海水より分離した寒天分解菌について

木 村 喬 久

（北海道大学水産学部水産細菌学講座）

Studies on Marine Agar-digesting Bacteria

Takahisa KIMURA

Abstract

The author isolated 6 strains of agar-digesting bacteria from sea water samples which were collected in the Northern Pacific (see Table 1) and the isolates were taxonomically studied. The following results were obtained:

1) Morphological and physiological characteristics and sesitivity to certain antibiotics of the isolates are summarized in Tables 2, 3, and 4.

2) On the basis of the above results, the 6 strains were classified as follows:

Strain Ag 3; genus *Agarbacterium* (species unknown)

Strain Ag 4; genus *Pseudomonas* (species unknown)

Strains Ag 5, 6 and 7; *Agarbacterium reducans*

Strain Ag 8; *Agarbacterium uliginosum*

3) Strains Ag 3, 5, 6, 7 and 8 had digesting ability of agar and alginic acid, though strain Ag 4 lacked the alginic acid-digesting ability (see Table 5).

Gran[1] がノールウエー海岸の海水中より *Bac. gelaticus* を分離報告して以来 Gray & Chambers[2]，Lundestad[3]，Waksman *et al.*[4,5]，Stanier[6] その他多くの研究者により多数の寒天分解菌が発見され，Bergey's Manual (7 Ed.)[7] によれば *Pseudomonas*, *Alginomonas*, *Vibrio*, *Cytophaga*, *Agarbacterium* 属等に約40種の寒天分解菌が記載されている。また最近 Kadota[8]，石松[9]，日高・鮫島[10]，Araki & Arai[11]，Yaphe[12]，Swartz & Gordon[13] 等によりそれぞれ数菌株が分離され，それ等の菌株の分類学的検討や，寒天分解酵素の酵素化学的な性状について報告がなされている。著者等の教室では1958年より海洋細菌に関する研究を進めているが，1958年5月～8月の間，北緯50度以北の北洋海域61測点より312件の海水試料を採取し，それ等の試料より711菌株を分離したが，それ等のうち Table 1 に示す6測点で採取した海水より分離した6菌株が寒天を著明に分解することを見出したので，本報においてこれ等6菌株の諸性状を観察し，分類学上の位置の検討を試みた結果を報告する。なお後に詳述するがこれ等6菌株中5株は寒天分解性のほか同様海藻成分のアルギン酸分解性も併有した。

実 験 方 法

1) 供試菌の分離法： 前記の各海洋観測点においてナンセン顛倒採水器により採水した海水を予め殺菌したポリエチレン容器に採取後船内冷蔵庫（0°～5° C）に保存し，帰港後直ちに研究室の冷蔵庫（0°～5° C）に移し，順次 ZoBell 2216 E 培地[14]（平板法）に混釈培養し，これから純粋分離した711菌株より明かに寒天液化力を有する6菌株を選び供試菌とした。

2) 細菌学的諸性状の観察法： 分離菌の諸性状の観察には，ZoBell 2216 E 培地（液状の場合は寒天をのぞく）を基礎培地とし，以下常法に従つて実施した。ただしゼラチン，澱粉の消化試験は平板法による Gordon & Smith[15] の方法に準拠し，カゼインの消化試験は牛乳寒天平板上の態度より観察し，糖の分解試験には人工海水を使用した Barsiekow 改良培地を用い，また至適 pH の観察には ZoBell 2216E 培地の寒天を

Table 1. Origin of sea water samples for isolated organisms

Station No.	Location of sampling		Depth of sampling (m)	Date
	Latitude	Longitude		
Ag 3	60°51′ N	175°00′ W	30	June 14, 1958
Ag 4	58°00′ N	175°00′ W	0	〃 15, 〃
Ag 5	50°00′ N	175°00′ E	49	〃 22, 〃
Ag 6	54°00′ N	175°00′ E	0	〃 25, 〃
Ag 7	56°05′ N	175°00′ E	100	〃 26, 〃
Ag 8	58°00′ N	175°00′ E	0	〃 27, 〃

0.25%の割に加えた半流動培地及び寒天非添加培地を用い，至適温度の観察には前記寒天非添加培地及び寒天斜面培地を用い，それぞれ発育の程度を肉眼的に観察した。

3) 抗菌剤に対する態度の観察法： ペニシリン，オキシテトラサイクリン，クロラムフエニコール，ジヒドロストレプトマイシン，スルファイソキサゾール等の各種抗菌剤に対する態度は，heart infusion —人工海水寒天培地を平板としてパッド・プレート法により観察した。

