

Hg²⁺ 存在下における Hg²⁺ 耐性菌の挙動

川上 英之・有村 斉明*・吉本 則之**
中野 宏幸・橋本 秀夫

広島大学生物生産学部
1987年9月1日 受理

The behavior of Hg²⁺ tolerant bacteria under various Hg²⁺ concentration

Hideyuki KAWAKAMI, Nariaki ARIMURA*, Noriyuki YOSHIMOTO**
Hiroyuki NAKANO and Hideo HASHIMOTO

Laboratory of Food hygiene and Applied Physics**, Faculty of Applied
Biological Science, Hiroshima University, Fukuyama, Nippon Steel
Chemical Co., Ltd., Tobata*

現在 Hg²⁺ 耐性菌の耐性機構としては、Hg²⁺ 還元酵素による Hg²⁺ の還元作用がよく知られている¹⁻⁴⁾。また Hg²⁺ 耐性菌は、一般にペニシリン等の抗生物質に対する耐性も同時にもつ多剤耐性菌である。一方ペニシリンは細菌の細胞壁や隔壁の生合成を阻害し、その結果細胞は死滅してゆくが中には変異を起こし伸長した細胞や spherical cell を形成するものが生じることが知られている⁵⁻⁷⁾。

我々は、下水から分離した Hg²⁺ 耐性能の高い細菌を用いて Hg²⁺ が耐性菌の生命活動に対して与える影響を調べる目的で増殖に対する熱力学的解析と形態学的観察を行なった。

その結果、活発に細胞分裂を行なっている対数増殖期の細胞は低い濃度の Hg²⁺ の存在下では本来の形態を保持する。しかし Hg²⁺ が全く存在しないとかえって異常を起こし変異し、フィラメント状に伸長することが判明した。

実験材料および方法

供試菌：

下水から分離した MIC⁹ 100 の Hg²⁺ 耐性菌 No. 10 および19株（いずれも *Pseudomonas*）の2株、非耐性菌 No. 7 および20株（いずれも *Moraxella-Acinetobacter*），それにコントロールとして、*Pseudomonas putida* (ATCC No. 12633) の5菌株を用いた。

増殖曲線の作製：

各供試菌は保存培地から nutrient broth (1% polypeptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0) 中で 25°C, 20時間前培養して賦活化した。試験に際してはこの菌液を Hg²⁺ 濃度 6.25, 12.5, 25.0 および 50.0 μg/ml になるように HgCl₂ を加えた nutrient broth と Hg²⁺ 無添加のものにそれぞれ接種し、25°C で振とう培養した。増殖曲線は 660 nm における吸光度を経時的に測定して求めた。

増殖に要する活性化エネルギーの測定：

供試菌を 0, 6.25, 12.5 および 25.0 μg/ml の Hg²⁺ 濃度で 20, 25, 30 および 35°C の各温度で振とう培養し、得られた増殖曲線から増殖速度 (ln k) を求めた。この ln k を Arrhenius の式： $\frac{d \ln k}{dT} = \frac{Ea}{RT^2}$ (Ea : 活性化エネルギー, R : 気体定数, T : 絶対温度) にあてはめ、得られた曲線の傾斜から増殖に要する活性化エネルギーを求めた。

* 新日鉄化学株式会社戸畑製造所

** 広島大学生物生産学部食品物理学研究室

細胞の形態に対する Hg^{2+} の影響：

供試菌を Hg^{2+} を含まない条件で 12.5 $\mu g/ml$ の Hg^{2+} を含む条件で 30°C で対数増殖期中期 (10時間)まで振とう培養し、微分干渉顕微鏡 (Olimpus BH2-NIC) を用いて細胞の形態を観察した。

結果および考察

増殖に対する Hg^{2+} の影響：

6.25 $\mu g/ml$ の Hg^{2+} 存在下で馴化培養した Hg^{2+} 耐性菌 (No. 10 & 19) を Hg^{2+} 添加 (6.25, 12.5 および 25.0 $\mu g/ml$) および無添加の nutrient broth に接種し 25°C で振とう培養した。得られた増殖曲線を図 1 および 2 に示す。

