腐植泥の強制酸化により生成する抗菌性無機金属複合体

城戸 裕, 杉井 篤, 柴田元雄

(熊本大学薬学部)

平成元年10月2日受理

An Antimicrobial Inorganic Metal Complex Produced by
Forced Oxidation of Humus Soil

Yutaka KIDO, Atsushi SUGII and Motoo SHIBATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Kumamoto 862

The antimicrobial inorganic metal complex produced by forced oxidation of humus soil was isolated and purified. This metal complex was isolated as needle crystals from a methanol extract of humus soil preparation and named KH-C₁. In chemical analysis and antimicrobial activity, KH-C₁ was found to be a metal sulphate complex different from the alum group. *Thiobacillus* spp. existing originally in humus soil was found to participate in the formation of KH-C₁.

(Received October 2, 1989)

緒 言

家畜の補助飼料として使用されている*腐植泥製品は豚などの下痢止めとして効果があり, またその水抽出液は生花の水上げを良くし日持ちさせると言われている。これらのことは腐植泥製品の中に何らかの抗菌性成分が存在するのではないかとわれ, 腐植泥製品の製造過程で本来抗菌力のない腐植泥から抗菌性成分が生成されるのではないかと考えられた。本報では腐植泥製品中に抗菌性成分が存在すること, また, これを抽出, 分離してその諸性質を明らかにするとともにこの抗菌性成分の生成に硫黄酸化細菌が関与していることを報告する。

実験材料および実験方法

1. 試料 腐植泥製品, ヒューマス, カルミー WKH はヒューマス産業の製品を使用した。硫黄酸化細菌の分離源の土壌としては腐植泥製品を調製する直前の掘り出したばかりの腐植泥を使用した。他の化学試薬は

特級あるいは1級のものを使用した。

2. 抗菌活性 抗菌活性は寒天希釈法⁽²⁾および寒天拡散法(カップ法)⁽³⁾で行った。検定培地としてはブイヨン寒天, グルコースブイヨン寒天およびポテトデキストロース寒天培地(PDagar)を用いた。後述するが抗菌性物質 KH-C₁は無機金属の硫酸塩の複合体であるので水溶液にしたのち pH を 7.0 に補正後その抗菌活性を上記の方法で検定した。

3. 試験菌 紫紋羽病菌(*Helicobasidium monpa* H-30)および白紋羽病菌(*Rosellina necatrix* R-15)は農林水産省蚕糸試験場桑病害研究室の保存株で九州農試の荒武義信博士からゆずりうけた。他の試験菌については Table II, III および IV に示した。

4. 硫黄酸化細菌の分離 硫黄酸化細菌の分離には下記の培地を用いた。

(ONM 培地)

(NH₄)₂SO₄ 0.2%, FeSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.03%, MgSO₄·7H₂O 0.03%, KH₂PO₄ 0.4%, S⁰ 1%, 水道水, pH 5.0

(PS 培地)

(NH₄)₂SO₄ 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, Na₂S₂O₃·5H₂O 10.0%, KH₂PO₄ 0.2%, FeCl₃·6H₂O

* ヒューマス, カルミー WKH: 湿地中で長期間堆積し, 泥状になった腐植泥を空気と充分接触させながら粉碎を繰り返し(強制空気酸化)活性化したものでヒューマス産業の製品⁽¹⁾。

Fig.1. Isolation of Antimicrobial Inorganic Metal Complex, KH-C₁ from Hyumas Karumi.

0.002%, CaCl₂ 0.01%, 水道水, pH 7.5

ONM および PS 培地は今井⁽⁴⁾らの用いた培地を使用した。上記の培地 30 ml に分離源土壌 1 g を加え、ロータリーシェーカー上 (160 rpm), 28°C で培養し、集積培養を5回くり返したのち寒天培地も併用して硫黄酸化細菌を純粋分離した。

5. 硫黄酸化細菌懸濁液の調製 分離した硫黄酸化細菌を上記の ONM 培地 30 ml を含む三角フラスコ (200 ml) で、ロータリーシェーカー上 (160 rpm), 28°C 5日培養し、粉末イオウなど固形物を除くためろ紙 (ワットマンろ紙) で濾過後、濾液を遠心分離 (12,000 rpm, 20 min) し、残渣に生理食塩水を加え、遠心分離を3回繰り返した後、残渣を再び生理食塩水に懸濁し、細菌懸濁液とした。

