Title	低温(5)貯蔵中における海水中の菌叢の変化
Author(s)	田島, 研一; 絵面, 良男; 坂井, 稔
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 22(1), 80-90
Issue Date	1971-05
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24222
Туре	bulletin (article)
File Information	22(1)_P80-90.pdf



低温 (5°C) 貯蔵中における海水中の菌叢の変化

田島 研一・絵面 良男・坂井 稔*

Variation in the Bacterial Flora in Chill Stored Sea Water

Kenichi Tajima, Yoshio Ezura and Minoru Sakai

Abstract

Monthly bacterial tests for a 3-month period provided evidence of a variation in the bacterial flora in chill stored sea water sampled in summer and winter seasons. Some evidences were also obtained from a seasonal variation in the qualitative composition of the flora, genus Micrococcus appearing more frequently in the summer water, immediately after sampling, while genus Achromobacter was dominant in the winter water. The rapid and greatest loss of their viability occurred during chill storing of the waters, but gram negative rods to be the most common organisms in the sea water were currently encounted for a long period. It appeared that the peptone (polypeptone, Daigo) have a marked effect on the variation of the flora within 3-month chill storage of the sea water. The flora, however, after its storage, was similar to that found at the sampling of both summer and winter sea waters with and without peptone, except that genus Micrococcus appeared in the summer while genus Achromobacter was dominant in the winter. It was found that marine type (M-type) occupied a much larger proportion in the winter flora while terrestrial type (T-type) increased in the summer flora, through the typing of isolates by modified Hidaka and Sakai's salts requirement test. The peptone also have a great effect on the variation of the isolated types within 3-month period chill preservation. The tendency of the variation, however, was similar to that described above after its longer period preservation. Further study should be made to learn the reason why there are differences in growth temperature and in salts requirement in the isolates of the same genus.

緒 営

前報¹⁾ においては主として海水中の低温細菌の分離法について検討を行ないその結果を報告したが、本報においては海産魚介類の低温保蔵の際、魚介類あるいはその容器などの付着菌養が低温貯蔵中にいかに変化するかを知る基礎的研究として、まず夏期と冬期に採水した海水をそのまま、あるいは微量の有機物(0.05%の割合の polypeptone)を添加し、それぞれ5°C に貯蔵し、採水時から3ヵ月間における生菌数の消長および分離菌については genus レベルの分類、発育温度域、発育に対する塩類要求性による菌型別などを検討したので、その結果について報告する。

北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

実験方法

- 1. 供試海水 供試海水は夏期と冬期, すなわち 1968 年 6 月下旬と 1969 年 1 月下旬,前報¹⁾ と同様の函館市近郊七重浜海岸より約 $100\,\mathrm{m}$ 沖合に突出した防波堤の突端において,表面海水を容量 $2l\,\mathrm{m}$ の 2 個の滅菌フラスコ中にそれぞれ約 $1l\,\mathrm{m}$ ずつ採取し,アイスポックスに納め,直ちに実験室に $10\,\mathrm{m}$ もち帰りその後の実験に供した。
- 2. 採水直後の試水についての実験 実験室 にもち帰った それぞれ 2 検体の 海水について,まず前報り に準じて最適希釈培養のものから生菌数/ml を測定するとともに,その代表的 平板上の全集落 (あるいは一定区画内の全集落) およそ 50 個前後を釣菌し,それぞれ 3 回純粋培養を繰り返し,得られた 分離菌株を ZoBell 2216 E 海水斜面培地に移殖し,その後の実験に 供した。 なお 生菌数測定に当っては,前報り の結果から 25°C, 6 日間培養を採用し,そのほかの培養も特記しない限り 25°Cで行なった。
- 3. 低温 (5°C) 貯蔵試水についての実験 前述の採水直後の実験を行なった後,各2 検体の海水中1 検体には 0.05% の割合に polypeptone を添加,他方は無添加のままともに 5°C の冷蔵庫中に納め,約1,2 および 3 カ月後に前述同様生菌数の測定および菌株の分離を行なった。

