



Title	低温性海洋細菌の分離培養についての検討
Author(s)	田島, 研一; TAJIMA, Kenichi; 絵面, 良男 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 22(1), 73-79
Issue Date	1971-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24221
Type	departmental bulletin paper
File Information	22(1)_P73-79.pdf



低温性海洋細菌の分離培養についての検討

田島 研一・絵面 良男・坂井 稔*

Procedure for the Isolation of Psychrophilic Marine Bacteria

Kenichi TAJIMA, Yoshio EZURA and Minoru SAKAI

Abstract

A study was made to provide a procedure for the isolation of psychrophilic bacteria in sea water. The procedure was seasonally applied to nearly pollution-free coastal sea water. The results obtained are summarized as follows:

(1) Diluted samples of sea water were inoculated at 40°C (4 days), 35°C (4 days), 25°C (6 days), and 15°C (10 days), and the viable colony counts per ml, average numbers of 3 plates, were measured according to the conventional procedure. On the other hand, all isolated colonies (about 30-40 colonies) were picked from a definite area of one plate out of the 3 plates, and transferred to the master plate. Microorganisms were inoculated on the four master plates according to some previously arranged position and spacing, incubated at the same temperature for isolation. Then a replica plating was made from the master plate for each of the seven daughter plates, incubated at 40°C (4 days), 35°C (4 days), 25°C (6 days), 15°C (10 days), 8°C (14 days), 5°C (14 days), and 0°C (21 days) respectively, and growth temperature ranges were determined. Thereafter, the percentage of the number of grouped isolates at a certain growth temperature range to that total of isolates was obtained. The percentage was then referred to with the viable colony counts per ml at each incubation temperature, and calculated probable bacterial counts. Furthermore, the sum total of the highest probable bacterial counts at each growth temperature range resulted in a probable total of bacterial counts in sample sea water (Table. 1).

(2) The total of viable counts in sea water is generally constant throughout a year, though temperatures of sea water get high and low.

(3) The effective incubation temperature and period for isolation of bacteria from sea water were for 10 days at 15°C or 6 days at 25°C. In cold season, however, if the temperature of sea water was below 12°C, the probable total of viable counts was obtained from higher counts after incubating both at 15°C for 10 days and at 25°C for 6 days.

(4) Among the marine psychrophilic bacteria of which the minimum growth temperature is below 8°C, those grown at about 40°C of maximum growth temperature were dominant in warm water, 35°C in lukewarm water, and 25°C in cold sea water. Dominant marine psychrophilic bacteria might be classified into a facultative type in warm water and an obligate type in cold water. The procedure described above was proposed to be employed for the isolation of marine psychrophilic bacteria.

結 語

低温細菌は生物学分野において分類学, 生理学, 生化学などに多くの興味ある問題を提供するのみならず自然界, すなわち海洋, 極地, 冬期間の陸地などにおいて種々な物質循環に重要な役割を演じ

* 北海道大学水産学部微生物学講座

(Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

ていることは明らかであり、さらに最近に至っては一般食品工業あるいは食品衛生分野においても重要関心事となってきている。低温細菌は、その性質上タン白および脂質分解性の強いものが多く¹⁻⁶⁾、食品の変質あるいは腐敗に大きく関与することから、冷凍・冷蔵食品の品質保持および貯蔵期間に大きい影響力をもっている⁷⁾。しかるに低温細菌の研究における過去の知見は主として酪農微生物の分野において得られたもので⁸⁾、これらを直ちに魚介類に適用することには若干の疑義もたれる。この点から魚介類に即した低温細菌に関する基礎的研究は動物性タン白資源を主として海産魚介類に依存するわが国においては目下の急務と考えられる。

本報においては、このような見地から海水中の低温細菌の分離培養法について検討すべく、比較的清浄と考えられる沿岸水を対象に基礎的研究を行なったので、その結果について報告する。

実験方法

1. 供試海水 供試海水は1968年6月上旬より翌年6月中旬に至る約1カ年間に、前後24回に亘って函館市近郊七重浜の海岸から約100m沖合まで突出している防波堤の突端において無菌的に表面海水を約50ml採取し、アイスボックスに納め、直ちに実験室にもち帰り実験に供した。

