海洋性硫酸塩還元細菌に関する研究—V. 海洋性硫酸塩還元細菌の栄養について (その2)

木 俣 正 夫・門 田 元・畑 幸 彦

(京都大学農学部水産微生物学研究室)

Studies on the Marine Sulfate-reducing Bacteria—V.

Nutritional Requirements of Marine Sulfate-reducing Bacteria (2)

Masao KIMATA, Hajime KADOTA, and Yoshihiko HATA

We have previously shown that the marine sulfate-reducing bacteria required extraordinarily higher concentrations in the carbon (energy) source than in the nitrogen source for their growth.

The present study is concerned with the energy sources which are required for the growth of these bacteria.

1) As given in Fig. 1, the activity of these bacteria growing in the medium which was deficient in the energy source was vigorously accelerated by the addition of Ca-lactate (1 g./L.).

2) As shown in Table 1, in the case of the pure culture, the marine sulfate-reducing bacteria could not utilize all of the organic compounds tested (excepting lactate, pyruvate, glycerol, DL-alanine, and formate), as the energy sources for their growth, and in the case of the crude culture, however, these organisms could utilize most kinds of the organic compounds. In the latter case, it is considered that, by the action of coexistent bacteria, a large variety of organic compounds tested were partially transformed into the matters having the chemical natures which could be utilized by the marine sulfate-reducing bacteria.

3) As shown in Table 2, these bacteria could develop by obtaining their energy requirements from the oxidation of molecular hydrogen.

第IV報¹⁾で明かにされた如く、海洋性硫酸塩還元細菌が発育するためには、培地中の窒素源は極く低濃度で足りるが、エネルギー源(炭素源)は窒素源に比して極めて高濃度に存在することが必要である。従つて、海底泥土中におけるこの細菌の発育乃至は硫酸塩還元 activity は、其処に存在する有機化合物、特に窒素源としてではなくエネルギー源として利用され得る有機化合物の種類及び濃度によつて支配されるものと考えられる。

本報では、この細菌にエネルギー源として利用される化合物の種類について検討を加え、併せて硫酸塩還元作用との関係を考察した。

Medium 4: Basal medium employed for the experiments concerning the energy source of marine sulfate-reducing bacteria.

実 験		
(1) 海洋性硫酸塩還元細菌の硫化物生産過程に及ぼすエネルギー源添加の影響	Peptone	0.3 g.
Medium 4 の組成を有するエネルギー源欠乏の semi-solid 培地に、Medium 1 ²⁾ で3日間 30°C で前培養した硫酸塩還元細菌の純粋培養を 1 cc/L 宛接種して 30°C で培養し、この培	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2
	K ₂ HPO ₄	0.2
	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.2
	L-Ascorbic acid	0.1
	Agar	3.0
	Filtered sea water	1,000 cc.
	pH	7.5

養にエネルギー源として Ca-lactate を随時 1 g/L の割合で添加し、更に 30°C 又は 18°C で培養を続け、生産される硫化物を定量して硫化物生成過程に及ぼすエネルギー源添加の影響を検討した。その結果は Fig. 1 に示す通りである。

Fig. 1. Effect of the addition of Ca-lactate on the development of sulfides by marine sulfate-reducing bacteria (Basal medium: Medium 4).

—○—○—: Ca-lactate was added to the medium before inoculation (Control); —●—●—: Ca-lactate was added to the culture after 30 hours' pre-incubation (Temperature of after-incubation: 30°C); —▲—▲—: Ca-lactate was added after 48 hours' pre-incubation (Temperature of after-incubation: 30°C); —△—△—: Ca-lactate was added after 30 hours' pre-incubation (Temperature of after-incubation: 18°C); —□—□—: No energy source was added to the culture during incubation.

