



Title	アルギン酸分解菌の簡易鑑別法について
Author(s)	木村, 喬久; KIMURA, Takahisa
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 12(1), 41-47
Issue Date	1961-05
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23121">https://hdl.handle.net/2115/23121</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	12(1)_P41-47.pdf



## アルギン酸分解菌の簡易鑑別法について

木 村 喬 久

(北海道大学水産学部水産細菌学講座)

### A Method for Rapid Detection of Alginate-digesting Bacteria

Takahisa KIMURA

#### Abstract

(1) A method for rapid detection of alginate-digesting bacteria is described. The method is as follows:

a) Medium; For land form bacteria, nutrient agar plate (see Fig. 5) containing 0.75 % sodium alginate is admirable (optimum concentration of alginate is 0.75-1.0 %, see Fig. 3).

For marine bacteria, ZoBell 2216E<sup>11)</sup> agar plate containing 0.75 % sodium alginate is more suitable than 2 other media (see Table 5).

b) Procedures; The plates are dried overnight and are then spot-inoculated with actively growing cultures on agar slants. After incubation at suitable temperature for over 48 hours, 0.5 N sulfuric acid (sulfuric acid concentration has no effect on this test within the limits of 0.5-2.0 N, see Fig. 4) or 70 % ethanol (see Fig. 1) are flooded on plate surface as precipitating agents of alginate. The presence of alginate-digesting bacteria is indicated by a clear area around the colony. Furthermore, the pH value of the media does not effect on this test within the limits of pH 6-8 (see Table 4).

(2) By the use of this method, 275 strains of alginate-digesting bacteria were detected from 1523 strains of marine bacteria (see Table 2); on the other hand alginate-digesting strain was not found in 49 strains of land form bacteria (see Table 3).

(3) It may be possible to count of the number of alginate-digesting bacteria by the application of this method on the plate counting method (see Fig. 6).

著者<sup>1)</sup>は先に海水から分離した6株の寒天分解菌について分類学的検討を行うと共に、これ等分離菌株中の5株がアルギン酸分解力も併有することを報告した。アルギン酸分解菌は Waksman, Carey & Allen<sup>2)</sup>により海水及び土壌より分離、報告されて以来現在まで数菌種が報告されている<sup>3,4,5</sup>。また Thøtta & Kass<sup>6)</sup>、井上・安藤等<sup>7)</sup>により海洋細菌、土壌細菌のみならず、腸内細菌中にもアルギン酸分解力を有するもの存在することが明らかにされ、最近山口<sup>8)</sup>はアルギン酸分解力を有する *Cloaca cloacae* を報告している。Bergey's Manual (7 Ed.)<sup>9)</sup>には Family *Pseudomonadaceae* に属す Genus *Alginomonas* 中の 5 Species, Family *Enterobacteriaceae*-Tribe *Escherichiae* に属す Genus *Alginobacter* 中の 1 Species が記載され、また *Escherichiae* に属す 5 Genus の鑑別の第一の Key としてアルギン酸分解試験が採用されている。以上の如く海水中には勿論、土壌、腸内等にもアルギン酸分解菌が広く分布しているが、これらの鑑別法は研究者により異り、アルギン酸塩添加半流動培地における粘性の変化を観察する法、還元力の変化を測定する法、その他種々採用されているが、いずれも結果を得るに数日乃至十数日を要し、また手技も複雑で、特に多数の菌株についての screening test には不適である。著者等の研究室では1958年~1959年の間に、北洋及びその他の海域で採取した海水から1500余株の海洋細菌を分離し、現在これ等分離菌株の諸性状を検査し、もつて海水中の菌叢の分類学的検討を行いつつあるが、これ等の菌株中には前記の寒天分解菌5株のほか、更に多数のアルギン酸分解菌の存在することを予想し、まずアルギン酸分解菌の簡易鑑別法についての検討を行った。

Gordon & Smith<sup>10)</sup>は抗酸性菌の澱粉消化試験の簡易法として、劃線培養した1%澱粉添加寒天平板面に95%アルコールを注加し、集落の周囲に出現する透明帯で鑑別し、またゼラチン分解性についても0.4%ゼラチン添加寒天平板面に塩酸酸性昇汞水を注加して同様の結果の得れることを報告している。著者はアルギン酸添加寒天平板がアルコールまたは鉍酸により白濁することから同様の方法がアルギン酸分解菌の鑑別に利用し得るものと考え、2, 3の検討を加えた結果、ほぼその目的にそうことが出来たので、ここにその方法を報告し、併せて前記1500余株の海洋細菌及び教室の保存菌株を供試しアルギン酸分解性を観察した結果を報告する。

