

水陸両生魚, ムツゴロウとトビハゼの消化管内細菌フローラ

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
著者	森井, 秀昭 笠間, 憲太郎
巻/号	55巻4号
掲載ページ	p. 733-741
発行年月	1989年4月

水陸両生魚、ムツゴロウとトビハゼの消化管内細菌フローラ

森井秀昭, 笠間憲太郎

(1988年11月9日受付)

Bacterial Flora in the Digestive Tracts of Mudskipper Fishes *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus cantonensis*

Hideaki Morii* and Kentaro Kasama*

Bacterial flora and viable counts in the gills and the digestive tracts (stomach and intestine) of mudskipper fishes *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus cantonensis* and in mud of a mud flat were studied to discuss the primary factors which control the composition of bacterial flora in the digestive tracts.

The flora was composed principally of *Vibrio*, coryneforms and others in the mud and the gills, and of *Vibrio* or coryneforms in the digestive tracts. The composition of flora in the stomach was similar to that in the intestine for *P. cantonensis* but not for *B. pectinirostris*. The counts in the stomach were much lower than that in the intestine for *B. pectinirostris* but could not recognize obvious difference between the two for *P. cantonensis*. The counts in the intestines of both the fishes were much higher in aerobic incubation than in anaerobic incubation and a large part of bacteria counted in aerobic incubation was *Vibrio*. The maximum count was in 100% sea water medium in the mud but in 50% sea water medium in the intestines, and a large part of bacteria accounted in both the samples was *Vibrio*. The counts in the digestive tracts were lower in autumn than in spring and summer in case of *B. pectinirostris* but almost equal for all seasons in case of *P. cantonensis*.

From these facts it was presumed that the flora of the digestive tracts is influenced by bacteria from the mud, differing from the stage of progress of the stomach and from wintering season in the fishes, being controlled by salt concentration and oxygen tension of sea water to be supplied through "water-drinking" for osmoregulation.

魚類の消化管内細菌フローラは魚類の生息環境、消化管の形態、食性などにより異なると考えられる。これまで、海産魚や淡水魚の消化管内細菌フローラに関する研究は数多く、総説¹⁻⁴⁾も見られる。しかし、汽水域に生息し、しかも干潟上で生活する水陸両生魚のムツゴロウとトビハゼの消化管内フローラに関する研究はまだ見られない。

ところで、ムツゴロウとトビハゼは同じハゼ科に属するが消化管の形態が異なり、また似た生活と活動を示しながらも食性を異にし、その生息域における移動性も少なく、消化管内フローラの構成を支配する要因を検討するには好都合である。

すなわち、ムツゴロウの胃はより発達し、長い円筒形で、外面的にも腸からの区別が明りょうであるが、トビハゼの胃は短い円筒形で、外面的には腸からの区別が困難である。腸はムツゴロウでは著しく長く、口腔から肛門までの長さの約6倍であるが、トビハゼではより短く

約2.5倍である。食性については、ムツゴロウは干潟上に着生している付着性珪藻を摂食するのに対し、トビハゼでは動物食で、泥上の小動物や泥状物質を摂食すると言われている。^{5,6)} 移動性については、秋から春までの休止期では両者とも巣穴(泥中に自ら掘った坑道)の中で越冬し、移動性はない。春から秋までの活動期でもムツゴロウは同じ巣穴を長期間にわたって占有する 경우가多いと言われ、トビハゼについても潮の干満に伴う干潟から川岸までの間の移動にすぎないとされている。⁶⁾

本研究は汽水域に生息し、干潟上で生活するこれら水陸両生魚のムツゴロウとトビハゼの消化管内フローラの特異性を明らかにすることを目的とするが、本報ではこれら両生魚の鰓、胃および腸とその生息干潟泥における生菌数とフローラを季節、塩分、酸素分圧などを考慮して調べ、これら両生魚の消化管内フローラの構成とその構成を支配する2-3の要因を検討した。

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

実験方法

供試魚と供試泥 供試魚のムツゴロウ *Boleophthalmus pectinirostris* とトビハゼ *Periophthalmus cantonensis* はともに長崎県諫早市を流れ、有明海の諫早湾に注ぐ本明川河口部の干潟で採取した。ムツゴロウは巢穴中から掘り出し、トビハゼは干潟上で捕獲した。採取した試魚は滅菌大型ペトリ皿に入れて持ち帰り、直ちに実験に供した。供試魚の採取日、供試尾数、体長、体重は Table 1 に示す。

