

## 海洋中の炭化水素酸化細菌の スクリーニング法\*

藤沢 浩明・村上 正忠

### Method for Screening Hydrocarbon-oxidizing Bacteria in the Sea

By

Hiroaki FUJISAWA and Masatada MURAKAMI

It has been reported that the population density of hydrocarbon-oxidizing bacteria was high in the oil-polluted areas of Japanese coastal waters such as the Seto Inland Sea. Accurate information on hydrocarbon-decomposing activity of these bacteria is indispensable to clarify the self-purification in the coastal waters. In spite of the above-mentioned importance, little has been known of it, as yet.

The present study was undertaken to find a useful method for screening hydrocarbon-oxidizing bacteria in the sea.

The results obtained can be summarized as follows ;

A membrane filter method was useful for separating directly hydrocarbon-oxidizing bacteria groups A and B from seawater and bottom sediment. In this method, the liquid diluted successively from bacterial source was filtered through a membrane filter of 0.45  $\mu\text{m}$  in pore size, and bacteria caught on the filter were incubated for 14-21 days at 25°C on agar medium A or B (*n*-hexadecane was used as index hydrocarbon, see Tables 2 and 3), and colonies of hydrocarbon-oxidizing bacteria grown up on the filter were picked up.

These separated bacteria were incubated in liquid medium A or B (see Table 5 and 6) under constant shaking of 110 strokes/min at 25°C for 10 days, and the amount of remaining *n*-hexadecane in each culture liquid was determined by gas chromatography. On the basis of decomposition rate of the substrate, hydrocarbon-decomposing activity of bacteria examined was divided into 6 grades. And it was found that the greater part of bacteria examined was clearly active, and 39 strains of the 45 strains in group A and 73 strains of the 96 strains in group B, respectively, belonged to the highest two grades of hydrocarbon-decomposing activity.

Therefore, it was concluded that the above-mentioned method was useful for screening hydrocarbon-oxidizing bacteria in the sea.

---

\* 水産大学校研究業績 第864号, 1980年2月23日受理.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 864. Received Feb. 23, 1980.

# 1. 緒 言

一般に石油汚染海域には、炭化水素酸化細菌 (HO と略称) が多数存在していることが知られている<sup>1,2)</sup>。日本沿岸海域でも、海水中や底泥中に HO がかなり高い密度で存在することが明らかにされ<sup>3,4)</sup>、また HO の密度と油分濃度などの環境因子との関係が解析されている<sup>4,5)</sup>。わが国の沿岸海域における HO の生態を明らかにし、油濁に対する自浄作用を評価するためには、海水や底泥から HO を分離し、分離菌株について炭化水素分解能を調べる必要がある。

その手始めとして、本研究では海域からの HO のスクリーニング法について、*n*-ヘキサデカンを指標炭化水素に選び、メンブランフィルター法による HO の分離と基質分解能の測定条件を検討したので、これらの結果について報告する。

# 2. 実験方法

## 2.1 供試細菌源

下関市吉見湾および岩国沿岸海域から採取した海水あるいは底泥を HO の分離源として用いた。海水については表層海水を 2 l の滅菌ポリ瓶に直接採取し、底泥については表層底土堆積物をエクマンバージ式採泥器によって採取し、1 l の滅菌ポリ瓶に移した。すべての試料は氷蔵して、できるだけすみやかに研究室に運び、実験に供した。これらの試料中の従属栄養細菌数は、海水で  $10^4 \sim 10^6$  cells/ml、底泥で  $10^6$  cells/g であった。

## 2.2 HO の分離法

試料を第 1 表に示す組成の滅菌基礎塩溶液<sup>6)</sup>で順次 10 倍希釈した後、各希釈液 10 ml を滅菌メンブランフィルター (孔径  $0.45 \mu\text{m}$ 、直径 47 mm、日本ミリポア製) で濾過した。ついで、A 寒天培地 (第 2 表) あるいは B 寒天培地 (第 3 表) 10 ml を直径 6 cm のシャーレに入れて予め調製した平板の表面に、100  $\mu\text{l}$  の *n*-ヘキサデカン (メンブランフィルターで濾過滅菌した) を加え、その上にそれぞれのメンブランフィルターを置いて、25°C で 14~21 日間培養した。

