

極低濃度のメタンを酸化分解する土壤中メタン酸化細菌の培養と検出

水圏土壌環境研究室 鶴岡 夏海  
指導教員 山口 隆司, 幡本 将史

1. はじめに

メタンは、強力な温室効果ガスの一つである。メタンはメタン酸化細菌によって酸化されるが、特に大気中のメタンは森林土壌中に生息するメタン酸化細菌によって最も効果的に酸化されることが知られている (Dalal and Allen, 2008)。通常メタン酸化細菌の微生物解析は、メタン酸化細菌が固有に持つメタン酸化酵素の一部をコードした *pmoA* 遺伝子を標的として行われる。大気メタンを主に酸化していると考えられているメタン酸化細菌の *pmoA* 遺伝子は *USCa*, *USCy*, *Cluster 1* と呼ばれているグループに分類されるが、培養されておらず分離株が得られていないためにどのようなメタン酸化細菌なのか明らかになっていない (Kolb, 2009)。

そこで本研究では、土壌中に生息する極低濃度のメタンの酸化分解を担うメタン酸化細菌を明らかにすることを目的として、これら微生物の集積培養を試みた。

2. 実験方法

(1) 培養装置

土壌試料は、学内の植生の異なる 2 箇所から採取した土壌 A, B を用いた。培養装置の概略を Fig. 1 に示す。カラム 1 は、容積 255 cm<sup>3</sup> の円筒形ガラスカラムを用い、内部に土壌を入れた。カラム 2 は、容積 982 cm<sup>3</sup> の円筒形ガラスカラムを用い、内部に土壌を植種したスポンジ担体を入れた。土壌 A, B に対してそれぞれ 2 つのタイプの培養方法を用いた。カラムは 30°C のインキュベーターに設置し、基質として 8.9 ppm のメタンガスを含む空気をカラムに連続的に供給し、週に一度の頻度で無機塩培地を 5 ml 供給した。

(2) メタン酸化活性試験

培養前の土壌の初期メタン酸化活性は、採取直後の土壌を 70 ml のバイアル瓶に詰めてメタン酸化活性試験を行った。それぞれのバイアル瓶は、ヘッドスペースに 8.9 ppm のメタンガスを 1 分間パージし、30°C の恒温槽内で静置した。採取した土壌のメタン酸化活性値は、パージ後と 2 時間後にバイアル内の気相をシリンジで 0.5 ml 採取して測定したメタン濃度の差分から算出した。集積培養系内のメタン酸化活性値は、ガラスカラムへのガスの供給を停止した直後とその 2 時間後に、ガラスカラム内の気相をシリンジで 0.5 ml 採取して測定したメタン濃度の差分から算出した。

(3) メタン酸化細菌の検出

メタン酸化細菌の検出には、*pmoA* 遺伝子を標的とするプライマーセット A189, mb661 を用いて PCR 増幅を行った。増幅産物は QIA Quick PCR Purification Kit を用いて精製後、TOPO TA Cloning Kid for sequencing を用いてクローンライブラリを作成し、塩基配列の解析を行った。得られた配列は NCBI の BLAST により相同性検索を行った。

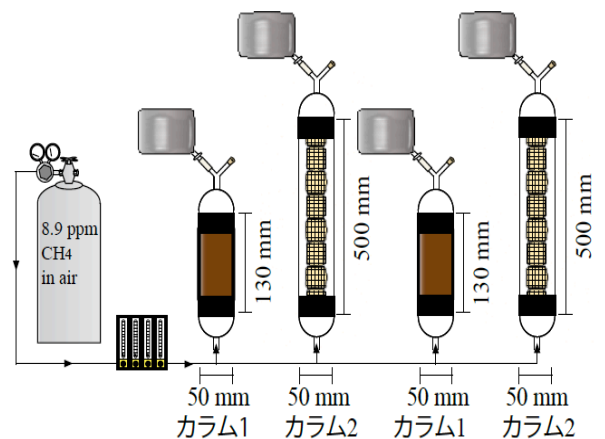


Fig. 1 培養装置の概略図

### 3. 実験結果

#### (1) 環境中土壌のメタン酸化

Table 1 に培養に用いた土壌の諸特性を示す。土壌 A は、*pmoA* 遺伝子を標的としたクローン解析の結果、*Methylocystis* sp. 0510-P-6 の *pmoA* 遺伝子配列と 95%以上の相同性を示したものと、*Methylocystis* sp. SS2C の *pmoA* 遺伝子配列と 96%の相同性を示すメタン酸化細菌を検出した。しかし、メタン酸化活性試験における 2 時間後の活性値は負の値を示した。土壌 B は、*pmoA* 遺伝子の検出が無かったものの、活性値は  $0.32 \text{ ng} \cdot \text{g-soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  を示し、8.9 ppm のメタンを 8 時間後には 2.0 ppm と大気レベルにまで低下させた。

