

廃棄物埋立土壌のメタン生成・消費に関する微生物の生態解析

長岡技術科学大学 ○国井伸隆、上田久美子

関口勇地、大橋晶良、原田秀樹

1. はじめに

近年問題となっている地球温暖化には大気中の温室効果ガスの増加が大きく関与している事がすでに知られている。中でもメタンガスは、温暖化寄与率が15%と二酸化炭素の次に高く、毎年1%の割合で増大していると報告されている(Blake, D. R. et al., 1998)。このメタンガスの発生源の約50%は湿地、廃棄物埋立地、水田などの土壌である。土壌に含まれる有機物は様々な微生物により分解され、最終的に嫌気環境下でメタン生成古細菌によりメタンガスとなる。こうして発生したメタンガスは好気環境下でメタン酸化細菌により一部酸化され、残りは大気へと放出される。このように、土壌からのメタンガスの放出には微生物が密接に関わっており、これらの生態解析はメタン発生機構の把握、またメタンガス放出の抑制、促進などを考えていく上で非常に重要である。

本報告では、人為的なメタン発生源である廃棄物埋立地に着目し、廃棄物埋立土壌内におけるメタン酸化・生成に関わる微生物群集の解析を目的とした。また、解析にはFISH法をはじめとする分子生物学的手法を用い、メタン生成古細菌、メタン酸化細菌の定量、同定を行った。

2. 実験方法

(1) 使用サンプル

今回使用したサンプルは、台湾の台南市にある家庭ゴミが直接埋め立てられた廃棄物埋立地を対象とし、地表面から10、30、100、300cmの深さの土壌を採取した。また、サンプルの性状を知るために、SS、VSS、VFA、COD、メタン生成・メタン酸化活性試験などの測定を行った。

(2) FISH法による目的菌の検出及び全菌数測定

FISH法は、Amannの手法(Amann et al., 1995)に準じて行ったが、土壌へのDNAプローブ吸着による検出阻害が見られたため、操作の中にブロッキング剤によるプレハイブリダイゼーションを加えた。FISH法にはCy-5蛍光標識を付加した細菌に特異的なEUB338プローブ(Amann et al., 1990)、古細菌に特異的なARC 915プローブ(Stahl et al., 1991)と、代謝経路の異なる2種類のメタン酸化細菌(Type IおよびType II)に特異的な1041-5プローブおよび1034-Serプローブ(Brusseau et al., 1994)を用いた。カウンター染色はエチジウムブロマイド(10ng/μl)を用いて行った。全菌数は土壌と滅菌蒸留水の懸濁液をフィルター濾過した後、エチジウムブロマイド(50ng/μl)染色液により染色し、蛍光顕微鏡によりカウントを行った。

(3) 古細菌、メタン酸化細菌の分子系統解析

メタン生成活性試験の結果より、メタン生成活性が最も高かった深さ100cmのサンプルに対し、分子生物学的手法を用いて古細菌の分子系統解析を行った。サンプルよりDNAを抽出し、古細菌に特異的なプライマーセットにより古細菌由来の16S rDNAのみをPCR増幅した。このPCR産物を大腸菌を用いてクローン化し、得られたクローンをRFLP解析により分類した。分類した各クローンについて16S rDNA塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。メタン酸化細菌の分子系統解析はメタン酸化活性試験の結果よりメタン酸化活性が最も高かった深さ10cmのサンプルを用いて行った。古細菌同様、DNAを抽出し、細菌に特異的なプライマーセットを用いてPCR増幅後、大腸菌を用いたクローン化を行った。得られたクローンにdot blot hybridization法を適用し、メタン酸化細菌の検出を行った。dot blot hybridization法にはメタン酸化細菌に特異的な1041-5プローブおよび1034-Serプローブの2種類を用いた。

3. 実験結果及び考察

サンプルの性状を知るために行ったメタン生成活性試験の結果では、土壌深さ100cmおよび300cmのサンプルでメタン生成活性が示された。また、100cm、300cmどちらのサンプルにおいても、酢酸資化よりも水素資化のメタン活性の方が高いという結果になった。これらの結果より、土壌深さ100cmおよび300cmのサンプルでメタン生成古細菌の存在が多いことが予想された。ARC 915プローブを用いたFISH法による廃棄物土壌中の古細菌の検出、定量を行ったところ、土壌深さ100cmおよび300cmにおいてメタン生成古細菌が検出された。しかし、検出率としてはエチジウムブロマイド染色によって検出された全菌数のうちの0.01%と非常に少なかった。この結果をメタン生成活性試験の結果と併せて考えると、これらの微生物は土壌中に確かに存在するが実際の環境中では活性が低く、

キーワード：温暖化、廃棄物埋立土壌、メタンガス、分子系統解析、メタン生成古細菌、メタン酸化細菌

連絡先：〒940-2114 新潟県長岡市上富岡町1603-1 長岡技術科学大学環境建設系

Tel 0258-46-1611(内線6313) FAX 0258-47-9600

FISH法で用いるDNAプローブの標的となる16S rRNA含有量が低いためにFISH法によるメタン生成古細菌の検出が困難であったということが原因の1つとして考えられる。

そこで、DNAを用いた分子生物学的手法によるメタン生成古細菌の同定・分子系統解析を行った。土壌深さ100cm部分からDNAを抽出し、古細菌由来の16S rDNAのみをPCR増幅してクローニングを行い、ランダムに71クローンを選択した。この71個のクローンはRFLP解析により6種類の電気泳動パターンに分類することができた。この6種類のクローンの塩基配列を決定し、分子系統解析を行った結果、6クローン全てが既知のメタン生成古細菌に近縁であることが判明した。また、この分子系統解析からおそらく土壌中のメタン生成古細菌は水素資化性のものが酢酸資化性のものよりも優占的に存在している可能性があると考えられる (Fig.1)。この結果は先のメタン生成活性試験の結果と一致している。

