

水田土壌中のメタン生成細菌の経時的変化

～直接検鏡法と培養法の比較～

いしはし まさふみ すぎやま ともりの そめや たかし
○石橋 正文・杉山 智規・染谷 孝

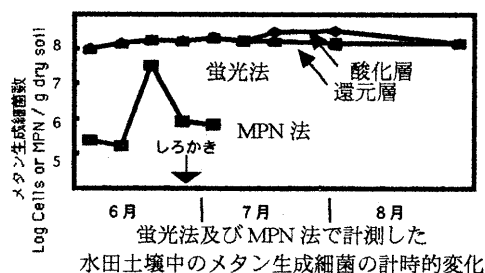
(佐賀大学 農学部)

【緒言】 環境試料中のメタン生成細菌の計測は MPN 法によって行われるのが一般的である。この方法を用いて Asakawa ら(1998)は、水田土壌中のメタン生成細菌数を測定し、一年を通じて大きな変動がないこと ($10^5 \sim 10^6$ MPN / g 乾土) を報告している¹⁾。一方、メタン生成細菌に特有の補酵素 F420 は自家蛍光を持つので、これを利用してメタン生成細菌を検出する方法(蛍光法)がある。しかし、蛍光法は感度が低く、環境試料中のメタン生成細菌の計測には向いていなかった。

先に演者らは、還元剤と蛍光退色防止剤を併用することで、環境試料中のメタン生成細菌の計測を可能とした。その結果、蛍光法は、MPN 法の数倍から数百倍も高い菌数を与え、MPN 法では、土壌中のメタン生成細菌数が過小評価されていることを明らかにした²⁾。そこで本研究では、蛍光法と MPN 法の両方を用いて、水田土壌中のメタン生成細菌数の経時的変化を調査した。

【方法】 佐賀大学水田土壌の作土層(0~10cm) から約 500 g の試料をランダムに 10 点採取し、混合縮分して分析に用いた。調査は 6 月から 8 月に行い、湛水期には酸化層と還元層に分けて採取した。蛍光法では、試料に還元剤溶液(システイン塩酸塩、最終濃度 0.05%) を加えて希釈・分散し(エースホモジナイザー、15,000rpm、5min)、これを吸引濾過器でヌクレオポアフィルター上に捕集し、蛍光退色防止剤(SlowFade-Light Antifade Kit、Molecular Probes 社)を滴下した。これをイメージジョンオイルで封入し、蛍光顕微鏡(V 励起: 380~420nm) 下で、F420 の自家蛍光を観察し菌数を計測した。紛らわしい自家蛍光物質があるときは、F420 の自家蛍光が UV 励起(330~380nm) では見られないという性質を用いて、メタン生成細菌を識別した。MPN 法は浅川らの方法³⁾に従った。酢酸培地を用い、6~9 週間の培養後、FID 検出器付きガスクロマトグラフでメタンガス生成の判定を行った。

【結果・考察】 蛍光法によるメタン生成細菌の計測値は、 $1.02 \sim 3.35 \times 10^8$ cells/g 乾土の範囲にあり、最大で 3 倍の変動があった。一方 MPN 法では、 $1.7 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^7$ MPN/g 乾土の範囲で変動した。蛍光法の計測値は、MPN 法の 6~800 倍も高く、しろかき後、蛍光法によるメタン生成細菌数は漸増し、特に酸化層では、還元層と比べてなんと約 2 倍高い菌数を示した。



以上の結果から、従来の MPN 法では、ごく一部のメタン生成細菌しか検出できておらず、蛍光法を用いることで、土壌中のメタン生成細菌の生態をより正確に研究できるようになった。しかも蛍光法では、わずか 1 時間足らずで計測でき、精度も高い。

¹⁾Asakawa, S., Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y. and Hayano, K. (1998): *Soil Biol. Biochem.* 3: 299-303.

²⁾石橋正文・染谷 孝・浅川 晋・内海真生・内山裕夫 (1999): 1999 年度日本土壌微生物学会講演要旨集, p.28.

³⁾浅川 晋・古賀 洋介・早野 恒一 (1996): *土と微生物*, 47: 31~36