

(22) 湖沼底泥のメタン生成細菌の活性とその分布

ACTIVITY AND DISTRIBUTION OF METHANOGENIC BACTERIA IN A LAKE SEDIMENT.

遠藤 銀朗*

Ginro ENDO*

ABSTRACT; Methane production in the environment has been recognized as an important factor for the global warming. It is also important as a process for self-purification in the polluted environment. In this study, the author isolated methanogenic bacteria which live in a lake sediment and investigated the methanogenic activity of the isolated bacteria. The author also studied the distribution of methanogenic activity in a lake sediment by using sediment samples which were obtained from each depth of the sediment, and temperature effects to the methanogenic activities. One coccus bacterial strain of methanogenic bacteria isolated from the lake sediment was a hydrogen utilizing methanogen. It was impossible to isolate acetate utilizing methanogen from the lake sediment because of the coexisting bacteria other than methanogens. There were many differences between hydrogen utilizing methanogenesis and acetate utilizing methanogenesis. Methanogenesis from hydrogen dominated in the lake sediment, especially in the deeper sediment. This methanogenic activity was also observed at low temperature. Methanogenesis from acetate was active at the upper sediment which contained much organic compounds, but not so high as methanogenesis from hydrogen.

KEYWORDS; methanogenesis, methanogenic bacteria, lake sediment, distribution of methanogenic activity, temperature effect.

1. はじめに

地球温暖化の問題および環境浄化の課題に関連して、湖沼におけるメタンの発生が重要視されるてきている。温室効果ガスとしてのメタンは、赤外線吸収能力が同一分子数あたり二酸化炭素の約40倍といわれており、大気圏における寿命（滞留時間）を考慮すれば同一排出量の二酸化炭素の約20倍の温暖化ポテンシャルを持っているといわれている¹⁾。地球全体のメタンの年間発生量は、まだ十分に把握されているとはいえないが、 $355\sim 870\times 10^{12}$ g程度であろうと推定されている²⁾。湿地や湖沼等の自然淡水域から発生するメタンは、このうち $120\sim 200\times 10^{12}$ g程度と考えられ、水田（ $70\sim 170\times 10^{12}$ gと推定される）を上回って最大の発生源とみなされる²⁾。

大気中のメタンの濃度は、産業革命以前の推定値が0.7ppmであつたのに対して、現在の実測平均濃度は1.7ppmにまで増大してきている。このような濃度の増大は、二酸化炭素が産業革命以前の推定値275ppmから現在の平均濃度345ppmに増大したとことと比較して、増加率がきわめて大きいことが知られる。

* 東北学院大学工学部 Faculty of Engineering, Tohoku-Gakuin University.

このことから考えて、メタンは将来二酸化炭素に匹敵する地球温暖化原因物質として注目されることになる
と予想される。また、二酸化炭素の場合は発生の大部分が人為起源であるため、とりうる削減対策が比較的
明瞭であるのに対して、メタンの場合には上述のように自然水域または食糧生産上不可欠な水田あるいは畜
産に由来する発生が大部分を占めており、発生源対策としてどのような方法をとるべきかについて今後の基
礎的な調査・研究の積み上げが必要と考えられる。湖沼等の水域におけるメタンの生成は、絶対嫌気性微生
物であるメタン生成細菌の代謝活動の結果としてなされていると考えられる。しかし、メタン生成細菌は絶
対嫌気性という特殊な性質を有するために、好気性または通性嫌気性微生物を対象とすることが大部分であ
った微生物研究とは異なって、ごく一部を除いてそれらの生態にまで立ち入って研究されることは稀であっ
た。このことにより、メタン生成細菌の湖沼等における生存と分布および活性についての情報はきわめて少
ないといえる。本研究においては、湖沼底泥に生息するメタン生成細菌の純粋分離を試み、湖沼底泥中に
生息するメタン生成細菌の代謝の特徴を調べたとともに、湖沼底泥深さおよび温度条件ごとのメタン生成活
性を試験し、湖沼底泥の質的相違と季節によるメタン発生ポテンシャルの変化等について基礎的な調査を行
なった。

