

海洋性硫酸塩還元細菌に対する 食塩濃度の影響*

畑 幸 彦

Response of Marine Sulfate-Reducing Bacteria to
the Salinity of Culture Medium*

By

Yoshihiko HATA

In the previous paper, it has been shown that the distribution of sulfate-reducing bacteria in the bottom sediments in the estuary was influenced by the chlorinity of the bottom water; the population of sulfate reducers enumerated by sea water medium was abundant in marine and brackish environments but scanty in fresh water zone, and number of sulfate reducers counted by fresh water medium was abundant in fresh water and brackish regions but few in sea water zone.

The present paper is concerned with the response to the salinity of culture media, of the sulfate-reducing bacteria isolated by use of sea water medium from various marine and the estuarine mud or water samples.

The influences of NaCl concentration or salinity on the growth and the sulfate-reducing activity of these bacteria were examined by use of the basal medium having the composition as has been shown in Table 1. The results obtained are given in Tables 2—7 and Figs. 1—3, and may be summarized as follows:

- 1) Most of the strains of sulfate reducers isolated could grow within NaCl concentrations of 1.0—6.5 %, and few of them could develop on the media containing NaCl in lower as well as higher concentration than the above mentioned. (Tables 2—4)
- 2) The optimum NaCl concentration the growth and the sulfide production by these bacteria was about 2.0—3.0 %. (Tables 5—7 and Figs. 1—3)

These results suggest that these strains are typical marine organisms.

The tolerance and the adaptation of these bacteria to extreme salinity are shown in Figs. 4—12, and may be summarized as follows:

- 1) In the normal population of these cultures, a small number of cells could grow on

* 水産講習所研究業績 第303号, 1960年2月11日 受理.
Contribution from the Shimane-seki College of Fisheries, No.303.
Received Feb. 11, 1960.

the media containing NaCl in lower or higher than the range which was shown in Table 2. (Figs. 4—6)

- 2) In the cultures which were preliminarily adapted to the media having extreme salinity, the proportions of the cells capable of growing beyond the above mentioned range of NaCl concentrations were somewhat increased. (Figs. 7—12)

These facts suggest that these bacteria could adapt, to some extent, to extremely low or high salinity.

The tolerance of these organisms to washing by the solutions of different osmotic pressure and suspending in these solutions are as shown in Fig. 13. These data show that when these bacteria were treated in short time with the extremely hypotonic or hypertonic solutions, a large number of the cells were injured but some of them survived.

既報¹⁾のように、河口水域の底土中における硫酸塩還元細菌の分布状態は、海水培地* を用いた場合には純淡水域にはきわめて少ないが汽水域および海水域にはほぼ一様に多数見出され、淡水培地** を用いた場合には海水域にははなはだ少ないが汽水域および純淡水域にはほぼ同程度に多数見出された。このことから、このような水域には海洋性および淡水性の2群の硫酸塩還元細菌が存在しており、それぞれの分布が環境の塩分濃度によって支配されていると考えた。

本報では、各地の主として沿岸海域および汽水域から海水培地を用いて分離された硫酸塩還元細菌の、発育に必要な食塩濃度の範囲、およびそれらの発育ならびに硫化物生成作用におよぼす食塩濃度の影響を明らかにし、さらにこれらの細菌の低食塩濃度または高食塩濃度に対する適応性あるいは抵抗性について検討した。

実 験

(1) いろいろの水域から海水培地で分離された硫酸塩還元細菌の、発育に必要な塩分濃度

さきに²⁾、舞鶴湾の底土から分離された硫酸塩還元細菌の1株について硫化物生成におよぼす塩分濃度の影響を明らかにしたが、今回はさらに舞鶴湾、広島湾、三田尻湾および下関地方沿岸における海水域および汽水域の底土または水から、海水培地を用いて分離された硫酸塩還元細菌の、発育に必要な食塩濃度の範囲を検討した。実験方法はつぎのとおりである。

海水調製の液体培地(本頁脚註の海水培地から Agar を除く)に 30°C で2日間前培養された硫酸塩還元細菌の純粋培養を、第1表の組成の基礎培地*** にいろいろの濃度の食塩を加えた被検培地に少量ずつ接種して 30°C で2週間培養し、黒色硫化物の生成および液の混濁によって発育の有無をみた。接種にあたっては前培養からの塩類の導入を避けるため、培養を2,500 r. p. m. 10分で遠心集菌し、滅菌された1.1 M ブ

* Ca-lactate 3.5 g, Beef extract 1.0 g, Peptone 2.0 g, L-Ascorbic acid 0.1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, K₂HPO₄ 0.2g, FeSO₄ · 7H₂O 0.2g, Agar 3.0 g, Filtered sea water 1,000 ml, pH 7.5.

** Ca-lactate 3.5 g, Beef extract 1.0 g, Peptone 2.0 g, L-Ascorbic acid 0.1 g, Na₂SO₄ 1.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.2 g, Agar 3.0 g, Tap water 1,000 ml, pH 7.5.

*** この組成は後報³⁾のように、Na⁺ および Cl⁻ 以外はこの種の細菌の発育に必要にして十分な種類と量のイオンを含んでいる。

Table 1. Basal medium employed for experiments on the NaCl requirement.

Ca-lactate	3.5 g
Peptone	2.0
L-Ascorbic acid	0.1
K ₂ HPO ₄	0.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
Distilled water	1,000 ml
pH	7.5

ドウ糖溶液（海水とほぼ等張）に再懸濁し、さらに同じ溶液で 100 倍にうすめ、この液 1 滴を 10 ml の被検培地に接種した。得られた結果は第 2 表に示す通りである。

Table 2. Growth of sulfate-reducing bacteria on the media containing NaCl in various concentrations.

Strain number	Isolated from:	Concentration of NaCl (%)																			
		0	0.25	0.5	0.75	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	
S M 1	Coastal marine sediment, Maizuru Bay	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S M 2	"	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
S M 3	"	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
S M 4	"	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S M 5	Coastal sea water, Maizuru Bay	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
S M 6	Brackish water, Takano River, Maizuru	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S M 8	Coastal marine sediment, Maizuru Bay	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
S M 9	"	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-
S M 10	"	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S M 11	Sediment on estuarine environments, Takano River, Maizuru	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S M 20	Coastal marine sediment, Maizuru Bay	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S M 21	"	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S M 23	Coastal sea water, Maizuru Bay	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
S M 24	"	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S M 30	Coastal marine sediment, Shimonoseki	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	-
S M 31	"	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
S M 32	"	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
S M 33	"	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
S M 34	"	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S M 41-1	Sediment on estuarine environments, Nagata River, Shimonoseki	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

