

## 漁場海域における微生物生態系の解析-I

琉球島弧周辺海水中のバクテリオファージ系の分布\*<sup>1</sup>

日高富男・河口貴史・白浜真之\*<sup>2</sup>

### Analytical Research of Microbial Ecosystems in Seawater around Fishing Ground-I Distribution of Bacteriophage Systems in Seawater around the Ryukyu Island Arc\*<sup>1</sup>

Tomio HIDAKA, Takafumi KAWAGUCHI  
and Mayuki SHIRAHAMA\*<sup>2</sup>

#### Abstract

The authors dealt with the counting of heterotrophic bacterial cells, phage-sensitive bacterial cells, and bacteriophage strains in seawater samples collected from 50 m, 100 m, and 300 m depth layers at 14 stations around the southern Ryukyu Island Arc. And then we estimated the microbial fertility of the seawater at the stations by the distribution pattern of them.

The results obtained were as follows:

- 1) The range of the number of bacterial cells per ml of every seawater sample was from a few to eighty. The data suggest that the experimental region is oligotrophic zone.
- 2) Bacteriophage systems were most abundant in the photosynthetic zone near 50 m depth in vertical distribution, although the distribution of bacterial cells was dependent on the stations.
- 3) Microbial population was more abundant at St. 4 and St. 6 near Hozan Sone and at St. 8 in East China Sea than at other stations. It becomes clear that the microbial fertilities at the three stations are higher than at others.
- 4) The microbial fertility of seawater in experimental region was higher in East China Sea side than in Pacific Ocean side bounded by Ryukyu Island Arc.

We conclude from the results described above that the microbial fertility of seawater is indicated more exactly and sensitively by the number of bacteriophage systems than by that of bacterial cells.

陸上における土壌細菌について知られていると同様に、海洋においても細菌は有機物の無機化や変換において支配的な役割を演じ、その場の生物生産性に大いに寄与している。従って、ある海域の生物生産性を解析するに際して、海洋微生物学的な知見は重要な意味を持つものである。海水中の細菌の分布は海水の有機物濃度や温度など化学的および物理的ないくつかの環

\*<sup>1</sup> この研究は昭和 53 年度文部省特定研究経費で行ったものである。

\*<sup>2</sup> 鹿児島大学水産学部微生物学研究室 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

境要因によって左右されるが、さらに生物学的な要因の一つとして、バクテリオファージ（細菌性ウイルス、単にファージとも呼ばれる）の作用があげられる。ファージはそれぞれ特異的な細菌株の活力ある細胞に寄生してその内で増殖し、ついにはその宿主細胞を溶菌して放出する。このようなファージの宿主特異性の厳しい感染や感染菌に対する溶菌作用は、その場の細菌相の形成や調節に大きく関与する。またある種のファージは、形質導入という遺伝機構によって宿主細菌の形質を遺伝的に変換して、それらの生化学的活動に少なからぬ影響をおよぼしう。よって、海水中のファージもまた間接的に海洋の基礎的な生産性に係りを持つことになる。

このたび、文部省の特定研究経費による「琉球島弧周辺海域における陸棚斜面漁場の開発利用に関する研究」が1978年から3ケ年にわたり行われることになった。その第一次の調査航海は本学練習船かごしま丸によって、主として南琉球島弧周辺海域を中心として実施された。著者らはその調査航海に参加する機会を与えられて調査海域の微生物学的研究を分担した。さきに述べた観点から、調査海域における微生物生態を細菌—ファージ系の範囲でとらえ、それらを構成する一般海洋細菌、ファージ宿主細菌、ファージ株に分けてそれぞれの分布を調べた。そしてそれらの分布の様相がその海域の生物生産性、ひいては漁場性にどのような関連を示し、いかなる生態系がその指標たりうるかについて検討し若干の知見を得たので報告する。

#### 実験材料および方法

**供試海水** 本調査は本学練習船かごしま丸によって、1978年10月27日から11月15まで、沖縄本島南部から西表島近海におよぶ海域で行われた。その間、海洋、地質、生物など各分野の調査定点は都合33点であったが、そのうち微生物学的調査を行った定点は14点であり、それらは Fig. 1 に示すとおりである。また、それら定点の位置および試料採取の日時を Table 1 に一覧表としてかかげる。各微生物学的調査定点において、水深50m層、100m層、時に300m層もの海水をそれぞれJ-Z式採水器で無菌的に採取して直ちに実験に供した。