### 実 験 I

基礎培地 ZoBell 2216E 寒天培地<sup>11)</sup>\* に1%の割にアルギン酸ソーダを添加した培地を平板とし、これに前記6株の寒天分解菌を spot culture (25°C, 48時間) 後、培地面に70%エタノールを注加した結果、Table 1 に示す還元力の測定値によく一致する透明帯が集落の周囲に出現した (Fig. 1)。またアルギン酸ソーダは鉍酸により不溶性のアルギン酸となり、上記アルコールの場合と同様な白濁を生ずることから、70%エタノールに代え硫酸を使用しても同様の結果が得られた。(Fig. 2 は1N硫酸を添加した場合の結果を示す)

Table 1. Alginic acid digesting activity of isolated marine agar-digesting bacteria, when grown in ZoBell 2216E medium (agar free) containing 0.25 % sodium alginate at 25°C

Strain No.	Reducing sugar (equivalent galactose $\gamma$ /ml)	
	48 hr	96 hr
Ag 3	82	738
Ag 4	37	42
Ag 5	164	722
Ag 6	104	667
Ag 7	214	747
Ag 8	36	652

### 実 験 II

次にアルギン酸ソーダの最適添加量を知るために実験IIを行つた。すなわち基礎培地に添加するアルギン酸ソーダの量を0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0及び1.25%となるように各培地を調製し、その平板面に実験Iの場合と同様の供試菌中の2株及び対照としてアルギン酸非分解菌2株を spot culture し (25°C, 48時間)、それぞれの培地面に1N硫酸を注加した結果 Fig. 3 に示す如き結果を得た。すなわち対照培地 (0%) では勿論白濁を生ぜず、0.25% 及び 0.5% では白濁の程度が弱く鑑別が困難で、また 1.25% では菌の発育は極めて良好であるが透明帯が明確でなく、0.75~1.0% で最も好適な結果が得られた。

次に培養後、培地面に注加する硫酸の濃度の最適値を求めるために、0.75%アルギン酸ソーダ添加 ZoBell 2216E 寒天平板に前記各供試菌を培養した後、種々の濃度の硫酸を培地面に注加した結果 Fig. 4 に見られる成績を得た。すなわち硫酸濃度が0.5~2.0Nの範囲内では白濁の程度に大差は認められない。

以上の結果から、培地のアルギン酸ソーダ添加量は0.75%、反応液の硫酸濃度は0.5Nで充分あることが明らかとなつたので、このような実験条件により、著者等の研究室で海水から分離した1500余株の海洋細菌

\* ZoBell 2216E 寒天培地は原報では天然海水を使用しているが、本報の実験においてはすべて天然海水に代えて人工海水を用いた。人工海水の組成 (Herpst): NaCl 30.0g, KCl 0.7g, MgSO<sub>4</sub> 2.6g, MgCl<sub>2</sub> 5.0g, CaSO<sub>4</sub> 1.0g, 蒸溜水 1000ml.

菌\*\*のアルギン酸分解力を検査した。その結果 Table 2 に示す如く、前記5株の寒天分解菌以外に多数のアルギン酸分解菌を検出することが出来た。

Table 2. Number of detected alginic acid-digesting strains in the isolates from water samples of several sea areas

Area	Year	Total number of isolates	Number of alginic acid-digesting strains
North Pacific, Bering Sea and Okhotsk Sea	1958	711	249
North Pacific and Bering Sea	1959 (1)	706	25
Pacific Ocean (East off Tohoku District of Japan)	1959 (2)	106	1

### 実 験 III

実験 I, 実験 II に引き続き海洋細菌以外の供試菌として、北海道衛生研究所において分離されたアルギン酸分解性腸内細菌、すなわち En 9; *Escherichia coli* (H.I.P.H.), En 10; *Aerobacter cloacae* (H.I.P.H.), En 11; *Aerobacter aerogenes* (H.I.P.H.), の3菌株の分生を受け、普通寒天培地に0.75%の割にアルギン酸ソーダを添加した平板培地で同様アルギン酸分解試験を行つた。その結果 Fig. 5 に見られる如く、上記腸内細菌の場合も37°C, 48時間培養後に明瞭にアルギン酸分解性が確認された。次に対照試験として Table 3 に示す如き教室保存の菌株を供試して、アルギン酸分解力を前試験同様普通寒天を基礎培地として試験した結果全菌株陰性の成績を得た。

