

1.はじめに

近年、オゾン層破壊や地球の温暖化が問題になっており、その要因としてCO₂やCH₄ガスなどがあげられる。CH₄においては、発生源として湿地・水田の土壌や廃棄物埋立地などからの放出が大きく寄与している。このようなグローバルな地球問題からも土壌の環境保全対策は大切であり、土壌や底泥内微生物生態をモニタリングすることは重要である。従来、平板培養法やMPN法などの培養法を用いて細菌群集の評価が行われてきているが、培養法では特異的な資化能や薬剤耐性を持った菌にしか利用できず、また一般に土壌環境中に生息している微生物のうち培養可能なものは数%程度にすぎないと考えられている。そこで本研究では近年、培養を伴わず微生物の検出が可能である分子学的手法に注目し、16SrRNAをターゲットとしたFISH(Fluorescence in situ hybridization)法による土壌内細菌数の測定手法の開発を進めている。ところが、蛍光染色法による土壌中微生物の検出には、土粒子と微生物とを分別し微生物のみを回収する抽出技術の問題や、無機物の自家蛍光の妨害問題を抱えている。本報では、超音波処理を用いた抽出法の検討と、複数の励起光を用いることで自家蛍光を判別し、FISH法での特異的細菌を検出する顕微鏡観察方法について報告する。

2.蛍光顕微鏡観察による土壌サンプル中の細菌検出

土粒子の自家蛍光は、広い励起および蛍光の波長帯域を持っている。よって、この土粒子の自家蛍光が染色された微生物と土粒子の判別を困難なものとし、微生物の蛍光顕微鏡検出に障害を及ぼす。本研究では、以下のような方法で全菌およびFISH法での特異的細菌の検出を試みた。なお、染色溶液としてFISHにはG励起で赤色の蛍光を発するTRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate)を付加したDNAプローブを用い、全菌染色溶液には核酸染色溶液であるYOYO-1を使用した。

(検出方法)

土粒子の自家蛍光は広い励起および蛍光の波長帯域を持っており、顕微鏡で測定できるB励起（緑色蛍光）、G励起（赤色蛍光）、赤外（青色表示）のどの波長域でも観察される。一方、TRITCで蛍光標識を行ったプローブで検出される特異的な細菌はG励起のみで蛍光を発する（赤色）。そこで、これら3つの励起で観察した画像を重ね合わせると、土粒子は黄色、緑色あるいは紫色、細菌は赤色と異なるため、特異的に細菌の検出が可能であった。同様に、3つの励起で観察された画像を重ね合わせることで、YOYO-1による全菌（緑色）の検出が可能であった。Fig.1に3つの励起で観察された画像を重ね合わせたYOYO-1による全菌染色結果を示す。矢印が緑色をしており、微生物の菌体が明瞭に識別でき菌数評価が可能であった。

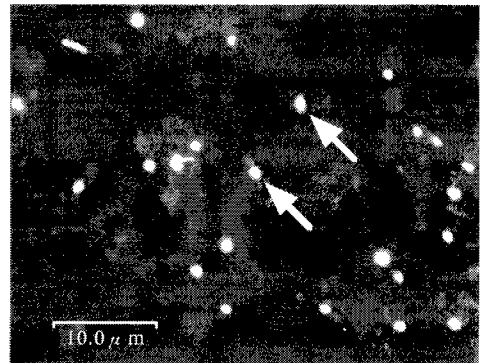


Fig.1 土壌中に存在する細菌の蛍光顕微鏡による検出画像 (YOYO-1による全菌染色を行い3つの励起観察画像を重ねた)

3.微生物の抽出

土壌サンプルの抽出では土粒子と微生物を分けることが重要となる。しかし従来の方法では、回収率が30～60%程度と比較的低い値であった。そこで、本研究では以下に述べる様な方法を新しく提案し土壌からの微生物抽出を行った。抽出方法の概略をFig.2に示す。

(1) 抽出方法

50mlのスクリュートップチューブにフレッシュな土壌サンプル5gとddH₂O45mlとを入れ10倍希釈を行い、土粒子とddH₂Oが均一に混じり合うようにボルテックスミ

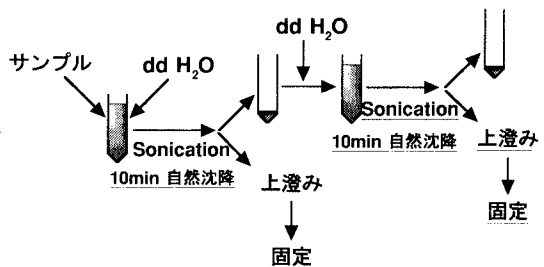


Fig.2 土壌中からの微生物抽出方法

キーワード：FISH、メタン菌、土壌、自家蛍光、抽出

連絡先：〒940-2188 長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学 水圏環境研究室 0258-46-6000(6313)

