海洋細菌の無機塩要求性に関する生理学的研究—I

溶菌防御に要求される最小塩類濃度

大工勝信・藤田八束・絵面良男・坂井 稔

(1975 年 10 月 3 日受理)

Physiological Studies on the Inorganic Salt Requirements
of Marine Bacteria—IMinimum Salt Concentration in the Cell-suspension
Required to Prevent LysisKatsunobu DAIKU^{*1}, Yatsuka FUJITA^{*2}, Yoshio EZURA^{*1},
and Minoru SAKAI^{*1}

No clear-cut criteria for the discrimination of marine bacteria obtained from marine isolates have been found as yet. HIDAOKA (1964, 1965), HIDAOKA and SAKAI (1965, 1968) divided many isolates into the following three types: M-type (marine type, which requires Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} for growth and scarcely grows at 37°C), H-type (halophilic type, which requires only Na^+ for growth) and T-type (terrestrial type, which seemingly needs no addition of salt for growth and grows well at 37°C). Subsequently, the present authors subdivided H-type into MH-type (marine halophilic type, which scarcely grows at 37°C) and TH-type (terrestrial halophilic type, which grows well at 37°C), and considered M- and MH-types to be marine bacteria, the M-type especially representing true or specific marine bacteria, and TH- and T-types as terrestrial bacteria. This study was undertaken to demonstrate the theoretical basis of this typing method and the validity of its criteria to discriminate between marine bacteria and non-marine bacteria. The type-specificity of the inorganic salt requirement among the four types was studied by physiological and biochemical investigations.

First, in order to prepare cell-washing and cell-suspending solutions without any excess of salt, the minimum salt solution required to prevent lysis was studied in this paper. Lysis was observed by the decrease of turbidity (O. D. at $610\text{ m}\mu$) in cell suspensions and by the leakage of U. V. absorbing materials (O. D. at $260\text{ m}\mu$) from cells. The results showed that lysis of M-type was not prevented in any NaCl and KCl solutions, and 21.6%~26.2% ASW (modified Herbst's artificial sea water) was determined as the minimum salt solution to prevent lysis. Lysis of the MH-type was prevented in 2.16%~2.40% NaCl solution, and that of the TH-type was prevented in 0.99%~0.86% NaCl solution, respectively. T-type, however, did not lyse even in distilled water. It was suggested that M-, MH-, TH- and T-types each require a type-specific salt not only for growth but also for lysis prevention.

*¹ 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan)

*² 現住所上野製薬研究所 (Present Address; Food Additive Section Research Laboratory, Ueno Chemical Industries, Ltd., 85, Shimoichiba, Itami, Japan)

微生物環境としての海水環境は、その特異的な塩類の組成と濃度、比較的高い浸透圧と pH 値、希薄な有機物濃度、低い温度、水深と共に高まる水圧、その他多くの点において陸・淡水環境とは著しく異っているが、海洋と陸・淡水の間には地勢上および気象上の諸要素のみならずその他の種々な媒介物により絶えず微生物の移動・交換が行われており、陸・淡水由来菌によりすでに分類上の位置・定義が明確にされている多くの菌種が、海洋環境に由来する種々の試料からも検出される。これら外来混入微生物のうちには海水環境に適応して生存するものも存在するであろうが、多くは新しい環境において比較的短期間に死滅するものと考えられている^{1,2)}。

STANIER³⁾ は来源の異なる寒天分解菌の分類に関する研究において、特異的海洋細菌の存在問題を明確にすることは目下の海洋微生物学における中心課題であると論じ、MACLEOD⁴⁾ もこの STANIER の指摘を支持し、もし海洋細菌とそれに対応する陸・淡水由来菌の間に、実験室的トレーニングにより消失され得る性状以外に差異が認められないならば、来源のみ異なるそれぞれについての栄養・代謝に関する研究は無意味であろうと述べている。

特異的（あるいは真正）海洋細菌と称されるべき細菌群の存在およびその特性に関しては現在なお論議の多いところであるが、この問題を明らかにしようとして試みられた多くの研究は、海洋細菌の発育⁵⁻⁷⁾ および浮遊液中における溶菌の防御^{8,9)} に対する特異的無機塩の要求性、発育・代謝系における好冷性ないし温度感受性¹⁰⁻¹²⁾、深海分離菌における好圧性ないし耐圧性¹³⁻¹⁵⁾ などを取りあげている。さらにこれらの特性を安定した性状⁹⁾あるいは不安定な性状¹⁶⁾とするものがある。また最近では *Vibrio* を除く海洋細菌の DNA 塩基組成におけるモル% GC が、対応する陸由来菌に比べ低い値を示す傾向が認められている¹⁷⁾。

