

II-105 伊豆沼底質から分離した硫酸還元菌の活性測定結果とメタン生成細菌の 純粋大量培養法の検討

東北学院大学工学部 学生員 ○田村 淳
同 中鉢 邦廣
同 正 員 遠藤 銀朗

1. はじめに

湖沼底泥は微小動物による食物連鎖や嫌気性微生物による有機物の分解を通して、湖沼の自浄作用に大きく寄与していると考えられる。底泥中の有機物の分解においては、まずClostridium 属の嫌気性細菌のような加水分解能力を持った微生物が関与し高分子有機物の低分子化がなされる。低分子化された有機物は硫酸還元菌や酢酸生成細菌などによって H_2 、ギ酸、酢酸などに変換された後、最終的にメタン生成細菌によってガス状物質に変えられ湖沼系外へ放出される。通常の湖沼に流入する河川水中の硫酸イオン濃度はBOD濃度に比較して高く、硫酸還元菌による有機物の分解は有機物分解経路における大きな比率を占めていると考えられる。本研究では湖沼底泥での有機物分解における硫酸還元菌の役割に注目して、宮城県北部に位置しラムサール条約の指定湖沼でもある伊豆沼に生息する嫌気性細菌を分離し、それらの増殖活性と硫酸還元活性を調べた。また、本研究においては、嫌気的環境における有機物分解の終結者として重要な役割を担っているメタン生成細菌を材料として、この微生物の生化学的特徴を調べるにあたって、まず必要とされる菌体を得るための大量培養方法を検討した。

2. 実験方法

伊豆沼底泥試料は0～12cmの底泥層をパイプによってコア状にサンプリングした。この底泥1g（湿重）を9mlの塩酸システイン（0.3mg/ml）およびレサズリン（0.01mg/ml）を含んだ脱酸素滅菌生理食塩水に懸濁した後、無酸素ガス噴射下で超音波処理して分散をはかり10倍希釈法によって分離用サンプルを調整した。これを硫酸還元菌用分離培地（固体培地）によって作成したロールチューブ中で培養して硫酸還元菌特有の黒色コロニーを形成させた。この黒色コロニーから形状などの異なる数種を選び出し液体培地に植え継いで増殖速度および硫酸還元速度の測定に用いた。増殖速度は、ブチルゴム栓で封じたL型試験管を用いてモノー振盪培養によったが、菌数の計数は、アクリジンオレンジ直接計数（AODC）法によった。硫酸還元量の測定は、よう素滴定法による硫化物測定に基づいて行なった。

メタン生成細菌の大量培養には、ドイツ微生物保存連盟（DSM）より購入した6種の標準メタン生成細菌を用いた。大量培養方法としては、バイアルビンによるバッチ培養法と三角フラスコを用いた H_2 、 CO_2 混合ガスの連続通気培養法について試験した。三角フラスコによる連続通気培養システムを図-1に示した。

3. 実験結果

硫酸還元菌の増殖活性および硫酸還元活性の結果は、各々図-2および図-3に示した通りである。これらの結果より、増殖の速いものは硫酸還元活性も高いことが知られた。最も増殖速度の速い硫酸還元菌は1日で増殖のピークに達した。遅い菌株は増殖のピークに達するのに約10日を要した。これらのことから、伊豆沼底質中の硫酸還元菌の多様性をうかがうことができた。

メタン生成細菌の大量培養実験では、6種のうち4種の大量培養に成功した。高温性メタン生成細菌であるMethanobacterium thermoautotrophicumの場合には、培地水分の蒸発によって連続通気培養

ができなかった。バイアルビン培養では4種のすべてのメタン生成細菌の大量培養が可能であった。得られた菌体量は、*Methanobacterium formicicum* で90 mg/100ml培地、*Methanobrevibacter arboriphilus*で37.5 mg/100ml、*Methanococcus voltae*で54.5 mg/100ml、*Methanobacterium thermoautotrophicum*で60 mg/100mlであった。以上のようにこれまで生理的特徴や細胞物質を調べるにあたって十分な菌体を得ることができていなかったメタン生成細菌の大量培養法を確立することができた。

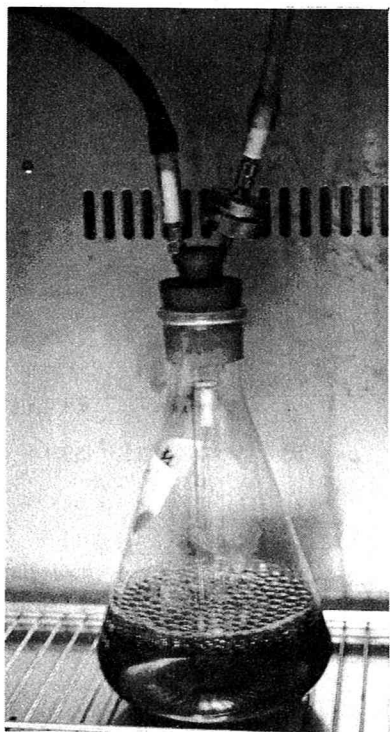


図-1 連続通気培養システム

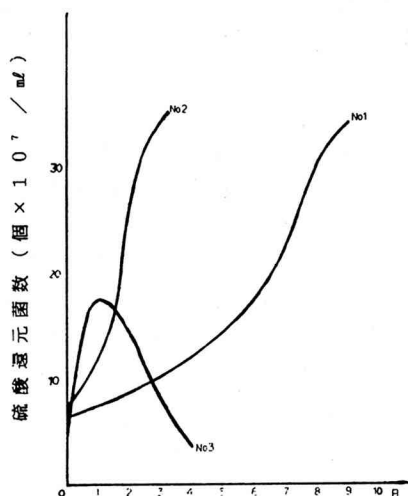


図-2 硫酸還元菌数の経日変化

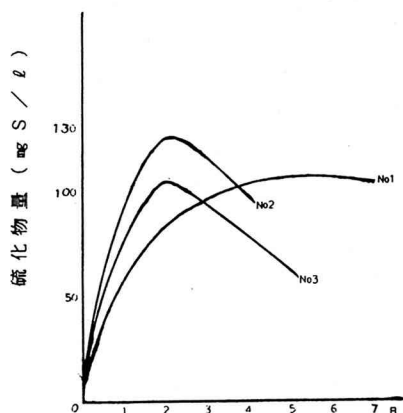


図-3 硫化物濃度の経日変化