S M41-2	//	- ± + -
S M42	//	- - + - -
S M43	//	- - ± + - - -
S M45	//	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - -
S M46	Coastal marine mud, Shimonoseki	- - - ± + + + + + + + + + + + + + + + + + + - - - -
S M47	//	- - + ± -
S M48	Coastal marine sediment, Shimonoseki	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - -
S M49	//	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + - - - - -
S M410	Coastal marine mud, Shimonoseki	- - - - + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - - -
S M51	Coastal marine sediment, Mitajiri Bay	- - + - -
S M52-1	//	- - ± + + + + + + + + + + + + + + + + + + - - - - -
S M52-2	//	- - ± + + + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - -
S M53-1	//	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + - - - - -
S M53-2	//	- - - - - ± + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - - -
S M54	//	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - - -
S M55-1	//	- - ± + + + + + + + + + + + + + + + + + + + - - - -
S M55-2	//	- - - + + + + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - -
S M56	//	- - ± + + + + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - -
S M57	//	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - - -
S M58	//	- - - + + + + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - -
S M59	//	- - - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + - - - - -
S M510	//	- ± + ± - -
S M511	//	- - - - + + + + + + + + + + + + + + + + + + + - - -
S M512-1	//	- - - - + + + + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - -
S M512-2	//	- - - - + + + + + + + + + + + + + + + + + + + - - - - -
S M513	//	- - - ± + + + + + + + + + + + + + + + + + + - - - - -
S M514	//	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - - -
S M515-1	//	- - - - + + + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - - -
S M515-2	//	- - - - + + + + + + + + + + + + + + + + + + ± - - - - -
S H 1	Coastal marine sediment, Hiroshima Bay	- + ± -
S K 1	Offshore marine mud, Maizuru	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + - - - - -
S K 2	Offshore sea water, Maizuru	- - - - - + + + + + + + + + + + + + + + + - - - - -

すなわち、発育可能な食塩濃度範囲は菌株によってかなり異なり、SH 1（食塩0.25~7.5%）のように比較的広範囲にわたって発育できるもの、SM 8（食塩1.5~5.5%）のように比較的狭い範囲で発育するもの、およびSM 1（食塩0.5~7.0%）のように発育可能範囲がこれらの中間にあるものなどいろいろの程度の要求がみられた。これらの結果を集約すると第3表のとおりとなる。

すなわち、SH 1のような比較的広塩性株は総分離菌株の9.6%を占めてもっとも少なく、SM 8のような比較的狭塩性株は26.9%にあたり、残り63.5%はそれらの中間性を示した。そして、これら発育可能濃度範囲の広狭と、その棲息環境が海水域であったか汽水域であったかとの間には、なんら関連性がみられ

Table 3. Growth of sulfate-reducing bacteria on the media of various NaCl concentrations.

Concentration ranges of NaCl (%)	Strains developed	
	Number	%
From 0.25 to 7.5	5	9.6
From 0.5—1.0 to 6.0—7.0	33	63.5
From 1.5—2.0 to 5.5—6.0	14	26.9

なかった。

以上は食塩濃度についておこなった発育可能域の結果であるが、これは、食塩を加える代わりにいろいろの程度に稀釈した海水で培地を調製して上と同様の方法で実験した第4表の結果とよく一致したから、上の結

Table 4. Growth of sulfate-reducing bacteria on the media containing sea water* in different strength.

Strain number	Strength of sea water** (%)								
	5	10	15	20	25	30	35	40	50
S M 1	—	—	—	±	+	+	+	+	+
S M 5	—	—	—	—	+	+	+	+	+
S M 8	—	—	—	—	—	—	—	—	+
S M 21	—	—	—	—	—	—	±	+	+
S M 33	—	—	—	—	—	+	+	+	+
S H 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S K 1	—	—	—	—	—	—	—	—	+

* This was added in stead of distilled water contained in the basal medium.

** Salinity of original sea water was 32.4 g total salt per kg.

果は食塩濃度のみならず一般に塩分の要求性を十分反映しているものと考えられる。それ故、以下の実験では論議を簡単にするため食塩濃度のみについておこなうことにした。

(2) 海洋性硫酸塩還元細菌の発育速度および硫化物生成作用におよぼす食塩濃度の影響

(1) の結果、海洋性硫酸塩還元細菌の発育可能な食塩濃度の範囲が明らかになったが、つぎにこれらの細菌の発育速度ならびに硫化物生成作用が食塩濃度によってどのような影響を受けるかを検討した。

すなわち、第1表の組成の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の代りに $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L* を含む基礎培地にいろいろの濃度の食塩を加え、これらに上の結果それぞれ塩分要求範囲を異にすることが判った S H 1, S M 1 および S M 8 の純粋培養を少量接種し滅菌流動パラフィンを重ねて 30°C に保ち、細菌数ならびに硫化物蓄積量を経時的に測定した。細菌数の測定は semi-solid 海水培地 (330 頁脚註参照) を用いて extinction dilution method により、硫化物の定量は富山・神崎の方法⁵⁾ によった。なお、これら菌株の相対的な発育速度ならびに硫酸塩還元速度の概略を比較するため、海水調製液体培地で 30°C 2 日間ずつ 3 回

* 後報⁴⁾ のように、この細菌は $\text{Fe}^{\#}$ を発育に必須とし、ある範囲内ではこの量の多いほど発育速度は大きく、また生産された硫化物が安定である。そこでこの実験では、 FeSO_4 よりも一般に安定と考えられる $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ を用い、またその量を増すことにした。

Table 5. Growth of strain SH 1 and the production of sulfides at 30°C in the media having different salinity.

Concentration of NaCl (%)	Incubation time (hrs.)					
	20		41.5		65.5	
	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
0	10 ² —10 ³	0	10 ² —10 ³	0	1—10	0
0.25	10 ² —10 ³	0	10 ² —10 ³	0	10—10 ²	0
0.5	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ³ —10 ⁴	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.027
1.0	10 ⁵ —10 ⁶	trace*	10 ⁶ —10 ⁷	0.029	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.162
1.5	10 ⁶ —10 ⁷	trace	10 ⁷ —10 ⁸	0.039	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.197
2.0	10 ⁶ —10 ⁷	trace	10 ⁷ —10 ⁸	0.044	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.241
2.5	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁷ —10 ⁸	0.029	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.210
3.0	10 ³ —10 ⁴	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.021	10 ⁸ —10 ⁹	0.154
3.5	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁵ —10 ⁶	0.025	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.115
4.0	10 ³ —10 ⁴	0	10 ⁵ —10 ⁶	0.008	10 ⁸ —10 ⁹	0.069
4.5	—	0	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁷ —10 ⁸	0.038
5.0	—	0	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.015
5.5	—	0	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁵ —10 ⁶	0.010
6.0	10 ³ —10 ⁴	0	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁶ —10 ⁷	trace
6.5	—	0	10 ³ —10 ⁴	0	—	0
7.0	—	0	10 ² —10 ³	0	10 ² —10 ³	0
7.5	—	0	10 ² —10 ³	0	—	0
8.0	10 ³ —10 ⁴	0	10 ² —10 ³	0	1—10	0

Incubation time (hrs.)					
89.5		141		237	
Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
—	0	0	0	—	0
—	0	1—10	0	—	0
10 ⁶ —10 ⁷	0.023	10 ⁶ —10 ⁷	0.025	10 ⁵ —10 ⁶	trace
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.202	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.163	—	—
10 ⁸ —10 ⁹	0.205	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.137	—	—
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.212	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.177	10 ⁴ —10 ⁵	0.031
10 ³ —10 ¹⁰	0.222	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.151	—	—
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.217	10 ⁸ —10 ⁹	0.154	10 ⁵ —10 ⁶	0.057
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.211	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.182	—	—
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.172	10 ⁸ —10 ⁹	0.215	—	—
10 ⁸ —10 ⁹	0.143	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.203	—	—
10 ⁷ —10 ⁸	0.068	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.210	—	—
10 ⁷ —10 ⁸	0.019	10 ⁸ —10 ⁹	0.207	—	—
10 ⁶ —10 ⁷	0.017	10 ⁷ —10 ⁸	0.124	—	—
10 ⁶ —10 ⁷	0.004	10 ⁷ —10 ⁸	0.073	—	—
—	0	10 ⁵ —10 ⁶	0.012	10 ⁵ —10 ⁶	0.035
—	0	10 ⁵ —10 ⁶	0.005	10 ⁵ —10 ⁶	0.029
—	0	1—10	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.011

* trace: less than 0.001 mg/ml.