4. 分離菌株の性状検査

- (1) 形態学的性状 ZoBell 2216 E 斜面培地に培養した分離菌について形状,運動性,鞭毛の有無,数およびその付着部位,グラム染色性,色素産生能などを検査するとともに,King の培地 (A および B)²⁾ の 6 日培養について暗室中,紫外線下で螢光色素産生能を観察した。
 - (2) 生化学的性状
- 1) オキシダーゼ試験 (Kovacs 法)⁵⁾ 1% (w/v) tetramethyl-p-phenylendiamine dihydrochloride 水溶液に浸した瀘紙上に、白金耳でかき取った斜面培養菌を塗抹し、塗抹部が紫色を呈した場合陽性と判定した。
- 2) グルコースからの酸およびガスの産生 Leifson の MOF 培地⁶⁾ を用い、分離菌の好気的ならびに嫌気的条件下でのグルコースからの酸およびガスの産生能を観察した。
 - (3) 生物学的性状
- 1) 海水要求性 寒天を除いた ZoBell 2216 E 培地の各組成分を 0.5% NaCl 水, 3% NaCl 水 および人工海水 (Herbst の組成が)を溶媒として 3種の液体培地 (pH 7.8~8.0)を調製し、これらに分離菌を 5 日間培養後、さらにそれぞれの 1 白金耳量を同じ培地に継代培養(5 日間)して発育の有無を観察した。
- 2) 高温および低温での発育能 新鮮培養菌を ZoBell 2216 E 斜面培地に接種し、40°C (4日間), 35°C (4日間), 25°C (6日間) および 0°C (14日間) 培養後、それらの発育を観察した。

実験結果

- 1. 低温(5° C) 貯蔵中における試水中生菌数の消長 polypetone 無添加の海水試料を 5° C の冷蔵庫中に貯蔵し約1 カ月でとに生菌数/ml を測定した結果は Table 1 に示した。夏期・冬期採水試料ともに採水時においては、前報¹⁾ で報告したごとく季節的にはほとんど差異はなく 10° 個のオーダーであったが、貯蔵 1 カ月後には 10° 個のオーダーに増加し、その後若干増加の傾向がみられたが大きな変動はなく、3 カ月後も 10° 個のオーダーを維持した。これに対し試水中に 0.05%の割合に polypeptone を添加し貯蔵した場合、夏期、冬期試料とも前者に比し生菌数の増加は大きく、1 カ月後には 10° 個のオーダーを維持した。
- 2. 低温 ($\mathbf{5}^{\circ}$ C) 貯蔵中における試水中菌叢(フローラ) の変化 前述の生菌数測定時にそれぞれの試料から実験方法の項で記載したごとく約50個前後の集落を釣菌し、得られた全分離菌株 ($\mathbf{823}$ 株) について形態学的、生化学的ならびに生物学的性状を検査し、Shewan の分類法 $\mathbf{5}^{\circ}$ (Fig. 1) に準拠して

. Table 1. Variation of the viable counts per ml in sea water during chill storing (5°C)

sample	temp. of sea water at	initial viable	peptone*	viable counts				
sample	sampling time	counts	pepione	1-month**	2-month**	3-month**		
summer sample	16.0°C	5.8×10 ³	without	2.4×104	5.9×10 ⁴	1.7×104		
(1968, 6, 19)		6.1×10 ⁸	with	1.6×10 ⁶	9.6×10 ⁵	2.4×10 ⁵		
winter sample	6,2°C	3.4×10 ⁸	without	3.3×10 ⁴	9.4×10 ⁴	6.4×104		
(1969, 1, 30)		4.4×10 ⁸	with	2.0×10 ⁶	2.5×10 ⁶	1.2×10 ⁶		

^{*} polypeptone (Daigo), 0.05%(w/v)

^{**} period of storage

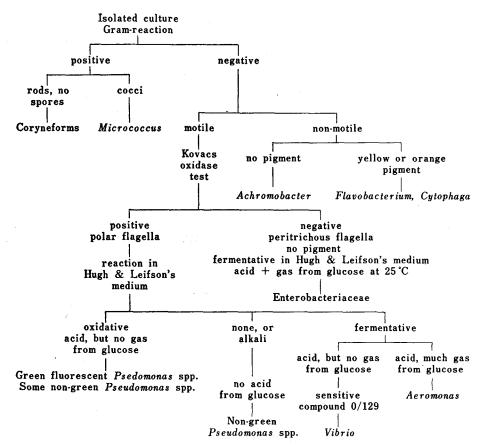


Fig. 1. A determinative scheme for the identification of certain genera of gramnegative bacteria (by Shewan, 1960)

