

## 海洋バクテリオファージの形態について

日 高 富 男・藤 村 剛\*

### A Morphological Study of Marine Bacteriophages

Tomio HIDAHA and Tsuyoshi FUJIMURA\*

#### Abstract

The authors carried out the isolation of marine bacteriophages from sea water samples collected from the two stations of the Pacific Ocean, off the south of Kyushu, Japan. The authors determined also the morphological character of the phages isolated. The sixteen marine bacteriophage systems were obtained in this study. The host bacteria isolated belong to *Vibrio* (9 strains), *Pseudomonas* (4), *Flavobacterium* (2), and *Achromobacter* (1). The isolated phages are highly specific to original host. They are virulent phages. The structure of the phage particles varies widely. The great variety is found in tail structure among the isolated phages. They are divided into three morphological groups; phages with a tail possessing a contractile sheath (4 strains), phages with a long and non-contracting tail (5), and phages with a short tail (7). According to the TIKHONENKO's grouping of phage, the authors suppose that they are phages containing deoxyribonucleic acid. It is difficult to find a morphological property of marine bacteriophages in this experiments. It is sure that they vary widely in their morphology.

現在まで、海洋バクテリオファージについての研究は少なく、特に本邦においてそれは寡聞である。その初期の研究については ZoBELL (1946) の著書に見られる。しかしそれは、当時海水から分離されたファージは陸の影響をうけた沿岸海域からのものが多く、各種の腸内細菌に対して活性を示すことや、またそれらファージは沿岸からの汚染をうけない外洋海域には見出し得ず、外洋中のファージ分布は非常に少ないことを述べたに過ぎない。その後、KRISS and RUKINA (1947) は黒海から採取した海水や海底泥から数株のファージを分離した。また、SMITH and KRUEGER (1954) は、サンフランシスコ湾の海底泥から *Vibrio* 属菌の1株を分離し、同時にその試料からその菌を溶菌するファージをも分離した。しかしこれら分離ファージの海洋由来性について、SPENCER (1960) は若干の疑問をはさんでいる。

SPENCER (1955, 1960) は北海の海水からグラム陰性菌の4属、*Photobacterium* (1株)、*Pseudomonas* (3)、*Flavobacterium* (2)、*Cytophaga* (1)、に活性を示す7株のファージを分離した。また彼 (SPENCER, 1963) は、そのファージ粒子の海洋中における濃度を検定し、1つの試水には10 ml 中に100粒子ものファージが見出されたが、多くの試水では海水10 ml 中にはファージ1~5粒子を含むにすぎないことを報告している。その後、SPENCER (1960) が分離した海洋ファージの形態は BRADLEY (1965) や VALENTINE *et al.* (1966) によって個々に明らかにされている。CHAINA (1965) は北海やインド洋から収集した629株の細菌を供試し、その中からファージに感受性な10

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

株の菌を選出した。それらは *Pseudomonas* 5株, *Flavobacterium* 2株, *Achromobacter* 2株, *Vibrio* 1株であった。最近 WIEBE and LISTON (1968) は海洋性 *Aeromonas* に対し活性を示すファージを分離し、それらの形態や性状について報告した。JOHNSON (1968) はまたインド洋の海底泥から *Vibrio*-ファージ系を分離して報告している。

これまで、海洋バクテリオファージの系統的研究は知られない。海洋中における細菌相の調節や海洋細菌の遺伝機構において海洋ファージの果たす役割を理解するうえにも、今後更にファージとその宿主細菌、ファージと環境因子との相互関係を明らかにすることが望まれる。著者らは、1970年、数次にわたり九州南方海域の海水から海洋バクテリオファージの分離を試み、その間に16株の海洋ファージを得ている。本報においては、これらファージの基礎的性状のうち、まず溶菌斑形態を比較し、さらにファージ粒子の構造を電子顕微鏡観察により明らかにし得たので、それらの知見を報告する。

### 実験材料および方法

**供試海水** 1970年6月16日、本学練習船“南星丸”を利用し、鹿児島県長崎鼻岬から真南へ5湊沖合 (31°04' N-130°35' E, 深度 129 m) から海水を採取した (この時の採取試料および分離物には 06N-の符号をつける)。また、同年10月14日にも“南星丸”を利用し、鹿児島県枕崎港の真南10湊沖合 (31°06' N-130°18' E, 深度 335 m) から海水を採取した (さきと同様に 0XN-の符号をつける)。採水には J-Z 式無菌採水器を用い、水深 50 m 層の海水をとって実験に供した。

**使用培地** 海水培地 (Sea Water Broth, SWB) は、HERBST's 人工海水 1 l にポリペプトン 5 g, 酵母エキス 1 g を溶解, pH 7.6-7.8 に調節したものである。海水寒天培地 (Sea Water Agar, SWA) とするため、上記 SWB に 1.5% 寒天が加えられた。また SWB に 0.5% 濃度の寒天を加えたものを軟寒天培地 (soft Sea Water Agar, sSWA) とした。

**供試菌の分離** 採取した海水は、その日のうちに研究室にもち帰り、菌の分離培養を行なった。すなわち、試水 0.1 ml ずつを 20 枚の SWA 平板に塗抹、また 1 ml ずつを 20 枚のシャーレに SWA で混釈し、それらを 20°C で 6 日間培養した。現われた集落を計数したうへ代表的な集落を選んで釣菌し、SWA 平板で塗抹培養法による純化を 3 回繰返して、供試菌を単離した。分離菌の性状検査は標準法 (HARRIGAN and McCANCE, 1966) で行ない、鑑別は BERGY's Manual, 7 版 (BREED *et al.* 1957) と、SHEWAN *et al.* (HENDRIE and SHEWAN, 1966; BAIN and SHEWAN, 1968) によって要約された鑑別法によった。なお菌の分離に供したあとの海水は、当日直ちにミリポアー濾過膜 (HA, 0.45  $\mu$ ) で濾過し、低温 (5~8°C) に保存した。

