

1. 研究課題名：海洋生物資源ライブラリーの構築
2. 研究機関：ポーラ化成工業株式会社 中央研究所・医薬品研究所
3. 研究者：蓮田勝美（主任研究員・医学博士）
4. 共同研究者：市毛秀則、太田洋子、中島琢自
5. 研究期間：
6. 要約：

海洋環境は一般には、貧栄養状態であり、そこには陸上と異なる、微生物をはじめとする多様な生物が棲息している。

本研究では、これらの海洋生物のうちで特に貧栄養条件下で生育している低栄養細菌と放線菌を海洋生物資源ライブラリー構築のための分離・収集する対象菌種とした。

これらの微生物源としての海洋試料の採取は、長崎県内大村湾、橘湾、九十九島における海底泥、海水、海洋生物の試料と、長崎半島、西彼杵半島、有明海沿岸の汽水域について2回（6月、9月）行った。海洋低栄養細菌分離用培地として、PPES2 と ORI 培地の2種類を用いた。寒天濃度を減らす目的でグルコマンナン製剤 Agarmate0.3%添加 50%人工海水培地条件下で、海洋細菌の分離を行った。放線菌の分離培地は、Glucose-Waksman's medium (GW)培地と Proline-water agar (PW)を用いた。得られた海洋試料から、純粋分離・収集した海洋細菌の総数は2967株であった。

それらは大村湾、橘湾、九十九島由来の海底泥由来菌 996 株（33.6%）、海水由来菌 529 株（17.8%）、海洋生物由来（魚類腸管）554 株（18.7%）、沿岸汽水由来 770 株（26.0%）であり、その他の土壌由来 118 株（3.9%）であった。

一方海洋に関わる放線菌は 529 株分離・収集された。それらは沿岸汽水域由来 407 株（76.9%）、海底泥由来 65 株（12.3%）、海水由来 3 株（0.6%）、その他の土壌由来株から 54 株（10.2%）であった。この中で海底泥と海水由来の 68 株の放線菌は特に海洋環境に馴化した株であろうと考えられ、その代謝や活性物質産生に興味を持たれる。

ここで、分離・収集した海洋細菌 2967 株は NB0001～NB2967 として海洋細菌ライブラリーとして登録した。

放線菌 529 株は NS0001～NS0529 として放線菌ライブラリーに登録し、超低温保存した。

これらの海洋細菌と放線菌を合わせて、3496 株を登録し、本事業における「海洋生物資源ライブラリー」の構築とした。

7. 研究の背景及び目的

海洋環境は、地球表面積の 2/3 を占めており、陸上環境とは異なり、未知の有用機能を秘めた微生物をはじめとする生物が数多く存在し、多彩な海洋生態系を構成している。

これらの生態系を構成している生物は、きわめて重要な資源である。ポーラ化成工業（株）医薬品研究所では、微生物の代謝産物から抗生物質をはじめとする各種の生理活性物質の探索研究を行っている。

これら活性物質の起源としての微生物、特に海洋環境に棲息する微生物に注目して、海洋微生物の探索・分離収集について各地の大学と共同研究を行ってきた。

これまでの研究から、海洋由来の微生物は未知の微生物も多く存在し、研究の主題により特徴ある微生物を分離・収集することが可能であることが判明した。

この事業における研究では、海洋県である長崎県の特徴を最大限に生かすべく、長崎県内における海洋試料の収集と海洋生物資源ライブラリー構築を目的として、

- (1) 海洋微生物資源ライブラリーのための調査研究
- (2) 海洋微生物資源の収集方法及び分離方法の確立と実施
- (3) 海洋生物資源ライブラリーの構築

の項目について、調査研究とその実施研究を行った。

8. 材料と方法

8-1. 海洋微生物分離・収集のための調査研究

- (1) 分離・収集する対象微生物の設定のための調査

海洋環境条件とそこに棲息する生物や食物連鎖等海洋環境循環など生態系における微生物群の調査と、海洋環境から分離された放線菌群の文献調査。

- (2) 低栄養細菌の分離条件と培地条件の検討

- 1) 低栄養細菌の分離条件の検討

海洋試料、特に海水において海表面水と海中水では生存菌数が異なる報告がある。そこで海洋に棲息する低栄養細菌の分離に先立ち、海表面水異物に付着している菌数と海中浮遊細菌測定のために、低蛋白吸着性ポリ弗化ビニリデン材質、孔径 5 μm 無菌濾過膜（日本ミリポア社、デュラポア）を用いて、海表面水の細菌（海表面浮遊異物に付着している細菌：付着菌）と海水中の細菌（海中浮遊菌：浮遊菌）に分別してそれぞれに生育する細菌の総数を下記の培地条件で測定した。

- 2) 低栄養細菌分離のための培地条件の検討

海洋の貧栄養環境条件下で生存している細菌群の分離のために 5 種類の培地を用いて 10 種類の条件設定を行いそれらにおける菌の出現数・性状を検討した。

それらは、Modified Winogradsky's Medium (MW)、海洋細菌選択培地 (SBS)、低栄養細菌選択培地 (PPES2)、Zobell 2216 培地 (Zobell) と Nutrient broth agar medium (NA) を用いた。

さらに PPES2 を改良した低栄養細菌分離用培地 2 (ORI) についても以後の実験に使用した。

貧栄養状態で生存している微生物の生育は、固化に使用する寒天そのものが生育に阻害的に作用する報告もあるので、ここでは寒天の部分的な代替が可能なガラクトマンナン成分の Agar mate を添加することにより寒天の使用濃度をより下げて、よりたくさんの低栄養細菌の発育を可能にする条件についても検討を行った。

尚、これらの実験は海洋微生物の分離実験であるため、培地は全て 50% 人工海水 (Jamarin S) を用いて実験を行った。

- (3) 海洋試料から放線菌の分離条件の検討

放線菌は孢子形成微生物であり、海洋や土壌の試料からの効率的な放線菌の分離・発育

のためには、試料の SDS 処理、超音波処理等の物理化学的処理が必要である。ここでは後述の長崎県内の現地実験を想定して、2種類の超音波発生機、すなわち大型で高い出力の移動不能な超音波発生機（神明台工業、SN300W）と、小型で移動可能な低出力の発生機（柴田科学、SB50W）を用いて試料中に含まれる放線菌胞子の発芽に及ぼす超音波処理条件についての検討を行った。条件検討には、No.88 ウタラ川試料と No.90 仲間川試料の沿岸由来の2試料を用いて下記の条件で超音波処理を行った。

超音波処理条件

条 件	超音波発生機	出 力	処理時間 (分)
1	SB社 小型	50W	1
2	SB社 小型	50W	6
3	SN社 大型	300W	1

上記試料約1gを0.05%SDS存在下で各条件にて超音波処理を行い、2種類の放線菌生育培地すなわち、Proline water agar (PW)と Krinsky's agar (KR)培地に、WASP - スパイラル・プレーター（グンゼ産業）を用いて塗抹し、28℃で2～4週間培養を行った。

培養後、出現した放線菌の全菌数を計測した。

8-2. 海洋試料の採取と現地における微生物取り扱い方法の実習

(1) 海洋試料の採取計画

海洋に棲息している微生物の分離・収集のために、長崎県内の海底泥、海洋生物及び海水等の海洋試料と沿岸試料を採取するために2回の試料採取計画を立案した。さらに外部機関からの海洋試料も入手した。

1) 第1回海洋試料サンプリング計画（別紙1-1、1-2、1-3参照）

日 時：1996年6月3日（月）から6月12日（水） 10日間

採取場所：大村湾、橘湾 採取に漁船をチャーター

長崎半島、西彼杵半島、有明海沿岸

採取試料：海底泥、海洋生物、海水

沿岸試料は特に汽水域試料を採取

2) 第2回海洋試料サンプリング計画（別紙2-1、2-2、2-3参照）

日 時：1996年9月24日（火）から10月3日（木） 10日間

採取場所：大村湾、橘湾 採取に漁船をチャーター

九十九島 カヌーによるサンプリング

長崎半島、西彼杵半島、有明海沿岸

採取試料：海底泥、海洋生物、海水

沿岸試料は汽水域試料

山土壌試料

3) トロール網漁試料（外部機関より入手）

日 時：1996年6月航海

場 所：東シナ海

採取試料：各種の魚類

4) その他沿岸試料及び植物試料（外部機関より入手）

(2) 海洋試料採取と現地（長崎市）における海洋細菌分類実験

大村湾、橘湾、九十九島における海底泥等の海洋試料の採取には、エグマン・バーギー採泥器、海水採取には杉本式ハイロート採水器を使用した。

長崎半島、西彼杵半島、有明海沿岸における沿岸試料の採取は河川の河口付近の汽水域の試料を採取した。

これらの長崎における海洋試料の採取及び沿岸試料の採取は、下記の機関のプロジェクトメンバーの協力により実行された。

協力プロジェクトメンバー（敬称略）

三菱長崎機工株式会社研究室 空閑哲雄、戸田 忍

長工醤油味噌協同組合 福田久孝

科学技術振興事業団長崎研究室 竹下哲史

ポーラ化成工業株式会社医薬品研究所 市毛秀則、中島琢自、蓮田勝美

尚、現地（長崎市）における微生物の分離実験は、三菱長崎機工株式会社研究室において実施された。

8-3. 海洋細菌の分離、純粋培養実験と超低温保存

(1) 試料中の総細菌数の測定と分離培養

採取した海洋試料からの微生物の生育実験、計測のためには、試料採取後、出来るだけ短時間のうちに所定の培地に塗抹する必要がある。試料中の総細菌数の測定と分離培養のために、前記の低栄養細菌分離培地（PPES2・AM、ORI・AM）2種類にWASPスパイラルプレーターを用いて、各平板当たり50 μ l及び100 μ l塗抹した。

20、48～72時間培養後、各平板に出現した細菌数をカウンターマツト（WASP専用コロニー計測システム）を用いて計測し、各試料における総細菌数を測定した。

(2) 海洋細菌の純粋培養

培養後出現した細菌はFig.1の方法に従って、コロニーの形状、色調、生育種類等を観察し、1つの試料から出来るだけ多種類の菌を選択すべく20～30clonesの菌について、前回生育した同一寒天培地条件下で純粋分離培養を行った。

所定の条件で培養後、再生育を確認し、それらの菌の中で単一cloneにまで純化された菌についてのみ以下に記す方法で菌株の保存を行った。

(3) 純粋分離細菌の超低温保存

前記の方法で単一クローンに純粋分離した細菌は、あらかじめ121、15minオートクレーブ滅菌した50%グリセリン溶液1ml中に生菌体を懸濁し、自立型セラムチューブ

(住友ベークライト社) 中にて、凍結させ、その保存には、超低温メディカルフリーザー(サンヨー Co.MDF792AD) に海洋細菌ライブラリーの標識 NB ナンバーを付与して凍結保存を行った。

