

〔醸酵工学 第56巻 第4号 249-257, 1978〕

メタン資化性細菌の分離とその性質

太田 欽幸・足立 融・小田 耕造

広島大学水畜産学部食品工業化学科

Isolation and characterization of methane utilizing bacteria. OHTA, Y., Y. ADACHI, and K. ODA (*Department of Food Science and Technology, School of Fisheries and Animal Husbandry, University of Hiroshima, Fukuyama, Hiroshima 720*) *Hakkokogaku* 56: 249-257. 1978.

Active enrichment cultures were obtained using soil as seed. Culture No. 12 growing most abundantly on methane was selected for further study. The culture, however, contained two kinds of bacteria as seen by microscopic observation. They were separated by Lindner's drop culture method. One bacterium, strain M, which was determined to be *Methylosinus* sp., was able to grow on methane and methanol as a sole carbon source, but the other, strain G, which was identified as *Pseudomonas* sp., could grow on glucose, methanol, and formaldehyde, but not on methane. The growing ability of strain M decreased within 1 month when it existed alone. Strain M showed poor growth on methane when it grew alone, but its growth on methane was enhanced 6-7 times as much as its pure culture when it was mixed with strain G. Strain M could also grow on methane abundantly in the medium containing the supernatant fluid of the cultured broth of strain G with methanol. Strain M was supposed to supply methanol, which is the intermediate metabolite of methane, to strain G.

Culture No. 12 is thought to be a new system of mixed culture different from others reported so far, based on differences of cultural conditions, cell composition and amino acid composition of cell protein.

メタンを唯一の炭素源として生育するメタン資化性菌の研究は古くから行われている。¹⁾しかし、まだ未解決の問題が多く、その1つとして、メタン資化性菌を自然界から分離すると、種類の異なった細菌の混合培養として分離され、^{2,3)}それぞれを単独分離するとメタンに生育できなくなる³⁾ものがあるが、その理由は分かっていない。

そこで本報では、その理由を明らかにする目的で、自然界からメタン資化性菌を分離し、純粋分離を行い、単独培養と混合培養との比較、メタン資化性菌と混合可能な菌、および得られた菌体の成分の検討を行い、その結果を得たので報告する。

実験方法

供試菌 メタン資化性菌は福山市内の土壌から分

† メタン資化性細菌の混合培養に関する研究(第1報)
Studies on Mixed Culture of Methane Utilizing Bacteria (I)

離した。メタン資化性菌との共生混合菌として、*Escherichia coli* K-12, *Bacillus subtilis* IFO* 3007, *Pseudomonas fluorescens* NRRL** B-10, *Staphylococcus aureus* IFO 3060, および *Aerobacter aerogenes* IFO 3317 を用いた。

試薬 メタンは純度99.7%(日本酸素製)のものを、他の試薬は市販の特級品を使用した。

培地および培養方法 培地は Vary と Johnson²⁾ に従い KH_2PO_4 , 1.1g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.04g; $\text{NH}_4\text{-H}_2\text{PO}_4$, 0.3g; Na_2HPO_4 , 2.0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.04g; CaCl_2 , 0.03g; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $1.2 \times 10^{-4}\text{g}$ を 1l の蒸留水に溶解し、pH 6.8 に調節して調製した。平板培地はこれに 0.25N の KCl で洗浄した粉末寒天³⁾ 15g を加えて調製した。炭素源はメタンまたはグルコースを用

* Institute for Fermentation, Osaka.

** Northern Utilization Research and Development Division, U.S. Department of Agriculture, Peoria, U.S.A.

いた。滅菌は 120°C, 15 分間で行ったが, グルコースが炭素源の場合は無機塩類とは別途に殺菌し, 冷却後添加した。平板培養および試験管培養は 10 l 容のデシケーターを用い, デシケーター内にガスフローメーター (大阪フローメーター工業製 18-2510 型) で流量を測定しながら常圧で 2 l のメタンを入れて行った。さらに量を増やして 50 ml または 1 l の培養を行うには, Fig. 1 に示すガス置換用装置を取り付けた 500 ml または 5 l 容の坂口振とうフラスコを使用した。接種の際に用いた種菌培養液は, ガス置換用装置を取り付けた 500 ml 容の振とうフラスコに 50 ml の培地を入れ, 保存菌株からそれが斜面培養菌体ならば 1 白金耳, 液体培養液ならば 1 ml を接種し, 長い方のガラス管からフローメーターで液量を測定しながら, 常圧で 100 ml のメタンを入れ, スクリューコックを固く閉じて 30°C 4 日間振とう培養 (120 rpm) して作製した。なお, この培養の間は 24 時間毎にフラスコ中のガスを短い方のガラス管からアスピレーターで抜き, 新しい空気を入れ換えた後に, 新たに常圧で 100 ml のメタンを入れた。また, グルコースが炭素源 (0.2%) の場合は,

