

# 大腸菌群菌株の粘質物(1)

田中 朗<sup>※</sup>・西躰雄二郎<sup>※</sup>・松本 宗人<sup>※</sup>

Akira TANAKA, Yūjiro NISHITAI and Muneto MATSUMOTO

On the Slime Substance of Coliforms (I)

## 緒 言

細菌類の生産する粘質物の、生産条件や化学組成については多数の研究があり、化学組成は、ポリグルタメイトや単純または複合多糖類であることなどが報告されている。*Enterobacter aerogenes* については、SANDFORD<sup>1)</sup>らや CONRAD<sup>2)</sup>らは、*Aerobacter aerogenes* A3 (S1) の生産する粘質物の構成糖がD-グルコース、D-グルクロン酸およびL-フコースであるとしている。

著者らは、松江市付近の河川水試料のLB培地試験の際に、陽性管より分離した大腸菌群細菌約420株のなかから、平板培地(とくにドリガルスキー培地)上のコロニーが強い粘性を示すもの5株をえた。これらの粘性菌株のうち、粘質物生産性のとくに顕著な1菌株について、粘質物生産条件や粘質物の化学組成をしらべたところ、この菌株は、*Enterobacter aerogenes* I型に属するものとみられ、その粘質物は、生育適温よりも低い温度において、また、好氣的条件において生産されることが

分った。また、その化学的性状は、ガラクトースを主体とする多糖類であろうと推論したので、これらを予報的に報告する。

## 実 験

### 1. 供試菌株

松江市付近の河川水のLB培地試験の陽性管より分離した約420菌株のうち、LB寒天培地やドリガルスキー培地などで、37°C 2日間培養したものの、培地上のコロニーが顕著な粘性を示した5菌株について、生育状況と粘性を官能的に観察し、またIMVIC試験を行った結果は第1表のようであった。この結果によれば、顕著な粘性を示した5菌株のうち、1菌株が*E. coli* I型に、2菌株が中間II型に、1菌株が中間III型に、1菌株が*E. aerogenes* I型にそれぞれ属していた。これらのうち、*E. coli* I型に属する菌株は生育は良好であったが粘質物は少なく、*E. aerogenes* I型に属する菌株は生育も粘質物も最もすぐれていて、中間型に属する3菌株は粘質物生産が前二者の中間的であった。この結果より、生育も粘質物もともにすぐれていたNo.263株(*E. aerogenes* I型)を以後の実験に供することとした(光学顕微鏡写真第1図)。

### 2. 粘質物の生産条件

供試菌No.263株について、粘質物生産と、培地、培養温度、分子状酸素など各種培養条件との関係を検討した。

#### (1) 培 地

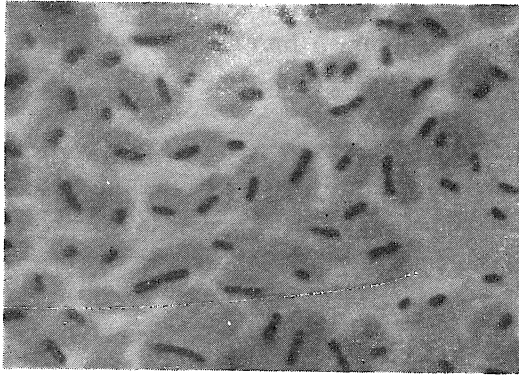
各種培地について、18mm 径試験管に8ml、20~30°C 4日間静置培養し、菌の生育および粘質物生産の状況を肉眼的に観察して第2表のような結果をえた。この結果によれば、供試した培地のいずれにおいても、菌の増殖とともに粘質物を生産したが、ペプトン水やグルタミ

第1表 粘質物生産菌株の性状

菌 株	生 育 <sup>※</sup>	粘質物 <sup>※</sup>	IMVIC類型
No. 81	++	++	Intermediate II
No. 102	++	++	Intermediate II
No. 157	++	++	Intermediate III
No. 263	++	++	<i>E. aerogenes</i> I
No. 328	++	+	<i>E. coli</i> I
No. 330(対照)	++	-	<i>E. aerogenes</i> I