供試泥は供試魚を採取した場所付近の干潟表層泥を採集した。すなわち、4 枚重ねの滅菌ガーゼ (30×45 cm)

を干潟上に広げて置き、その両端を滅菌ピンセットで持ち、干潟上を約 20 m 引き回した。この操作は潮が引いて間がない午前 10 時に行い、ガーゼ 4 枚のうち 2 枚から絞り取った泥を午前 10 時の試料とした。また残り 2 枚のガーゼはそのまま干潟上に 4 時間放置し、これより取った泥を午後 2 時の試料とした。午後 2 時のこのような採泥は、同時刻では干潟表面は乾燥し採泥が困難となること、および細菌数とフローラの変動をより正しく知るためである。なお、この 4 時間の間でも干潟上ではムツゴロウ・トビハゼとも摂食していた。採泥日、天気、採泥時の干潟表面温度、供試泥の乾燥重量は Table 2 に示す。

Table 1. Mudskipper fishes *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus cantonensis* and weights of the gills, stomach contents and intestinal contents of the fishes used in this experiment

Sampling date	No. of fish used	Body length (cm)	Body weight (g)	Gills (mg)	Stomach contents (mg)	Intestinal contents (mg)
<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>						
May 22, 1979	3	13.0-14.0	28.4-32.7	180-620	107-345	133-475
July 13, 1979	3	14.0-15.0	34.1-37.7	/	/	258-546
Aug. 27, 1979	3	13.5-17.0	26.8-44.3	258-482	128-330	88-190
Sept. 10, 1979	3	14.0-14.5	25.4-27.4	/	/	92-238
Oct. 28, 1979	3	16.0-16.5	36.0-39.0	296-643	68-159	108-451
Oct. 29, 1979	3	13.5-15.5	31.3-43.2	/	/	115-224
May 13, 1980	3	14.0-15.0	31.5-35.9	419-721	51-302	99-485
Aug. 26, 1980	6	15.0-17.0	28.0-30.0	/	/	76-125
Aug. 29, 1981	6	16.0-16.5	37.2-49.1	/	/	70-211
<i>Periophthalmus cantonensis</i>						
May 22, 1979	4	7.5- 8.0	6.2- 7.0	96-121	8- 39	5- 56
July 13, 1979	4	6.0- 7.5	3.9- 4.9	/	/	5- 20
Aug. 27, 1979	4	7.0- 9.5	4.4- 9.8	43-109	25- 82	5- 78
Sept. 10, 1979	4	6.5- 8.0	4.4- 8.0	/	/	10- 34
Oct. 28, 1979	5	7.0- 7.5	4.5- 5.6	43- 93	3- 28	10- 17
Oct. 29, 1979	5	5.0- 7.5	3.0- 5.1	/	/	3- 25
May 8, 1980	5	8.9- 9.2	5.0- 6.2	23- 47	8- 18	11- 53
June 19, 1980	6	7.5- 8.5	7.0- 9.1	/	/	8- 27
Aug. 1, 1980	6	6.0- 6.5	3.8- 4.4	/	/	9- 23
June 10, 1981	12	7.0- 8.5	5.2- 8.0	/	/	15- 53

The mudskipper fishes were caught alive at a mud flat in the estuary of the Honmyo River which empties into Omura Bay at Isahaya, Nagasaki, Japan.

Table 2. Mud used in this experiment

Sampling date	Atmospheric condition	Sampling time	Temperature on a mud flat (°C)	Dry matter of mud used (g/ml)
May 10, 1979	Cloudy	10 a.m.	26	0.09
		2 p.m.	30	0.68
May 22, 1979	Shiny	10 a.m.	28	0.15
		2 p.m.	32	0.57
Aug. 22, 1979	Shiny	10 a.m.	36	0.11
		2 p.m.	40	0.17
Nov. 2, 1979	Shiny	10 a.m.	20	0.18
		2 p.m.	22	0.19

Mud was collected from surface layer of a mud flat in the estuary of the Honmyo River.

