

海洋性硫酸塩還元細菌の 無機塩要求について*

畑 幸 彦

Inorganic Nutrition of Marine Sulfate-Reducing Bacteria*

By

Yoshihiko HATA

The author has previously reported that a majority of marine sulfate-reducing bacteria which were isolated from marine or estuarine environments could grow in the media containing NaCl in the concentrations of nearly 1.0—6.5 % (the optimum was 2.0—3.0 %).

In the present paper the author studied in detail the inorganic nutritional requirements of these bacteria.

As the test organisms marine sulfate-reducing bacteria strain SM1 was used throughout the study. Peptone and lactic acid added to the chemically defined basal medium, as shown in Table 1, which was employed in these experiments were demineralized by passage through the columns of ion exchange resins "Permutit H—70" (H—form) and "Permutit A" (OH—form). The solutions having the composition as shown in Tables 2 or 6 were employed as the standard salts mixtures.

The results obtained are shown in Tables 3—18, and may be summarized as follows:

- 1) Na^+ , K^+ , Mg^{++} and SO_4^{--} were essential for the growth of these bacteria, and Cl^- , HCO_3^- and PO_4^{---} also seemed to be necessary for the growth. On the other hand, Ca^{++} and Br^- were not essentially required for the growth and the sulfate-reducing activity of these organisms.
- 2) The amounts of the essential ions required for the growth were relatively small, and these ions could partially be replaced each other.
- 3) When these essential ions were sufficiently or excessively present the growth and the sulfate-reducing activity of these organisms were often influenced by the osmotic pressure of the media.

※ 水産講習所研究業績 第304号, 1960年2月11日 受理.
Contribution from the Shimonoseki College of Fisheries, No. 304.
Received Feb. 11, 1960.

前報¹⁾において、いろいろの水域から分離された硫酸塩還元細菌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た。また既報²⁾において筆者は、他の協同研究者とともに、この細菌の発育に Mg^{2+} および Fe^{2+} が不可欠であることを報告した。

硫酸塩還元細菌の発育に対する無機塩類の影響に関しては、BUTLIN・ADAMS・THOMAS³⁾ および POSTGATE⁴⁾ は Fe^{2+} についてその必要性を認め、また MILLER⁵⁾ は Fe^{2+} または Cd, Sb, Bi および Pb などの比較的難溶性塩類が存在するとこの細菌の硫化物生成作用が促進されることを明らかにした。UPDEGRAFF・WREN⁶⁾ は硫酸塩還元細菌の増殖に K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} および PO_4^{3-} が必要であることを報告し、BAAS BECKING・WOOD⁷⁾ は 2価カチオンに対する 1価カチオンの比率あるいは Cl^- , HCO_3^- および SO_4^{2-} の相対的濃度はこの細菌による硫酸塩の還元に対して決定的ではないこと、およびこの細菌は NaCl 濃度に対しては広範囲にわたって耐えられるが、 $MgCl_2$ によっては 0.9 N 以上で発育が阻害されることを認めた。また、鈴木・志賀⁸⁾ は水田土壌中における遊離硫化水素の発生が種々の含鉄材によって抑制されることを述べ、菅原・小山⁹⁾ は湖底泥土中における硫酸塩の還元に対して Fe^{2+} は促進的効果を持ち Mn^{2+} はこれと拮抗的に作用することを示した。また MACLEOD・ONOFREY¹⁰⁾ は数種の海洋性細菌の発育に対する Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} または PO_4^{3-} の必要性について報告した。

しかし、海洋性硫酸塩還元細菌の発育ならびに activity に対する種々の無機塩類の影響についての系統的研究はなされておらず、詳細は全く不明である。前報¹⁾で明らか通り、この細菌は典型的海洋性種であって一般細菌に比して高濃度の塩分を要求する点からも、このものの無機塩要求の実態を究明することは重要である。 Fe など比較的原子量の大きい金属については後報¹¹⁾ で述べることにし、本報では海水中の塩分の主成分である種々のカチオンならびにアニオンおよびこれらの塩類についてその必要性を明らかにし、さらにこれらイオン間における相互的關係について論じた。

実 験 方 法

1. 供試細菌：前報¹⁾で普通の塩分要求を示した SM 1 の菌株を用いた。
2. 接種ならびに培養：接種に際して前培養からの微量のイオンの導入を避けるため、あらかじめ海水液体培地¹⁾で $30^{\circ}C$ 2日間前培養された菌体を 2,500 r. p. m. 10 分で遠心集菌し、0.1 g/L の L-ascorbic acid を含む滅菌された 1.1 M ブドウ糖溶液（海水とほぼ等張）で 2 回洗滌再懸濁し、この懸濁液 10^{-4} ml を 80 ml の被検培地に接種した。培養基には滅菌流動パラフィンを約 2 cm 重層して、硫化物の酸化、逸散を防いだ。また綿栓からの汚染を避けるためこれに綿布を巻いた。培養温度はすべて $30^{\circ}C$ であった。
3. 培地の調製：細菌に対するイオンの必要性を明らかにするためには、そのイオンを含まない基礎培地を調製することが必須である。この細菌は既報¹²⁾ のように、無機塩類のみの合成培地では発育せず比較的少量の有機エネルギー源* および少量の含窒素有機物を発育に必要とするので、これらの有機物を含む天然培地から問題のイオンを除くことが肝要である。

有機物培地からのイオンの除去は極めて困難であるが、筆者は主として SHANKAR・BARD¹³⁾ および MACLEOD・ONOFREY¹⁰⁾ の方法を参考としてイオン交換樹脂 “Permutit” (The Permutit Co., N. Y., U. S. A.) を用いてつぎの方法で処理し、ほぼ満足な結果を得た。

すなわち、カチオンの除去には、0.5 N HCl で処理した “Permutit H-70” を直径 2.2 cm、長さ約 50 cm の硬質ガラス筒に填めてカラムをつくり、これにあらかじめ 15 ポンド 20 分間オートクレーブした第 1 表の組成の 2 倍濃度のペプトン・乳酸溶液 (pH 7.0) を 1 分間 3 ml の速度で通す。最初の約 200 ml

* この細菌は facultative autotrophs の一つであって、少量の有機物の存在下では一部ヒドロゲナーゼによって分子状水素を被還元基質へ伝達することによりエネルギーを獲得できるが¹²⁾、有機物培地にくらべて培養法が煩雑であり、かつ発育および硫酸塩還元作用がおくれるようである。

Table 1. Basal medium for the study of mineral requirements.