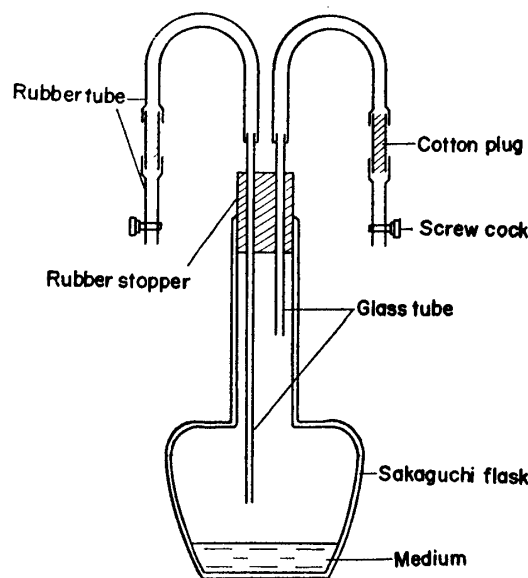


Fig. 1. Culture bottle with a gas changing apparatus used for growth of methane utilizing bacteria. An approximate amount of methane under atmospheric pressure was put in the flask through the long glass tube of the apparatus. During cultivation, the mixture of air and methane in the flask was replaced with fresh air by evacuation with an aspirator through the short glass tube, and then an approximate amount of methane was freshly put in the flask at 24-hr intervals.

綿栓をした 500 ml 容の坂口振とうフラスコに 50 ml の培地を入れ, 保存菌株を上記と同様に接種し, 30°C で 1 日間振とう培養し, これを種菌液として用いた。本培養にはこの種菌培養液を培地量に対して 2% 接種し, 種菌培養液の作製の場合と同様に培養を行った。生育度の測定は, ゴム栓を通して滅菌注射器で培養液を採取し, 660 nm における吸光度から, 検量曲線を用い計算した乾燥重量として表示した。

分離菌は, 斜面あるいは液体培地でデシケーター内メタン気相中で 30°C で 7 日間培養後, さらにメタン気相中で 5~6°C で保存した。

菌体成分の分析 液体培地で炭素源をメタンまたはグルコースとして得た菌体を 105°C で 24 時間乾燥後, 「衛生試験法」⁵⁾ に準拠し菌体成分の分析を行った。菌体たんぱく質の構成アミノ酸の分析は, 適量の乾燥菌体 (粗たんぱく質量として 50 mg 相当) を 3 ml の 6N HCl に懸濁させて, アンプル中で 110°C, 16 時間加水分解を行った。その後, その加水分解液をガラスフィルターでろ過し, 減圧下 35°C で蒸発乾燥させた。そして, その乾燥物を少量の蒸留水に溶解させ, さらに減圧下で蒸発乾燥を行った。この操作を塩素イオンの反応が無くなるまでくり返し, 最後に蒸発乾燥物を 50 ml の 0.2N ぐえん酸緩衝液 (pH 2.2) に溶解した。これをアミノ酸分析機 (日立製 304 型) を用いて分析した。なお, シスチンの定量は Schram ら⁶⁾ の方法に従って行った。

実験結果

メタン資化性菌の分離 メタン資化性菌の分離源として福山市内の各地の土壌, 河川水, 湖水, および沼泥を用いた。各分離源を固体の場合は滅菌生理食塩水に懸濁させ, 20 分間放置後, その上澄液を液体の場合はそのまま 1~2 滴をそれぞれ 20 ml 容の試験管に 7 ml 入れた液体培地に添加した。これをデシケーター内でメタン気相 (1 気圧) 下で 30°C, 10 日間培養した。その後, 生育の良好な培養液を 1 白金耳採り, 平板培地に塗抹した。この平板をデシケーター内メタン気相中で 1~2 週間 30°C で培養した。ついで, 良好に生育した単集落を白金耳で釣菌し, 再び平板培地で塗抹培養をくり返した。このようにして, 1~2 回の単集落分離では純粋分離は困難であるという Stock と McCleskey⁴⁾ の報告に従い, メタン資化性菌を分離した。その結果, 分離源 180 の試料から液体培養でメタンに良く生育した 20 本の 1 次培養を得た。その 1 白金耳を