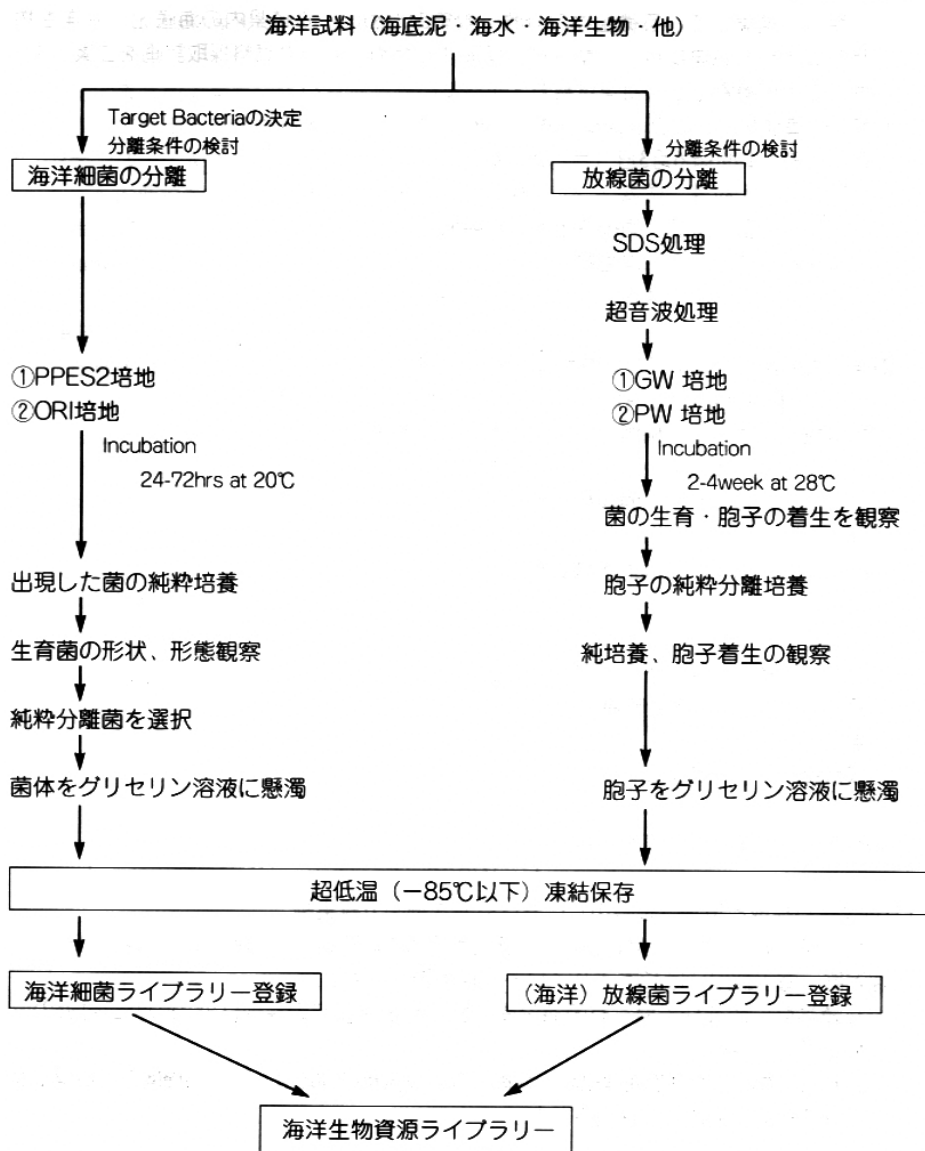


Fig.1 海洋生物資源ライブラリーの構築方法

8-4. 海洋に関わる放線菌の分離及び純粋培養と超低温保存

(1) 放線菌の分離方法

孢子形成している放線菌の発育のためには前述の如く、胞子の休眠の打破と混在する他の細菌数を減少させるために、SDS 処理、超音波処理等の前処理を行い発芽促進させる必要がある。

採取した海洋と沿岸試料からの放線菌の分離は、Fig.1 に記した方法で、まず 0.05% SDS 処理、次に 300W × 1 分間の超音波処理を行い、試料中に存在する胞子の発芽促進、

他の微生物の成育阻止のための前処理を行った。

この前処理試料を2種類の放線菌生育培地、すなわち Glucose Waksman's medium 寒天培地 (GW) と先の PW 寒天培地に塗抹した。

放線菌の生育、胞子の着生まで 28℃ にして 2 ~ 4 週間の培養を行った。

(2) 放線菌の純粋分離方法

前記2種類の培地上に生育してきた放線菌のコロニーの形状、色素産生性、胞子の色調と着生等の菌学的な形態観察を行い、各種の放線菌を選択して以下に述べる方法で純粋分離培養を行った。

個々のコロニーから胞子をかき取り、生理食塩水を用いて懸濁液を作成した。その胞子懸濁液を1白金耳同士の寒天培地に画線して 28℃ で 2 ~ 4 週間の培養終了後、菌の単一性と胞子着生を観察し、単一 clone に純粋分離された菌株について下記の保存を行った。

(3) 放線菌の超低温保存

単一クローンに純粋分離された放線菌は、着生した放線菌胞子を前述の海洋細菌と同様な方法で 50%グリセリン入りセラムチューブに懸濁し、-85℃ にて超低温凍結保存を行った。

8-5. 海洋生物資源ライブラリーの構築

本研究の主題である「海洋生物資源ライブラリーの構築」のために、前述の如く純粋分離培養した海洋細菌はライブラリーの標識記号として NB (Bacteria from Nagasaki Prefecture) 番号、放線菌は NS (Streptomyces from Nagasaki Prefecture) 番号を付与してそれぞれ海洋細菌ライブラリー (NB0001 から)、海洋に関わる放線菌ライブラリー (NS0001 から) として登録した。

これらの両者を合わせて「海洋生物資源ライブラリー」の構築とした。

9. 結果及び考察

9-1. 海洋微生物の分離・収集のための調査研究

(1) 収集する対象微生物の決定

海洋環境においては、ある特定の海域を住みかにはしている生物は、生物どうしの関わり合いを持ち、生物共同体として生活している。これら海洋の栄養環境とそこに棲息する微生物相に関する研究は微生物生態学分野で詳しく研究されている¹⁾。その研究によれば、海洋はきわめて貧栄養状態にあり、そこに棲息する細菌の多くは“Viable but Nonculturable Bacteria in Water, Food and the Environment”であると報告されている²⁾。

そこで本研究では海洋におけるより自然な環境条件すなわち貧栄養条件の下で生存し、しかも従来の細菌と質的に異なる菌も含まれると言われている低栄養細菌群を海洋生物資源ライブラリー構築のために収集する第1のターゲットとした。

さらに、今日までの微生物産物からの薬理活性物質探索研究の結果から、抗生物質をはじめとする多くの生理活性物質や有用酵素を産生する放線菌群も、低分布ながら海洋環

境からの分離報告もあり、ここでは海洋に関わる放線菌群についても収集する対象菌種とした。

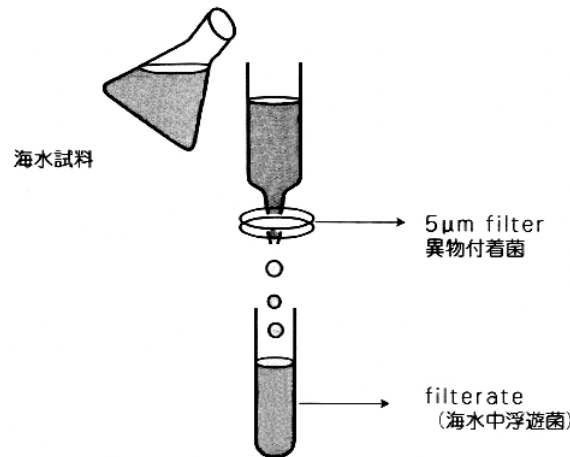
(2) 低栄養細菌の分離条件と培地条件の検討

材料と方法で記載した方法により海水試料中の細菌を付着菌と浮遊菌に濾過分別した後、MW、SBS、PPES2、Zobell と NA の5種類の培地とそれぞれに AM0.3%添加寒天培地の10種類の培地条件における生育総菌数と発育性状の観察を行った。

Table1 にその結果を示した如く、ここで使用した海水試料中の通常寒天培地濃度 (1.5% Bactoagar, Difco) 条件下での各種培地における生育菌数は $2.0 \times 10^2 \sim 9.5 \times 10^3$ cfu/ml であった。

これらの培地の中で PPES と Zobell 培地上には 10^3 cfu/ml と良好な生育菌数を示していた。

Table 1 海洋細菌分離培地条件の検討



Media	付着菌数 (cfu/ml)	備考	海洋浮遊菌数 (cfu/ml)	備考
MW	2.00×10^2	clear	1.51×10^2	clear、菌小さい
MW AM	2.68×10^2	clear、カビ	2.40×10^2	clear、菌小さい
SBS	8.03×10^2	clear	4.60×10^2	clear、菌小さい
SBS AM	8.96×10^3	swarm ×	7.06×10^3	swarm
PPES 2	2.01×10^3	clear	8.10×10^2	clear
PPES 2 AM	3.43×10^3	clear	1.35×10^3	clear
Zobell	2.00×10^3	clear	9.67×10^2	clear
Zobell AM	2.33×10^3	swarm ×	6.72×10^3	swarm 傾向
NA	9.54×10^3	swarm ×	1.70×10^3	swarm ×
NB AM	2.17×10^4	swarm ×	2.70×10^4	swarm ×

Media M W : Modified Winogradsky's Medium

SBS : 海洋細菌選択培地

PPES 2 : 低栄養細菌分離用培地

Zobell : Zobell 2216 培地

NA : Nutrient brlth agar

AM Agar mate (ガラクトマンナン) 0.3%

一方、MW、SBS 培地上での総細菌数は $1.51 \sim 8.03 \times 10^2$ cfu/ml ときわめて生育菌数が少なかった。

富栄養条件の対象として用いた NA 寒天平板上に生育した菌数は、浮遊菌、付着菌それぞれ 1.70×10^3 cfu/ml、 9.54×10^3 cfu/ml であった。

一方固化寒天による菌の生育阻害を軽減する目的で使用した AM 添加条件における各種培地上での出現生菌数は、同一培地との比較において同等または 10 倍程度の生育菌数の増加傾向を示した (Table1)。

これらの生育菌数の増加傾向は、AM の添加効果と判断し、以後の固化条件は Bactoagar (Difco) 0.9% + AgarMate 0.3% 添加条件で各種の培地を作成した。

寒天平板上に生育したコロニーの発育、純粋分離培養実験のしやすさ、混在菌の遊走の有無等の観察の結果から、海洋低栄養細菌分離用培地としては PPES2・50%人工海水・0.3%AM 添加・寒天培地 (PPES2・AM) が最適であると判断した。

通常自然界からの微生物の分離実験においては、異なる培地条件による複数培地で分離することが望ましいので、ここでは上記の PPES2・AM 培地を基本培地としてさらに低栄養条件で、かつ N 源の種類を異にする ORI・AM 培地の 2 種類を用いて実験をすることに決定した。

