

## 海洋バクテリオファージの増殖に及ぼす 培養温度と培地中無機塩の影響

日 高 富 男<sup>\*1</sup>

### Effect of Incubation Temperature and Mineral Environment on the Propagation of Marine Bacteriophages

Tomio HIDAKA<sup>\*1</sup>

#### abstract

The author investigated the effects of cultural conditions, temperature and mineral composition, on the propagation of five bacteriophage systems isolated from sea water. For test of them, a method of one-step growth experiment was used in this work. It is designed to observe one cycle of phage propagation, *i. e.* adsorption, multiplication, and burst. The results were as follows.

First, the host bacteria grew within the range of temperature from 17° to 35°C with optimum at 32 °C, however, the phages propagated only between 25° and 28 °C with optimum at 25 °C. Secondly, the host bacteria showed different behaviours on the mineral requirement for growth. Two of them required media supplemented 3 % NaCl for growth, and the other three required K-, Mg-, and Ca-salt as well as NaCl. But all of the tested phages propagated only in the same mineral condition as sea water. These results demonstrate that temperature and mineral conditions for the phage propagation in host cell are more restrictive than that for the growth of host bacterium alone. The properties of the tested phages, psychrophilic and specific mineral requirement for propagation, defined them as marine phages.

海洋微生物を性格づける特徴は、その増殖における低温性と海水無機塩要求性にあると言える。海洋細菌の特性については、古くから多くの研究者によって究明されてきている。バクテリオファージ（単にファージともいう）はその増殖に必要な素材の全てを宿主菌に依存し、若く活力ある宿主細胞内でのみ増殖するため、海洋ファージの増殖に係わる性状には宿主である海洋細菌の性状が重複することは避けられない。ファージ液中でのファージ粒子の安定性やファージ粒子自体の理化学的性状については、宿主細菌から離れた状態で検討するが、それらはいわばファージ粒子の静的な状態での性状である（CHAINA, 1965; ESPEJO and CANELO, 1968, 1969; HIDAKA, 1972, 1973; HIDAKA and ICHIDA, 1976; NAKANISHI *et al.*, 1966; SKLAROW *et al.*, 1973）。海洋ファージの増殖におよぼす培養条件の影響を検

<sup>\*1</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)

討する場合に、宿主細胞とファージ粒子とを混ぜて寒天重層平板に流込み、いろいろな条件で培養して溶菌斑形成能を観察する方法がとられている (JOHNSON, 1968; SPENCER, 1960; WIEBE and LISTON, 1968; ZACHARY, 1976). その方法では、前述の理由からファージ単独の性状を解析することは難しい。ファージの増殖は、宿主細胞へのファージ粒子の吸着と感染に始まり、細胞内で増殖、成熟した子孫ファージの放出に至る。この過程を1サイクルだけ行なうように仕組んだ実験として一段増殖実験法 (ELLIS and DELBRÜCK, 1939)がある。本報においてはこの実験法を用い、所定条件下における海洋ファージの一段増殖過程を観察した。これによって、宿主菌とファージとの挙動を解析しながら、海洋ファージの増殖に及ぼす培養温度や培地中の無機塩組成の影響を検討しえたので、その結果を報告する。

### 実験材料および方法

1. 供試海洋バクテリオファージ系 本報で供試した海洋ファージ系は、さきに九州南方海域の海水から分離したファージ系のうち代表5系 (06N-12P, 06N-24P, 06N-34P, 06N-52P, 06N-58P)である。それらはすでに、宿主菌の性状や溶菌斑形態、ファージ粒子構造を調べ (HIDAKA, 1971), ファージ粒子の安定性をも検討している (HIDAKA, 1972)。

2. 使用培地 海水培地 (Sea Water Broth, SWB) は、HERBST's 人工海水 1ℓ にポリペプトン 5g, 酵母エキス 1g 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% 寒天を加えた。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。次に無機塩要求性を調べるための5種所定培地 (HIDAKA, 1965) は、(a) 純水, (b) 0.5% NaCl 水溶液, (c) 3% NaCl 水溶液, (d) 1/6 濃度人工海水, (e) 人工海水, のそれぞれにポリペプトン 0.05%, 酵母エキス 0.01% 濃度に溶解し, pH を 7.6~7.8 に調節したものである。なお HERBST's 人工海水の組成は NaCl, 30; KCl, 0.7;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 10.8;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 5.4;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1.0 g/L で pH 7.6~7.8 に調節したものである。

3. バクテリオファージ定量法 ファージの定量は ADAMS (1959) の寒天重層法に準じて行なった。SWB で適宜  $10^{-7}$  希釈を行なったファージ液 1 ml を宿主菌新鮮培養物 ( $10^8$  cfu/ml) 1 ml と混ぜ、室温に 5~10 分間放置して宿主細胞にファージ粒子を吸着させる。その吸着液 0.2 ml を、予め溶解し 45°C に保温した sSWA 3 ml に注加し手早く混和した後、そのすべてを SWA 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 1 枚の平板に形成された溶菌斑数は [plaque forming unit (pfu)/ 供試希釈ファージ液 0.1 ml] を表わす。この測定値を 10 倍し希釈倍数を乗じて pfu/ml を算出した。