No. 10 株では、 Hg^{2+} 濃度 6.25 $\mu g/ml$ では無添加のものと同様増殖曲線を示した。しかし、12.5 $\mu g/ml$ では、誘導期が無添加のものや 6.25 $\mu g/ml$ の 11.0 時間よりも短くなり 10.5 時間であった。また、 Hg^{2+} 濃度を 25.0 $\mu g/ml$ 以上にすると全体の増殖はかなり抑制され、50.0 $\mu g/ml$ では 20 時間経過した後でも増殖は認められなかった。

No. 19 株では、全体としては No. 10 株と同様の増殖を示し 12.5 $\mu g/ml$ の Hg^{2+} が存在すると無添加のものに比べて誘導期がやはり短縮された。しかし 6.25 $\mu g/ml$ の場合は、誘導期は何か逆に長くなり 12.7 時間であった。

一般に Hg^{2+} などの薬剤によって誘導期が延長される。しかし今回用いた Hg^{2+} 耐性菌では培地中に 12.5 $\mu g/ml$ の Hg^{2+} が存在すると誘導期は逆に短縮された。これは *Staphylococcus aureus* の増殖に対して誘導期を短縮させるといふ Niacin の作用⁹⁾ と似ている。

比較のために非耐性菌 (No. 7 & 20) についても増殖曲線を求めた。図 3 に示すように Hg^{2+} を 6.25 $\mu g/ml$ 添加すると増殖せず Hg^{2+} に対する耐性がないことが判る。

Hg^{2+} 耐性菌の増殖に要する活性化エネルギー：

12.5 $\mu g/ml$ の Hg^{2+} の存在は Hg^{2+} 耐性菌の増殖を促進させることが判った。そこでこのような Hg^{2+} の効果をさらに確かめるために、 Hg^{2+} 存在下での増殖速度 ($\ln k$) と培養温度との関係から Arrhenius plot を求めた (図 4)。この図から判るように 12.5 $\mu g/ml$ の Hg^{2+} 存在下で傾斜が最も緩やかになり、培養温度間に

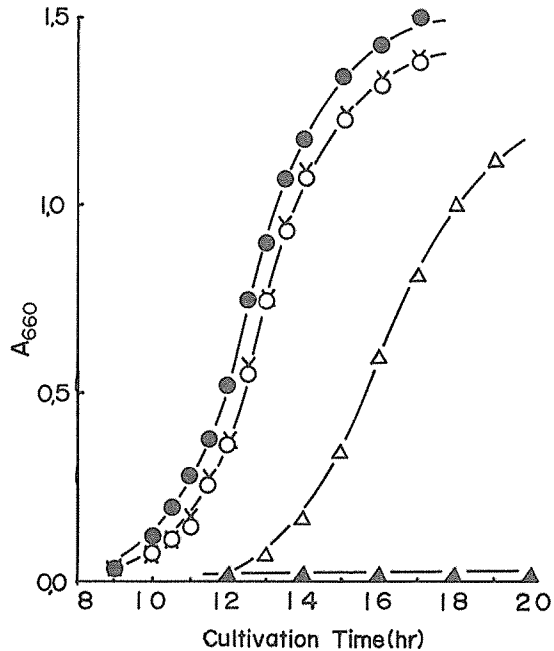


Fig. 1. The growth curves of Hg^{2+} tolerant *Pseudomonas* (No. 10) on various Hg^{2+} concentration at 25°C.