**海洋バクテリオファージの検出** ファージの検出は SPENCER (1960) の‘間接法’に準じて実験した。一連の 500 ml 容振盪フラスコにそれぞれ 150 ml の SWB を入れ、これらに SWB 中で 1 晩静置培養した分離菌の新鮮培養物 10 株分ずつ (5 ml  $\times$  10 本) を加え、2~3 時間振盪培養した。次いでその若い混合培養物に、さきに濾過して保存していた供試海水 200 ml を混和し、更に振盪しながら 2~3 時間培養した後、引き続き 1 晩静置培養してファージを集殖した。培養物は 4,500 G で 30 分間遠沈し、上清をミリポアー濾過膜 (HA, 0.45  $\mu$ ) で濾過する。濾液は相応する標示菌の新鮮培養液を塗抹した SWA 平板上に点滴し、乾燥をまって培養器に収めた。これらは 1 晩培養したのち点滴部分の溶菌を観察してファージの存否を検した。この操作における培養温度は 25°C である。

**海洋バクテリオファージの分離** 前記ファージ検出試験において溶菌がみられたものについて

は、その溶菌部分を白金耳にてとり、標示菌の新鮮培養物に接種し 25°C で1晩培養して増強する。次いでその培養物は遠沈後ミリポアー濾過膜 (HA, 0.45  $\mu$ ) で濾過し、無菌のファージ培養液 (lysate) とした。このファージ液を適宜希釈したものについて、ADAMS (1959) の寒天重層法に準じて溶菌斑形成を試みる。すなわち宿主菌新鮮培養物に希釈ファージ液を混和してファージを宿主細胞に吸着させたもの 0.2 ml を、予め融解して 45°C に保った sSWA 3 ml に注加し手早く混和した後、SWA 平板 (基層平板) 上に流込み重層する。重層寒天の固化するをまって 25°C にて1晩培養した。この方法で形成された単離溶菌斑をとり、前述と同様にして再度増強する。このように「単一溶菌斑よりの増強——寒天重層法での溶菌斑形成」の過程を数回くり返しファージの単離と鑑別を行なった。このようにして単一溶菌斑から増強作成されたファージ培養液の力価は  $10^9$ - $10^{10}$  pfu/ml であった。このファージ液は 5~8°C で保存した。

電子顕微鏡観察 上述のようにして調製されたファージ液 50 ml を低温高速遠沈機 (マルサン No. 50V-S) で 37,000 G, 90 分間遠沈し、得られた沈澱物を 1% 酢酸アンモニウム水溶液 1 ml に再懸濁した。この濃厚ファージ懸濁液を試料とし、リタングステン酸による陰染色標本を作成する。すなわちファージ濃厚液を 2% リタングステン酸水溶液 (NaOH で pH 7.2 に調整) と等量混和し (ファージ粒子,  $10^{10}$ - $10^{11}$  pfu/ml), それをコロジオン膜でおおって炭素蒸着したシートメッシュ上に滴下し、20~30 秒後残余の試料液を濾紙で適度に吸いとり乾燥させる。これを電子顕微鏡試料とし、日立製電子顕微鏡, HU-11D 型にそう入し、電顕実拡大 50,000 倍で観察した。

## 実 験 結 果

分離海洋バクテリオファージとその宿主菌 前述の 06N-海水から 68 菌株, 0XN-海水からは 105 菌株を分離した。そして 06N-分離菌のうち 8 株が、また 0XN-分離菌のうち 8 株がそれぞれファージに感受性を示した。そのファージ感受性菌の主要な性状は Table 1 にまとめた。これらの菌はすべて好気性桿菌で、日高 (HIDAKA and SAKAI, 1968) の無機塩要求性試験による分類では海洋型菌と好塩型菌とに属するものばかりで、陸棲型菌は含まれなかった。これらファージ感受性菌はいずれも海洋細菌と考えられる。分離菌はその性状からそれぞれ、06N-21, 06N-22, 06N-34, 0XN-52, 0XN-69, 0XN-72, 0XN-85, 0XN-86 と 0XN-100 の 9 株は *Vibrio* に、06N-25, 06N-52, 06N-58 と 0XN-32 の 4 株は *Pseudomonas* に、06N-12 と 06N-24 の 2 株は *Flavobacterium* に、そして 0XN-36 は *Achromobacter* に属する。

これら 16 株のファージ感受性菌に対し、それらを溶菌するファージは各菌に対しそれぞれ別個のものであった。つまり 16 株の個々の菌を宿主とするような異なる 16 株の海洋バクテリオファージが分離された。これらの分離ファージは前述のごとく '間接法' によって分離されたもの、すなわち 10 株の菌を混合し、それに海水を加えて混合培養し増強したものから分離されたファージであるので、あるいはそのファージが海水からでなく溶原菌 (lysogenic bacteria) から由来した可能性が考えられる。しかしそのことは溶原性試験で否定された。従ってこれらの分離ファージはヴィレント・ファージ (virulent phage) である。またこれら各ファージの宿主域を試験したところ、各ファージとも宿主特異性が強く、今のところ、分離時に知られたもとの宿主—ファージ系にのみ感染が成立する。

分離海洋バクテリオファージの溶菌斑形態 Fig. 1~2 に供試ファージの溶菌斑形態を示した。

Table 1. Brief characterization of the host bacteria.

Host bacteria	Cell form	Gram's stain	Flagellation	Kovacs oxidase	Hugh & Leifson test	Sensitivity to 0/129	Arginine dihydrolase	Gelatin hydrolysis	Starch hydrolysis	Growth in 7.5% NaCl	Growth at 37°C	Luminescence	Pigment (water insoluble)	Indole production	Nitrate reduction	H <sub>2</sub> S from cysteine	V. P. test	M. R. test	Typing (M-, H-, and T-type)*
06N-12	R	-	P	+	NC	-	-	+	+	-	-	-	Y	-	+	+	-	-	M-
06N-21	R	-	M	+	F	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	H-
06N-22	R	-	M	+	F	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	H-
06N-24	R	-	P	+	NC	-	-	+	+	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	M-
06N-25	R	-	M	+	NC	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	M-
06N-34	R	-	M	+	F	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	H-
06N-52	R	-	M	+	O	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	M-
06N-58	R	-	M	+	O	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	M-
0XN-32	R	-	M	+	NC	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	M-
0XN-36	R	-	-	-	O	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	M-
0XN-52	R	-	M	+	F	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	H-
0XN-69	R	-	M	+	F	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	H-
0XN-72	R	-	M	+	F	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	H-
0XN-85	R	-	M	+	F	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	H-
0XN-86	R	-	M	+	F	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	H-
0XN-100	R	-	M	+	F	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	H-

Key: R, rods; P, peritrichous; M, monotrichous; Y, yellow; -, negative; +, positive; O, oxidative; F, fermentative; NC, growth with no change in reaction; M-, Marine type; H-, Halophilic type.

