海洋性イルカ類の胃内細菌について*

森 井 秀 昭

(1972 年 5 月 17 日受理)

Bacteria in Stomach of Marine Little Toothed Whales

Hideaki MORII

The isolation of bacteria was made in order to ascertain their role in producing free isovaleric and other lower fatty acids which were detected previously in the stomachs of porpoises. The 14 strains were isolated aerobically from the stomachs of whales by using a modified ZoBELL 2216 medium and 2.5% NaCl glucose broth medium. Eleven strains of *Vibrio* and one strain each of *Corynebacterium* and *Staphylococcus* were obtained from adult *Neomeris phocaenoides*, *Prodelphinus* sp., and *Stenella attenuata* and the one strain of *Staphylococcus* from a nursing of *Delphinus delphis*. The bacteria were identified by the system of BERGEY's manual or SHEWAN *et al.*. The viable bacterial counts were about 10^5 /ml in each stomach of *S. attenuata* caught alive, the greater proportion consisting of *Vibrio*.

All *Vibrio* strains grew well at 30 to 35°C, and also were able to grow at pH 4.85, though the optimum pH for growth was pH 6 to 7. Halophilic *Vibrio* strains grew abundantly in 2 to 4% NaCl containing nutrient broth. The isolated bacteria may originate from the intestinal flora of fishes ingested by whales, because their features resemble those of gut *Vibrio* of fishes.

前報^{1,2)}では、アライルカの皮下脂肪中にはイソ吉草酸を主とした低級脂肪酸類が多量に含有されていることを述べた。これらの起源として胎児および乳児では当然母体血液の影響をうけ、少なくとも胎児油脂中のイソ吉草酸などの低級脂肪酸は母体血液に由来すること、また胃の構造が反すう動物に類似していることから、成体油脂中のイソ吉草酸などの低級脂肪酸は反すう動物と類似の機構で生産されていることなどが考えられた。そこでさらにスナメリ（成体）の血液および胃内容液について、イソ吉草酸などの遊離低級脂肪酸の存否についてしらべ、血液および胃内容液にはともにこれらの脂肪酸が存在していたことをあわせて報告した。

通常イルカ類の餌料である魚類やイカ類の油脂中にはイソ吉草酸などの低級脂肪酸は存在しない。したがって胃内容液に存在していたイソ吉草酸などの遊離低級脂肪酸はその胃腔内で生産されたものとする。これら低級脂肪酸については種々の生成機構が考えられるが、反すう動物やある種の有袋類³⁾などの胃内容液に存在する遊離低級脂肪酸は胃内微生物によつて生産される事実から、イルカの場合にも胃内微生物の作用によると考えるのが最も妥当である。従来イルカ類の胃内微生物についての研究はみあたらないので、今回はイルカ類の胃内微生物、特に細菌類の存否、常在性および分離菌株の性状などについて検討したので報告する。

実験材料および方法

イルカ試料 供試イルカはスナメリ *Neomeris phocaenoides*, マダライルカ *Prodelphinus* sp., マイ

* この研究の一部は昭和 40 年度日本水産学会秋期大会で講演した。

** 長崎大学水産学部 (Faculty of Fisheries, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki, Japan-852)

Table 1. Samples of little toothed whales used for the isolation of bacteria.

No. of samples	Species		Age	Contents of stomachs	Isolates**	Date of sampling	
1	<i>Neomeris phocaenoides</i>	♂	Adult	Fishes, its-bones and squid beaks etc. in I* and dark juice in II~IV*	—	C1	Mar., 1965
2	" "	♀	"		pH 4.85 in I	V1	Oct., 1965
3	" "	♂	"		pH 5.82 in I	None	Oct., 1965
7	" "	♂	"		pH 6.20 in I	V6, V7	July, 1968
8	" "	♂	"		—	V8, V9	Apr., 1969
4	<i>Prodelphinus</i> sp.	♀	"		—	V2, V3	Oct., 1966
5	" "	♂	"		pH 5.75 in I	V4, V5	May, 1967
9	<i>Stenella attenuata</i>	♂	Adult	Gastric juice in I~IV		V10, V11, S2	Nov., 1970
6	<i>Delphinus delphis</i>	♂	Nursling	Milk-like juice in I and II		S1	Jan., 1968

* The letters, I, II, III and IV designate the first, second, third and fourth stomach respectively.

** Bacterial strains were isolated from each stomach.

Whale of sample 9 was caught alive in the Kawana Bay at Ito of Izu Peninsula, and the other samples were caught in the west sea area of Kyushu and marketed.

