

クリスマス島のラグーンから分離した好塩性細菌

森下 新*、 森下 日出旗

(平成 26 年 1 月 10 日受理)

Bacteria isolated from lagoon in Christmas Island and their halophilic character

Arata Morishita and Hideki Morishita

Summary

We isolated the lagoon bacteria from Christmas Island in Republic of Kiribati and examined the growth property of their bacteria in salt resistance and growth temperature, nutritional requirement, and growth pH. Salt concentration in the lagoon water was 3.8%, and the temperature was 28°C. The isolated bacteria contained, slight halophiles, moderate halophiles, extreme halophiles, fresh water bacteria, and salt-tolerant bacteria. Extreme halophilic bacteria (H 3-8) could grow in 3.5M NaCl environment but not in isotonic condition environment of KCl, non-Electolyte, nor ethylene glycol (E.G). Optimal growth temperature was at 25°C, but bacteria of extreme halophilic and salt-tolerant required the temperature 37°C. Except extreme halophilic bacteria, the optimal pH for growth was 7.0. Only extreme halophilic bacteria needs 8.0 pH. The nutritional requirement of isolated bacteria was oligotrophic and eutrophic character.

Key words: Lagoon, Christmas Island, Halophilic bacteria

要旨: 赤道直下のキリバス共和国のクリスマス島においてそのラグーンに存在するバクテリアを分離し、その好塩性と生育 pH、温度、栄養要求、抗生物質耐性を調べた。このラグーンには淡水性細菌、好塩性細菌、中等度好塩菌、高度好塩菌、耐塩性細菌がみられた。これらの細菌の生育 pH は中性であり、生育温度は 25°C であったが、高度好塩菌と耐塩菌に 37°C のものもみられた。栄養要求性については富栄養性 Eutrophic であったが貧栄養性 Oligotrophic もみられた。抗生物質耐性は Kanamycin に対する耐性が主に好塩菌にみられた。

キーワード: ラグーン, クリスマス島, 好塩性細菌

*連絡責任者・別刷請求先 (corresponding author, E-mail: info@osk3.com)

株式会社 大阪生物環境科学研究所 (567-0851 大阪府茨木市真砂 3 丁目 4-30)

Osaka Institute of Environmental Life Science Inc., 4-30 Masago-3-chome, Ibaraki, Osaka 567-0851, Japan

1 はじめに

クリスマス島はハワイの南方2,113kmにあり赤道直下に存在し、キリバス共和国に属している。このキリバス共和国は33の環礁からなりサンゴ礁の島として知られ、最大級で面積が388km²を有する島である。

この島の由来はイギリスのジェームス・クックが1777年にこの島に到着したことに始まる。人口は約10万人でその98.9%はマイクロネシア人である。これは約2000年前、先住民として西方よりカヌーに乗ってやってきたマイクロネシア系の人々に由来するものである。

この島の周囲は図1に示す様に沖合3.3kmで水深1,000mに達する。

この島は赤道直下にあるためか表面水温は40°Cに達するが、水深1,000mの海洋の深層水は5°Cと極めて低い。そのためこの温度差を利用して海洋温度差発電を行ったらとの構想が打ち出された。この島は北緯1.5°という赤道直下に位置するため、宇宙開発事業団NASDA(現)宇宙航空研究開発機構(JAXA)の無人宇宙往還機の着陸実験上として計画されたが実行に至らなかった。しかし人工衛星の監視には使用された。

海洋温度差発電の仕組みは図2に示した通りである。まず表面の温かい海水をくみあげ、これによりアンモニアかフロンを温め、蒸気に気化させる。この蒸気気体によりタービンをまわし、発電にもって行く。その時使用したアンモニア(またはフロン)の蒸気は海からの深層水(5°C)で冷却して液化し、元にもどす。このアンモニアを気体にした後、液体にするために温度水を島の表面海水か、すぐ沖合の深層水を使用しながら目的を達する。要するにタービンを回し、発電に持って行くことが出来るというものである。

このことは日本では佐賀大学の海洋エネルギー研究センターが沖縄県久米島で実験を行っており、アンモニアと水の混合媒体を冷媒に使用している。一方、アメリカではハワイのコナコーストにあるハワイ州立自然エネルギー研究所(NELHA)が実験施設となっている。これらのことが事業化されるとこの施設から温排水を出すことになる。この温排水が環境にどのような影響を及ぼすのかそのことが問われることになった。そこでまずその近辺の海水中の微生物を調べることが必要になって来たのでその調査を行った⁽¹⁻⁶⁾。この報告書がその中身である。