Table 1. Composition of basal salt solution

NaCl	30.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 g
KCl	0.3 g
FeCl <sub>2</sub> · <i>n</i> H <sub>2</sub> O	0.01 g
Distilled water	1000 ml
pH adjusted to 7.5	

Table 2. Composition of agar medium A\* for isolation of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A

Basal salt solution**	1000 ml
L-Alanine	1.0 g
Agar	15.0 g
pH adjusted to 7.5	

\* A hundred microliters of *n*-hexadecane was poured onto the surface of each plate medium (about 10 ml of this fluid per Petri dish of 6 cm in diameter).

\*\*See Table 1.

Table 3. Composition of agar medium B\* for isolation of hydrocarbon-oxidizing bacteria group B

Basal salt solution**	1000 ml
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
Agar	15.0 g
pH adjusted to 7.5	

\* A hundred microliters of *n*-hexadecane was poured onto the surface of each plate medium (about 10 ml of this fluid per Petri dish of 6 cm in diameter).

\*\*See Table 1.

このようにして、メンブランフィルター上に発生したHOのコロニーの代表例を第1図(A)および(B)に示した。これらのコロニーを釣菌し、少量の*n*-ヘキサデカンを加えた寒天斜面培地(第4表)に接種し、25°Cで数日間培養した後、ZO-BELL 2216E培地<sup>7)</sup>を用いて常法により純粋分離し、上述の*n*-ヘキサデカンを加えた寒天斜面培地上で継代培養した。

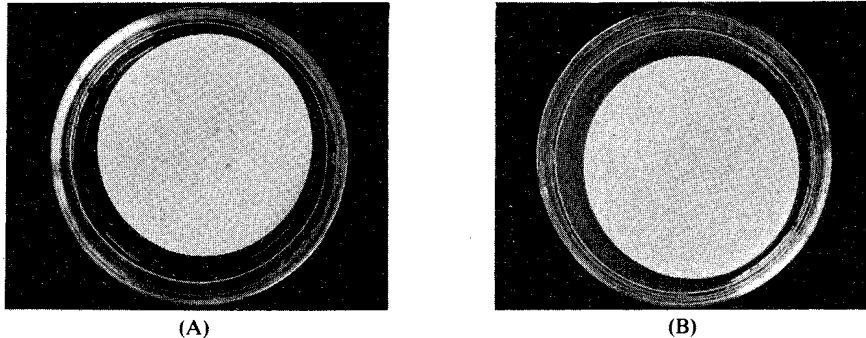


Fig. 1. Colonies of hydrocarbon-oxidizing bacteria on membrane filter.  
 (A): Hydrocarbon-oxidizing bacteria group A incubated on agar medium A (Table 2) for 21 days. Bacterial source is seawater sampled from Yoshimi coastal waters.  
 (B): Hydrocarbon-oxidizing bacteria group B incubated on agar medium B (Table 3) for 21 days. Bacterial source is the same as (A).

ここで、A培地上に増殖するHOをHO A群(Aと略称)とし、B培地上に増殖するものをHO B群(B)とするが、AおよびBの意義については既報<sup>9)</sup>で述べたとおりである。また、A培地あるいはB培地で分離された細菌は、必ずしもAあるいはBのみではないが、いずれもHOが高率を占めると考えられる。このことについては、改めて結果の項で後述する。

