

海洋性硫酸塩還元細菌に関する研究—VII.

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1) ※

畑 幸彦・三好英夫*・門田 元*・木俣正夫**

Studies on the Marine Sulfate-Reducing Bacteria—VII.

Relation between the Activity of Marine Sulfate-Reducing Bacteria and
the Oxidation-Reduction Potential of the Culture Media (1)

By

Yoshihiko HATA, Hideo MIYOSHI, Hajime KADOTA and Masao KIMATA

The growth and activity of marine sulfate-reducing bacteria are significantly influenced by the oxidation-reduction potential of the environment; these bacteria are able to grow and to reduce sulfate only under the condition of a relatively low Eh value. These microorganisms, on the other hand, tend to create reducing conditions in the environments primarily by the formation of hydrogen sulfide which is an intense reducing substance. It seems, therefore, important to study the relation between the activity of sulfate-reducing bacteria and the oxidation-reduction potential of the environment, when we consider the activities of these microorganisms in relation the various biological processes taking place in marine or estuarine environments.

The present paper describes the response of marine sulfate-reducing bacteria to various media having different Eh values as well as the effects of the activity of these bacteria upon the oxidation-reduction potential of the environmental media.

The results obtained are shown in Figs. 1—9 and Table 1, and may be summarized as follows:

(1) In the media containing L-ascorbic acid or Na_2S as reducing agents, marine sulfate-reducing bacteria required an oxidation-reduction potential of lower than Eh +0.20 volt for the initiation of growth.

The lower the initial oxidation-reduction potential of the media, the shorter were the lag periods in the growth and in the sulfate reduction within certain limits. When

※ 水産講習所研究業績 第271号, 1959年7月21日 受理

* 京都大学食糧科学研究所

** 京都大学農学部水産学教室

the oxidation-reduction potentials of the media were low enough for these bacteria to initiate the growth, however, the maximum number of cells, the highest concentration of sulfides and the lowest value of Eh which resulted from the growth were almost constant regardless of the initial Eh value of the media. These bacteria generally lowered the oxidation-reduction potentials of culture media to about Eh -0.20 volt.

(2) The growth and the sulfate-reducing activity of these bacteria were partly inhibited by "free hydrogen sulfide", when this substance was contained in the media in high concentration. But in case that the greater part of the sulfides occurred as FeS, the growth and the activity of these organisms were not retarded. These results suggest that when the sulfides are contained in the form of "insoluble metallic sulfides", the growth and the activity of these bacteria are not suppressed, even if the concentration of total sulfides present is very high.

海洋性硫酸塩還元細菌は偏性嫌気性細菌であって、底土のような酸化電位の低い環境下においてのみ生育することができる。又、この細菌の硫酸塩還元作用によって生産される硫化物は強い還元性物質であるから、この細菌の発育にともなって環境培地の酸化還元電位は著しく変動することが予想される。したがって、この細菌の増殖あるいは硫酸塩還元作用と環境培地の酸化還元電位との関係は、自然環境下におけるこの細菌の活動ならびにそれが他の生物に及ぼす影響を検討するさいに、考慮しなければならない重要な課題の一つであると考えられる。

第 III 報¹⁾において、われわれは、この細菌の発育と培地の酸化還元電位降下剤としての L-ascorbic acid の濃度との関係に関する予備的実験を行なったが、本報ではこれを拡張し、この細菌の発育および硫酸塩還元作用と、培地の酸化還元電位との関係を種々の角度からさらにくわしく検討した結果を報告する。

実 験

(1) 海洋性硫酸塩還元細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用に及ぼす L-ascorbic acid の影響

これまでの実験においては、海洋性硫酸塩還元細菌の発育に必要な嫌気的条件を与えるため培地に通常 0.1 g/L の割合で L-ascorbic acid を添加して培養を行なって来たが、ここでは培地に添加する L-ascorbic acid の濃度を数段階にかえた場合、この細菌の発育、硫酸塩還元作用および培地の酸化還元電位がそれによってどのような影響を受けるかを検討した。実験方法は次の通りである。

Medium 1²⁾* から L-ascorbic acid を除いたものを基礎培地とし、これに L-ascorbic acid を種々の濃度に加え、これらのおおのほに、硫酸塩還元細菌の純粋培養から得た洗滌菌体懸濁液を少量宛接種して 30°C に培養し、細菌数、硫化物生成量ならびに培地の酸化還元電

* 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, 0.2 g; FeSO₄ · 7H₂O, 0.2 g; agar, 3.0 g; filtered sea water, 1,000cc; pH 7.5

