

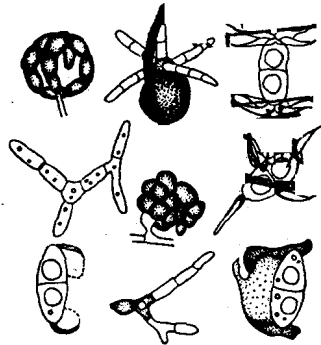
Q178.53
1

海洋学講座

11

海洋微生物

多賀信夫 編



東京大学出版会

海洋学講座 第11巻 海洋微生物

1974年3月30日 発行
1978年6月20日 2刷

検印
廃止

編者 多賀 信夫
発行者 加藤 一郎

発行所 財団法人 東京大学出版会
113 東京都文京区本郷 東大構内 電話(811)8814・振替東京6-59964

三秀舎印刷 誠製本

3340-65119-5149

海洋学講座

★編集委員

内田清一郎
小倉義光
黒木敏郎
多賀信夫
竹田厚
田中昌一
寺本俊彦
友田好文
奈須紀幸
西脇昌治
服部明彦
堀部純男
丸茂隆三
山本護太郎

★本巻の執筆者

石田祐三郎
京都大学農学部
江草周三
東京大学農学部
大和田紘一
東京大学海洋研究所
奥谷康一
香川大学農学部
門田元
京都大学農学部
河合章
京都大学食糧科学研究所
坂井稔
北海道大学水産学部
清水潮
東京大学海洋研究所
多賀信夫
東京大学海洋研究所
榎啓介
花柳研究所
畑幸彦
高知大学農学部
日高富男
鹿児島大学水産学部
丸山芳治
東京大学農学部
吉田陽一
京都大学農学部

〈50音順〉

Contents 第11巻目次

0章 展望—海洋微生物学の歴史と将来(多賀信夫)	1
0.1 海洋における微生物研究の発展	2
0.2 海洋微生物学の今後の課題	3
1章 海洋微生物の生理学的特性	7
1.1 海洋細菌の塩分要求(丸山芳治)	7
1.1.1 海水の塩分と微生物	7
1.1.2 海洋微生物の塩分要求性	8
1.1.3 細菌細胞に対する塩類の作用	10
1.1.4 酵素系に対する影響	12
1.1.5 まとめ	14
1.2 海洋細菌の低温性(石田祐三郎)	16
1.2.1 緒言	16
1.2.2 低温細菌の特性	19
1.2.3 低温細菌と海洋環境との関係	28
1.3 海洋細菌の好圧性と耐圧性(多賀信夫・丸山芳治)	34
1.3.1 深海における細菌の存在とその耐圧性	34
1.3.2 種々の細菌の増殖におよぼす水圧の影響	36
1.3.3 生化学的活性におよぼす水圧の影響	40
2章 海洋微生物の分類と生態	45
2.1 海洋細菌の分類(清水 潮)	45
2.1.1 細菌分類の方法の現況	45

2.1.2	海洋細菌の系統分類と同定	49
2.1.3	海水環境に見られる主要な従属栄養細菌	51
2.2	海水菌類の分類と分布 (椿 啓介)	65
2.2.1	研究史	66
2.2.2	海水菌類の定義, 生態および培養	76
2.2.3	各 論	69
2.3	海洋バクテリオファージ (日高富男)	81
2.3.1	海洋バクテリオファージの分布	83
2.3.2	海洋バクテリオファージの採集	84
2.3.3	海洋バクテリオファージの性状	85
2.4	魚介類の病原菌 (江草周三)	89
2.4.1	<i>Vibrio</i>	90
2.4.2	<i>Mycobacteria</i>	94
2.4.3	<i>Nocardia</i>	95
2.4.4	<i>Pasteurella piscicida</i> と養殖ハマチの類結節症菌	96
2.4.5	<i>Achromobacter</i>	98
2.4.6	<i>Myxobacteria</i>	98
2.4.7	<i>Leucothrix</i>	98
2.4.8	<i>Gaffkya homari</i>	99
2.4.9	キチン分解菌	100
2.5	腸炎ビブリオ (坂井 稔)	106
2.5.1	腸炎ビブリオ研究の経緯	106
2.5.2	腸炎ビブリオの定義	118
2.5.3	海洋細菌学からみた腸炎ビブリオ	119
2.6	海洋細菌の分布と生態 (多賀信夫)	127
2.6.1	従属栄養細菌の量的分布	127
2.6.2	海洋細菌と他の生物との生態的相互関係	140
2.6.3	海洋環境における従属栄養細菌のフローラ	144
2.6.4	海洋における細菌の増殖過程と細菌のバイオマス	146
3	海洋の物質サイクルにおける微生物の役割	153
3.1	有機物の分解と微生物との関連 (門田 元・奥谷康一)	153
3.1.1	有機物の分解過程における微生物の役割	153