一方、メタン酸化活性試験では土壌深さ10cm、30cmのサンプルでメタン酸化活性が示され、土壌深さ10cmの部分で特に高い値を示した。この結果より、比較的好気的な環境と考えられる廃棄物埋立地の上層部分の土壌においてメタンを基質とするメタン酸化細菌の存在が予想された。そこで、1041-5プローブおよび1034-Serプローブを用いたFISH法を行ったが、どのサンプルにおいてもメタン酸化細菌は検出されなかった。こちら、メタン酸化細菌の活性が低く、FISH法による検出が困難であったと考え、古細菌同様にDNAを用いた分子生物学的手法によるメタン酸化細菌の同定・分子系統解析を行った。土壌深さ10cm部分からDNAを抽出し、PCR増幅後、クローニングを行い、ランダムに354クローンを選択した。この354個のクローンにメタン酸化細菌を特異的に検出できる1041-5プローブおよび1034-Serプローブの2種類のプローブを用いてdot blot hybridization法を適用したところ、4クローンが今回用いたプローブで検出できるメタン酸化細菌として検出された。この4クローンの塩基配列を決定し、分子系統解析を行った結果、検出された4クローン中1クローンのみ既知のメタン酸化細菌と近縁であった (Fig.2)。今回用いた手法で検出されたメタン酸化細菌は354クローン中1クローンのみという結果になったが、メタン酸化活性試験の結果を考慮すると、このサンプルには今回用いたプローブでは検出できないメタン酸化細菌が存在しているのかもしれない。

4. 参考文献

- 1) Blake, D. R. et al., (1998). *Science*. 239: 1129-1131.
- 2) Amann et al., (1995). *Microbiol. Rev.*, 59, 143-169.
- 3) Amann et al., (1990). *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925
- 4) Stahl, D. A., (1991). *In Nucleic acid techniques in bacterial systematics*: 205-248.
- 5) Brusseau et al., (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 626-636.
- 6) Ovreas et al., (1997). *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3367-3373.

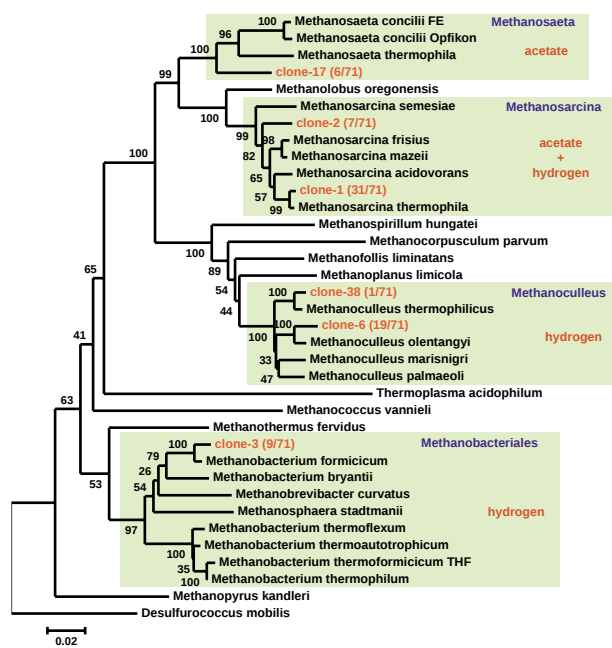


Fig.1 Phylogenetic tree of the clones among the class Euryarchaeota of the domain Archaea, based on neighbor joining analysis of partial 16S rDNA sequences. Numbers in parentheses indicate the frequency of the same RFLP patterns in the total clones. Numbers at nodes represent bootstrap values for the nodes. Desulfococcus mobilis is used as the outgroup.

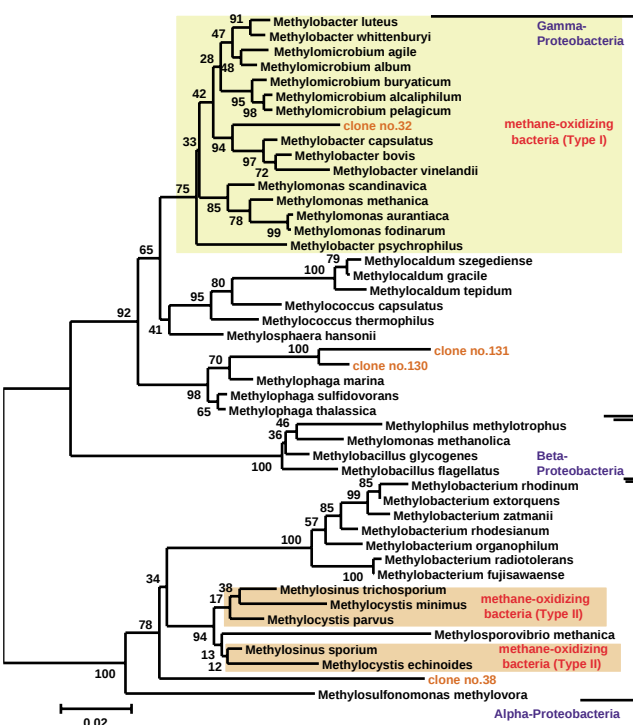


Fig.2 Phylogenetic tree of the clones among methylotrophic bacteria in alpha-, beta-, and gamma-Proteobacteria, based on neighbor joining analysis of partial 16S rDNA sequences. Numbers at nodes represent bootstrap values for the nodes.