(3) 海洋試料から放線菌の分離条件の検討

自然界の試料から多数・多種類の放線菌を分離するために、胞子の休眠打破、発芽促進のための超音波処理の検討結果を Table2 に示した。

ここで用いた沿岸由来試料の No.88、No.90 からの放線菌の生育菌数は、出力の小さい超音波発生機 SB50W × 1 分間処理や SB50W × 6 分間処理における出現菌数に比して、出力の大きな機種 SN300W × 1 分間処理において出現する放線菌の数は、前者の 3 ~ 5 倍であった。この結果から、放線菌胞子の良好な発芽のためには、大型で高出力の超音波での前処理が必要であることがわかった (長崎市における海洋微生物分離実験には、この大型機 SN300 は移動できないので、現地での超音波処理実験は出来ないことになった)。

Table 2 放線菌分離に及ぼす超音波処理条件

試料	使用培地	超音波処理条件			備考
		SB 50W 1min	SB 50W 6min	SN 300W 1min	
88	PW	0, 0	1, 5 (3 ± 2)	12, 9 (10.5 ± 1.5)	菌の種類多い
	KR	11, 6 (8.5 ± 2.5)	2, 1 (1.5 ± 0.5)	7, 8 (7.5 ± 0.5)	菌の種類少ない コロニー小さい
90	PW	14, 10 (12 ± 2)	14, 9 (11.5 ± 2.5)	32, 45 (38.5 ± 6.5)	菌の種類多い
	KR	6, 5 (5.5 ± 0.5)	7, 6 (6.5 ± 0.5)	29, 25 (27 ± 2)	菌の種類少ない

出現放線菌数 / plate
 PW : Proline Water Agar
 KR : Krinsky's agar

また、放線菌の分離のために使用培地は PW 培地と KR 培地上の放線菌コロニーの生育、菌数の多少、胞子の着生の状態等を観察した結果、KR 培地では菌の生育が悪く、出現する放線菌の数も少なかった。

一方、PW 培地は多様な菌が出現し、しかも菌数も良好な発現であった。

この結果から今後の放線菌分離のためには PW 培地を使用することにした。

そのほかに、陸上放線菌分離に使用され良好な分離生育培地である Glucose-Waksman's agar medium (GW 培地) も今回の海洋に関わる放線菌の分離培地として採用した。

9-2. 海洋試料と沿岸試料の採取

(1) 海洋試料の採取と現地（長崎市）における微生物研究法の修得

- 1) 長崎県内における海洋試料と沿岸試料の採取を別紙 1 - 1、1 - 2、1 - 3 と、2 - 1、2 - 2、2 - 3 に示した。

これらの計画にもとづき、第 1 回 1996 年 6 月 3 日～6 月 12 日、第 2 回 9 月 24 日～10 月 3 日の、のべ 20 日間にわたり大村湾、橘湾と九十九島における海底泥、海水及び海洋生物試料の採取と長崎半島、西彼杵半島、有明海沿岸試料の採取を実施した。得られた試料は海底泥 43 種類、海水 23 種類、海洋生物（魚腸管）試料 12 種類と沿岸から 38 種類、山土壌試料 2 種類の計 118 種類の試料を採取することが出来た。（Table 3、Table 4、Fig. 2、Fig. 3、Fig. 4、Fig. 5）

- 2) トロール網漁試料の入手

外部の漁業機関から東シナ海におけるトロール網漁による各種魚類の試料 29 種類を入手した。その魚種名と採取地点は Table 5 に示した。

- 3) その他の土壌と植物試料の入手

その他の土壌試料と植物由来試料を 6 種類外部機関から入手した。

4) 現地（長崎市）における微生物研究法の修得

プロジェクト・メンバーの安全のために、基本的な微生物取り扱い方法と基礎技術習得のために以下の項目について実施した。

微生物の基本的取り扱い方法、滅菌・消毒法

海洋微生物分離方法基礎実験

微生物の純粋培養方法

グラム染色と光学顕微鏡による観察

海洋試料から特殊な能力を持つ微生物の選択のための集積培養実験

Table 3 第1回採取海洋及び沿岸試料

	Date	採取地点		水深(m)	種類	性状
1	6/4/96	大村湾	1 長与浦 (32° 51N、129° 52E)	12	海底泥	Mud
2	"	"	2 津水湾 (32° 51N、130° E)	8	"	"
3	"	"	3 竹島沖 (32° 52N、129° 57E)	12	"	"
4	"	"	4 下川原沖 (32° 57N、129° 55E)	12	"	Mud and Sand
5	"	"	5 大串湾 (33° N、129° 45E)	10	"	Mud
6	"	"	6 片島沖 (33° 3N、129° 52E)	11	"	"
7	"	"	7 彼杵沖 (33° 1N、129° 56E)	12	"	Sand
8	"	"	8 白島沖 (32° 53N、129° 56E)	13	"	Mud
9	"	"	9 裸島沖 (32° 53N、129° 49E)	16	"	"
10	"	"	10 横島沖 (33° 3N、129° 48E)	13	"	Small sand
11	"	"	11 大村湾中心部 (33° 1N、129° 52E)	14	"	Mud
12	"	"	12 大村湾中心部 (32° 59N、129° 52E)	16	"	"
13	"	"	13 大村湾中心部 (32° 56N、129° 52E)	20	"	"
14	"	"	1W 長与浦 (32° 51N、129° 52E)	12	海水	
15	"	"	2W 津水湾 (32° 51N、130° E)	8	"	
16	"	"	3W 竹島沖 (32° 56N、129° 57E)	12	"	
17	"	"	12W 大村湾中心部 (32° 59N、129° 52E)	16	"	
18	6/5	"	1 フグ		腸管	
19	"	"	2 アイナメ		"	
20	"	"	3 キス		"	
21	"	"	4 ベラ		"	
22	"	"	二島 表面水		海水	
23	"	"	二島 底水		"	
24	6/6	橘湾	1 網場湾沖 32° 40N、129° 55E	28	海底泥	Mud and Sand
25	"	"	2 向島沖 32° 45N、130° 03E	10	"	"
26	"	"	3 向島沖 32° 44N、130° 03E	38	"	海藻
27	"	"	4 唐比沖 32° 46N、130° 08E	34	"	Mud and Sand
28	"	"	5 小浜沖 32° 44N、130° 08E	36	"	Mud
29	"	"	6 児島沖 32° 41N、130° 08E	33	"	"
30	"	"	7 神ノ瀬沖 32° 41N、130° 04E	32	"	Sand
31	"	"	8 茂木港沖 32° 41N、129° 59E	34	"	Mud and Sand
32	"	"	3W 向島沖 32° 45N、130° 03E	38	海水	
33	"	"	5W 小浜沖 32° 44N、130° 08E	36	"	
34	"	"	6W 児島沖 32° 41N、130° 08E	33	"	
35	"	"	8W 茂木港沖 32° 41N、129° 59E	34	"	
36	"	"	1 アラカブ		腸管	
37	"	"	2 ベラ		"	
38	6/7	長崎半島	1 西彼杵郡野母崎網掛岩付近海岸		沿岸土壌	Stone
39	"	"	2 " 高浜付近河口部		"	Sand
40	"	"	3 " 脇岬砂浜		"	"
41	"	"	4 " 樺島大橋下(海)		"	海藻
42	"	"	5 西彼杵郡三和町川原海岸ため池取水口付近		"	Sand
43	6/10	有明海沿岸	1 北高来郡小長井町今里川河口付近		沿岸土壌	Mud
44	"	"	2 北高来郡高来町湯江川河口付近		"	"
45	"	"	3 諫早市深海川河口付近		"	"
46	"	"	4 諫早市本明川八天町光江橋付近		"	"
47	"	"	5 諫早市本明川不知火橋先堤防付近		"	"
48	"	"	6 南高来郡吾妻町千鳥川干拓堤防付近		"	"
49	"	"	7 南高来郡国見町湯江川河口付近		"	Mud and Sand
50	"	"	8 南高来郡国見町倉地川河口付近		"	"
51	6/11	西彼杵半島	1 長崎市小江の河口付近		沿岸土壌	Stone and Sand
52	"	"	2 長崎市式見式見川河口付近		"	Sand
53	"	"	3 長崎市式見多以良川河口付近		"	Stone and Mud
54	"	"	4 西彼杵郡外海町神浦川河口付近		"	Sand and Mud
55	"	"	5 西彼杵郡大瀬戸町雪浦川河口付近		"	"
56	"	"	6 西彼杵郡大瀬戸町柳多以良川河口付近		"	"

Table 4 第2回採取海洋及び沿岸試

	Date	採取地点		水深(m)	種類	性状
92	9/24/96	長崎半島	1 西彼杵郡野母崎町網掛岩村付近海岸		沿岸	Stone
93	"	"	2 " 高浜付近河口部		"	Stone and Sand
94	"	"	3 " 脇岬砂浜		"	Sand
95	"	"	4 " 樺島大橋下(海)		"	Stone and Sand
96	"	"	5 西彼杵郡三和町川原海岸ため池取水口付近		"	"
97	9/25	大村湾	1 長与浦 32° 51.62N、129° 51.72E	12	海泥	Mud
98	"	"	2 津水湾 32° 50.77N、129° 59.20E	8	"	"
99	"	"	3 竹島沖 32° 52.56N、129° 56.67E	12	"	"
100	"	"	4 下川原沖 32° 57.68N、129° 55.31E	12	"	"
101	"	"	5 大串湾 33° 00.65N、129° 44.75E	10	"	"
102	"	"	6 片島沖 33° 02.81N、129° 51.63E	11	"	"
103	"	"	7 彼杵沖 33° 01.16N、129° 55.41E	12	"	"
104	"	"	8 白島沖 32° 53.33N、129° 56.09E	13	"	"
105	"	"	9 裸島沖 32° 56.88N、129° 55.09E	16	"	"
106	"	"	10 横島沖 33° 03.46N、129° 47.69E	13	"	"
107	"	"	11 大村湾中心部 32° 59.47N、129° 51.42E	14	"	"
108	"	"	12 " 32° 57.02N、129° 55.22E	16	"	"
109	"	"	13 " 32° 56.89N、129° 55.08E	20	"	"
110	"	"	1W 長与浦 32° 51.62N、129° 51.72E	12	海水	底水
111	"	"	2W 津水湾 32° 50.77N、129° 59.20E	8	"	"
112	"	"	3W 竹島沖 32° 52.56N、129° 56.67E	12	"	"
113	"	"	12W 大村湾中心部 32° 57.02N、129° 55.22E	16	"	"
114	9/26	"	1 シジュウゴ		腸管	
115	"	"	2 キス		"	
116	"	"	3 トラギス		"	
117	"	"	4 ベラ		"	
118	"	"	5 シロサバフグ		"	
119	"	"	6 タイ		"	
120	"	"	7 二島 表面水		海水	表面水
121	"	"	8 二島 底水		"	底水
122	9/27	橘湾	1 網場湾沖 32° 44.35N、129° 58.11E	28	海泥	Sand and Mud
123	"	"	2 向島沖 32° 44.46N、129° 58.03E	10	"	Mud
124	"	"	3 向島沖 32° 44.85N、130° 03.63E	38	"	海草
125	"	"	4 唐比沖 32° 45.12N、130° 04.55E	34	"	Mud
126	"	"	5 小浜沖 32° 46.15N、130° 07.81E	36	"	Mud and Sand
127	"	"	6 児島沖 32° 42.75N、129° 56.07E	38	"	Sand
128	"	"	3W 向島沖 32° 44.85N、130° 03.63E	38	海水	表面水
129	"	"	5W 小浜沖 32° 46.15N、130° 07.81E	36	"	"
130	"	"	6W 児島沖 32° 42.75N、129° 56.07E	38	"	"
131	9/30	西彼杵半島	1 長崎市小江の河口付近 32° 45.65N、129° 48.30E		沿岸	Sand and Mud
132	"	"	2 " 式見式見川河口付近 32° 47.16N、129° 47.47E		"	Stone
133	"	"	3 " 式見多以良川河口付近 32° 49.52N、129° 47.05E		"	Sand and Mud
134	"	"	4 西彼杵郡外海町神浦川河口付近 32° 52.64N、129° 41.19E		"	"
135	"	"	5 " 大瀬戸町雪浦川河口付近 32° 55.14N、129° 39.83E		"	"
136	"	"	6 " 大瀬戸町柳多以良川河口付近 32° 59.27N、129° 38.78E		"	"
137	10/1	九十九島	1 南九十九島元ノ島砂浜 33° 09.64N、129° 40.48E		海水	表面水
138	"	"	2 " 鹿子前(元ノ島前面付近) 33° 09.01N、129° 40.59E		"	"
139	"	"	3 " 牧島 33° 09.29N、129° 40.16E		"	"
140	"	"	4 墨床ノ鼻砂浜 33° 09.57N、129° 40.76E		"	"
141	"	"	1 南九十九島元ノ島砂浜		山土壌	団粒
142	"	"	2 "		海泥	Sand
143	"	"	3 " 牧島		山土壌	団粒
144	"	"	"		海泥	Sand
145	"	"	4 墨床ノ鼻砂浜		"	"
146	10/2	有明海沿岸	1 北高来郡小長井町今里川河口付近 32° 57.10N、130° 12.05E		沿岸	Sand and Mud
147	"	"	2 " 高来町湯江川河口付近 32° 53.40N、130° 08.50E		"	Sand and Small Stone
148	"	"	3 諫早市深海川河口付近 32° 51.50N、130° 05.13E		"	Mud
149	"	"	4 " 本明川八天町光江橋付近 32° 52.36N、130° 05.53E		"	"
150	"	"	5 " 本明川不知火橋先堤防付近 32° 50.21N、130° 03.23E		"	団粒(Mud)
151	"	"	6 南高来郡吾妻町千鳥川干拓堤防付近 32° 39.32N、130° 09.14E		"	Mud
152	"	"	7 " 国見町湯江川河口付近 32° 52.25N、130° 16.40E		"	Sand
153	"	"	8 " 国見町倉地川河口付近 32° 51.50N、130° 19.48E		"	Sand and Stone

