

## 大深度地下の水溶性ガス田におけるメタン生成菌群の多様性と バイオマス量の解析

大成建設（株）                    正会員    ○天石 文  
 タックコンサルタント                    沖田 紀子  
 大成建設（株）                    正会員    帆秋 利洋

### 1. 目的

我が国には北海道，千葉，新潟をはじめとして大深度地下に天然ガス田が存在し，一部商業生産が行われている．その中でも千葉県を中心とした南関東ガス田は可採埋蔵量 3750 億 m<sup>3</sup> にも達する我が国最大のガス田であり，茨城，埼玉，東京，神奈川県下の広大な地域に分布している．エネルギー資源の乏しい我が国においては，この地下に賦存するメタンは貴重なエネルギー資源と言える．しかしながら，最近報じられた東京都内の温泉掘削時に生じた爆発事故や，地盤沈下の問題等を抱えており，地下の水溶性メタンを直接利用するためには，様々な技術的解決策が要求されている．一方で東シナ海ガス田問題に代表されるように，日本領土内での未知のガス田賦存域の特定や，その埋蔵量の調査も急務の課題である．

メタンの生成は，熱起源説と生物起源説が提唱されているが，この南関東ガス田は安定同位対比等の解析結果から，生物起源であると考えられている．しかしながらそのメタンの成因に関する知見は現在のところ皆無である．本研究では，地下の水溶性メタンガスの生成メカニズムを探るため，千葉県茂原市のガス田を対象にメタンガス生成の主要部分を担っているメタン生成菌を中心とした各種微生物群集の棲息状況の実態について解析を行った結果について報告する．

### 2. 実験方法

#### 2.1 地下土壌試料

2002 年 11 月に千葉県茂原の関東天然瓦斯開発（株）の陸上ガス田開発サイトより試料を採取した．微生物調査の試料は既に稼働中のガス生産井において，地下水（かん水）と共に地上に汲み上げられた地下土壌（スラッジ）を用いた．スラッジはシルト状であり，かん水は古海水とも呼ばれるように，硫酸塩濃度が低く（約 10ppm），高濃度のヨウ素（約 140ppm）を含む以外は海水とほぼ同じ組成であった．

#### 2.2 全菌数及び生菌数の調査

スラッジ中に棲息する全菌数の計数を行った．グルタルアルデヒドで固定したスラッジを DAPI で染色し，落射蛍光顕微鏡により微生物細胞を計数した．生菌数計測はメタン生成菌と硫酸還元細菌について MPN（3 本法）により行った．メタン生成菌の培養は水素及び酢酸塩を基質とし，硫酸還元細菌は水素，酢酸塩，乳酸塩をそれぞれ電子供与体として添加した培地を用いた．なお，培養温度は試料採取地点とほぼ同じ 20℃ とし，約 1 ヶ月間静置培養を行った．各培養における対象微生物の増殖の確認に関して，メタン生成菌はガスクロマトグラフィーによるメタンガス生成の有無及びメタン生成菌の持つ補酵素 F<sub>420</sub> による青緑色の自家蛍光の観察により，また硫酸還元細菌はイオンクロマトグラフィーによる培地中の硫酸塩の減少により確認した．

#### 2.3 16S rDNA クローニング解析

地下土壌中におけるメタン生成菌の多様性解析を行うため，メタン生成菌を含む古細菌を対象とした 16S rDNA クローニング解析を行った．まず，微生物解析調査における PCR 条件のバイアスを可能な限り排除して実態を把握するため，プライマーセットによって検出されるメタン生成菌の検出感度について，実際のスラッジ試料を対象に事前検討を行った．用いたプライマーセットは古細菌の 16S rDNA を特異的に増幅する以下のセットである：Arch21f/U1492r，PRA46f/U1492r，PRA46f/PREA1100r，ARC344f/U1492r．スラッジ試料より

キーワード 陸上天然メタンガス田，メタン生成菌，16S rDNA 解析

連絡先 〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設（株）技術センター TEL045-814-7226

抽出した DNA を鋳型として、各プライマーセットを用いて PCR 増幅を行った。PCR 増幅産物は精製した後、TA Cloning kit を用いてプラスミド中に結合させ、*Escherichia coli* 細胞中へ形質転換した。アンピシリンを含む LB 寒天培地上で形質転換体の選別を行い、M13 プライマーで PCR 増幅を行うことにより挿入した配列を得た。得られた古細菌の 16S rDNA 部分配列のシーケンシングを行い、系統解析を行った。この事前検討結果より、最も検出感度が高かった A109f/U1492r のプライマーセットについて、更に詳細なクローン解析を行った。

### 3. 結果

#### 3.1 全菌数及び生菌数

スラッジ試料の全菌数は  $5.0 \times 10^7$  cells/g であり、生菌数は、メタン生成菌が水素基質で  $9.3 \times 10^5$  cells/g、酢酸塩基質で  $4.3 \times 10^5$  cells/g であった。これに対し硫酸還元細菌は、 $10^1$  から  $10^2$  cells/g のオーダーで計数されたのみであった。地下ガス田環境中において、メタン生成菌は硫酸還元菌と比較しておよそ 10,000 倍の高密度で生息していることが明らかとなった。

#### 3.2 16S rDNA によるメタン生成菌の多様性解析

PCR に用いるプライマーセットの違いによる検出クロンの比較検討実験では、使用した全てのプライマーセットで *Methanospirillaceae* 及び *Methanosaetaceae* のクロンが検出された。しかしながら、*Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* 及び未知のクロンクラスターの存在も、プライマーの組み合わせ検討の結果によって明らかとなった。古細菌を対象としたユニバーサルプライマーであっても、プライマーの種類やフォワードとリバースの組み合わせによって検出感度が異なるため、解析対象となる試料に適した条件で、より正確に実在する微生物の多様性解析を行うことが重要であることが明らかとなった。

クローニング解析によってスラッジ試料から多様な古細菌グループに属する DNA が検出され、これらは *Methanospirillum*, *Methanothermobacter*, *Methanosaeta* 及び未知のクロンクラスターの 4 つのグループに大別することができた。*Methanospirillum* 及び *Methanothermobacter* は水素を、*Methanosaeta* は酢酸塩を主要な基質とするメタン生成菌のグループである。もう 1 つのグループとして分類された未知のクロンクラスターは、排水堆積物や地下石油備蓄基地の石油汚染地下水などから検出されたクロン<sup>1)</sup>を含んでおり、多くの未培養のクロンから構成される、既知のメタン生成菌とは完全に離れて独立したクラスターを形成していた。

### 4. 考察

今回の調査では、培養により検出可能なメタン生成菌が全菌数に対して 1~2% の割合で検出された。同時に調査した硫酸還元細菌と比較して高密度で検出され、また海水と同程度 ( $\text{Na}^+$  0.44 M) の塩濃度であるかん水中に生息していたことから、遺伝子解析の結果と併せて、新規のメタン生成菌を含む特殊な微生物群集構造を形成している可能性が示唆された。なお、これらの微生物が今現在も尚、大深度地下環境においてメタンを生成し続けているものと推察された。

一方、茂原のガス田の地下かん水中より回収される水溶性天然ガスは、約 99% がメタンガスである。本数値は酢酸資化性メタン生成菌が生成するメタンと等量生成するはずの炭酸ガス量の存在比率が極めて小さいため、酢酸資化性メタン生成菌数が少ないことが予想された。しかしながら培養による生菌数の調査結果からは、酢酸資化性メタン生成菌が水素資化性メタン生成菌と同程度の密度で地下環境に棲息していることが推察された。本現象の原因解析は今後の検討課題であると同時に、地下ガス層にはメタン生成菌が利用可能な多様な物質が存在することが考えられ、今後スラッジやかん水中の有機物組成の分析や、メタン生成菌の利用可能な有機物を生成する従属栄養細菌の調査を継続していく予定である。

なお、本研究はメタンハイドレートプロジェクト資源量評価「メタンの生成・集積に関する微生物学的研究」の一環として実施したものである。

### 参考文献

1) Watanabe, K. et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol.68, p.3899-3907,200.