2. 湖沼底泥におけるメタン生成の推定メカニズム

湖沼に流入するあるいは湖沼内で生産される有機物は、通常沈殿によって湖沼底泥へと移行し微生物による
分解を受ける場合が多いと考えられる。貧栄養湖沼を除く一般の湖沼の底泥は、そのごく上部を除いて分
子上酸素の欠乏した嫌気的環境である。底泥へと移行した固形物性の有機物はまず加水分解微生物（Clostridium属細菌など）によって低分子化され、一部は湖沼水中に溶出して拡散するが、残りは底泥層でさらに
嫌気的に分解されて揮発性脂肪酸類やアルコール類などの中間代謝産物に変換される。この低分子化された
有機物はさらに硫酸還元細菌や酢酸生成細菌などによって H_2 、酢酸、ギ酸等に変えられ、これらの有機物
は最終的にメタン生成細菌の基質としてメタンに変換され、湖沼系外に放出されるかまたは湖沼水中に溶解
することになる。しかし、湖沼底泥におけるメタン生成の経路は底泥の性状によって異なると考えられる。
その主な違いは、湖沼の生物生産能力（富栄養化の程度）と流入する有機物の量や質に起因する。底泥層の
発達とその組成（特に有機物含量）は湖沼の富栄養化の進行段階によって異なり、各進行段階の底泥でのメ
タン生成の機構は図-1 (A), (B)に示したように異なると考えられる³⁾。底泥層が未発達で有機物含量の低
い場合には、主として水素ガスを基質とするメタン生成がなされると考えられる。一方、有機物を多く含む
富栄養化湖沼の底泥においては、水素ガスと酢酸を経由してメタンが生成されるものと推定される。

3. 実験材料・装置および方法

3. 1 供試底泥の採取

宮城県北部に位置する内陸性淡水湖沼である伊豆沼（周囲長約12km、平均水深1.2m）は、天然湿地を改修
して農業用水・遊水池・漁業水域などに利用されている国内の典型的な半人造湖沼である。また、ラムサール条約指定湖沼として、白鳥・雁などの水鳥サンクチュアリー水域および貴重種昆虫の生息水域として保全
されている。伊豆沼の地形および水質の概要は以前報告した通りであり⁴⁾、湖岸の葦原およびマコモ群落が
残されていること湖沼の広範囲に亘って連群生が見られることなどによって湖水全体が富栄養化の状態を呈
するまでには至っていないが、有機物を含む底泥層が発達し浅底化が進んでいる。底泥のサンプリングは文
献⁴⁾に示したこの伊豆沼の中間地点（船着場）において、図-2に示したプラスチック製デスポンザブルシ
リンジを改造して作成した装置によって深さ25cmまでの底泥をコア状に採取し、シリンジプランジャーを
用いて底泥底部より上部に向けて押し出しながら5cmごとに切り取る方法で深さごとに活性測定ビンに分け
た。直ちに活性測定ビンのヘッドスペースの空気を窒素ガスによって置換し実験室に運び純粋分離源および
活性測定のための試料とした。