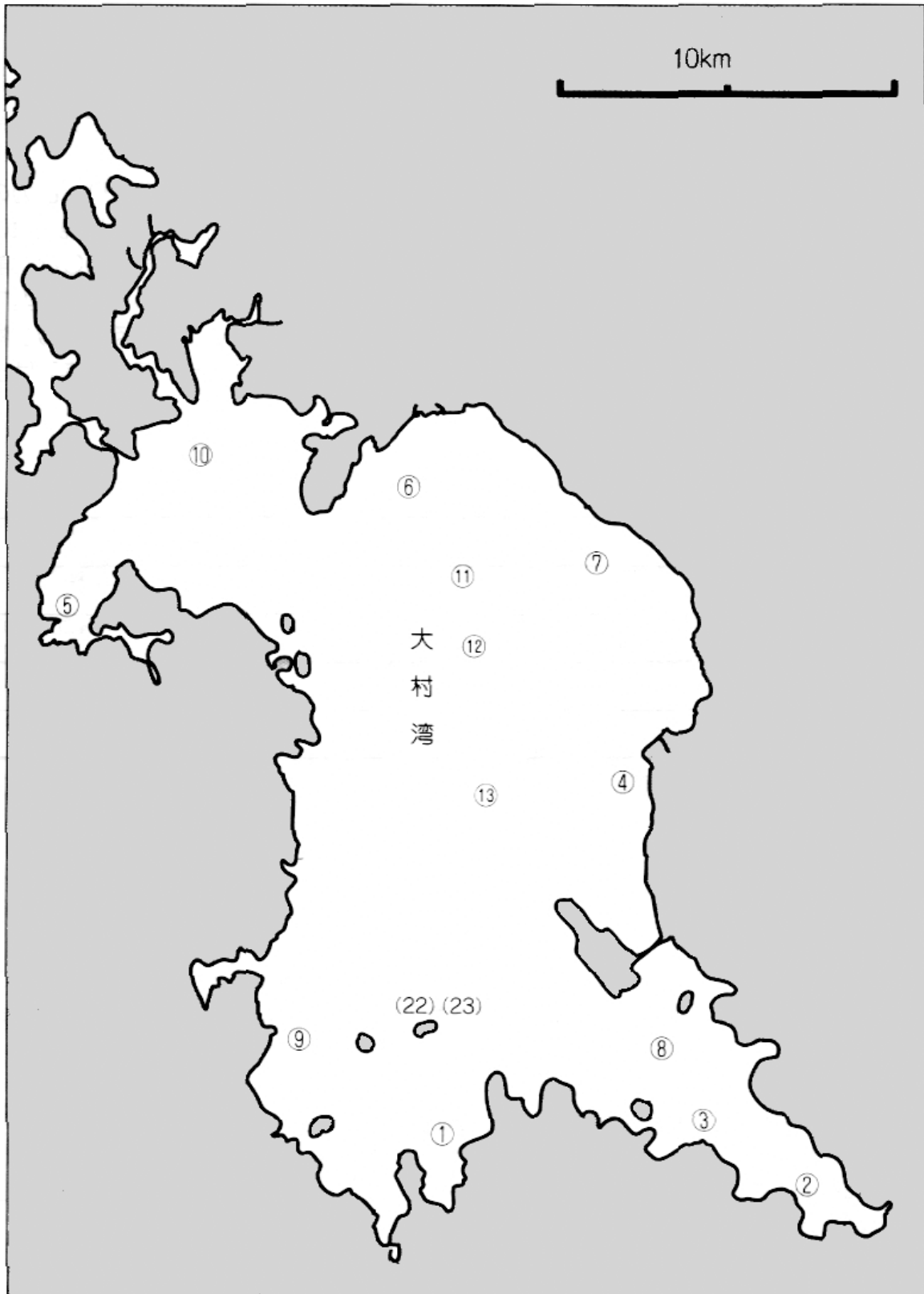


Fig. 2 大村湾における海洋試料採取地点



Fig. 3 橘湾における海洋試料採取地点



Fig. 4 九十九島における海洋試料採取地点



Fig. 5 長崎県沿岸における試料採取地点

Table 5 東シナ海魚類、その他試料

	Date	採取地点				種類	性状	魚種	
57	06/26/96	東シナ海	30°	06.1N	127°	10.5E	腸管	腸管、他内臓物	スケソウ
58	06/17	"	30°	15.5N	127°	17.3E	"	"	レンコ
59	06/19	"	30°	06.1N	127°	13.7E	"	"	ヒメコダイ
60	06/17	"	30°	26.2N	127°	11.9E	"	"	カナガシラ
61	06/26	"	30°	06.1N	127°	10.5E	"	"	アカムツ
62	06/17	"	30°	15.5N	127°	17.3E	"	"	メッキ
63		"					"	"	赤太刀
64	06/15	"	30°	11.3N	127°	07.4E	"	"	アカゲツ
65		"					"	"	アナゴ
66	06/15	"	30°	00.7N	127°	13.5E	"	"	アマダイ
67		"					"	腸管	イトタマガシラ
68		"					"	"	ニジハタ
69		"					"	"	キツネウオ
70		"					"	"	シロダイ
71		"					"	"	オジロバラハタ
72		"					"	"	オジサン
73		"					"	"	ヤシャベラ
74	05/17	"	30°	16.2N	127°	12.0E	"	選別した腸管	オコゼ
75	06/15	"	30°	11.3N	127°	07.4E	"	"	アラカブ
76	06/15	"	30°	00.7N	127°	13.5E	"	"	アンコウ
77	06/18	"	30°	07.3N	127°	17.9E	"	"	太刀魚
78	06/17	"	30°	15.5N	127°	17.3E	"	"	マトウ
79	06/19	"	30°	06.1N	127°	13.7E	"	"	シズ
80	06/15	"	30°	11.3N	127°	07.4E	"	"	メシマ
81	06/11	"	30°	04.1N	127°	10.7E	"	"	ナマズ
82	06/16	"	30°	02.8N	127°	12.8E	"	"	メダカ
83	06/15	"	30°	11.3N	127°	07.4E	"	"	ハモ
84	06/18	"	30°	07.3N	127°	17.9E	"	"	アカメ
85	06/26	"	30°	06.1N	127°	10.5E	"	"	黒マナ
86		舟浮・外離島					沿岸土壌		
87		ナガラ橋下					"		
88		ウタラ川					"		
89		アユハラ川					"		
90		仲間川					"		
91		ライチの枝					木		

(2) 海洋試料中の総細菌数の測定

ここで用いた PPES2・AM 寒天培地と ORI・AM 寒天培地上に生育した海洋細菌の総細菌数の測定結果を第1回試料由来菌を Table 6 に、第2回試料由来総細菌数も Table 7 に東シナ海魚類由来菌数を Table 8 に示した。

これらの結果から、大村湾、橘湾、九十九島の海底泥と海水試料からの総細菌数は、 $3.91 \times 10^2 \sim 3.77 \times 10^6$ cfu/g (ml) であり、各採取地点により生育菌数の分布に大きな差異があった。

沿岸試料からの生育菌数は $2.98 \times 10^3 \sim 5.45 \times 10^6$ cfu/g と高い分布であり、海洋試料よりもベースが1桁高い菌数を示しており、菌の種類も多岐にわたっていた。

海洋生物(魚腸管)からの出現総細菌数は、Table 8 に示した如く、 $5.56 \times 10^3 \sim 3.28 \times 10^8$ cfu/g の生育を示し、多数の菌が検出された。

Table 6 第1回採取海洋及び沿岸試料由来総細菌数と保存株 (NB)

