

平成14年度成果報告会

ガス漏洩検知技術 —間接モニタリング法—



大成建設株式会社 技術センター
土木技術研究所 生物環境研究室
帆秋 利洋



 TAISEI CORPORATION

地盤崩壊による メタンリークに伴う諸現象

塩分濃度の低下
還元状態への遷移
温度上昇

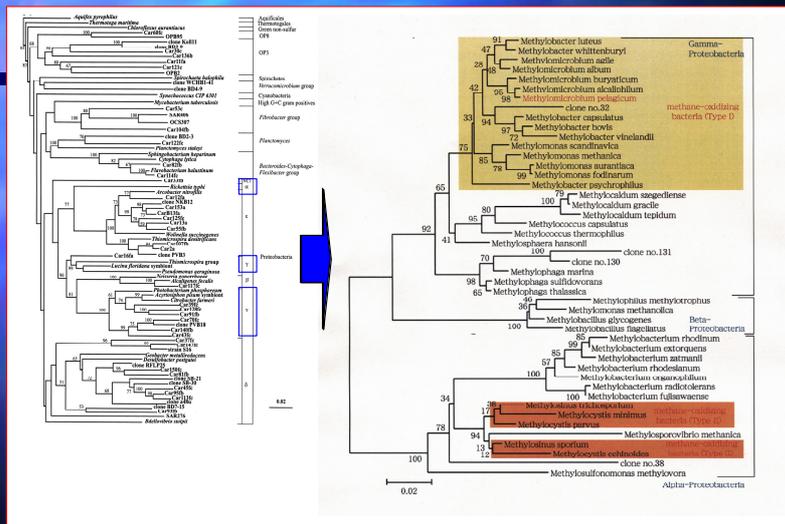
メタン酸化細菌の増殖

 TAISEI CORPORATION

平成14年度の実施計画

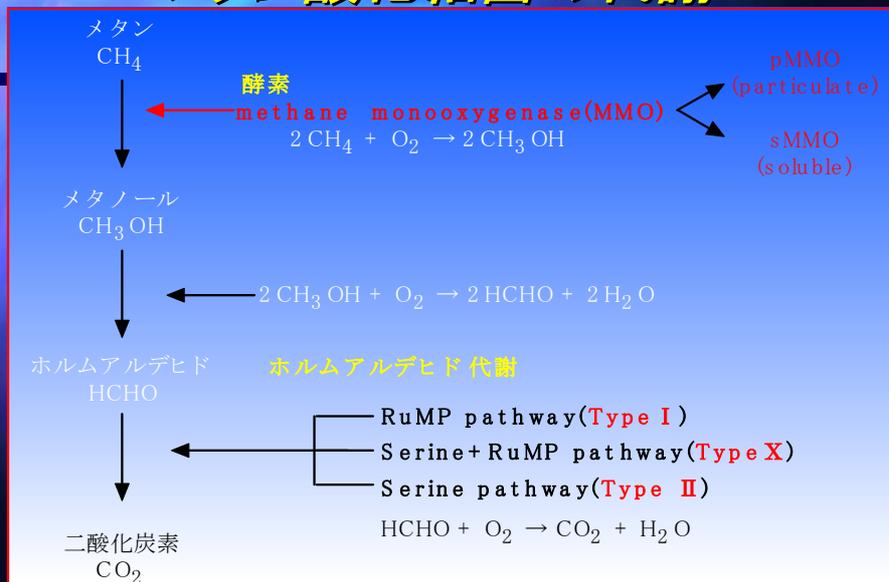
- ◆ 室内実験条件の確立(再現性、検出感度確認)
 - ・メタン酸化細菌の検出法
 - ・同上の分離、培養方法
 - ・各種分析手法の立ち上げ
- ◆ 生菌 / 死菌の判別法と解析手法の確立
- ◆ メタン濃度と微生物増殖の関係把握
- ◆ 周辺分野の情報収集

自然界に棲息する多様な微生物



微小(1 μm)、形態類似(球菌・桿菌・糸状菌)

メタン酸化細菌の代謝



TAISEI CORPORATION

メタン酸化細菌の系統分類

分類(系統)	属	酵素	代謝経路
Type I (<i>γ</i> -proteobacteria)	<i>Methylomonas</i>	pMMO	RuMP
	<i>Methylocaldum</i>	pMMO	RuMP/serine
	<i>Methylococcus</i>	pMMO/sMMO	RuMP/serine
	<i>Methylomicrobium</i>	pMMO	RuMP
	<i>Methylosphaera</i>	pMMO	RuMP
	<i>Methylobacter</i>	pMMO	RuMP
Type II (<i>α</i> -proteobacteria)	<i>Methylosinus</i>	pMMO/sMMO	serine
	<i>Methylocystis</i>	pMMO/sMMO	serine

