

オキヒイラギの発光細菌に関する研究I : 発光の持続性について

末広, 澄夫
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21524>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 18 (1), pp.103-108, 1960-10. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



オキヒイラギの発光細菌に関する研究 I

発光の持続性について

末 広 澄 夫

Studies on the luminous bacterium of *Leiognathus rivulatus* I On the duration of the bacterial luminescence

Sumio Suehiro

緒 言

ヒイラギ科の魚の発光については羽根田^{1,2,3)}の詳細な研究がある。同氏は「これらの魚の発光器官は食道の一部の周囲を取り巻くようにしてついでおり、食道に2カ所の開口部がある。発光細菌はこの器官の中に純粋培養の形で入っている。」と述べている。発光器官は心臓、肝臓と大きな血管束で結ばれており、そのことにより発光細菌の増殖、発光が行なわれるものと思う。したがって発光細菌は宿主の魚の生理にかなりの影響をあたえるであろう。ヒイラギ科の魚の発光器官はオキヒイラギを除いて他はすべて雌雄同大である。オキヒイラギは成熟すれば雄のものの方が雌のものよりはるかに大きくて体重の3%にも達するものがある。発光細菌がヒイラギ科の魚にあたえる影響を研究するにあたって、上述のように発光器官の大きいこと（雄）と、雌雄で大きさの異なることが好都合と思つて研究の対象に選んだ。

著者は今回分離した発光細菌の炭素源、窒素源の資化性を調べ、あわせてこれらの炭素源、窒素源の相違がこの細菌の発光の持続性にどのような影響をあたえるかを検討した結果を報告する。

実 験 の 部

I. 発光細菌の分離と菌学的性質

生きているオキヒイラギを脊開きにして発光器官を無菌的に切り取り、すりつぶして殺菌海水に懸濁させ、硝子棒でシャーレ中の固体培地上に塗布した。（培地はペプトン1%、肉エキス1%、寒天1.5%を海水に溶かし、pHを7.3にしたもの）23°Cで2日間培養し、現われた集落を暗室で調べ、よく発光するものから釣菌し、平板培養をくり返して純離した。この菌の菌学的性質はつぎのようであつた。

菌の形態：やや湾曲した桿菌で端は丸く、 $0.7 \sim 1.2 \times 1.1 \sim 1.8 \mu$ 、グラム陰性・孢子、capsuleなし、極性の単毛を持つ。海水ブイヨン寒天上の集落：小円、平滑、全縁、隆起状。海水ブイヨンゼラチン上の集落：小円、全縁。海水ブイヨン寒天（斜面）：糸状、光沢、灰白色乃至黄白色、臭気なく、半酪質、発光す。海水ブイヨンゼラチン穿刺：糸状、液化せ

ず。リトマスミルク (3% 食塩を含む)：変化なく，増殖，発光共弱い。0.2% ペプトン海水：中庸，柔毛状，密な多量の沈澱，腐敗臭なし。インドール，硫化水素共に生産せず。ペプトン培地中でアンモニアを生産す。硝酸塩を還元す。グリセリン，グルコース，フラクトース，ガラクトース，マンノース，セロビオース，デキストリンから生酸す。増殖至適温度は 20~26°C，37°C では増殖せず。

以上の結果を Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7th ed. 1957),⁴⁾ Spencer⁵⁾ と照合した結果，菌の大きさ，糖からの生酸性およびゼラチンの液化性等に多少の違いはあつたが，*Photobacterium fischeri* にもつとも近いのでこれに同定した。

つぎに羽根田の分離した *Coccobacillus equule* の菌学的性質は，同氏の報告¹⁾ によるとつぎのようである。

菌の形態：球桿菌，2.4~3.0×1.2μ，或る株は球状，或る株は桿状で端は丸い。運動性はないか，または弱い。capsule なし。グラム陰性。平板培養 (25~30°C で 20 時間)：円形，とつ円状，無定形，白色の集落で径は 1 mm 以下，平滑，光沢。7 日後では集落は大きくなり径は 1~2 mm。画線培養 (25~30°C で 20 時間)：糸状，多量。ゼラチン穿刺 (25~30°C で 2 日)：多量の糸状増殖，袋状に液化。バレイシヨ片 (25~30°C で 10 日間)：多量，隆起状，白色不透明，バレイシヨは変化なし。Metabolism：好気性，嫌気状態では増殖せず。増殖至適温度は 25~30°C。増殖可能の pH は 6.8~9.5，発光す。Biochemical：マンノース，グルコース，ガラクトース，フラクトースを資化す。インドールは生産せず。