\*Three types, Marine (M-) type, Halophilic (H-) type and Terrestrial (T-) type, were designated according to the requirement of bacteria for several kinds of salts in sea water (HIDAKA and SAKAI, 1968).

0XN-52P は非常に小さい、径 0.2~0.3 mm のピン穴大の溶菌斑を形成する。06N-12P, 06N-21P, 06N-22P, 06N-24P, 06N-25P, 0XN-32P, 0XN-69P, 0XN-86P は、径 1~2 mm の透明な溶菌斑を作る。06N-34P, 06N-52P, 0XN-72P, 0XN-100P は、小さく透明で周囲に混濁ハローをもつ溶菌斑を形成する。06N-58P, 0XN-85P は、径 3~5 mm の透明で輪かくのはっきりした溶菌斑を作る。0XN-36P の溶菌斑は、大きく (径 2~3 mm) 透明で周囲が混濁する。

供試海洋バクテリオファージ粒子の構造 供試ファージ粒子の電子顕微鏡写真は Fig. 3~6 に示した。またそれら構造の各部の大きさは Table 2 にまとめた。

06N-12P は外観六角形の多面体形をした頭部と、比較的長くて細い非収縮性の尾部をもっている。この尾部はやや湾曲する。このファージの特徴は尾部が収縮しないことである。供試ファージのうちこの形態に類するものは、06N-24P, 06N-52P, 0XN-32P, 0XN-52P であるが、それぞれ尾部の長さは異なる (Table 2 参照)。これらファージの尾部の末端構造は短かい裂片状の