生菌数の測定と菌株の分離 供試魚の鰓、胃および腸における生菌数の測定は、まず試魚の体表面を 70% アルコールで消毒後鰓を採取し、次に開腹後胃と腸を切り離し、胃内容物と腸内容物を取り出した。これら鰓と消化管内容物は測重後一定容の 50% 滅菌海水を加え、さらに鰓と胃内容物についてはポリトロンで 30 秒間ホモジナイズし、同海水の 10 倍段階希釈液とした。これを 50% 海水の ZoBell 2216 E 改変寒天平板培地⁷⁾を用い、20°C で 7 日間培養 (特記しない限り好気培養とする) 後の集落を算定した。なお、各試験には試魚 3 尾を用い、各個体毎の生菌数を測定したが、1 尾における試料の量が少ない場合 (特にトビハゼの胃または腸内容物において、その重量が 10 mg 以下の場合) には数尾分を合わせ 1 検体とした。一方、最適希釈平板培養およびその他の分離可能な各希釈段階の平板培養からは外観の異なる集落を鈎菌し、同平板を用いて菌株を単離した。供試魚の鰓、胃内容物、腸内容物の重量は Table 1 に示す。

腸における培地の塩分濃度別の生菌数の測定は、まず前述同様にして取り出した腸内容物に一定量の 10% 滅菌海水を加え、けん濁液とし、これを 0%, 50% および 100% 滅菌海水の 10 倍段階希釈液とした。次にこれらの希釈液と同じ塩分濃度の ZoBell 2216 E 改変寒天平板培地を用い、前述同様にして培養後集落を算定した。なお、各試験とも試料は 3—5尾分を合わせたものを一検体とし、この一検体についての生菌数を測定した。一方、生菌数測定後の最適希釈平板培養からは菌株の分離を行った。供試魚の腸内容物重量は Table 1 に示す。

腸における嫌気培養による生菌数測定は、まず窒素ガスを満たした無菌パック内で腸内容物を 50% 海水の 10 倍段階希釈液とする。次にこれを窒素ガス 80, 水素ガス 10, 炭酸ガス 10 より成る混合ガスの嫌気装置内で、50% 海水のトリプティカーゼ・ソイ寒天 (TSA), プレイン・ハート・インヒュージョン寒天 (BHIA), クックト・ミート寒天 (CMA), リーインフォースト・クロストリジウム寒天 (RCA), マッコンキー寒天 (MA), プルセラ寒天 (BA) (いずれも BBL) の各平板培地に接種した。これらの平板はさらにガスパックジャー (BBL) に移して培養後、生菌数を算定した。他方、比較のため TSA 培地による好気培養も行った。なお、各試験とも数尾分を合わせたものを一検体とし、この 2-3 検体について生菌数を測定した。生菌数測定後の最適希釈平板からはそれぞれの培地毎に集落を単離し、さらにこれら分離菌のすべてが発育した BHIA 培地を用い、外観の異なる集落を肉眼的に選別し、供試菌とした。

干潟泥の生菌数測定のうち、塩分濃度別の生菌数測定に関しては、まず供試泥を 10% 海水のけん濁液とし、これを 0, 50 および 100% 海水の 10 倍段階希釈液とし

た。また季節別の生菌数測定に関しては 50% 海水の 10 倍段階希釈液とした。次にこれらの希釈液を同じ塩分濃度の ZoBell 2216 E 改変寒天培地で平板培養し、集落を算定した。塩分濃度別の生菌数の測定は夏に一度だけ行った。なお、各試験とも一つの検体についてのみ生菌数を測定した。菌株の分離は最適希釈平板から行った。泥の乾燥重量は Table 2 に示す通りであり、生菌数は乾燥重量に対する値で算出した。

分離菌株の発育温度 および 塩分要求試験 基本培地 [50% 海水に Oxoid Lab Lemco (L 29) 1%, Oxoid Peptone (L 37) 1% を加え、pH 7.4 とした] を用い、20°C (以後特記しない限り培養温度はこの温度とする) で 18—36 時間前培養した培養液の 1 白金耳を試験培地に接種し、2—3 日間培養後に肉眼的に濁りの有無を観察し、発育の可否を判定した。発育温度試験は基本培地を用い 37°C と 42°C の発育の有無を、また塩分要求試験は基本培地の 50% 海水の代わりに蒸留水を用い、発育の有無をしらべた。

分離菌株の形態学的・生理学的性状検査 形態学的性状検査は前報⁸⁾ 同様に行った。なお、運動性については 1% ペプトン水⁹⁾ でも合わせ試験した。生理学的性状検査のうちデオキシリボ核酸 (DNA) の分解試験は新細菌培地学講座記載の方法¹⁰⁾ に従ったが、その他の試験は前報⁸⁾ 同様に行った。なお、各試験とも発育に塩化ナトリウムを必要とする菌株については試験培地に塩化ナトリウム 2.5% を加え試験した。