**使用培地** 海洋細菌や海洋ファージの分離、増強、保存のために海水培地、海水寒天培地、軟海水寒天培地を使用した。海水培地は75%濃度貯蔵海水1lにポリペプトン（大五栄養化学製）5g、酵母エキス（大五栄養化学製）1gを溶解し、pH 7.6~7.8に調整したものである。海水寒天培地は海水培地に1.5%濃度に寒天を加え加熱溶解して作成したものであり、同様に海水培地に0.5%濃度に寒天を加えたものが軟海水寒天培地である。

**海洋細菌の計数と分離** 無菌的に採取した試料海水は、直ちに船内実験室において細菌細胞数の測定と分離操作を行った。すなわち各試料海水はそれぞれ0.2mlずつを10枚の海水寒天平板に塗抹接種して6日間培養後、寒天平板上に現われたコロニーを計数して供試海水1ml中の細菌細胞数を算定した。次いで、それら10枚の寒天平板のうちコロニーの数やコロニーの分散状態などから見て代表的な平板数枚を選んで、その中に現われているコロニー全部をそれぞれ海水寒天斜面培地に分離移植した。それらは研究室に持帰り、純化してから以後の実験に供試した。船内での培養温度は室内空調温度23~25°Cであった。

**バクテリオファージの検出と分離** バクテリオファージの検出は集菌法で行った。海水培地

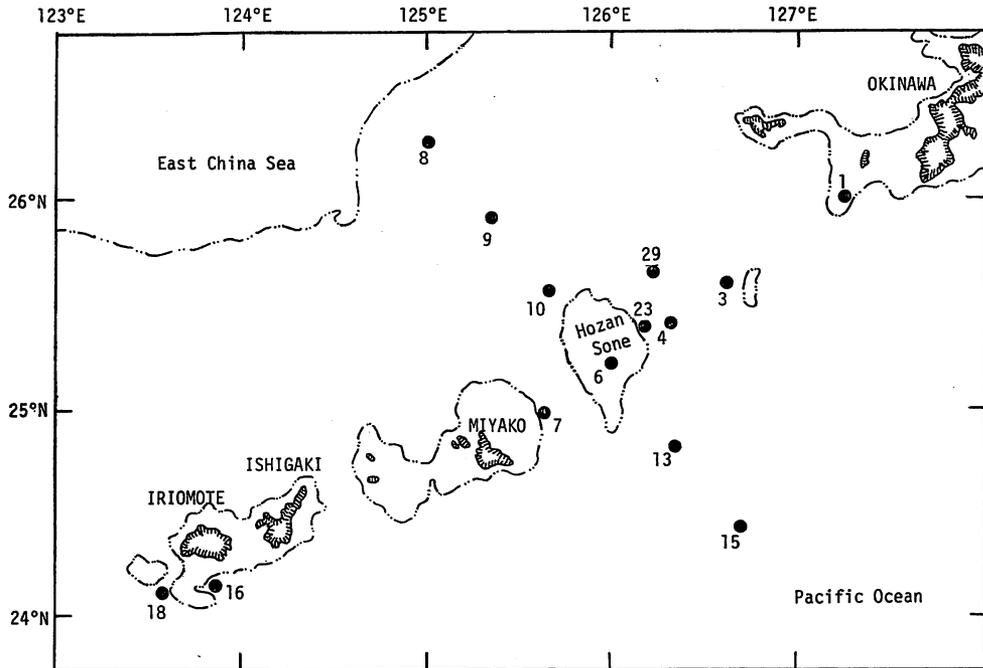


Fig. 1. Map showing the microbiological stations in cruise of Kagoshima-maru around the southern Ryukyu Island Arc, in Oct. 27 to Nov. 15, 1978.

Table 1. Sampling position, date and time at the microbiological stations.

