

汚濁沿岸海域におけるヘミセルロース 分解細菌の生態に関する研究*

村 上 正 忠

Studies on Ecology of Hemicellulose-decomposing Bacteria in Polluted Coastal Waters

By

Masatada MURAKAMI

目 次

1. 序 論	115
2. 沿岸海域におけるヘミセルロース分解細菌の分布	116
2・1 ヘミセルロース分解細菌の培養計数法	116
2・1・1 平板培養法によるキシラン分解細菌の判定	116
2・1・2 好気性キシラン分解細菌の培養計数用培地の検討	118
2・1・3 液体培養法による好気性ヘミセルロース分解細菌の判定および細菌計数法	120
2・1・4 嫌気性ヘミセルロース分解細菌の計数法の検討	122
2・1・5 キシラン分解糸状菌および放線菌の計数用培地の検討	123
2・2 広湾における海水中の好気性ヘミセルロース分解細菌の分布	125
2・3 広湾における底泥中のヘミセルロース分解細菌の分布	128
2・4 広湾における底泥中のキシラン分解糸状菌および放線菌の分布	136

* 水産大学校研究業績 第1035号, 1984年11月7日受理.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1035. Received Nov.7,1984

2・5	岩国沿岸海域における海水中の好気性キシラン分解細菌の分布	137
2・6	非汚濁海域（吉見沿岸）におけるヘミセルロース分解細菌の分布	140
3.	沿岸海域におけるヘミセルロース分解細菌の分布に関する推計学的解析	145
3・1	広湾における海水中のヘミセルロース分解細菌の分布に及ぼす環境因子の影響	145
3・2	広湾における底泥中のヘミセルロース分解細菌の分布に及ぼす環境因子の影響	149
3・3	パルプ廃水流入海域と非汚濁海域とでの細菌の分布の差異	155
4.	好気性キシラン分解細菌の菌学的性状	159
4・1	広湾から分離した好気性キシラン分解細菌の菌学的性状	160
4・2	非汚濁海域（吉見沿岸）から分離した好気性キシラン分解細菌の菌学的性状	164
5.	培養実験による基質の分解	167
5・1	好気性キシラン分解細菌の基質分解能	167
5・2	底泥培養実験におけるヘミセルロースの分解および硫化物の生成	170
6.	総 括	176
	謝 辞	178
	文 献	178
	Summary	182

1. 序 論

沿岸海域へ流入する産業廃水のうち、パルプ工場からの廃水は、リグニン、セルロース、ヘミセルロースおよびそれらの分解物を多量に含み、種々の環境問題および漁業被害の原因となるため、1950年代を中心に環境科学的観点から数多くの研究¹⁻⁶⁾が行われた。当時のパルプ産業ではサルファイトパルプが主体であり、研究もそれを対象にしたものが大部分を占めていた。しかし、その後パルプ産業を取り巻く情勢は変化し、原料用材および樹種の多様化などに伴って、パルプ製造法においては、サルファイトパルプ法から、クラフトパルプ法への転換が行われた。このクラフトパルプ法では、多量のリグニンを含む蒸解工程からの廃液は燃焼され、薬品の回収および自家発電用動力源として利用される^{7, 8)}。したがって、この工程からのリグニンが汚濁の原因になることはない。クラフトパルプ廃水に含まれるリグニンは、主として漂白工程からの原液液に含まれる塩素化リグニンまたはオキシリグニン⁹⁾に由来するものであるが、その量は少ない。一方、ヘミセルロースも蒸解液中へ溶出した部分は回収工程で焙焼されるが、パルプ中に残留する部分はその後の各工程から微細繊維などとして廃水中へ移行する^{10, 11)}。

上述のように、パルプ工場廃水自体の内容は、時代と共に次第に変化してきたが、そのうえに、排水規制が強化されたこともあって、対応策も変化し、色やCOD値に対する影響の強いリグニン系物質の除去に重点をおいた廃水処理^{8, 12)}が充実されてきた。この変化を反映して近年の廃水のCOD値⁸⁾は、過去のそれ¹³⁾よりはるかに低くなり、また、パルプ廃水流入海域における海水中のリグニン濃度もCOD値と共に減少してきた¹⁴⁾。また、廃水中にわずかに含まれるリグニンは主として漂白廃水に由来するため、従来のサルファイトパルプ廃液に含まれていたリグニンスルホン酸やクラフトパルプ蒸解液に含まれていたチオリグニンとは異なる低分子量のリグニン分解物からなり¹⁵⁾、流動拡散によって希釈され、広い海域へと分散するようになった。しかし、クラフトパルプ法工程の中で用廃水量の多い晒・製紙工程からの廃水の処理は、現状ではまだ完全とは言えず、セルロースやヘミセルロースなどが廃水中にかなり含まれ、それらが長い年月の間には排水口周辺に沈積することが報告されている¹⁶⁾。これらの物質は微生物の作用を受けて次第に分解され、有機酸などを経て無機化されるが、その分解・無機化過程で生ずる乳酸、ピルビン酸

およびギ酸などは硫酸還元細菌の増殖¹⁷⁾や硫酸還元反応¹⁸⁾の水素供与体として利用される。そのため、海域の二次的汚濁としての硫化物の生産は相変わらず続いている^{16, 19)}。以上のように、パルプ工場廃水による汚濁問題は部分的には改善されたが、現在でも完全に解決したとは言えない状況にある。

ここでクラフトパルプ法工程からの廃水の成分について述べる。この場合のパルプ廃水中の重要な有機物であるヘミセルロースは、パルプ用材の樹種によって異なり、広葉樹では、そのほとんどがグルクロノキシランであり、針葉樹ではグルコマンナンが多く、それに次ぐのがアラビノグルクロノキシランである。そうしてこの両者でヘミセルロースの大部分を占めている²⁰⁾。両樹種のキシランは β -1, 4-結合のキシロース主鎖に4-O-メチルグルクロン酸やアラビノースが単一側鎖として結合した多糖類^{21, 22)}であり、他の陸上植物のキシラン²³⁾と同様な基本構造である。また、グルコマンナンは1部のグルコースと3.1~3.8部のマンノースが無秩序に配列した、直鎖状 β -1, 4-結合多糖類であることが知られている^{21, 22, 24)}。パルプ用材としては、現在広葉樹と針葉樹の使用量がほぼ同程度であり、パルプ工場廃水中のヘミセルロースはキシランおよびグルコマンナンが主体である。

一方、パルプ工場廃水成分の微生物分解についてはいくつかの研究があるが、そのうち、海洋微生物に関するものとしては、リグニン²⁵⁾、木材パルプ²⁶⁾などについての研究がある。また、パルプ廃水流入海域における微生物についての研究も数多くなされている²⁷⁻³⁵⁾。そのうち、パルプ廃水成分の微生物分解およびその関連過程についての研究としては、KADOTA²⁹⁾による好気性セルロース分解細菌に関する研究、MIYOSHI^{34, 35)}による嫌気性セルロース分解細菌についての研究、木俣ら^{27, 28)}、畑ら³⁶⁾、畑^{18, 37)}、門田ら¹⁷⁾およびMIYOSHI³⁸⁾による硫酸還元細菌ならびに硫化物生成機構についての研究がある。

しかし、前述のようにクラフトパルプ法での廃水成分として重要であり、また、沿岸海域へ流入する一般有機物の中でも重要な位地を占めるヘミセルロースの海中での微生物分解に関しては、今までにほとんど研究が行われていない。

このような背景から、著者は沿岸海域とくにパルプ工場廃水流入海域でのヘミセルロースの分解に関与する微生物の生態を明らかにしようとして本研究を行った。

まず、クラフトパルプ工場廃水流入海域である広湾を対象海域として、ヘミセルロース分解細菌の分布をそれに関

連する環境因子とあわせて調査した。次に、推計学的方法を導入して、それらの調査データを解析し、ヘミセルロース分解細菌の分布と環境因子との相関関係について検討した。さらに、広湾から分離した好気性キシラン分解細菌の菌学的性状およびそのヘミセルロース分解能、ならびに底泥培養実験によるヘミセルロースの分解過程などを研究し、廃水成分等として流入するヘミセルロースが沿岸海域の微生物の生態にどのような影響を与えるのか、また、それを通じて海域の生態系における物質の動態にどのような変化をもたらすのかについて考察した。

2. 沿岸海域におけるヘミセルロース分解細菌の分布

沿岸海域におけるヘミセルロース分解細菌の生態の研究を進めるにあたって、まず、現場海域におけるヘミセルロース分解細菌の分布を把握する必要がある。そこで、調査の対象として、パルプ工場廃水流入海域である広湾および岩国沿岸海域を選び、ヘミセルロース分解細菌の分布を従属栄養細菌の分布や環境因子の変化と共に調べ、各群細菌数と環境因子の関係について検討した。なお、ほとんど汚濁の見られない海域である吉見沿岸における調査もあわせて行い、両海域におけるヘミセルロース分解細菌の分布の差異などについても検討し、パルプ廃水流入の影響を明らかにしようとした。

2・1 では、ヘミセルロース分解細菌の計数法および培養計数用培地について検討した。それにより確立された培養計数法を用いて、パルプ工場廃水流入海域における調査を行った。その結果を2・2から2・5までに述べる。2・6では、対照となる非汚濁海域である吉見沿岸における調査結果について述べる。

2・1 ヘミセルロース分解細菌の培養計数法

2・1・1 平板培養法によるキシラン分解細菌の判定

一般に、多糖類分解細菌の判定には、基質を添加した培地を使用する平板培養法および液体培養法が用いられている。前者では、多糖類の分解を平板上のコロニーの周辺における基質の分解によって生じる透明環により判定し、後者では、培養後の培養液中の基質量、分解生成物、あるいは酵素活性の変化などにより判定する。両者のうちでは前者がより簡便であることは言うまでもなく、従来から土壤中のキシラン分解微生物の分離培養法として用いられてい

る³⁹⁾。

また、海洋細菌についても、KADOTA²⁹⁾のセルロース分解細菌、木村⁴⁰⁾のアルギン酸分解細菌、藤沢⁴¹⁾の寒天分解細菌などに、平板培養法による識別法が用いられている。したがって、海域におけるキシラン分解細菌の判定にも、この平板培養法が適用できるかどうかを検討した。

実験方法

供試菌株

下関市吉見沿岸において採取した海水中に浸漬した腐朽麦わら、海水、海藻などを分離源とし、ZOBELL 2216 E 培地⁴²⁾にキシラン 1% を添加した寒天培地を用い、各試料希釈液 1 ml を接種した混和平板を作成し、25℃ で 5 日間培養したのち、分解環を生じたコロニーを選んで細菌の分離を行った。すなわち、コロニーの周辺に明りょうな透明環を生じた菌株、半透明の不明りょうなキシラン分解環を生じた菌株およびまったく分解環を生じない菌株、合計 10 菌株を分離し、供試菌とした。

液体培養法によるキシラン分解能の識別

上記の分離培養用培地と同じ組成の斜面培地で前培養した供試菌の 1 白金耳量を、上記培地から寒天を除いた、キシラン液体培地に接種し、25℃ で 5 日間培養したのち、培養液 1 ml に 4 ml の 85% エタノールを添加して、未分解のキシランを沈殿させたろ液中のキシラン分解生成物の全糖量を、フェノール・硫酸法⁴³⁾によって半定量的に測定し、供試菌株のキシラン分解能を調べた。

基質

WHISTLER ら⁴⁴⁾の方法により、小麦の麦わらから調製した粗キシランを用いた。

結果および考察

分離培養用平板の 1 例を Fig. 1 に示す。

平板上に増殖したコロニーのうち、コロニーの周辺に明りょうな透明環を生じるものは、キシラン分解菌としての識別が容易である。しかし、なかには半透明の不明りょうなキシラン分解環を生じるものもあり、それらは、はたしてキシラン分解菌と判定してよいか紛らわしい。したがって、種々の分解環を生じた菌株を選び、そのキシラン分解能の有無を確めた結果を Table 1 に示す。

Table 1 に見られるように、肉眼的にキシラン分解環を生じる菌株はいずれも、液体培養法による識別で、キシラン分解能を持つことが明らかとなった。これらの結果から、平板上のキシラン分解環が透明であるか半透明であるかを

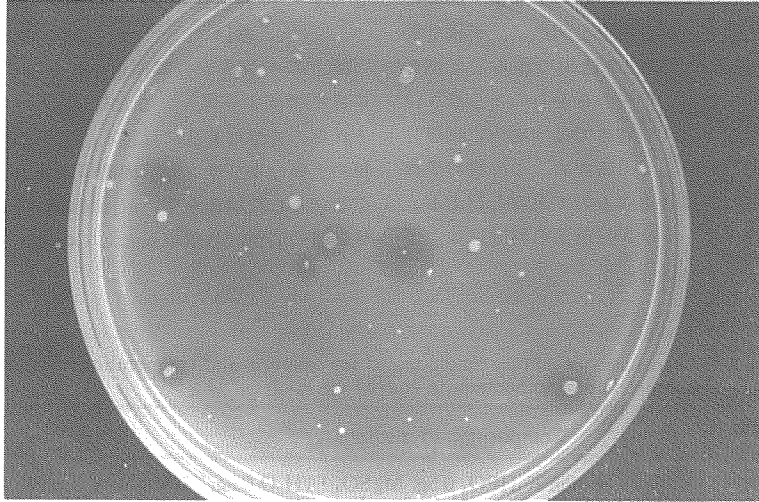


Fig. 1. Colonies on xylan plate surrounded by the clear zone.
The clear zone indicates the decomposition of xylan.

Table 1. Xylan-decomposing activity of the bacteria isolated from colonies grown on xylan agar plate and surrounded by clear zone.

Strain No.	Presence of clear zone	Xylan-decomposing activity		Bacterial source
		Absorbance of culture fluid*	Degree of activity	
WS 15	none	0.00	—	Rotten wheat straw in the sea
RA 2	opaque	0.03	+	<i>Porphyra</i> sp.
WS 9	opaque	0.06	+	Rotten wheat straw in the sea
GA 2	clear	0.19	+	<i>Enteromorpha</i> sp.
WS 36	clear	0.34	++	Rotten wheat straw in the sea
GA 6	clear	0.42	++	<i>Ulva pertusa</i>
W 6	clear	0.48	++	Seawater
WS 1	clear	0.54	++	Rotten wheat straw in the sea
GA 1	clear	0.21	+	<i>Ulva pertusa</i>
WS 24	clear	0.44	++	Rotten wheat straw in the sea

* Ethanol was added to the culture fluid which had been incubated at 25°C for 5 days, and the precipitate formed was removed by filtration. The phenol-sulfuric acid method was applied to the filtrate and the absorbance was determined at 517 nm.

問わず、分解環を生じるコロニーはすべてキシラン分解菌と判定できることが明らかになった。このように、海域におけるキシラン分解菌にも土壌の場合と同様に、平板培養法によるキシラン分解能の判定法を適用できることがわかった。なお、本実験に使用した麦わらからのキシランは熱水可溶性であり、混和平板作成時までは培地中に溶解分散し、寒天の凝固と共に白濁してくるため、この種の平板培養法における基質としては好適なものであると言える。したがって、以後の好気性キシラン分解菌の判定には、麦

わらキシランを用いる平板培養法を採用した。

2・1・2 好気性キシラン分解細菌の培養計数用培地の検討

陸上のキシラン分解微生物は土壌⁴⁵⁻⁴⁹⁾、腐植質^{45, 49)}、草食獣の反すう胃⁵⁰⁻⁵⁵⁾などに広く分布することが知られ、それらの分離培養法には種々の培地が用いられている。既報の主要なキシラン分解細菌用培地および海洋細菌用培地を参考とした培地を用い、海域における好気性キシラン分解細菌の培養計数用培地としての適否を検討した。

Table 2. Compositions of culture media tested for isolation and enumeration of aerobic xylan-decomposing bacteria in coastal waters.

Medium No.	Composition of medium	Remarks
B-1	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.0g, K ₂ HPO ₄ 0.5g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5g, CaCl ₂ 0.1g, FeCl ₃ 0.01g, NaCl 30g, Xylan 10g, Agar 10g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified medium of AOI <i>et al</i> ⁴⁵⁾
B-2	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.5g, K ₂ HPO ₄ 0.5g, MgSO ₄ 0.1g, CaCl ₂ 0.1g, FeSO ₄ 0.01g, NaCl 30g, Xylan 10g, Agar 10g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified medium of WAKSMAN <i>et al</i> ⁴⁷⁾
B-3	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 1.0g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.2g, KCl 0.2g, NaCl 30g, Xylan 10g, Agar 10g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified IWATA's medium A ⁵¹⁾
B-4	Peptone 10g, Meat extract 10g, Xylan 10g, Agar 10g, Filtered seawater 1,000ml, pH 7.5	Modified IWATA's medium B ⁵²⁾
B-5	NH ₄ NO ₃ 1.0g, K ₂ HPO ₄ 0.5g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.2g, FeCl ₃ 0.02g, NaCl 30g, Xylan 10g, Agar 10g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified SØRENSEN's medium A ³⁹⁾
B-6	Asparagine 1.0g, Yeast extract 1.0g, K ₂ HPO ₄ 0.5g, FeCl ₃ 0.02g, NaCl 30g, Xylan 10g, Agar 10g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified SØRENSEN's medium B ³⁹⁾
B-7	Pepton 2.0g, Meat extract 2.0g, K ₂ HPO ₄ 0.5g, MgSO ₄ 0.5g, NaCl 30g, Xylan 10g, Agar 10g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified medium of INAOKA <i>et al</i> ⁵³⁾
B-8	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.2g, Meat extract 0.2g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.2g, KCl 0.2g, NaCl 30g, Xylan 10g, Agar 10g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified INAOKA's medium A ⁴⁹⁾
B-9	Meat extract 2.0g, K ₂ HPO ₄ 0.2g, MgSO ₄ 0.2g, KCl 0.2g, NaCl 30g, Xylan 10g, Agar 10g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified INAOKA's medium B ⁵⁷⁾
B-10	Peptone 5.0g, Yeast extract 1.0g, FePO ₄ · 4H ₂ O 0.1g, Xylan 10g, Agar 10g, Filtered seawater 1,000ml, pH 7.5	Modified ZoBELL 2216 E medium ⁴²⁾
B-11	Peptone 5.0g, Yeast extract 1.0g, Xylan 10g, Agar 10g, Filtered seawater 1,000ml, pH 7.5	Modified ZoBELL 2216 E medium ⁴²⁾ (FePO ₄ free)

The substrate was a crude xylan prepared from wheat straw by the method of WHISTLER *et al*.⁴⁴⁾

実験方法

供試培地

陸上のキシラン分解細菌用培地を 3% NaCl, またはろ過海水で調製した培地 9 種および海洋細菌用培地 2 種を用いた。それらの培地組成を Table 2 に示す。

基質

WHISTLER⁴⁴⁾の方法により、小麦の麦わらから調製した粗キシランを各培地に 1% 添加した。

細菌の分離源

下関市吉見沿岸の水深 3 m の底泥を採取して試料とした。

細菌の計数

好気性従属栄養細菌数の測定には Table 2 の組成からそれぞれキシランを除いた培地を用い、底泥試料希釈液を接種した混和平板を作成し、25℃ で 5 日間保ったのち出現したコロニーの数から、試料 1 g あたりの菌数を算出した。好気性キシラン分解細菌数の測定には Table 2 の培地を用い、好気性従属栄養細菌と同様に平板培養を行い、2・1・1 のキシラン分解環による判定法により分解細菌数を算出した。

結果および考察

各培地における好気性従属栄養細菌および好気性キシラン分解細菌の出現状態を、Table 3 に示す。

好気性従属栄養細菌数は $10^4 \sim 10^5$ CFU/g, 好気性キシラン分解細菌数は $10^2 \sim 10^3$ CFU/g であって、両細菌数共、比較的多く検出される培地は、いずれも有機態窒素源を多く含む B-4, B-7, B-9, B-10 および B-11 の培地であった。このうち、B-4 は培地全体が黄土色に着色し、キシラン分解環の判定が困難であり、キシラン分解細菌の計数用培地として不適當であった。ほかの 4 種の培地ではキシラン分解環の検出が容易であり、いずれも好気性キシラン分解細菌用培地として適していた。また、著者ら⁵⁸⁾の海水および 2.5% NaCl 調製培地での比較では、海水調製培地の方が好気性従属栄養細菌数および好気性キシラン分解細菌数共に NaCl 調製培地の場合より高い計数値が得られ、海水培地の方がより適していると言える。本研究では海域における細菌を対象とすることから考えると、海域の一般細菌の計数に広く用いられている ZoBell 2216 E 培地⁴²⁾を基準とした B-10 および B-11 の培地が最も適していると言える。なお、上記培地に使用

Table 3. Numbers of aerobic xylan-decomposing bacteria in various media counted by the pour plate method.

Medium No.	Aerobic heterotrophic bacteria (CFU/g)	Aerobic xylan-decomposing bacteria (CFU/g)	Average diameter of clear zone* (mm)
B- 1	3.0×10^4	1.2×10^3	8.6
B- 2	1.5×10^4	4.0×10^2	16.9
B- 3	1.5×10^4	2.5×10^2	4.3
B- 4	2.3×10^5	$3.0 \times 10^{3**}$	2.0**
B- 5	2.0×10^4	7.5×10^2	8.8
B- 6	6.5×10^4	3.0×10^3	9.4
B- 7	2.0×10^5	4.5×10^3	9.9
B- 8	5.0×10^4	1.4×10^3	8.2
B- 9	1.7×10^5	2.5×10^3	10.1
B-10	3.0×10^5	3.5×10^3	8.4
B-11	4.5×10^5	2.5×10^3	30.0

*The clear zone indicates that xylan was decomposed.

**Detection of the clear zone was difficult.

Sample was collected from the bottom sediments in Yoshimi Bay.

した海水が沿岸域のろ過海水であるため、B-11 培地中にも微量のリン酸塩は含まれていたものと考え、培地へのリン酸塩の添加の影響がないとは言えない。したがって、一般的には B-10 培地の使用が有効と考えられる。

2・1・3 液体培養法による好気性ヘミセルロース分解細菌の判定および細菌計数法

ヘミセルロースのうち、水可溶性のものおよび不溶性画分の少ない基質の場合は、平板培養法による判定が困難である。ここで使用した針葉樹キシランおよびグルコマンナンはこの種のヘミセルロースであるため、液体培養法によるヘミセルロース分解能の判定を検討した。従来から液体培養法によるキシラン分解能の判定は行われており、培養後の培養液中の基質量の変化^{47, 51)}に基づいて分解能が判定されている。したがって、この種の判定法を用いる細菌計数法の適用を検討した。

実験方法

供試培地および培養法

2・1・2で最適とされた、B-10 培地に準じて調製し

た、G培地の組成を Table 4 に示す。

このG培地を各希釈段階それぞれ3本の試験管に用意し、吉見湾の底泥試料希釈液各1mlを接種し、25℃で7日間培養したのち、次の処理を行いキシラン分解能を調べた。

液体培養法によるヘミセルロース分解能の判定

G培地の培養後の処理の手順を Fig. 2 に示す。

Table 4. Composition of medium.

Medium G (for aerobic hemicellulose -decomposing bacteria)	
Peptone	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
FePO ₄ ·4H ₂ O	0.1 g
Hemicellulose	2.0 g
Filtered seawater	1,000 ml
pH 7.5	

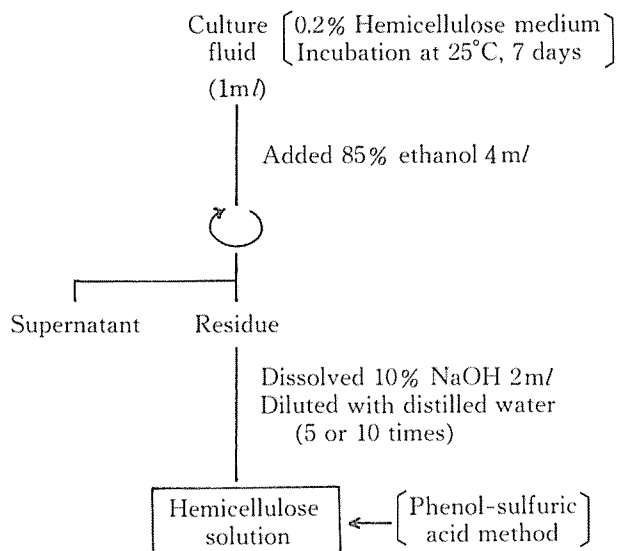


Fig. 2. Procedure for determination of decomposition (%) of hemicellulose.

この手順にしたがい、まず培養液をよく混和し、その 1 ml を沈殿管に取り、これに 4 ml の 85% エタノールを添加し、未分解のヘミセルロースを遠心沈殿させる。この沈殿を 10% 水酸化ナトリウム液 2 ml に溶解し、この溶液を定容として糖定量用試料とした。次に、この溶液中の全糖量をフェノール・硫酸法⁴³⁾により測定した。すなわち、糖液 1 ml に、5% フェノール 1 ml および濃硫酸 5 ml を加えて発色させ、その溶液の吸光度を 480 nm または 490 nm で測定した。この際試料を接種しない液体培地を同様に処理し、この糖量を対照とし、各試験管中のヘミセルロース分解率を求めた。その分解率 10% 以上を示す試験管を分解陽性管として、MPN 法によりヘミセルロース分解細菌数を算出した。

基質

グルコマンナンおよび針葉樹キシランとしては黒松から TIMELL⁵⁹⁾の方法により調製した、粗グルコマンナンおよび

粗針葉樹キシランを用いた。キシランとしては前項と同様に、小麦の麦わらから調製した粗キシランを使用した。

結果および考察

キシランおよびグルコマンナンを基質とする好気性ヘミセルロース分解細菌数の、液体培養法に基づく算出手順およびその結果を Table 5 に示す。

Table 5 に見られるように、分解陽性を示す各試験管中でのヘミセルロース分解率はほぼ 70% 以上であり、分解陰性管との分解率の差異は明確であり、この基質分解率によるヘミセルロース分解能の判定法は有効であることが明らかとなった。

次に、好気性キシラン分解細菌数について、平板培養法と液体培養法による差異および麦わらキシランと針葉樹キシランによる差異を比較し、Table 6 に示す結果を得た。

培養方法や基質の違いによる好気性キシラン分解細菌の

Table 5. Numbers of aerobic Hemicellulose-decomposing bacteria counted by the successive dilution method.

Dilution of sample	Tube No.	Xylan-decomposing bacteria			Glucmannan-decomposing bacteria		
		Decomposition rate of xylan (%)	Number of positive tube*	MPN per g	Decomposition rate of glucomannan (%)	Number of positive tube*	MPN per g
10 ⁻⁴	1	81.9			86.3		
	2	81.9	3/3		81.2	3/3	9.3×10 ⁴
	3	83.2			80.0		
10 ⁻⁵	1	81.8			71.5		
	2	71.1	3/3	4.8×10 ⁵	77.4	2/3	
	3	23.8			0		
10 ⁻⁶	1	79.0			0		
	2	0	1/3		0	0/3	
	3	5.6			4.5		

*Positive tube \geq 10.0% (decomposition rate).

Sample was collected from the bottom sediments in Yosimi Bay.

Table 6. Comparison of numbers of aerobic xylan-decomposing bacteria counted by different methods.

Methods	Substrates	Sample A (CFU/g or MPN/g)	Sample B (CFU/g or MPN/g)
Pour plate method	Medium B-10 (without substrate xylan)	1.2×10 ⁵	1.3×10 ⁶
Pour plate method	Wheat straw xylan	4.5×10 ⁴	7.5×10 ⁴
Successive dilution (MPN) method	Wheat straw xylan	1.1×10 ⁵	3.9×10 ⁴
Successive dilution (MPN) method	Softwood xylan	2.3×10 ⁴	4.8×10 ⁵

Samples were collected from the bottom sediments in Yosimi Bay.

計数値の変動はほぼ1桁以内であり、培養方法による計数値に差異はなく、また、同じβ-1, 4-キシランであれば、麦わらキシランであっても針葉樹キシランであってもその計数値には差異が見られなかった。したがって、実際には針葉樹キシランなどの木材キシランがバルブ廃水成分として流入している海域であっても、針葉樹キシランに置き換え麦わらキシランを使用してキシラン分解細菌数を評価しても、同等の計数値が得られると考えられる。そこで、本研究では計数法が簡便であり、しかも分解細菌の分離も容易な、麦わらキシランを用いる平板培養法によって、好気性キシラン分解細菌を計数することにした。

2・1・4 嫌気性ヘミセルロース分解細菌の計数法の検討

陸上の嫌気性キシラン分解細菌の分離培養用培地には、好気性キシラン分解細菌用培地にチオグリコール酸ナトリウムなどの還元性物質を添加した培地³⁹⁾が用いられている。したがって、この種の還元性物質を添加した培地を用いて、平板計数法および液体培養法による計数法について比較検討した。

実験方法

培地および計数法

嫌気性従属栄養細菌および嫌気性キシラン分解細菌の計数には、それぞれ ZoBell 2216 E 培地および 2・1・3 の G 培地に準じ、これにチオグリコール酸ナトリウムなどの還元性物質を添加した、Table 7 に示す ANH 培地お

よび ANG 培地を用いた。

また、生菌数は前項の液体培地による計数法に準じて測定した。すなわち、各培地をスクリーキャップ試験管に用意し、常法⁶⁰⁾に準じて吉見湾の底泥試料希釈液 1 ml を各試験管に接種したのち、その培地上に滅菌流動パラフィン約 1 ml を重層し、25℃ で 7 日間培養した。培養後、嫌気性従属栄養細菌数は培地の濁度により判定し、嫌気性キシラン分解細菌数は前項と同様に処理し、キシラン分解率から分解陽性管を判定し、MPN 法により計数した。また、平板培養法は上記 ANH 培地および ANG 培地に寒天を 1% 加えた培地を用い、混和平板を作成したのち、BBL のガスパック内で 25℃ で 7 日間嫌気培養を行い、好気性キシラン分解細菌の場合に準じて平板計数した。

基質

前項と同様に液体培養法には針葉樹キシランを、平板培養法には麦わらキシランを用いた。

結果および考察

液体培養法による各試験管でのキシラン分解率および 3 本 MPN 法による分解細菌数の算出手順およびその結果を、Table 8 に示す。

キシラン分解陽性管中の分解率は 20% から 50% の範囲であり、好気性ヘミセルロース分解細菌の場合より、分解率は低い傾向があったが、陽性管としての判定には十分な分解率であった。

次に、この液体培養法による計数値を平板計数値と比較

Table 7. Compositions of media for anaerobic bacteria.

Medium ANH (for anaerobic heterotrophic bacteria)		Medium ANG (for anaerobic hemicellulose-decomposing bacteria)	
Peptone	5.0 g	Peptone	5.0 g
Yeast extract	1.0 g	Yeast extract	1.0 g
FePO ₄ ·4H ₂ O	0.01 g	FePO ₄ ·4H ₂ O	0.01 g
Sodium thioglycollate	0.3 g	Sodium thioglycollate	0.3 g
L-Cystine hydrochloride	0.2 g	L-Cystine hydrochloride	0.2 g
Sodium resazurate	0.001 %	Sodium resazurate	0.001 %
Filtered seawater	1,000 ml	Hemicellulose	2.0 g
	pH 7.5	Filtered seawater	1,000 ml
			pH 7.5

Table 8. Numbers of anaerobic xylan-decomposing bacteria counted by the successive dilution method.

Dilution of sample	Tube No.	Sample A			Sample B		
		Decomposition rate of xylan (%)	Number of positive tube*	MPN per	Decomposition rate of xylan (%)	Number of positive tube*	MPN per g
10 ⁻³	1	30.4			27.0		
	2	47.5	3/3		21.1	3/3	
	3	41.7			34.1		
10 ⁻⁴	1	49.4			22.5		
	2	0	2/3	1.5×10 ⁴	28.6	3/3	4.3×10 ⁴
	3	61.4			26.5		
10 ⁻⁵	1	8.9			0		
	2	0	0/3		13.0	1/3	
	3	0			0		
10 ⁻⁶	1	21.9			1.2		
	2	0	1/3		1.2	0/3	
	3	5.9			0		

*Positive tube ≥ 10.0% (decomposition rate).

Samples were collected from the bottom sediments in Yosimi Bay.

Table 9. Comparison of numbers of anaerobic xylan-decomposing bacteria counted by different methods.

Methods	Anaerobic heterotrophic bacteria (CFU/g or MPN/g)		Anaerobic xylan-decomposing bacteria (CFU/g or MPN/g)	
	Sample A	Sample B	Sample A	Sample B
Pour plate method using anaerobic jar	9.0×10 ⁵	3.5×10 ⁴	6.0×10 ³	1.1×10 ³
Successive dilution (MPN) method	2.4×10 ⁶	7.5×10 ⁴	1.5×10 ⁴	4.3×10 ⁴

Samples were collected from the bottom sediments in Yosimi Bay.

したところ、Table 9 に示す結果が得られた。

Table 9 に見られるように、嫌気性従属栄養細菌数および嫌気性キシラン分解細菌数は両試料共に、平板計数値より液体培養法による計数値の方がやや高い傾向を示した。また、平板培養によるコロニーの周辺のキシラン分解環は好気性細菌の場合より小さく、判定が困難であった。以上のことから、嫌気性ヘミセルロース分解細菌の計数には液体培養法がより適していると言える。なお、液体培養中の分解率が低いことなどから、培養日数はやや長くする必要のあるものと思われる。

2・1・5 キシラン分解糸状菌および放線菌の

計数用培地の検討

陸上でのキシラン分解糸状菌および放線菌の分離には、一般に平板培養法が用いられている³⁹⁾。また、淡水域および海洋の糸状菌や放線菌の分離用培地も種々考案されてい

る⁶¹⁻⁶⁴⁾。これらの培地および土壌放線菌用培地⁶⁵⁾から数種を選び、海域における底泥中のキシラン分解糸状菌および放線菌の培養計数用培地としての適否を検討した。

実験方法

供試培地

海洋性の糸状菌および放線菌用培地それぞれ2種、ならびに陸上の糸状菌および放線菌用培地を2.5% NaClで調製した培地それぞれ2種、合計8種の培地について試験した。その培地組成をTable 10に示す。

基質

2・1・2と同様に、麥わらキシランを用いた。

菌数の測定

Table 10の各培地を滅菌加温融解したのち、培地1 ml/に対して、40 μgの硫酸ストレプトマイシンを無菌的に添

Table 10. Compositions of culture media tested for enumeration of xylan-decomposing molds and actinomycetes in coastal waters.