-x-: 0 $\mu g/ml$, -o-: 6.25 $\mu g/ml$, -●-: 12.5 $\mu g/ml$, -Δ-: 25.0 $\mu g/ml$, -▲-: 50.0 $\mu g/ml$

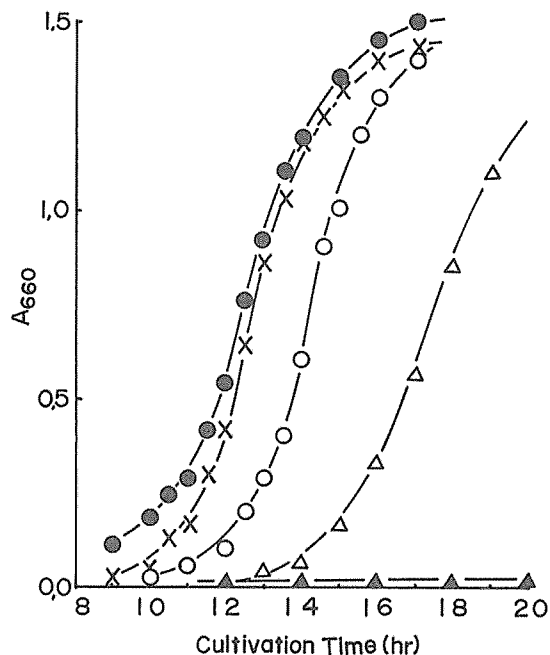


Fig. 2. The growth curves of Hg^{2+} tolerant *Pseudomonas* (No. 19) on various Hg^{2+} concentration at 25°C.

-x-: 0 $\mu g/ml$, -o-: 6.25 $\mu g/ml$, -●-: 12.5 $\mu g/ml$, -Δ-: 25.0 $\mu g/ml$, -▲-: 50.0 $\mu g/ml$

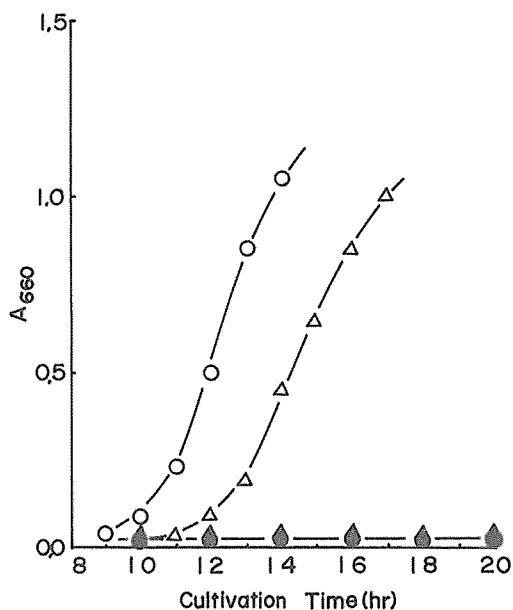


Fig. 3. The growth curves of Hg²⁺ not tolerant strains (No. 7 & 20) on 0 or 6.25 µg/ml of Hg²⁺ concentration at 25°C.
 -○-: No. 20 (0 µg/ml), -●-: No. 20 (6.25 µg/ml), -△-: No. 7 (0 µg/ml), -▲-: No. 7 (6.25 µg/ml)

おける増殖速度の差が最も小さくなった。

この Arrhenius plot から Arrhenius の式に従って Hg²⁺ 耐性菌が増殖に要する活性化エネルギー (E_a) を求めた (表 1)。先ず Hg²⁺ を添加しない条件では、No. 10 株が 7.3 Kcal, No. 19 株が 7.6 Kcal であった。一方非耐性菌 (No. 7 & 20) についても E_a を求めるとそれぞれ 7.4 と 7.2 Kcal であった。これに対して、Hg²⁺ を添加した条件では、Hg²⁺ 濃度 6.25 µg/ml で

は No. 10 が 4.9 Kcal, No. 19 が 6.6 Kcal, 12.5 µg/ml ではそれぞれ 2.5 および 5.0 Kcal と E_a が大きく減少した。しかし、Hg²⁺ 濃度を 25.0 µg/ml に増加させると逆に 7.3 および 8.0 Kcal と E_a は逆に増大した。この状態を図示すると (図 5)、両菌株とも V 字型の曲線を描き、 E_a は Hg²⁺ 濃度 12.5 µg/ml のときに最低となった。

