

海洋性硫酸塩還元細菌と培地の 酸化還元電位との関係*

畑 幸 彦

Relation Between the Activity of Marine Sulfate-Reducing
Bacteria and the Oxidation-Reduction Potential of
the Culture Media (2)*

By

Yoshihiko HATA

In the previous paper, it has been shown that marine sulfate-reducing bacteria required a redox potential of lower than $E_h +0.20$ volt for the initiation of growth, and that the lower the initial redox potential of the media, the greater was the rate of growth.

The present paper embodies the more detailed data on the redox potential for the initiation of growth of these organisms, the changes in redox potential during the growth cycle in the pure culture as well as in the mixed culture, and the influence of aeration on the redox potential and the population in the culture.

Marine sulfate-reducing bacteria strain SM1 and marine aerobic bacteria strains A1 and A5 which were isolated from the marine sediments were used as test organisms. For the inoculation the cell suspensions of these bacteria were employed after having been washed twice with sea water.

The results obtained are given in Tables 1-3 and Figs. 1-20, and may be summarized as follows:

- 1) The upper limit of E_h required for the initiation of growth of sulfate-reducing bacteria was ca. $+0.20$ volt in liquid medium as well as in semisolid medium. This upper limit somewhat raised when heavy inoculum was employed. In the latter case the lag period in the growth was shortened to some extent. These

※ 水産講習所研究業績 第311号, 1960年6月23日 受理.
Contribution from the Shimonoseki College of Fisheries, No. 311.
Received June 23, 1960.

※ 海洋性硫酸塩還元細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用と, 培地の酸化還元電位との関係について
(その2)

facts may be explained by the introduction of the reducing activities accompanied with the active cells of the organisms in the inoculum.

- 2) When aerobic bacteria coexisted, sulfate-reducing bacteria could grow in the media having initial Eh value higher than +0.20 volt. This may be due to the lowering of Eh accompanied with the growth of aerobes.
- 3) From the observations on the redox potential in various portions of the culture and the Eh—growth—sulfide relationship during growth, it may be suggested that the development of reducing conditions in the active culture of sulfate reducers is primarily attributable to the reducing activities of cells, and that sulfides formed and Fe^{2+} contained play an important role in the production and the maintenance of reducing conditions.
- 4) In the culture of aerobic bacteria (strains A1 and A5) the intense growth and the rapid fall in redox potential were observed when vigorously aerated.
- 5) When the culture of sulfate-reducing bacteria, in either logarithmic growth phase or accelerating death phase, was aerated Eh of the culture raised rapidly and sulfides in the media disappeared promptly but the viability of the cells were not so rapidly disappeared. Especially in the case of mixed culture with aerobes, the aeration hardly influenced the viability of sulfate-reducing bacteria. This may be due to the increase of protective effects accompanied with the vigorous growth of aerobes under the sufficient supply of oxygen by aeration.

既報¹⁾において、海洋性硫酸塩還元細菌は培地の酸化還元電位が Eh 約+0.20 volt 以下であれば発育を開始し、その速度は一般に Eh が低いほど大きいことを明らかにしたが、本報ではさらに、この細菌の発育開始に必要な Eh ンベルをくわしく追究し、純粋培養または好気性細菌との混合培養における Eh の変動、あるいはこれらの培養に対する通気の影響などについて種々の点から検討した結果を述べる。

実 験 方 法

1. 供試細菌：硫酸塩還元細菌は既報¹⁾の実験におけると同様に代表的海洋性種 SM1²⁾を用いた。また混合培養には、海底泥土からの硫酸塩還元細菌の純粋分離に際してこれと共存して分離がはなはだ困難であった好気性細菌 A1 株、および海底還元泥土から直接分離された好気性細菌 A5 株を、それぞれ SM1 と混合接種した。
2. 接種ならびに培養：接種にあたって前培養から微量の還元性物質が導入されるのを防ぐため、第1表の培地に 30°C 2日間培養された菌体を 2,500 r. p. m. 10分 で遠心集菌し滅菌海水で2回洗滌再懸濁し、この懸濁液 10⁻⁸ ml を約 300 ml の培地に接種した。しかし実験(1)においては、いろいろの程度に稀釈した菌体懸濁液を接種した。嫌気培養には、細谷・岸野式嫌気培養瓶を用いた。また培養温度はすべて 30°C であった。
3. 発育および硫化物の測定：硫酸塩還元細菌の発育は、第1表の組成に寒天 3.0 g/L を加えた semisolid 海水培地で dilution count し、この値から M. P. N. を求めて示した。好気性細菌は、ZOBELL の培地³⁾*

* Peptone 5 g, Beef extract 2 g, KNO₃ 0.5 g, Agar 15 g, Filtered sea water 1,000 ml, pH 7.2.

Table 1. Composition of the medium employed.

| | |
|---|----------|
| Ca-lactate | 3.5 g |
| Beef extract | 1.0 |
| Peptone | 2.0 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.2 |
| K ₂ HPO ₄ | 0.2 |
| Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O | 0.5 |
| L-Ascorbic acid | 0.1 |
| Filtered sea water | 1,000 ml |
| pH | 7.5 |

を用いて plate counts した。また硫化物は、富山・神崎の方法⁴⁾で水蒸気蒸溜し、ST. LORANT 法⁵⁾によってメチレンブルーにかえ 610 m μ で光電比色定量した。

4. Eh および pH の測定：Eh は白金電極および飽和甘汞電極を用いて電位差計で測定した。pH の測定はガラス電極 pH メーターによった。

実 験 結 果

(1) 発育開始に必要な Eh のレベルと接種量との関係

既報¹⁾において、この細菌は還元性物質として L-ascorbic acid または Na₂S を含む培地では Eh が約 +0.20 volt 以下であれば発育を開始することをみたが、この発育開始に必要な Eh のレベルをさらに詳しく調べるため、つぎの実験をおこなった。

第1表の組成から L-ascorbic acid を除いた液体培地、またはこれに寒天 3.0 g/L を加えた semisolid 培地をそれぞれ基礎培地とし、L-ascorbic acid をいろいろの濃度に加えて 9 ml ずつ試験管に分注し、これらにあらかじめ滅菌海水で 10 倍ごとの各種段階に希釈された洗滌菌体懸濁液 1 ml を接種し、これを空気を入れないように静かに振盪してできるだけ均一に分散させ、滅菌流動パラフィンを重層して 30°C に保ち、発育がはじまるかどうかをみた。この場合、同様に保温された無接種の対照の Eh を実験のはじめと途中 (2 週間後) およびおわり (5 週間後) に測定した。

その結果は第2表に示すとおり、液体培地については初期 Eh +0.188 volt (L-ascorbic acid 0.1 g/L) では菌体接種量 $2.2 \times 10^8 \sim 2.2 \times 10^8$ cells/10 ml にわたって発育がみられ、また初期 Eh +0.208 volt (L-ascorbic acid 0.05 g/L) では接種量 $2.2 \times 10^8 \sim 2.2 \times 10^8$ cells/10 ml において発育がはじまったが、初期 Eh が +0.231 volt 以上 (L-ascorbic acid 0.02 g/L 以下) のときはどの接種量でも 5 週間後においても全く発育できなかった。一方 semisolid 培地では、初期 Eh が +0.180 および +0.195 volt (L-ascorbic acid 0.1 および 0.05 g/L) のときは接種量 $2.2 \sim 2.2 \times 10^8$ cells/10 ml にわたって発育がはじまったが、+0.221 volt (L-ascorbic acid 0.02 g/L) においては接種量 2.2×10^8 cells/10 ml の場合を除いては発育がみられず、またそれ以上の高い Eh ではどの接種量においても全く発育がおこらなかった。発育がはじまったものについてみると、一般に Eh が低いほど、また接種量が多いものほど発育の開始が早かった。

以上の結果から、この細菌の発育開始に必要な Eh のレベルは +0.20 volt 附近以下であって、Eh +0.22 volt 附近以上では発育は開始されないものと思われる。そして発育可能な Eh の上限は接種量と密接な関係があり、接種量が多いものほど一般にこの上限が低くかつ発育開始が早くなるものと考えられる。接種量が多ければ Eh が比較的高くても発育が得られたのは、菌体に附随して導入された還元性物質によって、ある

Table 2. Relation between the redox potential of the medium and the growth of sulfate-reducing bacteria (SM₁) under various conditions. (Composition of the basal medium was similar to that shown in Table 1 but L-ascorbic acid was omitted.)

| Basal medium | Concentration of L-ascorbic acid added (g/L) | Eh in uninoculated medium (volts) | | | Eh in medium immediately after inoculation (volts) | Growth of sulfate-reducing bacteria | | | | | | | | |
|--------------|--|-----------------------------------|--------|--------|--|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | Storage time (days) | | | | Inoculum size ($\times 2.2$ cells/10 ml of medium) | | | | | | | | |
| | | 0 | 14 | 35 | | | 10^8 | 10^7 | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 | 10^1 |
| Liquid | 0 | +0.293 | +0.302 | +0.306 | +0.289 (10^8 cells/ml) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.001 | +0.287 | +0.290 | +0.286 | +0.286(10^7 //) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.005 | +0.275 | +0.279 | +0.287 | +0.297(10^6 //) | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.01 | +0.253 | +0.272 | +0.292 | --- | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.02 | +0.231 | +0.236 | +0.270 | --- | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.05 | +0.208 | +0.215 | +0.244 | --- | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 0.1 | +0.188 | +0.185 | +0.210 | --- | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Semi-solid | 0 | +0.291 | +0.310 | +0.322 | --- | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.001 | +0.288 | +0.300 | +0.295 | --- | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.005 | +0.271 | +0.284 | +0.288 | --- | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.01 | +0.254 | +0.263 | +0.284 | --- | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 0.02 | +0.221 | +0.231 | +0.277 | --- | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 0.05 | +0.195 | +0.201 | +0.226 | --- | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 0.1 | +0.180 | +0.197 | +0.206 | --- | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

N. B. -:Growth did not occur after 35 days; +:Growth occurred after 1 day; +':Growth occurred after 2 days; +':Growth occurred after 3 days; +':Growth occurred after 4 days.