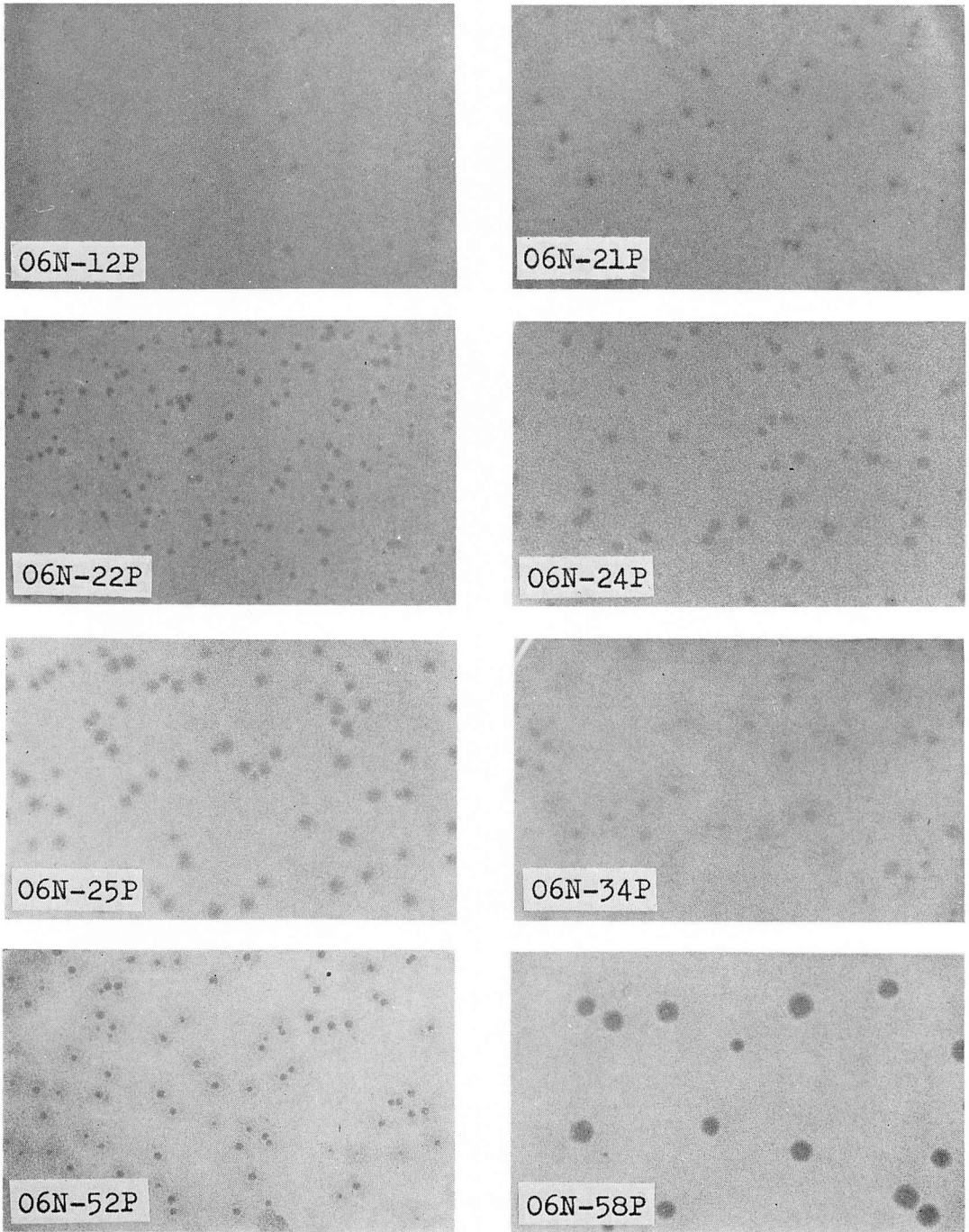


Fig. 1. Plaque morphology of the 06N-Phages.  $\times 1$

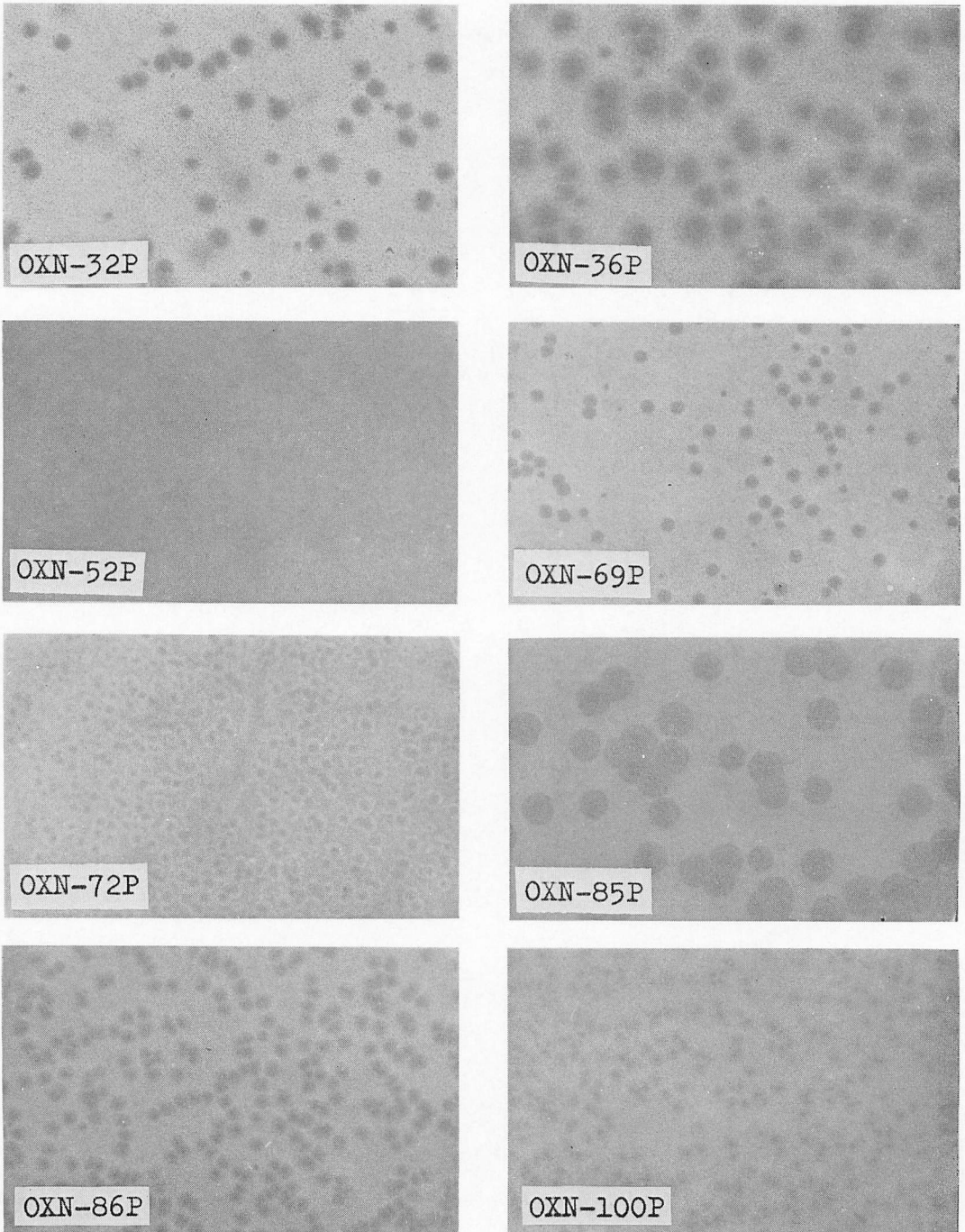


Fig. 2. Plaque morphology of the OXN-Phages.  $\times 1$



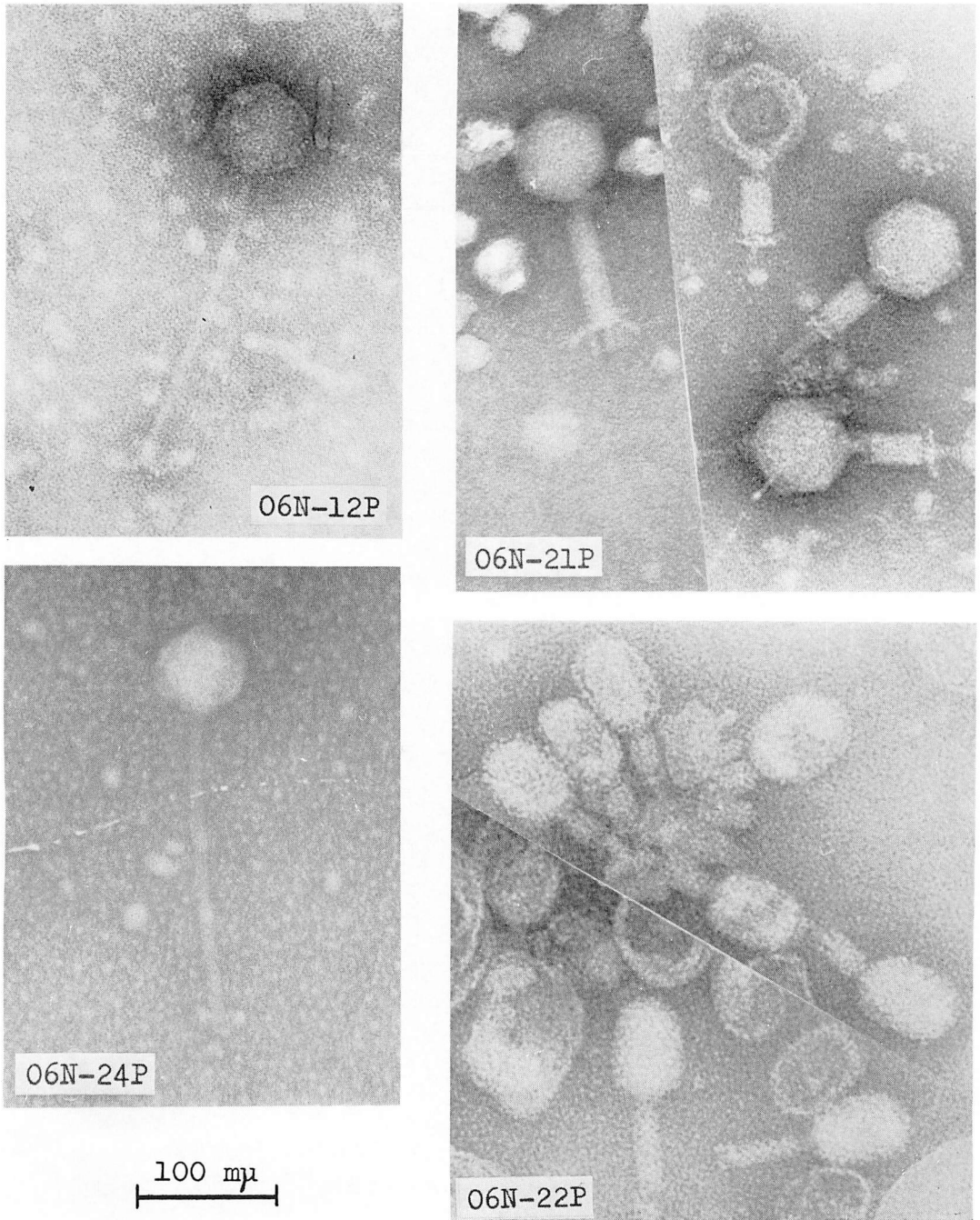


Fig. 3. Electron micrographs of O6N-12P, O6N-21P, O6N-22P and O6N-24P particles negatively stained with phosphotungstic acid.  $\times 200,000$