Peptone		2.0 g
Lactic acid		2.5
(NH ₄) ₂ HPO ₄		0.15
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O		0.5
L-Ascorbic acid		0.2
Salt solution		1,000 ml
	pH	7.5

は捨て残りをとる。この pH を再修正して再びオートクレーブし、0.5 N HCl で再生した同じカラムを通す。また、アニオンの除去には、30 % NaOH で処理した“Permutit A”のカラムを上と同じ方法で通す。

以上の方法で処理したペプトン・乳酸溶液に他の必要な塩類を加え、蒸留水で所定濃度に希釈し、稀薄 NH₄OH および HCl (または H₂SO₄) で pH を調整し、15 ポンド 20 分間オートクレーブし再び pH を修正して供試培地とした。また、重炭酸塩およびブドウ糖は加熱滅菌による分解、変化を避けるためこれらの溶液を SEITZ 濾過器で滅菌後、無菌的に加えた。

またこの細菌は発育に本来海水調製の培地を必要とするが、無機塩の要求をしらべるためには化学的組成の明確な培地を選ぶことが必要であるから、実験にはすべて人工海水を用いた。人工海水の標準としては先ず LYMAN・FLEMING¹⁴⁾ のものに準じて第 2 表の組成のものを選んだが、実験の進むにつれて、この細

Table 2. Composition of artificial sea water employed as the standard mineral solution.

NaCl	23.48 g	(0.403 M)
MgCl ₂	4.98	(0.052)
KCl	0.67	(0.009)
Na ₂ SO ₄	3.92	(0.028)
CaCl ₂	1.10	(0.010)
NaHCO ₃	0.19	(0.002)
KBr	0.10	(0.001)
Distilled water	1,000 ml	

菌の最少要求を満たすに足るさらに簡単な第 6 表の組成のものを考案し、以後は主としてこれによった。

4. 試薬およびガラス器具：試薬は入手できる限りの最純品を用いた。ガラス器具はクロム硫酸混液を通し蒸留水で洗滌後、0.5 N HNO₃ および 0.5 N NaOH で洗滌し蒸留水を満たして 15 ポンド 20 分間オートクレーブし 1 昼夜放置後、さらに蒸留水で数回洗滌した。

5. 蒸 溜 水：再溜水をさらにイオン交換装置 (Amberlite IR-120 および Amberlite IR-4 B) を通して純化した。

6. 発育および硫化物の測定：発育は semisolid 海水培地を用いて extinction dilution method により、硫化物は富山・神崎の方法¹⁵⁾によった。

実験結果

(1) 基礎培地の検討

上の方法で得られたイオン欠除の有機物培地がこの細菌の有機物要求を満たすか否か、また第2表の人工海水が天然海水を十分代用できるか否かをみるために、つぎの実験を行なった。

すなわち、未処理の有機物を含む培地、またはカチオンならびにアニオン除去処理の行なわれた有機物を含む培地を、天然海水または第2表の人工海水で調製し、細菌を接種して発育および硫化物生成作用をみた。その結果第3表の通り、どの培地においてもほとんど大差なく発育および硫酸塩還元作用が行なわれるこ

Table 3. Growth and sulfide production of sulfate-reducing bacteria strain SM 1 at 30°C in the media prepared with natural or artificial sea water which were treated or untreated with the ion exchange resin "Permutit".

Treatment with "Permutit H-70" and "Permutit A"	Basal sea water	Incubation time (hrs.)					
		24		46		72	
		Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
Treated	Artificial	10 ⁵ —10 ⁶	0	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.087	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.146
Untreated	Artificial	10 ⁵ —10 ⁶	0	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.069	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.112
Treated	Natural	10 ⁶ —10 ⁷	0	10 ⁸ —10 ⁹	0.099	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.138
Untreated	Natural	10 ⁵ —10 ⁶	0	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.116	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.143

Incubation time (hrs.)					
94		117		141	
Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Sulfides -S mg/ml	
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.248	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.284	0.262	
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.251	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.292	0.237	
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.244	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.295	0.237	
10 ⁹ —10 ¹⁰	0.234	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.280	0.245	

とが示された。すなわち、上の方法によってペプトン・乳酸を処理してもこの細菌の有機物要求は十分満たされること、および第2表の人工海水は天然海水にほとんど匹敵することが明らかになった。したがって以下の実験においては、この処理によってイオン欠除とした有機物培地を、第2表の人工海水で調製したものをもって標準完全培地とすることにした。

(2) Na⁺, K⁺, Ca[#] および Mg[#] の必要性

海水中の主要なカチオンである Na⁺, K⁺, Ca[#] および Mg[#] の必要性を明らかにするため、完全人工海水からこれらのイオンをそれぞれ単独に除いて培地を調製し、発育および硫化物生成作用をみた。この場合、被検カチオンの塩類を除くことによって随伴アニオンが同時に除かれるから、他の塩類を加えてこれを補なった。また滲透圧を一定にそろえるため、ブドウ糖*を加えて調節した。その結果は第4表に示す通りである。

* 既報¹²⁾の通り、この細菌は純粋培養においてはブドウ糖をエネルギー源として利用できないので、このものの自体の影響はない。

Table 4. Requirements of Na⁺, K⁺, Ca[#] or Mg[#] for the growth and the sulfate-reducing activity (SM1).

Modification of artificial sea water* employed as the basal solution		Incubation time (hrs.)			
		72	144		
Omitted (M)	Added (M)	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
Non	Non	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.146	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.332
NaCl(0.403), Na ₂ SO ₄ (0.028), NaHCO ₃ (0.002)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.028), Glucose (0.810)	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ³ —10 ⁴	0
NaCl(0.403), Na ₂ SO ₄ (0.028), NaHCO ₃ (0.002)	NH ₄ Cl(0.403), (NH ₄) ₂ SO ₄ (0.028), KHCO ₃ (0.002)	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ³ —10 ⁴	0
NaCl(0.403), Na ₂ SO ₄ (0.028), NaHCO ₃ (0.002)	KCl(0.403), K ₂ SO ₄ (0.028), KHCO ₃ (0.002)	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁴ —10 ⁵	0
Na ₂ SO ₄ (0.028), NaHCO ₃ (0.002)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.028), NaCl(0.058)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.133	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.257
NaCl(0.403), NaHCO ₃ (0.002)	Na ₂ SO ₄ (0.203)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.118	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.432
KCl(0.009), KBr(0.001)	Glucose(0.020)	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ³ —10 ⁴	0
KCl(0.009), KBr(0.001)	NaCl(0.009), NaBr(0.001)	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ² —10 ³	0
KBr(0.001)	KCl(0.001)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.202	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.438
KCl(0.009)	KBr(0.009)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.154	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.411
CaCl ₂ (0.010)	Glucose(0.030)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.244	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.362
CaCl ₂ (0.010)	NH ₄ Cl(0.020)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.149	10 ⁸ —10 ⁹	0.317
MgCl ₂ (0.052)	Glucose(0.153)	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁴ —10 ⁵	0
MgCl ₂ (0.052)	NH ₄ Cl(0.104)	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ³ —10 ⁴	0
Non	Glucose(0.810)	10 ⁷ —10 ⁸	0.018	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.422

* c.f. Table 2.

