海洋性硝酸化成細菌に関する研究—I.

培養法ならびに分布について (予報)

木俣正夫・河合 章・吉田陽一

(1961年2月28日受理)

STUDIES ON MARINE NITRIFYING BACTERIA (NITRITE FORMERS AND NITRATE FORMERS)—I.
ON THE METHOD OF CULTIVATION AND ON THE DISTRIBUTION (PRELIMINARY REPORT)

Masao KIMATA, Akira KAWAI and Yoichi YOSHIDA*

Preliminary studies were made on the method of cultivation for marine nitrifying bacteria and on the distribution of them.

A. Some results on the methods of cultivation were obtained, as follows;

1. Marine nitrifying bacteria don't grow in the ordinary media for soil ones, and grow hardly even in the media prepared by using sea water instead of fresh water.

2. Marine nitrifying bacteria grow well in the medium prepared as follows: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 30 mg (for nitrite formers) or KNO_3 ; 30 mg (for nitrate formers), KH_2PO_4 ; 2 mg, and chelated iron (EDTA-Fe); 0.2 mg are added to 1 liter of sea water, and this solution is adjusted to pH = 8.4 by the addition of 50% K_2CO_3 , and then autoclaved. This medium is very low in the concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or KNO_3 , comparing with the media for nitrifying bacteria of soil, that is, the concentration of the former is about 1/100 of that of the latter.

3. Further marine nitrifying bacteria grow very well, when small amounts of sand are added into the above mentioned media.

B. Researches on the distribution were made by using of the method of cultivation as described above, and some results were obtained, as follows:

1. In the sea water in nature, there are very few nitrite formers and nitrate ones, i. e. both of them are similarly fewer than 0.3 cell/ml. In the sea bottom muds, they are the maximum in bacterial counts at the surface layer of the muds, i. e. both of them are similarly $10^3 \sim 10^4$ cells/g, and they decrease with the length distant from the surface layer, i. e. are fewer than 10^2 cells/g at the layer below 15 cm in depth from the surface one.

2. In the breeding sea water in the aquariums of circulating system, nitrite formers and nitrate formers are markedly more than those in the sea water in nature, i. e. both of them are similarly $10^2 \sim 10^3$ cells/ml.

3. In the filter-sand of the aquariums of circulating system, both of nitrite formers and nitrate formers are similarly $10^4 \sim 10^5$ cells/g and these counts are almost unchanged by the length from the surface layer.

アンモニアから亜硝酸、亜硝酸から硝酸を生成する硝酸化成作用は、海洋中の窒素の循環における重要な一環であり、したがって海洋の生産力に密接な関連をもっている。それにもかかわらず、この分野における従来の研究はアンモニウム塩、亜硝酸塩、硝酸塩などの塩類の(量的変化の)定量のみにとどまっており、これらの諸塩類の量的変化に本質的な役割を演じている海洋性硝酸化成細菌に関する研究はほとんど行なわれていない。またこれら細菌の純粋分離や生理生態学的研究はもちろんのこと、このような諸研究を行なう

* 京都大学農学部 (Fac. Agr., Kyoto Univ., Maizuru, Japan).

ために必要な培養法すらも確立されていない。もちろん、このような細菌が海洋中に存在することは当然予想されるところであり、その存在を実証するための研究はすでに古くから行なわれている¹⁾が、培養法が不適当なため、まだ海洋中に常在することを実証するに至っていない。

しかし、土壌中の硝酸化成細菌に関しては農耕上重要であることと関連して比較的研究が多く、培養法、純粋分離法、そのほか生理生態学的研究に関する報告が多くみられる^{2), 3), 4), 5), 6)}。

したがって著者らは海洋性の硝酸化成細菌に関する研究を計画した。この研究をはじめに当たつてもつとも必要なことは培養法の確立である。それゆえ著者らは各種の培養法を考案し、それらを比較検討して本細菌の存在を確認するために好適と考えられる培養法をみい出し得たので、ここに報告する。