2. 分離培養法、生菌数および分離菌の発育温度域の測定法 供試海水を適宜滅菌人工海水(Herbstの人工海水⁹⁾)で希釈した後、各希釈海水の0.2mlずつをZoBell 2216 E海水培地¹⁰⁾の平板面に滅菌コ

Table 1. A procedure for the calculation of the total viable counts in sea water.
Probable Total Bacterial Counts/ml : 38,000

incubating temp. and period	15°C, 10 days		25°C, 6 days		35°C, 4 days		40°C, 4 days	
viable count /ml	22,000		25,000		5,800		2,400	
No. of picked colonies	33		40		30		25	
growth temp. range	B/A	C	B/A	C	B/A	C	B/A	C
40-0°C								
-5	1/33= 3.0%	660	8/40=20.0%	<u>5,000</u>	7/30=23.3%	<u>1,400</u>	3/25=12.0%	290
-8					5/30=16.7	<u>970</u>	3/25=12.0	290
-15					13/30=43.3	<u>2,500</u>	2/25= 8.0	200
-25					1/30= 3.3	<u>190</u>	2/25= 8.0	<u>200</u>
-35					1/30= 3.3	190	2/25= 8.0	<u>200</u>
35-0°C								
-5	8/33=24.2	5,300	12/40=30.0	<u>7,500</u>				
-8	5/33=15.2	3,300	7/40=17.5	<u>4,400</u>				
-15					2/30= 6.6	<u>380</u>		
					1/30= 3.3	<u>190</u>		
25-0°C								
-5	1/33= 3.0	660	1/40= 2.5	630				
-8	10/33=30.0	<u>6,700</u>	1/40= 2.5	630				
-15	7/33=21.2	<u>4,700</u>	11/40=27.5	<u>6,900</u>				
	1/33= 3.0	<u>660</u>						

note: Daughter plates were incubated at 40°C (4 days), 35°C (4 days), 25°C (6 days) 15°C (10 days), 8°C (14 days), 5°C (14 days), and 0°C (21 days).

A: No. of picked colonies B: No. of grown colonies C: probable viable counts

ンラージ棒で塗抹, 40°C (4日間), 35°C (4日間), 25°C (6日間) および 15°C (10日間) の4通りの分離培養を行ない, それぞれ最適希釈平板を選び, 常法¹³⁾により 1 ml 中の生菌数を測定するとともに, それぞれの代表的平板について一定区画中のすべての集落 (30~40個前後) を釣菌し, それらを一旦 ZoBell 平板面に配列を正して点滴移殖し, それぞれの分離温度で培養した後, それらを基に各7枚ずつの ZoBell 平板にレプリカ¹²⁾し, それぞれ 40°C, 35°C, 25°C, 15°C, 8°C, 5°C および 0°C の7温度で培養, その間 2, 4, 6, 7, 10, 14 および 21 日目に集落発生の有無を観察して, 各分離菌の発育温度域を観察した。

3. 海水中の推定生菌数ならびに推定総生菌数の算出法 試水中に存在することが予想される至適発育温度の異なるすべての細菌の生菌数の総和を算出する方法として, 著者らはずきのごとき方法を採用したのでその方法について1例をあげて説明することとする (Table 1 参照)。前述のごとく同一試料を 15°C, 25°C, 35°C および 40°C の4通りの温度で塗抹培養を行ない, それぞれ生菌数/ml を求めるとともに, それらの平板の一定区画中のすべての集落を釣菌し, 各集落の発育温度域を前述のごときレプリカ法により決め, 各発育温度域ごとに群別して全釣菌集落数に対する比率 (%) を求め, この比率 (%) と常法により求めた生菌数から各発育温度域ごとの推定生菌数を算出し, ついで4通りの分離温度を通じ各発育温度域における推定生菌数の最高値 (Table 1 アンダーラインで示した数値) の総和をもって, 試水中の推定総生菌数/ml と考えた。すなわち Table 1 に示した例では, 海水 1 ml 中の推定総生菌数は 38,000 である。

