

# 海洋細菌に関する研究—I

無機塩要求について陸棲細菌との比較\*

日 高 富 男

## Studies on the Marine Bacteria - I. Comparative Observations on the Inorganic Salt Requirements of Marine and Terrestrial Bacteria

Tomio HIDAOKA

### Abstract

1. Inorganic salt requirements of 113 strains of bacteria from the sea (100 strains from sea water and 13 strains from the surface of fresh fishes) were investigated. In addition 37 strains of terrestrial bacteria and 14 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were employed in the experiments.

2. These micro-organisms showed different mineral requirements. This was demonstrated in experiments with a basal medium (pH 7.6) which contained only 0.05 per cent of peptone and 0.01 per cent of yeast extract as organic matter (see Fig. 2 and Tables 3 and 4).

3. Many strains from sea water were able to grow in artificial sea water media with a salt concentration ranging from 0.5 to 12 per cent. In the majority of the strains, the salt concentration optimum for growth was found to be 5 to 7 per cent. Terrestrial bacteria, on the other hand, showed a moderate growth without any supplement of inorganic salts to the basal medium, and the growth was almost entirely suppressed at a salt concentration of 7 per cent, the optimum being 0.5 per cent (see Fig. 3).

4. Na-, K-, Mg-, and Ca-salts as contained in sea water were necessary for the growth of marine bacteria in the basal medium but not for that of terrestrial forms, whereas *Vibrio parahaemolyticus* seemed to require NaCl for their normal growth (see Fig. 1 and Table 5).

5. All the strains were tested on their growth capacity in the following five types of media during six days' incubation at 25°C. The media (pH 7.6) contained, common to all, 0.05 per cent of peptone and 0.01 per cent of yeast extract, which were dissolved in: (a) pure water, (b) 0.5 per cent NaCl solution, (c) 3 per cent NaCl solution, (d) Herbst's artificial sea water diluted six-fold, and (e) Herbst's artificial sea water.

6. Tested micro-organisms can be grouped into three from their growth capacity manifested in these media. One of them, which includes terrestrial bacteria, is characterized by the capacity to grow in every type of the media. Another group lacks in the capacity to grow in the (a) medium. The last one, to which the majority of marine bacteria belong, is characterized by incapability to grow in the media (a), (b), and (c) (see Tables 5 and 6).

7. Although organisms belonging to these three groups have been found in the sea, the writer believes that only the last-mentioned should be designated *marine bacteria* in the strict sense.

\* 本報告は昭和37年11月、日本水産学会秋季大会（長崎）において発表した。

海洋細菌の研究は大きく分けて次の二つの方向が考えられる。その一つはこの種細菌が海洋という特殊環境に棲息することによって備える特異性状についての研究<sup>1), 2), 22), 23)</sup>であり、他の一つは海洋の生態及び生産力の素因、または海洋学水理現象の指標としての研究<sup>3), 4)</sup>である。

海水は物理、化学的或は生態学的に特殊環境であるので、そこを棲息場所とする海水固有の海洋細菌が特異な性状を具有することは当然のことであろう。しかしその特性についての研究は海水から分離された特殊な細菌、例えば硫酸塩還元菌<sup>5)</sup>、寒天分解菌<sup>6)</sup>、繊維素分解菌<sup>7)</sup>、キチン分解菌<sup>8)</sup>など一部の菌群について詳細に行なわれているのみで、広範囲に亘る一般海洋細菌についてそれを系統だてて特異性を明らかにした研究は少い。著者は海洋細菌と陸棲細菌とをなるべく多数供試して両者の生理学的性状を比較検討し、海洋細菌の特異性を明らかにすることによって、いわゆる海洋細菌と称せられる一群を定義づけようと試み標題の研究を実施した。本報においては各種無機塩中、Na, K, Mg, Ca 塩等海水中の主要成分である塩類の要求性に顕著な差異を認めることが出来たのでその知見を報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 供 試 菌

本実験の供試菌は海棲細菌を主体とし、その対照菌として新鮮な魚体表から分離した細菌や、病原性好塩菌（腸炎ビブリオ）並びに陸棲細菌（標準菌株）をも合わせて供試した。

海棲細菌はさきに北海道大学水産学部微生物学研究室（主任 坂井稔教授）の諸氏が練習船おしよる丸の第44次航海（1959年6月—7月）において海水から分離した菌株を譲りうけたものである。即ちベーリング海及びアリューシャン海域の水深0—1000mの各水層からJ—Z式細菌検査用採水器を使用して無菌的に採取した海水を、ZoBELL 2216 E 寒天培地<sup>9)</sup>による混釈培養法で25°C、6日間培養後純粋分離した好気性有機栄養細菌である。この時分離された約600株のうち一般形態及び生理的性状を異にする各群より無差別に抽出した100株

Table 1. Habitat and main characters of some selected strains of bacteria isolated from sea water.

Strain No.	Date of isolation (in 1959)	Locality of isolation			Main morphology			
		Station		Depth (m)	Form	Gram stain	Motility	Flagella
		Lat.	Long.					
1001—7	June 9	42°00'N—146°00'E		0	Rods	—	+	Peritrichous
1007—1	June 9	42°00'N—146°00'E		98	Rods	—	+	Peritrichous
1028—4	June 12	48°00'N—156°59'E		63	Cocci	+	—	
1040—1	June 14	47°42'N—163°31'E		87	Rods	—	+	Polar
1055—1	June 16	48°00'N—170°00'E		694	Rods	—	+	Polar
1055—2	June 16	48°00'N—170°00'E		694	Rods	—	—	
1064—2	June 19	55°00'N—171°20'E		670	Rods	—	+	Polar
1142—1	June 30	54°10'N—172°00'W		49	Rods	—	—	
1179—2	July 13	58°19'N—174°50'E		56	Rods	+	—	
1197—4	July 15	57°19'N—169°58'E		863	Rods	—	+	Polar
1242—3	July 23	47°43'N—157°10'E		74	Rods	—	+	Polar

について本実験を行なったが、本報には代表菌11株について記載した。その代表菌の分離場所及び形態の概要は Table 1 の如くである。対照菌として魚体表細菌、病原性好塩菌とその類似菌及び陸棲細菌（標準菌株）を夫々13株、14株、37株を供試したが、本報告にはこのうちの下記代表菌9株について記載した。

*Vibrio metschnikovii* 1AM-1039

*Pseudomonas aeruginosa* 1AM-1007

*Pseudomonas fluorescens* Migula

*Proteus vulgaris* NCTC # 4175

*Escherichia coli* (O-26)

*Bacillus subtilis* NRRL 558

*Micrococcus lysodeikticus*

*Photobacterium* sp. (魚体表面から分離した発光細菌)

*Vibrio parahaemolyticus* (O-5)\*, (E. V. -5と略記)

## 2. 培養方法

ZoBELL 2216 E 培地<sup>9)</sup>(ポリペプトン5g, 酵母エキス1g, リン酸第2鉄\*\*0.1g/海水1L, pH 7.6)の組成を基準にし、実験目的に従って種々有機物濃度や無機塩組成及び濃度を変えた培地を用いた。培地は殆んど液体培地として用い、比濁用規格試験管(径16.5mm)に8ml分注して121°C, 10分間殺菌後、試験菌を常法により培養初菌数 $10^{3-4}$  cell/ml程度に接種して25°Cで所定時間静置培養した。

## 3. 発育度の測定と表示法

所定条件下で培養した後、コタキ AKA 型光電比色計により630m $\mu$  フィルターを用いて濁度(吸光値)を測定した。なお培養期間中所定時間毎に濁度を測定して、そのうちの最高濁度をもってその培養期間中における発育度とした。