実 験

A. 培養基および培養法

1. 予備実験

従来使用されている硝酸化成細菌の培養基はすべて淡水で調製されているから、まず淡水の代わりに海水を用いた同様の培養基をつくり、これに海水、海底の砂や泥などを直接接種して放置し、硝酸化成作用が起るかを多数の試料について観察した。なお亜硝酸の生成は硫酸還元ストリキニン試薬*により、硝酸の生成は G. R. 試薬**により判定した(以下の実験も同じ)。しかし硝酸化成作用の行なわれたものは全然なく、海洋性硝酸化成細菌はこのような方法では発育しがたいことが確認された。

一般に海水中に含まれる諸種の栄養塩類の濃度は土壌に比較すれば極めて稀薄であるから、海洋性硝酸化成細菌が発育するためには、上記の培養基はアンモニウム塩、亜硝酸塩などの諸成分の濃度が高すぎるのではないかと考えられたので、この点を考慮して二・三の予備実験を行なつた。その結果、次の組成を有する培養基一リットル海水 1 l に対し、硫酸アンモニウムまたは亜硝酸カリウム 30 mg, 第一燐酸カリウム 2 mg, chelated iron (EDTA-Fe) 0.2 mg を加え、さらに 50% 炭酸カリウムを加えて pH を 8.4 にし、15 ポンドで滅菌一に試料を接種すれば硝酸化成作用がおこる場合のあることが確認された。

さて、このようにして発育した硝酸化成細菌の培養の一定量を上記培養基で適宜稀釈し、この稀釈したもの一定量を再び同様の培養基に接種して 25°C に放置し、硝酸化成作用がおこるか否かを観察した。その結果、 $10^2 \sim 10^3$ 程度まで稀釈した培養を接種した場合には硝酸化成作用がおこるが、それ以上に稀釈したものを接種した場合にはこの作用がおこらず、硝酸化成細菌が発育したことは認められなかつた。なお硝酸化成作用が現われるまでに要する時間はきわめて長く 1~2 カ月であつた。また培養期間中に通気を行なつても好結果はえられず、むしろ悪影響をおよぼすように思われた。これは恐らく通気による攪拌とアンモニアの揮散が原因ではなかろうか。

2. 培養法

土壌中の硝酸化成細菌の培養には固形物として炭酸カルシウム末を添加する方法も行なわれているので、このような添加物の影響をみるために、上記培養基を試験管 (15×150mm) に 5 ml ずつ分注し、これらの各々に細砂、石英砂、炭酸カルシウム末、雲母片、脱脂綿および濾紙片をそれぞれ約 1g 添加して滅菌したものを用意した。次に硝酸化成細菌の同一培養を順次 10 倍ずつ稀釈した稀釈液を上記の試験管に 1 ml ずつ接種し、培養した。なおこの実験では同一添加物、同一稀釈度のものについて 5 本ずつ試験を行ない、各稀釈度における硝酸化成作用陽性の試験管の数 (5, 4, 3, 2, 1, 0) から大腸菌群の計数に用いられている最確数を求める方法を準用して、結果を表わした。なお培養温度および期間は前記のとおりとした。

結果は Fig. 1 に示すごとく、細砂または石英砂を添加した培養基を用いると原培養中に存在する硝酸化

* この試薬は亜硝酸または硝酸の存在下では赤色を呈するので、培養基中のアンモニアからこれらの物質の生成の有無をこの試薬によつて判定した。

** この試薬は亜硝酸の存在下では赤色を呈し、硝酸の存在には影響されないので通常亜硝酸の検出に用いられている。したがって培養基中の亜硝酸の消失の有無をこの試薬によつて判定した。

成細菌の数は 10^6 cells/ml (1 ml 中の細菌数を cell/ml で表わす) であり、無添加培養基では 10^4 cells/ml である。すなわち、細砂を添加した培養基に接種する細菌数の 100 倍ぐらゐを接種しなければ無添加培養基にはこの細菌が発育しないことになる。一般に添加物の種類によつて異なるが、接種する細菌数がある程度以上存在しなければ発育増殖しないことがわかる。また細砂を添加した培養基を用いても、稀釈度の高い、すなわち接種された細菌数が少ない場合には硝酸化成作用が現われるまでにはかなり長期間を要した。