Table 2. Main characteristics of isolated bacteria.

Characters	Strains	V1~V11	C1	S1, S2
Cell form		Rods	Rods, Pleomorphic	Cocci
Endospore		—	—	—
Motility		+	—	—
Flagellation		Polar	—	—
Gram stain		—	+	+
Diffusible pigments		—	—	—
Oxidase (Kovacs)		+	—	—
Catalase		+	+	+
Decolorization of methylene blue		+	+	+
Reduction of nitrate		+	+	+
OF test by Hugh and Leifson		Fermentative	Oxidative	Fermentative
Acid from glucose		+	+	+
mannose		+	+	+
fructose		+	+	+
maltose		+	+	+
lactose		—	—	+
sucrose		+	+	+
inulin		+	+	+
glycerol		+	+	+
dulcitol		—	—	—
erythritol		—	—	—
Gas from glucose		—	—	—
Methyl Red test		+	+	+
Digestion of agar		—	—	—
Digestion of cellulose		—	—	—
Hydrolysis of chitin		+	—	—
Production of H ₂ S (SIM medium)		—	—	—
NH ₃ from peptone		+	+	+
Sensitivity to 0/129		+	—	/
Number of strain		11	1	2

+: positive. —: Negative.

ルカ *Delphinus delphis* およびアラリイルカ *Stenella attenuata* の4種9試料で、そのうちアラリイルカは湾内追込み後6日目に生け捕りされたもの（集団のうちの1頭）で、その他はすべて魚市場へ水揚げされたものである。なおイルカの種類、試料の採取期日、胃内容物などについては Table 1 に示す。

魚市場へ水揚げされたもののうち、スナメリはいずれも生きていたか、またはそれに近い状態にあつた。マダライルカおよびマイルカについては、死後の経過時間は明らかでないが腐敗臭あるいは鮮度低下にともなう特異臭はほとんど感知されなかつた。これら試料は水揚げ後実験に供するまでに約 6-12 時間を経過していた。

細菌分離用検体の採取 イルカは解剖後、食道の入口付近および第IV胃末端付近の腸をひもで結び、食道および胃をその両側から切り離した。これらの外壁を 95% エタノールで十分に消毒してから胃壁に穴をあけ、滅菌試験管を差し込み、胃内容液を採取した。なお胃内容液は第I、第II、第IIIおよび第IV胃の各部

分から別々に採取した。

生菌数の測定および菌株の分離 生菌数の測定はアラリイルカについてのみ行なつた。すなわち捕獲後ただちに各胃内容液を採取し、それぞれの 1 ml を 0.1% ペプトン海水で 10 倍段階希釈液をつくり、奥積・堀江⁴⁾の ZOBELL 2216 改変寒天培地で平板とし、20°C で 4 日培養後の集落を算定した。なお桿菌と球菌の発生集落は区別が明確にできたので別々に算定した。また各検体の平板培養から外観の異なる集落を釣菌し、同平板培地を用いて純離した。

魚市場へ水揚げされたイルカからは細菌の分離のみを行なつた。すなわちそれぞれの胃内容液の 1 白金耳を基本寒天培地（ブドウ糖 1.0%，ペプトン (Difco) 1.0%，酵母エキス 0.5%，塩化ナトリウム 2.5%，寒天 1.5%，pH 7.0）に接種し、20°C で 4 日培養後、外観の異なる集落を釣菌し、同平板培地を用いて純離した。

なお嫌気性細菌の分離は今回は実施しなかつた。

発育温度・pH および塩分濃度 前培養は基本培地（C1, S1 および S2 の 3 菌株については塩化ナトリウムを除く）を用い、15-24 時間培養した。培養温度は 25°C（前記 3 菌株は 30°C）とし、以後特記しない限りこの温度とする。特に 37°C 発育試験は BAIN and SHEWAN⁵⁾ 記載の方法に従つた。

発育量は、前培養の菌液の 1 白金耳を試験管培地（18×180 mm）に接種し、経時的によく振りまぜた後試験管のまま濁度法（波長 660 mμ）で測定し、その結果をもとにして至適条件を決定した。なお発育の可否については、5 日間培養後に肉眼的に濁りの有無を観察し判定した。

至適温度は基本培地を用い、5°C 間隔で 20-45°C まで、また至適 pH は無糖基本培地の pH を 6N-塩酸と 6N-水酸化ナトリウムで pH 4-9 に調整し、これらの発育状態をしらべた。至適塩分濃度は基本培地に塩化ナトリウムを 0-15% 添加し調製した培地における発育状態をしらべた。

形態学的性状検査 肉汁培地（Oxoid, No. 2）および血液寒天基礎培地（Oxoid）を用い、既定温度での液体および固体培養について 12 時間毎に 4 日間一般形態を観察し、あわせてグラム染色を行ない、ペン

Table 3. Differential characteristics of *Vibrio* groups.