これらの結果から、今回用いた MIC 100 の Hg²⁺ 耐性菌は 12.5 µg/ml の Hg²⁺ 存在下で最も安定した増殖を行なうことが判った。このことは、Hg²⁺ がこれらの耐性菌にとって有害なものではなく、むしろ何らかの形で利用され増殖を促進させる効果をもっていることを示している。この場合 Hg²⁺ 無添加のものに比べて Hg²⁺ (12.5 µg/ml) を添加すると増殖に要する活性化エネルギーが低下したことから Hg²⁺ はエネルギー代謝と密接な関係をもつものと考えられる。

細胞の形態におよぼす Hg²⁺ の影響：

Hg²⁺ に対して上述のような挙動を示す耐性菌は Hg²⁺ 存在下でどのような細胞形態をとるか興味もたれる。そこで Hg²⁺ 無添加のもの と 12.5 µg/ml の Hg²⁺ を加えたものについて対数増殖期における細胞の形態を微分干涉顕微鏡で観察した。その結果、plate 1~3 に示すように No. 10 および No. 19 株とも Hg²⁺

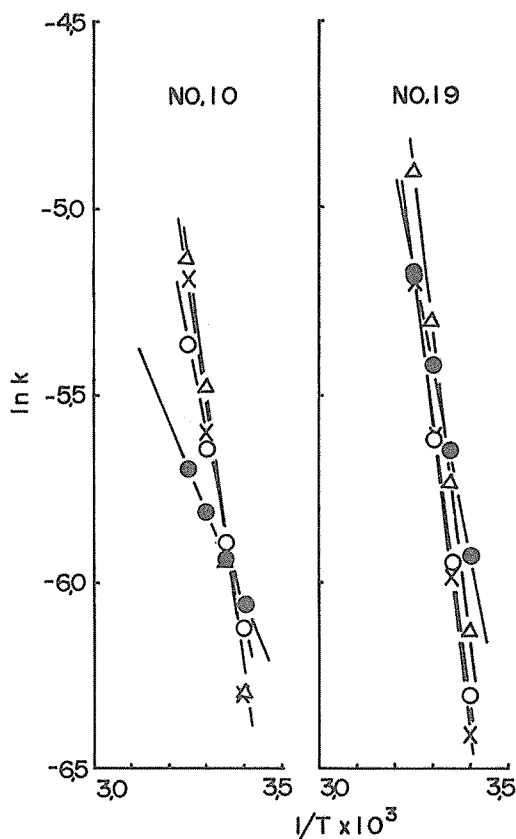
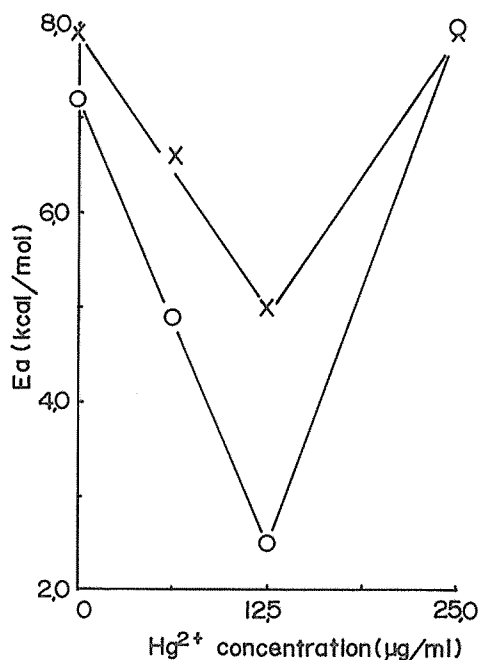


Fig. 4. The Arrhenius plots of growth rates ($\ln k$) of Hg²⁺ tolerant *Pseudomonas* (No. 10 & 19) on various Hg²⁺ concentration against various cultivation temperatures.