Medium No.	Composition of medium	Remarks
F-1	Yeast extract 1.0g, Glucose 10g, Xylan 10g, Agar 15g, Filtered seawater 1,000ml, pH 7.5	Modified medium of MEYERS <i>et al</i> ⁽⁶¹⁾
F-2	Peptone 0.1g, Glucose 1.0g, K ₂ HPO ₄ 0.05g, Ferric citrate 0.01g, Xylan 10g, Agar 15g, Filtered seawater 1,000ml, pH 7.5	Modified medium B of JOHNSON <i>et al</i> ⁽⁶²⁾
F-3	Sucrose 30g, NaNO ₃ 2.0g, K ₂ HPO ₄ 1.0g, KCl 0.5g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g, FeSO ₄ 10mg, NaCl 25g, Xylan 10g, Agar 15g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified Czapek Dox agar medium ⁽⁶²⁾
F-4	Yeast extract 4.0g, Soluble starch 15g, K ₂ HPO ₄ 1.0g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5g, NaCl 25g, Xylan 10g, Agar 15g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified EMERSON'S medium A ⁽⁶²⁾
Ac-1	Soluble starch 10g, Casein (dissolved in NaOH) 1.0g, Xylan 10g, Agar 15g, Filtered seawater 1,000ml, pH 7.5	Modified medium A of GREIN <i>et al</i> ⁽⁶³⁾
Ac-2	L-Asparagine 0.5g, Xylan 10g, Agar 15g, Filtered seawater 1,000ml, pH 7.5	Modified medium B of GREIN <i>et al</i> ⁽⁶³⁾
Ac-3	Glycerol 20g, L-Arginine 2.5g, CaCO ₃ 0.1g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.1g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1g, NaCl 25g, Xylan 10g, Agar 15g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified medium of PORTER <i>et al</i> ⁽⁶⁵⁾
Ac-4	Glycerol 20g, Glycine 2.5g, K ₂ HPO ₄ 1.0g, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.1g, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.1g, CaCO ₃ 0.1g, NaCl 25g, Xylan 10g, Agar 15g, Distilled water 1,000ml, pH 7.5	Modified LINDENBEIN'S medium ⁽⁶³⁾

Streptomycin sulfate was added to each agar medium at the level of 40 μ g per ml.

加し、平板培地とした。この平板上に吉見湾の底泥試料希釈液 0.1 ml を接種し、コンラッジ棒で全面に拡げた。この平板を 20℃ で 10 日間培養し、2・1・1 で述べたキシラン分解環による判定法にしたがい、分解菌数を算出した。また、全菌数は平板上に出現した全コロニー数から求めた。なお、糸状菌および放線菌の種類は、コロニーならびに菌体の形態学的観察により判定した。

結果および考察

糸状菌用培地 4 種 (F-1 ~ F-4) および放線菌用培地 4 種 (Ac-1 ~ Ac-4) における全菌数ならびにキシラン分解菌数の測定結果を、Table 11 に示す。

Table 11 に見られるように、糸状菌および放線菌の出現の最も多い培地は F-1 培地であり、しかもこの培地にはキシラン分解菌も多く出現したが、1, 2 種の糸状菌

のコロニーが平板に拡がり、分解菌のコロニーの周辺の分解環の判定が困難であった。次に、キシラン分解菌の出現が認められた培地は、糸状菌用 F-4 培地および放線菌用 Ac-1 培地であり、F-1 培地に比べるとキシラン分解放線菌の出現数はやや少ないものの、分解糸状菌の出現数にはほとんど差異がなかった。また、糸状菌用培地に放線菌が出現し、放線菌用培地にも糸状菌の出現が認められ、培地組成だけでは糸状菌または放線菌を限定することはできないと考えられる。したがって、現場調査では糸状菌および放線菌を区別せず、上記の F-4 培地および Ac-1 培地を用いて計数することにした。なお、F-1 培地での出現菌数が最も多いことから、MEYERS ら⁽⁶¹⁾の培地は沿岸海域における一般の糸状菌および放線菌の分離培養用培地として優れたものであると言える。

Table 11. Numbers of xylan-decomposing molds and actinomycetes in various media counted by the spread plate method.

Medium No.	Molds		Actinomycetes	
	Total plate count (CFU/g)	Xylan-decomposing count (CFU/g)	Total plate count (CFU/g)	Xylan-decomposing count (CFU/g)
F-1	6×10^3	$2 \times 10^{2*}$	5×10^3	$1 \times 10^{3*}$
F-2	3×10^3	—	1×10^3	—
F-3	5×10^3	—	1×10^2	—
F-4	4×10^2	2×10^2	1×10^2	1×10^2
Ac-1	2×10^2	2×10^2	2×10^2	—
Ac-2	3×10^2	—	1×10^2	—
Ac-3	1×10^2	—	3×10^2	—
Ac-4	3×10^2	—	—	—

*Detection of the xylan-decomposing zone was difficult.

— Not detected on minimum dilution plate (10^{-2}).

Sample was collected from the bottom sediments in Yoshimi Bay.

2・2 広湾における海水中の好気性ヘミセルロース分解細菌の分布

広島県呉市の広湾についてはパルプ工場廃水流入海域の1つとして、以前から新田ら^{1, 2)}による有機汚濁を主体とした調査、研究が報告されている。また、現在でも山岡ら^{16, 66-68)}により、有機汚濁物質に関する定量的研究がなされている。この広湾の沿岸には、パルプ工場以外に、有機汚濁物質を排出する大工場がなく、広湾はパルプ廃水系の汚濁物質の微生物による分解過程を研究するには格好の海域の1つである。したがって、この広湾を調査海域として選び、研究を進めることにした。

本節では、海水中の好気性従属栄養細菌および好気性ヘミセルロース分解細菌の分布状態ならびに環境因子を調べ、好気性ヘミセルロース分解細菌の分布と有機汚濁との関係および各群細菌数の季節的変動などについて、検討した。

実験方法

試料の採取

広湾における試料の採取定点を Fig. 3 に示す。

海水は北原式採水器を用い、各定点の水深 1 m 層および底層（底土上 1 m）から採取した。各試料を滅菌したポリ瓶に入れ、氷蔵して研究室に持ち帰り、細菌数、COD などの測定に供した。

細菌の計数

好気性従属栄養細菌数は ZOBELL 2216 E 培地⁴²⁾を用いる

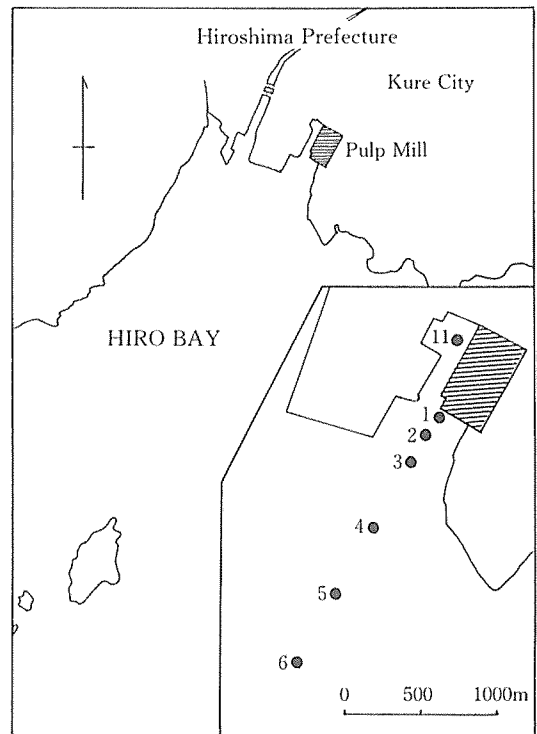


Fig. 3. Location of sampling stations in Hiro Bay.

平板計数法により、寒天分解細菌数は好気性従属栄養細菌計数後の平板についてヨウ素呈色法⁴¹⁾により寒天分解環を判別し、それぞれ計数した。好気性グルコマンナン分解細菌数はG培地を用い、MPN法(2・1・3)により算出し、好気性キシラン分解細菌数はB-10培地を用い、平板培養法による判定法(2・1・1)により計数した。なお、各細菌の培養計数用培地の組成をTable 12に示す。

基質

グルコマンナンとしては黒松粉末から、TIMELL⁵⁹⁾の方法により調製した粗グルコマンナンを用い、キシランとしては小麦の麦わらからWHISTLERら⁴⁴⁾の方法により調製した粗キシランを用いた。

環境因子の測定

海水の水溫、pH、塩素量、CODおよびSSの測定はそれぞれ常法^{69, 70)}によった。UV吸収は小倉⁷¹⁾の方法に準じて孔径0.45 μmのミリポアフィルターによりろ過したろ液の吸光度を10mmセルを用い、250nmおよび280nmの波長で測定した。溶存性炭水化物量は上記ろ液を用い、HANDA⁷²⁾の方法で測定した。

結果

広湾における海水中の好気性従属栄養細菌数、好気性ヘミセルロース分解細菌数(好気性グルコマンナン分解細菌および好気性キシラン分解細菌)、寒天分解細菌数および環境因子について、1979年から1981年にわたり、季節別に計5回調査し、Table 13に示す結果を得た。

海水中の好気性従属栄養細菌数は $10^1 \sim 10^7$ CFU/m^l、好気性グルコマンナン分解細菌数は $10^1 \sim 10^5$ MPN/m^l、好気性キシラン分解細菌数は $10^1 \sim 10^6$ CFU/m^l、寒天分解細菌数は $10^1 \sim 10^5$ CFU/m^lであった。各細菌数は地点的にも、季節的にもかなりの変動を示したが、一般に0m層および1m層海水中で高く、底層水で低い傾向が認められた。また、環境因子についても同様に、COD、UV吸収および溶存性炭水化物量は定点1の0m層で最も高く、工場廃水の影響が排水口に近い定点の表層水に強く及んでいることを示している。この0m層を除けば、CODが0.4~4.7 ppm、UV吸収(250nm)が0.011~0.063、溶存性炭水化物量が0.05~1.44 グルコース・mg/lであり、1m層海水中では底層水に比べてやや高い傾向が見られた。

Table 12. Compositions of media for enumeration of aerobic bacteria.

Medium H (for aerobic heterotrophic bacteria and agar-decomposing bacteria, ZoBELL 2216 E medium)		Medium B-10 (for aerobic xylan-decomposing bacteria)*	
Peptone	5.0 g	Peptone	5.0 g
Yeast extract	1.0 g	Yeast extract	1.0 g
FePO ₄ ·4H ₂ O	0.1 g	FePO ₄ ·4H ₂ O	0.1 g
Agar	10 g	Xylan	10 g
Filtered seawater	1,000 ml	Agar	10 g
	pH 7.5	Filtered seawater	1,000 ml
			pH 7.5
Medium G (for aerobic hemicellulose -decomposing bacteria)*		Medium C (for aerobic cellulose-decomposing bacteria, KADOTA'S medium)	
Peptone	5.0 g	NaNO ₃	0.5 g
Yeast extract	1.0 g	K ₂ HPO ₄	1.0 g
FePO ₄ ·4H ₂ O	0.1 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Hemicellulose	2.0 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g
Filtered seawater	1,000 ml	A strip of filter paper	
	pH 7.5	Filtered seawater	1,000 ml
			pH 7.5

*Modified ZoBELL 2216 E medium.

Table 13. The population densities of various groups of aerobic bacteria and the environmental conditions in seawater in Hiro Bay.

Date	St.	Sampling depth (m)	Temp. of water (°C)	pH	Cl (%)	COD (ppm)	SS (mg/l)	Absorbance		Dissolved carbohydrate (Glucose mg/l)	Heterotrophic bacteria (CFU/ml)	Glucmannan-decomposing bacteria (MPN/ml)	Xylan-decomposing bacteria (CFU/ml)	Agar-decomposing bacteria (CFU/ml)
								250nm	280nm					
Feb. 20, 1979	1	0	16.8	7.2	10.40	57.2	18.4	0.268	0.203	12.07	3.1×10^3		7.0×10^2	1.0×10^2
		1	11.5	8.3	18.11	2.5	13.4	0.063	0.045	1.44	4.1×10^3		6.0×10^2	6.0×10^2
		4	11.0	8.3	18.46	1.3	21.4	0.049	0.028	0.73	3.5×10^3		3.1×10^3	7.5×10^2
	2	1	11.5	8.4	18.42	1.8	9.6	0.036	0.020	0.09	7.0×10^3		4.7×10^3	7.0×10^2
		6	11.3	8.3	18.43	2.3	9.8	0.022	0.015	0.10	4.6×10^3		3.5×10^3	7.0×10^2
	3	1	11.5	8.3	18.05	3.3	14.6	0.037	0.023	1.02	4.2×10^3		1.1×10^3	4.5×10^2
		7	11.3	8.3	18.49	1.5	6.4	0.044	0.029	0.40	2.3×10^3		3.0×10^2	5.0×10^2
	4	1	11.6	8.3	18.42	1.7	13.8	0.039	0.027	0.31	4.3×10^3		2.7×10^2	4.0×10^2
		7	11.2	8.3	18.38	1.3	2.2	0.030	0.018	0.29	3.6×10^3		2.5×10^3	6.0×10^2
	5	1	11.5	8.3	18.46	1.0	9.6	0.058	0.041	0.05	2.1×10^3		8.0×10^2	5.0×10^2
		10	11.0	8.3	18.49	2.3	5.4	0.021	0.021	0.08	3.8×10^3		2.7×10^3	1.0×10^2
11	1	11.5	8.3	18.16	2.1	15.8	0.034	0.023	0.20	8.2×10^3		8.0×10^3	1.0×10^3	
Jun. 28, 1979	1	0	22.2	8.0	15.90	1.4	3.2	0.040	0.030	0.83	4.7×10^5	2.4×10^4	2.3×10^3	1.6×10^4
		1	21.2	8.2	17.64	1.0	1.4	0.026	0.019	0.52	5.3×10^3	9.3×10^1	1.0×10^2	4.0×10^2
	2	4	21.0	8.2	17.89	0.8	3.4	0.022	0.017	0.53	7.2×10^3	9.1×10^1	3.0×10^1	1.2×10^2
		1	20.9	8.1	17.46	1.0	0.6	0.021	0.014	0.47	1.5×10^4	1.5×10^2	1.8×10^2	2.4×10^2
	3	8	20.8	8.2	18.18	0.6	5.8	0.017	0.013	0.53	1.9×10^3	2.3×10^2	1.0×10^1	5.0×10^1
		1	21.0	8.2	17.62	1.0	2.8	0.025	0.019	0.51	1.8×10^4	2.4×10^3	2.4×10^2	1.7×10^3
	4	8	20.8	8.2	17.89	0.8	5.0	0.020	0.015	0.49	3.3×10^3	3.6×10^2	7.0×10^1	6.0×10^1
		1	20.8	8.2	17.98	0.9	2.8	0.017	0.012	0.48	3.3×10^3	4.3×10^2	5.0×10^1	3.3×10^2
	5	7	21.0	8.2	18.17	0.5	5.8	0.026	0.021	0.38	5.9×10^2	2.4×10^2	3.0×10^1	4.0×10^1
		1	21.0	8.2	17.74	0.8	3.4	0.022	0.017	0.45	2.1×10^3	4.8×10^2	1.3×10^2	3.7×10^1
	6	10	20.8	8.2	18.18	0.4	6.0	0.018	0.014	0.32	3.7×10^3	2.4×10^2	6.0×10^1	1.1×10^2
		1	21.0	8.2	17.44	0.9	2.4	0.024	0.019	0.35	3.3×10^3	9.3×10^2	9.0×10^1	2.5×10^2
Sept. 6, 1979	1	0	30.0	7.4	12.43	25.8	13.2	0.210	0.174	7.43	4.3×10^7	10^4	1.1×10^6	7.0×10^5
		1	26.3	8.0	17.80	1.3	11.2	0.021	0.015	0.79	4.1×10^6	10^5	1.6×10^4	1.2×10^5
		4	26.3	8.2	17.87	0.8	6.8	0.028	0.027	0.60	7.0×10^3	10^4	3.0×10^1	1.0×10^1
	2	1	26.2	8.1	17.60	1.5	12.6	0.042	0.033	0.68	3.1×10^6	10^5	1.7×10^4	1.3×10^5
		8	26.0	8.1	17.93	0.9	10.2	0.022	0.018	0.51	1.3×10^4	10^3	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$
	3	1	26.2	8.1	17.81	1.0	5.6	0.028	0.024	0.53	4.0×10^6	10^5	8.0×10^3	1.5×10^5
		10	26.0	8.0	17.93	0.8	11.8	0.030	0.022	0.51	3.5×10^1	10^1	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$
	4	1	25.8	8.1	17.85	1.0	5.6	0.021	0.016	0.48	5.1×10^3	10^2	4.0×10^1	$< 1.0 \times 10^1$
		8	26.0	8.1	17.93	0.8	7.6	0.016	0.015	0.53	6.1×10^1	10^1	$< 1.0 \times 10^1$	$< 1.0 \times 10^1$
	5	1	26.1	8.1	17.75	1.0	11.4	0.025	0.020	0.40	2.4×10^4	10^2	2.0×10^1	1.0×10^1
		11	25.8	8.2	17.95	0.8	13.0	0.025	0.022	0.56	5.4×10^4	10^2	1.5×10^2	6.3×10^3
	6	1	26.0	8.2	17.56	0.9	13.2	0.024	0.019	0.43	5.6×10^3	10^2	5.0×10^1	5.0×10^1
Nov. 27, 1980	1	0	24.8	7.3	9.70	37.0	5.2	0.341	0.281	11.21	1.6×10^4	6.0×10^2		3.5×10^2
		1	18.3	8.4	17.07	2.1	8.8	0.023	0.025	0.85	1.0×10^4	5.5×10^3		2.7×10^3
	2	1	17.8	8.4	17.15	1.6	2.2	0.026	0.022	0.75	2.8×10^4	7.0×10^3		7.0×10^3
		1	17.5	8.4	17.26	1.7	6.4	0.032	0.035	0.59	1.1×10^4	6.0×10^3		2.4×10^3
	3	1	17.6	8.4	17.41	1.7	7.8	0.016	0.020	0.73	7.7×10^3	5.0×10^3		2.2×10^3
		1	17.1	8.4	17.58	1.5	4.2	0.014	0.016	0.95	5.6×10^3	5.0×10^3		2.2×10^3
6	1	17.6	8.4	17.65	0.6	4.4	0.011	0.016	0.73	1.4×10^3	5.0×10^3		1.3×10^3	
Feb. 10, 1981	1	0	9.0	8.3	17.26	2.7	12.4	0.033	0.020	0.80	4.0×10^4		8.0×10^3	2.0×10^4
		1	10.0	8.2	17.58	2.8	40.0	0.032	0.021	0.90	1.0×10^4		5.8×10^3	8.5×10^2
		3.5	9.0	8.3	17.73	4.7	70.0	0.014	0.018	0.90	8.5×10^3		9.8×10^2	1.5×10^2
	3	1	9.0	8.3	17.75	2.1	25.2	0.023	0.020	0.50	3.4×10^2		1.9×10^2	1.5×10^1
		9.5	9.0	8.3	17.79	2.3	31.6	0.018	0.010	0.50	2.4×10^3		3.6×10^1	2.4×10^2
5	1	8.0	8.4	17.72	2.8	6.8	0.017	0.018	0.70	4.7×10^2		2.1×10^2	5.3×10^1	

AN: Approximate numbers of bacteria enumerated by the successive dilution method.

考 察

広湾における海水中の好気性従属栄養細菌数は、 $10^1 \sim 10^7$ CFU/m³であり、吉田ら³⁰⁾およびOKUTANIら³²⁾の釧路湾海域における結果とはほぼ同程度の計数値であった。とくに、9月期の $10^6 \sim 10^7$ の高数値はOKUTANIらの同時期の沿岸部の各定点でも出現しており、広湾のみの夏期における特異的現象ではなく、一般にパルプ廃水流入の影響の強い海域の沿岸部では、夏期に好気性従属栄養細菌数の高数値出現があるものと思われる。

次に、各群細菌数の季節的変動を調べるため、各群細菌数の対数および好気性従属栄養細菌数に対する好気性ヘミセルロース分解細菌数の比の季節別平均値ならびに標準偏差を、1 m層海水と底層水とに分けてTable 14に示す。

好気性従属栄養細菌数には、1 m層での夏季数値が高くなること以外には季節的変動は認められなかった。一方、ヘミセルロース分解細菌や寒天分解細菌では、1 m層海水中で夏季から秋季へかけての計数値が高く、底層水では冬季から夏季へかけて逆に低くなる傾向が認められた。すなわち、冬季には1 m層海水中と底層水での各群細菌数はほぼ同数値であるが、春季、夏季と水温が上昇するにしたがって、両層間の計数値の差異は大きくなり、細菌計数値からも夏季成層現象がうかがえる。

さらに、好気性従属栄養細菌数に対する好気性グルコマンナン分解細菌数および好気性キシラン分解細菌数の比は

冬季で高く(対数値で約-0.5)、夏季では低く(約-2.0)なる傾向を示した。しかし、細菌計数値の場合と異なり、1 m層海水と底層水との間にはこれら存在比の差異は認められず、各季節ごとの菌群構成には両層間で差異がないものと思われる。

上記のように、広湾における好気性ヘミセルロース分解細菌の存在比が1/10~1/100と大きいことは、同じパルプ廃水流入海域である岩国沿岸海域においても、好気性キシラン分解細菌の存在比が約1/10であること(2・5)と同様な傾向を示したものと言える。一方、非汚濁海域である吉見湾では、海水中の好気性キシラン分解細菌の存在比は1/1000~1/10000と非常に小さい結果が得られている(2・6)。

以上のことから、好気性キシラン分解細菌などの好気性ヘミセルロース分解細菌の存在比が大きいことは、パルプ廃水流入海域における特徴と考えられる。

2・3 広湾における底泥中のヘミセルロース分解細菌の分布

前節では広湾における海水中の好気性ヘミセルロース分解細菌の分布について調査し、パルプ廃水流入海域における好気性ヘミセルロース分解細菌の存在比などの特徴について考察した。本節では、有機汚濁物質の影響の著しい底泥中におけるヘミセルロース分解細菌の分布について調査した。

Table 14. The bacterial populations and the ratio of aerobic hemicellulose-decomposing bacteria to aerobic heterotrophic bacteria in different seasons in seawater in Hiro Bay.

		Feb.	Jun.	Sept.	Nov.	Total
log of aerobic heterotrophic bacteria (H) in CFU/m ³	1 m layer	3.5±0.5	3.8±0.4	5.3±1.5	3.9±0.4	4.0±1.0
	Bottom layer	3.6±0.2	3.4±0.4	3.2±1.4		3.4±0.8
log of aerobic glucomannan-decomposing bacteria (G) in MPN or AN/m ³	1 m layer		2.6±0.5	3.5±1.6	3.7±0.1	3.3±1.1
	Bottom layer		2.3±0.2	1.6±0.9		2.0±0.7
log of aerobic xylan-decomposing bacteria (X) in CFU/m ³	1 m layer	3.0±0.6	2.1±0.2	2.8±1.4		2.7±0.9
	Bottom layer	3.0±0.7	1.5±0.3	1.3±0.5		2.1±1.0
log of agar-decomposing bacteria in CFU/m ³	1 m layer	2.5±0.6	2.6±0.3	3.2±2.1	3.4±0.2	2.9±1.1
	Bottom layer	2.5±0.4	1.8±0.2	1.6±1.3		2.0±0.8
log of ratio (G/H)	1 m layer		-1.1±0.6	-1.8±0.3	-0.1±0.4	-1.0±0.8
	Bottom layer		-1.1±0.6	-1.6±1.1		-1.3±0.9
log of ratio (X/H)	1 m layer	-0.5±0.4	-1.7±0.3	-2.4±0.4		-1.4±0.9
	Bottom layer	-0.6±0.7	-1.9±0.5	-1.9±1.1		-1.4±1.0

Each value shows mean ± standard deviation.

山岡ら¹⁶⁾は広湾における底土堆積物中の炭水化物の分析から、その構成単糖がグルコース、マンノース、ガラクトース、キシロース、アラビノースなどであることを明らかにし、それらがセルロースおよびヘミセルロースに由来するとしている。その構成単糖から、ヘミセルロースは針葉樹系のグルコマンナンおよびアラビノキシランであると考えられる。したがって、これらのヘミセルロースを分解する細菌群として、グルコマンナン分解細菌とキシラン分解細菌との2つのグループについて調査した。なお、底泥の場合はその有機汚濁の状況および還元的环境であることなどから、海水の場合に調査した好気性細菌群のほかに嫌気性細菌群についても調査した。

実験方法

試料の採取

広湾における底泥の採取は、2・2の海水の場合と同じFig. 3の各定点で行った。エクマンバージ式採泥器および木俣式柱状採泥器⁷³⁾によって採泥した。なお、水平分布の検討では底泥の表層部(0~5 cm層)を試料とし、鉛

直分布ではそれぞれの深度のものを試料とした。各試料を滅菌したポリ瓶に入れ、氷蔵して研究室へ持ち帰り、細菌数、CODなどの測定に供した。

細菌の計数

好気性従属栄養細菌数、好気性グルコマンナン分解細菌数、好気性キシラン分解細菌数および寒天分解細菌数は2・2と同じ方法で測定した。好気性セルロース分解細菌数はKADOTA²⁹⁾の培地を用い、希釈計数法によりその概数を求めた。

嫌気性細菌の計数は、Table 15に示す各培地を用いて行った。

すなわち、嫌気性従属栄養細菌数はANH培地を用いて、比濁法によりMPNあるいは概数を求めた。嫌気性グルコマンナン分解細菌数、嫌気性キシラン分解細菌数および嫌気性セルロース分解細菌数はANG培地の基質をグルコマンナン、針葉樹キシランおよびセルロースそれぞれで充当した培地を用いて、2・1・4の嫌気性ヘミセルロース分解細菌の計数法にしたがいMPNを算出した。硫酸還元細菌数はHATA⁷⁴⁾の培地を用い、MPN法により計数した。

Table 15. Compositions of media for enumeration of anaerobic bacteria.

Medium ANH (for anaerobic heterotrophic bacteria)*		Medium ANG (for anaerobic hemicellulose-decomposing bacteria)*	
Peptone	5.0 g	Peptone	3.5 g
Yeast extract	1.0 g	Yeast extract	1.0 g
FePO ₄ · 4H ₂ O	0.01g	FePO ₄ · 4H ₂ O	0.01g
Sodium thioglycollate	0.3 g	Sodium thioglycollate	0.3 g
L-Cystine hydrochloride	0.2 g	L-Cystine hydrochloride	0.2 g
Sodium resazurate	0.001 %	Sodium resazurate	0.001 %
Filtered seawater	1,000 ml	Hemicellulose	2.0 g
		Filtered seawater	1,000 ml
pH 7.5		pH 7.5	
Medium ANG (for anaerobic cellulose-decomposing bacteria)*		Medium S (for sulfate-reducing bacteria, HATA's medium)	
Peptone	5.0 g	Calcium lactate	5.0 g
Yeast extract	1.0 g	Peptone	2.0 g
FePO ₄ · 4H ₂ O	0.01g	Yeast extract	1.0 g
Sodium thioglycollate	0.3 g	K ₂ HPO ₄	0.2 g
L-Cystine hydrochloride	0.2 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
Sodium resazurate	0.001 %	Fe(NH ₄) ₂ · (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	0.2 g
Cellulose	2.0 g	L-Ascorbic acid	0.1 g
Filtered seawater	1,000 ml	Agar	3.0 g
		Filtered seawater	1,000 ml
pH 7.5		pH 7.5	

*Modified ZoBELL 2216 E medium.

基質

グルコマンナンおよび針葉樹キシランとしては、黒松粉末から TIMELL⁵⁹⁾の方法により調製した粗グルコマンナンおよび粗針葉樹キシランを用い、後者は嫌気性キシラン分解細菌の計数の場合のみ使用した。好気性キシラン分解細菌計数用培地には、2・2と同様に変わらキシランを用いた。セルロースは東洋濾紙K.K.製セルロース粉末(60~80メッシュ)を用いた。

環境因子の測定

泥温、pH、COD、水分量、強熱減量および硫化物量の測定は常法⁷⁰⁾によった。Ehは採泥直後の試料について、酸化還元電位差計で測定した。70%エタノール抽出糖量は、PLUNKETT⁷⁵⁾の方法により測定した。ヘミセルロースは、木材分析法⁷⁶⁾および針葉樹からのヘミセルロース抽出法⁵⁹⁾に準じて測定した。すなわち、乾燥底泥をエタノール・ベンゼン抽出処理およびエーテル抽出処理をしたのち、その1~2gに30~40倍量の1%水酸化ナトリウム溶液を加え、室温で約3時間かくはん抽出した。さらに、上記の抽出ろ過後の残渣に上記抽出液と同量の17.5%水酸化ナトリウム(4%ホウ酸を含む)溶液を加え、室温で約2時間30分かかくはん抽出したのち、アルカリ液を同量の蒸

留水で希釈し、約30分かかくはん処理を続けた。それぞれのアルカリ抽出液に4倍量の85%エタノール(10%酢酸を含む)を加えてヘミセルロースを沈殿させ、その全糖量をフェノール・硫酸法⁴³⁾により定量した。有機酸は三好ら⁷⁷⁾の方法に準じて抽出したのち、シリカゲルクロマトグラフ法⁷⁸⁾によりその全量を測定した。さらに、有機酸組成のガスクロマトグラフ法による定性試験は上記エーテル抽出液について、山下ら⁷⁹⁾の方法により行った。すなわち、エーテル抽出した有機酸をブチルエステル化したのち、*n*-ヘキサンに溶解し、*n*-ドデカンに内部標準物質として測定した。

結果

底泥中のヘミセルロース分解細菌の水平分布

広湾における底泥中の従属栄養細菌数、ヘミセルロース分解細菌数、硫酸還元細菌数および環境因子について、1979年から1981年にわたり、季節別に計5回調査し、Table 16, 17 および 18 に示す結果を得た。

なお、各定点における各群細菌数の対数を Fig. 4 および 5 に図示した。

底泥中の好気性細菌群では、湿泥 1g あたり、従属栄養

Table 16. The environmental conditions in bottom sediments in Hiro Bay (in 1979).

Date	St.	Depth of overlying water (m)	Temp. of sediment (°C)	pH	COD (mg/g)	Water content (%)	Ignition loss (%)	70% ethanol soluble carbohydrate (Glucose mg/g)	Hemicellulose		Sulfide content	
									1% NaOH soluble fraction (Glucose mg/g)	17.5% NaOH soluble fraction (Glucose mg/g)	Free (S mg/g)	Total (S mg/g)
Feb. 20	1	5	11.5	7.2	55.8	72.0	18.8	0.57	4.12	3.49	0.07	0.53
	2	7	11.5	7.5	50.4	75.2	15.0		1.41	1.29	0.17	0.63
	3	8	11.8	7.7	33.6	66.8	13.6	0.41	0.57	0.50	0.05	0.35
	4	8	11.5	7.7	23.4	67.3	10.5		0.49	0.48	0.00 ₃	0.31
	5	10	11.5	7.8	14.2	64.4	10.0	0.50	1.51	1.03	0.00 ₂	0.05
	11	4.5	11.0	7.4	62.4	61.7	15.6				0.06	0.60
Jun. 28	1	5	20.3	7.6	158.7	84.3	37.5	0.46	4.98	5.65	0.63	1.51
	2	9	20.3	7.4	41.0	70.0	12.5	0.18	0.69	0.58	0.16	0.51
	3	9	20.2	7.6	46.5	67.4	13.1	0.18	0.83	0.55	0.11	0.32
	4	8	20.3	7.7	20.7	61.9	9.8	0.09	0.33	0.41	0.07	0.23
	5	11	20.1	7.6	20.5	65.0	9.0	0.11	0.36	0.40	0.05	0.18
	6	13	20.3	7.8	16.5	67.1	9.9	0.09	0.32	0.42	0.02	0.13
Sept. 6	1	5	25.5	7.4	137.6	83.6	29.0	0.46	4.36	5.58	0.47	1.31
	2	8.5	25.1	7.6	31.3	70.1	12.7	0.19	1.18	1.07	0.26	0.90
	3	11	25.8	7.6	30.2	70.6	11.0	0.19	0.79	0.75	0.16	0.48
	4	9	25.4	7.7	15.4	60.0	8.7	0.07	0.38	0.40	0.03	0.15
	5	12	25.0	7.5	14.9	65.9	9.2	0.10	0.36	0.45	0.03	0.11
	6	14	25.3	7.5	17.7	70.0	10.6	0.12	0.40	0.48	0.04	0.13

Table 17. The population densities of various groups of bacteria in bottom sediments in Hiro Bay (in 1979).

Date	St.	Aerobic bacteria					Anaerobic bacteria			
		Hetero- trophic bacteria	Glucoman- -decomposing bacteria	Xylan -decomposing bacteria	Agar -decomposing bacteria	Gellulose -decom- -posing bacteria	Hetero- trophic bacteria	Glucoman- -decomposing bacteria	Cellulose -decomposing bacteria	Sulfate -reducing bacteria
		(CFU/g)	(MPN or AN/g)	(CFU/g)	(CFU/g)	(AN/g)	(AN/g)	(MPN or AN/g)	(MPN/g)	(MPN/g)
Feb. 20	1	7.3×10^6	10^5	9.0×10^4	1.1×10^4		10^5	10^4		4.8×10^5
	2	3.0×10^6	10^5	2.5×10^4	3.0×10^3		10^5	10^5		4.8×10^5
	3	7.8×10^5	10^4	2.4×10^4	1.0×10^3		10^5	10^3		2.4×10^5
	4	5.1×10^5	10^4	7.0×10^3	3.5×10^3		10^5	10^3		2.4×10^5
	5	1.9×10^5	10^5	1.0×10^4	3.5×10^3		10^5	10^4		2.4×10^5
	11	8.4×10^5		2.2×10^4	1.3×10^4					
Jun. 28	1	1.5×10^7	1.1×10^7	3.2×10^5	3.0×10^4		10^6	4.8×10^5		2.6×10^6
	2	6.0×10^5	1.1×10^6	1.0×10^4	1.1×10^4		10^5	4.3×10^3		4.3×10^5
	3	3.6×10^6	2.4×10^6	3.0×10^4	6.0×10^3		10^5	2.9×10^3		2.3×10^5
	4	1.3×10^5	4.3×10^4	5.0×10^3	4.0×10^2		10^5	1.4×10^3		4.3×10^4
	5	5.7×10^5	4.3×10^4	6.0×10^3	9.0×10^3		10^5	7.3×10^2		2.3×10^5
	6	1.8×10^5	4.8×10^3	3.0×10^3	4.0×10^2		10^5	2.0×10^2		1.5×10^5
Sept. 6	1	1.1×10^7	2.4×10^6	3.0×10^4	1.0×10^3	10^2	10^6	1.1×10^7	$20. \times 10^5$	9.3×10^6
	2	9.0×10^5	2.4×10^5	7.0×10^3	7.0×10^2	$< 10^2$	10^6	4.8×10^6	2.1×10^3	9.3×10^5
	3	8.0×10^5	2.4×10^5	9.0×10^3	5.0×10^2	10^2	10^6	1.5×10^6	1.6×10^3	4.5×10^5
	4	3.3×10^5	4.3×10^4	6.0×10^3	3.0×10^2	10^2	10^6	1.5×10^5	3.9×10^4	2.3×10^5
	5	4.5×10^5	7.5×10^3	1.3×10^3	5.0×10^2	10^2	10^5	3.6×10^4	1.5×10^3	9.1×10^4
	6	1.5×10^5	4.8×10^4	4.0×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	10^2	10^6	3.6×10^4	2.1×10^3	3.6×10^4

AN: Approximate numbers of bacteria enumerated by the successive dilution method.