4) 寒天及びアルギン酸分解力の定量的観察法： 基礎培地して前記 ZoBell 2216E培地より寒天をのぞいたものにそれぞれ0.25%の割合に寒天及びアルギン酸ソーダを溶解し，pHを7.5に修正，3 ml ずつ試験管に分注，滅菌後，予め固定培地に前培養した供試菌を比濁法により一定濃度の懸濁液とし，その 0.3ml ずつ各試験管に接種し，25°C で24時間，48時間及び96時間培養後寒天及びアルギン酸の分解により生ずる還元力の増加を Somogyi-Nelson 法[16]により光電比色し，ガラクトース換算量をもつてその活度を表した。

実験結果及び考察

前述の如き方法による供試菌の一般的性状は，Table 2，3-(1) 及び Table 3-(2) に示す通りである。すなわち Table 2 に示す如く供試菌はいずれも，グラム陰性桿菌で，芽胞を形成せず，Ag 8 をのぞく他の5株はいずれも単極毛で活潑な運動性を示す。固形培地上では一般によく発育し，色素産生はそれほど著明ではない。平板上の集落は一般に中等大の正円を示す。いずれも海水成分を含まぬ普通ブイヨンには発育しないが人工海水ブイヨンにはよく発育し，Ag 3 は液面に厚い被膜を，Ag 4 は薄膜及び白色リングを形成，Ag 5，6 及び 7 は白色リングのみ形成し被膜は形成せず，Ag 8 はリングも形成しない。また各菌株はいずれも一様に混濁し，Ag 8 を除く 5 株は沈澱を形成する。上記の如く各供試菌株の形態学的性状には著しい差は認められないが，運動性，液状培地の発育態度等においてAg 3；Ag 4；Ag 5，6，及び 7；Ag 8 はそれぞれ若干の差異が認められる。

次に Table 3-(1) に示す生物学的性状においては，全菌株ともインドール産生，H_2S 産生，カゼインの消化性，牛乳培地の発育，V. P. 反応及び M. R. 試験，ウレアーゼ産生，溶血性（家兎血），病源性（マウスに対する），嫌気状態での発育等いずれも陰性で，硝酸塩の還元性，アンモニア産生はいずれも陽性，また死滅温度，発育温度，発育 pH 域，耐塩性も大体近似しているが，メチレン青還元性においては Ag 3 のみ (−)，Ag 8 が (±)，クエン酸塩培地での発育は Ag 5 のみが (±)，澱粉の消化性は Ag 4 のみ (−)，ポテト培地上の発育は Ag 4 のみが (+) で黄色色素を産生し，同じく Ag 4 のみはアルギナーゼ産生 (±) 等の点が異なり，これ等の結果からも Ag 5，6 及び 7 はほぼ同様の性状を示すが，その他の菌株においては若干の差異が認められる。

次に Table 3-(2) に見る如く炭水化物に対する態度は全菌株共に一般に広い活性を示すが，Table 2 及び Table 3-(1) の結果と同様 Ag 5，6，及び 7 は若干の差異はあつてもよく一致し，他の菌株とは明ら

Table 2. Morphological characteristics of isolated agar-digesting bacteria

Strain No.	Form	Size (μ)	Motility	Flagella	Spore	Gram	Agar colony	Agar stroke	Sea water broth	Normal broth
Ag 3	Rods or rarely curved, singly or rarely chains	1.0 by 1.6 to 2.6	+	Single polar	–	–	Circular, small or moderate, glistening, yellowish white, translucent	Abundant, filiform, opaque, yellowish white	Abundant, thick membranous, moderate turbid, moderate sediments	Not growth
Ag 4	Rods, singly or rarely chains	1.0 to 1.3 by 1.6 to 4.2	+	〃	–	–	Circular, small or moderate, glistening, brownish white, slightly swarming, translucent	Abundant, echnulate, opaque, white	Abundant, white ring and pellicle, very turbid, abundant sediments	〃
Ag 5	Rods or rarely curved, singly	0.8 to 1.0 by 1.6 to 3.2	+	〃	–	–	Circular, small or moderate, glistening, brownish white, translucent	Abundant, filiform, opaque, yellowish white	Abundant, white ring, very turbid, scanty sediments	〃
Ag 6	Rods or rarely curved, singly or rarely chains	1.0 by 1.6 to 3.2	+	〃	–	–	Circular, small or moderate, glistening, yellowish white	Abundant, filiform, opaque, white	Abundant, white ring, moderate turbid, scanty sediments	〃
Ag 7	Rods or rarely curved, singly	1.0 by 1.6 to 3.2	+	〃	–	–	Circular, moderate or large, glistening, brownish white, translucent	Abundant, filiform, opaque, white	Abundant, white ring, very turbid, scanty sediments	〃
Ag 8	Rods, singly	1.0 to 1.3 by 1.6 to 4.2	–	None	–	–	Circular, moderate or large, glistening, brownish white, translucent	Abundant, filiform, opaque, white	Moderate, moderate turbid	〃

