

炭酸カルシウムの沈積に關与する海洋微生物に關する研究 IV

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	信濃, 晴雄
卷/号	38卷8号
掲載ページ	p. 825-832
発行年月	1972年8月

炭酸カルシウムの沈積に關与する 海洋微生物に關する研究—IV.

炭酸カルシウムの沈積に關与する 海洋細菌の分類学的検討 (2)

信 濃 晴 雄

(1972年2月24日受理)

Studies of Marine Microorganisms Taking Part in the Precipitation of Calcium Carbonate—IV. A Taxonomic Study of Marine Bacteria Taking Part in the Precipitation of Calcium Carbonate (2)

Haruo SHINANO*

A taxonomic investigation of the bacteria, 453 strains of gram negative and monopolar flagellated rods, taking part in the precipitation of calcium carbonate, is described in this paper. The method of classification according to Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology* and SHEWAN's scheme was adopted in this study.

The results obtained were summarized as follows:

1. Four hundred and fifty three strains belonged to the 3 genera, *Alginomonas* (116 strains), *Vibrio* (5 strains) and *Pseudomonas* (332 strains).
2. One hundred and sixteen strains belonging to the genus *Alginomonas* were identified as *A. fucicola* (66 strains), *A. nonfermentans* (26 strains), *A. alginovora* (23 strains) or *A. alginica* (1 strain).
3. All the strains belonging to the genus *Vibrio* were identified as *V. phytoplanktis*.
4. Three hundred and twenty four strains among the 332 strains belonging to the genus *Pseudomonas* were identified as *P. calcis* or *P. calciprecipitans* and 8 strains could not be identified.

本報では前報¹⁾に引き続き炭酸カルシウムの生成に關与する海洋微生物のうち、単極毛を有して運動性の認められるグラム陰性桿菌 453 株について分類学的検討を行なつたのでその結果について報告する。

実 験 方 法

海水由来の炭酸カルシウムの生成に關与する細菌 653 株中、グラム陰性桿菌で単極毛を有し運動性の認められたものは 453 株であるが、これらの分類学的検討は主として Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology*²⁾ および SHEWAN^{3,4)} の方法に準拠して行なつた。なお、特記しないかぎり基礎培地は第 2 報⁵⁾で述べた組成のものを使用し、培養はいずれも 25°C で行なつた。

形態学的性状 基礎斜面培地に供試菌を接種し、24~48 時間培養した菌体細胞について形状、運動性、鞭毛の状態、グラム染色性などを第 2 報で述べたような方法で観察した。またポテト培地および基礎斜面培地において 7-21 日培養後の発育および産生色素の色調を観察した。

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

生化学的性状 糖からの酸の産生および糖の代謝様式, 硝酸塩の還元, インドールの産生, アンモニアの産生, リトマスミルクに対する態度, でん粉の水解, ゼラチンの水解, キチンの分解, 炭素源としてクエン酸塩の利用などの検査は前報で述べた方法と同様な方法によつた。またオキシダーゼ試験は KOVACS の法⁶⁾, アルギン酸の分解能検査は木村の法⁷⁾によつて行なつた。

生物学的性状 食塩を 12% (w/v) 含む培地における発育は食塩濃度を 12% (w/v) にした LYMAN and FLEMING の人工海水を使用して調製した ZOBELL 2216 E 培地⁸⁾に供試菌を接種, 5日後の発育の有無を観察した。またブイヨンにおける発育は普通ブイヨンに供試菌を接種, 5日後の発育の有無を観察した。

結果および考察

Bergey's *Manual* では, 好気性のグラム陰性桿菌で単極毛を有して運動性の認められるものはすべて Family Pseudomonadaceae および Spirillaceae に包含され, さらに種々の形態学的, 生化学的および生物学的性状により Family Pseudomonadaceae は 12 属に, Family Spirillaceae は 10 属に分類されている。またこれらの中でアルギン酸を分解するものはすべて Family Pseudomonadaceae 中の genus *Algino-* *monas* に編入されている。本報の供試菌株の中でアルギン酸分解性を有することから genus *Algino-* *monas* に所属させられた菌株は 116 株であつた。なお, グラム陰性桿菌の分類については不明確な点が多く, 特に genus *Pseudomonas* と genus *Vibrio* の鑑別には種々の困難が伴ない従来から分類上の混乱が問題視され

