

天然ガス含有温泉水に生息する細菌の分離とその性質

誌名	弘前大学農学部学術報告 = Bulletin of the Faculty of Agriculture, Hirosaki University
ISSN	0073229X
巻/号	59
掲載ページ	p. 18-26
発行年月	1996年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



天然ガス含有温泉水に生息する細菌の分離とその性質

星野希宜*・早川 真・大町鉄雄・浅田芳宏

生物機能開発学講座

(1995年9月30日受付)

緒 言

山形県戸沢村の野口温泉の温泉水は、古海水起源と推定され、NaClを4,000 ppm含有し、70°C、pH 8.0、DOは5.0である。しかも、油分及び天然ガス成分を含むものである(8)。この温泉は異臭を放つが今後の有効利用が期待される。源泉の排出路中には黄色で藻状の微生物群の生息が確認される。このような微生物は耐塩、耐熱、耐アルカリの炭化水素資化性菌の可能性が示唆される。近年、高度好熱菌、好塩、好アルカリ等の細菌で、従来の細菌と分類上全く異なる、いわゆる古細菌が見い出され研究されるようになった(6)。

本研究では、古海水起源の温泉水より炭化水素資化性細菌を分離し、その性質を明らかにすると共にその機能の有効利用の可能性を検討した。また、古細菌の可能性についても検討した。

実験材料及び方法

(I) 温泉水中のバクテリアの分離

温泉水 0.5 ml、あるいは、藻状塊の懸濁液 0.5 ml をパラフィン、または、ケロシン 1%含有 Söhngen 培地 5 ml に添加し、30°C (300 rpm) で好氣的に振盪培養した。培養後、Bouillon 寒天平板培地上に塗株し再び培養しコロニーを形成させた。その後、同培地のスラントに移植した。Söhngen 培地組成：K₂HPO₄ 0.5%、NH₄Cl 0.5%、MgSO₄·7H₂O 0.2%、Na₂CO₃ 0.05%、ケロシン、または、パラフィン 2% (v/v)、Tween-20 0.04%、pH 7.2。

(II) 分離菌株の耐性テスト

耐熱性は Bouillon 培地 (B培地) (5 ml) に24時間前培養した後、50~100°Cを10°C間隔でそれぞれ1時間処理した。その後、0.05 mlをB培地のプレートに塗布し、37°C、48時間培養した。コロニー形成で細菌の死滅を確認した。

耐酸、アルカリ性は、B培地に前培養したものを0.1 ml、pH 3~10に調整したB培地(5 ml)に接種した。また、耐塩性はNaClを5、10、15、20%含むB培地に接種し培養した。その後は

* 日鉄鉱業(株)資源開発部技術開発グループ

耐熱性と同様の操作を行った。

B 培地の組成：Peptone 1%， Meat extract 1%， NaCl 0.5%， pH 7.2。

(III) 分離菌株の同定

グラム染色， べん毛染色， その他生理的性質の検討は常法に従って行った(3)。色素の形成は King A, B, F, P 寒天培地を用いる方法に依った(5)。無機窒素源の利用はグルコース 1%， K_2HPO_4 0.1%， $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005%， KCl 0.002%， pH 7.2 に各無機窒素源を 0.5% 添加して培養した。Nitrogenase 活性は Döbereiner の Nitrogen-free 培地での生育の有無で調べた(1)。孢子染色は Barholomew と Mitter の Wirtz 変法によった(4)。Poly- β -hydroxy butyrate (PHP) 蓄積はスダンブラック染色法によった(4)。

(IV) プロテアーゼ， および， アミラーゼ活性の測定

粗酵素の調製；プロテアーゼの場合， SKB 培地に前培養後， 100 ml SKB 培地(500 ml 容坂ロコルベン)に前培養液 1.5 ml 接種し， 30°C で， 24時間振盪培養した。また， アミラーゼの場合， STB 培地を用いて同様に培養した。培養後， 10,000 rpm， 10分間遠心し， その上澄を粗酵素として用いた。

SKB 培地組成；肉エキス 0.3%， ペプトン 0.5%， NaCl 0.3%， スキムミルク 0.5%， pH 7.2 or 10.5。STB 培地組成；肉エキス 0.3%， ペプトン 0.5%， NaCl 0.3%， デンプン 0.5%， pH 7.2 or 10.5。