Table 2. Variation in the bacterial flora in summer sea water without peptone during chill storing

		period of	storage		
genus	initial	1-month	2-month	3-month	
Micrococcus	32*(55. 2) 4 (6. 9)	26 (54.2) 0 (-)	2 (4.2) 11 (22.9)	0 (0) 9 (20.9)	
Coryneforms Achromobacter	4 (6.9) 2 (12.1)	6 (16.7)	5 (10.4)	14 (32.6)	
Flavobacterium or Cytophaga Green fluorescent	6 (10.3)	10 (20.8)	10 (20.8)	8 (18.6)	
Psuedomonas spp.	7 (12.1)	0 (-)	9 (18.8)	2 (4.7)	
Non-green Pseudomonas spp. Vibrio	0 (-) 2 (3.4)	$ \begin{array}{cccc} 1 & (2.1) \\ 0 & (0) \end{array} $	0 (0)	10 (23.3)	
Yeast	0 (-)	3 (6.3)	0 (0)	o (o	
total	58 (100%)	48 (100%)	48 (100%)	43 (100%)	

^{*} number of strains

Table 3. Variation in the bacterial flora in winter sea water without peptone during chill storing

	period of storage							
genus	initial	1-month	2-month	3-month				
Micrococcus	3*(6. 6)	0 (-)	2 (4.0)	1 (2.0)				
Coryneforms	2 (4.4)	0(0)	0(0)	0(0)				
Achromobacter	28 (62, 2)	8 (16.7)	2 (4.0)	11 (22.0)				
Flavobacterium or Cytophaga	3 (6.6)	0 (-)	0 (-) .	1 (2.0)				
Green fluorescent	, ,			·				
Psuedomonas spp.	3 (6.6)	6 (12.5)	29 (58.0)	5 (10.0)				
Non-green Pseudomonas spp.	5 (11.1)	34 (70.8)	16 (32.0)	30 (60.0)				
Vibrio	0	0	0	0				
Yeast	0	0	0	0				
total	45(100%)	48 (100%)	50 (100%)	50 (100%)				

^{*} number of strains

genus レベルの分類を行なった。この結果から、それぞれの試料の 5° C、3カ月貯蔵した間におけるフローラの変化を検討した結果を Table 2 および 3 に示した。まず polypeptone 無添加例において、夏期試料 (Table 2) では 採水時ないし 1 カ月後までは Micrococcus 属が 圧倒的に高率 (55% 程度)を占めたが、2 カ月後には急激に減少(4.2%)、3 カ月後には検出されなくなった。これに対し同じくグラム陽性菌の Coryneforms ははじめ低率 (約7%) であったが(1 カ月後では検出できなかった)、2 カ月後には相当高率 (約23%) となり、その傾向は 3 カ月後も維持された。そのほか一般に海水中の常在菌と考えられるグラム陰性の Achromobacter,Flavobacterium,Pseudomonas,Vibrio などの諸菌属が検出され7.8)、これらは Vibrio を除き貯蔵中を通じ約 $20\sim30\%$ 程度に検出された。同じく polypeptone 無添加の 冬期試料 (Table 3) においては、前述の 夏期試料の場合に比べ Micrococcus属において著しい相違が認められ、Coryneforms を含めグラム陽性菌は全般的に少なく、これに反しFlavobacterium 属を除くグラム陰性菌が高率で、とくに採水時の Achromobacter 属 (62%)、貯蔵中の Pseudomonas 属において著明で green fluorescent および non-green Pseudomonas の合計は 1

