

## 石炭層における微生物によるメタン生産の可能性を探る

### Recent Topics of Methane Production in Coal Seam by Microorganisms

清水 了<sup>1\*</sup>, 上野 晃生<sup>1</sup>, 玉村 修司<sup>1</sup>, 長沼 毅<sup>2</sup>,  
石島 洋二<sup>1</sup>, 大味 泰<sup>1</sup>, 金子 勝比古<sup>1,3</sup>

SATORU SHIMIZU, AKIO UENO, SHUJI TAMAMURA, TAKESHI NAGANUMA,  
YOJI ISHIJIMA, YASUSHI OHMI and KATUHIKO KANEKO

<sup>1</sup> 公益財団法人北海道科学技術総合振興センター幌延地圏環境研究所 〒098-3221 北海道天塩郡幌延町栄町 5-3

<sup>2</sup> 広島大学大学院生物圏科学研究科 〒739-8528 広島県東広島市鏡山 1-4-4

<sup>3</sup> 北海道大学大学院工学院環境循環システム専攻地圏循環工学講座 〒060-8628 北海道札幌市北 13 西 8

\* TEL: 01632-9-4112 FAX: 01632-9-4113

\* E-mail: satoru.shimizu@h-rise.jp

<sup>1</sup> *Horonobe Research Institute for the Subsurface Environment, Northern Advancement Center for Science & Technology, Horonobe-cho, Teshio-gun, Hokkaido 098-3221, Japan*

<sup>2</sup> *Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

<sup>3</sup> *Faculty and Graduate School of Engineering, Hokkaido University, Sapporo 060-8628, Japan*

キーワード: 石炭層, メタン生成微生物, 微生物群集

Key words: coal seam, methanogen, microbial community

(原稿受付 2012年5月1日/原稿受理 2012年5月25日)

### 1. はじめに

石炭は世界の一次エネルギーの約3割・電源別発電量の4割を占めている。また、石炭の可採年数は133年と他の化石燃料よりも長い今世紀における重要なエネルギー資源であるといえる。しかし、石炭には他の化石燃料に比べて燃焼に伴い温室効果ガスであるCO<sub>2</sub>、酸性雨の原因となるNO<sub>x</sub>およびSO<sub>x</sub>の排出が多いなどの環境制約上の課題がある。さらに、我が国においては、石炭のほとんどを輸入に頼っており、国内に残っている石炭の多くは採炭できない深度に存在している。島田ら<sup>1)</sup>は日本における地下1,200 m以浅の浅部炭層の石炭埋蔵量約270億トンに対して、地下1,000–3,000 mの深部非可採炭層に3,000億トン以上、3,000 m以深の深部非可採炭層には3兆トン以上もの石炭が埋蔵されていると見積もっている。

このような背景のもと、もし石炭層において微生物反応により石炭をメタンに変換することができれば、以下のような利点とともに、石炭を天然ガス資源として回収することができる；(1) 採炭工程を経ずして石炭をガス資源として回収できる、(2) 採炭できない深度の石炭をガス資源として回収できる、(3) 褐炭などの低品位な石炭をガス資源として回収できる、(4) 環境影響のより少ないエネルギー資源として回収できる(天然ガスは石炭と比べて燃焼時にCO<sub>2</sub>やNO<sub>x</sub>/SO<sub>x</sub>の発生量が少ない)。(5) 海外において炭層メタンは非在来型のエネルギー資

源として商業生産が行われているが、枯渇した炭層ガス鉱床の再生がこの技術によって期待できる。

しかしながら、2006年以前までは石炭層における微生物学的な知見は少なく、例えば石炭層にはどのような種類の微生物が存在しているのかすらほとんどわかっていなかった。このような中、我々は北海道の夕張で行われていたCO<sub>2</sub>-ECBM (enhanced coal-bed methane recovery; コールベッドメタン回収増進)の実証試験等に関わり、石炭層の微生物群集構造、メタン生成活性および超臨界CO<sub>2</sub>による地下微生物への影響に関する基礎的な研究を行ってきた。近年、海外の商業用炭層ガス鉱床においてメタン生成反応を人為的に促進させるための研究が少数ではあるが行われ始めている。現在、我々の研究グループも北海道の天北炭田、石狩炭田および釧路炭田などをフィールドとして、微生物による石炭層におけるメタン生産の可能性を探るための研究を行っている。本稿では、これらの研究を通して得られた知見について最近の研究報告を交えて紹介したい。

### 2. 微生物起源の炭層メタン

はじめに「微生物によって石炭からメタンを商業的に作ることは可能なのか」について考えてみたい。これに類する自然現象、すなわちナチュラルアナログとして微生物起源の炭層メタンの分布を表1に示した<sup>2)</sup>。また、アメリカ合衆国において生産されている天然ガスのうち

表 1. 微生物起源の炭層メタンの分布<sup>2)</sup>.

Area	State or Country
Elk Valley	British Columbia
Maine Prairie	California
Forest City Basin	Kansas
San Juan Basin	New Mexico and Colorado
Michigan Basin	Michigan
Appalachian Basin	Pennsylvania
Wilcox Group	Texas
Powder River Basin	Wyoming
Illinois Basin	Indiana
Alberta Basin	Alberta
Black Warrior Basin	Alabama
Cook Inlet Basin	Alaska
Fort Yukon	
Nanushuk	
Bowen Basin	
Surat Basin	
Sydney Basin	
Port Phillip Basin	
Gippsland Basin	Australia
Waikato Basin	New Zealand
Greymouth	
Carpathian Foredeep	Central Europe
Ruhr Basin	Germany
Pannonian Basin	Hungary
Polish lignites	Poland
Upper Silesian Basin	
Zonguldak Basin	North Western Turkey
Uinta Basin	Utah
Xinji area	China
Pechora Basin	Russia
Northwestern Siberian plain	

約 10%が炭層由来のメタンであり、そのうち約半分が微生物起源のメタンといわれている<sup>2)</sup>。このように、石炭層における微生物によるメタン生成についてはナチュラルアナログが多く存在している。これらのナチュラルアナログで生じているメタン生成について、関与している微生物群集の構造や生成プロセスを明らかにすることにより、石炭層におけるメタン生成を促進する手段や石炭層におけるバイオメタンの商業生産が可能であるかについてのヒントが得られるかもしれない。

### 3. 石炭層の微生物

#### 3.1. 国内の石炭層における微生物研究

日本国内における石炭層を対象とした微生物研究は非常に少なく、北海道の石狩炭田で著者らが行った研究が一例報告されているのみである<sup>7)</sup>。ここでは、著書らに関わった北海道夕張市に位置する石狩炭田（瀝青炭層）における国内唯一の CO<sub>2</sub>-ECBM 実証サイト（CO<sub>2</sub>の炭層隔離により炭層メタン回収量の増産を目指した事業）から得られた知見について紹介する。はじめに CO<sub>2</sub>-ECBM の背景について説明する。世界各地に分布する地下深部の炭層には莫大な量の炭層メタン（coal-bed

methane; CBM）が胚胎されており、その総量は 140 兆 m<sup>3</sup> 以上であると推定されている<sup>3)</sup>。そのため、CBM は非在来型エネルギーとして注目を集めている。近年、温室効果ガス削減のための一手段である CO<sub>2</sub> 地中隔離の一環として、炭層に温室効果ガスである CO<sub>2</sub> を圧入して CO<sub>2</sub> で CBM を置換することによりエネルギー資源である CBM の回収増進を目指したプロジェクト（CO<sub>2</sub>-ECBM）が世界各国で進行中である<sup>4)</sup>。我が国では、2002 年から北海道の石狩炭田南部の夕張地域において、CO<sub>2</sub>-ECBM の調査プロジェクトが、経済産業省の補助事業により行われた<sup>5,6)</sup>。