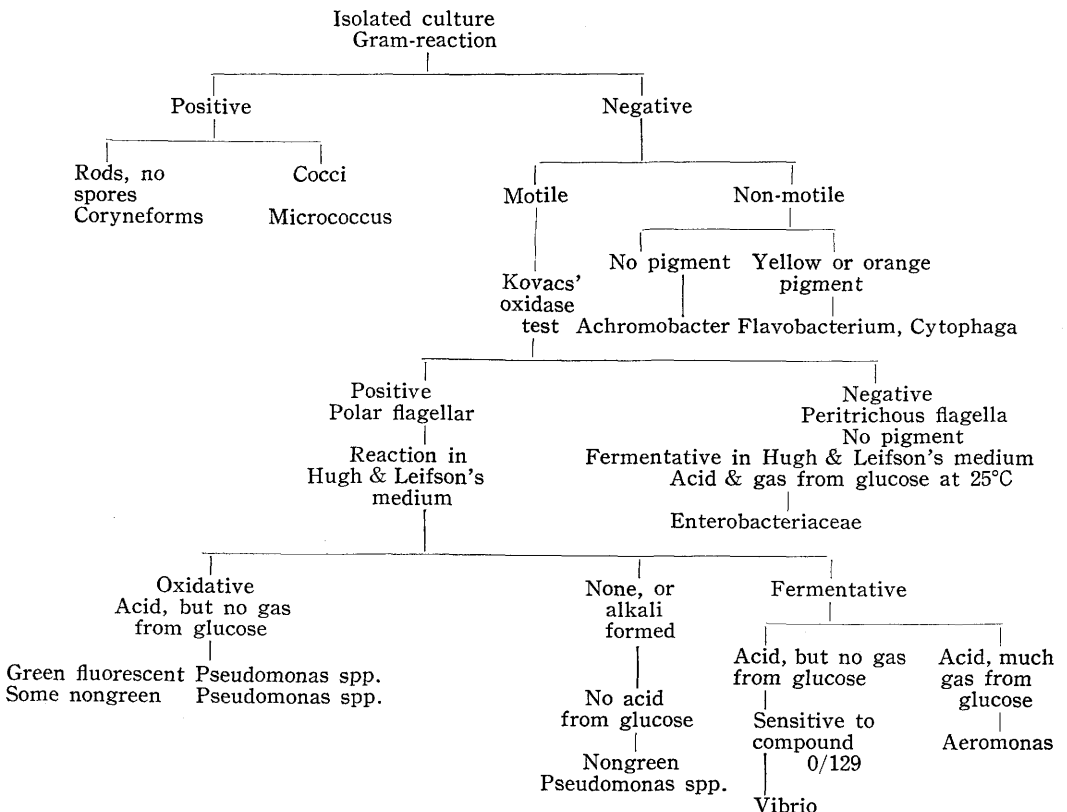


Fig. 1. An outline of the sequence of tests used in the screening of cultures (by SHEWAN, 1960)