6. 一般分析法

(a) C, H, N は高速 CHN コーダー MT-3 型により測定, Na: フレーム光度法分析, Mg, 全 Fe, Al, Zn, Mn: ICP 分析, Fe²⁺: 吸光光度法分析, SO₄²⁻: イオンクロマトグラフィー分析を九州環境管理協会に依頼した。

(b) 腐植泥中の pH および硫酸イオンの測定。土壌試料 10 g を 50 ml 容ビーカーにとり、蒸留水 25 ml を加え、ガラス棒で良くかき混ぜ均一な懸濁液とし、室温に 30 分以上放置した。pH は測定前に軽くかきまぜて pH メーター (堀場製) で測定した。硫酸イオンは懸濁液をメンブランフィルター (0.2 μm) で濾過後、濾液中の硫酸イオンをイオンクロマトグラフィー⁽⁵⁾によ

って定量した。硫酸イオンのイオンクロマトグラフィーは電導度検出器を装着した日立 55 A-12 型液体クロマトグラフを用い、#2710-SA-IC (日立, 4.0 mm×50.0 mm) のカラムを用い、40°C で行った。移動相溶液としては 0.75 mM のフタル酸水素カリウム溶液 (1 ml/min) を用いた。

結果および考察

1. 抗菌成分の存在とその分離

腐植泥製品は豚の下痢止めとして有効であり、何らかの抗菌成分が存在するのではないかと考えられた。そこで腐植泥製品の抗菌力を調べたところグラム陽性菌よりもグラム陰性菌、なかでも *Pseudomonas aeruginosa* に有効で、約 20 u/g (希釈単位) の抗菌力が認められた。この抗菌成分を抽出、分離するため、水、50% メタノールおよびメタノールを溶媒として用い、抽出温度 20°C (室

Fig.2. Crystal of Antibiotic Substance, KH-C₁.

Table I. Chemical Analyses and Empirical Formula of Antimicrobial Inorganic Metal Complex, KH-C₁

Component	%	Empirical formula
C	0	$\left[\begin{array}{c} \text{FeSO}_4 \cdot \\ \text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot \\ \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \\ \text{MgSO}_4 \end{array} \right] \cdot n\text{H}_2\text{O}$
H	3.86~ 4.07	
N	0	
*T-Fe	8.04~ 8.62	
Fe ²⁺	7.25	
Na ⁺	3.04~ 4.78	
Al ³⁺	2.26~ 2.55	
Mg ²⁺	2.15~ 2.67	
H ₂ O	34.61~34.82	
SO ₄ ²⁻	48.40~49.30	

*T-Fe ; Total Fe

温), 60°C, 90°C, 時間 (30 分, 1 時間, 2 時間) を変えて行ったところ, 水では抗菌成分はごくわずかし抽出されず, 50% メタノールによる還流抽出 (1 時間あるいは 2 時間) が最も良好 (収率 83~90%) であったが不純物も多く抽出され, 以後の分離精製が困難であった. 一方メタノールによる還流抽出 (1 時間あるいは 2 時間) は収率的には 50% メタノールに劣るが (収率 56~60%), 以後の分離精製が良好であった. すなわち 300 g の腐植泥製品に 5 倍量のメタノールを加え, 約 90°C で 1 時間還流抽出後, 濾過し, 濾液を濃縮 (30 ml) 後, 4 倍量のエタノールを加え, 生じた沈澱を遠心分離により除き, 上清を低温室 (4°C) にて 2 晩放置して約 1.0 g の無色針状晶を得た. この無色針状晶をメタノール・エタノール混液により再結晶し抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ を得た. 抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の分離法およびその結晶の写真をそれぞれ Fig. 1 および Fig. 2 に示した.

