

漁場海域における微生物生態系の解析—Ⅱ

琉球島弧周辺海域に常在する

バクテリオファージ系について*¹

日 高 富 男*²

Analytical Research of Microbial Ecosystems in Seawater
around Fishing Ground—II

On a Residentiary Bacteriophage-System in Seawater
around the Ryukyu Island Arc*¹

Tomio HIDAOKA*²

Abstract

The author surveyed the distribution of bacteriophage-systems in seawater at fifteen stations around Amami-O-shima in October 1979, and detected seventeen bacteriophage-systems in the region. One of them, the 9XK-4301 phage-system, was distributed widely there. One year before this investigation, it also had been distributed widely in region around Okinawa. Thus it is clear that the phage-system is a resident in seawater around the Ryukyu Island Arc. The 9XK-4301 phage-system forms clear plaques with diameter in 1.0-1.5 mm. The phage particles consist of a head with a hexagonal outline, about 65 nm in diameter, and a comparatively curved long tail with 8-10 nm width and 180-200 nm length. The 9XK-4301 host strain belong to *Beneckeia campbellii* originally isolated from seawater around the Hawaiian Islands by BAUMANN *et al.* (1971). We can utilize it as a hydrological indicator for the seawater mass of Kuroshio.

琉球島弧周辺海域における陸棚斜面漁場調査の、'78年次調査にひき続き、'79年次調査にも参加して、調査海域の微生物生態系を解析し、それらの知見とその海域の生物生産性や漁場性との関連を追求している。'78年次には沖縄本島南部沖合から宮古・石垣両島近海を経て西表島近海に至る南琉球島弧周辺海域で調査を行ったが、'79年次は北琉球島弧周辺、特に吐喝喇海峡から奄美大島近海を中心に調査した。前報（日高ら、1979）で述べたと同様に、調査海域における微生物生態を、海洋性従属栄養細菌とそれに感染するバクテリオファージ（単にファージとも呼ぶ）との係わりの範囲でとらえた。そして、細菌-ファージ系の宿主特異性の厳しさを利用して、分離ファージ系の宿主菌とファージを相互に鑑別しながら、それらの分布と動態を調べた。その結果、この'79年次調査においても'78年次調査で得られた

*¹ この研究は昭和54年度文部省特定研究経費で行ったものである。

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

知見, すなわち“ある海域の生物生産性や漁場性の程度は, その海域の海水中の細菌細胞数を指標として考えるよりも, その中の細菌-ファージ系の数を指標とする方がより鋭敏, 的確に推測できる”とする見解を再確認しえた. さらに, 今回の調査で得られたファージ系の分布の様相を前年のそれと比較検討するなかで, この調査海域中で時期と場所を異にしながら高い頻度で検出され, この海域に常在すると思われるファージ系を見出しえたので, そのファージ系の性状について報告する.