すなわち、Na⁺ については、NaCl, Na₂SO₄ および NaHCO₃ をすべて除きこれらの代りにブドウ糖を加えるか、あるいはこれらの NH₄ 塩または K 塩を加えた場合には全く発育しなかったが、Na 塩をすべて NaCl または Na₂SO₄ でおきかえた場合には十分な発育と activity が示された。K⁺ については、KCl および KBr を除きこれに匹敵する量のブドウ糖を加えるか、またはこれらの Na 塩を補なってもまったく発育せず、K 塩をすべて KCl または KBr でおきかえると十分発育した。つぎに Ca[#] については、これを除いてもブドウ糖または NH₄ 塩を補なると盛んに発育した。一方、Mg[#] においては、これを除くとブドウ糖または NH₄ 塩を補なっても全く発育できなかった。

以上の結果から、Na⁺, K⁺ および Mg[#] はこの細菌の発育に必須不可欠であるが、Ca[#] の存在はほとんど影響を与えないように思われる。そしてこれらの必要性は、これらイオンのおのおのを含むそれぞれ種類の塩によってよく満たされることが明らかになった。

つぎに、この細菌の発育にとってこれら必須イオンが少なくともどの程度以上に存在することが必要かをみるために、第5表に示したいろいろの組成の人工海水培地で実験した。すなわち上の結果にもとづいて、第2表の人工海水の Na⁺ を NaCl で、K⁺ を KCl でそれぞれ代用し Ca[#] を省いた。SO₄²⁻ は (NH₄)₂SO₄ で補なった。また培地の滲透圧はブドウ糖を加えて等しく調節した。

その結果、Na⁺ については、0.230 g atoms/L (通常の海水中における 1/2 程度) の濃度ではその速度はおそくとも十分発育できたが、0.046 g atoms/L (1/10 程度) では全く発育できなかった。K⁺ および Mg[#] では、それぞれ 0.001 および 0.005 g atoms/L * (それぞれ 1/10 程度) の濃度でも十分な発育が得られたが、

* 既報²⁾において、Mg[#] は 0.0005 g atoms/L でこの細菌の発育を支え得ることを示した。

Table 5. Response of sulfate-reducing bacteria strain SM1 to Na⁺, K⁺ and Mg⁺.

Composition of salt solution employed for the preparation of culture media (M)					Incubation time (hrs.)					
NaCl	KCl	MgCl ₂	(NH ₄) ₂ SO ₄	Glucose	44		94		166	
					Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
Standard* (Control)					10 ⁵ —10 ⁶	0	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.150	—	0.224
0.460	0.010	0.052	0.028	0	10 ⁷ —10 ⁸	0.019	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.080	—	0.234
0.230	0.010	0.052	0.028	0.460	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.060	—	0.230
0.046	0.010	0.052	0.028	0.820	10 ² —10 ³	0	0	0	—	0
0.460	0.005	0.052	0.028	0.010	10 ⁶ —10 ⁷	0	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.053	—	0.213
0.460	0.001	0.052	0.028	0.020	10 ⁶ —10 ⁷	0	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.081	—	0.231
0.460	0.010	0.026	0.028	0.070	10 ⁷ —10 ⁸	0.017	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.074	—	0.256
0.460	0.010	0.005	0.028	0.160	10 ⁷ —10 ⁸	0.020	10 ⁸ —10 ⁹	0.073	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.264

* c. f. Table 2.

その速度は濃度によって多少の支配を受けた。

また、Ca⁺の必要性については、さらにつぎの実験で確かめた。すなわち、以上の結果にもとづいて考案した第6表に示す簡単な人工海水で調製された基礎培地にいろいろの濃度のCaCl₂を加えて培養したが、

Table 6. Composition of the simplified artificial sea water.

(NH ₄) ₂ SO ₄	3.63 g (0.028 M)
NaCl	26.89 (0.460)
KCl	0.75 (0.010)
MgCl ₂	4.98 (0.052)
Distilled water	1,000 ml

Table 7. Effect of Ca⁺ on the growth and the sulfide producing activity of sulfate-reducing bacteria strain SM1. (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water.*. Ca⁺ was added as CaCl₂.)

Concentration of Ca ⁺ added (M)	Incubation time (hrs.)							
	24		47		64		112	
	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 ⁹ —10 ¹⁰	0.024	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.277	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.224	10 ⁸ —10 ⁹	0.172
0.001	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.041	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.305	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.281	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.179
0.005	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.037	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.360	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.263	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.204
0.010	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.038	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.300	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.220	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.176
0.020	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.029	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.350	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.246	10 ⁸ —10 ⁹	0.187

* c. f. Table 6.

第7表に示す通り Ca⁺ 0~0.020 g atoms/L の範囲内では Ca⁺ 添加の影響はほとんど現われなかった。さらに、Ca⁺ 欠除培地で継代培養しても発育および activity にはなんらの変化もおこらなかった。結局、以上の諸実験の結果を総括すると、この細菌の発育にとって Na⁺, K⁺ および Mg⁺ は必須不可欠

であることは明らかであり、その発育は通常の海水中における量に比して少なくとも $\frac{1}{2}$ 程度の Na^+ 、 $\frac{1}{10}$ 程度の K^+ および $\frac{1}{10}$ 程度の Mg^{2+} で十分ささえられるが、その速度はこれら必須イオンの濃度によって多少とも影響を受けるものと思われる。また Ca^{2+} については、この細菌にとっておそらく必須ではないか、あるいは極めてわずかにしか要求されず、その発育促進作用もほとんどないものと認められる。

また、上述の通り、この細菌の発育には第6表に示した比較的簡単な人工海水の培地で十分であることが明らかになったので、以下の実験では論議を簡単にするため、この組成を人工海水の基準とすることにした。

(3) Na^+ の必要性に対する K^+ の補償作用

実験(2)において、この細菌の発育には Na^+ が不可欠でありその必要量は他の必須イオンに比していく分大きいらしいということが示されたが、この場合 Na^+ の要求を K^+ によって一部代用できるか否か、さらに Na^+ の必要限界量はどの程度であるかを以下の実験でしらべた。

すなわち、基礎培地を第6表の組成から NaCl および KCl を除いた塩類溶液で調製し、これに第8表に示すいろいろの濃度の NaCl および KCl を加えた。これらの培地中における Na^+ と K^+ の g atoms の

Table 8. Response of sulfate-reducing bacteria strain SM1 to Na^+ and K^+ . (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water from which Na^+ and K^+ were omitted. Na^+ and K^+ were added as chlorides.)

