Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.
Vol. 36, No. 1, pp. 17～25 (1987)

鹿児島湾内海水中のファージ感受性細菌について

日高富男・上野有史・河部尚禎

On the Phage-Sensitive Bacteria in Seawater of Kagoshima Bay

Tomio HIDAKA*, Yuji KAMINO*, and Takayoshi KAWABE*

Abstract

Marine bacteria and bacteriophages were isolated from seawater samples collected from 1 m and 50 m depth layers at 8 stations of Kagoshima Bay, at 11 times of selected seasonal intervals during 1980 to 1984. The isolates from each sample included several phage-sensitive strains. The rate of them to total isolates from each sample vary from 0 to 87 % (av. 25%), at each station, depth, and season. The sensitive strains found in all genera of isolates, especially *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Moraxella*. The strains were divided several phage types in each genus. The habitat of them was segregated into each station and depth. It is found that the strains of phage-type level have a habitat segregation dependent on the oceanographic conditions in the Bay.

自然環境において，多くの微生物は混在して生活し，その場の環境条件に応じて微生物社会を形成する。その社会の様相は，微生物相互の作用や環境条件の変動に伴って，絶えず変化しつつある。微生物社会の底辺部分にあたる細菌-バクテリオファージ（以下，ファージ）系の構成については，細菌が生息する自然環境には，それらを宿主とする何らかのファージが存在し，宿主-寄生体関係を示しているであろうと考えられるがその詳細な知見は少ない。日高ら[1,2]，MOEBUS *et al.*[3] は，いくつかの外洋海域において，海洋細菌とこれを宿主とするファージとの関係を検討し，海洋細菌の菌株レベルでの変遷を認めている。本研究は，先の知見をさらに進展させるため，鹿児島湾内を調査海域とし，時間的に拡張して季節的あるいは経年的変化を追究するために，'80年5月から'84年5月までの4年間に11回の調査を行った。鹿児島湾の海況の概要については前報[4]ですでに記述した。調査の結果，分離海洋細菌中のファージ感受性菌の割合やその菌属組成及びそれらの季節的・経年的な遷移の様相，加えて'83年4月と11月におけるファージ感受性菌株の水平・鉛直的な棲み分けについて，いくつかの興味深い知見を得たのでここに報告する。

* 鹿児島大学水産学部微生物学研究室（Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 50-20 Shimoarata 4, Kagoshima, 890 Japan）

実験材料及び方法

調査海域　この調査は，鹿児島湾内の湾奥部，湾央部，湾口部の海域を通してほぼ中央線に沿って設けた8つの定点において行った。Fig. 1 に示されるように，定点1，2は湾奥部に，定点3は湾奥部と湾央部の境，西桜島水道に，定点4，5は湾央部に，定点6，7は湾口部に，そして定点8は湾口を少し出た湾外に位置する。各調査定点における水深はそれぞれ異なるが，表面下1m，50mの各層の海水を採取して試料海水とした。水深が浅い定点3では50m層の代わりに20m層から採水した。調査時期によっては，天候や作業の都合で，調査の定点や深度に欠除するものがある。

供試海水　各調査定点における所定深度の海水は，J-Z 式採水器を用いて無菌的に採取し，船上で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・保存には，海水培地，海水寒天培地，軟海水寒天培地を使用した。海水培地とは，75%濃度の人工海水1 ℓ にポリペプトン（大五）5g と酵母エキス（大五）1g を溶解し，最終 pH 7.6～7.8となるように調整してオートクレーブ殺菌（120℃，15分）したものである。海水寒天培地は海水培地に1.5%濃度となるよう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%濃度となるように寒天を加えたものが軟海水寒天培地である。