プロテアーゼ活性は堀越らの方法に従った(3)。

アミラーゼ活性は不破らの方法に従って 620 nm の吸光度を測定した(9)。

(V) 凝集体の形成

B 培地(100 ml)の食塩濃度を 0～5% まで変え， 静置， あるいは， 振盪培養を行った。その後， 培養液を一定量を 100 ml 三角フラスコにとり室温で静置し凝集体形成を誘導した。

(VI) 蛋白質の定量は Lowry らの方法に従った(7)。

結 果

(I) 温泉源より分離した細菌の同定

天然ガス成分を含有する温泉源から分離された菌株はパラフィン，ケロシンに耐性であるが，それらの物質を C 源として利用せず，むしろ乳化剤として用いた tween-20 を分解し，生育することが明らかとなった(data 略)。予想に反し，パラフィン，ケロシン資化菌は分離されなかった。そこで，前述の性質を有する菌株の中で，代表的株，203株と204株について同定を行った。その結果を表 1 に示した。細菌の形態，グラム染色，及び，生理的性質から“Bergey's manual of determinative Bacteriology”に従って分類すると Pseudomonas 属に属するものと判断された。特に本菌の特性として，90°C の高温，20%の塩，pH 11～12 の高アルカリに耐性であることである。他方，203株ではメチオニンで，204株では葉酸，パントテン酸，メチオニン，ア

表1 分離菌株の形態及び生理的性質

試 験 項 目	203株	204株
形 態	桿 状 菌	桿 状 菌
大 き さ	2.0~4.0×1.0 μ m	2.0~4.0×1.0 μ m
運 動 性	有 り	有 り
鞭 毛 染 色	周 鞭 毛?	周 鞭 毛?
グ ラ ム 染 色	陰 性	陰 性
胞 子 染 色	陰 性	陰 性
酸 素 要 求 性	通 性 嫌 気 性	通 性 嫌 気 性
耐 熱 性	90°C	90°C
耐 塩 性	0~10(20)w/v %	0~10(20)w/v %
pH 耐 性	(3)5~12	(3)5~11
オキシダーゼ反応	陽 性	陽 性
カタラーゼ反応	陽 性	陽 性
ウレアーゼ活性	陰 性	陰 性
ニトロゲナーゼ活性	陰 性	陰 性
脱窒反応	陽 性	陽 性 (弱い)
無機窒素源 (NaNO ₃) の利用	陰 性	陰 性
硝酸塩の還元(硝酸カリウム培地)	陽 性	陽 性
(コハク酸培地)	陰 性	陰 性
VP テ ス ト	陰 性	陰 性
MR テ ス ト	陰 性	陰 性
デンプンの加水分解	陽 性	陽 性
O-F テ ス ト	発 酵 的	非 分 解
クエン酸の利用(コーザーのクエン酸培地)	陰 性	陰 性
(クリステンセン培地)	陽 性	陽 性
硫化水素の生成	陽 性	陽 性 (弱い)
インドールの生成	陰 性	陰 性
色素の生成(フルオレシン)	陽 性	陽 性
(ピオシアニン)	陽 性	陽 性
糖 の 利 用	陰 性	陰 性
Fe ²⁺ 要 求 性	陽 性	陽 性
PHB 蓄 積	陰 性	陰 性

ラニン、トリプトファン等の物質により生育が促進された (data 略)。また、両株共にN源がNH₄Clの時、Fe²⁺による生育促進がみられた。これらの菌株はpH、塩、温度に耐性であっても、好塩、好高塩、好アルカリではないので古細菌とは考え難いが、詳細は16SrRNAや細胞壁の分析結果により判断されるべきで、今後の検討の結果で判明するものと期待される。

(II) プロテアーゼ、および、アミラーゼ

先に述べたように203, 204株は培地のpHが11, 12とアルカリ側でも生存可能である。従って、本菌の生産するプロテアーゼやアミラーゼの性質も高アルカリ性の可能性が推定されるので検討した。

初めにプロテアーゼ生産に及ぼす培地のpHの影響について検討した。SKB培地を用いて、pH 7.2と10.5で検討した。203株の場合pH 7.2でプロテアーゼは最大14 U/mlで、pH 10.5で