実験材料および方法

調査海域 この調査は本学練習船かごしま丸に乗船して, 1979年10月11日から10月23日の

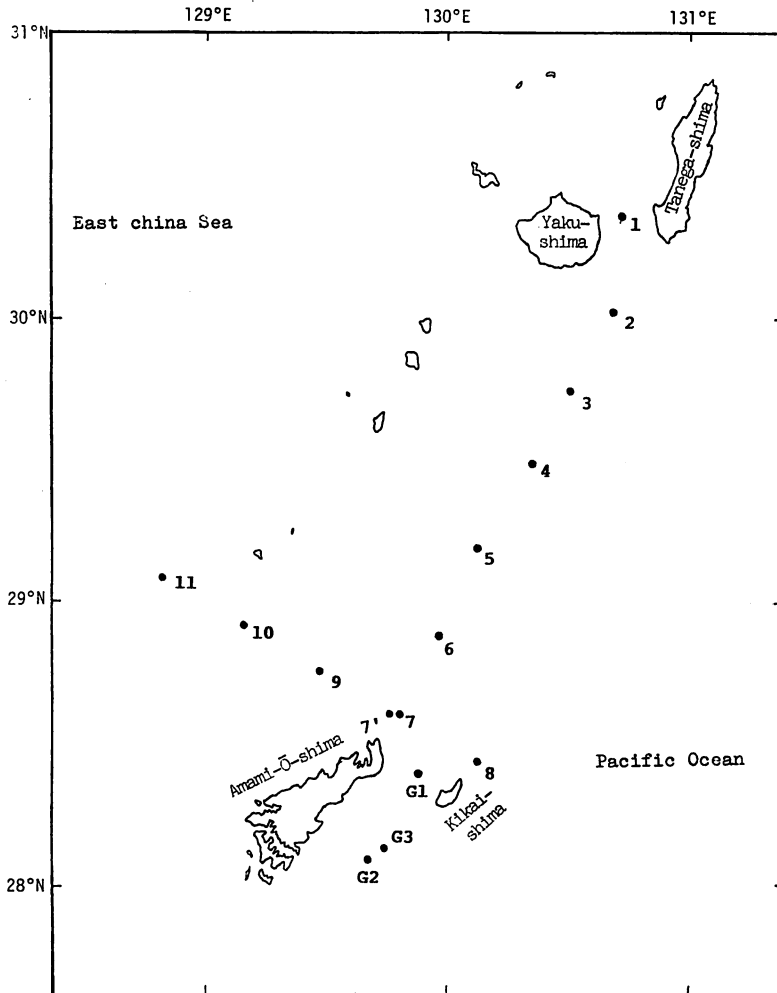


Fig. 1. Map showing the microbiological 9XK-stations.

間に行った。この調査海域における微生物学的調査の定点は他の研究分野—海洋、地質、生物—のそれと同じであって、その定点図を Fig. 1 に示す。また、それら定点の位置および試料採取の日時は Table 1 に表示する。Fig. 1 にみられるように、定点は種子島と屋久島の間中点から奄美大島北部のサンドン曾根を結ぶ線上の St. 1 から St. 7 までの7定点と、その線と St. 7 付近でほぼ直角に交叉する線上の St. 8 から St. 11 までの5定点、および奄美大島、喜界島近辺の漁場調査点の G1, G2, G3 の3定点との都合15定点であった。なお本調査における定点や採取試料および分離物などには 9XK- の符号を付し、'78年次のそれらには 8YK- の符号を付けて区別する。

Table 1. Sampling position, date and time at the microbiological 9XK-stations.

Station No.	Position		Date (in 1979)	Time
	Latitude	Longitude		
9XK- 1	30°22'.8N	130°45'.0E	Oct. 11	19: 06
2	30°01'.6N	130°42'.5E	11	21: 00
3	29°45'.0N	130°30'.4E	12	00: 37
4	29°29'.2N	130°20'.0E	12	04: 07
5	29°12'.5N	130°08'.8E	12	06: 45
6	28°53'.0N	129°58'.1E	12	10: 30
7	28°37'.2N	129°47'.3E	12	13: 55
G1	28°24'.9N	129°54'.0E	12	17: 40
G2	28°07'.1N	129°37'.9E	13	17: 32
G3	28°08'.0N	129°42'.7E	20	18: 15
8	28°27'.0N	130°07'.7E	21	14: 15
7'	28°37'.3N	129°46'.4E	21	19: 10
9	28°45'.9N	129°28'.0E	22	00: 22
10	28°56'.5N	129°07'.9E	22	06: 26
11	29°06'.0N	128°48'.1E	22	10: 05

各調査定点において、水深 50 m 層、100 m 層、300 m 層の3層のうち、その定点の水深に応じて1~3層の海水を、それぞれ J-Z 式採水器によって無菌的に採取して直ちに実験に供した。

調査対象微生物の培養、計数、分離、純化やフェージ感染性などの実験法は前報（日高ら、1979）に記載した通りである。

供試微生物の性状検査 分離フェージ系の宿主菌の細菌学的性状は、常法（HARRIGAN and McCANCE, 1966）によって検査し、その結果を BERGEY's Manual, 8th ed. (BUCHANAN and GIBONS, 1974) に照らして分類学上の位置を決定した。