平板培地に塗抹し、デシケーター内メタン気相中で 30°C 10日間培養すると、白色、桃色、または黄色を呈する直径が 1~1.5 mm の集落を形成した。その中でも桃色の集落がいずれの 1 次培養においても全体の 60~70% を占めていた。また、黄色の集落は、さらに単集落分離をくり返すと生育がみられなくなった。これらの黄色集落も含め 18 個の集落について試験管中でメタン気相下で液体培養を 30°C, 10日間行い、最も生育の良かった 1 次培養 No. 12 を選択した。

メタン酸化性菌は一般に純粋分離が非常に困難であるといわれている。そこで、先に選択した 1 次培養 No. 12 の純粋性を、集落の形、光学および電子顕微鏡による観察によって検討した。その結果、集落の色とその形は 2~3 回の上記と同じ方法で行った単集落分離で均一となったが、さらに 10 回の単集落分離をくり返した。この 1 次培養 No. 12 をメタン気相中で 30°C, 10日間平板培養をすると、その集落の色は桃色で、直径が約 1.5 mm であった。ついで、この 1 次培養 No. 12 をメタンを炭素源として Fig. 1 に示した 500 ml 容の振とうフラスコに液体培地を 50 ml 入れ、30°C, 4日間振とう培養を行った。これより培養液を 1 ml 採り、新しい 50 ml の液体培地に加えて 30°C, 4日間振とう培養を行い、この同じ操作を計 9 回くり返した。その後、この 1 次培養 No. 12 をフクシンで単染色し顕微鏡で観察すると桿菌が認められたが、その形が不揃いであったので、その純粋性に疑問が持たれた。そこで、

この培養液を直接電子顕微鏡で観察すると、明らかに形状の異なる細胞、ビブroid 状の細胞と桿状の細胞との 2 種類の細菌の混在が認められた。両細胞の混合割合は、ほぼ 1:1 であった。常法の単集落分離法や継代培養法では、これを分けることができなかった。そこで、一般に酵母の単細胞分離に用いられる Lindner の小滴培養法⁷⁾を用い、1 次培養 No. 12 中に含まれる 2 種類の細胞の分離を行った。それには、メタンを唯一の炭素源として、30°C, 4日間、1 次培養 No. 12 を振とう培養後、菌体を遠心分離 (17,000 × g, 5分) で集め、20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 2 回洗浄し、この菌体を液体培地に懸濁させた。この菌体懸濁液の小滴を製図用の丸ペンでカバーガラス上に作り、このカバーガラスをホールガラスの上に逆さにして置き、顕微鏡下で 1 細胞が存在する小滴を捜した。そして、ホールガラスのホール中の空気を注射器を用い綿ろ過した空気 4 とメタン 1 の混合気体で置換した。その後、カバーガラスをワセリンで固定密封した。水蒸気はワセリンを通して揮散しないが、メタンはワセリンを通して揮散するという Ribbons (私信) の研究結果に基づいて、このホールガラスを 5 l 容のデシケーターに入れ、ついで常圧下で 1 l のメタンを既述と同じようにして入れた。そして、30°C 4日間培養後、1 細胞から増殖した菌体が存在する小滴を殺菌ろ紙片で吸い取り、7 ml の液体培地に加え、デシケーター内メタン気相中で、30°C, 7日間培養した。一方、1 次培養 No.

Table 1. Characteristic descriptions of strain M.*

1. Morphological characters:
Shape and size: cells occurring, vibrios, 0.5–0.6 × 1.5–2.0 μm, non-motile.
2. Cultural characters:
Nutrient agar: no growth.
Mineral salts medium** agar colony: 0.1 mm in diameter after 12-day culture on methane at 30°C.
3. Physiological characters:
Gram stain: negative.
Strictly aerobic.
4. Assimilation of substrates:
Methane and methanol as sole carbon sources.
5. Temperature for growth:
Good growth at 30°C.

* This strain was obtained after separation by Lindner's drop culture method from the mixed culture, culture No. 12, which was isolated from soil by the enrichment culture method.

