

講 座

メタン生成細菌の分離・培養法の実際

古賀 洋介・森井 宏幸・西原 正照

産業医科大学化学教室

I はじめに

最近、メタン発酵を有機廃棄物処理、排水処理に利用する動きが盛んになってきている。メタン発酵はメタンガスをエネルギー源として回収できるので、処理にかかる経費を節減できるだけでなく、ある程度以上の規模になれば積極的にエネルギーを生み出すことにもなる。そのため、廃棄物処理だけでなく、未利用バイオマスを経済的にガス化することにも使われる可能性がある。日本では近年メタン発酵の高度化、さまざまな未利用バイオマスへのメタン発酵の適用の研究が進められてきているが、メタン発酵に関与する多種多様な微生物についての微生物学的、生化学的基礎研究は著しく少ない。これに比べて欧米では、メタン生成細菌（以下メタン菌と略す）が数多く分離され、メタン生成反応を中心にして生化学的に詳しく研究されてきている。¹⁾ ちなみに日本で単離されたメタン菌株は数株にすぎず、種名まで同定されたものは1株、²⁾ 新種として記載されたものは皆無という状況である。

メタン菌は絶対嫌気性細菌であり、*Clostridium* などと比べても格段に慎重な嫌気操作が要求されるため、取り扱いに困難があることは事実であるが、基本的な方法は確立しており、非常に高価な装置を必要とするわけでもない。日本で最初のメタン菌の分離は穴沢ら³⁾ によって報告されたが、菌学的記載はなされな

った。われわれは1980年に古細菌としてのメタン菌に興味をもち、脂質研究を目的に嫌気消化槽からメタン菌を分離し、*Methanobrevibacter arboriphilus* の新しい株と同定した。²⁾ 最近ではメタン菌の分離を試みる研究グループもふえてきているので、日本におけるメタン菌学の発展を願って、その基礎となる分離・培養法の実践的な手法を詳述することにした。なお、以下に記すことは、嫌気チェンバーに関する以外はすべてわれわれが日常的に行っていることであるが、原法は文献⁴⁻⁶⁾ によっている。

なお、メタン菌の一般的な性質については総説¹⁾ にまとめてあるが、その後記載された新種12種を加え、1987年4月までに知られているメタン菌は48種である。このうち約43種は確実な種とみなせる。分離・培養に関係する性質について簡単にまとめておこう。

メタン菌の嫌気性は、培地の Redox ポテンシャルが -0.33 V 以下で生育できる、⁴⁾ と表現されている。これは 1 l の水におよそ 10^{-56} 分子の酸素しか存在しない状態と計算されるが、事実上、単純に酸素を取り除くという操作だけでは実現不可能な状態である。従って、何らかのより強い還元系を加える必要がある。そして、培地が十分還元状態になったかどうかを容易に見きわめる方法がレサズリンの脱色 (-0.042 V 以下) である。メタン菌の嫌気性要求度を一口で言うと、レサズリンが赤くなっていたら生育できない、ということである。

メタン菌はグラム陽性のものと陰性のものがあり、どちらも細胞壁に真正細菌のような murein はもたないが、グラム陽性のメタン菌は murein とは異なる peptidoglycan の pseudomurein がある (*Methano-*

Methods for isolation and cultivation of methanogenic bacteria—Lecture—

YOSUKE KOGA, HIROYUKI MORII, and MASATERU NISHIHARA (Department of Chemistry, University of Occupational and Environmental Health, Japan, Kitakyushu 807, Japan)

bacterium, *Methanobrevibacter* など). グラム陰性メタン菌の細胞表層はグラム陰性真正細菌のとは全く異なり, タンパクサブユニットやタンパク性の sheath などである. 形態的にはメタン菌は長桿菌, 短桿菌, 球菌, ザルチナ状, 皿状などがある. メタン生成基質は H_2 - CO_2 , ギ酸, 酢酸, メタノール, メチルアミンなどである. 前二者は, メタンになるまで, 4段階の還元が必要であるが, 後三者はメチル基からメタンが生成する. 後三者の利用は一部のメタン菌種に限られている (*Methanosarcina*, *Methanothrix* など). メタン菌の生育温度は $20^{\circ}C \sim 97^{\circ}C$ で, 菌種によって4段階に分けられる ($20^{\circ}C$ 付近, $37^{\circ}C$ 付近, $60^{\circ}C$ 付近, $85^{\circ}C$ 以上). メタン菌はこれまでに, 湖沼の堆積物, 海底の堆積物, ウシの反芻胃, 動物の糞便, 大腸内容物, 排水処理装置の嫌気消化スラッジ, 深海の熱水湧水口付近などから分離されている. 嫌氣的で有機物のある所ならどこからでもメタン菌は分離できそうである. 水田土壌や特定の廃棄物のみを処理する嫌気消化槽など未調査の環境から新しいメタン菌が分離される可能性は大きいと思われる.

II メタン菌の分離・培養に必要な器具

H_2 , CO_2 , N_2 などの実験ガスと流量計 ガス類は後述の還元銅カラムを通して除酸素して使う場合には通常の純度でもよい. 高純度窒素なら還元銅カラムは不要である. 調圧器と流量計は, H_2 と CO_2 を 4 : 1 に混合するのに流量で調節するので必要である. H_2 用 1 l/min, CO_2 用 200 ml/min までの目盛があれば 6 l の通気培養までに十分である.

還元銅カラムと分配管 (三紳工業製, Fig. 1) 2 cm $\times$ 50 cm の石英カラムに銅の薄片を約 15 cm の長さにつめ, その部分を卓上焼却炉で約 $300^{\circ}C$ に加熱できるもの. カラムの下部よりガスを通す. 銅は使わない時は黒く酸化されているが, H_2 を流すと還元されて金属銅の光沢が出る. カラム温度は卓上焼却炉のヒーターをスライダックで調節することによって, $300^{\circ}C$ に調節する. H_2 存在下で温度が高すぎると CO_2 から CO が生ずることがある. 還元銅カラムを通過したガスは, 分配管で必要な本数に分岐させて使用する.