キサーでミキシングを行った。その後超音波処理(BRANSON:SONIFIER270 100W 0.2sec)を1sec間隔で10min施し、土壤中の上粒子に付着している微生物を土粒子から剥がした。次に土粒子と微生物を分離するために10min自然沈降させ、比重の重い土粒子は沈殿、軽い微生物は浮遊することで、上澄み液(微生物)と沈殿物(土粒子)とに分離した。微生物が浮遊している上澄み液を回収して、1回目の抽出作業とした。抽出後の沈殿物に微生物が付着および残留している可能性があるため、再びddH₂O 45mlをこの沈殿物に加え1回目と同様の抽出を行った。この抽出操作を3回行った。

(2) 評価方法

抽出検討に用いたサンプルは無菌土壤に既知量の純菌(*Methanobrevibacter arborophilicus* A2)を添加して、4℃で約20時間馴致をしたもので、上記の抽出方法により3回まで土粒子と微生物の分離抽出を行った。その後、3回各々の抽出溶液に核酸全菌染色溶液であるYOYO-1により染色を施し、2.で述べた観察方法により細菌を検出し、菌数測定を行った。回収率(各抽出溶液内細菌数/添加した純菌数)により抽出の効率を調べた。

(3) 抽出結果

Fig.3に既知量の純菌に対する各抽出回数における回収率を示す。1回目の抽出では75%、2回目では15%、3回目では4%程度の回収率で、3回目までの抽出を合計すると94%程度となる。このことから純菌添加土壤サンプルではあるが、この抽出方法で高い回収率を得ることが確認できた。

4. 土壤中サンプルの特異的細菌の定量

(1) 実験方法

上記の抽出法および蛍光顕微鏡観察法を用い、土壤サンプルの特異的細菌の検出を試みた。

使用した土壤サンプルは2種類で、長岡市内の水田及び底泥における地表から20 cmの深さから採取した。水田の土は灰色の粘土質で根等の有機物が含まれ、底泥の土は黒色で水田に比べ粒子が粗い土壌であった。

抽出されたサンプルについてAmann1)の方法に準拠しFISHを行った。ターゲット細菌および使用蛍光DNAプローブをTable 1に示す。

(2) 実験結果

水田、底泥における3種のプローブ(Table 1)による特異的細菌の存在率をFig.4に示す。*Archaea*(古細菌)は15~18%存在しており、そのうち*Methanobacteriales*(水素酸化性メタン生成細菌)が13~15%と多く存在していた。一方、*Methanosaeta*(酢酸酸化性メタン生成細菌)は比較的少ない値で、底泥中にはほとんど存在していなかった。

なお、土壤中微生物は1 μm程度の球菌が優占しており、その他3 μm程度の桿菌様の細菌も存在していた。

5. まとめ

土粒子の自家蛍光性質を利用し、土壤中でもFISHにより特異的細菌の検出が可能であった。本手法を他の蛍光プローブにも適用し様々な細菌の検出が可能であると考えられる。

6. 参考文献

- 1) Amann, R.I (1995) Molecular Microbial ecology Manual, 3.3.6. 1-15, Kluwer Academic Publishers

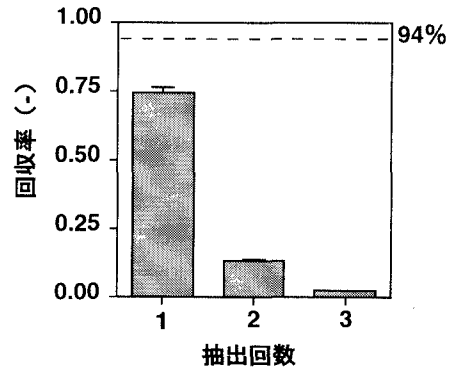


Fig.3 抽出回数と回収率との関係

Table 1 使用したDNAプローブ

Probe name	Target	Fluorescent label
ARC 915	All Archaea (5' GTGCTCCCCCGCAATTCCT 3')	TRITC *
MB 1174	Methanobacteriales (5' TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC 3')	TRITC
MT 757	Genus Methanosaeta (5' CCTAGCTTTCGTCCCTTG 3')	TRITC

* TRITC tetramethylrhodamine isothiocyanate

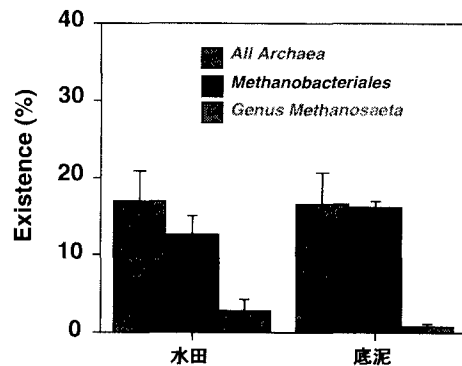


Fig.4 土壌における全菌に対する特異的細菌の存在率