供試微生物の電子顕微鏡観察 供試フェージ系の宿主細菌の細胞形態およびフェージの粒子構造を検査するために、電子顕微鏡用標本は次のようにして作成した。

宿主細菌細胞は海水培地で培養した幼若培養物を準備し、それに終濃度 5~10% になるように中性ホルマリン液を加えて細菌細胞を固定する。その試料を 3,000 rpm, 15分間遠沈して、上澄液を傾斜して完全に除去し、残った菌体沈澱物を適量の 2% 酢酸アンモニウム水溶液に

再懸濁して菌液とする。この菌液の適量を、カーボン蒸着した支持膜上に滴下して乾燥した後、クロムシャドウイングして標本を作成し、菌形の観察に供した。

一方、ファージについては、まず常法 (ADAMS, 1959) によってファージ増強液を作り、それを高速遠沈して分別したファージ粒子のペレットを、少量の2%酢酸アンモニウム水溶液に再懸濁して濃厚なファージ液 (10^{10-11} pfu/ml) とする。次いで、このファージ濃厚液と2%リンタングステン酸 (KOH で pH 7.2 に調整) との等量混液をカーボン蒸着した支持膜上に滴下し、30-60秒後、試料液を濾紙で適度に吸い取って乾燥し、リンタングステン酸による陰染色標本とする。この標本をファージ粒子構造の観察に供した。

これら標本は、日立製 H-300 型電子顕微鏡によって、加速電圧 75 KV の条件下、細菌細胞形態は5,000倍で、ファージ粒子構造は50,000倍で、それぞれ観察、撮影した。

実験結果および考察

海洋細菌およびファージ系の分布 調査定点の所定水深層から採取した海水に存在する海洋性従属栄養細菌は、寒天平板塗抹培養法によって計数し、海水 1 ml 当たりの細菌細胞数で表わした。また、分離海洋細菌個々のファージ感受性を調べて、海水 1 ml 当たりのファージ感受性細胞 (ファージ宿主細菌細胞) 数として算出した。それらは前者を白棒、後者を黒棒の棒グラフで Fig. 2 に示す。またその図の中には、調査海域の海底地形やそれに因る海況の違いを考えるよすがとして、各定点の深さをも併記する。

Fig. 2 にみられるように、各供試海水中の細菌細胞数はおよそ50以下であった。この数値は、本調査海域である北琉球島弧周辺海域が '78年次調査の南琉球島弧周辺海域と同様に貧栄養域 (吉田, 1973) であることを意味している。各定点における細菌細胞数のこの程度の変動の範囲内において、その鉛直分布をみれば、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のところなど不統一であるが、両層でのそれらには大きな差異は見られない。しかし 300 m 層の細菌細胞数は前2層のそれに比して明らかに減少する傾向がみられる。また、細菌細胞の水平分布についてみれば、St. 1, 2, 3, 8, 7', G1 は他の定点に比して細菌細胞数がやや多い。これらの定点は島に近く、比較的浅いところである。よって、海水中の細菌の増殖に対する主な制限因子である有機物濃度が、幾分高くなっていることが考えられる。St. 7 と St. 7' は奄美大島北方近海のサンドン曽根上のほぼ同じ位置であるが、St. 7 に比して St. 7' の方が細菌細胞数が多くなっている。ところで、この調査期間の中ごろ、10月18日には、この海域は大型台風20号の直撃をうけて、その前後5日間 (10月15日～10月20日) ほど大島海峡薩川湾に避泊を余儀なくされた。St. 7 ではその台風来襲前に試料海水を採取、測定したのに対して、St. 7' のそれは台風通過後に行われたものである。従って両者における細菌細胞数の差異には、時間の経過に伴う変動に加えて、台風の影響をも加わっているものと考えられる。しかし、台風の強力なエネルギーによって、海水の水平、鉛直混合がなされたであろうに、両者の測定値の間にはそれ程大きな差異がみられていない。それは試料海水を採取した深度が 50 m 以深にあったせいか、または、かかる外海にあっては、台風によって荒された海況はその通過後一両日で復元することかも知れない。

