炭酸カルシウムの沈積に関与する 海洋微生物に関する研究—VI.

炭酸カルシウムの沈積に関与する 海洋細菌の分類学的検討 (4)

信 濃 晴 雄

(1972 年 9 月 14 日受理)

Studies of Marine Bacteria Taking Part in the Precipitation of Calcium Carbonate—VI.

A Taxonomic Study of Marine Bacteria Taking Part in the Precipitation of Calcium Carbonate (4)

Haruo SHINANO*

In the previous papers the author gave the results of his taxonomic investigations of three groups of bacteria: Cocci, Gram negative and monopolar flagellated rods, Gram negative and peritrichous flagellated rods. In this report, the taxonomic investigations of 77 strains of the bacteria belonging to the group of Gram negative and non-motile rods were made according to Bergey's Manual and Shewan's determinative scheme. The results obtained were summarized as follows:

1. Fifty five strains belonged to the genus *Achromobacter* and 22 strains to the genus *Flavobacterium*.

2. The fifty five strains of the genus *Achromobacter* were identified as *A. eurydice* (25 strains), *A. butyri* (15 strains); *A. parvulus* (8 strains) or *A. steanohalis* (7 strains) and the 22 strains of the genus *Flavobacterium* were identified as *F. solare* (17 strains), *F. lutescens* (4 strains) and *F. domitator* (1 strain) respectively.

前報まで¹⁻³⁾において、第 2 報⁴⁾で述べた炭酸カルシウムの生成に関与する海洋細菌のうち球菌、単極毛を有し運動性の認められるグラム陰性桿菌および周毛を有し運動性の認められるグラム陰性桿菌について分類学的検討を行なった結果について述べたが、ここでは運動性の認められないグラム陰性桿菌について分類学的検討を行なったのでその結果について報告する。

実 験 法

海水由来の炭酸カルシウムの生成に関与する海洋細菌中、運動性の認められないグラム陰性桿菌は 77 株であるが、これら菌株についての分類学的検討は前報と同様に Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology* (7 ed.)⁵⁾ および SHEWAN ら⁶⁾の法によった。なお、基礎培地は第 3 報¹⁾で述べた組成のものをを用い、培養は 25°C で行なった。

形態学的性状 検査項目および検査法は第 2 報⁴⁾で述べた通りである。

* 北海道大学水産学部微生物学講座 (Microbiol. Lab., Fac. Fish., Hokkaido Univ., Hakodate, Hokkaido Japan).

Table 1-1. Physiological characteristics of the non-motile 55 strains belonging to genus *Achromobacter*.

Genus		<i>Achromobacter</i> (55)																											
Character	Species	<i>A. eurydice</i> (25)														<i>A. butyri</i> (15)				<i>A. steanohalis</i> (7)			<i>A. parvulus</i> (8)						
Hydrolysis of gelatin		—														+				+			— —						
Litmus milk		—														—				—			Unknown Al*						
Acid from glucose		+														+				+			— —						
Nitrate reduction		+														—				+			Unknown —						
Acid from sucrose		—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	— —											
lactose		—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	— —											
mannite		+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+	—	+	— —											
H ₂ S production		+	+	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+	—	—	+	—	— —											
Utilization of citrate		+	—	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+	— —											
Hydrolysis of starch		—	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	+	—	+	— —											
M. R test		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— —											
Indol production		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	— —											
No. of strains		1	5	1	2	1	1	1	3	2	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	5	2	3	2	1	1	4	4

* Alkaline

Table 1-2. Morphological and physiological characteristics of the non-motile strains belonging to genus *Flavobacterium*.