** Mineral salts medium described by Vary and Johnson²⁾ was employed throughout the present experiment.

12を0.2%のグルコースを唯一の炭素源とする液体培地で、30°C、1日間振とう培養し、その菌体を上記と同じ方法で処理し、単細胞分離を行った。ただし、この場合は、菌体は0.2%のグルコースを入れた液体培地に懸濁した。その結果、性状の異なる2種類の細菌が分離された。この2種類の細菌のうち、一方のビブroid状の細菌は、メタンおよびメタノールをそれぞれ唯一の炭素源として生育することができたが、グルコースを炭素源として生育できなかった。本菌株を以下M株と称し、その性質をTable 1にまとめた。M株は、ビブroid状の形態およびメタンを唯一の炭素源として生育する性質から Whittenbury ら⁸⁾ の分類による *Methylosinus* 属の細菌であると推定される。他方の桿菌は、炭素源としてグルコースに生育できたが、メタンを炭素源として利用できなかった。以下本菌株をG株と称する。このG株はグルコースの他に炭素源として、エタノール、*n*-プロパノール、*n*-ブタノールに良く生育し、しかも、これらの炭素源に比べ生育は

劣ったが、メタン代謝の中間体であるメタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸にも生育した (Table 2)。また、G株はTable 2に示すように、グラム陰性の好気的な運動性のある桿菌で、オキシダーゼ反応陽性、糖を酸化的に分解しガスを産生しない。これらの諸性質から、Bergey's Manual of Determinative of Bacteriology, 8th ed.⁹⁾ に従って、*Pseudomonas* 属の細菌である。

混合培養 M株を単独で培養すると生育が極端に悪くなり、メタン気相中平板培地で、30°C、12日間の塗抹培養で直径0.1mm程度の集落を形成したにすぎなかった。しかも、液体または平板培地で培養を4～5回くり返すうちに生育は衰え消滅してしまった。そこで、液体培地でメタンを炭素源として30°Cで、M株を単独またはG株と混合培養し、その生育状態を検討した。その結果、M株とG株とを混合培養すると、M株単独よりも6～7倍生育が促進された (Fig. 2)。前述のごとくG株のみではメタンには生育できなかった。ついで、Table 3に示す組み合わせで既知の

Table 2. Characteristic descriptions of strain G.*

1. Morphological characters:
Shape and size: cells occurring, single, straight rod, $0.5-0.7 \times 0.8-1.5 \mu\text{m}$, motile.
2. Cultural characters:
Nutrient agar colony: 2-3 mm in diameter, convex, circular, smooth, entire, yellowish white, opaque, fluorescent.
Nutrient agar slant: growth abundant, yellowish white, opaque, fluorescent.
Nutrient broth: turbid with sediment.
Gelatin stab: liquefaction.
3. Physiological characters:
Gram stain: negative.
Strictly aerobic.
Hydrolysis of starch: negative.
Utilization of citric acid: positive.
O-F test: oxidative.
Catalase reaction: positive.
Oxidase reaction: positive.
4. Assimilation of substrates:
Glucose, formic acid, acetic acid, formaldehyde, methyl alcohol, ethyl alcohol, *n*-propyl alcohol, *n*-butyl alcohol.
5. Temperature for growth:
Good growth at 30°C.
6. pH value for growth:
Good growth at pH 6 to 8.

* This strain was also obtained after separation by Lindner's drop culture method from culture No. 12.

細菌 5 株および G 株をそれぞれ M 株と液体培地でメタンを炭素源として 30°C で混合培養した結果、G 株のみに増殖促進効果があった。Table 1 と 2 に示す M および G 株のそれぞれの性質から、M 株と G 株とをメタンを炭素源として混合培養すると、M 株がメタンをメタノール等に酸化し、これを G 株が利用して生育することを示唆している。ついで、G 株を 1% のメタ

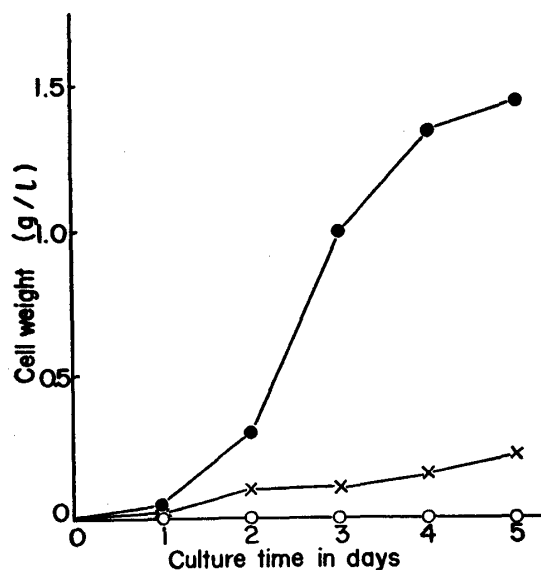


Fig. 2. Mixed and pure cultures of strains M and G on methane. Cultivation was performed at 30°C in a 500 ml-shaking flask with a gas changing apparatus as shown in Fig. 1, containing 50 ml of mineral salts medium. One hundred ml of methane under atmospheric pressure was introduced by the method given in Fig. 1.