※ LB培地, 37°C 24時間, 以後25°C 48時間培養。  
+は白金耳で糸引き 5cm 程度。

※ 応用微生物学研究室



第1図 供試菌株の光学顕微鏡図  
マンニットブイオン培地, 22°C 2日間培養,  
フクシン染色, 約×1,000, 菌体周囲の中間色  
調部が粘質物

第2表 各種培地と粘質物生産

	生 育	粘 質 物
ペプトン水	++	+
ブイオン	++	+
硫酸合成培地 <sup>1)</sup>	++	++
グルタミン酸合成培地 <sup>2)</sup>	++	+
クエン酸合成培地 <sup>3)</sup>	++	++
マンニットブイオン <sup>4)</sup>	卍	卍
マンノースブイオン <sup>4)</sup>	卍	卍
乳糖ブイオン <sup>4)</sup>	卍	卍
ブドウ糖ブイオン <sup>4)</sup>	++	++
蔗糖ブイオン <sup>4)</sup>	++	++
グリセリン <sup>4)</sup>	++	++

20~30°C 4日間培養

- 1) 硫酸3、クエン酸ソーダ3、リン酸ニカリ2、硫酸マグネシウム0.2、リン酸ニカルシウム0.1g/l
- 2) グルタミン酸ソーダ10、リン酸ニカリ2、硫酸マグネシウム0.2g/l
- 3) クエン酸三ナトリウム2.5、リン酸一アンモニウム1.5、リン酸ニカリウム1.0、硫酸マグネシウム0.2g/l
- 4) ペプトン10、肉エキス3g/lにマンニットなど各5g pHはすべて6.8

ン酸合成培地のように炭素源をペプチドやアミノ酸が兼ねている培地では粘質物の生産が劣るという傾向がみられた。

これに対して、炭素源として単糖や二糖やマンニットなどをブイオンに添加した培地では粘質物を多量に生産する傾向が明らかに認められ、就中、マンニットブイオンでは粘質物の生産が最も著しく、マンノースブイオン

と乳糖ブイオンがこれに次いでいた。これらの結果より、温度条件などの検討や粘質物分析試料調製用の培地としては、粘質物生産の最もすぐれていたマンニットブイオンを用いることとした。

### (2) 培養温度

500ml 容三角フラスコ中の上記マンニットブイオン培地 200ml に、この培地に30°Cで2日間培養した前培養菌を1mlずつ接種し、17°、22°、27°、32°および37°Cで5日間静置培養し、培養液についてその粘性を肉眼観察し、菌体量および粘質量をはかった。すなわち、菌体量は、培養液にエタノールを加えて約50%濃度として凝集する沈殿物を遠沈し、これを約50%エタノールで3回洗浄遠沈したものを試料として、予め石英砂をいれて秤量した6cm径秤量管に移して、105°Cで乾燥して乾燥菌体量をえた。この乾燥菌体量から、次記の粘質量に係数としての0.95を乗じてえた値を差し引いて乾燥菌体量とした。粘質量は、直接に定量することは困難であったので、上記の方法でえた洗浄沈殿物すなわち菌体(および粘質物)を3.(2)の方法で水解したのについてソモギ変法で還元糖を定量し、ガラクトースとして算出して、この値を粘質量とみなすこととした。

以上によって、粘質物生産と生育とに対する培養温度の影響について第2図のような結果をえた。この結果によると、17°Cから37°Cの間の5段階の温度において、22°Cが粘質物の生産が最もすぐれており、温度が高くなるに従って菌体の生産は増加するが、粘質物生産は低下し、生育適温である37°Cでは粘質物の生産は認められなかった。また、17°Cでは生育は緩慢であるが、粘質物は活発に生産されていることが認められた。