Table 5. Growth of strain S M 1 and the production of sulfides at 30°C in the media having different salinity.

Concentration of NaCl (%)	Incubation time (hrs.)					
	20		37		62.5	
	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
0	10 ² -10 ³	0	1-10	0	—	0
0.5	10 ³ -10 ⁴	0	10 ³ -10 ⁴	0	—	0
1.0	10 ³ -10 ⁴	0	10 ⁶ -10 ⁷	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.118
1.5	10 ⁶ -10 ⁷	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.102	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.209
2.0	10 ⁸ -10 ⁹	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.148	10 ⁸ -10 ⁹	0.231
2.5	10 ⁸ -10 ⁹	trace	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.204	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.254
3.0	10 ⁸ -10 ⁹	trace	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.211	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.262
3.5	10 ⁸ -10 ⁹	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.192	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.252
4.0	10 ⁷ -10 ⁸	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.156	10 ⁸ -10 ⁹	0.242
4.5	10 ⁵ -10 ⁶	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.062	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.241
5.0	10 ⁵ -10 ⁶	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.016	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.246
5.5	10 ⁵ -10 ⁶	0	10 ⁷ -10 ⁸	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.046
6.0	10 ⁴ -10 ⁵	0	10 ⁶ -10 ⁷	0	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.016
6.5	10 ⁴ -10 ⁵	0	10 ⁴ -10 ⁵	0	10 ⁷ -10 ⁸	trace
7.0	10 ⁴ -10 ⁵	0	10 ⁴ -10 ⁵	0	10 ⁵ -10 ⁶	0
7.5	10 ⁴ -10 ⁵	0	10 ³ -10 ⁴	0	—	0
8.0	10 ³ -10 ⁴	0	10 ³ -10 ⁴	0	—	0

Incubation time (hrs.)							
110.5		138.0		159.5		211	
Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
0	0	—	—	—	—	0	0
—	0	—	—	—	—	0	0
10 ⁹ -10 ¹⁰	0.222	—	—	—	—	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.124
—	0.189	—	—	—	—	—	—
—	0.204	—	—	—	—	—	—
—	0.174	—	—	—	—	—	—
10 ⁹ -10 ¹⁰	0.202	—	—	—	—	10 ⁸ -10 ⁹	0.109
—	0.184	—	—	—	—	—	—
—	0.201	—	—	—	—	—	—
—	0.206	—	—	—	—	—	—
—	0.177	—	—	—	—	—	—
—	0.204	—	—	—	—	—	—
10 ⁸ -10 ⁹	0.222	—	—	—	—	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.186
10 ⁷ -10 ⁸	0.037	10 ⁷ -10 ⁸	0.055	—	0.067	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.110
10 ⁷ -10 ⁸	trace	10 ⁷ -10 ⁸	0.017	10 ⁸ -10 ⁹	0.024	10 ⁸ -10 ⁹	0.045
—	0	—	—	10 ¹ -10 ²	0	1-10	0
10 ³ -10 ⁴	0	—	—	—	—	1-10	0

Table 7. Growth of strain S M 8 and the production of sulfides at 30°C in the media having different salinity.

Concentration of NaCl (%)	Incubation time (hrs.)							
	45		69		94		145	
	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
0	10 ² -10 ³	0	10 ¹ -10 ²	0	—	0	0	0
0.5	—	0	10 ¹ -10 ²	0	—	0	—	0
1.0	10 ³ -10 ⁴	0	10 ³ -10 ⁴	0	—	0	0	0
1.5	10 ⁷ -10 ⁸	0.009	10 ⁷ -10 ⁸	0.035	10 ⁸ -10 ⁹	0.066	10 ⁷ -10 ⁸	0.072
2.0	10 ⁶ -10 ⁷	0.017	10 ⁷ -10 ⁸	0.041	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.109	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.174
2.5	10 ⁷ -10 ⁸	0.023	10 ⁷ -10 ⁸	0.038	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.176	10 ⁸ -10 ⁹	0.129
3.0	10 ⁷ -10 ⁸	0.029	10 ⁸ -10 ⁹	0.045	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.159	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.144
3.5	10 ⁶ -10 ⁷	0.018	10 ⁷ -10 ⁸	0.031	10 ⁸ -10 ⁹	0.043	10 ⁹ -10 ¹⁰	0.135
4.0	10 ⁶ -10 ⁷	0.005	10 ⁷ -10 ⁸	0.021	10 ⁷ -10 ⁸	0.026	10 ⁸ -10 ⁹	0.107
4.5	10 ⁶ -10 ⁷	trace	10 ⁵ -10 ⁶	0.017	10 ⁷ -10 ⁸	0.037	10 ⁷ -10 ⁸	0.068
5.0	10 ³ -10 ⁴	0	10 ³ -10 ⁴	0	—	0	10 ¹ -10 ²	0
5.5	—	0	—	0	—	0	—	0
6.0	10 ³ -10 ⁴	0	10 ³ -10 ⁴	0	—	0	10 ¹ -10 ²	0
6.5	—	0	—	0	—	0	—	0
7.0	10 ² -10 ³	0	10 ³ -10 ⁴	0	—	0	0	0
7.5	—	0	—	0	—	0	—	0
8.0	10 ³ -10 ⁴	0	10 ² -10 ³	0	—	0	0	0

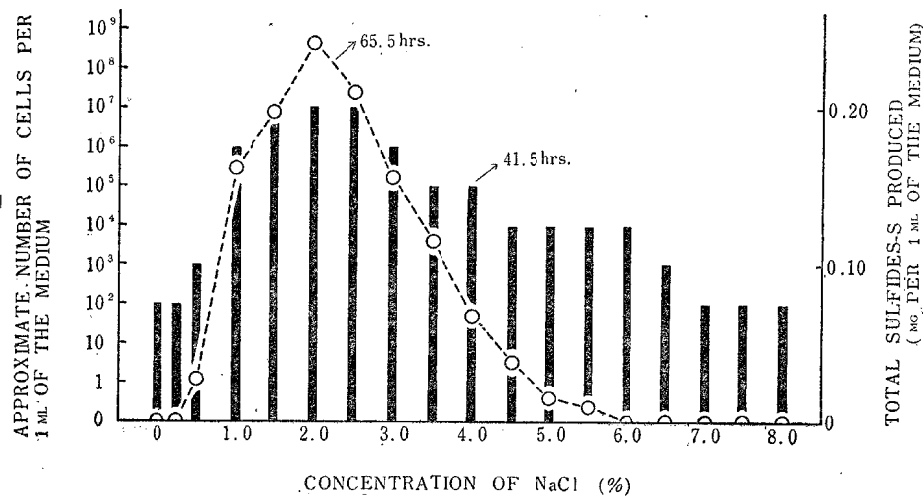


Fig. 1. Effect of NaCl concentration on the growth and sulfide production by strain SH1 at 30°C. —■— : cells ; --○-- : sulfides.

