

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380179

研究課題名(和文) 海洋域におけるメタン生成に関する研究

研究課題名(英文) Studies on methane fermentation in coastal area

研究代表者

澤山 茂樹 (SAWAYAMA, Shigeki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80357178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円、(間接経費) 4,170,000円

研究成果の概要(和文)：若狭湾底泥に、トリメチルアミンや硫化ジメチルを基質として添加した場合、比較的多くのメタンが生成し、その他の基質を添加した場合メタン生成量は少ないことが分かった。トリメチルアミンを加えると、Methanococoides属メタン生成菌クローンの増加が認められた。これらの結果から、メチル化合物資化性メタン生成菌が、沿岸域底泥のメタン生成に関与していることが考えられる。さらに、微細藻類からのメタン生成について研究を実施し、基質とした微細藻類種によってメタン生成ポテンシャルが異なることを見出した。本研究により、微細藻類ブルーム発生時に、海底泥からメタンが生成している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：While methane production was not observed in the control Wakasa bay sediment (Japan) without substrate addition, methane production was drastically enhanced by adding trimethylamine (TMA), significantly increased by adding dimethyl sulfide (DMS) and slightly increased by acetate. After incubation with TMA, relative abundance of Methanococoides-affiliated clones was drastically increased. Methylotrophic methanogens might have an important role for methane production cycle in coastal marine sediments. Following the addition of 11 different types of microalgal cells to coastal marine Maizuru Bay sediment, the highest methane production was recognized from sediment containing the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. These results indicate that the Maizuru Bay coastal marine sediment has potential for methanogenic activity and that microalgal cell addition to coastal sediments leads to methane fermentation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：メタン 地球温暖化 水質汚染

1. 研究開始当初の背景

化石燃料の大量使用に伴い発生する二酸化炭素により、大気中の二酸化炭素濃度が上昇し、地球温暖化を促進していると考えられている。一方、メタンは二酸化炭素の約21倍の温室効果を持つ気体で、水田や家畜起源の発生が地球温暖化に影響することが指摘されている。メタンの主な生成源は、古細菌に属するメタン生成微生物であり、メタン生成菌は絶対嫌気性を要求することから、もっぱら嫌気的な環境でメタンが生成すると考えられている。底泥などの海洋環境は、陸上に比べ大気からの酸素の供給が少ないため嫌気性の環境は存在するが、海水中には硫酸イオンが豊富に含まれるため、嫌気性環境における有機物の分解者としては硫酸還元菌が優勢であると考えられている。

2008年 Appl Environ Microbiol 誌 74 巻において、メタンハイドレートの大部分は微生物由来であることが報告されており、海洋におけるメタン発酵の重要性が指摘されている。海洋環境にはメタンハイドレートが大量に存在しているにも関わらず、現在の海洋環境にはメタン生成菌は少ないことが大きな学術的な課題となっている。また、生成したメタンは好氣的・嫌氣的にメタン資化性微生物により消費されることが知られており、実際のメタン発酵によるメタンの生成量は見かけの放出量に比べ大きいと考えられる。

現在までに海洋域においてメタン発酵やメタン生成菌の存在が報告されているのは、2009年 FEMS Microbiol Ecol 誌のチモール海のメタンシープや 2009年 Extremophile 誌の北海油田・ガス田など、メタンに関連した特殊な環境が多い。2008年の The ISME Journal 2 巻において、北極海の底泥サンプルについて異なる温度条件におけるメタン生成菌のポテンシャルが

報告されている。国内では、2005年に Microbes Environ. 誌 20 巻において、岩手県織笠川河口域のメタン生成に関する研究が報告されている。このように、海洋の底泥においては、メタン生成菌の存在は指摘されているが、メタン生成ポテンシャルやメタン生成の原料となる有機基質供給に関する研究が少なかった。

2. 研究の目的

メタンは二酸化炭素の約21倍の温室効果があり、その放出量の把握は重要な研究課題である。特に海洋からの放出量は、研究が少ない。そこで、当該研究「海洋域におけるメタン生成に関する研究」では、沿岸域底泥からのメタン生成について検討することを目的とした。メタン生成を促すような有機基質を底泥に添加し、メタン生成ポテンシャルやメタン生成菌の菌叢を解析した。メタン生成活性が強い海底泥を解析し、アオサなどマリンバイオマスのバイオガス化技術の基礎的知見を得る。さらに、2006年植物がメタンを生成するとの論文が発表されたが、本研究では海洋性微細藻類バイオマスを沿岸域底泥に添加した場合、メタンを生成するかどうかを検討した。海洋における主要な一次生産者である微細藻類バイオマスを、メタン生成菌が基質として利用することが可能であれば、海洋環境から大量のメタンが生成するポテンシャルがあることになる。これらの研究により、沿岸海洋域におけるメタン生成ポテンシャルについて、海洋環境微生物学における基盤的な実験データを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

若狭湾、舞鶴湾等から海底泥表層 0~5 cm をサンプリングし、メタン生成ポテンシャルやメタン生成菌菌叢解析に用いた。メタ

ン生成ポテンシャルの測定は、30 ml 容量のガラスバイアルに底泥を 15 g 添加し、有機基質、海水、酸化還元指示薬や還元剤を添加後、ブチルゴム栓で密封して窒素ガスを曝気して容器内の嫌気度を高めた。有機基質として、トリメチルアミン等のメチル化合物や培養した渦鞭毛藻 *Heterocapsa circularisquama* 等の微細藻類細胞濃縮液を使用した。バイアル気層中に含まれるメタンの濃度を、ガスクロで測定した。メタン生成菌菌叢解析は、DNA を抽出後、16SrRNA およびヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ遺伝子の部分配列を増幅し、PCR 増幅断片を大腸菌にクローニングするクローン解析によって行った。決定した配列の分子系統解析には、Clustal W や MEGA5 を使用した。

