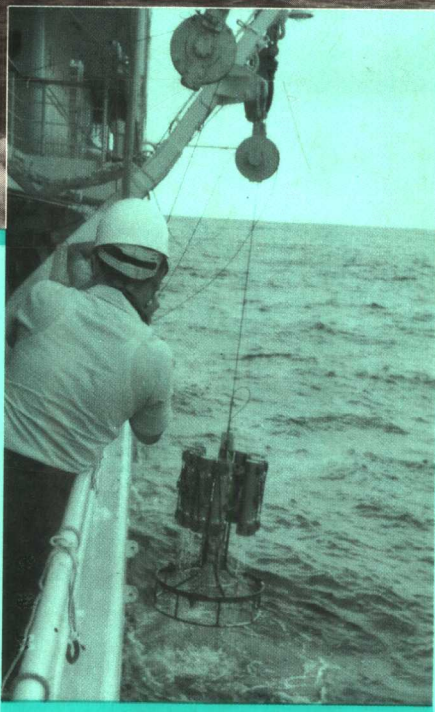


海洋微生物研究法

門田 元・多賀信夫編



学会出版センター

海洋微生物研究法

門田 元・多賀信夫 編

学会出版センター

海洋微生物研究法

1985年 5月10日 初 版

定価 3,800円

編 者 門 田 元
 多 賀 信 夫

検 印 省 略

発 行 者 山 田 猛

印 刷 所 大昭和印刷株式会社

製 本 所 誠 製 本 株 式 会 社

発 行 所 株式会社 学会出版センター

113 東京都文京区本郷6丁目2番10号

電 話 03-814-2001 (代表)・振替 東京 6-71057

挿図・伊藤允三／製版・大森製版所／カバー・平版印刷

ISBN 4-7622-8437-8

まえがき

本書で取扱う微生物は、ウイルス（ファージ）、細菌、放線菌、真菌および微細藻類の一部（らん藻）である。いずれも微小な生物で、形態の観察には光学顕微鏡または電子顕微鏡が用いられ、またその生理や代謝の研究には、実験室で培養によって増殖させた個体の集団が用いられるという共通点がある。

これらの微生物は、海水、海底堆積物、海洋動物の消化管内容物など、海洋のあらゆるところに分布し、それぞれの場所で環境に支配されながら生存しているが、一方、その活動は環境の生物学的要素や化学的要素に大きい影響を与えている。

海洋の生態系における微生物の役割は多様であり、種々の生物によって生産された有機物を分解し、物質循環の諸反応を触媒するだけではなく、食物連鎖を通じて生物生産の基盤となる生産者としての役割をも果たしている。また微視的には、微生物は生物間の相互関係の種々の過程において、ともにコミュニティを構成する他の生物の生活に大きい影響を与えている。

微生物の生存環境としての海洋は、最近話題になっている海洋底火山の過熱水噴出部のような特殊な場所を除けば、陸上の環境に比べて物理学的にも化学的にも比較的均一かつ安定である。すなわち、気温の影響を強く受ける表層部を除けば、一般に温度が低く、かつその変動が少いこと、塩分が一定していること、有機炭素の濃度が低いこと、深海では大きい水圧がかかっていること、などの特徴をもっている。このような環境特性に対応して、海洋の微生物は陸上環境の微生物とは違う生理・生態的特徴をそなえている。したがって、海洋における微生物の分布状態やその活性を調べ、その分離培養を行うためには、土壌微生物や食品微生物などの場合とは違った方法や技術が必要となる。海洋の環境問題との関連で微生物の生態を研究する場合や、水産業あるいは微生物利用工業の立場から海洋微生物を利用しようとする場合にも、対象となる海洋

微生物に適した研究方法を用いなければ、正しい研究結果を得ることはできない。

本書では、海洋に存在する主要な微生物群について、それらを研究する場合の基礎的技術と、最近におけるその進歩を、サンプリング法、菌数測定法、菌株の分離培養法、現場での活性測定法、および分類・同定法に分けて記述した。また各項目では、それらの方法を用いて得られた実験結果を例示するとともに、実施に当たってとくに留意すべき問題点についても指摘し、読者の理解を容易にしようとした。

