

VII-54

伊豆沼の試料より集積培養したメタン酸化細菌のメタン酸化能力に関する研究

東北学院大学大学院 学生会員 ○小野寺 健二
 東北学院大学工学部 嶋田 秀一
 東北学院大学工学部 藤田 亮
 東北学院大学工学部 正 会 員 遠藤 銀朗

1. はじめに

地球温暖化の原因としていくつかの温室効果ガス放出量の増加が挙げられるが、植生等の生物生態系を利用してそうしたガスを吸収させ、これを抑制しようとする研究は、主に二酸化炭素が対象としてなされている。しかしメタンに関しても、二酸化炭素に次いで重要視されなければならない温室効果ガスであることが、これまでの研究で明らかにされてきており、この削減方法についての研究も重要であると考えられる。日本においては、人為的有機物汚染を受けている湿地が多く存在しており、水田からのメタン発生も去さることながら、そのような湿地からのメタンの発生はかなりの量になっていると考えられている。そこで本研究では、ラムサール条約登録地で渡り鳥の飛来地として世界的に有名な宮城県築館町・若柳町・迫町に位置する伊豆沼を対象湿地とし、採取した底泥からメタン酸化細菌の集積培養を行い、メタン酸化速度やメタン酸化能力の増強効率についても調査した。これらの研究の結果を地球温暖化低減策としての湿地におけるメタン酸化細菌の導入技術の開発の展望について展望した。

2. 実験及び分析方法

2.1 実験方法

実施した実験項目は以下の通りである。

- 1) 現地からのサンプル採取（98年9月26日採取）
- 2) メタン酸化細菌の培養のための液体培地の作成と集積培養、菌体重量の測定
- 3) 固体培地の作成と分離培養
- 4) 液体培養によって培養したメタン酸化細菌の泥への導入（嫌気ジャー実験）、メタン酸化速度係数の決定
- 5) TCD ガスクロマトグラフによるガス成分（メタン、二酸化炭素等）の分析

2.2 泥サンプル採取状況

周辺湿地において、現地調査ではマコモ原・アシ原においてスコップで地面から 30 cm までの泥 300~600 g 程度採取した。さらに湖内植生（無植生・ショウブ・ハス）での泥採取は、ゴムボートで植生のある場所まで行き、採泥機を用い沼底から 30 cm までの泥を 300~600 g 程度採取した。

2.3 培養方法

①集積培養法

700 ml バイアル瓶に液体培地を 100 ml 入れ、この中に伊豆沼より採取した底泥 5 g を入れてゴム栓をする。

メタン酸化の化学式 $\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

をふまえた上での割合でガスを注入するのが理想といえるが、瓶内にヘッドスペースがあるため、この中の酸素が十分であると考えてメタンガスのみを始めに注入する。60 ml・120 ml・180 ml と注入するメタンガス量を変えて、その後のメタンの減少を調べた。液体培地と泥を入れたバイアル瓶にガスを注入し、1 週間毎にガスクロマトグラフ（TCD）によるビン内におけるメタンガス濃度の観察を行う。この時ガスは完全に入れ替える。

振とう機は、100rpm（1/min）・25℃で振とう培養を行う。なお、ガス注入の際には滅菌フィルターを用いる。

4~5 週間この測定を繰り返し、これに集積培養したメタン酸化細菌を 1 ml 植菌する。この実験では、メタン 60 ml の注入の実験において 1 週間後に完全に削減されるという結果が得られたため、1 日毎の実験も行って見た。この場合は、入れ替えは行わず前もって作成していた複数のバイアル瓶培地を 1 日 1 本サンプルとして使用する形式とした。また、5 週間後の培地はろ紙により菌体量の測定等も行った。これは、液体培地 5 ml をろ過するというものである。

②分離培養法

分離培養方法は、まず生理食塩水 0.8% を 10 ml ずつ試験管に入れ、20 本用意する。さらに寒天により固めてある固体培地をシャーレに用意し、生理食塩水で 10^{-1} ~ 10^{-5} まで希釈し、 10^{-3} と 10^{-5} の菌株をシャーレに植菌する。これらの作業はクリーンベンチ内において行った。植菌の終了後はこれらのシャーレを空気が入った嫌気ジャー内に入れ、メタンを 80 ml 入れた後、25℃に保たれたインキュベーターに入れ、約 3 日毎にコロニー増加数を調べた。

③液体培養によって培養した細菌の泥への導入：嫌気ジャー実験

液体培養により培養された培地を各泥（ハス、マコモ、ヨシ）に植え、メタンの酸化の様子をガス削減量（TCD測定による）により調査する。

集積培養したメタン酸化細菌を、実際の伊豆沼の土に直接植菌し、嫌気ジャーの中にメタンと植菌した土、空気を入れて 25 度で静置した。これによって導入したメタン酸化細菌はメタンを確実に削減できるかどうか、またどのくらいの速度で削減するのかを調べることとした。実験手順は以下の通りである。