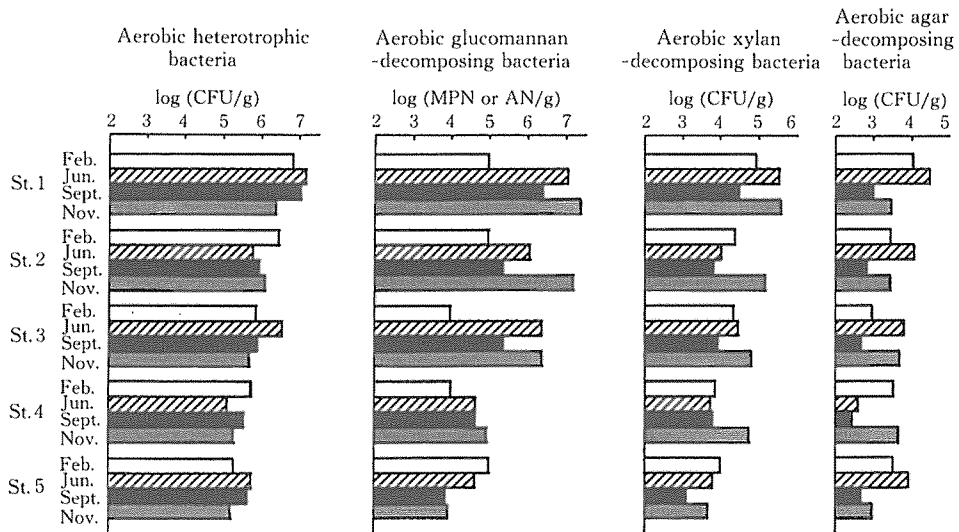


Fig. 4. Distribution of aerobic bacteria in bottom sediments in Hiro Bay. Location of stations is shown in Fig. 3.

Table 18. The population densities of various groups of bacteria and the environmental conditions in bottom sediments in Hiro Bay.

Date	St.	Depth of overlying water (m)	Temp. of sediment (°C)	pH	Eh (mV)	COD (mg/g)	Water content (%)	Ignition loss (%)	Hemicellulose		Organic acid ($\mu\text{geq/g}$)	Sulfide content	
									1% NaOH soluble fraction (Glucose mg/g)	17.5% NaOH soluble fraction (Glucose mg/g)		Free (S mg/g)	Total (S mg/g)
Nov. 27, 1980	1	4.5	18.3	7.4	-140	216.7	82.5	31.9	5.57	6.78	73.7	0.48	1.77
	2	8	18.8	7.4	-100	57.0	77.9	13.4	1.15	1.37	25.0	0.14	0.79
	3	6.5	18.5	8.0	+90	16.6	60.7	8.8	0.40	0.78	10.0	0.01	0.11
	4	8	18.8	8.0	+60	19.1	56.9	6.5	0.38	0.48	7.0	0.01	0.07
	5	10.5	17.8	8.0	+80	20.2	70.5	8.7	0.43	0.80	12.5	0.02	0.06
	6	13	18.5	8.1	+100	16.1	69.8	9.2	0.33	0.28	2.8	0.00	0.09
Feb. 10, 1981	1	4.5	12.0	7.5	-120	139.5	76.8	30.1	6.33	6.95	146.5	0.25	1.24
	3	10.5	11.0	8.1	-10	32.5	64.4	11.7	1.06	0.91	21.9	0.15	0.51
	5	11	10.0	8.5	+325	6.0	50.5	6.8	0.15	0.52	3.7	0.02	0.14

St.	Aerobic bacteria				Anaerobic bacteria			
	Heterotrophic bacteria (CFU/g)	Glucumannan-decomposing bacteria (MPN/g)	Xylan-decomposing bacteria (CFU/g)	Agar-decomposing bacteria (CFU/g)	Heterotrophic bacteria (MPN/g)	Glucumannan-decomposing bacteria (MPN/g)	Xylan-decomposing bacteria* (MPN/g)	Sulfate-reducing bacteria (MPN/g)
1	2.5×10^6	2.4×10^7	3.5×10^5	3.0×10^3	1.5×10^6	2.4×10^6	4.8×10^6	1.1×10^7
2	1.2×10^6	1.5×10^7	1.4×10^5	3.0×10^3	9.3×10^5	2.4×10^6	1.1×10^6	2.4×10^6
3	4.9×10^5	2.4×10^6	7.0×10^4	5.0×10^3	4.8×10^5	4.8×10^5	4.8×10^5	9.3×10^5
4	1.8×10^5	9.4×10^4	5.5×10^4	4.8×10^3	4.8×10^5	4.3×10^4	2.1×10^5	9.3×10^4
5	1.6×10^5	9.1×10^3	5.0×10^3	1.0×10^3	4.8×10^5	4.8×10^5	9.3×10^4	9.3×10^4
6	1.3×10^5	9.3×10^5	1.5×10^4	1.0×10^3	9.3×10^5	1.5×10^4	1.4×10^4	9.3×10^3
1	1.6×10^5	4.8×10^5	1.7×10^4	$< 1.0 \times 10^2$	9.3×10^4	4.8×10^5	4.8×10^5	1.1×10^6
3	2.7×10^5	3.9×10^4	9.5×10^4	2.5×10^3	2.4×10^5	1.8×10^4	3.6×10^3	9.3×10^4
5	2.9×10^4	2.8×10^4	9.0×10^3	$< 1.0 \times 10^2$	4.8×10^4	3.6×10^2	1.4×10^3	2.4×10^4

*The liquid medium was prepared with softwood xylan.

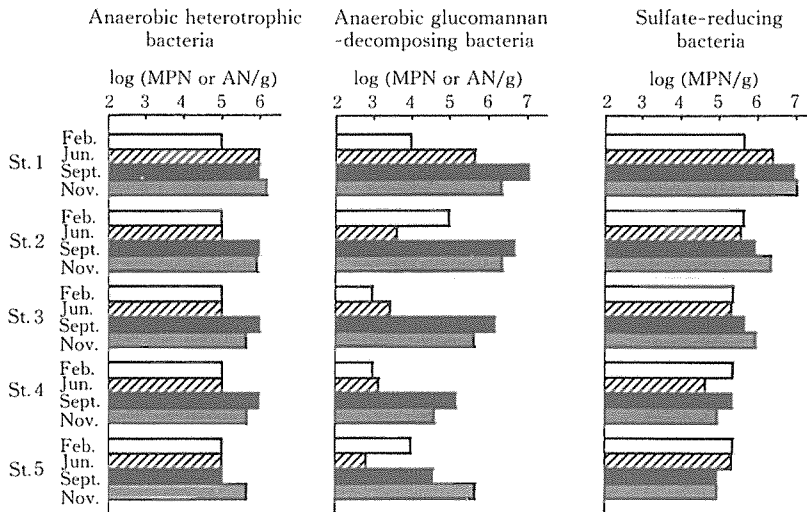


Fig. 5. Distribution of anaerobic bacteria in bottom sediments in Hiro Bay. Location of stations is shown in Fig. 3.

養細菌数が $10^4 \sim 10^7$, グルコマンナン分解細菌数が $10^3 \sim 10^7$, キシラン分解細菌数が $10^3 \sim 10^5$, 寒天分解細菌数が $10^2 \sim 10^4$, セルロース分解細菌の概数が 10^2 であった。嫌気性細菌群では, 従属栄養細菌数が $10^4 \sim 10^6$, グルコマンナン分解細菌数が $10^2 \sim 10^7$, キシラン分解細菌数が $10^3 \sim 10^6$, セルロース分解細菌数が $10^3 \sim 10^5$, 硫酸還元細菌数が $10^3 \sim 10^7$ であった。いずれの細菌数もパルプ工場の排水口に近い定点 1 における数値が最も高く, それを離れるにしたがって減少していた。

各環境因子は Table 16 および 18 に見られるように, 乾泥 1g あたり, COD が $6 \sim 217$ mg, 70% エタノール抽出糖量がグルコース換算で $0.1 \sim 0.6$ mg, ヘミセルロース量がグルコース換算で $0.6 \sim 13.3$ mg, 全硫化物量が S として $0.06 \sim 1.8$ mg, 有機酸が $3 \sim 147$ μ g 当量であり, 水分量および強熱減量はそれぞれ, $51 \sim 84\%$ および $7 \sim 38\%$ であった。それらの各測定値は各群細菌数の場合と同様に, 排水口に近い定点 1 で最も高く, それを離れるにしたがって減少しており, 各群細菌数と各環境因子との間にはかなりの関係があるものと思われる。さらに, 秋季および冬季のデータのみではあるが, Eh は定点 1 および 2 では負であり, 冬季でもかなりの還元状態であることがわかった。しかも, 両定点における各環境因子は他の定点より高く, 高度に汚濁された地点は工場排水口に近い定点 1 および 2 付近に限定されている傾向が見られた。

底泥中のヘミセルロース分解細菌の鉛直分布

底泥中の従属栄養細菌, ヘミセルロース分解細菌および硫酸還元細菌の深度別分布を Fig. 6 に示す。また, 同一深度における COD, 硫化物量および有機酸の分布を Fig. 7 に示す。

Fig. 6 および 7 から, 好気性細菌群および嫌気性細菌群の菌数はいずれも底泥の表層部で多く, 深度と共にやや減少する傾向が認められた。また, 同様に COD, 硫化物量および有機酸にも底泥の表層部での数値が最も高く, 深度と共に減少する傾向が明らかに認められた。以上のことから, 有機汚濁の進行した広湾においても一般海域の底泥と同様に, 微生物による分解活動の主たる場所は底泥の表層部と考えられる。したがって, 各定点における底泥の表層部の各群細菌や各環境因子の分布状態の比較解析により, 微生物の活動は考察できるものと考えられる。

考 察

広湾における底泥中の好気性従属栄養細菌数は $10^4 \sim 10^7$ CFU/g であり, 吉田ら³⁰⁾ および OKUTANI ら³²⁾ の澄灘海

域における結果とほぼ同程度であった。とくに, パルプ・製紙工場の多い川之江沿岸での細菌数³²⁾ は広湾のものと近似しており, 同様な有機汚濁レベルにあるものと思われる。また, MIYOSHI³⁴⁾ はこの川之江沿岸でのセルロース分解細菌数を調べ, 底泥表層部の好気性細菌群が $10^1 \sim 10^3$, 嫌気性細菌群が $10^2 \sim 10^3$ MPN/g であり, 還元状態の進んだ沿岸部では嫌気性細菌群が多く, 逆に沖合では好気性細菌群が多いことを報告している。広湾においても好気性セルロース分解細菌数が 10^2 , 嫌気性セルロース分解細菌数が $10^3 \sim 10^5$ であり, 上記の還元状態の進んだ沿岸部の定点と同程度の計数値が得られた。なお, 広湾における底泥中のヘミセルロース分解細菌数はセルロース分解細菌数の $10 \sim 1000$ 倍であり, ヘミセルロースの分解はほとんどヘミセルロース分解細菌の活動によるものと考えられる。

次に, 各群細菌数の季節の変動を検討するため, 各細菌数の対数ならびに従属栄養細菌数に対するヘミセルロース分解細菌数の比の対数について, 季節別に平均値および標準偏差を求め, Table 19 に示す結果を得た。

広湾底泥中の好気性従属栄養細菌数および硫酸還元細菌数には, それぞれの平均値に差異がなく, 季節の変動が認められなかった。一方, 好気性グルコマンナン分解細菌数, 好気性キシラン分解細菌数および寒天分解細菌数の夏季(9月期)の平均値は春秋両季の値より低下する傾向を示した。また, 嫌気性従属栄養細菌数および嫌気性グルコマンナン分解細菌数では夏季の平均値が最も高くなる傾向であり, それぞれの細菌群により季節の変動に差異があることが明らかとなった。これらの季節差は, Fig. 4 および 5 に示した各定点ごとの計数値にも明確に示されている。とくに, 好気性ヘミセルロース分解細菌数の夏季の減少傾向は, 一般に細菌の温度依存性の強いことから考えると特異的現象と言えるので, 次章の推計学的解析では, この夏季測定値の減少要因としてゲーミ変数を組み込み検討した。

従属栄養細菌数に対するヘミセルロース分解細菌数の比についての季節的平均値から, 夏季には好気性ヘミセルロース分解細菌の存在比が低下し, 逆に嫌気性ヘミセルロース分解細菌の存在比は高くなる傾向が認められた。これらの現象は後述するように, ヘミセルロース分解細菌の主体が好気性細菌群から嫌気性細菌群へと遷移すること起因するものと思われる。なお, この底泥中の好気性ヘミセルロース分解細菌の存在比の夏季での減少傾向は, 2・2の海水中の分解細菌の存在比にも見られ, 底泥中の好気性細菌群と海水中の好気性細菌群にはかなりの関連性があるものと考えられる。

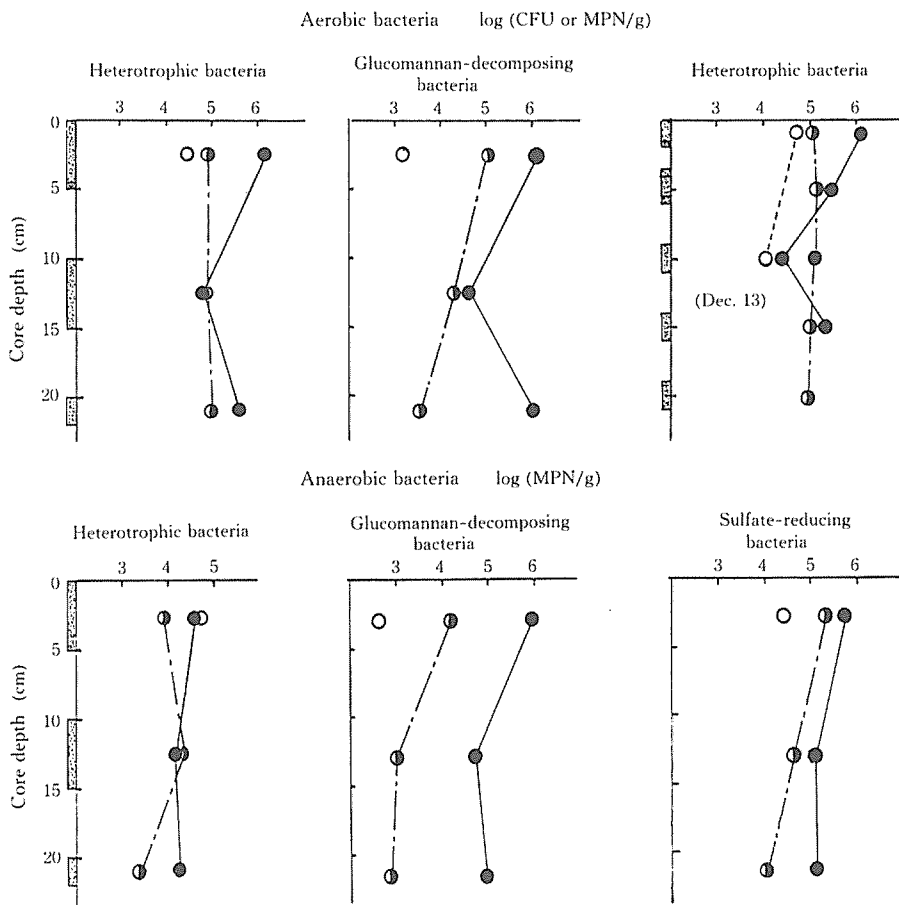


Fig. 6. Vertical distribution of various groups of bacteria in bottom sediments in Hiro Bay.
 ●— : St. 1, ◐--- : St. 3, ○--- : St. 5.

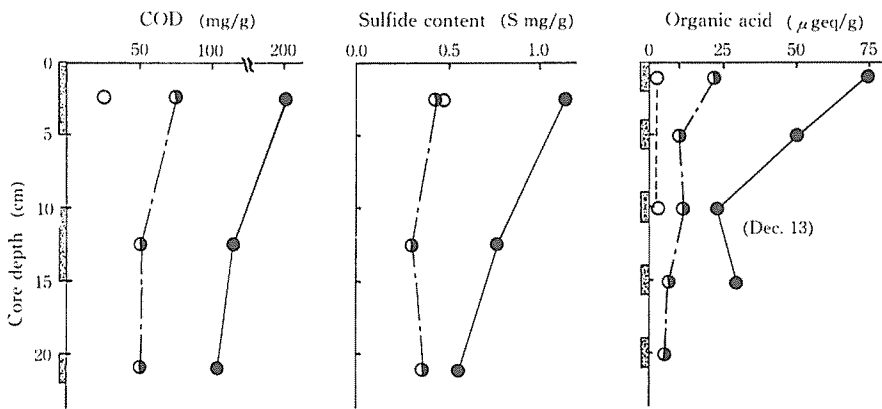


Fig. 7. Vertical distribution of the environmental conditions in bottom sediments in Hiro Bay.
 ●— : St. 1, ◐--- : St. 3, ○--- : St. 5.

Table 19. The bacterial populations and the ratio of hemicellulose-decomposing bacteria to heterotrophic bacteria in different seasons in bottom sediments in Hiro Bay.

	Feb.	Jun.	Sept.	Nov.	Total
Aerobic bacteria					
log of heterotrophic bacteria (H) in CFU/g	5.7±0.8	5.9±0.8	5.9±0.6	5.6±0.5	5.8±0.7
log of glucomannan-decomposing bacteria (G) in MPN or ANg	4.7±0.6	5.4±1.3	5.1±0.9	6.0±1.3	5.2±1.1
log of xylan-decomposing bacteria (X) in CFU/g	4.3±0.4	4.2±0.7	3.8±0.5	4.7±0.7	4.3±0.6
log of agar-decomposing bacteria in CFU/g	3.1±0.8	3.6±0.8	2.6±0.4	3.4±0.3	3.2±0.7
Anaerobic bacteria					
log of heterotrophic bacteria (ANH) in MPN or AN/g	5.0±0.2	5.2±0.4	5.8±0.4	5.9±0.2	5.4±0.5
log of glucomannan-decomposing bacteria (ANG) in MPN or AN/g	4.0±1.1	3.5±1.2	5.7±1.1	5.5±0.9	4.6±1.4
log of sulfate-reducing bacteria in MPN/g	5.4±0.5	5.4±0.6	5.6±0.8	5.6±1.1	5.5±0.7
Ratio of hemicellulose-decomposing bacteria to heterotrophic bacteria					
log of ratio (G/H)	-1.0±0.9	-0.5±0.7	-0.8±0.5	0.4±0.9	-0.5±0.9
log of ratio (X/H)	-1.3±0.6	-1.8±0.2	-2.1±0.4	-0.9±0.3	-1.5±0.6
log of ratio (ANG/ANH)	-1.0±1.0	-1.7±0.8	-0.1±0.9	-0.4±0.9	-0.8±1.0

Each value shows mean ± standard deviation.

一般に土壌中のヘミセルロース量は、WAKSMANの近似分析法⁸⁰⁾に基づく和田ら⁸¹⁾の方法により、その塩酸分解抽出画分から測定されるが、今回のようにヘミセルロースがパルプ工場廃水成分から成る場合では、ヘミセルロースなどの木材成分はかなり強い化学的処理を受けているため、パルプ中のヘミセルロース分析に用いられるアルカリ抽出法によりヘミセルロース量を測定することにした。分析結果として、ヘミセルロースのほぼ半量が1%水酸化ナトリウム抽出画分に溶出したことから、このヘミセルロースはかなり分解されていると考えられる。これらのヘミセルロースの量は両抽出画分共に定点1で最も高く、それを離れるにしたがって減少していた。しかし、この減少傾向のみでは、ヘミセルロースの排水口から沖へと流出するにしたがっての分解傾向は十分に把握できない。そこで、単なる希釈による減少を取り除いて考える必要があるため、今回は全有機物量に対するヘミセルロース量の比(ヘミセルロース含量)で表現することにした。この全有機物量の指標としては有機炭素量が適切であるが、広湾は他の有機汚濁が少なく、主としてパルプ廃水のみから成る比較的均質な汚濁系であることから、簡便に測定される強熱減量を有機物量の指標とした。このようにして求めた広湾にお

Table 20. Hemicellulose content to ignition loss at various station in bottom sediments.

Areas	St.	Hemicellulose content ± SD (Glucose mg/g Organic matter)
Hiro Bay	1	37.19±6.08
	2	15.67±3.71
	3	12.53±3.44
	4	9.75±2.44
	5	10.31±2.28
	6	8.30±1.67
Yoshimi Bay		4.12±1.53

SD: Standard deviation.

るヘミセルロース含量を、Table 20に示す。

Table 20から、排水口に近い定点1では37mg/gである数値が、定点6では8.3mg/gへと約1/4に低下しており、外部定点へと流出するにしたがって、ヘミセルロースが次第に分解されていることが認められる。また、セルロースやヘミセルロースの分解物である単糖などの量を示す、70%エタノール抽出糖量はヘミセルロース量の1/3-1/20であり、底泥中には多量に集積しておらず、その分解物で

ある単糖などは直ちに微生物により利用、分解されているものと考えられる。そのためか、微生物活動の低下する冬季には、ヘミセルロース量に対する70%エタノール抽出糖量の割合および糖量共に高くなる傾向が認められた。

一方、Miyoshi³⁴⁾は同様なパルプ廃水流入海域である川之江沿岸における底泥の分析から、底泥中の全炭水化物量は最大7.6 mg/gであり、そのうちセルロース量は2.05 mg/gであると報告している。この結果から、セルロース量は全炭水化物量の約1/4であると言える。また、山岡ら¹⁶⁾は広湾底泥中の炭水化物の構成単糖としてはグルコースが最も多いことを指摘している。これらの報告および本実験の結果を総合すると、パルプ廃水流入海域における全炭水化物量の大半はヘミセルロースであるが、そのすべてが木材ヘミセルロースに由来するとは言えず、その一部はセルロースの部分分解物であると考えられる。

次に、有機酸も排水口に近い定点1で最も高く、それを離れるにしたがって減少する傾向であった。この減少傾向はCODやヘミセルロース量の場合と同様であって、有機汚濁物質の分解に伴い増加したものであると思われる。それらの測定結果は、三好ら⁷⁾の舞鶴湾における結果に近いものであった。また、その有機酸組成はFig. 8に示すとおりである。

この有機酸のガスクロマトグラムから、有機酸の主要成分は酢酸であり、これについてプロピオン酸、ラク酸、乳酸およびイソ吉草酸などの存在が認められた。この結果は山岡ら⁶⁾の分析結果とも類似しており、これらの有機酸の大部分は、硫酸還元細菌による硫酸還元作用やその他の微生物による糖質の発酵作用により生成したものであると考えられる。

さらに、NIKAIDO⁸²⁾は一般海洋環境下では起りにくいメタンの生成が有機酸の集積の多い、しかも硫酸還元率の高い海域では起ることを報告している。そのメタン生成量は伊予三島湾で約2.5 ml/100g wet wt.であり、この海域は広湾と同様なパルプ廃水流入海域であることを考えると、広湾でも同様なメタン発酵が生じているものと考えられる。

2・4 広湾における底泥中のキシラン分解糸状菌および放線菌の分布

陸上のヘミセルロース分解微生物としては細菌よりむしろ、糸状菌および放線菌に関する記述が多く³⁹⁾、また、酵素化学的にも糸状菌および放線菌の持つヘミセルラーゼに関する報告が多い^{83, 84)}。このように、陸上環境下では糸状菌や放線菌のヘミセルロースの分解に果たす役割の重要性

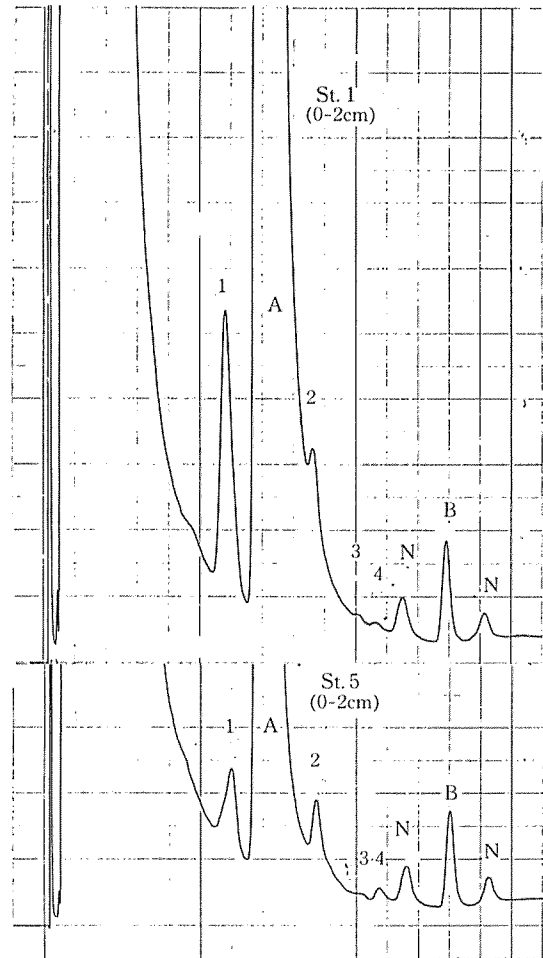


Fig. 8. Gas-liquid chromatograms of organic acids in bottom sediments in Hiro Bay.

1: Acetic acid, 2: Propionic acid,
3: *n*-Butyric acid,
4: Lactic acid and/or isovaleric acid,
A: Butyl ether,
B: Internal standard substance (*n*-Dodecane).
Column packing: 20% Silicone DC 550 on
Diasolid L 60-80 mesh.
Temperature: 50°C 5 min Hold, 50-210°C
(5°C/min).

が推測できる。一方、海洋環境下においても、糸状菌および放線菌の存在が知られるようになった^{63, 85, 86}。しかし、これらの菌が持つヘミセルロース分解能については、ほとんど知られていない。したがって、ヘミセルロース分解糸状菌および放線菌の広湾底泥中における存在について調査した。

実験方法

試料の採取

広湾における底泥の採取は Fig. 3 に示す各定点で行い、柱状採泥器を用いて、0-2 cm 層および 9-11 cm 層の底泥を採取し、滅菌したポリ瓶に入れ、氷蔵して研究室へ持ち帰り、各菌数の測定に供した。

糸状菌および放線菌の計数

キシラン分解糸状菌および放線菌数の測定は 2・1・5 にしたがった。すなわち、F-4 培地および Ac-1 培地を用い、各底泥試料希釈液 0.1 ml を平板培地上に塗布し、20℃ で 10 日間培養したのち、糸状菌および放線菌の総数ならびにキシラン分解菌数とそれぞれ糸状菌と放線菌とに区別することなく計数した。なお、好気性従属栄養細菌数および好気性キシラン分解細菌数は、2・3 と同様に平板計数した。

結果および考察

広湾における底泥中のキシラン分解糸状菌および放線菌数の測定結果を、Table 21 に示す。F-4 培地および Ac-1 培地共にほぼ同程度の出現菌数が得られ、湿泥 1 g あたりの糸状菌および放線菌の総

数は $1 \times 10^2 \sim 5 \times 10^2$ であり、そのうちキシラン分解菌数は $1 \times 10^2 \sim 2 \times 10^2$ であった。とくに、9-11 cm の深部泥層では、キシラン分解糸状菌および放線菌の存在が認められなかった。また、0-2 cm 層における糸状菌および放線菌の総数ならびに分解菌数共に地点的差異は認められず、これらの微生物の分布は有機汚濁とは無関係と思われる。さらに、好気性キシラン分解細菌の存在数と比較すると、キシラン分解糸状菌および放線菌数は細菌数の 1/10~1/100 と低かった。これらのことや上記の地点的分布傾向などから、広湾においてヘミセルロースの分解に関与する微生物の主体はヘミセルロース分解細菌と考えられ、有機汚濁の進行した海域における還元的環境下では、糸状菌および放線菌は活動しにくいものと思われる。したがって、本研究ではヘミセルロース分解細菌を対象に追求することにした。

2・5 岩国沿岸海域における海水中の好気性キシラン分解細菌の分布

広湾と同様にパルプ工場廃水流入海域である岩国沿岸海域は、種々の有機汚濁物質を排出する工場の存在する¹³⁾西部瀬戸内海でも最も汚濁の進んだ海域である。この岩国沿岸海域を広湾と対比して、検討することにした。

実験方法

試料の採取

岩国沿岸海域における試料の採取定点を Fig. 9 に示す。海水は、北原式採水器を用いて主として各定点の 1 m 層から採取した。各試料を滅菌したポリ瓶に入れ、氷蔵し

Table 21. The population densities of xylan-decomposing molds and actinomycetes in bottom sediments in Hiro Bay (Dec.3,1981).

St.	Core depth (cm)	F-4 medium molds and actinomycetes		Ac-1 medium molds and actinomycetes		ZoBELL 2216 E medium	
		Total plate count (CFU/g)	Xylan-decomposing count (CFU/g)	Total plate count (CFU/g)	Xylan-decomposing count (CFU/g)	Aerobic heterotrophic bacteria (CFU/g)	Aerobic xylan-decomposing bacteria (CFU/g)
1	0-2	5×10^2	1×10^2	1×10^2	1×10^2	1.3×10^6	9.0×10^3
	9-11	1×10^2	—	1×10^2	—	2.7×10^4	7.0×10^2
3	0-2	2×10^2	—	2×10^2	1×10^2	1.2×10^5	6.0×10^3
	9-11	—	—	—	—	1.4×10^5	8.5×10^3
5	0-2	2×10^2	2×10^2	2×10^2	1×10^2	6.9×10^4	1.5×10^3

— Not detected on minimum dilution plate (10^{-2}).

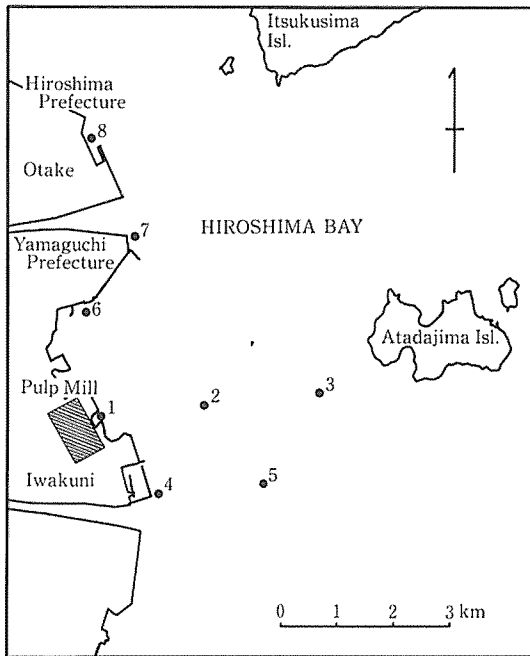


Fig. 9. Location of sampling stations in Iwakuni Area in Hiroshima Bay.

て研究室へ持ち帰り、細菌数、CODなどの測定に供した。

細菌の計数

好気性従属栄養細菌数、好気性キシラン分解細菌数および寒天分解細菌数は、2・2と同じ方法で平板計数した。好気性セルロース分解細菌数はKADOTA²⁹⁾の培地を用い、MPN法により計数した。

環境因子の測定

水温、pH、塩素量、COD、SS、UV吸収(250 nmおよび280 nm)ならびに溶存性炭水化物量の測定は、それぞれ2・2と同じ方法によった。リグニン量はニトロソリグニン法⁶⁾により、リグニンスルホン酸カルシウム量として求めた。

結果

岩国沿岸海域における海水中の好気性従属栄養細菌数、好気性キシラン分解細菌数および環境因子について、1973年から1975年にわたり、7回調査し、Table 22および23に示す結果を得た。

好気性従属栄養細菌数は $10^2 \sim 10^6$ CFU/ml、好気性キシラン分解細菌数は $10^1 \sim 10^5$ CFU/ml、好気性セルロース分解細菌数は $0 \sim 10^2$ MPN/ml、寒天分解細菌数は $10^2 \sim 10^4$ CFU/mlであった。また、1 m層海水中のCOD

Table 22. The population densities of various groups of aerobic bacteria and the environmental conditions in seawater in Iwakuni Area.

Date	St.	Sampling depth (m)	Temp. of water (°C)	pH	Cl (‰)	COD (ppm)	Absorbance at 250 nm	Absorbance at 280 nm	Dissolved carbohydrate (Glucose mg/l)	Aerobic heterotrophic bacteria (CFU/ml)	Aerobic xylan-decomposing bacteria (CFU/ml)	Aerobic cellulose-decomposing bacteria (MPN/ml)
Jan. 18, 1973	1	0	—	6.9	—	102.6	2.077	1.402	—	—	—	—
	1	1	12.7	8.2	—	5.1	0.092	0.062	—	1.7×10^6	3.8×10^5	1.6×10^2
	4	1	11.2	8.3	—	3.7	0.036	0.024	—	1.7×10^6	2.2×10^5	2.8×10^1
	6	1	11.5	8.4	—	0.6	0.011	0.007	—	9.1×10^5	4.1×10^4	1.7×10^1
	7	1	11.2	8.4	—	1.3	0.018	0.010	—	1.2×10^6	2.6×10^5	1.4×10^1
Feb. 15, 1973	8	0	—	8.1	—	19.7	0.251	0.210	—	—	—	—
	1	1	12.6	8.4	—	3.5	0.022	0.010	—	4.1×10^5	—	7.9
	1	0	12.3	6.9	—	174.8	1.989	1.315	—	—	—	—
	1	1	12.0	8.3	—	6.7	0.152	0.101	—	8.5×10^5	4.6×10^5	5.4×10^1
	2	1	11.0	8.5	—	0.9	0.025	0.015	—	1.5×10^5	6.9×10^4	3.3
Sept. 5, 1973	3	1	11.0	8.5	—	0.8	0.017	0.010	—	1.9×10^5	8.3×10^4	7.9
	4	1	11.0	8.3	—	3.7	0.081	0.050	—	1.7×10^6	2.2×10^5	2.8×10^1
	5	1	11.0	8.5	—	0.7	0.017	0.009	—	8.3×10^4	2.6×10^4	1.7
	1	0	28.9	6.8	13.28	80.4	1.650	1.112	41.95	—	—	—
	1	1	26.0	8.0	16.51	5.4	0.112	0.080	1.81	1.4×10^6	1.6×10^5	5.4×10^1
Sept. 5, 1973	2	1	25.8	8.1	17.41	1.8	0.064	0.052	1.41	1.3×10^6	3.7×10^4	4.9
	3	1	25.6	8.2	17.52	0.9	0.043	0.033	0.53	2.0×10^2	3.0×10^1	0
	4	1	25.8	8.0	16.99	2.8	0.058	0.042	0.73	1.2×10^6	3.3×10^3	3.5×10^1
	5	1	25.8	8.2	17.33	1.9	0.047	0.037	1.16	1.3×10^5	2.9×10^4	3.3

Table 23. The population densities of various groups of aerobic bacteria and the environmental conditions in seawater in Iwakuni Area.