2. 抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の理化学的性質

抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ は無色針状晶で, 水, メタノールおよびエタノールには可溶であるが, アセトン, ヘキサンおよびエーテルなどの有機溶媒には不溶である. KH-C₁ を元素分析, 原子吸光分析およびイオンクロマトグラフィーにより検討した結果, KH-C₁ は Fe, 8.04~8.62; Na, 3.04~4.78; Al, 2.26~2.55; および Mg, 2.15~2.67% で C および N を全く含まない無機金属の硫酸塩からなる複合体と考えられた. なお Fe は全 Fe で示したが, 84~95% は Fe²⁺ であった. 抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の分析値および実験式を Table I に示した.

Table II. Antimicrobial Spectrum of Antimicrobial Inorganic Metal Complex, KH-C₁

Test organisms	Medium	MIC (mg/ml)
<i>Escherichia coli</i> IFO-3301	I	5
<i>Proteus vulgaris</i> IFO-3167	I	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO-3448	I	2
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO-3061	I	5
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	I	5
<i>Mycobacterium smegmatis</i> IFO-3082	II	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO-0305	II	5
<i>Candida albicans</i> IFO-0583	II	5
<i>Aspergillus niger</i> IFO-4066	II	2
<i>Penicillium chrysogenum</i> IFO-4026	II	2
<i>Helicobasidium monpa</i> H-30	III	0.5
<i>Rosellina necatrix</i> R-15	III	1

Medium I: bouillon agar, II: glucose bouillon agar, III: potato dextrose agar.

3. 抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の生物学的性質

抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の寒天希釈法による抗菌スペクトルを Table II に示した. KH-C₁ はグラム陽性, 陰性細菌および真菌に対して最小阻止濃度 2~5 mg/ml 程度の弱い抗菌力を示した. 紋羽病菌 *Helicobasidium monpa* H-30 (紫紋羽病菌) および *Rosellina necatrix* R-15 (白紋羽病菌) に対する最小阻止濃度はそれぞれ 0.5 mg/ml および 1 mg/ml で, 常用する子のう菌に対してよりやや強い抗菌力を示した.

4. 抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ と明礬類との比較

無機金属の硫酸塩のうち明礬類は弱い抗菌力を示すことが知られている. 有色のクロム明礬を除き他の明礬類 (ナトリウム, カリウム, アンモニウムおよび鉄明礬) と KH-C₁ と化学組成ならびに抗菌力とを比較した.

KH-C₁ は明礬類には含まれていないマグネシウムや 2 価の鉄を含み, またカリウムや窒素を全く含まず, さらに金属組成比も異なることから, カリウム, アンモニウム, 鉄 (鉄は 3 価) およびナトリウムの各明礬類とは全く異なっている. 一方, それぞれの抗菌力を寒天希釈法およびカップ法で比較して Table III に示したが, 明礬類がグラム陰性菌の *P. aeruginosa* よりグラム陽性菌の *B. subtilis* に対して, より強い抗菌力を示すのに対し, KH-C₁ は *P. aeruginosa* に対して, より強い抗菌力を示した. 特異的抗菌力ならびに抗菌スペクトルを Table II に示した. また Table III には示していないが KH-C₁ と同じ金属組成比に調製した明礬類混合物の抗菌力は各

Table III. Comparison of KH-C₁ with Alum Group

Empirical formula	Composition	Antibiotic activity			
		Inhibition zone (mm)		MIC (mg/ml)	
		<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
AlNa(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	Al, Na, SO ₄ ²⁻	18.0	16.0	5	5
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	Al, K, SO ₄ ²⁻	18.0	16.0	5	5
AlNH ₄ (SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	Al, NH ₄ , SO ₄ ²⁻	18.0	16.0	5	5
FeNH ₄ (SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	Fe, NH ₄ , SO ₄ ²⁻	20.0	17.0	5	5
KH-C ₁ [FeSO ₄ ·Na ₂ SO ₄ · Al ₂ (SO ₄) ₃ · MgSO ₄] ·nH ₂ O	Fe, Na, Al, Mg, SO ₄ ²⁻	20.0	22.0	5	2

Medium: bouillon agar.