## 実験結果

### 1. 供試菌の発育に対する海水無機塩の効果

まず供試菌の発育に海水が如何に影響するかを知るため、海水肉汁培地(pH 7.8)と普通肉汁培地(pH 7.2)で25°Cと37°C培養における発育度を比較したところ、その結果は Fig. 1 の如くであった。Fig. 1 に示されるように海棲細菌の1040-1は25°Cで海水肉汁に培養した時のみ発育し、他の条件では発育し得なかった。1064-2は25°C, 37°C共に海水肉汁に発育するが、普通肉汁には25°Cでかすかに発育するのみで37°Cでは発育出来なかった。*Ps. aeruginosa*, *E. coli*は海水肉汁、普通肉汁の両培地において発育度の差は少なく、25°Cと37°Cの培養温度による発育度にも大差なかった。一方*Proteus vulgaris*は25°Cで培養した場合37°Cよりも発育良好であった。またE. V. -5もこれら培養条件でよく発育す

\* いわゆる病原性好塩菌であり、これは国立予防衛生研究所福見研究室でO抗原につき型別された Serotype 1~12型中の5型。

\*\* 本実験の培地作成条件ではリン酸第2鉄添加の効果は少なかったためほとんどの実験においてこれを添加しなかった。

ることを知り得たが、その発育の程度は普通肉汁より海水肉汁の方が優れ、且つ両培地での

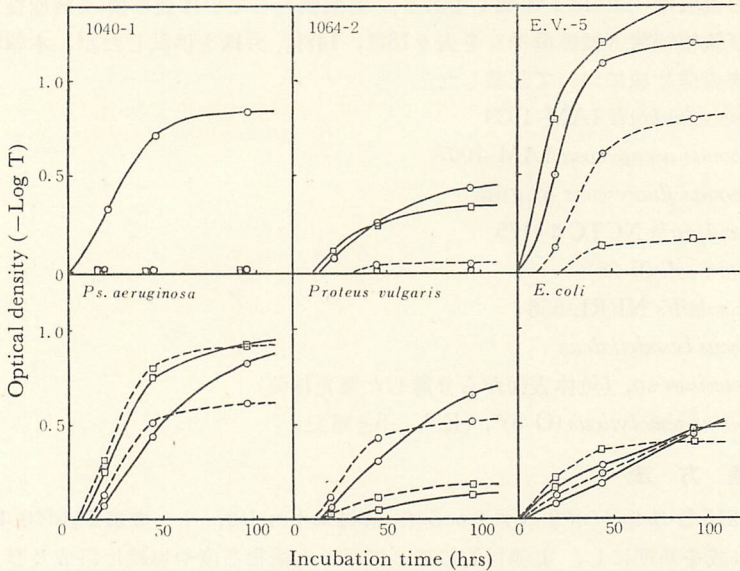


Fig. 1. Effect of culture media and incubation temperature on the growth of bacteria.

————— : Sea water broth, pH 7.8  
 - - - - - : Ordinary broth, pH 7.2  
 ○ : 25°C, □ : 37°C

発育度の差は 37°C 培養の時に著明にみられ、25°C 培養ではその差は縮まった。このように病原性好塩菌の海水に対する嗜好性は培養温度によってかなり異なって現われることが知られた。これらの結果から海棲細菌と陸棲細菌とではその性状にかなり大きな差異があることを認めた。即ち海棲細菌には海水を要求する菌が多く見出され、また発育温度は 37°C よりも 25°C が適し 37°C での発育度は 25°C のそれに比べて著しく劣り、全供試海棲菌のうち約 60% は 37°C に発育し得ない菌株であった。

Fig. 1 の結果において、海棲細菌が普通肉汁より海水肉汁の方に発育良好な理由として、前者は塩濃度が 0.5% NaCl であるに比べ後者は海水を使用した培地であり、その浸透圧が高いことに起因していると考えられるか、または海水に含まれる K, Mg, Ca 塩等 NaCl 以外の塩類が海棲細菌の発育を促進していると考えらるべきかについてはこの実験から結論を得ることが出来なかつた。そこで次に海棲細菌の海水要求性が浸透圧調節のために必要なものか或は栄養源として必要であるかを知るため次の実験を行なった。即ち培地を作成するに当たり、無機塩添加条件として海水及びそれと略々等張の 3% NaCl 溶液、並びに 0.5% NaCl 溶液及びそれと等張の 1/6 濃度海水、更に塩類を全く添加しないものとして純水等 5 種の塩類溶液を選び、夫々ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.1% を溶解し pH を 7.6 に調節した培地を作成した。この際天然海水に代えて Herbst 人工海水を使用した。予備実験において天然海水と Herbst 人工海水とでは本実験の条件で使用する場合殆んど同じ効果を示したからである。前記 5 種の培地を用い 25°C で 6 日間培養した結果の発育状態は Table 2 の如くで

あった。これによると陸棲細菌は 0.5% NaCl の培地 及びそれと同程度の塩濃度である 1/6 濃度人工海水の培地において発育度がやや高かったが、他の培地での発育度も若干の差があるのみで、全ての培地に充分発育し得ることを知った。E. V.-5 及び *V. metschnikovii* は

Table 2. Effect of several types of saline water on the growth of bacteria.  
The amounts of growth ( $-\text{Log } T \times 100$ ) was measured at the maximum turbidity during 6 days incubation at 25°C.

Tested strains	0.5% of peptone and 0.1% of yeast extract				
	Pure water	0.5% NaCl soln.	3% NaCl soln.	A. S. W.* (dild. 6 fold)	A. S. W.*
1001-7	8	5	10	10	20
1007-1	0	0	13	24	50
1028-4	0	0	6	50	60
1040-1	0	0	12	46	100
1055-1	0	0	45	99	120
1055-2	0	0	0	10	30
1064-2	0	0	10	19	29
1142-1	0	0	20	24	50
1179-2	0	2	22	25	28
1197-4	0	0	30	64	125
1242-3	0	13	56	42	52
<i>Photobacterium</i> sp.	0	0	15	17	25
E. V.-5	0	50	100	80	110
<i>V. metschnikovii</i>	0	35	21	35	28
<i>Ps. aeruginosa</i>	28	60	65	105	80
<i>Ps. fluorescens</i>	55	80	60	110	42
<i>Proteus vulgaris</i>	21	60	60	38	42
<i>E. coli</i>	30	50	30	59	31
<i>Bac. subtilis</i>	20	25	18	32	23
<i>M. lysodeikticus</i>	6	20	12	38	25

\* Herbst's artificial sea water of following formula:

NaCl, 30.0g; KCl, 0.7g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10.8g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.4g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1.0g; pure water, 1000ml.

(to apply Tables 4~7 and Figs. 2, 3)

純水で作成した培地には発育しないが他の培地では良く発育した。魚体表面から分離した *Photobacterium* sp. 及び海棲細菌の多くは 3% NaCl 溶液、人工海水、1/6 濃度人工海水で作成した培地に発育し得たが、純水、0.5% NaCl 溶液で作成した培地には発育し得なかった。もちろん魚体表細菌及び海棲細菌の中にも前記 5 種の全培地で発育するもの、または純水で作成した培地には発育し得ないが他の 4 種の培地で発育し得るものなども含まれていた。以

上の実験結果より考えて海棲細菌は海水中に含まれる無機塩を要求することが知られた。無機塩として単に NaCl のみの存在において発育を全うするものではなく、他の塩類例えば K, Mg, Ca 塩によって発育が促進されていることが明らかにされた。塩類濃度としては 0.5% NaCl 程度より 3% NaCl 程度の濃度が適していた。

## 2. 無機塩要求性比較のための培地条件の規制

前項 Table 2 の結果において、陸棲細菌が純水で作成した培地に発育することと、海棲細菌が 3% NaCl 溶液で作成した培地に貧弱な発育を示すことが観察されたが、これらのことから細菌の無機塩要求性を比較するためには培地中の無機塩量を把握し、培地条件を規制すべきであると考えて次の実験を行なった。

まず普通の細菌用培地の材料として用いられる有機栄養素材中の無機塩量を定量した。定量無機塩は前項の実験結果、海棲細菌の発育の良否が海水無機塩の存否にかかっているような知見が得られているので、人工海水成分との関連において、素材中の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  を対象とした。後報する如く人工海水中の各無機塩を夫々塩化物或は硫酸塩に変えて作成した各種の培地に対する供試菌の発育度には大差がなかったので、この際アニオンは測定の対象にしなかった。また培地作成用素材の各成分は、製造元や Lot No. によっても相当に変動することが知られているが<sup>14), 15), 16)</sup> この実験には教室保有のものを供試した。各有機栄養素材及び寒天の無機イオン含量は Table 3 の如くであった。この結果から培地素材中には  $\text{Na}^+$  が多いもの或は  $\text{K}^+$  が多いものと様々であるが一般に  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  は  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  含量

Table 3. Content of inorganic ions in commercial peptone, beef- and yeast- extract and agar for cultur media.