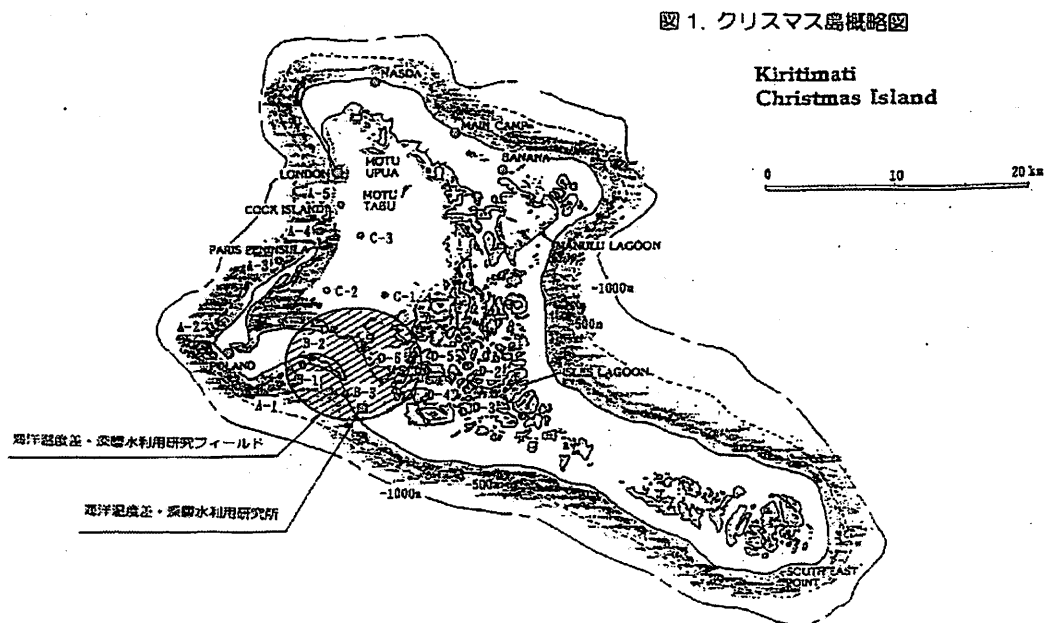
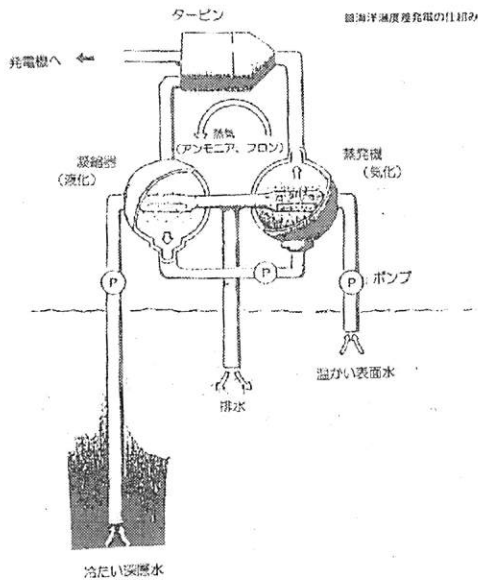


図2. 海洋温度差発電概略図



2 材料及び方法

クリスマス島のラグーンに定点を定め(図1)、その定点より水を採取し、日本に持ち帰った。これらの水よりバクテリアを分離し、その中で珊瑚礁の海水を想定し、好塩性を考慮し、その中で典型的な分離株を取り出し、その分離株について検討を行った。分離株の同定については Buchanan and Gibbons⁽⁷⁾に従った。

この分離株については好塩性細菌、低度好塩性細菌、中等度好塩菌、高度好塩菌、耐塩菌の6種に分け(表1)、その中4株につき検討を行った。検討項目は食塩濃度及び浸透圧について電解質の NaCl, KCl, 非電解質の Eethylene glycol (EG) に対する耐性、pH、温度、栄養濃度、抗生物質耐性等を調べた。

培地はBYP培地(0.3% Beef extract, 0.3% Yeast extract, 1% Polypepton)を使用し、pHは7.0とし、培養温度は30°Cで行った。生長は分光光度計(Bausch & Lomb)で、650nmで測定した。