分離菌株の分類学的所属 グラム染色・細胞の形態・胞子の有無・運動性・ペン毛の着生状態・黄色色素産生・カタラーゼ産生・オキシダーゼ産生・硝酸還元・O/F 試験・グルコースから酸とガスの産生・ゼラチン分解・寒天分解・DNA 分解・発育温度・塩分要求性・O/129 によるビブリオ感受性の各試験結果に基づき、Bergey's Manual^{11,12)} を基本とし、清水¹³⁾ の同定形式に従って分類学的所属を明らかにした。なお、清水の同定形式での *Acinetobacter-Moraxella* グループは、Bergey's Manual¹¹⁾ に従い、オキシダーゼ陰性を *Acinetobacter* とし、同陽性を *Moraxella* として区分した。また *Streptomyces*, *Nocardia*, *Arthrobacter* および *Corynebacterium* はこれらを一括してコリネ型細菌とした。

実験結果

ムツゴロウとトビハゼの鰓・胃・腸および干潟泥の生菌数 ムツゴロウとトビハゼの鰓、胃および腸における時期別の生菌数を Table 3 に示す。鰓の生菌数およびその時期的変化はムツゴロウとトビハゼでは類似した。すなわち泥温 (Table 2 参照) の高い春 (5 月 22 日) と夏 (8 月 27 日) では、鰓の湿重量に対する生菌数は両者と

Table 3. Seasonal variations of viable aerobic counts in the gills, stomach cavity and intestinal tract of the mudskipper fishes

Sampling date	Viable counts (cfu/g)		
	Gills	Stomach contents	Intestinal contents
	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>		
May 22, 1979	$5.2 \times 10^7 - 1.6 \times 10^8$	$3.2 \times 10^8 - 3.6 \times 10^7$	$5.7 \times 10^8 - 9.0 \times 10^9$
Aug. 27, 1979	$3.7 \times 10^7 - 2.3 \times 10^8$	$6.0 \times 10^8 - 6.7 \times 10^7$	$5.0 \times 10^8 - 1.1 \times 10^{10}$
Oct. 28, 1979	$7.3 \times 10^8 - 2.3 \times 10^7$	$5.1 \times 10^5 - 1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7 - 1.8 \times 10^8$
	<i>Periophthalmus cantonensis</i>		
May 22, 1979	$4.2 \times 10^7 - 9.6 \times 10^7$	$8.2 \times 10^7 - 2.3 \times 10^9$	$5.1 \times 10^8 - 1.8 \times 10^{10}$
Aug. 27, 1979	$4.5 \times 10^7 - 1.2 \times 10^8$	$1.4 \times 10^7 - 3.5 \times 10^8$	$1.2 \times 10^7 - 4.8 \times 10^9$
Oct. 28, 1979	$2.3 \times 10^8 - 9.3 \times 10^8$	$3.3 \times 10^7 - 3.6 \times 10^8$	$7.2 \times 10^7 - 5.0 \times 10^9$

Viable counts were performed on the homogenized samples with 50% sea water ZoBell 2216E agar modified⁷⁾ after incubation at 20°C for 7 days. Counts are the results obtained from three test samples which mixed a few samples in case of that the weight of one test sample was less than 10 mg.

も $10^7-10^8/g$ のオーダーで、泥温の低い秋 (10月28日) では $10^6-10^7/g$ に低下した。

胃の生菌数およびその時期的変化はムツゴロウとトビハゼでは異なった。すなわち春と夏では、ムツゴロウの胃内容物の湿重量に対する生菌数は $10^8-10^9/g$ 、トビハゼでは通常 $10^7-10^8/g$ 、時には $10^9/g$ で、トビハゼはムツゴロウの数倍から数百倍の値を示した。秋ではムツゴロウは $10^5-10^6/g$ に低下したが、トビハゼでは $10^7-10^8/g$ で、春や夏と変わりなかった。

腸の生菌数はムツゴロウ・トビハゼともほぼ同じ範囲内で変動し、腸内容物の湿重量に対する値はともに $10^7-10^{10}/g$ であった。時期的には春と夏では両者とも通常 $10^8-10^9/g$ 、時には $10^{10}/g$ を示した。秋ではムツゴロウは $10^7-10^8/g$ に低下したが、トビハゼは $10^7-10^9/g$ で春や夏と変わりなく、胃と同様の傾向を示した。なお、腸の生菌数は平均的にはトビハゼがムツゴロウの数倍から10倍程度高い値を示したが、これについては Table 4 と 5 を参考にされたい。

