

イカから分離した発光細菌の研究

(2021年7月～2022年11月 Archives)

大阪府立園芸高等学校バイオサイエンス科

微生物部 藤川湧陽 櫛田裕太

はじめに

微生物部では果実など身近な分離源から酵母や乳酸菌などを分離し研究材料としている。海洋資源のイカや魚に付着している微生物を研究材料にしたいと考えた。イカや魚に付着している発光細菌の純粋分離、分離後の発光細菌の性質を調べた。又、多くの人にサイエンスの不思議さや面白さを感じてもらおう一環として、イベント「イカ発光細菌でお絵描き」を企画し実行した。

1. イカの入手と人工海水の準備

スーパーで市販のイカを入手し人工海水^{*1}を注ぎ23℃に24時間放置した(図1)。

^{*1}ホームセンターで購入した。



図1 市販のイカと人工海水(ジエック(株)製)

2. イカから発光細菌の分離

方法: 培地はマリンアガー(東大大気海洋研究所の文献)を参考にした。3.6%人工海水にペプトン0.25%、酵母エキス0.05%相当量の寒天培地をオートクレーブで滅菌し平板培地を作成した。火炎殺菌した白金耳を使用してイカ組織の上部をなぞり、培地に接種した^{*2}。その後23℃で48時間培養した。

^{*2} 接種は平板の1/4を塗抹した後、白金耳を火炎殺菌後に再び画線の一部を引っ掛け、残りの塗抹していない部分に塗抹し、さらにもう1回繰り返した(図2)。

結果: 48時間後、明所で観察したところコロニーが形成されていた(図3)。暗所で観察すると一部青白く光っているコロニーの存在を確認した(図4)。

生育したコロニーの大部分に発光性は見られなかったが段階的に塗抹した結果、発光するコロニーを獲得することができ、イカ発光細菌の分離に成功した。

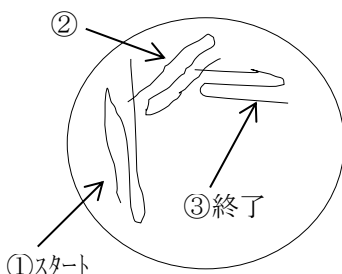


図2 塗抹した順序

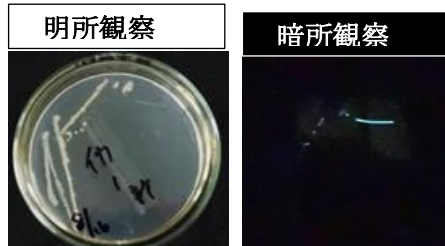


図3 イカ発光細菌分離

3. イカ発光細菌の継代培養

生育した発光コロニーから発光細菌を釣菌し、人工海水培地に継代し培養した。24時間後

得られたコロニーは元株コロニーより青白い光量が増加した(図4)。塗抹後の生育が良好で、

より大きいコロニーが形成されたといえる。

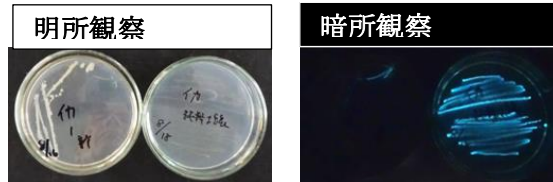


図4 継代培養の観察図(左:元株、右:二代目株)

4. イカ発光細菌培養培地の比較試験

発光細菌の培養培地は数多く知られているが、安価に作成できる培地に注目した。先の人工海水培地に加えて食塩含有培地^{*3}を使用した。^(^{*3} 参考文献: 海洋性発光バクテリアの教材化 北海道立教育研究所)発光細菌コロニー(発光細菌元株)から釣菌し人工海水培地と食塩含有培地に塗抹し23℃で24時間培養した。

結果と考察: 培養後、暗所で観察した(図5)。光量は食塩培地の方が格段に多い。その原因を探ることを課題とした。使用した人工海水培地(表1)と食塩含有培地(表2)の成分を比較した。人工海水成分は食塩を主成分として無機塩類、pH調整剤が含まれているので食塩含有培地と似ているといえる。発光量はグリセリンの有無が関係していると考えられる。

人工海水培地 食塩含有培地



図5 イカ発光細菌培養培地比較試験

| | |
|-------|-------|
| 人工海水 | 3.6% |
| ペプトン | 0.25% |
| 酵母エキス | 0.05% |

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 食塩(精製塩) | 3% |
| ペプトン | 0.5% |
| グリセリン | 0.3% |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 0.02% |
| 1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) | 0.02% |