### (3) 酸素

粘質物生産に対する分子状酸素の影響を調べるためにマンニットブイオン培地 200ml を用いて22°Cにおいて、次の培養を行い、生育量や粘質量をはかった。

a) 好氣的培養……500ml 三角フラスコを使用。表面積比(表面積 cm<sup>2</sup>:液量 ml)≒0.34

b) 半嫌氣的培養……250ml 三角フラスコを使用。表面積比≒0.14

c) 嫌氣的培養……200ml 三角フラスコを用い、表面積は流動パラフィンで培地と空気を遮断。

これらの培養液について、粘性を肉眼観察し、菌体量と粘質量を上記(2)の方法ではかった。結果は第3表のようで、好氣的静置培養では表面積がとくに著しく粘性となり、菌の生育量も粘質量も多かった。これに対して、半嫌氣的培養液や嫌氣的培養液では粘性が少ない

か、あるいはほとんど認められず、菌体量は好气的条件の培養よりもわずかに劣る程度で十分に生育しているにもかかわらず、粘質物の生産量は半嫌气的培養では明らかに少なく、嫌气的培養では粘質物の生産が認められなかった。また、振盪培養も行ったが、粘質物生産は好気培養の場合とほぼ同程度であるが、菌体量は幾分多い傾向を示していた。このような結果から、粘質物生産には、十分な分子状酸素の存在が必須条件であると考えられる。

第3表 菌体と粘質物生産に対する酸素の影響

	培養液の粘性	乾燥菌体量 (mg)	還元糖量 (mg)
好气的培養	+++	249	19
半嫌气的培養	++	221	8
嫌气的培養	±	195	0

マンニットブイオン培地 200ml, 22°C 96時間培養

(4) pH

マンニットブイオン培地について弱酸性 (pH 6.5), 中性 (pH 7.0) および弱アルカリ性 (pH 7.5) における粘質物生産と生育の状況を官能的に観察した結果は第4表のようである。

第4表 培地の pH と粘質物生産

	生育	粘質物
中性 (pH 7.0)	+++	+++
弱塩基性 (pH 8.0)	++	++
弱酸性 (pH 6.0)	++	++

マンニットブイオン培地, 22°C 72時間培養

3. 粘質物の性状

培養液を遠沈すると、菌体も粘質物とともに沈殿し、上澄液には粘質物がほとんど残らないことが観察され、粘質物のみを試料とすることは容易でないと判断したので、菌体と粘質物との混合物を試料とし、これを水解して還元糖量を定量して粘質量とみなした。また、この水解物について、ペーパークロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィーによって構成糖をしらべ、別に粘質物を生産していない培養について菌体をえて、上記と同様に処理分析して、両者の結果を比較することによって粘質物の性状をうかがうこととした。

(1) 培養

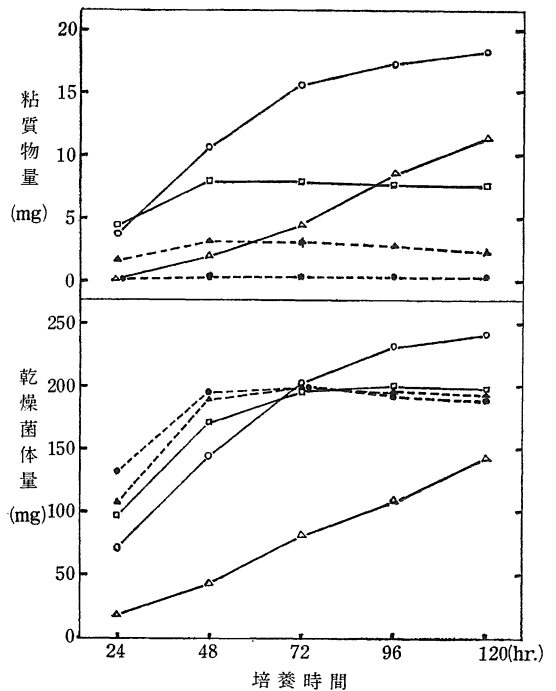
500ml 容三角フラスコにマンニットブイオン培地 200ml をとり、120°C 30分間の殺菌後、前培養 1ml ずつを接種し、22°C 4日間静置培養した液を供した。培養液は、とくに表層が顕著に粘性を帯びた状態であった。