次に、Fig. 2 に示されているファージ感受性細胞の分布についてみれば、St. 2, 10 のよう

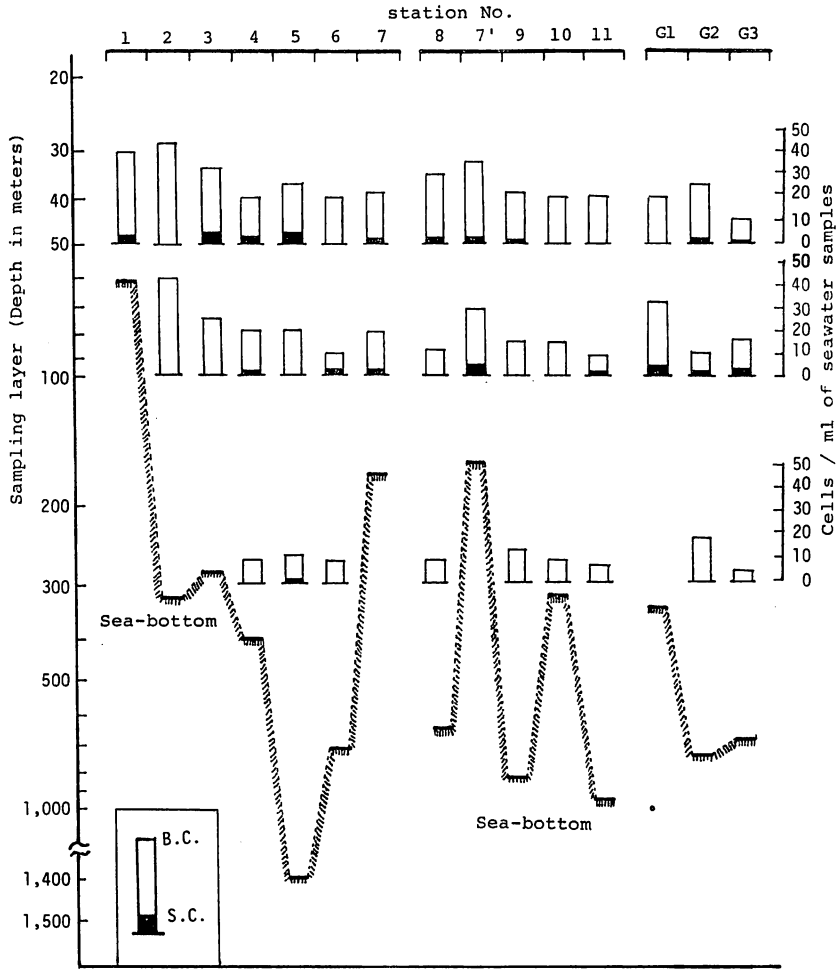


Fig. 2. Number of heterotrophic bacterial cells (B.C.) and phages-sensitive bacterial cells (S.C.) in seawater samples collected from 50 m, 100 m, and 300 m depth layers at the 9XK-stations.

に、細菌細胞数は他の定点よりも多いのに、その中にファージ感受性細胞が見出されないところがあった。このことは、ファージが特異な細菌株の若く活力あふれる細胞に適合して、寄生、増強するものであることを考え合わせれば、海水中の細菌細胞数の多寡とそれら細胞の活力の強弱とは必ずしも相関しない面があることを示唆している。そのような状況がどのような海況下においてひき起こされているかは興味ある問題であるが、本調査で得られたデータだけからは速断しえない。だが、St. 2, St. 10 のいずれもが黒潮の主流内において潮流の速い定点であることが、そのことに対して何らかの意味をもつかもしいと考えている。これらのほかに、同様な海況でのデータの累積が必要である。St. 2, 10 を除く他の定点にあっては、一般に細菌細胞数の多い定点においてファージ感受性細胞数も多い。それは

水深 50 m, 100 m 層では細菌細胞数の約1/5~1/10位である。しかし, 300 m 層では前述のように細菌細胞数も少なく, その中にファージ感受性細胞はほとんど見出されない。