-×-: 0 µg/ml, -○-: 6.25 µg/ml, -●-: 12.5 µg/ml, -△-: 25.0 µg/ml

Table 1. The activation energies (E_a) for growth of Hg^{2+} tolerant *Pseudomonas* (No. 10 & 19) and not Hg^{2+} tolerant strains (No. 7 & 20) (Kcal/mol)

Strain No.	Nutrient broth* ¹	Hg^{2+} concentration in the medium ($\mu g/ml$)* ²			
		0	6.25	12.5	25.0
No. 10	7.3	7.2	4.9	2.5	8.0
No. 19	7.6	7.9	6.6	5.0	7.9
No. 7	7.4	—	—	—	—
No. 20	7.2	—	—	—	—

*¹: E_a was measured in nutrient broth without Hg^{2+} *²: E_a was measured in nutrient broth after domestication to Hg^{2+} by cultivation in nutrient broth containing 6.25 $\mu g/ml$ Hg^{2+} .**Fig. 5.** The activation energies (E_a) for growth of Hg^{2+} tolerant *Pseudomonas* (No. 10 & 19) against various Hg^{2+} concentration.

-○-:No. 10, -×-:No. 19

が存在すると個々の細胞がよく分散しコントロールとして用いた *P. putida* (ATCC No. 12633) と同様に細胞の輪郭も明瞭で大きさも一定し、形態上の変化はみられず、*Pseudomonas* の特徴の1つである運動性も活発に認められた。これに対して、 Hg^{2+} を加えない場合では、細胞は伸長し、細胞分裂時の隔壁形成に伴う細胞のくびれがみられず、明らかに形態に変異が生じ運動性も緩慢であった。 Hg^{2+} 耐性菌のこのような形態の変異に関する報告は今回が最初である。

これまでに薬剤による細胞の形態の変異については、ペニシリンによるものがよく知られている^{5,6)}。ペニシリンによる形態の変異は細胞壁のペプチドグリカンの生合成が細胞分裂の過程で阻害されるために起こることが判っている。また低濃度のペニシリンの存在で隔壁の生合成が阻害され、フィラメント状の giant