にわたって連続継代培養したものを接種に供した*。また接種に当っては、前培養を 2,500 r. p. m. 10 分で

* これらの細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用は前培養での age の影響を敏感に受け、比較的 young な前培養を接種したときにはこれらの lag period が短かく且つ硫化物の最高値が大きいが、old な前培養による場合はこれらの lag period が長く且つ最高値が小さくなる傾向がある。

遠心集菌し、滅菌された 1.1 M ブドウ糖溶液 (L-ascorbic acid 0.1 g/L を含む) で 2 回洗滌しこれに再懸濁した後、懸濁液 10^{-4} ml を被検培地 90 ml に接種した。それらの結果は第 5, 6 および 7 表, ならびに第 1, 2 および 3 図に示す通りである。

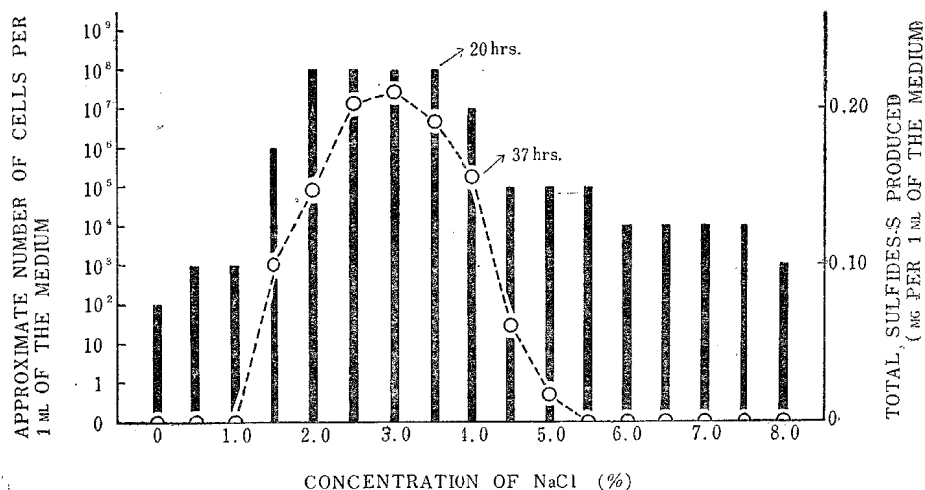


Fig. 2. Effect of NaCl concentration on the growth and sulfide production by strain SM1 at 30°C. —■— : cells ; --○-- : sulfides.

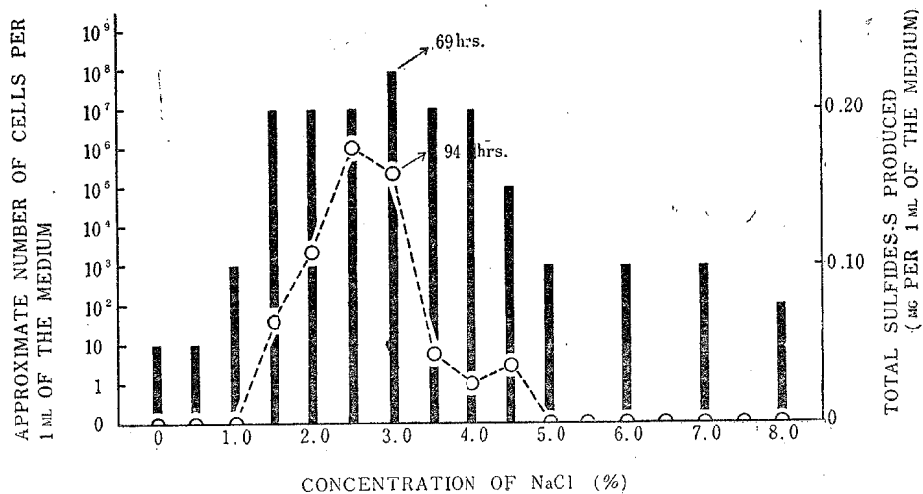


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the growth and sulfide production by strain SM8 at 30°C. —■— : cells ; --○-- : sulfides.

すなわち、いずれの菌株においても、発育ならびに硫酸塩還元作用がおこなわれた食塩濃度範囲は (1) においてみられた発育可能域にはほぼ一致した。そして、それらの至適食塩濃度は、SH1については 1.5~2.5% 付近、SM1については 2.5~3.5% 付近、SM8については 2.5~3.0% 付近とみられ菌株によって多少異なるようであるが、これらがいずれも典型的海洋性種であることを示している。

至適食塩濃度付近における発育速度、硫酸塩還元の activity ならびに硫化物の最高蓄積量 (生産と、空气中への逸散ならびに酸化による消失との間の平衡にもとずくと考えられる) は SM1 において最も大きく SH1 ではいく分小さかったが、SM8 においては前二者におけるよりもかなり低かった。また、いずれの

菌株においても、至適値から遠ざかった食塩濃度下では最高菌数および硫化物最高蓄積量は概して低い値に止まった。

(3) 海洋性硫酸塩還元細菌の population 中における、食塩要求程度を異にする細菌の分布状態

一般に、一群の生物が物理学的・化学的的刺激によって影響を受けるとき、その程度はすべての個体について一様ではなく、感受性には個体差がみられるのが普通である。

海洋性硫酸塩還元細菌が、河口付近または大量の二場排水が海へ放出される排水口付近のような、海水と低鹹水または高鹹水とが交錯する水域にあるとき、環境塩分濃度の急変によってその生育能力はどのような影響を受けるであろうか。これを推察するための基礎的実験として、まずこの細菌の normal population 中にはいろいろの程度の食塩要求性（あるいは耐性）をもつ細菌がそれぞれどのように分布しているかを観察し、さらに前培養における training によってこの分布状態にどのような変化がおこるかをみた。

まず、塩分要求範囲の異なる SH1, SM1 および SM8 の 3 株をそれぞれ海水調製の液体培地（330 頁脚

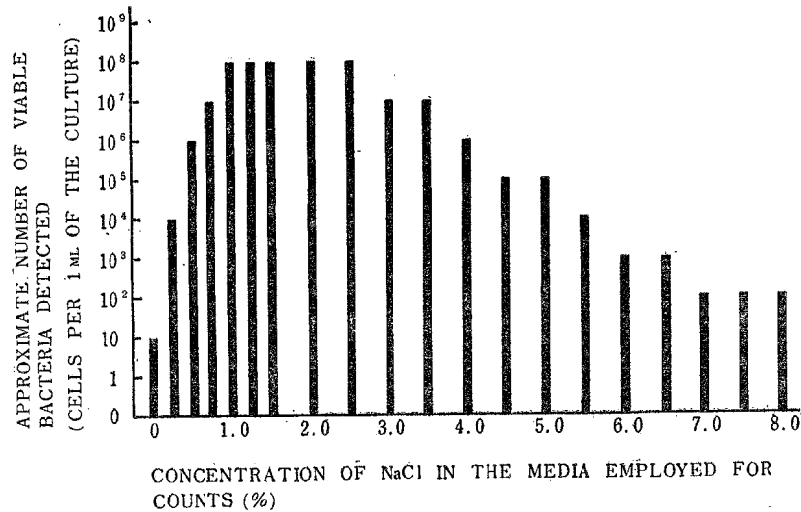


Fig. 4. Number of viable cells in the normal population of strain SH1 which were detected by use of the media having different salinity.