3.1.2	有機物の分解に関与する微生物	155
3.1.3	地球化学的側面からみた有機物の分解	162
3.2	窒素サイクルと微生物との関連 (河合 章・吉田陽一・丸山芳治)	169
3.2.1	硝酸化成過程	170
3.2.2	硝酸塩還元過程	174
3.2.3	種々の海域における細菌群の分布	177
3.2.4	窒素固定	179
3.3	硫黄サイクルと微生物との関連 (畑 幸彦)	187
3.3.1	海洋における硫黄循環のあらまし	188
3.3.2	有機硫黄化合物の変換	189
3.3.3	硫酸塩の還元	190
3.3.4	硫黄化合物の酸化	199
3.4	発育因子(ビタミン)と微生物との関連 (大和田敏一)	204
3.4.1	植物プランクトンのビタミン要求	204
3.4.2	海水中のビタミン測定法	207
3.4.3	分布ならびに季節変化	209
3.4.4	ビタミンの生産・消費	212
3.4.5	ビタミンの生態学的意義	216
	索引	223

0 章 展望—海洋微生物学の歴史と将来

現代の生物学の体系では、ビールス (virus), 細菌類 (bacteria) および真菌類 (fungi) のみならず、藻類 (algae), 藍藻類 (blue-green algae), 原生動物 (protozoa) など、いわゆるモネラ (monera) および原生生物 (protista) の生物系統群に属する微小な生物をすべて〈微生物 (microorganisms)〉と呼ぶのがふつうである。したがって、最近はこれら多岐にわたる生物群が微生物学の研究分野において対象とされる傾向がある。しかし、海洋の生物を対象とした学問分野においては、ビールス、細菌類および真菌類のみが微生物学の対象として研究され、一方、微小藻類や原生動物はプランクトン学の対象として、また藻類は藻類学 (海産植物学) の対象として研究されるのが一般的な慣習とされてきた。ZoBell [1946], Brisou [1955] および Kriss [1963] によるそれぞれの海洋微生物学に関する著書はこのような慣習にしたがって狭義の微生物群を対象として記述されているが、一方 Wood [1965] による著書, Oppenheimer [1963] や Droop and Wood [1968] による編著, また Wood [1968] や Strickland [1971] による総説では、前述した広義の微生物群が対象とされている。現在ではこのように研究者の視点の相違によって、この学問分野で対象とされる微生物群の範囲には広狭がある。しかしいずれにしても、海洋微生物学の分野が、細菌類、真菌類およびビールスに関する研究を中心として発展してきたこと、さらにいわゆる〈微生物学的研究技法〉を他の微生物群の研究に応用することによってより広義な体系へと発展しつつあることは確かである。

海洋微生物学が、海洋科学の一分野として体系づけられてきたその歴史的な経過をたどると、その研究の方向はふたつに大別される。すなわち、第一の方向は海洋に分布する細菌類や真菌類などの微生物自体の分類学的、生態学的あるいは生理・生化学的性状に関する研究であり、第二の方向は微生物作用に影響される海洋の諸過程を解析し理解しようとする研究である。

本編では対象とする海洋微生物の範囲を主として細菌、真菌、ビールスとし、しかも海洋微生物学における上記の研究方向に基づいて整理されたいくつかの研究主題に関して解説が行なわれている。これらの主題の中には、最近著しい研究の発展をみた、魚介類の病原菌、食中毒細菌腸炎ビブリオ、あるいは発育因子 (ビタミン) と微生物との関連などの、やや応用的あるいは中間領域的分野のものも取り上げられている。したがって、本編は海洋微生物に関連するすべての研究成果を網羅するという性格の編著とはならなかったが、海洋微生物学の現時点における側面あるいは動向は本編各章の解説により理解していただけるものと思う。

0.1 海洋における微生物研究の発展

海洋微生物の研究に関する歴史は、19世紀の後半に、Certes [1884], Fischer [1886, 1894] あるいは Russell [1891] などにより、海中における細菌の存在とその分布構成を広範囲に調査した開拓的な研究に端を発したといえる。その後 Issatchenko [1914] は、海における細菌の存在とその生化学的要因としての重要性に重点をおき、北極海やバレンツ海などで行なわれた彼自身および他の一連の研究成果を300ページの専門書(ロシア語)にまとめて発表した。他方、Drew [1913] により、細菌(とくに脱窒細菌)が熱帯水域における海底へのCaCO₃の沈積機構に関与することが報告された。これらの研究が端緒となり、それ以後海洋の物質循環過程における微生物の役割を解明する方向の研究が数多く報告されるようになった。このような海洋微生物の研究に関する初期の時代の発展経過については、すでに ZoBell [1946] の著書にも詳述されている。

近年に至るまでの海洋微生物学の発展の経過を特徴づけている一般的な傾向として、われわれは次のふたつの事実注目せねばならない [Kriss, 1963]。第1に、微生物の研究が主として海洋の沿岸水域およびその表層において行なわれ、しかも外洋水域および深海における研究の比重が小さかったことである。この意味では確かに、海洋微生物学は本質的に発展初期の段階にあったし、また外洋深海水域における多くの観測結果の集積が望まれていた。第2に、微生物の研究の大半が主として高濃度の栄養培地を用いたいわゆる培養法に基づいて行なわれてきたことである。この方法では、海洋の自然条件とははなはだしく異なった人工培地上で発育できる海洋微生物の少数グループのみを比較的正確に検出し、また分離培養することはできたが、一方海中微生物の総数あるいは微生物バイオマス(biomass, 菌体量)の分布に関するより正確な情報は得られなかった。