3 結果及び考察

まず、クリスマス島の置かれている位置と環境から微生物について塩分と温度につき検討を行った。ラグーンについての調査データは(表2)に示し

た。これによると測定時水温は大体28°Cで塩分は3.8~3.9%であった。

塩分についての微生物については表2に示す様に大まかには5種類に分けられた。それらは①淡水菌 ②低度好塩性細菌 ③中程度好塩菌 ④高度好塩菌 ⑤耐塩菌である。

この中、好塩菌は3つに分けられるがいずれも Obligate halophilic bacteria (絶対好塩性)であり、耐塩菌は Facultative halophilic bacteria (任意好塩性)であった。ラグーンから得られた4種のバクテリアは Freshwater bacteria (F-45) Slightly halophilic bacteria (S1-32), Extremely halophilic bacteria (H,3-28)及び Halotolerant bacteria (ST, 2-50)であった。

珊瑚礁では潮の干満により、更に太陽光により、塩分濃度の変動と水温の変動に常にさらされる状況にある。しかも赤道直下であることを考慮してもそのあたりの変動は常に起こりうるものであった。しかし表1に見られる様に調査データは水温28.4°C前後で塩分濃度は大体3.8%でおおきな変動はみられなかった。

特に内陸ラグーンにおいてはそのことが顕著に表れたものである。

1) 塩分濃度依存性

そこでまず代表的4株について塩分濃度依存性を調べてみた。結果は図3に示した通りである。これによると Freshwater bacteria は全く塩感受性菌で海水なみの3%NaCl、(0.5M NaCl)では生育出来ないものであった。しかし図2に見られる様に0.1M NaClでは Salt free より良好な成長を示す株であった。このことはKClでも非電解質のEGでもみられた。

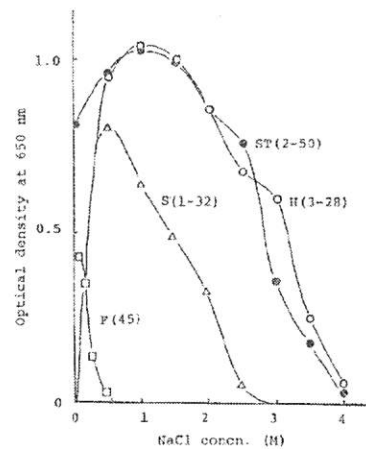


図3. 分離株の生長における食塩濃度の影響

表 1.

Halophiles (好塩細菌) Salt-tolerant bacteria (耐塩細菌)

Slight halophiles 低度好塩細菌 (食塩 1.5~5%で生育良好)

Pseudomonas, *Vibrio* (*V.parahaemolyticus*=病原性), *Achromobacter*,
Flavobacterium (海洋細菌など海に存在)

Moderate halophiles 中等度好塩細菌 (5~18%の食塩下で生育最適)

Ps. beijerinckii, *Vibrio* (*V.costicolus*, *V.halonitrificans*)
Achromobacter, *Sarcina*, *Bac. licheniformis*, *Mc.Halodenitrificans*,
Pc.halophilus, *Tetracoccus soyae nov.sp.*, *Bacteroides halosmophilus*
(肉、朝金、肉の塩漬液、みそ、しょうゆ調味などに存在)

Extreme halophililes 高度好塩細菌 (20~30%の食塩下で生育最適)

Halobacterium (*H.salinarium*, *H. cutirubrum*, *H.halobium*,
H.marismortui, *H.trapanicum*), *Sarcina litoralis* =*Mc.morrhuae*
(死海、塩湖、海塩、塩蔵食品に存在)

Salt-tolerant bacteria 耐塩菌 (大体 10%食塩下で生育)

Bacillus, *Micrococcus*, *Slaphylococcus* 中のいくつかの種
Pc.urinae equi, *Sc.faccalis*, *Brevibacterium linens*

上記の細菌以外の好塩性、耐塩性微生物としては

酵母の *Tbrulopsis halonitratophila nov.sp.*, (絶対好塩性),
T.wahmeri (低度好塩性) *Debaryomyces*, *Sacch.rouxii* (耐塩性)
カビの *Sporendonema sebi* (正しくは好浸透圧性)
緑藻類の *Dunaliella* (好塩性) 等がある