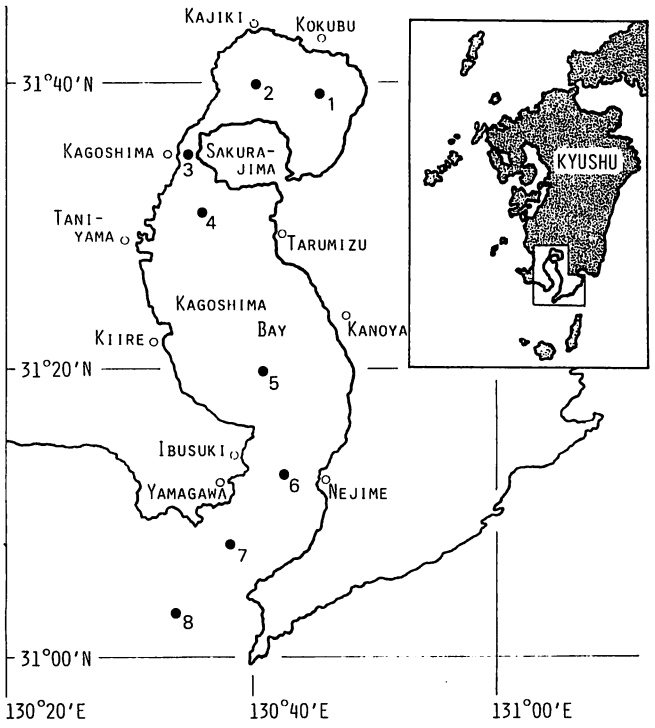

Fig. 1. Location of the sampling stations (●, 1～8) in Kagoshima Bay.

海洋細菌の計数と分離　無菌的に採取した供試海水は直ちに船内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，各試料海水をそれぞれ0.1ml ずつ10枚の海水寒天平板に塗抹接種して培養した。培養6日後，寒天平板上に出現した全コロニーを計数して供試海水1 ml 中の細菌細胞数（cfu／ml）を算定した。次いで，出現コロニーの分散状態が良く，その数が平均的である数枚の平板を選出し，それら平板の全てのコロニーを海水寒天斜面培地に分離移植した。それらの培養温度は23℃～25℃であった。

分離細菌の属同定　分離菌株は常法[5]に従ってグラム反応性（3％ KOH 法）[6]，運動性，HUGH & LEIFSON の OF 試験，KOVACS Oxidase 試験，0／129感受性試験，glucose からのガス生成試験，色素産生の各性状が調べられこの結果を，SHEWAN (1960)[7]の図式に清水(1978)[8]，絵面 (1976)[9]らの修正を加味して作成した日高 (1984)[10]の図式に照らし，分離菌を属レベルで同定した。

ファージの検出と分離　ファージの検出は集殖法により行った。採取直後の供試海水250ml を150ml 海水培地入り500ml 容振とう用肩付フラスコに加え，23～25℃で3日間集殖培養した。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分間遠沈した上澄液を Millipore filter（HA，0.45 μm）でろ過・無菌化して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幼若培養菌を接種した二重寒天平板を作成し，その上に前述の各粗ファージ液を滴下して1晩培養する。培養後粗ファージ液滴下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力をもつファージの存否を検査した。また分離細菌のファージ感受性も同様にして検査した。

ファージ検出試験で溶菌像が見られたものは，その溶菌部分の一部を白金線で取り出して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分間ほど保持し，その0.2ml を予め融解して45℃に保った軟海水寒天培地3 ml に加え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た単離溶菌斑を分離・懸濁して再び前述と同様に溶菌斑を形成させる。その過程を数回繰り返すことによってめざすファージの純化・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って類別した。これらの操作における培養温度は25℃である。

分離菌のファージ感受性　分離細菌に対する単離ファージの感染試験は，まず相互交叉スポット試験によって検出し，次いで溶菌斑形成能試験で確認した。

実験結果及び考察

1．各供試海水中の細菌細胞数に対するファージ感受性細菌細胞数の割合

鹿児島湾内海域の各定点において年期・季節を異にし，11回にわたって採取した各供試海水中の分離細菌細胞数に対するその中のファージ感受性細胞数の割合を Table 1 に示した。なおこれら調査時の試水中の従属栄養細菌細胞数（cfu／ml）は前報[11]で詳述した。Table 1 に見られるように，ファージ感受性細胞の割合は分離の時期，定点，深度によって0％から87％までの範囲で大きく変動している。しかし季節や地理的条件或いは深度による系統的な

傾向は見出し得なかった。しいて言えば湾奥，湾央に比して湾口，湾外の定点においてその割合が低い傾向が見られる。また試水中の細菌細胞数が多いほどその中のファージ感受性細胞数が増す傾向にあったが，前者に対する後者の割合は類似している。これらの結果を単純平均すれば，分離細菌の約25％がファージ感受性菌であった。この平均値は外洋海水におけるそれとほぼ類似しているが，外洋のそれらは変動範囲がせまかった[1,2]。

Table 1. Percentages of the phage-senstives to viable cell counts per ml. of seawater samples at various stations and depths in Kagoshima Bay, selected seasonal intervals.