一般に海洋細菌については、分離当初に発育に対し海水を要求する海洋由来菌と定義した ZOBELL and UPHAM の見解¹⁸⁾、この海水要求性を Na⁺ に対する特異的要求性とする MACLEOD and ONOFREY の見解⁵⁾、それらに加えて外洋における普遍的常在性を重視する KRISS¹⁹⁾ の見解等が支持されているが、この問題については未だ明確な結論は得られておらず、現状では海洋種と陸性種の関係は、原株とそれに対応する適応株と考える SCHOLLES and SHEWAN の見解²⁰⁾が最も一般的と考えられる。

日高ら²¹⁻²⁴⁾ は来源の異なる多数の菌株を、有機物含量の少い 5 種所定培地における発育能の差異から、海水要求性の海洋型 (marine type, M 型; 多くは 37°C で発育せず)、食塩要求性の好塩型 (halophilic

Table 1. List of strains tested

Types	Strains	Media	Incubation Temp. (°C)
M	marine pseudomonad FHU 1055-1	ZoBell 2216E agar	25
M	marine pseudomonad FHU 11-50	"	"
MH	marine pseudomonad FHU 3-1-51	3% NaCl nutrient agar	25
MH	marine vibrio FHU 3-7-116	"	"
TH	<i>Vibrio metschnikovii</i> IAM 1039	3% NaCl nutrient agar	25
TH	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NIHJ (O5 : K15)	"	37
T	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	Nutrient agar	25
T	<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	"	"

FHU: Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate, Japan

IAM: Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Japan

NIHJ: National Institute of Health, Tokyo, Japan

EFDL: Eastern Fish Disease Laboratory, U. S. A.

M: Marine type

MH: Marine halophilic type

TH: Terrestrial halophilic type

T: Terrestrial type

Fig. 1. Effects of the concentrations of NaCl and KCl on the lysis of marine pseudomonad 1055-1 (M-type). (A) Effects of the concentrations of NaCl, (B) Effects of the concentrations of KCl. The experimental conditions and the symbols were as follows: T-0 (○—○), turbidity (O.D. at 610 $m\mu$) of the cell suspension before incubation; T-1 (●—●), turbidity (O.D. at 610 $m\mu$) of the cell suspension after 1 hour incubation (at 25°C); U. V. (●—●), ultraviolet absorption (O.D. at 260 $m\mu$) of the supernatant of T-1 (centrifuged at 18,000 $\times$ g for 30 min at 5°C).

type, H 型) および少量の培地有機物に夾雑する痕跡程度の無機塩以外に見かけ上塩類を要求しない陸型 (terrestrial type, T 型; 多くは 37°C で発育する) の 3 型に型別したが, その後著者らは H 型を海洋由来の 37°C で発育せず, 食塩要求度の高い海洋性好塩型 (marine halophilic type, MH 型) および陸・淡水由来の 37°C で発育し, 前者に比し食塩要求度の低い陸性好塩型 (terrestrial halophilic type, TH 型) に細型別した。

著者らは以上の型別についての理論的根拠を明らかにし, かつその海洋細菌・非海洋細菌の鑑別法としての妥当性を検討することを目的に, 上記 4 菌型について主として特異的無機塩要求性を中心とする比較生理学的研究に着手したが, 海洋細菌や好塩菌には蒸留水・低張液あるいは食塩水中でも溶菌を起すものが存在するので, 本研究遂行上, 溶菌を防御しかつ過剰の無機塩による影響を可及的に少くした菌体洗滌液・菌体懸濁液および反応液を調製することが必要であるので, まず各菌型について溶菌防御効果をもつ最小塩類溶液の検討を行つたので, その結果について報告する。