Concentrations of Na^+ and K^+ added (M)		Incubation time (hrs.)												
		15		39		63		87		159				
Na^+	K^+	Cells/ml	Sulfides-S mg/ml	Cells/ml	Sulfides-S mg/ml	Cells/ml	Sulfides-S mg/ml	Cells/ml	Sulfides-S mg/ml	Sulfides-S mg/ml	Sulfides-S mg/ml			
0	0.470	10	10^2	0	0	0	0	0	0	0	0			
0.024	0.446	10	10^2	0	0	0	0	0	0	0	0			
0.118	0.352	10^4	10^5	0	10^6	10^7	0	10^8	10^9	0.093	10^9	10^{10}	0.133	0.221
0.235	0.235	10^5	10^6	0	10^9	10^{10}	0.034	10^9	10^{10}	0.108	10^9	10^{10}	0.131	0.203
0.352	0.118	10^5	10^6	0	10^9	10^{10}	0.041	10^9	10^{10}	0.102	10^8	10^9	0.106	0.224
0.446	0.024	10^5	10^6	0	10^9	10^{10}	0.051	10^9	10^{10}	0.075	10^8	10^9	0.120	0.197
*0.460	*0.010	10^6	10^7	0	10^9	10^{10}	0.056	10^9	10^{10}	0.094	10^9	10^{10}	0.124	0.214
0.470	0	10^4	10^5	0	10^2	10^3	0	10	10^2	0	0	0	0	0

* The concentrations in natural sea water.

総和が常に通常の海水中におけるこれら両イオンの総和に等しくなるようにしたものである。その結果は表に示す通り、 Na^+ 0.118~0.460 g atoms/L (Na^+ と K^+ の総和の 25~98 %) の範囲においては発育がみられたが、それより外ではまったく発育しなかった。発育速度および activity は Na^+ 0.118 g atoms/L においてかなり小さかったのを除いては、0.235~0.460 g atoms/L ではほとんど差が認められなかった。

つぎに、これと対比するため、 Na^+ を NH_4^+ でいろいろの程度におきかえて同様に実験した結果は第9表に示す通りであって、 Na^+ 0.023 g atoms/L では発育せず 0.115 g atoms/L 以上で発育がおこったが、この場合にはその速度が Na^+ 濃度によって大きな影響を受け、これとほぼ比例することが示された。

これら2つの結果を比較検討すると、前の実験における K^+ は単なる滲透圧の調節作用の他に、この細菌の Na^+ に対する要求を一部補償しているようにみえる。

さらに、 Na^+ の必要限界量を K^+ との関係において見出すため、 Na^+ および K^+ 欠除の基礎培地にいろいろの濃度の NaCl および KCl を加えて発育の有無およびその程度をみた。その結果は第10表に示す通り、 K^+ が 0.001 g atoms/L (通常の海水中の $\frac{1}{10}$ 程度) しか存在しないときには Na^+ 0.092 g atoms/L 以上で発育がおこったが、 K^+ が 0.046 g atoms/L 以上含まれるときには Na^+ 0.046 g atoms/L でも発育

Table 9. Response of sulfate-reducing bacteria strain SM1 to Na⁺. (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water from which NaCl was omitted.)

Concentrations of salts added to basal medium (M)		Incubation time (hrs.)					
		16		36		75	
NaCl	NH ₄ Cl	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
0	0.460	10 ³ —10 ⁴	0	10 ² —10 ³	0	1—10	0
0.023	0.437	10 ³ —10 ⁴	0	10 ² —10 ³	0	0	0
0.115	0.345	10 ⁵ —10 ⁶	0	10 ⁷ —10 ⁸	0.007	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.096
0.230	0.230	10 ⁷ —10 ⁸	0	10 ⁸ —10 ⁹	0.023	10 ⁸ —10 ⁹	0.211
0.345	0.115	10 ⁶ —10 ⁷	0.005	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.108	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.233
0.437	0.023	10 ⁷ —10 ⁸	0.005	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.117	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.244
0.460	0	10 ⁷ —10 ⁸	0.006	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.098	10 ⁸ —10 ⁹	0.235

Table 10. Response of sulfate-reducing bacteria strain SM1 to Na⁺ in the presence of K⁺ in various concentrations. (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water from which Na⁺ and K⁺ were omitted. Na⁺ and K⁺ were added as chlorides. Cl⁻ which was reduced with the decrease of NaCl concentration was added to the medium as NH₄Cl in equimolar concentration.)

Concentration of Na ⁺ added (M)	Concentration of K ⁺ added (M)																				
	0.001				0.046				0.092												
	Incubation time (hrs.)																				
	30	48	72	117	192	240	552	30	48	72	117	192	240	552	30	48	72	117	192	240	552
0.023	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.046	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—	±	±	—
0.092	—	±	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—
0.138	—	±	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—
0.184	—	±	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	+	±	—	—	—	—	—
0.230	±	±	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—

	Concentration of K ⁺ added (M)																				
	0.138				0.184				0.230												
	Incubation time (hrs.)																				
	30	48	72	117	192	240	552	30	48	72	117	192	240	552	30	48	72	117	192	240	552
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	±	±	—	—
	±	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—
	±	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—
	±	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—
	+	±	—	—	—	—	—	+	±	—	—	—	—	—	+	±	—	—	—	—	—

が示された。しかし Na^+ 0.023 g atoms/L では K^+ がいかなる濃度に加えられても発育がみられなかった。そして発育速度はこれら両イオンの濃度の影響をともに受けたが、概して Na^+ 濃度によってより大きく支配されるようであって、 Na^+ が比較的高濃度 (0.184~0.230 g atoms/L) に存在するときには K^+ の至適濃度はむしろ低い値 (0.046 g atoms/L 付近) にあるようにみえた。

上の結果から、この細菌の発育に対する Na^+ の必要量は共存する K^+ の濃度によってかなりの影響を受けるが、概して0.046~0.092 g atoms/L (通常の海水中における $\frac{1}{10}$ ~ $\frac{1}{6}$ 程度) 付近であると思われる。

(4) Na^+ の必要性に対する $\text{Ca}^{\#}$ または $\text{Mg}^{\#}$ の補償作用

つぎに、この細菌の Na^+ に対する要求を $\text{Ca}^{\#}$ または $\text{Mg}^{\#}$ によって一部補なうことができるか否かをみた。その方法は (3) におけると同様であって、培地中の Na^+ と $\text{Ca}^{\#}$ または $\text{Mg}^{\#}$ の g atoms の総和が常に海水中におけるものと等しくなるようにした。その結果は第11表および第12表に示す通りである。

Table 11. Response of sulfate-reducing bacteria strain SM1 to Na^+ and $\text{Ca}^{\#}$. (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water from which Na^+ was omitted. Na^+ and $\text{Ca}^{\#}$ were added as chlorides.)