No	Date	場所	種類	性状	総細菌数 (cfu/g)		保存株数	小計	保存No (NB)
					(PPES2)	(ORI)			
1	6/4/96	大村湾	海泥	Mud	8.64E+03	9.16E+03	26		1 - 26
2	〃	〃	〃	〃	2.58E+04	1.93E+04	31		27 - 57
3	〃	〃	〃	〃	1.74E+04	2.09E+04	18		58 - 75
4	〃	〃	〃	Mud and Sand	2.45E+05	1.23E+05	36		76 - 111
5	〃	〃	〃	Mud	1.28E+04	1.06E+04	20		112 - 131
6	〃	〃	〃	〃	1.72E+04	2.36E+04	26		132 - 157
7	〃	〃	〃	Sand	5.63E+04	4.65E+04	39		158 - 196
8	〃	〃	〃	Mud	2.36E+04	2.33E+04	40		197 - 236
9	〃	〃	〃	〃	1.23E+04	1.58E+04	42		237 - 278
10	〃	〃	〃	Small sand	8.54E+04	1.40E+04	26		279 - 304
11	〃	〃	〃	Mud	2.93E+04	2.78E+04	28		305 - 332
12	〃	〃	〃	〃	2.33E+04	1.17E+04	23		333 - 355
13	〃	〃	〃	〃	4.60E+04	4.10E+04	25	380	356 - 380
14	〃	〃	海水	〃	8.14E+03	3.47E+03	21		381 - 401
15	〃	〃	〃	〃	1.50E+04	6.40E+03	45		402 - 446
16	〃	〃	〃	〃	1.37E+04	8.72E+03	26		447 - 472
17	〃	〃	〃	〃	6.89E+02	1.10E+03	27	119	473 - 499
18	6/5	〃	腐苔	〃	2.65E+06	2.96E+06	28		500 - 527
19	〃	〃	〃	〃	2.37E+04	3.09E+04	25		528 - 552
20	〃	〃	〃	〃	8.03E+03	2.31E+04	27		553 - 579
21	〃	〃	〃	〃	5.97E+03	6.59E+03	30	110	580 - 609
22	〃	〃	海水	〃	3.09E+04	8.23E+04	28		610 - 637
23	〃	〃	〃	〃	1.51E+04	6.59E+03	25	53	638 - 662
24	6/6	磯崎	海泥	Mud and Sand	6.17E+02	6.17E+02	24		663 - 686
25	〃	〃	〃	〃	5.25E+03	3.49E+04	23		687 - 709
26	〃	〃	〃	海藻	3.77E+06	5.60E+06	47		710 - 756
27	〃	〃	〃	Mud and Sand	6.07E+04	4.94E+04	25		757 - 781
28	〃	〃	〃	Mud	3.96E+04	1.58E+04	24		782 - 805
29	〃	〃	〃	〃	5.78E+04	1.99E+04	24		806 - 829
30	〃	〃	〃	Sand	4.94E+05	7.62E+05	29		830 - 858
31	〃	〃	〃	Mud and Sand	1.92E+04	2.09E+04	23	219	859 - 881
32	〃	〃	海水	〃	8.74E+03	3.34E+03	21		882 - 902
33	〃	〃	〃	〃	1.90E+04	1.62E+04	36		903 - 938
34	〃	〃	〃	〃	1.28E+04	8.67E+03	28		939 - 966
35	〃	〃	〃	〃	9.30E+03	8.67E+03	27	112	967 - 993
36	〃	〃	腐苔	〃	5.56E+03	1.13E+04	23		994 - 1016
37	〃	〃	〃	〃	8.34E+03	8.64E+03	22	45	1017 - 1038
38	6/7	長崎半島	沿岸	Stone	4.94E+03	1.34E+03	20		1039 - 1058
39	〃	〃	〃	Sand	1.41E+04	1.72E+04	21		1059 - 1079
40	〃	〃	〃	〃	7.41E+03	1.17E+04	25		1080 - 1104
41	〃	〃	〃	海藻	2.33E+06	2.45E+06	25		1105 - 1129
42	〃	〃	〃	Sand	1.26E+05	1.52E+05	25	116	1130 - 1154
43	6/10	有明海沿岸	沿岸	Mud	3.40E+05	5.35E+05	25		1155 - 1179
44	〃	〃	〃	〃	6.38E+05	7.51E+05	25		1180 - 1204
45	〃	〃	〃	〃	3.70E+05	4.53E+05	25		1205 - 1229
46	〃	〃	〃	〃	2.32E+05	2.22E+05	25		1230 - 1254
47	〃	〃	〃	〃	8.26E+04	4.16E+04	17		1255 - 1271
48	〃	〃	〃	〃	5.29E+04	5.50E+04	15		1272 - 1286
49	〃	〃	〃	Mud and Sand	3.34E+04	3.42E+04	23		1287 - 1309
50	〃	〃	〃	〃	4.61E+04	4.10E+04	21	176	1310 - 1330
51	6/11	西彼半島	沿岸	Stone and Sand	1.78E+05	1.63E+05	23		1331 - 1353
52	〃	〃	〃	Sand	3.05E+04	3.55E+04	21		1354 - 1374
53	〃	〃	〃	Stone and Mud	4.51E+06	4.15E+06	28		1375 - 1402
54	〃	〃	〃	Sand and Mud	3.70E+04	5.32E+04	24		1403 - 1426
55	〃	〃	〃	〃	1.47E+04	1.82E+04	25		1427 - 1451
56	〃	〃	〃	〃	5.45E+04	4.23E+04	25	146	1452 - 1476
57	06/26/96	東シナ海	腐苔	腐苔その他内蔵物	2.04E+05	2.04E+05	10		1477 - 1486
58	06/17	〃	〃	〃	2.56E+05	1.84E+05	10		1487 - 1496
59	06/19	〃	〃	〃	4.57E+05	5.46E+05	10		1497 - 1506
60	06/17	〃	〃	〃	3.57E+05	1.83E+05	10		1507 - 1516
61	06/26	〃	〃	〃	2.25E+05	2.25E+05	10		1517 - 1526
62	06/17	〃	〃	〃	1.99E+05	1.84E+05	10		1527 - 1536
63	〃	〃	〃	〃	7.19E+05	5.34E+05	10		1537 - 1546
64	06/15	〃	〃	〃	3.50E+05	3.46E+05	10		1547 - 1556
65	〃	〃	〃	〃	5.89E+05	3.41E+05	10		1557 - 1566
66	06/15	〃	〃	〃	2.94E+05	3.21E+05	10		1567 - 1576
67	〃	〃	腐苔	〃	3.91E+04	3.60E+04	10		1577 - 1586
68	〃	〃	〃	〃	3.50E+04	3.19E+04	10		1587 - 1596
69	〃	〃	〃	〃	8.23E+03	5.15E+03	9		1597 - 1605
70	〃	〃	〃	〃	1.13E+04	6.17E+03	9		1606 - 1614
71	〃	〃	〃	〃	2.47E+04	3.19E+04	10		1615 - 1624
72	〃	〃	〃	〃	7.20E+03	4.12E+03	8		1625 - 1632
73	〃	〃	〃	〃	1.44E+04	2.06E+03	6		1633 - 1638
74	〃	〃	〃	〃	3.33E+05	2.81E+05	10		1639 - 1648
75	05/17	〃	〃	選別した腐苔	2.82E+05	2.93E+05	10		1649 - 1658
76	06/15	〃	〃	〃	2.99E+05	2.74E+05	9		1659 - 1667
77	06/18	〃	〃	〃	6.79E+04	8.34E+04	11		1668 - 1678
78	06/17	〃	〃	〃	9.26E+03	9.26E+03	10		1679 - 1688
79	06/19	〃	〃	〃	9.26E+04	1.17E+05	10		1689 - 1698
80	06/15	〃	〃	〃	1.75E+04	2.06E+04	11		1699 - 1709
81	06/11	〃	〃	〃	1.52E+05	1.30E+05	9		1710 - 1718
82	06/16	〃	〃	〃	2.99E+05	3.24E+05	10		1719 - 1728
83	06/15	〃	〃	〃	3.81E+04	4.32E+04	10		1729 - 1738
84	06/18	〃	〃	〃	7.41E+04	5.76E+04	10		1739 - 1748
85	06/26	〃	〃	〃	7.20E+03	2.06E+03	7	279	1749 - 1755
86	〃	舟浮・外離島	沿岸土壌	〃	4.12E+05	8.23E+05	9		1756 - 1764
87	〃	ナダラ橋下	〃	〃	1.31E+07	1.03E+07	12		1765 - 1776
88	〃	ウタラ川	〃	〃	4.12E+05	2.06E+05	12		1777 - 1788
89	〃	アユハラ川	〃	〃	3.34E+05	2.79E+05	19		1789 - 1807
90	〃	仲岡川	〃	〃	4.42E+06	6.79E+06	16	68	1808 - 1823
91	〃	ライチの枝	木	〃	3.37E+07	3.41E+07	14	14	1824 - 1837
								total	1837

Table 7 第2回採取海洋及び沿岸試料由来総細菌数と保存株 (NB)

No	Date	場所	種類	性状	総細菌数 (cfu/g)		保存株数	小計	保存No(NB)	
					(PPES2)	(ORI)				
92	9/24/96	長崎半島	沿岸土壌	Stone	5.45E+06	4.12E+06	20		2753	- 2772
93	◇	◇	◇	Stone and	1.01E+05	8.96E+04	18		1838	- 1855
94	◇	◇	◇	Sand	2.98E+03	3.40E+03	15		1856	- 1870
95	◇	◇	◇	Stone and	1.54E+07	1.65E+07	20		2773	- 2792
96	◇	◇	◇	◇	2.88E+04	2.45E+04	14	87	1871	- 1844
97	9/25	大村湾	海泥	Mud	1.60E+04	1.03E+04	16		1885	- 1900
98	◇	◇	◇	◇	5.76E+03	6.38E+03	17		1901	- 1917
99	◇	◇	◇	◇	1.96E+03	1.54E+03	20		1918	- 1937
100	◇	◇	◇	◇	8.13E+03	1.11E+04	18		1938	- 1955
101	◇	◇	◇	◇	2.88E+03	1.85E+03	17		1956	- 1972
102	◇	◇	◇	◇	5.87E+03	4.32E+03	20		1973	- 1992
103	◇	◇	◇	◇	6.38E+03	5.56E+03	20		1993	- 2012
104	◇	◇	◇	◇	8.44E+03	5.45E+03	15		2013	- 2027
105	◇	◇	◇	◇	6.48E+03	9.57E+03	16		2028	- 2043
106	◇	◇	◇	◇	1.31E+04	1.01E+04	17		2044	- 2060
107	◇	◇	◇	◇	5.66E+03	2.57E+03	19		2061	- 2079
108	◇	◇	◇	◇	6.38E+03	2.57E+03	19		2080	- 2098
109	◇	◇	◇	◇	7.20E+02	1.13E+03	19	233	2099	- 2117
110	◇	◇	海水	底水	3.91E+02	2.16E+02	20		2118	- 2137
111	◇	◇	◇	◇	7.10E+02	6.17E+02	18		2138	- 2155
112	◇	◇	◇	◇	9.26E+02	6.28E+02	18		2156	- 2173
113	◇	◇	◇	◇	2.26E+02	2.88E+02	16	72	2174	- 2189
114	9/26	◇	腸管		1.18E+07	5.52E+06	20		2190	- 2209
115	◇	◇	◇		2.78E+08	2.96E+08	20		2793	- 2812
116	◇	◇	◇		2.61E+06	2.27E+06	20		2210	- 2229
117	◇	◇	◇		5.88E+06	3.09E+06	20		2230	- 2249
118	◇	◇	◇		3.28E+08	2.90E+08	20		2813	- 2832
119	◇	◇	◇		1.92E+08	2.05E+08	20	120	2833	- 2852
120	◇	◇	海水	表面水	2.99E+04	3.91E+04	20		2853	- 2872
121	◇	◇	◇	底水	1.26E+05	1.28E+05	20	40	2873	- 2892
122	9/27	橋湾	海泥	Sand and	1.89E+04	1.67E+04	20		2250	- 2269
123	◇	◇	◇	Mud	1.10E+04	8.64E+03	19		2270	- 2288
124	◇	◇	◇	海藻	8.69E+04	6.31E+04	19		2289	- 2307
125	◇	◇	◇	Mud	5.35E+03	4.63E+03	19		2308	- 2326
126	◇	◇	◇	Mud and	8.11E+04	8.84E+04	20		2327	- 2346
127	◇	◇	◇	Sand	9.88E+03	7.00E+03	19		2347	- 2365
128	◇	◇	海水	表面水	1.85E+02	1.03E+02	20		2366	- 2385
129	◇	◇	◇	◇	1.03E+02	1.03E+02	19		2386	- 2404
130	◇	◇	◇	◇	6.07E+02	5.45E+02	20	175	2405	- 2424
131	9/30	西彼半島	沿岸土壌	Sand and	1.09E+05	1.02E+05	19		2425	- 2443
132	◇	◇	◇	Stone	5.82E+05	6.05E+05	19		2893	- 2911
133	◇	◇	◇	Sand and	6.20E+04	4.36E+04	13		2444	- 2456
134	◇	◇	◇	◇	2.06E+04	1.71E+04	17		2457	- 2473
135	◇	◇	◇	◇	4.50E+04	4.55E+04	11		2474	- 2484
136	◇	◇	◇	◇	2.15E+04	2.08E+04	12	91	2485	- 2496
137	10/1	九十九島	海水	表面水	2.55E+04	2.65E+04	19		2912	- 2930
138	◇	◇	◇	◇	2.27E+04	2.26E+04	18		2931	- 2948
139	◇	◇	◇	◇	6.97E+04	6.35E+04	19		2949	- 2967
140	◇	◇	◇	◇	2.82E+03	2.62E+03	18		2497	- 2514
141	◇	◇	山土壌	団粒	2.82E+04	2.34E+04	16		2515	- 2530
142	◇	◇	海泥	Sand	4.95E+04	4.35E+04	15		2531	- 2545
143	◇	◇	山土壌	団粒	1.24E+05	1.13E+05	20		2546	- 2565
144	◇	◇	海泥	Sand	2.03E+04	2.68E+04	19		2566	- 2584
145	◇	◇	◇	◇	1.99E+04	1.25E+04	14	158	2585	- 2598
146	10/2	有明海沿岸	沿岸土壌	Sand and	4.60E+04	4.46E+04	18		2599	- 2616
147	◇	◇	◇	Sand and	2.85E+04	1.83E+04	19		2617	- 2635
148	◇	◇	◇	Mud	1.15E+04	8.23E+03	19		2636	- 2654
149	◇	◇	◇	◇	4.01E+03	3.50E+03	20		2655	- 2674
150	◇	◇	◇	団粒 (Mud)	5.49E+04	2.70E+04	20		2675	- 2694
151	◇	◇	◇	Mud	8.18E+04	5.29E+04	18		2695	- 2712
152	◇	◇	◇	Sand	1.21E+04	1.04E+04	20		2713	- 2732
153	◇	◇	◇	Sand and	2.18E+04	1.50E+04	20	154	2733	- 2752
Total								1130		