別に、上記の培地の37°C 3日間の静置培養液を、粘質物を殆んど含まない菌体試料用に供した。この培養液は粘性が観察されなかった。

(2) 試料の調製

上記の培養液 200ml に無水エタノール 200ml を加えて約50%濃度とし、攪拌して、菌体(および粘質物)を凝集させた後、3,000rpm 5分間遠沈して、遠沈管中で沈殿に蒸留水 20ml を加えて攪拌懸濁、エタノールを加えて浮遊物を凝集させた後遠沈し、この洗浄をさらに2回行い菌体および粘質物をえた。

次に菌体および粘質物試料を水解して、還元糖の定量とクロマトグラフィーに供した。すなわち、試料を約1%濃度、塩酸で 0.1N として封管し、120°C 30分間水解



第2図 培養温度と菌体, 粘質量

- △—△ 17°C
- 22°C
- 27°C
- ▲.....▲ 32°C
- .....● 37°C

し、水解液を水酸化ナトリウムで中和して沈殿物を遠沈除去、上澄液に酢酸鉛液を加えて凝固沈殿物を遠沈除去した。この上澄液に無水炭酸ナトリウムを加えて沈殿物を遠沈して除鉛し、上澄液に活性炭を加えて濾別し、この濾液をまず還元糖定量用の試料とした。次に、濾液を60°Cで減圧濃縮乾固し、これに少量のピリジンを加え、糖を抽出してクロマトグラフィーの試料とした。

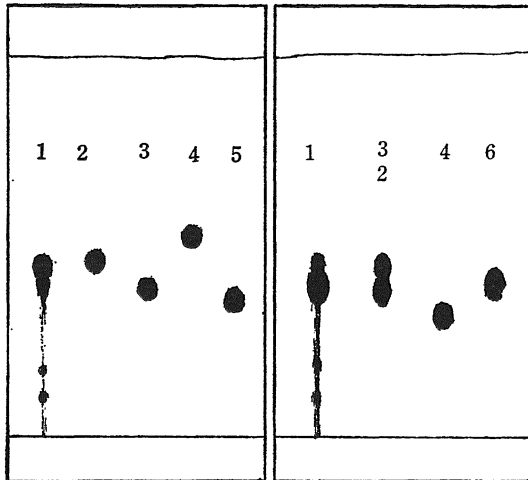
### (3) 粘質物量

上記(2)によって調製した還元糖定量用濾液について、ソモギ変法により還元糖を定量し、ガラクトースとして算出し、これに係数として0.95を乗じて粘質物量とした。

### (4) クロマトグラフィー

#### a) ペーパークロマトグラフィー

糖の分離は、東洋濾紙No.52を用い、上昇法により標品と比較して推定した。展開溶媒に水飽和フェノール、発色剤にアニリン水素フタル酸を使用し105°Cで発色させた。この結果の1例は第3図のようで、4個のスポットを検出した。ガラクトースと推定される大きなスポット、グルコースと思われるもの、オリゴ糖と思われる小さなスポット2個が認められた。確認のため薄層クロマトグラフィーを行った。



第3図 粘質物水解試料のクロマトグラム

- |          |           |
|----------|-----------|
| 1. 試料    | 2. ガラクトース |
| 3. グルコース | 4. フラクトース |
| 5. ラクトース | 6. マンノース  |

#### b) 薄層クロマトグラフィー

薄層プレートはシリカレーヤーG10を0.1%ホウ酸で懸濁し、ガラス板にのぼし風乾後105°Cで30分間乾燥したものを使用した。展開剤はメチルエチルケトン：酢

酸：メタノール液(3:1:1)を用い、45分間展開してから風乾、発色剤を噴霧、105°Cで発色させた。発色剤は20%硫酸:0.2%ナフトレゾルシンエタノール液(1:1)を用いた。この結果の1例は第3図のようで、スポットの大きさからガラクトースとグルコースがおよそ2対1の割合で存在するものと判断した。

## 考 察

(1) 先に分離した大腸菌群約420株のうち、粘性菌株として、*E. coli* 型約260株より1菌株、中間型約70株より3菌株、*E. aerogenes* 型約90株より1菌株をえたので、大腸菌群菌株約80菌株より1菌株の粘性菌株をえたこととなり、中間型株に比較的多くの粘性菌株がいたということになる。