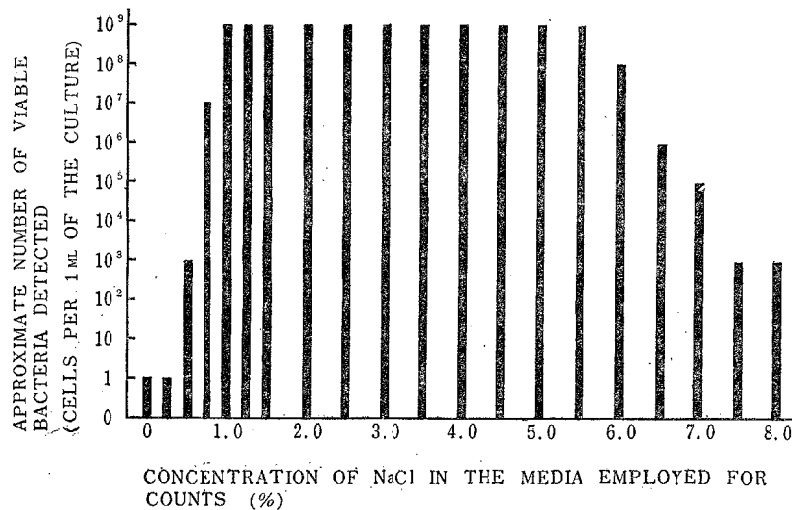


Fig. 5. Number of viable cells in the normal population of strain SM1 which were detected by use of the media having different salinity.

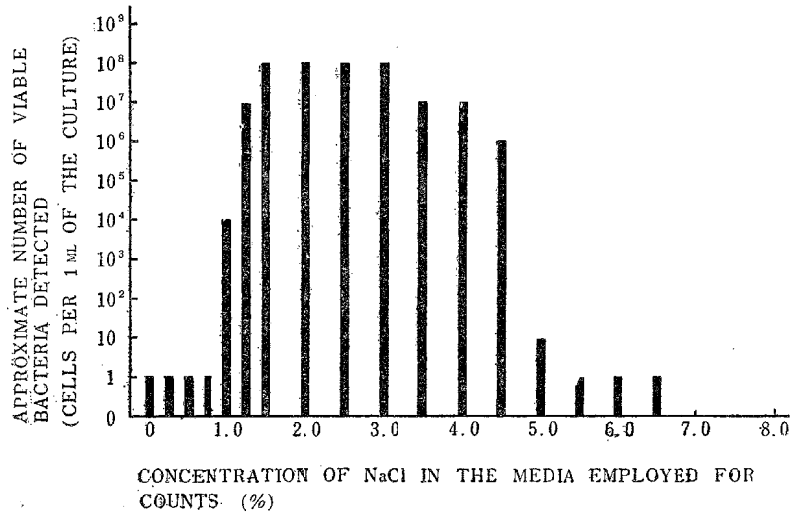


Fig. 6. Number of viable cells in the normal population of strain SM8 which were detected by use of the media having different salinity.

註参照)に 30°C で 3 日間前培養し、これらを、第 1 表の基礎培地に種々の濃度の食塩と寒天 3.0 g/L とを加えた培地を用いて、extinction dilution method で計数した。稀釈には、それぞれ相当する濃度の食塩水を用いた。その結果を第 4, 5 および 6 図に示す。

すなわち、(1) において 0.25~7.5% にわたる比較的広塩性を示した SH 1 は食塩 1.0~2.5% で最高計数値 (10⁸/ml) を示し、これを離れるほど計数値は低くなったが、発育可能範囲外の食塩 0% および 8.0% においても、なおそれぞれ 10¹/ml および 10²/ml を示した。一方、(1) において 1.5~5.5% の比較的狭塩性を示した SM 8 は食塩 1.5~3.0% において最高計数値 10⁸/ml を示し、これを離れると計数値は急激に低くなったが、発育不可能域である 1.0% においても 10⁴/ml の比較的高い値があらわれた。また (1) において食塩 0.5~7.0% を発育可能範囲として上の両者の中間の要求性を示した SM 1 では 1.0~5.5% において最高計数 10⁹/ml が得られたが、発育不可能域である 0% および 0.25% において 1/ml が、また 7.5% および 8.0% において 10³/ml の値がそれぞれ示された。

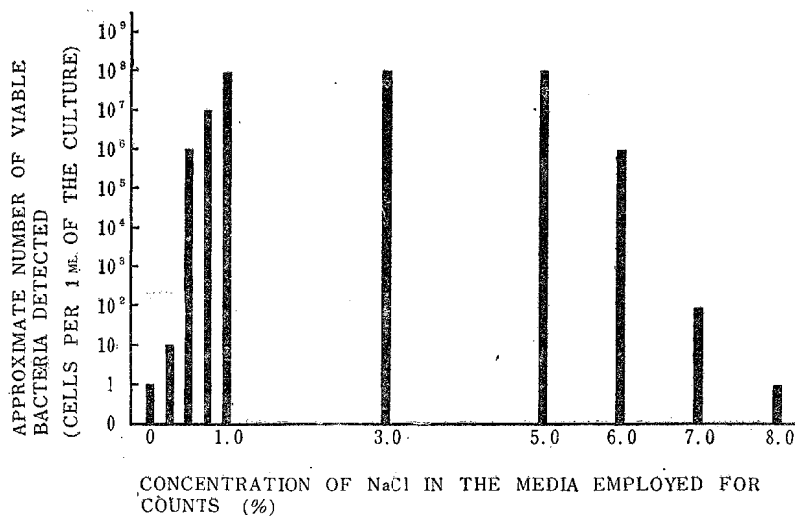


Fig. 7. Number of viable cells detected by use of the media having different salinity, in the population of strain SM1 which was preliminarily cultured in the medium containing 0.5% NaCl.

これらの計数値は、おそらく normal population 中のそれぞれの食塩濃度で発育できる細菌数を表わすものとみられるが、これらの示す傾向は (1) および (2) で得られた結果と大体よく対応し、それぞれの菌株の食塩要求性 (あるいは耐性) の特徴を裏書きしているようにみえる。

つぎに、中等度の食塩要求性を示した SM1 についての計数 (第5図) において、比較的低い食塩濃度 (0.5 および 1.0 %) と高い食塩濃度 (6.0 および 7.0 %) で発育した最高稀釈度の培養について、それぞれ引き続き上と同様に再び分布をしらべた。その結果は第7,8,9 および 10 図に示すとおりである。

すなわち、0.5 または 1.0 % の低濃度食塩培地で前培養された population 中には、original culture (第5図) にくらべて低濃度食塩要求菌数が多く高濃度食塩耐性菌数が少なくなる傾向が示され、一方、6.0 または 7.0 % の高濃度食塩培地で前培養されたものでは、original culture にくらべて高濃度食塩耐性菌

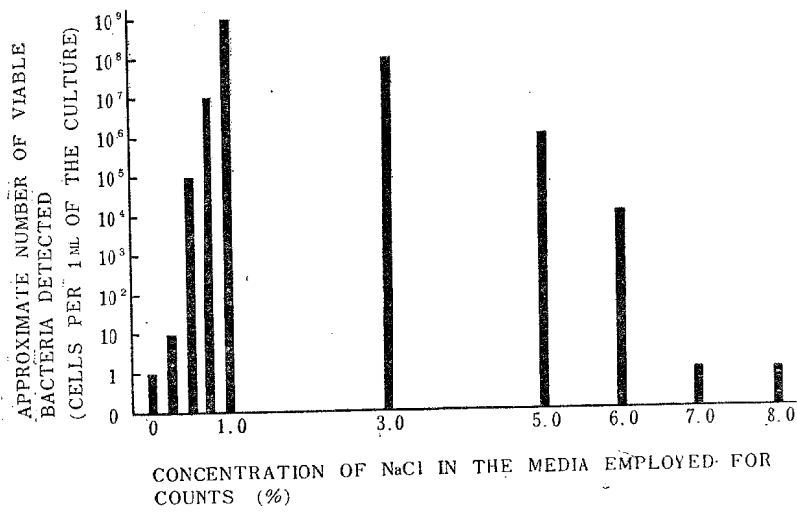


Fig. 8. Number of viable cells detected by use of the media having different salinity, in the population of strain SM1 which was preliminarily cultured in the medium containing 1.0 % NaCl.