夕張サイト（図 1）では、2004 年から CO<sub>2</sub> 注入井（IW-1：注入深度 890.1–896.3 meter below ground level；以下 mbgl とする）から石炭層への CO<sub>2</sub> の圧入試験および、IW-1 から少し離れた地点に掘削された CBM 生産井（PW-1：採水区間 843.1–907.0 mbgl）を用いた産出ガスのモニタリングを行ったが、事業期間内に注入井に圧入した CO<sub>2</sub> の生産井への到達は観測されなかった。しかし、CO<sub>2</sub> よりも石炭中の移動速度が速い N<sub>2</sub> を IW-1 に注入することにより、比較的短期間に PW-1 における N<sub>2</sub> 到達の観測には成功した。著者らは同サイトにおける石炭層の微生物群集構造、CO<sub>2</sub> の地中貯留による石炭層微生物へのインパクトを評価するための予察研究として PW-1 への到達が観測されている N<sub>2</sub> の石炭層注入による微生物影響などの調査を行った。研究には PW-1 から採取した地下水を使用した。採取した地下水は、水温 28.26°C、pH 7.82、EC 1.16 S/m の中温域の化石海水であった。N<sub>2</sub> 到達前の PW-1 の全菌数は 3.08 × 10<sup>5</sup> cells·mL<sup>-1</sup>、N<sub>2</sub> 到達後は 9.88 × 10<sup>5</sup> cells·mL<sup>-1</sup> であり、他の深部帯水層の全菌数 10<sup>3</sup>–10<sup>8</sup> cells·mL<sup>-1</sup> の範囲内であった。水質データ等の詳細については過去の報告<sup>7)</sup>を参照されたい。

PW-1 から生産されるガスの組成は 2004 年 11 月～2006 年 12 月の間の測定値でメタンが 86.9～94.8% を占めており、2006 年 4 月に IW-1 から注入した N<sub>2</sub> の PW-1 への到達が 2006 年 6 月に確認されている。我々は、石炭層地下水の採水を N<sub>2</sub> の PW-1 到達前後の 2006 年 4 月 17 日と 2006 年 7 月 19 日に行っており、石炭層の微生物群集を調査するとともに N<sub>2</sub> による微生物群集への影響についても調査した。ガス組成等の詳細については過去の報告<sup>7)</sup>を参照されたい。

PW-1 から生産されるガスの安定同位対比（δ<sup>13</sup>C および δD）を図 2 に、C1/（C2+C3）比および δ<sup>13</sup>methane を図 3 に示す。PW-1 のメタンの δ<sup>13</sup>C および δD 比は Whiticar ら<sup>8)</sup> が定義する熱分解起源の領域内にプロットされた（図 2）。さらに、PW-1 産出ガスの C1/（C2+C3）比および δ<sup>13</sup>methane 比も、Claypool & Kvenvolden<sup>9)</sup> が定義する熱分解起源の領域の近くにプロットされ、PW-1 のメタンが熱分解起源である可能性が高いことを示していた（図 3）。これらの結果から、PW-1 から生産されるメタンの起源は熱分解起源であることが強く示唆されている。しかし、PW-1 生産水からはメタン生成に関わる微生物群集の 16S rRNA 遺伝子が検出され、集積培養法によってもメタン生成活性が確認された<sup>7)</sup>。

石狩炭田 PW-1 生産水の 16S rRNA 遺伝子に基づく古細菌の群集構造を図 4 に示す。古細菌の 16S rRNA 遺伝

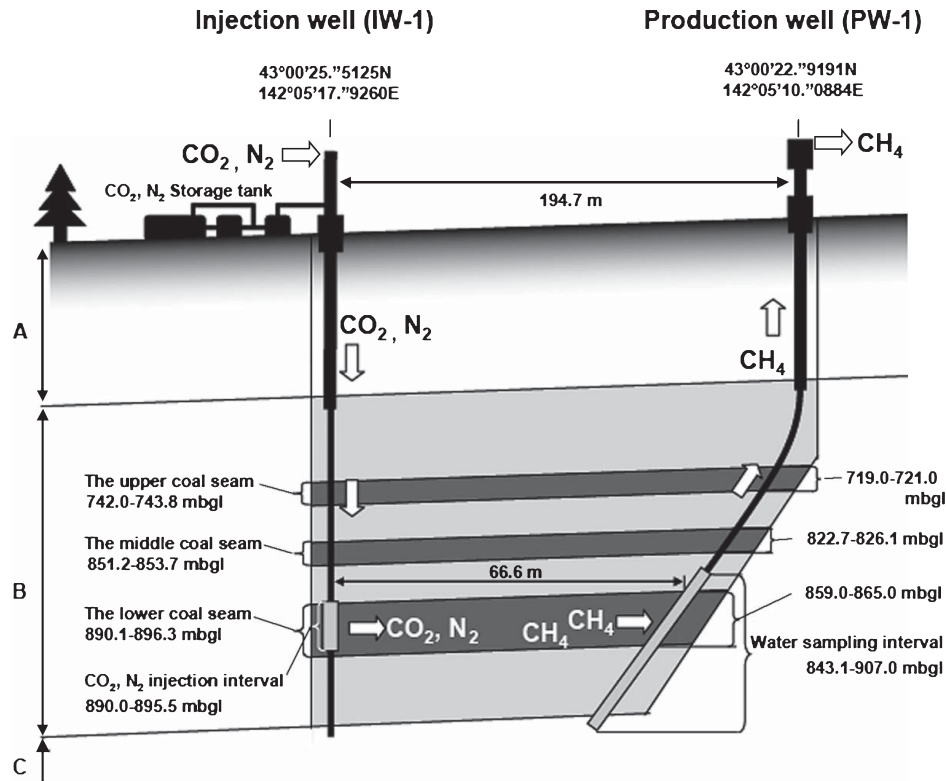


図1. 北海道石狩炭田夕張地域における CO<sub>2</sub>-ECBM 実証サイトの概要。

The depths (meter below ground level, mbgl) of the formations are shown along the vertical axis in IW-1. The abbreviations for the geological Formations are as follows: A, Horonai Formation (mudstone and sandstone, 0–678 mbgl); B, Yubari Formation (mudstone, sandstone, shale and coal, 678–916 mbgl) and C, Horokabetsu Formation (mudstone, 916–932 mbgl).