従来土壌中の硝酸化成細菌の培養には、炭酸カルシウム末のような固形物を培養基に添加すれば細菌がこれに付着し増殖して好結果が得られるという説と、必ずしもこのような物質の添加は必要でないという説とがあるが、海洋性硝酸化成細菌の培養には、この実験から、細砂のような固形物の存在は極めて好適であると思われる。したがつて以下の実験には特記しない限り、培養基には細砂を添加したものを使用した。

Fig. 1. Counts of nitrite formers from the same culture, using the media which are different in respect of added solid substances. A; sand, B; quartz sand, C; mica, D; calcium carbonate, E; filter paper, F; absorbent cotton, G; none.

Fig. 2. Counts of the bacteria from the same culture, using the media which are different in respect of the concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (for nitrite formers) or KNO_3 (for nitrate formers). ●; nitrite formers, ○; nitrate formers.

3. 培養基のアンモニウム塩および亜硝酸塩の濃度

培養基中に存在するアンモニウム塩および亜硝酸塩の濃度が細菌の発育に影響することは前記の予備実験からも明らかであるから、最適濃度を確かめるために次の実験を行なつた。

硫酸アンモニウムもしくは亜硝酸カリウムを種々の濃度に加えた培養基を調製し (その他の諸成分は前記と全く同様)、これらに海洋性硝酸化成細菌の培養稀釈液を接種して比較した。実験方法は前記培養法の場合と同様である。

得られた結果は Fig. 2 のとおりであり、亜硝酸生成細菌では硫酸アンモニウムの濃度が 30 mg/l、硝酸生成細菌では亜硝酸カリウムの濃度が 30 mg/l の場合に最高の計数値が得られ、結局、前記培養法を吟味する場合に用いた培養基の濃度が最適であることが明らかになつた。この培養基の硫酸アンモニウムもしくは亜硝酸カリウムの濃度は従来の土壌中の硝酸化成細菌に用いられているものに比して非常に低く、その 1/100 程度である。

B. 硝酸化成細菌の分布

実験から明らかであるが、前記の最良の培養法でも、この細菌がただ 1 個体接種されたときには発育不可能で、ある一定数以上の個体が接種されたときにはじめて発育増殖して硝酸化成作用が行なわれるのであれば、このある一定数が 1 個体として表現されることになるから、たとえこの方法で試料中に存在する海洋性硝酸化成細菌の数を測定しても、得られた数値は実際に存在した真の細菌数よりも少ないはずである。しかしこの細菌がこのある一定数以上存在する試料については、その分布状態をこの方法で比較することはできる。しかも、このある一定数が将来の研究で明らかになれば、得られた数値を補正することもできるはずである。

さて、この方法で海洋性硝酸化成細菌の分布状態を調べる予備研究として二・三の実験を行なった。

1. 海水中における分布

a. 自然海水：舞鶴湾（1960 年 1 月 27 日）および和歌山県白浜の近畿大学臨海研究所の海水魚養魚場（1960 年 2 月 23 日）における分布状態を調べた結果、海水中に存在する本菌の数は極めて少なく、いずれの調査点でも亜硝酸生成細菌、硝酸生成細菌のいずれも 0.3 cell/ml 以下であり、水平的にも垂直的にも分布状態に差がなく特徴はみいだせなかつた。