St. No.	Depth (m) \ Sampling Date	1980 May 28	1980 Sep. 5	1981 May 8	1981 Aug. 18	1981 Nov. 5	1982 Jan. 22	1982 May 18	1982 July 15	1983 Apr. 22	1983 Nov. 14	1984 May 9	Average
1	1							47	54	9		35	36
	50	26	67	0	63	62	53	29	35	87		10	43
2	1							23	40	14	16	32	25
	50	25	47	7	50	40	54	37	9	74	11	33	35
3	1									17	25	45	29
	20	15	17	36	57	75	45			4	15	16	31
4	1							17	10	3	59	5	19
	50	14	41	65	24	14	50	40	22	48	16	15	32
5	1							31	21	0	19	4	19
	50	50	11	56		9		56	30	37	27	22	33
6	1							68	0	24	34	30	31
	50	10	22	45		11		22	0	37	12	24	20
7	1							46	10	5	3	0	13
	50	13	4	49		20		20	0	23	6	14	17
8	1										8	37	23
	50	4	4	6							4	8	5
Average	1							39	23	12	23	24	24
	50	20	27	33	49	33	51	34	16	44	13	17	27

2．ファージ感受性菌の属組成

調査時期のうち'83年4月と11月の試料については，分離された全菌株の属組成と各属の中のファージ感受性細胞の占める割合を Fig. 2，3に示した。まず Fig. 2について，'83年4月調査時の分離菌の属組成は水深1m層と50m層とでは明らかに異なっていた。すなわち1m層では定点毎に *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Moraxella* が見出されたのに対し，50m層では全ての定点において *Pseudomonas* が優勢でそれに *Vibrio* や *Aeromonas* が少し混在する程度であった。*Pseudomonas* が優勢である傾向は湾奥に強く現れ，湾央，湾口と外に