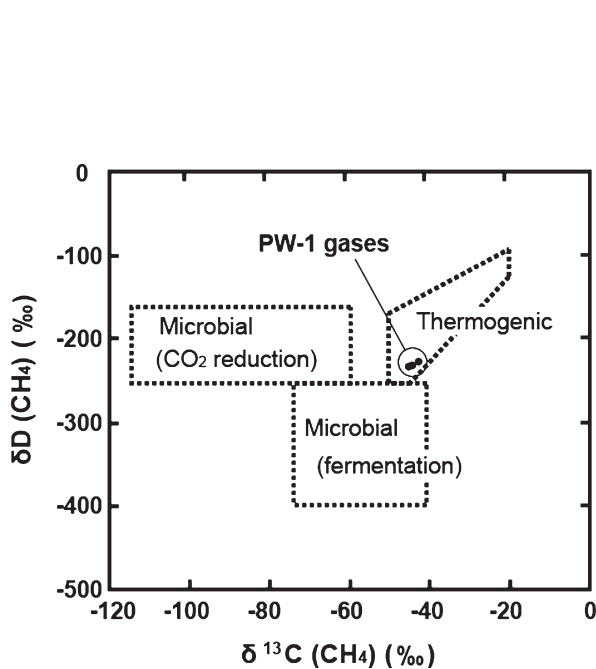


図2. 北海道石狩炭田夕張地域における PW-1 産出炭層メタンの炭素および水素同位体比。  
ガスの起源は Whiticar *et al.* (1983)<sup>9)</sup> の分類に従った。

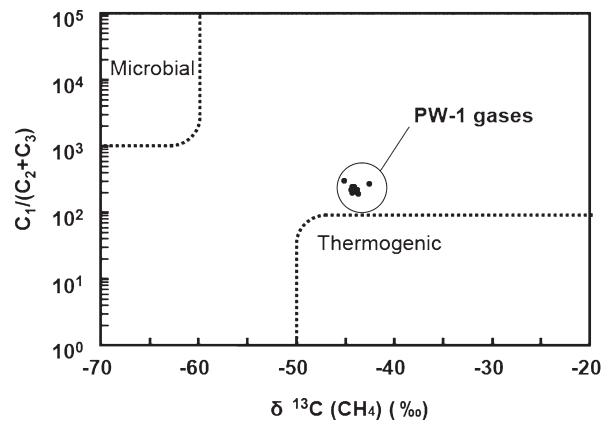


図3. 北海道石狩炭田夕張地域における PW-1 産出炭層ガスの C<sub>1</sub>/(C<sub>2</sub>+C<sub>3</sub>) [methane/(ethane+propane)] vs. δ<sup>13</sup>C<sub>methane</sub> の Bernard 図。  
ガスの起源は Claypool and Kvenvolden (1983)<sup>9)</sup> に従った。

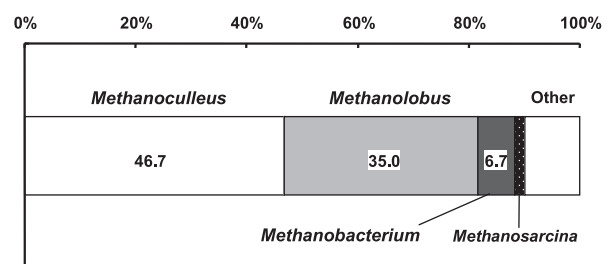


図4. 北海道石狩炭田夕張地域における PW-1 産出炭層地下水から検出された古細菌の系統。

子に基づくクローンライブラリーは、90.0%がメタン生成微生物の系統型で占められており、CO<sub>2</sub>基質型 (4H<sub>2</sub>+CO<sub>2</sub>→CH<sub>4</sub>+2H<sub>2</sub>O, ΔG<sup>0</sup> =-130.7 kJ/reaction) の *Methanoculleus* 属 および *Methanobacterium* 属 が 53.3%, メチル化合物基質型 (CH<sub>3</sub>OH+H<sub>2</sub>→CH<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O, G<sup>0</sup> =-113 kJ/reaction) あるいは酢酸基質型 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>+H<sub>2</sub>O→CH<sub>4</sub>+HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, G<sup>0</sup> =-31 kJ/reaction) の *Methanobacterium* 属 および *Methanosarcina* 属 が 36.7% を占めていた。これらの系統型は海外の炭田から検出されているメタン生成微生物の系統型とも属レベルで一致している (表 2)<sup>10-13)</sup>。

石炭層以外の地下環境と比較すると、高温油田帯水層<sup>14)</sup>、石油に汚染された帯水層<sup>15)</sup>、白亜紀の頁岩帯水層<sup>16)</sup>、第三紀堆積岩帯水層<sup>17)</sup> および 5 km- 深部断層帯の帯水層<sup>18)</sup> などからも *Methanoculleus* 属, *Methanobacterium* 属, *Methanosarcina* 属のメタン生成微生物の系統型が検出されている。以上のように、安定同位体分析の結果は PW-1 の産出ガス中の

メタンが熱分解起源であることを示していたが、地下水中の古細菌 16S rRNA 遺伝子ライブラリーは PW-1 の地下水中にメタン生成微生物が主要な微生物集団の一つとして存在していることを強く示唆していた。

石狩炭田 PW-1 生産水の真正細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づくクローンライブラリーは、メタン生成微生物との共存あるいは共生が報告されている系統群が優占していた (図 5)。全体として Firmicutes 門と硫酸還元微生物である δ-Proteobacteria 綱が全体の 88.1% を占めていた。Firmicutes 門の中では特にホモ酢酸生成微生物である *Acetobacterium* 属が優占しており (38.8%), 硫酸還元微生物である δ-Proteobacteria 綱の中では、*Syntrophus* 属が優占していた (20.9%)。このことは、ホモ酢酸生成微生物と硫酸還元微生物、特に硫酸還元微生物の中でも *Syntrophus* 属が、PW-1 の地下水における物質循環に深く関わっていることを示唆している。最近、他の深部地下環境において、メタン生成微生物と酢酸生成微生物の共存<sup>19)</sup> およびメタン生成微生物と硫酸還元微生物

