

昭和62年10月

原 著

秋田県内の温泉から分離された好熱性細菌

秋田大学鉱山学部資源化学工学科

井戸 栄治, 高橋 亨, 山崎 誠

(昭和62年5月7日受付, 昭和62年6月20日受理)

Thermophilic Bacteria Isolated from Hot Springs in Akita Prefecture

Eiji IDO, Toru TAKAHASHI and Makoto YAMASAKI

Department of Chemical Engineering for Resources, Mining College, Akita University

(Received May 7, 1987. Accepted June 20, 1987)

Abstract

The authors made a screening survey of the thermophilic bacteria which inhabit in the thermal water of hot springs in Akita Prefecture. Among the twelve isolates obtained in the course of this research, five were extreme thermophiles and the rest seven were moderate ones. From a taxonomical point of view, two typical strains from Oyasu hot springs were chosen and their morphological and physiological properties were characterized. Strain OH04 was a gram-positive, rod-shaped and sporeforming bacterium with several peritrichous flagella and was able to grow well at up to 72°C. Strain OH11 was a gram-negative, rod-shaped and nonsporulating bacterium with yellow pigment and its maximum temperature of growth was 78°C. The results are discussed in reference to comparison with formerly reported thermophilic bacteria.

1. 緒 言

細菌の中には、通常の生物が到底生息しえないような高温の環境にも適応して、活発な生命活動を営むものがあることが知られている¹⁾。一般に55°Cを境として、これより高い温度で生育できる細菌は好熱性細菌と呼ばれ、温泉はこれらの生物にとって最も好適な生息環境のひとつになっている。これまでに報告された好熱菌で最も代表的なものは、グラム陽性の有孢子性桿菌*Bacillus stearothermophilus*²⁾であり、この細菌の生育上限温度は65~70°Cであった。ところが近年、より高温の75°C以上で生育できる新しい細菌(これを高度好熱菌と称し、従来のものを中等度好熱菌と呼んで区別する)がアメリカ合衆国イエローストーン国立公園内の自噴泉より発見³⁾され、以後類似の高度好熱菌が静岡県⁴⁾の峯温泉⁴⁾および熱川温泉⁵⁾や群馬県の川俣温泉⁶⁾からも報告されるようになった。これらの高度好熱菌は、いずれもグラム陰性で孢子をつくらない桿菌という共通性があることから、現在では*Thermus*属と呼ばれる新しい属に分類されるようになっている。

高温という極限的環境に生存できる好熱性細菌は、その驚くべき生命力に対する自然科学的興味からも、またその耐熱性という特殊能力の潜在的有用性からも、注目すべき研究対象のひとつである。しかしながら、これまでに調査された地域、種類数共に大変限定されており、新たな好熱性微生物を探索することは、今後益々重要になるものと考えられる。

奥羽山脈中心部には、北の八幡平から南の栗駒にかけて日本でも有数の地熱地帯のひとつがあり、泉源温度が80℃を超える様々な泉質の温泉が多数存在している。そこには一体どのような好熱性細菌が活動しているであろうか。著者らは、この地域における好熱菌の生息状況を明らかにすることを目的として、まず秋田県内にある比較的高温の温泉を対象に好気的好熱性細菌の分離調査を行った。その結果、高度好熱菌5株を含む計12株の好熱性細菌が分離され、またそれらの細菌学的性質も明らかにされたので、両者を併せてここに報告する。

2. 試料と実験

2.1 試料の採取と分離培養法

好熱菌分離の出発試料は、秋田県内に湧出する高温の温泉水(強酸性や50℃未満の温泉は対象外)であり、これを湧出口附近や貯湯槽から滅菌したガラス容器に採取した。この時、底に堆積している泥状の沈澱物や土壌があればこれも少量加えるようにした。研究室に持ち帰った試料は、

直ちにその1mlを下記の液体培地5mlが入れてある試験管(16.5×165mm)に加え、モルトン栓をして70℃(時に65℃もしくは75℃)で振とう培養(100回/分)した。液体培地はRamaleyとHixsonの10倍濃度基礎塩溶液⁷⁾を蒸留水で10倍に希釈したもの、栄養源としてポリペプトン、酵母エキスを各々0.1%になるように加え、pHをNaOHで6.7に調整して作成した(培地組成を表1に示す)。

培養開始後1～3日すると、細菌が繁殖した場合には培養液の濁度が増加するので、これを0.1ml取り新しい培地5mlに移す。このようにして4～5回以上継代が可能になったものを、上記の培地組成に2%寒天を含む平板培地(予め径90mmのプラスチックシャーレに作成しておく)の上に白金耳で塗布し、65℃で静置培養した。形成され