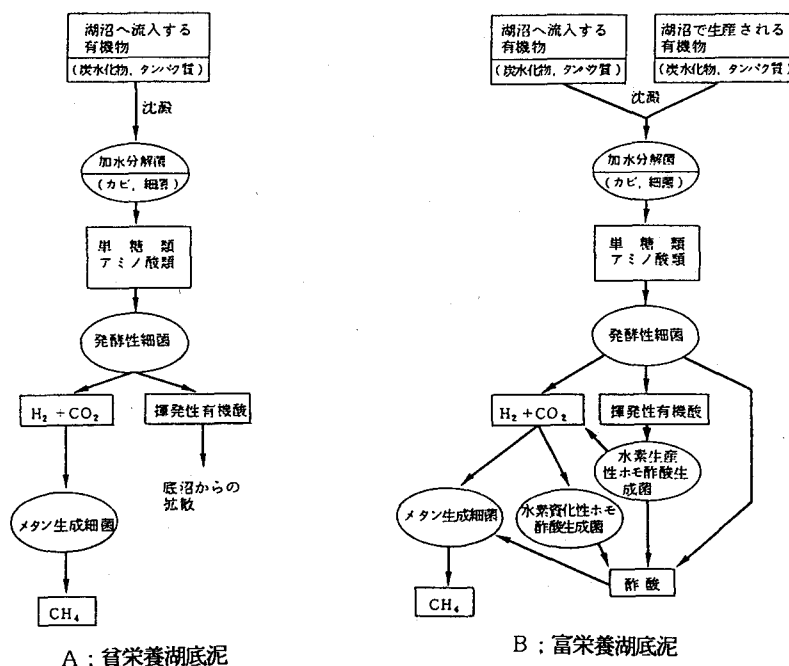


図-1 湖沼底泥におけるメタン生成の経路

3. 2 メタン生成細菌の培養培地

2. で述べたように、メタン生成細菌のエネルギー代謝の基質は水素ガス、ギ酸、酢酸、メタノール、メチルアミン類に限定されるが、湖沼底泥においてはさらに主として水素ガスおよび酢酸を基質とする代謝が中心となっているものと推定される。このため、本研究においては酢酸を含むものと含まない Balch らの培地⁵⁾を用いて分離培養およびメタン生成活性試験を行った。酢酸を含まない培地を用いた場合には、エネルギー源として水素ガスを気相中80% (残り20%は二酸化炭素) の混合ガスを2気圧に加圧して培養試験管に封入した。

メタン生成細菌用培地の調製上の留意点は、この細菌が絶対嫌気性細菌であるため O_2 分子の存在によって鋭敏に生育が阻害されることである。そのため、培地およびヘッドスペース中の O_2 分子を極力取り除くことが必要とされる。この方法として、250℃に熱した還元銅カラムを通したガスによって O_2 をパージするガス噴射法 (Hungate 法)⁶⁾を用いるとともに、培地に毒性の少ない還元剤 (塩酸システインおよび低濃度の硫化ナトリウム) を添加して、培地の酸化還元電位がマイナスの所定値になるように調製する方法を採用した。この際の酸化還元電位の指示薬としてレサズ

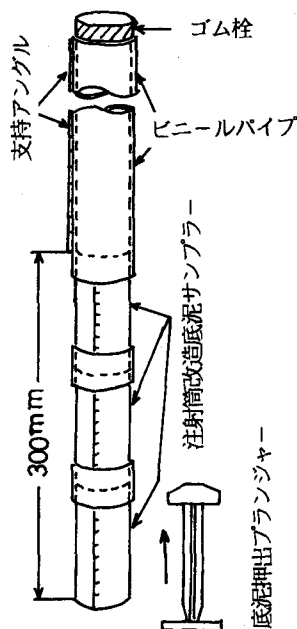


図-2 深さ別底泥採取装置

リンが用いられ、一般にこの指示薬が無色である範囲でメタン生成細菌の増殖が可能である。

3. 3 実験装置

以下の装置を必要とする。

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| (1) 還元銅カラムおよびガス噴射装置 | (7) 広口ビン用ブチルゴム栓（培養用ねじ口試験 |
| (2) 培養用ねじ口試験管（ブチルゴム栓付き、穴開 | 試験管の上半分を切断して取り付けしたもの） |
| スクリュウキャップ付き） | (8) 嫌気ボックス |
| (3) 希釈用一般試験管（ブチルダブルゴム栓付き） | (9) ガスクロマトグラフ |
| (4) (3)用の押さえ蓋付きオートクレーブ用カゴ | (10) 発生ガス測定用ガラスシリンジ |
| (5) 植種用デスポーザブル滅菌シリンジ | (11) その他微生物培地一般調製用と同じ装置類 |
| (6) 底泥培養用広口培養ビン | |

3. 4 メタン生成細菌の分離培養方法

(A) 供試底泥の希釈

500mg/Lの塩酸システインとレサズリンを含む生理食塩水を9mLずつ試験管に分注し、還元銅カラムを通して酸素を除去した窒素ガスによってガス噴射してブチルダブルゴム栓によって密封してオートクレーブ滅菌した。上記試験管1本に底泥試料1gをガス噴射しながら加え 10^{-1} 希釈試料とする。この希釈試料1mLを次の試験管に加え 10^{-2} 希釈試料とする。同様の操作を繰り返して必要段階の希釈試料を得た。

(B) 培地の調製および植種

前述の培地の調製はいずれもガス噴射下で行なった。噴射ガスとして窒素ガス80%・炭酸ガス20%の混合ガスを用い調製密閉後の炭酸によるpHの変化が無いようにした。ビタミン類および抗生物質を加える前の培地を試験管に入れた後ブチルゴム栓で封じ、オートクレーブ滅菌を行なった。滅菌培地が冷却した後濾過滅菌しながらビタミンと抗生物質を培地に注射器によって加えた。嫌気ボックス中で(A)の希釈底泥を滅菌注射器で一定量ずつ培地試験管に注入することによって植種し、ただちにまたは水素ガスを基質とする場合には水素ガス80%を含む混合ガスで置換し2気圧に加圧した後、30℃の恒温槽で振盪してメタン生成細菌の培養を行なった。