表 2. 炭層から検出されている微生物の系統。

Area	Coal rank <sup>a</sup>	Sample type <sup>b</sup>	Method <sup>c</sup>	Phylotypes
Ishikari Basin, Hokkaido, Japan <sup>7)</sup>	B	W	CI	<b>Methanogenic Archaea; Methanoculleus, Methanobacterium, Methanolobus, Methanosarcina, Other Archaea;</b> Terrestrial miscellaneous Euryarchaeotic group <sup>20,27,28)</sup> , South Africa gold mine Crenarchaeotic group-1 <sup>29)</sup> , Marine Group I <sup>30)</sup> , Soil Crenarchaeotic Group <sup>29)</sup> , <b>Proteobacteria; Syntrophus, Pelobacter, Desulphuromonadales, Bacteroides, Syntrophus, Pelobacter, Pseudomonas, Acidovorax, Sphingomonas, Novosphingobium, Firmicutes; Acetobacterium, Syntrophomonas, Sedimentibacter, Clostridium, Anovynatronum, Other Bacteria; Bacteroidetes, Cyanobacteria, OP3, Planctomycetes</b>
Powder river Basin, Wyoming, USA <sup>10)</sup>	SB	W	CI	<b>Methanogenic Archaea; Methanococcus, Methanocaldococcus, Methanothermococcus, Methanobrevibacter, Methanobacterium, Methanomicrobium, Proteobacteria; Desulfovibrio</b>
		C	CI	<b>Methanogenic Archaea; Methanobacterium, Methanothermococcus</b>
Powder river Basin, Wyoming, USA <sup>11)</sup>	SB	C	CB	<b>Methanogenic Archaea; Methanosarcina, Proteobacteria; Desulfovibrio, Firmicutes; Acidoaminobacter, Clostridium, Syntrophomonas, Acloleplasma, Other Bacteria; Spirochaeta</b>
Illinois Basin, Illinois, USA <sup>23)</sup>	B	W	CI	<b>Methanogenic Archaea; Methanocorpusculum, Proteobacteria; Rhodobacter, Firmicutes; Firmicutes, Other Bacteria; Bacteroidetes, Spirochaetes</b>
			CB	<b>Methanogenic Archaea; Methanocorpusculum</b>
Wilcox coal seam, Louisiana, USA <sup>24)</sup>	?	W	CB	<b>Methanogenic Archaea; Methanolobus</b>
Western Canada <sup>12)</sup>	SB	C	CI	<b>Proteobacteria; Roseobacter, Rhodobacter, Sphingomonas, Rhizobiales, Acidovorax, Aquaspirillum, Thiobacillus, Massilia, Janthinobacterium, Herminiimonas, Hydrogenophaga, Aeromonas, Acinetobacter, Marinobacter, Halomonas, Pseudomonas, Other Bacteria; Anthrobacter</b>
			CB	<b>Methanogenic Archaea; Methanosarcina, Methanoculleus, Methanocalculus, Methanobrevibacter, Methanothermobacter, Methanobacterium, Proteobacteria; Citorobacter, Enterobacteriales, Aeromonas, Pseudomonas, Firmicutes; Clostridiales, Lactobacilliales, Sedimentibacter, Other Bacteria; Synergistes, Bacteroidetes, Spirochaetes</b>
Surat Basin, Australia <sup>26)</sup>	B	W	CI	<b>Proteobacteria; Hydrogenophaga, Thaeira, Other Bacteria; Cytophaga</b>
			CB	<b>Proteobacteria; Achromobacter, Firmicutes; Fusibacter</b>
Sydney Basin, Australia <sup>26)</sup>	B	W	CI	<b>Proteobacteria; Methylobacter, Pseudomonas, Azorarcus, Methylothermobacter, Nitrospira, Marinobacter, Firmicutes; Fusibacter, Dethiosulfatibacter</b>
			CB	<b>Firmicutes; Clostridium, Aeromonas, Arcobacter, Shewanella, Bacteroides, Exiguobacterium, Soehngenia, Fusibacter, Acetobacterium, Geobacter</b>
		C	CI	<b>Other Archaea; Archaeoglobus, Thermococcus, Thermococcus, Proteobacteria; Phyllobacterium, Marinobacter, Halomonas, Afipia, Firmicutes; Geobacillus</b>
Port Phillip Basin, Australia <sup>26)</sup>	BC	C	CI	<b>Other Archaea; Archaeoglobus, Thermococcus, Proteobacteria; Methylocapsa, Acidocella, Acidiphilium, Thiomonas, Rhodobacter</b>
Gippsland Basin, Australia <sup>13)</sup>	BC	W	CI	<b>Methanogenic Archaea; Methanobacterium, Proteobacteria; Burkholderiaceae, Geobacteraceae, Enterobacteriaceae, Stenotrophomonas, Halomonas, Ralstonia, Desulfomicrobium, Delftia, Desulphuromonas, Desulfovibrio, Firmicutes; Geosporobacter, Thermotalea, Bacillus, Geobacillus, Veillonellaceae, Other Bacteria; Actinobacteria, Micrococccaceae</b>
Ruhr Basin, Germany <sup>25)</sup>	?	C	CB	<b>Methanogenic Archaea; Methanosarcina</b>

<sup>a</sup> SB; Subbituminous coal, B; Bituminous coal, BC; Brown coal.

<sup>b</sup> C; Coal, W; Groundwater.

<sup>c</sup> CB; Culture base, CI; Culture independent.



物の共存<sup>17-19)</sup>が示唆されている。また、硫酸還元微生物である *Syntrophus* 属は、水素生産共生微生物としてメタン生成微生物との共生関係が報告されており<sup>20,21)</sup>、深部地下環境においては中温の生分解性石油貯留層で *Methanocalculus* 属や *Methanosaeta* 属との共存が報告されている<sup>22)</sup>。これらのことを考え合わせると、メタン生成微生物、ホモ酢酸生成微生物および *Syntrophus* 属の硫酸還元微生物の幾つかは、PW-1の地下水のメタン生成システムにおいて互いに共生関係にあるのかもしれない。また、これらのメタン生成微生物との共存微生物の遺伝子が地下水から検出されたことは、地下水におけるメタン生成にメタン生成微生物が関与しているという仮説を支持するものである。海外の石炭層から検出されている真正細菌の系統型と比較すると、Firmicutes 門あるいは  $\delta$ -Proteobacteria 綱の系統型が検出されている点が共通していたが属レベルでは驚くほど共通点が少なかった。

PW-1 生産水を接種源とした培養法によるメタン生成活性は、CO<sub>2</sub> 基質型のメタン生成微生物用の Japan collection of microorganisms (JCM) 262 集積培地およびメチル化合物基質型の JCM230 集積培地を用いた培養試験において、いずれの培地からもメタン生成活性が確認されている。

以上のように夕張地域の石炭層の地下水において、CO<sub>2</sub> 基質型およびメチル化合物基質型の集積培養物からはメタン生成活性が示され、古細菌および真正細菌の 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーではメタン生成微生物ならびにメタン生成微生物との共存が報告されているホモ酢酸生成微生物および  $\delta$ -Proteobacteria 綱の *Syntrophus* 属が優占していることから、メタン生成に関わる微生物集団の存在が強く示唆された。しかし、これらの結果は石炭層のメタンが熱分解起源であるとする安定同位体比の結果とは相反していた。この解釈としては、炭層内の大部分のメタンは、微生物起源によるものではなく、石炭化反応過程の高温高圧下で熱分解反応により生成され、メタン生成微生物群集は、その後の地層の隆起などによる地層温度の低下にともない地下水中に出現した可能性が考えられる。

### 3.2. 海外の石炭層における微生物研究

世界の石炭層における微生物研究のうち微生物の系統について言及されている報告を表2にまとめた。地域的に最も報告が多いのが、北米（5例）とオーストラリア（4例）であり、日本と欧州はそれぞれ1例しか報告が