4 . 研究成果

沿岸海洋域におけるメタン生成ポテンシャルを検討する当該研究において、まず、由良川河口域底泥サンプルから、*Methanosaeta* 属メタン生成菌等に近縁の塩基配列が認められ、河口域においてメタン生成の可能性を示す実験結果が得られた。沿岸域底泥表層中には、硫酸還元菌に比べメタン生成菌の細胞濃度は低いと考えられ、実際メタン生成菌の 16SrRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 法では、電気泳動後にバンドが確認できないことがあった。PCR 法を検討した結果、1 段目で古細菌に特異的なプライマーを用い、2 段目でメタン生成菌に特異的なプライマーを用いる 2 段階 PCR 法 (Nested PCR) が、海底泥からのメタン生成菌 16SrRNA 遺伝子の PCR 増幅には有効であることが分かった。

舞鶴湾底泥をサンプリングし、メチル化合物等を基質として添加して底泥のメタン生成ポテンシャルを測定した。その結果、硫化ジメチルやトリメチルアミンを基質と

して添加した場合、酢酸などの有機酸に比べ比較的多くのメタンが生成することが分かった。若狭湾底泥サンプルについてクローン解析を行った結果、*Methanosarcina lacustris* や *Methanolobus profundus* といったメチル化合物をメタンに変換できるメタン生成菌に近縁な 16SrRNA 遺伝子が検出された。これらの結果から、若狭湾沿岸域では、メタン生成菌に特異的な基質で、硫酸還元菌が利用できない非競合基質であるメチル化合物を利用するメタン生成菌が、非競合基質が供給された際には活動していることが示唆された。

舞鶴湾底泥のメタン生成菌としては、*Methanobacterium* 属に近縁のクローンが多く検出された。その底泥にトリメチルアミンや硫化ジメチルを添加した後 10 日目の底泥についてクローン解析を行ったところ、*Methanolobus* 属や *Methanococoides* 属メタン生成菌のクローンが増えることが分かった。メチル化合物添加後、比較的短期間でメタン生成菌の菌叢が変化することが認められた。従来、メタン生成菌は一般的に増殖速度が遅いことが知られているが、今回の結果は比較的短期間に沿岸域底泥中のメタン生成菌がメチル化合物を基質として増殖する可能性を示しており、今後の研究の進展が期待される。

沿岸域底泥へのメチル化合物供給源として、微細藻類に着目した。海洋の一次生産者は微細藻類であり、微細藻類バイオマスがメタンへと変換するルートが太いと、海洋域において多量にメタンが生成している可能性がある。培養した微細藻類細胞を舞鶴湾底泥に添加し、微細藻類種によるメタン生成ポテンシャルの違いを検討した。その結果、渦鞭毛藻 *H. circularisquama* 細胞を海底泥に添加した際に、バイオガス生成量が特に多いことを明らかにした。さらに、渦鞭毛藻 *Prorocentrum micans* 細胞添加時

においてもメタン生成量が多いことが分かった。渦鞭毛藻以外では、羽状目珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* 細胞添加時に比較的多くのメタンが生成することがわかった。本研究により、微細藻類ブルーム発生時に、渦鞭毛藻や珪藻などの微細藻類バイオマスが海底泥に供給されれば、海底泥からメタンが生成している可能性が示された。これらの知見は、海洋微生物生態学や海洋環境微生物学への寄与が大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

石野亮太, 上野正博, 鯨坂哲朗, 澤山茂樹, 由良川河口域におけるメタン生成菌の検出, 第27回日本微生物生態学会大会, 2011/10

Tsukahara, K., Sawayama, S.,
Anaerobic treatment of ethanol stillage from cellulosic feedstocks under mesophilic and thermophilic conditions, International Symposium on Alcohol Fuels, 2011/10

Ishino, R., Ishii, K. Ueno, M., Ajisaka, T., and Sawayama, S.,
Activity and diversity of methanogens in a coastal marine sediment, Wakasa Bay, Japan. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference. 2012/7

澤山茂樹, メタン発酵とバイオガスの利用について, 産業機械工業会環境ビジネス委員会, 2012/7

石野亮太, 石井健一郎, 上野正博, 鯨坂哲朗, 澤山茂樹, 微細藻類ブルームがメタン生成に及ぼす影響, 平成24年度日本水産学会秋季大会, 2012/9
今井理人, 石井健一郎, 上野正博, 澤

山茂樹, 海底泥への微細藻類バイオマス添加に伴うメタン生成について, 平成25年度日本水産学会近畿支部後期例会, 2013/12

〔その他〕

ホームページ

<http://www.kanbi.marine.kais.kyoto-u.ac.jp/kenkyunaiyou.html>

メールマガジン

澤山茂樹, バイオガスとメタン生成, BTJ/GreenInnovation メール, Vol.193, 2011/7/21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤山 茂樹 (SAWAYAMA SHIGEKI)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 80357178

(2) 研究分担者 (SAKO YOSHIHIKO)

左子 芳彦
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 60153970

(3) 連携研究者

塚原 健一郎 (TSUKAHARA KENICHIRO)
(独) 産業技術総合研究所・バイオマス研究センター・研究員
研究者番号: 70357507