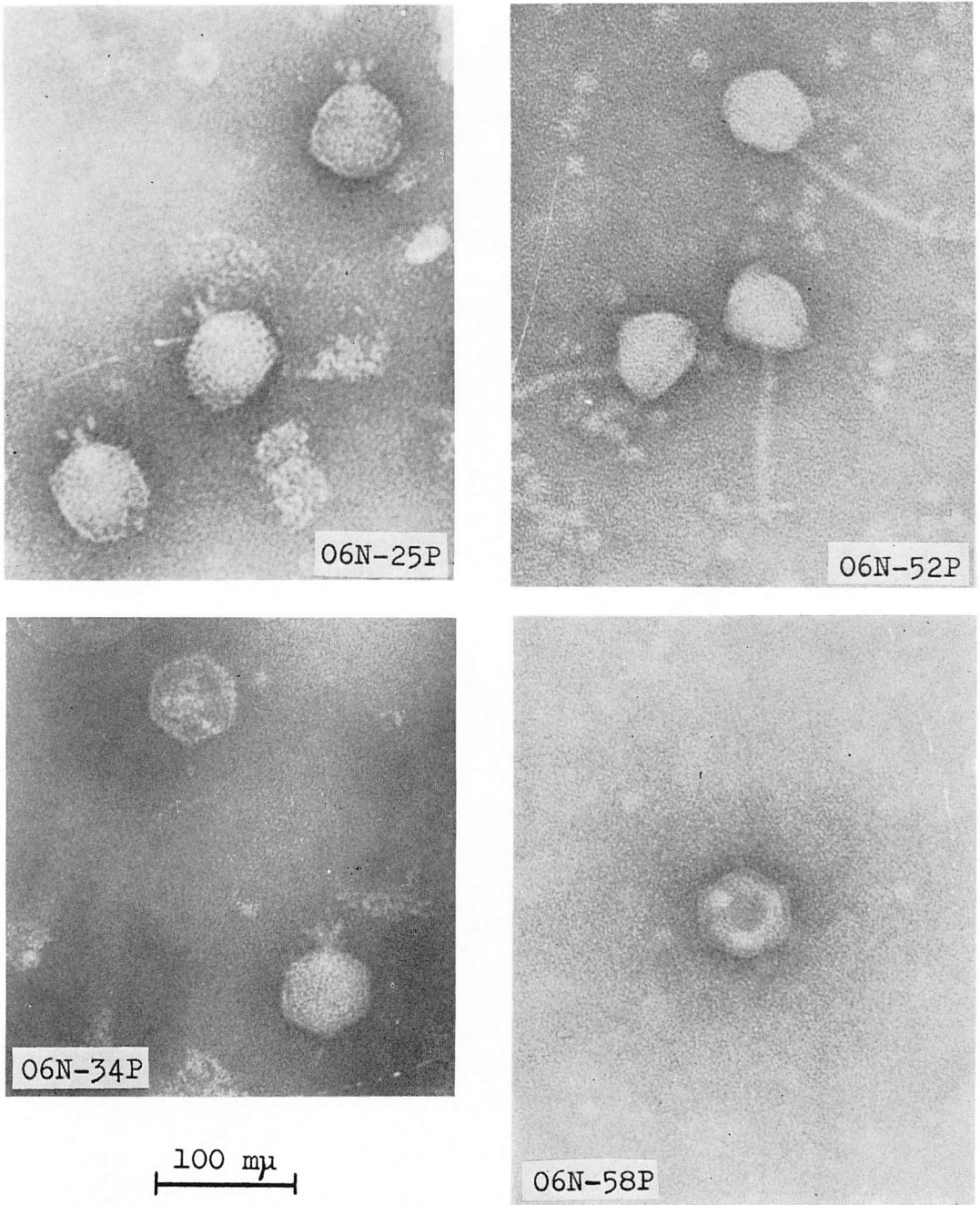
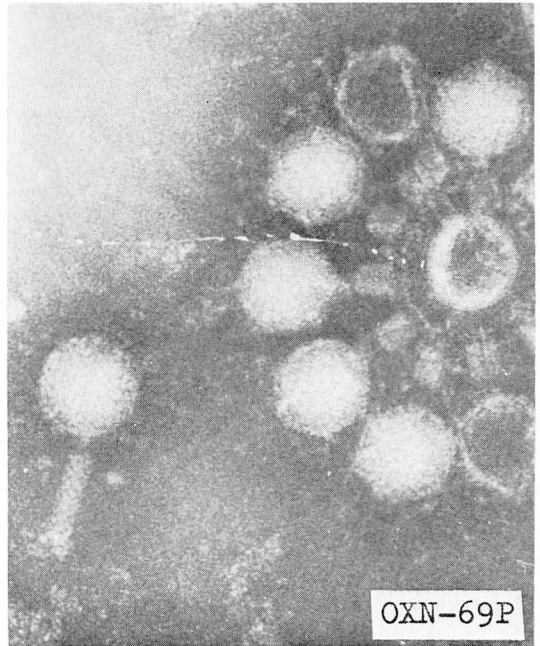
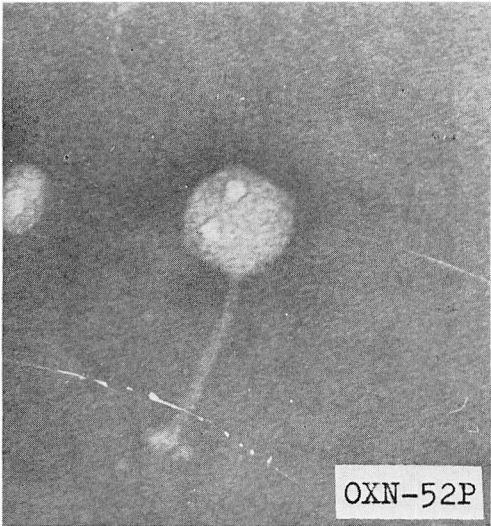
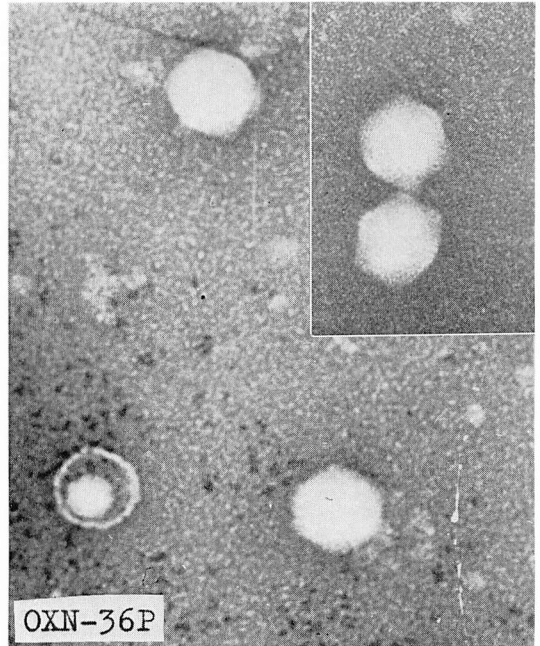
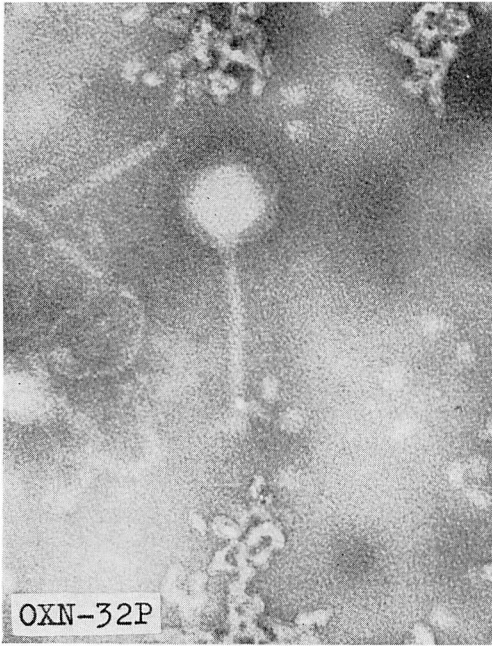