Matter	Lot No.	Maker	g/sample 100g					
			Moisture	Dry matter	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{++}$	$\text{Ca}^{++}$
Polypeptone	P0602	DAIGO EIYO KAGAKU Co., Ltd., Japan	3.9	96.1	2.53	0.54	0.034	0.00
TERUUCHI- Peptone		GOTŌFUUNDO Co., Ltd., Japan	5.8	94.2	0.78	5.40	0.053	0.15
KYOKUTO- Peptone		KYOKUTO SEIYAKU Industries Ltd., Japan	6.4	93.6	0.46	3.36	0.05	0.28
MIKUNI- Peptone	538 SH 06	MIKUNI KAGAKU Industries Ltd., Japan	4.0	96.0	0.41	3.52	0.048	0.184
Bacto- Tryptose	426125	Difco Laboratories Inc., U. S. A.	10.6	89.4	4.04	0.62	0.00	0.00
Bacto- Peptone	456887	Difco Laboratories Inc., U. S. A.	2.2	97.8	1.52	0.47	0.036	0.024
Yeast extract	P1023	DAIGO EIYO KAGAKU Co., Ltd., Japan	4.0	96.0	2.07	2.26	0.24	0.048
KYOKUTO- Meat extract	146	KYOKUTO SEIYAKU Industries Ltd., Japan	15.4	84.6	2.67	2.97	0.175	0.064
Bacto- Beef extract	457913	Difco Laboratories Inc., U. S. A.	22.7	77.3	4.09	3.91	0.051	0.00
NISSAN- Agar	620327	NISSUI SEIYAKU Co., Ltd., Japan	14.5	85.5	0.16	3.44	0.112	0.20

Analytical method:  $\text{Mg}^{++}$  and  $\text{Ca}^{++}$ , EDTA chelate titration<sup>10), 11)</sup>;  $\text{Na}^+$ , colorimetry<sup>12)</sup>;  $\text{K}^+$ , colorimetry<sup>13)</sup>

に比し少ない。Na<sup>+</sup> を NaCl 相当量として表わせば、多いもので10.4%、少ないもので1.0% を含む。各イオンの含量は夫々の素材においておよそ1~10倍の変動がみられた。これら有機物素材は大体において天然蛋白質或は酵母を人工的に処理、調製したものであるから、その原料の純度及び製造方法等により無機塩含量も変動することは当然のことと考えられる。従って使用製品の組成は一応定量し把握しておく必要がある。供試の寒天は Na<sup>+</sup> が少く K<sup>+</sup> 含量が多い。Mg<sup>++</sup> Ca<sup>++</sup> 含量も他の素材に比して多かったが、これは寒天そのものがガラクトタンのエステル結合したもので一部は Ca, Mg 塩になっているため、Mg<sup>++</sup> Ca<sup>++</sup> の含量が多く現れるものと考えた。

この実験に使用した培地は主にポリペプトン(大五栄養製) 5g, 酵母エキス(大五栄養製) 1g を 1ℓ に溶解したものである。これら有機物に夾雑している被検無機イオンは Na<sup>+</sup> 147mg, K<sup>+</sup> 53mg, Mg<sup>++</sup> 4.1mg, Ca<sup>++</sup> 0.48mg となり、かなりの無機塩量が培地の有機物素材から培地中に混入していることが明らかとなった。

次に有機物に夾雑して培地に混入する無機塩をなるべく少くするために、消極的な方法であるが培地中の有機物添加量を減らすことによって夾雑塩の混入の削減を計ることを考えてみた。その予備実験として培地中の有機物濃度(ポリペプトン 5g, 酵母エキス 1g/ℓ の濃度を 100としてこれを 1/2, 1/10, 1/20, 1/50と段階的に希釈したものを夫々 50, 10, 5, 2 とする Ratio で濃度を表現した。なおこの濃度100の全窒素量は700mg/ℓに相当した)が菌の発育に及ぼす影響を検討した結果 Fig. 2 の成績を得た。この Fig. 2 に示す濃度範囲内において、各供試菌の発育は培地中の有機物濃度に比例して発育度を増す傾向がみられた。海棲細菌

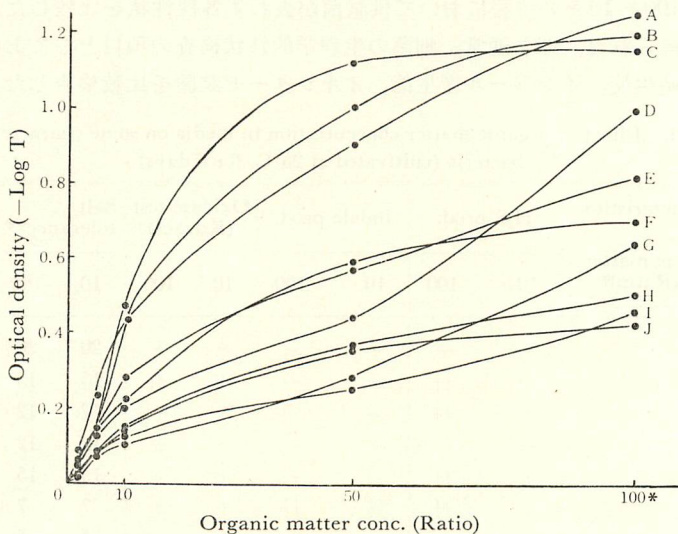


Fig. 2. Effect of organic matter concentration on the growth of bacteria (at 25°C. after 6 days).

Tested strains: A, 1197-4; B, 1055-1; C, E.V.-5; D, *Ps. aeruginosa*; E, 1040-1; F, *Ps. fluorescens*; G, *Proteus vulgaris*; H, 1007-1; I, *E. coli*; J, 1064-2

\* 100: 5g of peptone and 1g of yeast extract per liter (Total nitrogen, 700mg/l), dissolved in artificial sea water

菌が有機物濃度10—50 (Ratio) の間より50—100 の間での発育度の増加が低くなるのに対し、陸棲細菌は *Ps. aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *E. coli* にみられる如く、有機物濃度10—50の間よりも50—100の間での発育度の増加が高い。これに対し E. V.—5 は有機物濃度10の培地から発育旺盛で、50までに大体最高の発育を示し、有機物濃度50と100とではその差を認めなかった。培地の栄養量と菌収量との関係については、培地の栄養が豊富な時にはこれが消費しつくされないうちに蓄積した有害産物の影響によって発育は停止し、また栄養が貧弱な場合には有害産物の影響が問題にならないうちに栄養の欠乏がおこり、細菌の収量は栄養の量によって決定されることが知られている<sup>17)</sup>。このことより Fig. 2 に示した供試菌の発育傾向より考えて、陸棲細菌の最大収量を得るためにはこの有機物濃度100は未だ栄養不足の傾向がみられるが、海棲細菌に対しては適度の栄養量であり、E. V.—5 の如き菌株にあっては栄養過多の現象がうかがわれた。しかしながら実験の目的によっては必ずしも細菌の最大発育度を示す程の栄養豊富な培地を必要とせず、細菌が正常な発育を示すに必要なだけの栄養があれば充分な場合が多い。さて ZoBELL ら (1942)<sup>18)</sup> は細菌を液体培養する場合、有機物濃度がペプトン10mg/ℓ 以上あれば充分発育することを報告し、またグルコース0.1~10 mg/ℓ 濃度の液体培地においてそのグルコース代謝量及び同化量を定量している。別に海水の有機物濃度は種々の状態で大きく変動するが、通常5~6 mg/ℓ であると述べられている<sup>19)</sup>。更に本実験の Fig. 2 の結果によれば、全供試菌は有機物濃度2においても発育に伴う培地の濁りを肉眼的に充分観察し得る程であった。そこで有機物濃度100に対する10での発育度を比較すると大略、海洋細菌及びE. V.—5 では $\frac{1}{3}$ 、陸棲細菌では $\frac{1}{4}$ であった。次いで有機物濃度100と10との培養において供試菌が表わす各種性状を比較したところ Table 4 の如き結果が得られた。即ち通常、細菌の生理学的性状検査の項目としてあげられるもののうち硫化水素産生能、インドール産生能、オキシダーゼ試験を比較検査したところ、両培地

Table 4. Effect of organic matter concentration in media on some characteristics of bacteria (cultivated at 25°C. for 6 days).