Table 8 東シナ海魚類、その他試料由来総細菌数と保存株 (NB)

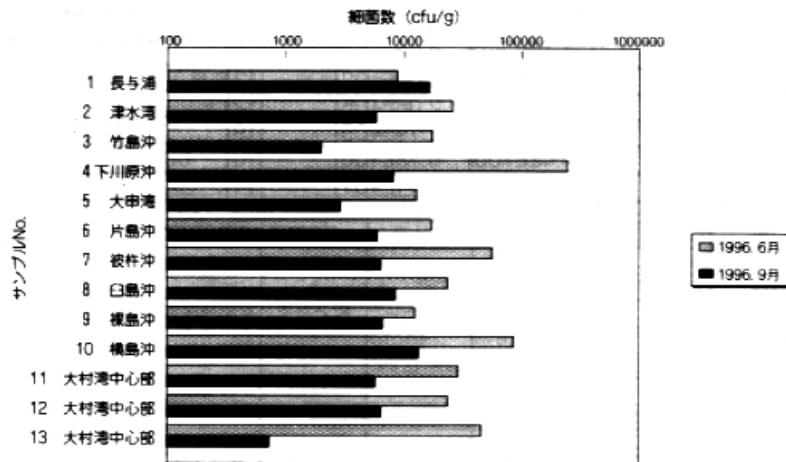
No	Date	場所	種類	性状	総細菌数 (cfu/g)		保存株数	小計	保存No (NB)
					(PPES2)	(ORI)			
57	06/26/96	東シナ海	腸管	腸管と他内蔵物	2.04E+05	2.04E+05	10		1477 - 1486
58	06/17	〃	〃	〃	2.56E+05	1.84E+05	10		1487 - 1496
59	06/19	〃	〃	〃	4.57E+05	5.46E+05	10		1497 - 1506
60	06/17	〃	〃	〃	3.57E+05	1.83E+05	10		1507 - 1516
61	06/26	〃	〃	〃	2.25E+05	2.25E+05	10		1517 - 1526
62	06/17	〃	〃	〃	1.99E+05	1.84E+05	10		1527 - 1536
63		〃	〃	〃	7.19E+05	5.34E+05	10		1537 - 1546
64	06/15	〃	〃	〃	3.50E+05	3.46E+05	10		1547 - 1556
65		〃	〃	〃	5.89E+05	3.41E+05	10		1557 - 1566
66	06/15	〃	〃	〃	2.94E+05	3.21E+05	10		1567 - 1576
67		〃	〃	腸管	3.91E+04	3.60E+04	10		1577 - 1586
68		〃	〃	〃	3.50E+04	3.19E+04	10		1587 - 1596
69		〃	〃	〃	8.23E+03	5.15E+03	9		1597 - 1605
70		〃	〃	〃	1.13E+04	6.17E+03	9		1606 - 1614
71		〃	〃	〃	2.47E+04	3.19E+04	10		1615 - 1624
72		〃	〃	〃	7.20E+03	4.12E+03	8		1625 - 1632
73		〃	〃	〃	1.44E+04	2.06E+03	6		1633 - 1638
74	05/17	〃	〃	選別した腸管	3.33E+05	2.81E+05	10		1639 - 1648
75	06/15	〃	〃	〃	2.82E+05	2.93E+05	10		1649 - 1658
76	06/15	〃	〃	〃	2.99E+05	2.74E+05	9		1659 - 1667
77	06/18	〃	〃	〃	6.79E+04	8.34E+04	11		1668 - 1678
78	06/17	〃	〃	〃	9.26E+03	9.26E+03	10		1679 - 1688
79	06/19	〃	〃	〃	9.26E+04	1.17E+05	10		1689 - 1698
80	06/15	〃	〃	〃	1.75E+04	2.06E+04	11		1699 - 1709
81	06/11	〃	〃	〃	1.52E+05	1.30E+05	9		1710 - 1718
82	06/16	〃	〃	〃	2.99E+05	3.24E+05	10		1719 - 1728
83	06/15	〃	〃	〃	3.81E+04	4.32E+04	10		1729 - 1738
84	06/18	〃	〃	〃	7.41E+04	5.76E+04	10		1739 - 1748
85	06/26	〃	〃	〃	7.20E+03	2.06E+03	7	279	1749 - 1755
86		舟浮・外麗島	沿岸土壌		4.12E+05	8.23E+05	9		1756 - 1764
87		ナダラ橋下	〃		1.31E+07	1.03E+07	12		1765 - 1776
88		ウタラ川	〃		4.12E+05	2.06E+05	12		1777 - 1788
89		アユハラ川	〃		3.34E+05	2.79E+05	19		1789 - 1807
90		仲唐川	〃		4.42E+06	6.79E+06	16	68	1808 - 1823
91		ライチの枝	木		3.37E+07	3.41E+07	14	14	1824 - 1837
total								361	

Table 9 大村湾における総細菌数の季節変動

No	調査地点	水深 (m)	培地 PPES2		培地 ORI	
			1996.6月	1996.9月	1996.6月	1996.9月
1	1 長与浦 (32° 51N, 129° 52E)	12	8.64E+03	1.60E+04	9.16E+03	1.03E+04
2	2 津水湾 (32° 51N, 130° E)	8	2.58E+04	5.76E+03	1.93E+04	6.38E+03
3	3 竹島沖 (32° 52N, 129° 57E)	12	1.74E+04	1.96E+03	2.09E+04	1.54E+03
4	4 下川原沖 (32° 57N, 129° 55E)	12	2.45E+05	8.13E+03	1.23E+05	1.11E+04
5	5 大串湾 (33° N, 129° 45E)	10	1.28E+04	2.88E+03	1.06E+04	1.85E+03
6	6 片島沖 (33° 3N, 129° 52E)	11	1.72E+04	5.87E+03	2.36E+04	4.32E+03
7	7 彼杵沖 (33° 1N, 129° 56E)	12	5.63E+04	6.38E+03	4.65E+04	5.56E+03
8	8 白島沖 (32° 53N, 129° 56E)	13	2.36E+04	8.44E+03	2.33E+04	5.45E+03
9	9 裸島沖 (32° 53N, 129° 49E)	16	1.23E+04	6.48E+03	1.58E+04	9.57E+03
10	10 横島沖 (33° 3N, 129° 48E)	13	8.54E+04	1.31E+04	1.40E+04	1.01E+04
11	11 大村湾中心部 (33° 1N, 129° 52E)	14	2.93E+04	5.66E+03	2.78E+04	2.57E+03
12	12 大村湾中心部 (32° 59N, 129° 52E)	16	2.33E+04	6.38E+03	1.17E+04	2.57E+03
13	13 大村湾中心部 (32° 56N, 129° 52E)	20	4.60E+04	7.20E+02	4.10E+04	1.13E+03
14	1W 長与浦 (32° 51N, 129° 52E)	12	8.14E+03	3.91E+02	3.47E+03	2.16E+02
15	2W 津水湾 (32° 51N, 130° E)	8	1.50E+04	7.10E+02	6.40E+03	6.17E+02
16	3W 竹島沖 (32° 52N, 129° 57E)	12	1.37E+04	9.26E+02	8.72E+03	6.28E+02
17	12W 大村湾中心部 (32° 59N, 129° 52E)	16	6.89E+02	2.26E+02	1.10E+03	2.88E+02
22	二島 表面水		3.09E+04	2.99E+04	8.23E+04	3.91E+04
23	二島 底水		1.51E+04	1.26E+05	6.59E+03	1.28E+05

(cfu/g)

Fig.6 大村湾海底泥における細菌数の季節変動



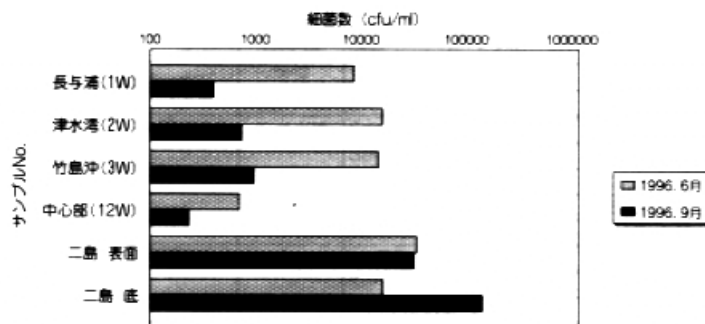
しかし、出現した plate 上の細菌種は2～3種類であり、試料によっては単一菌の純培養状態の生育も認められた。トロール漁における食性の異なる漁種について細菌数を測定したが、魚の腸管に常在している腸内細菌の種類はきわめて少ないことが明らかとなった。