いは生菌自体のもつ還元作用によって、菌体周辺に極く小部分に必要な低電位が形成されたためではなからうか（表に示すように大量接種のときにも、全体としての Eh には接種自体による変化はほとんどみられなかった）。そして一旦発育がはじまれば、それにとまう還元作用と硫化物生成によって全体としての電位も低下し、一層この細菌の発育が促がされるものと思われる。また液体培地と semisolid 培地とは、同一量の L-ascorbic acid を加えた場合にも後者における方が前者におけるよりも比較的少量の接種によって発育がおこったが、これは表に示すように後者の方が空気の接触・侵入が少ないためいく分低い Eh が得られたことと共に、後者では接種後の菌体の分散が比較的困難なため局部的低電位が形成されやすかったことによるのかも知れない。

(2) 培養における酸化還元電位の分布

既報¹⁾において明らかにしたとおり、この細菌の発育および硫化物生成作用にともなって培地の酸化還元電位はいちじるしく低下するが、この電位の低下は(少なくとも培養初期においては)硫化物生成にともなうよりも、むしろこれに先行する菌体の増殖に、より密接に附随しておこるように見える。すなわち、培養における低電位の形成には硫化物を主とする還元性物質の蓄積とともに、菌体自身のもつ還元作用力が大きな役割を果しているのではないかとと思われる。この点を明らかにするため 1L 容三角フラスコに第 1 表の組成およびこれから $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を除いた培地で 30°C 48 時間培養した後、第 3 表に示すいろいろの処理をして Eh を測定し、培養における電位の分布状態をしらべた。この場合、 Fe^{2+} を含まぬ培養基は滅菌前に一旦 10 ポンド 10 分間オートクレーブして後、沈澱を濾別して透明な培地とした。

その結果は第 3 表に明らかとなっており、培養をそのまま静置して測定したときの電位の垂直的分布は、底部でいく分低くなる傾向がみられたが概して上下での差はなかった (A)。 Fe^{2+} を加えたものの方が、これ

Table 3. Redox potential in different portions of the culture of sulfate-reducing bacteria (SM1) incubated at 30°C for 48 hours.

| Portion of the culture employed and the treatment of culture prior to the measurement | Eh (volts) | | |
|--|--|---|--------|
| | Culture medium | | |
| | Omitted $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | Contained $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L | |
| (A) No treatment | Upper layer | -0.123 | -0.180 |
| | Middle layer | -0.111 | -0.175 |
| | Bottom layer | -0.135 | -0.185 |
| (B) Shaked slowly | | -0.121 | -0.187 |
| (C) Centrifuged at 0—500 r. p. m. for 3 minutes | Supernatant I | — | -0.168 |
| | Precipitate I (FeS) | — | -0.172 |
| (D) Centrifuged at 4,000 r. p. m. for 20 minutes | Supernatant II | -0.113 | — |
| | Precipitate II (bacterial mass) | -0.156 | — |
| (E) The above precipitate II was washed twice with sea water | | +0.124 | — |
| (F) The above washed precipitate was heated at 90°C for 10 minutes | | +0.168 | — |
| (G) The above shaken sample was heated at 90°C for 20 minutes under the layer of liquid paraffin | | -0.127 | — |
| (H) The above supernatant II was boiled for 10 minutes | | +0.026 | — |

を加えなかった透明培地でよりもかなり低い Eh が得られたが、これは既報⁶⁾のとおり Fe^{2+} によって発育および activity が促進されたためと思われる。 Fe^{2+} を加えた培養では FeS が多量フラスコ底部に沈殿したが、この付近における特別な低電位の形成はみられず、またこの培養を 0—500 r. p. m. で 5 分間遠心して FeS を分離した場合にも上澄液と沈殿との間には電位に大差がみられなかった (C)。また透明培地での培養を 4,000 r. p. m. で 20 分間遠心した場合は、沈殿 (菌体の集塊) は上澄液 (菌体をほとんど含まない) にくらべてかなり低電位となった (D)。この沈殿を海水で 2 回洗滌した後の電位はかなり上昇したが、通常の海水にくらべると、なお約 0.2 volt 程度低かった (E)。つぎに、この洗滌菌体集塊を 90°C で 10 分間加熱殺菌した場合、電位はさらに上昇した (F)。また原培養を流動パラフィン重層下で揮発性物質の逸散を防ぎながら 90°C で 20 分間加熱して生菌を死滅させた場合には電位はほとんど変らなかつたが (G)、一方生菌を除いた上澄液を 10 分間煮沸して揮発性物質および熱による影響を受けやすい物質を除いた場合には電位はいちじるしく上昇した (H)。

以上の結果を総合すると、培養における低い電位の形成には還元性物質の生成と生菌自体のもつ還元作用力がともに関与していると考えられるが、概して前者がより支配的であるようにみえる。しかし還元性物質のうち顕著に蓄積された不溶性 FeS は特別な低電位の形成にあずかっているとは考えられず、むしろ溶存するある種の物質が低電位の主たる担い手であるように思われる。そのものの本体は明らかでないが、おそらく H_2S も主要な一部をなすものであろう。

(3) 純粋培養ならびに好気性細菌との混合培養における Eh の変動

上述のように硫酸塩還元細菌の純粋培養は還元性物質を加えて酸化還元電位を低くした培地でなければ発育できないが、若し好気性細菌が共存するときには初発電位が発育に必要なレベルよりも高い場合にも、先ず好気性細菌の発育にともなって電位が低下し必要な低電位が形成された後、硫酸塩還元細菌の発育と活動が開始されるものと予想される。この過程を純粋培養の場合と対比して検討するため、第 1 表の組成の培地に純粋培養を、またこの組成から L-ascorbic acid を除いた培地に好気性細菌との混合培養をそれぞれ接種培養し、Eh および pH の変動、生菌数、硫化物量を経時的に測定した。混合培養に用いた好気性細菌は実験

方法において述べたとおり A1 および A5 の 2 菌株であって、いずれも genus *Vibrio* に属するものようであった。その結果を第 1, 2 および 3 図に示す。すなわち 0.1 g/L の L-ascorbic acid を含む培地で純粋培養 (第 1 図) は接種後間もなく対数発育期に入り 30 時間頃には最高発育期に達した。Eh は発育ときわめて密接に並行して急速に降下し、発育が最高に達すると同時に最低値を示した。硫化物の生成は常に発育より少しずつおくれ、その最高蓄積は発育が最高に達してかなりの時間を経た後にみられた。すなわち Eh の降下は硫化物の生成よりも発育に、より密接に附随するようにみえる。そして一旦下降した Eh は長時間そのまま低い値にとどまり、発育および硫化物生成がおとろえた後も Eh の急激な上昇はみられなかった。

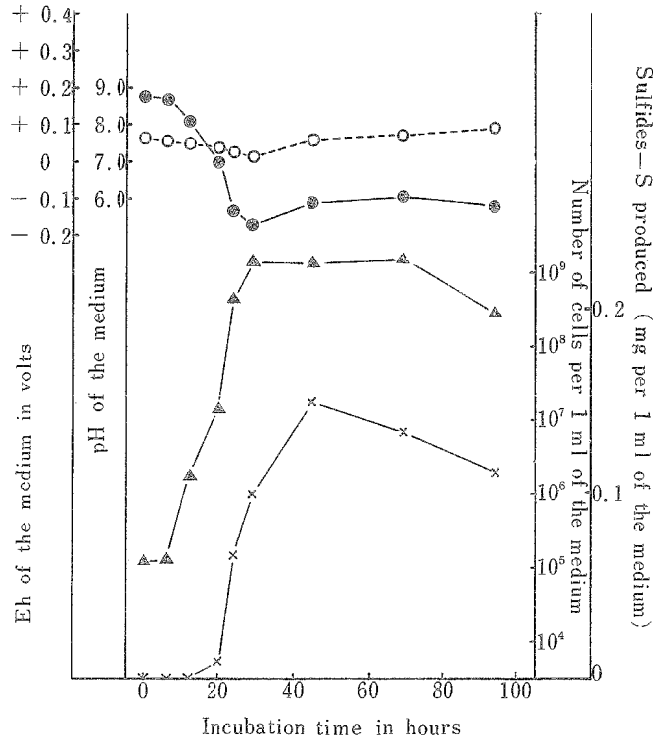


Fig. 1. Relation between the growth of sulfate-reducing bacteria strain SM1 in pure culture, the production of sulfides, the changes in Eh and pH of culture medium. —▲—: number of cells of sulfate reducers; —×—: sulfides formed; —●—: Eh of medium; ...○...: pH of medium.

