

わが国の沿岸海域における炭化水素 酸化細菌に関する生態学的研究—V*

炭化水素酸化細菌の二次スクリーニング

藤沢 浩明・村上 正忠

Ecological Studies on Hydrocarbon-oxidizing Bacteria
in Japanese Coastal Waters-V
Secondary Screening of Hydrocarbon-oxidizing Bacteria

By

Hiroaki FUJISAWA and Masatada MURAKAMI

It has been reported that the population density of hydrocarbon-oxidizing bacteria (HO for short) was high in the oil-polluted areas of Japanese coastal waters such as the Seto Inland Sea. Accurate information on hydrocarbon-decomposing activity of HO is indispensable to study the ecology of them in the coastal waters. The present work was undertaken to clarify hydrocarbon-decomposing activity of HO isolated from seawater and bottom sediment. In this investigation, *n*-hexadecane was used as the index hydrocarbon, and hydrocarbon-decomposing activity of these bacteria was divided into six grades, on the basis of the decomposition rate of them. The results obtained can be summarized as follows; As to hydrocarbon-decomposing activity of HO isolated from seawaters, 77 strains out of 144 strains of HO group A ranked with higher three grades, and 143 strains out of 183 strains of HO group B ranked with higher grades. In case of hydrocarbon-decomposing activity of HO isolated from bottom sediment, 6 strains out of 9 strains of HO group A, and 8 strains out of 10 strains of HO group B, ranked with higher three grades respectively. Fifty seven strains out of the above-mentioned 77 strains of HO group A, possessed higher hydrocarbon-decomposing activity in Medium B where ammonium chloride was used as nitrogen source, and also 133 strains out of the above-mentioned 143 strains of HO group B, possessed higher decomposing activity in Medium A where L-alanine was used. Therefore, it is found out that the greater part of groups A and B is non-exacting bacteria in nitrogen requirement.

* 水産大学校研究業績 第902号, 1981年2月16日受理。

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 902. Received Feb. 16, 1981.

1. 緒 言

わが国の沿岸海域には、海水中や底泥中に炭化水素酸化細菌（HO と略称）がかなり高い生息密度で存在することが知られ^{1,2)}、また HO の生息密度と油分濃度などの環境因子との関係が解析されている^{3,4)}。日本沿岸海域における HO の生態を明らかにし、油濁に対する自浄作用を評価するためには、まず HO を分離し、分離菌株について炭化

水素分解能を調べる必要がある。

したがって、本報では先に確立された HO のスクリーニング法⁵⁾を用いて、岩国および吉見沿岸海域の海水あるいは底泥から分離した HO A 群（A と略称）153菌株、HO B 群（B と略称）193菌株、合計346菌株について、*n*-ヘキサデカンを指標炭化水素として、それぞれの基質分解能を6階級に格付けし、強い分解能をもつ菌株を二次的に判別したので、これらの結果を報告する。

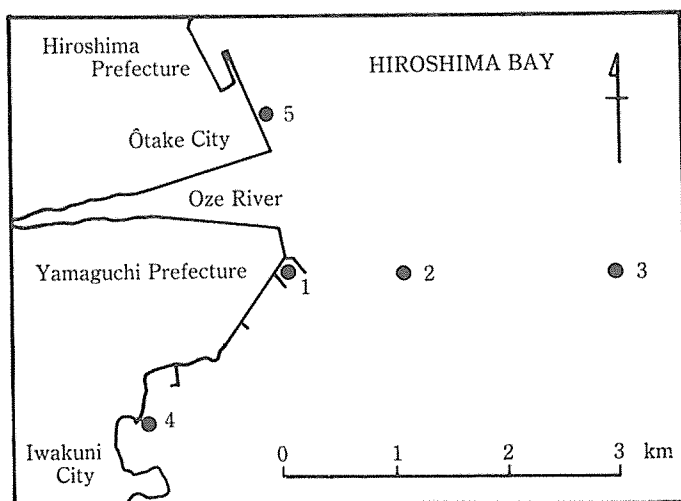


Fig. 1. Location of sampling stations in Iwakuni coastal waters.

