2. 海洋微生物*

徳田 廣**

はじめに

「一滴の海水にも何百何千という生命が宿っている」ということは、海の豊饒さを語るさいにしばしば引用される決まり文句である。ここでいう生命とは、おもに海洋微生物を指していると解釈されるが、動植物プランクトンのもとより、海産動植物の卵・精子や孢子までも、ときには一滴の海水に含まれているのである。微生物とはビールスやリケッチャは特異な例としても、一般に細菌類、菌類、酵母類などを指すが、海洋微生物という場合は、これらのほかに、微細藻類、植物プランクトン、微視的な動物プランクトンをも含めて考えるのが妥当であろう。本稿では、このような広い意味での海洋微生物を取扱っていきたいと思う。

ところで、混合培養 (mixed culture) の意味についてもひとこと触れておきたい。2種類以上の微生物が同じ培養器内で培養されている状態が混合培養である。したがって、1種類の浮遊性海産珪藻を培養していても、無菌培養 (bacteria free culture もしくは axenic culture) でなく、細菌が混在していれば混合培養であり、この場合厳密には有菌培養 (bacterized culture) もしくは単藻種培養 (uni-algal culture) といっている。一方、細菌だけの培養であっても、何種類かの細菌が、また微細藻類が無菌状態でも数種類が、それぞれひとつの培養器で培養されていれば、もちろん混合培養といえるわけである。

1. 試料の採集

海水を採取するためには採水器を用いるのがふつうであるが、水質分析用採水の場合とは異なり、採水器の内壁が金属製のものをを用いてはならない。採水時に痕跡的ながら溶出する金属が、試水中の微生物に悪影響を与え

るからである。現在、海洋微生物用採水器として、内壁のみが、あるいは全体がプラスチック製のもの、総ゴム製のもの、さらに滅菌可能なものなどが市販されている。ラフな実験目的ならば、採水器を事前に滅菌しておく必要がないようにも思えるが、採水器を保管している間に、陸産あるいは淡水産の微生物、とくに微細藻類のクロレラ、セネデスムス、クラミドモナス、ラン藻 (土埃りの中によく混っている) などが付着し、採水時に試水中に混入してくると、海水培地でもこれらの藻類が増殖しうることが多く、実験に支障をきたすことがある。したがって、常に滅菌済みの採水器を使用すべきである。タイドプール水や表層水を採取するときは、滅菌済みの瓶で直接汲んで差支えない。

プランクトンを採集するには、海水とともに採取してもよいが、プランクトンネットを用いるのがふつうである。このネットには、一応動物用、植物用といって、ネットの目の細かさに違いがあるが、目的に合ったネットを選ぶことが必要である。特定のプランクトン、たとえば赤潮プランクトンを採取しようとする場合、関東以西の沿岸域ならば、常時採水したり、ネットを引けば、他のプランクトンや微生物とともに赤潮プランクトンの採集が可能であるが、赤潮発現場で採水すれば、ほぼ単一の組成の試料が得られ、その後の分離、培養の実験がやりやすくなる。したがって、特異的な生物活性を示す微生物を採集する場合には、その微生物が大量発生している現場を見つけることがコツになるわけである。

浅海の海底には、さまざまな付着生物や底生生物が生息し、また海水中から動植物の死がいや有機懸濁物が沈降していくため、底質中には数・種類ともに非常に多くの微生物が生存している。この底質の採取は、採泥器を用いるが、やはり陸・淡水起源の微生物の混入を防ぐ意味から、滅菌可能な構造をしているものが望ましい。滅菌したガラス管 (直径1cm、長さ30cm) を挿入し、重力を利用した簡単な手動コアサンプラーなども市販されているので、利用されると便利であろう。

* 昭和48年6月11日受理

** Hiroshi Tokuda 東京大学農学部 水産学科

2. 試料の運搬・保存

採取した試料は滅菌した瓶につめ、研究室に持ち帰るわけだが、ネットで採集したプランクトンなどは、密度が高すぎて、運搬途中で死ぬことがよくあるので、瓶に入れたら自然海水でよく希釈しておく。運搬中は試料瓶が高温に曝されないよう、アイスボックスその他の容器に入れておかなければならない。とくに生菌数測定用に試料を用いようとする場合は、運搬中試料を 0~4℃ に保つように注意しなければならない。

採集現場から研究室まで 1 日以上もかかる場合、低温下に試料を維持することは非常にむずかしいので、現場近くの学校の理科室や水産試験所の研究室を借りて分離や培地への接種などの処理をしてから、高温に曝されないように運搬したほうが無難である。

研究室に持ち帰った試料は、できるだけ早く実験に使ったほうがよいが、冷暗所（4℃ 前後）に保存しておけば、ひと月近く保存がきく、ただし保存した試料では、微生物相が採取時よりかなり変化していることを考慮しておいていただきたい。

