

沿岸海域における細菌群の分布と増殖速度

林 孝市郎

Distribution and Growth Rate of Bacteria in Coastal Sea Water

Koichiro HAYASHI

1. 緒 言

沿岸海域は、陸と海とが接する所であり、砂浜、河口域、干潟などが存在し、人間生活にとっても重要な場である。しかし近年わが国では、海岸線の利用改変によって出現した人工、半人工海岸は、全国海岸線の約40%にも達すると推定され、これ以上の埋立を防止し、自然環境を守ろうとの運動も起こりつつある。

沿岸海域には、河川水や沿岸市町村からの排水が直接に流入し、富栄養化を受け易い水域であるとともに、潮汐作用や気温の影響を受け易い水域でもある。また沿岸海域に生息する生物群への栄養、食物が絶えず補給されて豊富に存在し、水深の浅いことや波浪の作用などによって溶存酸素も多量であるという特徴を有している。したがって、そこには生存する微生物群も多様、多数であり、微生物群による有機物の分解作用もまた強力であると考えられる。しかしながら、潮間帯、特に干潟域における微生物群の種類、作用、生態などに関しては僅かの知見があるに過ぎず不明の点も多い。干潟域は生物生産力の大きい場であるとともに、海水浄化能の高い場であると考えられ、干潟の重要性は従来から高く強調されてはいるが、これを実証した研究は今迄にほとんど行われていないのが実情である。

著者は、昭和57年から62年におよぶ約5年間にわたり、愛知県三河湾の干潟水域を主要な研究対象水域として、細菌群の分布、増殖速度、有機物分解活性などを測定してきた。今回多数の測定結果についてまとめることができたので、その一部を報告する次第である。

2. 研究方法

2. 1 試料の採取

試料海水および海底砂泥は、三河湾の矢作古川河口域に広がる干潟域の9定点(図1)から主として採取した。また知多半島沿岸、伊勢湾津市海岸、日本海の敦賀湾、小浜湾、宮津湾などからも試料海水を採取した。干潟域の試料は、年間を通じて約2ヵ月毎に採取し、細菌群の