上述のような海洋微生物に関する研究上の欠点を補うべく、Kriss [1963] あるいはソビエトの多くの研究者は、培養法のみならず直接検鏡法をも併用して、沿岸のみならず外洋海域における従属栄養細菌の量的分布ならびにその生化学的活性や分類学的性状、微生物総数とのバイオマス、海洋現場における微生物の増殖率および生産量などに関し、汎海洋的な多数の研究成果を発表した。これら多くのデータが Kriss [1963] あるいは Kriss *et al.* [1967] の著書に総括されて発表されたことは、彼らの用いた研究方法の是非あるいは精度に対する論議はともかくとして、スケールの大きい海洋微生物学の発展に大いに貢献した。

他方、ZoBell および彼の協力者達によって、1949年以降各所の深海において好圧性あるいは耐圧性を有する従属栄養細菌の存在と分布に関して一連の調査が行なわれた [ZoBell, 1968]。このような現場の調査研究が契機となって、それ以後現在に至るまで、海洋細菌あるいは陸棲細菌を用いた耐圧性に関する生理学的あるいは生化学的実験研究が盛んに行なわれるようになった。海洋における水圧という環境要因は、現場における微生物の生存あるいは活性に大きな影響をおよぼすと考えられるから、ZoBell その他の研究者によって明らかにされつつある研究成果は、海洋微生物学の発展に資するところが大きいといえる。

海洋に特異な環境要因としては上記の水圧のほか塩分と低水温とがある。このような環境要因に海洋微生物(とくに細菌)がどのように対応した特性を持っているかを究明することは、海洋微

生物学における一つの大きな基礎的な課題である。この部面の研究は過去にも断片的に報告されてはいたが、詳細な生理学的あるいは生化学的な研究が集中的に行なわれるようになったのは比較的最近になってである。塩分の要求性については、MacLeod *et al.* [1954] が海洋細菌の Na^+ や K^+ のみならず Mg^{++} 、 PO_4^{3-} および SO_4^{2-} の要求性を再確認したのを契機として、その後彼および彼の協力者やその他多数の研究者によって海洋細菌の塩分要求性に関する研究が報告されている [MacLeod, 1968]。一方、海洋細菌の低温性についても、Morita および彼の協力者やその他の研究者により最近までかなり多数の研究結果が報告されている [Morita, 1966, 1968]。

上述した研究の趨勢はほとんどが人工培地を用いる培養法あるいは直接検鏡法による海洋微生物の生態学的研究か、あるいはまた自然の海洋条件にはないような高濃度の培地を用いて分離培養された微生物に関する生理・生化学的研究のどちらかに終始していた。しかしこのような研究手段によって得られた結果からは、海洋の現場における真の生きた微生物の量（バイオマス）やその物質代謝活性が正確な定量値として見積もれないであろうことは事実である。最近では、このような反省のうえに立って、従来とはまったく異なった技法を用いて海洋現場の微生物量やその代謝活性を測定しようとする動向がある [Strickland, 1971]。たとえば、ATP を指標として微生物全体（細菌以外の微生物もすべて含まれる）の量を測定する試み、サクシネートデヒドロゲナーゼ (SDH) 活性を直接測定して海中生物の呼吸を計量する試み、アイソトープラベル基質を用いて海中微生物の基質取りこみ活性や無機化活性を測定して、これを反応速度論的に解析しようとする試み、あるいは開放系連続培養装置を用いて微生物の増殖率を速度論的に解析しようとする試みなどがその例である。

以上、海洋微生物に関する研究の発展経過のあらましをかいまんで述べたが、今後に残された未解明の問題も少なくない。慣習的な微生物研究技法あるいは新しく導入された研究技法のそれぞれのもつ長所短所を十分認識したうえで、今後これらの方法を用いて未解明の課題にどのように対処してゆくかが問題であろう。

0・2 海洋微生物学の今後の課題

海洋微生物に関する研究が将来どのような方向に進むかについての展望は、研究者の視点の相違によってまったく異なったものになるかもしれない。したがって、ここでは特定の研究方向を強調することは避けて、従来研究されたとしても未解決の問題、あるいはまったく研究されていなかった課題などの大小さまざまな項目を列挙するにとどめたい。

1) 陸棲細菌が海中に流入した場合、これらの運命はどうなるであろうか。海中において陸棲細菌が消失する機構、すなわち希釈、凝集沈積、毒性要因の存在、捕食生物の存在、飢餓などの要因のうち、どの要因が最も重要であろうか。

2) 病原性の細菌、酵母、糸状菌によってプランクトン生物が感染することがあるか否か。魚介類の大量斃死が病原菌によって起こる割合はどの程度であるか。外洋水域に分布する魚類や魚卵に細菌感染があるか否か。また水質汚濁のない水域で海藻類の病気はあるのか否か。

3) 海洋にバクテリオファージが分布することが明らかにされつつあるが、これらの生態的な意

義はどうであろうか。海産魚や軟体動物にビールス感染があるか否か。藻類にビールス感染があるのか否か。感染がないとすれば、なぜないのか。

4) 海産魚介類や動植物プランクトンの細菌フローラが明らかにされつつあるが、海藻類のフローラは前者と異なっているか否か。また生育環境の海水中の細菌フローラと生物体上のフローラとはどの程度に相異しているか。