### 2.3 分離細菌の基質分解能の測定法

*n*-ヘキサデカンを指標基質として、既報<sup>9)</sup>に準じた方法により、分離細菌の基質分解能を測定した。すなわち、供試細菌を前述の寒天斜面培地(第4表、*n*-ヘキサデカンを含まない)で、25°C、3日間、2回前培養した後、それぞれ1白金耳量(約 $10^8$  cells)を、Aの菌株についてはA液体培地(第5表)に、またBの菌株についてはB液体培地(第6表)に接種した。この場合、各培地50 ml(*n*-ヘキサデカン50  $\mu$ lを含む)を500 mlの肩付フラスコに入れ、綿栓して用いた。各培地は予め加圧滅菌し、また基質はメンブランフィルターで

Table 5. Composition of liquid medium A for hydrocarbon-oxidizing bacteria group A

Basal salt solution*	1000 ml
L-Alanine	1.0 g
pH adjusted to 7.5	
Hydrocarbon**	1000 $\mu$ l

\* See Table 1.

\*\*Fifty microliters of *n*-hexadecane is added to each 50 ml of the fluid without hydrocarbon.

Table 4. Composition of agar slant

Peptone	1.0 g
Yeast extract	0.2 g
Agar	15.0 g
Filtered seawater	1000 ml
pH adjusted to 7.5	

A small quantity of *n*-hexadecane is added to each slant.

Table 6. Composition of liquid medium B for hydrocarbon-oxidizing bacteria group B

Basal salt solution*	1000 l
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g
pH adjusted to 7.5	
Hydrocarbon**	1000 $\mu$ l

\* See Table 1.

\*\*Fifty microliters of *n*-hexadecane is added to each 50 ml of the fluid without hydrocarbon.

濾過滅菌しておいた。細菌を接種した培養フラスコを25°Cで10日間振盪培養(110ストローク/分)した後、培養液中の残存基質を *n*-ヘキサンで抽出し、抽出液を50 mlの定容とした。なお、抽出に先立って、*n*-ヘプタデカン50  $\mu$ lを内部標準物質として培養液に加えた。

Table 7. Operating conditions for gas chromatography

Apparatus	Hitachi Gas Chromatograph Model 063
Column	5% Silicone (SE)-52 on Chromosorb WAW (60~80 mesh), Stainless-steel tubing (3 mm $\times$ 2.0 m)
Detector	Hydrogen flame ionization
Temperature	Column 160°C, Injection and detector 200°C
Carrier gas	Nitrogen
Flow rate	Carrier gas 30 ml/min, Hydrogen gas 30 ml/min, Air 500 ml/min
Sample size	1 $\mu$ l
Internal standard substance	<i>n</i> -Heptadecane

この抽出液1  $\mu$ lを第7表に示す条件でガスクロマトグラフィー(内部標準法)によって定量し、培養液中の残存基準量をmg数で表わした。25°Cで10日間振盪した細菌無接種の対照培地中の基質量を同一方法によって求め、その量を基準にして減少量(mg)から減少率(%)を計算し、基質分解率とした。基質分解率によって次のように、各菌株の基質分解能を6段階に格付けした。基質分解率5% >  $\pm$ , 5%  $\leq$  + < 10%, 10%  $\leq$  # < 25%, 25%  $\leq$  ## < 50%, 50%  $\leq$  ### < 75%, 75%  $\leq$  ####。

なお、基質分解能の測定条件については、予め窒素源量、基質量および培養日数を検討し、最適条件を求めたが、これらの実験にあたっては、それぞれ上述の方法を基準にした。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 基質分解能に及ぼす窒素源量の影響

基質分解能の測定条件を決定するのに、まず培地中の窒素源量が問題となるので、窒素源量と基質分解率との関係について調べた。AおよびBの代表例をそれぞれ第8表および第9表に示した。第8表からAに

Table 8. Influence of amount of nitrogen source (L-alanine) on decomposition of *n*-hexadecane by a typical culture of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A (WA5X5-12)

Amount of nitrogen source (g/l)	Decomposition rate of <i>n</i> -hexadecane (%)
0.0	5.8
0.5	99.4
1.0	100.0
2.0	98.0
5.0	99.1
10.0	98.1
20.0	85.7