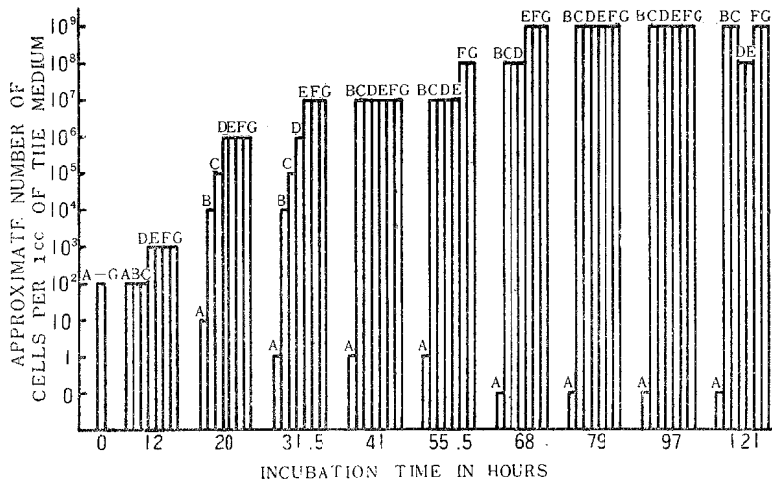


Fig. 1. Growth of sulfate-reducing bacteria at 30°C in the media containing L-ascorbic acid in various concentrations: medium A, 0 g/L; medium B, 0.01 g/L; medium C, 0.02 g/L; medium D, 0.03 g/L; medium E, 0.05 g/L; medium F, 0.1 g/L; medium G, 1.0 g/L.

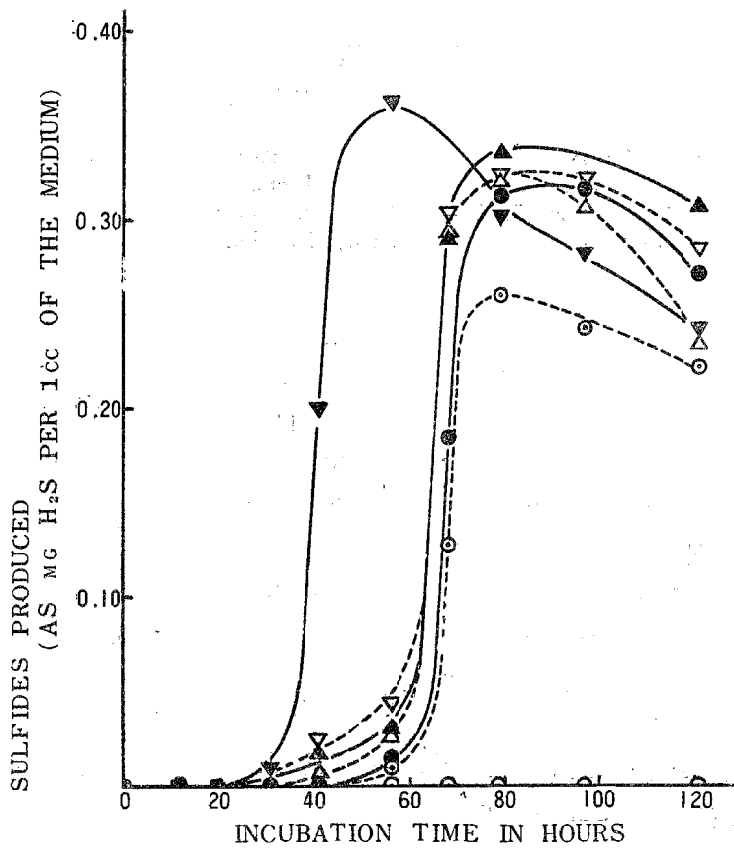


Fig. 2. Development of sulfides by sulfate-reducing bacteria at 30°C in the media containing L-ascorbic acid in various concentrations. Concentrations of L-ascorbic acid in the media were the same as those employed in Fig. 1.

○, medium A; ●, medium B; ●, medium C;
 △, medium D; ▲, medium E; ▽, medium F;
 ▼, medium G.