上述のファージ感受性細菌およびその菌を宿主とし感染性をもつファージは, それぞれ分離, 純化され都合 33 系が単離された。それら各分離ファージ系は, それぞれの宿主菌とファージを相互に交叉感染試験し, それらの類似性を調べたところ17系に整理, 統合された。それら17株の代表ファージ系がこの調査海域においてどのような分布を示すかを, それらファージ系の宿主菌の分布でもって Table 2 に示す。Table 2 において, 定点毎にそこに分布するファージ宿主菌を数えてみれば, さきに述べたと同様に, St. 2, St. 10 のようにファージ宿主菌が見出されない定点もあるが, St. 8, 11, G1 からは1株ずつ, St. 1, 3, 4, 6, 9 からは2株ずつ, St. 5, G3 からは3株ずつ, St. 7, G2 からは4株ずつ, St. 7' からは6株が検出されている。ここで St. 7, 7', G2 に他より多くのファージ宿主菌が分布していることには一つの意義が感じられる。それは, 従来から好漁場として知られている曾根付近の定点には, やはり活力あるファージ宿主菌が多種類分布していて, ファージ系の分布の様相は, その場の生物生産性や漁場性との間に相関性があることを物語っている。このことは前年の調査で得られた知見 (日高ら, 1979), すなわち“ある海域の生物生産性や漁場性の程度は, その海域の海水中の細菌細胞数を指標として考えるよりも, その中の細菌-ファージ系の数を指標とする方がより鋭敏, 的確に推測できる”ということを再確認しえたものと言える。

次いで, 同じく Table 2 において, 各ファージ宿主菌株別にそれらの分布をみれば, 多く

Table 2. Distribution of the detected bacteriophage-host strains in seawater at the 9XK-stations.

Isolated phage-host strains	Station No.														
	1	2	3	4	5	6	7	8	7'	9	10	11	G1	G2	G3
9XK-	1214	+													
	1218	+		+											
	3209		+							+					
	3210		+												
	4301*			+	+		+	+	+	+				+	+
	5202				+		+		+						
	5204				+				+	+					+
	6305					+									
	6307					+									
	7206						+							+	+
	7307						+								
	7'221									+					
	7'331									+					
	11302											+			
	G1319												+		
	G2206													+	
	G2207													+	

+; presence

のものはそれが分離された定点だけにその存在が認められる局所的な分布を示している。しかし、なかには2定点あるいは3定点にまたがって分布しているものもみられる。なかんずく9XK-4301 フェージ宿主菌は、8定点もの広域にその存在が認められて、このフェージ宿主菌がこの海域に常在するものであることを思わせる。そこで前年度の南琉球島弧周辺海域から分離されたフェージ宿主菌の中に、この菌と同種のものがあるかどうかを追跡したところ、やはりその海域の多くの定点から、同種のフェージ宿主菌が分離されていたことがわかった。それら2年次にわたる調査結果のなかで、その常在フェージ系の宿主菌9XK-4301菌の琉球島弧周辺海域での分布の様相をとりまとめて図示すれば、Fig. 3の如くである。図中において○印は'79年次調査の定点で、◎印は'78年次調査の定点である。また旗印を付した定点は調査時に当該フェージ宿主菌が分離されたことを示す。Fig. 3にみられるように、約1ヶ年間の時が経過し、場所を異にしながら多くの定点でこのフェージ宿主菌が見出されている。それは、このフェージ系がこの海域にひろく常在する典型的な海洋フェージ系であ