ロールチューブ作成器 (三紳工業製, Fig. 2) 寒天培地上にメタン菌のコロニーを作らせる方法は, 大きくわけて2種類ある. 一つは好気性菌と同様, ペトリ皿の中に寒天平板をつくり, その上にコロニーを

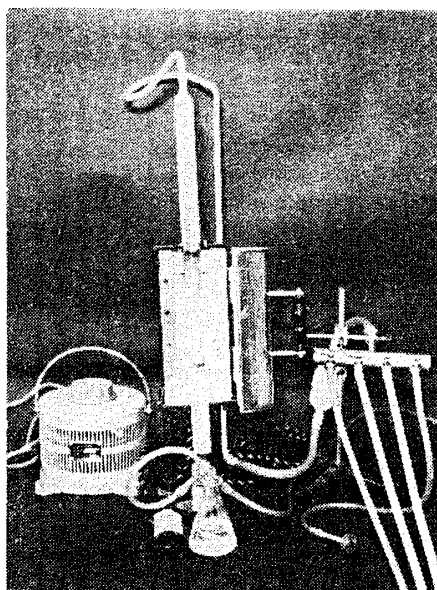


Fig. 1. A heated copper column for removing traces of oxygen from gases connected with a distributing apparatus.

つくらせる方法である. この場合, すべての操作は嫌氣的雰囲気の中で行う必要があるので, 後述の嫌気チェンバーが必要となる. 嫌気チェンバーは高価なのでどこにでも設置できるとは限らない. ロールチューブ法は嫌気チェンバーが製品化される前からメタン菌分離の最も確実な方法として使われていたもので, 必要な器具もかんたんなものである. 融けた寒天培地と菌懸濁液を試験管の中で $50^{\circ}C$ で混合して, 直ちに氷水中のローラーの上に試験管を横にして置き, 回転させながら寒天を固まらせると, 寒天ロールチューブができ上る. 寒天培地は試験管壁にうすく固まり, せまい開口部の割に広い表面積が得られる. ロールチューブ作成器とはそのローラーと氷水用バットである.

培養ビンとブチルゴム栓, アルミシールと締め具 Fig. 3 のような 100 ml, 300 ml, 500 ml, 1 l の血清ビン, 500 ml 坂口フラスコが培養用のフラスコとして用いられる. 口はいずれもブチルゴム栓の合う大きさ

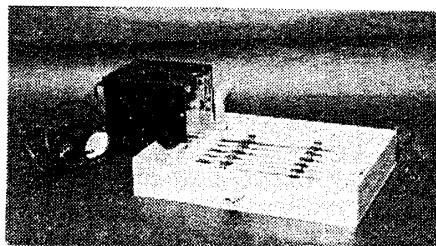


Fig. 2. A roll tube maker.

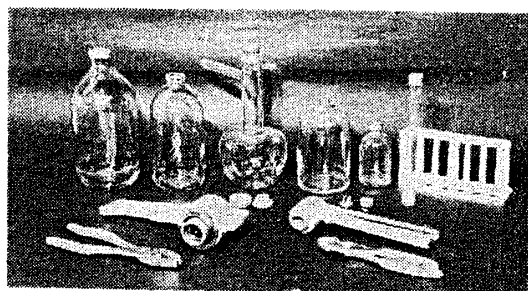


Fig. 3. Culture flasks, a test tube with a butyl rubber double stopper, crimpers, and handdecappers. Butyl rubber stoppers and aluminum sealing caps are seen in front of flasks.

と、アルミシールのできる形状でなければならない。ブチルゴム栓、アルミシールには大小2種類がある。小は直径 13 mm, 大は 22 mm の口に合う。100 ml, 300 ml 血清ビンが小の口, 他は大の口である。坂口フラスコは特注加工してブチルゴム栓(大)が合うように製作する。1 l の輸液用のビン(病院等で廃物として多量に捨てられている)の口の部分の形状が目的にかなっており代用できる。ビンの口にブチルゴム栓をさしこんだら、アルミシールを締め具(ハンドクリンパー, Wheaton 社製)できっちり締めつけ気密をよくする。アルミシールは一度締めたら培養終了まで開くことはない。開くときはペンチでもよいが、専用のハンド・ディキャッパ(Wheaton 社製)も市販されている。クリンパー、ディキャッパとも大小別である。

保存用など少量の培養で基質が気体でない場合には径 18 mm の試験管にブチルゴム製のダブル栓をして培養することもできる。ダブル栓は試験管の外側にかぶせる折りかえしのついたもので、通常のゴム栓よりはずれにくい。アルミシールなどでおさえてないから高圧をかけるわけにはいかない。また、試験管内の培養液と気相の接する面積が小さいので H_2 - CO_2 を基質とする培養には使えない。なお、ブチルゴムは最も O_2 を通しにくいので使われている。

6 l の大量培養には、Fig. 4 の 10 l の培養ビン(特注)を用いる。外径 21 cm, 全高 42 cm で上部に三つの口がついてある。このサイズはわれわれの手持ちのオートクレープに入るように決めた。中央の孔は通気管を通し、左の孔には還流冷却器をつけてガスの出口とする。還流冷却器によって培地量の蒸発減少を防ぐ。右の孔はサンプル採取孔である。ここにはダブル栓をかぶせてあり、針を突きさして注射器で培養液の一部

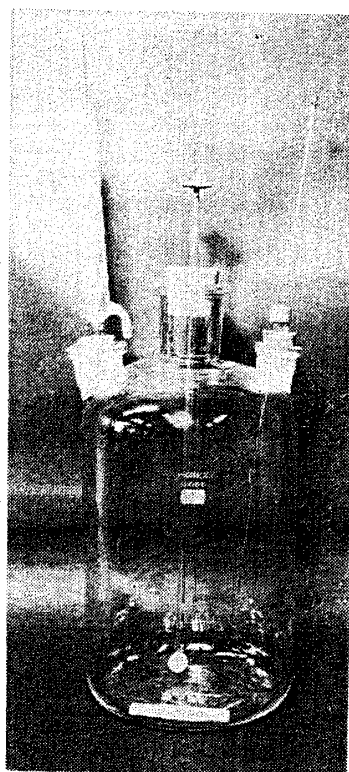


Fig. 4. A 10 l carboy with a reflux condenser(left neck), a gassing tube(center neck), and a sampling neck(right neck). A stirring rod(12 cm) is on the bottom.