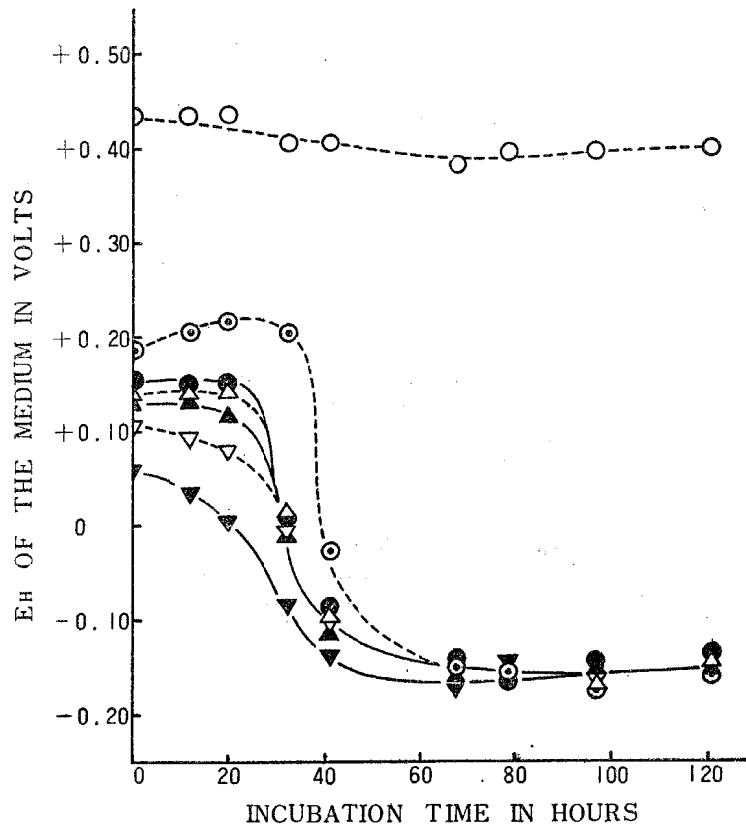


Fig. 3. Changes in oxidation-reduction potential of the media inoculated with sulfate-reducing bacteria during the incubation at 30°C. Composition of the media and their marks were the same as those employed in Fig. 2.

位の変化を経時的に測定した。洗滌菌体懸濁液を用いたのは、接種にともなう前培養から多量の還元性物質が導入されるのを防ぐためであって、懸濁液の調製は次の方法によった。

すなわち、まず海洋性硫酸塩還元細菌を、Medium 1²⁾ から寒天を除き、また $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度を 0.05 g/L とした液体培地* に 30°C で 36 時間前培養し、これを 2,500 r. p. m. で 5 分間遠心して集菌し、滅菌海水で 2 回洗滌後、滅菌海水に再懸濁した。この洗滌菌体懸濁液を 0.01 cc/L の割合で被検培地に接種した。

細菌数の測定は Medium 1²⁾ を用いて extinction dilution method によって行ない、硫化物の定量は富山・神崎の方法³⁾ に従った。また、培地の酸化還元電位の測定には電位差計を用いた。なお、培養にさいしては、生産される硫化物の酸化、逸散を防ぐため、培養液の表面を約 2 cm の厚さに滅菌流動パラフィンで覆った。

実験の結果は第 1, 2 および 3 図に示す通りである。すなわち、L-ascorbic acid 無添加の対照区においては、硫酸塩還元細菌の生菌数が時間とともに減少したのに対して、L-ascorbic acid を 0.01 g/L** 以上含む培地 (すなわち、initial Eh +0.2 volt 程度以下の培地) では

* 前培養培地中の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を少なくしたのは、接種にともなう FeS が多量に導入されるのを防ぐためである。

** 第 III 報の実験では、L-ascorbic acid の濃度が 0.01g/L の培地においても増殖がみとめられなかったが、これは、その際に用いた細菌の age がこの実験に用いたもののそれより old であったことによるものではないかと推定される。

接種後 12~20 時間位で増殖し始め、70~80 時間位で最大数 ($10^9 \sim 10^{10}$ cells/cc) に達した。この増殖速度は L-ascorbic acid の添加量の多いものにおける程大きかった。増殖にともなう硫化物の生成も、これとほぼ同様の傾向を示し、0.01 g/L 以上に L-ascorbic acid を含む培地では30~40時間頃から急激に増加した。この生成速度もまた一般に L-ascorbic acid 濃度の高い培地における程大きかった。培地の酸化還元電位は、培養開始時には当然 L-ascorbic acid の濃度の高いもの程低い値を示したが、無添加の対照区を除いていずれの培地でも、細菌の発育ならびに硫化物の生成にともなって20時間前後から急激に降下した。また、これが最低値に達するまでの時間は、細菌の発育および硫酸塩の還元と同様に L-ascorbic acid の濃度の高いものにおける程短かかったが、最後に到達する最低値そのものは、いずれの培地でもほぼ等しく Eh -0.15 volt 附近の値を示した。

この酸化還元電位の降下は主として硫化物の蓄積によって起ったものと推定されるが、第1、2および3図を比較検討すると、酸化還元電位の降下はわずかながら硫化物の生成に先行し、むしろ発育自体と、より密接に関連して起っているようにみえる。そこでこの点を更に確かめるため、次に L-ascorbic acid の添加量を 0.1 g/L とした培地について測定間隔を短縮して上と同様の実験を行なった。その結果は第4図に示す通りである。