Table 9. Influence of amount of nitrogen source (NH<sub>4</sub>Cl) on decomposition of *n*-hexadecane by a typical culture of hydrocarbon-oxidizing bacteria group B (WB5X-1)

Amount of nitrogen source (g/l)	Decomposition rate of <i>n</i> -hexadecane (%)
0.0	0.4
0.5	94.8
1.0	100.0
2.0	97.7
5.0	77.1
10.0	19.3
20.0	5.9

については、窒素源量0.5~10.0 g/l の場合に高い分解率を示した。また第9表からBについては、窒素源量0.5~2.0 g/l の場合に高い分解率がみられ、窒素源量が5.0 g/l 以上では、濃度が増加するにしたがって分解率は急速に低下した。第8表および第9表、さらに他の数菌株についての結果を総合して考察すると、窒素源量はA、Bとも1.0 g/l で充分であると考えられるので、以下の実験ではこの窒素源量を用いた。

### 3.2 基質分解能に及ぼす基質量の影響

培地中の基質量が問題となるので、基質量と基質分解率との関係について調べた。AおよびBの代表例を第10表に示した。

Table 10. Influence of amount of *n*-hexadecane on its decomposition by typical cultures of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A (WA5X3-10) and group B (WB5X1-1)

Amount of <i>n</i> -hexadecane $\mu\text{l}$ (mg)/50 ml	Decomposition rate of <i>n</i> -hexadecane by group A (%)	Decomposition rate of <i>n</i> -hexadecane by group B (%)
10 (7.8)	100.0	100.0
25 (19.6)	100.0	100.0
50 (39.2)	100.0	100.0
100 (78.4)	42.2	43.8

第10表から明らかなように、基質量が50  $\mu\text{l}/50\text{ ml}$  以下の場合に完全分解を示したが、100  $\mu\text{l}/50\text{ ml}$  では約40%の分解率であった。AおよびBの他の菌株数例についても、同じような結果が得られた。村上ら<sup>9)</sup>は、培地中の *n*-パラフィン量が350 mg/l 以上で、海洋性炭化水素酸化細菌の基質分解率が低下すると述べているが、著者らの実験結果からは、50  $\mu\text{l}/50\text{ ml}$  (78.4 mg/l) まで100%の分解率を示しているので、両者間に明らかな相違がみられる。このことは、供試細菌や培養条件の差異に起因すると考えられる。本実験結果から、基質量としては、最高分解率を示したもののうち最大量の50  $\mu\text{l}/50\text{ ml}$  が最適と思われるので、以下の実験ではこの基質量を用いた。

### 3.3 培養日数に伴う基質の分解経過

AおよびBの代表菌株について、培養日数に伴う基質の分解経過を調べ、それぞれのタイムコースを第2図および第3図に示した。

第2図および第3図から明らかなように、両菌株の基質分解の経過はよく似たパターンを示している。すなわち、4日まで基質分解に誘導期がみられ、その後6日から8日にかけて著しい基質分解が認められた。この結果は、ATLAS および BARTHA<sup>9)</sup>が海水からの分離細菌のパラフィン系原油の分解について得た結果とおおむね一致し、さらに村上ら<sup>9)</sup>の海洋性細菌の *n*-パラフィンの分解の結果とよく一致した。最高の基質分解に要する培養日数は、本実験結果から8~10日であった。他の数菌株についての結果を考え合わせると、スクリーニングの目的で細菌の基質分解能を判別するための培養日数は、10日で充分であると考えられる。

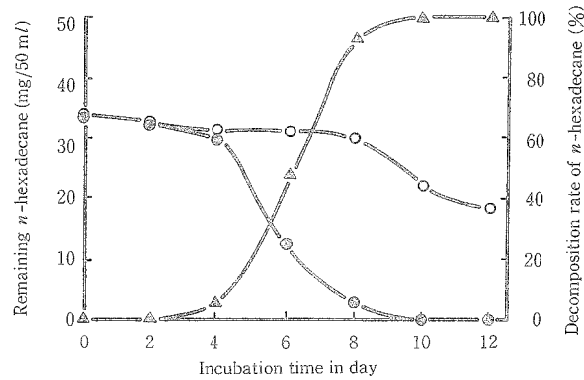


Fig. 2. Time course of decomposition of *n*-hexadecane by a typical culture of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A (WA5X3-15).