実験方法

供試菌株およびその型別法 日高ら²¹⁻²⁴⁾の

方法に従い (a) 蒸留水, (b) 0.5% および (c) 3% 食塩水, (d) 1/6 濃度および (e) 全濃度の人工海水 (HERBST の処方による) を溶媒とし, これにポリペプトン (大五栄養化学) および酵母エキス (大五栄養化学) をそれぞれ 0.05%, 0.01% の割合に加えた有機物量の少い 5 種類の所定培地 (pH 7.8) を調製し, それらに来源の異なる菌株を 25°C で 6 日間培養した。その結果発育のために培地の有機物中に夾雑する痕跡程度の無機塩 (Na^+ , 0.638 mM; K^+ , 0.137 mM; Mg^{2+} , 0.017 mM; Ca^{2+} , 0.012 mM) のほか, 見かけ上塩類を要求しない T 型 (5 種所定培地すべてに発育する), Na^+ を要求する H 型 (a あるいは a および b 培地で発育しない) および Na^+ のほかに K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} など海水中の主要無機塩を併せて要求する M 型 (d および e 培地のみ発育する) の 3 型に型別した。さらに H 型を主として陸・淡水由来の 37°C で発育する TH 型と, 海洋由来の 37°C で発育せず, 前者に比べて食塩要求度の高い MH 型に型別した。以上の 4 型に型別された菌株からそれぞれ 2 株宛を各型の代表株として選り本実験に供した。供試菌株, 供試培地, 培養温度等は Table 1 に示す通りで, 実験にはすべて 40 時間培養菌体を使用した。供試菌中 M および MH 型は著者らが海水から分離した菌株で, 他は各研究機関の好意により分与を受けた陸・淡水由来の菌株である。なお供試した改変 HERBST の人工海水の組成は Table 2 の脚注に示した。

供試菌体原液 各培養菌体は Table 1 に示すそれぞれの菌株の前培養培地の溶媒中に含まれる無機塩の組成およびその濃度に等しい塩類溶液で 2 回洗滌 (10,000 $\times$ g, 10 分, 5°C) 後, 同様の溶液に再懸濁し供試菌体原液とした。これらの菌体原液は同溶液で 10 倍に希釈したとき 610 $m\mu$ の吸光度 (O.D.) が 0.7 になるように調製した。

Fig. 2. Determinations of the minimum salt concentrations for preventing lysis. The experimental conditions and the symbols are the same as in Fig. 1.

溶菌測定法 若干の改変を行つた HIDAKA and KAKIMOTO^{25,26)} の方法によつた。各供試菌株の菌体原液 1 ml を下記のような塩類溶液 9 ml に加えたとき、菌体原液の塩類濃度の 1.0, 0.9, 0.8, ……0.3, 0.2, 0.1 倍濃度になるように予め調製した 10 種の塩類溶液を 9 ml 宛試験管にとり、各菌体原液ごとに 10 本 1 組の希釈液列を作つて恒温水槽 (25°C) に納め、恒温になるのを待つて菌体原液を各試験管に 1 ml 宛注加・混合し、ただちに 610 mμ で O. D. を測定 (T-0) した後水槽に納め、1 時間静置後再び同様に O. D. を測定 (T-1) すると共に各菌体懸濁液を遠心 (18,000×g, 30 分, 5°C) して上清液を採取し、260 mμ の U. V. 吸収を測定 (U. V.) した。以上の測定法による T-0, T-1 は低張液中で起る溶菌現象に伴う濁度の低下を、また U. V. は菌体内内容物の漏出を推定しようとするものである。

溶菌防御効果を有する最小塩類濃度溶液の決定法 M 型菌の場合、まず全濃度の人工海水 (A) で 2 回洗滌した菌体について T-0, T-1 および U. V. を測定し、このときの溶菌防御効果をもつ最小濃度 (B) を求め、つぎに A, 引続き B で各々 2 回ずつ洗滌した菌体について B を出発点とする希釈液列を用いて T-0, T-1 および U. V. を測定後、溶菌防御効果を有する最小濃度 (C) を求め、以下同様の操作を繰返して順次低下してくる最小濃度の最終的限界を求めて M 型菌における溶菌防御効果を有する最小塩類濃度溶液とした。

MH 型および TH 型菌は、M 型の場合の A を 3% 食塩水に、T 型菌は蒸留水に置換え、同様の測定方法によつて溶菌防御効果を有する最小塩類濃度溶液を決定した。

結 果

M 型菌に対し溶菌防御効果を有する人工海水の最小濃度 まず M 型の *marine pseudomonad* 1055-1 株について、3% 以下の濃度の NaCl および KCl 溶液による溶菌防御効果を測定した結果、Fig. 1 に示すごとく溶菌防御効果は共に認められず、この結果は他の M 型供試菌においても同様であつた。