大村湾の第1回(6月)と第2回(9月)の海洋試料の採取において、同一地点の試料を採取することが出来たので、これらの環境におけるマイクロフローラの季節変動を測定することが出来た。Table 9、Fig. 2、Fig. 6 に示した如く、ここで調査した13地点の海底泥試料では水深12mの長与浦(試料No. 1)における6月と9月の総細菌数はほぼ同数であったが、他の12地点における細菌数を比較すると6月採取試料由来の総細菌数は9月由来の3～64倍多く検出された。それらは地点4：下川原沖(水深12m)や地点13：大村湾中心部(水深16m)で特に顕著であり、それぞれ9月菌数の30倍、64倍の菌数を示していた。

さらに、6月試料から生育してくる細菌も多様であり、特に Agarose 分解活性等を持つ菌の発現が多数の試料でみられた。

Table 9、Fig. 7 は、海水における細菌数の季節変動を示した。

Fig.7 大村湾海水における細菌数の季節変動



採取海水試料は地点 1、2、3、12 における海水と同一地点・二島地点における表面水 22 と底水 23 を用いた。地点 1（長与浦）における総細菌数は、6 月では海底泥の菌数とほぼ同数存在していたが（ 8.1×10^3 cfu/ml）、9 月採取海水では 3.91×10^2 cfu/ml の菌数を示し、これは 6 月の 1/20 量の生菌数であり、また同時期（9 月）の海底泥の菌数の 1/40 量であった。9 月における海水中の菌の減少傾向は調査したほかの地点、2：津水湾、3：竹島沖、12：大村湾中心部の海水試料でも見られた（Table 9、Fig. 2、Fig. 7）。

6 月試料では地点 1、2、3 における海水中の菌数は、同一地点の海底泥試料のそれとほぼ同数の発現が見られたが、しかし 9 月期の試料中の海水中の細菌数は 1/8 ~ 1/41 に減少しており、9 月期の試料中の海水中の細菌数は夏期を過ぎると海底泥よりも海水中の総細菌数の急激な減少が認められた。

同一地点の表面水と底水の細菌数の比較（試料 22：二島表面水、試料 23：底水）では 6 月、9 月期ともに同様な菌数を示しており、この地点における表面と底部の総細菌数には差異がなかった。

しかし、9 月期の底水中の細菌は 6 月期の 8 倍の生育を示し、増加傾向であった。

これらの結果から、大村湾における微生物の活動は春先から 6 月にかけての気温の上昇とともに活発になり、総細菌数も増加するのであろうと考えられる。

夏期を過ぎ 9 月になると、生育する細菌は減少傾向を示し、海泥中よりもむしろ海水中の菌数の減少が著しい。

6 月期試料から出現した菌の種類・活性発現などの観察結果からも、この海域における微生物収集のための試料採取は春先から 6 月頃が適当であり、この時期の試料から多種類・多様な活性を持つ細菌が得られると思われる。

9-3 . 海洋細菌の分離、純粋培養と分離株の超低温保存

各採取試料から発現した海洋細菌種は、2 種類の培地（PPES2・AM、ORI・AM）を用いて、コロニーの観察、形態、菌の種類等を観察し、出来るだけ多種類の細菌を分離収集するために、生育した同一培地を用いてそれらの菌の純粋分離培養、再生育を確認した。採取した 153 種類の海洋・沿岸試料から分離した海洋細菌総数は 2967 株であった（Table 10）。

Table 10 採地地域別の分離菌数・放線菌数

	分 離 細 菌 数			分 離 放 線 菌 数		
	第 1 回	第 2 回	計	第 1 回	第 2 回	計
大 村 湾	662	465	1127	10	9	19
橘 湾	376	175	551	15	4	19
九十九島		158	158		37	37
長崎半島	116	87	203	10	52	62
有明海沿岸	176	154	330	56	61	117
西彼杵半島	146	91	237	47	103	150
東シナ海	279		279			0
その他・沿岸土壌	82		82	125		125
合 計	1837	1130	2967	263	266	529

全試料を通じて1試料からの分離細菌株数は 19.7 ± 7.2 株であった。

その内訳は大村湾に棲息する細菌 1127 株、茂木・橘湾由来 551 株、九十九島試料から 158 株の細菌と東シナ海魚類試料から 279 株の分離であり海洋試料からは 2115 株 (71.3%) の分離であった (Table 10)。

沿岸試料については、長崎半島試料から 203 株、有明海沿岸試料から 330 株、西彼杵半島試料から 237 株、その他の沿岸試料から 82 株の、合計 852 株 (28.7%) の細菌を分離・収集することが出来た。これらの分離・純化された菌株は、グリセリン溶液に懸濁し - 85 において超低温保存を行った。

9-4 . 海洋に関わる放線菌の分離と純粋培養及び超低温保存

海洋に関わる放線菌に関わる放線菌の分離・収集は、東シナ海の魚類試料 (29 種類) をのぞく 124 種類の試料を用いて行った。

用いた 2 種類の培地 (GW、PW) に出現した放線菌の単孢子分離、純粋分離培養 (純化) を行い、収集・保存した放線菌数を (Table 11、Table 12) に示した。

ここで、分離・収集した総放線菌数は 529 株であり、それらは沿岸汽水域由来株 407 株 (76.9%)、海洋試料由来 68 株 (12.9%)、その他土壌由来 54 株 (10.2%) であった。

ここで得られた放線菌 529 株はグリセリン溶液に懸濁し - 85 の凍結保存を行った。

今回分離された放線菌の多くは、沿岸汽水域試料から単離されたものであった。このことから放線菌の生活圏は陸上土壌であることが伺われる。

海底泥、海洋試料から分離された 68 株の放線菌は、特に海洋環境に馴化した放線菌と考えられ、それらの代謝や活性物質産生に興味を持たれる。

Table 11 第1回採取海洋・沿岸及びその他試料由来放線菌数と保存数

No	Date	採取場所	種類	性状	放線菌数 (cfu/200 μ L)		保存株数	小計	ライブラリ-No(NS)	
					GW	KR				
1	6/4/96	大村湾	海泥	Mud						
2	〃	〃	〃	〃						
3	〃	〃	〃	〃						
4	〃	〃	〃	Mud and Sand	2		2		1-2	
5	〃	〃	〃	Mud			1		3	
6	〃	〃	〃	〃	4	2	2		4-5	
7	〃	〃	〃	Sand		1				
8	〃	〃	〃	Mud			2		6-7	
9	〃	〃	〃	〃			2		8-9	
10	〃	〃	〃	Small sand						
11	〃	〃	〃	Mud			1		10	
12	〃	〃	〃	〃						
13	〃	〃	〃	〃						
14	〃	〃	海水							
15	〃	〃	〃							
16	〃	〃	〃							
17	〃	〃	〃							
22	6/6	〃	海水							
23	〃	〃	〃					10		
24	6/6	橘湾	海泥	Mud and Sand			7		11-17	
25	〃	〃	〃	〃			1		18	
26	〃	〃	〃	海草						
27	〃	〃	〃	Mud and Sand			1		19	
28	〃	〃	〃	Mud						
29	〃	〃	〃	〃	4	2	4		20-23	
30	〃	〃	〃	Sand						
31	〃	〃	〃	Mud and Sand	1		2		24-25	
32	〃	〃	海水							
33	〃	〃	〃							
34	〃	〃	〃							
35	〃	〃	〃					15		
38	6/7	長崎半島	沿岸	Stone						
39	〃	〃	〃	Sand	5.5	6.5	5		26-30	
40	〃	〃	〃	〃						
41	〃	〃	〃	海草	2		1		31	
42	〃	〃	〃	Sand	5	*1	4	10	32-35	
43	6/10	有明海沿岸	沿岸	Mud	62	28	8		36-43	
44	〃	〃	〃	〃	*49	38	5		44-48	
45	〃	〃	〃	〃	27	21.5	5		49-53	
46	〃	〃	〃	〃	4	4	4		54-57	
47	〃	〃	〃	〃	4	18	4		58-61	
48	〃	〃	〃	〃	52		3		62-64	
49	〃	〃	〃	Mud and Sand	20		12		65-76	
50	〃	〃	〃	〃		38	15	56	77-91	
51	6/11	西彼杵半島	沿岸	Stone and Sand	29.5		9		92-100	
52	〃	〃	〃	Sand	9	2	7		101-107	
53	〃	〃	〃	Stone and Mud	31	10	12		108-119	
54	〃	〃	〃	Sand and Mud	6	*2	4		120-123	
55	〃	〃	〃	〃	4	1	2		124-125	
56	〃	〃	〃	〃	12		13	47	126-138	
86		舟浮・外灘島					1		139	
87		ナダラ橋下					11		140-150	
88		ウタラ川					11		151-161	
89		アユハラ川					19		162-180	
90		仲間川					36		181-216	
91		ライチの枝					47	125	217-263	
Total							263			

Sample 200 μ l 当たりの出現コロニー数

* : エーゼ分離プレート

GW : Glucose-Waksman's medium

KR : Krinsky's agar

Table 12 第2回採取海洋・沿岸試料由来放線菌数

No	Date	場所	種類	性状	放線菌数 (cfu/200 μ L)		保存株数	小計	マイクロー-No(NS)	
					(GW)	(PW)				
92	9/24/96	長崎半島	沿岸土壌	Stone		1	5		307	311
93	〃	〃	〃	Stone and Sand		6	8		312	320
94	〃	〃	〃	Sand						
95	〃	〃	〃	Stone and Sand	2		8		321	327
96	〃	〃	〃	〃	90	75	31	52	328	358
97	9/25	大村湾	海泥	Mud						
98	〃	〃	〃	〃						
99	〃	〃	〃	〃	2					
100	〃	〃	〃	〃	1	3	1		264	
101	〃	〃	〃	〃	1	1	1		265	
102	〃	〃	〃	〃	2		5		266	270
103	〃	〃	〃	〃	1					
104	〃	〃	〃	〃	3					
105	〃	〃	〃	〃	(4)	(1)				
106	〃	〃	〃	〃	3		1		271	
107	〃	〃	〃	〃	1					
108	〃	〃	〃	〃	2					
109	〃	〃	〃	〃	1		1	9	272	
110	〃	〃	海水	底水						
111	〃	〃	〃	〃						
112	〃	〃	〃	〃						
113	〃	〃	〃	〃						
120	〃	〃	海水	表面水						
121	〃	〃	〃	底水						
122	9/27	橘湾	海泥	Sand and Mud	1		1		273	
123	〃	〃	〃	Mud	6					
124	〃	〃	〃	海草						
125	〃	〃	〃	Mud	2		3		274	276
126	〃	〃	〃	Mud and Sand	3					
127	〃	〃	〃	Sand	3					
128	〃	〃	海水	表面水						
129	〃	〃	〃	〃						
130	〃	〃	〃	〃				4		
131	9/30	西彼半島	沿岸土壌	Sand and Mud	2		5		359	363
132	〃	〃	〃	Stone	16	8	24		277	300
133	〃	〃	〃	Sand and Mud	21	14	22		364	385
134	〃	〃	〃	〃	33	10	9		386	394
135	〃	〃	〃	〃	17	26	16		395	410
136	〃	〃	〃	〃	1	6	27	103	411	437
137	10/1	九十九島	海水	表面水		4	1		438	
138	〃	〃	〃	〃						
139	〃	〃	〃	〃						
140	〃	〃	〃	〃						
141	〃	〃	山土壌	団粒	2		3		301,439	440
142	〃	〃	海泥	Sand	3	(4)	5		441	445
143	〃	〃	山土壌	団粒	19	(13)	4		446	449
144	〃	〃	海泥	Sand	7	2	13		450	462
145	〃	〃	〃	〃	4		11	37	463	473
146	10/2	有明海沿岸	沿岸土壌	Sand and Mud	20	(50)	5		302	306
147	〃	〃	〃	Sand and Small S	25	20	22		474	495
148	〃	〃	〃	Mud	2	(15)	15		496	510
149	〃	〃	〃	〃	4	(4)	15		511	525
150	〃	〃	〃	団粒 (Mud)	4					
151	〃	〃	〃	Mud			4		526	529
152	〃	〃	〃	Sand						
153	〃	〃	〃	Sand and Stone		(1)		61		

