海洋性硝酸化成細菌に関する研究—Ⅳ. 亜硝酸生成細菌の亜硝酸化成作用について (2)*

吉田陽一・河合 章・木俣正夫

(1966 年 11 月 12 日受理)

Studies on Marine Nitrifying Bacteria (Nitrite Formers
and Nitrate Formers)—IV.

On the Nitrite Formation of the Marine
Nitrite Formers (2)*

Yoichi YOSHIDA**, Akira KAWAI***,
and Masao KIMATA**

Of 4 strains of almost pure cultures of the marine nitrite formers (A 6, S 1, M 2 and SW 1), effects of salts on the nitrite formation were examined using the resting cells (adhering to the sand). The results obtained are as follows:

1. The optimum concentrations of sea water on the nitrite formation of the bacteria SW 1, S 1, A 6, and M 2 are about 40~50%, 50%, 60~80%, and 100%, respectively, and those of NaCl are about 0‰, 13‰, 25‰, and 30‰, respectively, and also the activities of these bacteria reduce markedly at a low concentration of salts except for the bacterium SW 1.

2. The nitrite formation of the bacterium A 6 is stimulated by Na^+ and K^+ but inhibited by Ca^{++} and Mg^{++} . On the contrary, that of the bacterium SW 1 is stimulated by Ca^{++} , Mg^{++} , and K^+ but inhibited by Na^+ . Further, the inhibition of Na^+ on the formation of SW 1 disappears by adding Ca^{++} but that of Ca^{++} on the formation of A 6 does by adding the same rates of salts with those in the artificial sea water.

著者らはさきに舞鶴湾の海底の泥および循環式海水魚飼育水槽から得た2種の海洋性亜硝酸生成細菌 (M 2 および A 6) の resting cell を用いて、その亜硝酸化成作用に及ぼす二・三の環境要因の影響についてしらべた際、亜硝酸化成作用の活性は海水または食塩濃度が低い場合に著しく低下することを見た¹⁾。このような性質は、塩濃度の増加に伴なつて亜硝酸化成作用の活性が低下する土壌性亜硝酸生成細菌の性質とは逆であり、したがつてこのような性質は海洋性亜硝酸化成細菌のもつ興味ある特性の一つであると考えられる。

本報では、このような海洋性亜硝酸生成細菌の特性が同種細菌に普遍的な性質であるか否かを明らかにするために、新しく舞鶴湾の海水および若狭湾の海底の砂から得た2株の海洋性亜硝酸生成細菌 (SW 1 および S 1) を用いて前報と同様の実験を行ない、得られた結果を比較検討した。また海洋性亜硝酸生成細菌 A 6 および SW 1 について、その亜硝酸化成作用に及ぼす諸種の塩類の影響についてもしらべ、若干の興味ある知見を得たので、これらの結果について報告する。

* 研究費の一部は文部省科学研究費による。

** 京都大学農学部水産学教室 (Dept. Fish., Fac. Agr., Kyoto Univ., Maizuru, Japan)

*** 京都大学食糧科学研究所 (The Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ. Kyoto, Japan)

実験方法

実験方法は下記を除いてすべて前報と全く同様である。

Table 1. Comparison among some marine nitrifying bacteria (nitrite formers).

No. of culture	Marine nitrifying bacteria (nitrite formers)			Contaminant	Habitat
	Size (mean) (μ)	Form	Flagella		
A 6	0.7 ~ 1.5	Oval	Polar	A species of heterotrophic bacterium	Aquarium with circulating system
S 1	1.0 ~ 1.6	Oval	Polar	A species of autotrophic bacterium	Bottom sand of Wakasa Bay
M 2	0.9 ~ 1.5	Oval	Polar	A species of heterotrophic bacterium	Bottom muds of Maizuru Bay
SW 1	0.25 ~ 0.6	Ellipsoidal rod	Polar	A species of heterotrophic bacterium	Sea water in Maizuru Bay

供試細菌は Table 1 に示すごとく、A 6, S 1, M 2 および SW 1 の 4 株の海洋性亜硝酸生成細菌である。このうち A 6 と M 2 は前報で用いた細菌であり、S 1 と SW 1 は新しく得た細菌である。これらはいずれも他種の従属栄養細菌または独立栄養細菌を 1 株混在している almost pure culture* である。これら 4 株の亜硝酸生成細菌のうち、A 6, S 1 および M 2 の 3 株は、菌体の大きさにそれほど大きな差異はみられないが、SW 1 は前記 3 種に比し非常に小形である。

供試砂 resting cell の調製では、SW 1 は基質濃度の高い培地には増殖し難いので、その増殖にはさきに用いた亜硝酸生成細菌用培地の、基質濃度を低くしたもの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mg/l を使用した。