Genus		Flavobacterium (22)												
Character	Species	F. solare (17)									F. lutescens (4)		F. domitator (1)	
Pigment*		Y	O	O	O	G	Y	G	Y	O	B	O	O	Y
Hdrolysis of gelatin		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
starch		—	—	—	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—
alginic acid		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acid from glucose		+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	—	+	+
sucrose		+	+	—	+	+	—	+	—	+	+	—	—	+
lactose		—	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+
mannite		+	—	—	+	+	—	+	—	+	+	—	—	+
Nitrate reduction		+	—	+	+	—	—	+	—	+	+	—	+	+
Indol production		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Litmus milk		—	—	—	—	R ^{2*}	—	R	—	A ^{13*}	—	Al	Al	Ac ^{4*}
Growth on potato		—	—	+	—	+	—	—	+	+	—	+	+	+
at 37°C		—	—	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+
No. of strains		6	1	3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1

*: Y=Yellow, O=Orange, G=Gray, B=Brown

2*: Reduction 3*: Alkaline 4*: Acid

生化学的性状 検査項目は好気的および嫌気的条件下における糖（グルコース）からの酸の産生ならびに各種糖類（シュクロース、ラクトース、マンニト）からの酸の産生、オキシダーゼ試験、ゼラチンの水解、ポテト培地上における発育、でん粉の水解、リトマスミルクに対する態度、アルギン酸の分解、インドールの産生、キチンの分解、硫化水素の産生、Voges-Proskauer 反応、Methyl-Red 試験、炭素源としてのクエン酸塩の利用などであるがこれらの検査法は第3報¹⁾ および第4報²⁾ で述べた通りである。

結果および考察

実験結果は Table 1 に示したが、グラム陰性桿菌で運動性の認められない細菌は Bergey's *Manual* ではそのほとんどが Family Achromobacteraceae に包含されている。供試菌 77 株はいずれも寒天溶解性、キチンおよびアルギン酸分解能が認められず、Family Achromobacteraceae に属する 5 属中の genus *Agarbacterium* および *Beneckea* には属さない菌株である。また供試菌 77 株の中には、黄色、橙色あるいは褐色の非水溶性色素を産生する菌株が 22 株存在したが、これらは明らかに genus *Flavobacterium* に属する菌株で、残る 55 株の色素非産生菌は genus *Alkaligenes* あるいは *Achromobacter* のいずれかに属する菌株である。この genus *Alkaligenes* と *Achromobacter* の 2 属に関する分類はきわめて明確さを欠きこの種の細菌の分類に当つての隘路となつているが、SHEWAN の scheme 上においても両者の鑑別がなされず同一の位置に併記されている。Bergey's *Manual* では、これらを鑑別する species key として、リトマスミルクに対する態度および糖からの酸の産生の有無を採り上げ、genus *Alkaligenes* に属する species はリトマスミルクを強くアルカリ化し、かつ糖からの酸の産生の認められないものとし、一方 genus *Achromobacter* に属する species にはリトマスミルクを弱く酸性化するもの、アルカリ化するものまたは変化しないものなどがあるが、一般に糖から酸を産生するものと定義している。

色素産生能の認められなかつた 55 株の供試菌中、リトマスミルクをアルカリ化する菌株は 6 株認められたが、これらはいずれも微弱な反応を示すに過ぎず、またその他の性状からも genus *Achromobacter* に属させるのが至当と考えられる菌株であつた。また糖類からの酸の産生に関して、供試菌株中、グルコースからの酸の産生が認められない菌株が 20 株存在したが、Bergey's *Manual* における genus *Achromobacter* の中の species には genus key の記載とは異なり、グルコースから酸の産生の認められないものも含まれていて、この性状が species key として採用されており、非運動性 *Achromobacter* の 5 species の中では *A. steanohalis* および *A. parvulus* の 2 species が糖類からの酸の産生の認められない species とされている。このようなことから糖からの酸の産生能は genus *Achromobacter* と genus *Alkaligenes* を鑑別する決定的要素とはなり得ず、現状ではリトマスミルクのアルカリ化の強弱のみが上記 2 属の鑑別法と考えられる。以上述べたようなことから供試菌 77 株中、非水溶性色素を産生しない 55 株はすべて genus *Achromobacter* に属するものと考えるのが妥当であろう。