Table 4. Growth temperature range of isolates from the summer sea water without peptone during chill storing

	maximum growth			period	of storage			
	temp.	initial		1-month	2-month	Ī	3-month	
	40°C	Micrococcus Coryneforms Achromobacter Flavobacterium Green fluoresce Pseudomonas spp.	18* 2 2 1 ont	Micrococcus 17 Achromobacter 1 Yeast 2	Coryneforms Achromobacter Flavobacterium Green fluorescen Pseudomonas spp. Non-green Pseudomonas spp.		Coryneforms Achromobacter Flavobacterium Green fluoresce Pseudomonas spp. Non-green Pseudomonas spp.	7 6 3 nt 1
grow at 0°C	35°C	Achromobacter Flavobacterium Green fluoresce Pseudomonas spp.	3 3 ent 2	Non-green Pseudomonas spp. 1	Micrococcus Coryneforms Flavobacterium Green fluorescen Pseudomonas spp. Non-green Pseudomonas spp.	1 1 2 nt 3	Coryneforms Achromobacter Green fluorescer Pseudomonas spp. Non-green Pseudomonas spp.	2 5 nt 1
	25°C	Achromobacter Flavobacterium Green fluoresce Pseudomonas spp. Vibrio	1 2 ent 3 1	Micrococcus 1 Achromobacter 3 Yeast 1	Micrococcus	1 3 4 nt 4	Flavobacterium Non-green Pseudomonas spp.	5
ာ	40°C	Micrococcus Coryneforms Vibrio	13 2 1	Micrococcus 6 Flavobacterium 1	Flavobacterium	1	Achromobacter Flavobacterium	I 2
wat 0	35°C			Micrococcus 1 Achromobacter 1			Achromobacter	1
not grow at 0°C	25°C			Micrococcus 1 Achromobacter 3 Flavobacterium 9	Coryneforms Achromobacter	3	Achromobacter Flavobacterium Non-green Pseudomonas spp.	1 1

^{*} number of strains

カ月後から3カ月後まで 70~90% におよび, green fluorescent *Pseudomonas* と non-green *Pseudomonas* の間では一方の減少時に他方が増加する傾向がみられた.

以上の polypeptone 無添加例に対し、polypeptone を 0.05% の割合に添加した例においては、前述のごとき夏期と冬期間の試料間における相違は認められても、傾向としてはそれぞれ polypeptone 無添加例の結果にほぼ一致した。ただ冬期試料における Vibrio 属において若干貯蔵中に検出率の高くなる傾向が認められた。

8. 低温 (5°C) 貯蔵海水からの分離菌の発育温度域 採水時および低温貯蔵中の各試水から分離した

Table 5. Growth temprature range of isolates from the winter sea water without peptone during chill storing

	maximum growth		period	of storage	
	temp.	initial	1-month	2-month	3-month
	40 °C	Achromobacter 2*	Achromobacter 3 Non-green Pseudomonas spp. 10	Micrococcus 2 Green fluorescent Pseudomonas spp. 8 Non-green Pseudomonas spp. 12	Micrococcus 1 Achromobacter 4 Flavobacterium 1 Green fluorescent Pseudomonas spp. 2 Non-green Pseudomonas spp. 26
grow at 0°C	35°C	Achromobacter 1 Green fluorescent Pseudomonas spp. 2	Achromobacter 1 Green fluorescent Pseudomonas spp. 2 Non-green Pseudomonas spp. 14	Green fluorescent Pseudomonas spp. 6 Non-green Pseudomonas spp. 3	Achromobacter 1 Non-green Pseudomonas spp. 1
	25°C	Achromobacter 3 Green fluorescent Pseudomonas spp. 1	Achromobacter 3 Green fluorescent Pseudomonas spp. 4 Non-green Pseudomonas spp. 10	Achromobacter 1 Green fluorescent · Pseudomonas spp. 8 Non-green Pseudomonas spp. 1	Achromobacter 3 Green fluorescent Pseudomonas spp. 1
t 0°C	40°C 35°C	Micrococcus 2 Flavobacterium 1 Micrococcus 1 Coryneforms 1		Green fluorescent Pseudomonas SDD. 2	
not grow at 0°C	25°C	Coryneforms 1 Achromobacter 22 Flavobacterium 2 Non-green Pseudomonas spp. 5	Achromobacter 1	spp. 2	