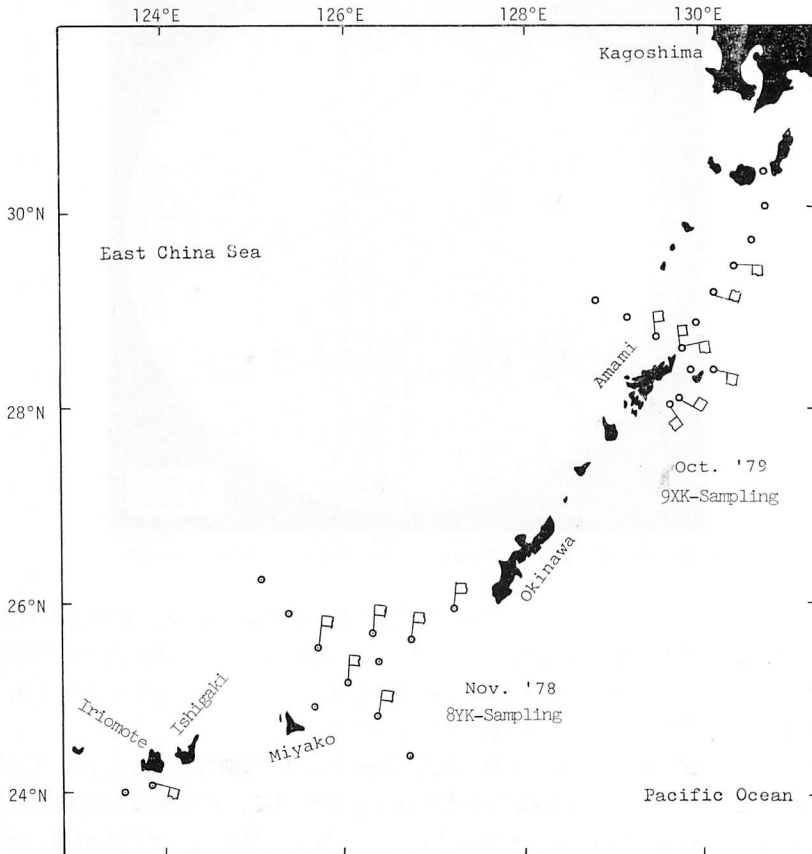


Fig. 3. Appearance of a residential bacteriophage-system in the seawater around the Ryukyu Island Arc. ◎, 8YK-station; ○, 9XK-station; Flag mark, presence of the bacteriophage-system.

ることを意味する。このフェージ系は琉球島弧から遠く距った定点よりも、むしろそれに沿った定点で多く分離されている傾向がみられる。なお、他の分離フェージ宿主菌についても、前年の分離フェージ系と比較しながらそれらの分布状態を検討中であるが、本報ではこの海域に常在すると思われるフェージ系の一つ、9XK-4301 フェージ系のみの記事にとどめる。

常在フェージ系の性状 調査海域に常在する 9XK-4301 フェージ系について、宿主菌へのフェージ感染によって形成される溶菌斑の形態、あるいは宿主菌やフェージのそれぞれの一般性状は次のごとくである。

まず、この 9XK-4301 フェージは二重寒天平板法 (ADAMS, 1959) によって、Fig. 4 に示すような溶菌斑を形成する。それは直径 1.0~1.5 mm の円形、透明で輪郭のはっきりした溶菌斑である。

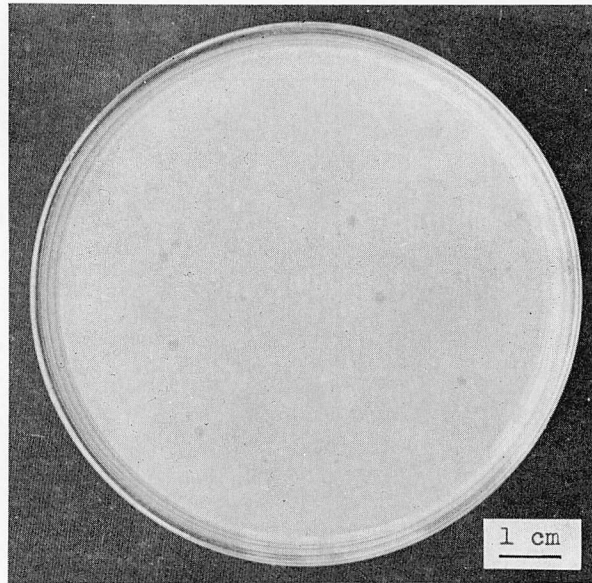


Fig. 4. Plaque morphology of the 9XK-4301 phage system.

次いで、この 9XK-4301 フェージの粒子構造を電子顕微鏡で観察、撮影した写真を Fig. 5 に示す。Fig. 5 にみられるように、このフェージは径 65 nm の外観六角形の多面体をした頭部と、巾 8~10 nm、長さ 180~200 nm の非収縮性の尾部とからなる構造である。この長い尾部は特徴的に湾曲し、その末端は裂状がうかがえる。

このフェージ系の宿主菌、9XK-4301 菌は、Fig. 6 の電子顕微鏡写真および Table 3 の記載にみられるように、グラム陰性の単極毛を有する短桿菌で、典型的な海洋細菌の性格を備えた菌である。さらに、Table 4 に示すように、この菌の生理・生化学的性状は、oxidase 陽性、グルコースを発酵的に代謝し、2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine (vibrio static compound, 0/129) および novobiocin に感受性など、BERGEY'S Manual, 8 版の鑑別指標に照らして、Genus *Vibrio* に属する菌株だと思われる。Genus *Vibrio* には 5 菌種が記載され

