

# 捕食圧がメタン酸化細菌に与える影響に関する基礎的検討

東北大学工学部 学生会員	○橋戸 駿
東北大学大学院工学研究科 正会員	藤林 恵
東北大学工学部・工学研究科 正会員	丸尾 知佳子
東北大学工学部・工学研究科	田中 伸幸
東北大学大学院工学研究科	白川 百合恵
東北大学大学院工学研究科 正会員	西村 修

## 1 はじめに

現在、地球温暖化は大きな環境問題となっており、原因となる温室効果ガスの削減対策が急務となっている。

メタンも温室効果ガスの一つである。

メタンは嫌気的な環境下でメタン生成細菌による有機物分解などに伴って生成されるが、生成されたメタンは好気的な環境下でメタン酸化細菌 (MOB) によって二酸化炭素に酸化されることが知られている。例えばメタンが大量に生成されている水田や湿地などでは、生成されたメタンの 30~99% が MOB によって消費されており<sup>1)</sup>、放出されるメタンの抑制に大きく寄与している。

これらのことから、MOB のメタン酸化活性の変化が、放出されるメタン量に影響を与えていることは明らかであり、放出量を抑制する観点から重要である MOB のメタン酸化活性に影響を与える因子について、共生細菌<sup>2)</sup>、pH、温度条件<sup>3)</sup>などが調べられてきた。しかし、MOB に対する動物による捕食が、MOB のメタン酸化活性に与える影響に関する知見はない。既往の研究においては硝化細菌が捕食圧を受けることで活性化し、硝化能が高まることが知られており<sup>4)</sup>、MOB においても適度な捕食圧がかかる条件化でメタン酸化活性が高まっている可能性がある。

そこで本研究では、真核生物のたんぱく質合成を阻害するシクロヘキシミドを添加して MOB 捕食者である原生動物の密度を数段階に変化させた活性汚泥を用いて、捕食圧がメタン酸化活性に与える影響を、リアクター実験によって調べた。

## 2 方法

### (1) 実験系

宮城県内の下水処理場で採取し、実験室にて培養している活性汚泥を用いて処理場のリアクターを模擬した実験系を作成した。500ml 三角フラスコに 300ml の活性

汚泥を入れて、栓をしたまま 20°C に保ったインキュベーターで培養し、外部の空気と接触しないようにした。栓には空気の流入口と流出口があり、流入口からは酸素濃度 8.9% の気体を実験期間中流入させ、汚泥を曝気させた状態を保った。活性汚泥はシェーカー (TAITEC R-20mini) で、常に回転速度 120 回/分で攪拌した。これにより、汚泥の溶存酸素濃度を 2.4mg/l に保ち、微好気性状態を維持した。pH は 6.8~7.0 程度を維持した。実験期間中、一日一回、活性汚泥に人工排水 (45  $\mu$  l /300ml) を与えた。

実験系は 6 系作成し、それぞれの系にシクロヘキシミドを 4, 1, 0.5, 0.1, 0.05mg/l となるように添加した。また、対照系としてシクロヘキシミドを添加しない系も用意した。実験は 4 日間行い、各系における MOB 現存量、原生動物現存量、メタン放出量を毎日測定した。

### (2) 測定項目

#### i) 脂肪酸分析

MOB には他の生物が持っていない特殊な脂肪酸、16:1n8, 16:1n5 が含まれている<sup>5)</sup>ことが知られている。本研究では MOB 現存量の指標として脂肪酸を利用した。脂肪酸の抽出、誘導体化には One-step method を用いた。はじめに、遠沈管に凍結乾燥した活性汚泥に、ヘキサン 4ml, BF<sub>3</sub> メタノール 2ml を入れ、温度条件 100°C、反応時間を 2 時間としてウォーターバス内で反応させた。室温で冷却後、ヘキサン 1ml, 純粋 2ml を入れよく攪拌した後、遠心分離器を用いてヘキサン層を回収した。この回収した脂肪酸を含むヘキサンをキャピタリーカラム (Agilent 社, SelectFAME, 0.25mm, 100m) を装填したガスクロマトグラフィーで分析した。分析条件は 150°C 5min, 150-230°C/min, 230°C 10min, 230-250°C-4°C/min の昇温プログラムで、キャリアーガスにはヘリウムを用いた。標準物質としてスペルコ社製の spelco37, bacteri

keywords: メタン酸化細菌, 活性汚泥, シクロヘキシミド, 食物連鎖, 脂肪酸

連絡先: 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06 東北大学工学部 建築・社会環境工学科 環境生態工学研究室  
TEL:022-795-7473 FAX:022-795-7471