ない。報告の多い北米についても、すべての商業用炭層について報告がある訳ではなく Powder river に報告が集中しており限定的である。石炭のランクに着目した場合、最も報告が多いのが瀝青炭 (Bituminous coal) 4例、次いで亜瀝青炭 (Subbituminous coal) で3例、褐炭 (Brown coal) 2例となっており、石炭ランクによって検出されているメタン生成古細菌の系統に特徴がみられる。瀝青炭および亜瀝青炭では多様な系統が検出されているのに対して褐炭では *Methanobacterium*<sup>13)</sup> の CO<sub>2</sub> 基質型の一系統のみが検出されている。瀝青炭および亜瀝青炭で検出されているメタン生成古細菌についても CO<sub>2</sub> 基質型の系統が圧倒的に多く、*Methanomicrobium* 属、*Methanocalculus* 属、*Methanoculleus* 属、*Methanocorpusculum* 属、*Methanobacterium* 属、*Methanobrevibacter* 属、*Methanobacterium* 属、*Methanothermobacter* 属、*Methanococcus* 属、*Methanocaldococcus* 属および *Methanothermococcus* 属<sup>7,10,12)</sup> が検出されており、炭層では CO<sub>2</sub> 基質型のメタン生成プロセスが主要であると推測されている。他には *Methanosarcina* 属および *Methanolobus* 属等<sup>7,11,24,25)</sup> のメチル化合物や酢酸等を基質とする系統も検出されている。石炭層から単離され記載されているメタン生成古細菌は *Methanolobus zinderi* SD1<sup>T 24)</sup> の一株が報告されているのみである。この株はルイジアナ州の Wilcox 炭層から単離されており、メチル化合物を基質とするメタン生成古細菌である。興味深いことにこの株の 16S rRNA 遺伝子の配列は我々が石狩炭田夕張地域の炭層から検出した古細菌クローンと非常に近縁であった。一方、真正細菌については、Proteobacteria 門および Firmicutes 門が各ランクの炭層で共通して検出されており、これらの系統が炭層中の有機物分解を行い、メタン生成古細菌の基質を生成していると推測されている。しかしながら、検出されている系統は詳細に見てみると非常に多様であり炭層間の共通点はあまりないため、石炭の分解プロセスは炭層によって特色があるのかもしれない。石炭の分解プロセスについては、Strapóć ら<sup>23)</sup> がイリノイの瀝青炭から検出された真正細菌 16S rRNA 遺伝子クローンの系統をもとに提案しており、石炭中の geomacromolecule の分解には *Spirochaeta* 属、*Sporomusa* 属、*Cytophaga* 属および *Rhodobacter* 属が関与し、その分解産物の発酵によるメタン生成基質 (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, Acetate) の生成に *Spirochaeta* 属、*Cytophaga* 属、*Acidoaminococcus* 属および *Rhodobacter* 属が関与していると考察している。

以上のように炭層における微生物生態学的な報告はまだまだ少ない。今後、炭層の CO<sub>2</sub>-ECBM 利用や炭層メタンの商業生産に対する関心の高まりにともない炭層微生物に関する知見が増えることが望まれる。

## 4. CCS による炭層微生物への影響

### 4.1. 超臨界 CO<sub>2</sub> が炭層微生物に与える影響

気候変動に関する政府間パネル (IPCC) における二酸化炭素回収・貯留 (Carbon Dioxide Capture and Storage; CCS) に関する特別報告書 (2005年) によれば、世界全体における CCS による貯留ポテンシャルは、2100年までに世界全体の排出削減対策のうち累積で

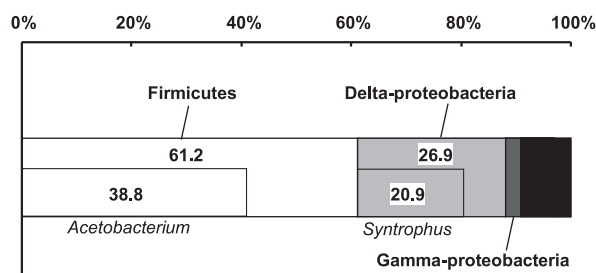


図5. 北海道石狩炭田夕張地域における PW-1 産出炭層地下水から検出された真正細菌の系統。

15～55%の貢献が見込まれている。石狩炭田の微生物研究のところで記述したが、石炭層は温室効果ガス削減のロードマップの中で CCS の重要な候補地とされている。そのため、石炭層におけるバイオメタン生産を目指した場合には、「CCS サイトでもバイオメタン生産は可能であるか？」についても検討が必要である。

CCS では CO<sub>2</sub> が超臨界状態で地中貯留されるケースが多いため、超臨界 CO<sub>2</sub> の微生物への影響を考える必要がある。すなわち、CO<sub>2</sub> は温度 31°C 以上かつ圧力 7 MPa 以上の条件で超臨界状態に達するため、地下 800 m 以深への貯留が想定されている多くの CCS サイトでは CO<sub>2</sub> は超臨界状態で貯留される。しかしながら、Dillow ら<sup>31)</sup> によると超臨界 CO<sub>2</sub> は種々の細菌を不活性化（増殖できない状態）にすることが明らかになっている。大腸菌を用いた実験<sup>31)</sup> では、超臨界 CO<sub>2</sub> との反応時間が進むにつれて培養可能な細胞数が激減すること、この現象は水が介在すると促進されることが明らかになっている。これらのことが炭層の微生物にそのまま適用されると、CCS サイトの炭層におけるバイオメタンの生産は困難であると考えざるを得ない。その辺りのことを確かめるため、我々は深部地下環境に生息する微生物を用いて実験を行っている。表 3 は我々が*E. coli* を用いて試験した結果であるが、超臨界 CO<sub>2</sub> 処理により直接計数法による細胞数には全く変化がみられなかったが、平板培養法による培養可能な細胞数は 24 時間以内に検出限界以下になることが明らかになっている。この実験系を用いて地下深部の地下水試料を用いて試験を行った結果を表 4 に示す。対照区である N<sub>2</sub> 処理区では細胞密度が増加していたのに対し、超臨界 CO<sub>2</sub> 処理区では直接計数法による細胞数に変化がみられなかった。N<sub>2</sub> 処理区における細胞密度の増加は、培養試験の温度圧力条件と試験に用いた地下水の原位置環境条件（20°C・1.4 MPa）が異なるためであると考えられる。また、超臨界 CO<sub>2</sub> で 28 日間処理した試験区では DNA が抽出できないという現象が観察されている。この結果をどう解釈するかであるが、先行研究や著者らの大腸菌試験の結果を考慮すると細胞は顕微鏡で観察可能であるが、増殖できない状態になっているかあるいは死滅していると我々は推測している。

#### 4.2. CCS サイトにおける原位置研究

CCS サイトにおける微生物の原位置研究は非常に少ない。ここでは北海道石狩炭田夕張市の CO<sub>2</sub>-ECBM 実証サイトで得られた知見と、石炭層ではないがドイツ Ketzin の CCS サイトで得られた知見について紹介する。

石狩炭田の CO<sub>2</sub>-ECBM 実証サイトでは先にも述べたように試験期間中に炭層に注入された CO<sub>2</sub> は生産井に達しなかった。そのため、生産井 PW-1（図 1）への到達が確認されている N<sub>2</sub> の微生物影響について説明する。PW-1 の N<sub>2</sub> 濃度は 2006 年 5 月から急激に増加したため、この時期に注入井 IW-1 から注入した N<sub>2</sub> が PW-1 に到達したと判断した（N<sub>2</sub> の生産井への到達をブレイクスルーとする）。これにより著者らは N<sub>2</sub> のブレイクスルー前後の炭層地下水を用いて微生物群集構造の比較を行った。PW-1 生産水の古細菌の群集構造と N<sub>2</sub> 注入による影響を図 6 に示した。PW-1 のアーキアの 90%以上はメ

表 3. *E. coli* JCM 20137 株の細胞数に対する超臨界 CO<sub>2</sub> の影響。

計測方法	処理方法 (35°C, 10 MPa)	処理前	1 日後	7 日後
直接計数法 cells/ml (DAPI)	超臨界 CO <sub>2</sub>	5.1 × 10 <sup>8</sup>	3.8 × 10 <sup>8</sup>	2.9 × 10 <sup>8</sup>
	N <sub>2</sub>		6.2 × 10 <sup>8</sup>	3.0 × 10 <sup>8</sup>
平板培養法 CFU/ml	超臨界 CO <sub>2</sub>	4.4 × 10 <sup>8</sup>	0	0
	N <sub>2</sub>		6.6 × 10 <sup>8</sup>	5.6 × 10 <sup>7</sup>