Fig. 4. Electron micrographs of 06N-25P, 06N-34P, 06N-52P and 06N-58P particles negatively stained with phosphotungstic acid.  $\times 200,000$





100  $\mu$

Fig. 5. Electron micrographs of OXN-32P, OXN-36P, OXN-52P and OXN-69P particles negatively stained with phosphotungstic acid.  $\times 200,000$

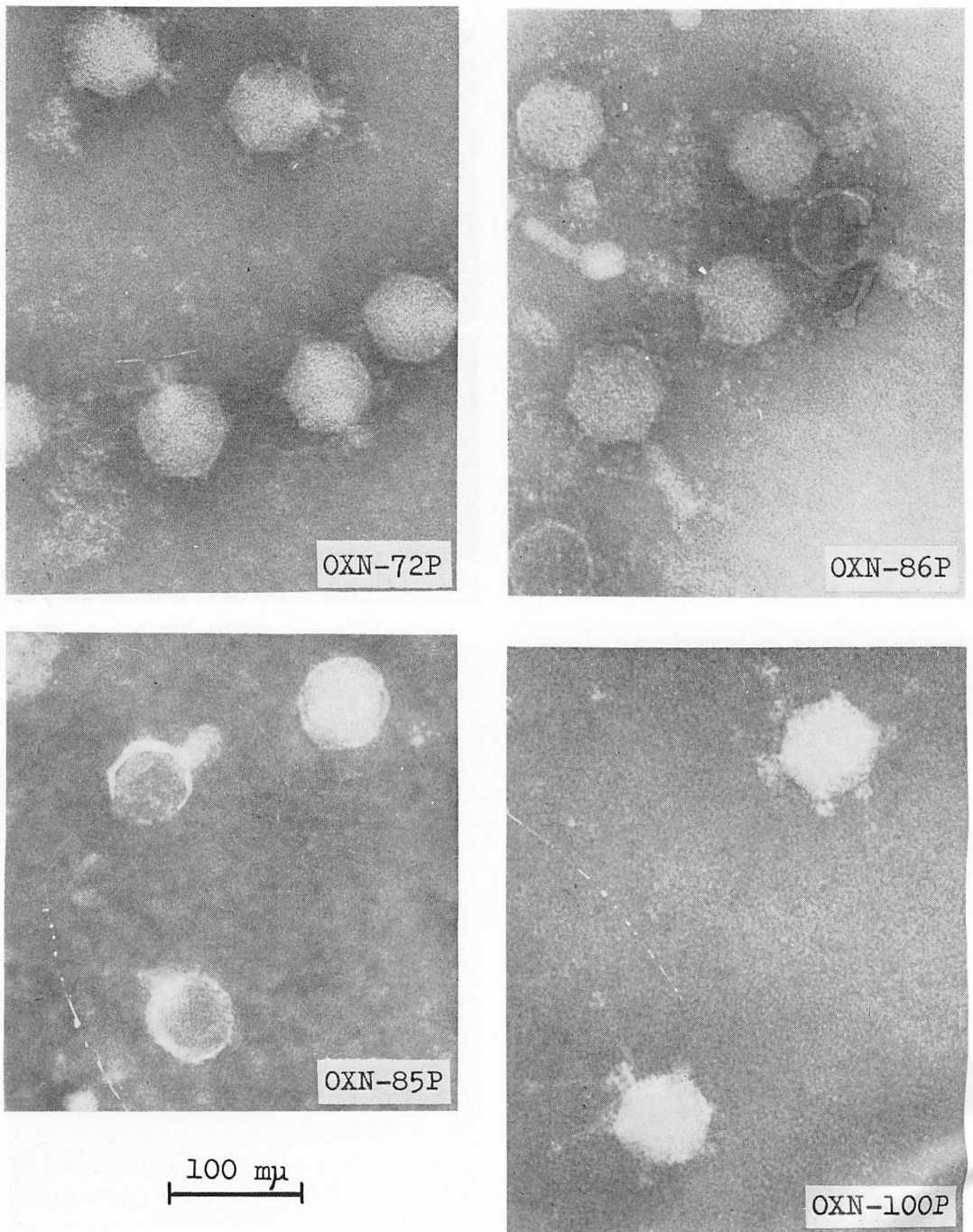


Fig. 6. Electron micrographs of OXN-72P, OXN-85P, OXN-86P and OXN-100P particles negatively stained with phosphotungstic acid.  $\times 200,000$

