

# II-547 汚濁湖沼底泥中のメタン生成細菌の 計数および分布特性

東北大学工学部 学生員○齋藤 均  
東北大学工学部 正 員 李 玉友  
東北大学工学部 正 員 野池達也

## 1. はじめに

近年、地球規模の環境問題に目が向けられるようになり、その代表的な例として、大気中の温室効果ガスの増加によってもたらされる地球温暖化問題が大きく取りあげられている。また温室効果ガスとしての $\text{CH}_4$ の寄与率は $\text{CO}_2$ の約40%にも達している。本研究は、地球温暖化に及ぼす微生物学的メタン生成の影響を検討するための第1歩として、重要なメタン発生源と思われる汚濁湖沼底泥からのメタン生成を解明する事を目指して、まず底泥にはどのくらいのメタン生成菌が存在するのかを調べるために、MPN法を用いて細菌の計数を行った。

## 2. 実験方法および対象湖沼

全メタン生成細菌計数用と酢酸酸化性メタン生成細菌計数用の二種類の培地において、炭素源としての基質濃度をそれぞれ、5.0、2.0、1.0、0.5 g/Lの四段階に変化させ、菌の計数をおこなう際の基質濃度と培養時間の影響を調べた。炭素源は全メタン生成菌用で、酢酸ナトリウム・ギ酸ナトリウム・メタノール・ $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ 混合ガスを、酢酸酸化性メタン生成菌用では酢酸ナトリウムを用いた。培地の組成は表-1に示した。また、培養は $36 \pm 1^\circ\text{C}$ のふ卵器によって行った。細菌の計数に用いたサンプルは、表-1に示す2つの閉鎖性湖沼の底泥から採取した。どちらも仙台市の市街地内にあるのだが、真美沢堤は生活雑排水の流入が認められ、かなり汚濁が進行しているのに対し、与兵衛沼の方は周囲を林に囲まれ、自然に近い状態が保たれている。

## 3. 実験結果

### ①対象とした湖沼の水質

それぞれの湖沼の水質特性は表-2のとおりである。ここで着目すべき点は、底泥の酸化還元電位、 $\text{COD}_\text{C}$ 値、底泥の強熱減量の違いである。真美沢堤は汚濁が進行しているだけに湖水中の $\text{COD}_\text{C}$ 値が高いが、底泥中の有機物量はさほど多くはない。しかし、底泥中の酸化還元電位は非常に低い値を示しており、嫌気性細菌が十分に生息できる環境となっている。これに対し、与兵衛沼は落葉や枯れ枝などの堆積により、底泥中の有機物量は多いが底泥の酸化還元電位はあまり低くない。この違いが、表-3に示した培養期間中に測定された最大の細菌数として現れている。

### ②メタン生成菌の計数に及ぼす基質濃度と培養時間の影響

培地濃度と培養時間に関するデータは図-1~4にまとめてある。このグラフによれば、どちらのサンプルにおいても基質濃度が比較的低い方に菌がより多く検出されている。もともとこの培地は、有機物濃度の高い嫌気性消化槽におけるメタン生成菌を計数するために検討されており、消化槽よりは遙かに有機物量の少ない湖沼底泥には、それに応じた培地濃度が必要である事がわかる。今回の実験においては、全メタン生成菌用で0.5 g/L、酢酸酸化性メタン生成菌用で1.0 g/Lの濃度が適当である事がわかった。また、培養時間においては、グラフの傾きおよびその他の研究報告<sup>1)</sup>と一致している事からみて、33日程度取れば十分であると思われる。

表-1 各種菌の計数に用いた培地の組成 (1Lあたり)

| 組成                       | 全メタン生成菌用                              | 酢酸酸化性メタン生成菌用           |
|--------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| 有機物濃度                    | 0.5~5.0g <sup>a)</sup>                | 0.5~5.0g <sup>a)</sup> |
| $\text{H}_2$             | 805 + $\text{CO}_2$ 205 <sup>b)</sup> | $\text{CO}_2$          |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$ | 0.4g                                  | 0.4g                   |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | 0.4g                                  | 0.4g                   |
| $\text{NH}_4\text{Cl}$   | 1.0g                                  | 1.0g                   |
| $\text{MgSO}_4$          | 0.1g                                  | 0.1g                   |
| ビタミン溶液 <sup>c)</sup>     | 10mL                                  | 10mL                   |
| ピタニン溶液 <sup>c)</sup>     | 10mL                                  | 10mL                   |
| Yeast extract            | 2.0g                                  | 0.2g                   |
| $\text{NaHCO}_3$         | 6.0g                                  | 6.0g                   |
| シスチン <sup>c)</sup>       | 0.5g                                  | 0.5g                   |
| レシチン <sup>c)</sup>       | 0.25g                                 | 0.25g                  |
| pH                       | 7.0~7.2                               | 7.0~7.2                |