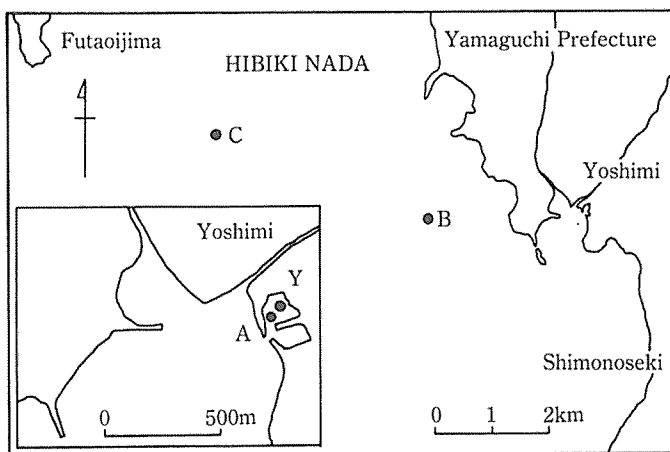


Fig. 2. Location of sampling stations in Yoshimi coastal waters.

2. 実験方法

2.1 供試細菌

岩国沿岸海域（岩国と略称，Fig. 1）および吉見沿岸海域（吉見と略称，Fig. 2）の各定点で採水した海水²⁾から，*n*-ヘキサデカンを指標炭化水素とするメンブランフィルター法⁴⁾によって分離したA144菌株およびB183菌株を供試した。また，底泥は吉見のみで採取し，同じ方法によって分離したA9菌株およびB10菌株を供試した。なお，AおよびBの意義については，既報⁵⁾で述べたとおりである。

2.2 細菌の炭化水素分解能の測定法

n-ヘキサデカンを指標炭化水素とする既報⁴⁾の方法によった。すなわち，各菌株の炭化水素分解能を次のように，基質分解率によって6階級に格付けした。 $\pm < \text{基質分解率 } 5\%$ ， $5\% \leq + < 10\%$ ， $10\% \leq ++ < 25\%$ ， $25\% \leq +++ < 50\%$ ， $50\% \leq ++++ < 75\%$ ， $75\% \leq +++++$ 。

3. 結果および考察

3.1 海水から分離したHOの*n*-ヘキサデカン分解能

岩国および吉見の海水から分離したA144菌株とB183菌株について，基質分解能を調べ，それぞれ結果を海域別に示すと，Table 1 および Table 2 が得られた。

Table 1 から，岩国の海水から分離したA65菌株のうち，*n*-ヘキサデカン分解率25%以上の強い基質分解能（ $+++$ ， $++++$ および $+++++$ ，以下同じ）をもつ細菌は17菌株（26.2%）であったが，吉見の海水から分離したAでは，79菌株中60菌株（75.9%）が強い基質分解能を示した。A全体でみると，強い基質分解能をもつ細菌は，144菌株中77菌株（53.5%）であった。

Table 2 から，岩国の海水から分離したB56菌株のうち，強い基質分解能をもつ細菌は36菌株（64.3%）であったが，吉見の海水から分離したBでは，127菌株中107菌株（84.3%）が強い基質

Table 1 *n*-Hexadecane-decomposing activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A isolated from seawater in Iwakuni and Yoshimi coastal waters

Decomposing activity of <i>n</i> -hexadecane	Number of strains isolated from Iwakuni coastal waters	Number of strains isolated from Yoshimi coastal waters	Number of strains pooled in the two areas
$\pm < \text{Decomposition rate } 5\%$	34	6	40
$5\% \leq + < 10\%$	14	7	21
$10\% \leq ++ < 25\%$	0	6	6
$25\% \leq +++ < 50\%$	3	11	14
$50\% \leq ++++ < 75\%$	1	8	9
$75\% \leq +++++$	13	41	54
Sum	65	79	144

Table 2. *n*-Hexadecane-decomposing activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria group B isolated from seawater in Iwakuni and Yoshimi coastal waters

Decomposing activity of <i>n</i> -hexadecane	Number of strains isolated from Iwakuni coastal waters	Number of strains isolated from Yoshimi coastal waters	Number of strains pooled in the two areas
$\pm < \text{Decomposition rate } 5\%$	12	8	20
$5\% \leq + < 10\%$	4	4	8
$10\% \leq ++ < 25\%$	4	8	12
$25\% \leq +++ < 50\%$	4	9	13
$50\% \leq ++++ < 75\%$	6	13	19
$75\% \leq +++++$	26	85	111
Sum	56	127	183

分解能を示した。B全体でみると、強い基質分解能をもつ細菌は、183菌株中143菌株（78.1%）であった。

以上の結果から、A、Bとも、岩国の海水より吉見の海水からの分離細菌に強い基質分解能をもつ菌株は多い傾向がみられたが、基質分解能の海域差については、今後さらに詳しく検討する必要がある。