MacLEOD and MATULA⁸⁾ は海洋細菌について Mg^{2+} と Ca^{2+} , Na^+ と K^+ の間における溶菌防御の相乗効果について報告しているが、組成の複雑な人工海水において、塩類間の相乗効果を考慮しながら溶菌防御効果を有する最小濃度溶液を決定することは、塩類の組合せ方および混合比率においてほとんど無数に近い選択が可能で、実験を繁雑にするおそれがある。従つて本実験では人工海水そのものを漸次希釈して溶菌を防御し得る最大希釈度を測定した。その結果は Fig. 2 および Table 2 に示すように、1055-1 株および 11-50 株は最終的にそれぞれ 21.6%, 26.2% の人工海水濃度で溶菌が防御された。すなわち約 4~5 倍希釈の人工海水は M 型菌の溶菌を防御し、NaCl と共存する Mg^{2+} および Ca^{2+} の相乗効果の大きいことが観察された。

MH 型菌に対し溶菌防御効果を有する NaCl の最小濃度 上記のように NaCl, KCl 単独溶液は M 型菌において溶菌防御効果が認められないが、MH 型の *marine pseudomonad* 3-1-51 株および *marine vibrio* 3-7-116 株に対しては Fig. 2 および Table 2 に示すように、最終的にそれぞれ 2.16%, 2.40% の NaCl 溶液で溶菌が防御された。なお M 型の場合と同様の方法で測定した 3-1-51 株における溶菌を防御し得る人工海水の最小濃度は 50.4% であり、M 型菌の場合に比べ Mg^{2+} および Ca^{2+} の溶菌防御におよぼす効果よりも Na^+ の効果の大きいことが認められた。

TH 型菌に対し溶菌防御効果を有する NaCl の最小濃度 *Vibrio metschnikovii* 1039 株および *Vibrio parahaemolyticus* (O5:K15) 株は Fig. 2 および Table 2 に示すように、それぞれ 0.86%, 0.99%, すなわち生理的食塩水に近い NaCl 溶液で溶菌が防御された。また 1039 株において溶菌防御効果の認められる人工海水の最小濃度は 17.6% で、TH 型は M 型に比べ NaCl 単独で、また MH 型に比べ 1/2~1/3 程度の NaCl 濃度で溶菌が防御される点において著しく異つた。

Table 2. Minimum salt concentrations for preventing lysis

Types	Strains	Concentrations for preventing lysis	
		Concentrations	Number of washing
M	<i>marine pseudomonad</i> FHU 1055-1	21.6% ASW*	2×4(100→60→36→21.6% ASW)
M	<i>marine pseudomonad</i> FHU 11-50	26.2% ASW	2×7(100→80→64→51.2→41.0 →32.8→26.2% ASW)
MH	<i>marine pseudomonad</i> FHU 3-1-51	50.4% ASW	2×4(100→80→56→50.4% ASW)
		2.16% NaCl	2×3(3.00→2.40→2.16% NaCl)
MH	<i>marine vibrio</i> FHU 3-7-116	2.40% NaCl	2×2(3.00→2.40% NaCl)
TH	<i>Vibrio metschnikovii</i> IAM 1039	17.6% ASW	2×5(100→70→56→49→29.4 →17.6% ASW)
		0.86% NaCl	2×6(3.00→2.40→1.92→1.54 →1.23→0.86% NaCl)
TH	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NIHJ (O5:K15)	0.99% NaCl	2×7(3.00→2.40→1.92→1.74 →1.38→1.10→0.99% NaCl)
T	<i>Pseudomonas fluorescens</i> EFDL	0	2×1(Distilled water)
T	<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 14174	0	2×1(Distilled water)

* ASW: Modified Herbst's artificial sea water (NaCl, 510 mM; KCl, 9.8 mM; $MgCl_2$, 52 mM; $MgSO_4$, 21 mM; $CaCl_2$, 7.3 mM)

T 型菌に対する溶菌防御 T 型菌の 2 供試菌については Fig 2 および Table 2 に示すように、共に蒸留水中においても溶菌は認められず、他の菌型とは全く異なる結果を示した。