4. 一段増殖実験法 培養温度の影響をみるための一段増殖実験は、基本操作の中で培養時の温度条件を変えたのみである。宿主菌を SWB で 1 晩培養し、その 0.5 ml を 4.5 ml の SWB に移植してさらに 2~3 時間振盪培養する。その宿主菌新鮮培養液 ( $10^8$  cfu/ml) 4.5 ml と当該ファージ液 ( $10^7$  pfu/ml) 0.5 ml とを振盪培養管に入れて混和 (MOI, 0.01), 所定温度で振盪培養する。その間にファージ粒子は宿主細胞に吸着される。所定吸着時間後、その培養液 (A) 0.1 ml を SWB 9.9 ml に加えて希釈液 (D) とする。その希釈液 (D) 0.05 ml を、さらに別に準備したいた振盪培養管中の SWB 5 ml に加えて希釈し、各所定温度で振盪培養を続け

増殖液(G)とする。希釈液(D)は直ちにその中の全ファージ数を測定すると同時に、Millipore filter (HA, 孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ) で濾過し、その濾液について未吸着ファージ数を測定する。それら両測定値の差から吸着ファージ数を知り吸着率を算定する。増殖液(G)はその後所定培養時間(5~10分)毎に、その一部必要量を無菌的にとり出し、適宜希釈してファージ数を測定する。各測定値から未吸着ファージ数を差引いて片対数方眼紙にプロットし、一段増殖曲線を作成する。

培地中の無機塩組成の影響をみるための一段増殖実験は、宿主菌の前培養液中やファージ液中の無機塩ができるだけ実験系に導入されないように修正してある。宿主菌をSWBで1晩培養し、その0.5 mlを4.5 mlの5種所定培地(a,b,c,d,eの各培地)に移植してさらに2~3時間25°Cで振盪培養する。その宿主菌の新鮮培養液0.05 mlと当該ファージ液( $10^7$  pfu/ml)0.05 mlとを5 mlの5種の所定培地(前培養に相応する培地)を入れた振盪培養管に加えて混和(MOI = 0.1), 25°Cで振盪培養する。所定吸着時間後に、その培養液(A)1 mlを相応する所定培地9 mlに加えて希釈液(D)とする。その希釈液(D)0.05 mlをさらに振盪培養管中の所定培地5 mlに加え、振盪培養を続ける。以下の操作は前記と同様に行う。

### 実験結果および考察

一段増殖実験(one step growth experiment)によって画かれた一段増殖曲線(one step growth curve)からは、ファージが宿主細胞に感染してから子孫ファージ粒子を放出し始めるまでの時間、潜伏期(latent period)と、その時間の拡がり、上昇期(rise period)、感染菌1個あたりの平均ファージ放出数(average burst size)などを知りうる。また曲線には現れないが、この実験から宿主細胞に対するファージ粒子の吸着率(absorption rate)も算定できる。供試海洋ファージの一段増殖実験法に際し、温度条件や培地中の無機塩組成を変えて培養し、それによってもたらされた一段増殖曲線の変化をとらえた。それから海洋ファージの増殖に及ぼす培養温度や培地中無機塩組成の影響を知り、それらの至適条件を考察する。

#### 1. 培養温度の影響

(1) 宿主菌の発育温度曲線：供試ファージ系の宿主菌をSWBに接種し、温度勾配振盪培養装置(ヤマト科学, Model SC-21)を用い6段階(17°, 21°, 25°, 28°, 32°, 36°C)の温度条件で4時間培養した。発育度は光電比色計(E. Leitz製, Model M)で波長550 nmの吸光値として表わした。かかる振盪短時間培養によっては、長時間培養よりも発育温度域及び至適温度が高温側に出るのが普通である。ファージの一段増殖実験は数時間の培養で終了するので、それに類する条件で実験した。その結果をFig. 1に示した。供試菌のうち06N-24を除く他の4菌について、この培養条件での発育温度域は17~35°Cであり、37°Cでは発育しなかった。至適発育温度は32°C付近にあった。これに対し、06N-24の発育温度域は20~32°Cで、至適温度は25°Cであり、すべて他の4菌より低温側であった。

(2) 各温度で前培養された宿主菌へのファージ吸着率：供試ファージ系の宿主菌をSWBの中で5段階温度で培養し、その培養菌に対する当該ファージの吸着率を25°C培養条件下で測定した。その結果をTable 1に示した。供試ファージ系の全てが25°C前後で前培養された宿主菌に対して最も高い吸着率を示した。その値はほぼ80%以上であった。しかし、