Strains	Characteristics		H <sub>2</sub> S prod.		Indole prod.		Oxidase test (Kovacs)		Salt tolerance**		Colony size***	
	Organic matter conc. (Ratio)*		10	100	10	100	10	100	10	100	10	100
1007—1	—	—	—	—	+	+	20	20	Small	Ordinary		
1040—1	+	++	—	—	+	+	15	15	''	''		
1055—1	+	++	—	—	+	+	12	12	''	''		
1064—2	—	—	—	—	+	+	12	12	''	''		
1197—4	+	++	—	—	+	+	15	15	''	''		
E. V.—5	+	++	++	++	+	+	7	7	''	''		
<i>Ps. aeruginosa</i>	—	—	—	—	+	+	5	5	''	''		
<i>Ps. fluorescens</i>	—	—	—	—	—	—	5	5	''	''		
<i>Proteus vulgaris</i>	+	++	++	++	—	—	5	5	''	''		
<i>E. coli</i>	+	++	++	++	—	—	5	5	''	''		

\* { 10: 0.05% of peptone and 0.01% of yeast extract in artificial sea water diluted 3 fold  
 100: 0.5% of peptone and 0.1% yeast extract in artificial sea water diluted 3 fold

\*\* Maximum salt concentration (%) tolerated with any growth

\*\*\* Colony size on and in agar plate



の有機物濃度に大きな差があるにもかかわらず同じ成績が得られ、また食塩耐性においても同様であった。また寒天平板中での集落形成能は有機物濃度 100—50 までは正常の大きさの集落を形成するが、有機物濃度が更に減少するに伴い、集落数の変動は少いが集落の大きさは段々小さくなり、有機物濃度 5 では肉眼的に集落形態を観察するには困難な程微細な集落となった。Fig. 2 の結果において、液体培地では有機物濃度 5—2 の低濃度までも、発育による濁度を測定出来たが、寒天培地上で集落形態を観察し、容易に釣菌し得る程度の大きさの集落を形成させるためには有機物濃度 10 以上が必要であることを知った。

これらの結果を総合して培地の有機物濃度は通常 ZoBELL 2216 E 培地の  $\frac{1}{10}$  濃度、即ちポリペプトン 0.5g, 酵母エキス 0.1g/ℓ で十分に細菌の正常発育及び固有の性状を示すことが明らかにされた。さきの有機物素材中の夾雑無機塩の影響を少くするため培地の有機物量を通常の  $\frac{1}{10}$  程度に減少しても何らの不都合なく菌の発育は観察し得ることがわかったので、この有機物希薄培地を基礎培地として今後の無機塩要求性試験を行うことに規制した。この培地を使うことにより有機物中に夾雑して培地に混入する無機塩量は常法の  $\frac{1}{10}$  に減ずるから、その影響は無視出来る程に軽減するものと考える。

### 3. 供試菌の好塩性、耐塩性及び海水無機塩要求性

前項で規制した有機物希薄基礎培地を用い、Table 2 と同様に純水、0.5% NaCl 溶液、3% NaCl 溶液、 $\frac{1}{6}$ 濃度人工海水、人工海水の 5 つの各種塩類溶液で作成した培地（これらの培地を夫々(a), (b), (c), (d), (e)培地と符号する）に対する供試菌の発育程度を測定した結果は Table 5 である。これと Table 2 との実験条件の相違は培地中の有機物濃度を  $\frac{1}{10}$  にした点である。Table 2 と Table 5 の結果を比較してその明白な相違点は 3% NaCl 溶液で作成した培地における海棲細菌の発育態度であった。即ち Table 2 では殆んどすべての菌が 3% NaCl 培地で発育し、あたかも海水無機塩中の K, Mg, Ca 塩は必須塩ではないかの

Table 5. Amounts of growth of bacteria in several types of media during 6 days incubation at 25°C. (Growth:  $-\text{Log T} \times 100$ )

Types of media Tested strains	0.05% of peptone and 0.01% of yeast extract				
	Pure water (a)	0.5% NaCl soln. (b)	3% NaCl soln. (c)	A. S. W. (dild. 6 fold) (d)	A. S. W. (e)
1001—7	0	1	6	11	26
1007—1	0	0	2	14	15
1028—4	0	0	0	18	29
1040—1	0	0	0	15	28
1055—1	0	0	0	35	43
1055—2	0	0	0	9	24
1064—2	0	0	3	16	13
1142—1	0	0	0	12	15
1179—2	0	0	17	28	40
1197—4	0	0	0	30	38
1242—3	0	0	3	10	9
<i>Photobacterium</i> sp.	0	0	3	1	5
<i>E. V.</i> —5	0	22	33	25	44
<i>V. metschnikovii</i>	0	10	9	12	14
<i>Ps. aeruginosa</i>	19	22	15	27	30
<i>Ps. fluorescens</i>	12	15	12	18	16
<i>Proteus vulgaris</i>	5	11	0	19	10
<i>E. coli</i>	8	11	22	22	15
<i>Bas. subtilis</i>	12	9	7	6	14
<i>M. lysodeikticus</i>	3	5	0	12	12

如き挙動を示したが、Table 5 では海棲細菌の多くは3% NaCl 培地で発育せず、その発育には NaCl 以外に K, Mg, Ca 塩が不可欠成分であることを示した。Table 2 では培地の有機物濃度が高いので、それに夾雑して培地に混入する無機塩量も多くなり、これが供試菌の無機塩要求性を見掛上弱めていることが推察され、さきに規制した有機物希薄培地の使用により無機塩要求性がかなり鋭敏に表現されることがわかった。この条件で海棲細菌と陸棲細菌との見掛上の比較は充分可能である。即ち陸棲細菌は5種の所定培地全部に発育可能であり、無機塩要求性は弱い。これに対し海棲細菌の多くは海水無機塩の主成分である Na, K, Mg, Ca 塩を含む (d), (e) 培地にのみ発育し、海水無機塩要求性の厳しさを示す結果で

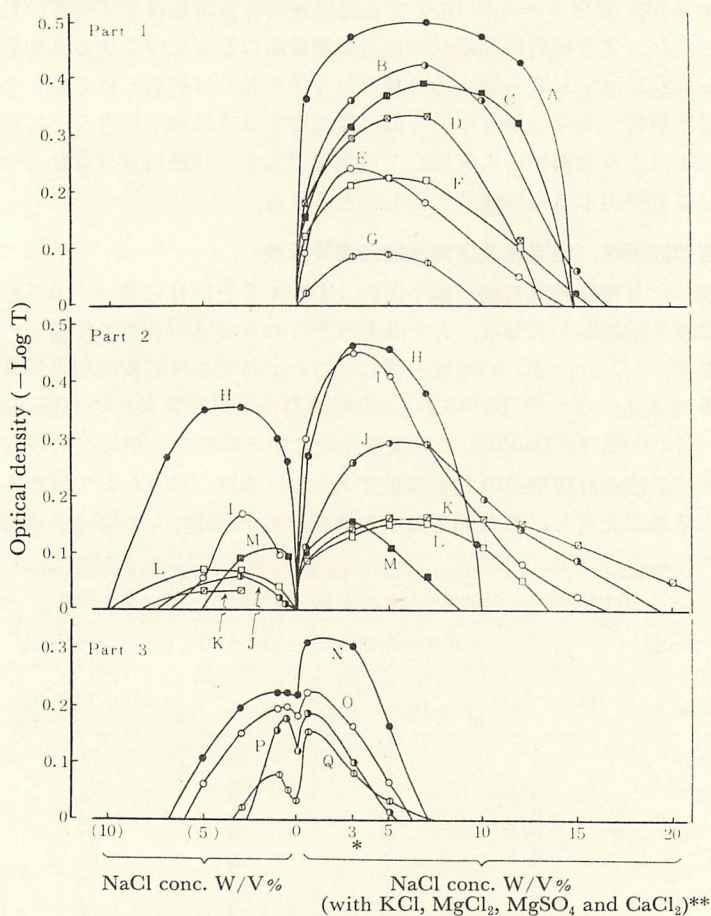


Fig. 3. Rate of growth in the broth containing different NaCl concentrations (at 25°C. for 10 days). All media (pH 7.6) contained 0.05% of peptone and 0.01% of yeast extract.