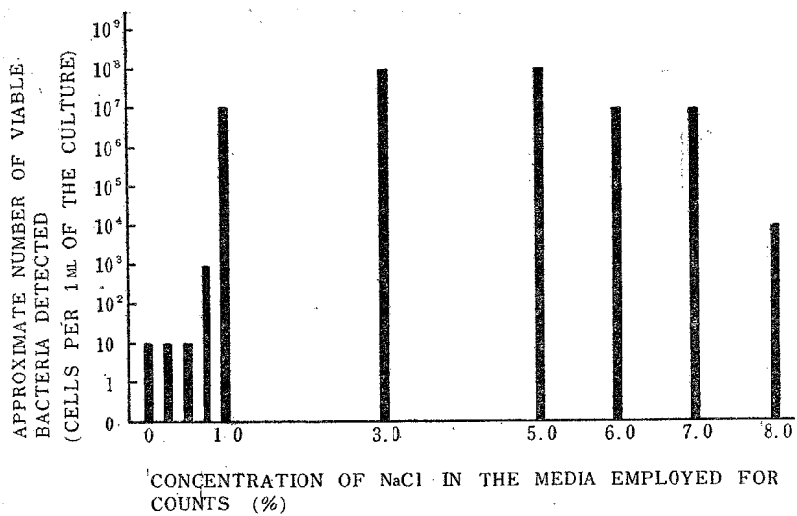


Fig. 9. Number of viable cells detected by use of the media having different salinity, in the population of strain SM1 which was preliminarily cultured in the medium containing 6.0 % NaCl.

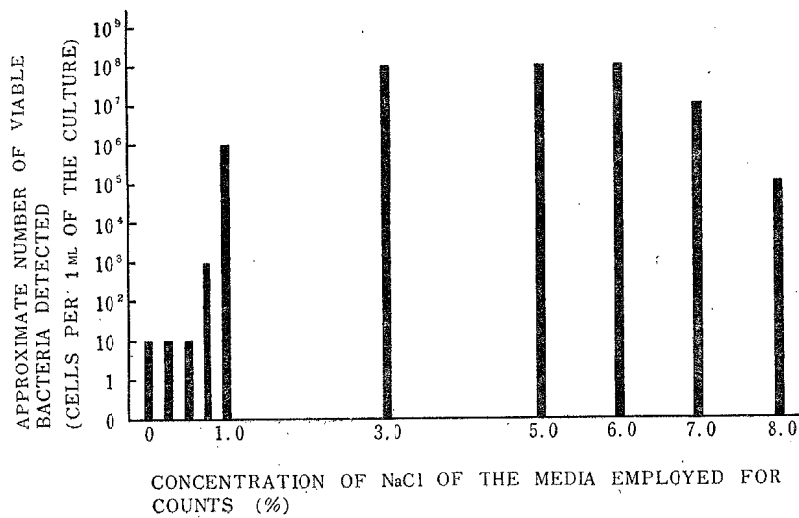


Fig. 10. Number of viable cells detected by use of the media having different salinity, in the population of strain SM1 which was preliminarily cultured in the medium containing 7.0 % NaCl.

数が多く低濃度食塩要求菌数が少なくなる傾向があらわれた。

またさらに、SM1を0.5または7.0%の食塩培地に約20代にわたって継代培養し、同じ食塩濃度培地を用いて再分離して、上と同様に食塩要求性の分布をしらべた。その結果は第11および12図に示される通り、0.5%食塩培地で馴致、再分離されたものは低濃度食塩要求菌数が多く高濃度食塩耐性菌数が少なくなる傾向が上より一層強くあらわれたが、7.0%食塩培地での再分離菌株は上の傾向がかえって弱められた。

以上2つの実験結果から、この細菌の食塩要求性(あるいは耐性)は training によってある程度までは比較的容易に順応できるが、極端な程度の適応は容易には起り得ないと考えられる。そして、どの培養においても食塩要求性の分布状態が前培養における食塩濃度付近に集中することなく original culture におけるものにほぼ近似したことから、以上の実験での計数値は固定された食塩要求性(または耐性)をもつある

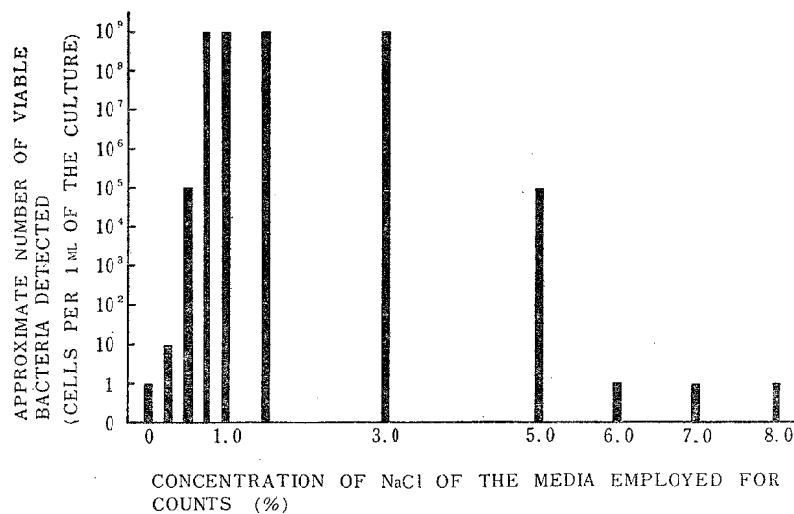


Fig. 11. Number of viable cells detected by use of the media having different salinity, in the secondary strain which was re-isolated from strain SM1 by use of the medium containing 0.5 % NaCl.

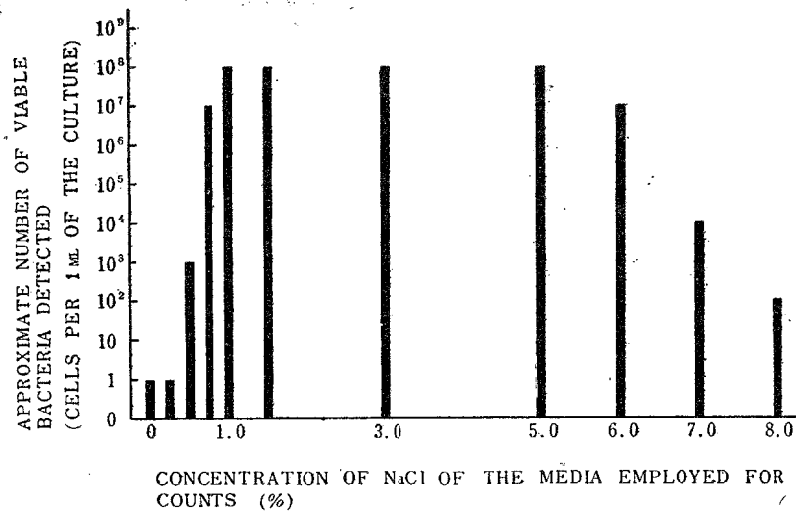


Fig. 12. Number of viable cells detected by use of the media having different salinity, in the secondary strain which was re-isolated from strain SM1 by use of the medium containing 7.0 % NaCl.