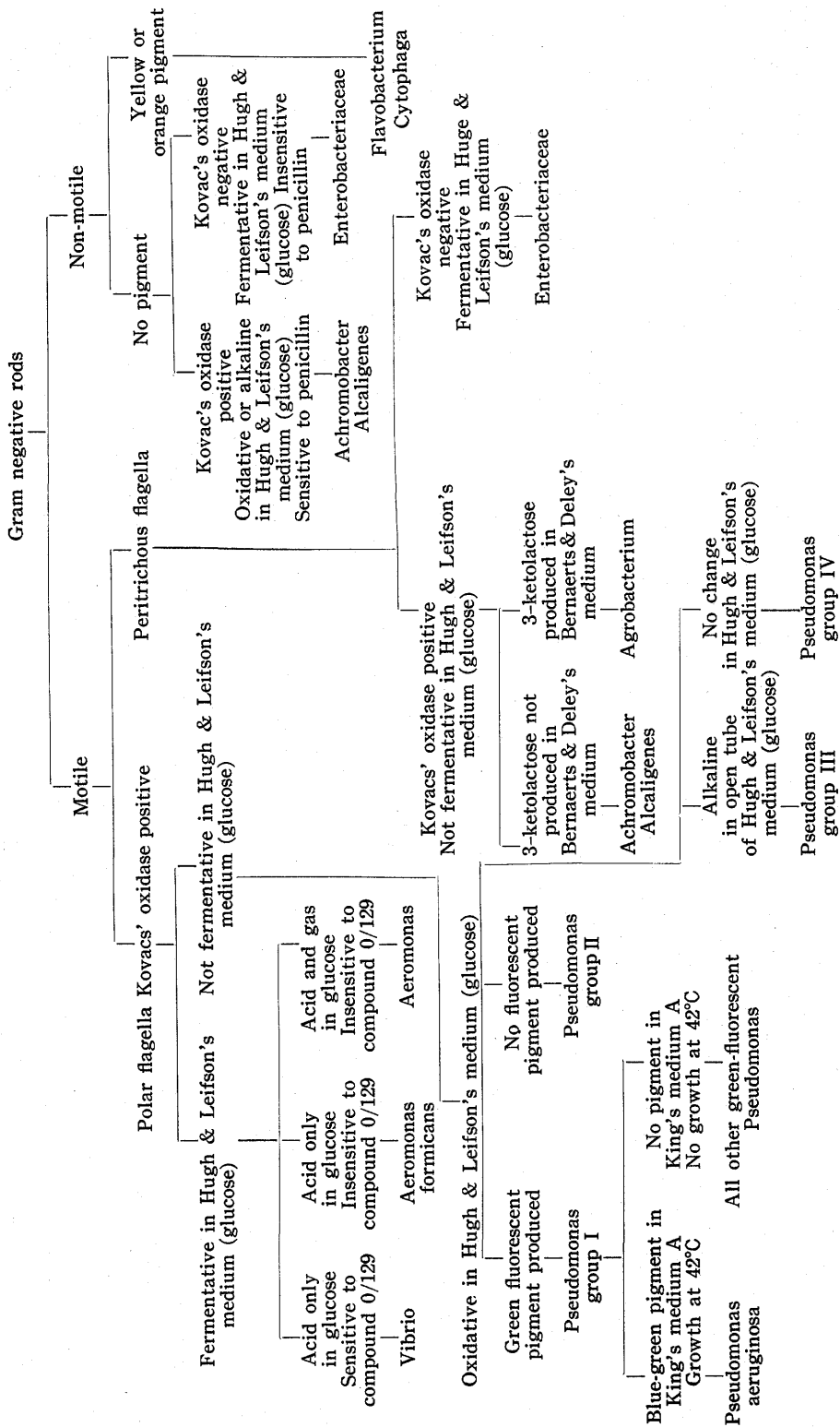


Fig. 2. Determinative scheme for the identification of certain Gram-negative rods (by SHEWAN, 1964)

てきたが、SHEWAN ら⁹⁾は 1954 年に 2, 3 の抗性物質と vibriostatic compound 0/129 (2:4-diamino 6:7-diisopropyl pteridin) に対する感受性により genus *Pseudomonas* と genus *Vibrio* とを鑑別する方法を報告し、また 1960 年⁹⁾にはグラム陰性桿菌について、運動性、オキシダーゼ試験、鞭毛の位置、および HUGH and LEIFSON¹⁰⁾の好氣的ならびに嫌氣的条件下におけるグルコース分解態度によるグラム陰性桿菌の分類法などを取り入れ Fig. 1 に示すような scheme を作製してグラム陰性桿菌の新分類法を提案し、またその後 1964 年⁴⁾にはさらにこれに多くの研究者の知見を取り入れて Fig. 2 に示すようなより詳細なグラム陰性桿菌の分類に対する scheme を提示している。この方法は DAVIS and PARK¹¹⁾、BROWN and WEIDMAN¹²⁾、LYSENKO¹³⁾ および RHODES¹⁴⁾らの総括的な *Pseudomonas* の分類学的研究あるいは *Pseudomonas* と *Vibrio* の各種性状の比較検討などによつてその妥当性が認められたと考えてよいであろう。供試菌 453 株中、前記のアルギン酸を分解することから genus *Alginomonas* に所属する 116 株を除く 337 株について、上記の SHEWAN の scheme によつて分類を行なうと、5 株が genus *Vibrio* に、332 株が genus *Pseudomonas* に分類される。以下、*Alginomonas*、*Vibrio* および *Pseudomonas* のそれぞれについて genus 別に述べることとする。

genus *Alginomonas* Bergey's *Manual* では genus *Alginomonas* はゼラチンの水解性とポテト培地における発育の有無およびその産生色素の色調のみを species key として分類が行なわれており、海水由来の 3 species を含めて 5 species が記載されている。Table 1 に示すように 116 株のアルギン酸分解菌を上記の species key により分類すると、26 株が *Alginomonas nonfermentans*、23 株が *A. alginovora*、66 株が *A. fucicola* および 1 株が *A. alginica* に同定される。