本書の刊行にさいして、編集の実務に多大のご協力をいただいた清水潮博士（東京大学海洋研究所助教授）および石田祐三郎博士（京都大学農学部教授）に感謝する。

昭和 60 年 3 月

編 者 門田 元
多賀信夫

目 次

まえがき

1. サンプルリング

1.1 採 水	1
a. 意 義	1
b. 減圧吸引するタイプの採水器	2
J-Z 採水器 2 / J-Z 採水器の改変タイプ 4 / ニスキン採水器 6 / J-M 採水器 6 / SON 採水器 6	
c. 減圧せず内部の空気またはガスと置換するタイプの採水器	7
ハイロート採水器 7 / Lewis 採水器 7 / Throndsen 採水器 7 / Bertoni 採水器 7	
d. 滅菌水と置換するタイプの採水器	7
Sorokin 採水器 7	
e. 海面皮層の採水	9
Garrett 式スクリーン採水器 9 / Harvey 式採水法 9 / その他 9	
f. 圧力保持滅菌採水器	9
g. まとめ	10
文 献	10
1.2 採 泥	12
a. 意義と問題点	12
b. 採泥および底泥試料の調製法	13
1.3 海産動物消化管内細菌	17
a. 意 義	17

b. 実験方法	18
培地 18 / 希釈液 18 / 消化管内容物試料 19 / 消化管壁試料 19 / 直接検鏡法 20	
c. 実験例	21
消化管内容物中の細菌相の特性 21 / 消化管内壁部に付着する細菌 21	
d. 問題点	21
文 献	22
 1.4 付着細菌	23
a. 意義	23
b. 実験方法	23
大型物体表面付着細菌 23 / 懸濁粒子付着細菌 26	
c. 実験例と問題点	28
大型物体表面付着細菌 28 / 懸濁粒子付着細菌 30	
文 献	31
 2. 微生物の一般的計数法および計量法	
 2.1 直接計数法	33
a. 意義と概要	33
b. 準備	34
洗滌 34 / 採水器 34 / AO 溶液 34 / Nuclepore フィルター 34 / 濾過器 35 / 落射型蛍光顕微鏡 35	
c. 操作	36
d. よい結果の条件	37
e. 活性のある菌群の計数	38
f. 計数例	38
文 献	40
 2.2 培養計数法	41
a. 意義	41

b. 方 法	42
寒天培地平板法と段階希釈法	42
c. 実 験 方 法	44
寒天培地平板法	44
MPN 法	46
d. 実 験 例	46
総菌数, DVC, 培養法生菌数, ビブリオ数の比較	46
培養方法による差	47
培養基の比較	49
e. 問 題 点	50
平板当りのコロニー数	50
細菌の集塊	50
混釈法に用いる寒天の種類	51
文 献	51
2.3 バイオマス測定法	53
a. LPS 測定原理	54
b. 実 験 器 具	54
c. 試水の採取および処理	55
d. 試 薬	55
e. 測 定	55
f. 直接的細菌量測定法の一例	56
g. LPS 量測定例	56
文 献	58

3. 計数値の統計的性格

3.1 計数値の統計的性格	59
a. 数に語らせよ—計数値のばらつき	59
b. 平板計数値のばらつきが異常に大きい場合(1)	59
c. 細菌細胞は各平板にどのように分配されるか	61
d. 平板計数値のばらつきが異常に大きい場合(2), 小さすぎる場合	62
e. 平板計数値の統計的性格をめぐるその他の問題	63
f. 最確数法(MPN 法)の統計的基礎をめぐる	64

(補 遺) 回帰係数, 相関係数について	66
文 献	68

4. 特定微生物の培養計数分離法

4.1 好気性従属栄養細菌	69
a. 意 義	69
b- 1. 従属栄養細菌	69
b- 2. 寒天分解細菌	71
b- 3. アルギン酸分解細菌	72
b- 4. セルロース分解細菌	73
b- 5. キチン分解細菌	75
b- 6. 澱粉分解細菌	76
b- 7. 蛋白質分解細菌	77
b- 8. 尿素分解細菌	77
b- 9. Tween 80 分解細菌	78
b-10. 有機リン分解細菌	79
c. 問 題 点	80
文 献	80
4.2 低栄養従属栄養細菌 (低栄養細菌)	81
a. 意 義	81
b. グラスファイバーフィルター平板法	83
実験方法 83 / 研究例 85 / 問題点 88	
c. ^{14}C -MPN 法	89
実験方法 89 / 研究例 92 / 問題点 94	
d. M-MPN 法	95
実験方法 95 / 研究例 96 / 問題点 98	
文 献	98