^{*} number of strains

全菌株について、0°C (14日間)、25°C (6日間)、35°C (4日間) および 40°C (4日間)の培養を行ない、分離菌株の発育温度域を 観察した 結果は Table $4\sim7$ に示した 通りである。 まず polypeptone 無添加の夏期試料の 5°C 貯蔵中 におけるフローラと その発育温度域の関係 (Table 4) をみると、採水時においてフローラの主体を占めていた 発育上限温度の高い (40°C) Micrococcus 属は漸減し、2カ月以降においては一般に海水中の常在菌と考えられているグラム陰性 桿菌の 諸菌属と Coryneforms が主体を占めるに至り、また 3 カ月に至っても 0°C で発育しないものが若干残存した。 同様に polypeptone 無添加の冬期試料 (Table 5) においては、採水時においてフローラの主体を占めていた 0°C で発育せずかつ発育上限温度の低い (25°C) Achromobacter 属が低温貯蔵中に急減し、これに代って0°C で発育する各種の発育上限温度を持つ non-green Pseudomonas, これにつき green fluorescent Pseudomonas が増加し、3 カ月後にはとくに発育上限温度の高い non-green Pseudomonas が高率と

Table 6.	Growth	temperature	range	of isolates	\mathbf{from}	\mathbf{the}	summer	sea	water	with
peptone dur	ring chill	storing								

	maxium growth		period o	of storage	
	temp.	initial	1-month	2-month	3-month
Ö	40°C	Micrococcus 29 Achromobacter 2 Green fluorescent Pseudomonas spp. 1	Green fluorescent Pseudomonas spp. 34 Vibrio 2	Micrococcus 1 Flavobacterium 4 Non-green Pseudomonas spp. 17	Micrococcus 3 Coryneforms 10 Achromobacter 6 Flavobacterium 7 Non-green Pseudomonas spp. 2
grow at 0°C	35°C	Micrococcus 1	Green fluorescent Pseudomonas spp. 9	Flavobacterium 2 Non-green Pseudomonas spp. 4	Coryneforms 1 Achromobacter 3 Flavobacterium 5 Non-green Pseudomonas spp. 4
	25°C	Micrococcus 1 Green fluorescent Pseudomonas spp. 2	Green fluorescent Pseudomonas spp. 3	Flavobacterium 1 Non-green Pseudomonas spp. 25	Flavobacterium 7 Non-green Pseudomonas spp. 2
not grow at 0°C	40°C 35°C 25°C	Micrococcus 19 Achromobacetr 1	Green fluorescent Pseudomonas spp. 1		Flavobacterium 3

^{*} number of strains

なったが、全般的には結局採水時にみられた諸菌属が出揃って、 0° C で発育しない菌属はみられなくなった。

これに対し polypeptone 添加例において、まず夏期試料 (Table 6) では、前述の polypeptone 無添加例同様発育上限温度の高い Micrococcus 属が急激に消失し、これに代り1カ月後には 0°C で発育し、各種の発育上限温度をもつ green fluorescent Pseudomonas が主体を占め、2カ月後には nongreen Pseudomonas および Flavobacterium 属がこれに代り,さらに3カ月後では non-green Pseudomonas はむしろ若干減少して、発育上限温度の高い Coryneforms、各種の上限温度をもつ Flavobacterium あるいは Achromobacter 属、そのほかの菌属が一様に出揃った。また polypeptone 添加の冬期試料 (Table 7) においては、前述のごとく採水時には 0°C で発育しないが、発育上限温度の低い (25°C) Achromobacter 属あるいは green fluorescent Pseudomonas などがフローラの主体を占めていたが、貯蔵中漸時各種の上限温度をもつ green fluorescent Pseudomonas が主体を占めるに至るとともに 0°C で発育しないものが消失した。

4. 低温(5°C) 貯蔵中の海水からの分離菌の塩類要求性による型別 採水時および低温貯蔵中の各試水から分離した全菌株について、それらの発育に対する海水中の主要無機塩の要求性を日高・坂井の法⁹⁻¹¹⁾ を簡易化した方法で、3型に分類した。すなわち 発育のために 海水を要求する海洋型 (M-型)、3%NaCl を要求する好塩型 (H-型)、培地中に 0.5%NaCl の存在のみで、他種塩の 添加を必要としない陸棲型 (T-型)の3型である。その結果は Table 8 に示した。まず polypeptone 無添加の