実験結果

1. 培養温度の測定菌数におよぼす影響と水温の関係 海水試料採水時の水温ならびに実験方法の項で述べた4培養温度で算出した試水中の生菌数の消長は Fig. 1 に示すごとくである。まず水温の最高は8月下旬~9月中旬の 22°C, 最低は2月下旬~3月上旬の 5°C 前後で, およそ7月から12月上旬に至る間は 12°C 以上, その後5月頃までは 12°C 以下で, 以後徐々に上昇した。つぎに前記の方法で算出した推定総生菌数は季節に関係なく年間を通じほとんど大きな変動は認められないが, 異なる培養温度により求められた生菌数については, 温水期 (12°C 以上) と冷水期 (12°C 以下) の間

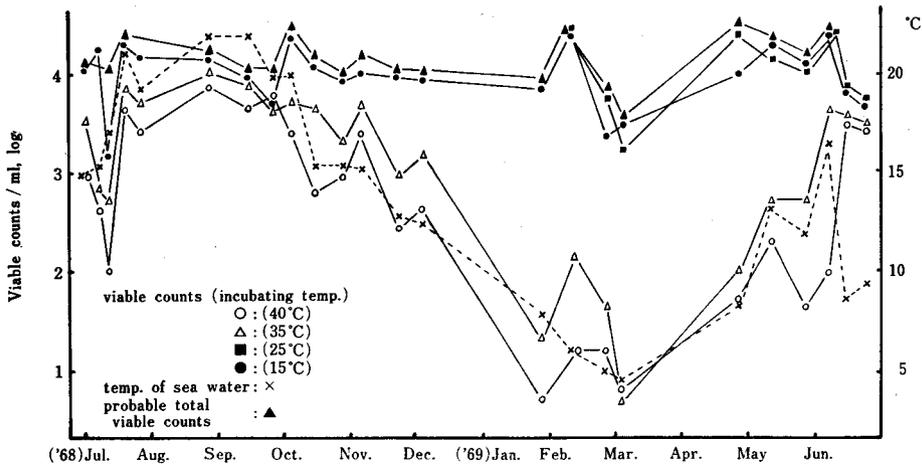


Fig. 1. Temperature of sea water at sampling time and variation of the viable counts in sea water calculated at various incubating temperatures.

にきわめて特徴的な差異が認められた。低温培養は高温培養より常に生菌数は大きく、その差異は温水期においては比較的小さいが、冷水期ではきわめて大きい。すなわち 15°C あるいは 25°C のごとき低温培養によって得られる生菌数は温水期、冷水期を通じ、推定総生菌数にほぼ一致し著者らの考案した推定総生菌数算出法の妥当性を肯定するとき結果を示した。また 35°C あるいはそれ以上の高温培養は、特に冷水期における場合、生菌数の測定に大きな誤差を招来することが確認された。

2. 推定総生菌数と培養温度の関係 15°C, 25°C, 35°C および 40°C の 4 培養温度で得られる各生菌数の推定総生菌数に対する比率(%)を Fig. 2 に示した。すなわち 40°C あるいは 35°C のごとき高温培養で得られる生菌数の推定総生菌数に対する比率(%)は温水期においては若干高いが、水温の低下とともに急激に低下し、冷水期に至っては両者の比率はほとんど認められるべき数値を示さなくなるに反し、15°C 培養ではその比率はきわめて高く、さらに 1969 年 2 月から 5 月の間に見られるような場合のごとく、15°C 培養でも両者の比率の低下するような際も、もし 25°C 培養を併用するならば、推定総生菌数に対する比率はほとんど 90~100% に達することが明らかにされた。