この菌とオキヒイラギの菌の大きな違いは運動性の有無である。しかしその他の点では大きな違いはないので，*Photobacterium phosphoreum*, *P. pierantonii* 等では運動性の有無にかかわらず同一種にまとめていることから両者も同 1 種として良いであろう。

II. 発光の持続性と各種炭素源，窒素源の資化性

基本培地としては Farghaly⁶⁾ の培地を使用した。その培地の組成はつぎの通りである。

NaCl.....	30 g	※Trace elements solution	
Na ₂ HPO ₄	5.3 g	CaCl ₂	2.7 g
KH ₂ PO ₄	2.1 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O.....	0.96 g
Nitrogen source	0.5 g	MnSO ₄ ·4H ₂ O	36 mg
Carbon source	5 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	39 mg
※Trace elements solution	0.05 ml/	Distilled water.....	1000 ml/
Distilled water.....	1000 ml/	pH	7.1 ~ 7.3

まず炭素源を除いた基本培地を 5 ml/ ずつ，試験管 (外径 18mm) に分注し 120°C，10 分間殺菌，炭素源はべつに 110°C，10 分間殺菌して，接種前に先の基本培地に 0.5% になるように加えた。窒素源は 0.05% とした。

供試窒素源としては硝酸カリ，硝酸ソーグ，第三リン酸アンモン，硝酸アンモン，塩化アンモン，硫酸アンモン，アスパラギンを用いたがいずれもよく資化した。これらの場合，炭素源はグリセリンを用いた。

つぎに炭素源は 25 種類 試験した。それらはグルコース，ガラクトース，マンノース，フラクトース，マルトース，サッカロース，ラクトース，ラフィノース，セロビオース，

アラビノース、キシロース、ラムノース、マンニット、ソルビット、ダルシット、イヌリン、デキストリン、グリコーゲン、サリシン、アルブチン、グリセリン、エタノール、酪酸ソーダ、乳酸カルシウム、焦性ブドウ酸ソーダ等である。窒素源は第二燐酸アンモンを用いた。これらの中で発化したものはグルコース、ガラクトース、マンノース、フラクトース、セロビオース、デキストリン、グリセリン、乳酸カルシウム等であつた。

つぎに上に述べた窒素源とグルコース、ガラクトース、グリセリン、乳酸カルシウムを組み合わせて培地を作り菌を接種し 23°C で培養して発光の持続性を調べた。発光の有無は眼を 10 分間 暗順応させて調べた。その結果を第 1 表に示した。各培地の発光の認められなくなつた時の pH を第 2 表に示した。

Table 1. The number of the days in which the bacteria maintained the luminescence. Farghaly's medium, at 23°C.

Nitrogen source	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ Cl	Asparagin	(NH ₄) ₂ HPO ₄
Carbon source							
Glucose	1	1	1	1	1	1	1
Galactose	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4	2-4
Glycerin	2-7	2-6	5	4-6	15-30	10	15-30
Ca-lactate	0	0	0	0	0	7-15	0

Table 2. The pH of the media at which the luminescence disappeared. Farghaly's medium, at 23°C.

Nitrogen source	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ Cl	Asparagin	(NH ₄) ₂ HPO ₄
Carbon source							
Glucose	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Galactose	6.1-6.2	6.3-6.6	6.5	6.2	6.1	6.0-6.1	6.3-6.5
Glycerin	6.7-6.9	6.5-6.7	6.5-6.6	6.5-7.0	6.9	6.5	6.8
Ca-lactate	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1

グルコースを炭素源とした培地ではわずか 1 日間発光したのみで発光は消失した。pH はすべて 5 以下に下がっていた。増殖、発光共に弱かつた。ガラクトースの場合はすべて 5 日後には発光は消失した。増殖は正常であつた。乳酸カルシウムの場合はアスパラギン以外には増殖も発光も見られなかつた。これは乳酸カルシウムのために pH の下がつたことが原因

Table 3. The number of the days in which the bacteria maintained the luminescence. Farghaly's medium containing Ca-carbonate, at 23°C.