表 4. 深部地下水中の細胞数に対する超臨界 CO<sub>2</sub> の影響。

計測方法	処理方法 (35°C, 8 MPa)	処理前	1 日後	28 日後
直接計数法 cells/ml (DAPI)	超臨界 CO <sub>2</sub>	8.8 × 10 <sup>5</sup>	8.1 × 10 <sup>5</sup>	6.2 × 10 <sup>5</sup>
	N <sub>2</sub>		4.2 × 10 <sup>6</sup>	1.8 × 10 <sup>7</sup>

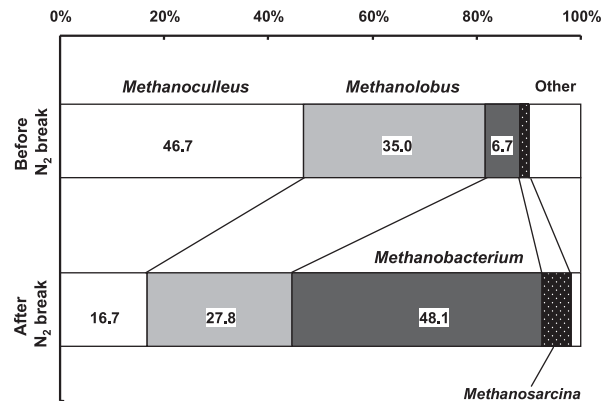


図 6. 北海道石狩炭田夕張地域における N<sub>2</sub> ブレイクスルー前後の PW-1 産出炭層地下水中の古細菌の系統の変化。

タン生成微生物で占められているが、N<sub>2</sub> のブレイクスルーによりメタン生成微生物の種組成が大きく変化すること、特に *Methanobacterium* 属の比率がブレイクスルー後に増加する傾向が観察された。ブレイクスルー前後の微生物群集構造の AMOVA 分析<sup>32)</sup> の結果、古細菌の遺伝的多様性に有意差 ( $p < 0.05$ ) がみられたが真正細菌では統計的な差異は認められなかった。以上の結果は地下に圧入した N<sub>2</sub> が炭層のメタン生成微生物の群集構造、すなわち炭層のメタン生成プロセスに影響を与えることを示唆しているのかもしれない。本プロジェクトは CO<sub>2</sub> が PW-1 に到達する前に終了したため、CO<sub>2</sub> が炭層微生物に与える影響を明らかにすることができていない。CO<sub>2</sub> の地中圧入は地下水 pH の著しい低下を招くことが予想されるため、炭層の微生物群集にも少なからず影響を与えることが予想される。

独 Ketzin の CCS サイトでは深度 800 m の帯水層に CO<sub>2</sub> 注入前後の全菌数や特定の微生物種の経時変化を FISH 法などによりモニタリングしている。全菌数は CO<sub>2</sub> 注入直後に減少し、その後約 1 ヶ月で CO<sub>2</sub> 注入前のレベルに復元することが報告されている<sup>33)</sup>。一方、帯水層中の pH は CO<sub>2</sub> 注入前約 7 であったが注入後約 5 まで減少したまま観測 5 ヶ月目まで安定しており、CCS

が帯水層中の化学的環境に大きな影響を与えたことが確認されている。微生物群集構造の変化については CO<sub>2</sub> 注入前の群集構造の変動幅が大きいためバックグラウンドデータが安定していないが、CO<sub>2</sub> 注入後 2 ヶ月間の短期的な観測データからは、古細菌の一時的な増加と硫酸還元微生物の消失が報告されている。このようにこの研究事例では CCS は帯水層中の化学的環境および微生物に影響を与えることが示唆された。しかし、この事例では微生物の活性を培養法により評価していないため、前述のように超臨界 CO<sub>2</sub> により活性を失っている（あるいは死滅している）細胞を観測している可能性もある。

以上のように CCS による微生物影響評価に関する知見は非常に少なく、多くの課題がある。著者らが最も重要と考えている課題は、超臨界 CO<sub>2</sub> により炭層の微生物が活性を失うかあるいは死滅するかどうかである。このことを正しく評価することによって、CCS サイトにおいて温室効果ガスの地中隔離とバイオメタン生産の両立が可能であるのかを判断することができる。そのためには、CCS サイトにおける微生物群集構造について、それらが活着しているかどうかを判別できる培養法等を主とした評価手法を検討する必要がある。

## 5. 石炭層におけるバイオメタン生産の試み

海外の石炭層におけるバイオメタン生産研究の概況を表 5 に示した。すべて北米の炭層に関するものであり、Powder River の亜瀝青炭に報告（4 例）が集中している。他に South Texas の亜瀝青炭、アラスカの褐炭についての報告があるのみである。この中でもっとも研究が進んでいるのがアメリカ合衆国地質調査所の Jones らのグループであり、South Texas と Powder River の亜瀝青炭を用いてバイオスティミュレーション（Biostimulation）とバイオオーグメンテーション（Bioaugmentation）技術によりメタン生成に成功している<sup>34,35</sup>。両技術を比較した場合、バイオスティミュレーションのみではメタン生成反応が定常値に達するまでに約 100 日間を要しているが、バイオオーグメンテーション技術を併用することにより、反応日数を約半分まで短縮することに成功している。Jones らの実験系では 50–60 日間で約 80 μmole (1.8 ml)/g coal のメタン生成がなされており、この数値は商業用炭層ガス鉱床のメタンガス包蔵量<sup>38</sup>) に匹敵する（表 6）。これに対して、Green ら<sup>11</sup>) が行った研究では約 18 日間で 20 μmole (4.8 ml)/g coal のメタン生成がなされている。しかし、Green らの実験系では添加物として酵母エキスが加えられている点や微生物添加量が反応溶液の 10% (vol.) にも及ぶ点で、炭素源を石炭のみ

表 5. 炭層におけるバイオメタン生成研究。

Area	Coal bed	Coal rank <sup>a</sup>	Treatment <sup>b</sup>	CH <sub>4</sub> produced	Lag time	Time to peak CH <sub>4</sub> level	Intermediates observed	Phylotype	Ref.
				μmole/g coal	days	days			
South Texas, USA (Indio Formation, Paleocen-Eocene Wicox Group)			BA	80	18	50–60	Acetate	Archaea; <i>Methanosaeta</i> , <i>Methanosarcina</i> , Bacteria; <i>Geobacter</i> , <i>Azonexus</i> , <i>Pelotomaclum</i>	Jones <i>et al.</i> , 2010 <sup>35</sup> )
			BS	60	75	100			
			BA	80	10	70			
			BS	60	80	100			
Powder River Basin, Wyoming, USA (Fort Union Formation, Paleocene)	upper Wyodak split bed	SB	BA	23	<5	40			Jones <i>et al.</i> , 2008 <sup>34</sup> )
	upper Wyodak split bed		BS	13	60	100			
	lower Wyodak split bed		BA	8	<5	40			
	Pawnee			9	<5	40			
			BA+BS	200	3	18			
				10	<10	90			
Fort Yukon, Alaska, USA (late Miocene)	Shallower	BC	BS	18	100	>350	Acetate	Ulrich <i>et al.</i> , 2008 <sup>37</sup> )	
	Deeper			14	15	38	Acetate		
				6	30	250–350	Acetate		

<sup>a</sup> SB; Subbituminous coal, BC; Brown coal.