Table 7. Growth temperature range of isolates from the winter sea water with peptone during chill storing

	maximum growth		period	of storage	
	temp.	initial	1-month	2-month	3-month
	40°C	·	Achromobacter 3 Green fluorescent Pseudomonas spp. 23	Green fluorescent Pseudomonas spp. 17 Non-green Pseudomonas spp. 1	Achromobacter 10 Green fluorescent Pseudomonas spp. 12 Non-green Pseudomonas spp. 12 Vibrio 2
	35°C	Achromobacter 11*	Achromobacter 1	Green fluorescent	Green fluorescent
grow at 0°C		Green fluorescent Pseudomonas spp. 2 Non-green Pseudomonas spp. 1	Green fluorescent Pseudomonas spp. 5	Pseudomonas spp. 3	Pseudomonas spp. 2
	25°C	Achromobacter 5 Green fluorescent Pseudomonas spp. 2	Achromobacter 4 Green fluorescent Pseudomonas spp. 14 Vibrio 1	$\begin{array}{ccc} Achromobacter & 2\\ Green & fluorescent\\ Pseudomonas\\ & spp. & 23\\ Non-green\\ Pseudomonas\\ & spp. & 1\\ Vibrio & 2\\ \end{array}$	Achromobacter 6 Flavobacterium 2 Green fluorescent Pseudomonas spp. 2 Non-green Pseudomonas spp. 3 Vibrio 3
-	40°C 35°C	Coryneforms 5			
not grow at 0°C	25°C	Micrococcus 1 Achromobacter 15 Flavobacterium 3 Green fluorescent Pseudomonas spp. 21 Non-green Pseudomonas spp. 3			

* number of strains

夏期試料についてみると、採水時の分離菌中 68.5% が T 型に属し、H型 24.1%で、M型は 7.4% に過ぎなかった。なおこの T型は、その大部分 (75.7%) が Micrococcus 属であった。しかしながら前述のごとくこのような T 型の Micrococcus 属は急激に減少し、これに対して採水時に低率であった M型が貯蔵 1 カ月後から急速に増加して 2、3 カ月後にはそれぞれ分離菌の過半数を占めるに至り、そのフローラは non-green Pseudomonas, Achromobacter あるいは Flavobacterium 属などであった。同じく polypeptone 無添加の冬期試料では採水時から分離菌の大部分 (71.4%) が M型に属し、 $1\sim3$ カ月の貯蔵期間中を通じ $80\sim90\%$ を維持した。 なおこの採水時のフローラの主体は前述のごとく発育上限温度の低い Achromobacter 属である。H型は採水時 20.4% であったが、1,2 カ月後まて残存したものは green fluorescent Pseudomonas のみであったが、これも 3 カ月後には消

Table 8.	. Typing	of isolates	from the	ie summei	rand the	winter	sea water	r during	chill
storing by	modified	Hidaka a	nd Saka	i's salts r	equireme	nt test			

	period	number	without peptone			number	with peptone			
	of storage	of strains	T	н	М	of strains	T	Н	M	
ie e	initial	55	68.5%	24. 1%	7.4%	61	73. 7%	17. 5	8.8%	
H 5	l-month	45	53.3	4.4	42. 2	49	0	91. 7	8.3	
summer sample	2-month	45	24.4	24. 4	51. 2	53	13.2	1. 9	84.9	
56 ×2	3-month	42	42.9	4.8	52. 3	.50	36.0	18.0	4 6. 0	
1 0	initial	44	8.2	20. 4	71.4	49	20.4	34.7	44. 9	
£ £	1-month	48	2.1	6.4	91. 5	51	5.9	92. 2	2.0	
winter sample	2-month	53	9.3	11.6	79. 1	49	6.1	85.7	8.1	
₽ 26	3-month	47	10.6	0	89.4	56	23. 2	19.6	57.1	

T: terrestrial type H: halophilic type M: marine type

失した。またT型は大体貯蔵期間中を通じ大体 10% 以下であった。M型で3カ月後まで残存したフローラは non-green *Pseudomonas* が圧倒的で、これについで *Achromobacter* 属と若干の green fluorescent *Pseudomonas* であった。