次に Bergey's *Manual* によれば Table 2 に示すように genus *Achromobacter* の中で非運動性のものは、ゼラチンの水解性、硝酸塩の還元能、グルコースからの酸の産生、およびリトマスミルクに対する態度などを species key として 5 species が記載されているが、本報では genus *Achromobacter* と認められた 55 株をこの species key により分類すれば、ゼラチン溶解性が認められ、硝酸塩還元能を有する 7 株は *Achromobacter steanohalis* に、ゼラチン溶解性が認められ、硝酸塩還元能の認められない 15 株は *A. butyri* に、またゼラチン溶解性の認められない菌株の中でグルコースから酸を産生し、リトマスミルクを変化しない 23 株は *A. eurydice* に、糖類から酸を産生しない 7 株は *A. parvulus* に同定される。また残り 1 株はゼラチン溶解性なく、糖類からの酸の産生も認められないことから *A. parvulus* に類似するがリトマスミルクを微弱ながらもアルカリ化すること、硝酸塩の還元能の認められないことから *A. parvulus* と同定するには若干の疑義が持たれるかも知れないが、ここでは一応 *A. parvulus* と同定した。

前述したように供試菌 77 株中、非水溶性色素を産生することから genus *Flavobacterium* とした菌株は 22 株であつたが Bergey's *Manual* では genus *Flavobacterium* は前報において述べたように非運動

Table 2. Key to the species of genus *Achromobacter*.

-
- I. Motile. Flagella peritrichous.
- A. Gelatin liquefied.
1. Litmus milk unchanged.
 - a. Nitrites not produced from nitrates.
 - aa. Nitrites produced from nitrates.
 - b. Produces acid from glucose and sucrose.
.....*Achromobacter iophagus*.
 - bb. Does not produce acid from glucose or sucrose.
 2. Litmus milk reaction acid or alkaline. Nitrites produced from nitrates.
 - a. Litmus milk acid.
 - aa. Litmus milk alkaline.
- B. Gelatin not liquefied.
1. Litmus milk unchanged.
 - a. Acid from glucose.
 - b. Nitrites produced from nitrates.
.....*Achromobacter aquamarinus*.
 - bb. Nitrites not produced from nitrates.
.....*Achromobacter guttatus*.
 - aa. No acid from carbohydrate media.
 - b. Attacks phenol and naphthalene.
 - bb. Action on phenol and naphthalene not recorded.
 2. Litmus milk slightly acid.
.....*Achromobacter superficialis*.
- II. Non-motile.
- A. Gelatin liquefied.
1. Nitrites slowly produced from nitrates.
.....*Achromobacter steanohalis*.
 2. Nitrites not produced from nitrates.
.....*Achromobacter butyri*.
- B. Gelatin not liquefied.
1. Acid from glucose.
 - a. Litmus milk unchanged. Action on nitrates not recorded.
.....*Achromobacter eurydice*.
 - aa. Litmus milk acid; litmus reduced in 5 days. Nitrites produced from nitrates.
 2. No acid from glucose.
.....*Achromobacter parvulus*.
-

性の species と運動性の認められる species の2群に大別され、前者は色素産生の条件、リトマスミルクに対する態度、ゼラチンの水解性、ポテト培地上における産生色素の色調、硝酸塩の還元能などの species key によつて分類されている。これらの key に従つて上記 22 株を分類するとリトマスミルクをアルカリ化、ゼラチンを水解しポテト培地で旺盛な発育の認められることなどから4株が *F. lutescens* に、またゼラチンを水解するとともにリトマスミルクを赤変、ポテト培地に発育し、グルコース、シュクロース、マンニットから酸の産生が認められることなどから1株が *F. domitater* に、またゼラチンの水解性がなくリトマスミルクの変化も認められないことから6株が *F. solare* に同定された。残りの11株は橙色あるいは黄色の色素を産生し、ゼラチンの溶解性が認められず、Bergey's Manual による species key に従えば *F. solare* に類似するがリトマスミルクを僅かに赤変する点が異なる。しかしながらこのリトマスミルクの赤変の程度はきわめて微弱であり、species を決定する程明瞭な変化ではない。このような点を考慮してこれら11株はいずれも *F. solare* と同定するのが至当と考える。