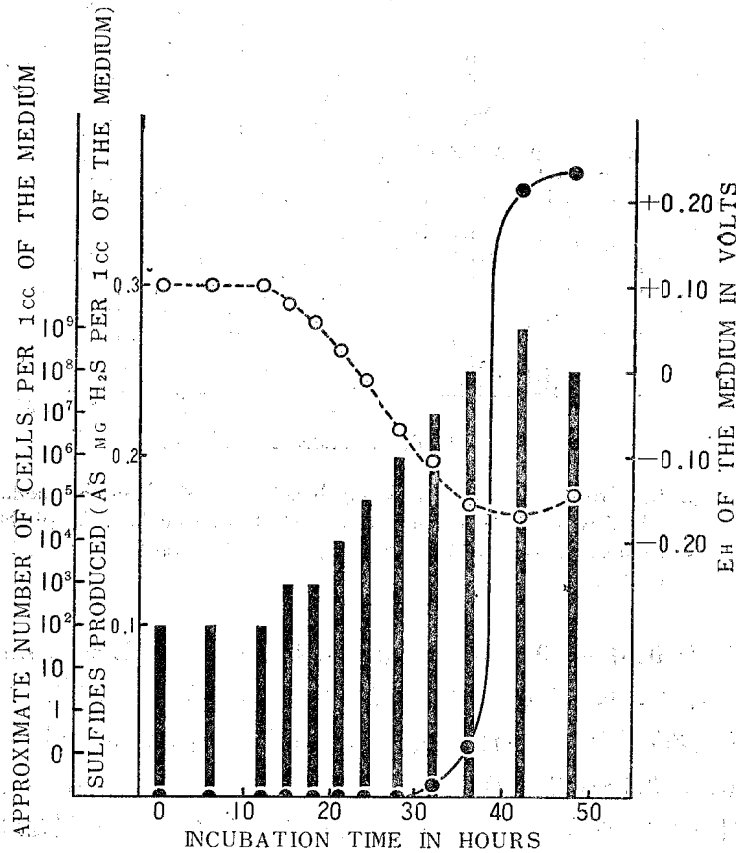


Fig. 4. Relation between the growth of sulfate-reducing bacteria, the production of sulfides and Eh of the medium at 30°C (initial concentration of L-ascorbic acid: 0.1 g/L).
 ■■■■, number of cells; —●—, sulfides formed;
 ...○..., Eh of the medium.

すなわち、培地の酸化還元電位は、細菌の発育が認められるのと殆んど同時に（15時間頃より）降下し始め細菌数の増加にともなって漸次低くなったが、一方、硫化物の生成はこれよりおくれ、32時間前後になってはじめて検出し得た。以上の結果は、培地の酸化還元電位の降下が、少なくとも培養初期においては、硫化物の蓄積に先行する細菌の増殖に附随して起こることを示している。

(2) 海洋性硫酸塩還元細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用に及ぼす硫化物の影響

実験(1)の結果、培地中に存在する L-ascorbic acid の濃度が高くなるにしたがって、この細菌の発育ならびに硫酸塩還元速度が大きくなることが明らかになったが、次に、この細菌が天然のいわゆる還元泥中に存在する場合のように、硫化物を多量に含有する培地に生育するとき、その発育および硫酸塩還元作用が硫化物によって如何なる影響を受けるかを検討するため、L-ascorbic acid の代わりに Na_2S を種々の濃度に添加した培地を用いて(1)と同様の実験を試みた。その結果は第5、6および7図に示す通りである。

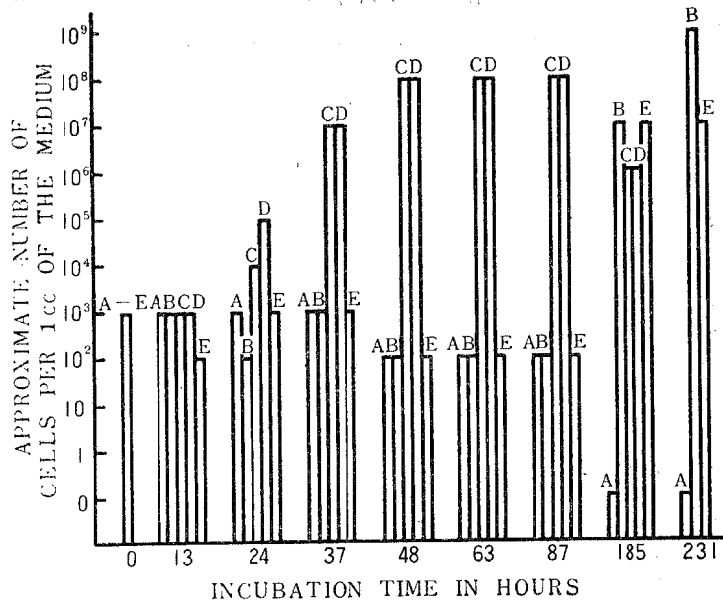


Fig. 5. Growth of sulfate-reducing bacteria at 30°C in the media added with Na_2S in various concentrations: medium A, 0 mM; medium B, 0.01 mM; medium C, 0.1 mM; medium D, 1.0 mM; medium E, 10.0 mM.