Station No.	Position		Date (in 1978)	Time
	Latitude	Longitude		
1	26°00.0'N	127°15.0'E	Oct. 31	10 : 15
3	25°35.8'N	126°37.2'E	31	16 : 25
4	25°24.0'N	126°18.8'E	31	19 : 07
6	25°12.2'N	126°00.7'E	31	22 : 00
7	24°27.8'N	125°38.2'E	Nov. 1	00 : 58
8	26°15.0'N	125°00.2'E	1	10 : 52
9	25°54.0'N	125°20.1'E	1	15 : 53
10	25°33.3'N	125°39.7'E	1	19 : 19
13	24°48.9'N	126°21.0'E	2	05 : 10
15	24°25.9'N	126°42.1'E	2	10 : 48
16	24°08.0'N	123°50.9'E	3	12 : 31
18	24°05.7'N	123°35.2'E	4	14 : 20
23	25°23.3'N	126°09.5'E	7	16 : 25
29	25°38.4'N	126°13.2'E	9	06 : 05

200 ml を入れた 500 ml 容振盪用肩付フラスコに採取直後の供試海水 250 ml を加えて船内 (23~25°C) で 2 日間ほど培養増強した後、5~8°C に冷蔵して研究室に持帰った。それら各供試海水からのファージ増強液は、それぞれ 4,500 G で 30 分間遠沈し、上清を Millipor filter (HA, 0.45  $\mu$ ) で濾過して無菌化し、粗ファージ液とした。次いでさきに分離しておいた海洋細菌のそれぞれを海水培地で 1 晩培養し、その幼若培養菌を接種した二重寒天平板 (ADAMS, 1959) を作成して、その上に前述の各粗ファージ液を点滴し、十分しみこませて後 1 晩培養する。培養後粗ファージ液点滴部分に溶菌像出現の有無を観察して、各粗ファージ液中に接種菌に対して感染能を持つファージの存否を検した。また、ついであるが分離細菌のファージ感受性も同様にして検査した。

ファージ検出試験において溶菌像が見られたものについては、その溶菌部分の一部を白金線できり出して 5 ml 程度の海水培地に懸濁し、その液を適宜希釈したものについて、ADAMS (1959) の二重寒天平板法によって溶菌斑形成を試みる。すなわち相応する宿主細菌の幼若培養液 1 ml に、適当に希釈したファージ液 1 ml を混和して 5 分間ほど保ち、宿主細胞にファージ粒子を吸着させ、その 0.2 ml を予め融解して 45°C に保った軟海水寒天培地 3 ml に注加して手早く混和した後、予め準備しておいた海水寒天平板上に流し込み重層する。重層寒天の固化するのを待って 1 晩培養する。この方法で形成される単離溶菌斑を再び分離・懸濁して更に前述と同様に溶菌斑を形成させ、その過程を数回繰返すことによって、目指すファージの純化、単離を行った。それら細菌-ファージ系は宿主細菌の種類や溶菌斑形態などにより類別して整理した。これらの操作における培養温度は 25°C であった。

これら実験方法のより詳細な記載は SPENCER (1963)、日高 (1974)、HIDAKA (1971, 1977) の報文を参照されたい。

### 実験結果及び考察

供試海水の温度分布 調査定点は琉球島弧に沿って沖縄本島南部から宝山曾根を経て西表島南部に至る 9 定点 (St. 1, 3, 4, 23, 29, 6, 7, 16, 18, この観測線を X-線と呼ぶ) と、その観測線と宝山曾根上 (St. 6) でほぼ直角に交叉する東シナ海側から太平洋側に至る 5 定点 (St. 8, 9, 10, 13, 15, この観測線を Y-線と呼ぶ) であった。

まず調査対象微生物の培養温度を決めるために、また調査海域の海況を知る目安として調査海域の水温分布を検討した。各定点の深さと試料海水採取深度、50 m, 100 m と 300 m 層における水温を Fig. 2 に示す。水温は、調査団員の一人、桜井氏によって DBT を用いて測定されたものである。

琉球海嶺上、X-線の各定点における海の深さは 120~490 m に過ぎないが、Y-線上のそれらは 1500~2400 m であり、それら X-線と Y-線の交点である宝山曾根、St. 6 の深さは 170m であった。試料海水採取深度における水温を比較すれば、50 m 層のそれは 26°C 前後あって、この深度では表水混合等温層内にあり、各定点での温度差は僅少である。100 m 層のそれは 21.8~24.6°C で各定点の温度差がやや大きかった。300 m 層では 10.7~17.9°C とさらに水温の差がひろがり、特に St. 8 のそれは他のものより 6~7°C も低かった。概して、