溶菌防御効果を有する最小塩類濃度溶液に懸濁した供試菌体の顕微鏡的観察 上記の結果より 1055-1 (M 型) 株、3-1-51 (MH 型) 株および *V. parahaemolyticus* (TH 型) を選び、M 型菌は全濃度および 21.6% の人工海水、MH 型菌および TH 型菌はそれぞれ 3% および 2.16%、3% および 0.99% の NaCl 溶液における菌体懸濁液を、それぞれ常法通り塗抹・乾燥して LÖFFLER のメチレン青による染色を行い鏡検した結果、形態的にもまた染色性においても異常は認められず、溶菌像は全く観察されなかった。

考 察

MACLEOD and MATULA⁹⁾ は海洋細菌の溶菌防御における 2 価陽イオンの効果は 1 価陽イオンに比べ著しく大きく、またその濃度はイオンの種類により差異のあることを指摘しており、また TAKACS *et al.*⁹⁾ は NaCl の種々の濃度溶液中に懸濁された海洋細菌において、細胞内外の Na⁺ 濃度および塩化物量がほぼ等しい事実から、少くとも NaCl は浸透圧効果のみで溶菌を防御し得ないことを推察しており、塩類溶液による溶菌防御機構は単に浸透圧効果のみで説明することは困難である。また溶菌現象に対し BROWN^{27~29)} は細胞壁中の分解酵素の役割を主張し、一方 BUCKMIRE and MACLEOD³⁰⁾, MATULA and MACLEOD³¹⁾ は細胞膜の高分子電解質と陽イオンの物理化学的關係によるとする高分子電解質説 (polyelectrolyte theory) を唱えたが、溶菌現象の機構については未だ不明な点が多い。

著者らは日高らの型別法^{21~24)}により型別した供試菌株のそれぞれについて、Table 2 に示したような溶菌防御効果を有する最小塩類濃度溶液を調製したが、その過程において最初に決定した溶菌防御効果を有する最小塩類濃度溶液は、継続的に同様の操作による実験を続けることにより、ある限界まではほぼ一定の割合で順次最小濃度が低下してくるという興味ある現象を認めた。すなわち M 型の 1055-1 株において全濃度人工海水 (100%) から 60%→36%→21.6% の人工海水濃度と順次約 60% の割合で最小濃度が低下し、最終的には 21.6% 以下では溶菌を防止し得なくなつた。同じ M 型の 11-50 株は約 80% の割合で、また MH 型および TH 型の各 2 株では 3% NaCl 溶液から約 80% の割合で順次低下する傾向が認められた。この結果は海洋細菌のみならず中等度好塩細菌の溶菌現象も無機塩と細胞膜成分との物理化学的相互関係^{32,33)}を支持する結果かも知れないが、著者らの今回の実験目的は溶菌機構の解明ということではないのでこの現象の追求は行わなかつた。

次に M, MH, TH および T 型菌の溶菌現象に対する無機塩の影響において、特異的海洋細菌と考えられる M 型菌は NaCl 単独では溶菌を防御し得ず、Na⁺ のほか Mg²⁺ および Ca²⁺ など 2 価陽イオンの共存を必要とし、その溶菌を防御し得る改変 HERBST の人工海水の最小濃度は 22~26% であつた。これに対し MH 型および TH 型菌はそれぞれ NaCl 溶液の 2.2~2.4%, 0.9~1.0% で溶菌が防御され、M 型菌とは全く異なる態度を示すと共に、MH 型菌は TH 型菌の約 2~3 倍量の NaCl を必要とし、両者間には明らかな差異が認められた。また T 型菌は蒸留水中においても溶菌は認められなかつた。

以上のごとく、本実験の供試菌株は M, MH, TH および T 型別にそれぞれ溶菌防御のために異つた塩の種類および濃度を要求し、日高ら^{21~24)}が主として発育におよぼす無機塩の影響に基づき型別した各菌型は、溶菌防御の面から見てもそれぞれの菌型に特異的な無機塩の組成および濃度を要求することが明らかとなり、日高らの型別法の妥当性を肯定するような結果を示した。

要 約

日高ら^{21~24)}の方法に準拠して型別した海洋型 (M 型)、海洋性好塩型 (MH 型)、陸性好塩型 (TH 型) および陸型 (T 型) の各 2 菌株について、Table 2 に示す方法で溶菌防御効果を有する塩類溶液の最小濃度を検討し、次の結果を得た。