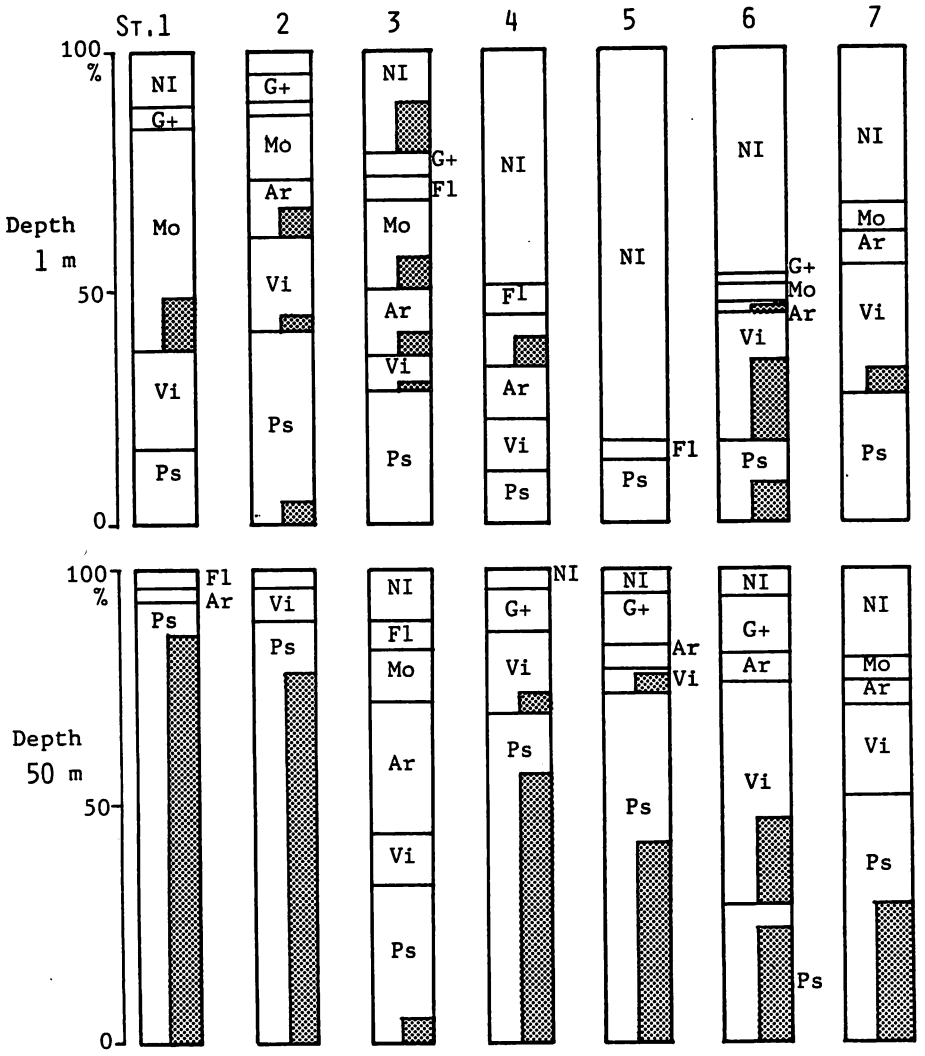

Fig. 2. Generic compositions of phage-sensitives in total isolates from seawater at various stations and depths of the Kagoshima Bay, April 22, 1983.
Key :
Generic abbreviations ; Ps=*Pseudomonas*, Vi=*Vibrio*, Ar=*Aeromonas*, Mo=*Moraxella*, Fl=*Flavobacterium*, Ca=*Caulobacter*, G+=Gram-positive, NI=Not Identify.
⊠ ; Phage-sensitives
The samples at St. 3 were collected from 1m and 20m depths.

向かうに従って *Pseudomonas* に対する *Vibrio* の割合が増加していた。このような組成を示す各属菌の中で，ファージ感受性細胞は，1 m層では *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Moraxella* のそれぞれに10～70%の範囲で見られ，それらは定点によってかなり変動していた。50m層においては各定点とも優勢菌である *Pseudomonas* にファージ感受性細胞の割合が高く，全体におけるファージ感受性細胞の割合を高めていた。*Vibrio* が優勢である定点6では *Vibrio* のファージ感受性細胞の割合で高かった。

次いで，Fig. 3は'83年11月の調査結果を示したものである。この時期の特徴は'83年4月のそれに比して *Moraxella* が各定点，深度において多く見かけられることであり，またその