酵素

pMMO(particulate methane monooxygenase):膜結合性メタン酸化酵素

sMMO(soluble methane monooxygenase) :水溶性メタン酸化酵素

代謝経路(ホルムアルデヒド固定経路)

RuMP : riblose monophosphate pathway

serine : serine monophosphate pathway

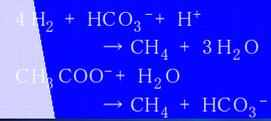
TAISEI CORPORATION

堆積物中での還元的メタン酸化(新説)

メタン生成古細菌
(*Methanogen*)

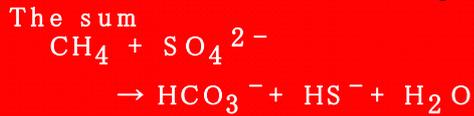
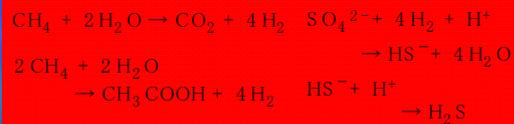
嫌気的環境下
(in anaerobic)

メタン生成
(Methane production)



通性嫌気環境下
(in anoxic)

メタン酸化 (methane oxidation) 硫酸還元 (sulfate reduction)



TAISEI CORPORATION

純粋培養菌株の入手

Strain name	NCIMB No.	Type	Growth condition				
			Temp	pH	CH ₄	Air	CO ₂
<i>Methylobacter luteus</i>	11914	Type I	30°C	6.8	50%	50%	-
<i>Methylococcus capsulatus</i>	11132	Type X	45°C	6.8	45%	45%	10%
<i>Methylosinus trichosporium</i>	11131	Type II	30°C	6.8	50%	50%	-

*Methylococcus capsulatus*はType Xであるが、一般的にType Iとして分類される

各菌のDAPI染色による顕微鏡画像



Methylobacter luteus

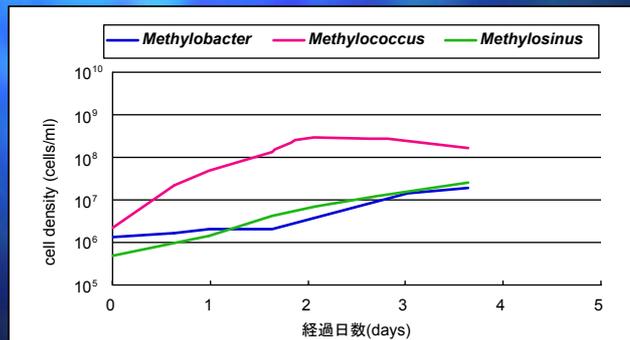
Methylococcus capsulatus

Methylosinus trichosporium

TAISEI CORPORATION

入手した菌株の増殖特性

Strain name	Doubling time(Td)
<i>Methylobacter luteus</i>	6.258 h
<i>Methylococcus capsulatus</i>	7.148 h
<i>Methylosinus trichosporium</i>	6.873 h



TAISEI CORPORATION

深海からの メタン酸化細菌の探索

sample name	sampling point	medium	pH	Temp	CH ₄	Air
KMA30	油つぼ	AMS	6.8	20°C	30	70
KMA50				20°C	50	50
KMA70				20°C	70	30

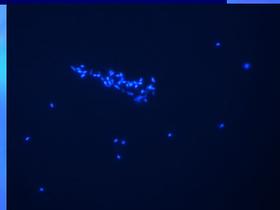
AMS medium:

Ammonium Mineral Salts medium without methanol

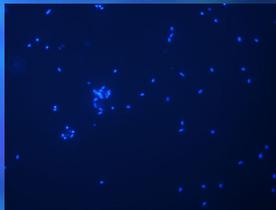
from ATCC(America)

TAISEI CORPORATION

深海水から増殖した (メタン酸化?)細菌群



KMA30



KMA50



KMA70

TAISEI CORPORATION

増殖した細菌群へのアプローチ

PCR-DGGE法により
メタン酸化細菌の存在確認

分離・単離
純粋培養菌株47株

PCR-DGGE法
により分類

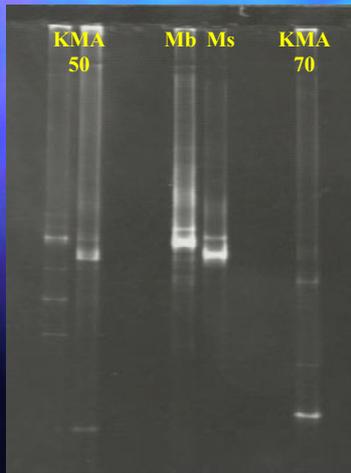
分子系統解析
(菌種同定)