Date	St.	Sampling depth (m)	Temp. of water (°C)	pH	Cl (‰)	COD (ppm)	Lignin content (mg/l)	Dissolved carbohydrate (Glucose mg/l)	Aerobic heterotrophic bacteria (CFU/ml)	Aerobic xylan-decomposing bacteria (CFU/ml)	Aerobic cellulose-decomposing bacteria (MPN/ml)	Agar-decomposing bacteria (CFU/ml)
Nov. 13, 1973	1	0	20.0	6.8	13.98	96.5		73.06	—	—	—	—
		1	18.0	8.1	17.77	3.1		1.13	1.8×10^6	5.0×10^4	4.3×10^1	
		2	19.0	8.3	17.89	1.9		1.03	1.3×10^6	2.7×10^5	4.9	
		3	19.0	8.3	17.88	1.2		0.70	6.5×10^5	9.0×10^4	1.3	
		4	19.0	8.3	17.96	1.1		0.36	4.5×10^5	5.0×10^4	2.2	
		5	19.0	8.4	17.83	1.1		0.59	5.8×10^5	4.0×10^4	7.0	
Jan. 21, 1974	1	0	—	7.2	11.55	87.7		54.68	—	—	—	—
		1	11.0	7.8	16.25	36.0		17.50	1.1×10^6	7.0×10^4	2.2×10^2	
		2	10.0	8.5	18.21	1.1		1.59	2.4×10^5	6.0×10^4	2.3	
		3	9.8	8.5	18.37	0.9		0.72	9.0×10^4	9.0×10^4	3.3	
		4	9.8	8.3	18.12	3.8		1.38	2.6×10^5	7.0×10^4	9.2×10^1	
		5	9.8	8.4	18.36	1.0		0.55	1.5×10^5	1.9×10^3	1.3×10^1	
Dec. 16, 1974	1	0	17.5	7.5	12.44	90.7	44.9	32.52	2.1×10^5	3.0×10^3	9.3	1.6×10^4
		1	14.2	8.3	17.64	3.4	3.1	1.48	2.2×10^5	4.0×10^4	1.1×10^2	4.1×10^4
		2	14.2	8.4	17.65	3.2	2.1	0.86	1.5×10^5	7.0×10^4	4.8×10^1	3.0×10^4
	2	1 m from bottom	13.8	8.5	17.82	4.9	0.7	0.48	1.8×10^5	1.5×10^3	4.8×10^1	6.0×10^2
		0	14.2	8.2	17.77	1.5	0.7	0.42	6.1×10^4	2.0×10^4	1.5×10^1	9.0×10^3
		1	14.5	8.4	17.78	2.1	0.6	0.40	5.2×10^4	2.0×10^4	7.5	2.2×10^4
1 m from bottom	2	14.0	8.3	17.80	1.3	0.6	0.43	6.8×10^4	1.1×10^4	2.4×10^1	1.9×10^4	
	14.0	8.5	18.08	1.1	0	0.29	2.1×10^4	2.4×10^3	9.3	2.5×10^3		
Feb. 14, 1975	1	0	12.7	7.2	14.05	53.2	41.6	34.74	—	—	—	—
		1	9.5	8.1	17.06	7.3	6.3	1.31	1.5×10^5	3.1×10^3	1.5×10^1	2.1×10^3
		2	9.8	8.2	17.90	1.2	0.8	0.29	5.2×10^4	9.0×10^2	1.4	1.0×10^3

は 0.6~36.0 ppm, UV 吸収 (250 nm) は 0.011~0.152, 溶存性炭水化物量はグルコース換算で 0.36~17.5 mg/l, リグニン量は 0.6~6.3 mg/l であった。これらの海水中の各群細菌数および COD, 溶存性炭水化物量などの測定値は, 2・2 の広湾における海水中の各数値よりやや高い傾向を示した。また, COD, 溶存性炭水化物量およびリグニン量はパルプ工場の排水口に近い定点 1 で高く, しかもその 0 m 層での測定値は 1 m 層の値の 10~50 倍であり, 炭水化物やリグニンを多量に含み, COD 値の高いパルプ工場廃水が排水口付近の海水の表層部に強く影響を及ぼしていることが認められた。この傾向も広湾の場合とほぼ同様であり, 一般にパルプ工場廃水は海水の表層部に広がる傾向があるものと思われる。

考 察

岩国沿岸海域における海水中の各群細菌数が広湾などに比べてやや高いのは, この沿岸に存在する各種の工場から, 種々の有機汚濁物質が流入し, その影響を受けているため

と考えられる。季節の影響を取り除いて見ると, この海域における好気性キシラン分解細菌数については溶存性炭水化物量との間に明らかな相関が認められている¹⁴⁾。このことから, 海水中の好気性キシラン分解細菌は炭水化物依存性をもつ菌群と考えられる。この海域の溶存性炭水化物量のすべてがパルプ工場廃水に由来するとは言えないが, パルプ廃水成分中の炭水化物量は好気性キシラン分解細菌の分布に影響するものと考えられる。

次に, 各群細菌数の対数および好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の比の対数を季節別に整理すると, Table 24 に示すとおりである。

各群細菌数および好気性キシラン分解細菌の存在比には, それぞれ夏季の数値に減少傾向が認められるものの, 2・2 の広湾における場合のような大きい季節的変動ではなかった。また, 好気性キシラン分解細菌数の好気性従属栄養細菌数に対する比は約 1/10 であり, 広湾における存在比の範囲内ではあるが平均的にはやや高めな値であった。このことから, パルプ廃水流入海域では好気性従属栄養細菌

Table 24. The bacterial populations and the ratio of aerobic xylan-decomposing bacteria to aerobic heterotrophic bacteria in different seasons in seawater in Iwakuni Area.

	Jan. Feb.	Sept.	Nov. Dec.	Total
log of aerobic heterotrophic bacteria (H) in CFU/ml	5.6±0.5	5.2±1.7	5.7±0.5	5.5±0.8
log of aerobic xylan-decomposing bacteria (X) in CFU/ml	4.7±0.8	3.8±1.5	4.8±0.4	4.6±0.9
log of ratio (X/H)	-0.9±0.6	-1.3±0.8	-0.9±0.4	-0.9±0.6

Each value shows mean ± standard deviation.

数に対する好気性キシラン分解細菌数の比は、ほぼ同程度であることが明らかとなった。

2・6 非汚濁海域（吉見沿岸）におけるヘミセルロース分解細菌の分布

バルブ廃水流入海域の対照海域として響灘に面した吉見沿岸海域を選び、海水、底泥および海藻を試料とし、従属栄養細菌数、ヘミセルロース分解細菌数および環境因子を調べ、バルブ廃水流入海域の結果と比較、検討した。

実験方法

試料の採取

吉見湾における海水および底泥の採取定点を Fig. 10 に示す。

海水は ZoBELL の簡易採水器、ハイロート採水器および北原式採水器を用い、各定点の 1 m 層を主として採取した。底泥は柱状採泥器、丸川式採泥器およびエクマンバージ式採泥器を用い、表層（0～5 cm）の底泥を採取した。各試料を滅菌したポリ瓶に入れ、氷蔵して研究室へ持ち帰り、細菌数、COD などの測定に供した。海藻は主として低潮線付近に生育しているものを大潮干潮時に採取し、直ちに研究室に持ち帰り試料とした。

細菌の計数

好気性従属栄養細菌、好気性キシラン分解細菌などの好気性細菌群の計数は、2・2 および 2・3 と同じ方法による。嫌気性グルコマンナン分解細菌、硫酸還元細菌などの嫌気性細菌群の計数は、2・3 と同じ方法による。なお、海藻は細切し、その 1 g を 99 ml の滅菌海水中に加えてよく振とうし、この懸濁液を試料として海藻 1 g あたりの付着細菌数を算出した。

基質

2・3 と同様に調製した、粗キシラン、粗グルコマンナンおよび粗針葉樹キシランを用いた。

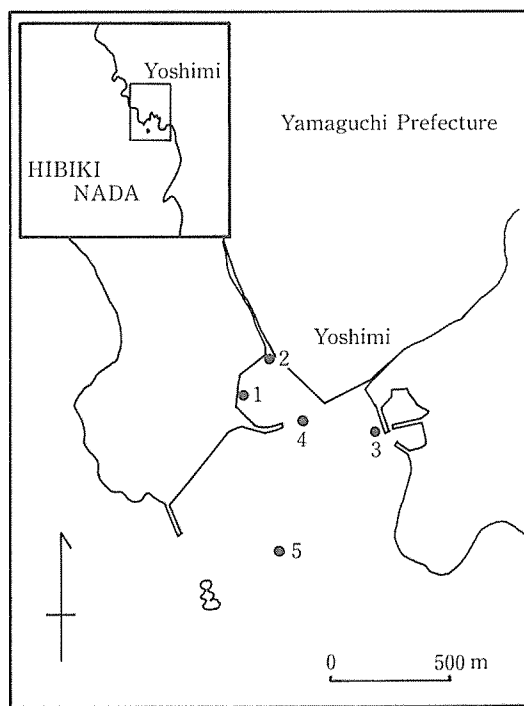


Fig. 10. Location of sampling stations in Yoshimi Bay.

環境因子の測定

海水の温度、pH、塩素量および COD の測定は 2・2 と同じ方法による。底泥の温度、pH、Eh、COD、水分量、強熱減量、ヘミセルロース量および硫化物量の測定は、2・3 と同じ方法による。

結果

海水中の好気性キシラン分解細菌の分布

吉見湾における海水中の好気性キシラン分解細菌数につ

いて、1966年から1967年にわたり、計8回調査して得られた結果を Table 25 に示す。

海水中の好気性従属栄養細菌数は $10^3 \sim 10^5$ CFU/ml、好気性キシラン分解細菌数は $0 \sim 10^1$ CFU/ml であり、両細菌数共に明らかな地点のおよび季節的な差異は認められなかった。また、COD は $0.4 \sim 4.0$ ppm であり、パルプ廃水流入海域における数値よりやや低い傾向であった。さらに、好気性従属栄養細菌数も広湾および岩国沿岸海域における細菌数よりやや低いものの、大差は見られなかった。一方、好気性キシラン分解細菌数はパルプ廃水流入海域における細菌数よりはるかに低く、両者の間には大きい差異のあることが認められた。

底泥中の好気性キシラン分解細菌の分布

吉見湾における底泥中の好気性キシラン分解細菌数の調査を海水の調査と同時にを行い、Table 26 に示す結果を得た。

底泥中の好気性従属栄養細菌数は $10^5 \sim 10^7$ CFU/g、好気性キシラン分解細菌数は $10^3 \sim 10^5$ CFU/g であり、COD は $0.2 \sim 23.5$ mg/g であった。好気性キシラン分解細菌数や COD は、パルプ廃水流入海域における数値よりやや低い傾向があった。また、個々の測定値には差異が見られたが、季節的にもまた地点的にも一定の傾向は認められなかった。ただし、好気性キシラン分解細菌数と COD との間には相関関係があることが認められた。

Table 25. The population density of aerobic xylan-decomposing bacteria and the environmental conditions in seawater in Yoshimi Bay.

St.	Date	Sampling depth (m)	Temp. of water (°C)	pH	Cl (‰)	COD (ppm)	Aerobic heterotrophic bacteria (CFU/ml)	Aerobic xylan-decomposing bacteria (CFU/ml)
1	Feb. 10, '66	1	12.0	8.3	—	—	1.2×10^5	1
	May 4, '66	1	15.6	8.2	—	1.6	3.8×10^4	1.5×10^1
	Sept. 14, '66	1	26.0	8.1	18.38	0.7	2.4×10^5	1.5×10^1
	Nov. 18, '66	1	13.8	8.3	17.33	1.6	1.5×10^4	0
	Feb. 18, '67	1	8.0	8.1	18.82	0.8	4.9×10^3	1.3×10^1
	May 13, '67	1	19.8	8.3	17.78	1.0	5.9×10^3	1.5×10^1
	Sept. 6, '67	1	30.0	8.2	18.25	1.3	3.6×10^3	3
	Dec. 6, '67	1	14.0	8.1	18.88	0.4	6.0×10^4	2
2	Feb. 10, '66	1	11.0	8.0	—	—	2.0×10^4	1.0×10^1
	May 4, '66	0.5	18.5	8.7	—	3.6	1.9×10^4	2.1×10^1
	Sept. 14, '66	1	27.5	8.5	18.21	0.6	1.2×10^5	3.4×10^1
	Nov. 24, '66	0	14.0	8.3	5.83	3.9	3.5×10^4	1.2×10^1
	Feb. 18, '67	0	6.9	8.3	15.10	0.6	8.3×10^4	3.0×10^1
	May 13, '67	0.5	19.2	8.3	17.04	2.7	1.1×10^4	0
	Sept. 6, '67	0.5	30.5	8.1	18.37	0.7	6.7×10^3	2.0×10^1
	Dec. 6, '67	0.5	12.5	8.1	18.54	0.7	1.0×10^4	5
3	May 13, '67	1	19.1	8.3	17.98	2.9	1.7×10^5	5
	Sept. 6, '67	1	30.8	8.1	18.26	1.2	1.7×10^5	5.0×10^1
	Dec. 6, '67	1	12.0	8.1	18.79	1.2	4.1×10^5	5.0×10^1
4	May 11, '66	1	17.3	8.2	17.69	1.4	1.2×10^4	5
	Nov. 24, '66	1	14.7	8.3	18.60	0.8	1.4×10^4	0
	Feb. 18, '67	1	8.0	8.1	18.62	1.2	2.3×10^3	5
	May 13, '67	1	19.4	8.3	17.67	2.4	7.8×10^4	1.0×10^1
	Sept. 6, '67	1	31.0	8.2	18.27	0.6	6.4×10^3	1.0×10^1
	Dec. 6, '67	1	13.2	8.1	18.85	0.9	4.9×10^4	1.0×10^1
5	May 11, '66	1	17.4	8.3	18.00	0.8	9.5×10^3	3
	Sept. 14, '66	1	26.0	8.1	18.50	1.3	1.1×10^5	0
	Nov. 24, '66	1	15.1	8.0	18.74	2.0	3.5×10^4	0
	Feb. 18, '67	1	9.0	8.1	18.86	0.4	2.3×10^3	2
	May 13, '67	1	18.9	8.3	17.93	2.7	6.1×10^3	0
	Sept. 6, '67	1	31.0	8.2	18.28	0.8	2.0×10^3	3
	Dec. 6, '67	1	13.0	8.2	18.94	0.8	2.3×10^4	0
	May 11, '66	8	16.9	8.2	18.22	0.7	4.9×10^3	1.0×10^1
	Sept. 14, '66	8	25.2	8.1	18.53	0.9	7.7×10^4	1.7×10^1
	Nov. 24, '66	7	15.0	8.3	18.85	2.2	3.4×10^4	0
	Feb. 18, '67	7	8.5	8.3	18.79	4.0	4.3×10^3	1.3×10^1

Table 26. The population density of aerobic xylan-decomposing bacteria and the environmental conditions in bottom sediments in Yoshimi Bay.

St. (Depth of overlying water)	Property of sediment	Date	Temp. of sediment (°C)	pH	COD (mg/g)	Aerobic heterotrophic bacteria (CFU/mg)	Aerobic xylan -decomposing bacteria (CFU/mg)
1 (2.5m)	Fine sandy loam	Feb. 10, '66	11.5	8.2	—	7.5×10^5	5.5×10^4
		May 4, '66	15.4	8.6	22.6	1.5×10^5	1.5×10^4
		Sept. 14, '66	26.2	8.1	23.5	2.2×10^5	2.0×10^3
		Nov. 24, '66	13.5	5.3	9.0	4.9×10^5	1.1×10^4
		Feb. 18, '67	8.7	8.8	18.9	7.1×10^5	3.3×10^4
		May 13, '67	19.0	9.1	14.7	4.0×10^5	7.0×10^4
		Sept. 6, '67	29.5	8.8	9.2	8.9×10^5	2.5×10^4
		Dec. 6, '67	14.5	8.4	12.8	1.6×10^6	1.3×10^4
2 (0.5m)	Coarse sandy loam	Feb. 10, '66	10.5	8.3	—	1.8×10^7	3.0×10^4
		May 4, '66	16.0	8.5	3.7	1.4×10^6	1.1×10^4
		Sept. 14, '66	26.3	8.6	1.9	2.7×10^5	1.0×10^3
		Nov. 24, '66	12.8	8.5	20.7	1.1×10^7	1.3×10^5
		Feb. 18, '67	6.9	8.9	20.0	2.8×10^5	3.9×10^4
		May 13, '67	19.4	9.3	14.0	2.1×10^6	6.0×10^4
		Sept. 6, '67	30.2	8.9	3.8	1.1×10^6	8.0×10^3
		Dec. 6, '67	14.0	8.4	8.6	1.0×10^6	9.5×10^3
3 (3.5m)	Loamy fine sand	May 13, '67	19.0	9.0	1.6	1.1×10^6	1.0×10^4
		Sept. 6, '67	30.1	8.8	0.8	2.3×10^5	1.3×10^4
		Dec. 6, '67	13.2	8.3	3.0	8.0×10^5	5.5×10^3
4 (5m)	Loam	May 11, '66	16.9	8.8	0.2	7.5×10^5	1.9×10^3
		Nov. 24, '66	15.5	9.0	3.4	3.1×10^5	1.6×10^3
		Feb. 18, '67	6.0	9.0	16.4	3.6×10^6	2.4×10^4
		May 13, '67	17.9	9.2	9.2	1.6×10^6	4.0×10^4
		Sept. 6, '67	29.5	8.8	6.9	1.1×10^6	1.1×10^4
		Dec. 6, '67	12.9	8.4	15.7	2.1×10^6	1.7×10^4
5 (8.5m)	Loamy fine sand	May 11, '66	16.9	8.7	0.6	8.1×10^5	2.7×10^3
		Nov. 24, '66	15.3	8.9	4.8	1.4×10^6	2.0×10^3
		Feb. 18, '67	8.5	9.0	12.2	6.7×10^5	1.4×10^4
		May 13, '67	17.3	9.1	8.4	1.8×10^6	2.4×10^4
		Sept. 6, '67	29.6	8.9	5.1	8.3×10^5	6.5×10^4
		Dec. 6, '67	14.0	8.4	4.8	9.2×10^5	5.5×10^3

海藻に付着する好気性キシラン分解細菌の分布

吉見沿岸に生息する緑藻類3種、褐藻類8種および紅藻類9種について調査した結果をTable 27に示す。

海藻に付着する好気性従属栄養細菌数は $10^4 \sim 10^8$ CFU/g、好気性キシラン分解細菌数は $10^2 \sim 10^5$ CFU/gであった。個々の試料間にはかなりの差異が見られるものの、緑藻、褐藻および紅藻の各藻類の間には明らかな差異が認められなかった。

底泥中のヘミセルロース分解細菌の分布

広湾における6月期調査とはほぼ同時期に、対照海域の底泥中のヘミセルロース分解細菌数について調査し、その結果をTable 28に示す。

好気性細菌群では、従属栄養細菌数が $10^4 \sim 10^5$ CFU/g、グルコマンナン分解細菌数が $10^3 \sim 10^4$ MPN/g、キシラン分解細菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/g、寒天分解細菌数が $10^3 \sim$

10^4 CFU/gであり、嫌気性細菌群では、従属栄養細菌数が 10^4 MPN/g、グルコマンナン分解細菌数が $10^2 \sim 10^4$ MPN/g、キシラン分解細菌数が 10^3 MPN/g、硫酸還元細菌数が $10^3 \sim 10^4$ MPN/gであった。一般に好気性細菌数の方が嫌気性細菌数よりやや高い傾向を示した。これらの各群細菌数は寒天分解細菌以外では、広湾底泥中における数値よりいずれも低い傾向であり、有機汚濁と細菌数の関係がどうかは定かでない。

考 察

吉見沿岸海域における好気性従属栄養細菌数および好気性キシラン分解細菌数の対数、ならびに好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の比の対数の、季節別の平均値および標準偏差をTable 29に示す。

海水中、底泥中および海藻の間では、各群細菌数および

Table 27. The population density of aerobic xylan-decomposing bacteria on the seaweeds collected at the shore of Yoshimi, Shimonoseki.

Species	Date	Aerobic heterotrophic bacteria (CFU/g)	Aerobic xylan-decomposing bacteria (CFU/g)
Green algae :			
<i>Enteromorpha</i> sp.	{ Feb. 24, '67	1.5×10^5	3.5×10^2
	{ Sept. 19, '67	2.1×10^5	7.0×10^2
<i>Ulva pertusa</i>	{ Feb. 24, '67	3.1×10^5	2.5×10^3
	{ May 11, '67	3.0×10^5	7.0×10^3
	{ Sept. 19, '67	5.2×10^5	7.0×10^3
	{ Dec. 18, '67	9.0×10^5	1.2×10^3
<i>Codium fragile</i>	May 11, '67	2.8×10^6	5.5×10^3
Brown algae :			
<i>Sargassum thunbergii</i>	{ Feb. 24, '67	1.5×10^6	6.0×10^4
	{ May 11, '67	6.8×10^5	5.0×10^3
	{ Sept. 19, '67	2.0×10^5	4.0×10^4
	{ Dec. 18, '67	9.8×10^5	7.0×10^3
<i>Hizikia fusiforme</i>	{ May 11, '67	7.5×10^5	1.9×10^3
	{ Sept. 19, '67	1.5×10^7	4.0×10^3
	{ Dec. 18, '67	1.8×10^5	$< 1.0 \times 10^2$
<i>Dictyota dichotoma</i>	Sept. 14, '66	7.4×10^5	3.1×10^3
<i>Petalonia fasciata</i>	Feb. 24, '67	3.0×10^6	5.0×10^5
<i>Undaria pinnatifida</i>	May 11, '67	4.3×10^4	1.0×10^2
<i>Sargassum horneri</i>	Nov. 24, '66	1.0×10^5	2.0×10^3
<i>Ishige okamurai</i>	Sept. 19, '67	2.5×10^5	4.0×10^3
<i>Myelophycus caespitosus</i>	Dec. 18, '67	6.8×10^5	2.0×10^2
Red algae :			
<i>Porphyra</i> sp.	Feb. 11, '66	1.1×10^6	4.0×10^5
<i>Grateloupia filicina</i>	{ May 11, '67	7.3×10^4	2.0×10^2
	{ Dec. 18, '67	2.1×10^5	9.0×10^2
<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	{ Feb. 24, '67	3.0×10^5	1.0×10^4
	{ May 11, '67	4.4×10^5	8.0×10^3
	{ Dec. 18, '67	1.8×10^5	1.0×10^3
<i>Chondrus ocellatus</i>	Nov. 24, '66	5.2×10^5	5.0×10^3
<i>Grateloupia turururu</i>	May 4, '66	8.5×10^4	2.5×10^2
<i>Hypnea charoides</i>	Sept. 14, '66	4.7×10^5	4.0×10^3
<i>Pterocladia tenuis</i>	Nov. 24, '66	7.3×10^4	8.5×10^3
<i>Polysiphonia urceolata</i>	Feb. 24, '67	3.8×10^4	2.5×10^2
<i>Gelidium amansii</i>	Sept. 19, '67	5.5×10^6	2.0×10^4

好気性キシラン分解細菌の存在比にかなりの差異が認められ、とくに、好気性キシラン分解細菌の存在比は底泥中および海藻では約1/100であるのに対し、海水中では1/1000~1/10000と非常に小さい値であった。また、各群細菌数および存在比のどちらにも、明らかな季節的変動は認められなかった。

次に、広湾および吉見湾における底泥中の6月期の調査データを比較し、それぞれの平均値および標準偏差をTable 30に示す。

各群細菌数は寒天分解細菌数を除いて、広湾における細

菌数が吉見湾の場合よりほぼ1桁高く、とくに、好気性キシラン分解細菌数および硫酸還元細菌数については、検定による平均値の差異が認められた。また、好気性ヘミセルロース分解細菌の存在比も、広湾における数値が吉見湾の場合よりやや高い傾向を示した。さらに、COD、水分量、ヘミセルロース量および硫化物量の各環境因子についても、広湾における平均値は吉見湾の場合よりそれぞれかなり高い数値であった。これらのことから、パルプ廃水流入海域では、その有機汚濁に伴い各群細菌数が増加し、それらの細菌群の活動により、より多くの硫化物が生成されるもの

Table 28. The population densities of various groups of bacteria and the environmental conditions in bottom sediments in Yoshimi Bay (Jun. 24, 1981).

St.	Depth of overlying water (m)	Temp. of sediment (°C)	pH	Eh (mV)	COD (mg/g)	Water content (%)	Ignition loss (%)	Hemicellulose		Sulfide content	
								1% NaOH soluble fraction (Glucose mg/g)	17.5% NaOH soluble fraction (Glucose mg/g)	Free (S mg/g)	Total (S mg/g)
1	2.5	22.0	8.0	+50	12.0	40.2	12.2	0.29	0.48	0.01	0.08
3	3	21.3	8.0	+260	1.9	26.6	8.6	0.02	0.26	0.00	0.01
4	6	21.0	8.0	+160	10.2	39.4	11.1	0.19	0.33	0.10	0.22
5	8	21.0	8.0	+300	5.7	44.6	11.6	0.06	0.20	0.07	0.14

St.	Aerobic bacteria				Anaerobic bacteria			
	Heterotrophic bacteria (CFU/g)	Glucomannan-decomposing bacteria (MPN/g)	Xylan-decomposing bacteria (CFU/g)	Agar-decomposing bacteria (CFU/g)	Heterotrophic bacteria (MPN/g)	Glucomannan-decomposing bacteria (MPN/g)	Xylan-decomposing bacteria* (MPN/g)	Sulfate-reducing bacteria (MPN/g)
1	1.9×10^5	9.3×10^3	6.0×10^2	2.4×10^4	9.3×10^4	1.1×10^4	4.3×10^3	1.1×10^4
3	2.0×10^5	4.8×10^4	2.5×10^3	2.0×10^4	2.4×10^4	1.5×10^3	1.5×10^3	1.5×10^3
4	2.1×10^4	1.5×10^3	1.4×10^3	5.0×10^3	2.4×10^4	4.3×10^3	4.8×10^3	2.1×10^4
5	1.8×10^5	4.8×10^3	1.0×10^3	3.0×10^4	2.4×10^4	7.5×10^2	1.2×10^3	1.1×10^4

*The liquid medium was prepared with softwood xylan.

Table 29. The bacterial populations and the ratio of aerobic xylan-decomposing bacteria to aerobic heterotrophic bacteria in different seasons in the sea near Yoshimi.

		Feb.	May	Sept.	Nov. Dec.	Total
log of aerobic heterotrophic bacteria (H) in CFU/m ³ or g	Seawater	3.9 ± 0.8	4.4 ± 0.6	4.3 ± 1.0	5.0 ± 0.5	4.4 ± 0.8
	Bottom sediments	6.6 ± 0.5	6.2 ± 0.2	6.0 ± 0.3	6.1 ± 0.4	6.2 ± 0.4
	Seaweeds	5.9 ± 1.1	5.5 ± 0.6	5.9 ± 0.7	5.5 ± 0.4	5.7 ± 0.7
log of aerobic xylan-decomposing bacteria (X) in CFU/m ³ or g	Seawater	0.5 ± 0.5	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.7	0.8 ± 0.5
	Bottom sediments	4.5 ± 0.2	4.2 ± 0.6	3.8 ± 0.5	3.9 ± 0.6	4.1 ± 0.5
	Seaweeds	4.1 ± 1.4	3.1 ± 0.8	3.7 ± 0.5	3.3 ± 0.5	3.5 ± 0.9
log of ratio (X/H)	Seawater	-3.4 ± 1.2	-3.6 ± 0.6	-3.3 ± 0.6	-4.0 ± 0.4	-3.5 ± 0.7
	Bottom sediments	-2.2 ± 0.4	-2.0 ± 0.4	-2.2 ± 0.5	-2.1 ± 0.3	-2.1 ± 0.4
	Seaweeds	-1.9 ± 0.7	-2.3 ± 0.4	-2.2 ± 0.4	-2.2 ± 0.8	-2.2 ± 0.7

Each value shows mean \pm standard deviation.

と考えられる。

なお、吉見湾における寒天分解細菌数は他の細菌群の場合と異なり、広湾のそれよりやや高い数値を示した。これは、吉見湾がテングサなどの寒天質を含む海藻の生息する沿岸に近いと考えられる。一方、広湾においてはヘミセルロース量が高く、それに伴って各ヘミセルロース分解

細菌数が高くなったものと考え、ヘミセルロース分解細菌および寒天分解細菌はそれぞれ基質依存性を持つ細菌群と考えられる。

さらに、広湾においては好気性ヘミセルロース分解細菌の存在比も吉見湾のそれより高い傾向であった。しかし、この差異は海水中での存在比の差異ほど顕著なものではな

Table 30. Comparison of the bacterial populations, the ratio of hemicellulose-decomposing bacteria to heterotrophic bacteria, and the environmental conditions in bottom sediments in different areas (Jun. data).

	Hiro Bay	Yoshimi Bay		Hiro Bay	Yoshimi Bay
Aerobic bacteria			Ratio of hemicellulose-decomposing bacteria to heterotrophic bacteria		
log of heterotrophic bacteria (H) in CFU/g	5.9±0.8	5.0±0.4	log of ratio (G/H)	-0.5±0.7	-1.2±0.4
log of glucomannan-decomposing bacteria (G) in MPN/g	5.4±1.3	3.9±0.5	log of ratio (X/H)	-1.8±0.2	-2.0±0.6
log of xylan-decomposing bacteria (X) in CFU/g	4.2±0.7	3.1±0.2	log of ratio (ANG/ANH)	-1.7±0.8	-1.1±0.3
log of agar-decomposing bacteria in CFU/g	3.6±0.8	4.2±0.3	Environmental conditions		
			COD in mg/g	50.7±54.3	7.5±4.6
Anaerobic bacteria					
log of heterotrophic bacteria (ANH) in MPN or AN/g	5.2±0.4	4.5±0.3	Water content in %	69.3±7.8	37.8±7.8
log of glucomannan-decomposing bacteria (ANG) in MPN/g	3.5±1.2	3.4±0.4	Hemicellulose in mg/g	2.6±4.0	0.5±0.2
log of sulfate-reducing bacteria in MPN/g	5.4±0.6	3.9±0.4	Total sulfide in S mg/g	0.48±0.52	0.11±0.09

Each value shows mean ± standard deviation.

かった。これは後(4.)で述べるように、底泥中の好気性キシラン分解細菌が主として *Bacillus* 属から構成されていることに起因すると思われる。すなわち、*Bacillus* 属はキシラン分解細菌としての報告も多く⁸⁴⁾、また、沿岸海域の底泥中には *Bacillus* 属の存在が多いこと⁸⁷⁾が明らかにされている。これらのことから、非汚濁海域である吉見湾でも底泥中には分解細菌のベースとなる *Bacillus* 属の存在が多く、そのため必然的に分解細菌数も多くなり、また、キシラン分解細菌の存在比も高くなり、汚濁海域との差異が大きくならなかったものと思われる。

3. 沿岸海域におけるヘミセルロース分解細菌の分布に関する推計学的解析

多くの環境因子によって影響を受ける細菌の生態を解明するためには、現場調査データの二次元的解析のみでは十分とは言えない。そのため、複数の要因を同時に扱う方法、すなわち、多変量解析法⁸⁸⁾などを用いることが有効となってくる。この種の方法を海域における微生物学的研究に取り入れたのは、我が国ではMiyoshiら³³⁾の撻灘における細菌数に影響する因子の解明に関する研究が最初である。その後、三河湾の従属炭糞細菌⁸⁹⁾、沿岸海域における炭化水

素酸化細菌⁹⁰⁾などの研究にも多変量解析法が使われ、新しい角度からの知見が得られている。したがって、本研究にもこの多変量解析法を導入し、ヘミセルロース分解細菌の分布に及ぼす各環境因子の影響について検討した。

3・1 広湾における海水中のヘミセルロース分解細菌の分布に及ぼす環境因子の影響

広湾における海水中のヘミセルロース分解細菌の分布に関するデータ(2・2)を基に、各群細菌および各環境因子の地点的分布の特徴、ならびに各環境因子のヘミセルロース分解細菌の分布に及ぼす影響などについて、主として重回帰分析を用いて解析した。

方 法

測定値の正規性の判定

推計学的処理に先だち、それぞれの測定値あるいは変数変換値の正規性を、実測頻度分布と、それより求めた平均値および標準偏差を用いて計算した正規分布とのヒストグラムの比較によって判定した。

層別因子を含む単回帰分析

測定結果は四季にわたることから、各群細菌および各環

環境因子の地点的分布に季節的要因がどのように影響しているかを調べるため、季節を層別因子とした回帰分析⁹¹⁾によって解析した。すなわち、パルプ工場から各定点までの水平距離 (x) に対する各測定値または変数変換値 (y) の散布傾向について、季節をこみにした場合の回帰式 $y = a_0 + a_1x$ と四季を通じて共通の勾配, b^{*k} を持ち, しかも季節ごとに異なる切片, b_0^{*k} を持つ回帰式 $y = b_0^{*k} + b^{*k}x$ とが成立するかどうかを調べ, 各測定値の地点的変動と季節的変動の有無を同時に検討した。なお, この際, a_1 または b^{*k} の有意性から地点的変動の有無を, b_0^{*k} の差の検定から季節的変動の有無を求めた。

重回帰分析

各群細菌数に影響する環境因子を調べるため, 複数の環境因子を独立変数とした各群細菌数についての重回帰式を求め, 各偏回帰係数の有意性の検定により, 各環境因子の各群細菌数に及ぼす影響の有無について解析した。なお, この重回帰分析に先だち, 各群細菌数と各環境因子との間の単相関係数を調べ, 各群細菌数に対して最も相関の高い環境因子を重回帰式の第1変数として取り込んだ。第2変数以後の処理は, 変数の追加または除去の基準を F 値で2

と設定 ($F_{IN} = F_{OUT} = 2$) した変数増減法⁹¹⁾により重回帰式を求めた。

結果および考察

海水中の細菌数および環境因子の頻度分布

測定結果の統計処理においては, それぞれの測定値 (または変数変換値) が正規分布とみなせない場合は誤差が大きくなる。そこで, これらの測定値はなんらかの変数変換により, 正規分布に近づける必要がある。これらの正規性の判定を, 各測定値 (または変数変換値) の実測頻度分布とこれが正規分布であると仮定した場合の計算頻度分布との比較により行った。その結果を Fig. 11 に示す。

これらの正規性の検定は本来実測分布と計算正規分布の差の χ^2 検定によるが, 今回は測定頻度が少なく, この種の検定が不可能であるため, 図に示した両者のヒストグラムの状況から正規性を判定した。1m層海水中では各群細菌数の対数値, COD および溶存性炭水化物量の実測分布はそれぞれその計算正規分布とほぼ近似しており, 正規分布であると確認できた。一方, 底層水中では, COD および好気性キシラン分解細菌数などは, 正規分布から大きく

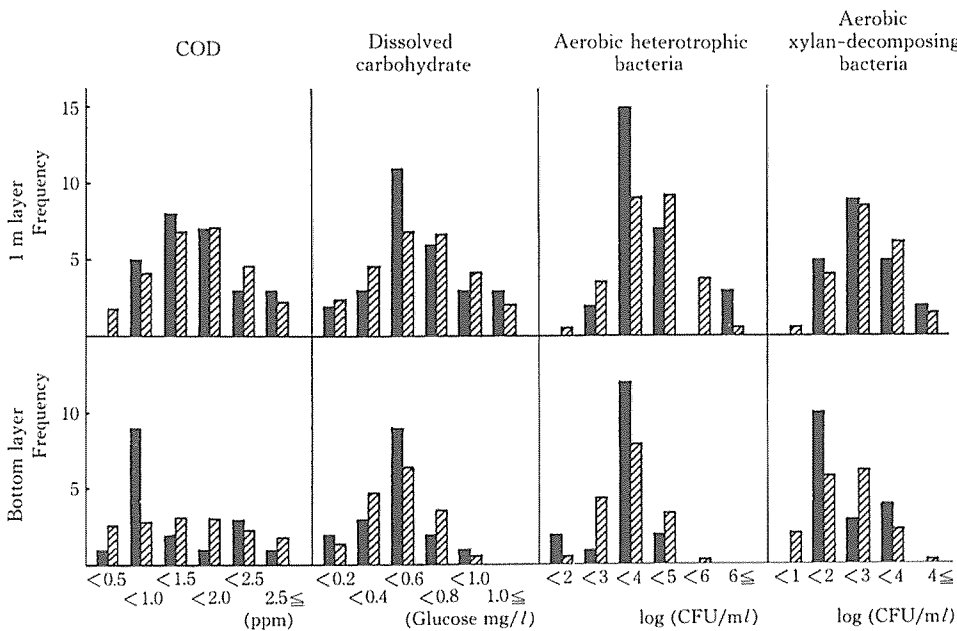


Fig. 11. Fitness of observed frequency distribution to normal series (the population densities of bacteria and the environmental conditions in seawater in Hiro Bay).
 ■ : observed distribution, ▨ : estimated normal distribution.