FA,PUFA-3,i17:0,a17:0 を用いてリテンションタイムから脂肪酸の同定を行った。MOB の指標である 16:1n8, 16:1n5 はガスクロ質量分析計を用いて同定を行い、炭素数と二重結合の数から、これらの脂肪酸を推定した。

ii) 原生動物の測定

測定は一日一回行った。クリーンベンチにて、あらかじめよく攪拌した各系から 300 マイクロリットルを三回ずつ採取し、滅菌シャーレに移した。その後、マイクロピペット (200 μ l) を使い、50 μ l を界線格子線入りスライドガラスに写し、24×18mmカバーガラスで覆った。そして、顕微鏡 (ZEISS Primo Star) で原生動物数をカウントした。カウントは主に繊毛虫、鞭毛虫に注目して行った。

iii) メタン濃度の測定

各フラスコの流出管でガスを採取し、0.5ml を GC-FID (SHIMADZU GC-14B) で分析した。カラムは (Molecular Sive13X 60-80 E-6962) を使用し、検出器, 注入口, カラムの温度をそれぞれ 120°C, 100°C, 80°C に設定して分析を行い、メタン濃度の測定を行った。

3. 結果と考察

実験に使用した活性汚泥の脂肪酸組成を解析した結果、細菌に由来するバイオマーカー脂肪酸が、全脂肪酸の約半数を占めていた。また、MOB に由来する脂肪酸も 3% ほど検出され、活性汚泥内に MOB が存在していることが示された。実験開始前のフラスコ流出管で採取されたガスのメタン濃度は 3.3ppm であった。一般的に大気のメタン濃度は 1.9ppm であることが知られている。本実験では窒素で約 2 倍に希釈した大気を流入させており、フラスコ内でメタンの放出が起っていることが確認された。

次に各系における原生動物個体数の経時変化を図 1 に、実験 4 日目における各系の原生動物の内訳を図 2 に示す。原生動物の密度は、1mg/l, 4mg/l の実験系では他の系に比べて初期に減少が見られた。

実験期間を通して、汚泥内で確認された原生動物のほとんどは、鞭毛虫類と繊毛虫類であった。実験最終日の単位体積あたりの組成は、薬剤添加濃度が高い系 (4mg/l,1mg/l) で鞭毛虫の割合が低下していることが図 2 より読み取れる。

これらの結果により、シクロヘキシミドの濃度を変えて原生動物の増殖を阻害することで、汚泥内での生態系を変化させることができ、MOB が受ける捕食圧が異なる

実験系を作成できている可能性が示された。

今後、MOB の捕食者となる原生動物を継続して制御しながら、MOB 特有の脂肪酸 (16:1n8, 16:1n5) によりのその増減を追うとともに、リアクターにおけるメタン酸化活性を測定し、その関係性から MOB が受ける捕食圧の違いによるメタン酸化活性の変化を解析する予定である。

参考文献

1) Bastviken, D ら 2009 Encyclopedia of Inland Waters. Elsevier, pp. 783-805  
 2) Hiroyuki Iguchi ら 2011 APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, pp. 8509-8515 Vol. 77, No. 24  
 3) G. M. KING ら 1992 APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, pp. 2758-2763 Vol. 58  
 4) 李先寧 ら 2000 環境工学研究論文集, 37, pp. 41-49  
 5) Nichols, P.D. ら 1985 FEMS Microbiol Ecol 31, 327-335

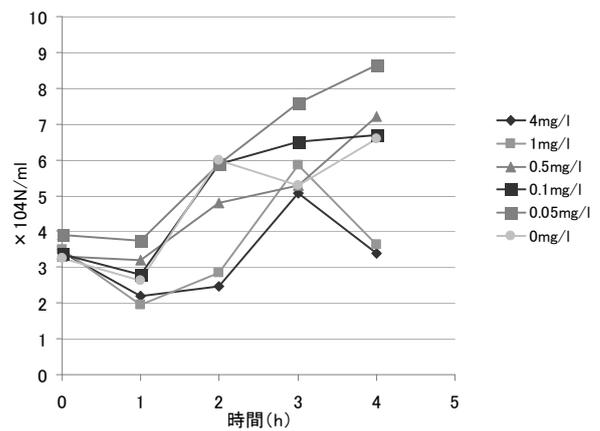


図 1 各系での原生動物生息密度推移

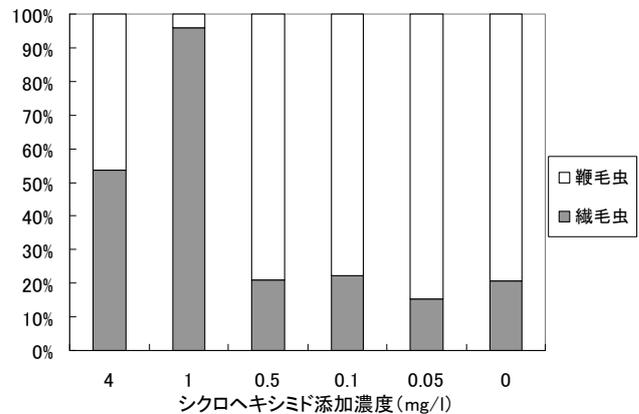


図 2 実験最終日における各系の鞭毛虫、繊毛虫の存在比