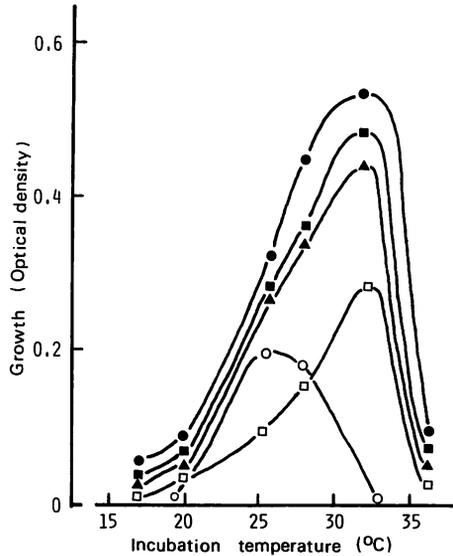


Fig. 1. Growth-temperature curves of host bacteria of used phage systems.  
 Symbols: —□—, 06N-21; —○—, 06N-24; —▲—, 06N-34; —●—, 06N-52;  
 —■—, 06N-58.

06N-24P は全体的に吸着率が低く、25 °C 培養菌に対しても 60% 程度であった。同一宿主菌であっても前培養温度の違いによって、それに対するファージ吸着率が少しずつ異なることが知られた。このことによって、ファージ実験における宿主菌の新鮮培養物は、培養条件を細かく吟味して作成しなければならないことがわかる。

(3) 各温度での宿主菌へのファージ吸着率：供試ファージ系の宿主菌を 25 °C で培養し、その培養菌に対する当該ファージの吸着率を 5 段階の温度で測定した。その結果を Table 2 に示した。これらの温度段階において、吸着率は 17 °, 21 °C で低いが、25 °, 28 °, 32 °C ではほぼ同じであり、むしろ吸着温度が高いほど吸着率は除々に上る傾向が見られた。このことを前

Table 1. Adsorption rates of used phages to the host cells cultured at various temperatures.

Phage	Subculture temp. of host				
	17	21	25	28	32°C
06N - 21P	56	65	85	89	83
06N - 24P	10	18	55	40	18
06N - 34P	66	72	77	75	74
06N - 52P	62	74	89	86	66
06N - 58P	54	80	95	93	71

Condition : Host cells,  $10^7$ /ml; MOI, 0.01; Adsorption temperature, 25 °C; Adsorption time, 10-20 min.

Table 2. Effect of temperature on the phage adsorption to the host cells.

Phage	Adsorption rate at				
	17	21	25	28	32°C
06N - 21P	59	64	85	86	89
06N - 24P	70	72	54	54	57
06N - 34P	60	65	89	89	93
06N - 52P	61	84	90	92	95
06N - 58P	75	82	92	92	93

Condition: Host cells,  $10^7$ /ml; MOI, 0.01; Adsorption time, 10-20 min.

項の結果も合わせ考える時、宿主細胞の条件が整っておれば、吸着の適温域はかなり広いようである。この実験においても、06N-24Pは他のファージ系と異なり低温側において吸着率が高くなっていた。

(4) 各温度での一段増殖実験：供試ファージ系の宿主菌を  $25^\circ\text{C}$  で培養し、それを宿主細胞として5段階温度で一段増殖実験を行った。各ファージ別に各温度における一段増殖曲線を Fig. 2 ~ 6 に示した。またそれら一段増殖曲線から読みとられた潜伏期と放出数を Table 3 にまとめた。Fig. 2 に示された 06N-21P の一段増殖曲線が培養温度の違いによって変化する様子は、他のファージ系のそれと異っていた。すなわち 06N-21P においては、培養温度の低下に伴って、潜伏期と上昇期が増し、放出数は減少していた。このように各培養温度によっ

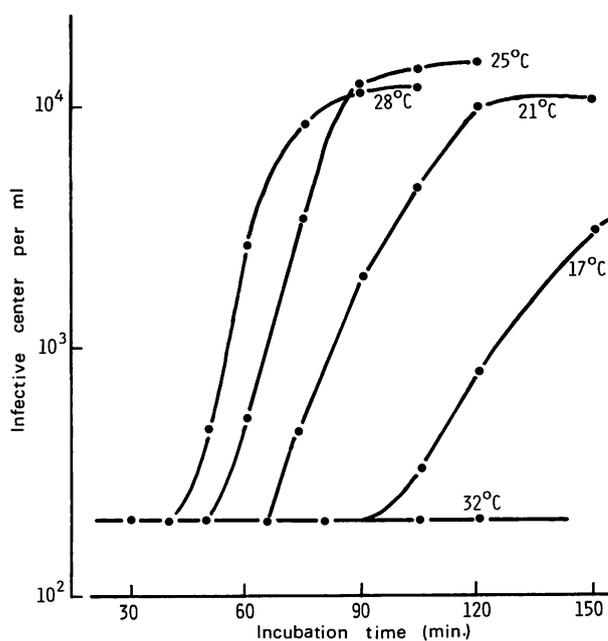


Fig. 2. One-step growth curves of 06N-21P-system incubated at various temperatures. Host cells,  $10^7$ /ml; MOI, 0.01; Adsorption time, 20 min.