離れていた。これらのことから、海水では正規性の認められる1m層海水を主体に推計学的解析を進めた。なお、塩素量については、一般に沿岸海域において正規分布とされている $\sqrt{19-Cl}$ 変換値^(89,90)を用いることにした。

地点的分布における季節因子の影響（層別因子を含む単回帰分析）

パルプ工場からの水平距離に対する各群細菌および各環境因子の分布傾向とそれに季節的要因の影響が及んでいるかどうかを、季節を層別因子として含む単回帰分析によって調べ、Table 31に示す結果を得た。

まず、季節をこみにした場合には1m層海水中の各群細菌数およびCODの F_a が有意であることから、それぞれの $y = a_0 + a_1x$ の回帰式が成立した。しかもその a_1 はいずれも負であることから、これらの測定値は工場排水口に近い定点で最も高く、工場から離れるにしたがって次第に減少する傾向のあることが明らかとなった。一方、底層水では回帰式が成立せず、地点的変化の傾向はまったく認められなかった。これらのことおよびFig.11のヒストグラ

ムの山が低い測定値の方にあることなどから、底層水には沖合部の、CODや細菌数の少ない海水が流入していることが推測される。そのため、底層水では有機汚濁とは無関係と思われる地点的分布となったものと考えられる。

次に、層別因子を含む単回帰分布による回帰式($y = b_0^{(k)} + b_1^{(k)}x$)が成立したのはCODだけであった。切片 $b_0^{(k)}$ および勾配 $b_1^{(k)}$ における F_0 値がそれぞれ8.32および0.92であった。このことから、切片の季節差は高度に有意であり、それぞれ季節ごとに異なる切片が存在することがわかった。また、勾配では季節的差異が有意でなく、全季節に共通の勾配があることがわかった。以上のことから、CODでは、季節ごとに異なる4本の平行な回帰直線で示される減少傾向があり、それぞれの切片は春季から夏季にかけて低く、秋季から冬季にかけて高いものであった。さらに、好気性従属栄養細菌数では、一部の季節で地点による変化が特異的であるためか、 $b_1^{(k)}$ の F_0 値も有意であったが、 $b_0^{(k)}$ の F_0 および F_b 値はそれぞれ高度に有意であることから、冬季に低く、夏季に高い季節的変動がおおむ

Table 31. Results of the linear regression analysis for the population density of bacteria or the environmental conditions (y) on the distance from pulp mill in km (x) in the four seasons data of seawater in Hiro Bay.

y	Seasons pooled				Common regression coefficient at various seasons							
	a_0	a_1	F_a	n_2	$b_0^{(k)}$				F_b	F_0		
					Feb.	Jun.	Sept.	Nov.		$b_1^{(k)}$	$b_0^{(k)}$	$b_1^{(k)}$
1m layer;												
log H	4.52	-0.67	5.09*	24	3.88	4.39	5.89	4.52	-0.79	16.74**	12.78**	4.28*
log G	3.76	-0.58	2.62	16		3.10	3.97	4.21	-0.58	3.06	2.35	12.77**
log X	3.24	-0.85	10.28**	18	3.39	2.72	3.48		-0.81	10.34**	2.16	6.13*
log A	3.41	-0.72	5.14*	24	2.91	3.27	3.83	4.06	-0.81	7.11*	1.95	5.82**
COD	1.89	-0.43	4.93*	24	2.45	1.43	1.38	1.80	-0.33	5.42*	8.32**	0.92
A_{250}	0.032	-0.006	2.46	24	0.041	0.026	0.030	0.024	-0.004	1.75	3.75*	0.29
DCh	0.72	-0.15	2.94	24	0.72	0.58	0.67	0.89	-0.15	2.96	1.27	1.20
Bottom layer;												
log H	3.43	-0.03	0.01	15	3.57	3.40	3.20		-0.00	0.00	0.28	0.13
log G	1.91	0.09	0.04	8		2.27	1.54		0.09	0.04	2.75	0.02
log X	1.96	0.19	0.14	15	2.81	1.31	1.12		0.36	1.57	16.08**	0.10
log A	1.85	0.37	0.82	15	2.31	1.57	1.29		0.46	1.71	3.47	6.70*

log H: log of aerobic heterotrophic bacteria in CFU/ml, log G: log of aerobic glucomannan-decomposing bacteria in MPN or AN/ml, log X: log of aerobic xylan-decomposing bacteria in CFU/ml, log A: log of agar-decomposing bacteria in CFU/ml, A_{250} : Absorbance at 250nm, DCh: Dissolved carbohydrate.

$y = a_0 + a_1x$, $y = b_0^{(k)} + b_1^{(k)}x$ ($k = 2, 3$ or 4).

F_a : The Snedecor's F for a_1 with 1 and n_2 degrees of freedom, F_b : The Snedecor's F for $b_1^{(k)}$ with 1 and $n_2 - (k-1)$ degrees of freedom, F_0 : Difference of coefficients in various seasons for $b_0^{(k)}$ with $k-1$ and $n_2 - (k-1)$ degrees of freedom, and for $b_1^{(k)}$ with $k-1$ and $n_2 - 2(k-1)$ degrees of freedom.

*significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

ね認められた。

海水中における各群細菌数に及ぼす環境因子の影響

各群細菌数に及ぼす各環境因子の影響を調べる手始めとして、まず、各群細菌数と各環境因子との相関係数を調べ、Table 32 に示す結果を得た。

この単相関関係から、好気性従属栄養細菌数には温度との、また好気性グルコマンナン分解細菌数には溶存性炭水化物量との相関が認められたが、好気性キシラン分解細菌数では COD や SS との相関係数がやや大きいものの有意とはならなかった。また、汚濁とは無関係な多糖類を分解する寒天分解細菌数には各環境因子との相関が認められず、寒天分解細菌の分布はこの海域における有機汚濁とは無関

係であることが明らかとなった。

次に、各群細菌数に対する単相関係数の最も高い環境因子を第 1 変数として取り込み、変数増減法による重回帰分析を行った。その結果を Table 33 に示す。

好気性従属栄養細菌数には、温度因子のほかに COD や UV 吸収 (280 nm) の因子の影響が見られた。なお、この COD や UV 吸収の単相関係数は好気性従属栄養細菌数に対して、それぞれ -0.19 と 0.08 であり、共に無相関に見えたが、重回帰分析により温度因子の影響を取り除くと、このように細菌数に影響する因子であることが明らかとなった。また、好気性グルコマンナン分解細菌数には UV 吸収および溶存性炭水化物量が、好気性キシラン分解細菌

Table 32. Correlation coefficient matrix of bacterial numbers to the environmental conditions in seawater (1 m layer) in Hiro bay.

Factors	Temp	$\sqrt{19-Cl}$	COD	A_{250}	A_{280}	DCh	SS
log H	0.61**	0.15	-0.19	0.08	0.08	0.10	-0.05
log G	-0.02	0.15	0.45	0.27	0.46	0.62**	0.26
log X	-0.17	-0.23	0.38	0.37	0.31	0.16	0.38
log A	0.24	0.15	-0.03	0.11	0.21	0.24	-0.10

Temp: Water temperature in °C, $\sqrt{19-Cl}$: $\sqrt{19-Cl}$ transformation of chlorinity in‰, A_{250} : Absorbance at 250nm, A_{280} : Absorbance at 280nm, DCh: Dissolved carbohydrate in Glucose mg/l.

Sample size is 27 (18 for log G and 21 for log X).

**significant at 0.01 level

Table 33. Results of multiple linear regression analysis by the stepwise procedure ($F_{in} = F_{out} = 2$) of the population densities of aerobic bacteria in seawater (1 m layer) in Hiro Bay.

y	Step of selection	Constant a_0	Temp(x_1) a_1	$\sqrt{19-Cl}$ (x_2) a_2	COD(x_3) a_3	A_{250} (x_4) a_4	A_{280} (x_5) a_5	DCh(x_6) a_6	SS(x_7) a_7	n_2	r	R
log H	1	2.155	0.104 (0.61)							25	0.61**	0.61**
	2	-0.083	0.165 (0.98)		0.735 (0.51)					24	0.45*	0.71**
	3	-0.819	0.173 (1.02)		0.680 (0.47)		31.05 (0.24)			23	0.32	0.75**
log G	1	1.036						3.800 (0.62)		16	0.62**	0.62**
	2	-0.077					65.39 (0.38)	3.468 (0.56)		15	0.46	0.72**
log X	1	1.988			0.453 (0.38)					19	0.38	0.38

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_7x_7$$

r: Partial correlation coefficient of newly entered variable, R: Multiple correlation coefficient.

Values in parentheses show standard partial regression coefficient.

*significant at 0.05 level

**significant at 0.01 level

数には COD がそれぞれ影響を及ぼす因子であることがわかった。これらの各環境因子のうち、温度因子以外はパルプ工場廃水の流入の影響を端的に示す因子であり、好気性従属栄養細菌数および好気性ヘミセルロース分解細菌数は共にパルプ工場廃水の流入の影響を強く受けていることが推測できる。

さらに、それぞれの偏回帰係数の有意性から見ると、好気性従属栄養細菌数ではステップ2の温度およびCODの2変数からなる重回帰式が成立することになり、その寄与率も約50% ($R^2 \approx 0.50$) となった。一方、好気性グルコマンナン分解細菌数では、ステップ1の溶存性炭水化物量との単回帰式が成立した。このような関係は岩国沿岸海域における好気性キシラン分解細菌数の場合にも認められ¹⁴⁾、前章と同様に本解析結果からも、海水中のヘミセルロース分解細菌の糖質依存性が確認された。

3・2 広湾における底泥中のヘミセルロース分解細菌の分布に及ぼす環境因子の影響

広湾における底泥中のヘミセルロース分解細菌の分布に関するデータ(2・3)を基に、各群細菌および各環境因子の地点的分布の特徴、ならびに各群細菌数に及ぼす各環境因子の影響などについて、重回帰分析を用いて解析した。

方 法

前節と同様な方法によって、まず各測定値などの正規性を判定した。次に、層別因子を含む単回帰分析によって各測定値の地点的分布の特徴ならびに季節の要因の影響を調べた。さらに、重回帰分析によって各群細菌数に及ぼす各環境因子の影響について解析した。

結果および考察

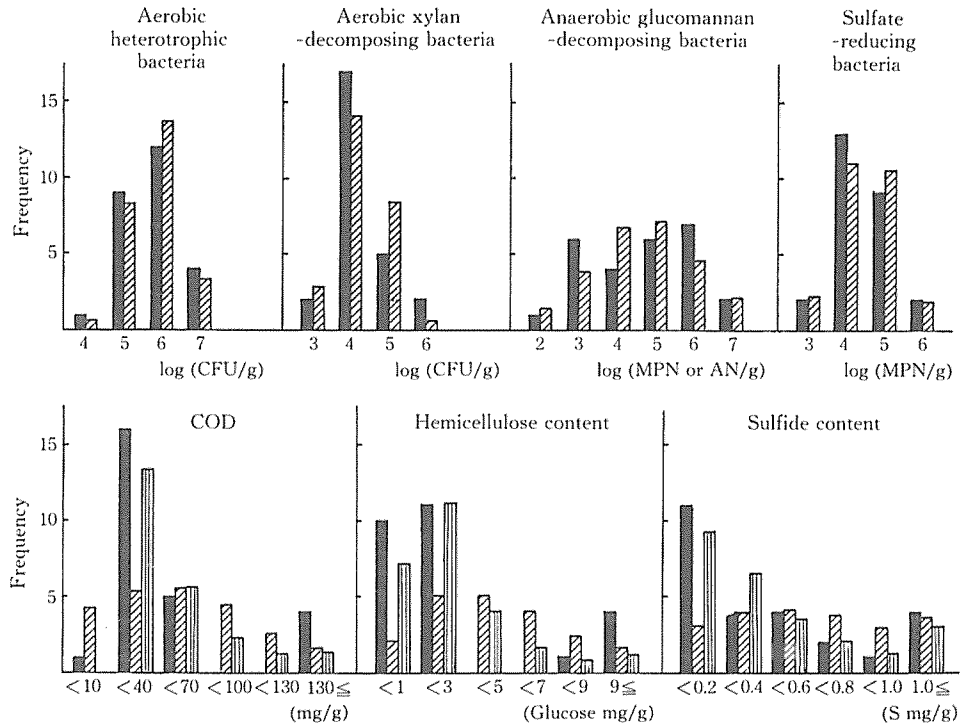


Fig. 12. Fitness of observed frequency distribution to normal series (the population densities of bacteria and the environmental conditions in bottom sediments in Hiro Bay).

■ : Observed distribution, ▨ : Estimated normal distribution, □ : Estimated root normal distribution.

底泥中の細菌数および環境因子の頻度分布

底泥中における各群細菌数の対数および各環境因子の実測頻度分布、ならびに計算正規分布のヒストグラムをFig. 12に示す。

各群細菌数の対数の頻度分布はその計算正規分布と近似しており、細菌数の対数変換値が正規分布であると認められた。一方、COD、ヘミセルロース量および硫化物量については、実測頻度分布に対して、計算正規分布と計算平方根正規分布との両ヒストグラムを対応させたところ、実測頻度分布はいずれも計算平方根正規分布と近似していた。また、温度以外のはかの環境因子にもほぼ同様な傾向が見られた。したがって、これらの環境因子は平方根変換をして、以後の推計学的処理に用いた。

地点的分布における季節因子の影響（層別因子を含む単回帰分析）

底泥中の各群細菌数および各環境因子について、パルプ工場からの水平距離に対する分布傾向を、季節を層別因子として含む単回帰分析によって調べ、Table 34 および Fig. 13 に示す結果を得た。

まず、各群細菌数および各環境因子では、四季のデータをこみにした場合には、各回帰式がほぼ成立した（各 $y = a_0 + a_1x$ の F_a が有意）。すなわち、各群細菌数および各環境因子には、パルプ工場の排水口から離れるにしたがって次第に減少する傾向が認められた。

次に、季節を層別因子として組み込んだ単回帰分析の結果から、各ヘミセルロース分解細菌数の地点的分布に、各季節ごとの変動が認められた（ $b_0^{(k)}$ の F_0 が有意）。すなわち、それぞれの季節で異なる切片を持つ4本の平行線で示される分布傾向があることがわかった。これら細菌群のうち、好気性グルコマンナン分解細菌および嫌気性グルコマンナン分解細菌については、Fig. 13 に示すとおりである。好気性グルコマンナン分解細菌では、夏季には春季および秋季より低い切片であることが認められ、夏季における特異的な減少傾向が全地点を通じて現われた。一方、嫌気性グルコマンナン分解細菌では、夏季における回帰式の切片が最も高く、各季節の温度に関係すると考えられる変動傾向が認められた。また、各細菌群のうち、好気性従属栄養細菌および硫酸還元細菌には、季節的変動が認められ

Table 34. Results of the multiple linear regression analysis (dummy variables are used to express seasonal difference) of the population densities of bacteria and the environmental conditions (y) on the distance from pulp mill (x) in the four seasons data of bottom sediments in Hiro Bay.

y	Seasons pooled				Common regression coefficient at various seasons							
	a_0	a_1	F_a	n_2	$b_0^{(k)}$				$b_1^{(k)}$	F_b	F_0	
					Feb.	Jun.	Sept.	Nov.			$b_0^{(k)}$	$b_1^{(k)}$
log H	6.30	-0.71	22.18**	24	6.11	6.54	6.48	6.23	-0.75	24.36**	1.20	0.10
log G	5.96	-0.97	12.54**	24	5.36	6.27	5.93	6.84	-1.08	22.71**	4.99**	1.45
log X	4.74	-0.65	19.11**	24	4.73	4.68	4.32	5.22	-0.65	29.68**	5.69**	0.49
log A	3.49	-0.42	4.70*	24	3.39	3.93	2.98	3.74	-0.44	6.62*	3.62	0.40
log ANH	5.52	-0.11	0.55	24	5.12	5.32	5.98	6.01	-0.19	4.19	16.39**	0.20
log ANG	5.45	-1.11	8.96**	24	4.73	4.51	6.70	6.49	-1.24	34.59**	18.36**	0.15
log S	6.12	-0.88	35.24**	24	5.91	6.17	6.32	6.29	-0.92	37.89**	1.08	3.14
$\sqrt{\text{COD}}$	8.55	-3.24	19.71**	24	8.11	9.18	8.48	8.82	-3.32	18.26**	0.23	0.13
$\sqrt{\text{WC}}$	8.56	-0.37	7.95**	24	8.42	8.64	8.68	8.65	-0.40	8.37**	0.54	0.55
$\sqrt{\text{IL}}$	4.36	-0.97	17.56**	24	4.31	4.55	4.38	4.26	-0.98	15.63**	0.16	0.16
$\sqrt{\text{HCell}}$	2.20	-0.91	17.37**	24	2.27	2.09	2.16	2.23	-0.90	14.60**	0.08	0.07
$\sqrt{\text{SC}}$	0.92	-0.40	40.93**	24	0.88	0.96	0.97	0.89	-0.41	37.80**	0.32	0.11

log ANH : log of anaerobic heterotrophic bacteria in MPN or AN/g, log ANG : log of anaerobic glucomannan decomposing bacteria in MPN or AN/g, log S : log of sulfate-reducing bacteria in MPN/g, $\sqrt{\text{COD}}$: Root of COD in mg/g, $\sqrt{\text{WC}}$: Root of water content in %, $\sqrt{\text{IL}}$: Root of ignition loss in %, $\sqrt{\text{HCell}}$: Root of hemicellulose in Glucose mg/g, $\sqrt{\text{SC}}$: Root of sulfide content in S mg/g.

$y = a_0 + a_1x$, $y = b_0^{(k)} + b_1^{(k)}x$ ($k = 4$: Feb., Jun., Sept., and Nov.)

F_a : The Snedecor's F for a_1 with 1 and n_2 degrees of freedom, F_b : The Snedecor's F for $b_1^{(k)}$ with 1 and $n_2 - (k - 1)$ degrees of freedom, F_0 : Difference of coefficients in various seasons for $b_0^{(k)}$ with $k - 1$ and $n_2 - (k - 1)$ degrees of freedom, and for $b_1^{(k)}$ with $k - 1$ and $n_2 - 2(k - 1)$ degrees of freedom.

*significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

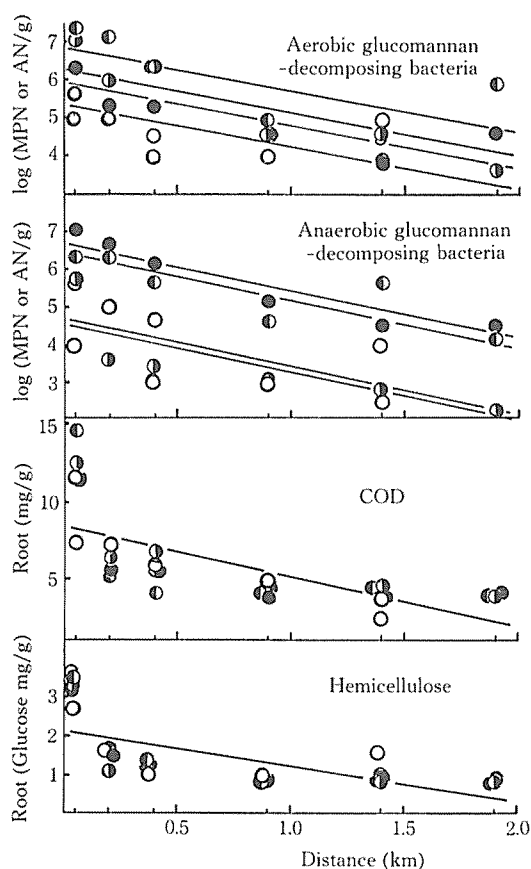


Fig. 13. Relations of the population densities of bacteria and the environmental conditions to the distance from pulp mill in bottom sediments in Hiro Bay.

○: Feb., ●: Jun., ●: Sept., ●: Nov..

Thin solid lines show the regression lines with common coefficient but seasonally different constants.

Thick lines show the regression lines at pooled data.

ず (b^* の F_0 が有意でない), 四季を通じて一定の地点的変化の傾向を示していた。さらに, 各環境因子にも同様に季節的変動は認められず, 一定の地点的減少傾向であることが明らかとなった。これらの傾向は Fig. 13 に図示した COD およびヘミセルロース量の例とほぼ同様であった。

以上のうち, 夏季の季節的変動に大きな差異のある好気性グルコマンナン分解細菌数と嫌気性グルコマンナン分解

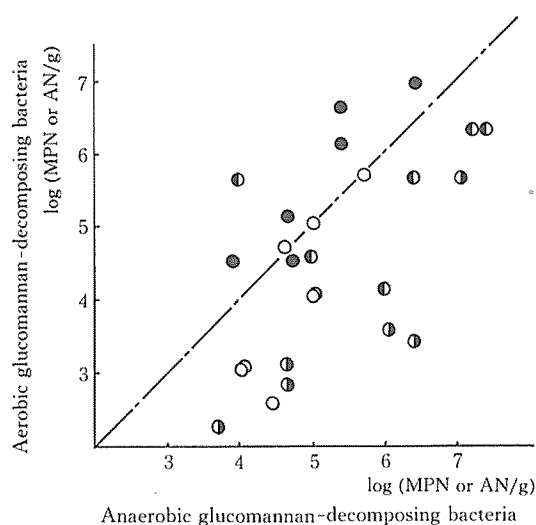


Fig. 14. Relation between the population density of aerobic glucomannan-decomposing bacteria and the population density of anaerobic glucomannan-decomposing bacteria in bottom sediments in Hiro Bay.

○: Feb., ●: Jun., ●: Sept., ●: Nov..

細菌数との関係を図示すると, Fig. 14 のようになる。

この図から明らかなように, 秋季から春季へかけては各点が $y=x$ 線の右下側にちらばり, 好気性細菌群が優勢であることを示している。これに対して, 夏季における各点は $y=x$ 線の左上側にあり, 嫌気性細菌群が優勢へと変わること示している。これは夏季における有機汚濁物質の分解の進行に伴う, 種々の要因がもたらした菌群の遷移現象と思われる。

底泥中における各群細菌数に及ぼす環境因子の影響

重回帰分析における第 1 変数取り込みのために, 各群細菌数と各環境因子との間の単相関係数を求め, Table 35 の結果を得た。

好気性従属栄養細菌数, 好気性ヘミセルロース分解細菌数, 嫌気性ヘミセルロース分解細菌数および硫酸還元細菌数には, 種々の環境因子との間に有意な相関が見られ, それぞれ有機汚濁との関係が強いことを示していた。これに対して, 有機汚濁に無関係な多糖類を分解する寒天分解細菌数の場合は, 海水中におけると同様に各環境因子との間に有意な相関がほとんど認められず, 有機汚濁に無関係な分布傾向を持つことが明らかとなった。

Table 35. Correlation coefficient matrix of the population densities of bacteria to the environmental conditions in bottom sediments in Hiro Bay.

Factors	Temp Temp. of sediment in °C	$\sqrt{\text{COD}}$ Root of COD in mg/g	$\sqrt{\text{WC}}$ Root of water content in %	$\sqrt{\text{IL}}$ Root of Ignition loss in %	$\sqrt{\text{HCeI}}$ Root of hemi- cellulose in Glucose mg/g	$\sqrt{\text{ESCh}}$ Root of 70% ethanol sol. fraction in Glucose mg/g	$\sqrt{\text{OA}}$ Root of organic acid in $\mu\text{geq/g}$	$\sqrt{\text{SC}}$ Root of sulfide content in S mg/g
Aerobic bacteria								
log H	0.16	0.66**	0.71**	0.68**	0.60**	0.65**	0.39	0.67**
log G	0.19	0.63**	0.57**	0.61**	0.58**	0.43	0.36	0.64**
log X	-0.28	0.61**	0.43*	0.59**	0.63**	0.77**	0.27	0.60**
log A	-0.16	0.25	0.26	0.22	0.19	0.53*	-0.28	0.20
Anaerobic bacteria								
log ANH	0.59**	0.29	0.42*	0.26	0.24	0.03	-0.09	0.31
log ANG	0.39*	0.50**	0.58**	0.48*	0.55**	0.26	0.56	0.56**
log S	0.13	0.77**	0.70**	0.76**	0.76**	0.62*	0.69*	0.81**

Sample size is 26 (15 for 70% ethanol sol. fraction and 9 for organic acid).

*significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

次に 各群細菌数に対して最も単相関係数の高い環境因子を重回帰分析の第1変数として取り込み、変数増減法により逐次選択した結果を Table 36 および 37 に示す。

Table 36 の好気性細菌群では、好気性従属栄養細菌数には水分量、好気性グルコマンナン分解細菌数には温度およびヘミセルロース量、好気性キシラン分解細菌数にはヘミセルロース量が、それぞれ細菌数に影響を及ぼす因子であることが認められた。なお、この好気性ヘミセルロース分解細菌についての重回帰分析には温度因子と共に、先の地点的分布傾向において認められた夏季の減少傾向を夏季ダミー変数として、同時に追加取り込みを行った。その結果、それぞれの夏季ダミー変数が有意となると共に、上記のヘミセルロース量の影響もより明確になったと言える。これらのことから、好気性ヘミセルロース分解細菌ではヘミセルロース量が細菌数に影響を及ぼす、いわゆる基質依存性の強い細菌群であることが明らかとなった。さらに、前項でも認められた好気性ヘミセルロース分解細菌の夏季の特異的な減少傾向は、本解析からも確認できた。

Table 37 から明らかなように、嫌気性細菌群では、従属栄養細菌数には温度およびヘミセルロース量、グルコマンナン分解細菌数には水分量、温度およびヘミセルロース量が、それぞれ影響を及ぼす因子であった。両菌群共に、ヘミセルロース量などの有機汚濁関係因子のほかに温度因子の影響が強く、温度依存性の強い菌群と言える。しかし、これは温度が直接の要因と考えるより、温度上昇に伴う微

生物の活動の活発化による底質の還元的条件の発達によって嫌気性菌群の増殖に適した環境が生じたためと思われる。また、硫酸還元細菌数には、COD が最も強い影響因子であることが認められた。これはすでに木俣ら²⁷⁾の結果に認められており、有機汚濁物質のうち、易分解性の有機物が硫酸還元細菌の増殖を促進するという結論に一致する。

以上の重回帰分析のうち、各偏回帰係数の有意性が認められる変数までの回帰式をまとめると、Table 38 が得られた。

好気性従属栄養細菌数および硫酸還元細菌数には一般の有機汚濁指標である水分量や COD などの因子の影響が強く及んでおり、その寄与率はいずれも 50% ($R^2 = 0.5$) 以上であった。また、各ヘミセルロース分解細菌数はヘミセルロース量および季節的要因 (温度および夏季ダミー変数) の影響を受け、それぞれの重回帰式の寄与率は 50% 以上であった。

さらに、広湾における底泥中の各群細菌数のうちには、季節的要因の影響を受けているものが見られた。そこで、この季節を層別因子として整理し、各群細菌数と各環境因子との相関係数を調べ、Table 39 に示す結果を得た。

Table 39 から明らかなように、広湾における底泥中の各群細菌数には 70% エタノール抽出糖量との相関が認められ、有機汚濁物質として流入したセルロースやヘミセルロースの分解物である単糖類などの影響が、直接あるいは間接的に各群細菌数に及んでいると考えられる。また、有

Table 36. Results of multiple linear regression analysis by the stepwise procedure ($F_{in} = F_{out} = 2$) of the population densities of aerobic bacteria in bottom sediments in Hiro Bay.

y	Step of selection	Constant a_0	Temp (x_1) a_1	$\sqrt{\text{COD}}$ (x_2) a_2	$\sqrt{\text{WC}}$ (x_3) a_3	$\sqrt{\text{IL}}$ (x_4) a_4	$\sqrt{\text{HCl}}$ (x_5) a_5	Summer dummy variable (x_6) a_6	n_2	r	R
log H	1	-2.354			0.980 (0.71)				24	0.71**	0.71**
	2	3.918		0.216 (0.63)					24	0.63**	0.63**
log G	2	2.345	0.103 (0.51)	0.207 (0.60)				-1.099 (-0.44)	22	$r_1 = 0.44^*$ $r_6 = -0.39$	0.72**
	3	1.941	0.135 (0.67)	0.019 (0.05)			0.683 (0.58)	-1.395 (-0.56)	21	0.27	0.74**
	4	1.916	0.138 (0.69)				0.744 (0.63)	-1.423 (-0.57)	22	$r_1 = 0.57^{**}$ $r_5 = 0.68^{**}$ $r_6 = -0.50^*$	0.74**
log X	1	3.580					0.423 (0.63)		24	0.63**	0.63**
	2	3.461	0.018 (0.15)			0.413 (0.60)	-0.715 (-0.49)		22	$r_1 = 0.15$ $r_6 = -0.43^*$	0.72**
	3	3.765				0.405 (0.59)	-0.551 (-0.38)		23	$r_5 = 0.64^{**}$ $r_6 = -0.47^*$	0.72**

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n$$

r : Partial correlation coefficient of newly entered variable, R : Multiple correlation coefficient.

Summer dummy variable was entered with Temp variable in equation.

Values in parentheses show standard partial regression coefficient.

*significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

Table 37. Results of multiple linear regression analysis by the stepwise procedure ($F_{in} = F_{out} = 2$) of the population densities of anaerobic bacteria in bottom sediments in Hiro Bay.

y	Step of selection	Constant a_0	Temp (x_1) a_1	$\sqrt{\text{COD}}$ (x_2) a_2	$\sqrt{\text{WC}}$ (x_3) a_3	$\sqrt{\text{IL}}$ (x_4) a_4	$\sqrt{\text{HCl}}$ (x_5) a_5	n_2	r	R
log ANH	1	4.434	0.055 (0.59)					24	0.59**	0.59**
	2	4.112	0.058 (0.63)				0.169 (0.31)	23	0.38	0.67**
log ANG	1	-9.104			1.656 (0.58)			24	0.58**	0.58**
	2	-9.277	0.076 (0.30)		1.509 (0.53)			23	0.35	0.65**
	3	-1.744	0.110 (0.43)		0.388 (0.14)		0.749 (0.50)	22	0.39	0.72**
	4	1.056	0.119 (0.46)				0.909 (0.60)	23	$r_1 = 0.54^{**}$ $r_5 = 0.64^{**}$	0.71**
log S	1	4.356		0.182 (0.77)				24	0.77**	0.77**

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n$$

r : Partial correlation coefficient of newly entered variable, R : Multiple correlation coefficient.

Values in parentheses show standard partial regression coefficient.

**significant at 0.01 level

Table 38. Multiple linear regression equations to express the influence of the environmental conditions on the population densities of various groups of bacteria in bottom sediments in Hiro Bay.

y	Constant a_0	Temp(x_1) a_1	$\sqrt{\text{COD}}$ (x_2) a_2	$\sqrt{\text{WC}}$ (x_3) a_3	$\sqrt{\text{HCEl}}$ (x_5) a_5	Summer dummy variable (x_6) a_6	R
Aerobic bacteria							
log H	-2.345			0.980			0.71**
log G	1.916	0.138			0.744	-1.423	0.74**
log X	3.765				0.405	-0.551	0.72**
Anaerobic bacteria							
log ANH	4.434	0.055					0.59**
log ANG	1.056	0.119			0.909		0.71**
log S	4.356		0.182				0.77**

**significant at 0.01 level

Table 39. Correlation coefficients between the population densities of bacteria and the environmental conditions, estimated by the multiple linear regression analysis (dummy variable is used to express seasonal difference) in bottom sediments in Hiro Bay.

	Temp	$\sqrt{\text{COD}}$	$\sqrt{\text{HCEl}}$	$\sqrt{\text{ESCh}}$	$\sqrt{\text{OA}}$	$\sqrt{\text{SC}}$
n_2	24	24(21)	24(21)	13(11)	7(6)	24(21)
Aerobic bacteria						
log H	0.16	0.66**	0.60**	(0.86**)	0.39	0.67**
log G	0.19	(0.71**)	(0.73**)	(0.88**)	0.36	(0.79**)
log X	-0.28	(0.72**)	(0.70**)	(0.87**)	0.27	(0.77**)
Anaerobic bacteria						
log ANH	0.59**	(0.56**)	(0.53**)	(0.65**)	-0.09	0.31
log ANG	0.39*	(0.76**)	(0.80**)	(0.91**)	(0.90**)	(0.83**)
log S	0.13	0.77**	0.76**	(0.89**)	0.69*	0.81**

Values in parentheses show correlation coefficients corrected for seasonal difference.

*significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

機酸との相関は、嫌気性グルコマンナン分解細菌数および硫酸還元細菌数に認められた。このことは、上記の各ヘミセルロース分解細菌数が基質となるヘミセルロース量との相関のみでなく、ヘミセルロースの分解生成物である単糖類などの量との相関をも強く示すことから考えると、この有機酸は嫌気性グルコマンナン分解細菌数との関係では単糖類などの分解生成物の位置にあると言える。したがって、嫌気性グルコマンナン分解細菌はヘミセルロースの加水分解能を持つことのほかに、単糖類などから有機酸を生成す

る、糖類の発酵に大きい役割を持つ菌群であると推測できる。なお、硫酸還元細菌数と有機酸との相関は、硫酸還元反応に水素供与体として一部の有機酸が利用されること¹⁸⁾、ならびにこの還元反応の結果酢酸などの有機酸を生じること³⁸⁾などの研究結果を本研究の側面的解析から裏づけしたものとと言える。

3・3 パルプ廃水流入海域と非汚濁海域とでの細菌の分布の差異

前章の調査結果から、各群細菌数の対数およびヘミセルロース分解細菌の存在比には、季節的差異や海域における差異が認められたが、各調査定点間における変動が大きい。そのため明確に検定された差異ではない場合が多かった。そこで、3・1および3・2では、パルプ工場からの水平距離をx軸にとり、各測定値の調査定点間の変動および季節的差異を確認した。しかし、この方法は同一定点における各調査時点ごとの比較には使用できても、他の海域との比較には使えない。したがって、この調査定点間の変動を他の海域と比較することの可能な一般的要因に置き換える必要がある。その要因として、各調査定点における有機汚濁の程度を反映し、しかも他の海域とも比較しやすい、好気性従属栄養細菌数を用いることにした。そこで、この好気性従属栄養細菌数をx軸にとり、これに対する好気性キシラン分解細菌数の関係が、各季節あるいは海域の違いにより、どのように変動するかを検討した。

方法

3・1と同様に層別因子を含む単回帰分析に、季節および海域の違いを層別因子として組み込み、季節差および海域差を解析した。

結果および考察

海水中における好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の関係

まず、広湾における海水中の好気性従属栄養細菌数と好

Table 40. Correlation coefficient matrix of the population densities of aerobic bacteria in seawater (1m layer) in Hiro Bay.