b. 水族館の飼育海水：大阪府みさき公園自然水族館の循環式海水魚飼育水槽の海水中に存在する硝酸化成細菌数を測定した（Fig. 3）。大型水槽（水量：200 ton）の海水中には亜硝酸生成細菌 $5 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ 、硝酸生成細菌 $7 \times 10^2 \text{ cells/ml}$ 、小型水槽（水量：40 l）の海水中には亜硝酸生成細菌 $4 \times 10^2 \text{ cells/ml}$ 、硝酸生成細菌 $4 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ 存在することを観察した。大型水槽と小型水槽とにおける差異には大きな意義はないものと考えられるが、循環式飼育水槽の海水中には自然状態の海水に比して極めて多数の硝酸化成細菌が存在することは明らかである。

Fig. 3. Distribution of nitrifying bacteria in the aquariums of circulating system. ■; nitrite formers, □; nitrate formers, W₁: breeding sea water S₁: surface layer of filter-sand S₁': deep layer of filter-sand } of large scale aquarium, W₂: breeding sea water S₂: deep layer of filter-sand } of small scale aquarium.

Fig. 4. Vertical distribution of nitrifying bacteria in the bottom muds in Maizuru Bay (Jan. 27, 1960). ●; nitrite formers, ○; nitrate formers.

2. 海底土・砂中における分布

a. 自然状態の海底土：舞鶴湾内の一定点および前記近畿大学白浜養魚場内の二定点の海底土を採取し（いずれも海深数mの場所であり、底土の採取はさきに著者らが報告した方法⁷⁾による）、海底の表層から約 20 cm の深さまでの間の各層についてそれぞれそこに存在する硝酸化成細菌数を測定した。

結果は Fig. 4 と Fig. 5 のごとくであつて、硝酸化成細菌の数は表層にもつとも多く、亜硝酸生成細菌 $10^3 \sim 10^4 \text{ cells/g}$ （底土 1 g 当たりの細菌数）、硝酸化成細菌 $10^2 \sim 10^4 \text{ cells/g}$ 附近であるが、深部に至るにしたがい次第に減少し、15 cm 以下の深さではいずれも 10^2 cells/g よりも少ない。

b. 水族館の汚過槽の砂：循環式飼育水槽では通常砂、小石などの層を通して飼育水を汚過している。この間に海水中的アンモニアは硝化されると考えられているので海底の状態と比較するため、前記みさき水族館の汚過槽の砂について実験を行ない、Fig. 3 に示す結果を得た。すなわち亜硝酸生成細菌、硝酸生成細菌いずれも 10^4

Fig. 5. Vertical distribution of nitrifying bacteria in the bottom muds in the farm of marine fish. (Left; station A, right; station B). ●; nitrite formers, ○; nitrate formers.

~ 10^5 cells/g であり、また表層からの距離による差異もほとんどみられない。

考 察

この実験で海洋性硝酸化成細菌が発育しうる培養基ならびに培養法が発見されたが、この方法によつて、これらの細菌が1個体接種されたときにも常に発育可能なのか、またはある一定数以上接種されたときのみ発育可能なのか明らかではない。しかしある培養を 10^7 倍に希釈してその1 ml を培養基に接種しても充分発育可能であつたことから、このある一定数はかなり少数であることは確実であるが、さらに栄養要求その他詳細なる研究を行ない、よりすぐれた培養法の発見に努めるつもりである。

この方法によつて海洋中には海洋性硝酸化成細菌が常在し、その数は一般に海水中には極めて少なく、海底土中には非常に多いことが確かめられた。すなわち上記のある一定数を1個体と仮定すれば海水中には亜硝酸生成細菌も硝酸生成細菌もともに 0.3 cell/ml 以下、海底土の表層には $10^3 \sim 10^4$ cells/g 程度であるから、後者は前者の 10^4 倍程度またはそれ以上存在するわけである。また海底土では表層にもつと多く、下層になるにしたがつて少なくなり、 15 cm 以下の層では表層の $1/1000$ 程度である。以上の諸事実の傾向はだいたい予想されたところであるが、諸海域においてはそれらの海洋の環境、泥土の性状などの相異が大きな影響を与えるものと考えられ、これらについて今後さらに研究を進めるつもりである。

