水産動物の消化管に存在するキチン分解細菌 に関する研究—I.

スズキ消化管内のキチン分解細菌数について

奥谷康一・早崎幸夫・木俣正夫

(1964年8月25日受理)

STUDIES ON CHITIN-DECOMPOSING BACTERIA PRESENT IN THE DIGESTIVE TRACT OF AQUATIC ANIMALS—I. THE NUMBER OF CHITIN-DECOMPOSING BACTERIA IN JAPANESE SEA-BASS, *LATEOLABRAX JAPONICUS*

Koichi OKUTANI, Yukio HAYASAKI and Masao KIMATA*

Although many workers²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ have detected chitin-decomposing bacteria in the digestive tract of certain animals, little information are found regard as its nutritional problem to the host.

SEKI and TAGA⁵⁾ found a chitin-decomposing bacteria in the digestive tracts of octopus, squid and swell-fish and suggested that this bacteria is not important with respect to the nutrition for these animals, because the amount of the products formed, due to chitin decomposition, which may be easily utilized by the host is very little. However, in spite of their suggestion, the importance of symbiotic bacteria aiding animals in the digestion of chitin should not be negligible.

In the previous paper²⁾, by the present authors it was reported that the chitin-decomposing bacteria were present in the stomach of Japanese sea-bass, *Lateolabrax japonicus*. The present study was carried out in order to demonstrate the population of chitin-decomposing bacteria present in the digestive tract of this fish, and also the effects of some environmental conditions on the bacterial counts were ascertained.

Results obtained are as follows.

1) As the medium used for the counting of chitin-decomposing bacteria, there are few differences between the medium prepared with fresh water containing 2.5% NaCl and that with natural sea water (Table 1).

2) There are few differences between the result obtained by the liquid culture and that by the agar plate culture, when the dilution method is used for the counting of chitin-decomposing bacteria (Table 2).

3) When the chitin-decomposing bacteria present in digestive tract of Japanese sea-bass is counted using the medium adjusted pH 4.5 and pH 7.0, the results obtained are more larger in the latter case (Table 3).

4) A greater part of total bacterial cells present in the digestive tract of this fish is chitin-decomposing bacteria (Table 2 and Table 3).

著者らはさきにスズキについて研究し、摂取されたキチン質は胃壁から分泌されるキチン分解酵素によって構成単糖および二糖類に分解されることを明らかにした¹⁾。さらにまた、消化管中にキチン分解細菌の存

* 京都大学農学部水産学科 (Dept. of Fish., Fac. of Agr., Univ. of Kyoto, Maizuru, Japan).

在を認め胃においては内容物 1 g 中 10^4 個の菌体が存在することを観察した²⁾。胃における低 pH 値の条件下で、これらの細菌がいかなる挙動を示すか、また消化管の他の部分にはキチン分解細菌はどのくらい存在し、どのような挙動を示すかを確かめキチンの消化との関連を明らかにすることを目的として本実験に着手し、ここに第 1 報を報告する。

実験材料および方法

供試魚： 5月～7月に若狭湾で漁獲され、生きたまま京都府漁連（舞鶴市）に陸揚げされたスズキ (*Lateolabrax japonicus*) である。体重は 1350～1527 g、体長は 440～480 mm である。

細菌数の測定： 延髄刺殺後、魚体を氷冷して実験室に持ち帰り、ただちに開腹して胃、幽門垂および腸の内容物 1 g をできるだけ無菌的に採取し、それらのおのの 9 ml の滅菌ペプトン水 (2.5 % NaCl 加) を加えて十分振盪し、これを常法に従って順次 10 倍ずつ希釈し、消化管内容物のそれぞれ 10^{-2} , 10^{-3} , ... 10^{-11} g に相当する一定量 (0.1 ml) を採り、ペプトン 0.5 %, 酵母エキス 0.1 %, 食塩 2.5 % および再沈澱キチン¹⁾ 0.5 % (いずれも w/v) を含む液体培地 (pH 4.5 および 7.0, 同一希釈度の試料について 5 本) および上記培地に 2.5 % 寒天を加えたキチン寒天平板培地 (pH 4.5 および 7.0) に接種した。後者の場合には、接種後直ちにガラス棒で平板上に広げた。培養はいずれも 22°C, 7 日間である。