5) 海洋環境の変化に対応して海洋細菌のフローラは、どの程度に変化するか。海洋の異なった水塊と細菌フローラとの関係はあるのか否か。

6) 海洋における微生物的窒素固定において、藍藻類、細菌、酵母などのうち、どの微生物群が最も大きな活性を保有しているのか。海洋藻類に共生的な窒素固定微生物が生存するのか否か。

7) 海洋微生物が鉄、マンガン、ニッケル、コバルト、ストロンチウム、バナジウム、ヨウ素、水銀、カドミウムなどの微量成分をどの程度濃縮するか、またその濃縮機構とそれにおよぼす要因はなんであるのか。このような濃縮機能をもった微生物の種類はどんなものか。

8) 汚染物質である農薬、PCB、合成洗剤、石油などの分解能を持つ微生物が海域に存在するとしたら、その微生物の種類あるいはその分解機構はどうであるのか。

9) 海洋における生物死骸あるいは生物起源の高分子有機物の分解過程はどのようであり、またその現場における分解速度の見積りはどの程度であろうか。

10) 海洋細菌が海中有機物を利用する効率、すなわち細胞質内に取り込む量および酸化分解する量はどの程度であろうか。これまでの断片的な実験データによれば前者は有機物（モデル基質）の約 $\frac{1}{2}$ あるいは約 $\frac{1}{3}$ とされている。種々のモデル高分子有機物基質あるいは生物死骸有機物の場合の前記の利用あるいは分解効率はこのくらいであろうか。

11) 海洋の現場における細菌の増殖率はどの程度であり、また環境要因の変化にともなってそれがどのように変動するか。これまでガラススライド垂下による直接観察法あるいはケモスタットを用いる開放系連続培養法によるデータが得られているが、さらに簡便な測定方法が考えられるだろうか。

12) 海洋の単位水域または容積当りの細菌体重量（バイオマス）または細菌の生産量はどの程度に見積もられるだろうか。

13) 海洋の極表層（mm単位）には多数の微生物群が集積されているが、これら微生物（とくに細菌類）の分類学的あるいは生理・生化学的性状はどのようなものであろうか。

14) 土壌微生物のフローラは、常在性（autochthonous or indigenous）な種類と醗酵性（zymogenous or fermentation-producing）の種類とに生態学的に区分されることが、すでに Winogradsky [1925] によって提唱されている [Alexander, 1961]。海洋環境においても、上記のような微生物フローラの区分が可能であろうか。またもしも、海に常在性な微生物（特に細菌）フローラが存在するとしたならば、それらはどんな種類の微生物群であり、またどのような生理・生化学的性状を有するものであろうか。

15) 培養法と直接検鏡法とによる菌数算定結果が大幅に相違する最も大きな原因ははたしてなんであろうか。現在用いられている培養法では検出できない微生物群が存在するとしたならば、このような微生物群の性状はどのようなものであろうか。より正確に菌数を算定できる改良方法はな

いであろうか。また、培養法で検出できない微生物群の現場における生態的な意義はどの程度あるであろうか。

以上、種々の課題を列挙したが、もちろんこのほかにも問題があるかもしれない。しかしいずれにしても、上述したような種々の疑問点が解明され、これらの成果が海洋微生物学の体系の中に入り入れられて、将来この学問分野がよりいっそう発展することが切望される。 (多賀信夫)