A. nonfermentans に同定された 26 株は、いずれもゼラチンを水解するとともにポテト培地に発育して褐色系色素を産生する菌株であるが、その他の性状においては Bergey's *Manual* の記載と異なる点も多い。すなわち Bergey's *Manual* によれば、この species はインドールおよび硫化水素を産生するが炭素源としてクエン酸塩を利用しない。また糖類から酸を産生せず、硝酸塩を還元すると記載されている。しかしながら上記の *A. nonfermentans* と同定された 26 株はグルコース、シュークロース、ラクトースのいずれの糖からも酸を産生するものが多く、グルコース、シュークロースからは全株が酸を産生し、ラクトースから酸を産生しない菌株は 2 株、マンニトから酸を産生しないものは 1 株に過ぎない。また 26 株中 17 株は硝酸塩を還元、8 株は炭素源としてクエン酸塩を利用し、17 株はペプトンから硫化水素を産生するが、インドールを産生する菌株はなかつた。一方形態学的な面においても、この species は 1~4 本の極毛を有し、形状も球状に近い桿菌とされていることなど、上記の *A. nonfermentans* と同定された 26 株の菌株とはかなりの相違点がみられる。このことは genus *Alginomonas* における分類上の species key に採用されている性状項目が少ないことに起因する結果と考えられる。

次に *A. alginovora* および *A. fucicola* に同定された菌株はそれぞれ 23 株および 66 株であるが、この 2 species は *A. alginica* と共に海水由来の菌種で、海洋において普通にみられる species とされている。しかし Bergey's *Manual* には生化学的性状についての記載がないので比較検討はできないが、*A. nonfermentans* の場合と同様に、これらの species に編入される菌株の性状はきわめて多岐にわたることが Table 1 に示す結果からも容易に推察される。なお、*A. fucicola* について WAKSMAN ら¹⁵⁾はこの species の特性として暗褐色または黒色に近い色素の産生を記載しているが、*A. fucicola* に同定された 66 株中にそれに該当するものは認められなかつた。

また、*A. alginica* に同定された菌株は僅か 1 株に過ぎないが、従来からこの *A. alginica* は運動性は認められながらもその鞭毛の位置および数は不明とされてきた species である。なお、最近 ADAMS ら¹⁶⁾はこの species を周毛菌であるとし、これを genus *Alginomonas* から Family *Achromobacteraceae* 中の genus *Agarbacterium* に移すべきであるとの見解を報告している。

genus *Alginomonas* は海洋に広く分布し、この genus の分類法の確立は、今後きわめて重要な課題になるものと考えられる。

Table 1. Physiological characteristics of the 116 strains belonging to genus *Alginomonas*.

Genus	<i>Alginomonas</i> (116)																												
	<i>non-fermentans</i> (26)				<i>alginovora</i> (23)				<i>fucicola</i> (66)			<i>alginica</i> (1)																	
Species																													
Character																													
Hydrolysis of gelatin	+				+				+			-																	
alginate acid	+				+				+			+																	
Growth on potato	+				+				-			-																	
Color on potato	Gray or brown				Ivory				-			-																	
Acid from glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+													
sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+													
lactose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+													
mannite	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+													
Nitrate reduction	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-													
H ₂ S production	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-													
Utilization of citrate	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+													
No. of strains	5	2	3	6	5	1	1	1	1	1	1	1	6	11	6	16	2	5	1	1	2	6	4	1	1	1	1	1	1

Table 2. Morphological and physiological characteristics of the strains belonging to genus *Vibrio*.