を採取できるようになっている。この容器の底はマグネチックスターラーの攪拌子の安定した高速回転を得るために、できるだけ平らであることが望ましい。ガラス製なのでどうしても盛り上がるが、その場合でも盛り上がりの頂点ができるだけ底の円形の中央にあるのが望ましい。頂点がずれていると、攪拌子自体の中心と回転の中心がずれてしまい、高速回転が得られない。このことは特に大きな攪拌子を用いた場合にあてはまる。

大型スターラーと恒温槽 上の 6 l の培地を効率的に攪拌し、Vortex 型渦巻を起こさせるために強力マグネチックスターラー(工業用大型, 40~1400 rpm, 2~30 l まで攪拌可能, 回転計付き, 例えば、池田理化の IS-3GL)が必要である。攪拌子は通常の棒状のもので長さは 5~12 cm のものがよい。円形のもののかき回す面積が小さいので、十分な攪拌が得られない。渦巻の大きさは攪拌子の長さと同回転数に比例する。十分な攪拌とは渦巻の底がガラス容器の底に達する程度のものであるが、この状態を得るには 5 cm の攪拌子で 1200 rpm, 12 cm のもので 1000 rpm を要する。一

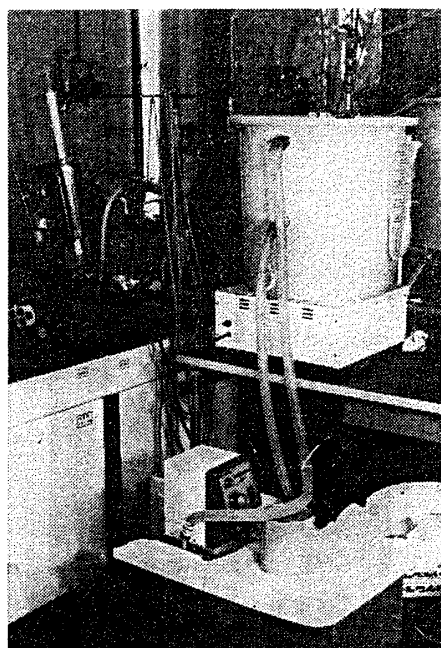


Fig. 5. The whole arrangement of a 6 l culturing apparatus. A 10 l carboy shown in Fig. 4 containing 6 l of medium is incubated in a big bucket (upper right) connected with a thermostat (lower). A heated copper column (upper left) for supplying H_2 - CO_2 gas is connected to the carboy.

般に回転の安定性と渦巻の形状との関係で攪拌子の長さを決める。トルクの弱いスターラーでは回転数を上げると攪拌子がとびやすい。

培地の保温は直径 40 cm, 高さ 40 cm のバケツ型プラスチック容器 (特注) に上記培養ビンを入れ, 外部循環能力のある恒温槽から恒温水を循環させることによっている (Fig. 5)。

注射器と注射針, 除菌用フィルターユニット 1 ml, 2.5 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml の注射器と注射針 (太さ 22G $\times$ 1 $\frac{1}{4}$ S. B., 0.7 $\times$ 32 mm) を用いてブチルゴム栓をした培養ビン中の培地に接種したり, 試薬を添加したりする。ガラス製の注射器なら乾熱滅菌してくり返し使用できる。注射針を取りつけた状態で一本ずつ試験管に入れ, 口をアルミホイルでおおって乾熱するとよい。滅菌済みのプラスチック製ディスポーザブルの注射器と滅菌済み注射針を用いると手間が省ける。ディスポーザブルであるがオートクレーブして再使用することもできる。大きな培養ビンから数 ml のサンプルを採取するには 50 cm の針, ロールチューブからコロニーをとったり, 培地を試験管に分注したりするときに試験管にひっかけてガスを流し続けるの

には, 根本で直角に曲げた 10 cm 位の針が必要である。 H_2 , CO_2 などのガスやオートクレーブできない $NaHCO_3$ 溶液などを無菌処理するために, ディスポのメンブランフィルターユニット (プラスチック製のユニットにはいって注射器, 注射針を取りつけられるようになっているもの) が必要である。これは注射器と針の間, またはガスの出口と針の間に取りつけて使う。

嫌気チェンバー 嫌気チェンバーの原形は, 嫌気的ガスを充満させたビニール袋の中で嫌気性菌を取り扱うものであった。嫌気チェンバーの基本的な構成は, 菌を取り扱う嫌気的無菌箱の部分, チェンバー内の雰囲気 O_2 を入れないで器具を出し入れするための前室, 前室や本体チェンバー内のガスを置換するための排気ポンプと嫌気ガス供給装置 (ボンベなど) である。その他に, 本体チェンバー内でインキュベートするための小型のふ卵器, チェンバー内ガスの微量の O_2 を除去する循環式触媒付き除酸素装置, 器具の出し入れの際, 前室のガス置換を自動的に行うマイコン装置などが付属するものもある。

ガスクロマトグラフ, 螢光顕微鏡 これらは直接培養に必要な機器ではないが, メタン菌の特性上培養の際にはほとんど必須である。メタン生成を最も容易に測定できるのはガスクロマトグラフィーである。メタン, H_2 , CO_2 などだけを測定するのであれば, 昇温装置は不要であり, 検出感度も高い必要はないので, TCD (熱伝導度型検出器) だけのついている最も簡単な機械でよい。カラムは 2 m の活性炭カラムでよい。メタン菌は F_{420} という強い螢光を発する補酵素を共通して持っているため, 螢光顕微鏡で他の細菌と容易に区別できる。メタン測定と螢光顕微鏡はメタン菌の確認にきわめて有効である。

Ⅲ 培地組成

われわれが使っている培地の例を Table 1 と 2 に示した。各培地の特徴を以下に述べる。

Table 1 の Balch の medium 1 は完全には独立栄養的でないふつうのメタン菌 (例えば *Methanobacterium formicicum*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanobrevibacter arboriphilus*, *Methanosarcina barkeri*) の培養に適している。酢酸とギ酸が含まれているので, 酢酸要求性の有無にかかわらず, また, メタン生成基質としてギ酸を利用するか, H_2 - CO_2 を利用するかにかかわらず使用可能である。酵母エキスとトリプトン

ースで促進されるものにも好適である。 *Methanobrevibacter ruminantium* や *Methanomicrobium mobile* は coenzyme M や低級脂肪酸を要求するので、それら

の菌を培養する時だけ coenzyme M や低級脂肪酸を加える。

Table 1 の medium 2 は酢酸, 辛酸, 酵母エキス,

Table 1. Composition of the growth media.