Table 3. The tested microorganisms of land form bacteria

<i>Salmonella paratyphi</i> A	<i>Bacillus mesentericus fuscus</i>
" <i>abortus equi</i>	" <i>mesentericus ruber</i>
" <i>paratyphi</i> B	" <i>mesentericus vulgatus</i>
" <i>reading</i>	" <i>megatherium pumulus</i>
" <i>typhi murium</i>	" <i>megatherium</i> NRRL B 739
" <i>paratyphi</i> C	" <i>subtilis</i> PCL
" <i>cholerae suis</i>	" <i>subtilis</i> NRRL 558
" <i>nagoya</i>	" <i>prodigiosus</i>
" <i>newport</i>	" <i>butylicus</i>
" <i>bonariensis</i>	" <i>denitrificans</i>
" <i>typhi</i>	" <i>tumidaciens</i>
" <i>enteritidis</i>	" <i>fichina</i>
" <i>dublin</i>	" <i>lactis immobilis</i>
" <i>pullorum</i>	" <i>natto</i>
" <i>anatum</i>	" <i>pasteurii</i> (Miquel) Chester
" <i>london</i>	<i>Bacterium xylinum</i>

\*\* 供試海洋細菌の分離法; Table 2 中の1958年度に分離した菌株は北太平洋, ベーリング海及びオホーツク海の各海洋観測点でナンセン採水器により水面~水深1500mの各水層より採取した海水を滅菌容器に移し船内冷蔵庫に保存し帰港後研究室で、また1959年度 (1) は北太平洋及びベーリング海, 1959年度 (2) は三陸沖で同様各海洋観測点の各水層より J-Z. 細菌検査用採水器で採取した海水を直ちに船内研究室で、それぞれ ZoBell 2216E 培地で混釈培養後、純粋分離を行つたものである。

<i>Salmonella give</i>	<i>Proteus vulgaris</i> Hauser
" <i>newington</i>	" <i>morganii</i>
" <i>senftenberg</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 33F
<i>Escherichia coli</i>	" <i>fluorescens</i> 43
" <i>coli</i> (0-55)	" <i>fluorescens</i> Migula
" <i>coli</i> (0-111)	<i>Micrococcus perflavus</i> Bergey
" <i>freundii</i>	<i>Sarcina lutea</i>
Coli form {	
<i>coli</i> type	
inter. type	
aero. type	

実 験 IV

次に培地の pH 及びその組成が本試験法に及ぼす影響を知るために次の如き実験を行つた。すなわちまず 0.75%アルギン酸ソーダ添加 ZoBell 2216E 寒天培地の pH を 5~9 にそれぞれ調節し、実験Ⅱにおいてアルギン酸の分解性を確認した海洋細菌の 4 株及び実験Ⅲに供試したアルギン酸分解性腸内細菌 3 株を供試菌として同様の実験を行つた結果 Table 4 に示す如き成績を得た。すなわち海洋細菌の場合 pH 6~8 の範囲

Table 4. Effect of pH values of media on alginase test

pH	Strain No.	Activity		Growth		Strain No.	Activity		Growth	
		48 hr	96 hr	48 hr	96 hr		48 hr	96 hr	48 hr	96 hr
5	1032 - 1	-	+	+	+	En 9	+	+	+	+
	1062 - 3	-	+	+	+	En 10	+	+	+	+
	1175 - 3	-	+	+	+	En 11	+	+	+	+
	1241 - 1	-	±	+	+					
6	1032 - 1	+	+	+	+	En 9	++	++	+	+
	1062 - 3	+	+	+	+	En 10	++	++	+	+
	1175 - 3	+	+	+	+	En 11	+	++	+	+
	1241 - 1	+	+	+	+					
7	1032 - 1	+	+	+	+	En 9	++	++	+	+
	1062 - 3	+	+	+	+	En 10	++	++	+	+
	1175 - 3	+	+	+	+	En 11	+	++	+	+
	1241 - 1	-	+	+	+					
8	1032 - 1	+	+	+	+	En 9	++	++	+	+
	1062 - 3	+	+	+	+	En 10	++	++	+	+
	1175 - 3	+	+	+	+	En 11	+	+	+	+
	1241 - 1	-	+	+	+					
9	1032 - 1	+	+	+	+	En 9	+	+	+	+
	1062 - 3	+	+	+	+	En 10	+	+	+	+
	1175 - 3	+	+	+	+	En 11	+	+	+	+
	1241 - 1	-	±	+	+					

Strains 1032-1, 1062-3, 1175-3 and 1241-1 are marine bacteria, ZoBell 2216E medium containing 0.75% sodium alginate was used for test at 25°C.