好気性細菌との混合培養 (第 2, 3 図) では、いずれも共存する好気性細菌が先ず直ちに発育をはじめ、それにとまって Eh は最初の高い値からきわめて急激に降下した。硫酸塩還元細菌の発育は Eh の降下に続いてはじまり、Eh が最低値に達した頃ことに急激な対数発育を示した。また、この発育より少しおくれ硫化物の生成がみられた。そして第 2 図の場合には、共存する好気性細菌 (A1 株) は硫酸塩還元細菌の発育およびそれにとまらう硫化物生成が顕著になった後もそのまま発育を続け、最高発育期は硫酸塩還元細菌のそれと並行して継続した。これに対して第 3 図に示す場合は、共存好気性細菌 (A5 株) は Eh の降下および硫酸塩還元細菌の発育がさかんとするにつれて増殖を停止し、ことに硫化物の顕著な蓄積にとまって急速な死滅を示した。すなわち、前者における共存好気性細菌は低い Eh および高濃度の硫化物によって傷害を受けることなく、硫酸塩還元細菌と全く共存し得る通性的傾向の強い細菌であるのに対して、後者における好気性細菌は低い Eh あるいは高濃度の硫化物によって生育を阻害される偏性的傾向の細菌である

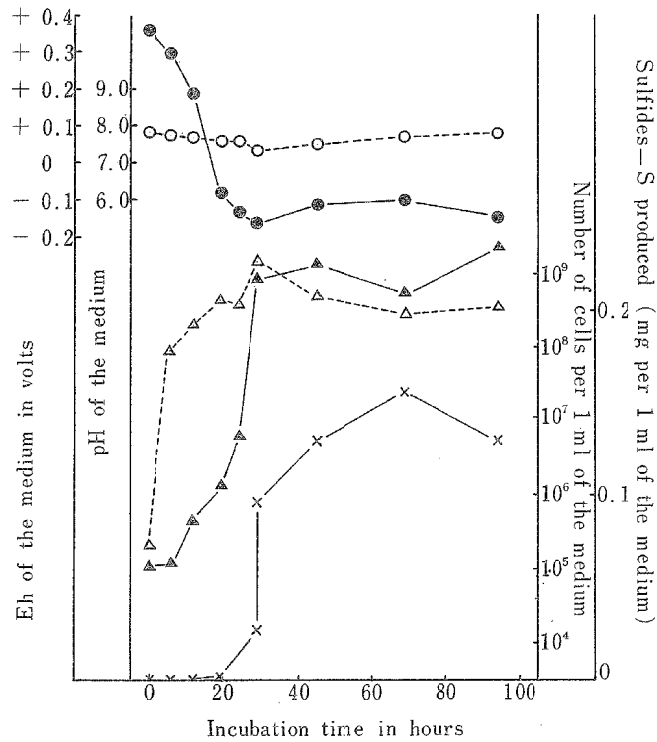


Fig. 2. Relation between the growth of sulfate-reducing bacteria (SM 1) and aerobic bacteria strain A1 in mixed culture, the production of sulfides, the changes in Eh and pH of culture medium. The marks were the same as those employed in Fig. 1 with the exception of $\cdots\triangle\cdots$: number of cells of aerobes.

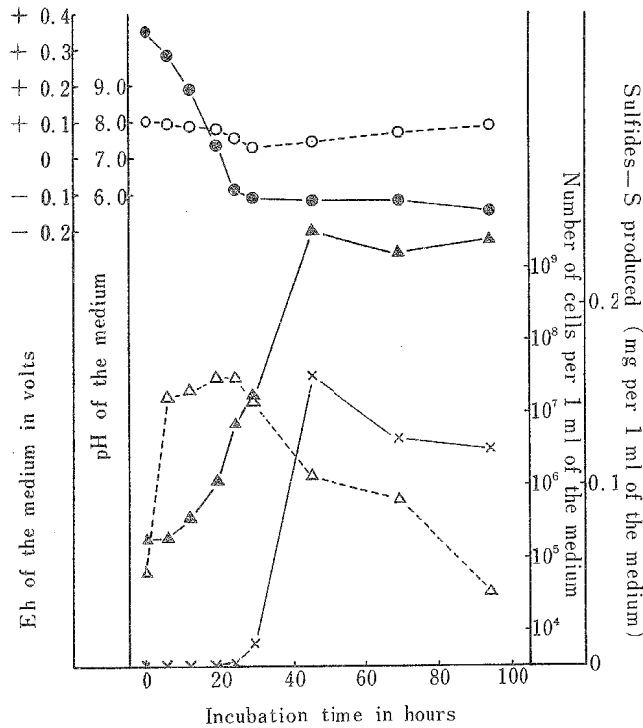


Fig. 3. Relation between the growth of sulfate-reducing bacteria (SM1) and aerobic bacteria strain A5 in mixed culture, the production of sulfides, the changes in Eh and pH of culture medium. The marks were the same as those employed in Fig. 1 and 2.

ことを示すものといえよう。以上のことは、これら2種の好気性細菌の分離の際の特徴(実験方法参照)と
考えあわせて興味ぶかく、また硫酸塩還元細菌と他の一般細菌との間の共生あるいは拮抗現象と関連する重
大な問題であると考えられる。

(4) 好気性細菌と培地の酸化還元電位との関係

上の実験で、好気性細菌が硫酸塩還元細菌と共存するとき、この細菌の種類によって酸化還元電位あるい
は硫化物に対する態度が異なることが示された。自然環境下では硫酸塩還元細菌と他の一般細菌とは互に密
接に影響し合って生活していると思われるので、共存好気性細菌と酸化還元電位との関係を検討することは
天然状態における硫酸塩還元細菌の実態を究明するための重要な課題である。そこで以下の実験において、
これら共存好気性細菌の発育あるいは生存に対する酸素、還元性物質または培地の酸化還元電位の影響につ
いて検討した。

第1表の組成から L-ascorbic acid を除いた培地に、好気性細菌 A1 または A5 の培養を少量接種し、
これを最初空気を通気しつつ培養したのち嫌気培養にかえるか、終始好氣的に静置培養するか、または最初
嫌気培養したのち通気培養にかえるかのいろいろの培養をおこない、細菌数、Eh および pH を経時的に
測定した。その結果は第4～9図に示すとおりである。

先ず A1 株を通気培養した場合(第4図)、急速な発育ともなって Eh はすみやかに降下し、発育が
最高に達したとき Eh もほぼ定常な最低値を示した。これの通気をやめ L-ascorbic acid 0.1 g/L を加える
とともに水素を約20分間はげしく通ずると、Eh はきわめて急激に一層降下したが細菌数はほとんど変化せ

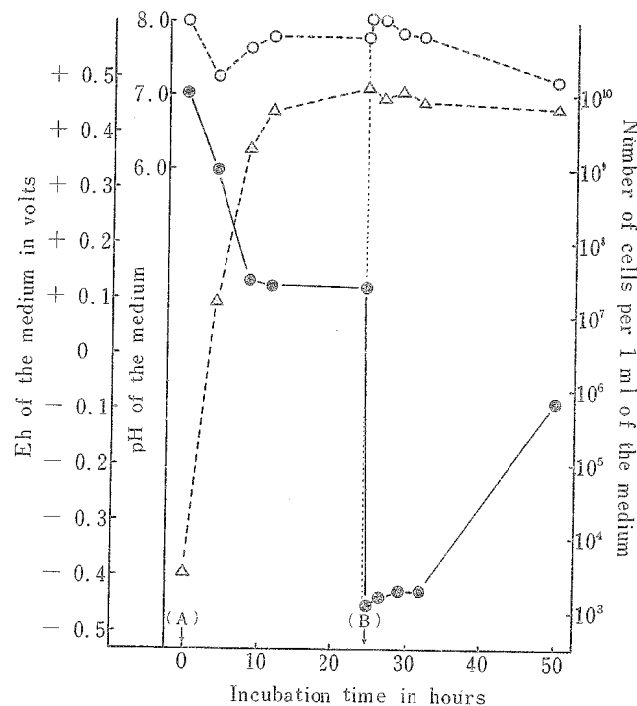


Fig. 4. Relation between the growth of aerobic bacteria (A1), the changes in Eh and pH of culture medium under the change of cultural condition from aerobic to anaerobic. (A): aeration started; (B): aeration was stopped, L-ascorbic acid (0.1 g/L) was added, N₂ was bubbled for 20 min., and culture was placed into anaerobic jar. ...△...: number of cells; —●—: Eh of medium; ...○...: pH of medium.