文 献

- ALEXANDER, M., 1961, *Introduction to Soil Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc., New York and London, p. 472.
- BRISOU, J., 1955, *Microbiologie du milieu Marin*, Éditions Médicales Flammarion, Paris.
- * CERTES, A., 1884, Sur la culture, à l'abri des germes atmosphériques, des eaux et des sédiments rapportés par les expéditions du Travailleur et du Talisman; 1882-1883, *Compt. rend. Acad. Sci.*, **98**, 690-693.
- DREW, G. H., 1913, On the precipitation of calcium carbonate in the sea by marine bacteria, and on the action of denitrifying bacteria in tropical and temperate seas, *J. mar. biol. Ass. U. K.*, **9**, 479-525.
- DROOP, M. R. and WOOD, E. J. E (eds.), 1968, *Advances in Microbiology of the Sea*, Volume 1, Academic Press, London and New York.
- * FISCHER, B., 1886, Bakteriologische Untersuchungen auf einer Reise nach Westindien, *Zeitschr. f. Hyg.*, **1**, 421-464.
- * FISCHER, B., 1894, Die Bakterien des Meeres nach den Untersuchungen der Plankton-Expedition unter gleichzeitiger Berücksichtigung einiger älterer und neuerer Untersuchungen, *Ergebnisse der Plankton-Expedition der Humboldt-Stiftung*, **4**, 1-83.
- * ISSATSCHENKO, B. L., 1914, *Investigations on the bacteria of the glacial Arctic Ocean* (Monograph in Russian), Petrograd, p. 300.
- KRISS, A. E., 1963, *Marine Microbiology [Deep Sea]* (Translated in English by Shewan and Kabata), Oliver and Boyd Ltd., London. [アー・イエー・クリス著, 飯塚 広・山田豊一訳, 1963, 海洋微生物学, 技報堂]
- KRISS, A. E., MISHUSTINA, I. E., MITSKEVICH, N. and ZEMTSOVA, E. V., 1967, *Microbial Population of Oceans and Seas*. (English translation), Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, p. 287.
- MACLEOD, R. A., ONOFREY, E. and NORRIS, M. E., 1954, Nutrition and metabolism of marine bacteria. I. Survey of nutritional requirements, *J. Bacteriol.*, **68**, 680-686.
- MACLEOD, R. A., 1968, On the Role of Inorganic Ions in the Physiology of Marine Bacteria, In DROOP, M. R. and WOOD, E. J. F. (eds.), *Advances in Microbiology of the sea*, Academic Press, London and New York, p. 95-126.
- MORITA, R. Y., 1966, Marine psychrophilic bacteria, *Oceanog. Mar. Biol.: an annual review*, **4**, 105-121.
- MORITA, R. Y., 1968, The basic nature of marine psychrophilic bacteria, *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto Univ.*, No. 12, 163-177.
- OPPENHEIMER, C. H. (ed.), 1963, *Symposium on Marine Microbiology*, Charles C. Thomas Pub.
- * RUSSELL, H. L., 1891, Untersuchungen über im Golf von Neapel lebende Bakterien, *Zeitschr. f. Hyg.*, **2**, 165-206.
- STRICKLAND, J. D. D., 1971, Microbial activity in aquatic environments, In HUGHES, D. H. and ROSE, A. H. (eds.), *Microbes and Biological Productivity*, Cambridge Univ. Press, London, p. 231-253.
- * WINOGRADSKY, S., 1925, Etudes sur la microbiologie du sol. I. Sur la méthode, *Ann. Inst. Pasteur*, **39**, 299-354.
- WOOD, E. J. F., 1965, *Marine Microbial Ecology*, Chapman and Hall Ltd., London, Reinhold Pub. Corp., New York.
- WOOD, E. J. F., 1968, Perspectives in Marine Microbiology, In DROOP, M. R. and WOOD, E. J. F. (eds.), *Advances in Microbiology of the Sea*, Academic Press, London and New York, p. 1-22.
- ZOBELL, C. E., 1946, *Marine Microbiology*, Chronica Botanica, Co.
- ZOBELL, C. E., 1968, Bacterial life in the deep sea, *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto Univ.*, No. 12, 77-96.

(*直接参照できなかったもの)

1 章 海洋微生物の生理学的特性

1.1 海洋細菌の塩分要求

1.1.1 海水の塩分と微生物

海水のもっとも特徴的なことは〈塩辛い〉ことであろう。それは海水は陸水に比し高い濃度の塩分を有しているためである。塩分(salinity)は海水 1 kg 中に含まれる塩類の g 数をいい、ふつう‰で表わす(注)。海水の塩分は河川水、海水の蒸発、結氷、融解等の影響を受け、とくに表面海水ではかなりの差異がある。すなわち河川水の流入の多い内湾ではほとんど 0‰に近く、また日射の強い蒸発の激しい紅海やペルシャ湾などでは 40‰にも達している。

(注) 実際には海水 1 kg に含まれる固形物質の含量を g 単位であらわしたもので、この際、炭酸塩は酸化物に変え、臭素、ヨウ素は塩素で置換し、有機物は完全に酸化したものである。その他塩素量(chlorinity)であらわすこともある。

一般に、外洋の塩分は 33~37‰であり、その主成分は NaCl である。塩分 35‰の海水 1 kg 中に含まれるおもな陽イオンの含量は Na 10.7g, Mg 1.3g, Ca 0.41g, K 0.40g であり、陰イオンは Cl⁻ 19.4g, SO₄²⁻ 2.7g, CO₃²⁻ 0.14g である。そのほか陸上にみられる大部分の元素は海水にも微量成分として含まれている。海水中の総陽イオン量は陰イオン量よりわずかに多く海水は弱アルカリ性を呈し、pH は平均 8 ぐらいである。この塩分は水温などとともに水棲生物の生活に大きな影響をおよぼし、海洋生物は塩分に対して敏感に反応する。比較的塩分の低い内海には外海とは異なった低塩分を好む種類の生物が生息しているが、これも淡水には生存できない。サケ・ウナギなど海洋と河川を往復する魚類は、環境の塩分の激変に対応してホルモンや塩類細胞等生理・生態に大きな変化があり、浸透圧調節機構が完成して後はじめて塩水、淡水に適応する。微生物もあらゆる海洋環境、すなわち表層から水圧 1000 気圧以上という最深部に至る海水や海底泥から分離されているがこれら微生物の塩分に対する反応性はどうか。すでに 19 世紀末には海洋試料によるコロニー形成数は培地に海水または 3% NaCl を入れたとき最高になることが知られている。ZoBell [1946, 1959] も微生物の食塩 (NaCl) 要求度は、その微生物が生息する環境の塩分と一致する傾向があり海水試料の微生物は 2~4% 程度の食塩濃度で生育するものが多いことを認めた(表 1.1)。

