

PH-03**A comparative study of characteristics between *Mastigamoeba balamuthi* and strain AF065-Y, an anaerobic amoeba, isolated from a Japanese paddy field soil**

Yukimi Uchimura, Michio Kawasaki, Akio Tonouchi
Grad.Sch.of Agri.,Hiroasaki Univ.

***Mastigamoeba balamuthi* と日本の水田土壌から分離した嫌気性アメーバ AF065-Y 株の特徴比較研究**

○内村 ゆき美、川崎 通夫、殿内 暁夫
弘前大・院農

Key word : *Mastigamoeba balamuthi*, anaerobic amoeba, paddy field soil, organics decomposition

【目的】平成18年度に本学部附属金木農場の落水水田土壌から分離された嫌気性アメーバ AF065-Y 株は、アフリカのガンビアの井戸水から分離された鞭毛体を形成する嫌気性アメーバ *Mastigamoeba balamuthi* に分子系統的に最も近縁であったが、これまで菌(酵母)食性が確認されない、種を特徴づける鞭毛体を形成しない等 *M. balamuthi* と異なる特徴を有することを報告してきた。今回は主として生理・生化学的特徴の解析を行った。

【方法】両菌株の基質利用性、塩濃度耐性、増殖温度、カタラーゼ・オキシダーゼ活性、pH、酸素・乾燥に対する感受性、菌食性を調査した。【結果及び考察】スクロースの利用性(AF065-Y株は陽性、*M. balamuthi*は陰性)と細菌食性(AF065-Y株は陰性、*M. balamuthi*は陽性)を除き基質利用性は両者間で共通であった。AF065-Y株の増殖温度範囲は10-30°C、増殖pH範囲は4.2-7.8、NaCl濃度1%以上では増殖不能であるのに対し、*M. balamuthi*の増殖温度範囲は10-37°C、増殖pH範囲は4.2-8.1、NaCl濃度2%まで増殖可能であった。カタラーゼ・オキシダーゼ活性は共に陰性であった。AF065-Y株は酸素感受性で乾燥により速やかに死滅するのに対し、*M. balamuthi*は乾燥や酸素暴露に耐性を示し、好気条件下(還元剤を含まない培地で静置培養)でも増殖可能であった。このようにAF065-Y株は*M. balamuthi*よりも環境の変動に対する感受性が高いこと、水田土壌においては溶存有機物を基質として利用することが示唆された。またシストを形成しないAF065-Y株の水田土壌での落水期の生残性は土壌の存在が大きいことが考えられた。

PH-05**A study of an anaerobic cellulose-degrading bacterium isolated from a Japanese paddy field soil**

Haruka Horino, Takashi Fujita, Akio Tonouchi
Grad. Sch. of Agri., Hiroasaki Univ.

水田土壌から分離した嫌気性セルロース分解細菌に関する研究

○堀野 遥、藤田 隆、殿内 暁夫
弘前大・院農

Key word : paddy field soil, *Bacteroides cellulosolvens*, anaerobic cellulose-degrading bacterium

【目的】水田土壌中の植物遺体由来の多糖は多様な細菌によって様々な中間代謝産物を経て最終産物であるメタンや二酸化炭素に分解される。弘前大学農学生命科学部附属金木農場の水田土壌から新規性の高い嫌気性セルロース分解細菌 T-1-35 株を分離したので報告する。

【方法】酵母エキス、セロビオースを添加した嫌気性細菌用完全合成培地を基本培地とし、嫌気条件下で培養した培養液を用い、各種生理・生化学的、形態学的特徴付けを行った。細胞形態は位相差顕微鏡や透過型電子顕微鏡を用いて観察した。系統解析は16S rDNA塩基配列に基づき行った。

【結果】T-1-35株は2-3本の鞭毛を有する運動性の無孢子グラム陽性桿菌で、増殖には酵母エキスを必要とし、種々の糖質を基質として増殖し、エタノール、酢酸、プロピオン酸、二酸化炭素、水素を生成した。至適増殖温度は35°C(温度範囲15-40°C)、至適pHは8.0-8.5(pH範囲5.5-10)であった。16S rDNA塩基配列に基づいた系統解析により、T-1-35株は*Clostridium* Cluster IIIに位置づけられる非運動性の無孢子グラム陽性桿菌 *Bacteroides cellulosolvens* strain WM2^Tを最近縁種とすることが示されたが、配列相同性は93.5%と低かった。T-1-35株と*B. cellulosolvens*には系統学的、生理・生化学的、形態学的に明確な差異があり、T-1-35株は属レベルで新規であることが示唆された。

PH-04**Isolation and characterization of novel anaerobic bacteria from a Japanese rice field soil**

Takuya Honda, Kouji Kitakura, Takashi Fujita, Akio Tonouchi
Grad. Sch. of Agri., Hiroasaki Univ.