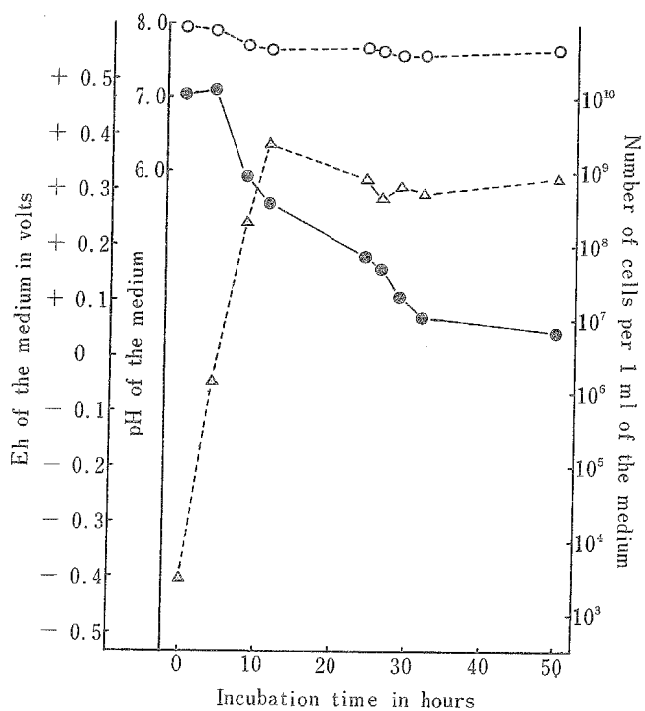


Fig. 5. Relation between the growth of aerobic bacteria (A1), the changes in Eh and pH of the culture medium under aerobic stationary cultivation. The marks were the same as those employed in Fig. 4.

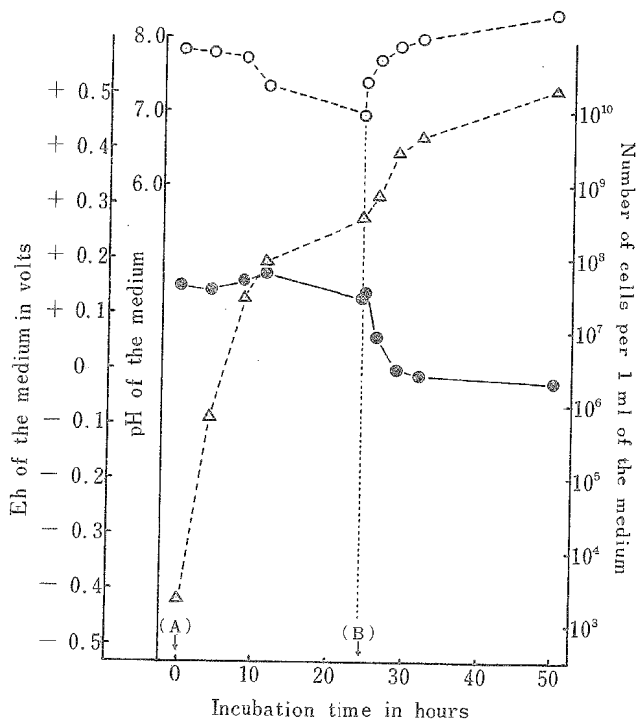


Fig. 6. Relation between the growth of aerobic bacteria (A1), the changes in Eh and pH of the culture medium under the change of cultural condition from anaerobic to aerobic. (A): anaerobic cultivation started; (B): aeration started. The other marks were the same as those employed in Fig. 4.

ず、その後も嫌気的環境下で長時間最高発育を持続した。またこの細菌を好氣的に静置培養したときは(第5図)、通気培養にくらべて発育の速度と程度はかなり小さく、Eh もやや緩慢な降下が続いた。この細菌を L-ascorbic acid 0.1 g/L を含む培地に嫌気瓶中で培養した結果は(第6図)、発育は一層ゆるやかで低い程度のまま一旦定常状態に入ろうとしたが、これに空気を通ずると再び急速な発育がはじまった。Eh は最初の嫌氣的培養ではほとんど変化しなかったが、通気後発育の再開とともにはげしく降下した。

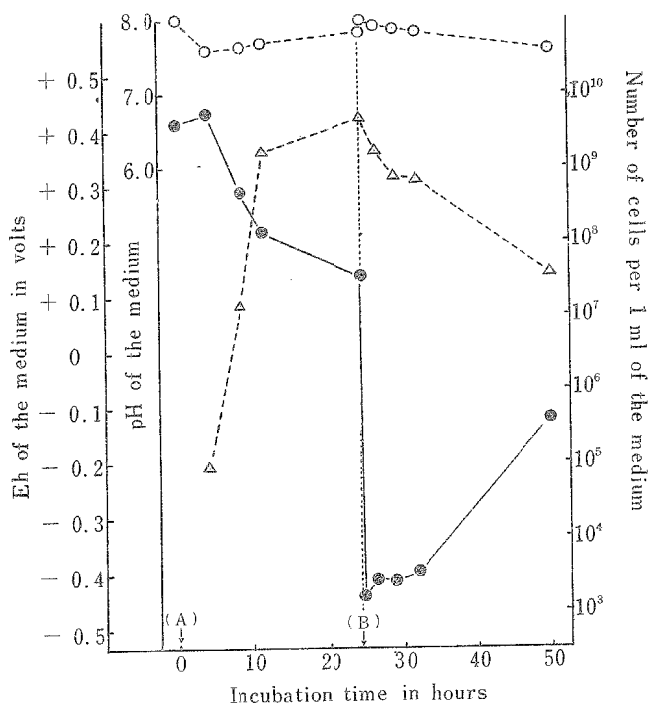


Fig. 7. Relation between the growth of aerobic bacteria (A5), the changes in Eh and pH of culture medium under the change of cultural condition from aerobic to anaerobic. The marks were the same as those employed in Fig. 4.

つぎに、A5株については培養条件のちがひによる差異が上より一層強く示された。すなわち空気の通気培養では(第7図)、急激な発育とEh降下が並行したが、L-ascorbic acid添加と水素通気によってEhが異常に低くなった後は生菌数ははげしく減少した。一方嫌気培養では(第9図)、発育は最初はなほだしく抑制されたが通気後はきわめて急激となり、これにともなってEhは急速に降下した。好氣的静置培養(第8図)では上の両者の中間の状態がみられた。

結局、上の実験から、これら2種の好気性細菌の培養では空気の通気によって発育がいちじるしく促進されるだけでなく、それにともなって酸化還元電位の降下もきわめて急激になることが明らかになった。このことは、酸化還元電位が酸素分圧自体の指標ではなく可逆的酸化還元系の平衡状態にもとづくものであることを思えば理解できる。また、同じく好気性細菌であっても、菌種によって酸化還元電位、ことに低い電位に対する態度がいちじるしく異なり、低い電位に対してはなほだ敏感であるものと、これによってほとんど損傷を受けないものがあることが示された。前者は発育初期においても、低い酸化還元電位による発育阻害がことに著しかった。これらの事実、いわゆる偏性的傾向と通性的傾向との差異を示すものであって、上の実験(3)における混合培養の結果をよくうら書きするものである。

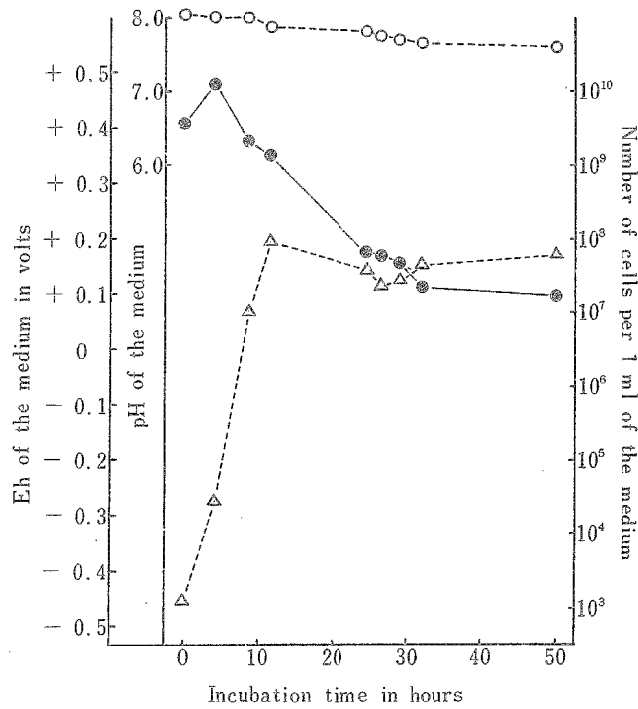


Fig. 8. Relation between the growth of aerobic bacteria (A5), the changes in Eh and pH of the culture medium under aerobic stationary cultivation. The marks were the same as those employed in Fig. 4.