この食塩要求度の相違により細菌の分類がなされている。一般に生理的食塩濃度 (0.9%) 以上の食塩をその生育、生存のために必要とし、それ以下の食塩濃度では生育できない細菌を好塩菌(ha-

表 1-1 種々の塩分を含有する寒天栄養培地に生育する細菌数の比較(%) [ZoBell, 1959]

試料	寒天栄養培地の塩分 (%)						
	0.5	1.0	2.0	3.5	7.0	10.0	25.0
海水	19.2	39.0	86.9	100.0	37.2	13.8	0.2
海泥	24.1	35.4	78.7	100.0	44.5	9.4	0.3
塩田	4.8	7.1	10.3	18.8	51.2	60.3	100.0
塩湖(Great Salt Lake)	2.2	5.8	13.0	25.3	38.6	68.2	100.0
土壌	100.0	79.1	61.7	24.4	10.9	5.3	0.4
下水	100.0	69.2	43.5	13.8	6.7	2.8	0.0

lophilic bacteria) または偏性好塩菌 (obligate halophilic bacteria) と称しているが、実際には2%または3%以上の食塩を要求する細菌をいう場合が多い。食塩含量の低い培地にも高い培地にも生育できる細菌を耐塩菌 (halotolerant bacteria) または通性好塩菌 (facultative halophilic bacteria) と呼んでいる。一方、食塩があるところでは生育できない細菌を非好塩菌 (non-halophilic または halophobic bacteria) と称し、表1-1のごとく、陸棲細菌にはこの種類が多い。好塩菌の分類は人により異なり、たとえば Larsen [1962] は2%以上の NaCl を要求するものを好塩菌と総称し、生育至適 NaCl 濃度が2~5%であるものを弱好塩性 (slightly halophilic)、5~20%であるものを中好塩性 (moderately halophilic)、20~30%であるものを強好塩性 (extremely halophilic) として分類している。一方 Gibbons [1969] は3%以上の食塩を要求するものを好塩菌と称し、3~15%食塩が存在するときのみ生育するものを moderate halophiles、15%以上の NaCl を要求するものを extreme halophiles と定義している。細菌の食塩要求性は安定なものでないとの報告 [ZoBell, 1946] もあり、また細菌の生育至適食塩濃度は他の塩類、栄養素、温度等の環境条件にも影響を受けるので、食塩濃度による細かい分類は意味がないと思われる。しかし強好塩菌は種類も限られ遺伝的に他の細菌と明確に区別できる。

一方、海洋微生物 (marine microorganisms) とは海洋環境に生息し増殖し海水を要求するもののみを称しているが海洋環境に生息・増殖している微生物全部を海洋微生物というべきであろう。

海洋微生物としては細菌以外に酵母、カビ、藻類、ファージなどがあるが、その好塩性に関する研究は少ない。ここでは主として海洋細菌のみを取り上げるが、それも比較的よく研究されているのは MacLeod らによる弱好塩性海洋細菌 *Pseudomonas* sp., type IV (Pseudomonad B16) などの特定の菌株に限られているようである。一般の好塩微生物についてはすでに論じた [丸山, 1971]。

1-1-2 海洋微生物の塩分要求性

(1) 海洋細菌

海洋細菌を海洋環境で生育できる海棲細菌とすれば海洋細菌は海水の塩分濃度で生育できる耐塩菌、または好塩菌であろう。海洋から分離される一般従属栄養細菌の大部分はグラム陰性の桿菌であり、その多くは生育のために海水または2~4% NaCl を要求する [ZoBell, 1946]。Hidaka [1965] は北太平洋等から分離した275菌株の生育試験を行なったが、分離菌の32%は人工海水培地のみで生育する真の海棲細菌であり、18%はNaCl (3%) を要求する好塩菌であり、残りの50%は人工海水、NaCl 培地のほか純水培地にも生育できる陸棲細菌に分類すべき細菌であったと報告している。海洋従属栄養細菌としては好塩菌が少ないがこの実験に用いられた菌の49%が

ラム陽性菌であったためと考えられる。グラム陽性球菌は一般に好塩菌が少なく耐塩菌が多い。

MacLeod [1968] はアミノ酸, グルコース, ビタミン類等からなり, 塩類をほとんど含まない合成培地を調製し, この培地を用いて海洋細菌の塩分要求につき詳細な研究を行ない次の結果を得た。すなわち海水から分離された菌の 95% はグラム陰性桿菌であり, その大部分は生育のために Na^+ を要求したが残りの 5% はグラム陽性菌で Na^+ をほとんど含まない培地に生育できた。

海水培地に最もよく生育する 6 株の海洋細菌の塩類要求が調べられたが全部の菌が Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} と鉄を要求し, 2 株はそのほかに Ca^{2+} を 3 株は Cl^- を要求した。他の 3 株も Cl^- があつたほうがはるかによく生育した。 Cl^- は Br^- で置き換えることができるが I^- は生育を阻害するようである [MacLeod and Onofrey, 1956]。