Strain En 9; *E. coli* (H.I.P.H.), En 10; *A. cloacae* (H.I.P.H.), En 11; *A. aerogenes* (H.I.P.H.), nutrient agar medium containing 0.75 % sodium alginate was used for test at 37°C.

内でほとんど同程度の結果が得られ、一方腸内細菌の場合には pH 6~8 は勿論 5 及び 9 においても充分鑑別することが出来、培地 pH の影響はほとんど認められなかつた。また培地の組成による影響については、実験Ⅱにおいて海洋細菌中アルギン酸分解陽性を確認した 25 菌株を供試菌とし、基礎培地として ZoBell 2216E 培地、同培地の人工海水を蒸溜水で置換した培地及び普通寒天培地の蒸溜水を人工海水で置換した 3 種の培地を用い同様に試験を行つた結果 Table 5 に示す如く海水成分を除去した培地は海洋細菌の発育に遺せず、したがつて供試菌中ただ 1 株において陽性成績が認められたに過ぎなかつた。また普通寒天培地に海水成分を添加した場合においては、アルギン酸分解力の強力な菌株は充分鑑別され得るが、分解力の比較的弱い菌株では陽性反応を示すに至るまでの培養時間が遅延するか、もしくは陰性の結果を示した。

Table 5. Effect of composition of media on alginase test

Strain No.	Medium I		Medium II		Medium III			
	Activity 48 hr 96 hr	Growth 48 hr 96 hr	Activity 48 hr 96 hr	Growth 48 hr 96 hr	Activity 48 hr 96 hr	Growth 48 hr 96 hr		
1031-2	++	++	-	-	±	±	++	++
1035-1	++	++	-	-	±	±	++	++
1035-4	++	++	-	-	±	±	++	++
1036-3	+	++	-	-	±	±	+	++
1038-1	++	++	-	-	±	±	++	++
1038-2	++	++	-	-	±	±	++	++
1043-1	++	++	-	-	±	±	++	++
1045-2	+	++	-	-	±	±	-	++
1045-5	++	++	-	-	±	±	++	++
1056-1	++	++	-	-	±	±	++	++
1062-3	+	++	-	-	±	±	+	++
1126-5	++	++	-	-	±	±	+	++
1141-2	-	+	++	++	-	-	-	++
1166-3	++	++	-	-	±	±	++	++
1175-3	++	++	-	-	±	±	++	++
1204-1	++	++	-	-	±	±	++	++
1241-1	±	+	++	++	-	-	-	+
1241-4	++	++	-	-	±	±	-	++
1241-5	++	++	-	-	±	±	+	++
1242-2	++	++	-	-	±	±	++	++
1243-3	±	+	+	++	-	-	-	+
1244-2	±	+	+	++	-	-	-	++
1245-1	++	++	-	+	±	±	++	++
1246-1	++	++	-	-	±	±	++	++
1249-4	++	++	-	-	±	±	++	++

Medium I ; 0.75% sodium alginate + ZoBell 2216E medium

Medium II ; " " " + sea water free ZoBell 2216E medium

Medium III ; " " " + sea water-nutrient agar medium

## 実 験 V

本法が海水等の試料中に含有されるアルギン酸分解菌の菌数測定に利用され得るか否かを知るために次の如き実験を行った。すなわちアルギン酸分解菌として前記 *E. coli* (H.I.P.H.), 非分解菌として *Sarcina lutea* を供試菌とし、両菌の生理的食塩水懸濁液を等量ずつ混和し、適宜希釈した後アルギン添加普通寒天培地を用い、常法に従つて混積培養を行い試験した。すなわち Fig. 6 に見られる如く、明らかに陽性菌の集落周囲には透明帯が見られ、一方陰性菌の集落にはこれを認めず、本法により試料中のアルギン酸分解菌の菌数測定が可能であることを認めた。