測定などに供した。

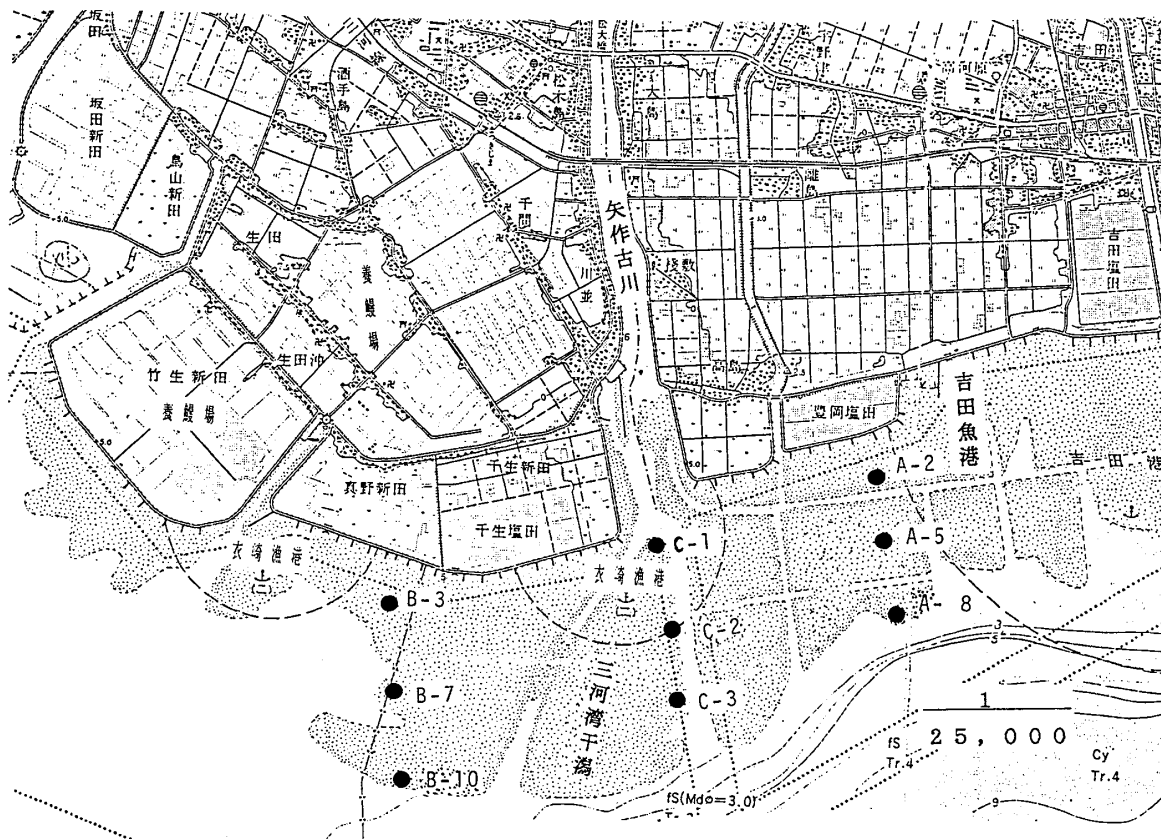


図1 三河湾の試料採取定点

2. 2 細菌数の測定法

2. 2. 1 総菌数と生菌数の直接測定法

総菌数の測定は、Porter (1980)¹⁾のDAPI法を使用して実施した。この方法は、細菌群の現存量の測定とともに、細菌群の増殖速度の測定にも有用な方法である。生菌数の直接測定法として、Kogureら(1978)²⁾の方法を使用した。これらの測定方法を図2に示した。またHobbieら(1977)³⁾、Zimmermanら(1978)⁴⁾のAO染色法も併用した。これらはすべて、落射蛍光顕微鏡を使用する直接菌数計数法である。

2. 2. 2 各種細菌群数の測定法

各種細菌群の現存量の測定には、今迄に種々の方法が考案されてきたが、培養法による各種細菌群の測定は、培地の種類、培養時間、培養温度などについて、なお多くの検討が必要な微生物群も存在する。この研究では、顕微鏡を使用する直接計数法以外の細菌群は「海洋微生物研究法、門田・多賀編、学会出版センター(1985)」の方法⁵⁾によって測定した。

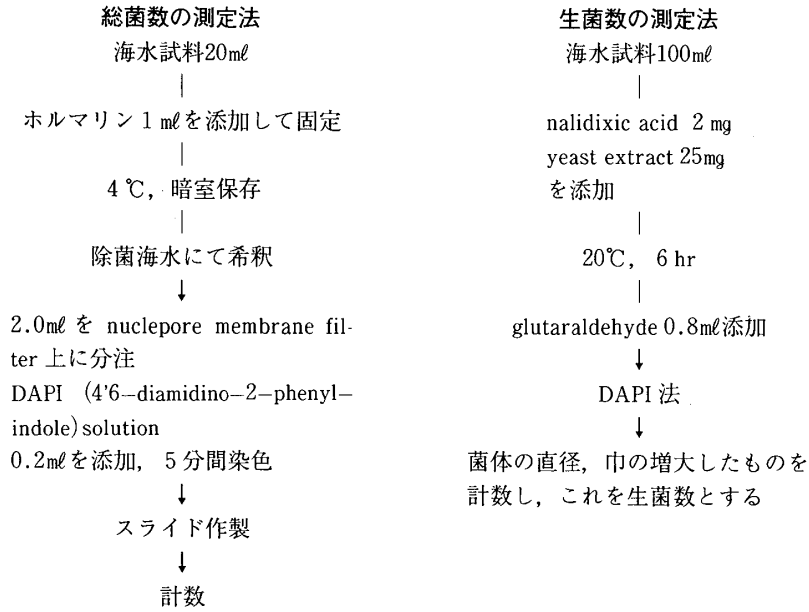


図2 DAPI法 (Porter, 1980) による総菌数と生菌数の測定方法

2. 2. 3 細菌群の増殖速度, 生産量, 被食量の測定方法

自然環境下において, 細菌群の増殖速度を測定するため, 図3に示した微生物増殖速度測定容器 (R装置) を使用した。容器の中央部の両側には, 0.1 μ m の pore size を有する nuclepore membrane filter を挿入し, 50ml の試料を収容し, 現場海水中に浸漬し, 一定時間毎に一定量の試料を取り出し, 試料中の総菌数と生菌数とを測定し, 海水中における細菌群の増殖速度を算出した。この方法によれば, 細菌群が現場の海水中において, 他の生物の影響, 特に被食されることなく, 自由に増殖できる小環境を設置した場合の増殖速度を求めることができる。