Table IV. Some Taxonomic Properties of Isolates

	ONM-strain No.1	ONM-strain No.8
Energy source	S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻
Size (μm)	0.7×1.5	0.7×1.5
Accumulation of sulfur outside cell	None	None
Pellicle formation	None	None
Carbon source	CO ₂ from air	CO ₂ from air
Aerobism	Aerobic	Aerobic
Mobility	+	+
Gram stain	-	-
SO ₄ ²⁻ production	+	+

明礬類と同様に *P. aeruginosa* より *B. subtilis* に対し、より強い抗菌力を示し、KH-C₁ は明礬類とは異なる抗菌性を持っていることが明らかとなった。

以上から KH-C₁ は明礬類とは異なる抗菌性をもつ金属硫酸塩複合体と考えられた。

5. 硫黄酸化細菌の分離とその性質

本来、抗菌力を持たない植物性腐植泥 (pH 7.0) から腐植泥製品を強制空気酸化を行いながら調製する際、pH はほぼ 3.0 まで低下するが加熱滅菌 (120°C, 30 分) した腐植泥ではこの pH の低下は認められない。これは空気酸化以外に pH の低下には微生物の関与、ことに無機金属複合体 KH-C₁ の化学組成から硫黄酸化細菌の関与が考えられた。そこで腐植泥から ONM 培地および PS 培地を用い、28°C でロータリーシェーカー上 (160 rpm) で集積培養を行い、5 回集積を繰り返したのち、ONM 寒天および PS 寒天平板に画線し、ONM 培地から 8 株 (ONM-No.1~No.8)、PS 培地から 3 株 (PS-No.1~No.3) を分離した。これらの分離株をそれぞれ ONM 液体培地あるいは PS 液体培地で 28°C、ロータリーシェーカー上 (160 rpm) で振盪培養し、pH の

変化を調べた (Fig. 3)。ONM 培地分離の 8 株はすべて pH を約 1.0 まで下げるが、5 日目で pH を 1.0 まで下げる A グループと 4 日目から徐々に pH を低下させる B グループに分かれた。

Fig. 3. pH Changes of Isolates Cultured in ONM- or PS-Medium. Group A, ONM strain No.1, 2, 3 and 7; Group B, ONM strain No.4, 5, 6 and 8; Group C, PS strain No.1, 2 and 3.

Fig. 4. Time Course of SO_4^{2-} Production from Hyumas Karumi. (○●), Non-sterilized soil; (△▲), sterilized soil.

一方、PS 培地分離の3株は全て pH を 5.0 近くまでしか低下させなかった (C グループ)。A および B グループのそれぞれの代表として ONM-No. 1 株および ONM-No. 8 株の菌学的性質を Table IV に示した。両菌の大きさは同様に $0.7 \times 1.5 \mu\text{m}$ 、運動性の短桿菌であった。両菌とも ONM 培地に良く生育し、試験管での静置培養で、表面皮膜の形成は認められなかった。また、両菌とも好気性菌で粉末イオウおよび2価のイオウをエネルギー源とし、炭酸ガスを唯一の炭素源としている。他の菌も同様の性質で、以上の性質から両グループとも *Thiobacillus* 属細菌と考えられた。

6. 抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ 生成への硫黄酸化細菌の関与

腐植泥から数株の硫黄酸化細菌を分離したが、これら細菌の抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ 生成への関与を明らかにするため、さらに次の検討を行った。掘り出したばかりの腐植泥と滅菌 (120°C , 30 分) した腐植泥を用いて、腐植泥製品調製操作を行い、pH の変化と SO_4^{2-} イオンの生成を調べた (Fig. 4)。Fig. 4 から明らかなように pH の低下は SO_4^{2-} イオンの生成によるものであり、滅菌腐植泥では pH 低下も SO_4^{2-} イオン生成もほとんど認められないから SO_4^{2-} イオン生成 (pH の低下) に細菌が関与することが認められた。さらに分離硫黄酸化細菌が抗菌性無機金属複合体生成に関与することを明らかにするため、以下の検討を行った。すなわち未滅菌腐植泥と滅菌腐植泥を用い、あらかじめ ONM 液体培地で培養した ONM-No. 1 株および ONM-No. 8 株の細菌懸濁液を添加して上記の腐植泥製品調製操作を行

Fig. 5. Time Course of SO_4^{2-} Production by *Thiobacillus* spp. (○●), Non-sterilized soil; (□■), Non-sterilized soil with the suspension of group A and B; (△▲), sterilized soil with the suspension of group A and B.