(): cfu/100 μ l

total 266

9-5. 海洋生物資源ライブラリーの構築

本事業における「海洋生物資源ライブラリー」の構築のために、前述の如く、海洋に棲息する微生物の分離・収集のために、長崎県内における海洋及び沿岸試料の採取を2回実施した。

さらに、東シナ海におけるトロール漁、魚類試料とその他の試料を入手した。

Table 13 に示した如く、それらは海底泥試料 43 種類、海水試料 23 種類海洋生物（魚類）試料 41 種類であり、長崎県内の大部分の地域から収集した沿岸試料は 38 種類であった。その他の土壌試料 8 種類を得て、合計 153 種類であった。

これら海洋に関わる試料から海洋細菌と放線菌を分離し、純化した菌の凍結保存の登録細菌数は、NB0001 から NB2967 の 2967 株であった (Fig.8、Table 6、Table 7、Table 8)。

Table 13 採取海洋試料別ライブラリー登録株数

採取場所	種類	サンプル数	細菌	第1回サンプリング (1996.6月)		第2回サンプリング (1996.9月)	
				放線菌	サンプル数	細菌	放線菌
大村湾	海底泥	13	380	10	13	233	9
	海水	6	172		6	112	
	魚腸管	4	110		6	120	
橘湾	海底泥	8	219	13	6	116	4
	海水	4	112	2	3	59	
	魚腸管	2	45				
長崎半島	沿岸	5	116	10	5	87	52
有明海沿岸	沿岸	8	176	56	8	154	61
西彼杵半島	沿岸	6	146	47	6	91	103
九十九島	海底泥				3	48	29
	海水				4	74	1
	土壌				2	36	7
	小計	56	1476	138	62	1130	266
東シナ海	魚腸管	29	276				
その他	土壌、他	6	82	125			
	小計	35	361	125			
				合計	153	2967株	529株

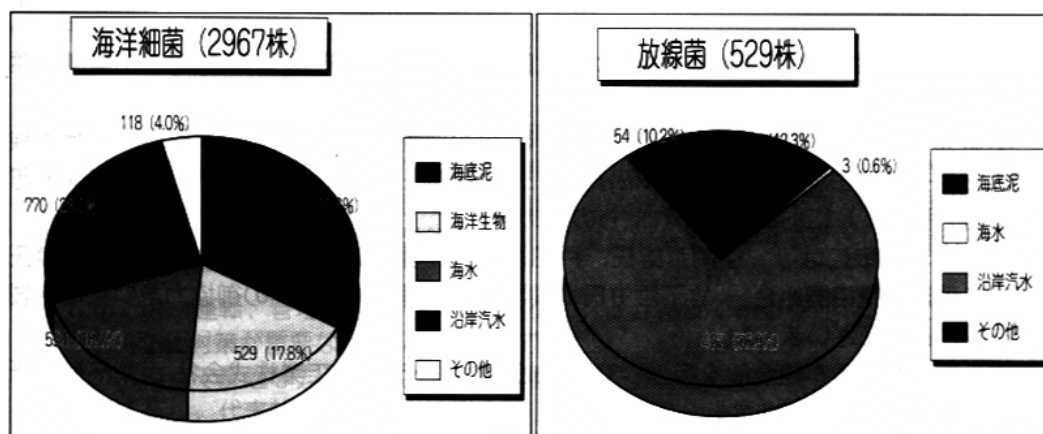


Fig.8 海洋生物資源ライブラリー登録微生物数と分離源

Fig.8 に示した如く、それらの株の内訳は海底泥試料 996 株 (33.6%)、海水由来 529 株 (17.8%)、海洋生物 (魚腸管) 由来 554 株 (18.7%)、沿岸汽水域由来 770 株 (26.0%)、土壌その他由来 118 株 (4.0%) の分離頻度であった。

今回分離登録した細菌の中で海洋由来株は 2079 株 (70.1%) を占めるものであった。

一方、海洋に関わる放線菌の分離は、第 1 回試料から 138 株、第 2 回採取試料から 266 株、その他の土壌等から 125 株合計 529 株分離・収集することが出来た (Fig.8)。

ここで分離収集された放線菌の多くは (407 株、76.9%) 沿岸汽水域試料から得られたものであり、放線菌の棲息の場として陸生であることが示唆された。

しかし今回の実験では大村湾、橘湾、九十九島の海底泥や海水試料から、68 株の放線菌が分離されており、これらの菌は特に海洋環境に馴化した放線菌と考えられ、その代謝や活性物質産生に興味を持たれる。ここで収集した放線菌 529 株を NS0001 から NS0529 として海洋放線菌ライブラリーに登録した。

この研究において分離・収集した海洋細菌 NB0001 ~ NB2967 の 2967 株と放線菌 NS0001 ~ NS0529 の 529 株をライブラリー登録して、全登録微生物株数 3496 株について本事業における「海洋生物資源ライブラリー」の構築をはかった。

10. 今後の展開

本事業で構築した海洋生物資源ライブラリーは、微生物資源ライブラリーとしての第一歩であり、これらの資源 (菌株) の有効利用と適切な維持管理が必要である。

これらのライブラリーの利用により多種多様な薬理活性物質の探索研究、各種の有用酵素の開発研究等の産物への応用が可能となるであろう。

また特殊な能力を持つ微生物の選択分離により、地球環境の浄化等の微生物そのものの産業利用へと発展させることが出来ると考えている。

ここで分離・収集した海洋低栄養細菌の中にはその生育や生態について未知の菌種が多く存在すると考えられ、これらの細菌の長期的な安定保存には解決しなければならない課題がいくつも存在する。今後、これらの菌の安定保存条件の研究を行ってゆかなければならないであろう。

さらに今後これらのライブラリーに登録された細菌の分類・同定研究を行い、分別して利用しやすいライブラリーとする必要もある。

今後海洋微生物資源ライブラリーの作成を続け、資源の積み上げ、保存株数の増加を継続的に実施することにより、より充実した価値のある「海洋生物資源ライブラリー」となるであろう。

謝 辞

本研究の機会を与えてくださいましたプロジェクトリーダーである長崎大学薬学部渡邊正己教授に深く感謝致します。本研究を行うにあたり、長崎県内における 2 回の海洋試料の採取及び現地の分離実験は、三菱長崎機工株式会社の好意により、三菱長崎機工株式会社研究室 (長崎市深堀町 1 丁目 2 番地 1) において行われたものである。

海洋試料採取には、空閑哲雄氏、戸田忍氏（三菱長崎機工株式会社）、福田久孝氏（長工醤油味噌協同組合）、竹下哲史氏（科学技術振興事業団）の御協力をいただき誠にありがとうございました。

本事業における事務全般を担当していただいたポーラ化成工業株式会社医薬品研究所の近藤智紀氏に感謝します。

11. 引用文献

- 1) 海洋科学 20 (2), 68 1988; 石田祐三郎
- 2) 日本細菌学会誌 51 (1), 54 1996; R. R. Colwell

12. 研究業績

12-1. 原著論文 なし

12-2. 総説など なし

12-3. 国際学会発表 なし

12-4. 国内学会発表 なし

12-5. 新聞など なし。

12-6. 特許 なし。

13.

CONSTRUCTION OF A LIBRARY FOR MARINE BIOLOGICAL RESOURCES
POLA PHARMA CEUTICAL R&D LABORATORIES, POLA CORPORATION
560 KASHIO-CHO, TOTSUKA-KU, YOKOHAMA 244, JAPAN.

Katsumi Hasuda, Hidenori Ichige, Yoko Ohta and Takuji Nakashima

Abstract

Marine environments are nutritionally poor as compared with land space, therefore many unique forms of life are present. In this study, we decided to collect facultative oligotrophic bacteria and streptomycetes to construct a marine biological resources library.

We collected sea-muds, sea-waters, and biological materials from the area of Omura-bay, Tachibana-bay, and Kujukushima-islands in Nagasaki prefecture; soils from the coast of Nagasaki-peninsular, Nishisonogi-peninsular and Ariake-kai as the sources of microorganisms.

The manipulations of gathering were performed in June and September in each area.

We used that two different media, PPES2 and ORI, would be useful for the isolation of facultative oligotrophic marine bacteria through our investigation.

We employed the medium which containing 0.3% Agar-mate (glactomannane) in 50% artificial sea-water to reduce agar concentration. Glucose-Waksman's agar medium (GW) and Proline-Water agar medium (PW) were used for the isolation and purification of streptomycetes. The 2967 strains of bacteria were isolated from 153 marine samples and registered as a bacterial resources library with registration number NB (Bacteria from Nagasaki prefecture) 0001 to NB2967. The library was composed as following: 996 bacterial strains from sea-muds (33.6%), 529 strains from sea-waters (17.8%), and 554 from intestine contents of fishes (18.7%) obtained from Omura-bay, Tachibana-bay and Kujukushina-islands; 770 from sea-shore samples (26.0%) obtained from the coast of Nagasaki-peninsular, Nishisonogi-peninsular and Ariake-kai and 118 from the other soils (3.9%).

On the other hand, the 529 strains of streptomycetes, related to sea environments, were isolated and registered as a streptomycetes resources library with registration number NS (Streptomycetes from Nagasaki prefecture) 0001 to NS0529. The library is composed as following: 65 strains from sea-muds (12.3%) and 3 from sea-waters (0.6%); 407 from sea-shore (76.9%) and 54 from the other soils (10.2%). The 68 strains isolated from sea-muds and sea-water would be especially acclimatized to marine environmental condition. We are interested in their metabolites as bioactive substance, because they may possess some remarkable secondary metabolic systems.

The 3496 microorganisms in total were stored as the marine biological resources library in a deep freezer (below -85°C).