亜硝酸化成作用の測定では、SW 1 はその活性が比較的低く、しかも基質濃度が高い場合にはその活性がさらに低下するので供試砂の量を倍量の 2 g とし、反応混液は基質濃度の低い、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 mg/l を用いた。

なお、亜硝酸化成作用の活性の比較は、亜硝酸の生成量が最大のときの活性を 100 とし、他はそれに対する比率(%)で表わした。

結 果

反応混液における海水濃度の影響 得られた結果は Fig. 1 に示すとおりであつて、4 株の細菌の間には若干の差異がみられる。すなわち、亜硝酸化成作用の最適海水濃度は、SW 1 では 40~50%, S 1 では 50~60%, A 6 では 60~70%, M 2 では 90~100% である。

Fig. 1 The effect of sea water concentration on the activity of nitrite formation of the resting cells of marine ammonia-oxidizing bacteria.

* 混在菌は、前報¹⁾でものべたように、本実験の条件下では、アンモニウム塩、亜硝酸塩の酸化ならびに、亜硝酸塩の還元活性を示さない。

Table 2. Composition of the salt solutions. These solutions are adjusted to pH 8.4, with NaOH solution or HCl solution.

No. of solution	1	2	3	4	5	6	7
Sort of salts	Artificial sea water	NaCl	CaCl ₂	NaCl MgCl ₂	NaCl Na ₂ SO ₄	NaCl CaCl ₂	NaCl KCl
Ingredient							
NaCl (%)	24.32	24.32	—	20.00	20.00	20.00	20.00
MgCl ₂ ·6H ₂ O (%)	10.99	—	—	10.99	—	—	—
Na ₂ SO ₄ (%)	4.06	—	—	—	4.06	—	—
CaCl ₂ ·6H ₂ O (%)	2.25	—	2.25	—	—	2.25	—
KCl (%)	0.69	—	—	—	—	—	0.69
NaHCO ₃ (Buffer) (%)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Distilled water (ml)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

反応混液における食塩濃度の影響 得られた結果は Fig. 2 に示すとおりで、特に SW 1 は他の 3 株に比しいちじるしく相違する。すなわち、最適食塩濃度は S 1 では 13‰ 付近、A 6 では 25‰ 付近、M 2 では 30‰ 付近である。しかし SW 1 は食塩を添加しない場合が最も活性が高く（最適海水濃度での活性に比すればその 40% にすぎないが）食塩濃度の増大につれて活性が低下する。

反応混液中における諸塩類の影響 Table 2 に示したように、塩の種類やその組合せを種々変えた液を調製し、この液に基質を前記と同様に加えて反応混液とし、これを用いて、A 6 および SW 1 の 2 菌株の亜硝酸化作用に及ぼす諸塩類の影響をしらべた。得られた結果は Fig. 3 に示すとおりで、塩の種類またはその組合せの相違により亜硝酸化作用がいちじるしく影響を受けること、およびこれらの塩類の影響は A 6 と SW 1 とではかなり異なることがわかる。すなわち、NaCl 液 (solu. 2) では A 6 の活性（人工海水の場合の活性を 100 とし他はそれに対する比で表わす）は 60% 前後であるが、SW 1 の活性は著しく低く 5% 前後である。その反対に CaCl₂ 液 (solu. 3) では SW 1 の活性は非常に高く 100% 近くであるが、A 6 の活性はいちじるしく低く 5% 前後である。また CaCl₂ 液の低塩濃度による影響を除くために、さらに NaCl を加えた NaCl·CaCl₂ 液 (solu. 6) の場合でも同様の結果が得られ、SW 1 の活性はほとんど 100% 近いが、A 6 の活性は著しく低く 10% 前後である。次に NaCl·KCl 液 (solu. 7) では NaCl 液の場合に比し、A 6, SW 1 とともに活性が若干高くなり、A 6 では 100% 近く、SW 1 では 25% 前後の活性がみられる。また、NaCl, MgCl₂ 液 (solu. 4) では NaCl 液の場合に比し、A 6 の活性は低く、その反対に

Fig. 2 The effect of NaCl concentration on the activity of nitrite formation of the resting cells of marine ammonia-oxidizing bacteria.

Fig. 3 The effect of some salts on the activity of nitrite formation of the resting cells of marine ammonia-oxidizing bacteria.