Tested strains: A, 1197-4; B, 1040-1; C, 1055-1; D, 1028-4; E, 1055-2; F, 1142-1; G, *Photobacterium* sp.; H, E.V.-5; I, 1179-2; J, 1001-7; K, 1007-1; L, 1064-2; M, *V. metschnikovii*; N, *Ps. aeruginosa*; O, *Ps. fluorescens*; P, *Proteus vulgaris*; Q, *M. lysodeikticus*

\* This equals artificial sea water

\*\* See text for details

あった。E. V. —5などは前2者の中間的無機塩要求性を有し、NaClを要求するような傾向が見られた。

次に、規制した有機物希薄培地を用いこれに各種濃度の塩類を加えて供試菌の耐塩性を調べた結果を Fig. 3 に図示した。Fig. 3 の横軸は0 (純水) を境にし、左側の目盛は各種濃度のNaCl 溶液で作成した培地の NaCl 濃度を示すものであり、右側の目盛は、海棲細菌の中には無機塩として NaCl のみの添加では発育し得ない菌が多いことがわかったので、人工海水組成を基礎に更に NaCl を附加して調整した高張液で作った培地の含有 NaCl 濃度で表現したものである。なおこの3%濃度が丁度人工海水そのままの組成に相当し、3%以下は人工海水をそのまま希釈して、その希釈液の NaCl 濃度で表わした。これら各種塩類濃度の培地に菌を接種し、25°C で10日間培養後、各菌の夫々の培地における発育度から耐塩曲線を描き Fig. 3 の Part 1—3 に分けて図示した。Fig. 3, Part 1 に示すごとく、多くの海棲細菌は無機塩として NaCl のみの存在では NaCl 高濃度においても発育出来ず、NaCl 以外に K, Mg, Ca 塩の存在において発育し、この条件でおよそ NaCl 12%までは発育を明らかに観察出来たが、15%では発育しないか或は極く貧弱な発育を示す程度の耐塩性であった。最適 NaCl 濃度は少くとも3%以上で多くは5—7%にあった。また0.5%では発育度は減少し、0%では全く発育出来なかつた。即ち Part 1 に挙げられている菌は好塩的で同時に海水無機塩要求性が厳しい菌群である。海棲細菌のうちでも1179—2, 1001—7, 1007—1, 1064—2等また E. V. —5, *V. metschnikovii* は Fig. 3, Part 2 の如き耐塩曲線を示し、いずれも NaCl 0%では発育し得ないが、この菌群は NaCl 以外に K, Mg, Ca 塩を含む培地には勿論、NaCl のみを加えた培地でも発育することが出来た。しかし NaCl のみの場合よりも K, Mg, Ca 塩を含む培地の方が各塩濃度における発育度及び耐塩性がかなり高かつた。この菌群では菌株によって耐塩性の変動が大きく、また1179—2, 1007—1 菌にみられるように K, Mg, Ca 塩を含む場合 NaCl 0.5%から発育を示すが、同一菌株でも NaCl のみ加えた培地で培養された場合1%, 或いは3%以上から発育するという異った好塩態度を示すものもあつた。このことは NaCl と K, Mg, Ca 塩の相剰作用或いは補償作用を考究するうえの示唆となり得るものと考えられる。この菌群は最適塩濃度3—5%であり、好塩的であるが海水無機塩要求性は弱かつた。Fig. 3, Part 3 にみられるように陸棲細菌すべては NaCl 0%でも発育し、大体 NaCl 0.5%附近で最高の発育を示すものが多く、各塩濃度での発育度及び耐塩性は、K, Mg, Ca 塩存在でやや高くなるが Part 2 の菌群のように顕著ではなかつた。耐塩度は、NaCl 5%まで発育を示し7%で発育を停止する程度であつた。

これら耐塩性を液体培地中での発育度(濁度)からばかりでなく更に細胞形態の変化を比較観察した。ここに海水無機塩を含む各 NaCl 濃度の培地に発育した菌について観察した結果の一部を Plate 1 に示した。これによると海棲細菌1055—1 菌は NaCl 7%までは正常形態を示すが10%以上では菌形が伸張した。E. V. —5 は NaCl 5%位から菌形は変り、7%では細胞は伸張、膨大し、1055—1 菌に比しかなり変形がみられた。*E. coli* では NaCl 3%ですでに正常形態が失われ、5%で伸張、膨大、7%で極端に延長して糸状となり明らかに畸形を呈していた。

以上種々行なつた実験結果から、さきに規制した有機物希薄培地に各種の塩類を添加した(a), (b), (c), (d), (e)の5つの所定培地に供試菌を接種、25°C 6日間培養し、その発育態度を

考察することにより、供試菌が好塩性でしかも海水無機塩要求性の厳しい菌であるか、または好塩性のみで海水無機塩 K, Mg, Ca 塩を殊更要求しない菌であるか、或は陸棲細菌のように塩類要求性が極く弱い菌であることを判別することが出来、更に供試菌夫々の耐塩性を加味することにより海水中の固有細菌である海洋細菌と他の細菌とを識別し得る可能性を裏付けする結果が得られた。

#### 4. 所定培地での発育態度に対する培養温度の影響

供試海棲細菌及び陸棲細菌は各々発育最適温度を異にするところから、5種の所定培地における発育挙動も培養温度によって変ることが予測されるので、各種培養温度での発育挙動

Table 6. Amounts of growth of bacteria in several types of media during 6 days incubation at various temperatures (Growth:  $-\text{Log } T \times 100$ ).

Temp. °C	Types of media**	Strains*														
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
37	(a)	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	10	0	11	6
	(b)	0	0	0	0	0	0	0	0	16	12	0	10	0	5	22
	(c)	0	0	0	0	0	0	0	14	17	7	0	7	4	0	7
	(d)	0	0	0	0	0	0	0	24	13	18	11	11	4	11	35
	(e)	0	0	0	15	0	10	2	32	19	0	0	8	6	8	15
30	(a)	0	0	0	0	0	0	0	0	25	18	12	15	0	17	1
	(b)	0	0	0	0	0	0	0	26	18	18	14	19	15	16	17
	(c)	0	3	0	0	0	19	0	30	32	17	0	10	14	8	2
	(d)	0	12	1	20	0	24	11	30	11	31	22	20	22	14	45
	(e)	24	14	34	12	38	42	17	45	30	22	8	14	19	20	35
25	(a)	0	0	0	0	0	0	0	0	21	15	10	14	0	12	3
	(b)	0	0	0	0	0	0	0	22	20	18	11	14	15	9	5
	(c)	0	3	0	2	0	7	0	23	15	15	0	22	16	7	0
	(d)	9	15	15	35	30	30	18	27	31	22	19	22	15	6	12
	(e)	24	17	16	16	38	45	19	46	30	14	10	15	15	14	12
20	(a)	0	0	0	0	0	0	0	0	32	19	15	21	0	15	19
	(b)	0	0	0	0	0	6	0	31	13	25	18	17	16	13	7
	(c)	0	13	0	0	0	8	0	30	38	19	0	13	22	10	0
	(d)	22	17	42	23	43	41	5	32	23	51	23	22	15	20	29
	(e)	23	22	36	25	27	41	28	45	38	17	13	15	23	10	22
15	(a)	0	0	0	0	0	0	0	0	15	12	9	12	0	4	0
	(b)	0	0	0	0	0	0	5	0	15	10	26	15	14	6	0
	(c)	0	11	0	0	0	10	6	15	16	17	2	4	7	2	0
	(d)	17	21	31	13	34	23	10	20	21	19	18	20	17	12	7
	(e)	28	22	38	9	48	33	8	28	13	6	8	18	15	3	5
6	(a)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	(b)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
	(c)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(d)	0	3	9	0	5	3	0	1	0	2	0	0	0	2	1
	(e)	3	12	42	1	27	6	0	2	0	1	0	0	0	2	1