液体培地の場合は、細菌の発育は濁濁の有無から、また濁濁の認められた試験管から一白金耳量を上記キチン寒天平板に画線し、22°C で 7 日間放置した後発育せる菌苔周辺部に透明帯が生じるか否かからその試験管内におけるキチン分解細菌の有無を判定し、全細菌数およびキチン分解細菌数をそれぞれ各希釈度における陽性試験管の数から、一般に大腸菌の計数に用いられている方法に準じて、消化管内容物 1 g 中の最確数であらわした。

キチン寒天平板培地の場合には、発生せる全コロニーの数から全細菌数を、またそのコロニー周辺部に透明帯を生じたものの数からキチン分解細菌数を判定した。

pH 4.5 のキチン寒天平板を調製する場合には、オートクレーブにより寒天が加水分解を受けるのを避けるために、下記のごとく培地を I および II に分けてオートクレーブし、平板を作る際に I および II を等量滅菌ペトリ皿に無菌的に注入した。

I: 5 % 寒天, 0.5 % 再沈澱キチン, 水道水で調製し, pH を 6.0 に調整する。

II: 0.5 % 再沈澱キチン, 1 % ペプトン, 0.2 % 酵母エキス, 5 % NaCl, 水道水で調製し, pH を 4.5 に調整する。

以上 I および II を混和して作製した寒天平板は pH 4.5 を呈する。

Table 1. Number of bacterial cells in the stomach contents as measured with S. W.* and F. W.** media (pH 7.0).

Media	Total bacteria	Chitin-decomposing bacteria
S. W.	per g 1.7×10^5	per g 4.5×10^3
F. W.+2.5 % NaCl	1.6×10^5	1.7×10^4

* Aged sea water.

** Tap water+2.5 % NaCl.

Table 2. Counting of bacteria (pH 7.0).

Exp.	Digestive tracts	Bacteria*	Liquid media	Agar plate media
1	Stomach	T. B. C. B.	1.6×10^5 1.7×10^4	1.0×10^5 1.0×10^4
2	Pyloric caeca	T. B. C. B.	2.4×10^7 2.3×10^7	5.0×10^7 5.0×10^7
3	Pyloric caeca	T. B. C. B.	1.6×10^7 1.6×10^7	2.6×10^7 2.6×10^7
	Intestine	T. B. C. B.	1.6×10^7 1.6×10^7	1.8×10^7 1.8×10^7
4	Intestine	T. B. C. B.	5.4×10^7 5.4×10^7	3.0×10^7 3.0×10^7

* Bacterial cells per gram of contents in digestive tracts.

T. B.: Total bacteria.

C. B.: Chitin-decomposing bacteria.

Table 3. Effect of pH of the medium used on the estimation of the bacterial populations in the fish digestive tracts.

Exp.	Digestive tracts	Bacteria*	pH value of the medium	
			4.5	7.0
1	Pyloric caeca	T. B. C. B.	7.8×10^2 4.5×10^2	1.4×10^6 1.4×10^6
	Intestine	T. B. C. B.	2.0×10^2 2.0×10^2	3.3×10^9 3.3×10^9
	Intestine	T. B. C. B.	1.3×10^3 1.3×10^3	1.5×10^9 1.5×10^9
2	Pyloric caeca	T. B. C. B.	2.6×10^7 2.6×10^7	5.0×10^7 5.0×10^7
	Intestine	T. B. C. B.	1.8×10^7 1.8×10^7	3.5×10^8 3.5×10^8
3	Stomach	T. B. C. B.	4.5×10^9 4.5×10^9	2.4×10^4 2.4×10^4
	Pyloric caeca	T. B. C. B.	7.0×10^5 7.0×10^5	3.5×10^6 3.5×10^6
	Intestine	T. B. C. B.	1.6×10^7 1.6×10^7	3.5×10^5 3.5×10^5
4	Stomach	T. B. C. B.	3.4×10^8 3.4×10^8	5.5×10^9 5.2×10^9
	Pyloric caeca	T. B. C. B.	1.4×10^5 1.2×10^5	4.0×10^6 3.9×10^6
	Intestine	T. B. C. B.	1.4×10^6 1.4×10^6	3.0×10^7 3.0×10^7

* Bacterial cells per gram of contents in digestive tracts.