<sup>b</sup> BA; Bioaugmentation, BS; Biostimulation.



表 6. 商業用炭層ガス鉱床のメタン包蔵量<sup>38)</sup>。

Basin	Coal Rank	Gas Content <sup>a</sup>		
		scf/ton coal	m <sup>3</sup> /t coal	μmole/g coal
San Juan (US)	Bituminous	300–600	8.4–16.8	375–750
Uinta (US)	Bituminous	425	11.9	531
Black Warrior (US)	Bituminous	250–500	7–14	313–625
Powder River (US)	Subbituminous	30–70	0.84–1.96	38–88
Western Canadian Sedimentary (Alberta)	Subbituminous	55–110	1.54–3.08	69–138
Bowen (Australia)	Bituminous	200–400	5.6–11.2	250–500
Qinshui (China)	Anthracite	300–900	8.4–25.2	375–1125

<sup>a</sup> scf/ton, 標準立方フィート /ton (=0.028m<sup>3</sup>/t, 15.6°C・1 atm) として換算した。

としている他の研究事例とは一線を画すべきかもしれない。

炭層バイオメタン生成研究における興味深い点として、酢酸が重要な中間代謝物であることを示唆する報告が複数ある(表5)。この事象は亜歴青炭と褐炭の両方で観察されている。これらの報告では反応開始とともに酢酸濃度の増加が生じ、続いてメタン濃度の増加にともない酢酸濃度の減少が観察されている。Jones ら<sup>35)</sup> はメタン濃度の増加にともない酢酸をメタン生成基質とすることが報告されている *Methanosaeta* 属および *Methanosarcina* 属の 16S rRNA 遺伝子のコピー数の増加を報告している。Green ら<sup>11)</sup> は、酢酸濃度については言及していないが石炭バイオメタン生成実験において *Methanosarcina* 属の 16S rRNA 遺伝子のみが検出されたことを報告している。このように石炭からのバイオメタン生成プロセスは酢酸を基質としたメタン生成反応が重要なプロセスとなっている可能性が高い。Jones らは石炭からのバイオメタン生成プロセスについて、かれらが検出した微生物の系統や石炭関連化合物の分解反応に関する過去の報告などをもとに考察を行っている。参考までに Jones らが提案している石炭からのバイオメタン生成モデル<sup>35)</sup> を図7に示す。図7では、酢酸が石炭からのバイオメタン生成プロセスにおいて重要な中間代謝物でありメタン生成基質であることおよび石炭から生成されたアルカンや芳香族化合物などが酢酸の根源物質であることが提案されている。

石炭からのバイオメタン生成における根源物質は明らかになっていないが、興味深い報告がいくつかある。Harris ら<sup>36)</sup> はアラスカの褐炭と Powder river の亜歴青炭のクロロホルム抽出画分とバイオメタン生成量に正の相関があることを報告しており、Green ら<sup>11)</sup> は Powder river の亜歴青炭についてある種の有機溶媒を添加したところ、メタン生成量が飛躍的に増加したことを報告している。これらの報告は有機溶媒により溶出される石炭中の脂質がバイオメタン生成の根源物質である可能性を示唆している。

今後、石炭中の有機物の特徴付けとバイオメタン生成実験系から単離された株を用いて各反応プロセスを検証していくことにより、石炭からのバイオメタン生成プロセスの詳細が明らかになることを期待したい。

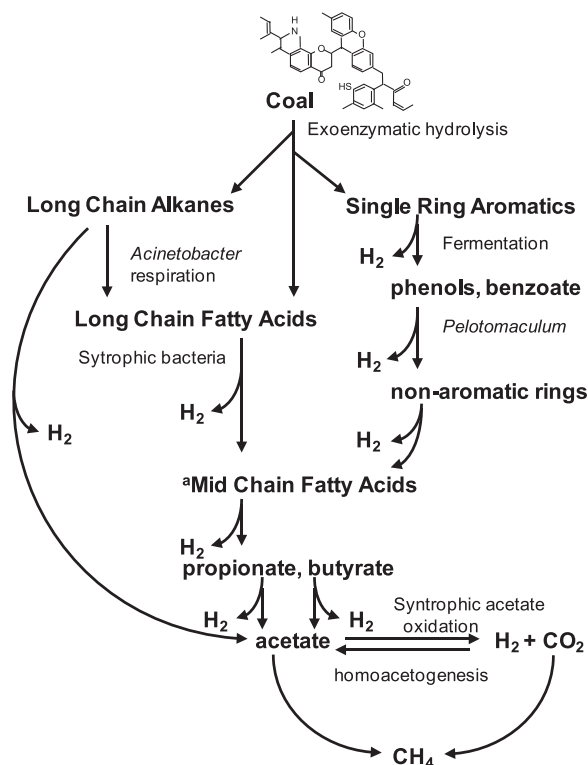


図7. Jones らが彼らの最近の研究や他のラボの過去の研究に基づいて提案している石炭からのバイオメタン生成モデル<sup>35)</sup>。

<sup>a</sup>Mid-chain fatty acids は培養試験において検出されていない。

## 6. まとめ

石炭層におけるバイオメタン生産を目指した研究はまだ始まったばかりである。今後、石炭層の初期状態の微生物生態、CCS サイトにおける原位置研究、バイオメタン生産のための科学および工学研究に関心が集まり、様々な分野から多くの方々がこの研究に参加されることにより、炭層利用に関する先端的・学際的な研究成果が充実するとともに炭層バイオメタン鉱床開発が国内外においてエネルギー・環境問題に対する革新的な環境調和型資源開発の貢献策の一つとして実を結ぶことを願う。



## 謝 辞

この研究は経済産業省の予算で行われた。本稿紹介した石狩炭田夕張地域の CCS-ECBM サイトの情報は(財)石炭エネルギーセンターから提供して頂いた上、多くのご助言を頂いた。心から謝意を表す。