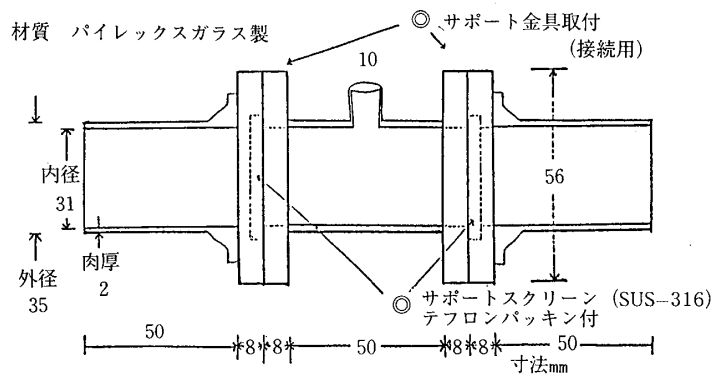


図3 微生物増殖速度測定容器 (R装置)

しかし, 自然海水中において細菌群は, 増殖とともに他の生物による被食や死亡などが生じ, これらを考慮した増殖速度を測定しなければ, 細菌群の生産量を論ずることができない。従来細菌の増殖速度の測定のため, 多くの方法が提案されている⁶⁾が, 著者は前田 (1985)⁷⁾の方法は比較的实施し易いと判断し, この方法にしたがって海水中における細菌群の生産量と被食量

とを測定した。この際総菌数と生菌数とは前述の顕微鏡を使用する直接計数法により実施した。細菌群の生産量と被食量の計算方法を図4に示した。

1日間の細菌の増加量 $T_1' - T_0'$

$$\text{生菌1細胞当りの増殖量 } (\alpha) = \frac{\text{1日間の増殖量}}{\text{0日時の生菌数}} = \frac{T_1' - T_0'}{V_0'}$$

原水とろ過水中の生菌の単位当りの増殖量が同じであるとする

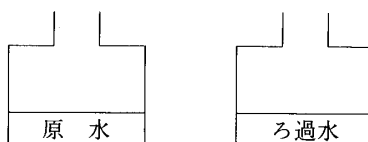
$$\text{原水中の増加量} = V_0 \times \alpha = V_0 \times \frac{T_1' - T_0'}{V_0'}$$

被食量は0日時の全細菌数と増加量の和から1日後の全細菌数を差し引いたものであるから

$$\text{原水中における被食量} = T_0 + V_0 \times \alpha - T_1$$

$$T_0 + V_0 \times \left(\frac{T_1' - T_0'}{V_0'} \right) - T_1$$

T ; 全菌数
V ; 生菌数
D ; 死菌数



T' ; 全菌数
V' ; 生菌数
D' ; 死菌数

図4 細菌群の生産量と被食量の計算方法

2. 2. 4 分離菌株の同定

三河湾の海水および干潟砂中に生息している細菌群の主要な種類を明らかにするため、海水試料から150菌株を、干潟砂から150菌株を分離し、Bergey's manual^{8),9),10)}に準拠してgenusレベルまでの同定を実施した。

3. 研究結果および考察

3. 1 三河湾の干潟域における細菌群の現存量

干潟域における細菌群の現存量は、季節、干潟域の場所、試料採取時間、海水の干満状態、降雨、風波など干潟域の環境に影響を与える多くの要因によって変動すると考えられる。また同一地点においても、同時に多数の試料を採取して細菌群の現存量を測定し、平均値と偏差とを求めることが望ましい。しかしこれには多数の器具と人力とを要し、容易ではないため、1定点について1試料の測定結果を求めざるを得なかった。三河湾の干潟域全体として、年間を通じて、各種微生物群の現存量を全体的に把握するためには、測定された多数の測定結果の平均値を求めれば、一応の代表値とみなすことが可能であろう。特に夏季と冬季との測定値、沿岸に近い定点と離れた定点での測定値などに大きい差がない場合には、求められた平均値は、

その水域の代表値としての価値が高い。5年間にわたり、9定点の試料についての測定結果は、年間を通じて、少数の例外を除いて、著しい差が認められなかった。したがって、採取した全試料から得られた測定値の平均値は、それなりの意味を有していると考えられる。干潟砂中に存在する細菌群と酵母の現存量の平均値を多数のものから順次配列して示したものが図5である。干潟砂と海水中の細菌群の現存量は、干潟砂中に多い細菌群は、干潟砂上の海水中にもやはり多数存在している傾向が示されている。しかし全く同一の分布パターンであるとは言い難い。砂粒子表面においては、微生物群は小コロニーの形で存在することが多く、また海水に比較して砂層は微好气的～嫌气的環境が形成され易い。これに対して、海水中では干満、波浪、河川水の影響などによって好气的条件が維持され、微生物群は流動した海水中に単独または懸濁物に付着して浮遊した状態で存在しているなど、砂粒子からなる砂層と流動する海水との環境の差が各種微生物群の現存量にも影響しているものと考えられる。図5に示したごとく、海水中には総菌数として 5.5×10^6 cells/ml, 砂粒子中には 5.0×10^8 cells/g (wet) が存在し、海水に比較して砂粒子表面に多数の細菌群が存在していた。