Factors	log G	log X	log A
log H	0.72**	0.61**	0.78**
log G		0.95**	0.94**
log X			0.81**

**significant at 0.01 level

Table 41. Results of the multiple linear regression analysis (dummy variables are used to express regional and seasonal difference) of the population density of aerobic xylan-decomposing bacteria (y) on the population density of aerobic heterotrophic bacteria (x) in seawater.

Factors	Various equations				Common regression coefficient at various data					
	a_0	a_1	F_a	n_2	$b_0^{(k)}$	$b_1^{(k)}$	F_b	F_0		
Hiro Bay	Feb.	-0.38	0.98	13.71**	7	0.03				
	Jun.	0.35	0.46	4.57	4	-1.17				
	Sept.	-2.13	0.94	51.05**	4	-1.71	0.86	102.1**	26.35**	0.37
Iwakuni Area	0.15	0.81	37.81**	24	-0.12					
Yoshimi Bay	Feb.					0.87				
	Jun.					-0.25	0.62	35.61**	71.36**	4.60*
	Sept.					-0.43				
Yoshimi Bay	-0.45	0.25	2.76	22	-2.04					

$$y = a_0 + a_1x, \quad y = b_0^{(k)} + b_1^{(k)}x$$

F_a : The Snedecor's F for a_1 with 1 and n_2 degrees of freedom,

F_b : The Snedecor's F for $b_1^{(k)}$ with 1 and $n_2 - (k-1)$ degrees of freedom,

F_0 : Difference of coefficients in various data for $b_0^{(k)}$ with $k-1$ and $n_2 - (k-1)$ degrees of freedom, and for $b_1^{(k)}$ with $k-1$ and $n_2 - 2(k-1)$ degrees of freedom.

*significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

気性キシラン分解細菌数との関係は、他のヘミセルロース分解細菌数の場合にも同様であるかどうかを調べるため、各群細菌数相互間の単相関係数を求めて Table 40 に示した。

海水中の好気性従属栄養細菌数に対する好気性ヘミセルロース分解細菌数や寒天分解細菌数との相関係数はほぼ同程度であり、好気性グルコマンナン分解細菌数と好気性キシラン分解細菌数との相関係数は 0.95 と非常に高いので、好気性ヘミセルロース分解細菌数についての関係は、いずれか1つの分解細菌数を代表として論じて差しつかえないことがわかった。そこで、他の海域における結果と比較することのできる、好気性キシラン分解細菌数を代表として選んだ。

次に、層別因子を含む単回帰分析の結果を Table 41 お

よび Fig. 15 に示す。

広湾における海水中の好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の関係には、各季節ごとの b_0^* の F_0 が有意であり、季節差が明らかに認められた。すなわち、Fig. 15 に示すように、冬季で高く、夏季に低い3本の平行な回帰直線で示される関係であった。また、岩国沿岸海域における両者の関係を広湾における関係式に追加して調べたところ、 b_0^* の F_0 が有意でないことから、共通の回帰係数であることがわかった。しかも、その切片は広湾での冬季とほぼ同程度と高く、前章における好気性キシラン分解細菌の存在比の大きさを裏づけるものであった。このことから、同じバルブ廃水流入海域においては、好気性キシラン分解細菌の存在傾向はまったく類似していることが認められた。一方、吉見湾における両細菌数の関係は、

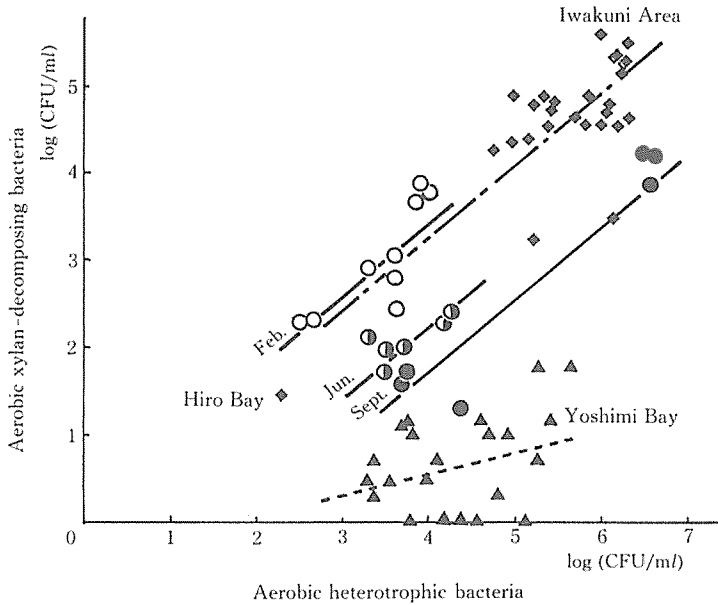


Fig. 15. Relations between the population density of aerobic xylan-decomposing bacteria and the population density of aerobic heterotrophic bacteria in 1 m layer of seawater.

○ : Feb., ◐ : Jun., ● : Sept. in Hiro Bay.

Thick solid lines show the regression lines with common coefficient but seasonally different constants in Hiro Bay.

Chain line shows the regression line of Iwakuni Area (◆) with the same coefficient at Hiro Bay.

Broken line shows the insignificant linear regression equation of Yoshimi Bay (▲).

広湾における各季節ごとの両細菌数の関係とは共通の分布傾向を示さなかった ($b_1^{(k)}$ の F_0 が有意)。また、吉見湾のみでは、好気性従属栄養細菌数とは無相関の好気性キシラン分解細菌数の散布図となった。以上のことから、バルブ廃水流入海域と非汚濁海域とでは、好気性キシラン分解細菌の存在傾向ならびに菌数のレベルに明らかな差異が見られ、2. の好気性キシラン分解細菌の存在比の差異を裏づける結果となった。

底泥中における好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の関係

まず、底泥中における各群細菌数相互の関係を Table 42 に示す。

好気性従属栄養細菌数に対する各ヘミセルロース分解細菌数の相関関係は、それぞれ類似しており、また、ヘミセルロース分解細菌数相互の相関係数も比較的高いことから、海水中の場合と同様に、好気性キシラン分解細菌数で好気性ヘミセルロース分解細菌数を代表できることがわかった。

次に、好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の関係について、層別因子を含む単回帰分析を行った結果を、Table 43 および Fig. 16 に示す。

Table 42. Correlation coefficient matrix of the population densities of bacteria in bottom sediments in Hiro Bay.

Factors	log G	log X	log A	log ANH	log ANG	log S
log H	0.54**	0.56**	0.61**	0.26	0.41*	0.74**
log G		0.73**	0.41*	0.52**	0.58**	0.65**
log X			0.58**	0.35	0.40*	0.58**
log A				0.00	0.01	0.37
log ANH					0.77**	0.35
log ANG						0.64**

*significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

Table 43. Results of the multiple linear regression analysis (dummy variables are used to express regional and seasonal difference) of the population density of aerobic xylan-decomposing bacteria (y) on the population density of aerobic heterotrophic bacteria (x) in bottom sediments.

Factors	Various equations				Common regression coefficient at various data				
	a_0	a_1	F_a	n_2	$b_0^{(k)}$	$b_1^{(k)}$	F_b	F_0	
								$b_0^{(k)}$	$b_1^{(k)}$
Hiro Bay	Feb.	2.56	0.32	2.64	6	0.22			
	Jun.	-1.18	0.90	41.02**	4	-0.17			
	Sept.	0.60	0.54	5.92	4	-0.48	0.73	58.08**	11.32**
	nov.	-1.55	1.11	14.01*	4	0.60			2.38
Yoshimi Bay		-1.61	0.92	31.07**	29	-0.44			

$$y = a_0 + a_1x, \quad y = b_0^{(k)} + b_1^{(k)}x$$

F_a : The Snedecor's F for a_1 with 1 and n_2 degrees of freedom,

F_b : The Snedecor's F for $b_1^{(k)}$ with 1 and $n_2 - (k-1)$ degrees of freedom,

F_0 : Difference of coefficients in various data for $b_0^{(k)}$ with $k-1$ and $n_2 - (k-1)$ degrees of freedom, and for $b_1^{(k)}$ with $k-1$ and $n_2 - 2(k-1)$ degrees of freedom.

*significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

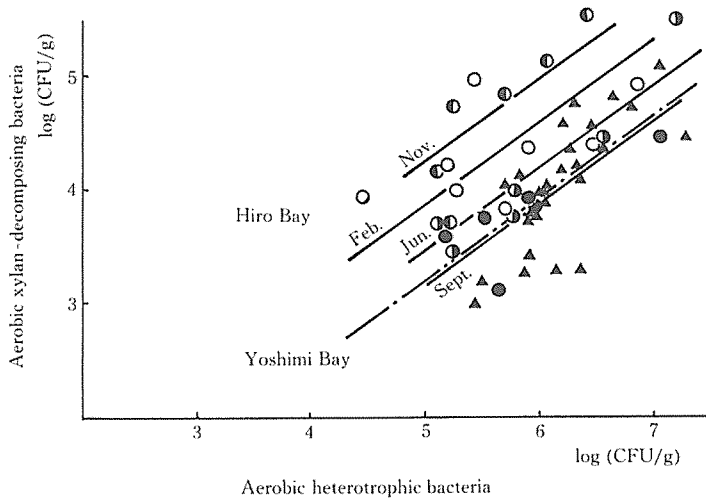


Fig. 16. Relations between the population density of aerobic xylan-decomposing bacteria and the population density of aerobic heterotrophic bacteria in bottom sediments.
 ○ : Feb., ◐ : Jun., ● : Sept., ◑ : Nov. in Hiro Bay.
 Thick solid lines show the regression lines with common coefficient but seasonally different constants in Hiro Bay.
 Chain line shows the regression line of Yoshimi Bay (▲) with the same coefficient at Hiro Bay.

Table 44. Results of the multiple linear regression analysis (dummy variable is used to express regional difference) between the population densities of bacteria and the environmental conditions in bottom sediments.

Factors	Different equations				Common regression coefficient at different areas				
	a_0	a_1	F_a	n_2	$b_0^{(k)}$	$b_1^{(k)}$	F_b	F_0	
					$b_0^{(k)}$	$b_1^{(k)}$		$b_0^{(k)}$	$b_1^{(k)}$
$\log X(y) : \sqrt{HCEl}(x)$									
Hiro Bay	3.15	0.74	30.65**	4	3.20	0.71	22.55**	6.42*	3.78
Yoshimi Bay	3.74	-1.00	1.63	2	2.62				
$\sqrt{SC}(y) : \log S(x)$									
Hiro Bay	-1.94	0.47	12.34*	4	-1.66	0.42	20.93**	3.65	0.68
Yoshimi Bay	-0.88	0.30	20.45*	2	-1.34				
Data pooled	-0.83	0.28	22.02**	8					

$y = a_0 + a_1x, y = b_0^{(k)} + b_1^{(k)}x$
 F_a : The Snedecor's F for a_1 with 1 and n_2 degrees of freedom,
 F_b : The Snedecor's F for $b_1^{(k)}$ with 1 and $n_2-(k-1)$ degrees of freedom,
 F_0 : Difference of coefficients in different areas for $b_0^{(k)}$ with $k-1$ and $n_2-(k-1)$ degrees of freedom, and for $b_1^{(k)}$ with $k-1$ and $n_2-2(k-1)$ degrees of freedom.
 *significant at 0.05 level **significant at 0.01 level

広湾における底泥中の両細菌数の関係には、海水中の場合と同様に季節差が認められ、秋季から冬季へかけて高く、夏季に低い、それぞれ切片の異なる4本の平行な回帰直線で示される変動をすることが明らかとなった。さらに、非汚濁海域である吉見湾における両細菌数の関係を広湾の両

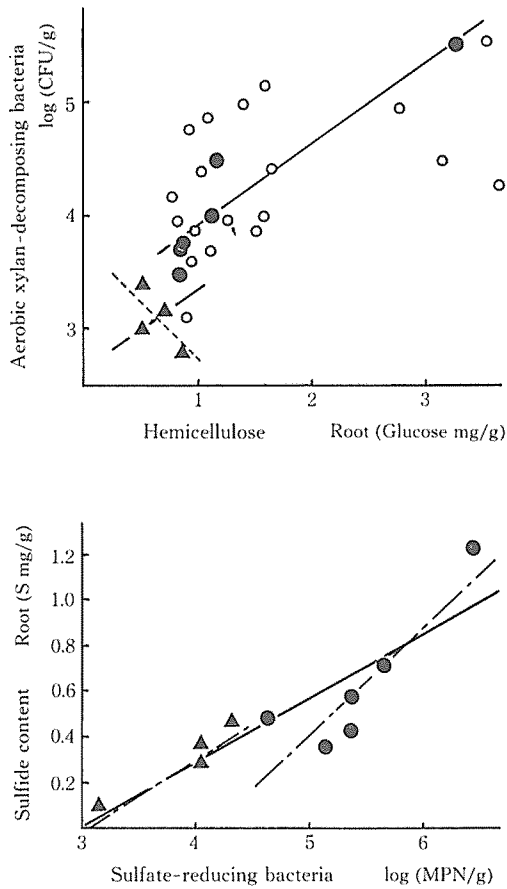


Fig. 17. Difference between Hiro Bay and Yoshimi Bay in the relations of the population densities of bacteria to the environmental conditions in bottom sediments.

● : Jun. in Hiro Bay,
▲ : Jun. in Yoshimi Bay,
○ : Other seasons in Hiro Bay.

Thick solid lines show the regression lines with common coefficient.

Chain lines show the regression lines at different areas.

Broken line shows the insignificant linear regression.

細菌数の関係に追加すると、Fig. 16に見られるように、吉見湾における好気性キシラン分解細菌の存在傾向は、広湾における各季節のものと共通な回帰係数を持ち、その切片は広湾における夏季のものと同程度であり、海水中における場合のような明確な海域差は認められなかった。これらの底泥中における好気性キシラン分解細菌の存在傾向も、2.の好気性キシラン分解細菌の存在比を裏づけるものとなった。

ヘミセルロース量および硫化物量と関連細菌数との関係

広湾における6月期の底泥中のデータと吉見湾における同時期のデータの平均値の比較だけでは、検定による両海域の差異が認められない場合もある。したがって、各環境因子と関連する各群細菌数との関係について、海域の違いを層別因子として組込んだ単回帰分析によって調べた。ヘミセルロース量に対する好気性キシラン分解細菌数の関係、および硫酸還元細菌数に対する硫化物量の関係はTable 44およびFig. 17に示す。

ヘミセルロース量に対する好気性キシラン分解細菌数の関係には、吉見湾より広湾で切片の高い、勾配は両海域で共通の、2本の平行な回帰直線で示される分布傾向となり、明らかな海域差が認められた。また、それぞれの海域を独立させて見ると、広湾では上記回帰式とほぼ同等の回帰式となるのに対して、吉見湾では4点のみのデータではあるが点線で示すように、回帰式は有意とならなかった。このことから、非汚濁海域では好気性キシラン分解細菌は、ヘミセルロース量と無関係に分布することがわかった。

次に、硫酸還元細菌数に対する硫化物量の関係はFig. 17に見られるように、両海域で切片や勾配共に等しい回帰式が得られ、細菌と生成物の存在傾向には海域差が認められなかった。ただ、吉見湾では両者共に低く、広湾では両者共に高い、それぞれの有機汚濁の程度に応じた数値差のみが現われたと言える。このことから、硫酸還元細菌の持つ硫化物生成能には海域差はないものと思われる。

4. 好気性キシラン分解細菌の菌学的性状

陸上環境下におけるキシラン分解細菌としては *Bacillus* 属に関する報告が多く^{49,57,92,93)} そのほか *Vibrio*, *Cellvibrio*, *Clostridium* 属なども報告されている^{39,45)}。また、草食獣の反すう胃内から、*Bacillus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Ruminococcus* などの属の細菌の存在が知

られている⁸⁴⁾。

一方、海洋環境下においては、WAKSMANら⁹⁴⁾の分離したセルロースあるいは寒天を分解する細菌がマンナンやガラクトサンを分解すると報告されているほかには、キシランやグルコマンナンを分解する細菌の種類に関する報告はほとんど見あたらない。近年に至ってようやく、ARAKIら⁹⁵⁾により沿岸海域におけるマンナン分解細菌として *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, および *Moraxella* 属が明らかにされた。このように海洋環境下におけるヘミセルロース分解細菌に関する報告は少なく、また、キシラン分解細菌の種類や菌学的性状についてはほとんど知られていない。そこで、海域から分離した好気性キシラン分解細菌の種類ならびに生理学的性状について検討した。4・1では広湾からの分離菌株について、4・2では吉見沿岸海域からの分離菌株について述べる。

4・1 広湾から分離した好気性キシラン分解細菌の菌学的性状

広湾における海水中および底泥中から分離した好気性キシラン分解細菌について、各種菌学的性状を調べ、属レベルでの分類をし、さらに、各生理学的培地での増殖能などを調べた。

実験方法

供試菌株

広湾における海水中および底泥中から、キシラン平板培養法により分離した、それぞれ、42および57菌株と、底泥中から、グルコマンナン液体培地(G培地)で集積培養したのち、ZoBELL 2216 E 寒天平板培地で分離したグルコマンナン分解細菌 19菌株との合計 118菌株を供試した。なお、上記のグルコマンナン分解細菌 19菌株は、すべてキシラン分解能を持っていた。

分類方法

供試菌株について以下の方法によって菌学的性状を調べ、清水⁹⁶⁾の図式に準じて属レベルで分類した。

形態学的観察

供試菌株を ZoBELL 2216 E 寒天培地に接種し、25℃で3～7日間培養したのち、常法⁹⁷⁾によって普通染色およびグラム染色を行い1500倍光学顕微鏡下で細胞形態などを観察した。また、ZoBELL 2216 E 培地で1～3日間培養したのち、運動性を懸滴法により観察した。さらに、運動性のある菌株については、LEIFSON⁹⁸⁾のべん毛染色法により観察した。

生理学的および生化学的性状の検査

生理学的および生化学的試験用培地として、ZoBELL 2216 E 培地を基にした培地、または3% NaCl およびろ過海水で調製した培地を用いた。一般の生理学的および生化学的試験については、常法^{97, 99)}にしたがって行った。グルコースの発酵性および糖類からの酸の生成能については、MOF 培地¹⁰⁰⁾を用いて HUGH-LEIFSON の方法¹⁰¹⁾により、25℃で7日間観察した。寒天およびアルギン酸の分解性については、それぞれ、ZoBELL 2216 E 寒天培地、および1% アルギン酸ナトリウムを加えた50% 海水で調製した ZoBELL 2216 E 寒天培地に、供試菌を接種し、25℃で7日間培養したのち、前者はヨウ素呈色法¹¹⁾により、後者は木村¹⁰¹⁾の方法によって、それぞれの分解性を判定した。一般の5°ならびに37℃ および7% NaCl 培地での増殖能については、ZoBELL 2216 E 培地およびその海水を7% NaCl で置き換えた培地を用いた。各温度、各 pH および各種塩分濃度の培地での増殖能の試験には、ペプトン 0.05% および酵母エキス 0.01% を加えた海水培地 (ZoBELL 2216 E 培地の有機物の組成を1/10にした培地) および HIDAKA¹⁰²⁾の各種塩分濃度の培地を用いた。これらの各種塩分濃度の培地における増殖能を基に、供試菌株を陸上型、好塩型および海洋型の3タイプに類別¹⁰²⁾した。

結果

広湾における海水中および底泥中から分離した好気性キシラン分解細菌の属組成を、Table 45 に示す。

海水中および底泥中どちらにも、*Bacillus* 属の菌株が多く、その割合は海水中で約60%、底泥中で約80%であった。次に、*Vibrio-Aeromonas* に属する菌株が10～15%の割合で存在し、底泥中では両菌属ではほぼ90%を占めていた。海水中では上記の2菌属のほか、*Pseudomonas* 属の菌株が約10%程度存在しており、底泥中の場合より出現菌属はやや多い傾向が見られた。なお、底泥中からの分離菌について、キシラン平板培地とグルコマンナン液体培地との分離方法の違いによる、属組成上の差異は認められなかった。

次に、広湾からの分離菌株の属別および分離源別の、各生理学的および生化学的性状を調べ、各形質ごとの陽性菌株の割合(%)を Table 46 に示す。

Bacillus および *Vibrio-Aeromonas* に属する菌株では、グルコースの発酵性を持つ菌株が多く、各糖類からの酸の生成能も多くの菌株が持っていた。また、これらの菌株では、カゼイン、ゼラチンおよびデンプンの加水分解能や

Table 45. Compositions of genera in aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from seawater and bottom sediments in Hiro Bay.

Genera	Seawater*	Bottom sediments	
		Xylan plate (A)*	Glucomannan liquid tube(B)**
<i>Pseudomonas</i>	4		
<i>Vibrio</i> — <i>Aeromonas</i>	6	5	3
<i>Bacillus</i>	27	48	14
Others	5	4	2
Total	42	57	19

* Isolated with wheat straw xylan plate medium.

** Isolated with softwood glucomannan liquid medium.

7% NaCl 培地での増殖能など多くの性状が陽性となる菌株が多かった。一方、海水中からの *Pseudomonas* 属の菌株では、グルコースなどの各糖類からの酸の生成、ゼラチン液化性、7% NaCl 培地および 5℃ における増殖能などに陽性の性状を示したが、上記の 2 菌属とはやや異なる性状であった。さらに、寒天やアルギン酸の加水分解能は *Bacillus* および *Vibrio*—*Aeromonas* 属の一部に見られ、その割合は低いものであった。

各温度、各 pH および各種塩分濃度の培地における増殖能は、Table 47, 48 および 49 に示すとおりである。

0℃ から 35℃ までの各温度における増殖菌株数から、全般的に 10℃ 以上の各温度で増殖能を示す、いわゆる中温細菌が多い傾向が認められた。とくに、*Bacillus* 属の菌株はそのほとんどがこの種の増殖能を示した。一方、海水分離菌の *Pseudomonas* および *Vibrio*—*Aeromonas* 属では、0℃ および 5℃ における増殖能を示す菌株の多い傾向が見られた。

Table 48 から明らかなように、ほとんどの菌株が pH 5.5 から 9.5 へかけて、増殖能を示した。また、属別および分離源の違いをとわず、約 85% の菌株は pH 4.5 においても増殖能を示し、かなり低い pH に耐える菌株の多い傾向が見られた。

Table 49 に見られるように、塩分無添加培地で増殖を示す、いわゆる陸上型の菌株は全菌株の約 50% であった。とくに、底泥中からの *Bacillus* 属にはこの陸上型の菌株が約 60% と多かった。次に、0.5% または 3% NaCl 培地で増殖する、好塩型の菌株は全体の約 30% であり、海水分離菌の *Pseudomonas* および *Vibrio*—*Aeromonas* 属のほとんどがこのタイプであった。さらに、*Bacillus* 属の約

20% は、海水培地でのみ増殖する海洋型の菌株であった。陸上型や好塩型であっても、1/6 海水および海水培地での増殖能はすべての菌株に見られ、いずれも海水環境下で十分に活動するものと考えられる。なお、ごく一部の菌株は各種塩分濃度の培地で増殖能を示さなかったが、これは培地の有機物濃度が ZoBell 2216 E 培地の 1/10 の組成であったためと思われる。

考 察

広湾における底泥分離菌株は *Bacillus* および *Vibrio*—*Aeromonas* 属が大半を占めており、ARAKI ら⁹⁵⁾の報告や 4・2 で述べる非汚濁海域における分離菌株の属組成と比較すると、その種類が少なく、有機汚濁の進行に伴って、菌の種類が限定されたものと考えられる。また、*Vibrio*—*Aeromonas* 属は通性嫌気性菌群であり、*Bacillus* 属にもかなり通性嫌気的性状の菌株がいること¹⁰³⁾、ならびに *Bacillus* 属分離菌株の多数にグルコースの発酵性が認められることなどから、広湾における底泥分離菌株の大半は通性嫌気性菌群と考えられる。したがって、好気性キシラン分解細菌ではあるが、有機汚濁の進行した還元的環境下で十分に活動しているものと推測される。

次に、底泥分離菌株には単糖類などを分解して酸を生成する菌株が多く、有機汚濁物質として流入したヘミセルロースを加水分解するだけでなく、多くの菌株はヘミセルロースの分解物である単糖類などを利用、分解することがわかった。さらに、これらの菌株にはセロピオースからの酸生成能を持つ菌株が多いことから、ヘミセルロースの分解物だけでなく、セルロースの分解物にも広く作用するものと考えられる。また、pH 4.5 での増殖能を示す菌株が

Table 46. Characteristics of aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from seawater and bottom sediments in Hiro Bay.

	Genera and sources							
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Vibrio-Aeromonas</i>		<i>Bacillus</i>		Others	Source pooled	
	Sea water	Sea water	Bottom sediments A	Bottom sediments B	Sea water			Bottom sediments A
No. of strains	4	6	5	3	27	48	14	11
Morphology								
Gram-positive	0	0	0	0	78	56	71	27
Gram-negative	100	100	100	100	22	44	29	73
Rods; length < 2 μ m	75	83	60	100	22	31	29	64
Motility	0	100	100	100	70	79	71	55
Flagella			Polar			Peritrichous		
Biochemical test								
Catalase	100	100	100	100	100	100	100	82
Oxidase	100	100	100	100	26	56	71	27
Fermentative metabolism	0	100	100	100	93	100	71	64
Oxidative metabolism	100	0	0	0	7	0	29	9
Indole production	0	0	0	33	0	0	0	0
Methyl red test	0	33	80	33	56	67	50	27
V-P test	0	33	40	0	26	44	43	9
H ₂ S production	25	17	60	33	41	44	0	36
NO ₃ reduction	0	67	60	67	63	33	50	36
Ammonification	100	33	60	100	74	71	86	55
Acid from								
Glucose	100	100	100	100	100	100	100	82
Maltose	100	33	100	67	81	73	86	73
Lactose	100	33	80	0	85	67	50	55
Sucrose	100	100	80	100	100	98	100	91
Mannose	0	33	100	100	93	96	100	91
Galactose	100	33	100	33	85	83	71	18
Xylose	0	33	100	33	93	94	64	45
Arabinose	0	100	100	33	89	85	86	45
Cellobiose	100	50	100	0	96	92	64	55
Mannitol	75	50	80	67	93	92	64	73
Glycerol	0	50	80	33	89	90	64	73
Hydrolysis of								
Casein	25	83	60	33	63	63	36	64
Gelatin	100	100	80	67	100	94	86	73
Starch	25	67	60	33	89	46	50	82
Agar	0	0	0	0	37	13	43	0
Na-alginate	0	0	40	0	30	4	0	9
Growth in/at								
7% NaCl	100	100	60	100	96	83	93	64
5°C	100	67	80	33	15	6	14	27
37°C	0	50	80	100	93	96	93	73

Number (%) of strains which showed positive response.

非汚濁海域より多く、糖類の分解に伴い集積した有機酸などの酸性物質の存在下でも、かなり耐性のある菌株と思われる。

さらに、底泥分離菌株の優占種である *Bacillus* 属のほとんどの菌株は中温菌であり、しかも、陸上型の菌株が半数以上を占めていることは、一般の海洋細菌とはまったく異

なる。このことは汚濁海域における菌株の性状の特徴の1つと考えられる。

なお、広湾における海水中の出現菌の種類は非汚濁海域の場合より少なく、底泥分離菌株と同じ属の菌株が多く、底泥の影響を強く受けていることが明らかとなった。

Table 47. Numbers of strains which showed the growth at various temperatures in aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from seawater and bottom sediments in Hiro Bay.

Genera	Sources	No. of strains tested	Incubation Temp.(°C)							
			0	5	10	15	20	25	30	35
<i>Pseudomonas</i>	Seawater	4	4	4	4	4	4	4	1	1
<i>Vibrio</i> – <i>Aeromonas</i>	Seawater	6	3	3	5	5	5	5	5	5
	Bottom sediments	4	0	0	3	3	3	3	3	3
<i>Bacillus</i>	Seawater	27	1	3	23	23	24	24	24	24
	Bottom sediments	47	0	0	41	42	44	44	43	43
Others	Source pooled	9	3	3	9	9	9	9	9	9
Total		97	11	13	85	86	89	89	85	85

Table 48. Numbers of strains which showed the growth in various pH media in aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from seawater and bottom sediments in Hiro Bay.

Genera	Sources	No. of strains tested	pH values in media					
			4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
<i>Pseudomonas</i>	Seawater	4	4	4	4	4	4	4
<i>Vibrio</i> – <i>Aeromonas</i>	Seawater	6	5	5	5	5	5	5
	Bottom sediments	8	6	7	7	7	7	7
<i>Bacillus</i>	Seawater	27	16	20	22	23	23	23
	Bottom sediments	62	47	55	56	56	56	56
Others	Source pooled	11	9	11	11	11	11	11
Total		118	87	102	105	106	106	106

Table 49. Numbers of strains which showed the growth response to different salinity in aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from seawater and bottom sediments in Hiro Bay.

Genera	Sources	No. of strains tested	Types of diluents in media					Groups			No growth in all media
			Pure water	0.5% NaCl soln.	3% NaCl soln.	1/6 sea water	Sea water	Terrestrial type	Halo-philic type	Marine type	
<i>Pseudomonas</i>	Seawater	4	0	4	0	4	4	0	4	0	0
<i>Vibrio</i> – <i>Aeromonas</i>	Seawater	6	0	5	3	5	5	0	5	0	1
	Bottom sediments	8	4	5	3	8	8	4	3	1	0
<i>Bacillus</i>	Seawater	27	12	22	22	26	26	12	8	6	1
	Bottom sediments	62	37	44	42	60	60	37	11	12	2
Others	Source pooled	11	7	9	10	11	11	7	4	0	0
Total		118	60	89	80	114	114	60	35	19	4

4・2 非汚濁海域（吉見沿岸）から分離した好気性キシラン分解細菌の菌学的性状

吉見沿岸における海水、底泥および海藻から分離した好気性キシラン分解細菌について、4・1と同様に各菌学的性状を調べ、属レベルで分類し、各生理学的培地での増殖能などを検討した。

実験方法

供試菌株

吉見沿岸海域における海水中、底泥中および海藻から、キシラン平板培養法により分離した、それぞれ26菌株、41菌株および44菌株、合計 111 菌株の好気性キシラン分解細菌を用いた。

分類方法

供試菌株について、4・1と同様に各菌学的性状を調べ、清水⁹⁶⁾の図式に準じて属レベルで分類した。

形態学的観察

供試菌株について、4・1と同様に普通染色、グラム染色、運動性およびべん毛染色によって観察した。

生理学的および生化学的性状の検査

各生理学的および生化学的性状については4・1と同じ培地を用いて、常法^{97, 99)}にしたがって調べた。その他の試験も4・1と同様に行った。また、各温度、各pHおよび各種塩分濃度の培地における増殖能の測定も4・1と同じ方法によった。なお、一部の代表菌株については、上記培地および各温度における7日間培養後の増殖の程度を比濁により求めた。すなわち、660 nm における培養液の吸光度で増殖の程度を示した。

結果

吉見沿岸海域における海水中、底泥中および海藻から分離した好気性キシラン分解細菌の属組成を Table 50 に示す。

海水分離菌株は、*Pseudomonas*, *Vibrio-Aeromonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus* など多くの属から成っていた。これに対して、底泥分離菌株はその約50%が *Bacillus* 属であり、ほかに *Pseudomonas*, *Vibrio-Aeromonas* および *Achromobacter* 属から成っていた。また、海藻分離菌株は *Pseudomonas* 属が約55%と多く、ほかは *Vibrio-Aeromonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* および *Flavobacterium* 属であり、出現する属は海水の場合とほぼ同様であったが、*Pseudomonas* や *Vibrio-Aeromonas* 属の占める割合の多い傾向が見られた。

次に、吉見沿岸海域からの分離菌株の形態学的および生理学的性状を調べ、Table 51 に示す結果を得た。

Vibrio-Aeromonas, *Flavobacterium* および *Bacillus* 属の菌株ではグルコースの発酵性があり、*Pseudomonas* および *Achromobacter* 属の菌株ではグルコースの酸化的酸生成能が見られた。糖類からの酸の生成およびゼラチンやデンプンの加水分解能も多くの菌株が持っていた。また、寒天分解細能は *Pseudomonas* および *Vibrio-Aeromonas* 属の菌株に、アルギン酸分解能は *Pseudomonas*, *Vibrio-Aeromonas* および *Achromobacter* 属の菌株に認められた。このように、キシラン分解細菌はキシランのみでなく、デンプン、寒天、アルギン酸などの他の多糖類をも分解する性状を示した。

Table 50. Compositions of genera in aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from the sea near Yoshimi.

Genera	Seawater	Bottom sediments	Seaweeds	Total No. of strains
<i>Pseudomonas</i>	6	2	24	32
<i>Vibrio-Aeromonas</i>	2	4	9	15
<i>Achromobacter</i>	5	1	6	12
<i>Flavobacterium</i>	1		1	2
<i>Bacillus</i>	8	22	4	34
Unidentified	4	12		16
Total	26	41	44	111

さらに、供試菌株の各温度、各 pH および各種塩分濃度の培地における増殖能を調べ、それらの結果を Table 52、53 および 54 に示した。

Table 52 から、*Pseudomonas* および *Achromobacter* 属の菌株では 0°C および 5°C で増殖する菌株が多く、いわゆる低温細菌の占める割合が多い。これに対して *Vibrio*-

Table 51. Characteristics of aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from the sea near Yoshimi.

	Genera					
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Vibrio-Aeromonas</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	Unidentified
No. of strains	32	15	12	2	34	16
Morphology						
Gram-positive	0	0	0	0	50	56
Gram-negative	100	100	100	100	50	44
Rods; length < 2 μm	81	87	75	100	44	38
Motility	94	73	50	0	71	44
Flagella	Polar	Polar	Peritrichous		Peritrichous	
Biochemical test						
Oxidase	100	100	100	0	71	56
Fermentative metabolism	0	100	0	100	71	50
Oxidative metabolism	100	0	92	0	24	44
Indole production	0	20	0	0	0	0
Methyl red test	0	80	0	0	29	19
V-P test	0	13	0	0	50	0
H ₂ S production	9	33	8	0	21	6
NO ₃ reduction	56	87	75	100	38	75
Ammonification	97	60	75	50	85	38
Acid from						
Glucose	94	100	73	100	88	75
Lactose	13	93	42	100	21	50
Sucrose	72	100	67	100	74	75
Hydrolysis of						
Casein	75	20	50	50	12	6
Gelatin	81	67	58	0	65	63
Starch	84	93	75	50	44	81
Agar	9	60	0	0	0	19
Na-alginate	75	53	58	0	6	25

Number (%) of strains which showed positive response.

Table 52. Numbers of strains which showed the growth at various temperatures in aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from the sea near Yoshimi.

Genera	No. of strains tested	Incubation Temp.(°C)							
		0	5	10	15	20	25	30	35
<i>Pseudomonas</i>	32	16	26	29	30	31	31	31	29
<i>Vibrio-Aeromonas</i>	15	0	0	13	14	14	14	14	12
<i>Achromobacter</i>	12	5	7	7	8	9	9	9	7
<i>Flavobacterium</i>	2	0	0	0	1	2	2	2	1
<i>Bacillus</i>	34	0	0	9	22	29	29	28	28
Unidentified	16	0	1	7	10	11	12	12	10
Total	111	21	34	65	85	96	97	96	87

Table 53. Numbers of strains which showed the growth in various pH media in aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from the sea near Yoshimi.