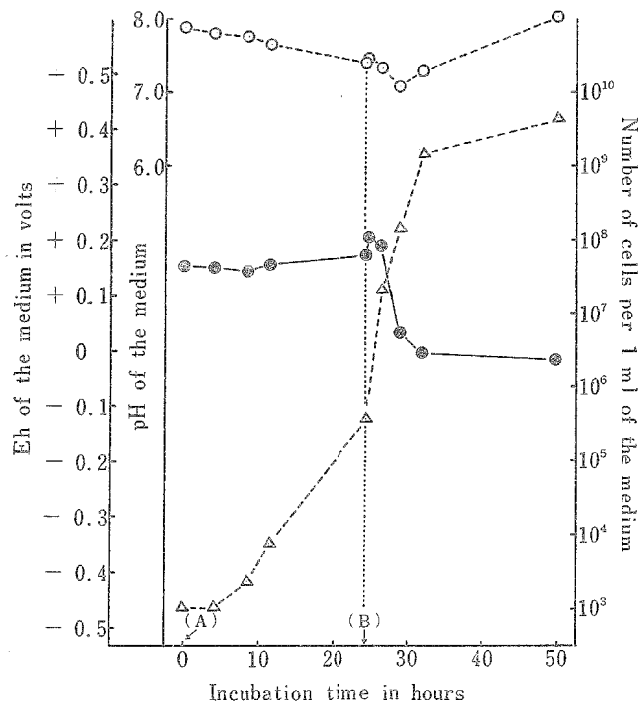


Fig. 9. Relation between the growth of aerobic bacteria (A5), the changes in Eh and pH of the culture medium under the change of cultural condition from anaerobic to aerobic. (A): anaerobic cultivation started; (B): aeration started. The other marks were the same as those employed in Fig. 4.

(5) 純粋培養ならびに好気性細菌との混合培養に対する通気の影響

硫酸塩還元細菌が天然において酸素（または空気）にさらされるか、あるいは高い酸化還元電位の環境下におかれたとき、その発育あるいは生存はどのような影響を受けるであろうか。既報¹⁾のとおり、この細菌は偏性嫌気性細菌であるから最初から高い酸化還元電位の下では全く発育を開始できないが、若しある程度発育が進行した後または最大発育をとげた後に、酸素にふれるかあるいは高い酸化還元電位の環境下におかれた場合、その後の発育ないしは生存はどのような影響を受けるであろうか。この点を明らかにするための基礎実験として、先ず対数発育期にある硫酸塩還元細菌の培養に空気を通じてその影響をみた。

第1表の培地に硫酸塩還元細菌を純粋培養し、またはこれから L-ascorbic acid を除いた培地に好気性細菌 A1 株と混合培養して、対数発育期の中ごろからはげしく空気を通気した。その結果は第10～13 図に示すとおりである。すなわち純粋培養においては第10, 11 図に示すように空気の通気によって Eh の急昇がみられたが、生菌数のいちじるしい減少はなく、かえってゆるやかな増殖が続いた。そして第10 図に示すように、短時間（3時間）通気した後 L-ascorbic acid 0.1 g/L を加えたとともに窒素ガスを約30分間はげしく通じて Eh を急に下げると、発育は一旦わずかに下降した後ふたたび対数発育を示した。空気通気中には生菌数が減少することなく通気をやめて Eh を下げた後にかえって死滅がみられたのは、おそらく空気

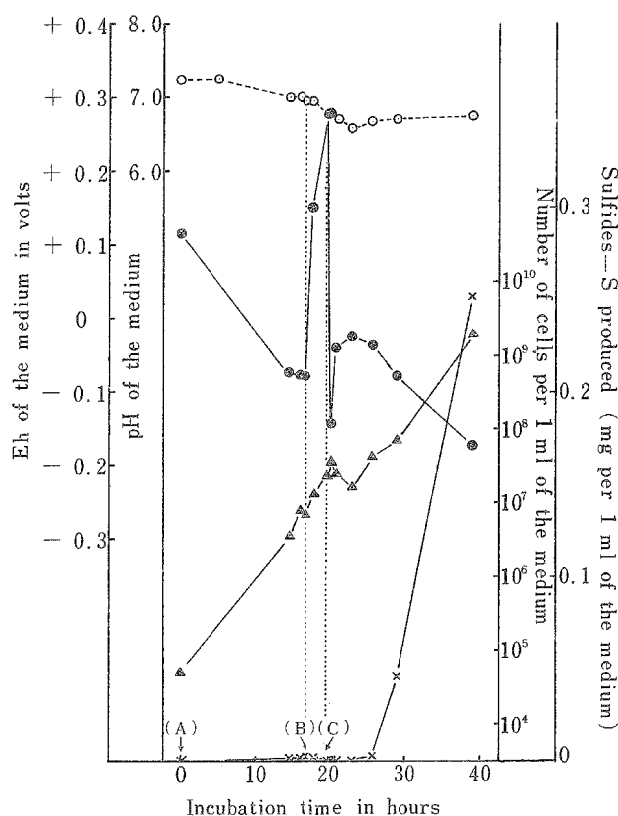


Fig. 10. Influence of aeration on the population of sulfate-reducing bacteria (SM1) during the growth in pure culture, the production of sulfides, the changes in Eh and pH of the culture medium. (A): anaerobic cultivation started; (B) aeration started; (C): aeration was stopped, L-ascorbic acid (0.1 g/L) was added, N_2 was bubbled for 20 min., and culture was placed into anaerobic jar. The other marks were the same as those employed in Fig. 1.

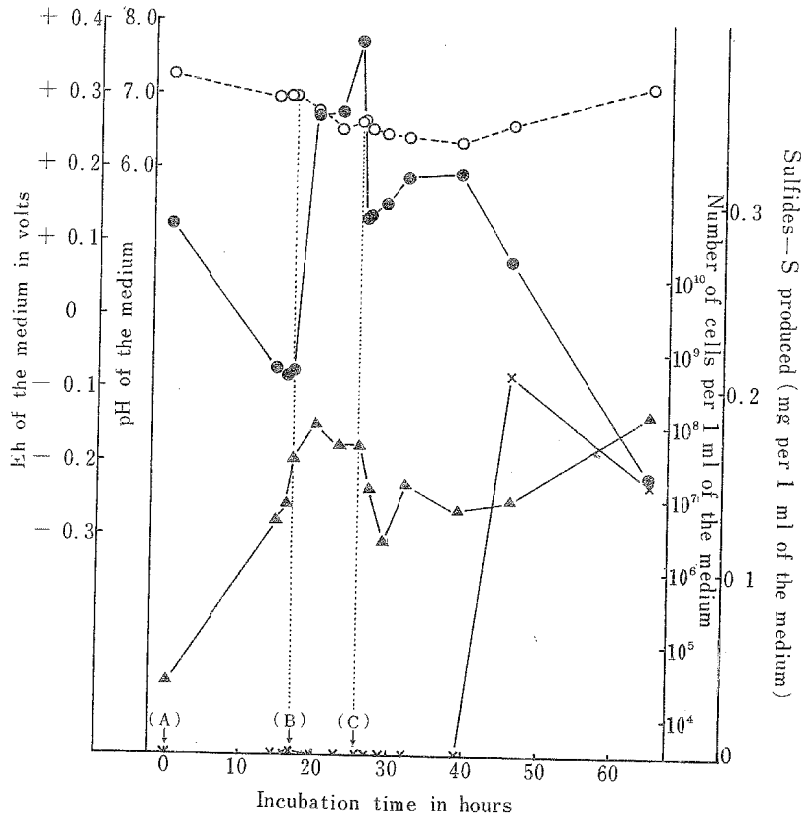


Fig. 11. Influence of aeration on the population of sulfate-reducing bacteria (SM1) during the growth in pure culture, the production of sulfides, the changes in Eh and pH of the culture medium. The marks were the same as those employed in Fig. 10.