から明かであるが、更に他の化合物についてこの点を確かめるため、次の実験を行った。

実験(1)と同様に Medium 4 の組成を有するエネルギー源欠乏の semi-solid 培地を基礎培地とし、これに各種有機化合物をエネルギー源として 1 g/L 宛添加した培地を作り、これらの各々に硫酸塩還元細菌の純粋培養又は粗培養を少量宛 (Medium 1 で 3 日間 30°C で前培養したものを 1 cc/L 宛) 接種して 30°C で培養し、生成される硫化物を定量した。その結果は Table 1 及び Fig. 2 に示す通りである。

Table 1 から明かなように、純粋培養の場合には lactate, glycerol, pyruvate, DL-alanine 及び formate を加えたものは多量の硫化物を生産したが、これら以外の化合物を加えたものは何れも無添加 (対照区) のものと同様に微量の硫化物を生成したに過ぎなかった。即ち、この細菌は単独では供試化合物のうち lactate, glycerol, pyruvate, DL-alanine 及び formate 以外のものを直接にはエネルギー源として利用し得ないことが明かになった。

一方、粗培養の場合には fructose 及び rhamnose を除き、他の化合物を加えたものではすべて顕著な硫化物の生成が認められた。即ち、この細菌は他の細菌と共存する場合には、供試化合物の殆んどすべてをエネルギー源として利用し得ることが確認された。

又、以上の実験とは別に、繊維素のみをエネルギー源とする合成培地³⁾に硫酸塩還元細菌の純粋培養を接種し、30°C で培養を試みた結果では、硫化物の生成は全く認められなかったが、これに海洋性繊維素分解細菌である *Vibrio purpureus*³⁾ 又は *Cytophaga halojia*⁴⁾ を同時に接種して同様に培養すると、顕著な硫化物の生成が認められ、繊維素も間接的にはエネルギー源として利用され得ることが観察された。

即ち、最初からエネルギー源として Ca-lactate を高濃度を含む対照区では、培養開始後間もなく硫化物の生成が始まったが、Ca-lactate 欠除のものでは定量し得る量の硫化物は生成されなかった。しかし、培養開始後 30 時間目及び 48 時間目に、この Ca-lactate 欠除の培養に 1 g/L の割合で Ca-lactate を添加し、更に 30°C で培養を続けると、いずれの場合にも Ca-lactate の添加後直ちに急激な硫化物の生成が開始された。又、培養開始後 30 時間目に同濃度に Ca-lactate を添加し、その後 18°C で培養した同様の培養においても、その速度はやや小であったが、顕著な硫化物の生成が観察された。

この結果から、窒素源が十分な濃度に存在する場合でも、エネルギー源が不足するときには、この細菌の発育は僅かに行われても硫化物の生成は殆んど行われぬが、これに十分な濃度にエネルギー源を補えば直ちに顕著な硫化物の生成が起ることが明かになった。

(2) 海洋性硫酸塩還元細菌によつてエネルギー源として利用され得る有機化合物について

この細菌に Ca-lactate がエネルギー源として極めてよく利用されることが実験(1)

Table 1. Development of sulfides by marine sulfate-reducing bacteria in the medium containing a different kind of organic compounds as a sole source of energy at 30°C (Basal medium : Medium 4).

Compounds contained	Maximum amount of sulfides produced as mg. H ₂ S per 1 cc. of the culture medium		Compounds contained	Maximum amount of sulfides produced as mg. H ₂ S per 1 cc. of the culture medium	
	Pure culture	Crude culture		Pure culture	Crude culture
None (Control)	±	0.03	Na-butyrate	±	0.06
Xylose	±	0.05	Na-succinate	±	0.08
Arabinose	±	0.07	Ca-lactate	0.21	
Galactose	±	0.10	Na-pyruvate	0.25	
Glucose	±	0.15	Na-malate	±	0.08
Fructose	±	±	Na-tartarate	±	0.06
Lactose	±	0.05	Na-citrate	±	0.07
Trehalose	±	0.07	Ethanol	0	0.08
Cellobiose	±	0.07	Butanol	±	0.18
Maltose	±	0.09	Glycerol	0.20	
Sucrose	±	0.36	Acetone	0	
Rhamnose	±	±	DL-Alanine	0.14	
Mannitol	±	0.07	L-Leucine	±	0.05
Inositol	±	0.27	L-Aspartic acid	0	0.07
Erythritol	±	0.07	L-Asparagine	±	0.07
Dextrin	±	0.09	L-Glutamic acid	±	0.05
Inulin	±	0.07	L-Arginine	±	0.06
Starch	±	0.25	L-Cystine	±	0.16
Glycogen	±	0.06	L-Cysteine	0	0.16
Gluconic acid	±	0.08	L-Phenylalanine	±	0.05
Alginic acid	±	0.03	L-Histidine	±	0.05
Na-formate	0.06		L-Tyrosine	±	0.07
Na-acetate	±	0.07			