Character	Genus	
	<i>Vibrio</i> (5)	<i>phytoplanktis</i> (5)
Gram stain	- - -	
Motility	+ + +	
Pigment*	C C C	
Production of acid from		
glucose (anaerobic)	+ + +	
glucose (aerobic)	+ + +	
sucrose	- + +	
lactose	- - +	
Oxidase production	+ + +	
Ammonia production	+ + +	
Hydrolysis of gelatin	+ + +	
starch	+ + +	
chitin	+ + +	
Indol production	- - -	
H ₂ S production	+ + +	
Citrate utilization	- - -	
Nitrate reduction	+ + +	
Digestion of agar	- - -	
casein	+ + +	
Litmus milk	- - -	
Growth in nutrient broth prepared with fresh water	- - -	
No. of strains	2 1 2	

*: C=Cream

しないなど、*V. phytoplanktis* の記載に一致する点もきわめて多いことから、これらの5菌株は *V. phytoplanktis* にきわめて近縁な菌株で、*V. phytoplanktis* と同定して差支えないものと考えられる。

genus *Pseudomonas* 供試菌 453 株の中で **genus *Pseudomonas*** に属する菌株は 332 株であるが DREW¹⁷⁾ および MOLISCH¹⁸⁾ により海洋における炭酸カルシウムの生成に関与する細菌として報告された海水由来菌は *Bergey's Manual* にそれぞれ *Pseudomonas calcis* および *P. calciprecipitans* として記載されている。この海水由来の 2 species は色素産生能なく、ゼラチンを水解し、単極毛を有し運動性が認められ、寒天分解能なく海水を使用したゼラチンおよび寒天培地において炭酸カルシウムを生成し、食塩濃度 12% から 30% において発育しないとされているが、両者の明確な鑑別 key はない。

供試菌株中の **genus *Pseudomonas*** に所属する 332 株を上掲の species key に従って検討すると、まずゼラチンの水解性の認められないものが 8 株存在し、このことから、これら 8 株は明らかに *P. calcis* あるいは *P. calciprecipitans* とは異なる菌株である。*Bergey's Manual* では海水由来の *Pseudomonas* でゼラチンを溶解しない species の記載はないが ZOBELL and UPHAM¹⁹⁾ は海洋環境から分離した *Pseudomonas* の中でゼラチン溶解性の認められないものとして *P. neritica*, *P. perfectmarinus*, *P. sessilis*, *P. azotogena*,

genus *Vibrio* SHEWAN の scheme により **genus *Vibrio*** に所属される菌株は供試菌 453 株中の 5 株である。**genus *Vibrio*** は *Vibrio comma* を中心に医学の分野において研究史の古い **genus** であるが、海洋由来の *Vibrio* としては発光性、寒天分解能、色素産生能、ゼラチンの水解性、硝酸塩の還元能、海水の要求性などを species key として 9 species が記載されている。すなわち、*Bergey's Manual* ではグルコースから酸を産生し、発光性、寒天分解能ともなく、発育に海水を必要とする species として水溶性の暗褐色の色素を産生する *V. marinopraesens*, 淡褐色またはクリーム色の色素を産生する *V. phytoplanktis* の 2 species, また発光性を有し寒天分解能の認められるものとして *V. luminosus*, *V. indicus*, *V. agarliquefaciens*, *V. andoi*, *V. granii* および *V. beijerinckii* の 6 species が、次に炭水化物から酸の産生の認められない species として *V. adaptatus* および *V. hyphalus* の 2 species が記載されている。

供試菌 453 株中、**genus *Vibrio*** に所属せしめた 5 株はゼラチンの溶解性、硝酸塩の還元能およびでん粉の水解性など、*V. phytoplanktis* と同定するには生化学的性状において異なる点も認められることからいささか疑義が持たれるが、これら 5 株は Table 2 に示すようにいずれもグルコースから酸を産生し、発光性、寒天分解能ともに認められず、海水要求性を有し海水寒天培地上においてクリーム色の色素を産生するとともにインドール産生能なく、カゼインを消化、硫化水素を産生し蒸留水で作製した普通ブイヨンに発育せず、リトマスミルクを変化

Table 3. Physiological characteristics of the species of *Pseudomonas calcis* or *Pseudomonas calciprecipitans*.