\* Tested strains: A, 1055—2; B, 1007—1; C, 1055—1; D, 1064—2; E, 1197—4; F, 1179—2; G, 1028—4; H, E. V.—5; I, *Ps. aeruginosa*; J, *Ps. fluorescens*; K, *Proteus vulgaris*; L, *E. coli*; M, *V. metschnikovii*; N, *Bac. subtilis*; O, *M. lysodeikticus*.

\*\* All types media (pH 7.6) contain 0.5g of peptone and 0.1g of yeast extract in 1 l solvent. (a), pure water; (b), 0.5% NaCl solution; (c), 3% NaCl solution; (d), artificial sea water diluted 6 fold; (e), artificial sea water.

を比較検討した。この種実験の実施にあたっては既報<sup>20)</sup>の知見に基づき培養温度の厳正を期した。その実験結果は Table 6 に示す如くであった。ここにおいても5種の所定培地に対する発育態度は前項までの実験結果と同様に陸棲細菌は全培地に発育し、海棲細菌は人工海水を含む(d)培地と(e)培地にのみ発育する菌が多い。(d)培地と(e)培地における各種培養温度での発育度を考えるとき、培地中塩濃度が単に浸透圧調節ばかりに関与しているものであれば、Van't Hoff の式  $P = nRT$  [ただし、 $P$  は浸透圧、 $n$  はモル濃度、 $R$  は0.082 (気圧/絶対温度)、 $T$  は絶対温度とする] より一定濃度の溶液の浸透圧効果は温度に比例して強くなるはずであるから、少なくともこの実験条件の塩濃度及び温度変化の範囲においては(d)培地と(e)培地とでの培養温度変化に伴う発育度の変化は両者平行する筈である。しかし実際においては(e)培地での培養が広範囲の培養温度でよく発育するに対し、(d)培地には培養温度が最適温度より上下に若干移動することにより著しく発育度は減少し、(e)培地で37°C で発育する菌も(d)培地には発育し得ないものが多かった。この傾向は特に E. V. -5 の (b)培地と(c)培地との発育態度において著明に現われている。このことは培地に添加された塩類が3%というかなり高い濃度であっても単に浸透圧調節ばかりでなく他に栄養的意義、外境の変化に対する細胞構造の保護等複雑な機能に関与していることを推察し得る結果であった。次に各供試菌の最適温度は、本実験の如く一週間培養後の菌の成育量からみればやや低い温度の方に最適温度があり、海棲細菌では20~25°C において収量多い結果が得られた。陸棲細菌も20°C から30°C の間では成育量に大差なく、海棲細菌と一律に25°C 培養でも不都合なく両者を比較検査出来ることが明らかにされた。

## 5. 海洋細菌と陸棲細菌との鑑別法

海水中に存在する細菌の数及び種類は沿岸からの距離、海域の状態等により相当異り、また海水中にも陸上からの流入や空中から落下した一過性の菌をまかなり含んでいることが推察される。従って海水から分離した菌が直ちに海水固有の海洋細菌であると考えすることは早計であろう。そこで前項までの耐塩性及び海水無機塩要求性にに基づき海水中の混入陸棲細菌と海洋細菌との菌数を算別する方法を検索した。その予備実験として純水、人工海水、7% NaCl 含有人工海水に夫々ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.1%、寒天1.5%を溶解して作成した寒天培地 (pH 7.6) の平板に供試菌を画線培養し、25°C、7日間培養後その発育程度を観察したところ、Table 7 の如き結果が得られた。この結果では、純水培地に陸棲細菌は充分発育するが、海棲細菌は殆んど菌株が発育しない。一方人工海水培地では陸棲細菌も海棲細菌も共によい発育を示した。7% NaCl 含有人工海水培地では海棲細菌が良好に発育し、陸棲細菌は発育し得ない。好塩菌の E. V. -5 は海棲細菌に近い発育態度を示し、*V. metschnikovii* は人工海水培地にのみ発育し他の2つの培地には発育し得なかった。この結果から推して、海水から細菌を分離培養する場合、前記3種の寒天培地で平行して行なうことにより、純水培地に発育する集落数は陸棲細菌数を、7% NaCl 加人工海水培地に発育する集落数は海洋細菌と好塩菌数を、人工海水培地では陸棲、海洋両細菌とその中間型をも含む総菌数を夫々表わすものとする。従ってこの操作により、少なくとも海水中に混在する陸棲細菌の割合を推測し得る。

Table 7. Growth of marine and terrestrial bacteria on several types of agar media, at 25°C. for 7 days.

Types of agar media Tested strains	5g of peptone, 1g of yeast extract and 15g of agar per liter		
	Pure water	A. S. W.	A. S. W. (plus NaCl to 7%)
1001—7	—	++	++
1007—1	—	++	++
1028—4	±	++	++
1040—1	—	+++	+++
1055—1	—	+++	+++
1055—2	—	++	++
1064—2	—	++	+
1142—1	—	++	++
1179—2	±	++	++
1197—4	—	+++	+++
1242—3	—	++	+
<i>Photobacterium</i> sp.	—	+	—
E. V.—5	—	++	++
<i>V. metschnikovii</i>	—	+	—
<i>Ps. aeruginosa</i>	+++	+	—
<i>Ps. fluorescens</i>	+++	+	—
<i>Proteus vulgaris</i>	+++	+	—
<i>E. coli</i>	+++	+	±
<i>Bac. subtilis</i>	+++	+	±
<i>M. lysodeikticus</i>	+++	+	±

Signs (—, ±, +, ++, +++) represent degree of growth

## 考 察

細菌の無機塩要求性の検査にあたり實際上最も困惑する点は培地材料の有機栄養素材中に未知量の無機塩が夾雑することである。Table 2において陸棲細菌がポリペプトン、酵母エキスを純水に溶かして作成した培地に充分発育したことは、ポリペプトン、酵母エキス中にその細菌の発育に必要な量のミネラルを含有していることを示唆している。そこでポリペプトン、酵母エキス中にどの程度の無機塩を含むかが問題になって来るわけで、Table 3にその定量結果を示した。その含量の多寡はさておき細菌の無機塩要求性を検討する場合、まず培地に添加する有機物素材を予め無機塩を含まない状態にし、これに所定組成の各種無機塩を添加することにより、培地中の微量塩類を含めたすべての無機塩量を、目的に応じ自由にしかも完全に規制し得ることが望ましい。実際 SHANKAR・BARD (1952)<sup>21)</sup>、MACLEOD・ONOFREY (1956, 1957)<sup>22), 23)</sup>及び畑(1960)<sup>5)</sup>らは細菌の無機塩要求の研究において、培地に加える有機物素材に脱塩処理を施して無機塩不含にしたものを使用している。例えば畑(1960)はカチオン交換樹脂“Permutit H-70”及びアニオン交換樹脂“Permutit A”を用いて脱塩したペプトンを供試している。しかし氏の報告にも言及しているように Fe<sup>++</sup> や PO<sub>4</sub><sup>---</sup>の完全除去は不能であった。また市販の無機塩試薬中にも微量ながら各種の他の無塩が夾雑す