表2 ラグーンにおける調査資料

主ラグーン内部																			
日時	天候	気温 ℃	場所	深度 m	資料	水温 ℃	塩分 %	DO ppm	PH	COD ppm	SiO2-Si ug/l	PO4-P ag/l	NH4-N ag/l	NH2-N ag/l	NH3-N ag/l	SS ppm	透明度 m		
24/1015	○□	28.3	C-1	0	S-12	28.42	38.88	7.2	7.94		0.95	0.02	0.005		0.072	2.1			
				1		28.42	38.88												
				2		28.42	38.88												
				2.5		28.42	38.88												
24/1115	○□	29.1	C-2	0	S-13	28.35	38.88	7.8	7.98		0.64	0.02	0.002		0.103	4.0			
				1		28.37	38.88												
				1.5		28.42	38.88												
24/1146	○□	29.0	C-3	0	S-14	28.29	38.39	7.2	7.96		0.95	0.02	0.003		0.094	3.4			
				1		28.28	38.40												
				2		28.27	38.40												
				3		28.28	38.39												
3.5		28.28	38.40																
内陸ラグーン内部																			
日時	天候	気温 ℃	場所	深度 m	資料	水温 ℃	塩分 %	DO ppm	PH	COD ppm	SiO2-Si ug/l	PO4-P ag/l	NH4-N ag/l	NH2-N ag/l	NH3-N ag/l	SS ppm	透明度 m		
26/940	○□	29.8	D-2	0	S-15	29.14	134 ~139	5.4	8.08		74.89	0.02	0.003			45.0			
26/1004	○□	30.9	D-3	0	S-16	29.6	89 ~90	7.0	8.14			0.04	0.007			31.0			
26/1038	○□	30.3	D-4	0	S-17	28.4	100	6.0	8.06		28.62	0.03	0.04		0.105	13.8			
26/1050	○□	30.6	D-5	0	S-18	28.8	70	7.0	8.39			0.04	0.005			5.6			
26/1115	○□	30.9	D-6	0	S-19	29.6	40	8.1	8.21		5.8	0.03	0.003		0.07	6.5			

次に Slightly halophilic bacteria (S,1-32) についてはふつう海水なみの 0.5M NaCl を Peak にして 2.5M NaCl まで生長が見られた。しかし Salt-free では生長はみられなかった。どうやらこの株は Marine bacteria が origin であるが、ラグーンの高い塩濃度にさらされることにより高塩濃度の適応したものと思われる。また図3で見られる H (3-28) 株は 4M NaCl 近くまで育成できる高度好塩菌であるがこの株の由来も Marine bacteria によるものと想像された。

このことは赤道直下であることによる環境の影響によるものと思われる。また耐塩菌の ST (2-50) 株 (図7) は塩分のない所でも生長がみられるが NaCl 濃度に対する生長挙動は高度好塩菌と全く同格であり、このクリスマス島の塩分にさらされる状況は大変異常なもので、このことがこれらのバクテリアの挙動に大きく影響したものと思われる。

2) NaCl, KCl の電解質及び Ethylene glycol (EG) の影響

そこでこれらの Bacteria の細かい挙動を見てみた。

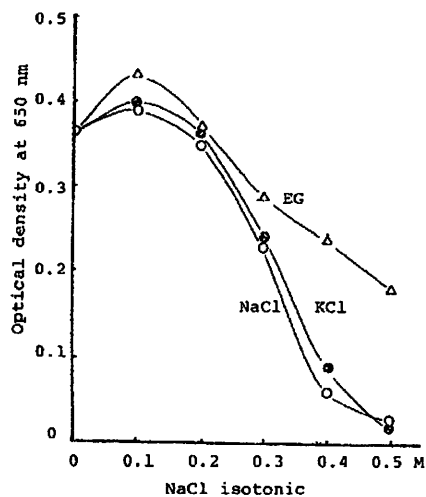


図4. 分離株 F (45) の生長における浸透圧の影響

以後、NaCl と等張の KCl、非電解質の Ethylene glycol (EG) について分離株の反応を調べてみた。すると 図4 に示す様に F (45) は塩感受性でありながら実際には 0.1M NaCl に Peak を示す挙動を示した。この Peak は非電解質の Ethylene glycol (EG) でも同様のことがみられ非常に興味あるところである。これは NaCl や

KCl の電解質のみならず浸透圧の影響が大きいことがうかがえる。

次に Slightly halophilic bacteria である S1-32 株について電解質の KCl 及び非電解質の EG について調べてみた。その結果は図5に示した通りである。この結果からみるとまさに NaCl 環境のみに生長が見られ、Salt free、KCl、EG 環境ではみられなかった。このことは NaCl が最も重要であることを示している。