3. 分離と培養

いよいよ研究室で培養ということになっても、天然海水中の微生物相をそのまま培養器中で維持しようとするのは、まずもって至難の術である。自然の海とは異なり、培養器では海水の体積に対する器壁の表面積が大きすぎ、塩ビやアクリル製のものはもとより、ガラス製培養器をもってしても、海水中に溶存する痕跡的な栄養素の吸着が器壁によって生ずるため、培養器中では海水の化学組成に微妙な変化をきたす。また水温はうまく調整できても、海におけるような波による搅拌現象は、振とう装置や通気装置を用いても再現不可能である。すなわち、天然の化学的、物理的条件を培養では再現できないわけである。したがって、ある条件下で培養すれば、必然的にその条件に適した微生物のみが増殖し、淘汰が行われてしまう。そこで、はじめから実験目的に沿って、対象とする微生物を分離しておいたほうがよいわけである。

3・1 微細藻類・植物プランクトンの分離と培養

試水もしくはネットで集めた試料を、遠沈もしくは海水の添加によってプランクトンが適当な密度になるように濃縮あるいは希釈し、顕微鏡下でガラス毛细管（キャピラリー）を使って吸い上げ、1細胞もしくは1群体ずつ、2, 3 ml の培養液を入れた試験管に入れていく。手際よくやるには熟練が必要だが、1, 2 か月も訓練すれ

ば結構上手になる。温度 20℃ 前後、照度 4,000 lux 前後で培養すると、7~10 日間で培養液がプランクトンの増殖によって、緑色や茶褐色に色づいてくる。

これを 50 ml ないし 100 ml の培養液に移し、そこでも増殖したら、さらに多量の培養液に移してやり、本格的な培養を行なうわけである。分離の際に培養液を少量にし、増殖したら培養液の量を徐々に増してやるのがコツである。1 l もの培養液に数細胞の植物プランクトンを植えても、まず生えてこない。

分離の今一つの方法は、培養液に 1.2% 程度の寒天を入れて平板培地を作り、ひと晩 37℃ で寒天表面の余分な水分を除いてから、寒天表面に 0.1 ml の試水を滴下し、先端をシリコンコーティングして撥水性をもたしたガラス棒でよく寒天表面上に広げた後、20℃、4,000 lux 前後で培養すると、7~10 日後植物プランクトンや微細藻類のコロニーが形成されてくる。顕微鏡下で確かめながら、目的の種類を白金耳でとり、2.3 ml の培養液に懸濁させ培養を行なう。しかしこの方法では、寒天表面上では限られた種類しか増殖できないので、すべての植物プランクトンや微細藻類に適用できるわけではない。

植物プランクトンや微細藻類の培養を大量（1 l 以上）に行なうと、少量（100 ml 以下）の場合よりもどうしても細胞密度が低くなる。この原因はまだ明確にされていないが、珪藻の培養では、培養液に 1~5 mg/l の Na₂S を添加することにより、密度を高めることができる。

培養法には、いくつかの方法がある。まず静置培養（stagnant culture）法というのは、培養器を静置しておくやり方で、1 日に数回手で培養器をゆっくり振り、搅拌してやる方法である。赤潮生物や中心珪藻（centric diatom）では、この方法でないと増殖しない種類が多い。通気培養（aerating culture）法というのは、ポンプによって空気もしくは 5% 程度の炭酸ガスを混入した空気を培養器中に送り、培養液を搅拌すると同時に、光合成に必要な CO₂ 源を供給する方法。振とう培養（stirring culture）法は、培養器を水平方向や円周方向に振とうして培養するやり方。海産クロレラや羽状珪藻（pennate diatom）などは、通気もしくは振とう培養法でよく増殖する。

3・2 動物プランクトンの分離と培養

動物プランクトンの分離も植物プランクトン同様、ガラス毛细管で試水より個体ごとにピックアップしてやらなければならない。しかし植物プランクトンより個体が大型のものが多いため、非常にやりやすい。動物プランクトンの分離を習得してから植物プランクトンを扱うほうが容易であろう。

動物プランクトンの培養基質には、天然海水を濾過したもの、あるいは人工海水を用いればよい。培養器に

海洋微生物用の培地および培養液一覧

a) SWII medium¹⁾

filtered sea water	1,000 ml
KNO ₃	72.2 mg (=10 mg N)
KH ₂ PO ₄	4.5 mg (=1 mg P)
Na ₂ glycerophosphate	10.5 mg (=1 mg P)
Fe-EDTA (1:1 chelation)	0.5 mg (as Fe)
Tris buffer	500 mg
pH	8.0-8.2