すなわち、 Na_2S を 0.01~1.0 mM の濃度に加えた培地では L-ascorbic acid の場合と同様にいずれもよく発育し、 Na_2S の添加量の多いものにおける程、発育、硫化物生成ならびに酸化還元電位降下の速度が大きかった。然るに、 Na_2S の濃度が 10 mM の培地では発育および硫化物生成の速度が 0.1~1.0 mM の場合よりもかえって低くなり、 Na_2S 濃度 0.01 mM の培地でのそれに匹敵する程度にとどまった。これは、硫化物がある程度以上の濃度に存在すると、この細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用が一部阻害されるためと思われる。よって、この点を更に確かめるため、次の実験を試みた。

Medium 1²⁾ から Ca-lactate, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および L-ascorbic acid を除き lactic acid を 4.0 g/L 加えたものを基礎培地とし、これに $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ および $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を種

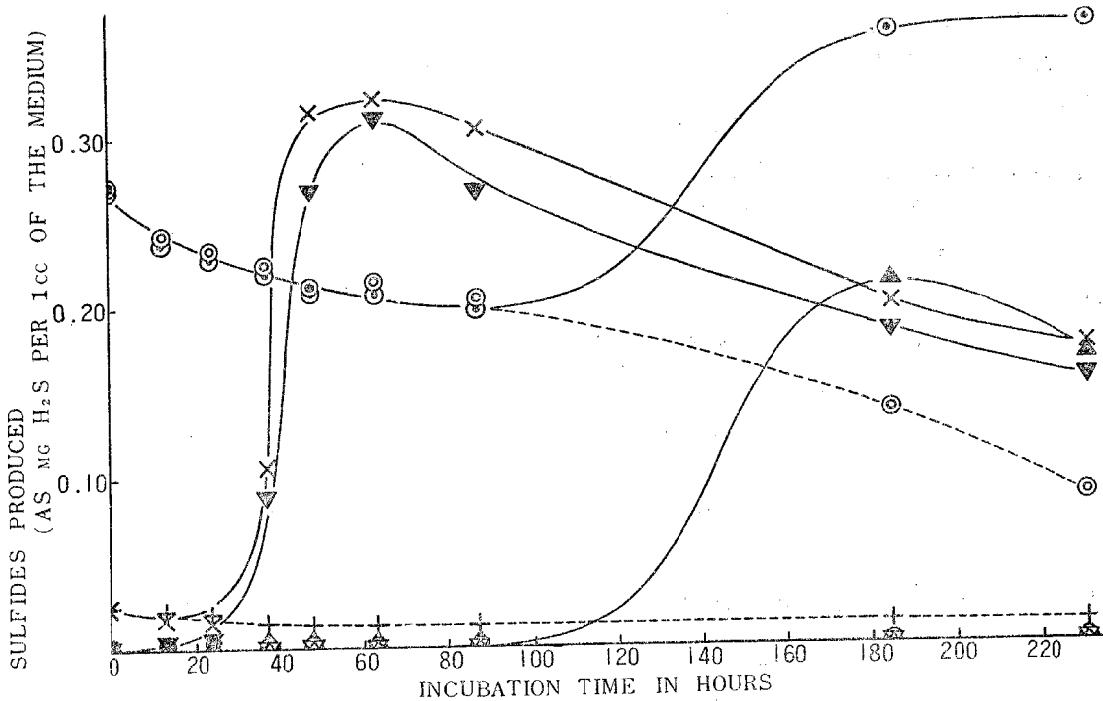


Fig. 6. Development of sulfides by sulfate-reducing bacteria at 30°C in the media added with Na₂S in various concentrations. Concentrations of Na₂S in the media were the same as those employed in Fig. 5.

—●— and ...○..., medium A; —▲— and ...△..., medium B; —▼— and ...▽..., medium C; —×— and ...+..., medium D; —●— and ...○..., medium E.
 —: inoculated with sulfate-reducing bacteria; ...: uninoculated control.