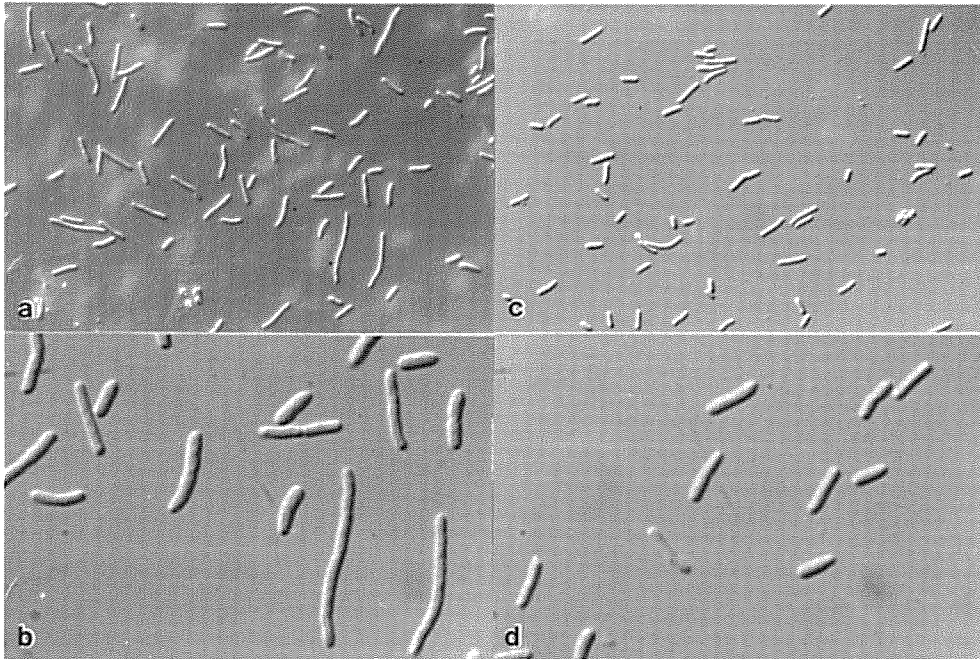


Plate 1. The morphological change of Hg²⁺ tolerant *Pseudomonas* (No. 10) when was incubated in nutrient broth with or without Hg²⁺ up to middle of log phase (9.5 h) at 30°C with shaking. (a); not containing Hg²⁺, ×200, (b); ×500, (c); containing Hg²⁺ (12.5 μg/ml), ×200, (d); ×500

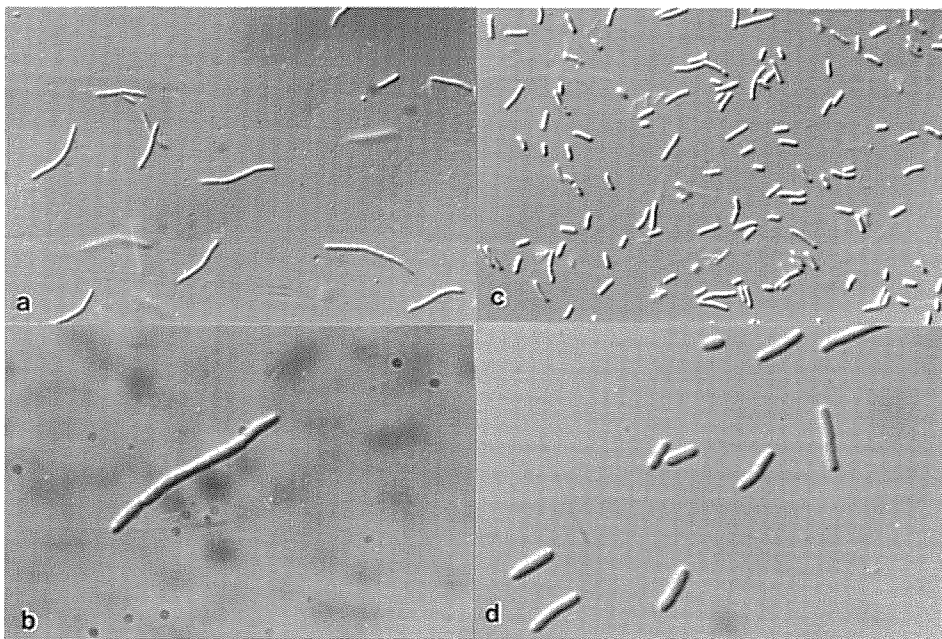


Plate 2. The morphological change of Hg²⁺ tolerant *Pseudomonas* (No. 19) when was incubated in nutrient broth with or without Hg²⁺ up to middle of log phase (10.5 h) at 30°C with shaking. (a); not containing Hg²⁺, ×200, (b); ×500, (c); containing Hg²⁺ (12.5 μg/ml), ×200, (d); ×500

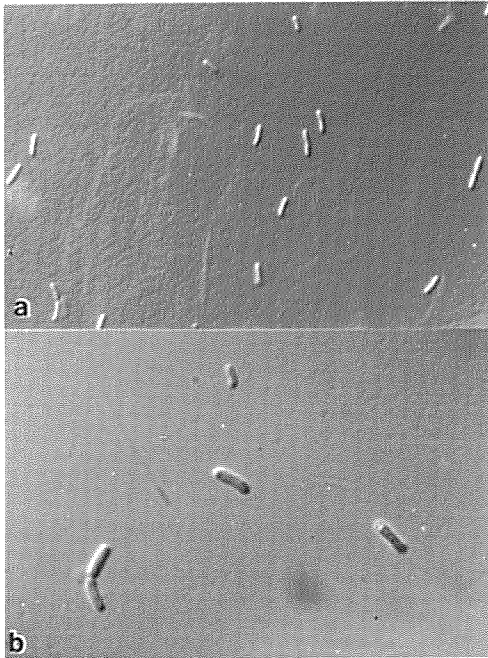


Plate 3. The shape of *P. putida* (ATCC No. 12633) when was incubated in nutrient broth up to middle of log phase (10.0 h) at 25°C with shshking. This was investigated as the control in this study.