〔注〕 海産藻類用補強海水培養液で、1.2%の寒天を添加すれば、寒天培地を調製できる。

b) ASP 2 medium²⁾

NaCl	1.8 g	Mn (as Cl ⁻)	0.12 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	Co (as Cl ⁻)	0.3 μg
KCl	0.06 g	Cu (as Cl ⁻)	0.12 μg
Ca (as Cl ⁻)	10 mg	B (as H ₃ BO ₃)	0.6 mg
NaNO ₃	5 mg	Tris buffer	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.5 mg	B ₁₂	0.2 μg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	15 mg	Vitamin Mix S3*	1.0 ml
Na ₂ -EDTA	3.0 mg	H ₂ O	100 ml
Fe (as Cl ⁻)	0.08 mg	pH	7.6-7.8
Zn (as Cl ⁻)	15 μg		

* One ml of Vitamin Mix S3 contains: thiamine HCl, 0.05 mg; nicotinic acid, 0.01 mg; Ca pantothenate, 0.01 mg; p-aminobenzoic acid, 1.0 μg; biotin, 0.1 μg; inositol, 0.5 mg; folic acid, 0.2 μg; thymine, 0.3 mg

〔注〕 海産藻類用人工海水培養液で、赤潮プランクトンの培養に適している。

は、通気や振とうを行わず、静置しておけばよい。しかし水温は20℃前後を保つように注意しなければならない。動物プランクトンでもっとも培養しやすいのは、通称アカコベ (*Tigriopus japonicus*) といっている橈脚類 (*Copepoda*) の一種である。餌として食べた藻類中のカロチノイドのため体色が赤く、糸状の細いアノリ (*Enteromorpha prolifera*) が生えているタイドプールによく生息しているので、採集も簡単である。またブラインシュリンプ (brine shrimp, *Artemia* sp.) は、熱帯魚の餌としてその乾燥卵が市販されているが、その卵を海水に入れて通気してやると、2、3日後にはふ化する。これを静置培養に移してやるのも一法である。

培養している動物プランクトンには、当然餌を与えないといけないが、細菌、酵母、あるいは植物プランクトンを与えてやる。

3.3 細菌・酵母・菌類の分離と培養

これらの微生物を混合培養するには、それぞれに適した培養液を試料に添加し、20℃前後で培養してやればよい。プランクトンとは異なり、通気や振とうを行なった方が、高密度な培養が得られるのは当然である。

酵母だけあるいは細菌だけを培養したい場合は、やはりはじめに分離操作を行わなければならない。陸もしくは定温動物起源の微生物の分離に混釈法 (agar pour method) といって、固まる寸前の寒天培地と試料とを

c) ASP 12 (NTA) medium¹⁾

distilled water	100 ml	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	15 mg
NaCl	2.8 g	B ₁₂	0.02 μg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.7 g	biotin	0.1 μg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.4 g	thiamine	10 μg
KCl	0.07 g	P11 metals*	1 ml
Ca (as Cl)	40 mg	SII metals**	1 ml
NaNO ₃	10 mg	Tris buffer	0.1 g
K ₂ PO ₄	1.0 mg	nitrilo-	
Na ₂ glycerophosphate	1.0 mg	triacetic acid	10 m
		pH	7.8-8.0

* One ml of P11 metals contains: EDTA, 1mg; B (as H₃BO₃), 0.2 mg; Zn (as Cl), 0.005 mg; Fe (as Cl), 0.01 mg; Mn (as Cl), 0.04 mg; Co (as Cl), 0.001 mg

** One ml of SII metals contains: Br (as Na), 1.0 mg; Rb (as Cl), 0.02 mg; I (as K), 0.001 mg; Sr (as Cl), 0.2 mg; Li (as Cl), 0.02 mg; Mo (as Na), 0.05 mg

〔注〕 海産藻類用人工海水培養液で、広い範囲の菌類に適用できる。

d) 2216 E (modified) medium¹⁾

Peptone	5.0 g
Yeast extract	1.0 g
Glucose	5.0 g
Ascorbic acid	0.1 g
FePO ₄	0.01 g
(Agar	15 g)
75% sea water	1000 ml

〔注〕 もっともよく用いられている海洋微生物用培地で、寒天を除けば液体培地となる。

e) Medium for Yeast, filamentous Fungi¹⁾

Glucose	20.0 g
Yeast extrac.	1.0 g
Nutrient agar (Difco)	23.0 g
Agar	2.0 g
Sea water to	1000 ml

For isolation use Chloromycetin (100 mg/l)

f) Medium for Marine Lower Fungi¹⁾

Glucose	1 g
Gelatin hydrolysate (NBC)	1 g
Liver extract (NBC)	0.1 g
Yeast extract	0.1 g
Sea water	1000 ml

For isolation, add 0.5 g of streptomycin sulfate and 0.5 g of penicillin G

〔注〕 寒天を1.2~1.5%添加し、平板培地を調製できる。

g) Medium for Petroleum Oil¹⁾ decomposing Bacteria

(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	10 mg
Yeast extract	5 mg
EDTA	10 mg
Petroleum Oil	100-200 mg
pH	8.1