ることが普通とされている。一方細菌の発育に必要な無機塩の分量は  $10^{-6}$  mol 以下のことが多い<sup>24)</sup>。従って細菌の無機塩要求量以下にすべての塩類を除くことは至極困難な問題である。本実験の目的は海洋細菌と陸棲細菌との無機塩要求度の差を見出すにあるので、供試菌の絶対的な各種無機塩要求量を知るには及ばず、最大公約数的な無機塩要求度以上の特異な無機塩要求性について検索し相対的見掛上の比較を行うこととし、その方向に実験を進めた。また要求度は各種無機塩培地での発育初速度の優劣によらず、一週間培養により菌が発育するか否か、また発育した場合には菌収量の多寡によって比較した。

本実験においては培地の有機物素材に夾雑する無機塩の影響をなるべく削減するために有機物希薄培地、即ちポリペプトン0.05%、酵母エキス0.01%を純水に溶解した培地を基礎培地とし、これに種々塩類を加えて細菌の無機塩要求性を比較検討した。この有機物希薄培地は菌が発育するに十分な有機物を含有し、更にその有機物に夾雑する無機塩として培地1ℓ当たり  $\text{Na}^+$  14.7mg,  $\text{K}^+$  5.3mg,  $\text{Mg}^{++}$  0.41mg,  $\text{Ca}^{++}$  0.048mg と外に痕跡の各種無機塩を含むことが察せられる。先づこの有機物希薄な基礎培地で供試菌を培養し、発育の可否によって菌を大別した。即ちこの基礎培地に発育し得るものは陸棲細菌（標準菌株）のすべてと、魚体表細菌、海棲細菌の一部であり、この基礎培地に良好な発育を示す菌は必定無機塩要求度の弱い菌であることから陸上固有の菌であろうと考え、陸棲型菌と仮称した。魚体表細菌、海棲細菌中にもこの型の菌が見出されるのは陸棲型菌が海水に混入して一過性の棲息をしているものであろうことが推測し得る。基礎培地に発育し得なかった菌は更に基礎培地に0.5% NaCl, 3% NaClになる如く夫々所定量のNaClを添加したものと及び $\frac{1}{6}$ 濃度人工海水や人工海水により作成した夫々の培地における発育態度を調べた。0.5% NaCl, 3% NaClの培地に発育し得る菌は無機塩としてNaClのみを要求するものであり、0.5% NaClに発育せず、3% NaClに発育するのはNaCl要求量の差である。これらを好塩型菌とした。また発育にNaCl以外に海水無機成分の主要成分であるK, Mg, Ca塩を海水の組成と同じ程度の量の附加を必要とし、海水無機塩要求度のきびしい菌即ち海水固有の菌と思われるものを海洋型菌とした。このように供試菌を好塩性及び海水無機塩要求性から3つに群別した。なお全供試海棲細菌の群別と各群の分布と割合については後報で詳述する。

従来海洋細菌と陸棲細菌とを判別するには好塩性、耐塩性を目安とする場合が多い。しかし好塩性、耐塩性が元来NaCl濃度に対しての意味であるならば、海棲細菌にはNaClのみの添加では発育し得ない菌株が多いことから検出出来ないことになる。もともと細菌の好塩性、耐塩性はかなり不安定な性状で、培養条件例えば他の塩類K, Mg, Ca塩の存否や培養温度等で変動したり、累代培養でそれら性状を増減することも知られている。故に海洋細菌と陸棲細菌との分別の指標とするには適当ではない。その点、ここに云う海水無機塩要求性はかなり固定した性状であり、塩濃度逡減培地に10回以上の継代培養をしても海水無機塩要求性は低下しなかった。以上の理由から海洋細菌と陸棲細菌とを区別するためには供試菌の海水無機塩要求性を前記の術式に従って検査し、その成績から判定した方がより簡便にして且つ有効な手段であると信ずる。

別に、海水は通常有機栄養源が希薄であるので、海洋細菌がそのことによって特徴づけられ陸棲細菌に比し栄養希薄な培地に優勢に発育可能ではないかと考えたが、Fig. 2の結果からもわかるように、そのことについては若干の差が見られるだけで、海洋細菌と陸棲細菌

との区別の指標とする程特徴的でなかった。むしろ発育温度において、海洋細菌の多くが 37°C で発育し得ないことの方が陸棲細菌に比しての特徴となり得る。

好塩型菌は好塩性、耐塩性等については海洋型菌に類似するが、海洋型菌との相違は K, Mg, Ca 塩を要求しない点である。この好塩型菌を海洋固有の菌と考え得るか否かについては論議の余地があると思うが、後報する如く、好塩型菌の NaCl 要求は多分に滲透圧調節的な要素が見出される。これらのことから好塩型菌は陸棲型菌と海洋型菌との中間的な無機塩要求性を示すが、どちらかと云えば陸棲型菌に近い傾向がしばしば見られた。

海水中には海洋型菌、好塩型菌は勿論、陸棲型菌も見出すことが出来るが、これはいわゆる一過性の混入菌を含むためであろう。しかしてこれら 3 型菌のうち海洋型菌が海水固有の細菌、いわゆるほんとの意味の“海洋細菌”に相当するのではないかと考えている。

## 要 約

海棲細菌 100 株にその対照菌として魚体表細菌 13 株、病原性好塩菌とその類似菌 14 株、陸棲細菌 (標準菌株) 37 株を加えた計 164 株を供試菌として、それらの好塩性、耐塩性、海水無機塩要求性を比較検討し次の知見を得た。

1. 各種細菌の無機塩要求性はポリペプトン 0.5g, 酵母エキス 0.1g を純水 1ℓ に溶解して作成した有機物希薄な基礎培地 (pH 7.6) を使って比較することにより充分その差異を観察し得た (Fig. 2 及び Table 3, 4 参照)。

2. 海洋細菌は海水無機塩を附加した基礎培地において NaCl 濃度 0.5~12% で発育することが出来、その発育至適 NaCl 濃度は 5~7% であった。海水無機塩を加えぬ基礎培地には発育し得なかった。一方陸棲細菌は無機塩を加えない基礎培地にも発育し得て、その発育至適 NaCl 濃度は 0.5% であり、NaCl 濃度 5% まで発育するが、7% では全く発育出来ぬ程度の耐塩性であった (Fig. 3 参照)。

3. 海洋細菌の発育には基礎培地に海水無機塩である Na, K, Mg, Ca 塩の添加を必要とするが、陸棲細菌の発育にはその必要がなかった。病原性好塩菌は NaCl を必要とした (Fig. 1 及び Table 5 参照)。

4. 供試菌を基礎培地(a)及びそれに 0.5% NaCl (b), 3% NaCl (c), 1/6 濃度人工海水(d), 人工海水(e)の夫々を附加した 5 種の所定培地で 25°C, 6 日間培養し、その発育態度より(a), (b), (c)培地に発育せず、(d), (e)培地に発育する菌を海洋型、(a)培地に発育せず、他の 4 つの培地に発育する菌を好塩型、5 種の所定培地全部に発育出来る菌を陸棲型 (仮称) とに群別し得る可能性を認めた (Table 5, 6 参照)。

5. 海洋型菌、好塩型菌は勿論、陸棲型菌の多くも海水中に見出すことが出来るが、これら 3 型菌のうち海洋型菌が海水固有の細菌、いわゆる真の“海洋細菌”であろうと推測した。

