

多様なメタン酸化細菌の優占種と環境

広島大学大学院 学生会員 ○新野 貴大
学生会員 松浦 哲久
正会員 金田一智規
正会員 尾崎 則篤
正会員 大橋 晶良

1. はじめに

メタンは、鉱山や森林土壌、水田、活性汚泥、埋立地など、地球上の至る所で発生しており、二酸化炭素の20倍以上の温室効果を持つガスである。そのため、地球温暖化の進行を防ぐにあたってメタン放散の削減が重要視されており、その手段の一つとしてメタン酸化細菌による酸化分解が注目されている。

メタン酸化細菌は多様な細菌群であり、分類学的に *Gamma-proteobacteria* に属する Type I メタン酸化細菌と *Alpha-proteobacteria* に属する Type II メタン酸化細菌に大別される。この2種類のメタン酸化細菌については、古くから優占種と環境因子との関係が調査され、Type I メタン酸化細菌は低いメタン濃度・高い酸素濃度を好み、Type II メタン酸化細菌は高いメタン濃度・低い酸素濃度を好むことが通説となっている⁽¹⁾。

しかし、近年、メタン削減型のバイオリアクターでのメタン酸化細菌のコミュニティ調査が盛んに行なわれるようになり、それらのデータは、通説通りの結果でないことが多い⁽²⁾⁽³⁾。そのため、改めてメタン酸化細菌の優占種に関わる環境因子について整理し、メタン酸化細菌の生態を把握する必要がある。

メタン酸化細菌の多様性について整理することができれば、これを用いた工学的な分野への応用も期待される。例えば、メタンハイドレート採掘現場や埋め立て地等のメタン発生源のメタン酸化細菌を調べることで、その環境に関する指標を網羅的に得ることができるようになると考えられる。

そこで本研究では、メタン酸化細菌をメタン・酸素・pH についてそれぞれ異なる環境条件で培養し、どのような環境下でどの種のメタン酸化細菌が優占化するかについての知見を得るとともに、既往の研究と比較することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 メタン酸化細菌の培養とサンプリング

スポンジを微生物保持担体とした Down-flow hanging sponge(DHS)リアクターを用いて、メタン酸化細菌の連続培養を行った(Fig.1)。Run1 は、メタン濃度 10%、酸素濃度 20%、pH7 とし、Run2 は低メタン濃度 0.1%、Run3 は低酸素 2%、Run4 は pH4、Run5 は pH5、Run6 は pH6 の環境下でメタン酸化細菌を培養した (Table 1)。

培養開始後、各 Run においてメタン消費速度が上昇し、メタン酸化速度が定常になったところで運転を終了し、バイオマスのサンプリングを行った。サンプリングでは、スポンジに付着したバイオマスを採取し、後述の FISH 法による観察のために、パラホルムアルデヒドを用いて細胞の固定を行った。

2.2 FISH 法による観察

メタン酸化細菌の優占化の判断には、細菌の遺伝子を蛍光標識で染め分ける Fluorescence in situ hybridization(FISH)法を用いて、Type I と Type II のどちらが優占化しているかを蛍光顕微鏡で観察した。細菌を蛍光標識するためのプローブは、真正細菌を網羅的にターゲットとする EUB 338 mix に加え、Type I にターゲットの M γ 705、Type II には M α 450 を使い、ホルムアミド(FA)濃度はそれぞれ 15%、20%とし、ハイブリダイゼーションは 46℃で行った(Table 2)。

3. 実験結果および考察

3.1 メタン濃度および酸素濃度の影響

Run1~4 において、FISH 法によるメタン酸化細菌の優占種の観察

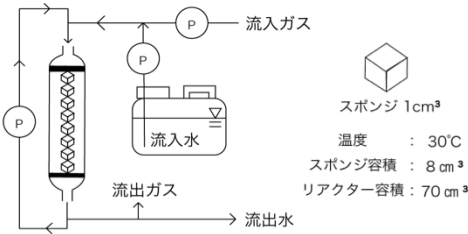


Fig. 1 DHS リアクター概略図

Table 1 培養条件

	CH ₄	O ₂	pH
Run1	10%	20%	7
Run2	0.1%	20%	7
Run3	10%	2%	7
Run4	10%	20%	4
Run5	10%	20%	5
Run6	10%	20%	6

Table 2 FISH 法に用いたプローブ

Probe name	Sequence(5'-3')	FA(%)
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	15 or 20
EUB338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	
EUB338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	
EUB338 IV	GCAGCCTCCCGTAGGAGT	
M γ 705	CTGGTGTTCCTTCAGATC	15
M α 450	ATCCAGGATACCGTCATTATC	20

を行ったところ、Run1~3 ではメタンや酸素濃度に関わらず Type I メタン酸化細菌が優占化した。一方、pH を変化させた Run4 では、メタン酸化細菌の優占種が Type II に変化した(Fig. 2, Table 3)。

Run1 の条件は、既往の研究で Type I メタン酸化細菌が優占化することが示されており⁽²⁾、この実験条件においても Type I メタン酸化細菌が優占化した。