○ : control  
 ⊙ : incubation  
 ▲ : decomposition rate

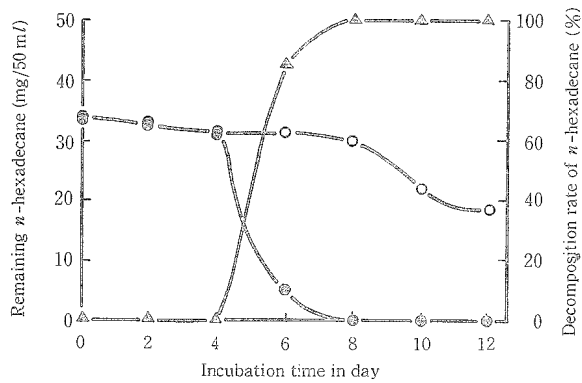


Fig. 3. Time course of decomposition of *n*-hexadecane by a typical culture of hydrocarbon-oxidizing bacteria group B (WB5X1-1).

○ : control  
 ⊙ : incubation  
 ▲ : decomposition rate

### 3.4 分離細菌の*n*-ヘキサデカン分解能

吉見湾の1海水試料からの分離したA35菌株およびB88菌株について、*n*-ヘキサデカン分解能を調べた結

果を第11表に示す。また吉見湾の1底泥試料から分離したA10菌株およびB8菌株についての結果を、第12表に示す。

Table 11. *n*-Hexadecane-decomposing activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from a seawater sample

Decomposing activity of <i>n</i> -hexadecane	Number of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A	Number of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria group B
Decomposition rate 5% > ±	0	2
5% ≤ + < 10%	0	2
10% ≤ + < 25%	1	9
25% ≤ ++ < 50%	3	8
50% ≤ +++ < 75%	4	10
75% ≤ ++++	27	57
Sum	35	88

Table 12. *n*-Hexadecane-decomposing activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from a bottom mud sample

Decomposing activity of <i>n</i> -hexadecane	Number of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A	Number of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria group B
Decomposition rate 5% > ±	1	0
5% ≤ + < 10%	1	0
10% ≤ + < 25%	0	0
25% ≤ ++ < 50%	0	2
50% ≤ +++ < 75%	1	2
75% ≤ ++++	7	4
Sum	10	8

第11表から明らかのように、海水からの分離細菌は、Aで35菌株中31菌株(89%)、Bで88菌株中67菌株(76%)が、それぞれ基質分解率50%以上を示す強い分解能をもつことがわかった。

第12表から底泥からの分離細菌は、Aで10菌株中8菌株(80%)、Bで8菌株中6菌株(75%)が、それぞれ基質分解率50%以上の強い分解能を示した。

両実験結果から、海水および底泥からの分離細菌を各群ごとに合計してみると、A45菌株およびB96菌株のほとんどすべてが、基質分解率5%以上の明らかな分解能を示し、さらにAで39菌株(87%)、Bで73菌株(76%)が、それぞれ分解率50%以上の上位2階級に属する強い分解能をもつことがわかった。

これらのことから、本実験で用いたメンブランフィルター法は海洋中のHOの分離法として有効であり、とくに操作が簡便であるために実用性が高いと考えられ、さらに分離細菌について基質分解率を基準にして分解能を格付けする本法も、HOの基質分解能の判別法として有用であると思われる。したがって、これらの方法によって、海洋中のHOをうまくスクリーニングできることが認められた。