水田土壌からの新規嫌気性細菌の分離と諸性質の解析

○本田 拓也、北村 浩二、藤田 隆、殿内 暁夫
弘前大学・院農

Key word : rice field soil, synergistaceae, bacteroidetes, anaerobic bacteria

【目的】水田土壌における有機物の嫌氣的分解は多種多様な細菌種により行われる。我々は、水田土壌を接種源として構築した嫌気のプロピオン酸分解系に共存する複数の細菌種を見出し、Synergistaceae科に属する4F6E株(第27回微生物生態学会大会で一部報告)、Bacteroidetes門に属する6E株および4F6B株の純粋分離に成功した。本研究では、これら3菌株の系統分類学的解析を行ったので報告する。

【方法】培養等の操作は全てO₂除去N₂ガス気相下で行った。細胞形態は透過型電子顕微鏡や位相差顕微鏡を用いて観察した。生理・生化学的特徴付けは常法に従った。系統解析は16S rDNA塩基配列に基づいて行った。【結果】4F6E株は2-3本の鞭毛を有する運動性のグラム陰性桿菌で、増殖に酵母エキスを要求した。生理生化学的・形態学的特徴は近縁種である *Aminobacterium* 属細菌に類似している。ゲノムDNAのG+C含量は61.9mol%であった。16S rDNA配列に基づく分子系統解析により4F6E株は、*Aminobacterium*の基準種である *Aminobacterium colombiense* (16S rDNA相同性:89.5%)を最近縁種とする、Synergistaceae科に位置づけられる細菌であることが示された。4F6E株は、16S rDNA配列の相同性が低いことや細胞脂肪酸組成の違いから、Synergistaceae科の新属であることが示唆された。6E株および4F6B株は、運動性のないグラム陰性桿菌で、種々の糖質を炭素源として利用した。6E株の至適増殖温度は30°C(温度範囲は20-40°C)であり、4F6B株の至適増殖温度は37°C(温度範囲は20-40°C)であった。16S rDNA配列に基づく分子系統解析により6E株および4F6B株は、それぞれ *Meniscus glaucopis* (16S rDNA相同性:89.0%)、*Owenweeksia hongkongensis* (16S rDNA相同性:86.4%)を近縁種とする Bacteroidetes 門に位置づけられる細菌であることが示された。

PH-06**Isolation and phylogenetic characterization of anaerobic bacteria producing psychrotrophic extracellular lipase, protease and amylase**

Naoko Matsumoto, Nobuo Kaku, Katsuji Ueki, Atsuko Ueki,
Masanori Watanabe
Grad. Sch. of Agri., Yamagata Univ.

細胞外耐冷性リパーゼ、プロテアーゼ、アミラーゼ生産嫌気性細菌の分離と系統学的特徴付け

○松本 直子、加来 伸夫、上木 勝司、上木 厚子、渡辺 昌規
山形大・院農

Key word : anaerobic bacteria, lipase, protease, amylase, psychrotrophic enzyme

Purpose: To isolate anaerobic bacteria producing psychrotrophic extracellular lipase, protease or amylase, and to characterize their phylogenetic positions and temperature dependence of enzyme activities.

Method: Using paddy soil and residual rice plant as inocula, anaerobic enrichment cultures were performed with media supplemented with 1% substrate (lard, skimmed milk or starch) for each enzyme at 10, 18 and 30 °C. Isolation of bacteria from enrichment cultures was performed by anaerobic roll-tube methods. The colonies with halo-forming activity were isolated, and the morphological, physiological and phylogenetic characteristics of the isolated strains were studied. The activity of each enzyme was measured by using the supernatant of liquid culture as crude enzyme.

Results: About 30 strains of each lipase-, protease- and amylase-producing bacteria were isolated and purified, respectively. Most of the lipase-producing strains were gram-negative rods, whereas those of protease-producing were gram-positive spore forming rods. The results of PCR-DGGE band pattern analysis of 16S rDNA V3 region revealed that protease-producing strains were divided into three groups (Pro1, Pro2 and Pro3). Some strains belong to the Group Pro1 have relatively high protease activities at 10 °C. We also studied about the strains producing lipase and amylase.