		Balch's ⁶⁾			DSM ^a 120
		Medium 1	Medium 2	Medium 3	
KH ₂ PO ₄	(g)	0.3	0.15		0.227
K ₂ HPO ₄	(g)	0.3		0.14	0.348
(NH ₄) ₂ SO ₄	(g)	0.3	0.15		
NaCl	(g)	0.61	0.31	18	2.25
KCl	(g)			0.335	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	(g)	0.16	0.095	3.45	0.5
MgCl ₂ ·2H ₂ O	(g)			2.75	
NH ₄ Cl	(g)		1.25	0.25	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	(mg)	9	5	140	250
Nitrilotriacetic acid ^b	(mg)	15	15	15	
MnSO ₄ ·2H ₂ O ^b	(mg)	5	5	5	0.09
FeSO ₄ ·7H ₂ O ^b	(mg)	3	1	3	2
CoSO ₄ ^b	(mg)	1	1	1	0.6
ZnSO ₄ ^b	(mg)	1	1	1	0.3
CuSO ₄ ·7H ₂ O ^b	(mg)	0.1	0.1	0.1	0.03
AlK(SO ₄) ₂ ^b	(mg)	0.1	0.1	0.1	
H ₃ BO ₄ ^b	(mg)	0.1	0.1	0.1	0.9
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O ^b	(mg)	0.1	0.1	0.1	0.091
NiCl ₂ ^b	(mg)	0.1	0.1	0.1	0.06
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·7H ₂ O	(mg)		20		
NaHCO ₃	(g)	5	7.5	5	0.85
Cysteine·HCl	(g)	0.5	0.6	0.5	0.3
Na ₂ S·9H ₂ O	(g)	0.5	0.6	0.5	0.3
Na Acetate	(g)	2.5		1	
Na Formate	(g)	2.5			
Yeast extract	(g)	2		2	2
Trypticase	(g)	2		2	
Casitone	(g)				2
Trace vitamins ^c	(ml)	10	10	10	10
Methanol	(ml)				10
Resazurin	(mg)	1	1	1	1
Supplements		^d			

^a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Catalogue of Strains 1983.

^b prepared as a 100-fold concentrated stock solution of trace minerals in the case of Balch's media. For DSM 120 medium, 333-fold concentrated solution without FeSO₄ was used.

^c contains, in milligrams per liter of distilled water: biotin, 2; folic acid, 2; pyridoxine HCl, 10; thiamine HCl, 5; riboflavin, 5; nicotinic acid, 5; DL-calcium pantothenate, 5; vitamin B₁₂, 0.1; *p*-aminobenzoic acid, 5; lipoic acid, 5.

^d 0.5 g each of valeric, isovaleric, α -methylbutyric, and isobutyric acids and 0.1 mg of 2-mercaptoethanesulfonic acid are added when *Methanobrevibacter ruminantium* and *Methanomicrobium mobile* are cultured.

トリプチケース等を除いてあり、完全に独立栄養的な *Methanobacterium thermoautotrophicum* に用いる。この培地は微量のビタミン以外には有機物が含まれていない上に、この菌は 65°C で培養するのでコンタミの恐れのもっと少ないメタン菌である。

Table 1 の medium 3 は *Methanococcus* 属および *Methanogenium* 属のメタン菌用の培地で、NaCl, Mg^{2+} の濃度が他のものより高いのが特徴である。

Methanosarcina の場合はメタノールを基質にするのが最も生育がよいので、DSM 120 培地が適している。

Table 1 の培地の塩は硫酸塩になっているが、これは硫酸還元菌のコンタミを招くおそれがあるので、塩をすべて塩化物塩にしたのが Table 2 の培地である。これは特に天然物からのメタン菌の集積培養に用いるとよい。われわれは *M. arboriphilus* A2 をこの培地で分離した。ここではギ酸ナトリウムを基質にしているが、 $H_2-CO_2/NaHCO_3$ を基質としてもよい。

trace vitamins はどれも同じであり、微量無機塩類も多少の違いはあるが概ね同じである。気相は $H_2-CO_2(4:1)$ を用い、2~3 atm に加圧するか、通気する。

Table 2. Composition of medium used for selective enrichment and growth of *M. arboriphilus* A2 and some other methanogens.⁵⁾

KH_2PO_4	(g)	0.75
K_2HPO_4	(g)	0.75
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	(g)	0.36
NH_4Cl	(g)	0.9
Nitrilotriacetic acid ^a	(mg)	41
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ^a	(mg)	3.6
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ^a	(mg)	0.9
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ^a	(mg)	1.5
$ZnCl_2$ ^a	(mg)	0.9
$CaCl_2$ ^a	(mg)	0.18
H_3BO_4 ^a	(mg)	0.17
Na_2MoO_4 ^a	(mg)	0.09
$NiCl_2$ ^a	(mg)	0.18
$Na_2S \cdot 9H_2O$	(g)	0.5
Trace vitamins ^b	(ml)	10
Na formate	(g)	10
Resazurin	(mg)	1

^a prepared as a 100-fold concentrated stock solution of trace minerals.

^b see footnote c of Table 1.

ギ酸、酢酸、メタノールなど水溶性のメタン生成基質を使う場合の気相は N_2 にする。

調製するときの細かい手順は後述するが、 $NaHCO_3$ 溶液、システイン溶液、 Na_2S 溶液、メタノール溶液は別滅菌することだけここで注意しておく。

IV 培地調製法

上記の培地成分はいくつかのグループに分けて溶解し保存溶液とする。Table 1 の脚注 b あるいは Table 2 の脚注 a の微量無機塩とキレート剤である nitrilotriacetic acid は、脚注に示したように濃厚溶液としてつくっておき、表に示した濃度になるように少量加える。ビタミンも同様である。 $NaHCO_3$, Na_2S , システイン、メタノール以外のものは直接混合溶解する。オートクレーブ滅菌前の脱気操作が培地量によって異なるので後述する。

$NaHCO_3$ は熱をかけると分解するので、沸騰水に窒素ガスを通気しながら冷却した水に $NaHCO_3$ を溶かし、8%溶液とし、さらに10分間 N_2 を通気する。オートクレーブ滅菌はしないので、フィルターを通して培地に注入する。還元剤であるシステイン、 $Na_2S \cdot 9H_2O$ などは N_2 を10分間通気した水で2.5%溶液として調製し、気相を N_2 にしてブチルゴム栓をしてオートクレーブ滅菌しておく。メタノールは50%水溶液に N_2 を10分間通気してからブチルゴム栓をしてオートクレーブ滅菌しておく。

1本 10 ml 以下の場合 培養液が少量 (10 ml 以下) の場合 (寒天ロールチューブ作成も含む)、以下の方法で脱気までの操作をまとめて行い、後で試験管または 100 ml 培養ビンに分注する。培地から O_2 を除くため、培地成分のうち還元剤、 $NaHCO_3$, メタノール以外のものを溶解してナス型フラスコ中で約1分間激しく沸騰させる。これに窒素ガスを通気しながら冷却する。これらの操作の間フラスコの上にはガラス製のロートをのせ、ロートの上はアルミホイルでおおい、蒸発による液量変化をできるだけ防ぐ。 N_2 ガスの通気針は、アルミホイルからロートの足を通して培地中にさしこむ。次に試験管または 100 ml 培養ビンにも N_2 を通気しながら、ゴムスポイドで内部の空気を N_2 に置換した駒込ピペットを用いて試験管に分注し、ブチルゴムの栓をする。試験管の場合は4本ずつアルミホイルで全体を二重に包み込み、ダブル栓が飛ばないようにしてオートクレーブする。