著者ら [Maruyama *et al.*, 1970; 丸山, 1973; 丸山, 本書 3・2・4] は 2 種類の無窒素培地を用い種々の海洋試料から多数の窒素固定微生物を分離したが, 一般の海洋従属栄養菌と異なり比較的多数のグラム陽性細菌, 酵母等が認められた。これら分離細菌について塩類要求性試験法 [Colwell, 1970] に従って Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} の要求性を調べた。この結果を表 1・2 [丸山・乙部, 未発表] に示した。試験した細菌の

表 1・2 海水, 海底土, プラクトン試料より分離された窒素固定菌 (N菌) の Na 要求性 [丸山・乙部]

試料	菌株数	Na ⁺ 要求性			
		+		-	
		グラム染色		グラム染色	
海水 中部太平洋 相模湾・駿河湾	67	24	+0	43	+32
			-24		-11
プラクトン 中部太平洋	31	7	+0	24	+16
			-7		-8
海底土 日本海, 東京湾 相模湾, 駿河湾	33	17	+0	16	+10
			-17		-6

37% が Na^+ (0.4M) を要求し, その全部がグラム陰性菌であった。残りの 63% は Na^+ を要求せず, その 70% はグラム陽性菌であった。まだ例数が少ないが各試料により Na 要求性に多少の違いが見られ, たとえば海底土から分離される細菌はプラクトン付着菌や海水からの分離菌等に比し NaCl 要求菌が多

かった。この条件下では K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} に対する要求性を示す菌株は認められなかった。なお調べた酵母菌の大部分は Na^+ を要求しないが, かなり高濃度の NaCl 培地にも生育できる耐塩性を示した。海洋菌といっても分離培地組成によりかなり性質の違った菌が分離されるようである。

海洋菌の生育可能な上限 NaCl 濃度は菌により異なるが好塩菌では 10% NaCl 濃度のものが多い。

細菌の生育至適食塩濃度や生育阻止食塩濃度は栄養塩, 温度等の環境条件に影響される。Stanley and Morita [1968] は, 海洋低温細菌 *Vibrio marinus* の生育下限食塩濃度 0.15M での生育至適温度は 11.6°C であるが, 0.35~0.45M NaCl での最高生育温度は 19.8°C であることを認めた。

陸棲細菌も微量の塩類を要求するものもあり, 上述の塩分要求性に関し, 陸棲細菌と異なる海洋細菌の特徴は比較的高濃度 (3%) の NaCl を要求するものが多いことであろう。

(2) 強好塩菌

塩蔵品, 塩湖, 塩田, 岩塩などから 20% 以上の NaCl を含む培地に生育する好塩菌が分離され

ているが、その大部分は、*Halobacteria* 群と *Sarcina-Micrococcus* 群のどちらかに属しカロチノイド系赤色色素をもっているのが紅色好塩菌 (red halophiles) と呼ばれている。*Halobacteria* はグラム陰性桿菌でその生育至適食塩濃度は 25~30% で、12~20% NaCl 以下では生育は阻害され、5~10% NaCl 以下で溶菌する。後者は *Sarcina* 属と *Micrococcus* 属に属す紅色好塩球菌として分類されているがいずれも性質がきわめて類似しているため、独立した *Halococcus* 属とする提案もある。生育至適食塩濃度は 20~25% で、5~10% 以下では生育できないが純水中でも溶菌は起こらず *Halobacteria* より好塩性は少ない。強好塩菌はふつうの海洋環境では生育に不適であり、典型的な海洋細菌ではないが好塩性の研究にはよく使われている。

(3) その他の海洋微生物

多数の酵母、カビ、藍藻、ファージ等も海洋環境から分離されているが、これら微生物の塩分要求に関する研究は細菌に比し少ない。大部分の海洋性酵母、カビは淡水培地でも、食塩培地でも生育でき生育限界食塩濃度 10~25% 程度の比較的高い耐塩性を持つものが多い。しかし下等菌類の藻状菌等には生育至適食塩濃度 2% 程度の好塩性を持つものが報告されている [Vishniac, 1960]。1~4% NaCl 培地のみ生育する海洋性藍藻について 2, 3 の報告がある。Spencer [1955] による海洋性バクテリオファージの分離をはじめ、いくつかの海洋菌を溶菌する海洋起源のファージが分離されているが、その生存、溶菌のために Na^+ と Mg^{2+} が必要とされている。

1.1.3 細菌細胞に対する塩類の作用

(1) 細胞内塩類濃度

好塩菌の細胞内にはいかなる種類の塩分がどの程度含まれているのであろうか。海洋細菌 *Pseudomonas* B16 についての実験 [Matula *et al.*, 1970] によれば、 Na^+ と Cl^- の場合は外液の濃度と細胞内濃度はほぼ一致していたが、 K^+ の場合、細胞内濃度は細胞外濃度に比し 10~30 倍も高かった。強好塩菌ではこの傾向はさらに著しく、 Na^+ や Cl^- の細胞内濃度は外液濃度よりやや低いが、 K^+ の場合細胞内 K^+ は細胞外 K^+ の 100 倍以上にもなり、ほとんど飽和に近い濃度まで細胞内に濃縮される [Christian and Waltho, 1962]。なお後述するごとくこのような K^+ の細胞内蓄積には Na^+ が必要である。陸棲の非好塩菌でもこの傾向が認められるが非好塩菌の細胞内 K^+ 含量は、その菌の耐塩性に比例しており、外液の高濃度塩類の脱水作用や、原形質分離作用に対する抵抗力の原因となっている。