4.3 嫌気性従属栄養細菌	99
a. 意 義	99
b. 実験方法と問題点	100
嫌気培養法 100 / 計数・分離法 102	
文 献	106
4.4 炭化水素分解細菌	107
a. 意 義	107
b. 実験方法	108
炭化水素分解細菌の計数法 108 / 培地組成 108 / 培地調製法 111 / 培養方法 112	
c. 実験例	113
計数例 113 / 分離例 115	
d. 問題点	115
文 献	116
4.5 硫酸還元細菌および無色硫黄細菌	117
A 硫酸還元細菌	117
a. 意 義	117
b. 実験方法	119
培養条件 119 / 培地の組成および調製方法 120 / 計数法 121 / 純粋分離法 122 / 硫酸還元活性の測定法 123	
B. 無色硫黄細菌	124
a. 意 義	124
b. 実験方法	125
計数法 125 / 純粋分離法 126	
c. 問題点	127
文 献	127

4.6 硝化および脱窒細菌	128
a. 意義	128
b. 歴史	128
c. 実験方法	130
硝化細菌 130 / 脱窒細菌 130	
d. 研究例	131
e. 問題点	134
文献	135
4.7 窒素固定微生物	136
a. 実験方法, 実験例, 問題点	137
培地 137 / 試料の採取と計数 139 / 窒素固定活性の測定 139	
b. 藍藻	140
文献	141
4.8 光合成細菌	142
a. 意義	142
b. 実験方法	144
光合成細菌の選択的計数分離法 144 / Rhodospirillaceae の計数分離法 145 / Chromatiaceae と Chlorobiaceae の計数分離法 146 / <i>Erythrobacter</i> の分離計数法 147	
c. 実験例	148
文献	149
4.9 好圧細菌と耐圧細菌	150
a. 意義	150
b. 加圧培養法	151
加圧培養装置 151 / 液体培地を用いる培養法 152 / 固形培地を用いる培養法 153 / その他の方法 153	
c. 実験例	154
d. まとめ	156

文 献	156
4.10 低温細菌	157
a. 意 義	157
b. 実験方法—現場海水中の低温細菌の計数・分離法	158
c. 研 究 例	159
d. 問 題 点	160
文 献	161
4.11 ビタミン生産細菌	162
a. 意 義	162
b. 実験方法	163
計数法 163 / ビタミンの生産 164	
c. 実 験 例	167
d. 問 題 点	167
文 献	169
4.12 デロビブリオ	170
a. 意 義	170
b. 実験方法	171
試 料 171 / 方 法 171 / 純粹分離 174 / 菌株の保存 174	
c. 実 験 例	174
文 献	176
4.13 バクテリオファージ	177
a. ファージ培養の準備	178
培 地 178 / 指示菌の新鮮培養液 178 / 試料の採取と調製 178 /	
試料の濾過除菌 178	
b. ファージの検索	179
意 義 179 / 実験方法 179 / 問題点 179	

c. ファージ計数法	180
意 義 180 / 実験方法 180	
d. ファージの分離・純化法	181
意 義 181 / 実験方法 181 / 実験例 181	
e. 1 段増殖実験	181
意 義 181 / 実験方法 182 / 実験例 183	
文 献	183
 4.14 放 線 菌	185
a. 意 義	185
b. 実験方法	186
c. 研究例	187
d. 今後の問題	190
文 献	191
 4.15 真 菌	193
a. 定 義	193
b. 培養特性	193
c. 採集方法	194
鞭毛菌類 194 / 子囊菌類および不完全菌類 195	
d. 分離と培養	198
文 献	199
 5. 現場活性の測定法	
 5.1 水—増殖速度	201
a. 意 義	201
b. 実験方法	201
直接法 202 / 間接法 205 / 生化学的活性法 205	
c. ま と め	207