培養フラスコの場合 培養液が 50 ml 以上の場合

は、還元剤、 NaHCO_3 、メタノール以外の培地成分を溶解して培養ビンに分注し、密栓せずに1分間オートクレーブして抜気する。熱いうちに N_2 を通気しながら冷却し、プチル栓をしてアルミシールで締めてから改めて滅菌のために15分間オートクレーブする。

この時点で培地はレサズリンの赤色を呈している。8% NaHCO_3 溶液はメンブランフィルターユニットをつけていない注射器で吸い上げ、その針をはずして滅菌してあるフィルターユニットを注射筒の先につけ、さらに滅菌してある針を取りつけて、既に滅菌してある培地に注入する。次に気相の N_2 を $\text{H}_2\text{-CO}_2$ (4:1) と置換する。この操作もフィルターをつけた注射針を通して行う。メタノール、還元剤は滅菌してある注射器で培地に注入する。還元剤は接種直前に添加する。

通気培養の場合は上記と同様に培地を調製し、15分間オートクレーブした後、 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 混合ガスを常時通気しながら冷却し、 NaHCO_3 、還元剤を順次加える。

いずれの場合でも、還元剤を加えてしばらくするとレサズリンの赤色が消えるので、その後接種する。

V 馴養化（集積培養）と単離

馴養化 メタン生成微生物生態系は機能の異なる多種の細菌から成り立っており、この中からメタン菌だけを分離するには、メタン菌生育の直接の基質になる物質を加えてメタン菌数をふやさなければならない。この過程を馴養化または集積培養という。メタン菌の存在すると思われる汚泥、堆積物等をできるだけ嫌氣的に採取してくれば、それ以後の操作は採取源にかかわらず共通であるので、ここではわれわれが行った下水処理場の嫌気消化槽からのメタン菌の分離について記す。

廃水処理場では下水を最初に活性汚泥で好氣的に処理し、その時できた余剰汚泥を消化槽でメタン発酵により処理している。気温の高い時期は最初の活性汚泥法で微生物も含めたほとんどの有機物が分解されてしまうので二段階目のメタン発酵の成績が少し落ちる。従って、消化槽からサンプリングする時期は夏以外の方が多種多様の活性の高いメタン菌がとれると思われる。消化槽からバケツやひしゃく等で採取した汚泥は500 ml のポリエチレンビンに口元まで満たし、手早く栓をし、ビンの中に空気を残さないことが肝要である。消化槽から採取するときは、サンプル量が多いので少々空気にふれてもかまわない。

馴養化においては特にメタン生成の基質を何にする

かが重要である。メタン生成の基質は $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 、ギ酸、酢酸、メタノールがあるが、 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 、ギ酸にするか、酢酸、メタノールで馴養化するかによって集積されてくるメタン菌の種類が大きく異なる。筆者らは、このうち比較的増殖速度の高い $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 系、およびギ酸系で Table 2 の培地を用いて馴養化を行った。酵母エキス、ポリペプトン等の有機物を適量加えることにより、さらに多種類のメタン菌が馴養化されるが、加えすぎるとメタン菌以外の嫌気性菌が優勢になることがあるので注意を要する。

培地 250 ml を 500 ml 三角フラスコに調製し（IV培地調製法参照）、Fig. 6 の装置を組み立てる。水溶性基質の場合にはメタンなどのガスが発生してガス溜めの飽和食塩水を押し出し、メスシリンダーの水位が次第に上ってくる。馴養化中メスシリンダーの水位はガス溜めの水位よりやや高くして微陽圧をかけておく（Fig. 6A）。 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ を基質にする場合はメタン生成に伴って気圧は減少していくので、ガス溜めには初めから $\text{H}_2\text{-CO}_2$ を十分に入れておく。ガス溜めの $\text{H}_2\text{-CO}_2$ の減少に伴ってメスシリンダーの飽和食塩水がガス溜めに流入する（Fig. 6B）。ガス溜め用の液体として飽和食塩水を使うのは、水より O_2 、メタンの溶解度が低いからである。この装置に廃水処理場の消化槽から採取した汚泥 250 ml を加える。1週間おきに培養液の10～50%を新しく調製した培地へ植え継ぐ。馴養化の進み具合は、ギ酸系の場合はガス発生量で、 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 系ではガス減少量で簡単に調べることができる。さらにガスクロマトグラフでメタン発生を確認して培養液の

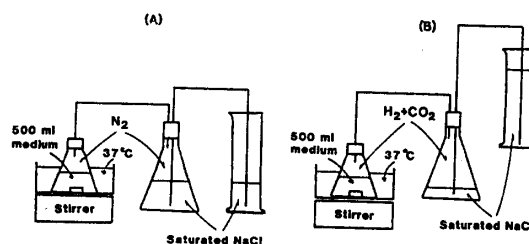


Fig. 6. An arrangement of the apparatus for enrichment culture. (A) Water-soluble substrates (e.g., formate) are used for methanogenesis. The surface of the saturated NaCl solution in the graduated cylinder should be kept the same level as or a higher level than that in the Erlenmeyer flask. (B) $\text{H}_2\text{-CO}_2$ is the substrate for methanogenesis. The level of the saturated NaCl solution in the graduated cylinder should be higher than that of the Erlenmeyer flask to avoid causing negative pressure in the culture flask.