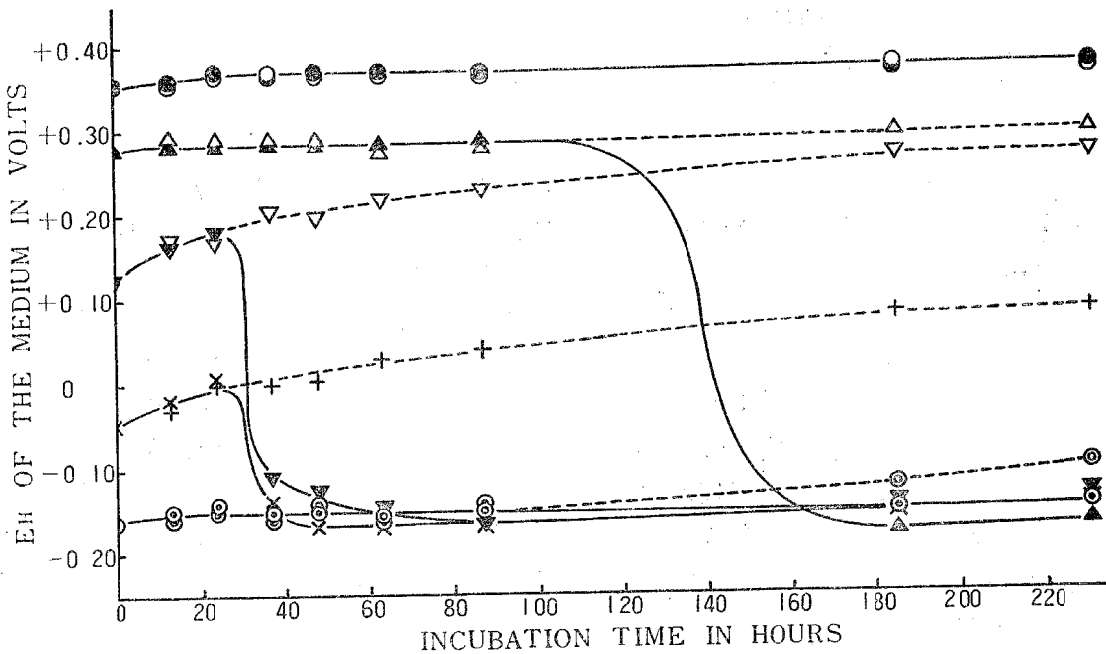


Fig. 7. Changes in oxidation-reduction potential of the media inoculated with sulfate-reducing bacteria during the incubation at 30°C. Composition of the media and their marks were the same as those employed in Fig. 6.

種の濃度に添加して上述と同様の方法で接種，培養を行ない，細菌の発育，硫化物の生成ならびに培地酸化還元電位の変動を測定観察した。この場合における硫化物は，“遊離硫化水素”^{*}と不溶性金属硫化物^{**}とに分けて定量した。その結果は第1表，および第8ならびに9図に示す通りである。

Table 1. Production of "insoluble metallic sulfides" and "free H₂S" by sulfate-reducing bacteria in media added with Na₂S and FeSO₄ in various concentrations at 30°C.

| Medium | Concentrations of supplements (mM) | | Sulfides (H ₂ S mg/cc of medium) | | | | | | |
|--------|------------------------------------|-------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Na ₂ S | FeSO ₄ | Incubation time (hours) | 0 | 23 | 46 | 70 | 142 | 214 |
| A | 1.0 | 1.0 | Free H ₂ S | 0.012 | 0.014 | 0.208 | 0.137 | | |
| | | | Insoluble sulfides | 0.018 | 0.011 | 0.029 | 0.031 | | |
| B | 1.0 | 10.0 | Free H ₂ S | 0.010 | 0.088 | 0.063 | 0.077 | | |
| | | | Insoluble sulfides | 0.021 | 0.013 | 0.240 | 0.159 | | |
| C | 1.0 | 50.0 | Free H ₂ S | 0.012 | 0.007 | 0.033 | 0.041 | | |
| | | | Insoluble sulfides | 0.020 | 0.013 | 0.222 | 0.218 | | |
| D | 10.0 | 1.0 | Free H ₂ S | 0.173 | 0.114 | 0.090 | 0.123 | 0.177 | |
| | | | Insoluble sulfides | 0.019 | 0.025 | 0.031 | 0.034 | 0.044 | |
| E | 10.0 | 10.0 | Free H ₂ S | 0.068 | 0.023 | 0.156 | 0.110 | | |
| | | | Insoluble sulfides | 0.154 | 0.125 | 0.250 | 0.286 | | |
| F | 50.0 | 1.0 | Free H ₂ S | 0.779 | 0.648 | 0.554 | 0.332 | 0.202 | 0.102 |
| | | | Insoluble sulfides | 0.031 | 0.036 | 0.032 | 0.031 | 0.028 | 0.027 |
| G | 50.0 | 50.0 | Free H ₂ S | 0.125 | 0.077 | 0.088 | 0.089 | | |
| | | | Insoluble sulfides | 0.777 | 0.634 | 1.098 | 0.485 | | |

* detected by steam distillation from neutral solution.

すなわち，medium A，B および C におけるように Na₂S の添加量が少ないか，又は medium E および G におけるように Na₂S が多くても同時に FeSO₄ · 7H₂O の添加量も多く従って“遊離硫化水素”の初発濃度が低い培地では，たとえ“不溶性金属硫化物”（この場合は FeS）が極めて高濃度に存在しても，つねに発育速度は大であった。一方，medium D および F におけるように，Na₂S に比して FeSO₄ · 7H₂O の添加量がいちじるしく少なく従って最初から“遊離硫化水素”が高濃度に存在する培地では，培地の初発酸化還元電位ならびに全硫化物量がそれぞれ medium E および G におけるとほとんど同様であるにもかかわらず，発育ならびに硫化物生成作用がいちじるしく阻害され，初発“遊離硫化水素”量の特に高い medium F においては214時間後にも発育が全くみられなかった。また，medium A および E におけるように，発育にともなって“遊離硫化水素”の蓄積が顕著になるとそれ以後の発育が阻害される傾向がみられた。培地の酸化還元電位は，つねに発育ならびに硫酸塩還元作用にともなって急激に降下した。

* 富山・神崎の定量法³⁾において，試料を塩酸性とせずそのまま（微アルカリ性で）蒸溜したときに溜出するものであって，厳密な意味での free H₂S のみを指すものではない。