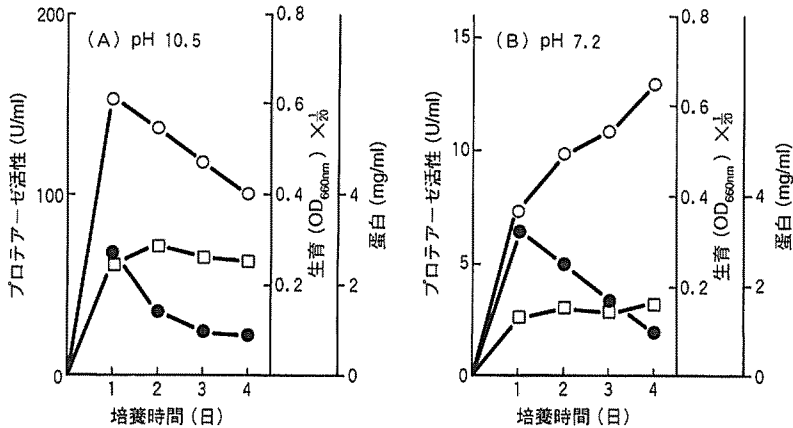


図1 *Pseudomonas* sp. 203株のプロテアーゼ生産に及ぼす培地の pH の影響
プロテアーゼ活注 (○→), 生育 (●→), 蛋白 (□→)

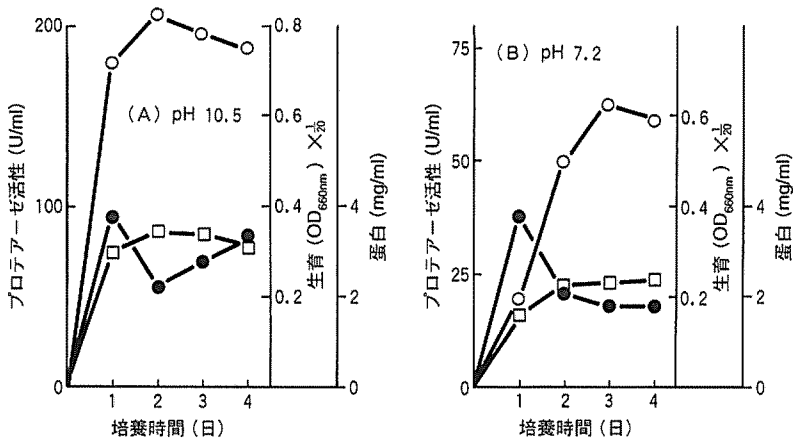


図2 *Pseudomonas* sp. 204株のプロテアーゼ生産に及ぼす培地の pH の影響
プロテアーゼ活注 (○→), 生育 (●→), 蛋白 (□→)

は、最大 150 U/ml と 10 倍以上の生産性を示した(図 1)。同様に 204 株でも pH 7.2 で 63 U/ml、pH 10.5 で 220 U/ml と約 4 倍であった(図 2)。従って、分離した株のプロテアーゼ生産はアルカリ側で促進された。pH 10.5 で生産したプロテアーゼを用いて至適 pH を検討した結果、203 株、204 株共に 8.0 であった(図 3)。両菌株共に耐熱性菌であるが、そのプロテアーゼの至適温度は 40°C で(図 4)、熱安定性は 70°C で 100% 失活した(図 5)。pH 7.2 生産プロテアーゼについても同様の結果を得た。

次に 203, 204 両株の生産するアミラーゼについて検討した。pH 7.2 で培養した 203 株のアミラーゼは至適 pH が 6.0 であるのに対して、204 株の場合は、pH 7.0 と異なっていた(図 6)。一方、

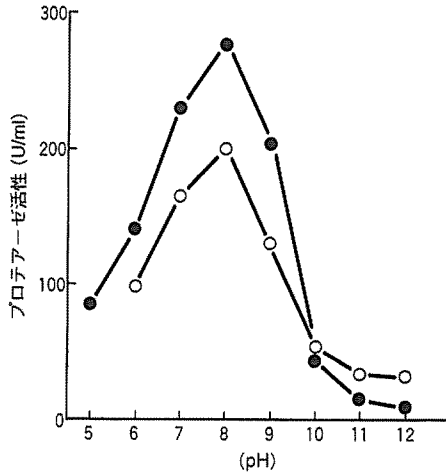


図3 *Pseudomonas* sp. 203株と204株のプロテアーゼ活性に及ぼす pH の影響

203株 (—○—), 204株 (—●—)