## 文 献

- 1) Shimada, S., H. Koide, and K. Yamazaki. 2010. Geological CO<sub>2</sub> storage by underground coal gasification. *J. MMIJ.* 126: 602–607.
- 2) Strapoć, D., M. Mastalerz, K. Dawson, J. Macalady, A.V. Callaghan, B. Wawrik, C. Turich, and M. Ashby. 2011. Biogeochemistry of microbial coal-bed methane. *Annu. Rev. Earth Planet Sci.* 39: 617–656.
- 3) Shimada, S. 1995. State of arts of coalbed methane development. *J. MMIJ.* 111: 135–143.
- 4) Damen, K., A. Faaij, F. van Bergen, J. Gale, and E. Lysen. 2005. Identification of early opportunities for CO<sub>2</sub> sequestration—worldwide screening for CO<sub>2</sub>-EOR and CO<sub>2</sub>-ECBM projects. *Energy.* 30: 1931–1952.
- 5) Nako, M. and M. Fujioka. 2005. Multi well pilot test for Japan CO<sub>2</sub> geosequestration in coal seams project. *J. MMIJ.* 121: 461–464.
- 6) Yamaguchi, S., K. Ohga, M. Fujioka, and M. Nako. 2006. Field test and history matching of CO<sub>2</sub> sequestration project in coal seams in Japan. *Int. J. Soc. Mater. Eng. Resour.* 13: 64–69.
- 7) Shimizu S., M. Akiyama, T. Naganuma, M. Fujioka, M. Nako, and Y. Ishijima. 2007. Molecular characterization of microbial communities in deep coal seam groundwater of northern Japan. *Geobiology.* 5: 423–433.
- 8) Whiticar, M.J., E. Faber, and M. Schoell. 1986. Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO<sub>2</sub> reduction vs. acetate fermentation-isotope evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 50: 693–703.
- 9) Claypool, G.E. and K.A. Kvenvolden. 1983. Methane and other hydrocarbon gases in marine sediment, pp. 299–327. In G.W. Wetherill (ed.) *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 11. Annual Reviews Inc., Palo Alto, California.
- 10) Klein, D.A., R.M. Flores, R.E. Hanson, C.N. Venot, K. Gabbert, R.A. Schmidt, A. Pruden, and G.D. Stricker. 2008. Molecular sequences derived from Paleocene Fort Union Formation coals vs. associated produced waters: Implications for CBM regeneration. *Int. J. Coal. Geol.* 76: 3–13.
- 11) Green, M.S., K.C. Flanagan, and P.C. Gilcrease. 2008. Characterization of a methanogenic consortium enriched from a coalbed methane well in the Powder River Basin, U.S.A. *Int. J. Coal. Geol.* 76: 34–45.
- 12) Penner, T.J., J.M. Foght, and K. Budwill. 2010. Microbial diversity of western Canadian subsurface coal beds and methanogenic coal enrichment cultures. *Int. J. Coal. Geol.* 82: 81–93.
- 13) Midgley, D.J., P. Hendry, K.L. Pinetown, D. Fuentes, S. Gong, D.L. Mitchell, and M. Faiz. 2010. Characterisation of a microbial community associated with a deep, coal seam methane reservoir in the Gippsland Basin, Australia. *Int. J. Coal. Geol.* 82: 232–239.
- 14) Orphan, V.J., L.T. Taylor, D. Hafenbradl, and E.F. Delong. 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 700–711.
- 15) Watanabe, K., Y. Kodama, N. Hamamura, and N. Kaku. 2002. Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3899–3907.
- 16) Takai, K., M.R. Mormile, J.P. McKinley, F.J. Brockman, W.E. Holben, W.P. Kovacik Jr, and J.K. Fredrickson. 2003. Shifts in archaeal communities associated with lithological and geochemical variations in subsurface Cretaceous rock. *Environ. Microbiol.* 5: 309–320.
- 17) Shimizu, S., M. Akiyama, Y. Ishijima, K. Hama, T. Kunimaru, and T. Naganuma. 2006. Molecular characterization of microbial communities in fault-bordered aquifers in the Miocene formation of northernmost Japan. *Geobiology.* 4: 203–213.
- 18) Moser, D.P., T.M. Gihring, F.J. Brockman, J.K. Fredrickson, D.L. Balkwill, M.E. Dollhopf, B.S. Lollar, L.M. Pratt, E. Boice, G. Southam, G. Wanger, B.J. Baker, S.M. Pfliffer, L.H. Lin, and T.C. Onstott. 2005. *Desulfotomaculum* and *Methanobacterium* spp. dominate a 4- to 5-kilometer-deep fault. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8773–8783.
- 19) Kotelnikova, S. and K. Pedersen. 1998. Distribution and activity of methanogens and homoacetogens in deep granitic aquifers at Äspö hard rock laboratory, Sweden. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 121–134.
- 20) Dojka, M.A., P. Hugenholtz, S.K. Haack, and N.R. Pace. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3869–3877.
- 21) Jackson, B.E., V.K. Bhupathiraju, R.S. Tanner, C.R. Woese, and M.J. McInerney. 1999. *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Arch. Microbiol.* 171: 107–114.
- 22) Grabowski, A., D. Blanchet, and C. Jeanthon. 2005. Characterization of long-chain fatty-acid-degrading syntrophic associations from a biodegraded oil reservoir. *Res. Microbiol.* 156: 814–821.
- 23) Strapoć, D., F.W. Picardal, C. Turich, I. Schaperdoth, J.L. Macalady, J.S. Lipp, Y.S. Lin, T.F. Ertefai, F. Schubotz, K.U. Hinrichs, M. Mastalerz, and A. Schimmelmann. 2008. Methane-producing microbial community in a coal bed of the Illinois basin. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2424–2432.
- 24) Doerfert, S.N., M. Reichlen, P. Iyer, M. Wang, and J.G. Ferry. 2009. *Methanolobus zinderi* sp. nov., a methylotrophic methanogen isolated from a deep subsurface coal seam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1064–1069.
- 25) Krüger, M., S. Beckmann, B. Engelen, T. Thielemann, B. Cramer, A. Schippers, and H. Cypionka. 2008. Microbial methane formation from hard coal and timber in an abandoned coal mine. *Geomicrobiol. J.* 25: 315–321.
- 26) Li, D., P. Hendry, and M. Faiz. 2008. A survey of the microbial populations in some Australian coalbed methane reservoirs. *Int. J. Coal. Geol.* 76: 14–24.
- 27) Chin, K.J., T. Lukow, and R. Conrad. 1999. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic archaeal community in an anoxic rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2341–2349.
- 28) Eder, W., W. Ludwig, and R. Huber. 1999. Novel 16S rRNA gene sequences retrieved from highly saline brine sediments of Kebrüt Deep, Red Sea. *Arch. Microbiol.* 172: 213–218.
- 29) Takai, K., D.P. Moser, M. DeFlaun, T.C. Onstott, and J.K. Fredrickson. 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5750–5760.
- 30) Fuhrmann, J.A., K. McCallum, and A.A. Davis. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature.* 356: 148–149.
- 31) Dillow, A.K., F. Dehghani, J.S. Hrkach, N.R. Foster, and R. Langer. 1999. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *PNAS.* 96: 10344–10348.
- 32) Schneider, S., D. Roesseli, and L. Excoffier. 2000. Arlequin version 2.000, a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

- 33) Morozova, D., M. Wandrey, M. Alawi, M. Zimmer, A. Vieth, M. Zettlitzer, and H. Wurdemann. 2010. Monitoring of the microbial community composition in saline aquifers during CO<sub>2</sub> storage by fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Greenhouse Gas Control*. 4: 981–989.
- 34) Jones, E.J., M.A. Voytek, P.D. Warwick, M.D. Corum, A. Cohn, J.E. Bunnell, A.C. Clark, and W.H. Orem. 2008. Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples. *Int. J. Coal Geol.* 76: 138–150.
- 35) Jones, E.J., M.A. Voytek, M.D. Corum, and W.H. Orem. 2010. Stimulation of methane generation from nonproductive coal by addition of nutrients or a microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7013–7022.
- 36) Harris, S.H., R.L. Smith, and C. E. Barker. 2008. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals. *Int. J. Coal Geol.* 76: 46–51.
- 37) Ulrich, G. and S. Bower. 2008. Active methanogenesis and acetate utilization in Powder River Basin coals, United States. *Int. J. Coal Geol.* 76: 25–33.
- 38) Jenkins, C.D. and C.M. Boyer II. 2008. Coalbed- and shale-gas reservoirs. *J. Petrol. Tech.* 60: 92–99.