T. B.: Total bacteria.

C. B.: Chitin-decomposing bacteria.

る細菌の大部分はキチン分解細菌であることがわかる。胃では $10^4 \sim 10^9$ 、幽門垂では $10^6 \sim 10^8$ 、腸では $10^5 \sim 10^9$ であり、同一部分でも試料の相違によつて差異が大きいことが認められる。この理由は明らかではないが、おそらく食餌条件（たとえば食餌の種類、消化管の充満度など）に基づくためではあるまいか。

考 察

水産動物の消化管におけるキチン分解細菌に関する研究は古くから行なわれているが^{3,4)}、キチンの消化に関連して栄養化学的立場から論ぜられたものはほとんど見当たらない。また二、三の水産動物について行なつた関らの研究⁵⁾によれば消化管内において行なわれる細菌によるキチン分解量は、ごくわずかであつて考慮するほどのものではない。しかしながらスズキの消化管内に存在するキチン分解細菌数は、全細菌数にほぼ匹敵し、最高 10^9 のオーダーであり、これまでに報告されたものよりはるかに多い。したがつて、これらの細菌の生化学的性質のいかんによつては、栄養化学的見地からキチンの消化と関連性があると予想される。

水産動物の消化管内に存在するキチン分解細菌数の計測には、これまで中性付近に調整された培地が用いられている。胃に存在する細菌は実際には pH 4.5~5.5 という低 pH 値のもとにさらされているのである

実 験 結 果

海水培地と 2.5 % NaCl 加淡水培地：海水で調製した培地と 2.5% NaCl 加淡水で調製した培地とを用いて細菌の発現の状態を比較したところ、Table 1 に示すように、全細菌数、キチン分解細菌数ともに大差なくキチン分解細菌はむしろ後者を用いた場合にやや多く現われ、特に不利とは考えられないので以後の実験には後者を採用した。

液体培養と寒天平板培養：一般に液体培地を用いた場合には平板培地を用いた場合よりも細菌数は多く出現することが認められているが、Table 2 に示されるようにこの実験では両者の間にほとんど差異が認められなかつた。

培地の pH：胃に内容物が存在するときには内容物および粘膜の pH は 4.5~5.5 であり¹⁾、幽門垂および腸のそれは 6.8~7.0 にある。したがつて各消化管内の細菌数を調べる際に培地の pH の影響を考慮する必要がある。この点につき検討を行なつた結果を Table 3 に示した。すなわち pH 4.5 で増殖する細菌は、胃のみならず幽門垂および腸にも多数存在するが Exp. 3 の Intestine を除くすべての実験において pH 7.0 の培地を用いた場合には pH 4.5 の培地を用いた場合よりも検出される細菌数が多い。

スズキ消化管内の細菌数：Table 2 および Table 3 から、スズキ消化管内に存在す

から、この付近の低 pH 値の下でよく発育して生化学作用を営み得る細菌が重要である。著者らはこの事実を重視し、pH 4.5 に調整した培地と pH 7.0 に調整した培地を併用したところ、pH 4.5 の培地に出現し、かつキチン分解を行なう細菌はかなり多数に存在することが明らかにされた。これらの細菌の詳しい性質については続報にのべる。

摘 要

スズキ消化管内に存在するキチン分解細菌数を求め、細菌の計測に影響を及ぼす二、三の条件について検討し、次の結果を得た。

- 1) 培養基調製用の水は、淡水に 2.5 % NaCl を加えたものでも海水そのままのものでも大差がない。
- 2) 稀釈法による菌数測定には液体培養でも寒天平板塗布培養でも細菌の出現率には大差がない。
- 3) pH を 4.5 (胃の pH に相当) および 7.0 (幽門垂および腸の pH に相当) に調整した培地で培養すれば、細菌の出現率は前者より後者において常に大きい、その差は胃の場合には比較的少ない。
- 4) スズキ消化管内に存在する細菌の大部分は、キチン分解細菌である。

文 献

- 1) 奥谷康一・木俣正夫: 本誌, **30** (3), 262 (1964).
- 2) 奥谷康一・木俣正夫: 本誌, **30** (7), (1964).
- 3) BENTON, A. G.: *J. Bacteriol.*, **29**, 449 (1935).
- 4) ZOBELL, C. E. and S. C. RITTENBERG: *Contributions from the Scripps Institution of Oceanography New Series*, No. 5, 275 (1937).
- 5) SEKI, H. and N. TAGA: *Jour. Oceanogr. Soc. Japan*, **19**, 158 (1963).