表1. 培地組成

ポリペプトン	0.1%
酵母エキス	0.1%
10倍濃度基礎塩溶液	
1,000ml/ Castenholzの10倍濃度塩溶液 (g/蒸留水1l)	
ニトリロ三酢酸	1.0
CaSO ₄ ・2H ₂ O	0.6
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.0
NaCl	0.08
KNO ₃	1.03
NaNO ₃	6.89
Na ₂ HPO ₄	1.11
10ml/ Nitsch's微量成分溶液 (g/蒸留水1l)	
H ₂ SO ₄	0.5
MnSO ₄ ・5H ₂ O	3.16
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.5
H ₃ BO ₃	0.5
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.046
10ml/ FeCl ₃ ・5H ₂ O (0.4g/蒸留水1l)	

たコロニー(集落)は、色・形などから別種と判断されるものを個別に拾い出して再び液体培養を行う。なお、この操作を単一の集落が形成されるまで繰り返して純粋分離を確実にした。最終的に分離株は、アンプル中に凍結乾燥封管して長期保存に供した。

2.2 分離株の細菌学的特性付けと形態観察

分離された各菌株の特性については、グラム染色性や生育の温度およびpH依存性など通常の細菌学的性質を明らかにすることに加え、熱安定性を調べるために100℃の熱処理や4℃の冷却処理を時間を変えて行い、対照と比べて寒天培地上のコロニー数がどう変化するかを計測してみた。また光学顕微鏡観察と併せて走査型電子顕微鏡による形態観察も行った。菌体試料液はカバーガラス上で風乾後、2%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)溶液で4℃下1時間固定する。これを水洗後再び風乾し、金蒸着を8分間行った後、JEOL-SEM50Aで観察した。

3. 結果と考察

3.1 好熱菌の分離状況

本研究における試料の採集は、1986年9月から12月にかけて行われた。採取地と温泉水の温度、pHおよび好熱菌の分離結果を表2に示す。ここで表中の生育上限温度は、新しい培地に移して3日以内に菌の増殖が見られる最高の温度を表している。5℃刻みで調べたので、株によってはさらに数度高いところでも生育できることを断っておきたい。表に示されるように県内7つの温泉、13の地点より合計12株の好熱菌が分離された。小安温泉は含芒硝食塩泉で、ここからは熱湯が河岸壁から噴き出ている通称“大噴湯”を始めとして分離の効率がよく(結果として採取地点数が多くなってしまったが)、高度好熱菌5株を含む計10株の好熱性細菌が得られた。この外には、重曹炭酸泉の蟹場温泉から中等度好熱菌が2株分離されたのみで、その他の温泉からは1株

表2. 好熱菌の分離状況

採 取 地	温度[℃]	pH	分 離 株[生育上限温度℃]
蒸ノ湯温泉(鹿角市八幡平)	80	6.1	—
大沼温泉*(“)	94	7.6	—
大深温泉(仙北郡田沢湖町)	80	4.4	—
蟹場温泉(“)	50	5.6	KM01[65], KM02[65]
黒湯温泉(“)	80	3.6	—
“ (“)	63	3.6	—
小安温泉(雄勝郡皆瀬村)	90	7.8	OH02[70]
“ (“)	63	7.7	OH03[70]
“ (“)	73	6.6	OH04[70]
“ (“)	78	8.8	OH07[75], OH09[75], OH10[75]
“ (“)	91	8.4	OH11[75]
“ (“)	90	7.8	OH05[70], OH06[70], OH12[75]
大湯温泉(“)	91	9.2	—

* 大沼地熱発電所内

も得ることはできなかった。

得られた12の菌株は、生育上限温度からみると次の2群に大別される。即ち、ひとつは75℃では生育できない中等度好熱菌の7株KM01, KM02, OH02, OH03, OH04, OH05, OH06であり、これらはいずれも白色の円形コロニーを形成するという共通点を有していた。初めの2株が生育上限温度がやや低く、また各々はコロニーの白色の程度が異なっている。他方、小安温泉の5株OH07, OH09, OH10, OH11, OH12は、いずれも75℃以上で生育することのできる高度好熱菌であり、こちらは黄色のコロニーを形成するという共通点があった。

中等度好熱菌は、温泉の他にも堆肥中など自然界に広く分布することが既によく知られていたが、高度好熱菌については、緒言にも述べたようにその分離報告すら極めて限られている。今回小安温泉から高度好熱菌が分離されたことは、東北地方以北の北日本では初めての報告であり、その生態学的分布を考える上で意義深いものと思われる。