顕微鏡観察(位相差および蛍光顕微鏡観察)を行う。約2か月馴養化を続けた後、培養液中の細菌がほとんどメタン菌になったのでこの培養液からロールチューブ法でコロニーを作り、メタン菌を単離した。

ロールチューブ法

1)寒天ロールチューブ作成 寒天1.7%を加えた培地 5 ml を試験管に入れオートクレーブする。湯浴の中で 50°C まで冷却する。これに 8% NaHCO_3 を加え、気相を $\text{H}_2\text{-CO}_2$ (4:1) に置換し、 Na_2S などの還元剤を加える。レサズリンの赤色が消えたら、メタン菌培養液または集積培養液を培地で希釈したものを注射器を用いて注入する。このとき培地に加える 8% NaHCO_3 、還元剤および希釈培養液は前もって 50°C に暖めておく。湯浴の中で泡のたたないようによく攪拌してから、氷水を入れたロールチューブ作成器で回転しながら寒天を試験管壁面に固める。寒天ロールチューブをふ卵器に入れ、コロニーができるのを待つ。好熱性メタン菌の単離には、寒天のかわりにジェランガム (Gelrite) を用いるとよいと思われる。⁷⁾ ジェランガムは一度固まれば 100°C でも融けず、透明度も高く、中温性メタン菌も寒天より大きなコロニーが得られたという。⁸⁾

2)コロニーの摂り方 コロニーができたら(メタン菌のコロニーはせいぜい直径 1 mm 程度にしかないが)、Fig. 7 のように、10 cm 位の曲げた針をロールチューブの中に入れてひっかけて N_2 ガスを流しながら、先端を直角に曲げたパストールピペットを用いてコロニーを取り液体培地に移す。パストールピペットは乾熱滅菌し、ゴムスポイドでピペット内の空気を N_2 に置換してから用いる。一つのコロニーに対し

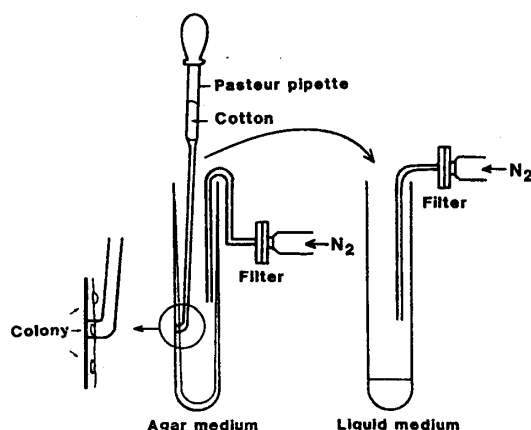


Fig. 7. Procedure for colony isolation from a roll tube.

て1本ずつ使用する。コロニーを移す時はパストールピペットの先端を試験管壁に押しつけ、寒天ごとコロニーを取り、すばやく少量の液体培地に移す。菌株の純化を完全にするために、ロールチューブによるコロニー形成と液体培養を数回繰り返す。

純粋なメタン菌が単離されたことの確認は、その菌株がメタンを発生することをガスクロマトグラフィーで確かめ、コロニーの大きさ、形状などの性状が均一であること、培養液の希釈に対応してコロニーの数に変化すること、顕微鏡による形態観察および蛍光顕微鏡による F_{420} の蛍光観察により行う。位相差顕微鏡写真と蛍光顕微鏡写真を同一視野で撮影し、位相差顕微鏡写真のすべての細胞が蛍光を発していることを確認しなければならない。また、メタン生成の基質を除き、真正細菌の生育基質を加えた複合培地に接種して菌の生育が起こらないことを確認すべきである。単離したメタン菌は試験管または小さい培養ビンの液体培養のまま冷蔵庫で保存し約3か月ごとに植え継いでいる。

VI 密閉式の培養法

培地 100 ml までは密閉培養、500 ml~5 l では通気培養法による。まず 100 ml までの少量の培養法について述べる。

接種 メタン菌の接種は注射器を用いて行う。この時、次の点に注意する。

- ①ガラス製注射器をオートクレーブして使用するとき注射器を乾燥して用いる。ぬれていると空気がはいりやすい。
- ②注射器内の空気を N_2 ガスと無菌的に置換するために滅菌してあるフィルターユニットをガス出口につけ、そのフィルターの前で注射器のピストンを数回出し入れする。注射器内に空気が残っていると、培養液を吸い上げた時にレサズリンが赤くなり、以後の培養は不可能になる。
- ③ $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 系の密閉培養では培養終了時は培養ビン内が陰圧になることが多いので $\text{H}_2\text{-CO}_2$ 混合ガスで陽圧にして注射針を差し込む。
- ④注射針をブチルゴム栓に差し込む前にブチルゴム栓の表面を70%アルコールに浸した消毒綿でぬぐう。気相が N_2 の場合はブチル栓の表面を火炎殺菌してもよい。ブチルゴム栓の表面は接種時以外は滅菌したアルミホイルで包んで汚染しないようにする。ブチルゴム栓の表面が汚れていると、針をさした時に

コンタミするおそれがある。また、アルコール消毒綿をつくる脱脂綿はアルコールに浸す前にオートクレーブしておいた方がよい。脱脂綿から孢子形成嫌気性菌がコンタミすることがある。

NaHCO_3 と還元剤を培地に加える時や、培養液の一部を採取する時にも、上記と同様の注意が必要である。

培養

1) 静置培養 メタン生成の基質が水溶性のギ酸、メタノール、酢酸などで、気相を N_2 とする培養では静置培養でよい。ギ酸の場合には、菌体がギ酸を資化して培養液の pH が上昇するので、大量培養の場合には pH コントローラーを用いて濃塩酸を添加しながら pH を一定に保つ必要がある。濃塩酸のかわりにギ酸を添加しても培養経過は全く変わらない。一般にギ酸を基質にするとメタン菌濃度はあまり高くない。*M. arboriphilus* A2 では 0.2 g/l の乾燥菌体しか得られない。

2) 振とう培養 H_2 - CO_2 を基質とする密閉培養の場合には、 H_2 ガスが培地に溶け込みにくいので、培養液を培養ビンの容量の約 1/10 にして気液界面を広くし、加圧し、さらに振とうすることが必要である。 H_2 と CO_2 のポンプの調圧器で圧力を両方とも 2 kg/cm² とし、 H_2 と CO_2 の流速を 4 : 1 とし注射針を通してガスを流し、気相に圧力をかける。生育が旺盛になってきたら、気相の圧力が低下するので H_2 - CO_2 ガスを定期的に追加する。*M. thermoautotrophicum* の場合この方法で 1 g/l まで生育する。ただし、培養容器の大きさは 1 l が上限であるので、6 本掛けの振とう恒温槽 1 台で 600 ml しか培養できない。

VII 通 気 培 養

H_2 - CO_2 を基質として 500 ml~5 l の培養をするには、通気培養が適している。 H_2 - CO_2 通気培養では H_2 が培地に溶け込みにくいので、通気培養では H_2 と CO_2 の流速を 10 : 1 とし NaHCO_3 の量を半分にする。通気量は *M. thermoautotrophicum* の場合、6 l の培養液に対して H_2 - CO_2 混合ガスを当初 1250 ml/min としていたが、375 ml/min で十分である。消耗品のなかで最も高価なものは H_2 であるので、通気量はできるだけ絞ったほうがよい。密栓培養と異なり、通気すると Na_2S が H_2S となって減少するので時々加える必要がある。12時間おきに培地 6 l に対して $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ を 0.5 g の割で加えている。排出ガスは