通気の影響がおくられてあらわれたためではなかろうか。最初の対数発育にともなってわずかに生成された硫化物は空気通気によって全く消失したが、二次的対数発育にともなって顕著な硫化物の生成がみられた。また Eh は窒素通気後に自然酸化のため一旦上昇したが、発育と硫化物生成にともない再び降下した。一方、比較的長時間（9時間）空気を通気した場合には、第11図にみられるとおり通気中発育は停止して平衡状態となり、L-ascorbic acid の添加と窒素通気によって Eh を下げた後にかえって生菌数のかなりの減少がみられ、その後発育は徐々に回復したがその速度はゆるやかであって、再び二次的対数発育期はあらわれなかった。これに対して好気性細菌 A1 株との混合培養においては、第13図に示すとおり空気通気によって Eh はかなり上昇したが、純粋培養におけるような急激な上昇はみられなかった。これは図に示されるように、好気性細菌の発育（ならびに活動）が促進され、それが Eh のいちじるしい上昇をおさえたためと思われる。硫酸塩還元細菌は空気の通気中ほとんど発育を停止したが、生菌数のいちじるしい減少はおこらなかった。約9時間の空気通気を止めそのまま静置したところ、Eh は再びすみやかに下降しはじめ、硫酸塩還元細菌の発育も間もなく急にさかんとした。硫化物もこれにともなって顕著に生成された。また、第12図は比較のため硫酸塩還元細菌の静置培養の結果を示すものである。

結局以上の結果から、硫酸塩還元細菌の培養が対数発育期に空気を通気された場合、通気時間が短いときは通気がおわり Eh が下げられた後にふたたび lag phase を経ることなくすみやかに二次的対数発育が開始されるが、通気時間が長いときは発育の回復ははなはだ緩慢であることが明らかになった。そして好気性細菌と共存するときには、空気の通気によって好気性細菌の発育が促進される結果、Eh の急昇はおこら

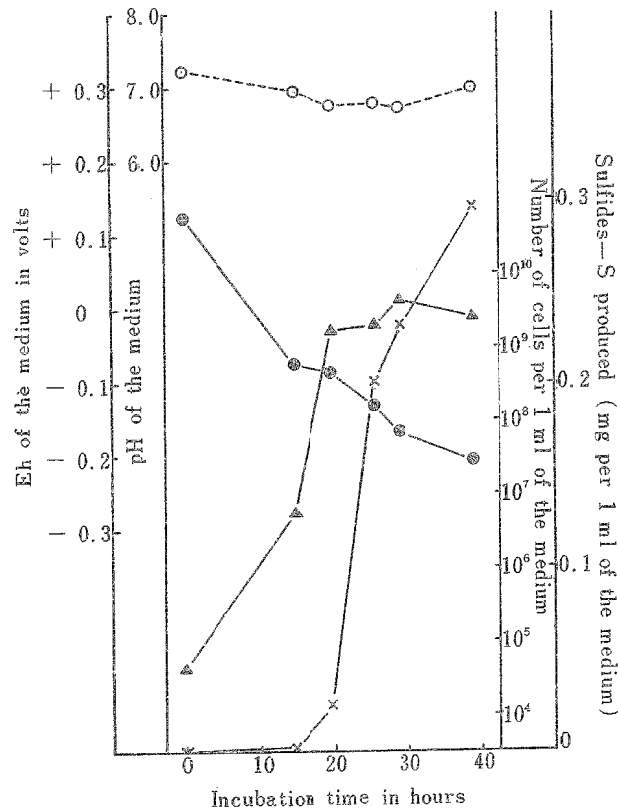


Fig. 12. Relation between the growth of sulfate-reducing bacteria (SM1) in pure culture, the production of sulfides, the changes in Eh and pH of culture medium under anaerobic stationary condition. The marks were the same as those employed in Fig. 10.

ず、長時間の通気によっても比較的その影響が小さかった。

以上は、一般に微生物の物理的、化学的の刺激に対する感受性が最も高いといわれる対数発育期に空気と接触した場合についての結果であるが、つぎにこの細菌の培養が最高発育をとげた後にいろいろの酸化還元条件におかれた場合、その生存はどのような影響を受けるかをみた。

すなわち、上の実験で39時間静置培養された純粋培養（第12図に示したもの）を、さらに嫌気培養瓶中に静置保温するか、そのままげしく空気を通気するか、あるいはこれに好気性細菌 A1 株を少量接種混合してのち空気を通気した。その結果を第14～16図に示す。

すなわち、嫌气的条件下では（第14図）、生菌数および硫化物量はともに徐々に減少したが約50時間後にもかなりの細菌が生残り硫化物も相当多量残された。Ehの上昇もはなはだゆるやかであった。純粋培養に空気を通気した場合には（第15図）、硫化物量はすみやかに減少し6時間後にはほとんど消失したが、生菌数の減少は比較的ゆるやかであって25時間後でも 4.9×10^6 /ml が残存した。しかし約50時間後には生菌は全くみ出されなかった。また Eh は最初から急速に上昇した。好気性細菌を少量混合して後空気を通気したときは（第16図）、最初から好気性細菌のきわめてさかんな発育がみられた。そして硫酸塩還元細菌数の減少、硫化物の消失、Ehの上昇ははじめの6時間ぐらいはかなり急激であったが、好気性細菌がさかんな発育を遂げた後はこれらの変動が極めてゆるやかとなり、ことに硫化物においてはわずかながら再び増加がみられた。しかし約50時間後においてはこれらの変化量はすべて大きくなった。

一方、前の実験において好気性細菌 A1 株と39時間混合培養したもの（第13図に示されたもの）を、

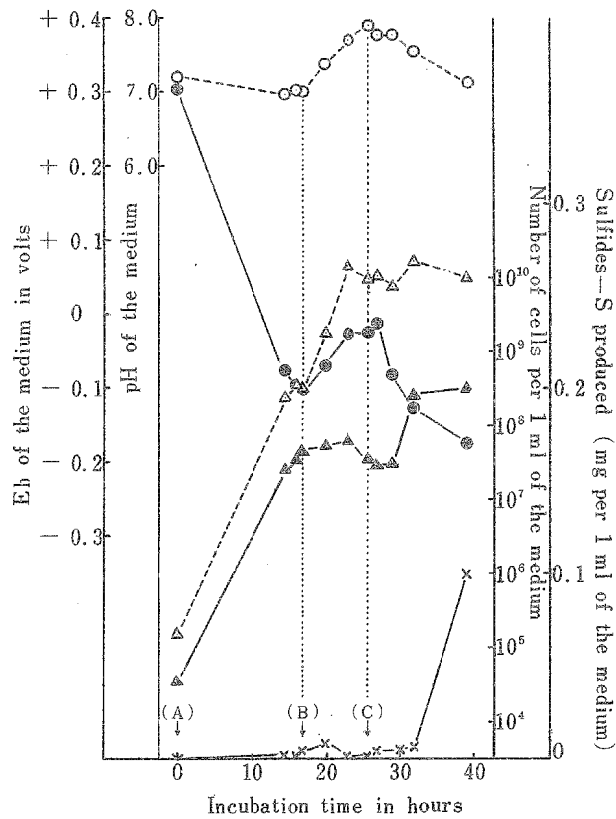


Fig. 13. Influence of aeration on the population of sulfate-reducing bacteria (SM₁) and aerobic bacteria (A₁) during the growth in mixed culture, the production of sulfides, the changes in Eh and pH of culture medium. ...△...: number of cells of aerobes (A₁). The other marks were the same as those employed in Fig. 10.

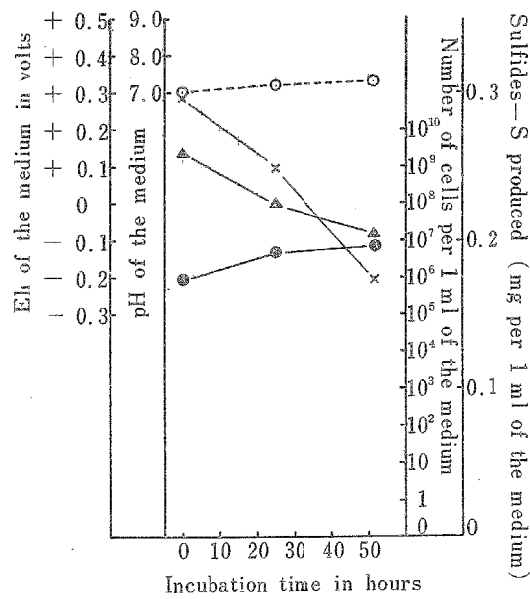


Fig. 14. Changes in population of sulfate-reducing bacteria (SM₁), amount of sulfides contained, Eh and pH of culture medium under anaerobic condition after the preincubation for 39 hrs. The marks were the same as those employed in Fig. 1.

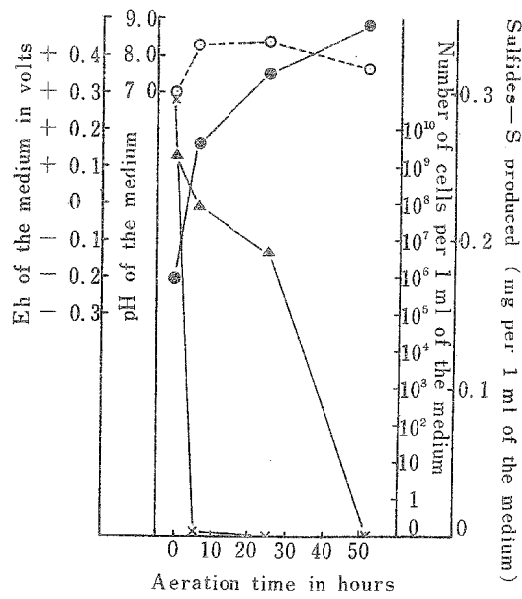


Fig. 15. Changes in population of sulfate-reducing bacteria (SM₁), amount of sulfides contained, Eh and pH of culture medium during aeration after the pre-incubation for 39 hrs. The marks were the same as those employed in Fig. 1.