(C) 培養結果の評価と純粋培養

メタン生成細菌の培養の結果は、培養試験管のヘッドスペースにメタンガスが存在するかどうかによって評価した。水素ガスを基質とした場合には、培養が進行することによって負圧となるため水素ガスを含む混合ガスを注入した後ヘッドスペースガスをサンプリングした。サンプリングしたガスは、活性炭カラム・TCD検出器のガスクロマトグラフを用いてヘリウムガスをキャリアーガスとして各ガス成分の濃度を測定した。メタンガスの生成がみられた試験管中の培養液をさらに無菌的かつ嫌氣的に希釈して次の植種サンプルとして用いて培養を繰り返した。

(D) 分離メタン生成細菌の代謝活性試験

メタン生成が確認できかつ顕微鏡観察によって純粋培養であると判断された培養液を、新たな培地の試験管に1/10液量植菌してメタン生成量を経日的に測定し分離細菌のメタン生成活性を調べた。水素資化性メタン生成細菌についての試験においては、ヘッドスペースに水素ガスと炭酸ガスの混合ガスを経日的に補給する方法で試験を継続し、試験管内部が極端な負圧とならないように配慮した。

3. 5 湖沼底泥のメタン生成活性の測定方法

(A) 底泥と添加培地の調製

3. 1に示した方法で底泥の深さ方向に5cmずつ

分けて採取した試料を35mLずつ活性測定ビンに封入し、これをさらにガス噴射法によって嫌気度を高めた。3.4(B)と同じように作成した培養培地（ただし、ギ酸を除いて酢酸単一または水素ガス単一培地としたもの）を、酢酸基質の場合は50mLを加え、水素ガス基質の場合は10mLを加えさらに水素ガス80%の混合ガスを加圧せずに加えて、培養を開始した。

(B) 活性試験と発生ガス量の測定

底泥深さ5cmごとの試料（25cmまでの5サンプル）を酢酸単独基質用と水素ガス単独基質用について各々別に用意し、さらに10℃、20℃、30℃で培養するためにこれらの温度にはほぼ一致する湖沼水温期を選んで3回に分けて採取した底泥について、メタン生成活性を試験した。活性はメタンの発生量および発生速度によって評価した。測定方法は3.4(D)と同じである。

(C) その他の底泥の性状の測定

底泥のその他の性状として、底泥の固形物含有率、含水率、有機物含有率等を測定した。

表-1 伊豆沼より採取した底泥の性状

底泥深さ (cm)	蒸発残留物 (W/W %)	有機物含率 (W/W固形物 %)
0 - 5	17.5	19.5
5 - 10	23.4	14.7
10 - 15	32.8	10.4
15 - 20	29.4	11.8
20 - 25	37.6	6.7

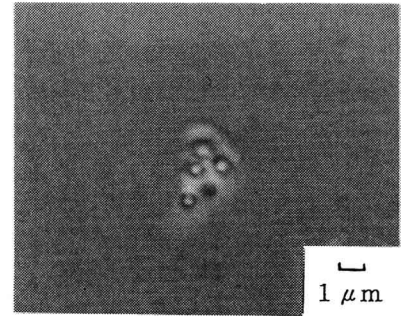


図-3 湖沼底泥より純粋分離した水素資化性メタン生成細菌

4. 実験結果

4.1 湖沼底泥メタン生成細菌の分離結果と分離した細菌の代謝活性

本研究において湖沼底泥のメタン生成細菌を分離培養した結果、水素資化性で球状細菌1種を純粋分離することができた。分離したメタン生成細菌の光学顕微鏡写真を図-3に示した。また、この分離細菌の水素