Genera	No. of strains tested	pH values in media					
		4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
<i>Pseudomonas</i>	32	1	29	30	30	29	29
<i>Vibrio-Aeromonas</i>	15	3	15	15	15	15	15
<i>Achromobacter</i>	12	0	8	9	9	8	8
<i>Flavobacterium</i>	2	0	1	1	1	1	1
<i>Bacillus</i>	34	18	29	30	29	28	27
Unidentified	16	0	10	11	10	9	9
Total	111	22	92	96	94	90	89

Aeromonas, *Flavobacterium* および *Bacillus* 属の菌株は、すべて 10℃ 以上の温度で増殖し、いわゆる中温細菌で占められていた。

Table 53 から、*Bacillus* 属の約 50% の菌株および *Vibrio-Aeromonas* 属の 20% の菌株は、pH 4.5 における増殖能を示し、比較的低い pH にも耐えることがわかった。他

Table 54. Numbers of strains which showed the growth response to different salinity in aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from the sea near Yoshimi.

Genera	No. of strains tested	Types of diluents in media					Groups			No growth in all media
		Pure water	0.5% NaCl soln.	3% NaCl soln.	1/6 sea water	Sea water	Terrestrial type	Halo-philic type	Marine type	
<i>Pseudomonas</i>	32	2	2	4	21	31	2	2	27	1
<i>Vibrio-Aeromonas</i>	15	1	2	5	5	15	1	4	9	1
<i>Achromobacter</i>	12	0	0	1	6	9	0	1	8	3
<i>Flavobacterium</i>	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0
<i>Bacillus</i>	34	10	27	27	33	32	10	17	6	1
Unidentified	16	2	5	6	10	13	2	7	5	2
Total	111	17	38	45	77	101	17	31	55	8

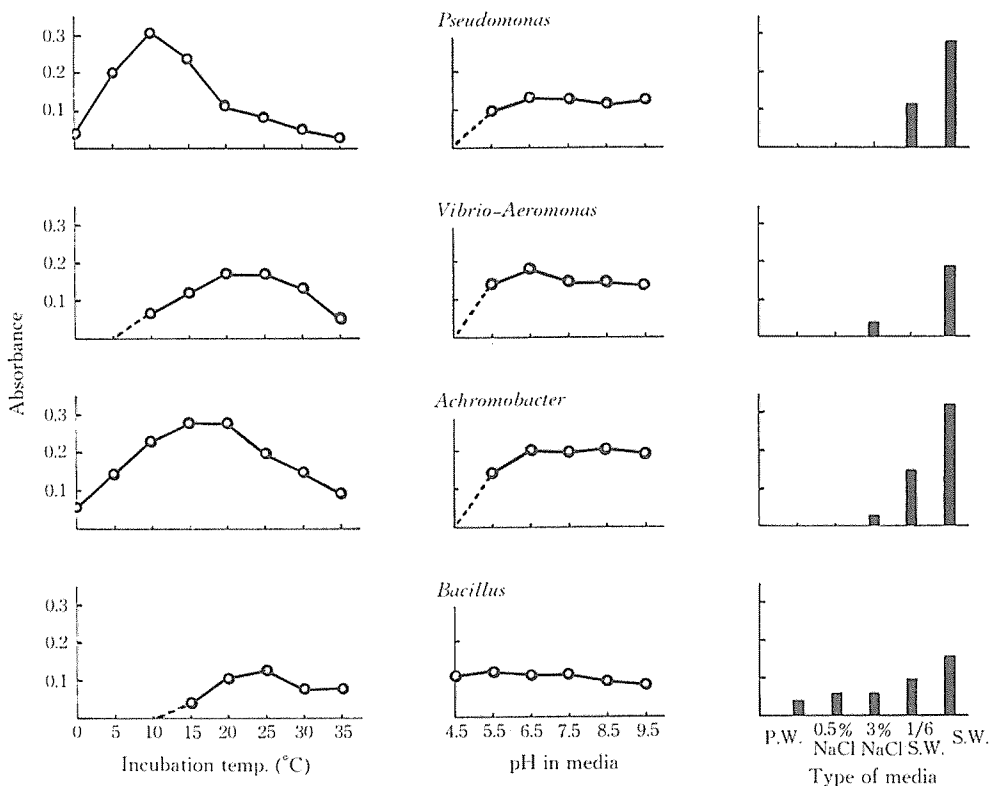


Fig. 18. Growth of aerobic xylan-decomposing bacteria under different conditions in HIDAKA's media.

の菌株では、pH 5.5 から 9.5 へかけての増殖能が認められた。

Table 54 から、*Pseudomonas* および *Achromobacter* 属では、海水培地でのみ増殖する、海洋型の菌株が大半を占めていた。*Vibrio-Aeromonas* 属では海洋型が多いものの好塩型や陸上型も見られた。*Bacillus* 属では約半数が好塩型であり、陸上型および海洋型もかなり存在していた。また、*Flavobacterium* 属の 2 菌株は陸上型であった。

さらに、*Pseudomonas*, *Vibrio-Aeromonas*, *Achromobacter* および *Bacillus* 属から、各温度、各 pH および各種塩分濃度の培地における増殖能の異なる代表菌株を選び、各培地および培養条件下での増殖の程度を吸光度で表わし、Fig. 18 に示す結果を得た。

Fig. 18 から、*Pseudomonas* 属の菌株は海洋型の低温細菌、*Vibrio-Aeromonas* 属の菌株は好塩型の中温細菌、*Achromobacter* 属の菌株は好塩型の低温細菌であり、それぞれ海洋細菌に多く見られる 3 つのタイプの特徴を示す代表的菌株であった。また、*Bacillus* 属の菌株は陸上型の中温細菌であり、しかも、pH 4.5 における増殖能を示す、上記の 3 つのタイプとはまったく異なる増殖特性を持つ菌株であった。

考 察

非汚濁海域における好気性キシラン分解細菌はパルプ廃水流入海域と大きく異なり、多くの属から構成されていた。また、それらには *Pseudomonas* 属を代表とする海洋型の細菌の占める割合が多かった。その出現菌属は、ARAKI ら⁹⁵⁾ のマンナン分解細菌の場合とほぼ同様であった。

次に、海藻から分離した *Pseudomonas* 属の菌株にはアルギン酸分解能を持つ菌株が多く、これらは Bergey's Manual (第 7 版)¹⁰⁴⁾ では *Algimonas* 属に相当する菌株と考えられる。この種の菌株が海藻付着細菌の代表であることは、海藻の多糖類の特徴と分解細菌の関連性を推測させるものであった。

さらに、吉見湾の底泥分離菌株は広湾の場合と同様な属組成であり、*Bacillus* 属が約半数と多く、次に *Vibrio-Aeromonas* 属が約 10% を占めていた。このように、沿岸海域の底泥中では *Bacillus* 属は、汚濁海域や非汚濁海域をとわず分解細菌の優占種であり、ヘミセルロースの分解に主体的役割を果たしていると推測できる。なお、これらの *Bacillus* 属の菌株の中には陸上型の中温細菌の存在が認められ、さらに、一般の土壌中のキシラン分解細菌として *Bacillus* 属についての報告が多いこと^{49, 57, 92, 93)} などから、

沿岸海域の底泥中の好気性キシラン分解細菌には陸上の土壌細菌の影響が及んでいるものと思われる。

5. 培養実験による基質の分解

微生物によるヘミセルロースの分解に関しては、1889年に HOPPE-SEYLER¹⁰⁵⁾ により、ブナキシランが川の汚泥中の微生物によって分解されることが報告されて以来、植物界に広く分布するキシランを中心に数多くの微生物学的および酵素化学的研究がなされている⁸³⁾。これらのうち、種々の微生物のヘミセルロース分解能を培養実験によって論じたものとしては、WAKSMAN ら^{47, 106)} および SØRENSEN³⁹⁾ による土壌微生物に関する研究がある。一方、海域におけるこの種の研究は、著者ら^{107, 108)} の一般海域における細菌のキシラン分解能に関するもの以外にはほとんど見あたらない。本章では、微生物によるヘミセルロースの分解を培養実験によって調べ、パルプ廃水流入海域における好気性キシラン分解細菌の活動およびヘミセルロースの分解の過程をより明らかにしようとした。5・1 では広湾から分離した好気性キシラン分解細菌のヘミセルロース分解能について、5・2 では底泥培養実験におけるヘミセルロースの分解について検討した。

5・1 好気性キシラン分解細菌の基質分解能

細菌のキシラン分解能の判定には、供試菌株をキシランを含む液体培地で培養し、あるいは培養ろ液を基質と反応させて、培養液または反応液中の基質量の変化^{47, 51)}、還元糖量の増加^{39, 51, 57, 93)}、および粘度の低下⁹³⁾から検討する方法が用いられているが、これらの方法を多数の菌株を対象にした比較試験に用いるのは、操作が煩雑なため不適当である。そこで、操作が簡便でしかも、粘度、還元糖量およびキシラン分解率などかなりの相関を示し、キシラン分解能の程度を知るのに有効である。P.S.値(フェノール・硫酸法による糖濃度を示す)の測定法¹⁰⁷⁾によって、広湾から分離した菌株のヘミセルロース分解能を調べた。

実 験 方 法

供試菌株

4・1の実験に供した広湾における海水および底泥中から分離した好気性キシラン分解細菌 118 菌株を用いた。なお、各種ヘミセルロースの分解能については、グルコマンナン

分解能をあわせて持つグルコマンナン液体培地分離細菌19菌株を除く、キシラン平板分離細菌99菌株を供試した。

ヘミセルロース分解能の測定

供試菌株をキシラン0.2%を含むZoBELL 2216 E 寒天斜面培地に接種し、25℃で3～5日間前培養したのち、その1白金耳量を、2・2と同様なG培地およびANG培地(嫌気性キシラン分解能測定用)に接種し、25℃で7日間培養した。なお、ANG培地についてはスクリュウキャップ試験管を用い、滅菌流動パラフィンを重ねて培養した。一定日数後、培養液をよく振り混ぜて均一にしたのち、一定量を採取して、Fig. 19に示す手順にしたがって、P.S.値を測定した。

まず、培養液を2倍量に希釈し、その液2mlに対して8mlの85%エタノールを加えて、未分解のヘミセルロースを沈殿させ、この上澄液を糖量測定のための試料とした。次に、この試料液について、細菌を接種しない培地を同様に処理したものを対照として、フェノール・硫酸法⁴³⁾による吸光度を測定し、その吸光度をP.S.値としてあらわした。このP.S.値を基に、表に示すようにキシラン分解能の強さを6階級に格付けした。なお、各種ヘミセルロース分解能については、上記格付けのうち、+++以上の上位3段階を強い分解能とし、+以下の下位3段階を弱い分解能とする2段階に種別した。

基質

キシランとしてはWHISTLERら⁴⁴⁾の方法により、小麦の麦わらから調製した、精製キシラン(DP 65)を用いた。針葉樹キシランおよびグルコマンナンとしてはTIMELL⁵⁹⁾の方法により調製した、精製針葉樹キシラン(DP 15)および精製グルコマンナン(DP 80)を用いた。広葉樹キシランについては、山陽国策パルプK.K.から提供を受けた精製広葉樹キシラン(DP 150)を使用した。なお、こ

れらのヘミセルロースの日下部¹⁰⁹⁾の分析法による単糖組成、およびYAMAGUCHIら¹¹⁰⁾の方法によるヘミセルロース末端基の定量の1例をFig. 20に示す。

結果および考察

好気性キシラン分解細菌の好気性キシラン分解能

広湾における海中および底泥中からの分離菌株の好気性キシラン分解能について、6段階に格付けした結果をTable 55に示す。

全菌株の65%のものは+++以上の強いキシラン分解能を示し、とくに、底泥からの*Bacillus*属の菌株では、強い分解能を持つ菌株がその80%を占めた。一方、*Vibrio-Aeromonas*属では、+++以上の強い分解能を示す菌株は半数以下であった。また、*Pseudomonas*属の菌株では、いずれも++以下の弱いキシラン分解能であった。このように、広湾の底泥中の優占種である*Bacillus*属に強いキシラン分解能を持つ菌株が多いことは、ヘミセルロースの分解に果す*Bacillus*属の役割の大きさを示唆している。

好気性キシラン分解細菌の嫌気性キシラン分解能

広湾分離菌株の嫌気性キシラン分解能について、6段階に格付けした結果をTable 56に示す。

全菌株の65%のものは+++以上の強い嫌気性キシラン分解能を持ち、強い分解能を持つ菌株の数は好気性キシラン分解能の場合とほとんど差異が認められなかった。一方、嫌気条件下ではキシラン分解能を示さない菌株が全体の約25%の菌株に見られ、*Pseudomonas*属および*Bacillus*属の約20%の菌株がこれに概当していた。これに対して、*Vibrio-Aeromonas*属の大半と*Bacillus*属の約80%の菌株は嫌気条件下でもキシラン分解能を示し、しかも、そのほとんど強い分解能を持つ菌株であった。以上のことから、好気的条件下での分離細菌ではあるが、その多くは広湾の有機汚濁の進行した嫌気的環境下でも十分にヘミセルロースの分解活動を行っているかと推測される。

好気性キシラン分解細菌の各基質分解能

広湾分離菌株の針葉樹キシラン、グルコマンナンおよび広葉樹キシラン分解能について調べた。その結果をTable 57に示す。

供試菌株をキシラン(麦わら)分解能で+++以上の強い分解能を示す菌株と++以下の弱い分解能を示す菌株との2群に分けて、それぞれの群に属する菌株のキシラン以外のヘミセルロースに対する分解能も、2群に分けた。この表から明らかなように、針葉樹キシラン分解能については、キシラン分解能の場合と同様な分解能の傾向が見られた。

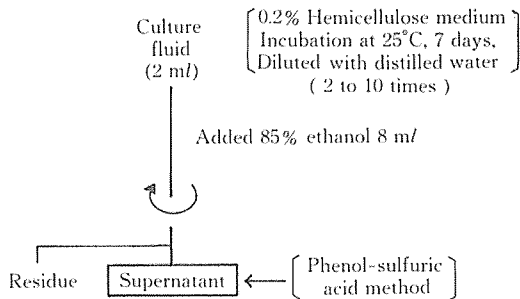


Fig. 19. Procedure for determination of P. S. value.

すなわち、キシラン分解能の強い菌株では針葉樹キシラン分解能も強く、また、逆に弱いキシラン分解能を示す菌株では針葉樹キシラン分解能も弱かった。このことから、針葉樹キシランはキシラン分解細菌により、キシランと同等に分解されることがわかった。

次に、グルコマンナン分解能はキシラン分解細菌の約60%の菌株に見られ、キシラン分解能の強い菌株でもその約半数の菌株では、グルコマンナン分解能が弱くなる傾向が見られた。これはキシランとグルコマンナンとの構成糖の違いによるものと思われる。なお、グルコマンナン

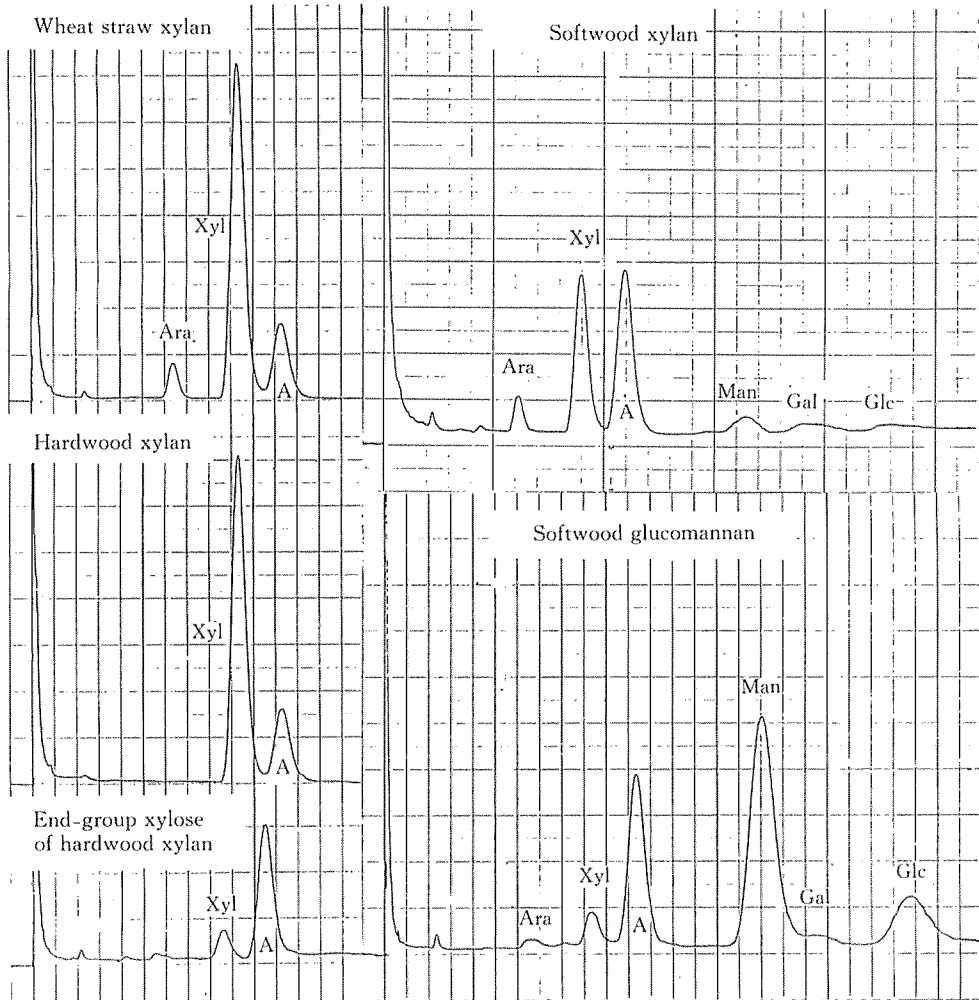


Fig. 20. Gas-liquid chromatograms of alditolacetates from the acid-hydrolyzate of different hemicelluloses.

Ara : L-Arabinose, Xyl : D-Xylose, Man : D-Mannose,
Gal : D-Galactose, Glc : D-Glucose,
A : Internal standard substance (Methyl- β -D-glucoside).
Column packing : 3% ECNSS-M on Gas Chrom Q 100-120 mesh.
Temperature : 180°C (constant).

Table 55. Xylan-decomposing activities under aerobic condition in various strains isolated from various sources in Hiro Bay.

Genera	Sources	No. of strains	Grades of activities*						
			++++	+++	++	+	±		
<i>Pseudomonas</i>	Seawater	4					2	2	
<i>Vibrio</i> - <i>Aeromonas</i>	Seawater Bottom sediments	{ A B	6	2			2	2	
			5	3		1	1		
			3				1	2	
<i>Bacillus</i>	Seawater Bottom sediments	{ A B	27		13	2	3	7	2
			48	1	33	9		1	4
			14		7	1		1	5
Others	Source pooled	11		5			1	5	
Total		118	1	63	12	4	16	22	

*P.S. value : Absorbance at 480nm $1.0 \leq ++++$, $0.5 \leq +++ < 1.0$, $0.3 \leq ++ < 0.5$, $0.15 \leq + < 0.3$, $0.05 \leq \pm < 0.15$, $0.00 < \pm < 0.05$.

Table 56. Xylan-decomposing activities under anaerobic condition in various strains isolated from various sources in Hiro Bay.

Genera	Sources	No. of strains	Grades of activities*						No growth and/or no decomposition	
			++++	+++	++	+	±			
<i>Pseudomonas</i>	Seawater	4						4		
<i>Vibrio</i> - <i>Aeromonas</i>	Seawater Bottom sediments	{ A B	6	2				3	1	
			5	4		1				
			3				1	1	1	
<i>Bacillus</i>	Seawater Bottom sediments	{ A B	27		18	3		1	1	4
			48	1	35	2				10
			14		8			1		5
Others	Source pooled	11		4				2	5	
Total		118	1	71	5	1	2	8	30	

*P.S. value : Absorbance at 480nm $1.0 \leq ++++$, $0.5 \leq +++ < 1.0$, $0.3 \leq ++ < 0.5$, $0.15 \leq + < 0.3$, $0.05 \leq \pm < 0.15$, $0.00 < \pm < 0.05$.

を分解しない菌株は、キシラン分解能の強い群より弱い群に多く見られたが、強い群でもかなりの数にのぼった。

さらに、広葉樹キシラン分解能については、キシラン分解能の強い菌株でもその約75%の菌株は弱い広葉樹キシラン分解能しか示さず、広葉樹キシランはキシラン分解細菌により分解され難い基質であった。このことは、広葉樹キシランの基質が古く、角質化していたためと考えられる。

5・2 底泥培養実験におけるヘミセルロースの分解および硫化物の生成

前節の培養実験の成績のみでは、複雑な自然環境化における細菌の生態を理解するのに十分でない。また、現場調査の結果は絶えまなく進行する変化の過程の一断面を現わすにすぎず、その結果からだけでは連続的に変化する汚濁物質の分解の過程を十分に知り得ない。このような観点から、畑¹⁸⁾は両者の中間的な試みとして、底土堆積物モデル実験を行い、堆積物中における硫化物の生成に関して、

Table 57. Hemicellulose-decomposing activities under aerobic condition in strains isolated from Hiro Bay, by the use of wheat straw xylan plate medium.

		Wheat straw xylan -decomposing activities		Total
		High activity	Low activity	
No. of strains		68	31	99
Softwood xylan -decomposing activities	High activity	61	8	69
	Low activity	7	21	28
	Negative	0	2	2
Glucomannan -decomposing activities	High activity	21	2	23
	Low activity	29	10	39
	Negative	18	19	37
Hardwood xylan -decomposing activities	High activity	17	1	18
	Low activity	50	27	77
	Negative	1	3	4

High activity : Grades of activities expressed as +, ++ and +++ in Table 55.
 Low activity : Grades of activities expressed as ++, + and ± in Table 55.

**Fig. 21.** Appearance of sediments with hemicelluloses and cellulose in incubation bottles.

X : Xylan 2%, GM : Glucomannan 2% C : Cellulose 2%,
 N : No addition.

成果を得ている。しかし、ヘミセルロースを添加した場合における硫化物の生成については、まったく知見が得られていない。したがって、本節ではこのヘミセルロースを

添加した底泥培養実験を行い、ヘミセルロースの分解および硫化物の生成について検討した。

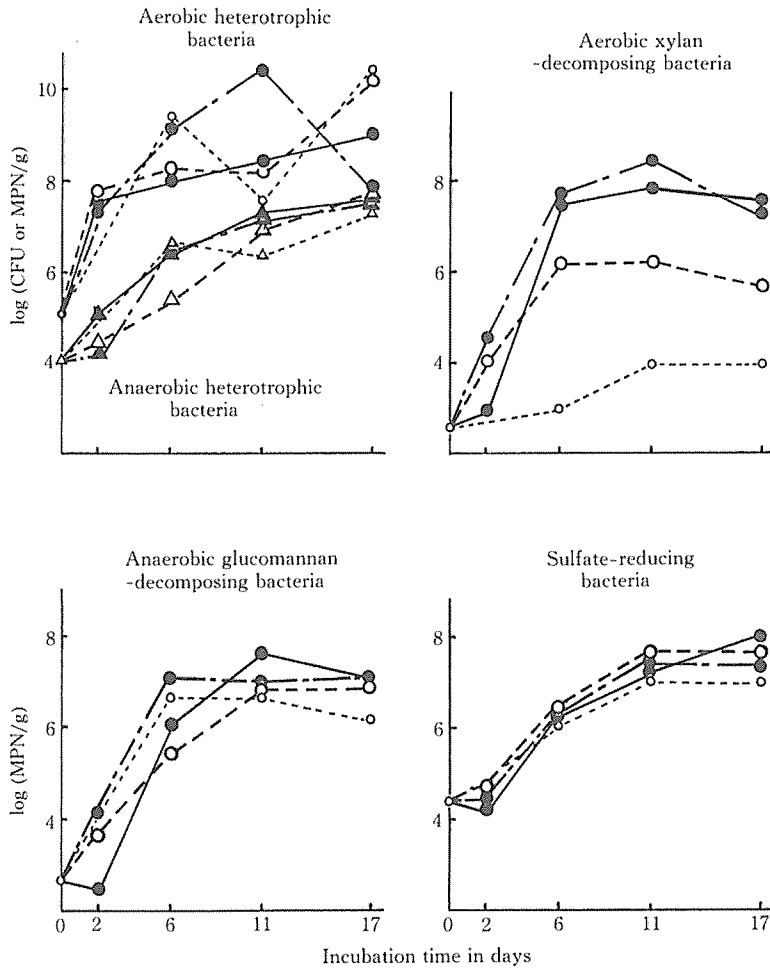


Fig. 22. Changes in bacterial numbers during incubation of sediments with hemicelluloses and cellulose.

●— : Glucomannan 2%, ●--- : Xylan 2%,
○— : Cellulose 2%, ○--- : No addition.

実験方法

底泥培養実験

比較的有機物の少ない吉見湾の底泥を風乾し、60メッシュのふるいを通す区分だけを基礎底泥として用いた。この基礎底泥に2%の割合でヘミセルロースおよびセルロースを添加し、この混合底泥100gを500ml培養瓶に入れ、滅菌海水300mlを加え底泥モデルとした。また、

100ml培養瓶も用いたが、この場合は混合底泥を25g、滅菌海水を75mlとした。これらに底泥容量の約1%量の広湾底泥を添加し、2日に1回、底泥モデル上部の海水の1/3量(100mlまたは25ml)を新しい滅菌海水で交換しながら、20℃または各温度で培養した。一定日数培養したのち、500ml培養瓶では、滅菌ガラス管を用いて、底泥の一定量を採取し、各細菌数およびCODなどの測定用試料とした。また、100ml培養瓶は各実験区ごとに複数

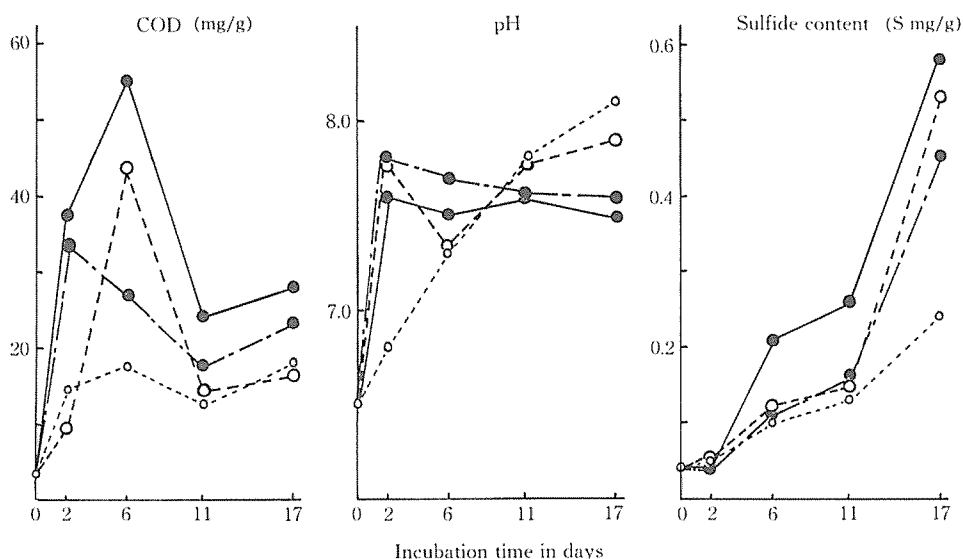


Fig. 23. Changes in COD, pH values and sulfide contents during incubation of sediments with hemicelluloses and cellulose.

●—: Glucomannan 2%, ●---: Xylan 2%,
○---: Cellulose 2%, ○- - - : No addition.

個培養し、一定日数後そのうちの1本を取り出して供試した。なお、各温度別培養実験には、粗針葉樹キシラン2%を添加した底泥を用いた。

基質

底泥培養実験には、ヘミセルロースとして2・1と同じ、粗グルコマンナンおよび粗針葉樹キシランを用い、セルロースとしては市販のセルロース粉末（東洋濾紙K.K.製）を用いた。

細菌の計数

好気性従属栄養細菌数および好気性キシラン分解細菌数については平板培養法によって、嫌気性従属栄養細菌数、嫌気性グルコマンナン分解細菌数、嫌気性キシラン分解細菌数および硫酸還元細菌数については液体培養法によって、それぞれ2・2および2・3と同じ方法で計数した。なお、温度別培養の場合の好気性キシラン分解細菌数については、液体培養法によって計数した。

COD、ヘミセルロース量などの測定

底泥中のCOD、pH、硫化物量、ヘミセルロース量および70%エタノール抽出糖量については、それぞれ、2・3と同じ方法で測定した。なお、ヘミセルロース量については1% NaOH抽出画分のみについて測定した。

結果および考察

底泥培養実験におけるヘミセルロース分解細菌の消長および硫化物の生成に及ぼす基質の影響

基礎底泥にヘミセルロースおよびセルロースを添加した底泥培養中の10日目の様子を、Fig. 21に示す。また、底泥培養中の各群細菌数の消長をFig. 22に、COD、pHおよび硫化物量の変化をFig. 23に示す。

Fig. 21に見られるように、ヘミセルロース添加区やセルロース添加区では無添加区に比べて、底泥の黒色化や一部海水層まで黒色化が進んでいる様子が認められた。

Fig. 22から、培養中の各群細菌数は各添加区および無添加区共に日数の経過にしたがって次第に増加し、ほぼ11日目でそれぞれ最高値となっている。この際のヘミセルロース添加区における好気性キシラン分解細菌数は 10^8 CFU/gであり、嫌気性グルコマンナン分解細菌数は、 10^7 MPN/gであって、両細菌群共にその後減少する傾向が見られた。一方、嫌気性従属栄養細菌数や硫酸還元細菌数にはこれらの減少はみられず、添加区のうちにはむしろ増加の傾向すら認められた。これらのことから、他の細菌群とは異なり、好気性キシラン分解細菌にはなんらかの阻害要因が現れ、17日目の計数値を低下させたものと思われる。

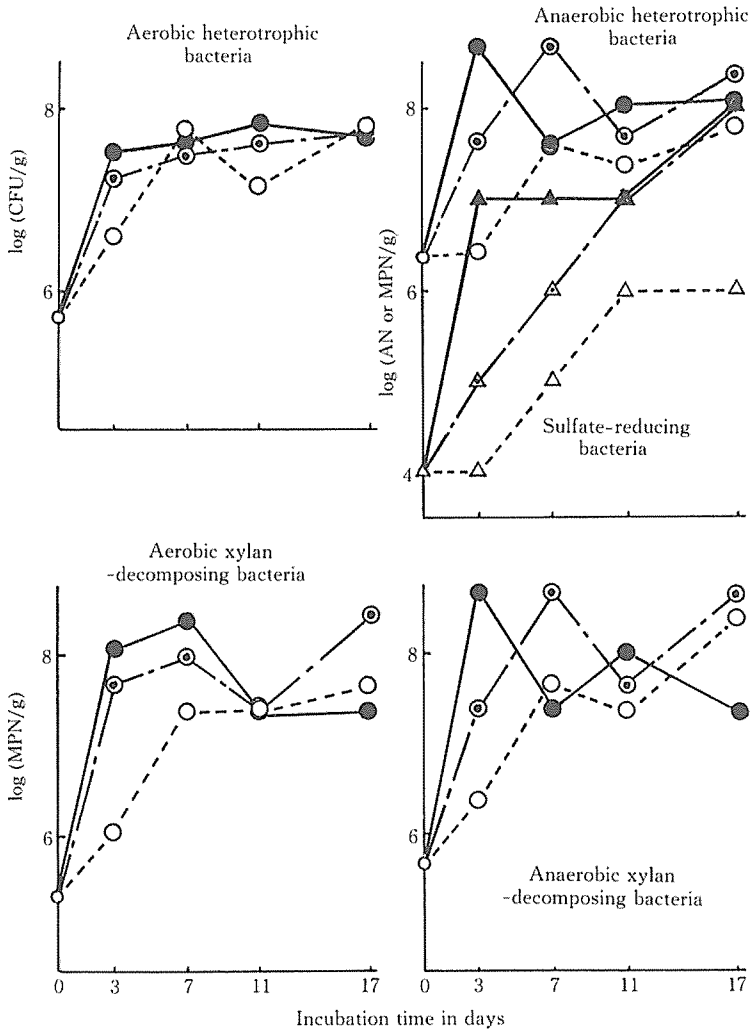


Fig. 24. Changes in bacterial numbers during incubation at different temperatures in sediments with 2% xylan.

●—: 30°C, ○---: 20°C, △---: 10°C.

る。また、この好気性キシラン分解細菌ではヘミセルロース添加区の細菌数が最も大きく、次にセルロース添加の細菌数が大きく、無添加区の細菌数はあまり増加しなかった。このようにヘミセルロースの添加の影響が顕著なのは、好気性キシラン分解細菌が基質依存性の強い菌群であるためと考えられる。

Fig. 23 から明らかなように、培養 2 日目から 6 日目にかけて、COD はヘミセルロースおよびセルロース添加区

で共に増加しており、いずれの基質もかなり分解されたものと認められる。なお、この COD の増加の山はヘミセルロース添加区の方が早目に現れており、ヘミセルロースの分解がより早く進行したと思われる。次に、pH にも微生物分解の影響が見られ、とくに、ヘミセルロース添加区では有機酸の生成などによるものと考えられる pH の低下が認められた。また、硫化物量は培養日数と共に増加し、17 日目には添加区と無添加区との差異が明らかとなり、へ

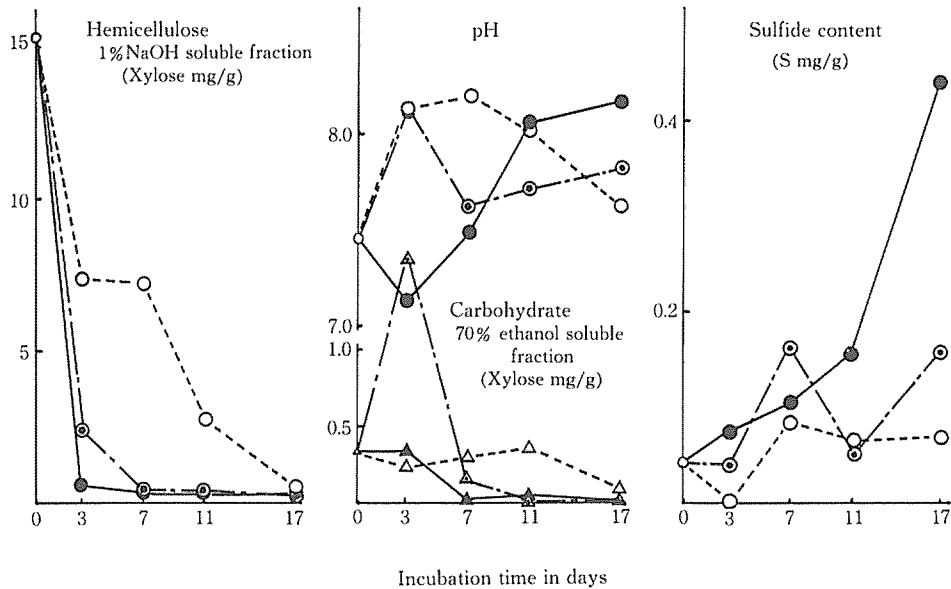


Fig. 25. Changes in hemicellulose, carbohydrate, pH values and sulfide contents during incubation at different temperatures in sediments with 2% xylan.