Groups	I	II	III
Characters			
Spreading growth	+	-	-
Luminescence	-	+	-
Acid from mannitol	+	-	-
sorbitol	+	-	-
glycogen	+	-	-2/3*
Hydrolysis of starch	+	-	-
Voges-Proskauer reaction	-	-	-
Hydrolysis of alginate	-5/6	-	-
Indole production	-3/6	-	-
Arginine dihydrolase (Thornley)	-	-	+
Lysine decarboxylase (Møller)	+	±	+
Liquefaction of gelatin	+	-	-
Litmus milk	P	D	D
Number of strains	6	2	3

Group I: V1, 2, 6, 7, 10 and 11. Group II: V8 and 9. Group III: V3, 4 and 5.

+: Positive. -: Negative. ±: Weak or transient positive.

P: Peptonization. D: Decolorization of litmus.

*: Negative strains/Total test strains.

毛は 24 時間固体培養について電子顕微鏡観察を行なった。また SIM 培地 (栄研) による運動性もあわせて観察を行なった。

生理学的性状検査 C1, S1 および S2 の 3 菌株以外の菌株の各試験には、2.5% 塩化ナトリウム添加培地を用いた。各試験培地には 15-24 時間肉汁培養の 1 白金耳を接種して試験した。

オキシダーゼ産生 KOVACS⁶⁾ の方法。カタラーゼ・メチレンブルー還元・硝酸塩還元 常法。炭水化物の分解 HUGH and LEIFSON⁷⁾ の培地および方法。ブドウ糖からガスの産生・色素の産生・集落の展延性・発光性 BAIN and SHEWAN⁵⁾ 記載の方法。デンプン水解・Voges-Proskauer 試験・Methyl Red 試験常法。寒天分解・アルギン酸分解・セルロース分解 奥積・堀江⁴⁾ 記載の方法。キチン分解 (ペプトン (Difco) 5g, 酵母エキス 1g, 精製キチン⁸⁾ 4g, 寒天 15g, 海水 1000 ml, pH 7.0) の培地を用い、集落周囲に透明帯の形成の有無を 6 日間観察した。インドール産生 SIM 培地 (栄研) を用い 1, 2 および 4 日間の培養について Ehrlich-Böhm 法で試験した。硫化水素産生 SIM 培地 (栄研) を用い、6 日間観察を行なった。アルギニン-ジヒドロラーゼ産生 THORNLEY⁹⁾ の方法。リジン-デカルボキシラーゼ産生 MøLLER¹⁰⁾ の方法。ゼラチン液化 BAIN and SHEWAN⁵⁾ 記載の方法。リトマス牛乳試験 常法。

実験結果

成体イルカ 8 試料のうち 7 試料の胃内容検体 (第 I-第 IV 胃) から 13 菌株の細菌が分離され、このうち 11 菌株がグラム陰性細菌で、2 菌株がグラム陽性細菌であつた (Table 2)。後述するようにグラム陰性細菌

Table 4. Relations of temperature, pH and salinity to the growth of the isolates.

Genera	Conditions	Vibrio			Corynebacterium	Staphylococcus
		I	II	III		
Temp. (°C)	35	+	+	+	+	+
	37	+	—	+	+	+
	40	+	—	±	+	+
	45	—	—	—	+	±
	opt. temp.	30~35	30~35	30~35	40	35~40
pH	4.00	—	—	— 2/3	—	—
	4.50	—	—	+	—	+
	4.85	+	+	+	+	+
	opt. pH	6~7	6~7	6~7	7	7
NaCl (%)*	0.0	—	—	—	+	+
	0.5	+	+	+	+	+
	5.0	+	+	+	+	+
	7.5	+	—	—	+	+
	10.0	— or ±	—	—	+	+
	15.0	—	—	—	—	+
	opt. NaCl	2~4	2~3	2~3	0	0

The results showed the 5 day-culture, and the incubation temperature for the tests of growth-pH and -salinity was 25°C for strains V1~V11 and 30°C for the other 3 strains.