Symbols: ●, mixed culture of strains M and G; ×, strain M alone; ○, strain G alone.

ノールを炭素源とする液体培地で、30°C、2日間振とう培養後遠心分離 (17,000×g, 5分) し、その上澄液を得た。これを減圧下 35°C で 2 分の 1 容に濃縮し、これを培地組成の 2 倍濃度の液体培地と 1:1 の割合で混合し、高圧滅菌して M 株を接種し、30°C 4日間振とう培養した。その結果、上澄液を入れた培地では添加しない培地に比べて M 株は 5~6 倍生育が促進された (Fig. 3)。従って、G 株の培養上澄液に M 株に対する生育促進物質の存在が示唆された。

混合培養の培養条件 M 株を単独で培養したり、またはメタン気相中で 5~6°C に保存しておく、約 1 カ月でメタン資化性能が劣化し、ついには消滅してしまった。そこで、最初自然界から分離した M 株と G 株との混合状態すなわち 1 次培養 No. 12 の培養条件を、既報^{2,3)} の混合培養の培養条件と比較するために検討した。1 次培養 No. 12 をメタンを炭素源として液体培地を用い、25, 30, 35, および 40°C でそれぞれ 4 日間振とう培養すると、30°C で最も良く生育し、35°C ではほとんど生育できなかった (Fig. 4)。つぎに、Table 4 に示す各種窒素源の窒素量を 44.8 mg/l として、窒素の形態の一次培養 No. 12 の生育に及ぼす影響を検討した結果、りん酸アンモニウム系の窒素源が良かった (Table 4)。また、硝酸態よりも、アンモニア態窒素での生育の方が良かった。さらに、生育促進的物質を見出す目的で液体培地 1 l 当たり、酵母エキス、ペプトン、脱脂大豆アルカリ抽出液、廃糖蜜、およびコーンステープリカーをそれぞれ 0.1 g、金属塩は Table 5 に示す濃度で培地に添加して、1 次培養 No. 12 に対するこれらの物質の生育促進効果を検討し

Table 3. Mixed culture of strain M with various authentic bacterial strains and strain G.

Combination	Cell weight* (g/l)
M	0.19
M+ <i>Escherichia coli</i> K-12	0.21
M+ <i>Bacillus subtilis</i> IFO 3007	0.19
M+ <i>Pseudomonas fluorescens</i> NRRL B-10	0.20
M+ <i>Staphylococcus aureus</i> IFO 3060	0.19
M+ <i>Aerobacter aerogenes</i> IFO 3317	0.18
M+G	1.20

* Cell yield obtained after 5-day culture at 30°C in a 500 ml-shaking flask with a gas changing apparatus as shown in Fig. 1, containing 50 ml of mineral salts medium. One hundred ml of methane gas under atmospheric pressure was introduced into the flask as a carbon source by the method given in Fig. 1.