3・2 底泥から分離した HO の *n*-ヘキサデカン分解能

吉見の底泥から分離したA 9 菌株およびB 10菌株について、基質分解能を調べた結果を Table 3 に示した。Table 3 から、強い基質分解能をもつ細菌が、Aで9菌株中6菌株（66.7%）であり、Bで10菌株中8菌株（80.0%）であって、両者共に、強い基質分解能をもつ細菌が大部分を占めていることが明らかである。さらに、多くの菌株について、また他の海域の底泥について調べる必要がある。

3・3 AをB培地で、BをA培地で培養した場合の *n*-ヘキサデカン分解能

実験手法として、Aの培養には有機態窒素源L-アラニンが、Bの培養には無機態窒素源塩化アンモニウムが用いられているので、いわばAは全通性HOであり、Bは窒素要求性の厳密でない一部の通性HOと考えられることを指摘した⁵⁾。また、海水中のAの生息密度とBの生息密度との間には密接な相関関係が認められ、前者が後者の約10倍であることが明らかにされている²⁾。さらに、

海水中のみでなく底泥中でも前者が後者の約10倍であって、BはAに含まれることを示唆した¹⁾。Bに有機態窒素源を利用するHOが含まれると同様に、Aにも無機態窒素源を利用するHOが含まれる可能性がある。いわばA、Bいずれにも窒素要求性の厳密でない細菌がかなり存在し、両者間の重複が予想されることが、両生息密度間に密接な相関関係がみられる一原因となっているとも考えられる。

以上の理由から、AおよびBの *n*-ヘキサデカン分解能を明らかにする上で、AをB培地で培養した場合の基質分解能、逆にBをA培地で培養した場合の基質分解能について調べ、両者間の重複の程度を検討する必要があると考えられる。

Table 1 のAのうち、強い基質分解能をもつ細菌、すなわち岩国の海水から分離した17菌株および吉見の海水から分離した60菌株、合計77菌株について、B培地で培養した場合の基質分解能を調べ、Table 4 に示す結果を得た。

Table 4 から、B培地で強い基質分解能を示すAの存在比率は、岩国で88.2%、吉見で70.0%、全体で74.0%となって、いずれもかなり高いことがわかる。なお、+以上の基質分解能をもつAの存在比率は、岩国で94.1%、吉見で73.3%、全体で77.9%であった。

ついで、Table 2 のBのうち、強い基質分解能をもつ細菌、すなわち岩国の海水から分離した36菌株および吉見の海水から分離した107菌株、合計143菌株について、A培地で培養した場合の基質分解能を調べ、Table 5 に示す結果を得た。

Table 5 から、A培地で強い基質分解能を示す

Table 3. *n*-Hexadecane-decomposing activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from bottom sediment in Yoshimi coastal waters

Decomposing activity of <i>n</i> -hexadecane	Number of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A	Number of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria group B
± < Decomposition rate 5%	1	1
5% ≤ + < 10%	1	1
10% ≤ ++ < 25%	1	0
25% ≤ +++ < 50%	1	2
50% ≤ ++++ < 75%	2	2
75% ≤ ++++	3	4
Sum	9	10

Table 4. *n*-Hexadecane-decomposing activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria group A isolated from seawater in case of incubating them in Medium B*

Decomposing activity of <i>n</i> -hexadecane	Number of strains isolated from Iwakuni coastal waters	Number of strains isolated from Yoshimi coastal waters	Number of strains pooled in the two areas
± < Decomposition rate 5 %	1	16	17
5 % ≤ + < 10 %	0	1	1
10 % ≤ ++ < 25 %	1	1	2
25 % ≤ *** < 50 %	3	7	10
50 % ≤ **** < 75 %	5	9	14
75 % ≤ *****	7	26	33
Sum	17	60	77

*Ammonium chloride was used as nitrogen source.

Table 5. *n*-Hexadecane-decomposing activity of hydrocarbon-oxidizing bacteria group B isolated from seawater in case of incubating them in Medium A*

Decomposing activity of <i>n</i> -hexadecane	Number of strains isolated from Iwakuni coastal waters	Number of strains isolated from Yoshimi coastal waters	Number of strains pooled in the two areas
± < Decomposition rate 5 %	0	5	5
5 % ≤ + < 10 %	0	1	1
10 % ≤ ++ < 25 %	1	3	4
25 % ≤ *** < 50 %	0	5	5
50 % ≤ **** < 75 %	2	8	10
75 % ≤ *****	33	85	118
Sum	36	107	143

* L-Alanine was used as nitrogen source.