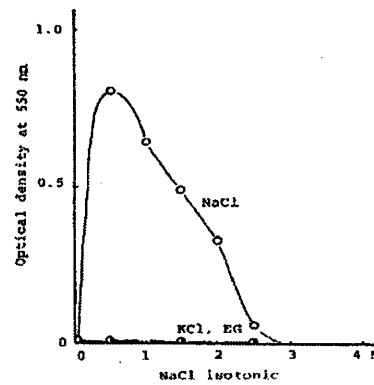


図5. 分離株 S(1-32) の生長における浸透圧の影響

次に H (3-28) 株について図5と同様のことを調べてみた。この結果は図6に示した。これによると S 株と同様 Salt-free では育成出来ず、3.5M~4M NaCl でも育成がみられこの株はまさに高度好塩菌、Extremely halophilic bacteria であった。このことは海水環境からみると考えられない事であるが、どうやらこのクリスマス島では赤道直下で塩分の増加を行うラグーンが存在することによりその環境から誘導され耐塩性を持つに至ったものと想像される。

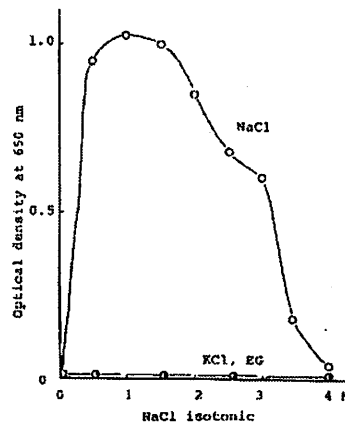


図6. 分離株 H(3-28) の生長における浸透圧の影響

表 3. 分離株の生長における pH の影響

Strains	pH						
	4	5	6	7	8	9	10
P (45)	0.082	0.080	0.060	<u>0.670</u>	0.560	0.440	0.127
S (1-32)	0.040	0.040	0.140	<u>0.540</u>	0.410	0.290	0.240
H (3-38)	0.020	0.040	0.380	0.510	0.580	0.510	0.320
ST (2-50)	0.040	0.280	0.520	0.540	0.480	0.130	0.020

(Data: O.D. 650 nm)

表 4. 分離株の生長における温度の影響

Strains	Temperature (°C)				
	20	25	30	37	42
F (45)	0.180	0.190	0.180	0.128	0.022
S (1-14)	0.660	<u>0.940</u>	0.660	0.560	0.390
(1-32)	0.530	<u>0.560</u>	0.470	0.440	0.430
(1-34)	0.540	<u>0.680</u>	0.490	0.560	0.078
H (2-26)	0.560	<u>0.780</u>	0.500	0.600	0.160
(3-28)	0.620	<u>0.900</u>	0.720	0.780	0.150
(3-29)	0.460	0.550	0.670	<u>0.770</u>	0.120
ST (1-12)	0.590	<u>0.600</u>	0.540	0.530	0.420
(2-50)	0.225	0.225	0.210	<u>0.260</u>	0.160

(Data: O.D. 650 nm)

表 5. 分離株の生長における栄養濃度の影響

Strains	BYP concentrations							
	2/1	1/1	1/2	1/5	1/10	1/20	1/50	1/100
P (45)	<u>0.920</u>	0.720	0.630	0.475	0.347	0.213	0.127	0.048
S (1-32)	0.970	<u>1.110</u>	0.730	0.485	0.303	0.123	0.147	0.100
H (3-38)	<u>0.850</u>	0.720	0.405	0.195	0.098	0.071	0.068	0.029
ST (2-50)	<u>1.400</u>	1.300	1.080	0.780	0.520	0.305	0.180	0.030

(Data: O.D. 650 nm)

表 6. 分離株の抗生物質に対する耐性

Strains	Drugs							
	PC-G	AP	SM	KM	CM	TC	EM	PMX-B
F (42)	+	+	-	-	-	-	-	-
(45)	+	+	-	-	-	-	-	-
S (1-14)	-	-	-	+	-	-	-	-
(1-32)	-	-	-	+	-	-	-	-
(1-34)	-	-	-	+	-	-	-	-
H (2-26)	+	-	+	+	-	-	-	-
(3-28)	+	-	+	+	-	-	-	-
(3-29)	+	-	+	+	-	-	-	-
ST (1-12)	-	-	+	+	-	-	-	-
(2-50)	-	-	-	-	-	-	-	+

(Drug concn., final 50 ? /ml, +: resistance, -: sensitive)

次に耐塩性を有する ST (2-50) 株について検討した。この株についての結果は図 7 に示した通りである。この株は salt-free でも育成できるが NaCl に対して 3.5M でも生育出来る。しかし KCl 及び EG 環境ではその濃度が増すことにより 3M NaCl 等張環境に於いて直線的に阻害された。しかし NaCl のみ好塩性を示し、1M NaCl 前後の濃度で最大を示し、halotolerant な性質を示した。