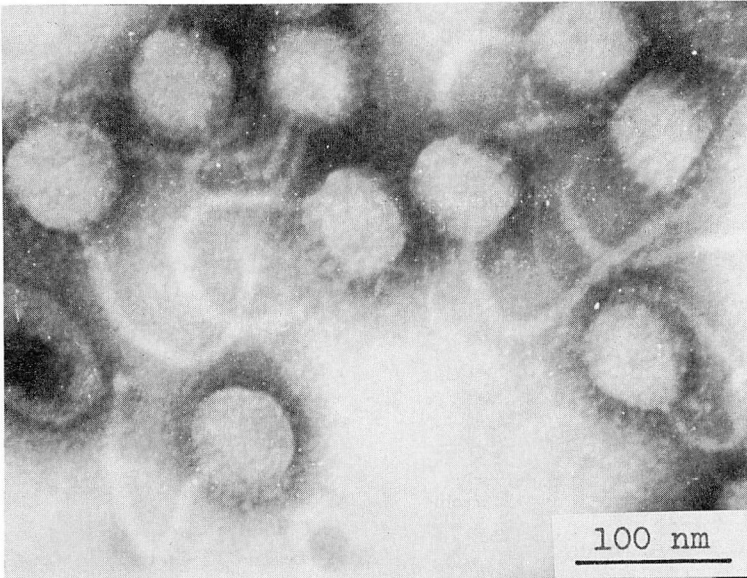


Fig. 5. Electron micrograph of the 9XK-4301 phage particles negatively stained with phosphotungstic acid. $\times 200,000$

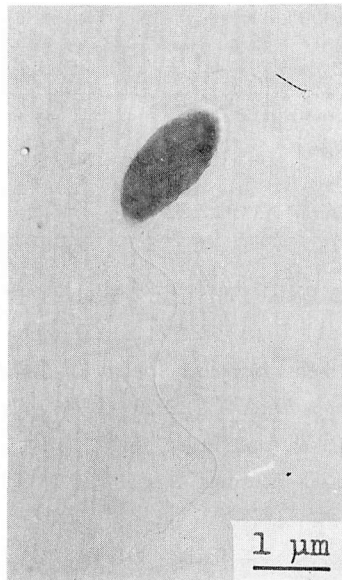


Fig. 6. Electron micrograph of the 9XK-4301 host bacterium cell. $\times 10,000$

ているが、そのうちの *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, *V. fischeri* のいずれかに属する菌株であるがその決め手が弱い。そこで、細菌-フェージ系の宿主特異性の厳しさを考えて、この 9XK-4301 フェージを、*Vibrio* 属菌およびそれに関連する菌種の標準菌株に感染

Table 3. Morphological and cultural characters of the 9XK-4301 host bacterium.

Cell form	Rod
Gram's stain	—
Flagellation	Monotrichous (polar)
Diffusible pigment	—
Luminescence	—
Growth without added NaCl	—
Growth in 7.0% NaCl	+
Growth in 10.0% NaCl	—
Growth at 5°C	—
Growth at 37°C	—
Growth at 42°C	—
Relation to oxygen	Facultatively anaerobic

+, positive; —, negative

Table 4. Physiological characters of the 9XK-4301 host bacterium.

Kovacs oxidase	+
Hugh & Leifson test	Fermentative
O/129 sensitivity	+
Novobiocin sensitivity	+
Arginine dihydrolase	—
Lysine decarboxylase	—
Ornithine decarboxylase	—
Methyl red test	—
Voges-Proskauer test	—
Indole production	—
H ₂ S production	—
Nitrate reduction	+
Gelatin liquefaction	+
Casein hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Chitin hydrolysis	+
Tween 80 hydrolysis	+

+, positive; —, negative

Table 5. Sensitivity of vibrio and related bacteria to the 9XK-4301 phage.