〔注〕 石油分解菌の分解能を調べるために考案された培養液であるが、1.2~1.5%の寒天を添加し、石油分解菌分離用平板培地として用いることができる。

シャーレ内で混和する方法は、海洋微生物には適用しないほうが無難である。これは、海産のものは一般に熱に弱いためである。

ふつうは、あらかじめ寒天培地を調製しておき、その表面に試水を0.1 ml 滴下し、植物プランクトンの項で述べたと同様、ガラス棒で試水を丁寧に広げた後培養する方法 (spread agar plate meth.) がとられている。接種後数日すると、微生物のコロニーが現われてくるから、顕微鏡で確めながら白金耳で釣り上げ、液体培地や

寒天培地に移してやる。

海洋微生物独特の培養法に、メンブランフィルター法 (membrane-filter meth.) というのがある。沿岸水では 1 ml 中に $10^4 \sim 10^6$ 細胞もの微生物が含まれていることは稀ではないが、太平洋の真中などのような、oceanic な環境では、微生物密度はひじょうに低く、 $100 \sim 1,000$ ml 中に数細胞ということがある。こうした場合、メンブランフィルター (小孔の平均直径 $0.2 \sim 0.45 \mu$) で適当量の海水を汙過して微生物をフィルター上に集め、あらかじめ調製しておいた寒天培地上にこのフィルターを貼り付け、培養する方法がとられている。

いずれの微生物を培養するにしても、海洋性のものは採集時から培養終了時まで、高温に曝さないようにすることが肝要である。微生物の培養を 37°C で行なうのは、人間や家畜起源のものについてのみであり、海洋微生物に適用すると、とんでもないみじめな結果に終ることを銘記しておいていただきたい。

4. 培地・培養液

海洋微生物用の培地や培養液には、培養の目的によ

り、さまざまな処方のあるものがあるが、一般によく用いられている代表的な組成をいくつか紹介しておこう (前ページの別表参照)。基質として用いられる海水は、採水後少なくとも 3 か月以上、できれば 6 か月以上暗所に保存しておいたものを用いる。

引用文献

- 1) Iwasaki, E.: The life cycle of *Porphyra teneta* in vitro. Biol. Bull., 121, 173 (1961)
- 2) Provasoli, L., J. J. A. McLaughlin and M. R. Droop: The development of artificial media for marine algae. Arch. Mikrobiol., 25, 392 (1957)
- 3) Gunkel, W. and C. Oppenheimer: Symp. Mar. Microbiol. (ed. C. Oppenheimer, Charles C. Thomas Publisher), 677 (1963)
- 4) Personal communication via S. F. Meyers, University of Miami
- 5) Fuller, M. S., B. E. Fowles and D. J. McLaughlin: Occurrence of *Phythium* sp. on the marine alga *Porphyra*. Mycologia, 56, 745 (1964)
- 6) Miget, R. J., C. H. Oppenheimer, H. I. Kator and P. A. LaRock: Microbial degradation of normal paraffin hydrocarbons in crude oil. In "Proc. Joint Conf. Prev. Contr. oil spills" by API and FWPCA, 327 (1969)

3. バクテリオファージ (Bacteriophage)*

永井 史郎**

はじめに

絶対寄生によってのみ自己増殖するのがファージであり動植物に寄生するものをビールス (virus)、細菌類に対するものをバクテリオファージ、簡単にファージ (phage) という。ファージには DNA 2 本鎖ファージ (T2 ファージ)、テンプレート・ファージ、DNA 1 本鎖、RNA 1 本鎖ファージなどが存在するが、ここでは RNA 1 本鎖ファージの一種である MS2 ファージと寄主である雄株の大腸菌 (*Escherichia coli*) C 3000 についての二、三の実験例を紹介する。

1. MS2 ファージと大腸菌

ここでのファージの生活サイクルを図 1 に示す。大腸菌の線毛 (pilus) に吸着したファージ (1 本鎖 RNA (分子量 10^6) が外套タンパクで包まれている) は外套タンパクを外部に残し RNA だけ細菌細胞内に侵入する (A, B)。また線毛は雄株の大腸菌にのみ存在し、大腸菌の一世代のある時期にのみ生成し老化した細菌では脱離する。つぎにファージ RNA が侵入すれば寄主細菌の DNA, RNA レベルの反応は停止し、ファージ RNA を主体にした反応、つまりファージ RNA 合成のための酵素 RNA ポリメラーゼを生成し、自己 RNA の複製を開始する (C)。さらに自己の外套タンパク、また外套タンパク (coat protein) とファージ RNA を

* 昭和 48 年 5 月 21 日受理

** Shiro Nagai (正会員) 東京大学 応用微生物研究所