Table 2. Dimmensions of the phage particles used.

phages	Size of head Diameter, m $\mu$	Size of tail	
		Length, m $\mu$	Width, m $\mu$
06N-12P	60	200-220	10
06N-21P	65	95-100	22
06N-22P	70 $\times$ 45	60-70	22
06N-24P	60	200-220	10
06N-25P	60	15	7
06N-34P	60	15	10
06N-52P	60	110-120	10
06N-58P	60	10	5
0XN-32P	60	100-120	10
0XN-36P	60	10	10
0XN-52P	70	115-125	10
0XN-69P	65	65-75	20
0XN-72P	65	15	10
0XN-85P	60	10	5
0XN-86P	65	65-70	20
0XN-100P	65	20	10

突起をもった尾板からなっている。その尾板の構造は非常にもろく、標本作成時にしばしば破壊するのが知られた。

06N-21P は、外観六角形の頭部と、収縮性尾鞘と6個のスパイクをつけた尾板とをもった尾部とからなり立っている。尾部は外部の尾鞘とその内側の中空心棒から構成される。尾鞘には二つの状態があり、その一つは伸びた本来の状態、他は収縮した状態である。(06N-21P, 06N-22P, 0XN-69P, 0XN-86P の写真参照) 収縮した状態の時には尾鞘は短かく太くなり、そのため中空心棒が露出している。供試ファージのうち、06N-22P, 0XN-69P, 0XN-86P がこの形態に類似するが、ただ 06N-22P は頭部が扁長している。この構造の代表的なものとしては *E. coli* B の T-even ファージがよく知られている。

06N-34P 粒子の尾部構造は一見して他のものと異なっている。このファージの尾部は短く尾板が大部分を占めている。尾板はその先に六角に配置された六つの突起をもち、非常に短いネックを通じて、ほとんど直接頭部に接続している。供試ファージのうちこの構造に類するものは、06N-25P, 0XN-72P, 0XN-100P である。このうち 0XN-72P と 0XN-100P の両ファージ粒子は尾板から数本の尾部糸様の特異な構造物を出し、その糸の先端には末端構造が見られる。それら粒子の形はあたかもでんでん太鼓のようである。

06N-58P 粒子は正多面体様の形をした頭部と特徴的な短い尾部から成っている。このファージの鑑別の特徴はこの短い円錐状の尾部で、その短い尾部は比較的簡単な構造である。供試ファージのうちこの構造に類するものは、0XN-36P と 0XN-85P である。これらは *E. coli* B に感染する T 系ファージ、T<sub>3</sub>, T<sub>7</sub> に類似した形である。

## 考 察

陸棲の細菌、例えば *Staphylococcus* や腸内細菌の菌株の鑑別にファージ型別法 (Phage typing) が重要であることはよく知られている。この技法の海洋細菌学への応用は、同様に有効であり、興味もたれる。またそのことは、海洋細菌と陸棲細菌との鑑別の困難さを解消する一助となるものであろう。従って海洋細菌に活性な海洋バクテリオファージの分離と同時に、海洋細菌のファージ型別を試みることもこの研究の主な目的の一つである。しかし相応する菌種のすべての菌株を溶菌するようなファージは見出し得なかった。本実験の範囲内では供試海洋ファージの宿主特異性は厳しいものであって、海洋細菌相互または海洋細菌と陸棲細菌の間を型別するファージは分離されなかった。この問題について今後更に追究したい。

ファージ粒子の大きさは、それ自身が培地中を拡散する度合を左右するので、一般に、小さいファージ程大きい溶菌斑を生成する傾向にあると考えられる。しかしその関係は明確なものではない。本実験においてもごく小さいピン穴大の溶菌斑を形成する 0XN-52P は他の供試ファージ粒子より大きい頭部をもち、06N-58P、0XN-85P のごとく尾部が短くほとんど頭部のみのものは大きい溶菌斑を作るなど、やや上記の傾向がうかがえる。しかしファージの溶菌斑形態とその粒子構造との間には明らかな関係は見られない。それは溶菌斑の大きさを決定するのは、そのファージ粒子の大きさばかりでなく、そのファージの宿主細胞への吸着率 (adsorption rate) や放出量 (burst size) とも関係するためと考える。

SMITH and KREUGER (1954) が分離し研究した *Vibrio*-ファージの電子顕微鏡写真は、おそらく海洋ファージの形態検査の最初のものであろう。そのファージは径 95~100 m $\mu$  の頭部と径 15 m $\mu$  長さ 100 m $\mu$  の尾部とからなっている。BRADLEY (1965) は SPENCER (1960) が分離したファージ、NCMB 384, の電子顕微鏡写真を報告している。それは、径 60 m $\mu$  の多面体の頭部と長さ 100 m $\mu$  の非収縮性の尾部とから成り尾部の先には特別に複雑な先端構造をもっている。VALENTINE *et al.* (1966) は SPENCER (1960) が分離したファージの一つが特徴ある三角形の尖った尾板をもつことを明らかにした。WEIBE and LISTON (1968) は、850 m の深さの海底泥から分離した海洋性 *Aeromonas* sp. に対し活性を示すファージを研究し、その形は径 53 m $\mu$  の六角形の頭部と細い 160 m $\mu$  の尾部からなり尾部の先には尾板をもつことを明らかにした。JOHNSON (1968) は彼の分離ファージの形態について、約 60 m $\mu$  の径をもつ六角形の頭部に非常に小さい尾部を付けた形であると報告している。

このように、現在までの海洋ファージ粒子構造の研究は系統的なものではなくて、少数の海洋ファージ、主に SPENCER (1960) によって分離されたものについての個々の観察にすぎない。