Concentrations of Na^+ and $\text{Ca}^{\#}$ added (M)		Incubation time (hrs.)				
		15		40		38
Na^+	$\text{Ca}^{\#}$	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Sulfides -S mg/ml
0	0.470	10^3 — 10^4	0	10^2 — 10^3	0	0
0.024	0.446	10^3 — 10^4	0	10^2 — 10^3	0	0
0.118	0.352	10^3 — 10^4	0	10^7 — 10^8	0	0.197
0.235	0.235	10^8 — 10^9	0.008	10^8 — 10^9	0.096	0.216
0.352	0.118	10^7 — 10^8	0.006	10^9 — 10^{10}	0.088	0.193
0.446	0.024	10^7 — 10^8	0.009	10^8 — 10^9	0.094	0.224
*0.460	*0.010	10^8 — 10^7	0.008	10^8 — 10^9	0.109	0.214
0.470	0	10^7 — 10^8	0.005	10^8 — 10^9	0.095	0.228

* Concentrations in natural sea water.

Table 12. Response of sulfate-reducing bacteria strain SM1 to Na^+ and $\text{Mg}^{\#}$. (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water from which Na^+ and $\text{Mg}^{\#}$ were omitted. Na^+ and $\text{Mg}^{\#}$ were added as chlorides.)

Concentrations of Na^+ and $\text{Mg}^{\#}$ added (M)		Incubation time (hrs.)				
		15		40		38
Na^+	$\text{Mg}^{\#}$	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Sulfides -S mg/ml
0	0.512	10^3 — 10^4	0	10^3 — 10^4	0	0
0.026	0.486	10^3 — 10^4	0	10^3 — 10^4	0	0
0.128	0.384	10^7 — 10^8	0.003	10^7 — 10^8	0.117	0.254
0.256	0.256	10^7 — 10^8	0.001	10^8 — 10^9	0.120	0.241
0.384	0.128	10^8 — 10^9	0.003	10^9 — 10^{10}	0.122	0.239
*0.460	*0.052	10^8 — 10^9	0.008	10^9 — 10^{10}	0.121	0.248
0.486	0.026	10^7 — 10^8	0.004	10^8 — 10^9	0.120	0.233
0.512	0	10^4 — 10^5	0	10^3 — 10^4	0	0

* Concentrations in natural sea water.

すなわち、Ca[#] が補なわれたときには、Na⁺ が0.118 g atoms/L 以上存在すると発育したが、その速度は Na⁺ 0.118 g atoms/L でかなりおくれたのを除いて 0.235~0.470 g atoms/L の範囲内ではほとんど差が認められなかった。また、Mg[#] が補なわれたときには、Na⁺ 0.128~0.486 g atoms/L で発育し、その速度は Na⁺ 0.460, Mg[#] 0.052 g atoms/L (通常の海水中における割合) でいく分大きいようであったが概して大差はみられなかった。

以上を第9表の結果と対比すると、この細菌による Na⁺ の要求はある程度 Ca[#] または Mg[#] によって満たされることが明らかである。すなわち、K⁺ の場合と同様に、Na⁺ を NH₄⁺ でおきかえた第9表における結果よりも Ca[#] または Mg[#] でおきかえた上の場合の方がかなりよい成績を示したことから、単なる滲透圧調節作用の他に少なくとも一部はイオンそのものによる補償的役割を果していると思われる。

(5) 滲透圧の要求に対する各種カチオンの効果

実験(3)および(4)の結果から、この細菌の発育に対する Na⁺ の必要性はおそらく K⁺, Ca[#] または Mg[#] によって一部補償的に代用され得ると考えた。

上の実験は滲透圧をこの細菌の発育に最適である海水のレベルにそろえて行なったものであるが、つぎに Na⁺ は最低要求を満たす程度の低濃度とし、これに各種無機塩類または有機物をいろいろの濃度に加えて種々の滲透圧培地を調製し、この細菌の発育および硫化物生成作用に対する各種カチオンによる滲透圧の影響

Table 13. Effects of the osmotic pressure of culture medium on the growth and the sulfide producing activity (strain SM 1). Desired osmotic pressure was obtained by adding NaCl, NH₄Cl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ or glucose to the basal medium. Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water containing NaCl in the concentration of 0.115 M.

Supplement	Incubation time (hrs.)						
	18		39		61.5		
	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	
Non (Basal medium only: NaCl 0.115 M)	10 ⁴ —10 ⁵	C	10 ⁶ —10 ⁷	0.002	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.083	
NaCl	0.115 M	10 ⁶ —10 ⁷	0.008	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.051	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.109
	0.230	10 ⁷ —10 ⁸	0.013	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.064	10 ⁸ —10 ⁹	0.150
	0.345	10 ⁷ —10 ⁸	0.022	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.071	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.210
Glucose	0.230	10 ⁴ —10 ⁵	C	10 ⁶ —10 ⁷	0.002	10 ⁸ —10 ⁹	0.047
	0.460	10 ³ —10 ⁴	C	10 ² —10 ³	0	10 ⁵ —10 ⁶	0.007
	0.690	10 ³ —10 ⁴	C	10 ³ —10 ⁴	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.005
NH ₄ Cl	0.115	10 ³ —10 ⁴	C	10 ⁷ —10 ⁸	0.005	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.045
	0.230	10 ³ —10 ⁴	C	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.007
	0.345	10 ³ —10 ⁴	C	10 ³ —10 ⁴	0	10 ⁷ —10 ⁸	0.011
KCl	0.115	10 ⁷ —10 ⁸	0.008	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.053	10 ⁸ —10 ⁹	0.115
	0.230	10 ⁷ —10 ⁸	0.008	10 ⁸ —10 ⁹	0.052	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.165
	0.345	10 ⁷ —10 ⁸	trace	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.070	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.167
CaCl ₂	0.115	10 ⁷ —10 ⁸	trace	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.074	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.143
	0.230	10 ⁶ —10 ⁷	trace	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.079	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.179
	0.345	10 ³ —10 ⁴	C	10 ⁸ —10 ⁹	0.056	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.080
MgCl ₂	0.115	10 ⁷ —10 ⁸	0.004	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.061	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.117
	0.230	10 ⁷ —10 ⁸	0.022	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.067	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.163
	0.345	10 ⁶ —10 ⁷	trace	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.078	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.268

響をみた。その結果は第 13 表に示す通りである。

すなわち、NaCl 0.115 M のみを含む基礎培地では、発育および硫化物生成作用がはなはだ緩慢であったが、KCl, CaCl₂ または MgCl₂ を加えて浸透圧を高めた培地ではこの速度が著しく大きくなり、同じモル濃度に NaCl を加えたものとはほぼ等しいか、あるいはそれを上回る値を示した。そして、これらの速度の増大は概して浸透圧の増加と（海水における値付近までは）ほぼ比例したが、CaCl₂ の場合には最高濃度（0.345 M）においてはかえって低下した。また、これら促進作用は初期において Na⁺ がその他のイオンよりもいく分大きいようであったが、大差はみられなかった。一方、ブドウ糖または NH₄Cl を加えて浸透圧を高めた培地では濃度とともに発育速度が小さくなり、明らかな阻害があらわれた。*