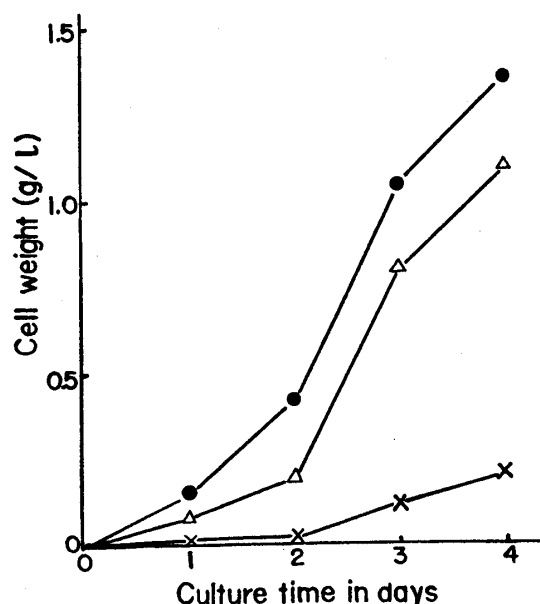


Fig. 3. Growth of strain M in the medium containing the supernatant fluid of strain G culture broth. Cultivation of strain M was performed at 30°C in a 500 ml-shaking flask containing 50 ml of the following medium with 100 ml of methane under atmospheric pressure introduced by method given in Fig. 1. The medium was prepared as follows: The culture broth of strain G grown at 30°C for 2 days in mineral salts medium with 1% methanol was centrifuged at $17,000 \times g$ for 5 min and the supernatant fluid was concentrated under vacuum at 35°C to half volume. Then, one part of the double-fold concentrated fluid was mixed with one part of the liquid medium with double fold amounts of ingredients of the medium. The mixture was the medium for growth of strain M after adjustment of pH to 6.8.

Symbols: ●, mixed culture of strains M and G; △, growth of strain M alone in the medium containing the supernatant fluid of the culture of strain G; ×, strain M alone.

た。その結果、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ のみが生育を促進し (Table 5), その検討した濃度の範囲では 100 mg/l が最適であった。それ以上 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ を培地に添加すると、多量の沈殿が生じたので添加できなかった。

菌体成分の分析 メタンあるいはグルコースに生育した 1 次培養 No. 12 のそれぞれの菌体成分の比較を行い、さらに既報²⁾ のメタン生育混合菌体の成分との比較を目的として実験した。Fig. 1 と同様のガス置換装置を取り付けた 5 l 容の振とうフラスコに 1 l の液体培地を入れ、1 次培養 No. 12 を炭素源がメタンの場合は 4 日間、グルコース (0.2%) の場合は 2 日間

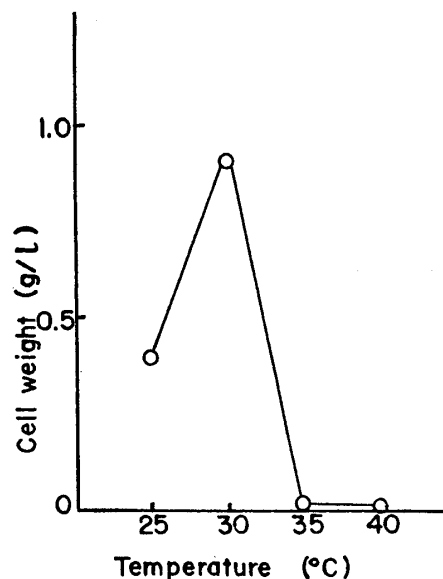


Fig. 4. Growth temperature of culture No. 12. Cell weights shown were obtained after 4-day culture in a 500 ml-shaking flask containing 50 ml of mineral salts medium. One hundred ml of methane under atmospheric pressure was introduced into the flask by the method given in Fig. 1.

それぞれ 30°C で振とう培養した。その後、遠心分離 ($17,000 \times g$, 5 分) で集菌し、105°C で 24 時間乾燥して、培地 1 l 当たりメタン生育菌体 1.2 g とグルコース生育菌体 1.1 g とを得た。メタン生育菌体の粗たんぱく質含量はグルコース生産菌体のそれより 20% 高かったが、粗脂肪の含量はグルコース生育菌体の方が逆に

Table 4. Effect of nitrogen form on growth of culture No. 12.

Nitrogen source	Cell weight* (g/l)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (44.8 mg N/l)	1.20
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.21
NH_4Cl	1.10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.00
NH_4NO_3	0.90
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0.00
KNO_3	0.00

* Cell yield obtained after 5-day culture at 30°C in a 500 ml-shaking flask containing 50 ml of mineral salts medium with each indicated nitrogen source. One hundred ml of methane gas under atmospheric pressure was introduced into the flask by the method given in Fig. 1.

Table 5. Effect of growth stimulating substances on growth of culture No. 12.

Substance	Concentration (g/l)	Cell weight* (g/l)
None	—	0.90
Yeast extract	0.1	0.80
Soy bean extract**	0.1	0.88
Waste molasses	0.1	0.90
Corn steep liquor	0.1	0.90
Fe ₂ (SO ₄) ₃	5×10 ⁻⁴	1.10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4×10 ⁻³	0.90
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3.4×10 ⁻⁴	0.80
MnCl ₂	3.0×10 ⁻⁴	0.92
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.4×10 ⁻⁴	0.90
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4.4×10 ⁻⁵	0.85

* Cell yield obtained after 4-day culture at 30°C in a 500 ml-shaking flask containing 50 ml of mineral salts medium with indicated amount of each substance. One hundred ml of methane gas under atmospheric pressure was introduced into the flask by the method given in Fig. 1.