耐性能を有する Hg^{2+} 耐性菌にとって Hg^{2+} は増殖を促進させると共に細胞を安定な状態に保持する効果をもつことが示唆された。

cell や spherical cell が形成されることが観察されている^{5,6}。これらの事実と今回の結果を併せて考えると、一度高い Hg^{2+} 耐性能を獲得した細胞にとって、 Hg^{2+} の存在は正常な細胞形態や生理機能を維持するために、有効に作用するが、逆に Hg^{2+} が存在しないと、変異しやすくなり、特に形態形成に不可欠の細胞壁や隔壁の生合成を阻害するようになるのではないかと考えられる。これらの点について現在さらに詳しい試験を進めている。

要 約

Hg^{2+} によって細菌の受ける影響を調べるため下水から分離した Hg^{2+} 耐性能の高い *Pseudomonas* (No. 10 & 19) を用いて増殖に対する熱力学的解析と形態学的観察を行なった。

その結果、12.5 $\mu g/ml$ の Hg^{2+} 存在下での増殖は Hg^{2+} が存在しない場合に比べて誘導期が短縮された。この時の増殖に要する活性化エネルギーは、No. 10 株が 2.5 Kcal, No. 19 株が 5.0 Kcal と両菌株とも最低となった。一方、形態学的には、 Hg^{2+} (12.5 $\mu g/ml$) 存在下で、本来の形態と運動性を保持するが、逆に Hg^{2+} が存在しないと変異しやすくなり、細胞が伸長することが判った。これは細胞壁や隔壁の生合成が阻害されるために起るものと推察された。

以上の結果から、今回分離した MIC 100 の高い

参 考 文 献

- 1) KOMURA I., and K. IZAKI: *J. Biochem.*, **70**, 885-893 (1971)
- 2) KOMURA I., T. FUNABA and K. IZAKI: *J. Biochem.*, **70**, 895-901 (1971)
- 3) FURUKAWA K., and K. TONOMURA: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 217-226 (1972)
- 4) IZAKI K., Y. TASHIRO, and T. FUNABA: *J. Biochem.*, **75**, 591-599 (1974)
- 5) ADLER H. I., C. E. TERRY, and A. A. HARDIGREE: *J. Bacteriol.*, **95**, 139-142 (1968)
- 6) MATSUHASHI, S., T. KAMIRYO, P. M. BLUBERY, P. LINNET, E. WILLOUGHBY, and J. L. STROMINGER: *J. Bacteriol.*, **117**, 578-587 (1974)
- 7) LADZUNSKI, C., and B. M. SHAPIRO: *J. Bacteriol.*, **111**, 499-509 (1972)
- 8) 田中信男, 中村昭四郎著: 抗生物質大要第3版 (1982), p. 19-23
- 9) UEMURA T., and T. YANAGITA: *Chem. Pharm. Bull.*, **6**, 138-142 (1958)

Summary

Thermodynamical and morphological studies were conducted to know the effect of various conc. of Hg²⁺ on high Hg²⁺ tolerant *Pseudomonas* strains (No. 10 & 19) isolated from sewage.

In the thermodynamical studies, the lag phase was shortened and the minimum activation energy for growth of these strains (No. 10 & 19) was recognized under 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg²⁺ conc.: 2.5 Kcal/mol and 5.0 Kcal/mol respectively. On the other hand, morphological studies revealed that the native cell maintained the shape when Hg²⁺ conc. was 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ but in the absence of Hg²⁺ it was observed to abnormal long shape.

The result suggested that 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hg²⁺ conc. was required for the growth and maintenance of native cell in high Hg²⁺ tolerant *Pseudomonas*.