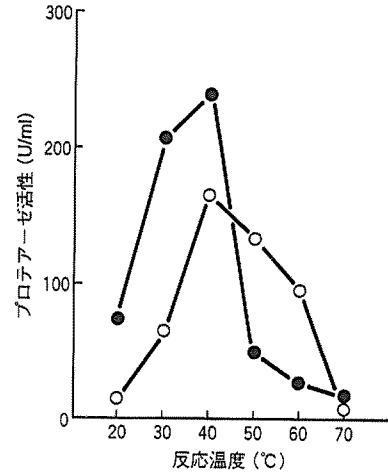


図4 *Pseudomonas* sp. 203株と204株のプロテアーゼ活性に及ぼす反応温度の影響

203株 (—○—), 204株 (—●—)

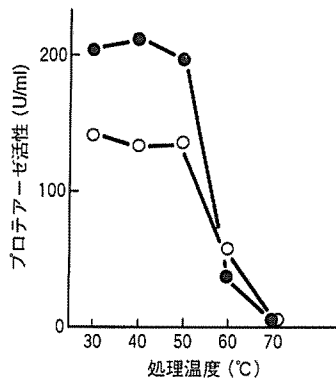


図5 *Pseudomonas* sp. 203株と204株のプロテアーゼの熱安定性

203株 (—○—), 204株 (—●—)

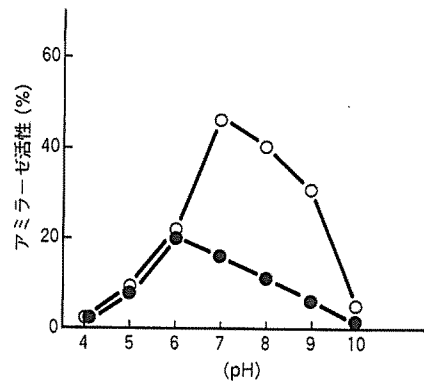


図6 *Pseudomonas* sp. 203株と204株のアミラーゼ活性に及ぼす pH の影響

203株 (—●—), 204株 (—○—)

培養は pH 7.2で行い、反応は 40°C で20分間行った。

pH 10.5 で培養した場合、203株のアミラーゼは7～8の間に、204株の酵素は7.0に至適 pH を有していた(図7)。また、アミラーゼの生産は pH 10.5 の培地の方が大であった。至適温度は、203, 204両株共に pH 7.2 培養酵素は 40°C であるのに対し、pH 10.5 培養時酵素は 30°C 以下で至適温度が異なっていた(図8, 9)。また、いずれも 70°C で100%失活した。以上の結果から、70°C, pH 8.0 に生息し、90°C, pH 12 に耐性の203, 204両株の生産するプロテアーゼ、アミラ