い、pH の変化と SO_4^{2-} イオンの生成を調べた (Fig. 5)。未滅菌腐植泥 (300 g) に細菌懸濁液 ($\text{OD}=0.2$, 各 5 ml) を添加した場合の SO_4^{2-} イオンの生成 (pH の低下) は懸濁液無添加の未滅菌腐植泥 (300 g) の場合より急速であり、 SO_4^{2-} イオンの生成には分離した *Thiobacillus* 属細菌が関与すると考えられた。一方、滅菌腐植泥 (300 g) に上記懸濁液 ($\text{OD}=0.2$, 各 5 ml) を添加した場合は、 SO_4^{2-} イオンの生成ならびに pH の低下はほとんど認められず、さらに長期間 (3 週間) にわたっても pH の低下 (pH 7.0→5.6) は懸濁液無添加の未滅菌腐植泥の場合よりゆるやかであった。また、滅菌腐植泥 (300 g) に硫黄源として ONM 液体培地 (5 ml) のみを添加した場合も SO_4^{2-} イオンの生成ならびに pH の低下もほとんど認められなかったが、滅菌腐植泥 (300 g) に上記懸濁液 ($\text{OD}=0.2$, 各 5 ml) と ONM 液体培地 (5 ml) とを添加した場合は明らかな pH の低下 (3 週間後、pH 7.0→3.4) が認められた。このことはオートクレーブ滅菌時かなり強い硫黄臭があることを考慮すると滅菌によって硫黄酸化細菌の基質となる腐植泥中の含硫成分に何らかの変化 (分解) が起きたのではないかと考えられる。未滅菌腐植泥において pH の低下と SO_4^{2-} イオンの生成が認められ、さらに強制酸化を続けて pH が 3.0 以下まで低下した場合に初めて抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ を抽出することが出来た。以上の結果から、抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の生成には腐植泥中に存在する *Thiobacillus* 属細菌により生成された SO_4^{2-} イオン

が腐植泥中の無機金属 (Fe, Na, Al, Mg など) と結合し, 特異な抗菌性 (グラム陽性菌よりグラム陰性菌に対してより強い) をもち, 3 価鉄の鉄明礬とは異なる 2 価鉄の無機金属硫酸塩複合体になったと考えられる. その構造に関しては X 線解析においても明確な構造が確定できず, なお検討中である.

要 約

腐植泥製品中の抗菌成分の存在とその分離および抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の生成への硫酸化細菌の関与について検討した結果, 以下のような結果を得た.

(1) 腐植泥製品中には抗菌成分が存在し, その抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ をメタノール抽出などにより無色針状晶として分離した.

(2) 抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ は化学分析値およびその抗菌スペクトルから明礬類とは明らかに異なる無機金属 (Fe, Na, Al, Mg) の硫酸塩の複合体と考えられた.

(3) 抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の生成に最も関与しているのは腐植泥中の *Thiobacillus* 属細菌と考えられた.

最後に掘り出したばかりの腐植泥および腐植泥製品を提供して下さったヒューマス産業株式会社および抗菌性無機金属複合体 KH-C₁ の X 線解析をして下さった住友化学分析センターに深謝いたします.

- (1) 森下唯雄: 日本公開特許公報, 62, 1362(1987).
- (2) S. A. Waksman and H. C. Reilly: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 17, 556 (1945).
- (3) 厚生省: 日本抗生物質医薬品基準解説, 薬事時報社, 1978, 556 (1945).
- (4) a) 今井和民, 奥積晶世, 片桐英郎: 発酵工学雑誌, 42, 755 (1964).
b) 今井和民, 奥積晶世, 片桐英郎: 発酵工学雑誌, 42, 762 (1964).
c) 今井和民, 独立栄養細菌, 化学同人, 京都, 1984, p.67.
- (5) D. T. Gjerde, J. S. Fritz and G. Schumuckler: *J. Chromatogr.*, 186, 509 (1979).