いったん飽和食塩水の中でバブリングさせてから（ガスの流れを確認するため）ゴム管で戸外に排気している。

培地 500 ml の場合 1 l の培養ビンを用い、ブチルゴムを通して長い針で通気する。もう 1 本の針でガスの出口とする。1 l の培養ビンでは大量培養の場合のようにガス出口に還流冷却器はつけない。*M. arboriphilus* A2 は、500 ml の通気培養で最大菌濃度が 2.5 g/l まで増殖した。

多量の菌体の調製を必要とするときは、以下に述べる大量培養法を行うのが便利である。装置は Fig. 9 の連続培養系から培地の連続供給排出系を除いたもので、原理はジャーフェーメンターと同じ通気攪拌培養である。*M. thermoautotrophicum* はビタミン以外の有機物の含まれていない培地 (medium 2) で 65°C で培養するので、コンタミのおそれがほとんどなく、かなりラフな半連続培養ができる。

この培養では大量の培地 (6 l) を用いるために、培地内への基質の供給、すなわち通気攪拌が十分に行えるかどうか最も重要なポイントとなるので、まずこの点に関して述べる。

ガスの流量はそれほど重要ではなく、培養液の攪拌による H_2 の溶け込み速度が重要である。攪拌は、液相を回転させるだけの普通の攪拌では不十分であり、Vortex 型の渦巻によって気相から基質を巻きこんでいく形で行う必要がある (Fig. 8)。攪拌が不十分であった場合、菌の生育速度が非常に遅くなり、かつ、その生育上限もかなり低下する。以下十分な攪拌のための要点を記述する。

- ①強いトルク（回転力）のスターラーとそれに対応する大きさの棒状の攪拌子、底の平らなガラスビン等「Ⅱ必要な器具」の項に記した器具を用いる。

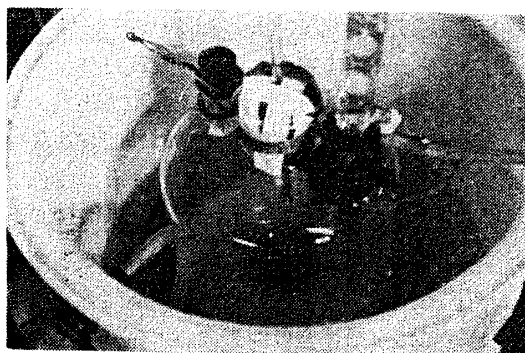


Fig. 8. A vortex of culture medium for an efficient gas-supply in a 10 l carboy.

②この培養装置の場合培地の量を 6 l 以上にしないこと。この量以上にしても容器の底に達するほどの渦巻は得られるが、渦巻が細長くなって十分な基質の供給が行われなくなり、生育速度と生育上限が急速に低下する。

以下に実際の大量培養の手順を述べていくが、雑菌の混入（コンタミ）の心配をする必要のない好熱菌 (*M. thermoautotrophicum*) と十分な配慮を要する中温菌とでは接種や集菌の際の仕方が異なるので、まず高温菌の場合を述べ、次に中温菌を扱う際の注意点を記載する。

***M. thermoautotrophicum* の培養** 10 l 培養用ガラスビンに medium 2 を 6 l 入れ、オートクレーブで滅菌する。この時、還流冷却器とガラス容器にさしこむ通気用ガラス棒、ゴム栓なども同時に滅菌する。危険防止のため、オートクレーブ終了後器内の温度が 65°C に下がってから取り出し、すぐ還流冷却器を取り付けた後に通気を開始する。NaHCO₃、L-システイン、Na₂S を加える。*M. thermoautotrophicum* の場合は、これらの試薬を固体のまま秤りとして培地の中に投じてよい。この培養ビンプラスチック桶の中へ移して保温用の水の循環を開始する。あらかじめ振とう培養しておいたメタン菌培養液 200 ml を注ぎ込んで接種する。このとき 10 l 培養ビンの中の培地の攪拌を止めておかなければならない。また、接種用培養液のビンのブチル栓をはずすときは、中を少し陽圧にしておかないと空気が急激に流入するおそれがある。これらの注意は共に空気の混入を最小限にとどめるためのものである。保温用の水は 65°C で蒸発が激しいので、恒温槽には蓋をする必要がある。*M. thermoautotrophicum* の場合、7～10日で菌濃度 1.3 g/l に達する。この値に達してからも生育は続くが、速度が非常に緩やかになる。上記の菌濃度まで生育したら培養ビンのサンプリング孔に滅菌した長いガラス管を挿入し、アスピレーターで吸引して 5 l の三角フラスコに 5 l の培養液を取り出す。この間、通気は続ける。この時、保温用プラスチック桶の水をぬいておかないと軽くなった培養ビンが浮いて倒れてしまう。別に 5 l の三角フラスコで調製した 5 l の培地 (NaHCO₃ や Na₂S 等も既に加えてあるもの) を同じ孔からロートを用いて流し込む。この際ごく少量の空気を巻き込んでしまうがこの菌の場合は問題ない。先の培養の残り 1 l 分が種菌となって引き続き培養できる。新培地を冷却するときの通気は 10 l 培養ビンの排出ガス管を

つないで行う。この培地の温度は通気中に低下して室温程度にまで下がってもよい。当研究室ではこの方法によって既に 2 年余にわたって *M. thermoautotrophicum* を半連続培養している。

中温菌の培養 基本的には *M. thermoautotrophicum* と同じであるが、コンタミに十分注意する必要がある。NaHCO₃、Na₂S などは無菌的に注射器で注入する。また、接種の場合もロートを通して流し込むことは不可で、注射器で注入する。*M. arboriphilus* の場合は *M. thermoautotrophicum* と違ってコンタミしやすいので、半連続培養はできず全量集菌する。

以上のような大量培養の装置が何組かそろえられれば、これらを直列につなぐことによってガス消費量を増やさずに培養量を増大させることが可能である。

VII 連続培養

H₂-CO₂ 系でのメタン菌の生育を常に一定の条件で追跡研究するには連続培養が必要である。Fig. 9 は *M. arboriphilus* A2 でわれわれが行った水素制限連続培養の装置である。混合ガスを N₂-H₂-CO₂ としたのは H₂ の含量を変えて水素制限になっていることを確認するためである。⁹⁾ 通常の連続培養と異なる点は流入培地にも嫌気混合ガスを通気している点である。5 l のビタミン以外の有機物を含まない Table 2 の培地（ギ酸ナトリウムも除く）を用いた。酵母エキス等を含む培地で長期間の実験をしていると雑菌のコンタミがあった。最少培地では安定した連続培養が可能である。このときの希釈率は 0.21～0.43 day⁻¹ であった。