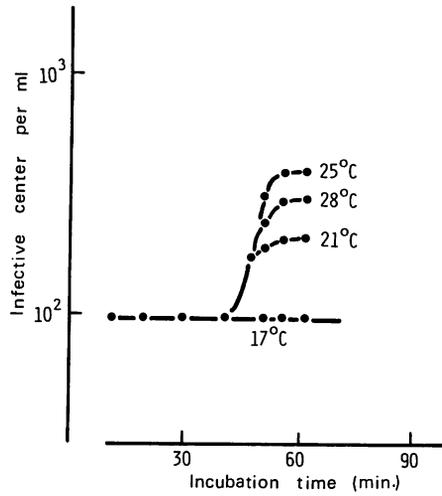


Fig. 3. One-step growth curves of 06N-24P-system incubated at various temperatures. Host cells,  $10^7$ /ml; MOI, 0.01; Adsorption time, 10 min.

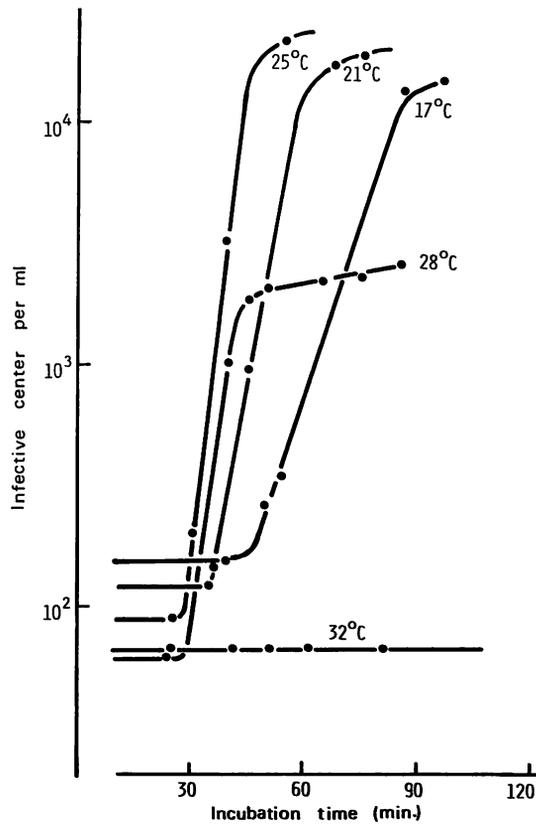


Fig. 4. One-step growth curves of 06N-34P-system incubated at various temperatures. Host cells,  $10^7$ /ml; MOI, 0.01; Adsorption time, 10 min.

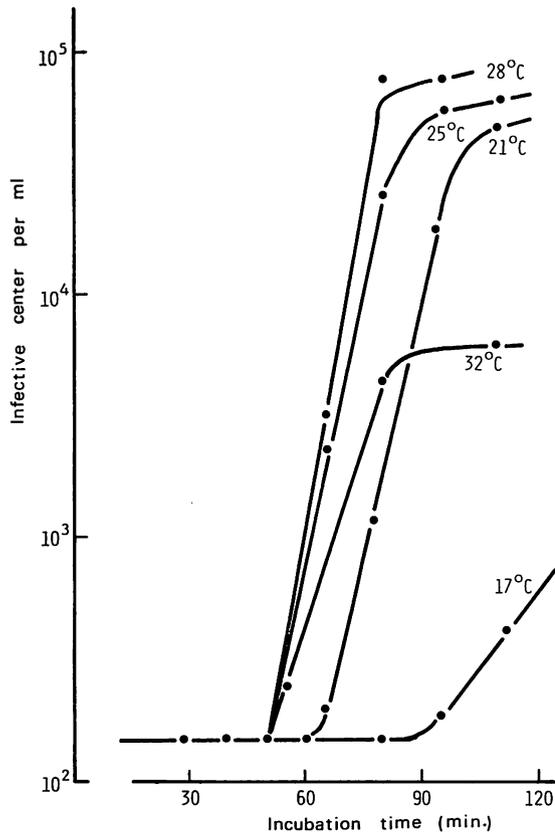


Fig. 5. Ono-step growth curves of 06N-52P-system incubated at various temperatures. Host cells,  $10^7$ /ml; MOI, 0.01; Adsorption time, 15 min.