3.2 分離株の細菌学的性質とその分類

上に述べたように、分離された各菌株は2群に大別されるが、各群はコロニーの色が違っていることなどから、それぞれ種属の相異なる好熱菌に対応しているのであろうと考えられた。そこで各群の代表としてOH04, OH11を選び、さらに詳細に細菌学的性質を調べて各々の種の同定を試みることにした。その結果は次の通りである。

まずOH04はグラム染色陽性で、生育上限温度は72℃であり、40℃以下では生育が起こらないいわゆる絶対好熱菌であった。この菌の熱安定性は極めて強く、100℃で30分間処理しても、また4℃や室温で1昼夜放置しても、寒天培地上のコロニー数で判定する限りほとんど死滅は見られなかった。生育のpH依存性は、5.5から9.5まで比較的広い範囲にわたり良好な生育が認められ、至適pHは6～8であった。光学顕微鏡による形態観察によると、直径0.5～0.6 μm 、長さ3～8 μm の長桿菌で、運動性が認められた。また分裂直後と思われる2つの菌体が両端でくっついている形態も時に見られた。走査型電子顕微鏡による高倍率の観察(図1.a)では、両端の丸い長桿菌である形態が鮮明に見られ、加えて莢膜様構造や、菌体表面から長さ5～10 μm の鞭毛が5～6本出ている様子までが見てとれる。先の菌体の運動性はこの周鞭毛によって起こるものと思われる。またこの菌は、直径0.8～1.0 μm 、長さ1.2～1.6 μm の内生胞子を形成することができる(図1.b)。

一方OH11はグラム染色陰性であり、生育上限温度は78℃であった。これもまた40℃以下では生育しない絶対好熱菌であったが、運動性は認められなかった。この菌の熱安定性は同様に良かったが、100℃20分間の処理でコロニー数が半減するというようにその程度はOH04に比べやや弱かった。生育のpH依存性は、至適pHを8.5として ± 1 前後の比較的狭い範囲でしか良好な生育を示さなかった。この株をpH 6.7の培地で分離することができたのは幸運であったと言えよう。実際、この培地ではOH11の継代は永く続かず不安定で、以後pH 8.5の培地で植え継ぐようになっている。走査型電子顕微鏡による観察では、これは直径0.4～0.5 μm 、長さ2～5 μm の長桿菌であり(図2.a)、OH04に比べやや小型であった。莢膜、鞭毛などの構造や孢子形成能は認められなかったが、この菌の分裂増殖に際して面白い現象が観測された。即ち、新しい培地に移して1日目では、細胞分裂しても互いに直ぐには切り離れることなく幾つもの菌体が繊維状につながっている形態が多く見られる(図2.b)のに対し、さらに2日目経過(3日目)すると、それぞれ切り離れて、もはやそのような形態は見られなくなるのである。