** Filtrate of 10% defatted soybean extracted in 0.1 N NaOH at room temperature, overnight.

Table 6. Chemical analysis of cells of culture No. 12 grown on methane and glucose.

Cells grown on	Crude protein* (%)	Crude fat* (%)
Methane**	49.2	3.5
Glucose***	40.2	4.2

* In dry cells.

** Cells obtained after 4-day culture at 30°C in a 5 l-shaking flask with a gas changing apparatus as shown in Fig. 1, containing 500 ml of mineral salts medium. One liter of methane gas under atmospheric pressure was introduced into the flask by the method given in Fig. 1.

*** Cells obtained after 2-day culture at 30°C in a 5 l-shaking flask with a cotton plug containing 1 l mineral salts medium with 0.2% glucose.

メタン生育菌体のそれより約25%高かった (Table 6). つぎに, アミノ酸組成を調べた結果を Table 7 に示す. メタン生育菌体のたんぱく質には, グルコース生育菌体のそれよりシスチンおよびメチオニンがそれぞれ4倍と1.5倍多く含有されていた.

Table 7. Amino acid composition of culture No. 12 protein.

Amino acid	Cells grown on	
	methane for 4 days*	glucose for 2 days**
Alanine	4.5%	4.4%
Arginine	18.3	16.2
Aspartic acid	2.4	2.6
Cystine	2.8	0.6
Glutamic acid	0.6	3.2
Glycine	8.7	9.2
Histidine	1.6	1.2
Isoleucine	5.0	4.6
Leucine	8.3	7.0
Lysine	4.8	4.6
Methionine	2.4	1.6
Phenylalanine	3.8	3.8
Proline	4.4	4.7
Serine	1.6	1.9
Threonine	3.9	4.3
Tyrosine	3.2	2.2
Valine	8.3	8.6

* Cells grown on methane were obtained by the same method in Table 6.

** Cells grown on glucose were obtained by the same method in Table 6.

考 察

Vary と Johnson²⁾ は, 土壌から2種類の桿菌から成るメタン資化性混合菌 culture HR を分離し, その構成菌を単集落分離法でそれぞれ単独に分別したが, これらの細菌はいずれも単独ではメタンに生育しなかった. また, Sheehan と Johnson³⁾ および Mueller¹⁰⁾ はそれぞれ活性汚泥からメタン資化性菌を分離しているが, それらはいずれも混合菌である. これらの研究では, 混合菌を分別せずに実験を進めており, 共存する混合菌が相互にどのような作用をし合っているかは追及されていない. 本報では, 土壌から分離した1次培養 No. 12 が, *Methylosinus* 属細菌と推定されるピブロイド状の M 株と, *Pseudomonas* 属細菌と同定された G 株との混合体であることを認めた. これらの両細菌は, 常法の単集落分離法や継代培養法では分別されず, Lindner の小滴培養法で分別された. M 株はメタン, メタノールに生育し, G 株はメタノール, ホルムアルデヒド, ぎ酸に生育する細菌であること, および M 株は G 株のメタノール生育培養上澄液の添加培地でそ

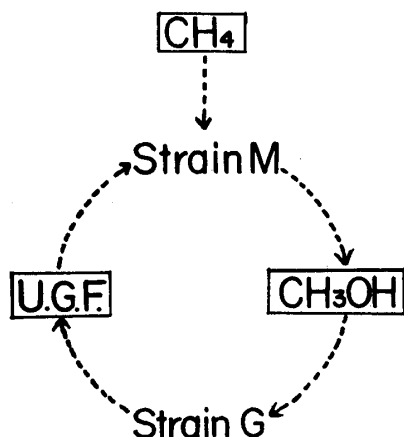


Fig. 5. Proposed scheme of interaction of strains M and G.

Symbols: U.G.F., unknown growth factor.