## 4. 要 約

海洋中の炭化水素酸化細菌 (HO) のスクリーニング法について、*n*-ヘキサデカンを指標炭化水素に選び、メンブランフィルター法による HO の分離と基質分解能の測定条件を検討し、次の結果を得た。

1. 海水および底泥から、メンブランフィルター法によって、HO A群およびB群をよく分離することができた。すなわち、試料を適度に希釈した液をメンブランフィルター (孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ ) で濾過し、このフィルターを予め平板に作成したA寒天培地 (L-アラニン 1 g, 寒天15 g, 基礎塩溶液 1 l, pH7.5, 約10 ml の培地上に*n*-ヘキサデカン約100  $\mu\text{l}$  を加える) あるいはB寒天培地 (塩化アンモニウム 1 g, 寒天15 g, 基礎塩溶液 1 l, pH 7.5, *n*-ヘキサデカン100  $\mu\text{l}$ /培地10 ml) の上に置き、25°Cで14~21日間培養し、フィルター上に発育したコロニーを鈎菌する。

2. 分離細菌の*n*-ヘキサデカン分解能の測定法として、供試菌株1白金耳量をそれぞれ、A液体培地 (L-アラニン 1 g, 基礎塩溶液 1 l, pH7.5, *n*-ヘキサデカン50  $\mu\text{l}$ /培養液50 ml) あるいはB液体培地 (塩化アンモニウム 1 g, 基礎塩溶液 1 l, pH 7.5, *n*-ヘキサデカン50  $\mu\text{l}$ /50 ml) に接種し、25°Cで10日間振盪培養 (110ストローク/分) し、培養液中の残存基質量をガスクロマトグラフィーによって定量し、細菌を接種しない対照培地中の基質量を基準にして基質分解率を求め、これらの値によって各菌株の基質分解能を判別することが有効である。

3. 基質分解率によって各菌株の基質分解能を6段階に格付けすると (基質分解率  $5\% > \pm$ ,  $5\% \leq < 10\%$ ,  $10\% \leq \# < 25\%$ ,  $25\% \leq \#\# < 50\%$ ,  $50\% \leq \#\# < 75\%$ , および  $75\% \leq \#\#\#$ )、海水および底泥から分離したA群45菌株、B群96菌株のほとんどすべての菌株が、基質分解率5%以上の明らかな分解能を示し、さらにA群で39菌株 (87%)、B群で73菌株 (76%) が、分解率50%以上の上位2階級に属する強い分解能をもつことがわかった。

4. 1~3から、本実験で確立した方法は、海洋中のHOのスクリーニング法 (分離および炭化水素分解能の測定) として有用であることが認められた。

終わりに、本実験に協力された水産大学校微生物学研究室卒論学生であった有馬 強、木田長史郎、入江一博、北原文昭および大谷謙二の諸君に謝意を表す。なお、研究費の一部分は環境庁水島重油流出事故漁業影響調査費および農林水産生態系における汚染物質の循環と指標生物に関する研究費によった。

## 文 献

- 1) ZoBELL C.E., 1969: in "Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills" (ed. by API and FWPCA), American Petroleum Institute, Washington, D.C., pp. 317~326.
- 2) 徳田 広, 1976: 石油汚染と水産生物 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 60~75.
- 3) 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦, 1978: 日水誌, 44, 91~104.
- 4) 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦, 1979: 日水誌, 45, 1099~1107.
- 5) 村上正忠・藤沢浩明・真鍋武彦, 1979: 日水誌, 45, 1091~1098.
- 6) 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦, 1977: 日水誌, 43, 659~668.
- 7) MORITA R. and C.E. ZoBELL, 1955: *Deep-Sea Research*, 3, 66~73.
- 8) 村上昭彦・松田時雄・渡辺展宏・長沢伸一, 1976: 日海洋会誌, 32, 242~248.
- 9) ATLAS R.M. and R. BARTHA, 1972: *Biotechnol. and Bioeng.*, 14, 297~303.