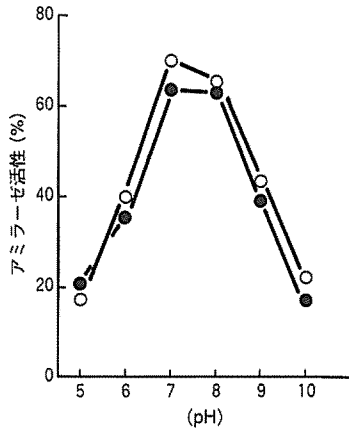


図7 *Pseudomonas* sp. 203株と204株のアミラーゼ活性に及ぼす pH の影響

203株 (●), 204株 (○)
培養は pH 10.5で行い, 反応は 40°C で20分間行った。

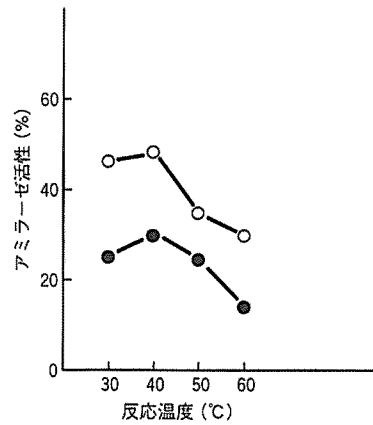


図8 *Pseudomonas* sp. 203株と204株のアミラーゼ活性に及ぼす反応温度の影響

203株 (●), 204株 (○)
培養は pH 7.2で行い, 反応は pH 7.0で20分間行った。

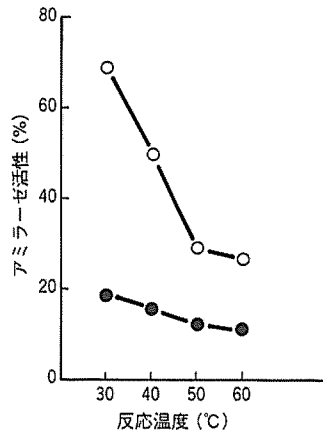


図9 *Pseudomonas* sp. 203株と204株のアミラーゼ活性に及ぼす反応温度の影響

203株 (●), 204株 (○)
培養は pH 10.5で行い, 反応は pH 7.0で20分間行った。

ーゼは、いわゆる、中温、中性酵素であり、菌株の生息特性とは異なることが明らかになった。

(III) 細菌凝集体の形成

野口村温泉の排出口の温泉水中に藻状の凝集体（黄色）が観察された（図10）。204株, 203株

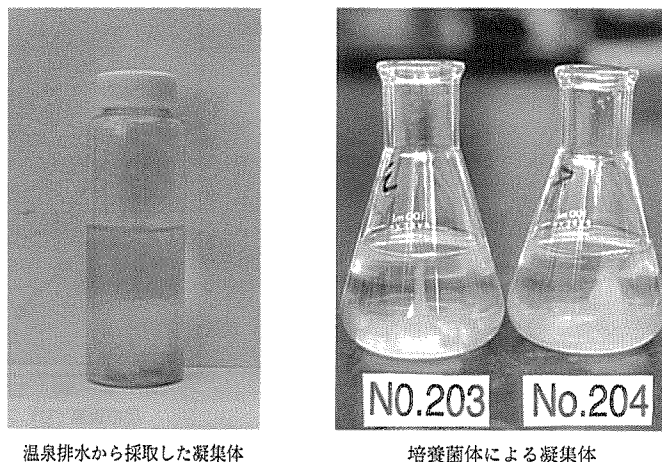


図10 *Pseudomonas* sp. 203株と204株による凝集体形成

表2 凝集体形成に関する NaCl 濃度の影響

菌 株	NaCl	0	1	3	5	10
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TAM 12001		—	—	—	—	×
<i>Bacillus subtilis</i> TAM-4		—	—	—	—	×
<i>Pseudomonas</i> sp 203		—	+	++	++	×
<i>Pseudomonas</i> sp 204		—	+	++	++	×
<i>Bacillus</i> sp B-1		—	/	/	++	×
<i>Bacillus</i> sp SK-1		—	/	/	++	×

○生育するが凝集体形成せず，⊕凝集体形成，⊗生育せず，○測定せず。

はこれらから分離したので、なんらかの条件下で、凝集体形成が認められ藻状になると考えられる。そこで、これらの菌株を用いてB培地を基礎として、NaCl 溶液10%、好気培養、あるいは、65°C、静置、40°C 振盪培養を行ったがそれらの条件下では藻状凝集体形成は認められなかった。ところが偶然、食塩濃度を高めて好気培養したものを室温放置したものに於いて凝集体の形成を見出した。そこで凝集体の形成に及ぼす NaCl 濃度の影響を検討した。使用菌株として、*Pseudomonas* sp. 203, 204株を、さらに、B寒天培地と SKT 寒天培地を用いて温泉水より分離した B-1 株と SK-1 株も用いた。対照株として、グラム陽性菌として、*Bacillus subtilis* TAM-4、グラム陰性菌として、*Pseudomonas fluorescens* IAM 12,001株を用いた。B-1、SK-1 株共にグラム陽性、長桿菌で、耐熱性胞子を形成し、*Bacillus* 属細菌に類縁菌と推定された。食塩を 0, 1, 3, 5, 10%含む 100 ml B培地 (500 ml 坂口フラスコ) で 30°C、好氣的に24時間振盪培養後、30°Cで一週間静置培養を行った。その結果を表2に示した。凝集体の完全な形成