かに異る態度を示す。以上の諸性状を総括するに，Ag 5 ，6及び7は同一の Species，その他の菌株はそれぞれ異つた Species と考えられる。

Table 3-(1). Physiological characteristics of isolated agar-digesting bacteria

Strain No.		Ag 3	Ag 4	Ag 5	Ag 6	Ag 7	Ag 8
Indole production		−	−	−	−	−	−
H_2S production		−	−	−	−	−	−
Nitrate reduction		+	+	+	+	+	+
Ammonia production		+	+	+	+	+	±
M.B. reduction		−	+	+	+	+	±
V.P. reaction		−	−	−	−	−	−
M.R. test		−	−	−	−	−	−
Citrate medium (growth)		+	+	±	+	+	+
Gelatine agar (plate)	Growth	+	+	+	+	+	+
	Hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Starch agar (plate)	Growth	+	+	+	+	+	+
	Hydrolysis	+	−	+	+	+	+
Milk agar	Growth	+	+	+	+	+	+
	Casein hydrolysis	−	−	−	−	−	−
Milk (growth)		−	−	−	−	−	−
Potato medium	Growth	−	+	−	−	−	−
	Chromogenic	−	Y.G.	−	−	−	−
Urease production		−	−	−	−	−	−
Alginase production		+	±	+	+	+	+
Temperature relation (°C)	Max.	35∼40	35∼40	35∼40	35∼40	35∼40	35∼40
	Opt.	25	25	25	25	25	25
	Min.	<5	<5	<5	<5	<5	<5
	Extinction	40∼50	40∼50	50∼60	40∼50	40∼50	40∼50
pH relation	Max.	10	10	10	10	10	10
	Opt.	7∼8	7∼8	7∼8	7∼8	7∼8	7∼8
	Min.	5	5	4∼5	3	4∼5	4∼5
Salinity range (% NaCl)	Max.	7.5	10.0	>15.0	>15.0	>15.0	10∼15
	Opt.	1.0	1.0∼3.0	3.0∼5.0	1.0∼5.0	1.0∼5.0	3.0
	Min.	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
Hemolysis (rabbit)		−	−	−	−	−	−
Pathogenesis (mice)		−	−	−	−	−	−
Anaerobic growth		−	−	−	−	−	−

M.B. : Methylene blue; V.P. : Voges-proskauer; M.R. : Methyl red; Max. : maximum; Opt. : optimum; Min. : minimum; Y.G. : yellowish gray.

Table 3-(2). Physiological characteristics of isolated agar-digesting bacteria, acid production from carbohyrate at 25°C

Strain No.	Ag 3	Ag 4	Ag 5	Ag 6	Ag 7	Ag 8
Rhamnose	+	+	−	+	+	+
Arabinose	+	+	−	−	−	+
Xylose	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	−	+	+
Dextrine	+	+	+	−	+	+
Starch	+	−	+	+	+	+
Inulin	+	+	+	+	+	+
Cellulose	+	+	−	−	−	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	−	−	−	−	−	−
Dulcitol	+	+	−	−	−	−
Innositol	+	+	−	−	−	+
Mannitol	−	−	+	+	+	−
Salicine	+	+	+	+	+	+

これ等6菌株はいずれもグラム陰性，非芽胞形成桿菌で，炭水化物から酸を産生するがガスを産生せず，また寒天を分解する点から Bergey's Manual に準拠すれば Family *Pseudomonadaceae*, *Spirillaceae* 及び *Achromobacteriaceae* のいずれかに属するものと考えられる。Ag 5，6 及び 7 の 3 株はいずれも単極毛菌で形態学的には *Pseudomonadaceae* 或は *Spirillaceae* に属するものと考えられるが，生物学的諸性状においてはむしろ *Achromobacteriaceae* 中の Genus *Agarbacterium* に近似している。なお Family *Achromobacteriaceae* 中運動性を有するものは一般に周毛菌であるが，本 Family 中の Genus *Agarbacterium* 中には運動性を有するも鞭毛の type の明瞭にされていないものが 4 Species あり，その中の non-chromogenic でポテト培地に発育せぬ *Agarbacterium reducans* によく一致する。しかしこの Species は菌形が短桿状で，ラムノース及びアラビノースから酸を産生するもラクトース或はキシロースから酸を産生しないが Ag 5，6 及び 7 はいずれも中等大の桿菌で，アラビノースから酸を産生せず，ラクトース及びキシロースから酸を産生し，また Ag 5 はラムノースから酸を産生しない。以上若干の点において差が認められるが，これ等の 5 株は *Agarbacterium reducans* と同定しても差支えないもの考えられる。次に Ag 8 は同様 Genus *Agarbacterium*