以上、現在までに得られた情報から、各々の菌株の種属について考えられることは次の通りである。

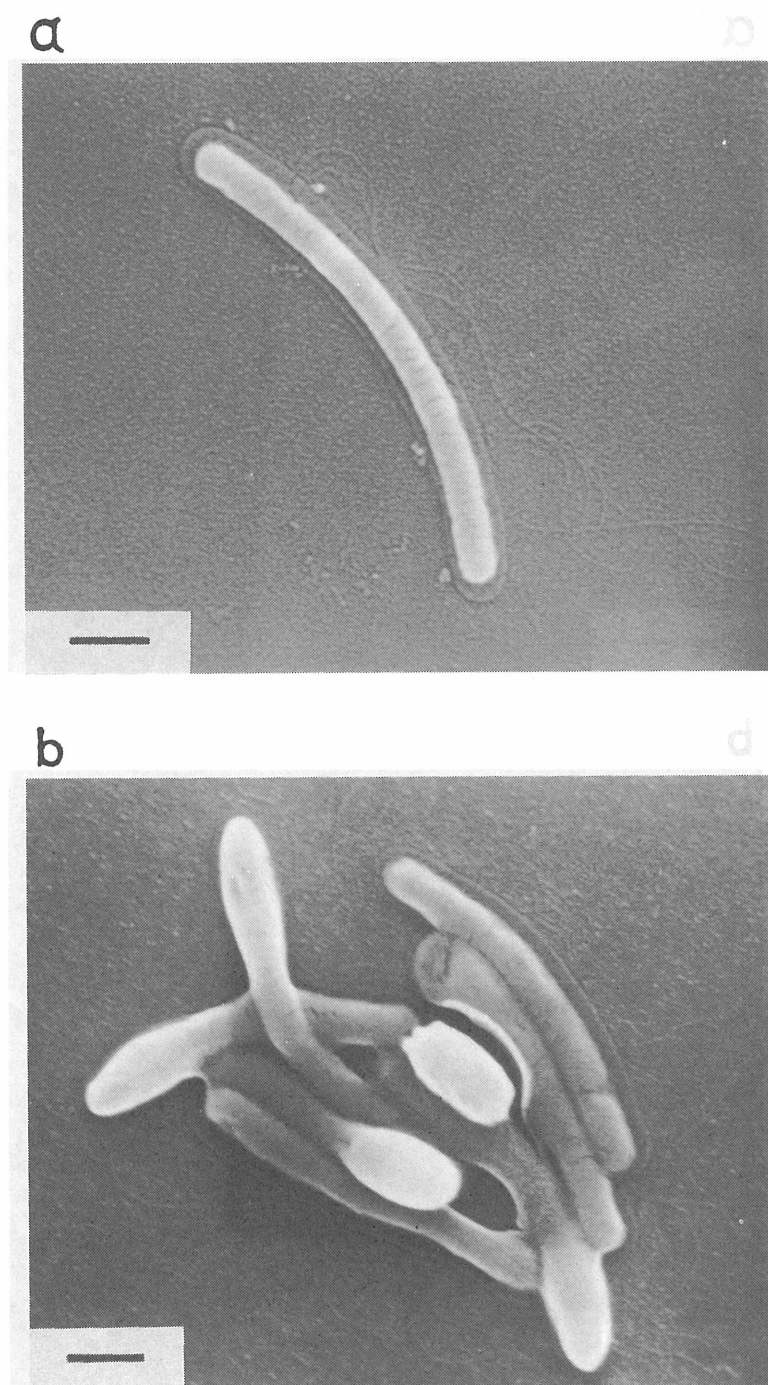


図1. 小安温泉から分離された*Bacillus* 属に属する細菌OH04の走査型電子顕微鏡写真 (スケールは1 μ m)
 (a) 静止期の細胞, 莢膜様構造や周鞭毛が見られる.
 (b) 内生孢子形成の瞬間.