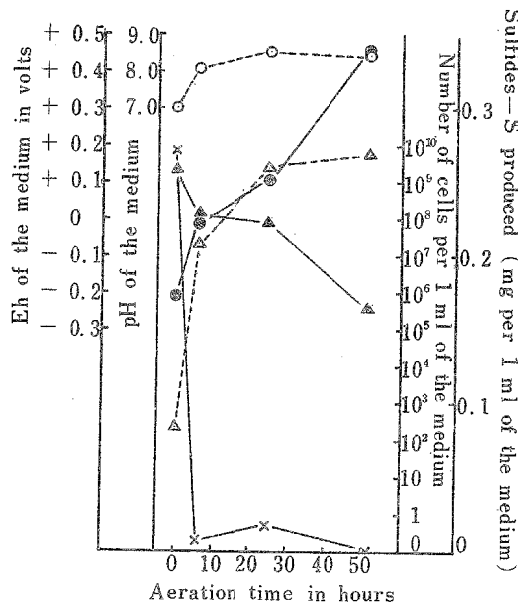


Fig. 16. Changes in population of sulfate-reducing bacteria (SM₁) and aerobic bacteria (A₁), amount of sulfides contained, Eh and pH of culture medium during aeration after inoculation with aerobes to pre-incubated 39 hrs' pure culture of sulfate reducers. ...△...: number of cells of aerobes. The other marks were the same as those employed in Fig. 1.

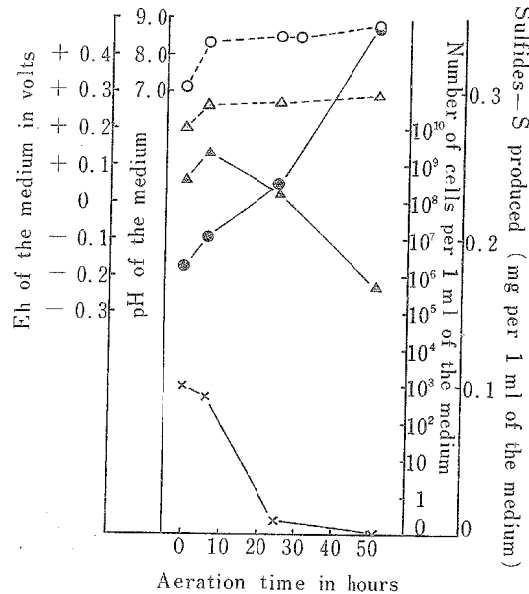


Fig. 17. Changes in population of sulfate-reducing bacteria (SM1) and aerobic bacteria (A1), amount of sulfides contained, Eh and pH of culture medium during aeration after the pre-incubation for 39 hrs. in mixed culture. The marks were the same as those employed in Fig. 16.

さらに空気を通気して保温した場合は第 17 図に示すとおりである。好気性細菌は通気によって再び増加を示し、硫酸塩還元細菌も一旦わずかに増加したがその後かなり速やかに減少した。硫化物の消失、Eh の上昇は、最初は比較的ゆるやかであったが、その後はかなり急激であった。

すなわち以上の結果、硫酸塩還元細菌の培養が最高発育を遂げた後に空気に接触した場合、硫化物の消失および Eh の上昇はかなり急激であるが、生菌は比較的長く生きることが明らかになった。そして好気性細菌と共存するときは、硫化物の減少、Eh の上昇および硫酸塩還元細菌数の減少はいちじるしく抑制されることが示された。

論 議

一般に細菌の発育に必要な Eh のレベルは前培養条件、接種量、培地の組成あるいは培養条件などによって大きな影響を受けるので、実験 (1) で得られた発育可能な Eh レベルの値を他の細菌について報告されたものと厳密に比較することはそれほど重要ではない。しかし嫌気性細菌についてなされたいくつかの報告と照らし合わせると、この硫酸塩還元細菌が発育に要求する Eh レベルの上限は比較的高いように見える。たとえば KLIIGLER・GUGGENHEIM⁷⁾が *Clostridium welchii* の発育は Eh 約 -0.125 volt 以下 (L-ascorbic acid 0.2 g/L 以上) でおけると報告し、また、STOLP⁸⁾が *Clostridium butyricum* は L-ascorbic acid 0.25 g/L 以上を含む培地で発育できることをみたのに対して、本報での結果はこの硫酸塩還元細菌が概して Eh +0.20 volt 以下 (L-ascorbic acid 0.05 g/L 以上) で発育を開始し得ることを示している。上の実験で大量接種のときには培地の初発 Eh が比較的高くても発育がはじまることを観察し、これは主として菌体のもつ還元作用力にもとづく現象ではないかと考えたが、このことと考えあわせて、この細菌の発育可能な Eh レベルの上限が比較的高いことはこの細菌の還元作用力がはなはだ強いことを示すものではなからうか。REED・ORR⁹⁾は多くの *clostridia* の発育と接種量との関係についてしらべ、還元

要因を含めぬ培地に十分の大量接種をおこなうと菌体の activity によって培地の Eh が (-0.2 volt 附近まで) 降下して発育がはじまるが、この限界接種量よりもわずかでも少ないときには Eh は一旦下がるがその程度が完全でないので発育できずに再び上昇するとし、Eh を下げ発育を開始させるのに必要な接種量はその細菌の、高い Eh に対する感受性と相関し菌種によって 1~1,000 倍の開きがあることを示した。はたして、発育がはじめられないときにも検知できる程度の Eh 降下が真におこるかどうか、あるいはかなりの程度にまで Eh がさがってもなお発育できない場合があるか否かは疑わしいが、この観察は上述の考察をささえるのに有力である。

HEWITT¹⁰⁾ も述べているように、細菌の培養に形成される酸化還元電位は真にどのような物質にもとづくものであるか、あるいは Eh 測定にあたって実際にどのような酸化還元系が測られているのかについてわれわれはまだ十分の知識をもっていない。しかし、培養における還元状態の発達、菌体による還元性物質の生成と菌体自身がおもつ還元作用力によることはおそらく疑いない。実験(2)で培養における Eh の分布をしらべた結果も低い電位の形成にはこの両者がともに関与しているらしいことがみられた。そして、FeS が大量に存在するところに特別な低電位の発達はみられず、菌体および FeS を遠心除去した上澄液中にも十分低い電位が存在したことから、溶存物質中に低電位の主要な担い手があるように思われる。しかし、実験(3)および(5)における電位-発育-硫化物の関係図からみて、少なくとも最初の急激な電位降下は主として細菌の還元作用力に帰せられ、その後生成される H₂S あるいは FeS はこの降下をさらに助長するとともに、一旦つくられた低電位の維持に重大な役割を果しているとみるのが妥当ではなかろうか。

低電位の維持に対するこれら物質の効果は、つぎの実験でしらべられた。すなわち、第1表の組成から Fe⁺ 塩を除いた培地に硫酸塩還元細菌を 48 時間培養し、これをそのまま、あるいはこれに Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 1.0 g/l を加えた後、空気または窒素を通気して Eh、硫化物および生菌数の変動をしらべた。その結果第 18~20 図に示すように、空気の通気とともに硫化物の急速な減少と Eh の上昇とが

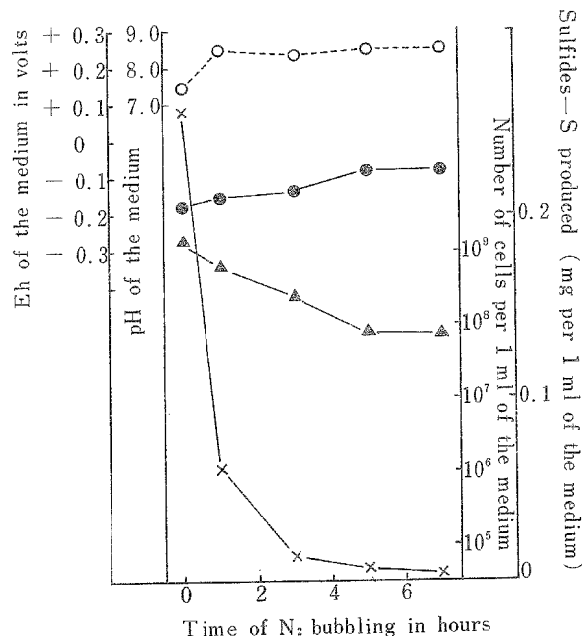


Fig. 18. Changes in population of sulfate-reducing bacteria (SM₁), amount of sulfides contained, Eh and pH of culture medium under bubbling N₂ after pre-incubation on Fe⁺ deficient medium for 48 hrs. The marks were the same as those employed in Fig. 1.