- a). 有機物は、全メタン生成菌用で、酢酸ナトリウム・ギ酸ナトリウム・メタノールを、酢酸酸化性メタン生成菌用で、酢酸ナトリウムを各0.5、1.0、2.0、5.0g (メタノールはmL)の4段階に調整した。
- b). 気相組成を805 $\text{H}_2$  + 205 $\text{CO}_2$ で調整した後、2気圧で封入する。
- c). 各成分を高純度 $\text{CO}_2$ ガスで調整した後、1気圧で封入する。
- d). メタノール溶液の組成 (g/L) (蒸留水) :
- Nitrotriacetic acid, 4.5;  $\text{FeCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , 0.40;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.12;  $\text{Alk}(\text{SO}_3^-)$ , 0.01;  $\text{NaCl}$ , 1.00;  $\text{CaCl}_2$ , 0.02;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.01;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.10;  $\text{ZnCl}_2$ , 0.10;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.01;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.01;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.02.
- e). ビタミン溶液の組成 (mg/L 蒸留水) :
- Folic acid, 2; Pyridoxine hydrochloride, 10; Riboflavin, 5; Biotin, 2; Nicotinic acid, 5; DL-Calcium pantothenate, 5; Vitamin B12, 0.1; P-aminobenzoic acid, 5; Isoleucic acid, 5; Thiamine hydrochloride, 5;

表-2 対象湖沼の底泥および水質の特性

| 湖沼名  | 気温<br>( $^\circ\text{C}$ ) | 水温<br>( $^\circ\text{C}$ ) | pH   | ORP<br>(mV) | $\text{COD}_\text{C}$ (mg/L)<br>底泥 | I. L.<br>(%)      |
|------|----------------------------|----------------------------|------|-------------|------------------------------------|-------------------|
| 真美沢堤 | 13.9                       | 12.3                       | 6.79 | -107        | 31                                 | $2.5 \times 10^4$ |
| 与兵衛沼 | 13.4                       | 11.0                       | 7.44 | 2           | 17                                 | $4.2 \times 10^4$ |

ORP : 底泥の酸化還元電位  
I. L. : 底泥の強熱減量

表-3 MPN法で測定した  
湖沼底泥中のメタン生成細菌の菌数

| 湖沼名      | 真美沢堤<br>NPN/mL    | 与兵衛沼<br>NPN/mL    |
|----------|-------------------|-------------------|
| 培地の種類    |                   |                   |
| TM-5.0   | $1.4 \times 10^5$ | $1.1 \times 10^5$ |
| TM-2.0   | $8.4 \times 10^4$ | $3.4 \times 10^4$ |
| TM-1.0   | $1.7 \times 10^3$ | $2.2 \times 10^2$ |
| TM-0.5   | $3.5 \times 10^3$ | $2.7 \times 10^3$ |
| HACH-5.0 | $5.1 \times 10^4$ | $4.3 \times 10^2$ |
| HACH-2.0 | $1.7 \times 10^4$ | $3.3 \times 10^2$ |
| HACH-1.0 | $8.5 \times 10^4$ | $1.7 \times 10^3$ |
| HACH-0.5 | $2.8 \times 10^4$ | $4.2 \times 10^2$ |