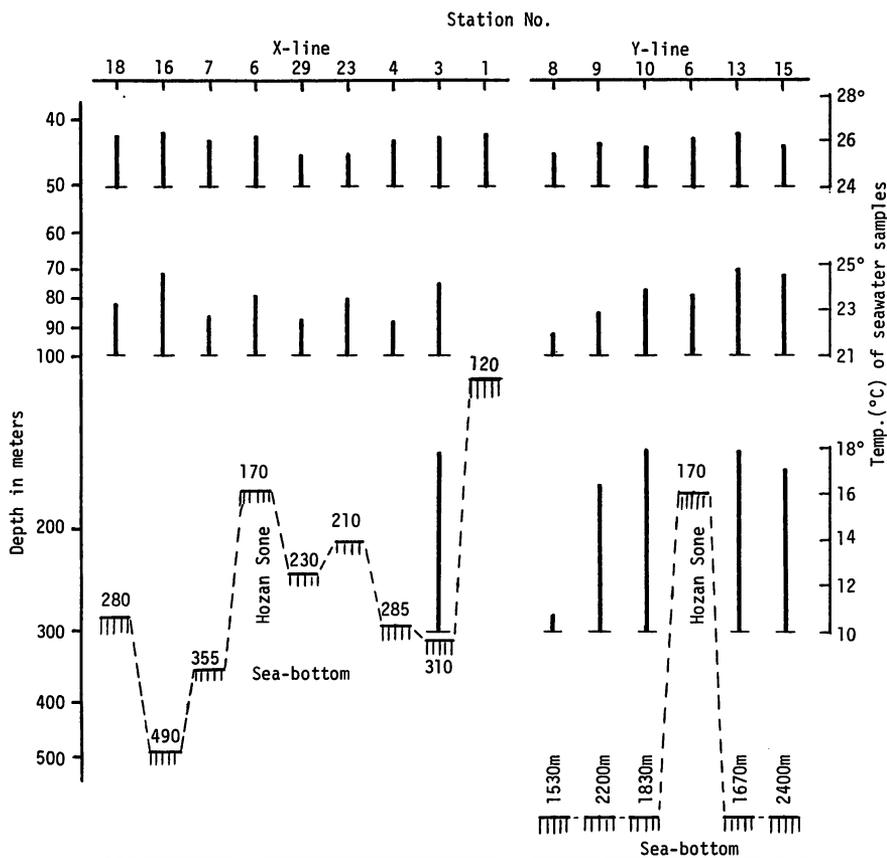


Fig. 2. Depth at microbiological stations and temperature of seawater samples collected from 50 m, 100 m, and 300 m depth layers at the stations.

水深が浅い海嶺上、X-線各定点の各層の水温には大きな違いは見られなかったが、Y-線上のそれらは海嶺を境にして東シナ海側で低く、太平洋側で高い傾向が見られた。この現象は海嶺によって分けられる両海域の海況の違いを表わしている。また St. 6 付近のより詳細な水温断面図(桜井・前田, 1979)には宝山曾根上で湧昇現象がみられている。St. 8 の各層の温度分布は、他の定点とは明らかに異っているが、これはその位置から考えて黒潮流の端にあたり、東シナ海陸棚水の混入や大陸棚斜面の影響をうけているものと思われる。

このような試料海水の温度分布から考えてそこに棲む微生物には偏性好冷細菌は少ないと考え、海洋細菌及びファージの分離培養は 23~25°C で行った。

**海洋細菌の分布** 海洋における細菌分布の様相はその海域の生物生産性の評価に役立つ。そこで調査海域における海水中の細菌数を測定した。すなわち調査定点において水深 50 m, 100 m 及び 300 m 層から採取した海水中の従属栄養細菌を平板培養法によって数え細菌細胞数、cells/ml で表わした。それらを白棒グラフ図示したのが Fig. 3 である。