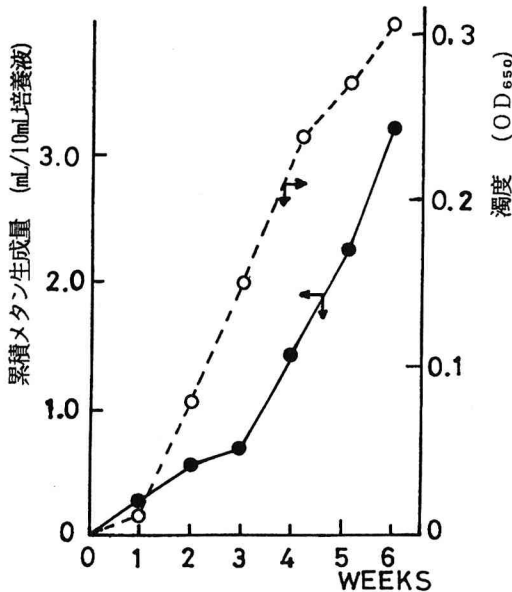


図-4 分離したメタン生成細菌のメタン生成活性と菌体増殖

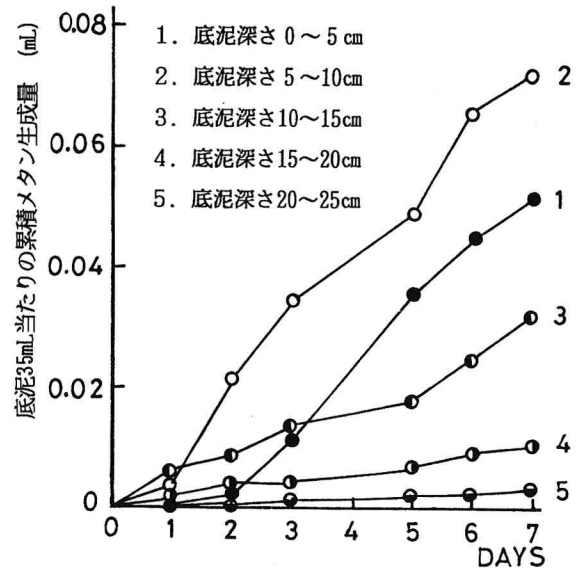


図-5 底泥を嫌氣的に培養ビンに封じた後25℃に保温した際のメタンの生成

ガス（気相80%）供給条件下で30℃での培養における濁度の増加とメタンの累積発生量を図-4に示した。

一方、酢酸資化性メタン生成細菌の分離は、採用した分離培養法で増殖する嫌気性細菌には多種の非メタン生成細菌が含まれており、かつそれらの増殖がメタン生成細菌よりも卓越したため、メタン生成細菌の純粋培養を得ることができなかった。また、得られた混合培養のメタン生成活性はかなり低いものであった。

4. 2 湖沼底泥におけるメタン生成の深さ方向分布と温度の影響

伊豆沼の底泥を前述の通り深さ 5cmごとに分けて採取し、これを脱酸素した窒素ガスによってガス噴射して絶対嫌氣的に封じて20℃に保温した場合のメタン生成を調べたところ、図-5に示す結果を得た。また、採取底泥の深さごとの固形物含量および有機物含量は表-1に示す通りであった。

各深さごとの底泥を封じた培養ビンに水素ガス基質（無機培地および水素ガス80%・炭酸ガス20%の混合ガス）を供給しながら20℃に保温した場合のメタン生成は、図-6に示す通りであった。この他の温度として10℃および30℃におけるメタン生成を調べた。同様に各深さごとの底泥を封じた培養ビンに酢酸基質を与えて20℃に保温した場合のメタン生成を図-7に示した。この場合にも、他に10℃および30℃におけるメタン生成活性を調べた。

水素ガス基質を与えた場合の底泥のメタン生成について各温度ごとのメタン生成を生成速度の最大値によって比較して、図-8に示すような結果を得た。ここで、最大メタン生成速度の値はガスの生成量を測定した各2点間の累積メタン生成量の変化が最大値を採用した。また、酢酸基質を与えた場合の最大メタン生成速度についても、図-9に示した結果を得た。

5. 考察および結言

湖沼底泥のメタン生成細菌の純粋分離と分離したメタン生成細菌によるメタン生成の活性度および底泥そのもののメタン生成活性度を調べ、淡水湖沼水域における温暖化ガスとしてのメタンの生成ポテンシャルおよびそれによる自浄作用能力を評価することを目的として研究を行なった。湖沼底泥におけるメタン生成の場合、主として水素ガスを利用する経路と酢酸を利用する経路の2つが考えられるが、本研究において調査対象とした伊豆沼底泥においては、図-7に示したように酢酸からのメタン生成が低速度でなされたことが知られるものの、主として水素ガスを与えた場合に活発なメタン生成がなされることが知られた。このことは、純粋分離できたメタン生成細菌が水素資化性のもののみであり、かつ分離できた水素資化性メタン生成細菌の増殖速度およびメタン生成の活性度が、本研究で得られた酢酸資化性メタン生成細菌を含む混合培養に比較して大きい（図-4）ことから裏付けられた。