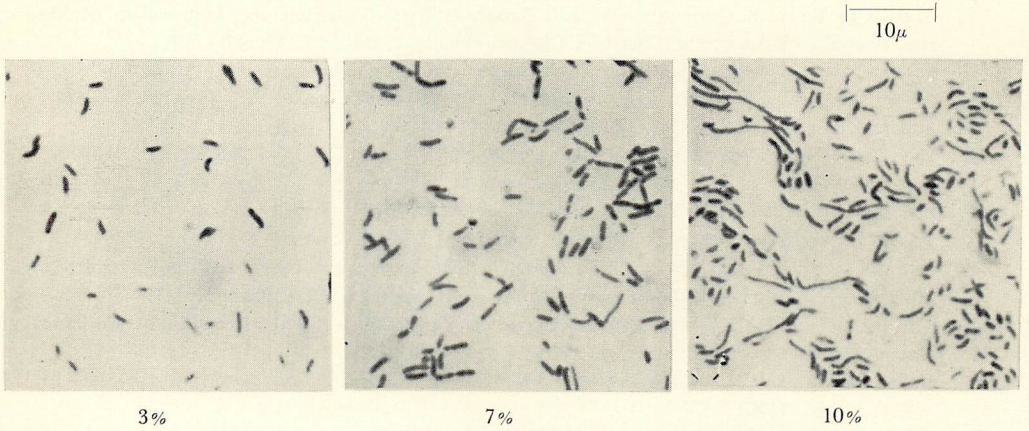
本報告は昭和 37 年度内地研究員として、北海道大学水産学部微生物学研究室で行った研究成果の一部である。本研究を行うに当って貴重な菌株の分与並びに終始御懇切な御指導を賜わった北海道大学水産学部教授坂井稔博士をはじめ、研究の実施、結果に対し御便宜、御討議頂きました木村喬久、信濃晴雄両氏に対し深甚の謝意を表す。また本報をまとめるに当り多大の御配慮、御後援を賜わった本学部柿本大岩教授に深謝する。



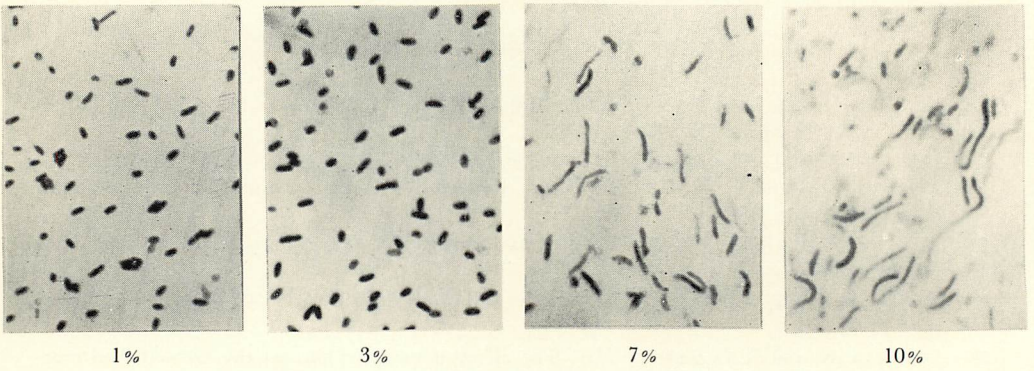
## 文 献

- 1) ZoBELL, C. E. (1946): "Marine Microbiology", (Chronica Botanica Co., Waltham, U. S. A.).
- 2) MACLEOD, R. A., E. ONOFREY and M. E. NORRIS (1954): Nutrition and Metabolism of Marine Bacteria—I. Survey of Nutritional Requirements, *J. Bacteriol.*, **68**, 680—686.
- 3) KRIS, A. E., I. E. MISHUSTINA and E. V. ZEMTSOVA (1962): Biochemical Activity of Microorganisms Isolated from Various Regions of the World Ocean, *J. gen. Microbiol.*, **29**, 221—232.
- 4) KRIS, A. E.; 飯塚広・山田豊一共訳 (1963): "海洋微生物学", (技報堂, 東京, 日本).
- 5) 畑 幸彦 (1960): 海洋性硫酸塩還元細菌の無機塩要求性について, 農水講研報, **9**, 347—362.
- 6) 木村喬久 (1961): 海水より分離した寒天分解菌について, 北大水産学部研究彙報, **12**, 33—40.
- 7) KADOTA, H. (1956): A Study on the Marine Aerobic Cellulose-decomposing Bacteria. *Memoirs of the College of Agriculture, Kyoto University*, No. 74, 1—128.
- 8) SEKI, H. and N. TAGA (1963): Microbiological Studies on the Decomposition of chitin in Marine Environment—I, II. *J. Oceanograph. Society of Japan*, **19**, 101—108, 109—111.
- 9) MORITA, R. and C. E. ZOBELL (1955): Occurrence of Bacteria in Pelagic Sediments Collected During the Mid-Pacific Expedition. *Deep-Sea Res.*, **3**, 66—73.
- 10) 日本化学会編 (1958): "実験化学講座", **14**, 地球化学, 156—157, **15**, 分析化学 (上), 9—24, (丸善, 東京, 日本).
- 11) 上野景平 (1959): EDTA の使い方. 分析化学, **8**, 207—214.
- 12) 小松節子 (1958): "化学の領域", 増刊33. 生化学領域における光電比色法, 各論1, 8—13.
- 13) 山田猛・降矢震 (1958): "化学の領域", 増刊33. 生化学領域における光電比色法, 各論1, 1—3.
- 14) 栗飯原景高 (1961): 標準寒天平板培養法とその背景にあるもの. メディアサークル, No. 23, 8—16.
- 15) ——— (1963): 食品の細菌学的検査法で使用する培地の基準について. モダンメディア, **9**, 323—331.
- 16) 岡本季彦・竹森栄子・水野伝一 (1960): 細菌の栄養に関する研究—12. ペプトンの再検討, その3, 日本細菌学雑誌, **15**, 1184—1188.
- 17) 植村定治郎・福見秀雄・柳田友道 (1960): "微生物生理学", 146, (朝倉, 東京, 日本).
- 18) ZoBELL, C. E. and C. W. GRANT (1942): Bacterial Activity in Dilute Nutrient solutions. *Science*, **96**, (2486), 189.
- 19) HARVEY, H. W. (1957): "The Chemistry and Fertility of Sea Waters", 6, (Cambridge University Press).
- 20) KLINGE, K. (1960): Differential Techniques and Methods of Isolation of *Pseudomonas*. *J. appl. Bact.* **23**, (3), 451.
- 21) SHANKAR, K. and R. C. BARD (1952): The effect of metallic ions on the Growth and morphology of *Clostridium Perfringens*. *J. Bacteriol.*, **63**, 275—290.
- 22) MACLEOD, R. A. and E. ONOFREY (1956): Nutrition and Metabolism of Marine Bacteria—II, Observation on the Relation of Sea water to the Growth of Marine Bacteria. *J. Bacteriol.*, **71**, 661—667.
- 23) ——— (1957): ——— IV, Quantitative Requirements for Halides, Magnesium, Calcium and Iron. *Can. J. Microbiol.*, **3**, 753—759.
- 24) LAMANNA, G. and M. F. MALLETT (1953): "Basic Bacteriology", 321, (The Williams and Wilkins Co., Baltimore).

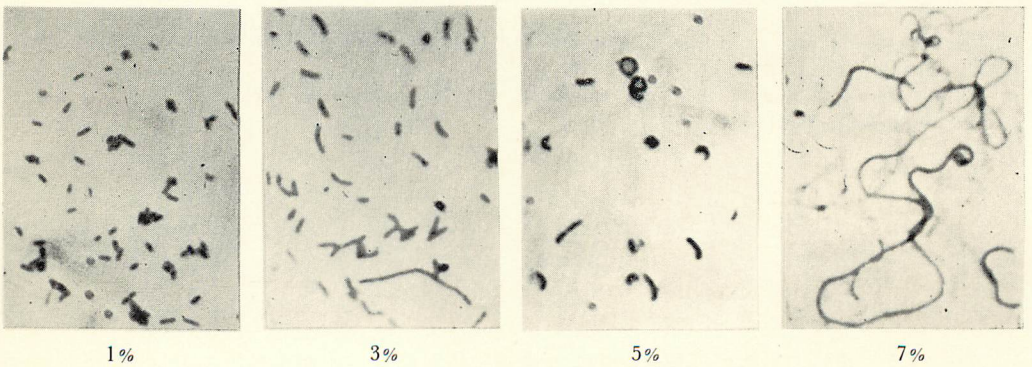
Plate 1  
Effect of salt concentration on the morphology of bacteria



Marine bacterium 1055-1



*Vibrio parahaemolyticus* (0-5)



*Escherichia coli*