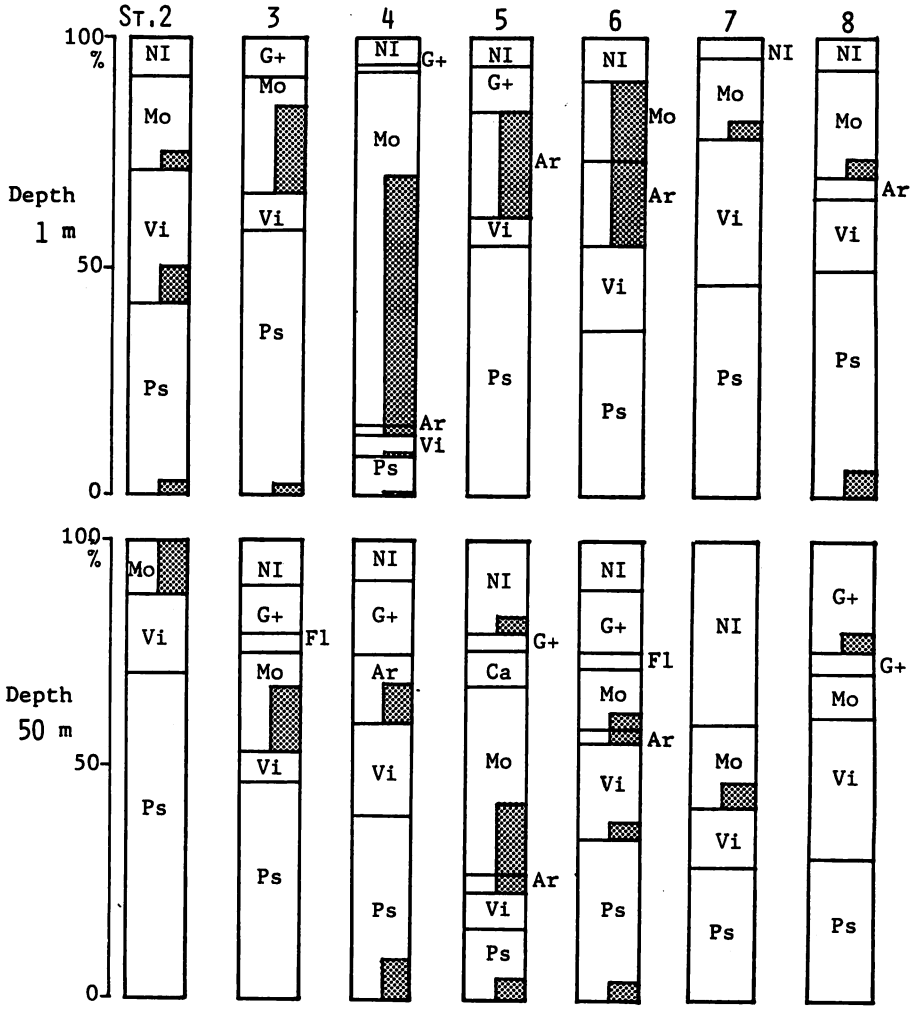

Fig. 3. Generic compositions of phage-sensitives in total isolates from seawater at various stations and depths of the Kagoshima Bay, November 14, 1983.
Key : See Fig. 2.

Moraxella にファージ感受性細胞が高い割合で含まれていた。さらに各定点における水深1m層と50m層との間に菌属組成に大差は見られなかった。このように調査時期によってファージ感受性細胞が含まれる菌属に違いが見られるが，全調査期間を通して見れば，分離されたすべての菌属のいずれもがどの時期かでファージ感受性細胞を含んでいた。つまり，調査海域の環境条件が変動する中にあって，その調査時期がある菌属の発育に適した条件であれば，その菌属が優勢となり，その菌属にファージ感受性細胞が多く現れると言える。

3．ファージ型菌の深度別分布

'83年4月，11月には，細菌相をさらに細やかに調べるため，調査海域中に存在したファージを用い分離ファージ感受性菌についてファージ型別を行った。まず'83年4月の各ファージ型菌の分布を Table 2に示した。ファージ型は *Pseudomonas*-a～i，*Vibrio*-j～r，*Aeromonas*-s～w，*Moraxella*-x～z の合計24型に分けられた。この調査時期の50m層で優勢であったファージ感受性 *Pseudomonas* は a から i までの9つの菌型に分けられ，そのうち i は全定点の50m層に分布していた。そして，h，g を含めたこれら3つの菌型は50m層にだけ見られ，1m層にはそれらとは異なる6つの菌型（a～f）が分布していた。この6つの菌型は，広域に分布することはなく，それぞれ1つの試料からのみ検出され，分布細胞数も少なかった。このように同じ *Pseudomonas* でも表層性菌型と中層性菌型に群別され，水深によって明瞭な棲み分けが見られた。*Vibrio* においても j～p 型は表層性であり q，r の2型が中層性であった。また *Aeromonas* と *Moraxella* の菌型はすべて表層性であって個々に散在していた。

次に，'83年11月の各菌属内の各ファージ型の分布を Table 3に示した。この表に見られるように *Pseudomonas* と *Vibrio* においては，前表と同様に表層性と中層性の菌型に分けられたが，*Aeromonas* と *Moraxella* では表層性と中層性および両水深に広く棲む型が含まれた。この時期のファージ感受性細胞の優勢菌属であった *Moraxella* について見れば，定点4の1m層ではファージ感受性 *Moraxella* の5つの菌型が検出されたが，その中の菌型20，21は定点2から定点6までの広域に分布していた。そしてこの2つの菌型は，定点4の1m層において，それぞれ110，230 cfu／ml という高い密度であった。また，この他に広域に分布していたものには *Aeromonas* の菌型13があり，定点4から定点6に分布していた。この菌型13はファージ感受性 *Aeromonas* の主導菌であった。その他の菌型は個々の試料から散発的に検出されたものであった。

以上のように，同じ菌属に属する細菌株であってもファージ型により分布に明らかな違いがあることがわかる。また，分布域の広い菌型を含む試料では，その菌型の属する菌属中に多くのファージ感受性菌株が見出されている。ファージの宿主特異性は厳しく，細菌に対するファージの係わりは菌株レベルで選択されるので，細菌-ファージ系としてとらえることにより，現場の環境条件の変動を反映した細菌相の細かな変遷が把握できる。

Table 2. Distribution of the bacterial cells belonging to various phage-types in Kagoshima Bay, April 22, 1983.