The optimum conditions of growth were determined turbidimetrically after 10 hrs. culture for strains V1~V11 and after 24 hrs. culture for the other 3 strains.

* The percentage of NaCl added to basal medium.

はすべて *Vibrio* であつた。また試料 1 のスナメリからは *Corynebacterium* が分離され、試料 3 のスナメリからは細菌は検出されず、酵母が分離された。

マイルカの乳児からは *Staphylococcus* が分離され、その他の細菌は検出されなかつた。

Vibrio が分離されなかつた成体イルカの試料 1 と 3 の場合、胃内容液内には活発に運動する *Vibrio* 様の細菌を認めたが、継代培養することができず、この点に関してはなお検討を要するものと思う。

分離菌株の主なる形態学的ならびに生理学的性質を示すと Table 2 のようである。

グラム陰性の 11 菌株はすべて単極毛で運動性を有する桿菌でオキシダーゼ陽性、ブドウ糖を酸酵的に分解して酸を産生したがガス発生は認められず、また *Vibriostatic agent* 0/129 に対して感受性を示した。SHEWAN¹¹⁾ の同定形式によればすべて *Vibrio* 属に該当した。これらは Table 3 に示すように 3 群に区別され、BAIN and SHEWAN⁵⁾ の *Vibrio* 属細菌の同定法によると I 群は *Vibrio parahaemolyticus* の項に入るが、この群は白糖を分解するなど細部では相違する。II 群は発光性の *Vibrio* で、III 群は *Vibrio* spp. となつた。

グラム陽性の C1 株は通常 $0.8 \times 4-50 \mu$ 、種々の長さを有する直ないし曲桿菌で、また多形態を示し、内部には異染粒が存在した。この菌株は BERGEY¹²⁾ によれば *Corynebacterium* 属に該当する。

グラム陽性の S1 および S2 菌株は不規則な配列の球菌で、ブドウ糖および乳糖などを酸酵的に分解して酸を産生した。またアルギニンからアンモニアを産生し、硝酸塩を還元した。これらの菌株は BERGEY¹²⁾ によれば *Staphylococcus* に属する。

発育に対する温度・pH および塩分濃度の関係についての試験結果は、Table 4 に示す。

発育至適温度は *Vibrio* は $30-35^{\circ}\text{C}$ 、グラム陽性の 3 菌株は $35-40^{\circ}\text{C}$ 、至適 pH は *Vibrio* では pH 6-7、他の菌株では pH 7 であつた。また至適塩分濃度は *Vibrio* では 3% 前後で、塩化ナトリウム無添加培地では発育せず好塩性を示し、他の 3 菌株は塩化ナトリウム無添加の培地で最も良い発育を示したが、10% 塩化ナトリウム培地中でも発育し耐塩性であつた。またすべての分離菌株は著者が測定²⁾ した胃内容液の最低 pH 4.85 で十分に発育が認められた。

考 察

分離菌株 14 株のうち 11 株は *Vibrio* で好塩性を示し陸棲細菌の汚染とは考えにくい。また非好塩性の *Staphylococcus* S2 株は捕獲直後に分離したもので外部汚染はないものと思う。もしイルカ胃内細菌が餌料とともに搬入された海水細菌や魚体付着細菌とすると、*Vibrio* 以外の細菌類なども分離されるものと考えられ、実際に魚の胃内からは *Vibrio* の他 *Pseudomonas* や *Achromobacter* が検出されている¹³⁾。イルカの胃内から *Vibrio* 以外のグラム陰性細菌が検出されなかつたのはおそらく胃内の消化液や酸素圧などによつて、*Vibrio* のみが選択的に増殖したことも考えられる。分離した *Vibrio* は中温性で好塩性を示し、これらの性質は海産魚類腸管内の *Vibrio* についても同様で^{4,8)}、また I、II および III 群とほぼ類似の *Vibrio* が海産魚類腸管内からも分離されている⁴⁾。従来、海産魚類の腸内細菌は主として *Vibrio* とされ^{4,14,15)}、したがって分離した *Vibrio* は餌である魚類腸管内の *Vibrio* が主として分離されたとも考えられる。