1. M 型菌は Na⁺ 単独で溶菌を防御し得ず、Mg²⁺ および Ca²⁺ の共存を必要とし、溶菌防御効果を

有する最小濃度は改変 HERBST の人工海水の約 22~26% 濃度であつた。

2. MH 型菌および TH 型菌は共に Na^+ 単独で溶菌が防御され、その最小濃度はそれぞれ 2.2~2.4 %, 0.9~1.0% NaCl 溶液であつた。

3. T 型菌は蒸留水中においても溶菌は認められなかつた。

文 献

- 1) C. E. ZOBELL: *Bull. Scripps Inst. Oceanogra. New Ser.*, **159**, 55-77 (1942).
- 2) C. E. ZOBELL: *Marine Microbiology*, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass., 1946, pp. 60-63.
- 3) R. Y. STANIER: *J. Bacteriol.*, **42**, 527-559 (1941).
- 4) R. A. MACLEOD: *Bacteriol. Rev.*, **29**, 9-23 (1965).
- 5) R. A. MACLEOD and E. ONOFREY: *J. Bacteriol.*, **71**, 661-667 (1956).
- 6) M. E. TYLER, M. C. BIELLING, and D. B. PRATT: *J. gen. Microbiol.*, **23**, 153-161 (1960).
- 7) R. A. MACLEOD and E. ONOFREY: *Can. J. Microbiol.*, **3**, 753-759 (1956).
- 8) R. A. MACLEOD and T. I. MATULA: *ibid.*, **8**, 883-896 (1962).
- 9) F. P. TAKACS, T. I. MATULA, and R. A. MACLEOD: *J. Bacteriol.*, **87**, 510-518 (1964).
- 10) S. D. BURTON and R. Y. MORITA: *ibid.*, **86**, 1019-1024 (1963).
- 11) R. D. HAIGHT and R. Y. MORITA: *ibid.*, **92**, 1388-1393 (1966).
- 12) W. J. WIEBE and G. B. CHAPMAN: *ibid.*, **95**, 1874-1886 (1968).
- 13) C. E. ZOBELL and F. H. JOHNSON: *ibid.*, **57**, 179-189 (1949).
- 14) C. E. ZOBELL and R. Y. MORITA: *ibid.*, **73**, 563-568 (1957).
- 15) C. E. ZOBELL and L. L. HITTLE: *Can. J. Microbiol.*, **13**, 1311-1319 (1967).
- 16) D. B. PRATT and G. WADDELL: *Nature*, **183**, 1208-1209 (1959).
- 17) E. LEIFSON and M. MANDEL: *Int. Syst. Bacteriol.*, **19**, 127-137 (1969).
- 18) C. E. ZOBELL and H. C. UPHAM: *Bull. Scripps Inst. Oceanogra.*, **5**, 239-292 (1944).
- 19) A. E. KRISS: *Marine Microbiology [Deepsea]* (Translated from the Russian by J. M. SHEWAN and Z. KABATA), Oliver & Boyd, Edinburgh, 1963, 43-51.
- 20) R. B. SCHOLES and J. M. SHEWAN: *Adv. Mar. Biol.*, **2**, 133-169 (1964).
- 21) 日高富男: 鹿児島大水産紀要, **12**, 135-152 (1964).
- 22) T. HIDAKA: *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **14**, 127-180 (1965).
- 23) 日高富男・坂井 稔: 食衛誌, **6**, 235-241 (1965).
- 24) T. HIDAKA and M. SAKAI: *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.*, **12**, 125-149 (1968).
- 25) T. HIDAKA and D. KAKIMOTO: *This Bull.*, **34**, 72-77 (1968).
- 26) T. HIDAKA and D. KAKIMOTO: *ibid.*, **34**, 706-771 (1968).
- 27) A. D. BROWN: *Biochim. Biophys. Acta.*, **44**, 178-179 (1960).
- 28) A. D. BROWN: *ibid.*, **48**, 352-361 (1961).
- 29) A. D. BROWN: *ibid.*, **62**, 132-144 (1962).
- 30) F. L. A. BUCKMIRE and R. A. MACLEOD: *Can. J. Microbiol.*, **11**, 677-691 (1965).
- 31) T. I. MATULA and R. A. MACLEOD: *J. Bacteriol.*, **100**, 403-410 (1969).
- 32) T. UNEMOTO, T. TSURUOKA, and M. HAYASHI: *Can. J. Microbiol.*, **19**, 563-571 (1973).
- 33) T. UNEMOTO and R. A. MACLEOD: *J. Bacteriol.*, **121**, 800-806 (1974).