この図に見られるように、St. 8 の 100 m 層の細菌細胞数が 80/ml と多かったが、その他は

60/ml 以下であった。それらは定点によって、50 m 層の細菌細胞数が 100 m 層のそれより多いところや、その逆など不統一であったが、両層での細菌細胞数にはそれほど大きな差異は見られなかった。また 300 m 層の細菌細胞数では、St. 3 のそれが海底に近い深度 (Fig. 2 参照) のせいか 40/ml と他より多かったが、他は 20/ml 以下であった。これらの結果は、海水中の細菌細胞の分布は各定点、各層で不統一であるが、それでも 100 m 以深よりも 50~100 m の深度に細菌細胞数の多い層があることを示唆している。この程度の細菌細胞数の変動の範囲内においてみれば、宝山曾根を境にして太平洋側の定点に比して東シナ海側の定点が若干高い値を示していた。また宝山曾根上の St. 6 や東シナ海大陸寄りの St. 8 では他の定点よりも細菌細胞が多く分布していた。一般にこのような細菌細胞数の増加は下層からの湧昇部分や水塊と水塊との接触界面などの有機物濃度が高くなったところに現われるものである。このことは、前項で述べたように St. 6 付近に曾根による湧昇がみられていることや、St. 8 が陸棚水の混入や陸棚斜面の影響をうける状態にあることなどによく符合している。同様な現象が小規模ながら St. 3 や St. 4 にも見られた。

ところで、吉田 (1973) は海域の栄養階級区分における細菌数の一応の基準として、貧栄養域の生菌数は  $10^2$ /ml 以下、富栄養域  $10^2 \sim 10^4$ /ml、過栄養域  $10^3 \sim 10^5$ /ml、腐水域  $10^6$ /ml 以上という数値をあげている。この基準に照せば、本調査定点のすべては貧栄養域であることがわかる。

ファージ感受性細菌の分布 本項においては前項で測定された細菌細胞数のなかで、その幾つがファージ感受性細胞、すなわちファージの宿主たるべき細菌細胞であるかを検討した。ファージは、特異な細菌株の旺盛に増殖しつつある若い活力あふれる細胞に、好んで感染、寄生するものである。よって、ある海域にファージ感受性細胞が多く分布することは、その場の細菌細胞が活力に富む状態にあることを意味する。このことに関連して従来は、分離された個々の細菌について、自然条件下での増殖速度などを測定して、その場におけるそれら細菌の活動を評価しているが、その方法は非常に労力と時間を要して、広い海域の多くの定点についての調査には不向きである。従って本項では、細菌-ファージ系の宿主-寄生体関係における相互の活力を加味してその場の生物生産性を評価することを試みた。

各供試海水中のファージ感受性細胞数を算出し、Fig. 3 の細菌細胞数のグラフに黒棒で図示した。この図に見られるように、供試海水中のファージ感受性細胞数はその中の細菌細胞数の約 1/2 ないし 1/4、あるいはそれ以下であった。細菌細胞数が 50 m 層と 100 m 層で不統一な分布を示していたのに対し、ファージ感受性細胞数の分布では全定点において 100 m 層、300 m 層に比して 50 m 層が明らかに高い値を示している。このことは水深 50 m 層付近の光合成層が生物生産の活発な水層であることを意味する。各定点の 50 m 層におけるファージ感受性細胞数について比較すると、宝山曾根付近の St. 4, St. 6 と東シナ海の大陸寄りの St. 8 で高く、細菌細胞数の分布において見られたよりもさらに顕著な差が現われており、それらの定点における生物生産の優位性が明らかである。

ファージ株の分布 一般に海水中のファージは希薄である。SPENCER (1960, 1963) によれば、彼が黒海の水から分離した 7 株のファージのうち 1 株は海水 10 ml 中に 100 粒子、他の 3 株は 10 ml 中に 1~5 粒子程度であり、また残りの 3 株はあらかじめ集菌培養しては