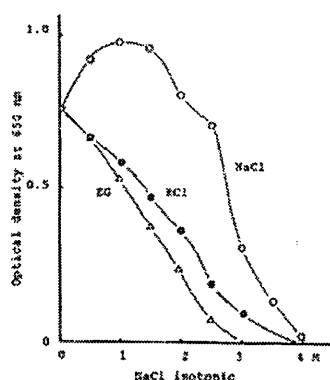


図 7. 分離株 ST(2-50)の生長における浸透圧の影響

この様にクリスマス島のラグーンから分離した Bacteria には塩分に対して多様性を示すものが多く太平洋の真中で赤道直下という地理的環境からするとそこでの bacteria はそれなりの塩分に対して挙動を示し、一様でない所が興味ある所である。

3) pH の影響

次にこれらの bacteria について pH の影響を調べてみた。これを表 3 に示した。これらの株の中 H 株以外は pH 7 を最適 pH とした。唯一 H 株のみ pH 8 を最適 pH として要求した。このことから pH に関しては余り変わらないものと思われる。

4) 温度の影響

次に温度に対する分離株の生長への影響を調べてみた。この結果を表 4 に示した。これによると最適温度は 25°C あることが明らかとなった。しかし、H 株と ST 株のあるものは 37°C に最適温度を示した。これは *Vibio parahaemolyticus* なみのもので非常に顕著な例であると思われる。^{8, 9)}

5) 栄養要求性

次にこれら分離株について栄養要求性を調べてみた。

栄養に使った BYP は増殖させるために使用した BYP 培地の濃度変化をさせて成長をみたもので

ある。結果は表 5 に示した通りである。この結果からみると富栄養での生育が S 株以外良好な成長を示し、富栄養細菌 Eutrophic bacteria であるものの、1/100 BYP でも生育を示し、貧栄養性細菌、Oligotrophic bacteria でもあった。これらの結果からみるとこのラグーンでは微生物の生育のための栄養は変動がはげしく富栄養でも貧栄養でも生き延びることが出来る Bacteria であることがクリスマス島の特徴である。

6) 抗生物質の影響

そこで更に抗生物質に対する挙動を調べてみた。結果を表 6 に示した。

使用した構成物は 8 剤である。この抗生物質について調べてみると Penicillin 系と Kanamycin、Streptomycin に耐性のものが多く見られた。この理由についてはまだよく解っていないが今後の問題である。

参考文献

- Mimura.H & S.Nagata (2000)
Isolation of halotolerant microorganisms from seawater around the inland sea in Western Japan, Microbes and Environments 15(4)217-221
- Sasaki.H, E. Iwata, A. Oshima, A. Ishida & S. Nagato (2009)
Isolation of extreme halotolerant bacteria from Asian Resert Dust ; Molecular phylogeny and growth properties of their cells, Resear. J. Microbiol.4(7) 250-268
- Macheod R.A.(1955)
The question of the existence of specific marine bacteria, Bactiol Rev. 29,9-23
- Galinski E.A. (1995)
Osmoadaptation in bacteria
Adv. Micob.physiol.37; 273-328
- Carrasco.I.J., M.C.Marquez, X. Yanfen, Y.Ma & D.A.Cowan et al (2006)
Gracibacillus orientalis sp. nov., a novel modelately halophilic bacterium isolated from a salt lake in inner Mongolia, China, Int. J. sist. evol. microboil. 567 ; 599-604
- Yuans.,P, Ren. J. Liu, Y. Xue, Y.Ma and P. Zhou (2007)
Lentibacillus halodirnas sp.nov., a moderately

halophilic bacterium isolated from a salt lake in Xin-Jiang, China, *Int. J. sist. evol. microbial*, 485-488

7) Buchanan R.E. and Gibbons, N.E. (eds)(1974); *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th Ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore

8) Morishita H. and H.Takada (1976) Sparing effect of Lithium ion on the specific requirement for sodium ion for growth of *Vibrio parahaemolyticus*, *Can. J. Microbiol*, 22, 1263-1268

9) Morishita H. (1980) Specific requirement of Na⁺ for growth and macromolecular synthesis of a slightly halophilic marine bacterium, *Vibrio parahaemolyticus* (eds) Saline environment 93-109, *Jap. Conf. Halo. Micro.*