5. イカ発光細菌の培養培地成分(グリセリン)の発光量効果

人工海水培地(A)と食塩含有培地(B)のグリセリンの有無を区分として発光細菌元株を塗抹法で接種した。23℃で24時間培養し明所、暗所で観察しコロニーの生育状況と発光量を調べた(図6、7)。

結果と考察: 明所観察から培地A、Bともグリセリンを添加した右シャーレの発光細菌コロニーは生育良好であった。暗所観察ではA、Bともグリセリンを添加した右シャーレの光量が多かった。培地Aはグリセリンを添加しなくても一定の光量があるので完成された培地なのであろう。培地Bは明らかにグリセリンの効果がみられた。イカ発光細菌はグリセリンを資化し細胞増殖をすすめる性質があり光量は菌体量に比例していると考えられる。

明所観察

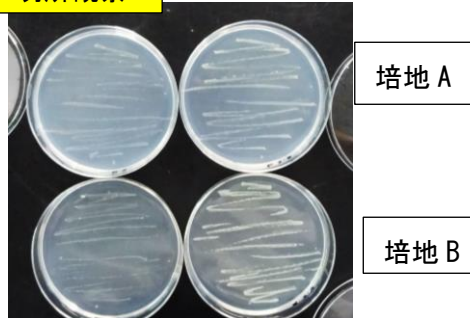


図6 イカ発光細菌の培地成分による生育比較(左:グリセリン0%、右:グリセリン0.3%)

暗所観察



図7 イカ発光細菌の培地成分による発光量比較(左:グリセリン0%、右:グリセリン0.3%)

6. イカ発光細菌の培地成分(電解質)による発光条件の検討

イカ発光細菌の培養培地は主成分としてNaClを含有している。NaCl以外の電解質を添加した場合について発光強度の変化を調査した。20℃、15時間培養後に観察した(図8)

| | |
|--------------------------------------|-------|
| 培地成分 | |
| 電解質 | 3% |
| ペプトン | 0.5% |
| グリセリン | 0.3% |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 0.02% |
| 1 M リン酸緩衝液 | 0.02% |

| | |
|-------------------------------------|----------|
| NaCl なし(A) | NaCl (B) |
| Na ₂ SO ₄ (C) | KCl (D) |
| K ₂ SO ₄ (E) | |

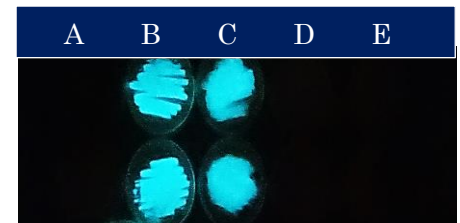


図8 電解質成分の異なる培地のイカ発光細菌生育試験(暗所撮影)

発光する培地に共通する電解質イオンはNa⁺である。

7. イカ発光細菌の細胞像

走査電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した(図9)。細胞は桿状で長さはおおよそ0.8~1.4μm程度であることが分かった。

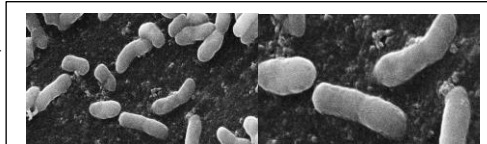


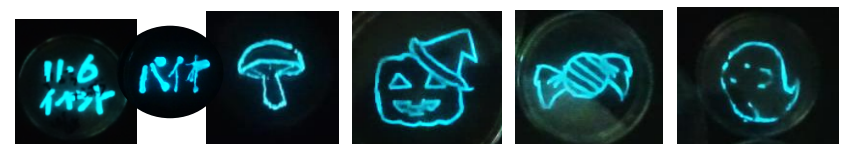
図9 イカ発光細菌の走査電子顕微鏡観察(左:×10k、右:×20k)

8. イカ発光細菌でお絵描き

発光細菌を使って寒天にお絵描きをする体験イベントを企画しました(2021年、2022年の2年間)。11月のキューズモール箕面において園芸フェスタが催され、「翌日には暗やみで青白く光って見える」というふれこみで小学生を中心に約70名が体験に参加、コロナ禍で貴重な部活動を経験しました(図10)。以下作品集です。



図10 イベント風景



おわりに: イカ発光細菌の性質について、栄養成分としてグリセリンが有効、電解質イオンにナトリウムイオンが必須であることが判明した。まだまだ調べてみたいことが多く、例えば、グリセリン以外の栄養成分などの探索、液体培地培養による生菌数検査と発光量の関係、抗生物質・UVによる有用物質生産株(光触媒酵素活性化)育成などに取り組みたい課題は多い。