N. B. ±.....less than 0.02 mg./cc.

即ち、以上の実験結果から、この細菌が単独でエネルギー源として利用し得る化合物は比較的狭い範囲のものに限られるが、若し他の細菌が共存すればそれらの共存細菌は極めて広範囲に亘る種々の化合物を代謝して、其処に二次的に硫酸塩還元細菌が利用し得るエネルギー源を供給するため、殆んどあらゆる種類の有機化合物は間接的にこの細菌のエネルギー源として利用されるに至るものと考えられる。従つて、上記粗培養実験で利用されなかつた fructose 等少数の化合物も、共存細菌の種類によっては恐らく間接的に硫酸塩還元細菌のエネルギー源となり得るものと考えられる。

(3) 海洋性硫酸塩還元細菌による分子状水素の利用について

或る種の硫酸塩還元細菌が、次式に従つて分子状水素

を利用して硫酸塩を還元することは、STEPHENSON and STICKLAND⁵⁾, WIGHT and STARKLEY⁶⁾, STARKEY and WIGHT⁷⁾, ZOBELL⁸⁾, 及び SISLER and ZOBELL^{9), 10)} らにより報告されており又 STARKEY¹¹⁾ はこの種の細菌にエネルギー

Fig. 2. Development of sulfides by marine sulfate-reducing bacteria in the medium containing various kinds of organic compounds as a sole source of energy at 30°C (Basal medium: Medium 4).

●—●—: Ca-lactate ; --○--○--: Glycerol ;
--▲--▲--: Na-pyruvate ; --△--△--: DL-Alanine ;
--▼--▼--: Na-formate ; --□--□--: None (Control).

ギー源として用いられる各種の有機化合物は、一旦脱水素酵素の作用を受けた後、硫酸塩の還元用に用いられるものであろうと述べている。

著者は、上記の実験に供した海洋性硫酸塩還元細菌も直接分子状水素をエネルギー源として利用し得るのではあるまいかと考え、次に Medium 5 の組成を有するエネルギー源欠乏の培地に、Medium 1²⁾ で 3

Medium 5: Basal medium employed for the experiments concerning the utilization of molecular hydrogen by marine sulfate-reducing bacteria.

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	0.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Na ₂ S·9H ₂ O	0.24
Filtered sea water	1,000 cc.
pH	7.5

は、接種量が 1 白金耳/7 cc のものにおいてのみならず、3～5 白金耳/7 cc のものにおいても発育は認められなかった。

以上の結果から、この細菌は分子状水素をエネルギー源として利用し得るものと考えてもよいであろう。

Table 2. Development of marine sulfate-reducing bacteria in Medium 5 overlaid with hydrogen gas.

Gases overlaid	Amount of inoculant (loops per 7 cc. of medium)		
	1	3	5
Air	—	—	—
H ₂	—	+	+

考 察

実験 (1) の結果から明かなように、この細菌は充分な窒素源の存在の下でもエネルギー源が不足するときは殆んど硫化物の生産を行わないが、これにエネルギー源を高濃度に添加すれば、直ちに極めて顕著な硫酸塩還元作用を現わす。WAKSMAN¹²⁾ らが指摘している通り、一般に正常海域の海底泥土は可利用有機物に乏しい状態にあるものと考えられる。従つて、このような環境へ廃水により高濃度の可利用有機物が供給されると、これをエネルギー源として硫酸塩還元細菌が極めて旺盛な硫酸塩還元作用を現わし、急激な硫化物の生産が行われることが予想される。