St. No.	Depth (m)	Bacterial cell counts of each phage-type/ml of seawater — Phage-types: *Pseudomonas* a	b	c	d	e	f	g	h	i	*Vibrio* j	k	l	m	n	o	p	q	r	*Aeromonas* s	t	u	v	w	*Moraxella* x	y	z
1	1																								30		
	50								12	70																	
2	1	10	21	10	13						21	15								23	11	14					
	50								9	61																	
3	1												19										34			9	34
	20								10																		
4	1																										9
	50								74									10									
5	1																										
	50								8	25							4										
6	1					29	10						57	10	10									10			
	50							5		16								15									
7	1															11											
	50								4	19																	

Table 3. Distribution of the bacterial cells belonging to various phage-types in Kagoshima Bay, November 14, 1983.

St. No.	Dep-th (m)	Bacterial cell counts of each phage-type/ml of seawater — Phage-types: *Pseudomonas* 1	2	3	4	5	6	*Vibrio* 7	8	9	10	*Aeromonas* 11	12	13	*Moraxella* 14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	NI 27	28
2	1	10						11		9								17											
	50																				8	8							
3	1			8												8					32								
	20																				22			8					
4	1				7					7		18	7				16	32			110	230	16						
	50					4								4															
5	1													17															
	50						5							5								5	5		10			5	
6	1													8							8								
	50						3			3				3												3			
7	1																		4									
	50																									5		
8	1					4													4									
	50																										4	

要　　約

海洋における細菌-ファージ系の構成と分布を明らかにするため，鹿児島湾を調査海域とし，そこに8定点を設け，各定点の1m，50m各層から採取した海水試料について，従属栄養細菌細胞数とその菌数中のファージ感受性細菌細胞数の割合，それらの菌属組成及びファージ感受性菌株の分布を調べた。調査は'80年5月から'84年5月までの4か年間に11回行った。その結果，分離海洋細菌中のファージ感受性細菌の割合は季節や定点，深度によって0～87%の変動が見られ，平均25%であった。ファージ感受性細菌は分離されたすべての菌属にわたって多少なりとも含まれるが，中でも *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Moraxella* の各菌属に多かった。ファージ感受性菌株をファージ型別した各型菌は表層性と中層性およびその中間的両水深層に分布するものとに分けられ，それらは深度や定点において明らかな棲み分けが見出された。

文　　献

1) 日高富男（1981）：漁場海域における微生物生態系の解析－Ⅲ，北琉球島弧西方海域における海洋バクテリオファージ系の棲み分けについて．鹿大・水・紀要，**30**，pp. 331-338.

2) 日高富男・島津誠一郎（1985）：漁場海域における微生物生態系の解析－Ⅴ，南琉球島弧西方海域における細菌相について．鹿大・水・紀要，**34**，pp. 59-69.

3) MOEBUS, K. and H. NATTKEMPER (1981)：Bacteriophage sensitivity patterns among bacteria isolated from marine water. *Helgolander Meeresuntersuchungen*, **34**, 375-385.

4) 日高富男(1983)：鹿児島湾における発光細菌分布の季節変動．沿岸海洋研究ノート，**21**，pp. 19-28.

5) HARRIGAN, W.F. and M.E. MCCANCE (1966)：“Laboratory Methods in Microbiology”, Academic Press, New York.

6) BUCK, J.D. (1982)：Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **44**, 992-993.

7) SHEWAN, J.M., G. HOBBS and W. HODGKISS (1960)：The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 463-468.

8) 清水潮（1974）：海洋微生物の分離と生態．多賀信夫編“海洋微生物”，pp. 45-65，東京大学出版会.

9) 絵面良男（1976）：厚岸湾より分離した海洋細菌の分類学的研究．学位論文（北海道大学）.

10) 日高富男・島津誠一郎（1984）：鹿児島湾内海水中の細菌属組成の季節変動．鹿大・水・紀要，**33**. pp. 97-105.

11) 日高富男（1984）：鹿児島湾における細菌分布の季節変動．鹿大・水・紀要，**33**. pp. 85-96.