1. 泥 50 g に集積培養したメタン酸化細菌 10 ml を加え、メタン：空気=1：10 の比率で嫌気ジャーに入れる。
2. TCD ガスクロでメタン濃度を測定する。
3. 泥の種類を各 3 通りとし、メタン酸化細菌を導入しなかったものを含めて、計 6 通り行う。
4. 得られたデータをもとにメタン酸化速度係数を求める。

3. 調査結果の一例

ここでは、調査結果の一例として嫌気ジャー実験のマコモ原の泥における実験結果を下の図 1 と図 2 に示した。図 1 は泥のみで培養したもので、図 2 はマコモ原からの泥に集積培養 4 回行った培地（これもマコモ原の泥から培養した）を培地 10 ml 植菌したものである。

これにより、泥のみと泥にメタン酸化細菌を導入した場合とでどのような違いを調べた。

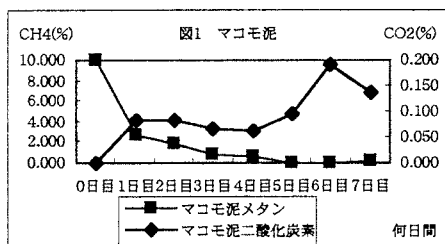


図1.マコモ泥にメタン酸化細菌を導入しない場合のCH₄酸化とCO₂発生

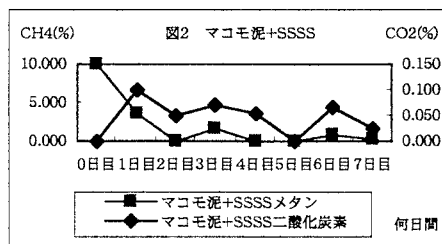


図2.マコモ泥にメタン酸化細菌を導入した場合のCH₄酸化とCO₂発生

4. 考察および結論

集積培養において、まずハスを実験例として挙げるが、この実験結果からわかった事は、メタンが削減されるとともに二酸化炭素が発生するということがいえた。次に、ガス量の変動から見てハスの泥での培養は 0～1 週間の間が最もさかんに菌が繁殖し、ハス S での培養は 1～2 週間の間がさかんである事が分かった。

メタンの量、または液体培地の量を変えていろんな角度からメタンの削減量を調べてみた。その結果、気づいたことは、1 週間あれば、60 ml のメタンをメタン酸化細菌は削減してしまうことである。液体培地の量を 100 ml と 80 ml の二つを用意してメタン削減量を調べたが、これは、液体培地が多い方が削減することが分かった。他には、全体的に細菌の増殖は 2 日から 2 週間の間がピークであると考えられる。

固体培養実験についてメタン酸化細菌の増殖速度について調査実験を行ったが、コロニー数について調べた結果、10⁻³ に希釈した場合、10⁻⁵ に希釈した場合よりもコロニーの形成が早く成されるということが確認できた。実験結果から、10⁻³ 倍に希釈した試料を用いて最大コロニー形成が得られた約 6 日後に 10⁻⁵ に希釈した試料からのコロニー形成が増殖数のピークをむかえる傾向にあることがわかった。

それ以降のコロニー数・増殖数に関しては、コロニー自体の測定が過大となり測定が不可能な状態になってしまったものであり、その原因としてはメタン酸化細菌の代謝産物を栄養とする細菌や藻類等の増殖が考えられた。

増殖測定実験においては、日にちが経つごとにメタン酸化細菌が確実に増えていることが確認された。増殖のスピードはマコモ、ハスの違いはほとんど観られなかった。次に PH 実験においては、実験開始時の PH から 4 日目まで下がりその後、6.88 にまで達するとそれより下にはならなかった。これもマコモ、ハスの双方の土壌より集積したメタン酸化細菌についていえることだった。よってメタン酸化細菌は、PH が 6.88 の時が 1 番増殖しやすい環境であると考えられる。

この菌体重量・PH・TCD 測定による実験はメタン酸化細菌の増殖状況を調べる為に始めた実験であった。その中で気になる疑問点がでてきた。それはメタン酸化細菌は順調にほぼ直線的に増殖していったが、メタンの減少はメタン酸化細菌の増殖とは比例せず、初期に減少の遅れが見られたことである。このメタン酸化細菌の増殖とメタンの削減の時間差、タイムラグはなぜ起こるのだろうか。メタン酸化細菌は増殖の際にメタンの削減能力が落ちるのだろうか。または細菌はメタンの削減能力を最大限に発揮できる菌体密度の状態というのがあるのだろうか。今後の研究において、このメタン酸化細菌の増殖とメタン削減量の関係を調べていく必要があると考える。