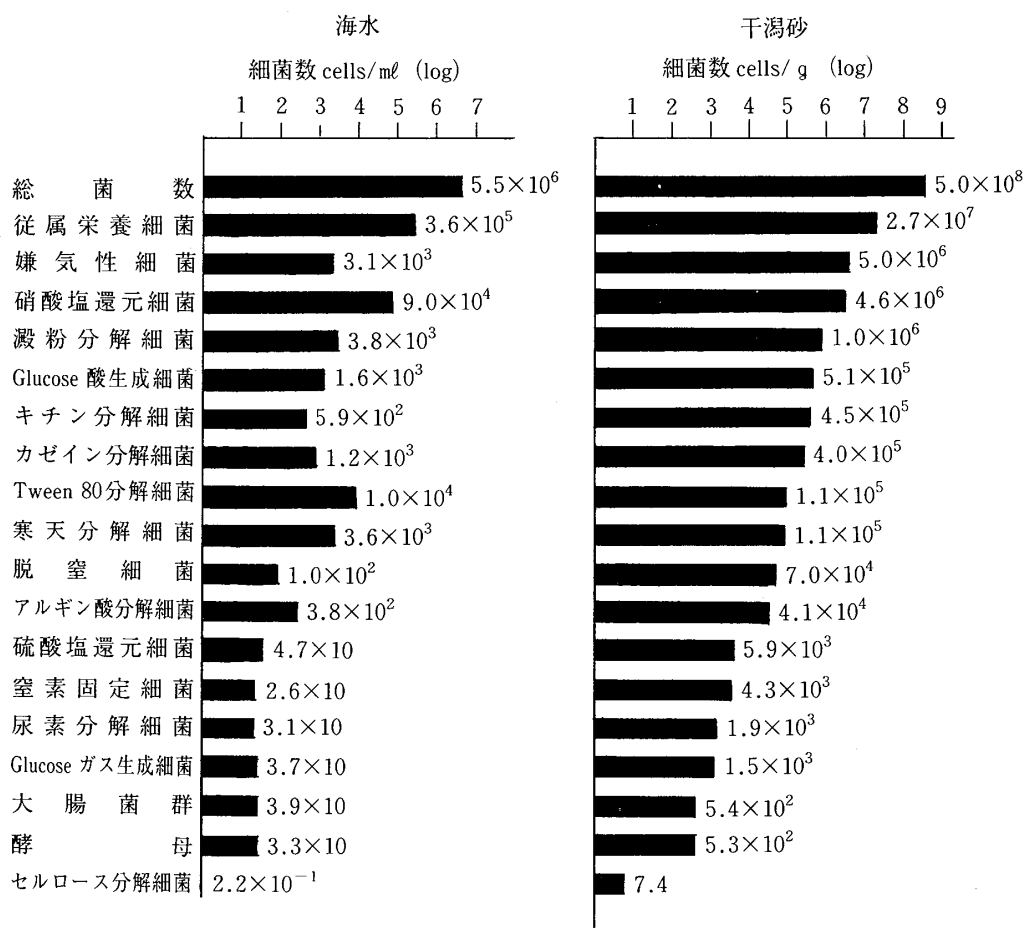


図5 三河湾干潟域における細菌・酵母の現存量

細菌群の現存量を、C、N量で表現することは物質循環を考察する上では必要と考えられる。細菌体の比重を1.1、水分含量を78%、乾重量の50%をC量とする換算がよく使用されているが、今迄に提案されている細菌のC量は、 $0.13\sim 0.17\times 10^{-14}$ g C/細胞の範囲であり、これからC/N比の測定によって、N含量を表現することが行われている。¹¹⁾ この研究では、今井の計算基準¹²⁾に従って計算すると、海水中には、77mg C/m³、21mg N/m³が細菌群のC、N量として現存していることになる。また干潟砂の表層から5cm層までの計算をすれば、350mg C/m²、90mg N/m²が細菌群としてC、N現存量となる。

3. 2 沿岸海域における細菌群の増殖速度

細菌群は海水中の有機物の分解者として、物質循環に大きい役割を果たしているが、また海水中の有機・無機物を利用して増殖し、増殖した細菌体自身が高次生物の餌料として捕食されている。しかも細菌群は極めて高い増殖力を有しているため、植物プランクトンとともに生物の食物連鎖の最初の段階として重要視されている。海水中における細菌群の増殖速度を測定した結果は次のごとくである。