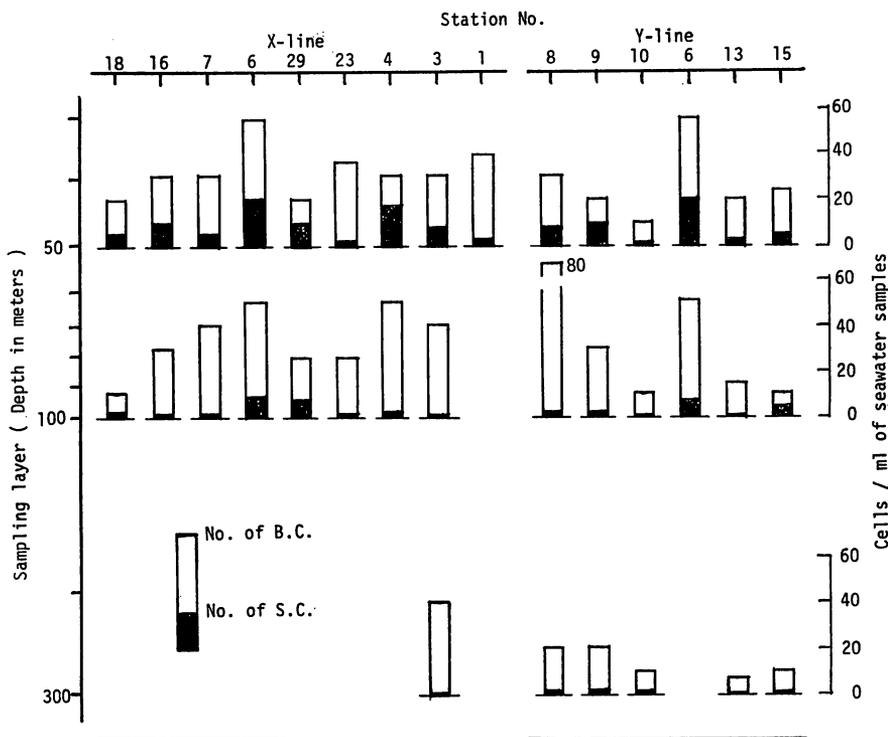


Fig. 3. Number of heterotrophic bacterial cells (B.C.) and phagesensitive bacterial cells (S.C.) in seawater samples collected from 50 m, 100 m, and 300 m depth layers at the stations.

じめて検出されたもので、海水 300 ml に 1 粒子を含む程度であると想定している。この程度の濃度であるので海水から直接ファージを計数し、分離することは困難である。本調査においては実験方法の項でも述べたように、集殖法によってファージ株を検出、分離し類別した。従って海水中的ファージ粒子数ではなく供試海水 250 ml 中から分離されたファージ株数として整理し、その分布を検討した。

各定点の 50 m, 100 m 及び 300 m 層におけるファージ株の分離株数を示したものが Fig. 4 である。各供試海水から分離されたファージ株の分布もファージ感受性細胞の分布と同様に垂直的にみて 100 m 層, 300 m 層に比して 50 m 層に明らかに多く、かつ定点別には St. 4, St. 6 と St. 8 が他の定点より多かった。各定点の各層に分布するファージ株の中には、そこにそのファージ株の宿主細胞が見られないまま、ファージ株のみが存在する場合もあった。このことは宿主細胞内で増強し放出されたファージ粒子は宿主細胞に比べて化学的、物理的な逆境条件に対してより耐性であり、種々の環境条件の変動によって規制されることが少なく、より広い海域に散在できるためと思われる。

前項のファージ感受性細胞の分布及びこの項のファージ株の分布、それらを組合せた細菌-ファージ系としての分布の様相をとらえてその場の生物生産性を評価することは、単に細菌細