## 考 察

以上実験 I ~ V の結果を総括的に考察するに、細菌のアルギン酸分解試験において、一般細菌では普通寒天培地、海洋細菌では ZoBell 2216 E 培地を基礎培地として、これ等に 0.75% の割合にアルギン酸ソーダを添加し平板として、培地面に供試菌を spot culture した後（前者では 37°C、後者では 25°C で 48 時間 ~ 96 時間）、培地面に 0.5N 硫酸或いは 70% アルコールを注加することにより簡易にアルギン酸分解性を鑑別することが可能である。（この場合病原菌においては反応液として後者の使用が望まれる）。また培地の pH は 6 ~ 8 の範囲ではほとんど差異は認められない。従つて本法は従来の方法に比し迅速且つ容易に結果が得られ、特に多数の菌株について行われる screening test に応用して極めて有利であると考えられる。また本法は海水その他の試料中に含まれるアルギン酸分解菌の定量的菌数測定における混積培養法に應用することも可能である。なお本法により著者等の研究室で海水から分離した海洋細菌 1500 余株中にアルギン酸分解菌が相当多数存在することが判明したが、今後これ等の分類学的検討を行うことは既報のアルギン酸分解菌が数菌種に過ぎないことに鑑み極めて興味ある問題と考える。

## 要 約

著者はアルギン酸分解菌の鑑別法について検討した結果、screening test 法として次の如き簡易鑑別法を提唱したい。すなわち一般細菌では普通寒天培地 (Fig. 5 参照)、海洋細菌では ZoBell 2216 E 培地 (3 種の培地で比較検討した結果本培地が最適、Table 5 参照) を基礎培地として、これ等に 0.75% の割合にアルギン酸ソーダを添加 (Fig. 3 参照)、この平板培地面に供試菌を spot culture 後 (前者では 37°C、後者では 25°C、共に 48 時間以上)、アルギン酸ソーダの precipitating agent として 0.5N 硫酸 (0.5 ~ 2.0N の濃度範囲では大差がない、Fig. 4 参照)、或いは 70% アルコール (Fig. 1 参照) を培地面に注加することにより、アルギン酸分解菌では集落周囲に明瞭な透明帯が出現する。なお本法における培地の pH は、6 ~ 8 の範囲ではほとんど鑑別に影響はない (Table 4 参照)。また本法は海水その他の試料中に含まれるアルギン酸分解菌の定量的菌数測定における混積培養法に應用することが可能である (Fig. 6 参照)。次に本法により教室保存の海洋細菌 1523 株について試験した結果多数のアルギン酸分解菌が検出された (Table 2 参照) が、同様教室保存の海洋に由来しない 49 菌株についての試験ではアルギン酸分解性を有するものは見当らなかつた。

稿を終るに臨み、本実験の供試菌の一部としてアルギン酸ソーダ分解性腸内細菌の御恵与を頂いた北海道衛生研究所中村豊所長に謝意を表し、また本実験遂行に当り終始御懇切なる御指導と御校閲を賜った坂井稔教授並びに実験中種々御援助を頂いた信濃晴雄学士に深甚なる感謝の意を表す。なお本研究費の一部は文部省科学研究費によるものでここに記して謝意を表す。

(本論文の要旨は昭和 35 年度日本水産学会春季大会において報告した。)

## 文 献

- 1) 木村喬久 (1961). 北大水産彙報 12, (1), 33-40.
- 2) Waksman, S.A., Carey, C.L. & Allen, M.C. (1934). *J. Bact.* 28, 213.
- 3) 遠藤庄三 (1941). 植物学誌 55, 39.
- 4) Yoshikawa, S. (1954) *Sci. Rep. Hyogo Univ. Agric.* 1, 50.
- 5) Kooiman, P. (1954). *Biochem. et Biophys. Acta* 13, 338.
- 6) Thøtta, Th. & Kåss, E. (1947). *C.A.* 41, 791.
- 7) 井上勝弘・安藤芳明 (1956). 農化 30, 742.
- 8) 山口和夫 (1958). 農化 32, 483.
- 9) Breed, R.S. *et al* (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7 Ed., 1094p, New York; The Williams & Wilkins Co.
- 10) Gordon, R. & Smith, M.M. (1953). *J. Bact.* 66, 41.
- 11) Morita, R. & ZoBell, C.E. (1955). *Deep-Sea Res.* 3, 66.