以上の結果は、不可欠カチオンがそれぞれこの細菌の最低要求量に存在する場合、発育および activity を主として支配するものは浸透圧であって、各カチオンの相対的比率は必ずしも海水中のそれを必要としないことを示すものといえよう。しかしカチオンの種類によってこの促進作用には多少の強弱が認められたが、さらにまた各イオン間には複雑な拮抗的關係が存在するかも知れない。なおこの場合、有機物は必ずしも有効ではないようである。

(6) Br⁻ および HCO₃⁻ の必要性

実験 (2) において、完全人工海水から Br⁻ および HCO₃⁻ を欠いた塩類溶液で調製された培地でも十分な発育がみられたことから、この細菌の発育には Br⁻ および HCO₃⁻ はほとんど必要でないようにみえる。しかし、この場合の基礎培地中の有機物はアニオン除去処理が行なわれていなかったから、これからの微量の導入が考えられる。そこで、アニオン除去処理が行なわれた有機物を含む基礎培地に、KBr および NaHCO₃ を加えずに、または加えて培養しその影響をみた。

Table 14. Effects of Br⁻ and HCO₃⁻ on the growth and the sulfide-producing activity of sulfate-reducing bacteria strain SM1. (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water.)

Treatment of basal medium with or without "Permutit A"	Added to basal medium (M)	At 30°C after 45 hrs.	
		Cells/ml	Sulfides -S ng/ml
Without	—	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.119
With	—	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.135
With	KBr(0.0008)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.155
With	NaHCO ₃ (0.0023)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.134
With	KBr(0.0008), NaHCO ₃ (0.0023)	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.133

結果は第 14 表に示す通り、有機物からアニオン除去処理を行なった場合にもこの処理を行なわなかった場合と同様の発育と activity を示し、またこれらの塩類を新たに加えてもその効果は認められなかった。したがって、この細菌の発育には Br⁻ および HCO₃⁻ はほとんど必要でないか、または極く微量にしか要求されず、少なくともこれを別に加える必要はないものと思われる。しかし、HCO₃⁻ については、一般に autotrophs のみならず heterotrophs の発育にとってもこれが微量の程度には不可欠であることが認められている。ことに上の場合に HCO₃⁻ 添加の影響がみられなかったのは、発育初期での観察が行なわれなかったこととともに空気中の CO₂ が培地（微アルカリ性）へ吸収され、おそらくこれが主として利用されたことによるのではなかろうか。

炭酸塩添加の影響をさらにくわしく検討するため、上と同様の HCO₃⁻ 欠除の基礎培地にいろいろの濃

* これらによる阻害が他の実験におけるより極めて顕著であったのは、Na⁺ の存在する程度によって阻害の大きさが異なるためかも知れない。

Table 15. Effects of carbonates on the growth and the sulfide-producing activity of sulfate-reducing bacteria strain SM 1. (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water.)

Concentration of carbonates added (M)		Incubation time (hrs.)					
		23		37		59	
NaHCO ₃	CaCO ₃	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
C	0	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.064	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.189
2 × 10 ⁻³	0	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.061	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.144
5 × 10 ⁻³	0	10 ⁵ —10 ⁶	0	10 ⁷ —10 ⁸	0.085	10 ⁸ —10 ⁹	0.119
1 × 10 ⁻²	0	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.074	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.158
2 × 10 ⁻²	0	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁷ —10 ⁸	0.082	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.127
5 × 10 ⁻²	0	10 ³ —10 ⁴	0	10 ² —10 ³	0	1 —10	0
0	5 × 10 ⁻³	10 ⁵ —10 ⁶	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.079	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.204
0	1 × 10 ⁻²	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.069	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.222
0	2 × 10 ⁻²	10 ⁴ —10 ⁵	0	10 ⁶ —10 ⁷	0.075	10 ⁹ —10 ¹⁰	0.224
0	5 × 10 ⁻²	10 ³ —10 ⁴	0	10 ⁴ —10 ⁵	0.082	10 ³ —10 ⁹	0.224

Incubation time (hrs.)			
106		208	
Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
—	0.277	10 ⁶ —10 ⁷	0.133
—	0.218	10 ⁷ —10 ⁸	0.152
—	0.216	10 ⁶ —10 ⁷	0.132
—	0.202	10 ⁵ —10 ⁶	0.146
—	0.229	10 ⁵ —10 ⁶	0.144
—	0	0	0
—	0.227	10 ⁵ —10 ⁶	0.159
—	0.236	10 ⁵ —10 ⁶	0.205
—	0.225	10 ⁴ —10 ⁵	0.204
—	0.252	10 ⁵ —10 ⁶	0.217

度の NaHCO₃ または CaCO₃ を加え、経時的に発育および硫化物生成量を測定した。その結果は第 15 表に示す通りであって、NaHCO₃ についてはほとんど添加の効果があらわれず、むしろ無添加の対照に比して硫化物の最大蓄積量が少ない傾向がみえた。一方、CaCO₃ についてはこの濃度範囲内ではほとんど大差がなかったが、無添加のものに比較すると硫化物の生成速度が概して大きかった。しかし CaCO₃ の最も多い 5 × 10⁻² M では、初期の発育が他のいずれの培地でよりもいく分おくれた。

すなわち、炭酸塩が NaHCO₃ として加えられたときにはこの細菌の発育を促進する作用はほとんどないが、CaCO₃ として存在するときにはある範囲内ではある程度の促進作用があるのではなからうか。後者における促進作用は、不溶性微粒子による固体表面の増加がこの細菌の発育に好都合な条件を与えたためかも知れない。

(7) Cl⁻ および SO₄²⁻ の必要性

海水中におけるアニオンの主要部分を占める Cl⁻ および SO₄²⁻ の必要性について調べた。すなわち、アニオン除去処理を行なった有機物の培地を、Cl⁻ または SO₄²⁻ 欠除の塩類溶液で調製して、発育および

Table 16. Effects of Cl^- and SO_4^{--} on the growth and the sulfide-producing activity of sulfate-reducing bacteria strain S M1.

Modification of the simplified artificial sea water		Incubation time (hrs.)			
		20		41	
Omitted (M)	Added (M)	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
Non	Non	10^8-10^4	0	10^9-10^{10}	0.047
NaCl(0.460), KCl(0.010), MgCl ₂ (0.052)	Na ₂ SO ₄ (0.230), K ₂ SO ₄ (0.005), MgSO ₄ (0.052), Glucose(0.230)	10^8-10^4	0	10^8-10^4	0
NaCl(0.460), KCl(0.010), MgCl ₂ (0.052)	NaBr(0.460), KBr(0.010), MgSO ₄ (0.052)	10^8-10^4	0	10^2-10^3	0
*(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.028)	NH ₄ Cl(0.056)	10^8-10^4	0	10^8-10^4	0

Incubation time (hrs.)							
50		92		120		140	
Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
10^9-10^{10}	0.135	—	0.123	—	0.116	10^8-10^9	0.097
—	0	10^9-10^{10}	0.073	—	0.136	10^8-10^9	0.123
—	0	10^8-10^4	0	10^6-10^7	0.024	10^9-10^{10}	0.102
—	0	10^8-10^4	0	10^2-10^3	0	10^2-10^3	0

* With the medium in which requirement of SO_4^{--} was tested, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ contained in basal medium was replaced by the equimolar FeCl_2 .