増殖特性把握

モニタリングに有用な
メタン酸化細菌の獲得

TAISEI CORPORATION

PCR-DGGE法による メタン酸化細菌の検出



Primer set
EUB341F - 1041-5(Type I)
EUB341F - 1034ser(Type II)



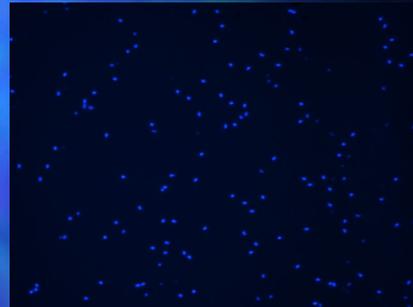
メタン酸化細菌が
存在することを確認

 TAISEI CORPORATION

メタン酸化細菌の分離



ロールチューブ法による分離



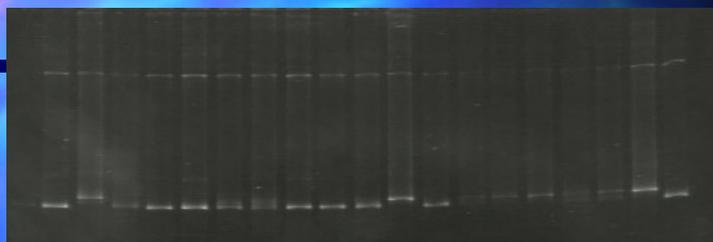
分離した菌株の顕微鏡画像
(DAPI染色)



分離菌株47

 TAISEI CORPORATION

分離株のDGGE解析による分類



Type I : 6種類 Type II : 3種類

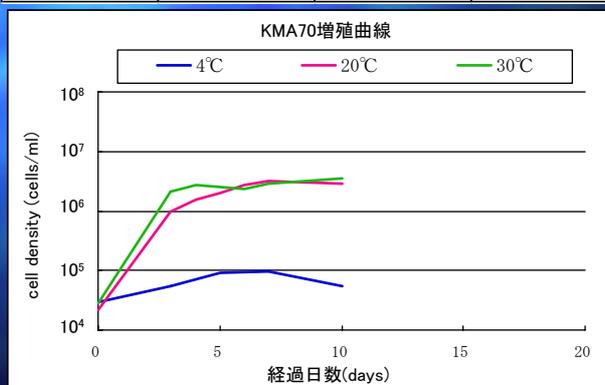
分子系統解析(解析中)

TAISEI CORPORATION

培養温度による増殖速度の変化

ex.KMA70

	4°C	20°C	30°C
μ [day ⁻¹]	0.220	1.110	1.442
Td[day]	3.144	0.624	0.481



TAISEI CORPORATION

微生物メタンセンサー

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Mar. 1998, p. 864-870
0099-2240/98/\$04.00+0
Copyright © 1998, American Society for Microbiology

Vol. 64, No. 3

Use of an Oxygen-Insensitve Microscale Biosensor for Methane To Measure Methane Concentration Profiles in a Rice Paddy

LARS R. DAMGAARD,¹ NIELS PETER REVSBECH,^{1*} AND WOLFGANG REICHARDT²

Department of Microbial Ecology, Institute of Biological Sciences, University of Aarhus, DK-8000 Aarhus C, Denmark,¹ and Soil and Water Sciences Division, International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines²

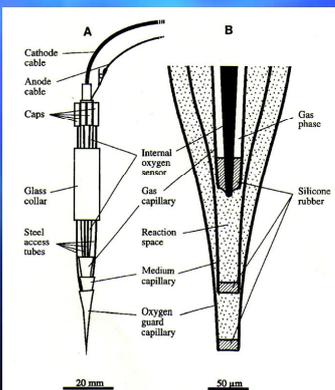


FIG. 1. Methane microsensor. (A) Entire sensor. (B) Transsect through the sensor tip region.

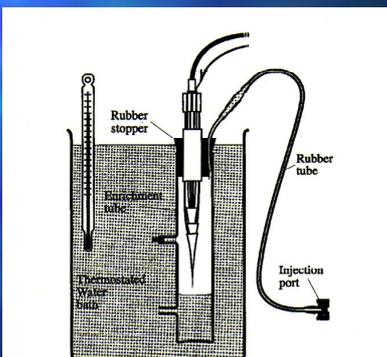


FIG. 2. Section through the calibration setup. The drawing illustrates the situation after injection of both a calibration gas mixture and a few milliliters of water to force the gas in the rubber tube into the enrichment tube.

PORATION