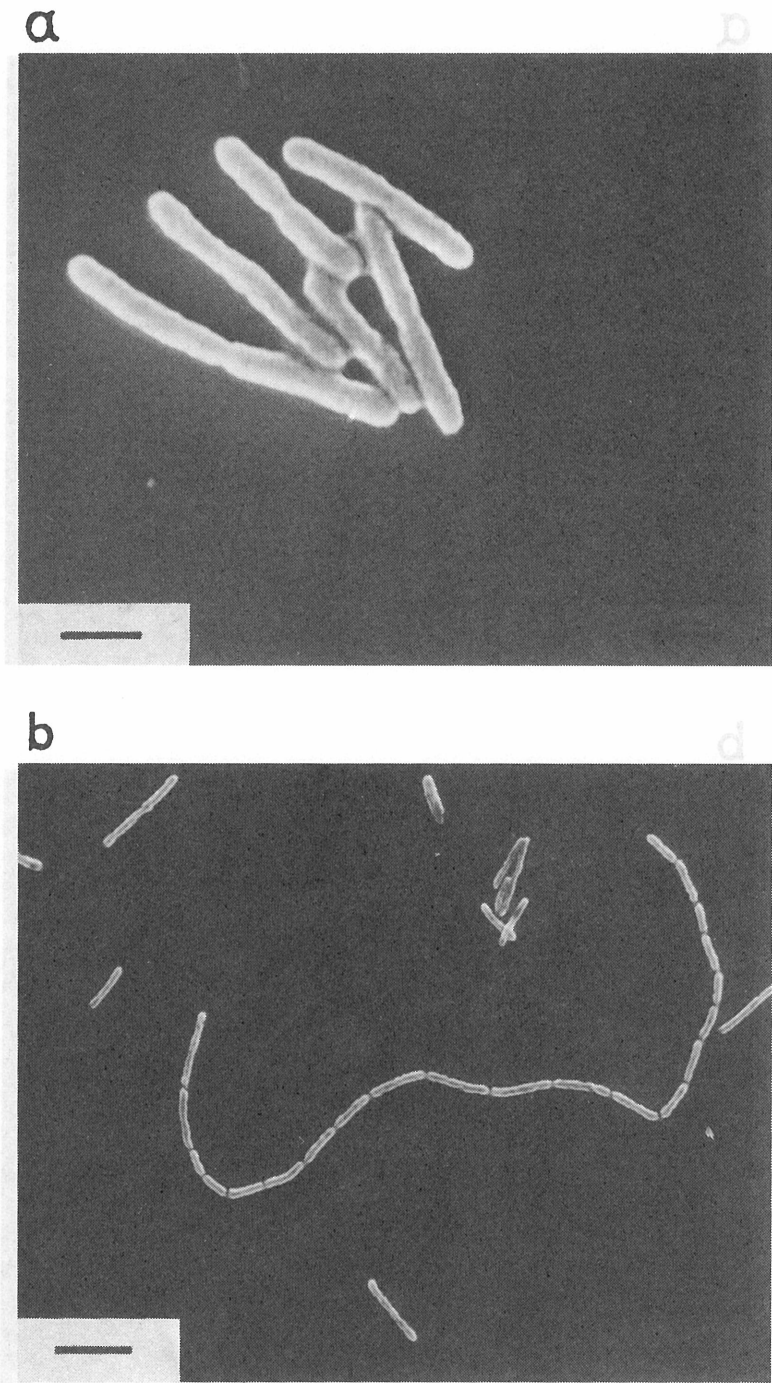


図2. 小安温泉から分離された*Thermus* 属に属する細菌OH11の走査型電子顕微鏡写真 (スケールは(a) 1 μ m, (b) 5 μ m)。(a) 静止期の細胞。(b) 増殖期の細胞。分裂した細胞が繊維状に幾つもつながっている。

OH04はグラム陽性で孢子形成能があることから*Bacillus*属に分類されるべきものであろう。70℃前後まで生育できる*Bacillus*属と言え、従来*B. stearothermophilus*と考えるのが通例であった。ところが*B. stearothermophilus*には、その顕著な特性として常温で急速に死滅することが上げられており¹⁾、一方、OH04はその点で常温で極めて安定という相反する性質を有している。つまりこの株は、従来の中程度好熱菌とは異なる新しい型の*Bacillus*属好熱菌であると考えられるのである。そこで著者らは、この株を仮に*Bacillus aktothermophilus* OH04と呼ぶことにして、分類上の正確な帰属に関しては、今後の検討を待って明らかにしたいと考えている。

OH11は黄色の色素(カロチノイド)を含むグラム陰性の長桿菌という点で、近年報告されている高度好熱性細菌の仲間の1種であろうかと考えられる。形態、生育上限温度などからみてBrockとFreezeがイエローストーン国立公園で発見した*Thermus aquaticus* YT-1³⁾およびTaguchiらが群馬県で分離した*Thermus caldophilus* GK24⁶⁾によく似ているが、地理的な要因を考慮に入れると、むしろ後者に近縁のものと考えるのが妥当かも知れない。いずれにせよ、この株は*Thermus*属に分類されるべきものと思われるので、著者らはこれを一応*Thermus* OH11と呼ぶことにした。

結 語

以上本研究により、78℃で活発に生育できるグラム陰性の長桿菌が秋田県小安温泉から分離され、高度好熱性細菌が東北地方にも生息することが初めて明らかにされた。高度好熱菌の研究は歴史がまだ浅く、特に生態学的分布についてはしられざることが多い。ここに新たな生息地と菌株が得られたことは、その意味で意義が大きい。同温泉からは、同時に、これまでに報告されたことのない性質を持つ中程度好熱菌が分離された。これは72℃で生育が可能な極めて熱安定性と環境適応力の強いグラム陽性長桿菌で、今後の好熱性細菌の研究にとって有用性の高い材料が新たに提供されたものと考えられる。

なお本研究では、中性pH域で生育する好熱性細菌に焦点を定めて調査を行ったが、県内には高温で強酸性の温泉も多数存在している。分離培養条件を変えてこれらの温泉に生息する好酸性好熱菌について研究することは、今後に残されている課題であろう。

最後にこの研究を行うに当たり、走査型電子顕微鏡観察に関し本学資源地学研究施設の本多朔郎博士並びに佐々木恭治氏に多大の御助力をいただきました。ここにご両名に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 大島泰郎(1978): “好熱性細菌”(UP バイオロジーシリーズ), 東京大学出版会.
- 2) Allen, M.B. (1953): *Bact. Rev.*, **17**, 125-173.
- 3) Brock, T.D. and Freeze, H. (1969): *J. Bacteriol.*, **98**, 289-297.
- 4) Oshima, T. and Imahori, K. (1971): *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 513-517.
- 5) Saiki, T., Kimura, R. and Arima, K. (1972): *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2357-2366.
- 6) Taguchi, H., Yamashita, M., Matsuzawa, H. and Ohta, T. (1982): *J. Biochem.*, **91**, 1343-1348.
- 7) Ramaley, R.F. and Hixson, J. (1970): *J. Bacteriol.*, **103**, 527-528.