3. 2. 1 R装置を使用した場合の増殖速度

三河湾の吉田漁港の海水中にR装置を浸漬することにより、海水中における細菌群の増殖速度を測定した。5月(水温23.4–18.7℃)に、最初の細菌群数を異にした場合について実験した結果を図6に示した。これによれば、最初の細菌群が少ない程細菌群は速やかに増殖し、世代時間は短くなった。このことは、原生動物などによって細菌が捕食されたとしても、細菌群は数が少なくなればなる程増大した増殖速度で、もとの細菌群レベルにまで回復することを示している。またこの海水環境下では、何等かの原因によって細菌群が減少したとしても、18時間後にはもとの細菌濃度となり、海水は一定の細菌群を維持していくことを示している。次に特定の細菌菌株についても、同様な増殖速度を有しているかどうかを明らかにするため、三河湾海水から黄色のコロニーを形成する菌株(X-菌株)と赤色コロニーを形成する菌株(Y-菌株)とを分離した。この2菌株の細菌学的性質を表1に示した。X-菌株は*Flavobacterium*属に、Y-菌株は*Bacillus*属に所属すると同定できた。この2菌株の培養物を滅菌海水を使用して希釈した後R装置内に収容し、吉田漁港内の海水中に浸漬し、14時間後に平板法により、この2菌株の菌数増加を黄色または赤色コロニーを計数することにより求めた。結果を図7に示した。X-菌株とY-菌株とは、R装置内に収容した時の最初の細菌数が異なるため、同様な増殖速度ではなかったが、X-菌株は $\mu=0.19$ 、Y-菌株は $\mu=0.79$ の増殖速度を示し、これらの2菌株は、自然環境下において速やかに増殖することが認められた。

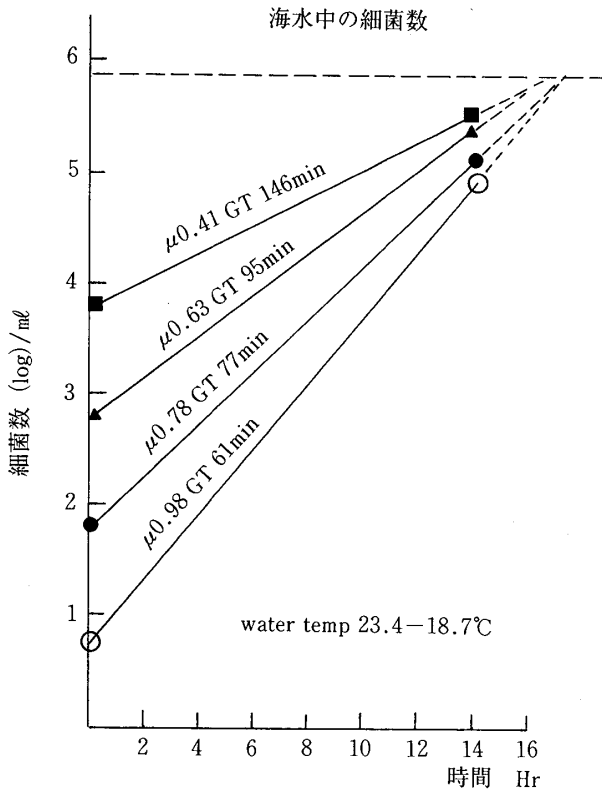


図6 三河湾海中における細菌群の増殖速度

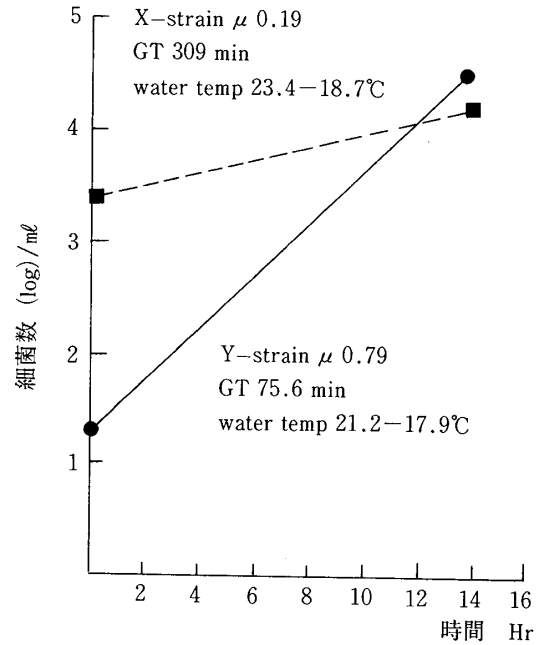


図7 分離菌株の海中における増殖速度

表1 三河湾干潟域から分離した2菌株の細菌学的性質

	X-strain	Y-strain
Form	rod	rod
Gram	-	+
Spore	-	+
Flagella	-	Peritrichate
Motility	-	+
Growth	facultative anaerobe	facultative anaerobe
Pigment	yellow	red
Genus	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacillus</i>

