本板硝子, Cat.No.PCR1100)
KAPA 3G Plant PCR Kit (KAPABIOSYSTEMS, Cat.No.KK7251)
FastGene™ Scriptase II (FastGene™, Cat.No.NE-LS53)

下記のデータは、一般財団法人沖縄県環境科学センター 吉川 大介様、古家 克彦様、株式会社照屋土建 崎原 健吾様、照屋 正悟様、
沖縄工業高等専門学校 田邊 俊朗様、宮里 真珠様、大鏡建設株式会社 山入端 豊様のご厚意により掲載させていただきました。
本アプリケーションノートは、令和2年度土木学会全国大会第75回年次学術講演会の発表内容を元に編集いたしました。

背景

バイオオーグメンテーションで効率良く浄化を進めるために重要なのは、汚染土壌に投入した微生物の菌数をモニタリングし、微生物投入のタイミ
ングを計ることである。

ところが従来の方法では、汚染現場で土壌試料を採取しても、研究室等に持ち込み後に生菌数測定のための培養を行うため日数が掛かっており、汚染
現場での微生物投入のタイミングを逸することも多いと考えられる。

本アプリケーションでは、浄化工事現場において実施可能であり、微生物投入のタイミングを逸することのない、できるだけ迅速な投入細菌の
生菌数をモニタリングする方法について検討した結果を紹介する。

実験方法

1. 投入菌株の培養と土壌試料の採取

C重油分解性細菌（菌株番号19G）を用いて模擬汚染土壌を作製

2. 模擬汚染土壌からの全RNA抽出

使用サンプル：各土壌250 mgに19G培養液0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.2%添加

各サンプルにスキムミルク150 mgを添加

使用キット：Biomeme Sample Homogenization Kit (Biomeme, Cat.No.3000093)

M1 SamplePrep Cartridge Kit for RNA (Biomeme, Cat.No.3000536)

3. モバイルリアルタイムPCRによる菌数測定

抽出した全RNAを鋳型とし、TaqMan®プローブ法によるリアルタイムRT-PCRで19G株の16SrRNA遺伝子を検出した。

逆転写反応およびqPCRには、FastGene™ Scriptase IIおよびKAPA 3G Plant polymeraseをそれぞれ用いた。

使用キット：PicoGene®PCR1100 (日本板硝子, Cat.No.PCR1100)

KAPA 3G Plant PCR Kit (KAPABIOSYSTEMS, Cat.No.KK7251)

FastGene™Scriptase II (FastGene™, Cat.No.NE-LS53)

● 反応組成 Reaction composition

Template RNA	___ μL (Total RNA 10 ng)
2x KAPA 3G Plant reaction buffer	8.5 μL
KAPA 3G Plant polymerase	1.0 μL
FastGene™ Scriptase II	1.0 μL
F Primer	700 nM (final conc.)
R Primer	700 nM (final conc.)
Probe	200 nM (final conc.)
DW	___ μL
Total	20.0 μL

● 反応プログラム Reaction program

RT	42℃ / 180s
Hotstart	95℃ / 15s
Denature	95℃ / 5s
Annealing	62℃ / 20s
Cycles	45 cycles



PicoGene®PCR1100



PicoGene®PCR1100用
測定チップ

4. 模擬汚染土壌試料のTPH濃度測定

実証試験場より採取してきた模擬汚染土壌は、土壌中に残留するC重油のTPH濃度を測定した。

TPH濃度測定法は、環境省の油汚染対策ガイドラインに示されている溶媒抽出GC-FID法に従った。

実験結果と考察

1. RNA抽出とCT値-19G菌数検量線の作成

- リアルタイムRT-PCRに必要な十分量のRNAを抽出することが出来た（表-1）。
- 抽出したRNAを鋳型としてモバイルリアルタイムPCR装置でリアルタイムRT-PCRを行い、19G株の16SrRNA遺伝子を検出することが出来た。混合土に添加した19G株培養液の割合およびそこに含まれる19G菌数と、測定で得られたCT値より作成したCT値-19G菌数検量線を示す（図-1）。

表-1 標準試料からのRNA抽出量

19G株培養液 (%)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
RNA濃度 (ng/μL)	5.0	3.9	3.9	4.8	4.2	4.5