水族館の循環式飼育水槽の海水中には硝酸化成細菌が自然状態の海水よりも極めて多数に存在することが明らかにされた。これは汙過槽の砂からこのような細菌がたとえ少数であるとしても間断なく遊離し、飼育水中へ流入するためか、あるいは特殊の環境のため飼育水中で発育増殖するためか明らかではない。また汙過層の砂に存在するこれらの細菌数は $10^4 \sim 10^5$ cells/g であつて表層からの距離によつてほとんど異ならない。これは海底の場合とは異なる点であつて当然のことと思われる。また水族館では海水の場合でも汙過槽の砂の場合でも常に硝酸生成細菌の数は亜硝酸生成細菌の数よりいくぶん多いが、これが正常の状態であるかどうかはさらに多くの研究の結果によらなければ明らかではない。

摘 要

海洋性硝酸化成細菌の培養ならびに分布について予備的研究を行なつた。

A. 培養法については次のような結果が得られた。

1. 海洋性硝酸化成細菌は土壌中の硝酸化成細菌を対象とした従来の培養基には発育しない。また、この培養基を淡水の代りに海水で調製したものにも発育しがたい。

2. 海洋性硝酸化成細菌は次の組成の培養基には発育する—海水 1 l に対し、硫酸アンモニウムまたは亜硝酸カリウム 30 mg, 第一磷酸カリウム 2 mg, chelated iron 0.2 mg, を加え、さらに 50% 炭酸カリウムを加えて pH を 8.4 にし、 15 ボンドで滅菌する—。この培養基の硫酸アンモニウムもしくは亜硝酸カリウムの濃度は従来土壌中の硝酸化成細菌の培養基に用いられている濃度に比して非常に低く、その $1/100$ 程度である。

3. 上記培養基に細砂を添加すれば硝酸化成細菌は極めてよく発育する。

B. 分布については上記の培養法を用いて次のような結果が得られた。

1. 海水および海底土中に硝酸化成細菌は常在するが、その数は海水中では極めて少なく、亜硝酸生成細菌も硝酸生成細菌とともに 0.3 cell/ml 以下であり、海底土中ではその表層にもつと多く、いずれも $10^3 \sim 10^4$ cells/g, 下層になるにしたがつて少なくなり、 15 cm 以下の層では 10^2 cells/g 以下である。

2. 循環式水族館の飼育海水中には硝酸化成細菌の数が自然状態の海水中よりも非常に多く、亜硝酸生成細菌、硝酸生成細菌のいずれもそれぞれ $10^2 \sim 10^3$ cells/ml 程度である。

3. 循環式水族館の汙過層の砂に存在する硝酸化成細菌の数は非常に多く、亜硝酸生成細菌も硝酸生成細菌ともに $10^4 \sim 10^5$ cells/g で表層からの距離によつてほとんど異ならない。

文 献

- 1) ZOBELL, C. E.: Marine Microbiology, Chronica Botanica Company, Waltham (1946), p.150.
- 2) QUASTEL, J. H. and P. G. SCHOLEFIELD: Bact. Rev., **15**, 1~53 (1951).
- 3) ENGEL, M. S. and M. ALEXANDER: J. Bacteriol., **76**, 217~222 (1958).
- 4) LEWIS, R. F. and D. PRAMER: J. Bacteriol., **76**, 524~528 (1958).
- 5) SAKAI, H.: Soil and Plant Food, **4**, 81~82 (1958).
- 6) 坂井 弘: 土壤肥料雑誌, **30**, 53~56 (1959).
- 7) 木俣正夫・河合 章・石田祐三郎: 本誌, **26**, 1227~1230 (1960).