採取底泥を25℃に保温して観察した際のメタン生成（基質無添加）は、図-5に示したように深さ 0~5cmの底泥では2日程度の遅滞の後にメタンの生成がみられ、底泥表層が湖沼水の溶存酸素に直接触れることによってメタン生成細菌の生育が抑制されていることを示すものと考えられる。この条件下で最もメタン生成が多かったのは深さ5~10cmの底泥であったが、この層の底泥中の有機物含量が表-1に示すように比較的高いことおよび溶存酸素の影響が及ばないことなどによって、メタン生成細菌の生存条件が整っていることなどによるものと考えられる。

このように、底泥のメタン生成活性が底泥の深さによって異なることは、水素ガス基質および酢酸基質を与えて測定した各底泥層のメタン生成からも明らかとなった。各基質を与えた場合の各深さの底泥におけるメタン発生状況を図-6と図-7に例示したように、20℃の場合の累積メタン生成量の経日変化から、水素ガス基質を与えた場合と酢酸基質を与えた場合では、メタン生成の応答が異なることが知られた。水素ガス基質を与えた際には、各底泥深さにおけるメタン生成の間に大きな差がみられない（図-6）のに対して、酢酸基質の場合には底泥の深さによって大きく異なり、底泥の浅層におけるメタン生成が活発で底泥深部で

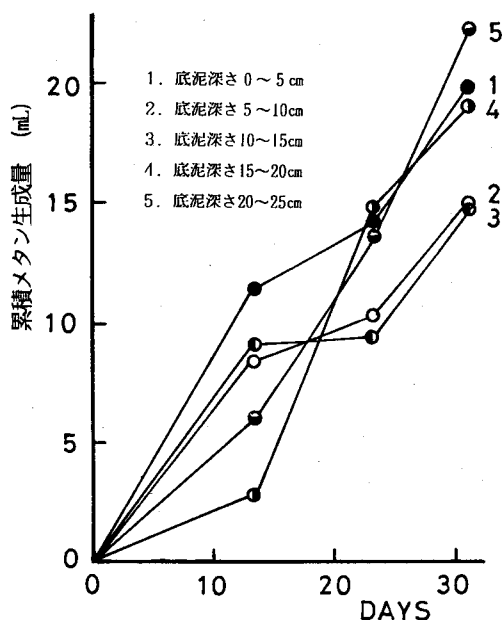


図-6 水素ガス基質を与えた際の底泥によるメタンの生成 (20℃保温, 使用底泥量35 mL)

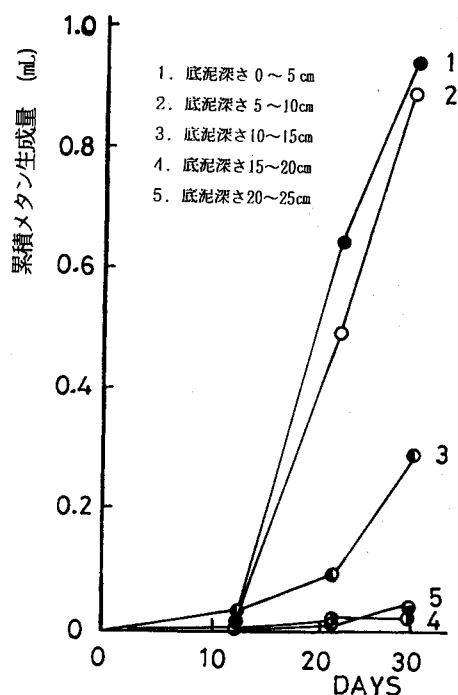


図-7 酢酸基質を与えた際の底泥によるメタンの生成 (20℃保温, 使用底泥量35 mL)

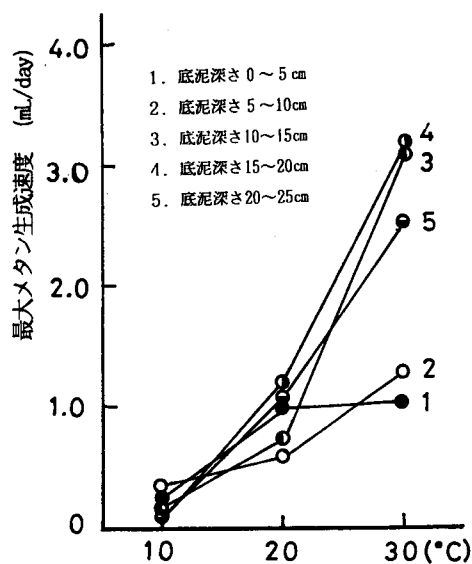


図-8 水素ガス基質を与えた際の各温度での最大メタン生成速度 (使用底泥量35 mL)