Bacteria	Strains	Sensitivity
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	33	—
<i>V. anguillarum</i>	18	—
<i>V. fischeri</i>	5	—
<i>Beneckea compbellii</i> ATCC 25920	1	+

せしめ、その感受性の有無から 9XK-4301 菌との類縁菌を検索した。そのフェージ感染試験の結果を Table 5 に示す。Table 5 に記載されている *Vibrio parahaemolyticus* 33 株、*V. anguillarum* 18 株、*V. fischeri* 5 株、*Beneckea compbellii* 1 株のうち、結果的にみて、9XK-4301 フェージは *Beneckea compbellii*, ATCC25920 のみに感染し、他の菌株への感染は認められない。*Beneckea* は Genus *Vibrio* に類以の菌属であるが、type の設定がなく分類学的に不明確な菌属として、BERGEY'S Manual, 8 版にはとりあげられていない菌属名である。フェージの宿主特異性から考えて、同一フェージに感受性をもつ 2 つの菌株は strain レベルで近縁なものであると思われる。よって 9XK-4301 菌は *B. compbellii* ATCC 25920 に近縁の菌株であることが知られる。*B. compbellii* は BAUMANN ら (1971) によってハワイ諸島海域の定点 20°30' N : 157°30' W の海水から分離されたものであり、その細菌学的性状は 9XK-4301 菌のそれとよく一致している。従って、琉球島弧周辺海域に常在する 9XK-4301 フェージ系は、さらに広い北太平洋の北赤道海流から黒潮に至る流域に常在する可能性が考えられる。

このように、9XK-4301 菌，*B. compbellii*，を宿主とするファージ系が黒潮流域ばかりでなく，その源流にさかのぼって常在するファージ系の一つであってみれば，このファージ系を指標とすることによって，黒潮の流路や流域など黒潮水塊の水理的動態を察知しうるものと考えられる。

要 約

本調査海域，北琉球島弧周辺海域は，その各調査定点における海水中の細菌細胞数の測定結果から，'78年次の調査海域，南琉球島弧周辺海域と同様に貧栄養海域であることが知られた。また本調査において，前年の調査で得られた知見，すなわち“ある海域の生物生産性や漁場性を推測する指標としては，単にその海水中の細菌の分布の多寡よりも，ファージ系の分布の動態をとらえることの方がよりの確である”ということを再確認し得た。次に本調査海域に広く分布するファージ系を認めたが，これと同種のものが'78年次の調査海域にも広域に分布していたことが知られた。このファージ系はこの海域で時期と場所を異にしながら高い頻度で検出されるものであり，琉球島弧周辺海域に常在するファージ系であると思われる。このファージ系の宿主菌は，*Beneckea compbellii* に近縁の菌株であり，よって，このファージ系は *B. compbellii*-phage と言える。このファージ系の溶菌斑は径 1~1.5 mm の円形，透明である。またそのファージ粒子構造は，径 65 nm の外観六角形をした多面体の頭部と，巾 8~10 nm，長さ 180~200 nm の尾部からなり，尾部は特徴的に湾曲している。このファージ系が黒潮海域に常在するものであれば，このファージ系を指標として，黒潮の流路や流域など黒潮水塊の水理的動態を追求しうるものと考えられる。

謝 辞

この特定研究の計画・実施にあたって多大の御尽力，ご援助をいただいた研究代表者の高橋淳雄教授をはじめ，共同研究者や，かごしま丸乗組員の各位に深甚の謝意を表します。また試料採取に手助けをいただいた学生，角野秀己，崎田勲の両君に厚く御礼申し上げます。

文 献

- ADAMS, M. A. (1959): "Bacteriophages", Interscience Publishers, Inc., New York.
- BAUMANN, P., L. BAUMANN and M. MANDEL (1971): Taxonomy of marine bacteria: the Genus *Beneckea*. *J. Bacteriol.* **107**, 268-294.
- BUCHANAN, R. E. and N. E. GIBONS (1974): "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed." The Williams and Willkins Co. Baltimore.
- HARRIGAN, W. F. and M. E. McCANCE (1966): "Laboratory Method in Microbiology", Academic Press, New York.
- 日高富男・河口貴史・白浜真之 (1979): 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. 鹿大・水・紀要, **28**, 47-55.
- 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.