Nitrogen source	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ Cl	Asparagin	(NH ₄) ₂ HPO ₄
Carbon source							
Glucose	2-3	2-3	2-3	2-3	2-4	2-4	2
Galactose	2-8	6-14	6-15	2-7	2-7	7-14	2-3
Glycerin	3-6	15-30	15-30	2-6	15-30	5-12	15-30
Ca-lactate	15-20	3-5	5-10	2-5	5-10	7-15	15-21

であろう。グリセリンは以上のいずれよりも好結果が得られた。しかし第1表に示したようにどの炭素源の場合も pH が下がっているため接種前に沈降性炭酸カルシウムを 4mg/ml 培地に加えた。その結果を第3表に示した。グルコース、乳酸カルシウム等では好結果が得られた。発光停止時の pH は第4表に示したように炭素源がグルコース以外ではすべて上昇した。

Table 4. The pH of the media containing CaCO_3 at which the luminescence disappeared. Farghaly's medium, at 23°C.

Nitrogen source							
Carbon source	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	NaNO_3	KNO_3	NH_4NO_3	NH_4Cl	Asparagin	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
Glucose	6.2	6.1	6.1	6.3	5.9	5.9	6.0
Galactose	8.0	7.6-8.0	7.6-8.0	8.0-8.2	8.0-8.2	7.8-8.2	8.0
Glycerin	8.0-8.2	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0-8.2	8.0
Ca-lactate	7.6-7.8	7.5-7.8	7.8-8.0	7.6-7.8	7.8-8.0	7.8-8.0	8.0

つぎに酵母エキス、ペプトン、カゼイン加水分解物および肉エキス等の各1% 海水溶液を培地として (pH 7.3) 菌を接種した。いずれも発光の強さは上に述べたどの合成培地の場合よりも強かつた。発光の持続期間も酵母エキスの場合は 23°C で約2カ月間も持続し、他のものも1カ月以上持続した。また従来は海洋性の発光細菌の培地としてはペプトン1%, 肉エキス1%, グリセリン0.3%, 炭酸カルシウム0.3%を含むものが一般に使用されていた。しかしこの菌はグリセリンを加えても発光、増殖に影響がなかつたので加えなかつた。しかし若しグリセリンを加えるなら必ず炭酸カルシウムを加えるべきで、加えない場合には pH は 6.0位 まで下つて発光の持続期間は数日間となつた。

グリセリンを炭素源にした基本培地に菌を接種し、23°C で2日間培養し十分発光するようになったものを 5°C に保つと、1日後には発光は非常に弱くなり約3日後には発光しなくなつた。しかしこれを 23°C にもどすと1~2日で発光するようになった。また接種後ただちに 5°C に保つと約1週間で十分増殖したが発光はしなかつた。これを 23°C に移すと発光するようになった。この菌を長期間発光させる温度は 15~25°C であつた。この菌の増殖至適温度は 20~25°C であつたが、5°C に保つと約1カ月後には死滅した。

考 察

羽根田が南洋産の各種ヒイラギ科の魚から分離した菌はすべて同一種に属し、その菌学的性質はすでに記した。著者がオキヒイラギ、ヒイラギ、ウチヒイラギから分離した菌もまた同一種であつたが、上に述べたように羽根田の報告したものと鞭毛その他の点で多少の違いがあつた。しかし種類の菌のみが発光器官から分離された点は両者共同様であつて、なぜ唯一種の菌のみが発光器官の中にいるのかは不明である。しかし少なくとも、著者の分離した菌はすべて、どのような培地に増殖しても全く腐敗臭がなかつた。したがつてこの菌の代謝生産物は、宿主に腐敗菌、病原菌が寄生した程の悪影響を与えないように思う。又この菌が宿主の生理におよぼす影響は不明であるが、後報で述べるようにこの菌は

基本培地に数種のアミノ酸を加えると、発光の強さ、増殖度、増殖速度等がいちじるしく増大した。しかしその際窒素源として無機のアンモニウム塩が必要であつた。このことは宿主の窒素排泄との関係を思わせるものがある。宿主にいつからこの菌が入り込むかは不明だが、著者が採集した全長 12 mm のオキヒイラギの仔魚でも魚体が光つていたことから考えても、魚の発育のかなり初期の中にこの菌が発光器官の中に入るものと思う。