このように NaCl は好塩菌の細胞膜を比較的自由に出入でき、細胞内外の濃度が同じになることや Na^+ を sucrose + K^+ で完全に置換できないことなどから NaCl の役割はたんなる溶菌を防ぐ浸透圧作用に関係することではないと思われる。

細胞内 K^+ の存在状態につき、Lanyi and Silverman [1972] は強好塩菌 *H. cutirubrum* を凍結、融解して溶菌し、透析すると細胞内 K^+ は容易に定量的に外液に拡散したが Mg^{2+} は透析されなかったことを認め、 K^+ は Mg^{2+} のような結合形ではなく遊離の状態であると推論している。

(2) 物質の細胞膜透過

好塩菌の生育に NaCl がとくに必要であるひとつの理由は栄養物質の細胞膜透過の際 NaCl を必要とし、他の塩では代用できないからである。Payne [1960] は海洋菌 *Pseudomonad* M11 のグルクロン酸酸化酵素系の誘導に、NaCl (0.25M) と K^+ (0.007M) を必要とするが、この際とくに NaCl は基質の膜透過に必要であることを認めた。Li⁺, Rb⁺, Cs⁺ には Na⁺ や K^+ の働きはない。海洋菌 *Pseudomonad* B16 [MacLeod, 1971] の D-galactose の膜透過, K^+ の能動輸送や無機磷酸の細胞内取込みに Na⁺ が必要であった。またこの菌により代謝されないアミノ酸アナログの α -アミノイソ酪酸 (AIB) の細胞内取込みに Na⁺ と K^+ が必要であり、細胞内に蓄積された AIB の維持にも細胞膜透過に要した濃度と同濃度の Na⁺ が必要であった。基質の膜透過の際要求される Na⁺ は Li⁺ や K^+ などで代用できないが、細胞外漏出を防ぐ Na⁺ の作用は Li⁺ などの 1 価陽イオンである程度置換できる。

強好塩菌 *H. salinarium* の場合もグルタミン酸を細胞内に取り入れる際高濃度の NaCl を要求し、同濃度の KCl, CH₃COOK または CH₃COONa は NaCl の代りになることはできない [Stevenson, 1966]。

Thompson and MacLeod [1971] は基質の細胞膜透過に対する Na⁺ と K^+ の作用機作に関し、細胞内 K^+ を取り除いた *Pseudomonad* B16 を用いた実験結果から 1 つの仮説を提唱している。この菌は 0.3 M NaCl, 0.05 M MgSO₄, 0.01 M KCl 溶液中では細胞内に 0.3 M K^+ を蓄積するが、この菌を 0.05 M MgSO₄ 溶液で洗うと細胞内 K^+ の 95~98% が溶出される。この K^+ 欠細胞は K^+ を加えないと 0.3 M NaCl, 0.05 M MgSO₄ 液中では α -AIB を蓄積しない。 K^+ 以外の他の陽イオン、たとえばよく K^+ のかわりに使われる Rb⁺, Cs⁺ でもこの働きはない。しかし K^+ 欠細胞を濃密な懸濁液にして①この菌の細胞壁を通過しないイヌリン、②細胞壁は通過するが細胞質膜を通過しない sucrose、③細胞壁も膜も通過するグリセリンの取り込みを AIB の取込みと比較してみると、AIB は細胞内に蓄積されないが Na⁺ (0.3 M) があると③のグリセリンの場合と同じく細胞質膜を通過していることがわかった。この働きは Na⁺ に特異的であり K^+ や Li⁺ は Na⁺ の代りにはならない。Na⁺ 存在下での AIB 細胞質膜透過は AIB と構造的に類似しているグリシン、セリン、アラニンにより拮抗的に阻害されるが、類似していないバリン、イソロイシンでは阻害されない。その他これらの系の動力学的解析などや動物細胞の能動輸送の機構等を参照して Na⁺ は海洋菌の細胞質膜の表面で膜透過酵素 (パーミアーゼ) のような基質特異性を持つ担体と結合して、担体と基質との親和性を高め、その結果 Na⁺-担体-基質複合体が形成され、膜の内側に運ばれる。このときエネルギー供与系と K^+ があると Na⁺-担体の基質に対する親和性が減り基質は細胞内に放出蓄積される。担体は再び膜の外側表面にもどり基質と結合できる活性形にもどる。

この説は興味深いものであるがなお高濃度の NaCl の必要性、基質蓄積過程における Na⁺ の関与の有無、および K^+ の役割など不明な点が多く今後の研究にまたなければならない。

(3) 細胞膜構造と塩類との関係

海洋好塩細菌の中には淡水または NaCl 希薄溶液中で溶菌するもの、部分的な変形を受けるもの、全然影響されないものがあるが、容易に溶菌する菌の細胞膜構造は非好塩菌の膜構造といかなる差異があるのだろうか。電子顕微鏡的観察によれば *Pseudomonad* B16 の細胞膜はおのおの