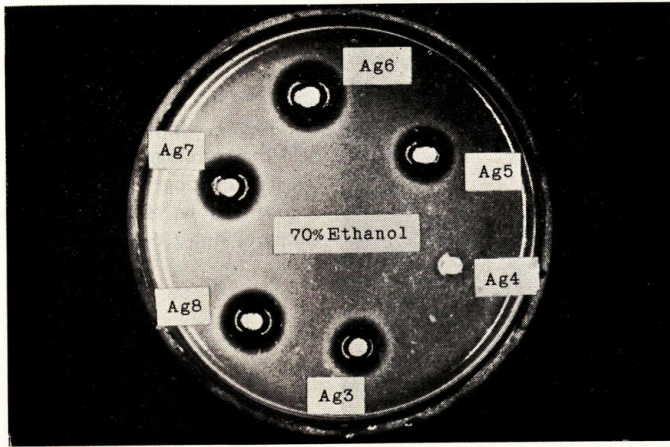


Fig. 1. Seventy per cent ethanol was used as precipitating agent, showing clear area which became visible around the colony of alginic acid-digesting strain.

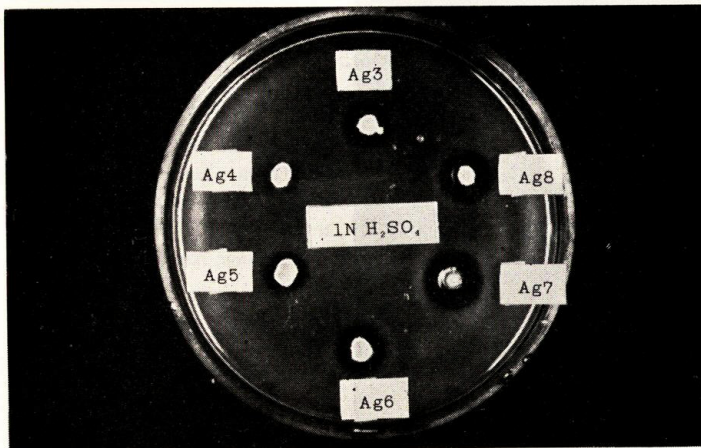


Fig. 2. A solution of 1 N sulfuric acid was used as a precipitating agent.

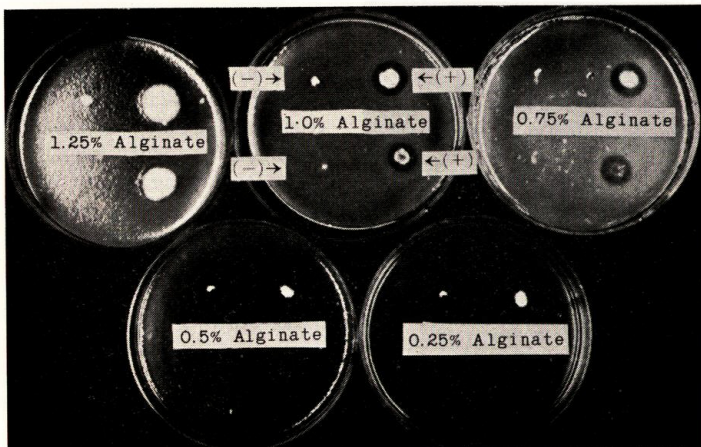


Fig. 3. Influence of sodium alginate concentration, showing that the optimum concentration was 0.75-1.0%



Fig. 4. Influence of sulfuric acid concentration as precipitating agents, showing that the concentration had no effect within the limits of 0.5-2.0 N

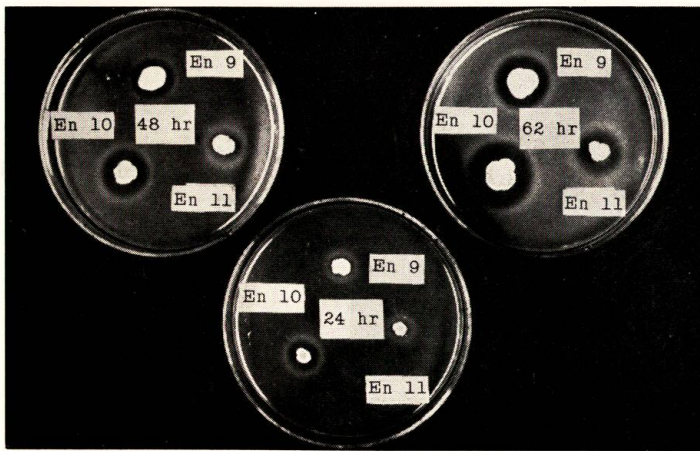


Fig. 5. The picture of the clear area when the alginic acid-digesting Enterobacteria were tested with nutrient agar medium as the basic medium



Fig. 6. The picture when the application of alginase test for counting of alginic acid-digesting bacteria by the plate counting method, showing it may be possible (The sample mixture was prepared with alginic acid-digesting *Escherichia coli* H.I. P.H. and *Sarcina lutea* in this model experiment.)