Bの存在比率は、岩国で97.2%，吉見で91.6%，全体で93.0%となつて、著しく高いことがわかる。なお、+以上の基質分解能をもつBの存在比率は、岩国で100%，吉見で95.3%，全体で96.5%であつた。

Table 4 および Table 5 の結果を合わせて考察すると、予想通りA、B共に窒素要求性の厳密でない細菌が大部分を占めており、とくにBでこの傾向が強いことがわかつた。したがつて、実験上A、B別々に分離した菌株であっても、互に他群の性質をもつ細菌が多く、両者が重複する程度は大きいといえる。AおよびBの意義については既報⁵⁾で述べたように、いずれも通性HOであつて、さらに窒素要求性によってAおよびBの2者に分けたのであるが、もともと細菌には窒素要求性の厳密でない種類が多いこと⁶⁾から、両者間の重複はやむをえないと考えられる。ただ、従来のほと

んどすべてのHOの研究で、窒素源として無機態窒素のみの培地が用いられている（この場合の細菌はBに相当する）が、日本沿岸海域において有機態窒素の濃度が高い有機汚染の現状⁷⁾から考えて、有機態窒素源を利用するHOの必然的存在を予測した上で、あらたにAの概念をたてたのである。実際にAの生息密度がBの生息密度の約10倍であること^{1,2)}からみれば、当然Aは日本沿岸海域における油濁の浄化に大きい役割を果していると考えられる。しかし、A、B相互間の重複の程度が大きいこと、Bの生息密度が海域の油濁指標として有効であること^{2,3)}、さらにAよりもBに強い基質分解能をもつ菌株が多いこと（Table 1 および Table 2）などを考え合わせると、今後の研究においては、Bを主とし、Aを従として研究を進めてもよいと思われる。

4. 要 約

わが国の沿岸海域における炭化水素酸化細菌 (HO) の生態を明らかにする研究の一環として、岩国沿岸海域および吉見沿岸海域の海水あるいは底泥から分離した HO A 群 (A) 153 菌株, HO B 群 (B) 193 菌株, 合計 346 菌株について, *n*-ヘキサデカンを指標炭化水素とした場合の基質分解能を 6 階級 (±, +, #, ##, ### および ####) に格付けし, 強い基質分解能をもつ細菌を二次的に判別し, 次の結果を得た。

1. 海水から分離した HO では, 強い基質分解能 (##, ### および ####) をもつ細菌が, A で 144 菌株中 77 菌株 (53.5%) であり, B で 183 菌株中 143 菌株 (78.1%) であった。両者共に, 岩国沿岸海域より吉見沿岸海域からの分離細菌に強い基質分解能をもつ菌株が多い傾向がみられた。

2. 底泥から分離した HO では, 強い基質分解能をもつ細菌が, A で 9 菌株中 6 菌株 (66.7%) であり, B で 10 菌株中 8 菌株 (80.0%) であった。

3. 強い基質分解能をもった A の 74.0% は, B 培地 (窒素源は塩化アンモニウム) でも強い基質分解能を示し, また強い基質分解能をもった B の 93.0% は, A 培地 (窒素源は L-アラニン) でも強い基質分解能を示した。したがって, 両者共に窒素要求性の厳密でない菌株が大部分を占めていることがわかり, A, B 別々に分離した菌株であっても, 互に他群の性質をもつ細菌が多く, 両者の重複する程度は大きいと考えられる。

終わりに, 本実験に協力された水産大学校微生物学研究室卒論学生であった有馬 強, 木田長史郎, 入江一博, 北原文昭, 大谷謙二, 上原啓嗣および大畑安夫の諸君に謝意を表す。なお, 研究費の一部分は, 環境庁水島重油流出事故漁業影響調査費および農林水産生態系における汚染物質の循環と指標生物に関する研究費によった。

文 献

- 1) 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦：日水誌, 44, 91~104 (1978).
- 2) 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦：日水誌, 45, 1099~1107 (1979).
- 3) 村上正忠・藤沢浩明・真鍋武彦：日水誌, 45, 1091~1098 (1979).
- 4) 藤沢浩明・村上正忠：水産大研報, 28, 101~108 (1980).
- 5) 藤沢浩明・村上正忠・真鍋武彦：日水誌, 43, 659~668 (1977).
- 6) 坂口謹一郎・有馬 啓：生物化学ハンドブック (児玉桂三編), 新版, 技報堂, 東京, 1964, pp. 632~635.
- 7) 吉田陽一：海洋の生態系と微生物 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1975, pp. 71~84.