なお、最近 THORNLEY⁷⁾ はグラム陰性の短桿菌あるいは球状に近い桿菌で運動性が認められず genus *Achromobacter* に属する菌株とされてきた 120 株の細菌と既知のグラム陰性の各属 (*Pseudomonas*, *Escherichia*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alkaligenes*, *Diplococcus*, *Moraxella* など) に含まれる 75 株とについて ADANSON の数値分類法により分類学的検討を行なった。この結果、大部分の菌株が 85% 前後の高い相似性を有する一つの群にまとめられ、THORNLEY はこれらの菌株を *Acinetobacter* に属する菌株と考えるのが妥当であろうと述べている。*Acinetobacter* という属名は 1954 年 BRISOU and PRÉVOT⁸⁾ がグラム陰性で運動性が認められず、色素産生能のない短桿菌に新しく命名した属名で、現在 Bergey's Manual では genus *Achromobacter* の中で運動性の認められない 5 species 中 4 species (*A. steanohalis*, *A. butyri*, *A. eurydice*, *A. delmarvae*) に *Acinetobacter* の属名を用いた記載がある。また最近 SHEWAN⁹⁾ は魚から分離した運動性の認められないグラム陰性桿菌で従来は genus *Achromobacter* に属する菌株と考えられていた細菌について ADANSON の数値分類法により検討を行なった結果、Family Brucellaceae 中の genus *Moraxella* に含まれる 2 菌種 (*Mor. osloensis* *Mor. lacunata*) ときわめて高い相似性を示したことを報告し、1960 年および 1964 年に SHEWAN が提案したグラム陰性桿菌の分類方式中での genus *Achromobacter* に対する考え方とは多少異なつた見解を示している。以上述べたようなことから、グラム陰性で運動性が認められず色素産生能のない短桿菌についての分類学上の位置はきわめて流動的であり、今後さらに種々の観点からの検討が必要と思われる菌群といえよう。

本研究を遂行するに当り、種々有益なる御助言と御援助をいただいた坂井 稔教授、木材喬久助教授、絵面良男助手に深甚なる謝意を表する。

要 約

海水培地中に炭酸カルシウムを生成する海水由来菌株の中、グラム陰性桿菌で運動性の認められない 77 株について分類学的検討を行ない次のような結果を得た。

1. 供試菌 77 株中 55 株は genus *Achromobacter* に、また 22 株は genus *Flavobacterium* に属する菌株であつた。
2. genus *Achromobacter* に属する 55 株中、25 株が *A. eurydice*, 15 株が *A. butyri*, 7 株が *A. steanohalis*, 8 株が *A. parvulus* に同定された。
3. genus *Flavobacterium* に属す 22 株は、17 株が *F. solare* に、4 株が *F. lutescens* に、1 株が *F. domitator* に同定された。

文 献

- 1) 信濃晴雄: 本誌, 38, 727-732 (1972).
- 2) 信濃晴雄: 同誌, 38, 825-832 (1972).
- 3) 信濃晴雄: 同誌, 38, 833-838 (1972).
- 4) 信濃晴雄: 同誌, 38, 717-725 (1972).
- 5) R. S. BREED *et al.*: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7 ed., 1094 pp., Wilkins, Co., Baltimore (1957).
- 6) J. M. SHEWAN *et al.*: *J. appl. Bact.*, 23, 379-390 (1960).
- 7) M. J. THORNLEY: *J. gen. Microbiol.* 49, 211-257 (1967).
- 8) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7 ed.) より引用.
- 9) J. M. SHEWAN: *J. appl. Bact.*, 34, 299-315 (1971).