この菌の発光の持続性の点から云えば、炭素源としてはグリセリンがもつとも適していた。その原因は pH が余り変化しないためであろう。したがつて炭素源がグルコースの時、炭酸カルシウムを加えない場合、pH のいちじるしい低下が発光を弱くした原因と云える。しかし炭素源が乳酸カルシウムで窒素源がアスパラギンの時は pH が 6.1 にまで下つても発光しているので、pH の変化だけが発光の強弱の原因とは考えられない。著者はグルコース、ガラクトース、グリセリン等を炭素源とする培地で増殖、発光後、発光の消失したものに炭酸カルシウムを加えると 1 日後に再び発光を始めることを知つた。この場合 pH は上昇したが 0.1~0.4 程度であつて、それだけが発光回復の原因とは考えられない。Farghaly も「炭酸カルシウムを加えて培養すると発光の持続性は増し、発光の強さも 75% 増したが、pH の保持だけではその説明は出来ない」と述べている。そして炭酸カルシウムを加えた時の効果は Ca イオンにあるのではなく、CO₂ にあることを同氏は認めている。著者も発光の消失した培地に CO₂ を吹き込んで発光の回復するのを認めたことがある。これらのことは今後検討したい。

終りに終始懇篤な御指導、御校閲をいただいた恩師富安教授、ならびに懇篤な御指導をいただいた内田教授、横須賀博物館長羽根田博士にお礼を申上げる。

要 約

1. オキヒイラギの発光細菌を *Photobacterium fischeri* と同定した。
2. この菌は窒素源として硝酸カリ、硝酸ソーダ、硝酸アンモン、硫酸アンモン、塩化アンモン、磷酸第二アンモン、アスパラギンを資化した。
3. 供試した 25 種類の炭素源のうち、グルコース、ガラクトース、マンノース、フラクトース、デキストリン、セロビオース、グリセリン、乳酸カルシウムを資化した。
4. 発光の持続性に影響を与えるものは炭素源であつて、そのうち持続性の点ではグリセリンがもつともよかつた。
5. 発光持続の点でもつともよい培地は酵母エキスの 1% 海水溶液で、23°C で約 2 カ月間発光を持続した。

文 献

- 1) Haneda, Y., 1940. The Palao Tropical Biological Station Studies, 2: 29.
- 2) ———, 1950. Pacific Science, 4: 214.
- 3) ———, 1955. The Luminescence of Biological Systems, 335-385. American Association for the Advancement of Science.
- 4) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th ed., 1957.
- 5) Spencer, R., 1955. J. Gen. Microbiol., 13: 111.
- 6) Farghaly, A. H., 1950. J. Cellular. Comp. Physiol., 36: 165.

Résumé

The luminous bacterium of *Leiognathus rivulatus* was identified as *Photobacterium fischeri*.

The bacterium assimilated such nitrogen sources as potassium nitrate, ammonium nitrate, ammonium sulfate, sodium nitrate, ammonium chloride, diammonium hydrogen phosphate and asparagin. Basal medium described by Farghaly was used.

The bacterium assimilated such carbon sources as glucose, galactose, mannose, fructose, cellobiose, glycerin, calcium lactate and dextrin.

The bacterium maintained luminescence about two months at 23°C in 1% yeast extract sea water medium. Intensity of bacterial luminescence in 1% peptone-, hydrolized casein- and meat extract-media was greater than yeast extract medium during the first ten days, but thereafter the intensity of the former rapidly decreased. Duration of the bacterial luminescence is shown in Table 1. Table 2 shows the pH values of the media at which the luminescence disappeared. When glucose was used as carbon source, the luminescence disappeared after only one day in all cases. When the luminescence disappeared the pH values of the media were all below 5 in glucose and 6.1-6.7 in galactose. In order to adjust the pH value, 4 mg Ca-carbonate per ml of the medium was added before inoculation. The results are shown in Table 3. Table 4 shows the pH values of the media containing Ca-carbonate at which the luminescence disappeared. Duration of luminescence was prolonged in glucose, galactose and Ca-lactate media. Excepting the media containing glucose, pH values of the media were raised.