** 上記の方法で蒸溜した後の試料を，更に塩酸性で蒸溜したときに溜出するもの。

結局以上の実験から、培地中に高濃度に硫化物が存在する場合、これが大部分“遊離”の硫化水素として存在するときには、この細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用がいちじるしく阻害されるが、 Fe^{++} と反応して不溶性硫化鉄として存在するときには、それがたとえ極めて高濃度 (H_2S として 0.8 mg/cc 程度) であっても発育ならびに硫酸塩還元作用は何ら阻害を受けないことが明らかになった。しかして、この“遊離硫化水素”による阻害作用はほぼ H_2S 0.15 mg/cc 以上で起るものと推定される。また、培地の初発“遊離硫化水素”の濃度が高すぎたために発育が阻害された medium Dにおいては、かなりおくられて発育ならびに硫化物の生産が開始されたが、これは“遊離硫化水素”の酸化、逸散にもとづく減少によってその阻害が消失したためか、またはこの程度 (0.173 mg/cc) の硫化水素の存在下でも緩慢ながら発育が行われるためであろう。“遊離硫化水素”の濃度の最も高い (0.779 mg/cc) medium F においては、更に約1カ月後“遊離硫化水素”

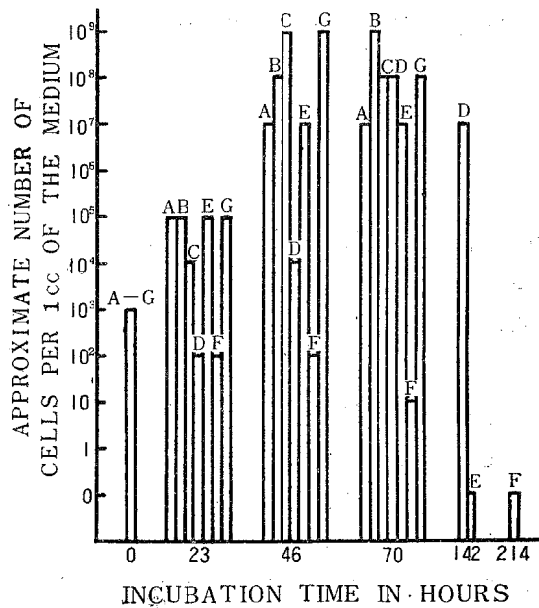


Fig. 8. Growth of sulfate-reducing bacteria at 30°C in the media added with Na_2S and $FeSO_4$ in various concentrations:

| medium | concentrations of supplements (mM) | |
|--------|------------------------------------|----------|
| | Na_2S | $FeSO_4$ |
| A | 1.0 | 1.0 |
| B | 1.0 | 10.0 |
| C | 1.0 | 50.0 |
| D | 10.0 | 1.0 |
| E | 10.0 | 10.0 |
| F | 50.0 | 1.0 |
| G | 50.0 | 50.0 |

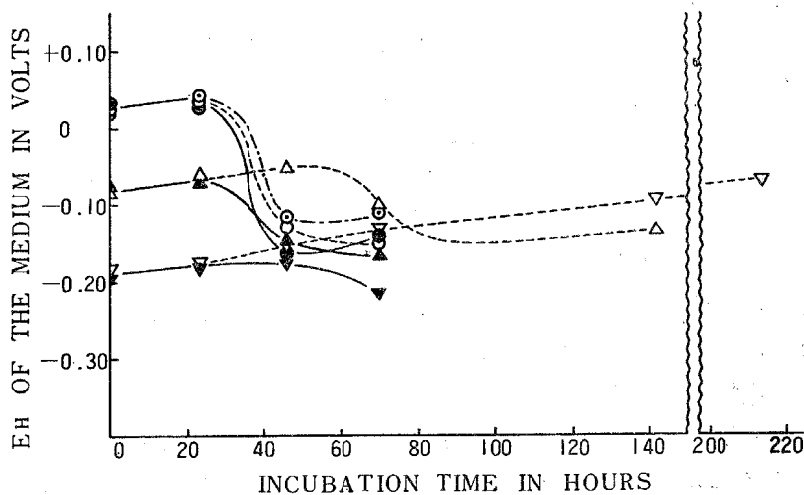


Fig. 9. Changes in oxidation-reduction potential of the media inoculated with sulfate-reducing bacteria during the incubation at 30°C . Composition of the media were the same as those employed in Fig. 8.
 ...○..., medium A; ---●---, medium B; —●—, medium C;
 ...△..., medium D; —▲—, medium E; ...▽..., medium F;
 —▼—, medium G.