次に三河湾以外の沿岸海域における細菌群の増殖速度を測定した。海水中的細菌数を1/100となるよう除菌した現場海水をR装置内に収容し、現場海水の中にR装置を浸漬し、12時間後に装置内の細菌数を測定し、世代時間と増殖速度とを算出した。結果を表2に示した。これによれば、測定は4月～5月の水温として16.0-21°Cの範囲において測定されたが、世代時間は4-19時間、増殖速度は0.05-0.4のかなり広い範囲であった。これはそれぞれの海域の特徴が表現されていると考えられる。しかし先述したごとく、増殖速度は測定の最初の菌数と深い関係があるため、R装置を使用した測定結果については、今後更に検討する必要がある。

表2 沿岸海域における細菌群の増殖速度

試料	水温(℃)	世代時間(Hr)	増殖速度(μ)
名古屋港	16.0	19.51	0.051
武豊港	19.0	8.42	0.119
豊浜	20.0	7.74	0.129
常滑港	18.0	18.05	0.055
敦賀港	19.0	4.66	0.215
小浜湾	21.4	9.60	0.104
高浜	18.8	5.88	0.170
舞鶴湾	20.9	9.16	0.109
宮津湾	20.0	2.45	0.408
津一町屋浦	14.7	6.86	0.146
浜島-太平洋側	18.0	4.88	0.205
浜島港	18.0	6.14	0.163
英虞湾	18.0	7.34	0.136
二見ヶ浦	17.0	7.55	0.132
松阪港	16.0	5.88	0.170

3. 2. 2 細菌群の生産量と被食量

前田(1985)の方法を使用して、三河湾の海水について、細菌群の生産量と被食量とを算出した結果を表3および図8に示した。これらによれば、三河湾の海水中においては、24時間に現存量と同程度の細菌が生産され、生産された量に近い細菌が捕食されているという結果が得られた。つまり海水中で細菌群は被食される量を絶えず増殖により補給して、一定の細菌数レベルを維持していることが証明されたわけである。細菌群を捕食する微生物として、繊毛虫や鞭毛虫などが考えられるが、昭和62年1月の測定結果では、繊毛虫と鞭毛虫との合計は定点によって多少異なるが、 $3.4 \times 10^2 \sim 7.9 \times 10^2 / \text{ml}$ の範囲であり、繊毛虫が大部分で鞭毛虫は少数が存在したに過ぎなかった。前田(1985)が相模湖において細菌群の生産量と被食量について測定した結果⁷⁾と三河湾干潟域における今回の測定結果とは、ほとんど同程度の生産量と被食量であり、相模湖と三河湾とは、淡水、海水と異なった環境ではあるが、細菌群の生産量と被食量において同様であることは興味深い。

表3 三河湾海水中における細菌群の生産量と被食量

	September	November	January
生産量			
cells/ml/day	6.7×10^6	7.8×10^6	5.5×10^6
被食量			
cells/ml/day	4.1×10^6	3.2×10^6	3.0×10^6