硫化物生成作用をみた。この場合、各カチオンの濃度はそれぞれ一定になるようにした。その結果は第16表に示す通り、 Cl^- 塩をすべて相当する SO_4^{--} 塩または Br^- 塩でおきかえると、その速度ははなはだ小さかったが最後には十分な発育と相当量の硫化物生産がみられた。一方、 SO_4^{--} 塩をそれぞれの Cl^- 塩でおきかえた場合には全く発育がおこらなかった。この結果、この細菌の発育にとって Cl^- はおそらく必須ではないが SO_4^{--} は必須不可欠のように見える。後者はこの細菌にとっては水素受容体として主要な代謝基質であるから、(少なくとも他の水素受容体がない場合には) 不可欠であるのは当然と思われる。

つぎに、 Cl^- をいろいろの濃度を含む (Na^+ は等濃度に存在する) 培地で培養し、この細菌の発育および硫化物生成作用と Cl^- 濃度との関係を見た。その結果は第17表に示す通り、 Cl^- を全く加えない場合にも発育がおこったがその速度および硫化物生産量は極めて小さく、その他の濃度範囲内でも発育速度および activity が Cl^- 濃度にある程度比例することがみられた。すなわち、 Cl^- はこの細菌の発育に対してほとんど、または極めて僅かにしか要求されないが、ある範囲内では濃度に比例して発育促進作用をもつものと思われる。

Table 17. Effect of Cl^- concentration on the growth and the sulfide-producing activity of sulfate-reducing bacteria strain SM 1. (The composition of salts solution employed for the preparation of basal medium was: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.028 M; K_2SO_4 , 0.005 M; MgSO_4 , 0.052 M.)

Added to basal medium (M)			Incubation time (hrs.)					
			27		41		50	
NaCl	Na_2SO_4	Glucose	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
0	0.264	0.264	10^8-10^4	0	10^8-10^4	0	10^5-10^6	0
0.026	0.251	0.251	10^8-10^4	0	10^8-10^9	0.010	10^9-10^{10}	0.012
0.052	0.238	0.238	10^8-10^4	0	10^9-10^{10}	0.015	10^9-10^{10}	0.028
0.104	0.212	0.212	10^2-10^3	0	10^9-10^{10}	0.024	10^9-10^{10}	0.046
0.158	0.185	0.185	10^8-10^4	0	10^9-10^{10}	0.028	10^9-10^{10}	0.080
0.264	0.132	0.132	10^2-10^3	0	10^9-10^{10}	0.023	10^9-10^{10}	0.095
0.528	0	0	10^8-10^4	0	10^9-10^{10}	0.033	10^9-10^{10}	0.092

Incubation time (hrs.)					
66		92	98	140	
Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Sulfides -S mg/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml
10^9-10^{10}	0.007	0.058	0.079	10^9-10^{10}	0.061
10^9-10^{10}	0.108	0.085	—	10^9-10^{10}	0.041
10^9-10^{10}	0.116	0.088	—	10^8-10^9	0.040
10^9-10^{10}	0.122	0.075	—	10^9-10^{10}	0.048
10^9-10^{10}	0.120	0.080	—	10^8-10^9	0.026
10^9-10^{10}	0.106	0.061	—	10^8-10^9	0.052
10^9-10^{10}	0.137	0.102	—	10^8-10^9	0.044

また、 SO_4^{--} の必要性については他の水素受容体とともに現在くわしく検討中である。

(8) PO_4^{---} の影響

PO_4^{---} 欠除の基礎培地にいろいろの濃度の $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を加えて、この細菌の発育および硫化物生

Table 18. Effect of PO_4^{---} on the growth and the sulfide-producing activity of sulfate-reducing bacteria strain SM 1. (Basal medium was prepared with the simplified artificial sea water from which $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ was omitted.)

Concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ added to basal medium (g/L)	Incubation time (hrs.)									
	23		37		59		106	208		
	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	Sulfides -S mg/ml	Cells/ml	Sulfides -S mg/ml	
0	10^4-10^5	0	10^4-10^5	0	10^7-10^8	0.082	0.209	10^5-10^6	0.123	
0.015	10^4-10^5	0	10^6-10^7	0.096	10^8-10^9	0.191	0.189	10^4-10^5	0.121	
0.030	10^4-10^5	0	10^6-10^7	0.098	10^9-10^{10}	0.210	0.193	10^5-10^6	0.139	
0.075	10^4-10^5	0	10^5-10^6	0.071	10^9-10^{10}	0.194	0.194	10^5-10^6	0.124	
0.150	10^3-10^4	0	10^5-10^6	0.049	10^8-10^9	0.147	0.204	10^4-10^5	0.142	
0.300	10^4-10^5	0	10^5-10^6	0.066	10^9-10^{10}	0.143	0.185	10^5-10^6	0.129	

成作用をみた。その結果は第 18 表に示す通りである。すなわち、 PO_4^{3-} を全く加えない培地でも十分な発育と硫化物生成作用が示されたが、その速度および activity は他のものにおけるよりもかなり小さかった。一方、 PO_4^{3-} を 0.015~0.300 g atoms/L 加えた培地では、いずれでもほとんど大差なく発育した。

このことから、 PO_4^{3-} はこの細菌の発育にとっておそらく不可欠であって、極めて低濃度においては発育はある程度これの濃度に比例するが、その必要量ははなはだ微量であろうと考えられる。

論 議

一般に、微生物の発育および生理作用にとって K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , PO_4^{3-} あるいは SO_4^{2-} など多くの無機要素が必要である¹⁶⁾ ことは周知の事実であるが、その詳細については余り明らかでない。その主な理由の一つは、培地に夾雑物として導入される微量の塩類を除くことが困難なためである。ことに、有機物を含む培地から塩類を完全に除くことは極めてむづかしく、確実な方法はまだ知られていない。

筆者は SHANKAR・BARD¹³⁾ ほかに数氏がそれぞれ用いた方法を応用し、カチオン交換樹脂 “Permutit H-70” およびアニオン交換樹脂 “Permutit A” によって基礎培地からの有機物除去を試みたが、この方法によって真にイオンを除去することができたか否かは疑わしく*、また細心の注意を払ったにもかかわらず試薬および器具などからの微量の夾雑物の混入をまぬがれ得なかったと思われる。しかし少なくとも、以上の実験においてその存在が発育に不可欠であるか、あるいは発育促進作用をもっていることが示されたものについてはおそらく疑いないところである。