中の非運動性でグルコースから酸を産生するもマンニトールから酸を産生しない *Agarbacterium uliginosum* と次の諸点で若干の相違点が認められるが他の諸点でよく一致し，*Agarbacterium uliginosum* と同定し得る。すなわち本 Species は液状培地に被膜及び沈澱を生ずるが，Ag 8 はこれらの性状を認めず，また本 Species は固形培地上で橙色または黄色色素を産生し，カゼインを分解せず，グリセロールから酸を産生しないが，Ag 8 は色素産生がそれほど明瞭でなく（微黄白色）カゼインを分解せず，グリセロールから酸を産生する。次に Ag 3 及び 4 については *Agarbacterium* 中に一致する Species が見当らず，*Pseudomonus* 及び *Vibrio* 中にも該当すべきものはない。

Shewan *et al.*[17] によれば *Pseudomonadaceae* はペニシリン（2.5 IU）に対し感受性なくストレプトマイシン（80γ）及びクロラムフエニコール（100γ）に感受性を有するに対し，*Achromobacteriaceae* はペニシリンに対しても感受性を有する。また *Pseudomonadaceae* 中の pigment-producing *Pseudomonas* はテラマイシン（オキシテトラサイクリン，10γ）に非感受性であるに対し，non-pigment-producing *Pseudomonas* 及び *Vibrio* は感受性を有し，更に *Vibrio* は Vibriostatic compound 0/129 にも感受性を有する。以上の Shewan 等の報告とは濃度が若干異るが供試菌の抗菌剤に対する感受性を示すと Table 4 の通りである。なお遺憾ながら Vibriostatic compund 0/129は入手困難で供試し得なかつた。すなわち供試6菌株はいずれもテラマ

Table 4. The sensitivity of isolated agar-digesting bacteria to certain antibiotics on heart infusion sea water medium at 25°C

Strain No.	Penicillin		Oxytetracyclin		Chloramphenicol (60γ)	Dihydrostrepto-mycin (100γ)	Sulfaisoxazol (50γ)
	(10 u.)	(1 u.)	(30γ)	(10γ)			
Ag 3	+	−	−	−	卌	廾	卌
Ag 4	±	−	−	−	卌	卌	−
Ag 5	+	−	−	−	卌	卌	卌
Ag 6	±	−	−	−	卌	卌	卌
Ag 7	−	−	±	−	卌	卌	卌
Ag 8	±	−	−	−	卌	廾	±

− : insensitive; ± : slightly sensitive; + : sensitive;
廾 : markedly sensitive; 卌 : very markedly sensitive.

イシン（10γ）に対し感受性なく *Vibrio* に包含し得ない。また Ag 6，7 及び 8 についてはペニシリン（10μ）に対する感受性はほとんど認められず，この点で *Achromobacteriaceae* に包含することに若干の疑義を生ずるが，これ等の3株は色素産生能が著明でなく，テラマイシンに感受性を有しない点からむしろ前記生物学的性状から *Agarbacterium* と推定した結果を認めて差支ないものと考える。Ag 5 は明かにペニシリンに対して感受性を有し，テラマイシンに非感受性である点から，生物学的性状から同じく *Agarbacterium* に包含されるとしたことは妥当である。なお Ag 3 は抗菌剤に対する態度から同様 *Agarbacterium* に包含され得るが，上記のごとく生物学的性状より Species を決定する迄には至らなかつた。一方 Ag 4 はペニシリン感受性がなく，ポテト培地上で黄色色素を産生する点からテラマイシンに非感受性であつても Genus *Pseudomonas* に包含されるべきであろう。以上総括するに Ag 3 及び 4 は Species 不明ながら前者は Genus *Agarbacterium* 後者は Genus *Pseudomonus* に包含され，Ag 5，6 及び 7 は *Agarbacterium reducans*，Ag 8 は *Agarbacterium uliginosum* と同定される。