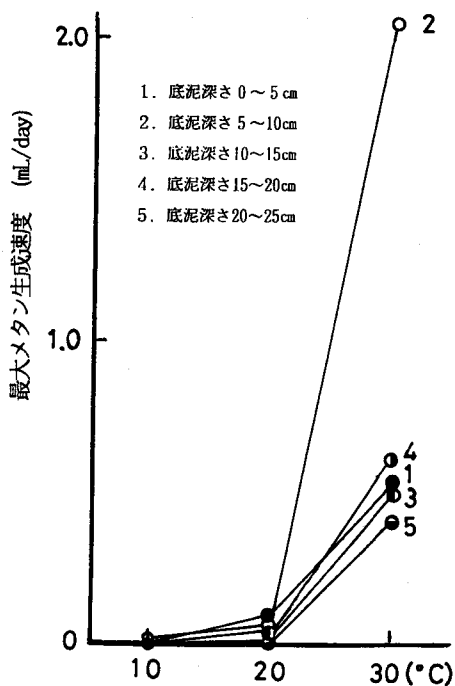


図-9 酢酸基質を与えた際の各温度での最大メタン生成速度 (使用底泥量35 mL)

は生成活性が低かった（図－7）。このことは、底泥中での酢酸の供給が比較的新鮮な有機物（枯死した水棲植物などや沈殿流入有機物など）が豊富に存在する底泥上層部でなされており、この上層部に酢酸資化性メタン生成細菌が集中して生息していることを示すものと考えられる。

各深さの底泥のメタン生成活性の温度による変化（図－8および図－9）は、メタン生成細菌の特性として汚泥の嫌気性消化などにおいてみられるものと同じであることが知られた。しかし、この変化についても水素ガスを基質として与えた場合と酢酸を基質として与えた場合とでは異なることが示されている。水素ガス基質を与えた場合には10℃の低温度でもメタン生成がみられ、20℃ではそれがかなり大きいものとなり、30℃では浅部底泥の活性に比べ深部底泥のメタン生成が大きい活性を示した。これに対して酢酸基質を与えた場合には、10℃ではいずれの深さの底泥でもメタン生成がほとんどみられず、また20℃においてもそれほど高まらない。30℃でようやく顕著なメタン生成速度の増大がみられるようになり、中程度の水温以下において酢酸からのメタン生成が大きく抑制されることが知られた。

以上のように、本研究で用いた湖沼底泥は水素ガスを基質とするメタン生成が全般的に卓越し、また低温期においても水素ガスを基質とするメタン生成がなされていると推定される。この実験的研究を通して、水素ガスや酢酸が十分に供給された場合に湖沼底泥が生産するメタンの量（メタン発生ポテンシャル）を評価する手法を確立できたと考える。広大な水域を持つ湖沼等の底泥で発生するメタンや二酸化炭素のような温室効果ガスの発生量を実測することは、技術的に困難である場合が多い。したがって、今後は実際の湖沼底泥でメタン生成細菌等の微生物に供給される水素や有機物の量的把握と、底泥の質的構成および堆積量（深さ）と温度条件等のデータを把握することによって、湖沼における温室効果ガスの生成量を総合的にシミュレートすることを可能にするための研究が必要になるものと考えられる。

（参考文献）

- 1) 日本環境衛生センター，地球温暖化問題の検討に係る地域情報の整備等に関する調査報告書，1991
- 2) Rogers J.E. and Whitman W.B., Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases., American Society for Microbiology, 1991
- 3) 遠藤銀朗，荏原インフィルコ時報，Vol.91, 1984
- 4) 遠藤銀朗，環境システム研究，Vol.18, 178-183, 1990
- 5) Balch W.B. et al., Microbial Reviews, Vol.43, No.2, 260-296, 1975
- 6) Bryant M.P., Journal of Clinical Nutrition, Vol.55, 1324-1328, 1972

（謝辞）

本研究を行なうに当たって、東北学院大学工学部学生（当時）越野純君と花山功君の尽力を得たことに感謝いたします。