#### (2) 集積培養系内のメタン酸化活性

各集積培養系内のメタン酸化活性値は、培養日数による上昇または低下のいずれの傾向も見られなかった。カラムごとに土壌の活性値を比較すると、カラム 1, 2 どちらにおいても土壌 B は、土壌 A の 2 倍程度の活性値を有していた。また、どちらの土壌においても活性値のばらつきは、カラム 1 よりもカラム 2 のほうが 3 倍以上も大きかった。以上より、カラム 1 とカラム 2 の培養方法を比較すると、カラム 1 は、メタン酸化活性値は高くないが安定してメタンの酸化を行うことが示された。一方でカラム 2 は、メタン酸化活性値は高くなるものの、ばらつきが大きく、土壌 A は生成側にも値が大きくふれていた。

#### (3) 集積培養系内のメタン酸化細菌の検出

集積培養系内の土壌を対象に *pmoA* 遺伝子を標的としたクローン解析を行った結果、土壌 A はカラム 1, 2 において、メタン酸化細菌の存在を確認できた。カラム 1 において確認できたメタン酸化細菌は、*Methylocystis* sp. Kb7 と *Methylocystis* sp. 0510-P-6 の *pmoA* 遺伝子配列と 96%以上の相同性を示した。カラム 2 において検出できたメタン酸化細菌は、*Methylocystis* sp. Kb7 と *Methylocystis* sp. 0510-P-6 の *pmoA* 遺伝子配列と 96%以上、*Methylocystis* sp. Pi5/4 の *pmoA* 遺伝子配列と 97%の相同性を示した。

土壌 B は、培養前に *pmoA* 遺伝子を検出できなかったが、カラム 1 において *Methylocystis* sp. 0510-P-6 の *pmoA* 遺伝子配列と 95%以上の相

Table 1 採取した土壌の特性

	土壌A	土壌B
植生	メタセコイヤ	ササ
pH	5.94	6.11
含水率	22%	41%
<i>pmoA</i> 遺伝子	<i>Methylocystis</i> sp.と近縁	検出無し
初期濃度9 ppmの活性値 ( $\text{ng} \cdot \text{g-soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	-0.021	0.32
初期濃度110 ppmの活性値 ( $\text{ng} \cdot \text{g-soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	0.42	11

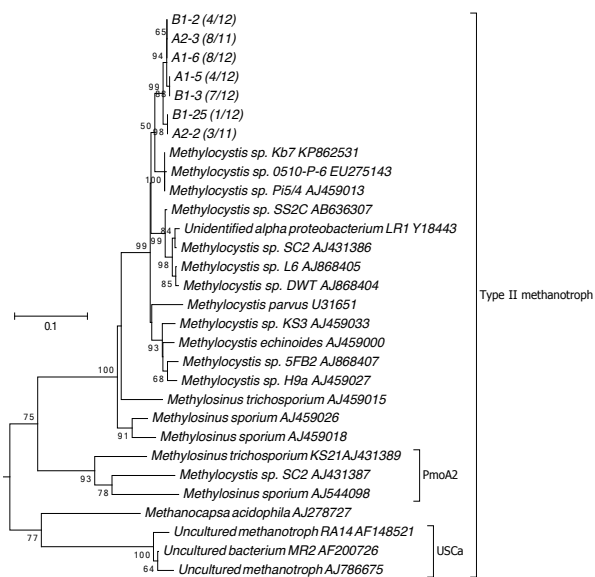


Fig. 2 *pmoA* 遺伝子配列に基づいた系統樹. 450 bp の塩基配列を用いて Neighbor-joining 法で解析を行った。アウトグループは *Nitrosomonas europaea* (L08050) を用いた。A1 は土壌 A のカラム 1, B1 は土壌 B のカラム 1 を示す。

同性を示したものと、*Methylocystis* sp. Pi5/4 の *pmoA* 遺伝子配列と 97%の相同性を示す *pmoA* 遺伝子が検出された。

#### 4. まとめ

本集積培養系は、植生および pH の異なる 2 つの土壌を、同じメタン濃度で集積培養を行ったにも関わらず、両土壌において *Methylocystis* 属に分類される *pmoA* 遺伝子が優占して検出された。このことから 8.9 ppm のメタンは、主に *Methylocystis* 属によって酸化分解されていることが示唆された。他の大気レベルのメタン酸化を担う微生物を培養するには、メタン濃度、培地条件などの培養条件の更なる検討が重要である。

#### 参考文献

- Dalal, R.C. and Allen, D.E. (2008) Greenhouse gas fluxes from natural ecosystems, *Aust J Bot* 56, pp.369-407
- Kolb S., (2009) The quest for atmospheric methane oxidizers in forest soils, *Environ Microbiol Rep*, 1, pp. 336-346
- Shrestha P. M. et al., (2012) Linking activity, composition and seasonal dynamics of atmospheric methane oxidizers in a meadow soil, *The ISME Journal* 6, pp. 1115-1126