次にこれ等6菌株の 25°C における発育にともなう寒天及びアルギン酸の分解力を定量的に観察した結果を示すと Table 5 の通りである。すなわちこれ等寒天分解菌のうち Ag 4 を除く他の5株は，極めて強力なアルギン酸分解力をも有することが明かである。現在 Bergey's Manual に記載されている Species の中で寒

Table 5. The agar-digesting or alginic acid-digesting activity of isolated agar-digesting bacteria when grown in 0.25% agar or sodium alginate which contained ZoBell 2216E medium at 25°C

Strain No.	Reducing sugar (equivalent galactose γ/ml)				
	Agar			Alginate	
	48 hr	96 hr	104 hr	48 hr	96 hr
Ag 3	63	123	113	82	738
Ag 4	76	89	123	37	42
Ag 5	104	139	89	164	722
Ag 6	35	71	89	104	667
Ag 7	71	—	93	214	747
Ag 8	71	119	89	36	652

天及びアルギン酸の両者に対する活性を示すものは Genus *Alginomonas* に属する ***A. alginovora, A. fucicola*** などがあるが，これ等と著者の分離菌の性状とは著しく異り，このアルギン酸に対する活性については，各種の Genus についても今後更に検討が必要であろう。なおこれ等6菌株の酵素化学的究明については今後更に研究を進めるつもりである。

要　　約

1) 1958年5～8月の間に，北洋海域の61測点から312件の海水を採取し，これらの培養により711菌株を分離したが，これ等のうち Table 1 に示す6測点で採取した海水から分離された6菌株は寒天を著明に液化した。

2) これら6株の寒天分解菌は形態学的及び生物学的諸性状，並びに抗菌性物質に対する感受性よりそれぞれ Ag 3： Species 不明の *Agabacterium*, Ag 4： Species 不明の *Pseudomonas*, Ag 5，6 及び7： ***Agarbacterium reducans***, Ag 8： ***Agarbacterium uligionsum*** と同定した。

3) これら6菌株のうち Ag 4 を除く他の5株は寒天分解力のみでなく，極めて強力なアルギン酸分解力を併有した。

本実験遂行にあたり終始御指導を賜り且つ本報告の御校閲をいただいた坂井稔教授に対し深甚の謝意を表し，また種々御助力をいただいた信濃晴雄学士に感謝する。なお本研究費の一部は文部省科学研究費並びに財団法人水産科学研究奨励会交付金によるもので，ここに記して感謝の意を表する。

（本論文の要旨の一部は昭和34年度日本水産学会春季大会において報告した）

文　　献

1) Gran, H.H. (1902). *Zbl. Bakt.* **9**, 562.
2) Gray, P.H.H. & Chambers, C.H. (1924). *Anu. Appl. Biol.* **11**, 324.
3) Lundestad, J. (1928). *Zbl. Bakt.* **II** Abt. **75**, 321.
4) Waksman, S.A. & Bavendamm, W. (1931). *J. Bact.* **22**, 91.
5) ――――――, Carey C.L. & Allen M.C. (1934). *J. Bact.* **28**, 213.
6) Stanier, R.Y. (1941). *J. Bact.* **42**, 527.
7) Breed, R.S. *et al.* (1957). ***Bergey's Manual of Determinative Bacteriology***, **7 Ed.**, 1094 p. New York: The Williams & Wilkins Co.

8) Kadota H. (1951). *Mem. Coll. Agr. Kyoto Univ.* **59**, 54.
9) 石松一雄 (1953). 大阪市工研報告 **14**, 1.
10) 日高富雄・鮫島宗雄 (1953). 鹿大水産紀要 **3**, 158.
11) Araki, C. & Arai, K. (1954). *Mem. Facul. Indust. Arts, Kyoto Techn. Univ. Sci & Tech.* **3(B)**, 7.
12) Yaphe, W. (1957). *Can. J. Microbiol.* **3**, 987.
13) Swartz, N.N. & Gordon, N. (1959). *J. Bact.* **77**, 403.
14) Morita, R. & ZoBell, C.E. (1955). *Deep-Sea Res.* **3**, 66.
15) Gordon, R. & Smith, M.M. (1953). *J. Bact.* **66**, 41.
16) Somogyi, M. (1945). *J. Biol. Chem.* **160**, 69.
17) Shewan, J.M., Hodgkiss, W. & Liston, J. (1954). *Nature* **173**, 208.