以上の polypeptone 無添加例に対し添加例の夏期試料では採水時は無添加例の場合とほぼ同様の傾向で、1 カ月後では 日型が 91.7% の高率を占め、そのほとんどが green fluorescent Pseudomonas であったが、2 カ月後には検出されなかった。これに対し M型が 2 カ月後には約 85% に達し、そのフローラはすべてが non-green Pseudomonas であったが、これも 3 カ月後には僅かに残存するに過ぎず、結局 M型は 46% に減少し、そのフローラは Flavobacterium 属、ついで Achromobacter および若干の non-green Pseudomonas と Coryneforms であった。 また T型で 3 カ月後まで残存したものは 36%で、Coryneforms、Flavobacterium 属であった。同じく polypeptone 添加の冬期試料においては、採水時 M型が約 45%を占め、その主体は前述の無添加例と同様に発育上限温度の低いAchromobacter 属であるが、これらは 1、2 カ月後には急減し、これに代り H型の green fluorescent Pseudomonas が急増したが、3 カ月後には再び M型の Achromobacter 属が増加し、non-green Pseudomonas とともに M型のフローラの主体を占めるに至り、57%に達した。また T型は H型の green fluorescent Pseudomonas の急増により、1、2 カ月後には比率としては減少したが、3 カ月後には 23.2% に上昇した。

総括および考察

著者は前報りにおいて、低温性海洋細菌の分離温度、培養日数、海水中の生菌数の算出法、分離菌の発育温度域などについて年間を通じ季節的に検討を行なった。本報においては夏期と冬期に採水した海水を低温(5°C)に貯蔵し、採水時から約1カ月ごとに3カ月間、それぞれ微量の有機物(polypeptone, 0.05%の割合)を添加したものと無添加のものとに分け、海水試料中のフローラの変化の様相を検討した。実験から得られた結果を総括し若干の考察を加えてみると、前報りにおいて海水の生菌数は年間を通じほとんど変化なく一定であると報告したごとく、夏期と冬期における採水時の生菌数はともに1ml中10°個のオーダーでほとんど差異はなく、これらを5°Cで貯蔵した場合、約1カ月後には10°個のオーダーに増加し、その後若干の変動はあっても3カ月後においても10°個のオーダーを維持した。また試水中に微量の有機物を添加した場合、当然前者に比し菌数の増加は著明であった。すなわち海水細菌の低温(5°C)貯蔵中における増殖は緩慢ながら相当長期にわたり持続される

ことが推察された。

つぎに海水中のフローラは採水時においては,夏期と冬期ではその組成は相当に異なり,夏期では Micrococcus 属,冬期は Achromobacter 属が圧倒的に高率であったが,これらはいずれも低温貯蔵中に急速に消滅あるいは減少し,結局は一般に海水中の常在菌と考えられているグラム陰性の諸菌属および Coryneforms などが一様に長く残存し,これらは発育上限温度は種々であってもその大部分は 0° C で発育した。しかも Vibrio 属については栄養素の少ない海水中での生存は比較的短期間であろうことが推察された。なお全般的には polypeptone 添加例は無添加例に比し,貯蔵中のフローラの変化がやや著明な傾向がみられるが,これは菌属による栄養素の選択性あるいは低温環境への適応性の相違がやや明瞭に現われるためと推察される。

つぎに採水時および低温貯蔵中の海水から分離した菌株の発育温度域を観察した結果,前報¹⁾で報告したごとく夏期に採水した海水からの分離菌は発育上限温度の高いものが高率で、冬期分離菌はその低いものが高率であった。また全般を通じ、低温貯蔵中に 0°C (14日間) で発育しない菌株は漸減する傾向が認められた。なお夏期と冬期試料の採水時のフローラの組成は異なるが、結局貯蔵3カ月後においてはいづれの試料のフローラも海水常在菌のグラム陰性桿菌および Coryneforms などが主体を占めるに至り、それらの発育上限温度は菌属のいかんにかかわらず種々なものが混在するようになった。このような同一菌属中に発育温度差の存在する点については、さらに species レベルでの同定が実施されないと明確にされない。