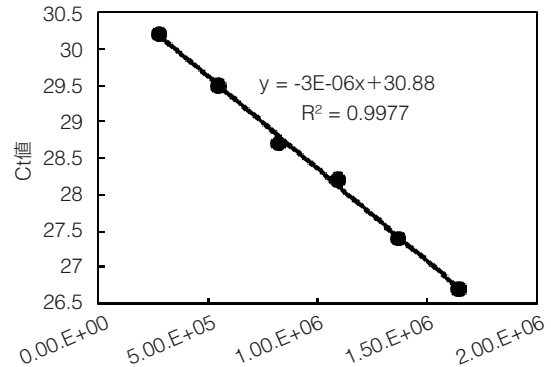


図-1 CT値-19G菌数検量線

2. 模擬汚染土壌試料の菌数定量

- モバイルリアルタイムPCRを用いて、模擬汚染土壌中の19G株菌数を定量することができた（図-2）。
- 模擬汚染土壌中のC重油のTPH濃度測定の結果を示す（図-3）。

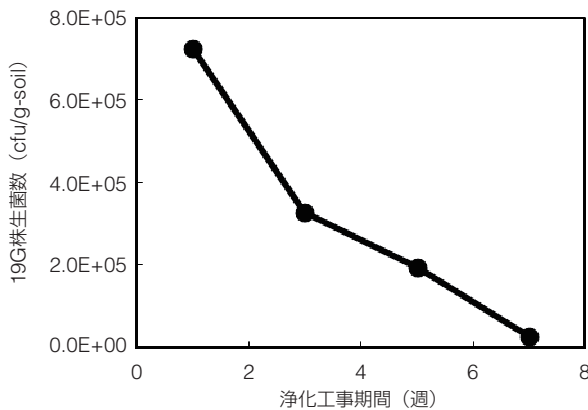


図-2 模擬汚染土壌中の生菌数モニタリング

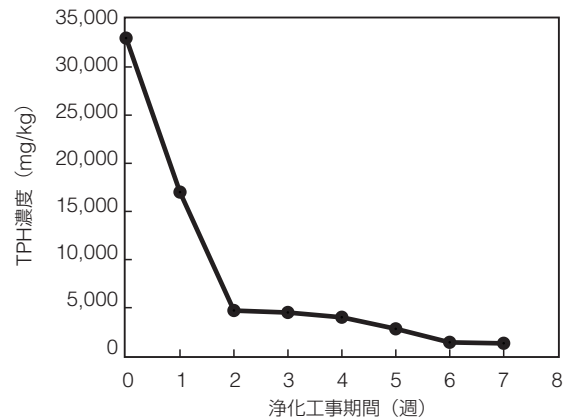


図-3 模擬汚染土壌中のTPH濃度推移

上記のグラフから実証試験初期は土壌中の栄養分とC重油の含有量が多く重油分解菌19G株にとって生育環境が良いと考えられ、多くの19G株が存在していることが分かった。ここからC重油の分解が進むにつれて、土壌中の栄養分の枯渇、細菌の炭素減となるC重油が少なくなり、細菌数が減っていったと考えられる。

● まとめ

- RNAの現場抽出の検討では、カートリッジタイプの抽出キットを使用することで、操作が簡単で時間短縮につながり目的量のRNAを抽出することができた。
- 細菌数のモニタリングは、モバイルリアルタイムPCR装置を使用して検量線の作成を行い、模擬汚染土壌の細菌数の定量を行うことができた。
- 実際の汚染現場で投入細菌の菌数定量まで行うことができれば、微生物投入のタイミング等、迅速な判断が可能となる。
- さらなる条件等の検討が必要であるが、モバイルリアルタイムPCRを用いた細菌の菌数のモニタリングは可能であると考えられる。



お客様のコメント

- モバイルリアルタイムPCR装置は、コンパクトで持ち運びがしやすく、浄化工事等の現場事務所での使用が可能であると考えられる。
- 当該製品を用いる事で、土壌サンプリングからRNA抽出、PCR測定までを現場で完結することができ、大幅な時間短縮につながる。