の生育が促進されることから、Fig. 5 に示す相互関係が考えられる。すなわち、M 株がメタンをメタノールに酸化し、これを利用して G 株が生育する。これに対して、G 株は M 株に生育促進物質を与えるので全体として生育が高められる。しかし、これらの関係については、M 株の生育が不安定で消滅してしまったので、これ以上研究が進められなかった。今後、生育の安定したメタン酸化性菌を用いて、これらの相互関係を解明すべきである。

ついで、1 次培養 No. 12 の培養条件を検討し、既報^{2,3)}の混合菌のそれと比較した。Vary と Johnson²⁾ は、culture HR の生育至適温度は 30°C、生育至適 pH は 6.5、窒素源としてアンモニア態が良好であったとしている。これらの結果は、1 次培養 No. 12 について得られた結果と一致する。しかし、culture HR が銅イオンにより生育が促進され、酵母エキスにより生育が阻害される点は、本 1 次培養 No. 12 はこれらの物質により生育が影響されない点で異なる。また、Sheehan と Johnson³⁾ の混合菌は、生産至適温度が 45°C であり、本 1 次培養 No. 12 のそれが 30°C である点で異なるが、彼らの混合菌が鉄イオンによりその生育が促進される性質は、本混合菌と一致する。メタン生育乾燥菌体中の粗たんぱく質と粗脂肪の含量は、Vary と Johnson²⁾ の culture HR ではそれぞれ 59.2% と 6% であるが、本 1 次培養 No. 12 では両成分とも culture HR のそれらより低く、それぞれ 49.2% と 3.5% であった。また、アミノ酸組成では、1 次培養 No. 12 は culture HR よりアルギニンの含量が 3 倍高いが、逆にメチオニン、リジンの含量はそれぞれ 50% および 20% 低かった。

結論として、既報のメタン酸化性の混合培養では混合菌の分別が不成功に終わっていること、本 1 次培養 No. 12 との培養条件の相違、菌体成分およびアミノ酸組成の相違から、本 1 次培養 No. 12 は、既報の混合培養とは異なる新しい混合系であると考えられる。

混合菌系をメタンを炭素源として培養する場合、混合菌が相互に共生の関係にあるので、それぞれを単独分別して培養するより、そのまま混合体として培養した方が良い生育が得られる。さらに、メタン酸化性菌と共生している混合菌系では、炭素源をグルコースにするよりメタンとして培養した方が、シスチン、メチオニンに富むたんぱく質が得られる。

要 約

福山市内の土壌から、メタン-無機塩類培地でメタン酸化性能のある培養を多数(20系)を得た。その 1 培養について特に検討を加えて、2 種類の細菌 M 株と G 株とが混在した系であることが分かった。両者は単集落分離法や継代培養法では分別できず、Lindner の小滴培養法によって分別された。

M 株は、メタン、メタノールに生育すること、およびその形態から *Methylosinus* 属の細菌と推定されるメタン obligate な細菌であり、G 株はグルコース、メタノールなどに生育する *Pseudomonas* 属の細菌と同定された細菌であった。M 株は単独培養では生育が劣化し消滅したが、G 株と混合すると生育が M 株単独の場合よりも 6~7 倍促進された。既知保存株 5 株 (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, および *Aerobacter aerogenes*) との混合培養では、M 株の生育促進は認められなかった。G 株のメタン生育培養上澄液の添加で、M 株の生育は 5~6 倍促進された。

本培養系は、混合菌を分別して培養できること、培養条件の相違、さらに菌体成分およびアミノ酸組成の相違から、既報の混合培養とは異なる新しい混合系である。

なお、本研究の要旨は、昭和51年度日本醸酵学会大会において発表した。

文 献

- 1) Söhngen, N.L.: *Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. II*, 15, 513 (1906).
- 2) Vary, P. S., Johnson, M. J.: *Appl. Microbiol.*, 15, 1473 (1967).

- 3) Sheehan, B.J., Johnson, M.J.: *Appl. Microbiol.*, **21**, 511 (1971).
 - 4) Stocks, D. K., McCleskey, C. S.: *J. Bacteriol.*, **88**, 105 (1964).
 - 5) 日本衛生学会編：衛生試験法注解, p. 53, 金原出版, 東京 (1965).
 - 6) Schram, E., Moore, E., Bigwood, E. J.: *Biochem. J.*, **57**, 33 (1954).
 - 7) 京都大学農学部農芸化学教室編：農芸化学実験書, 第2巻, p. 832, 産業図書出版, 東京 (1965).
 - 8) Whittenbury, R., Phillips, K. C., Wilkinson, J.K.: *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 205 (1970).
 - 9) Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. (eds): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974).
 - 10) Mueller, J. C.: *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1114 (1969).
- (昭53. 2. 3受付)