TM : 全メタン生成菌計数用培地を表す  
HACH : 酢酸酸化性メタン生成菌計数用培地を表す  
数字は培地中の有機物濃度を示す

### ③湖沼の底泥におけるメタン生成菌の分布

真美沢堤の底泥中には、全メタン生成菌で  $10^5$ MPN/mL程度、酢酸資化性メタン生成菌で  $10^4$ MPN/mL程度が検出されており、この値は汚濁河川である多摩川の下流域で検出されたこの時期のメタン生成細菌の菌数に近い値<sup>2)</sup>である。一方、与兵衛沼においては全メタン生成菌および酢酸資化性メタン生成菌の双方で  $10^3$ MPN/mL程度と真美沢堤の値より1~2オーダーも低い値である。この違いは、底泥中でのメタン生成細菌の成育環境、特に酸化還元電位の違いによるものであると思われる。さらに真美沢堤の全メタン生成細菌の菌数と酢酸資化性メタン生成細菌の菌数を比較して、メタン生成菌の大部分(約70%)は酢酸資化性をもっていることがわかる。また、与兵衛沼の菌数のデータにおいて、全メタン生成菌の90%近くが酢酸資化性メタン生成菌である事がわかった。湖沼におけるメタン生成菌の中で、酢酸資化性のものが圧倒的に多いという結果は、Phelps and Zeikusの報告<sup>3)</sup>と一致している。

## 4. まとめ

①湖沼底泥のメタン生成菌のMPN法による計数において、培地中の有機物濃度は、全メタン生成菌用で0.5g/L、酢酸資化性メタン生成菌用で1.0g/Lが適当である事がわかった。また、培養時間は $36 \pm 1^\circ\text{C}$ において33日程度で十分である事がわかった。

②汚濁している湖沼の底泥において、 $10^5$ MPN/mLもメタン生成菌が計数されたのに対して、酸化還元電位が比較的高く、水質汚濁があまり進行していない湖沼の底泥においては、 $10^3$ MPN/mLのメタン生成菌が計数された。

③湖沼の底泥におけるメタン生成菌のうちで、酢酸資化性のものが圧倒的に多い。

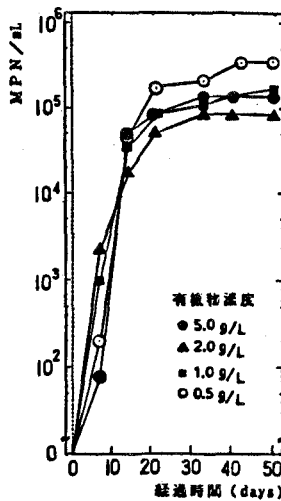


図-1 真美沢堤の全メタン生成細菌の菌数

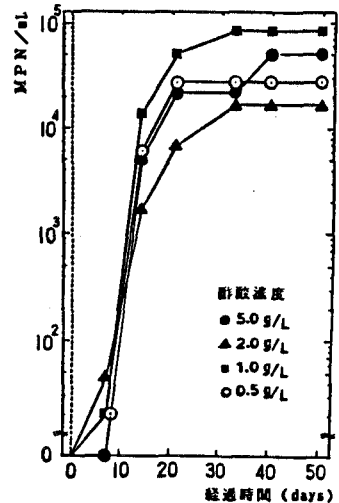


図-2 真美沢堤の酢酸資化性メタン生成細菌の菌数

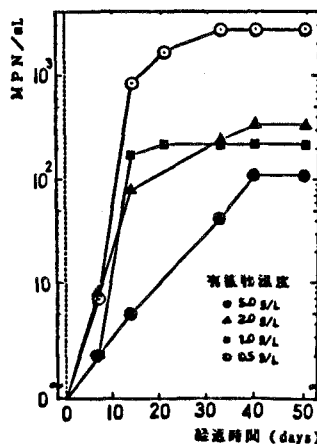


図-3 与兵衛沼の全メタン生成細菌の菌数

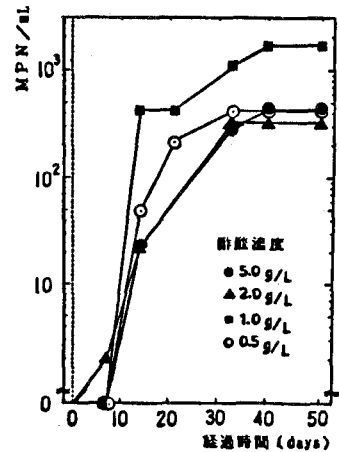


図-4 与兵衛沼の酢酸資化性メタン生成細菌の菌数

### 参考文献:

- 1)Yuyou LI and Tatsuya NOIKE (1989) 水質汚濁研究 Vol.12, No.12, pp771-780
- 2)Susumu TAKII (1989) The Japanese Journal of Limnology Vol.50, No.3, pp235-246
- 3)T.J.Phelps and J.G.Zeikus (1984) Applied and Environmental Microbiology Vol.48, pp1088-1095