て、一段増殖曲線はそれぞれ潜伏期、上昇期、放出数を異にしていた。一方 Fig. 3 における 06N-24P の曲線と Fig. 4 における 06N-34P の曲線では、培養温度が違っても潜伏期はほとんど変わらず、放出数だけが変化していた。次いで Fig. 5 における 06N-52P の曲線と Fig. 6 における 06N-58P の曲線では、培養温度のある段階から潜伏期に違いがみられ、06N-52P では培養温度 32°, 28°, 25°C では潜伏期は同じであったが、21°C ではそれがやや延長し、17°C ではかなり延びていた。これに対し 06N-58P では、32°, 28°, 25°C 培養と 21°, 17°C 培養との間に潜伏期の大きな違いが見られた。もちろん両ファージ系とも培養温度によって放出数も異なっていた。このように各ファージ系の一段増殖曲線から見られる潜伏期、上昇期、放出数は、培養温度によってそれぞれ異なる挙動を示していた。06N-52P が 28°C で最大の放出数を示したのに対し、他の 4 つのファージ系は 25°C で最大放出数を示した。32°C でファージの増殖がみられる 06N-52P, 60N-58P とも、その温度での放出数は最大放出数の 1/10~1/5 に減少していた。17°, 21°C においての放出数は 25°C の時の 1/3~1/2 程度であった。一段増殖曲線から、潜伏期が最も短かく放出数が最大である培養温度がそのファージ増殖のため

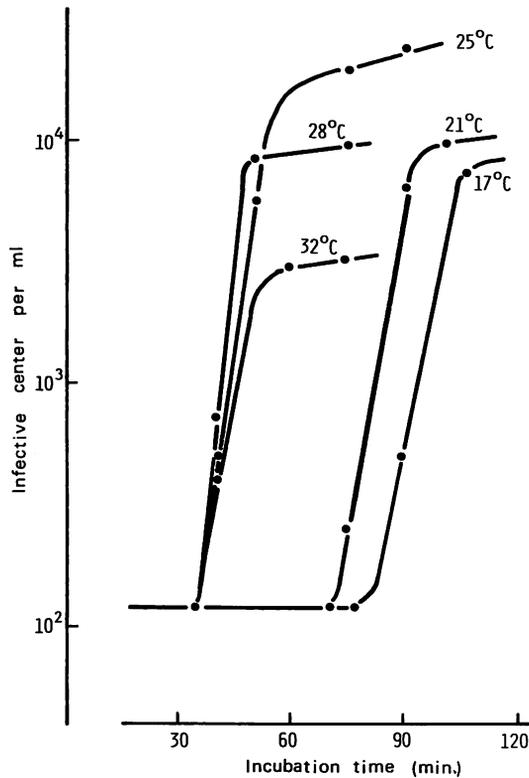


Fig. 6. One-step growth curves of 06N-58P-system incubated at various temperatures. Host cells,  $10^7$ /ml; MOI, 0.01; Adsorption time, 15 min.

の至適温度と見做すならば、供試海洋ファージ系の増殖のための至適温度は  $25^\circ\text{C}$  付近にあることがわかった。この至適温度条件においての各供試ファージ系の潜伏期と放出数は Table 3 に見られる。それによると 06N-21P の潜伏期は 50 分、放出数は 70 であった。同様に 06N-24P のそれは 40 分、4；06N-34P のそれは 25 分、240；06N-52P のそれは 50 分、500；06N-58P のそれは 35 分、170；と 5 つの供試ファージ系相互でもその増殖力にはかなりの違いが見られた。

これらの結果より、ファージが宿主菌へ吸着しその菌体内で増殖する時の温度域は、一般に宿主菌の発育温度域より狭く、その至適温度は宿主菌のそれより低い。すなわちその宿主菌がゆとりある代謝作用を営んでいる時に、ファージは旺盛に増殖するものと考えられる。また供試海洋ファージ系の増殖至適温度は、陸棲細菌に感染するファージ（例えば *Ps. aeruginosa* P など）のそれ ( $32^\circ\text{--}36^\circ\text{C}$ ) より低かった。

## 2. 培地中の無機塩組成の影響

(1) 5 種所定培地中での宿主菌の発育挙動：無機塩の組成及び濃度を異にする 5 種類の所定培地に細菌を接種し、 $25^\circ\text{C}$  で 6 日間培養してそれらの発育パターンから細菌の発育における無機塩要求パターンを知り、陸棲型 (T-type) 菌、好塩型 (H-type) 菌、海洋型 (T-type)

Table 3. Latent period and burst size of used phages at various temperatures.\*  
Medium, Sea water broth; MOI, 0.01; Adsorption time, 10-15 min.

Phage	17		21		25		28		32°C	
	L.p.	B.s.								
06N - 21P	95	27	65	50	50	70	40	60		0
06N - 24P		0	40	2	40	4	40	3		0
06N - 34P	40	85	35	150	25	240	25	30		0
06N - 52P	95	210	60	320	50	400	50	500	50	37
06N - 58P	75	75	70	85	35	170	35	75	35	25

L. p. : Latent period (min.)      B. s. : Burst size

\* Averages of 3-4 experiments for each phage.