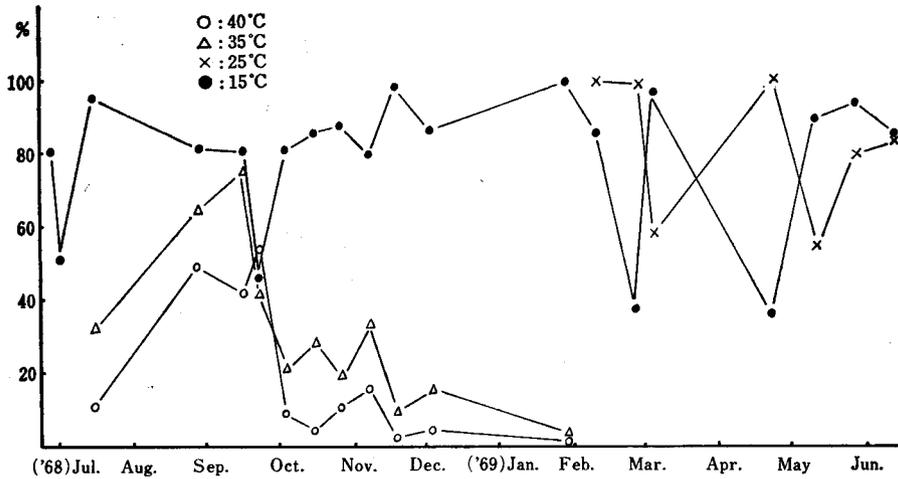


Fig. 2. The percentage of viable counts at various incubating temperatures to the probable total viable counts.

3. 低温細菌の発育上限温度の季節的変動 15°C 分離菌のうち発育下限温度が 8°C 以下にあるもの、すなわち一応低温細菌のカテゴリーに入ると考えられるもののみについて発育上限温度を検討し、これらが試水中の生菌数 (15°C 培養における) に占める比率 (%) を求め、その結果を Fig. 3 に示した。すなわち 7 月中旬より 9 月中旬のごとき高水温期においては、低温細菌といえども発育上限温度の高いもの (40°C あるいはそれ以上) が試水生菌数中の 80% 前後の高率を占め、9 月中旬より 10 月下旬のごとき水温の低下しはじめる時期には発育上限温度のやや低いもの (35°C) が高率となり、これに反して上限温度の低いもの (25°C) は、高水温期においてはきわめて低率であるが、10 月下旬以降のごとき水温が低下し、発育上限温度の高いものがほとんど検出されなくなるにつれて急激に高率となり、冷水期に至ってはほとんど 90~100% を占めた。このような傾向は 25°C 分離菌においても同様である。また 35°C および 40°C 分離菌についても同様の検討を行なったが、この場合発育上限温度の低いものは当然検出されないが、温水期においては発育上限温度の高いものが、ほぼ低温培養の場合に匹敵した。これに対し、冷水期では高温培養での分離菌株数が極端に少なくなるため一定の傾向はみられなかった。

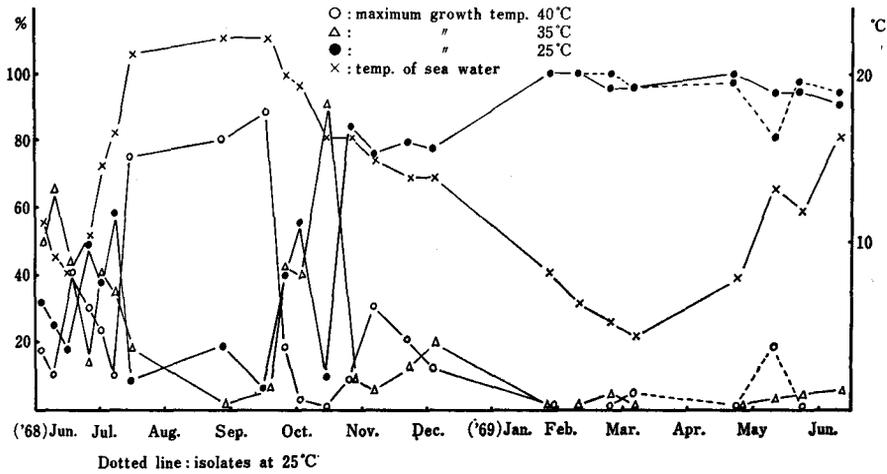


Fig. 3. The percentage of the isolates grow at 0°C, 5°C and 8°C among the isolates at 15°C and 25°C to the viable counts.

4. 発育上限温度を異にする低温細菌の季節的変動 15°C および 25°C 分離菌中、一応低温細菌と考えられる発育下限温度が 8°C 以下のものを、それらの発育上限温度差により細区分し、まずそれぞれの推定生菌数を算出し、つぎにそれらの推定総生菌数に対する比率 (%) を求め、それらの比率の総和と推定総生菌数中に占める低温細菌 (発育下限温度の 8°C 以下のもの) の比率の関係を検討し、その結果を Fig. 4 に示した。すなわち Fig. 4 に示すごとく温水期においては発育上限温度のいかににかか

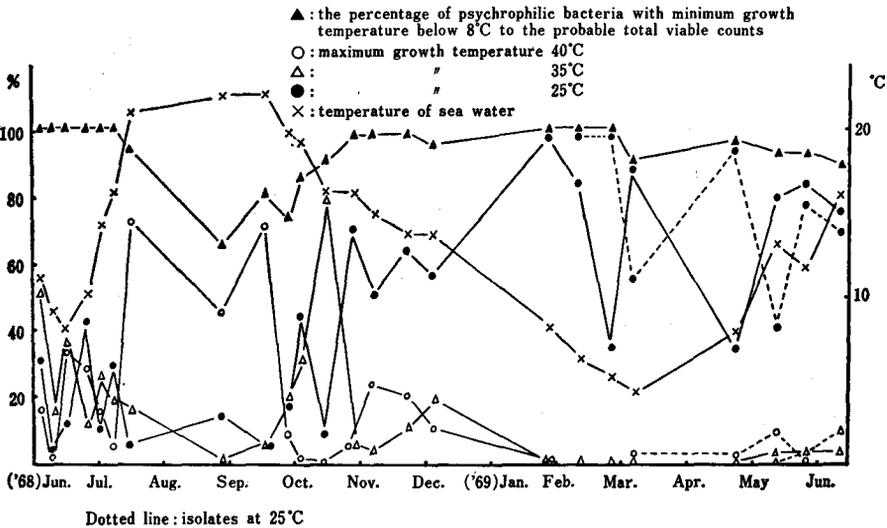


Fig. 4. The percentage of the viable counts of isolates with different maximum growth temperature which grow below 8°C among the isolates at 15°C and 25°C to the probable total viable counts.

ならず、それらの比率(%)の総和は推定総生菌数中に占める低温細菌の比率とはほぼ一致するが、これに反し冷水期においては必ずしも両者の一致はみられなかった。また 35°C および 40°C 分離菌中同様に発育下限温度が 8°C 以下のものについてのみ同様の検討を試みたが、高水温期では、発育上限温度の異なるものの推定総生菌数に対する各比率は若干ながら高い値を示したが、水温の低下とともに低下し、冷水期においては、このような高温培養では発育下限温度の低いものはほとんど検出されなくなり、各比率の総和と推定総生菌数中に占める低温細菌の比率の比較はほとんど期待し得られなくなった。

総括および考察

1968年7月より翌年6月までの間に低温性海洋細菌の分離培養温度を検討する目的で、まず試料として採取した海水の採水時の水温測定および各種の培養温度で測定した試水中の生菌数の季節的消長、さらにそれらから著者らの考案した方法 (Table 1) で算出した推定総生菌数に対するそれぞれの比率(%)を求めた結果、15°Cあるいは25°Cのごとき低温培養によって得られる生菌数は温水期、冷水期を通じて推定総生菌数とほとんど一致し、これに対し高温培養によって得られる生菌数は水温の変化に大きく左右されることが確認された。またそれぞれの培養温度により得られる生菌数の推定総生菌数に対する比率(%)は、15°C、10日間培養の場合はきわめて高く、さらに冷水期において15°C培養での分離率が若干低下する際も、もし25°C、6日間培養法を併用すればほとんど90~100%の分離率が得られることが判明した。他方40°Cあるいは35°Cのごとき高温培養は高水温期においては比較的高い比率で生菌数を測定し得るが、冷水期ではほとんど期待されるような結果は得られなかった。以上の点から海水中の生菌数測定には年間を通じ15°Cあるいは25°C、さらに冷水期においては特に15°Cおよび25°C培養の併用を行なうべきであることが思考された。

つぎに15°C(10日間)、25°C(6日間)、35°C(4日間)および40°C(4日間)の各培養法で分離したもののうち、一応低温細菌のカテゴリーに入るものと考えられる、すなわち発育下限温度が8°C以下にあるもののみについて、それぞれ上限温度別にそれらの生菌数中に占める比率(%)を求めた結果、高水温期においては低温培養(15°C、25°C)の場合でさえ上限温度の高い40°Cあるいはそれ以上のものが80%前後の高率を占め、水温の低下とともにそれらが急激に低下し、反対に上限温度の低いものが徐々に増加する傾向を示し、水温の低下の初期においては上限温度のやや低い35°Cのもの、冷水期に至るとさらに上限温度の低い25°Cのものが高率(90~100%)となって上限温度の高いものはほとんど検出されなくなることが確認された。これに反し高温培養(35°C、40°C)では勿論上限温度の低いものは検出されず、温水期においてのみ上限温度の高いものが低温培養の場合とほぼ同様に分離される傾向がみられた。

以上のことから未だ低温細菌(Psychrophiles)についての定義は確立されていないが、一応発育下限温度の8°C以下のものを低温細菌と考えるならば、海水については温水期ではいわゆる、*facultative Psychrophiles*が高率を占め、冷水期においては*obligate Psychrophiles*が高率を占めることが推察された。また発育下限温度の8°C以下のもののみについて、それらの発育上限温度により、すなわち40°Cあるいはそれ以上、35°Cおよび25°Cに分類し、それぞれの推定生菌数を求め、それらの推定総生菌数に対する比率(%)の総和と、推定総生菌数中、同様に発育下限温度の8°C以下にあるものの占める比率(%)との関係について検討を行なった結果、低温培養の場合、温水期では両者はほとんど一致したが、冷水期においては必ずしも一致をみなかった。しかしながら Fig. 2 で指摘したように、海水試料中の低温細菌の分離や生菌数測定には、冷水期においては15°C培養のみならず、25°C培養を併用し、何れか生菌数の多い方を採用することにより、その目的が達せられ得ることが推察された。

要 約

1. 海水中に存在する発育温度域を異にするすべての細菌数（推定総生菌数）を算出する方法として一私案（Table 1）を提案した。
2. 海水中の総生菌数は、温水期、冷水期にかかわらず年間を通じ大体一定である。
3. 海水からの生菌数測定や細菌分離法としては 15°C（10日間）、25°C（6日間）、特に冷水期においては両法の併用が最適である。
4. 低温性海洋細菌（発育下限温度が 8°C 以下のもの）の発育上限温度は、高水温期においては 40°C 程度のもの、水温の低下期においてはやや低い 35°C のもの、冷水期においてはさらに低い 25°C のものがそれぞれ高率を占め、温水期ではいわゆる facultative Psychrophiles が、冷水期には obligate Psychrophiles が高率を占める。したがって海水中の低温細菌を対象とする場合、特に上記 3 に示した培養法が必要である。

謝 辞

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) 小川益男 (1966). ジャパン フード サイエンス 5(1), 64.
- 2) ——— (1966). 同誌 5(2), 62.
- 3) ——— (1966). 同誌 5(3), 71.
- 4) ——— (1966). 同誌 5(4), 66.
- 5) ——— (1966). 同誌 5(5), 67.
- 6) Shaw, B. G. & Shewan, J. M. (1968). *J. appl. Bact.* 31, 89.
- 7) 善養寺浩 (1969). メディア・サークル 14, 187.
- 8) Thomas, S. B. (1969). *J. appl. Bact.* 32, 269.
- 9) 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.
- 10) ZoBell, C. E. (1941). *J. Mar. Res.* 4, 173.
- 11) 厚生省編 (1959). 衛生検査指針 III-1.
- 12) 広田幸敬 (1963). 蛋白質・核酸・酵素 8(9), 532.