特別な細菌の数をあらわすものではなく、1つの population 中における食塩要求性についての個体変異の幅と高さを示すものであると思われる。

(4) 海洋性硫酸塩還元細菌が各種滲透圧溶液と接触した後の生育能力

以上は発育中の細菌の食塩濃度に対する態度について行なった実験であったが、つぎに、この細菌がいろいろの滲透圧の溶液と接触したとき、その後の生育能力にどのような変化がおこるかを検討した。その方法はつぎの通りである。

海水調製の液体培地で 30°C に 2 日間前培養された SM1 の培養を、4,200 r. p. m. 10 分で遠心集菌し、滅菌した蒸留水、1.1 M ブドウ糖溶液、海水および 0.3, 3.0 または 8.0 % 食塩水 (すべて L-ascorbic acid 0.1g/L を含む) に再懸濁させて 30 分間放置した後、0.5, 3.0 および 8.0 % の食塩培地で計数した。稀釈にはそれぞれ相当する食塩水を用いた。また、一部は以上の集菌、懸濁、放置を 2 回繰り返した後計数した。それらの結果は第 13 図に示すとおりである。

すなわち、1 回処理した場合には、海水および 3.0 % 食塩水では original population におけるものと全く等しいか、またはそれを上回る計数値を示し、海水と等張である 1.1 M ブドウ糖溶液でもほとんど同様の計数値が得られたが、8.0 % および 0.5 % 食塩水ではかなり低くあらわれ蒸留水ではさらに著しく減少した。2 回処理した場合には、海水では original population におけるのと同じ値が示され 3.0 % 食塩水でもほぼ同様であったが、8.0 % 食塩水、1.1 M ブドウ糖溶液、0.5 % 食塩水ではこの順序にしたがってはなはだしく減少し、蒸留水では 3.0 % 食塩培地での計数が 10⁵/ml を示したに過ぎずその他の培地では計数値 0 となった。

以上の結果から、この細菌が海水とほぼ等張である 3.0 % 付近の食塩水または 1.1 M ブドウ糖溶液と短時間接触してもその後の生育能力はほとんど損なわれないが、0.3 % または 8.0 % 付近の低張または高張溶液と接触するとそのうちの相当数の生育能力が失なわれ、蒸留水ではこれが極めて著しいことが明らかになった。しかし蒸留水の場合においてさえも、短時間 (30 分程度) の接触のみでは、なおかなりのもの (original population の 1/100 程度) の生育能力が保存されていることが示された。また、海水とほぼ等張である 3.0 % 食塩水および 1.1 M ブドウ糖溶液では海水での処理にくらべて幾分計数値が低くあらわれたことは、海水中にはこの細菌の生存に対して滲透圧の調節以外にある種の補助的要因が存在することを想像させる。

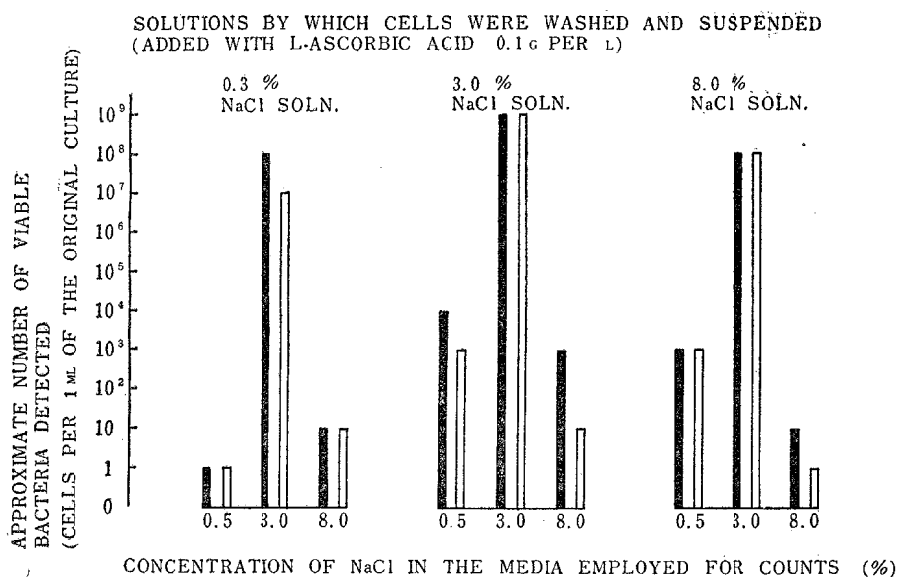
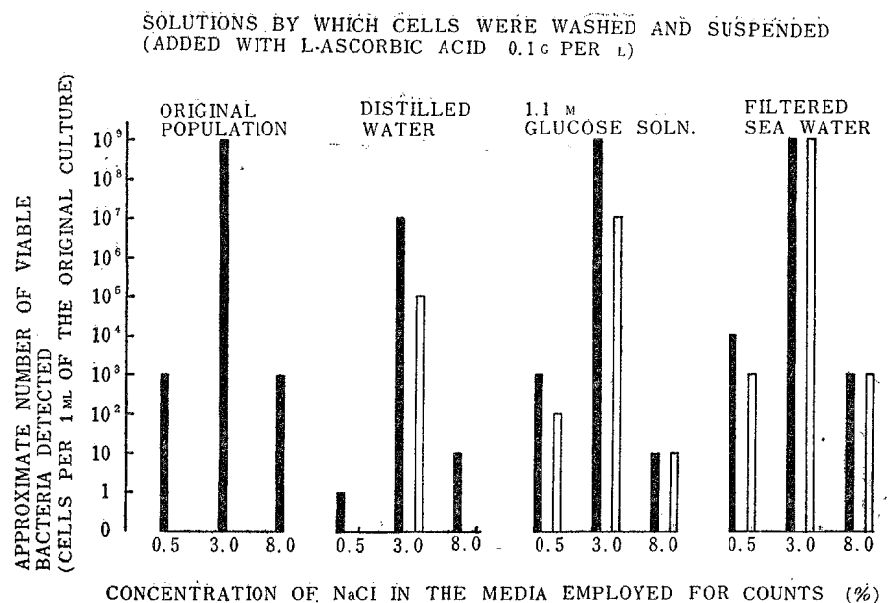


Fig. 13. Number of viable cells detected by use of the media containing different concentrations of NaCl, in the culture of strain SM1 after washed and suspended in solutions having different osmotic pressure. **■** : treated once; **□** : treated twice.