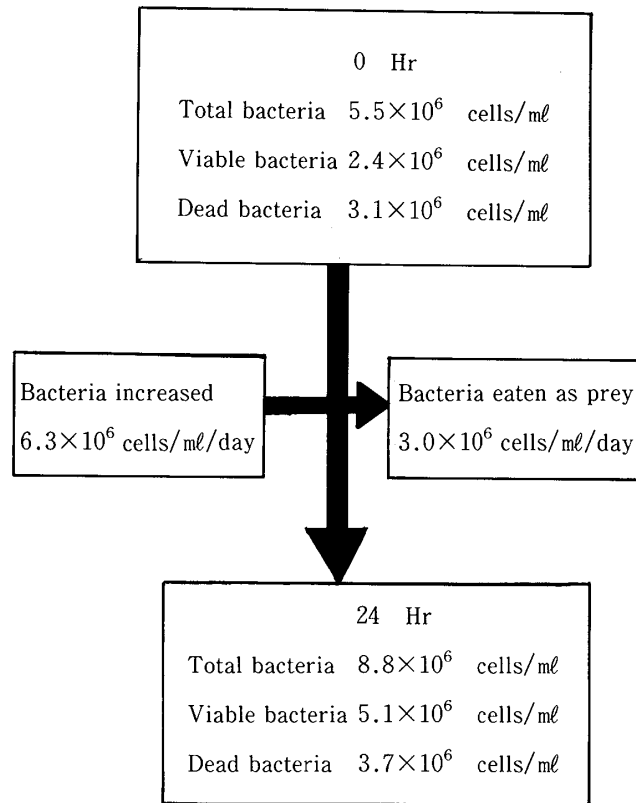


図8 三河湾海中における細菌群の現存量・生産量・被食量の関係（数値は平均を表す）

3. 2. 3 三河湾干潟域における細菌群の分布の特徴

三河湾の干潟域では、矢作古川から河川水が流入している。降雨量の多い梅雨期には、多量の淡水が干潟域に流入し、特に干潮時においては、広範囲にわたり淡水域が出現する。この場合には干潟域の微生物相は大きく変化している。矢作古川の河川水中には 10^6 cells/ml程度の淡水培地で増殖する細菌群が存在しているが、この中 10^3-10^4 cells/mlの細菌は海水環境においても増殖することが可能である。三河湾海水中に生存する 10^6 cells/mlの生菌数の中、 10^3-10^4 cells/mlは淡水中において増殖可能である。このように環境水の塩分が急変したとしても、河川水、海水とも、それぞれ変化した塩分環境水中で増殖できる細菌群を含有し、細菌の増殖速度が高いこともあり、干潟域は降雨による淡水化の影響を受けたとしても、急速にもとの状態に回復することとなる。河川水中に存在し、海水環境においても増殖できる細菌群は、*Pseudomonas* と *Vibrio* に属する菌株が大部分（90%）で他の属のものは低い割合であった。先述したごとく、年間を通じて三河湾干潟域では、海水、干潟砂とも各種細菌群数に著しい差は見られなかったが、水温の低下している冬季は他の季節に比較して若干細菌数の減少が見られた。また沿岸に近い所は海水の富栄養化のため、細菌数が多少高い傾向が認められた。低潮時と高潮時の海水中の細菌数を比較すると、低潮時の方が細菌数の高い場合も多く見られた。これは海底の細菌群が上層の海水中に舞い上がるためと考えられる。干潟砂・堆積物（0-10cm

層)中に存在する総菌数は、 10^8-10^9 cells/g (wet) と多数であるが、干潟砂の表層よりも下層に硫酸塩還元細菌数がより多数存在していた。表層に存在する細菌群は生化学的活性が高く、表層に存在する細菌群は生化学的活性が高く、嫌気条件下において増殖できる細菌数についても、表層に多数存在していた。

三河湾干潟域海水中に存在する主要な従属栄養細菌は、*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus*などに属する菌株で、干潟砂中では、*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*が主要な菌株であった。嫌気条件下において増殖できる細菌群数は、海水、干潟砂中ともに多数で、特に干潟砂の10cm下層では、*Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*などに属する菌株が主要なもので、これらは嫌気条件下において増殖できる分離菌株の約80%を占めた。海水、干潟砂とも硝酸塩を還元する能力のある細菌数が多いことは、環境が嫌気状態となれば、硝酸塩は亜硝酸、窒素ガスの生成へと還元されることとなる。干潟域は酸素供給が十分な浅海であるため、この反応は海水中ではなく、干潟砂の表層よりも下方で進行するものであろう。脱窒細菌は海水中に 10^2 cells/ml、干潟砂中に 10^4 cells/g (wet)程度が存在しているが、海水中で脱窒作用が進行するとは考え難く、干潟砂中において硝酸塩の還元作用に引き続いて進行していると考えられる。窒素固定細菌は海水中に10cells/ml、干潟砂に 10^3 cells/g (wet)程度が存在しているが、この程度の現存量では三河湾における窒素固定作用は微弱であると考えられる。実際に測定した結果では、干潟砂において $0.1-0.6$ mg N/m²/dayの範囲であった。霞ヶ浦の底泥について測定された結果では、底泥表層で脱窒活性 104.3 μg N/g/day、窒素固定活性 87.8 ng N/g/day、5-10cm層では脱窒素活性 14.8 μg N/g/day、窒素固定活性 133.1 ng N/g/day、で、脱窒と窒素固定作用の比は、表層で1186:1、5-10cm層では111:1の比のごとく脱窒作用が窒素固定作用に比較して極めて高いことが示されている(須藤, 1983)¹³⁾。三河湾干潟域においてもこれと同様の関係と考察される。三河湾干潟砂中に分布している脱窒細菌は、*Pseudomonas*に属するものが大部分(87%)で次に*Alcaligenes*(13%)であった。また窒素固定細菌は*Vibrio*と*Aeromonas*に属するものがほとんどであったが、その他にEnterobacteriaceaeとVibrionaceaeに属する菌株も分離された。