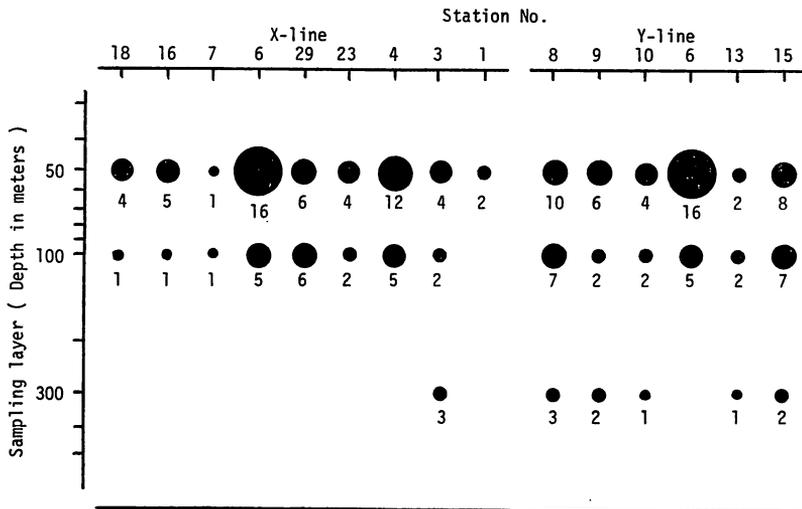


Fig. 4 Number of bacteriophage strains isolated from seawater samples collected from 50 m, 100 m, and 300 m depth layers at the stations. Figures under the circles indicate the number of isolated bacteriophage strains per 250 ml of seawater sample.

胞の分布をとらえてそれを行うよりも、一層的確で敏感な良い方法であることが知られた。これらを指標にして考えれば、本調査海域は微生物学的に見て貧栄養海域で、生物生産性の低い海域であるが、その中で宝山曾根付近の St. 4, St. 6 及び東シナ海の大陸棚寄りの St. 8 において他の定点に比して若干高い生物生産性がうかがえる。また琉球島弧を境にして太平洋側に比して東シナ海側の海域の方が、生物生産性の高いことも認められた。

#### 要 約

本研究では南琉球島弧周辺海域の 14 定点における 50 m, 100 m 及び 300 m から採取した海水について、海洋細菌細胞数とファージ感受性細胞数、ファージ株数を測定し、それらの分布の様相から各定点、各水深における生物生産性を評価した。

その結果は次のとおりであった。

1) 各供試海水中の細菌細胞数の範囲は数個/ml から 80/ml であった。このことは調査海域が貧栄養域であることを示唆している。

2) 細菌細胞の垂直分布は各定点によって様々であったが、細菌-ファージ系のそれは水深 50 m 付近の光合成層において最も多く分布していた。

3) 細菌細胞数や細菌-ファージ系数は 宝山曾根付近の St. 4 と St. 6 及び東シナ海の St. 8 において他の定点のそれより多かった。それら 3 定点は他の定点よりも明らかに生物生産性が優位であった。

4) 調査海域における海水の生物生産性は、琉球島弧を境にして、太平洋側よりも東シナ海側で高かった。

これらの結果から、海水の細菌細胞数よりも細菌-ファージ系数の方がその海域の生物生産性をよりの確に、敏感に指標することを知りえた。

### 謝 辞

この研究は昭和53年度文部省特定研究経費によって行った。この特定研究の計画・実施にあたって多大の御尽力をいただいた研究代表者の高橋淳雄教授をはじめ、この分担研究の遂行中いろいろと有益なる御討議をいただいた共同研究者の各位に深甚の謝意を表します。また、試料採取に御協力ご援助いただいた、かごしま丸船長植田総一教授はじめ乗組員各位に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- ADAMS, M. A. (1959): "Bacteriophages", Interscience Publishers, Inc., New York.
- HIDAKA, T. (1971): Isolation of marine bacteriophages from sea water. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, 37, 1199-1206.
- 日高富男 (1974): 海洋バクテリオファージ. 多賀信夫編「海洋微生物」, pp. 81-89, 東京大学出版会.
- HIDAKA, T. (1977): Detection and isolation of marine bacteriophage systems in the south-western part of the Pacific Ocean. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 26, 55-62.
- 桜井仁人・前田明夫 (1979): 南琉球弧周辺海域における水温微細構造. 琉球島周辺海域における陸棚斜面漁場の開発利用に関する研究報告書 (昭和53年度) pp. 40-43, 鹿児島大学水産学部.
- SPENCER, R. (1960): Indigenous marine bacteriophages. *J. Bacteriol.*, 79, 614 only.
- SPENCER, R. (1963): Bacterial viruses in the sea. in "Symposium on Marine Microbiology" (C. H. OPPENHEIMER, ed.), 350-365, Charles. C. Thomas, Springfield, Illinois.
- 吉田陽一 (1973): 低次生産段階における生物生産の変化. 日本水産学会編「水圏の富栄養化と水産増殖」 pp. 92-103, 恒星社厚生閣.