論 議

実験(1)の通り、各地の主として沿岸海域および汽水域から海水培地を用いて分離された硫酸塩還元細菌は、菌株によって発育できる食塩濃度範囲を多少異にし比較的広塩性から狭塩性にいたるいろいろの程度の要求がみられたが、その多くは一般には1.0~6.5%付近を発育可能範囲とするものようであった。そ

して、これらの中には食塩 0.25 % (あるいは海水強度 5 %) 付近の低塩分濃度でも発育できるものが若干存在したが、発育に全く食塩を必要としないものは見出されず、一方 8.0 % 以上の食塩濃度で発育できる耐塩性種も存在しなかった。また、実験 (2) の結果、これらは発育および硫酸塩還元作用の至適食塩濃度を概して 2.0~3.0 % 付近とする典型的な海洋性種であることが明らかになった。これらのことは、MILLER⁶⁾ および LITTLEWOOD・POSTGATE⁷⁾ がそれぞれ塩水、海水または淡水から分離した硫酸塩還元細菌の多くは食塩 1 % を発育至適濃度としたと報告していることと甚だ異なるが、彼らを用いた基礎培地* 中には Na 塩、塩化物など解離し得る水溶性塩類を高濃度に含んでいたから、実際の食塩濃度 (あるいは塩分濃度) はこれより遙かに高い値となる。

硫酸塩還元細菌の塩分要求については、その他多数の研究者によって広範囲にわたる異なった結果が報告されている (ZOBELL⁸⁾ によって綜述されている) が、以上のことから考えると沿岸海域および河口付近の汽水域に棲息する硫酸塩還元細菌は (淡水性種は別として) ほとんど典型的海洋性種とみなされ、極端な広塩性種はたとえあるとしても極めて稀にしか存在しないのではなかろうか。

既報¹⁾において淡水の影響がほとんどない純海水域にも淡水培地に発育できるものが少数見出されたが、実験 (3) の結果と照らし合わせると、極端な広塩性種の存在というよりも、むしろ海洋性種の normal population 中の低塩分要求性菌がこの培地に出てきた可能性が大きい。すなわち、ここに用いた extinction dilution counts によるときは、ことに稀釈率の低いところでは、サンプルからの塩分の導入を無視できないからである。このことはまた、上の海水域から淡水培地に生育できる粗培養を得て同じ培地に継代培養したとき、大量を接種しないと発育できず、しかもその多くは数代のうちに消失したことからもうかがわれる。

実験 (3) の結果は、normal population 中に通常の発育可能範囲を越えて低いまたは高い食塩濃度で発育できる細菌が少数存在することを示し、はなはだ奇異の感を与える。しかし、この理由はおそらくつぎのように考えられる。すなわち、この計数法では低い稀釈度においては前述のようにサンプルである前培養 (この場合は海水培地) からの塩分が計数培地へ導入されるのをまぬがれないから、1~10/ml のような低い計数値を与えたものについては、その計数培地中の真の塩分濃度が所定濃度よりも高くまたは低くなっていたためであろう。あるいはまた、発育可能範囲を求めた実験 (1) では接種量が少なかったため、上述のような細菌が含まれていなかったのか、または増殖開始に必要な菌量に達しなかったからであろう。

つぎに、これら食塩要求の程度を異にする population の分布状態は、(3) にみられるように前培養での食塩濃度によって影響を受け、分布が示す個体変異の中心が前培養培地の食塩濃度の方向へいく分移動することがみられ、ある程度食塩濃度に適応できることを示した。しかし、極端に低濃度または高濃度の食塩培地で淘汰培養を繰り返した後この培地で再分離した場合にも、original culture から極端にかけはなれた結果は得られなかった。この事実は、trained culture について耐塩性の著しい適応をみた LITTLEWOOD・POSTGATE⁷⁾ の結果とは異なり、ZOBELL⁸⁾ が指摘しているように、塩分要求のはなはだしい適応が容易には起り難いことを意味し、また正常な発育環境よりも低張または高張のもとで培養することは塩分要求変異種を選択する働きはあっても変異助長作用はないことを示すものであろう。

実験 (4) の結果から、これらの細菌が本来の棲息環境よりも低張または高張の溶液と短時間接触したとき、その後の生育能力はかなり損なわれるが、蒸留水のような極端な低張液あるいは 8.0 % 食塩水のようなはなはだしい高張液と接触したときにも、なお相当の生育能力が残されていることがみられた。天然の環境下では、陸水や廃液の供給を受ける場合にもこの細菌の棲息地である底土中へは直接的影響が比較のおよび難いであろうということを考え合わせると、この生育能力の保存はさらに大きいことが想像される。

* たとえば MILLER⁶⁾ の用いた基礎培地はつぎのとおりである。NH₄Cl 1.00 g, MgSO₄·7H₂O 2.00 g, Na₂SO₄ 36.50 g, K₂HPO₄ 0.50 g, CaCl₂·2H₂O 1.70 g, Sodium lactate 21.00 g, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O trace, Distilled water 1,000 ml.

なお、SM1の菌株はさきに筆者が他の協同研究者とともに実験に供したものであって、これの発育ならびに硫化物生成作用と塩分濃度との関係についてはすでに概略を報告した²⁾。本報での結果は既報のものとは詳細の点で多少異なるが、これは後者では海水を稀釈または濃縮して供試培地としたから基質である硫酸塩をはじめ食塩以外の塩類濃度の影響をまぬがれなかったためと思われる。

摘 要

各地の、主として沿岸海域および汽水域から海水培地を用いて分離された硫酸塩還元細菌の、発育および硫酸塩還元作用と食塩濃度との関係を調べつぎの結果を得た。

1. これらの細菌の大部分は食塩1.0~6.5%付近を発育可能範囲とし、それより低濃度または高濃度で発育できるものは僅かに過ぎなかった。
2. これらの細菌の発育および硫化物生成作用は、概して食塩2.0~3.0%付近を至適濃度とした。
3. これらの細菌の純粋培養の normal population 中には、上の発育可能範囲を越えて、より低濃度またはより高濃度で生育できるものが少数存在した。
4. これら population 中における異なった食塩濃度に生育できる細菌数の分布状態から、これらの細菌は正常な発育環境より低張または高張の環境にある程度適応して発育できるが、極端な適応または変異はおこり難いことを推論した。
5. これらの細菌が正常な棲息環境より低張または高張の環境下に短時間おかれたとき、その後の生育能力はかなり損なわれるが、なお相当数が生育能力を保つことを推定した。

本研究にあたり、ご指導いただいた京都大学農学部木俣正夫教授、およびご指導ならびにご校閲いただいた京都大学食糧科学研究所門田 元教授に厚くお礼申し上げる。また、細菌の分離に際し試料泥土の一部を採集していただいた本所赤築敬一郎助教授に深謝する。

文 献

- 1) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・三好英夫：1957. 日本水産学会誌, **22**, 701—707.
Masao KIMATA, Hajime KADOTA, Yoshihiko HATA and Hideo MIYOSHI: 1958. *Records Oceanogr. Works Japan*, Special No. **2**, 187—199.
- 2) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明：1955. 日本水産学会誌, **21**, 109—112.
- 3) 畑 幸彦：1960. 本報告, **9**, 347—362.
- 4) 畑 幸彦：1960. 本報告, **9**, 363—375.
- 5) 富山哲夫・神崎嘉瑞夫：1951. 日本水産学会誌, **17**, 115—121.
- 6) MILLER L.P.: 1949. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **15**, 437—465.
- 7) LITTLEWOOD, D., J.R. POSTGATE: 1957. *J. gen. Microbiol.*, **17**, 378—389.
- 8) ZOBELL, C.E.: 1958. "Ecology of Sulfate Reducing Bacteria." *Producers Monthly*, **22**, 12—29.