を＋, 僅かに凝集体を形成するを+, 白濁するが凝集体を形成しないを-, 増殖自体認められないものを×で示した。対照の2菌株は10%のNaClで生育不可能であり, 凝集体を形成しないのに対し, *Pseudomonas* sp. 203, 204株とB-1, SK-1株は共に5% NaCl₂で凝集体を形成した。凝集体の形成および生育度から, 3%のNaClが最適条件であった。また, 凝集体は粘質性の分泌ポリマーを介して形成されることが図10より推察された。また, ポリマーは主として糖より構成されると推定された。以上の結果から, 温泉水より分離した203, 204, B-1, SK-1株は凝集体の形成より温泉由来であることが説明され, さらに, その形成にNaClと静置が必須条件であることが明らかになった。さらにGlucoseの添加により凝集体の形成は阻害された。

要 約

1) 70°C, pH 8.0, NaClを4,000ppm含有, DOは5の古海水起源で天然ガス含有の温泉水から細菌を分離した。

2) 細菌の形態, 生理的性質から“Bergey's manual of determinative Bacteriology”に依り*Pseudomonas*属細菌であると同定された。

3) *Pseudomonas* sp. 203と204株は90°Cの高温, pH 12の高アルカリ, および, 20%の塩に耐性であった。また, 石油成分に耐性であるが資化は出来ない。従って, 古細菌ではなかった。

4) 両株のプロテアーゼ生産は培地のpHが10.5で最も良好であるが, プロテアーゼの至適pHは8.0, 至適温度は40°Cで, 70°Cで完全に失活した。アミラーゼの至適pHも7.2, 至適温度は40°C, あるいは, 30°Cであった。いずれにせよ, 細菌の生息条件とはかなり異なっていた。

5) 温泉水で形成されている黄白色の糸状凝集体から203, 204株を分離したが, これらの菌の培養により人為的に糸状凝集体形成を可能にした。形成には3~5%のNaClの存在と, ある時期以降の嫌気的条件が必須であった。

文 献

1. DÖBEREINER, J. and V. L. D. BAIANI : Selective infection of maize roots by streptomycin resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25** : 1264-1269, 1979.
2. FUWA, Hidetsugu : A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. *J. Biochem.* **41** : 583-604, 1954.
3. HORIKOSHI, K : Production of Alkaline Enzymes by Alkalophilic Microorganisms, part I. Alkaline Protease Produced by *Bacillus* No. 221. *Agr. Biol. Chem.* **35** : 1407-1414, 1971.
4. 駒形和男 : 細菌の分類と同定. 長谷川武治編 : 微生物の分類と同定, 203-244p., 学会出版センター, 1988年.
5. KING, E. O., W. K. WARD and D. E. RANEY : Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44** : 301-307, 1954.
6. 古賀洋介 : 古細菌. *Up Biology*, 東大出版会, 1988.
7. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 256-275, 1951.
8. 日鉄鉱業(株)資源開発部技術開発グループ : 野口温泉水の化学的特性と起源について. 資源開発部報告集, 1990.
9. TAKAMI, H., T. AKIBA and K. HORIKOSHI : Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotech.* **30** : 120-124, 1989.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA FROM HOT-SPRING WATER

Kiyoshi HOSHINO*, Makoto HYAKAWA, Tetsuo OHMACHI and Yoshihiro ASADA

Laboratory of Microbiological technology

SUMMARY

Bacteria were isolated from yellow filamentous aggregates in hot-spring water which was pH 8.0 and contained gas and sodium chloride (4%). Its temperature was 70°C. The isolated bacteria strain 203 and 204 were identified as a *Pseudomonas* sp. according to Bergey's manual of determinative bacteriology. High pH and temperature were not required for the growth of these bacteria as Archaeobacteria. However, these bacteria could survive under the presence of 20% of sodium chloride, at pH 12 and 90°C. It was therefore expected that proteinase and amylase produced by them were active at high pH and temperature.

Production of proteinase by these strains at pH 10.5 was higher than that at pH 7.2. Optimum pH and temperature of proteinase of both strains were 8.0 and 40°C.

Although optimum pH of amylase of both strains was 7.0, their optimum temperature was different. Results showed that these strains have neutral proteinase and amylase.

Moreover, it was found that both strains formed the yellow filamentous aggregates with only standing for one week, after aerobic cultivation in the medium containing NaCl (3%).

Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ. No. 59 : 18—26, 1995.

* Nitetsu-kogyo Co. Research Center