Character	Species	<i>Pseudomonas calcis</i> or <i>P. calciprecipitans</i> (324)													
Pigment production		-													
Hydrolysis of gelatin		+													
Digestion of agar		-													
Deposition of CaCO ₃		+													
Indol production		-													
Growth in 12-30% salt solution		+ or -													
Production of acid from glucose (anaerobic) glucose (aerobic)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	mannite	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	lactose	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Nitrate reduction		+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
No. of strains		30	34	19	11	16	50	8	136	3	4	3	8	1	1

P. aestumarina, *P. stereotropis* および *P. xanthochrus* の 7 株を新種として記載しているが、これらの菌種はいずれも鞭毛が束毛でしかも両極毛性であり、形態学的に前記 8 株と異なるのみならずまた生化学的性状においても硝酸塩の還元能、糖からの酸の産生、でん粉の水解性など異なる点が多い。また *Bergey's Manual* では塩水由来の *Pseudomonas* としてゼラチン溶解性なく単極毛を有し、セルローズの分解能が認められないものとして *P. beijerinckii* を記載しているが、この species の特徴として紫色の色素の産生が掲げられているために、供試菌株中 genus *Pseudomonas* に属する菌株でゼラチン溶解性の認められない 8 株は既知の genus *Pseudomonas* に属するいずれの species と同定できなかつた。

残る 324 株は Table 3 に示すようにいずれも *P. calcis* あるいは *P. calciprecipitans* と同定される菌株と考えられるが、この中の 276 株は LYMAN and FLEMING の人工海水の食塩濃度を 12% として作製した ZOBELL 2216 E 培地において発育が認められた。しかしながら *Bergey's Manual* においても 12-30% の食塩濃度の海水培地に発育しないとする species key は第 2 義的な性状として取り扱われており、またこのような性状が species の同定における決定的要因となることには疑義を抱かざるを得ない。このような点を考慮するならば、食塩濃度 12% の海水培地に発育の認められた 276 株は *P. calcis* あるいは *P. calciprecipitans* と同定して差支えないものとする。

本実験を遂行するに当たり、種々有益な御助言をいただいた坂井 稔教授、木村喬久助教授、絵面良男助手に厚くお礼申し上げます。

要 約

海水由来の炭酸カルシウムの生成に関与する細菌の中、グラム陰性桿菌で単極毛を有し運動性の認められた 453 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 453 株中 116 株が genus *Alginomonas* に、5 株が genus *Vibrio* に、また 332 株は genus *Pseudomonas* に属する菌株であつた。
2. genus *Alginomonas* に属する 116 株は 66 株が *Alginomonas fucicola* に、26 株が *A. non-fermentans* に、また 23 株が *A. alginovora* に、また 1 株は *A. alginica* に同定された。
3. genus *Pseudomonas* に属する 332 株中 324 株が *P. calcis* あるいは *P. calciprecipitans* に同定されたが、残る 8 株は同定し得なかつた。

文 献

- 1) 信濃晴雄: 本誌, 38, 727-732 (1972).
- 2) R. S. BREED *et al.*: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1094 pp., Williams and Wilkins, Co., Baltimore (1957).
- 3) J. M. SHEWAN *et al.*: *J. appl. Bact.* 23, 379-390 (1960).
- 4) J. M. SHEWAN *et al.*: *Annals de l'Institut Pasteur de Lille* 15, 43-49 (1964).
- 5) 信濃晴雄: 本誌, 38, 717-725 (1972).
- 6) N. KOVACS: *Nature*, 178, 703 (1956).
- 7) 木村喬久: 北大水産学部研究彙報, 12, 41-48 (1961).
- 8) C. E. ZOBELL: *J. Marine Res.*, 4, 173-188 (1941).
- 9) J. M. SHEWAN *et al.*: *Nature*, 173 208 (1954).
- 10) R. HUGH and F. LEIFSON: *J. Bact.*, 66, 24-26 (1953).
- 11) G. H. G. DAVIS and R. W. A. PARK: *J. Gen. Microbiol.*, 27, 101-119 (1962).
- 12) A. D. BROWN and J. F. WEIDEMANN: *J. appl. Bact.*, 21, 11-17 (1958).
- 13) O. LYSENKO: *J. gen. Microbiol.*, 25, 379-408 (1961).
- 14) M. E. RHODES: *ibid.*, 21, 221-263 (1959).
- 15) S. A. WAKSMAN *et al.*: *J. Bact.*, 28, 213-220 (1934).
- 16) J. N. ADAMS *et al.*: *ibid.* 81, 162-163 (1961).
- 17) G. H. DREW: *Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 182*, 7-45 (1914).
- 18) V. V. MOLISCH: *Cent. f. Bact.*, II Abt., 65, 130-139 (1925).
- 19) C. E. ZOBELL and H. C. UPHAM: *Bull. Scripps Inst. Oceanogr. Univ. Calif.*, 5, 239-292 (1944).