(2) 培養液を白金耳で引いて糸引き状態を肉眼的に観察した結果と粘質物定量値との関係についてみると、太くて長い糸を引く培養液ほど粘質物定量値が高い傾向があったので、官能的な観察によっても粘質物生産量の目安をつけることが可能であった。

(3) 粘質物が糖類やマンニットのよう炭素源を強化した培地で著しく生産されることや、生育適温よりも低い温度で培養した場合に生産されることや、また、嫌氣的な培養条件では菌の生育は良好でも粘質物の生産が少ないか、あるいは認められなくて、好氣的な条件下での粘質物生産が著しい。これらのことから好氣的な条件下では、少量の炭素源から生育や粘質物合成のエネルギーをまかなうと共に残存する糖類やマンニットのよう物質を材料として粘質物が生産され、嫌氣的な条件下や糖類のような炭素源が強化されない培地ではエネルギーをまかなうために多量の炭素源が消費され、粘質物生産のための材料やエネルギーが制限されるために粘質物の生産が少ないか或いは認められないという結果を与えるのではないかと考えられる。

(4) 粘質物の構成糖としてガラクトースとグルコースとが約2対1の量比で存在していたことやオリゴ糖と思われるものを検出したことから、供試菌の粘質物は多糖類であろうと推論した。また、粘質多糖類がオリゴ糖の反覆した高分子であるばあいが多いいわれていることを考え合わせると、供試菌粘質物がガラクトース2分子とグルコース1分子よりなるオリゴ糖の反覆した多糖類ではないかとも考えられるが、これらの点は今後の課題である。

## 要 約

1) 河川水より分離した約420株の大腸菌群菌株から、粘質物生産性の5菌株をえて、そのうちで粘質物生産性の

最も高い菌株 (*Enterobacter aerogenes* I型) について、粘質物の生産条件と粘質物の化学組成を検討した。

2) 炭素源として糖類やマンニットを強化した培地で粘質物が多量に生産され、マンニットブイヨン培地では粘質物生産量が最も多かった。また、粘質物の生産は、供試菌の生育適温では生産されず、これより低い22°Cで最も多く生産された。また、嫌気条件下では菌の生育は良好でも粘質物は生産されず、粘質物の生産には十分な分子状酸素の存在が必要であった。

3) 粘質物はガラクトースとグルコースを主要構成糖とする多糖類であろうと推論した。

## 文 献

1. SANDFORD, P. A. and CONRAD, H. E. : *Biochemistry*, **5**(5) : 1508—1517 (1966).
2. CONRAD, H. E., BAMBURG, J. R., EPLEY, J. D. and KINDT, T. J. : *Biochemistry*, **5** (9) : 2808—2817 (1966).
3. 松本宗人・西躰雄二郎・田中 朗 : 島根大学農学部研究報告 **7** : 140—145 (1973).
4. BARKER, S. A., FOSTER, A. B., SIDDIQUI, I, R., and STACEY, M. : *J. Chem. Soc.*, 2358 (1958).
5. BARKER, S. A. et al. : *Nature* **181** : 999 (1958).
6. HOW, M. G., BRIMACOMBE, G. S., and STACEY, M. : *Advan. Carbohydrate Chem.* **19** : 305 (1964).

## Summary

1) Five strains which produce a slime substance were selected from about 420 strains of coliforms isolated from fresh water. One of the strains (type : *Enterobacter aerogenes* I) showing the most remarkable producibility of the slime substance was studied on the conditions of the production and on the chemical compositions of the slime substance.

2) Among the media studied, sugars-or mannitol-enriched media resulted a good production of the slime substance. Optimum temperature for the production of the slime substance was 22°C which was far low from the optimum for the growth of this bacteria. Under the anaerobic condition, a considerable growth of the cells was observed, but the slime substance was not produced. An aerobic condition (presence of molecular oxygen) was essential for the production of the slime substance.

3) Thinlayer chromatograms of the acid-hydrolyzates of the slime substance showed that the substance may be a polysaccharide consisting of galactose and glucose.