

寒冷湿地帯のメタン生成菌群の培養及びメタゲノム解析による メタン生成評価へのアプローチ

生命分子化学講座 生態化学分野

小川匡則

【背景と目的】メタンは二酸化炭素の約 30 倍もの温室効果をもつ気体である。メタンの主たる発生源であるメタン生成菌の生息場所は湖沼、海洋、湿地、ルーメンなど多岐にわたる。しかしながらメタン生成菌は絶対嫌気性であるため培養が困難とされ、またどれほどのメタン生成菌が培養可能かほとんど分かっておらず、研究が難しい分野である。本研究では簡便な手法によるメタン生成菌培養を検討するとともに、メタン生成菌の生育ならびにメタン生成に必要な条件を探求することを目的とした。

【方法】ガスクロ容器内に Winogradsky's 無機塩溶液ベースの 0.3 %ジェランガムソフトゲル培地(1 mM 酢酸ナトリウム, 5 mM 硫酸アンモニウム, 2.78 mM グルコース添加)を用いて培養条件および培地組成を検討した。培養法としてはソフトゲル中での集積培養や液体培地を流動パラフィンで封入した嫌気状態で前培養した細菌群を接種源にするなどの手法を試みた。メタン濃度を SHIMADZU GC-17A(CP MOLSIEVE 5A PLOT, 0.32 mm×30 m, VARIAN)で経時的に測定し、メタン生成を確認した。得られたゲル培地培養物からは DNA を回収し、16S rDNA 領域の PCR 増幅産物について DGGE(変性濃度勾配ゲル電気泳動)による菌相解析を行った。

【結果】東シベリアの湖沼にて採取された底質を嫌気条件下、集積培養した結果、約 80 日の培養でバイアルのヘッドスペース(12.56 ml)に約 16,500 ppm 量のメタン生成が見られた。主たるメタン生成菌は古細菌に分類される *Methanobacterium* sp.であった。さらにフィンランドの湿地にて採取された低層湿原底質(深さ 50-110 cm) 10 mg の 10 ml 滅菌水懸濁液上澄を流動パラフィンで封鎖した液体培地(メタン生成用培地と同組成)で前培養し、試験管底部の微生物群集を接種源としてソフトゲル培地で培養した結果、1 週間で約 200 ppm 量のメタン生成が見られた。これは、これまで培養を試行した中で、培養開始7日以内の 1 日当りメタン生成量では高い成績を示していた。これらを菌相解析した結果、メタン生成の多かった培養物では周辺に存在している細菌種が少ないなど、メタン生成量と菌相との間に相関が見られた。

【考察及び結論】底質ならびにソフトゲル培養物のメタゲノム解析の結果、メタン生成菌の生育には周辺の細菌との関わりが大きな影響を持つことが示唆された。メタン生成菌の培養には絶対的な嫌気性が必要であり、大がかりな CO₂ インキュベータを用いずにこの環境を研究室内で作り出すためには、酸素を消費する通性嫌気性真正細菌や水素生成細菌などとの共存が重要である。従って、メタン生成条件を整えるための前培養を行うことが有効と考えられた。