菌に型別されている (HIDAKA, 1956)。本報での供試海洋ファージ系の宿主菌にもその方法を適用して、それらの無機塩要求性を型別した。その結果を Table 4 に示した。Table 4 に見られるように、供試菌 06N-21 と 06N-34 は 5 種所定培地の a, b に発育せず, c, d, e に発育する好塩型であった。それらは 3% 程度の NaCl の存在下で発育し得て、必ずしも海水成分中の K-塩, Mg-塩, Ca-塩を要求しない。これに対し、06N-52 と 06N-58 は 5 種所定培地の a, b, c に発育せず, d, e に発育する海洋型の菌であった。それらは発育のために海水中の無機塩組成を要求するものであった。06N-24 は海洋型菌のなかでも、さらに発育のための塩類濃度範囲が狭く e 培地のみに発育した。

(2) 5 種所定培地中での一段増殖実験： 供試海洋ファージ系の宿主菌は 5 種所定培地において Table 4 に掲げられたような発育パターンを示した。5 種所定培地のうち、宿主菌が発育可能な培地についてそれら培地条件下で一段増殖実験を行った。それによって画かれた一段増殖曲線を各ファージ系別に Fig. 7~11 に示した。またそれらの曲線から読みとられた潜

Table 4. Growth extents of host bacteria in five types of defined media. The growth extents indicate the maximum turbidity during 6 days incubation at 25 °C.

Host bacteria	Growth (O.D. X 100) in					Type **
	Five types of defined media *					
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	
06N - 21	0	0	26	15	33	H
06N - 24	0	0	0	0	26	M
06N - 34	0	0	20	14	30	H
06N - 52	0	0	0	44	47	M
06N - 58	0	0	0	34	38	M

\* All types of media (pH 7.6) contain 0.05% of polypeptone and 0.01% of yeast extract and dissolve in following diluents: (a) pure water, (b) 0.5% NaCl solution, (c) 3% NaCl solution, (d) artificial sea water diluted six-fold, (e) artificial sea water.

\*\* H, Halophilic type; M, Marine type

伏期と放出数を Table 5 にまとめた。Fig. 7~11 にみられるように、供試海洋ファージ系の全ては5種所定培地のうちe培地でのみ増殖し、他の培地(c, d)では180分間培養しても増殖しなかった。つまり供試海洋ファージが宿主細胞に吸着・感染し増殖するためには、

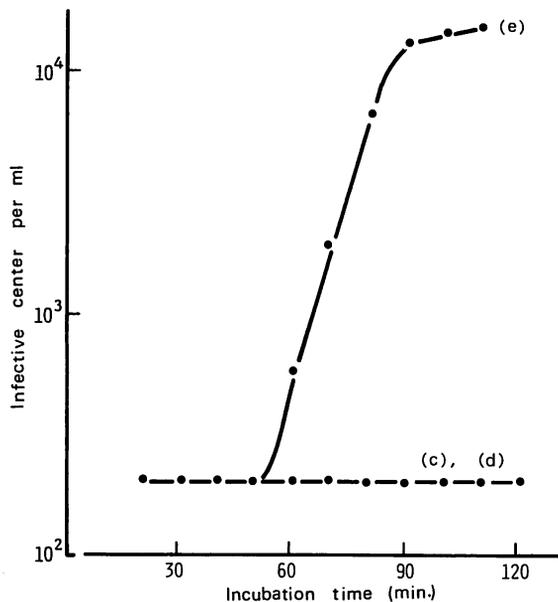


Fig. 7. One-step growth curves of 06N-21P-system in various media changed in mineral composition. Incubation temperature, 25 °C; Host cells, 10<sup>8</sup>/ml; Adsorption time, 20 min.

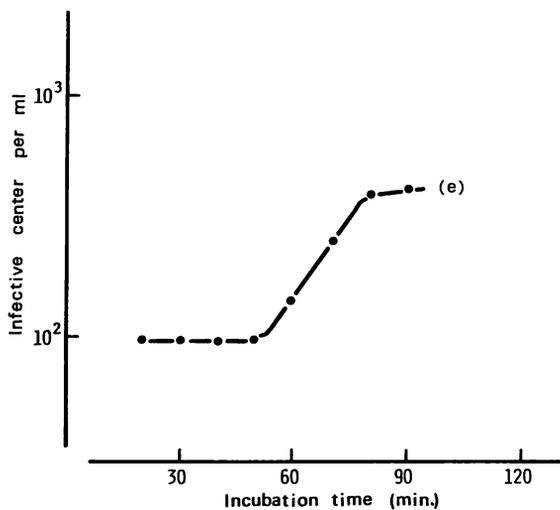


Fig. 8. One-step growth curves of 06N-24P-system in various media changed in mineral composition. Incubation temperature, 25 °C; Host cells, 10<sup>8</sup>/ml; Adsorption time, 20 min.

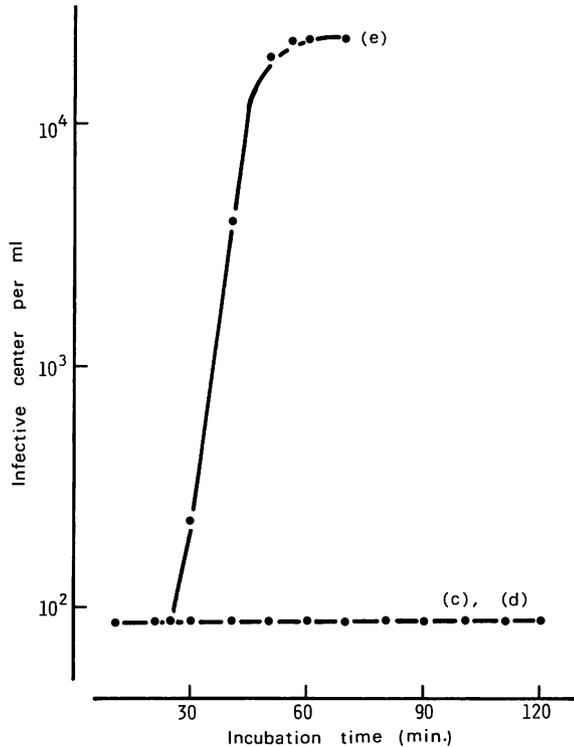


Fig. 9. One-step growth curves of 06N-34P-system in various media changed in mineral composition. Incubation temperature, 25 °C; Host cells, 10<sup>6</sup>/ml; Adsorption time, 10 min.

培地中の無機塩組成は海水の無機塩成分, NaCl, KCl, Mg-塩, Ca-塩などが, 海水と同様な濃度組成にあらねばならないことがわかった。これに対して陸棲ファージ (*Ps. aeruginosa* P など) は 5 種所定培地の b, d で増殖するが, a, c, e 培地では増殖しなかった。これらのことは海洋ファージと陸棲ファージを鑑別する場合, それらの増殖段階における無機塩要求性が重要な指標になり得ることが知られた。また, Table 4 と Table 5 を比較して, 宿主菌の発育における無機塩要求性とファージ増殖の時の無機塩要求性との間に相違がみられた。すなわちファージ増殖における無機塩の要求は宿主菌の発育に対するそれよりも厳しい条件にあると言える。それに関連して一段増殖実験中の吸着率を見ると, 例えば 06N-34P にあっては, 5 種所定培地の c, d, e 培地のうち e 培地に比べ c, d 培地で吸着率がやや低下するが決定的な欠陥ではなかった。それにも拘わらず, c, d 培地でファージが増殖できなかったことは, 吸着後のファージ核酸の注入や菌体内でのファージ増殖過程に, 培地中の無機塩組成が大きく影響しているものと思われる。

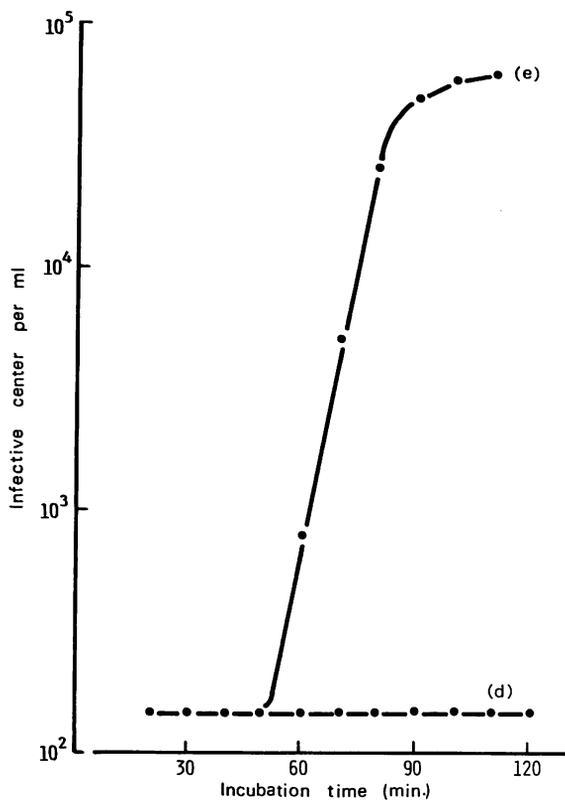


Fig. 10. One-step growth curves of 06N-52P-system in various media changed in mineral composition. Incubation temperature, 25 °C; Host cells,  $10^6$ /ml; Adsorption time, 20 min.

Table 5. Burst size of used phages in various media changed in mineral composition at 25 °C.

Phage	Burst size				
	Five types of defined media				
	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
06N - 21P	/	/	0	0	70
06N - 24P	/	/	/	0	4
06N - 34P	/	/	0	0	220
06N - 52P	/	/	/	0	400
06N - 58P	/	/	/	0	160
<i>Ps. aeruginosa</i> P	0	70	0	120	0

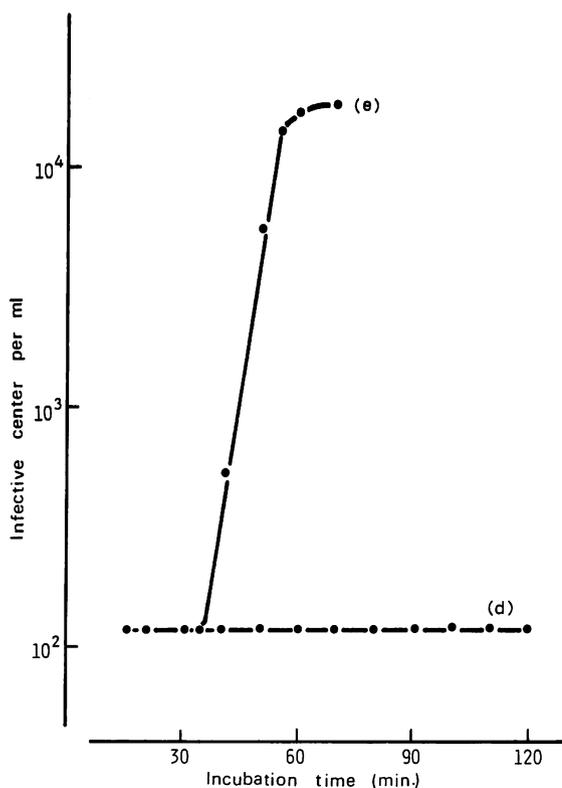


Fig. 11. Ono-step growth curves of 06N-58P-system in various media changed in mineral composition. Incubation temperature, 25°C; Host cells, 10<sup>6</sup>/ml; Adsorption time, 15 min.

### 要 約

供試海洋ファージ系, 06N-21P, 06N-24P, 06N-34P, 06N-52P, 06N-58P の増殖に及ぼす培養温度と培地中無機塩組成の影響について検討した。その結果, 各宿主菌の発育温度域は 17~35°C であり, 発育至適温度は 32°C 付近にあった。これに対し, 各供試ファージの菌体内増殖の温度域は宿主菌発育のそれに比して狭く 25~28°C で, 至適温度は宿主菌のそれより低い 25°C 前後にあった。また, 各宿主菌の発育のための無機塩要求性には差異があり, それを型別すると, 06N-21, 06N-34 は NaCl を要求する好塩型, 06N-24, 06N-52, 06N-58 は NaCl, KCl, Mg-塩, Ca-塩などの海水無機塩成分を要求する海洋型であった。しかしそれらに感染するファージは, 培地中の無機塩成分, NaCl, KCl, Mg-塩, Ca-塩が海水と同様な濃度組成にある時のみ増殖した。このように宿主菌体内でのファージの増殖には, 宿主菌が発育できる温度域や無機塩組成より狭く厳しい条件下においてのみ増殖することが知られた。そして供試ファージの増殖における低温性と, 厳しい海水無機塩要求性は, それらが海洋ファージであることを性格づけていた。

## 文 献

- ADAMS, M. A. (1959): "Bacteriophages", Interscience Publishers, Inc., New York.
- CHAINA, P. N. (1965): Some recent studies on marine bacteriophages. *J. gen. Microbiol.*, **41**, Proceedings XXV.
- ELLIS, E. L. and M. DELBRÜCK (1939): The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.*, **22**, 365.
- ESPEJO, R. T. and E. S. CANELO (1968): Properties of bacteriophage PM2: A lipid-containing bacterial virus. *Virology*, **34**, 738-747.
- ESPEJO, R. T. and E. S. CANELO (1969): The DNA of bacteriophage PM2. Ultracentrifugal evidence for a circular structure. *Virology*, **37**, 495-498.
- JOHNSON, R. M. (1968): Characteristics of a marine *Vibrio*-bacteriophage system. *J. Arizona Acad. Sci.*, **5**, 28-33.
- HIDAKA, T. (1965): Studies on the marine bacteria-II. On the specificity of mineral requirements of marine bacteria. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, **14**, 127-180.
- HIDAKA, T. (1971): Isolation of marine bacteriophages from sea water. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, **37**, 1199-1206.
- HIDAKA, T. (1972): On the stability of marine bacteriophages. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, **38**, 517-523.
- 日高富男 (1973): 新たに分離した海洋バクテリオファージの性状. 鹿大・水・紀要. **22**, 47-61.
- HIDAKA, T. and K. ICHIDA (1976): Properties of a marine RNA-containing bacteriophage. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, **25**, 77-89.
- NAKANISHI, H., Y. IIDA, K. MAESHIMA, and T. TERAMOTO (1966): Isolation and properties of bacteriophages in *Vibrio parahaemolyticus*. *Biken's J.*, **9**, 149-157.
- SKLAROW, S. S., R. R. COLWELL, G. B. CHAPMAN, and S. F. ZADE (1973): Characteristics of a *Vibrio parahemolyticus* bacteriophage isolated from Atlantic coast sediment. *Can. J. Microbiol.*, **19**, 1519-1520.
- SPENCER, R. (1963): Bacterial viruses in the sea. In "Symposium on marine microbiology", 350-365, ed. by OPPENHEIMER, C. H., Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- WIEBE, W. J. and J. LISTON (1969): Isolation and characterization of a marine bacteriophage. *Marine Biol.*, **1**, 244-249.
- ZACHARY, A. (1976): Physiology and ecology of bacteriophages of the marine bacterium *Beneckeana natriegens*: Salinity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 515-422.