

Ⅱ－108 湖沼底泥からのメタン生成細菌の分離と大量培養法に関する研究

東北学院大学工学部 学生員 ○大庭 佳彦

同 石川 広幸

同 正 員 遠藤 銀朗

１．はじめに

メタン生成細菌は絶対嫌気性細菌であるため、純粋培養が極めて困難な微生物の一つである。しかし、この微生物の物質代謝の能力は嫌気的環境における有機物分解による環境の浄化あるいは温室効果ガスであるメタンの生産などを通して、環境工学上の重要な研究課題を提供している。本研究では、湖沼底泥での有機物分解におけるメタン生成細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ある伊豆沼に生息するメタン生成細菌の分離を試みた。また、昨年度の報告に引き続き、メタン生成細菌の遺伝子工学のための生体材料（DNAおよびRNA）を抽出するための細菌細胞の大量取得を目的として、大型バイアルビンを用いる方法を更に開発し改良を加えたとともに、メタン生成細菌の増殖特性を吸光度によって測定するための装置を開発したので報告する。

２．実験方法

宮城県北部に位置する淡水湖沼である伊豆沼より底泥を採取し、これを微生物源としてメタン生成細菌の分離培養を行った。この場合、ガス噴射法によって嫌気的に１０倍希釈した伊豆沼底泥を嫌気的に調整したロールチューブに接種し、ハンゲート法によってロールチューブ内の寒天培地上にコロニーを形成させた。形成されたコロニーのうち約１０コロニーを嫌気ボックス中で液体培地（水素／炭酸ガス基質または酢酸基質）に移して培養を行い、メタンガスの発生の確認、顕微鏡による観察を行った。

メタン生成細菌の大量培養方法の開発に付いては、昨年度実施した、水素／炭酸ガス系基質での培養¹⁾とは異なる種類のメタン生成細菌として、蟻酸を利用する *Methanobacterium formicicum* (DSM 1312)、酢酸を利用する *Methanosarcina barkeri* (DSM 804)、および *Methanothrix soehngenii* (DSM 1312)、および好温メタン生成細菌の *Methanobacterium thermoautotrophicum* (DSM 2133) の４種を用いて、大型バイアル（７００ml）を用いた培養方法を開発し、これらの菌体回収を試みた。

また同時に、これらのメタン生成細菌の増殖特性を簡便に調べる方法として、嫌気性のＬ型試験管およびそれを用いて行う濁度測定装置を試作して使用した。また濁度と菌数の関係については、濁度測定時のサンプルをアクリジンオレンジ蛍光染色法（AODC）によって蛍光顕微鏡での測定を行い、メタン生成細菌ごとの菌数換算を可能とした。

３．実験結果

３－１．メタン生成細菌の分離培養；完全な純粋培養メタン生成細菌を取得することは出来なかったが、水素／炭酸ガス基質から非常に活発にメタンガスを生産するメタン生成細菌の部分純化した培養を行うことが出来た。写真－１に示したこの微生物は、Ｂ２励起の蛍光顕微鏡下で青色自家蛍光を出すことから、 F_{420} を保有する水素／炭酸ガス資化性の球状メタン生成細菌（*Methanococcus* 属に含まれるか？）と考えられる。しかし、写真－２示したようにまだそれ以外の細菌の混入が認められており、次段階の純化培養が必要とされる。

３－２．メタン生成細菌の大量培養結果；７００mlバイアルビンによる大量培養を行った結果、得られた菌体量は各メタン生成細菌について表－１に示した通りである。培地液量は、水素／炭酸ガス／蟻酸基質の場合

合100ml、酢酸／メタノール基質の場合300mlとした。また、酢酸／メタノール基質の場合には振とうは行わず静置培養したものである。得られた菌体量のうち、Methanothrix soehngenii が最も少量であったが、16S rRNA および染色体DNAの調整のためには十分な量が取得できた。

3-3. メタン生成細菌の増殖特性；特殊L型試験管による増殖速度測定結果（濁度の増加による）を図-1および図-2に示した。また、AODC法によって測定した濁度と細菌細胞数の関係を表-2に示した。図-1、2のように Methanobacterium thermoautotrophicum は極めて速い増殖を示すのに対して、Methanoxanthobacteriumはその1/20に満たない増殖速度であることが知られた。

(参考文献)1) 田村,中鉢,遠藤；土木学会東北支部年講 p 270-271 (1990)



写真-1

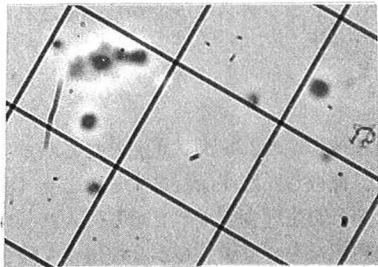


写真-2

表
|
1

メタン生成細菌	菌体収量 (湿重 g/L)
Methanobacterium formicum	2.20
Methanosarcina barkeri	11.3
Methanothrix soehngenii	0.577
Methanobacterium thermoautotrophicum	1.11

表
|
2

メタン生成細菌	AODC (10 ⁸ cell/mL) 当たりの濁度 (OD ₆₅₀)
Methanobacterium formicum	0.213
Methanosarcina barkeri	0.383
Methanothrix soehngenii	0.007
Methanobacterium thermoautotrophicum	0.201

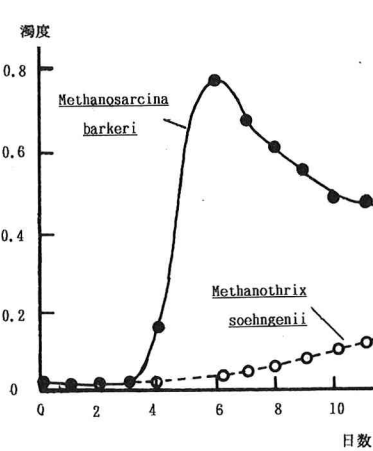


図-1

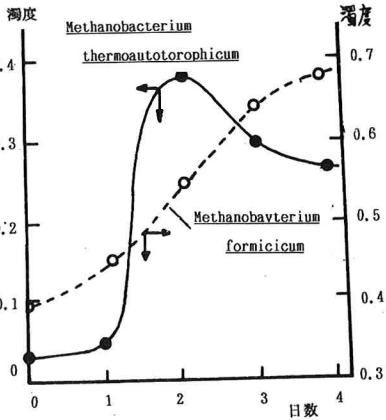


図-2