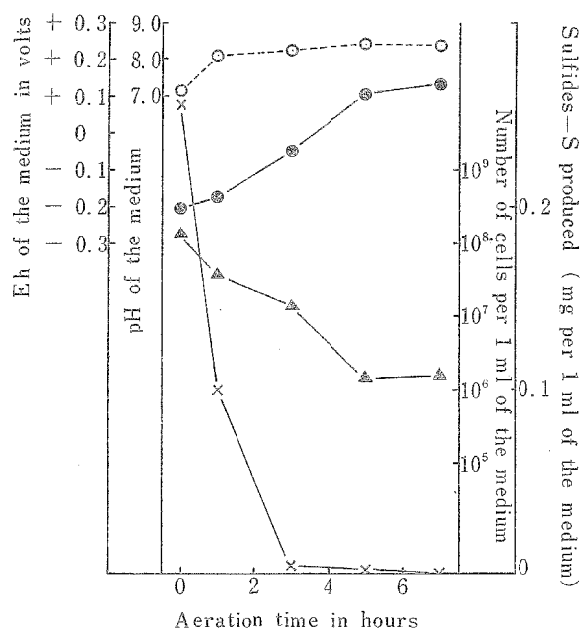


Fig. 19. Changes in population of sulfate-reducing bacteria (SM1), amount of sulfides contained, Eh and pH of culture medium during aeration after pre-incubation on Fe⁺⁺ deficient medium for 48 hrs. The marks were the same as those employed in Fig. 1.

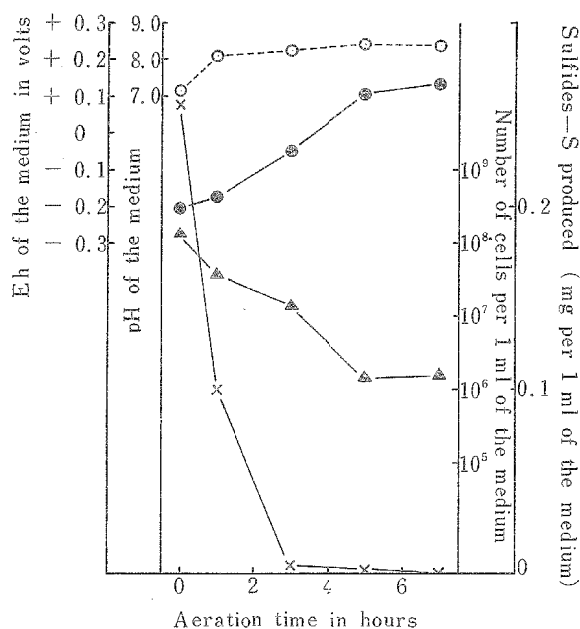


Fig. 20. Changes in population of sulfate-reducing bacteria (SM1), amount of sulfides contained, Eh and pH of culture medium during aeration after Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O (1.0 g/L) was added to pre-incubated 48 hrs' culture on Fe⁺⁺ deficient medium. The marks were the same as those employed in Fig. 1.

みられたが、硫化物の存在する間は概して Eh の急昇はおこらず、これが消失した後すみやかに上昇することが示された。Fe[#] を加えた培地 (第 20 図) における方がこれを加えなかった培地 (第 19 図) でよりも硫化物の消失はかなりおそく、Eh の上昇もこれに応じていく分おくれた。そして窒素通気 (第 18 図) においてさえも、通気にとまなう硫化物の逸散に応じて Eh の上昇がみられた。これらのことは低い電位の形成、維持に硫化物が重大な役割を果していることを想像させる。硫化物の消失が Fe[#] を加えた培地でおくれたのは、遊離 H₂S が不溶性 FeS となったため通気にとまなう逸散と酸化がおそかったからであろう。また硫酸塩還元細菌数はいずれの場合にも (窒素通気においてさえ) 通気にとまない漸次減少したが、Fe[#] が加えられたものでは硫化物消失後にも減少の程度がかなりゆるやかであった。Fe[#] による保護作用を示すものかも知れない。窒素通気の場合に生菌減少の程度が小さかったのは当然であろう。結局以上の結果から、Eh の形成維持に対して硫化物は重大な役割をもっており、Fe[#] の存在は不溶性 FeS をつくることによって硫化物の逸散、酸化を防ぐため、このはたらきを一層助長するものと考えられる。

実験 (3) において、初発 Eh が硫酸塩還元細菌の発育可能レベルより高い場合には、共存好気性細菌の発育にとまなう低電位の形成によってこの細菌の発育が開始されることがみられたが、この共存好気性細菌による低電位の形成は、実験 (4) の結果からわかるように発育ときわめて密接に関連し、空気通気によってかえって Eh の降下が促進された。すなわち、細菌の培養における電位の高さは酸素の多少と直接には相関せず、常に変化の状態にある酸化還元系の動的平衡の一断面を反映するものであるという多くの人の説を支持するものである。これら好気性細菌の発育によって到達される Eh の最低値は、硫酸塩還元細菌によるものよりもかなり高かったが、培養に形成される電位の値は培地の組成によって大きく支配されるから、この値にもとづいて両者の還元作用力を比較することは妥当ではない。すなわち、好気性細菌と嫌気性細菌とを区別する特徴は、発育によって到達される最低電位の高さのちがいにあつたのではなく、発育可能な初発 Eh のレベルの相違にある。しかし、少なくともこの硫酸塩還元細菌の場合には、大量に生成される硫化物が上述のように Eh 降下一層助長することが考えられる。

発育中の硫酸塩還元細菌に対する通気の影響は、一般に外部からの刺激に最も敏感といわれる対数発育期においてすら割合決定的ではなく、また最高発育後の通気による生菌数の減少も比較的ゆるやかであつて、この細菌の生存は酸素あるいは高い Eh に対してかなり大きく抵抗することを示している。好気性細菌と共存するときには、発育期にも死滅期にも通気による影響はいちじるしく緩和され、生菌数の減少、硫化物の消失および Eh の上昇はともにはなはだしく抑えられた。これらのことは、天然におけるこの細菌の生態を考察する上にきわめて重大である。

摘 要

海洋性硫酸塩還元細菌の発育ならびに activity と培地の酸化還元電位との関係を、純粋培養ならびに好気性細菌との混合培養についてしらべ、つぎの結果を得た。

1. この細菌の発育可能な Eh レベルの上限は約 +0.20 volt であつた。大量接種のときには Eh レベルがかなり高くても発育できたが、おそらく菌体自身のもつ還元作用力によるものであろう。
2. 好気性細菌と共存するときには、これの発育にとまなう低電位の形成のため、初発 Eh がきわめて高くても硫酸塩還元細菌の発育がおこつた。
3. 培養における Eh の分布状態および Eh 一発育一硫化物の関係から、この細菌の培養における還元状態の発達は先ず発育にとまなう菌体の還元作用力によるが、生成された硫化物がこれの助長と維持に重大な役割をもち、さらに Fe[#] は硫化物の消失をおさえるため一層この傾向を強めることが示された。
4. 好気性細菌の発育は空気の通気によって促進され、これと密接に並行して Eh の降下も急激となつた。
5. 発育期または死滅期にある硫酸塩還元細菌の培養に空気を通気した場合、Eh の上昇と硫化物の消失が

急速であったのにくらべて生菌の発育，生存には比較的影響が少なかった。ことに好気性細菌と共存するときには，通気によってこの発育と活動が促進されるため，その影響ははなはだしく抑制された。

おわりに，本研究をご指導いただいた京都大学農学部木俣正夫教授，ご指導ならびに本報のご校閲をいただいた同大学食糧科学研究所門田 元教授に厚くお礼申し上げます。また，実験の遂行その他をご援助いただいた井上美恵子嬢に深謝する。

文 献

- 1) 畑 幸彦・三好英夫・門田 元・木俣正夫，1959：本報告，**8**，135—145.
- 2) 畑 幸彦，1960：本報告，**9**，329—345.
- 3) ZOBELL C. E. and C. B. FELTHAM, 1934 : *Bull. Scripps Inst. Oceano., Tech. Ser.*, **3**, 279—296.
- 4) 富山哲夫・神崎嘉瑞夫，1951：日水会誌，**17**，115—121.
- 5) ST. LORANT I., 1929 : *Z. Physiol. Chem.*, **185**, 245.
田宮 信雄，1958：化学の領域，増刊34，pp. 1—2.
- 6) 畑 幸彦，1960：本報告，**9**，363—375.
- 7) KLIGLER I. J. and K. GUGGENHEIM, 1937 : *J. Bact.*, **35**, 141—156.
- 8) STCLP H., 1955 : *Archiv Mikrobiol.*, **21**, 293—309.
- 9) REED G. B. and J. H. ORR, 1943 : *J. Bact.*, **45**, 309—320.
- 10) HEWITT L. F., 1950 : "Oxidation Reductor Potentials in Bacteriology and Biochemistry"
6th ed., E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh, England.