Run2 の条件は、Type I のメタン酸化細菌が優占化すると報告されており、本研究でも通説通りであった。

Run3 の条件は、Type II のメタン酸化細菌が優占化すると報告されているが、本研究では Type I が優占化していた(Fig.3)。このようになった原因として、温度、窒素源、微量元素等の影響があげられる。

pH4 の環境では、Type I メタン酸化細菌でも低 pH で生育出来る細菌が存在するものの、Type II メタン酸化細菌が優占化した。

Run1~3 で優占化した菌の形状や大きさがそれぞれ異なることから、同じ Type I の中でも違うメタン酸化細菌の種が優占化したことが示唆されたことから、メタン酸化細菌の種の推定が今後の課題である。

3.2 pH の影響

先述の培養において、メタン酸化細菌の優占化には pH が大きな影響を及ぼしていることが示唆された。そのため、より細かい pH の影響を観察することを目的として Run5・6 を運転し、メタン及び酸素濃度の同じ条件である Run1 及び Run4 と比較した。

pH5 の環境では、pH4 で優占化した Type II と、Type I の両方が混在していた。

pH6 の環境になると、低 pH 環境下において存在していた Type II が確認されなかった一方、Type I が優占化していた。

pH7 の環境は、先述の Run1 の培養条件であり、pH6 の場合と同様に Type I が優占化していた。

酸性土壌のメタン酸化細菌のコミュニティ解析では、Type II メタン酸化細菌が優占化していることから⁽³⁾、酸性環境下では、Type II メタン酸化細菌が優占化するのかもしれない。

また、pH が変化しても、メタン・酸素濃度の条件が同じであれば、メタン消費速度は大きく変化しないことも分かった(Fig.4)。それぞれの pH に適応して活動するメタン酸化細菌が存在することが示唆される。

4. まとめ

メタン酸化細菌を培養した結果、pH7 の条件では、メタンや酸素濃度に関わらず Type I が優占化した。また、pH が下がるにつれて優占種が Type I から Type II へと変化することが観察された。このことから、メタン酸化細菌のコミュニティに対して、メタン・酸素・pH の因子の中では pH が最も大きな影響を及ぼすことが分かった。

参考文献

(1)Amaral et al., 1995, *FEMS Microbiology Ecology*, 18, 289-298
(2)Hatamoto et al., 2010, *Water Research*, 44(5), 1409-1418
(3)Radajewski et al., 2002, *Microbiology*, 148(8), 2331-2342

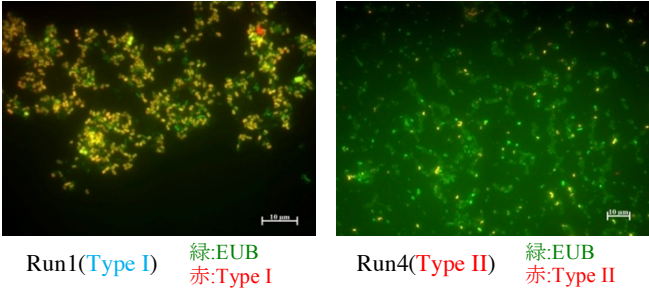


Fig. 2 FISH 法による観察結果の例

Table 3 メタン酸化細菌の培養結果

	Run1	Run2	Run3	Run4	Run5	Run6
CH ₄	10	0.1	10	10	10	10
O ₂	20	20	2	20	20	20
pH	7	7	7	4	5	6
Mγ 705 (Type I)	○	○	○	×	○	○
Mα 450 (Type II)	×	×	×	○	○	×
メタン消費速度 (g/L/day)	7.37	0.19	3.85	6.79	8.27	7.97
培養日数	23	69	35	28	24	17

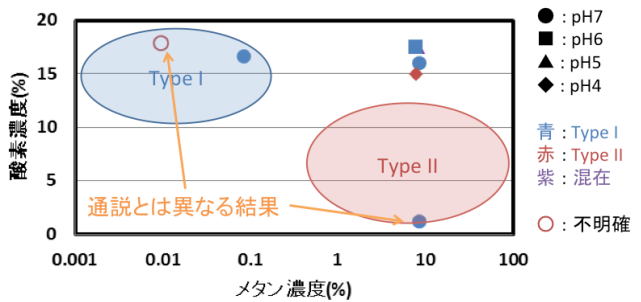


Fig. 3 メタン・酸素濃度と優占種の関係

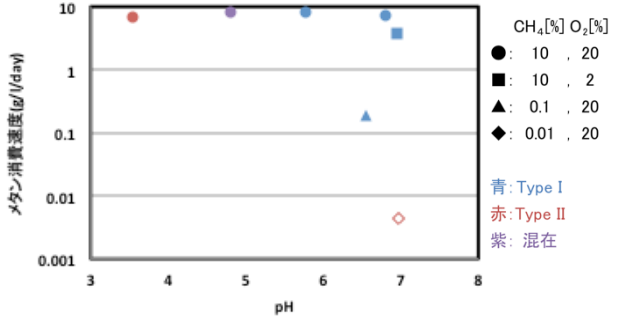


Fig. 4 pH とメタン消費速度及び優占種