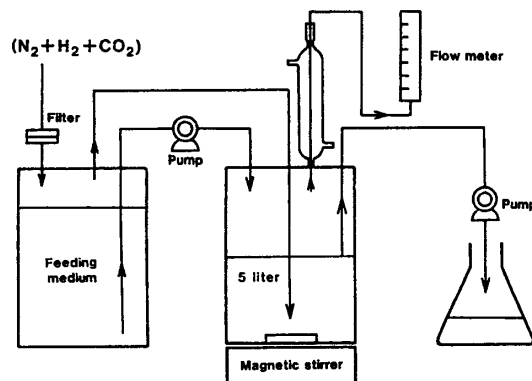


Fig. 9. Schematic diagram of an arrangement of apparatus for hydrogen-limiting continuous culture.

IX ラジオアイソトープによるラベル培養法

ラジオアイソトープを培地に加えれば、菌体に取り込まれてラベルされる。なお、 $^{14}\text{CO}_2$ によるラベル実験の場合には、 CO_2 は気体であるため、取り扱い上の注意が全く異なると思われるので、ここではふれない。ここではわれわれが実際に使用経験のある ^{32}P 正リン酸や ^{14}C 酢酸、 ^{14}C グリセロールを例にして不揮発性前駆体を培地に加える場合に限定して実験上の注意事項を記す。 ^{32}P でラベルするには培地のリン酸濃度をなるべく下げた方がよい。これは、単に培地中の ^{32}P の比放射能を高くするためだけではない。*Methanobacterium* 属のメタン菌には cyclic-2,3-diphosphoglycerate が蓄積しており、これが ^{32}P の効果的な取りこみを妨げているが、低リン酸培地に移すと減少させることができるからである。リン酸が欠乏しては生育できないので、正常な生育が可能な最低濃度としてわれわれは 0.4mM を用いている。 ^{32}P は HCl 溶液になっていることが多いので、培地の pH を保つために 0.05M MOPS(3-(*N*-morpholino)-propane sulfonic acid) 緩衝剤を加えておくのがよい。この低リン酸培地で最低2回前培養をくりかえしてから ^{32}P を含むラベル実験に入る。

メタン菌の酢酸やグリセロールの膜透過系についての知見は乏しいが、独立栄養性の *M. thermoautotrophicum* の場合には能動輸送ではないようで、培地中の酢酸やグリセロールの濃度に比例してアイソトープが取り込まれる。酢酸やグリセロールの濃度を高くすれば比放射能は低下するので、取り込まれる放射性前駆体の量はいずれにしても多くはない。実際、*Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* と比べるとラベルされる効率率は著しく低い。

実験目的によって扱う培地量は異なるであろうが、アイソトープを加えた培養の場合、数十 ml 培養が扱いやすいであろう。培養フラスコは 1 l の血清ビンより吸光度測定用側管付き坂口フラスコの方が便利である。500 ml の坂口フラスコに 50 ml~100 ml の培地を入れ、 $\text{H}_2\text{-CO}_2$ で 2 atm に加圧して振とう培養する。アイソトープ実験室に H_2 , CO_2 のそれぞれのボンベ、還元銅カラムなどを持ち込めない事情があるときには $\text{H}_2\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{S}(80:20:0.2)$ の混合ガス(特注)を用いてもよい。 H_2S に還元性があるため、還元銅カラムを通さなくても使用できる。注射器でラジオアイソトープの溶液を加えるときや、ラジオアイソトープの入

っている培養液からサンプルを注射器で取るとき、フラスコ内が 2 atm に近い高圧になっていると、注射器のピストンが押し上げられたり、注射器をブチルゴム栓から引き抜くときに注射器内の液が針先から飛び出したりして思わぬ RI 汚染を招くことがある。これを防ぐには、フラスコ内のガスを抜いて 1 atm よりわずかに陽圧にしておくこと、ブチルゴム栓から針を抜くときには必ず軟らかい紙類や綿などで針のまわりを何重にもおおい、針から飛び散る液を吸収させるようにしなければいけない。ガス抜きをする針の出口にも重ねた紙をあてておく。サンプル採取や試薬の添加を終わって培養を継続するときは、再度加圧する。サンプリングを定量的にする必要があり、しかも得られた培養液が空気にふれてもかまわない場合には、注射器の目盛でおよその量を採取して別の容器に移し、あらためてピペットで正確に取るようにする。

坂口フラスコの側管と Klett 光電比色計による濁度の測定は生育追跡の目安になるが、菌量と濁度は比例しない。というのは、培地には重金属の硫化物塩の黒い沈殿があり、菌の生育と共にこれが減少して白くなってくるためである。正確に生育を測定するには、タンパクなどの菌体成分の定量によるのがよい。

X メタン菌入手先・寄託先

メタン菌株を保存している保存機関は ATCC と DSM(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Grisebach Strasse 8, D-3400, Göttingen, Federal Republic of Germany) であるが、ほとんど全てのメタン菌を持っているのは DSM だけである。DSM の Dr. H. Hippe(DSM senior staff の一人で、古細菌、硫酸還元菌、chemolithotrophs などの責任者)宛、手紙で申し込めば購入できる。カタログも同所から発行されている。新たに分離したメタン菌株は、DSM に寄託しておけばその保存については安心である。

文 献

- 1) 古賀洋介・森井宏幸：醸酵工学, 64, 115 (1986).
- 2) Morii, H., Nishihara, M., Koga, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2781 (1983).
- 3) 穴沢秀治, 別府輝彦：日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 132 (1980).
- 4) Hungate, R. E.: *Methods in Microbiology*, (Norris, J. R., Robinson, D. W.), Vol. 3b, p. 117, Academic Press, New York(1969).
- 5) Zeikus, J. G.: *Bacteriol. Rev.*, 41, 514 (1977).

- 6) Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., Wolfe, R. S.: *Microbiol. Rev.*, 43, 260 (1979).
- 7) Lin, C. C., Casida, L. E. Jr.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 427 (1984).
- 8) Harris, J. E.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 1107 (1985).
- 9) Morii, H., Koga, Y., Nagai, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 310 (1987).

(昭62.5.18受付)