つぎに分離菌の塩類要求性による型別の結果については、夏期試料では前述のごとく Micrococcus 属が採水時分離菌の大部分を占め、かつそれらのほとんどが陸棲型菌 (T型) であるため採水時の T 型 の占める比率は 高率であるが、 このことは 夏期の沿岸海水は陸からの汚染のはなはだしいことを 示すものと考えられる。 しかしこの Micrococcus 属は低温貯蔵中に急速に減少し, これに代り採水 時低率であった海洋型菌 (M型)は1カ月後から海水常在菌の各種のグラム陰性菌および Coryneforms の増加により急速に増加し、2、3カ月後には分離菌の過半数を占めるに至り、 好塩型菌 (H型) は Pseudomonas 属の増減に大きく左右された。 これに対し冬期試料では採水時から3カ月間の貯蔵期 間を通じ M型が70~90% の高率を占めた。これは前述のごとく採水時高率に分離された Achromobacter の大部分が M型で, この Achromobacter 属が貯蔵中急速に減少する際も, M型の non-green Pseudomonas あるいは green fluorescent Pseudomonas などが増加することによるものである。 H 型では Achromobacter 属の減少とともに低下し、 2カ月後までは green fluorescent Pseudomonas により 10% 前後の比率を占めていたが、3カ月後には消失した。また T型は全期間を通じ 10% 以 下であった。つぎに polypeptone 添加例において、夏期試料は前述のごとく Micrococcus 属の貯蔵 中における急減による T型の減少、1カ月後における green fluoreseent Pseudomonas の急増により H型の増加、M型における2カ月後の non-green Pseudomonas の急増による上昇などによる特異的 な現象がみられたが、3カ月後には前述の polypeptone 無添加例とほぼ一致した結果となり,また冬 期試料では 1,2 カ月後の green fluorescent Pseudomonas の急増およびその 3 カ月後までの残存によ るH型の増加、M型における 2,3 カ月後における Achromobacter 属の急減, T型における Coryneforms の貯蔵中における消失など特異的で、全般を通じ polypeptone 無添加例に比し、H型および M 型における型別比率の変動が大きい傾向がみられた。

要 約

夏期と冬期における沿岸海水について、低温 (5°C) 貯蔵中における海水中のフローラの変化を検討し、つぎのごとき結果を得た。

1. 採水時における海水中の菌叢は夏期では Micrococcus 属, 冬期では Achromobacter 属が圧

倒的に高率であるが、これらは低温貯蔵中に急速に減少ないし消失し、結局は一般に海水中の常在菌と考えられているグラム陰性桿菌が長期にわたり残存する。なお低温貯蔵中における菌叢の変化は有機物無添加の場合に比し微量添加例で著明な傾向がみられるが、3カ月後においては(上記のでとき夏期の Micrococcus 属、冬期の Achromobacter 属の圧倒的状態は別として)、微量有機物の添加、無添加あるいは夏期、冬期海水にかかわらず、大体採水時の状態に復す傾向がみられた。

- 2. 分離菌の塩類要求性による型別分類では海洋型は冬期採水の海水中に、陸棲型は夏期採水の海水中に高率に検出された。低温貯蔵中における分離菌の型別消長は polypeptone 添加例においてその変化が著明であるが、3ヵ月後においてはこの場合も上記1と同様に大体採水時の状態に復す傾向がみられた。
- 3. 同一菌属 (genus) で発育温度域の異なるもの、あるいは塩類要求性の異なるものの存在することについては species レベルの分類を実施しないと明確にされない。

謝 舒

本実験遂行に当り御協力を頂いた木村喬久助教授ならびに信濃晴雄助手に厚く御礼申し上げる。

文 献

- 1) 田島研一·絵面良男·坂井 稔 (1971), 北大水産彙報 22, 73.
- 2) King, E. O. et al. (1954). J. Lab. Clin. Med. 44, 301.
- 3) Kovaes, N. (1960). Nature, Lond. 178, 703.
- 4) Leifson. E. (1963). J. Bact. 66, 24.
- 5) 微生物学ハンドブック編集委員会 (1957). 微生物学ハンドブック 621, 東京; 技報堂.
- 6) Shewan, J. M. et al. (1960). J. appl. Bact. 23(3), 379.
- Kriss, A. E. (1963). Marine Microbiology, translation by J. M. Shewan and Z. Kabata.
 Oliver & Boyd, Edinburgh.
- 8) ZoBell, C. E. (1946). Marine Microbiology, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.
- 9) 日高富男 (1964). 鹿児島大学水産学部紀要 12 (2), 135.
- 10) 日高富男·坂井 稔 (1965). 食衛誌 6, 235.
- Hidaka, T. & Sakai, M. (1968). Proc. U.S.-Japan Seminer on Marine Microbiology, Bull.. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto Univ., 12, 125.