文 献	209
5.2 水—取込み・無機化活性	210
a. 意 義	210
b. 理論的な背景	211
c. 材 料	213
反応容器 213 / モデル基質溶液 213 / 液体シンチレーション計数用 カクテル 213 / 滅菌人工海水 214 / 洗滌水 214	
d. 方 法	214
e. 測 定 例	215
f. 問 題 点	216
文 献	217
5.3 底 泥	218
a. 意 義	218
b. 実験方法	219
アイソトープを用いる方法 219 / 化学分析による方法 220	
文 献	222
 6. 海洋微生物の分類・同定法	
6.1 数値分類法	223
a. 意 義	223
b. 方 法	224
形質の試験と記録 224 / 類似度の計算 224 / 分類体系の構成 225	
c. 問 題 点	226
コンピュータープログラム 226 / コンピューターによる同定 226	
文 献	227
6.2 海洋細菌の同定	228
a. 意 義	228

b. 方 法	231
グラム陽性細菌 231 / グラム陰性細菌 231	
c. 問 題 点	232
鞭毛の観察 232 / G-C 比の測定 233 / 属の細分について 233	
文 献	233
6.3 分子生物学的分類法	
6.3.1 DNA 塩基組成比(GC 含量)	234
a. DNA 塩基組成比	234
b. DNA の抽出・精製	234
c. 測 定 法	235
測定機器 236 / T_m の測定 236	
d. 問 題 点	236
DNA 抽出 236 / DNA の純度 236 / T_m 測定 237 / 分類学上の問題点 237	
文 献	239
6.3.2 DNA 相同性	240
a. DNA の抽出・精製	240
b. 方 法	241
c. 問 題 点	242
文 献	244
6.4 放 線 菌	245
a. 同定操作	245
形 態 246 / 培養性状 246 / 生理的性質 248 / 菌体成分 248	
b. 検 索	250
c. <i>Streptomyces</i> 属	251
d. <i>Micromonospora</i> 属	252
e. <i>Nocardia</i> 属	254
文 献	256

6.5 真菌の分類・同定	257
a. 分類体系	257
b. 分類基準	266
c. 同定に必要な重要文献	267
文 献	268
 <付 録>	
1. MPN 計数表(最確数値表)	269
2. 滅菌法	272
3. 細菌染色法	277
4. 電子顕微鏡	281
5. 生化学的同定法	283
6. 数値分類プログラム例	287
 事項索引	293
学名索引	302
著者紹介	307

1. サンプルング

1.1 採 水

a. 意 義

微生物の生態を研究する第一歩はサンプリングである。目的とする微生物の存在状態を保ったまま、また外部から汚染されることなく採取する必要がある。海洋微生物の研究対象となる場合は、水平的には陸水などが流入しているごく内湾の汽水域から沿岸水域を経て外洋水域に至るまで、一方垂直的には干潟などのように干潮時に干出するところから内湾の数 m 程度の場所、さらに 10,000 m を超える海溝に至るまで、多種多様な環境の場がある。そこで、研究を行うにあたり、量的質的にどのようなサンプルが必要なのか、そのサンプルをどの場所から採取する必要があるのか、などの要件に応じて、サンプルを採取するために適当な機器を選択し、それを使いこなす技術が必要になってくる。

海洋観測において常用されるナンセン採水器、パンドン採水器、ロゼット採水器などは操作もしやすく、また一度に各水深から充分量の試水をとることができるので、海水中の化学成分や塩分測定のための採水器としては重要である。しかし、滅菌できないことや、採水器が開いた状態で途中の海水層を通過するなどのため、微生物研究用の採水器としては適当でない。この目的のためには、少なくともあらかじめ滅菌を行い、また閉じた状態で目的水深に達することが必要である。

Bertoni と Melchiorri-Santolini¹⁾ は、微生物研究用の理想的な採水器として次の点をあげている。①試水に不純物が溶出してこない材質、たとえばガラス、テフロン、シリコンゴムなどが望ましい。ゴム、金属、プラスチックなどは時としてトラブルのもとになる。②内部を洗滌できる。③滅菌できる。④採