酵母の分離、同定は「酵母の分類、同定法、飯塚・後藤(1977)」¹⁴⁾に準拠して実施した。海水中に10cells/ml、干潟砂中に 10^2 cells/g (wet)程度の酵母が分布していたが、分離した菌株は*Rhodotorula*に属するものが約45%で最も多く、次に*Torulopsis*(43%)、*Candida*(10%)の順であった。干潟域には、河川水を通じて陸上の酵母が絶えず流入していると考えられ、海水環境に耐えられるものは、干潟域においても増殖が可能である。しかしこれらの酵母の現存量は少ないので、干潟域において酵母の果たしている役割は大きいものではないと考えられる。

4. 要 約

愛知県三河湾の干潟域を主要な研究対象水域とした。海水および干潟砂泥中に存在する細菌群の現存量と増殖速度などを測定し、沿岸海域における細菌群の生態、作用などを明らかにす

ることを目的として研究した。

- 1) 三河湾の干潟域に設定した9定点の試料について測定した細菌群の現存量は、年間を通じて少数の例外を除いて著しい差が認められなかった。
- 2) 干潟域海水中には、 5.5×10^6 cells/ml, 砂粒子中には 5.0×10^8 cells/g (wet) 程度の総菌数であった。
- 3) 海水中における細菌群の増殖速度は、除菌により細菌数を少数とする程増大した。
- 4) 自然海水中では、絨毛虫や鞭毛虫などにより、多数の細菌群が捕食されているが、捕食された量は細菌群の絶えざる増殖によって補給されているので、海水中には一定レベルの細菌数が維持されている。
- 5) 河川水中の細菌群は、沿岸海水中に流入してもすべて死滅することはなく、 $10^3 \sim 10^4$ cells/ml程度の細菌は海水環境においても増殖可能であった。また海水中に存在する $10^3 \sim 10^4$ cells/mlの細菌は、淡水中においても増殖可能であった。
- 6) 三河湾干潟域海水中では、*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* などが主要な菌株であり、干潟砂中には、*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus* が主要な菌株であった。干潟砂の10cm下層では、*Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides* などに属する菌株が主要なもので、これらは、嫌気条件下において増殖できる分離菌株の約80%であった。
- 7) 干潟域海水中には、10 cells/ml, 干潟砂中には 10^2 cells/g (wet) 程度の酵母が分布していた。干潟砂から分離した酵母は、*Rhodotorula* 約45%, *Torulopsis* 43%, *Candida* 10%であった。沿岸海域において、これら酵母の作用は微弱であると推定される。

本研究の実施にあたり、ご援助ご協力をしていただいた三重大学水産学部水産微生物学講座の菅原庸教授、木村俊夫助手および同講座において研究中であった学生諸君に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Porter, K. G. and Feig, Y. S.: *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943 (1980)
- 2) Kogure, K., Simidu, U. and Taga, N.: *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415 (1978)
- 3) Hobbie, J. E., Daley, R. J. and Jasper, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225 (1977)
- 4) Zimmerman, R., Iturriaga, R. and Becker-Birek, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 926 (1978)
- 5) 門田元・多賀信夫編：海洋微生物研究法, p. 69, 学会出版センター (1985)
- 6) 門田元・多賀信夫編：海洋微生物研究法, p. 201, 学会出版センター (1985)
- 7) 前田秋一：用水と廃水, **27**, 10 (1985)
- 8) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.: *Bergey's manual of determinative Bacteriology*, 8th Ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 9) Krieg, N. R. and Holt, J. G.: *Bergey's manual of systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins Co., Baltimore (1984)

- 10) Sneath, P. H. A., Main, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G.: Bergey's manual of systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams & Wilkins Co., Baltimore (1986)
- 11) 今井一郎：潮間帯周辺海域における浄化機能と生物生産に関する研究, 昭和58年度研究成果報告書, 東海区水産研究所, p. 165 (1984)
- 12) 今井一郎：潮間帯周辺海域における浄化機能と生物生産に関する研究, 昭和59年度研究成果報告書, 東海区水産研究所, p. 145 (1985)
- 13) 須藤隆一郎編：環境浄化のための微生物学, p. 129, 講談社サイエンティフィック (1983)
- 14) 飯塚廣・後藤昭二：酵母の分類同定法, p. 1, 東京大学出版会 (1977)