BRADLEY (1967) は一般にファージをその形態から六つの群に分けることを提唱した。その後、TIKHONENKO (1970) は BRADLEY のファージ分類の 4 群と 5 群とは同一群に合併すべきものであろうとし、おおよそ BRADLEY の分類を基礎にして、ファージを五つの群に分けている。それは、1) 繊維状のファージ、2) 尾部類似のものをもつファージ、3) 短い尾部をもつファージ、4) 長く非収縮性の尾部をもつファージ、5) 収縮性尾鞘をつけた完全な形をした尾部をもつファージとである (Fig. 7 参照)。

Fig. 3~6 に示されるように分離海洋バクテリオファージの形態には巾広い変化が見られる。ここに分離された海洋ファージの形態を TIKHONENKO の群別に照らせば、その 3, 4, 5 群に属す

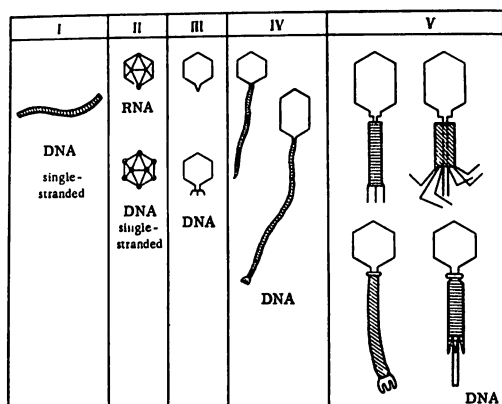


Fig. 7. Scheme illustrating members of different groups of phages. (TIKHONENKO, A. S., 1970)

る。また同時にそれらは DNA フェージであることが推測される。分離海洋フェージ粒子の各部の構造のうち、頭部の形はいずれも外観六角形で類似しているが、尾部の形の相違は著しい。尾部構造のこのように大きな相違は、これらフェージの宿主特異性が厳しいことから、宿主菌のリセプター (receptor) との結合の多様性に関するものであろう。本研究において、海洋バクテリオフェージの形態的特性を表わす共通点は見出し得ず、むしろその形態の多様性を認めた。0XN-72P, 0XN-100P に見られる尾部糸様の構造は他に類を見ない変わったものである。今後更に TIKHONENKO の分類にある 1 群または 2 群の形態をもつフェージをも海洋中で検索したい。

### 要 約

1970 年、九州南方海域における二回の試水採取により、その海水から 16 組の宿主—フェージ系を分離した。これらの宿主菌は典型的な海洋細菌であり、*Vibrio* (9), *Pseudomonas* (4), *Flavobacterium* (2), *Achromobacter* (1) に属した。分離フェージの宿主特異性は厳しく、分離当初の宿主以外の菌の溶菌は見出しえなかった。これらのフェージは海水中に遊離して生息する海洋フェージで、ヴィルレント・フェージ (virulent phage) である。供試フェージの構造は個々により非常に異なり、特に尾部構造の相違は甚だしい。それらを大別すると、収縮性尾鞘をつけ完全な形をした尾部をもつフェージ 4 株、長い非収縮性の尾部をもつフェージ 5 株、短い又はこん跡の尾部をもつフェージ 7 株であった。それらは TIKHONENKO の分類の 3, 4, 5 群に属し、DNA フェージである。これら供試フェージの構造から、海洋バクテリオフェージの形態的特性を表わす共通点は見出し得ず、むしろその形態の多様性を認めた。

終わりに、本研究を進めるにあたり御指導を賜った本学部柿本大菅教授に深く感謝の意を表します。また試水採取に際し多大の御協力をいただいた本学練習船“南星丸”の高橋琴一船長はじめ乗組員各位に厚く御礼申し上げます。電子顕微鏡写真の撮影には、本学医学部の上原二郎、厚地義春の両氏に絶大なる援助を仰いだ。記して謝意を表します。



## 文 献

- ADAMS, M. A. (1959): "Bacteriophages", Interscience Publishers, Inc., New York.
- BAIN, N. and J. M. SHEWAN (1968): Identification of *Aeromonas*, *Vibrio* and related organisms. in "Identification Methods for Microbiologists, Part B" (B. M. GIBBS and D. A. SHAPTON, ed.), 79-84, Academic Press, New York.
- BRADLEY, D. E. (1965): The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by the electron microscope. *J. R. Microsc. Soc.*, **84**, 257-316.
- BRADLEY, D. E. (1967): Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacterial Rev.*, **31**, 230-314.
- BREED, R. S., E. G. D. MTRRAY, and N. R. SMITH (1957): "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7th ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- CHAINA, P. N. (1965): Some recent studies on marine bacteriophages. *J. gen. Microbiol.*, **41**, Proceedings xxv.
- HARRIGAN, W. F. and M. E. MCCANCE (1966): "Laboratoly Methods in Microbiology", Academic Press, New York.
- HENDRIE, M. S. and J. M. SHEWAN (1966): The identification of certain *Pseudomonas* species. in "Identification Methods for Microbiologist, Part A" (B. M. GIBBS and F. A. SKINNER, ed.), 1-7, Academic Press, New York.
- HIDAKA, T. and M. SAKAI (1968): Comparative observation of the inorganic salt requirements of the marine and terrestrial bacteria. *Bull. Misaki Marine Biol. Inst. Kyoto Univ.*, No. 12, 125-149.
- JONHSON, R. M. (1968): Characteristics of a marine *Vibrio*-bacteriophage system. *J. Arizona Acad. Sci.*, **5**, 28-33.
- KRISS, A. E. and E. A. RUKINA (1947): Bacteriophage in the sea. *Rept. U.S.S.R. Acad. Sci.*, **57**, 833-836.
- SMITH, L. S. and A. P. KRUEGER (1954): Characteristics of a new *Vibrio*-bacteriophage system. *J. gen. Physiol.*, **38**, 161-168.
- SPENCER, R. (1955): A marine bacteriophage. *Nature*, **175**, 160-161.
- 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.
- TIKHONENKO, A. S. (1970): "Ultrastructure of Bacterial Viruses" (Translated from Russian by B. HAIGH), 29-32, Plenum Press, New York.
- VALENTINE, A. F., P. K. CHEN, R. R. COLWELL, and G. B. CHAPMAN (1966): Structure of a marine bacteriophage as revealed by the negative-staining technique. *J. Bacteriol.*, **61**, 819-822.
- WIEBE, W. J. and J. Liston (1968): Isolation and characterization of a marine bacteriophage. *Marine Biol.*, **1**, 244-249.
- ZOBELL, C. E. (1946): "Marine Microbiology", 82-83, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass.