



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; TAJIMA, Kenichi; 絵面, 良男 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 22(1), 80-90
Issue Date	1971-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24222
Type	departmental bulletin paper
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 encountered 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 言

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叢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 カ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100m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の2個の滅菌フラスコ中にそれぞれ約1lずつ採取し, アイスボックスに納め, 直ちに実験室に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¹⁾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海水斜面培地に移植し, その後の実験に供した。なお生菌数測定に当っては, 前報¹⁾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)³⁾ 1%(w/v) tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride水溶液に浸した濾紙上に, 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⁴⁾を用い, 分離菌の好氣的ならびに嫌氣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⁵⁾)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 polypeptone無添加の海水試料を5°Cの冷蔵庫中に貯蔵し約1カ月ごとに生菌数/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 10^8 個のオーダーであったが, 貯蔵1カ月後には 10^4 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 10^4 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 10^6 個, 2, 3カ月後も 10^5 ~ 10^6 個のオーダーを維持した。

2. 低温(5°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(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⁶⁾(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 sampling time	initial viable counts	peptone*	viable counts		
				1-month**	2-month**	3-month**
summer sample (1968, 6, 19)	16.0°C	5.8 × 10 ⁸	without	2.4 × 10 ⁴	5.9 × 10 ⁴	1.7 × 10 ⁴
		6.1 × 10 ⁸	with	1.6 × 10 ⁶	9.6 × 10 ⁶	2.4 × 10 ⁶
winter sample (1969, 1, 30)	6.2°C	3.4 × 10 ⁸	without	3.3 × 10 ⁴	9.4 × 10 ⁴	6.4 × 10 ⁴
		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

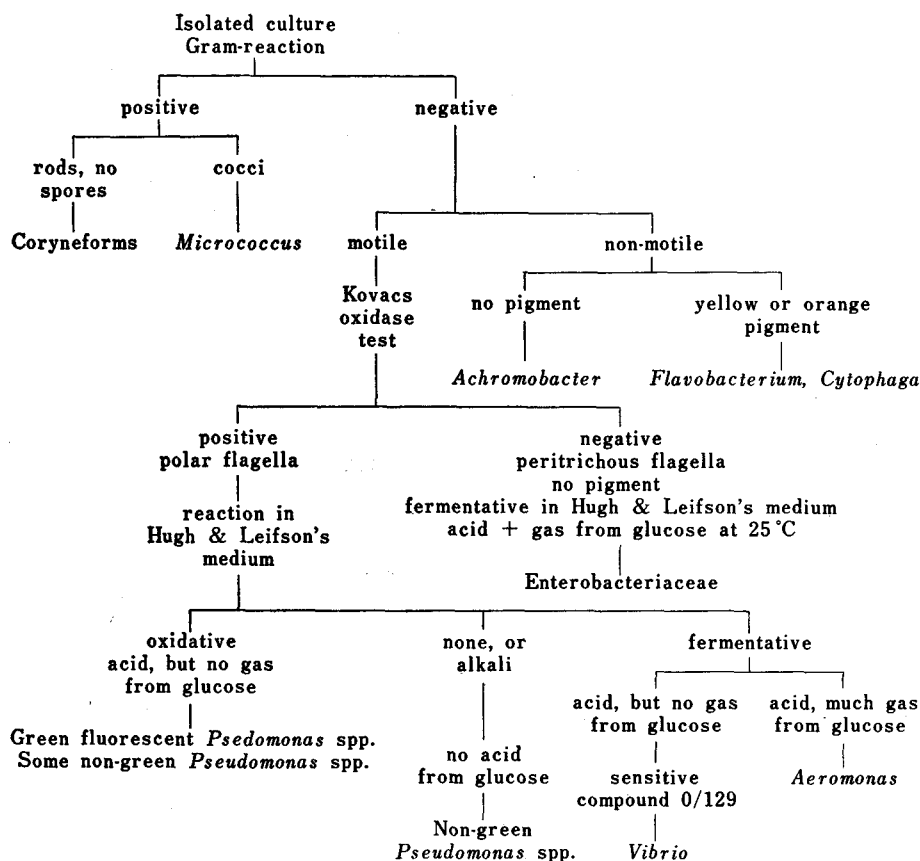


Fig. 1. A determinative scheme for the identification of certain genera of gram-negative bacteria (by Shewan, 1960)

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

genus	period of storage			
	initial	1-month	2-month	3-month
<i>Micrococcus</i>	32* (55.2)	26 (54.2)	2 (4.2)	0 (0)
Coryneforms	4 (6.9)	0 (-)	11 (22.9)	9 (20.9)
<i>Achromobacter</i>	2 (12.1)	6 (16.7)	5 (10.4)	14 (32.6)
<i>Flavobacterium</i> or <i>Cytophaga</i>	6 (10.3)	10 (20.8)	10 (20.8)	8 (18.6)
Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp.	7 (12.1)	0 (-)	9 (18.8)	2 (4.7)
Non-green <i>Pseudomonas</i> spp.	0 (-)	1 (2.1)	11 (22.9)	10 (23.3)
<i>Vibrio</i>	2 (3.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Yeast	0 (-)	3 (6.3)	0 (0)	0 (0)
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

genus	period of storage			
	initial	1-month	2-month	3-month
<i>Micrococcus</i>	3* (6.6)	0 (-)	2 (4.0)	1 (2.0)
Coryneforms	2 (4.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Achromobacter</i>	28 (62.2)	8 (16.7)	2 (4.0)	11 (22.0)
<i>Flavobacterium</i> or <i>Cytophaga</i>	3 (6.6)	0 (-)	0 (-)	1 (2.0)
Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp.	3 (6.6)	6 (12.5)	29 (58.0)	5 (10.0)
Non-green <i>Pseudomonas</i> spp.	5 (11.1)	34 (70.8)	16 (32.0)	30 (60.0)
<i>Vibrio</i>	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 20~30% 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 temp.	period of storage			
		initial	1-month	2-month	3-month
grow at 0°C	40°C	<i>Micrococcus</i> 18* Coryneforms 2 <i>Achromobacter</i> 2 <i>Flavobacterium</i> 1 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 1	<i>Micrococcus</i> 17 <i>Achromobacter</i> 1 Yeast 2	Coryneforms 7 <i>Achromobacter</i> 1 Green fluorescent <i>Flavobacterium</i> 3 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 2 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 2	Coryneforms 7 <i>Achromobacter</i> 6 <i>Flavobacterium</i> 3 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 1 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 3
	35°C	<i>Achromobacter</i> 3 <i>Flavobacterium</i> 3 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 2	Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 1	<i>Micrococcus</i> 1 Coryneforms 1 <i>Flavobacterium</i> 2 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 3 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 2	Coryneforms 2 <i>Achromobacter</i> 5 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 1 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 1
	25°C	<i>Achromobacter</i> 1 <i>Flavobacterium</i> 2 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 3 <i>Vibrio</i> 1	<i>Micrococcus</i> 1 <i>Achromobacter</i> 3 Yeast 1	<i>Micrococcus</i> 1 <i>Achromobacter</i> 3 <i>Flavobacterium</i> 4 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 4 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 7	<i>Flavobacterium</i> 2 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 5
not grow at 0°C	40°C	<i>Micrococcus</i> 13 Coryneforms 2 <i>Vibrio</i> 1	<i>Micrococcus</i> 6 <i>Flavobacterium</i> 1	<i>Flavobacterium</i> 1	<i>Achromobacter</i> 1 <i>Flavobacterium</i> 2
	35°C		<i>Micrococcus</i> 1 <i>Achromobacter</i> 1		<i>Achromobacter</i> 1
	25°C		<i>Micrococcus</i> 1 <i>Achromobacter</i> 3 <i>Flavobacterium</i> 9	Coryneforms 3 <i>Achromobacter</i> 1	<i>Achromobacter</i> 1 <i>Flavobacterium</i> 1 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 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 無添加例の結果にはば一致した。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。

3. 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 temperature range of isolates from the winter sea water without peptone during chill storing

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

* 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 4~7 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 from the summer sea water with peptone during chill storing

	maxium growth temp.	period of storage			
		initial	1-month	2-month	3-month
grow at 0°C	40°C	<i>Micrococcus</i> 29* <i>Achromobacter</i> 2 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 1	Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 34 <i>Vibrio</i> 2	<i>Micrococcus</i> 1 <i>Flavobacterium</i> 4 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 17	<i>Micrococcus</i> 3 Coryneforms 10 <i>Achromobacter</i> 6 <i>Flavobacterium</i> 7 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 2
	35°C	<i>Micrococcus</i> 1	Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 9	<i>Flavobacterium</i> 2 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 4	Coryneforms 1 <i>Achromobacter</i> 3 <i>Flavobacterium</i> 5 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 4
	25°C	<i>Micrococcus</i> 1 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 2	Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 3	<i>Flavobacterium</i> 1 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 25	<i>Flavobacterium</i> 7 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 2
not grow at 0°C	40°C	<i>Micrococcus</i> 19 <i>Achromobacter</i> 1			
	35°C				
	25°C		Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 1		<i>Flavobacterium</i> 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 non-green *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 temp.	period of storage			
		initial	1-month	2-month	3-month
grow at 0°C	40°C		<i>Achromobacter</i> 3 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 23	Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 17 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 1	<i>Achromobacter</i> 10 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 12 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 12 <i>Vibrio</i> 2
	35°C	<i>Achromobacter</i> 11* Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 2 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 1	<i>Achromobacter</i> 1 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 5	Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 3	Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 2
	25°C	<i>Achromobacter</i> 5 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 2	<i>Achromobacter</i> 4 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 14 <i>Vibrio</i> 1	<i>Achromobacter</i> 2 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 23 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 1 <i>Vibrio</i> 2	<i>Achromobacter</i> 6 <i>Flavobacterium</i> 2 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 2 Non-green <i>Pseudomonas</i> spp. 3 <i>Vibrio</i> 3
not grow at 0°C	40°C	<i>Coryneforms</i> 5			
	35°C				
	25°C	<i>Micrococcus</i> 1 <i>Achromobacter</i> 15 <i>Flavobacterium</i> 3 Green fluorescent <i>Pseudomonas</i> spp. 21 Non-green <i>Pseudomonas</i> 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、1~3 カ月の貯蔵期間中を通じ 80~90% 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 カ月後まで残存したものは 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 summer and the winter sea water during chill storing by modified Hidaka and Sakai's salts requirement test

	period of storage	number of strains	without peptone			number of strains	with peptone		
			T	H	M		T	H	M
summer sample	initial	55	68.5%	24.1%	7.4%	61	73.7%	17.5	8.8%
	1-month	45	53.3	4.4	42.2	49	0	91.7	8.3
	2-month	45	24.4	24.4	51.2	53	13.2	1.9	84.9
	3-month	42	42.9	4.8	52.3	50	36.0	18.0	46.0
winter sample	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
	2-month	53	9.3	11.6	79.1	49	6.1	85.7	8.1
	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、これについて *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 H 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¹⁾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¹⁾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 1 ml 中 10⁸ 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 10⁴ 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 10⁴ 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つ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 fluorescent *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（上記のごとき夏期の *Micrococcus* 属、冬期の *Achromobacter* 属の圧倒的状态は別として）、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カ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 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) 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) Kovacs, 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.
- 7) 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.
- 11) Hidaka, T. & Sakai, M. (1968). *Proc. U.S.-Japan Seminar on Marine Microbiology, Bull. Misaki Mar. Biol. Inst., Kyoto Univ.*, 12, 125.