すなわち、 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} および SO_4^{2-} はこの細菌の発育および硫化物生成にとって必須であり、その速度はある範囲内においてはこれらイオンの濃度に比例すると考えられる。また、 PO_4^{3-} については本実験結果ではその不可欠性が示されなかったが**、細菌の代謝系におけるリン酸塩の重要性から、また多くの細菌におけるこの塩の必要性から考えてこのものもおそらく必須であるとみられ、本実験においても低濃度付近では発育がこの濃度に比例することが示された。 Cl^- も同様にその必須性は確認できなかったが、低濃度付近での growth response からみておそらく微量の程度に不可欠ではなからうか。また、 HCO_3^- については、空気中からの CO_2 の溶解を防ぎ得なかったの上で得られた結果をそのまま認めることはできない。一般に細菌の無機塩要求性はその環境条件によって大きく支配されるが、ことに HCO_3^- については、この細菌が facultative autotrophs の一つとみなされ、 H_2 の存在下では炭酸塩あるいは重炭酸塩を水素受容体として細胞原形質の合成に利用すると考えられる^{12) 17)} ので、この意味からしてもこの細菌に対する炭酸塩の重要性は無視できない。しかし、本実験のように他に十分の有機炭素源ならびにエネルギー源が存在するときには、主として heterotrophic な発育を遂げるために炭酸塩は大量には要求されず、その発育促進作用もあらわれなかったとみるのが妥当ではなからうか。この炭酸塩と硫酸塩還元細菌の発育との関係については、POSTGATE¹⁸⁾ が HCO_3^- または CO_2 によって発育が促進されたと報告している。

前報¹⁾において、この細菌の発育可能な NaCl 濃度範囲は 0.5~7.0 %程度であってその至適値は 3.0% 付近であることを明らかにしたが、本報における Na^+ の必要性についての結果と Cl^- に対する要求についての結果とを対照すると、この NaCl の必要性は Cl^- よりも Na^+ の必要性をより強く反映しているように思われる。しかし、この Na^+ そのものの必要限界量は、他のイオンにおけるよりはいく分大きいとはいえ、比較的少ないのであって、これが K^+ , Ca^{2+} または Mg^{2+} によって一部補償的に代用されることがみられた上、一般にこれら Na^+ 以外の塩類によって浸透圧が高められるときにも、それが海水における値に近づくとしたがつて発育および activity が増大することが示された。

* 事実、後報¹¹⁾のように微量の Fe^{2+} が残されていることが判った。

**基礎培地のペプトン中に相当量含まれていると思われる有機態リン化合物は、本報の除去処理では除かれないので、おそらくこれがこのような結果を与えたものと考えられる。

すなわち、この細菌の発育に対する個々のカチオンおよびアニオンの必要性は比較的低濃度で満たされ、これら不可欠イオンが最低要求濃度以上に存在する場合には、この細菌の発育および activity はこれらイオンの濃度比によるよりは、むしろ環境の滲透圧によって大きく支配されることが明らかである。したがって、この細菌の盛んな発育および activity の発現には必ずしも海水の塩分組成を必要とせず、他の塩類による場合であっても必要な滲透圧が保たれている環境下では (SO_4^{--} が十分存在するときには) この細菌が盛んな発育と硫化物生成作用を示すことがあり得ると考えられる。

摘 要

海洋性硫酸塩還元細菌の発育および硫化物生成作用に対する各種カチオンおよびアニオンの必要性をしらべ、つぎの結果を得た。

1. この細菌の発育に対して Na^+ , K^+ , Mg^{2+} および SO_4^{--} は必須不可欠であり、 Cl^- , HCO_3^- および PO_4^{---} もおそらく不可欠のようであったが、 Ca^{2+} および Br^- の存在は (海水中における濃度付近では) ほとんどその影響が認められなかった。
2. 不可欠イオンのそれぞれの必要限界量は極めて微量であり、ある程度相互に補償的に代用できた。
3. この細菌の発育および activity を主として支配するものは (その他の条件が満たされたときには) 環境の滲透圧であって、イオンの相対的濃度比は必ずしも海水中のそれを必要としなかった。

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、イオン交換樹脂の入手にご便宜をいただいた東京大学大学院富山哲雄氏に深謝する。

文 献

- 1) 畑 幸彦：1960. 本報告, **9**, 329—345.
- 2) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明：1955. 日本水産学会誌, **21**, 113—118.
- 3) BUTLIN, K. R., M. E. ADAMS and M. THOMAS : 1949. *J. gen. Microbiol.*, **3**, 46—59.
- 4) POSTGATE, J. R. : 1956. *J. gen. Microbiol.*, **15**, 186—193.
- 5) MILLER, L. P. : 1950. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **16**, 74—83.
——— : 1950. *Ibid.*, **16**, 85—89.
- 6) UPDEGRAFF, D. M. and G. B. WREN : 1952. *Bact. Proc.*, p. 136.
- 7) BAAS BECKING, L. G. M. and E. J. F. WOOD : 1955. *Proc. Kon. Ned. Ak. v. Wet. Amsterdam*, **58**, 160—181.
- 8) 鈴木新一・志賀一一：1953. 中国農試報告, A (2), 73—90.
- 9) KOYAMA, T. and K. SUGAWARA : 1953. *J. Earth Sci.*, Nagoya Univ., **1**, 24—34.
- 10) MACLEOD, R. A. and E. ONOFREY : 1956. *J. Bact.*, **71**, 661—667.
——— : 1957. *Cand. J. Microbiol.*, **3**, 753—759.
- 11) 畑 幸彦：1960. 本報告, **9**, 363—375.
- 12) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦：1955. 日本水産学会誌, **21**, 229—234.
——— : 1955. ———, **21**, 235—239.
- 13) SHANKAR, K. and R. C. BARD : 1952. *J. Bact.*, **63**, 279—290.
- 14) LYMAN, J. and R. H. FLEMING : 1940. *J. Marine Research*, **3**, 134—146.
- 15) 富山哲夫・神崎嘉瑞夫：1951. 日本水産学会誌, **17**, 115—121.
- 16) SNELL, E. E. : 1951. "Bacterial Physiology (Ed. by WERKMAN, C. H. and P. W. WILSON)", Academic Press, New York. pp. 219—220.
KNIGHT, S. G. : 1951. *Ibid.*, pp. 500—516.
- 17) SISLER, F. D. and C. E. ZOBELL : 1951. *J. Bact.*, **62**, 117—127.
- 18) POSTGATE, J. R. : 1951. *J. gen. Microbiol.*, **5**, 714—724.