生け捕りしたアラリイルカの胃内容液に約 $10^5/\text{ml}$ の細菌の存在を確認し、その大部分が *Vibrio* で (Table 5)、また分離菌株の大多数が *Vibrio* であつた事実から、摂餌にともなつて搬入され、イルカ胃内では優先増殖した *Vibrio* が、摂取した魚類などの分解に関与しているものと考ええる。すなわち発育環境条件からみて、分離したすべての *Vibrio* は胃内 pH で十分に発育でき、中温性でイルカ体温¹⁶⁾ でも発育可能であり、また魚類腸内細菌と同様に好塩性である。またすべてペプトンからアンモニアを生産し、胃液で消化された蛋白質などをさらに分解し、一方すべてキチンを分解し、マルトース、ショ糖および六炭糖類から生酸し、すべてメチルレッド陽性であつた。これらの事実から胃内ではその消化酵素の作用と相まつて主として *Vibrio* が低級含窒化合物や糖類を分解し、低級脂肪酸類やアミノ酸などを生成するものと考ええる。

Table 5. Viable counts of bacteria in the gastric juice of a dolphin, *Stenella attenuata* (Sample 9).

Gastric juice	Viable counts (/ml)		
	Total	<i>Vibrio</i>	<i>Staphylococci</i>
Ist stomach	1.6×10^5	160×10^3	3×10^3
IIrd stomach	1.7 "	169 "	4 "
IIIrd stomach	5.7 "	566 "	8 "
IVth stomach	7.1 "	692 "	19 "

Vibrio was distinguished from *staphylococci* by the appearance of colonies.

なおイルカ胃内には胃内固有の常在菌として *Vibrio* が存在していることも考えられるが、これらの点などについてはさらに検討を必要とする。

要 約

海洋性イルカ4種9試料の胃内から細菌を分離し、これらの形態学的および生理学的性状、および発育環境条件などをしらべ次の結果を得た。

- 1) 9試料中8試料の胃内から *Vibrio* 11株, *Staphylococcus* 2株および *Corynebacterium* 1株の計14菌株を分離した。
- 2) *Vibrio* の発育至適温度は 30-35°C, 至適 pH は 6-7 および至適塩分濃度は 3% 前後であつた。またすべての分離菌株は pH 4.85 で十分に発育した。
- 3) 生け捕りしたアラリイルカの胃液内には約 $10^5/\text{ml}$ の細菌が存在し、その大部分が *Vibrio* であつた。

終りに、本稿の御校閲をいただいた本学部教授銭谷武平博士、イルカの種の査定ならびに解剖学上の所見について御教示をいただいた本学部教授水江一弘博士、同講師竹村 陽氏、東京大学海洋研究所助教授梶原 武博士、同大学院宮崎崎之氏、電子顕微鏡観察を行なつて下さつた長崎大学医学部文部技官末松 正氏および本研究の全般的な御指導をいただいた本学部教授金津良一博士に対し深謝の意を表します。

なおこの研究の一部は文部省科学研究費（奨励研究）によつたものである。

文 献

- 1) 森井秀昭・金津良一： 本誌, 38, 599-605 (1972).
- 2) 森井秀昭・金津良一： 本誌, 38, 801-805 (1972).
- 3) R. J. MOIR, G. SHARMAN, M. SOMERS and H. WARING: *Nature*, 173, 269-270 (1954).
- 4) 奥積昌世・堀江 進： 本誌, 35, 93-100 (1969).
- 5) N. BAIN and J. M. SHEWAN: In "Identification Methods for Microbiologists" (B. M. GIBBS and D. A. SHAPTON eds.), 2. Academic Press, London • New York, p. 79-84 (1968).
- 6) N. KOVACS: *Nature*, 178, 703 (1956).
- 7) R. HUGH and E. LEIFSON: *J. Bacteriol.*, 66, 24-26 (1953).
- 8) K. OKUTANI: *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst.*, Kyoto Univ., 10, 1-47 (1966).
- 9) M. J. THORNLEY: *J. appl. Bacteriol.*, 23, 37-52 (1960).
- 10) V. MØLLER: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 36, 158-172 (1955).
- 11) J. M. SHEWAN, G. HOBBS and W. HODGKISS: *J. appl. Bacteriol.*, 23, 379-390 (1960).
- 12) R. S. BREED, E. G. D. MURRAY and N. R. SMITH: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore (1957).
- 13) K. AISO, U. SIMIDU and K. HASUO: *J. gen. Microbiol.*, 52, 361-364 (1964).
- 14) J. LISTON: *ibid.*, 16, 205-216 (1957).
- 15) U. SIMIDU, E. KANEKO and K. AISO: *This Bull.*, 35, 77-82 (1969).
- 16) L. IRVING: *The Biology of Marine Mammal*, Academic Press, New York • London, p. 154 (1969).