がいちじるしく減少(約 0.03 mg/cc)した後においても全く発育が行われなかったが、これは不可逆的変化によって菌体が死滅したためであろう。

総 括

以上の実験(1)および(2)の結果、培地中における L-ascorbic acid または Na_2S の濃度が高くなる程この細菌の発育、硫酸塩還元作用ならびにそれらにともなう培地の酸化還元電位の降下がすみやかになることが明らかになった。しかし一般に、発育が起りさえすれば、発育の終りに達せられる増殖量、硫化物生成量ならびに酸化還元電位の最終値には、還元性物質の添加量の多少による差はみられなかった。このことは、これらの還元性物質がそれ自体この細菌の代謝に利用されるのではなく、培地の酸化還元電位降下剤として作用することを示すものであろう。つまり、これらの物質の濃度が高いほど培地の初発酸化還元電位は低くなり、それにともなって、この細菌の発育開始までの時間が短くなるものと考えられる。一方、実験(2)の結果からわかるように、極めて高濃度に硫化物が存在すると、培地の酸化還元電位はいちじるしく低くなるにもかかわらず、かえってこの細菌の発育ならびに硫化物の生成が抑制されたが、これは大量の“遊離硫化水素”による発育阻害作用にもとづくものであつて、培地に Fe^{++} が存在して不溶性の FeS として沈降するときには、全硫化物濃度が極めて高く(H_2S として 0.8 mg/cc 程度)でも阻害は起らないことが明らかになった。この点については、MILLER⁴⁾⁵⁾もまた、硫酸塩還元細菌 *Desulfovibrio desulfuricans* による硫化物の生成が大量の硫化水素によって阻害されるが、硫化水素を酢酸亜鉛に吸収させて除くか又は培地に Fe, Cd, Sb, Bi または Pb などの化合物を加えて不溶性硫化物として沈澱させると、硫化物の生成が盛んになることを報告している。海洋性硫酸塩還元細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用に対する金属塩類の影響については現在詳細に検討中であるが、 Fe^{++} のみならず不溶性硫化物を生成するその他の金属イオンによっても、この細菌の発育に対する硫化水素の阻害作用は除かれるものようである。

海底泥土中には、通常、鉄その他不溶性硫化物を生成する金属が相当多量に含まれており、たとえば諸種の海城における red clay 中には塩類、有機物、 CaCO_3 および水分を除いたものについて Fe は Fe_2O_3 として 6.18~9.59% (すなわち 387~600 m-mol/1,000 g) 存在する⁶⁾から、天然においては生産された硫化物は大部分が不溶性硫化物として沈降するため、この細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用は“遊離硫化水素”による阻害作用を受けることなく継続して行なわれるものと推察される。

次に、実験(1)の結果、培地の酸化還元電位の降下は硫化物の生成に先行し、むしろ発育にともなっておこることが観察されたが、これは恐らく著者らの用いた硫化物定量法で検出され得ない微量の硫化物またはその他の還元性物質の生成によって起ったものか、あるいは増殖した細菌細胞自体の代謝にもとづく還元作用によって生じたものと考えられる。後者については、CLIFTON⁷⁾が *Escherichia coli* について、また STOLP⁸⁾が *Clostridium butyricum* について行った実験において指摘しているが、この実験の場合にも酸化還元電位の降下は細菌細胞自体の還元作用と密接な関連があるかと推定される。また、この細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用にともなって降下する培地の酸化還元電位の最低値は、以上の諸実験を通じて Eh -0.15~-0.17 volt 程度であった。

摘 要

1. 海洋性硫酸塩還元細菌は、還元性物質として L-ascorbic acid または Na_2S をふくむ培地では、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たが、その発育および硫酸塩還元速度は、一定の範囲内では培地に加えられた還元性物質の濃度が高いほど大であった。しかし一旦発育を開始したものにおいては、最後に到達する細菌数および硫化物生産量の最大値、ならびに酸化還元電位の最低値は、培地の初発 Eh の高低にかかわらずほぼ一定の値を示した。

2. 培地に高濃度の“遊離硫化水素”(約0.15 mg/cc 以上)が存在する場合、この細菌の発育ならびに硫酸塩還元作用はいちじるしく阻害されたが、硫化物が大部分 FeS として存在するときは発育ならびに硫酸塩還元作用は阻害を受けなかった。このことから、一般に、硫化物が“不溶性金属硫化物”として存在するときには、全硫化物の濃度が極めて高くても、この細菌の増殖および代謝はそれによる阻害を受けないことを推定した。

文 献

- 1) 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.
- 2) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明：1955. 日本水産学会誌, **21**, 102—108.
- 3) 富山哲夫・神崎嘉瑞夫：1951. 日本水産学会誌, **17**, 115—121.
- 4) MILLER, L. P. : 1950. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, **16**, 73—83.
- 5) MILLER, L. P. : 1950. *ibid*, **16**, 85—89.
- 6) SVERDRUP, H. U. et al. : 1949. "The Ocean," 3rd ed., Prentice-Hall, New York, pp. 991.
- 7) CLIFTON, C. E. et al. : 1934. *J. Bact.*, **28**, 541—559.
- 8) STOLP, H. : 1955. *Archiv Mikrobiol.*, **21**, 293—309.