SW 1 の活性は高く、A 6, SW 1 とともに 30%前後の活性を示す。 $\text{NaCl} \cdot \text{Na}_2\text{SO}_4$ 液 (solu. 5) では NaCl 液の場合に比し、A 6, SW 1 とともにそれほど差異はみられず、A 6 は 60%前後、SW 1 は 15%前後の活性を示す。

考 察

海洋中や循環式海水魚飼育水槽から得た 4 株の海洋性亜硝酸生成細菌の resting cell について、その亜硝酸生成作用に及ぼす塩濃度の影響をしらべたところ、反応混液の海水濃度や食塩濃度が低い場合には、M 2, A 6 および S 1 の 3 株では著しい活性の低下がみられたが、SW 1 では海水の場合に幾分活性の低下がみられただけで、食塩の場合にはむしろ食塩濃度の低下に伴って活性が増大した。しかしこの場合、食塩濃度が 0‰の場合でも、最適海水濃度の場合における活性に比すればその活性は低く 40%前後であつた。またこれら 4 株の細菌の海水や食塩の最適濃度は M 2, A 6, S 1, SW 1 の順に低い。以上のように海水や食塩濃度の影響は 4 株の細菌の間ではかなりの相違がみられる。

次に亜硝酸化成作用に及ぼす諸種の塩類の影響をみると、A 6 と SW 1 とではその影響がかなり異なっており、A 6 に対しては Na^+ , K^+ が促進的に、 Ca^{++} , Mg^{++} が阻害的に作用し、SW 1 に対しては Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ などが促進的に Na^+ が阻害的に作用する。さらに SW 1 の場合 Na^+ が単独のときにみられた Na^+ の阻害作用は Ca^{++} が添加されると消失すること、また A 6 の場合 Ca^{++} が単独のときにみられた Ca^{++} の阻害作用は Na^+ が添加されただけではほとんど消失せず、諸種の塩類が人工海水の割合に添加された場合には消失することがわかつた。

海洋性の従属栄養細菌の酵素活性に及ぼす塩の要求性については最近かなりの研究がみられるようになった^{2~4)}が、そのほとんどが Na^+ や K^+ の必要性を指摘するにとどまつており、本実験で得られたような諸種の塩類の複雑な拮抗作用や細菌の種類によるその影響の相異に関する研究はほとんどみられないようである。

なお、本実験に用いた海洋性亜硝酸生成細菌 SW 1 は、他の 3 株の海洋性亜硝酸生成細菌に比し、その大きさが非常に小さく、亜硝酸化成作用の最適基質濃度も非常に低く、またその最適塩分濃度も低く、諸塩類に対する要求性もかなり異なっているため、海洋性細菌でないのではないかと疑問も生ずるが、他の 3 株の細菌と同様に、海洋性亜硝酸生成細菌用培地には増殖するが淡水性亜硝酸生成細菌用培地⁵⁾にはほとんど増殖し得ないので海洋性亜硝酸生成細菌と考えるべきであるまいか。

要 約

1. 前報で用いた 2 株の海洋性亜硝酸生成細菌 (A 6 および M 2) の他に新しく得た 2 株の細菌 (S 1 および SW 1) の resting cell を用いてその亜硝酸化成作用におよぼす海水や食塩の濃度の影響を比較検討し、さらに A 6 および SW 1 の 2 株についてその亜硝酸化成作用に及ぼす諸種の塩類の影響をしらべた。

2. 供試細菌のうち 3 株 (A 6, M 2, S 1) の亜硝酸化成作用は、海水や食塩の濃度の低い場合にはその活性が著しく低下するが、SW 1 は他の 3 株と異なり、海水の濃度が低い場合にその活性は幾分低下するが、食塩の場合はむしろ食塩濃度の増加に伴って活性が低下する。

3. 亜硝酸化成作用に及ぼす諸種の塩類の影響は、A 6 と SW 1 とではかなりの相違がみられる。すなわち A 6 では Na^+ , K^+ が促進的に、 Ca^{++} , Mg^{++} が阻害的に作用するに対し、SW 1 では Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ などが促進的に、 Na^+ が阻害的に作用する。また SW 1 では Na^+ の阻害作用は Ca^{++} の添加によって失われるが、A 6 では Ca^{++} の阻害作用は Na^+ の添加によつても失われず、人工海水の割合に諸種の塩類を加えた場合に消失する。

文 献

- 1) 木俣正夫・河合 章・吉田陽一: 本誌, **29**, 1031~1036 (1963).
- 2) N. TOMLINSON and R. A. MACLEOD: *Can. J. Microbiol.*, **3**, 627~638 (1957).
- 3) G. R. DRAPEAU and R. A. MACLEOD: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 111~115 (1963).
- 4) W. J. PAYNE: *J. Bacteriol.*, **80**, 696~700 (1960).
- 5) 吉田陽一・河合 章・木俣正夫: 本誌, **33**, 367~371.