●—: 30°C, ○—: 20°C, △—: 10°C.

ミセルロース添加区もセルロース添加区とほぼ同程度の硫化物量になることがわかった。なお、このセルロース添加区における硫化物の生成の過程は、畑¹⁸⁾の結果と類似した傾向であった。以上のことから、海域にもたらされたヘミセルロースもセルロースと同様に微生物分解を受け、海域における硫化物の生成に強く影響することが明らかとなった。

底泥培養実験におけるヘミセルロース分解細菌の消長および硫化物の生成に及ぼす培養温度の影響

キシラン添加培養中の各群細菌数およびヘミセルロース量などの変化を、Fig. 24 および 25 に示す。Fig. 24 から、各群細菌数の変動傾向は培養温度により異なり、30°C 培養ではすでに 3 日目ではほぼ最高値となった。これに対して、10°C 培養では 3 日目までの細菌数の増加は小さく、その後次第に増加して 11 日目頃には他の場合と同程度の細菌数となった。なお、20°C 培養では、両者の中間的変動傾向を示した。とくに、培養温度の違いによる菌数差の大きい細菌群は、硫酸還元細菌であった。一方、キシラン分解細菌では好気性細菌群および嫌気性細菌群共に、30°C 培養における細菌数が 3 日目から 7 日目へかけて最高値となったのち、培養後半には減少する傾向が見られた。これらの傾

向は、両従属栄養細菌数や硫酸還元細菌数には認められない。以上のことと前項の底泥培養実験における好気性キシラン分解細菌数の結果をあわせて考えると、これらの傾向は、温度などの影響により有機物の分解が進行した条件下における特異的な好気性キシラン分解細菌の遷移によるものと考えられる。これに類似した現象は現場調査において、好気性ヘミセルロース分解細菌数の夏季減少傾向として認められており、まったく同質とは言えないが、かなりの関連性はあるものと考えられる。なお、培養実験中の嫌気性キシラン分解細菌にもこれらの減少が見られたが、これは好気性キシラン分解細菌の大半を占める通性嫌気性細菌群が、嫌気性キシラン分解細菌の計数值に重複して計数されているためと考えられる。

Fig. 25 から明らかなように、30°C 培養では添加したヘミセルロースの分解はすみやかであり、また、硫化物の生成も急速に進行することが認められた。これらのことから、広湾においても夏季高温期には、ヘミセルロースの分解や硫化物の生成などは盛んに進行するものと考えられる。なお、10°C 培養ではヘミセルロースの分解や有機酸の生成 (pH の低下) などは進むものの、硫化物の生成には至らないものと推測された。

6. 総 括

沿岸海域に流入する産業廃水のうち、パルプ工場からの廃水は、リグニン、セルロース、ヘミセルロースおよびそれらの分解物を多量に含み、種々の環境問題および漁業被害の原因となる。そのため、この問題についてはすでに1950年代を中心に数多くの研究が行われた。

その後、パルプ産業を取り巻く情勢は変化し、パルプ製造法のクラフトパルプ法への転換が進み、パルプ工場廃水の内容も次第に変化してきた。また、排水規制が強化されたこともあって、CODや色に対する影響が強いリグニン系物質の除去に廃水処理の重点が置かれるようになってきた。このような社会情勢の変化に伴って、工場から排出される廃水の質的内容も変化した。これに対応した研究はほとんど行われていない。また、現状では、晒・製紙工程からの廃水の処理はまだ完全とは言えず、長い年月の間には、セルロースやヘミセルロースなどが排水口周辺に沈積し、海域の汚濁の原因の1つになっている。したがって、このような廃水の質的内容の変化に対応する研究は、環境科学および漁場の保全上から重要であると考えられる。

海域におけるパルプ廃水成分の微生物分解に関連した研究としては、すでにセルロース分解細菌や硫酸還元細菌に関する詳細な研究がなされており、底泥中のセルロースの分解に伴って、硫化物が生成されることが知られている。しかし、上記のように廃水成分として重要なヘミセルロースの微生物分解に関しては、ほとんど研究が行われていない。

著者は、このヘミセルロースの分解に関与する微生物のパルプ廃水流入海域における生態を明らかにしようとしてこの研究を行った。

すなわち、まず広湾を対象海域として、ヘミセルロース分解細菌の分布を調べ、次に推計学的方法を導入して、それらの調査データを解析し、ヘミセルロース分解細菌の分布の特徴などについて検討し、さらに、現場海域から好気性キシラン分解細菌を分離し、それらの菌学的性状およびヘミセルロース分解能、ならびに底泥培養実験によるヘミセルロースの分解などについて検討した。得られた結果の主要な点は次のとおりである。

1) 海域に存在するヘミセルロース分解細菌を構成する2つのグループであるキシラン分解細菌とグルコマンナン分解細菌の培養計数法を確立し、その方法を用いて、クラフトパルプ工場廃水流入海域である広湾における、ヘミセ

ルロース分解細菌の分布を調べた。その結果によると、この海域の海水中の好気性キシラン分解細菌数は $10^1 \sim 10^4$ CFU/mlであり、好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の比は1/10~1/100であった。この存在比は非汚濁海域である吉見湾でのそれ(1/1000~1/10000)と比較するとかなり大きい値であった。また、岩国沿岸での存在比は約1/10と大きい値であった。これらのことから、パルプ工場廃水の流入の影響の強い海域では好気性キシラン分解細菌の存在比が大きいことが明らかになった。

一方、底泥中では、好気性グルコマンナン分解細菌数が $10^3 \sim 10^7$ MPN/g、好気性キシラン分解細菌数が $10^3 \sim 10^5$ CFU/g および嫌気性グルコマンナン分解細菌数が $10^2 \sim 10^7$ MPN/gであった。また、好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の比はほぼ1/10~1/100であり、吉見湾でのそれ(1/100)と比べるとやや大きい傾向を示した。このように、底泥中ではパルプ廃水流入海域と非汚濁海域との間に好気性キシラン分解細菌の存在比に関して海水中におけるほど大きい差異がないのは、好気性キシラン分解細菌の多くが*Bacillus*属の細菌から構成されていたためと思われる。すなわち、沿岸海域の底泥中には、分解細菌のベースとなる好気性従属栄養細菌のうち、*Bacillus*属の占める割合がもともと高く、また、これらの*Bacillus*属にはキシラン分解能を持つ菌株が多いため、非汚濁海域においても好気性従属栄養細菌に対する好気性キシラン分解細菌の存在比が比較的大きくなったものと考えられる。

2) 海域におけるヘミセルロース分解細菌の分布と環境因子との関係を、推計学的手法を用いて解析した。まず、季節を層別因子とした単回帰分析の結果は、広湾における底泥中の各群細菌数およびCOD、ヘミセルロース量などは、パルプ工場に近い場所で大きく、それを離れるにしたがって減少する傾向があることを示した。また、ヘミセルロース分解細菌数には季節による差異が見られ、とくに好気性ヘミセルロース分解細菌数は夏季には春季および秋季より少なくなる傾向が見られた。一方、嫌気性ヘミセルロース分解細菌は夏季にも多く、その数は好気性ヘミセルロース分解細菌数より多かった。

重回帰分析の結果からは次の点が明らかになった。まず、広湾の1m層海水中の好気性従属栄養細菌数には、温度およびCODの影響があり、好気性グルコマンナン分解細菌数には、溶存性炭水化物量の影響が見られた。また、底泥中の好気性従属栄養細菌数および硫酸還元細菌数には、そ

れぞれ水分量およびCODの影響が見られた。これに対して、ヘミセルロース分解細菌数には、好気性菌群および嫌気性菌群共にヘミセルロース量が影響因子になっていた。さらに、嫌気性グルコマンナン分解細菌数には、温度も強く影響していた。これらのことから、ヘミセルロース分解細菌は基質依存性の強い細菌群と考えられ、海域に流入したヘミセルロース量の多少に応じてその菌数が増減する傾向のあることが明らかとなった。

さらに、各群細菌数相互間の回帰分析の結果から、海水中の好気性従属栄養細菌数に対する好気性キシラン分解細菌数の関係は、パルプ廃水流入海域では両海域共同様な傾向を示したが、吉見湾ではそれらとは異なる傾向が見られた。また、底泥中における好気性従属栄養細菌数と好気性キシラン分解細菌数との関係は広湾および吉見湾共に同様の傾向であったが、広湾では吉見湾よりやや大きい細菌数を与えた。

3) 広湾における好気性キシラン分解細菌の菌学的性状および属レベルでの分類から、好気性キシラン分解細菌としては海中および底泥中共に、*Bacillus* 属および *Vibrio-Aeromonas* 属の細菌が多く、菌の種類が環境条件による制約を受けて限定されていることが明らかになった。こ

れらの菌株には、糖の分解能および糖の発酵性を示すものが多かった。また、一般にこれら両菌属には通性嫌気性菌が多いとされており、上記の性状などとあわせて考えると、これらの菌株は広湾の汚濁環境下で活発に活動しているものと推測できる。なお、底泥中の優占種である *Bacillus* 属の菌株の約 60% は、陸上型の中温細菌であることがわかった。

一方、非汚濁海域の好気性キシラン分解細菌としては、上記 2 つの属のほかに、*Pseudomonas*, *Achromobacter* および *Flavobacterium* に属する細菌が見られた。また、海洋型の菌株がほぼ半数を占め、次が好塩型の菌株であり、陸上型の菌株は約 15% と少ない傾向を示した。

4) 好気性キシラン分解細菌の基質分解能から、広湾分離菌株のうち、好气的条件下で強いキシラン分解能を示す菌株は底泥中からの *Bacillus* 属細菌に多く、その約 80% の菌株がこれに相当した。また、嫌气的条件下でキシランを分解する菌株は全体の約 75% であり、これらの菌株には *Bacillus* および *Vibrio-Aeromonas* に属するものが多かった。分離菌株の多くは、有機汚濁の進行した嫌气的環境下でヘミセルロースの分解活動をしているものと推測できる。

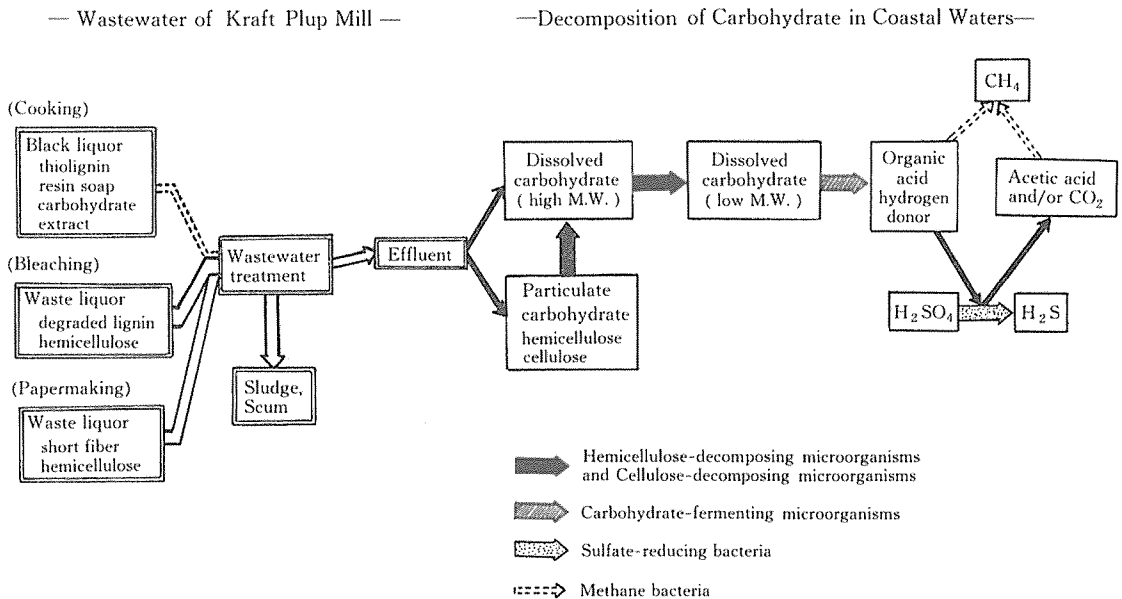


Fig. 26. Decomposition process of hemicellulose in coastal waters (Modified KADOTA's schema¹¹¹⁾ and related pathway.

次に、底泥培養実験の結果から、好気性キシラン分解細菌は、ヘミセルロースの添加区と無添加区とでその菌数に顕著な差があることが明らかになり、それらは基質依存性の強い菌群と考えられた。また、ヘミセルロース添加区ではセルロース添加区よりすみやかに基質の分解が進行する傾向があった。

ヘミセルロース添加区における硫化物の生成量はセルロース添加区と同程度であり、無添加区に比べて著しく大きい値を示した。

これらの事実から、海域にもたらされたヘミセルロースはセルロースと同様に微生物の作用によって分解され、底泥中における硫化物生成反応の水素供与体として利用されることが明らかになった。

5) 以上の結果を総合すると、パルプ工場廃水によって海域に導入されたヘミセルロースは、基質依存性の強いヘミセルロース分解細菌数を増加させ、従属栄養細菌数に対するヘミセルロース分解細菌数の比を大きくすることが明らかになった。また、推計学的処理によって得られた結果および海域から分離されたヘミセルロース分解細菌の性状などから、秋季から春季にかけては、主として好気性ヘミセルロース分解細菌群が海域に流入したヘミセルロースの分解に関与していると考えられる。なお、これらの菌群の中では *Bacillus* 属および *Vibrio-Aeromonas* 属の細菌が優勢であり、糖類発酵能を持つものが多く、しかもそれらの大半は嫌気的条件下でもキシラン分解能を持っているため、広湾の汚濁環境下でも活発に活動するものと考えられた。さらに、夏季には、好気性ヘミセルロース分解細菌数が減少し、嫌気性ヘミセルロース分解細菌群へと遷移する傾向が見られた。これらの嫌気性細菌群には有機酸との相関が強く、還元状態の進行した環境に適応した発酵性の強いものが多いと考えられる。

以上のように、ヘミセルロース分解細菌は海域に流入したヘミセルロースの加水分解に関与するだけでなく、糖類からの有機酸の生成にも関与するが、ここに生成した有機酸は硫酸還元細菌による硫酸呼吸の水素供与体として働き、セルロースの場合と同様に、汚濁環境下での硫化物の生成に強く関与していることが明らかとなった。これらの分解過程を模式的に示すと、Fig. 26 のようになる。

このようにして生成される硫化物は、微生物活動の高まる夏季には、底泥から上部の水層へと拡散するものと考えられる。とくに水の流動の少ない停滞した水域では、それらが底層水の低酸素化を起こして、そこに生息する種々の生物に大きい影響を及ぼすと考えられる。

謝 辞

本研究を終わるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った京都大学名誉教授 門田 元先生に深甚なる感謝の意を表する。

また、本研究の遂行にあたり、御指導および御鞭撻を賜った京都大学教授 越島哲夫先生、同教授 岩井 保先生、同教授 石田祐三郎先生、水産大学校教授 藤沢浩明先生、同教授 前田 弘先生ならびに京都大学助手 東 順一博士に衷心より感謝する。

さらに、研究にあたり、有益な御教示および御鞭撻を賜った高知大学教授 畑 幸彦先生、中国工業技術試験所環境化学研究室主任研究官 山岡到保氏、ならびに本実験に協力された水産大学校微生物学研究室の卒論学生であった諸氏に深く感謝する。

文 献

- 1) 新田忠雄・荒川 清・杉本仁弥・藤谷 超・伊賀原弥一郎・竹内 脩：内海水研報，第3号，1-84 (1953)；第6号，59-103 (1954)；第7号，1-77 (1955)。
- 2) 新田忠雄・荒川 清・杉本仁弥・藤谷 超・伊賀原弥一郎・千国史郎：内海水研報，第10号，57-135 (1975)；第11号，23-115 (1958)。
- 3) 河辺克己・富山哲夫：日水誌，20，700-704，705-708 (1954)；1081-1085，1086-1088 (1955)；21，37-41 (1955)。
- 4) 五十嵐彦仁・中村邦典：北水試月報，12，394-407 (1955)。
- 5) 田村 保・板沢靖男・森田良美：日水誌，20，344-349 (1954)。
- 6) 多賀信夫：水処理技術，7 (8)，1-19 (1966)。
- 7) 玄地 実：木材化学，下巻 (右田・米沢・近藤編)，共立出版，東京，1968，pp. 243-248。
- 8) 古田 稔：用水と廃水，16，1269-1276 (1974)。
- 9) 鮫島一彦・近藤民雄：木材誌，16，347-352 (1970)。
- 10) 用水廃水便覧編集委員会編：用水廃水便覧 (改定二版)，丸善，東京，1973，pp. 817-841。
- 11) 小倉達郎：用水と廃水，16，91-100 (1974)。
- 12) 三本 昇：紙パルプ技術タイムズ，昭50(4)，16-26 (1975)。
- 13) 杉本仁弥・鈴木正也・竹内 脩：内海水研C輯，No. 1，

- 1-114 (1964).
- 14) 村上正忠・藤沢浩明: 水産大研報, **28**, 63-74(1979).
- 15) 紙パルプ技術協会編: 紙パルプ製造全書, 第10巻, 環境対策・用水, 紙パルプ技術協会, 東京, 1978, pp. 103-105.
- 16) 山岡到保・谷本照己: 農化, **51**, 625-630 (1977).
- 17) 門田 元・三好英夫: 京大食研報告, 第27号, 9-29 (1964).
- 18) 畑 幸彦: 水産大研報, **14**, 37-83 (1965).
- 19) 清水 徹・中井美代子・伊達悦二・橋本敏子・信宗正男・妹尾正登・白根義治: 用水と廃水, **20**, 169-187 (1978).
- 20) J. K. HAMILTON and N. S. THOMPSON: *Pulp, Paper. Mag. Can.*, **59**, 233-241 (1958).
- 21) 越島哲夫: 化学と生物, **20**, 23-32 (1982).
- 22) 越島哲夫・杉原彦一・浜田良三・福山萬治郎・布施五郎: 改訂基礎木材工学, 文教出版, 大阪, 1983, pp. 181-195.
- 23) R. L. WHISTLER and C. L. SMART: in "Polysaccharide Chemistry". Academic Press, New York, 1953, pp. 134-151.
- 24) 田中龍太郎・越島哲夫: 木材誌, **18**, 403-408 (1972).
- 25) 川上日出国・大山哲夫: 紙パ技協誌, **32**, 359-367 (1978).
- 26) I. VANCE, S. O. STANLEY, and C. M. BROWN: *J. Gen. Microbiol.*, **114**, 69-74 (1979).
- 27) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明: 日水誌, **21**, 102-108, 109-112, 113-118 (1955); M. KIMATA, H. KADOTA, Y. HATA, and T. TAJIMA: *Rec. Oceanogr. Works Japan*, **2**, 85-93 (1955).
- 28) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・三好英夫: 日水誌, **22**, 701-707 (1957).
- 29) H. KADOTA: *Memoirs Coll. Agr., Kyoto Univ.*, No. 74, 1-128 (1956).
- 30) 吉田陽一・倉田 亮・小林俊男・木俣正夫: 日本海洋学会誌, **25**, 295-298 (1969).
- 31) K. OKUTANI and T. OKAICHI: *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, **23**, 137-148 (1971).
- 32) K. OKUTANI, T. OKAICHI and H. KITADA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **38**, 1041-1049 (1972).
- 33) H. MIYOSHI and K. NAKAMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 645-652 (1975).
- 34) H. MIYOSHI: *Res. Rep. Kochi Univ.*, **26**, 11-16 (1977).
- 35) H. MIYOSHI: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 197-202 (1978).
- 36) 畑 幸彦・三好英夫・門田 元・木俣正夫: 農水講研報, **8**, 135-145 (1959).
- 37) 畑 幸彦: 農水講研報, **9**, 329-345, 347-362, 363-375 (1960); **10**, 57-77, 79-87 (1960).
- 38) H. MIYOSHI: *Memoirs Fac. Agr. Kochi Univ.*, No. 18, 135-183 (1967).
- 39) H. SØRENSEN: *Acta Agr. Scand.*, Suppl. 1, 1-86 (1957).
- 40) 木村喬久: 北大水産彙報, **12**, 41-48 (1961).
- 41) 藤沢浩明: 日水誌, **30**, 506-515 (1964).
- 42) R. MORITA and C. E. ZOBELL: *Deep-Sea Res.*, **3**, 66-73 (1955).
- 43) M. DUBOIS, K. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, and F. SMITH: *Nature*, **168**, 167 (1951); *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 44) R. L. WHISTLER, J. BACHRACH, and D. R. BOWMAN: *Arch. Biochem.*, **19**, 25-33 (1948).
- 45) K. AOI and J. ORIKURA: *Centralbl. Bakt. II. Abt.*, **74**, 321-333 (1928).
- 46) P. PATRIC, C. H. WERKMAN, and R. M. HIXON: *J. Bact.*, **19**, 16 (1930).
- 47) S. A. WAKSMAN and R. A. DIEHM: *Soil Sci.*, **32**, 119-139 (1931).
- 48) H. SØRENSEN: *Nature*, **172**, 305-306 (1953); **176**, 74 (1955); **177**, 845 (1956).
- 49) M. INAOKA: *Mem. Ehime Univ. Sect. VI*, **2**, 91-94 (1961).
- 50) E. V. MCCOLLUM and W. A. BRANNON: *J. Am. Chem. Soc.*, **31**, 1252-1260 (1909).
- 51) 岩田久敬: 農化, **12**, 587-594 (1937).
- 52) 岩田久敬: 農化, **13**, 978-988 (1938).
- 53) 山藤一雄・稲岡 恵: 農化, **24**, 343-345 (1951).
- 54) 糸野文雄・神立 誠: 農化, **33**, 737-740 (1957).
- 55) B. A. DEHORITY: *J. Bact.*, **91**, 1724-1729 (1966).
- 56) M. INAOKA and H. SODA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **29**, 155-156 (1956); *Nature*, **178**, 202-203 (1956).
- 57) M. INAOKA: *Mem. Ehime Univ. Sect. VI*, **2**, 95-103 (1961).
- 58) 藤沢浩明・村上正忠・浜田盛承・瀬良 洋: 日水誌,

- 33, 438-447 (1967).
- 59) T. E. TIMELL: *Tappi*, **44**, 88-96 (1961).
- 60) 土壤微生物研究会編：土壤微生物実験法，養賢堂，東京，1979，pp. 59-67.
- 61) S. P. MEYERS and E. S. REYNOLDS: *Mycologia*, **51**, 138-145 (1959).
- 62) S. AARONSON: *Experimental Microbial Ecology*, Academic Press, New York, 1970, pp. 171-187.
- 63) A. GREIN and S. P. MEYERS: *J. Bact.*, **76**, 457-463 (1958).
- 64) S. T. WILLIAMS and T. CROSS: in "Methods in Microbiology" (ed. by C. BOOTH), Vol. 4, Academic Press, London, 1971, pp. 295-334.
- 65) J. N. PORTER, J. J. WILHELM, and H. D. TRESNER: *Appl. Microbiol.*, **8**, 174-178 (1960).
- 66) 山岡到保・谷本照己：農化，**51**，127-128 (1977)
- 67) 山岡到保・谷本照己：日化，**1977**，1554-1559 (1977).
- 68) 山岡到保：日化，**1978**，1706-1711 (1978).
- 69) 気象庁編：海洋観測指針，日本海洋学会，東京，1959.
- 70) 松江吉行編：水質汚濁調査指針，恒星社厚生閣，東京，1965，pp. 106-197.
- 71) 小倉紀雄：水処理技術，**4** (9)，45-52 (1963)；**16**，317-322 (1975).
- 72) N. HANDA: *J. Oceanogr. Soc. Japan*, **22**, 79-86 (1966).
- 73) 木俣正夫・河合章・石田祐三郎：日水誌，**26**，1227-1230 (1960)
- 74) Y. HATA: *Data Oceanogr. Obs. Explo. Fish.* (Shimonoseki Univ. Fish.), No. 1, 381-399 (1965).
- 75) M. A. PLUNKETT: *Deep-Sea Res.*, **5**, 259-262 (1957).
- 76) 右田伸彦・米沢保正・近藤民雄編：木材化学 (下)，共立出版，東京，1968，pp. 1-31.
- 77) 三好英夫・白井享・門田元：日水誌，**28**，534-539 (1962).
- 78) WPCF, APHA, and AWWA: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, Washington D. C., 1979, pp. 527-529.
- 79) 山下市二・田村太郎・吉川誠次・鈴木重治：分析化学，**22**，1334-1341 (1973).
- 80) S. A. WAKSMAN and K. R. STEVENS: *Soil Sci.*, **26**，113-137 (1928).
- 81) 和田秀徳・金沢晋二郎・高井康雄：土肥誌，**42**，109-117 (1971).
- 82) M. NIKAIIDO: *Geochem. J.*, **11**，199-206 (1977).
- 83) 福井作蔵：蛋白質・核酸・酵素，**6**，90-99 (1961).
- 84) R. F. H. DEKKER and G. N. RICHARDS: in "Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry" (ed. by R. S. TIPSON and D. HORTON), Vol. 32, Academic Press, New York, 1976, pp. 277-352.
- 85) S. P. MEYERS and E. S. REYNOLDS: in "Symposium on Marine Microbiology" (ed. by C. H. OPPENHEIMER), C. C. Thomas Publisher, Illinois, 1963 pp. 315-328.
- 86) K. TUBAKI: *Bull. Misaki Marine Biol. Inst., Kyoto Univ.*, No. 12, 195-202 (1968).
- 87) B. AUSTIN, D. A. ALLEN, A. ZACHARY, M. R. BELAS, and R. R. COLWELL: *Can. J. Microbiol.*, **25**，447-461 (1979).
- 88) 奥野忠一・久米均・芳賀敏郎・吉澤正：多変量解析法，日科技連，東京，1977，pp. 1-24.
- 89) 村上正忠・藤沢浩明：水産大研報，**26**，299-311 (1978).
- 90) 村上正忠・藤沢浩明：日水誌，**45**，1091-1098 (1979).
- 91) 奥野忠一・久米均・芳賀敏郎・吉澤正：多変量解析法，日科技連，東京，1977，pp. 25-157.
- 92) F. J. SIMPSON: *Can. J. Microbiol.*, **2**，28-38 (1956).
- 93) 高橋光雄・橋本揚之助：酸工，**41**，116-119 (1963).
- 94) S. A. WAKSMAN, C. L. CAREY, and H. W. REUSZER: *Bio. Bull.*, **65**，57-79 (1933).
- 95) T. ARAKI and M. KITAMIKADO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**，1135-1139 (1978).
- 96) 清水潮：海洋科学，**5**，588-594 (1973).
- 97) 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要，丸善，東京，1976，pp. 119-158.
- 98) E. LEIFSON: *Atlas of Bacterial Flagellation*, Academic Press, London, 1960, pp. 3-7.
- 99) 坂崎利一：新細菌培地学講座 (上)，近代出版，東京，1978，pp. 279-404.
- 100) E. LEIFSON: *J. Bact.*, **76**，1183-1184 (1963).
- 101) R. HUGH and E. LEIFSON: *J. Bact.*, **66**，24-26 (1953).
- 102) T. HIDAHA: *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, **14**，127-180 (1956).
- 103) R. E. BUCHANAN and N. E. GIBBONS: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.) ,Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974, pp. 340-348, 529-550.

- 104) R. S. BREED, E. G. D. MURRAY, and N. R. SMITH: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7th ed.) , Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1957, pp. 202-204.
- 105) F. HOPPE-SEYLER: *Hoppe-Seyler's Zeitschr. Physiol. Chem.*, **13**, 66-121 (1889).
- 106) S. A. WAKSMAN and R. A. DIEHM: *Soil Sci.*, **32**, 73-95, 97-117 (1931).
- 107) 藤沢浩明・村上正忠：日水誌, **35**, 677-684 (1969).
- 108) 藤沢浩明・村上正忠：日水誌, **37**, 119-123 (1971).
- 109) 日下部 功・神山 由・安井恒男：農化, **51**, 167-169 (1977).
- 110) H. YAMAGUCHI, S. INAMURA, and K. MAKINO: *J. Biochem.*, **79**, 299-303 (1976); **81**, 563-569 (1977).
- 111) H. KADOTA: in "Techniques for the Assessment of Microbial Production and Decomposition in Fresh Waters" (ed. by Y. I. SOROKIN and H. KADOTA) , Blackwell Scientific Publications, London, 1972, pp. 15-16.

Studies on Ecology of Hemicellulose-decomposing Bacteria in Polluted Coastal Waters

By

Masatada MURAKAMI

Summary

On the microbiological degradation of the pulp pollutants in coastal waters, the cellulose-decomposing and sulfate-reducing bacteria have already been investigated in detail, and it has been demonstrated that the sulfide-producing activity of sulfate reducers is markedly accelerated with the development of cellulose decomposition in bottom sediments.

Little has been known as yet of the decomposition of hemicellulose which is one of the organic pollutants in the polluted coastal waters. Therefore, the author undertook a series of studies to clarify the ecology of hemicellulose-decomposing bacteria in coastal waters polluted with pulp mill effluent. The present studies were primarily made of the glucomannan-decomposing and xylan-decomposing bacteria in Hiro Bay to determine the distribution of these bacteria and to estimate statistically their relation to the environmental factors in coastal waters. Experiments were conducted on the physiological and hemicellulose-decomposing activities of xylan-decomposing bacteria isolated from the seawater and bottom sediments in Hiro Bay, and also on the decomposition of hemicellulose in the sediment samples.

The results obtained from these investigations are summarized as follows:

Distribution of hemicellulose-decomposing bacteria in polluted coastal waters

It was established that the modified ZoBELL 2216 E medium was most suitable for the enrichment and enumeration of the xylan-decomposing and glucomannan-decomposing bacteria as two typical groups of hemicellulose-decomposing bacteria in coastal waters.

The distribution of hemicellulose-decomposing bacteria in Hiro Bay polluted with kraft pulp mill effluent, was estimated by means of the above-mentioned medium. The data collected from the seawater showed that the number of aerobic xylan-decomposing bacteria per ml of seawater in this area was 10^1 to 10^4 . The ratio of the number of xylan-decomposing bacteria to that of heterotrophic bacteria at 1 m depth was 1/10 to 10/100, and this ratio was 10 to 1,000 times as high as that in the control area (Yoshimi Bay), and was similar to that in the Iwakuni area polluted with pulp mill effluent.

Therefore, it can be said that this ratio is one of the most suitable indices for the pollution from pulp mill.

On the other hand, the numbers of the aerobic glucomannan-decomposing, aerobic xylan-decomposing and anaerobic glucomannan-decomposing bacteria per g of wet matter in the bottom sediments in Hiro Bay were 10^3 to 10^7 , 10^3 to 10^5 and 10^2 to 10^7 , respectively. The ratio of

the number of aerobic xylan-decomposing bacteria to that of aerobic heterotrophic bacteria in Hiro Bay was 1/10 to 1/100, and slightly higher than that in control area.

Statistical examinations on the data collected in polluted coastal waters.

The relation between the number of hemicellulose-decomposing bacteria and the environmental factors in coastal waters was estimated by the statistical methods.

As a result of multiple linear regression analysis in which the dummy variables were used as seasonal different factors, the values of bacterial count of each group, COD and hemicellulose contents in the bottom sediments in Hiro Bay were most abundant at the station near the pulp mill, and those values decreased with the distance from the pulp mill.

The number of aerobic hemicellulose-decomposing bacteria in summer was less than that in spring or in autumn, but the number of anaerobic hemicellulose-decomposing bacteria was the highest in summer and more than that of aerobic hemicellulose-decomposing bacteria in summer.

From the significant test of the multiple linear regression analysis by stepwise procedure, it was found that the number of aerobic heterotrophic bacteria at 1 m depth in Hiro Bay was subject to the influences of the temperature and the COD value, and that the number of aerobic glucomannan-decomposing bacteria was liable to the influence of the dissolved carbohydrate content.

In the bottom sediments, it was showed that the environmental factors influencing the number of bacteria were the water content for the aerobic heterotrophic bacteria, the COD value for sulfate-reducing bacteria, and the hemicellulose content for the aerobic and anaerobic hemicellulose-decomposing bacteria, respectively. In addition, the development of anaerobic glucomannan-decomposing bacteria was more remarkably influenced by the temperature, as compared with the other groups of bacteria.

From these facts, it can be said that the hemicellulose-decomposing bacteria are dependent upon the substrate of hemicellulose, and the number of hemicellulose-decomposing bacteria increases with the hemicellulose content.

Characteristics of aerobic xylan-decomposing bacteria

On the basis of the morphological and physiological test of the aerobic xylan-decomposing bacteria isolated from the seawater and bottom sediments in Hiro Bay, *Bacillus* and *Vibrio-Aeromonas* predominated in both the seawater and the bottom sediments. This experiment seems to show that the species of organisms isolated are limited to some kinds of bacteria by the environmental conditions in the same area.

Most of the isolated strains were endowed with the ability to decompose and ferment a variety of carbohydrates, and both genera of bacteria experimented, *Bacillus* and *Vibrio-Aeromonas*, were almost facultative anaerobes. About 60% of *Bacillus* species which were predominant in the bottom sediments were terrestrial types mesophilic bacteria.

It can be presumed that these strains are in full activity under environmental conditions polluted with pulp mill effluent.

On the other hand, the aerobic xylan-decomposing bacteria in control area (Yoshimi Bay) were composed of *Pseudomonas*, *Achromobacter* and *Flavobacterium* in addition to the above-mentioned two genera groups. About 50% of these strains were marine types of bacteria, but about 15% of them were terrestrial types of bacteria.

Decompositions of hemicellulose substrate in liquid medium and sediment samples cultures

When the hemicellulose-decomposing activities of aerobic xylan-decomposing bacteria were examined, about 80% of *Bacillus* species isolated from bottom sediments showed a high activity under aerobic conditions, and about 75% of tested strains showed a xylan-decomposing activity under anaerobic conditions. Most of these strains were *Bacillus* and *Vibrio-Aeromonas*.

From these experiments, it can be said that most of the strains actively decompose hemicellulose substrates under anaerobic conditions produced with the development of organic pollution.

In order to clarify the mechanism of the microbiological decomposition of hemicellulose in the development of reducing conditions in bottom sediments, the numbers of various bacterial groups and the degrees of bacterial activities were investigated in the sediment samples including hemicelluloses and cellulose powders in concentration of 2% each to the dry basal sediments. The number of aerobic xylan-decomposing bacteria in the sediments with hemicellulose was remarkably higher than that in substrate-free control. It seems that the number of aerobic xylan-decomposing bacteria is remarkably influenced by the hemicellulose substrates.

The decomposition of substrates in the sediments with hemicellulose progressed more rapidly than that in the sediments with cellulose. The production of sulfide in the sediments with hemicellulose was more abundant than that in the control, and was as much as that in the sediments with cellulose.

From the above-mentioned facts, it is concluded that the hemicellulose which flows into coastal waters like cellulose is rapidly decomposed by microorganisms in this area, and that the decomposition products are fermented to organic acids by organisms almost similar to the hemicellulose decomposers. Therefore, the organic acids produced in this way function as hydrogen donor in the sulfate respiration of sulfate-reducing bacteria. When the degradation of hemicelluloses and cellulose proceeds in the bottom sediments in coastal waters polluted with pulp mill effluent, the growth of sulfate reducers and the production of sulfides are remarkably accelerated by both the development of reducing conditions and the formation of organic acids.