

# 嫌気性菌培養のための簡便な還元剤 Ti(III)

## —アルカリ性下の培養への応用—

新村 洋一

東京農業大学生物産業学部

北海道網走市八坂 196

嫌気性菌培養のための還元剤としては、システイン塩酸とチオグリコール酸ナトリウムが繁用されてきた。これらの還元剤による完全な酸素除去には加熱が必要なため、オートクレーブ殺菌後に混入した酸素の除去は困難であった。さらに、システインとチオグリコール酸ともアルカリ性下ではスルフィド結合を形成するため、アルカリ域では還元力が維持できない欠点がある。

著者らは、アルカリ性 (pH 10) 嫌気性菌分離の還元剤として Ti(III) を用いたが、アルカリ性下で有効だけでなく、従来の SH 系還元剤の欠点を補う特長が改めて見い出されたのでここに紹介する。

### 1. 適用微生物

Ti(III) のクエン酸塩を嫌気性菌の培養に用いたのは、Zehnder ら (1974) が最初である (6)。彼らは、偏性嫌気性菌 (*Methanobacterium* strain, *Clostridium formicoaceticum*, *Bifidobacterium bifidum*) には有効であるが、通性嫌気性菌 (*Escherichia coli*, *Pseudomonas denitrificans*) には阻害があると報告している。他に Rumen Bacteria に用いられた例がある (1, 2, 5)。

著者らは、pH 10 の培地 A (3, 4) を 0.5 mTi(III) で -350 mV 以下にし、自然界から菌を検索したところ、*Amphibacillus xylanus* が分離された (3, 4)。*Amphibacillus* は嫌気のみならず好気条件下でも同等な生育が可能な通性嫌気性菌である。そこで他の通性嫌気性菌の嫌気培養に用いたところ、乳酸菌 (*Lactobacillus*, *Sporolactobacillus*) の他、*Bacillus licheniformis* でも良好な結果を得た。

培地にあらかじめレサズリンを入れておき、レサズリンの赤色を無色に還元する最少量の Ti(III) を添加

することがコツと考えられる。

### 2. クエン酸 Ti(III) の調製 (1)

Zehnder らの方法を基に、嫌気操作を加えた。

① 0.2 M クエン酸ナトリウム水溶液 50 ml にアルゴンガスをスタラー攪拌下で 15 分吹き込む。以下の操作はこのアルゴン吹き込み下で行う。

② 20 % TiCl<sub>3</sub> 溶液 (和光純薬製) 5 ml を加える。

③ 飽和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 液で pH 7.0 に調製する。

④ あらかじめ窒素またはアルゴン置換した試験管に注射器で分注する。W プチル栓 (三神工業 (株) 045 (531) 7741) を用いると便利である。

密栓後冷暗所に保存すれば半年は安定に使用できる。

⑤ 使用時は注射器で W プチル栓の上から Ti(III) 液を抜きとり、0.2 μM フィルター (DISMIC-25 CS, ADVANTEC 製) を注射器の先に取りつけてフィルター滅菌を行い、直接培地に注入する。

⑥ 培地にレサズリン (1 mg/l) をあらかじめ加えておき、レサズリンの示す赤色が無色になるまで Ti(III) を添加する。反応は瞬時に起こるため、少量ずつ加えてゆるく攪拌する。この状態で酸素は完全に除去され、*Clostridium* 属細菌は容易に生育する。

### 3. 本法の実施例⑤, ⑥

著者らが *Amphibacillus xylanus* の嫌気培養に用いた方法を以下に示す。本法はアルカリ性培地であるが、中性の嫌気培地でも同様に行える。

① [培地 A] 450 ml (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 無添加) を 1 l 三角フラスコに入れ、沸騰湯浴中で 20 分間加温する (レサズリンはうすい赤色を呈す)。

② 窒素ガス 15 分吹き込み後、窒素気流下で嫌気培養ビンに移す。

③ 121°C, 15 分オートクレーブ殺菌後室温まで冷却する。

④ pH 10.6 [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液] (培地同様に嫌氣的に調

微生物実験プロトコール No. 9

連絡先

電話：0152-48-2116

ファックス：0152-48-2940

製)50 ml を注射器により無酸素的に注入する。これにより培地は pH 10.0 になる。

⑤この操作で培地は赤変するので、Ti(III) 溶液を、レサズリンが無色になるまで加える。10 ml 当り 0.05 ml 以下で完全無色となり、-350 mV 以下になっていた。

[培地 A] 950 ml

グルコースまたはキシラン	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2
酵母エキス	3
ポリペプトン	0.3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	200 mg
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100
レサズリン	1

純水 950 ml に溶かし、pH 7.0 に調製する。

[Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液] 50 ml

1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液に 1 M NaHCO<sub>3</sub> 溶液を加え、pH 10.6 に調製し、50 ml にする。

長期に保存された嫌気培地中のレサズリンが赤変することはよくあることである。また植菌過程で酸素が混入するミスも起こりやすい。このような時、Ti(III) を少量注入すれば瞬時にして無酸素状態になる。また還元剤ぬきで窒素吹き込みのみで調製した培地 (システイン、チオグリコール酸ぬき) に植菌直前に Ti(III) を添加しても一般の *Clostridium* の培養には十分であった。

## 文 献

1. Jones, G.A. and Pickard, M.D. Effect of titanium (III) citrate as reducing agent on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **39** : 1144-1147 (1980).
2. Marounek, M. and Wallace, R.J. Influence of culture Eh on the growth and metabolism of the rumen bacteria *Selenomonas ruminantium*, *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides succinogenes* and *Streptococcus bovis* in batch culture. *J. Gen. Microbiol.* **130** : 223-229 (1984).
3. Niimura, Y., Yanagida, F., Uchimura, T., Ohara, N., Suzuki, K. and Kozaki, M. A new facultative anaerobic xylan-using alkalophile lacking cytochrome, quinone, and catalase. *Agric. Biol. Chem.* **51** : 2271-2275 (1987).
4. Niimura, Y., Koh, E., Yanagida, F., Suzuki, K., Komagata, K. and Kozaki, M. *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40** : 297-301 (1990).
5. Wachenheim, D.E. and Hespell, R.B. Inhibitory effects of titanium(III) citrate on enumeration of bacteria from rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* **48** : 444-445 (1984).
6. Zehnder, A.J.B. and Wuhrmann, K. Titanium(III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. *Science* **194** : 1165-1166 (1976).