この際にエネルギー源として直接利用され得る有機物の種類は、Table 2 に示したように比較的狭い範囲の特殊な化合物に限られ、一般の工場廃水中にこれらの化合物が含まれていることは殆んどあり得ないものと考えられるが、海洋中には殆んどあらゆる種類の有機化合物を代謝する微生物が存在するから、廃水中に含まれている大部分の有機物は一旦他の微生物によつて部分的な分解を受けた後、間接的に硫酸塩還元細菌にエネルギー源として利用され得るものと考えられる。

又、この細菌は分子状水素をエネルギー源として利用し得ること (実験 (3)) から、この細菌の純粋培養が lactate, glycerol, pyruvate, DL-alanine 及び formate 以外の供試有機化合物をエネルギー源として利用し得なかつたのは、この細菌がこれら以外の有機化合物に対する脱水素酵素を欠陥していたためであると考えられ、一方、粗培養が極めて多種類の有機化合物をエネルギー源として利用し得たのは、共存細菌が広範囲に亘る有機化合物を脱水素し得たことにもよるものと思われる。従つて、海底泥土中に存在する各種の細菌により脱水素され得るあらゆる有機化合物は、泥土中における硫酸塩還元細菌のエネルギー源となり得るものと考えられる。

摘 要

1. エネルギー源欠乏の培地に接種培養された海洋性硫酸塩還元細菌は、培地に豊富なエネルギー源が添

加されると直ちに急激な硫化物の生産を開始することを観察した。

2. この細菌は単独では peptone, lactate, pyruvate, glycerol, DL-alanine 及び formate のみをエネルギー源として利用し得るに過ぎないが、他の細菌が共存する場合には単糖、二糖、多糖、糖アルコール、アルコール、有機酸、及びアミノ酸等の極めて広範囲に亘る有機化合物をエネルギー源として利用し得ることを明かにした。

3. この細菌は分子状水素を利用して硫酸塩を還元し得ることを明かにした。

本研究費の一部は日本ユネスコ国内委員会の委託研究費によつた。発表を許可せられた同委員会に謝する。

文 献

- 1) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦：本誌，21，229～234 (1955).
- 2) 木俣正夫・門田 元・畑 幸彦・田島卓明：本誌，21，102～108 (1955).
- 3) 門田 元：本誌，16，63-70 (1950).
- 4) 門田 元：本誌，19，476-480 (1953).
- 5) M. STEPHENSON and L. H. STICKLAND： *Biochem. J.*，25，215-220 (1931).
- 6) K. M. WIGHT and R. L. STARKEY： *J. Bact.*，50，238 (1945).
- 7) R. L. STARKEY and K. M. WIGHT：Tech. Rep. Distrib. Comm.，No. 1945, Amer. Gas Ass.，pp. 108 (1945).
- 8) C. E. ZOBELL： *Bull. Amer. Ass. Petrol. Geol.*，31，1709-1751 (1947).
- 9) F. D. SISLER and C. E. ZOBELL： *J. Bact.*，60，747-756 (1950).
- 10) F. D. SISLER and C. E. ZOBELL： *J. Bact.*，62，117-127 (1951).
- 11) R. L. STARKEY： *Arch. Mikrobiol.*，9，268-304 (1938).
- 12) S. A. WAKSMAN： *Soil Sci.*，36，125-147 (1933).

○訂 正

第 21 卷・第 2 号，木俣・門田・畑・田島・海洋性硫酸塩還元細菌に関する研究—I.

頁	行	誤	正
104	Talle 1,	Loss on ignition Station 1	11. 68 11. 86
107	32	発 長	発 表

第 21 卷・第 2 号，木俣・門田・畑・田島・海洋性硫酸塩還元細菌に関する研究—II.

頁	
111	Fig. 2 の図と Fig. 3 の図とを入れ替える。