胃と腸の生菌数を比較すると、ムツゴロウでは腸は胃に比べて極めて高く、数百倍の値を示したが、トビハゼでは胃と腸の間の差はほとんどないか、場合によっては数倍から10倍程度高かった。

ムツゴロウとトビハゼの腸における塩分濃度別の生菌数を Table 4 に示す。腸における塩分濃度別の生菌数は実験を行った3回とも同様の傾向を示し、すなわち両魚種とも50%海水での生菌数が最高値を示し、100%海水での生菌数の数倍から10倍程度、0%海水での数百倍から数千倍で、腸内では好塩性の細菌が優占した。なお0%海水での腸内容物湿重量に対する生菌数はムツゴロウで $10^5-10^6/g$ 、トビハゼで $10^6/g$ であった。

ムツゴロウとトビハゼの腸における嫌気培養による生菌数を Table 5 に示す。ムツゴロウの腸における嫌気培養による生菌数は、培地による差も多少見られたが大半

が $10^7/g$ で、比較のため行った好気培養では $10^8/g$ 、またトビハゼについては嫌気培養では $10^8/g$ 、好気培養では $10^9/g$ で、両魚種とも好気培養菌数は嫌気培養菌数に比べ10倍程度高い値を示した。

干潟泥における時刻、時期および塩分濃度別の生菌数を Table 6 に示す。干潟泥における50%海水での生菌数は全実験期間(5月10日-11月2日)を通して午前10時は午後2時より多かったが、時期的な差異はほとんどなく、すなわち泥の乾燥重量に対する生菌数は全実験期間を通して午前10時では $10^7/g$ 、午後2時では $10^6/g$ であった。また、夏(8月22日)に行った実験では0および100%海水の場合とも、午前10時は午後2時より生菌数は多かったが、その差は50%海水の場合ほど顕著ではなかった。

塩分濃度別の生菌数は、夏に行った実験では午前10時および午後2時の場合とも100%海水での値が最も高く、50%海水の数倍から10倍程度、0%海水の数倍から100倍程度であった。

ムツゴロウとトビハゼの鰓・胃・腸および干潟泥のフローラ ムツゴロウとトビハゼの鰓、胃および腸のフローラを Table 7 に示す。なお、実験1(Exp 1)は春(ムツゴロウは5月13日、トビハゼは5月8日)に、実験2(Exp 2)は秋(両試魚とも10月28日)に採取した試魚から分離したフローラであり、また夏に採取した試魚からの分離菌株は保存の不備で死滅した。Table に示すように、フローラを構成する菌種数は両魚種とも鰓、胃および腸の順に減少した。鰓では両魚種とも、実験1と2で構成フローラを異にしたが、主たるフローラは *Vibrio* やコリネ型細菌で、その他 *Alteromonas* などが高率を示す場合があった。胃ではムツゴロウについては実験1および2とも大半がコリネ型細菌で *Vibrio* は少なかったが、トビハゼについては実験1ではコリネ型細菌、実験2では *Vibrio* が大半を占めムツゴロウと

Table 4. Viable aerobic counts in the intestinal tract of the mudskipper fishes in the medium prepared with different concentrations of sea water

Sampling date	Viable counts (cfu/g intestinal contents)		
	0% SW*	50% SW	100% SW
<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>			
July 13, 1979	1.2×10^5	1.5×10^8	1.8×10^7
Sept. 10, 1979	2.3×10^5	1.3×10^8	3.9×10^7
Oct. 29, 1979	1.8×10^6	8.6×10^8	8.9×10^7
<i>Periophthalmus cantonensis</i>			
July 13, 1979	2.9×10^6	2.0×10^9	6.4×10^8
Sept. 10, 1979	1.9×10^6	1.0×10^{10}	8.0×10^8
Oct. 29, 1979	8.1×10^8	8.8×10^8	3.8×10^8

* sea water.

Viable counts are the results obtained from one sample which mixed intestinal contents from several fishes.

Table 5. Viable anaerobic and aerobic counts in the intestinal tract of the mudskipper fishes

Sampling date	Viable counts (cfu/g intestinal contents)						
	Anaerobic						Aerobic
	TSA	BHIA	MA	CMA	RCA	BA	TSA
<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>							
Aug. 26, 1980	4.3×10^7	2.2×10^7	4.0×10^5	2.7×10^7	1.1×10^7	1.2×10^7	1.0×10^8
Aug. 29, 1981	3.0×10^7	1.5×10^8	4.5×10^6	/	1.0×10^7	5.0×10^7	/
<i>Periophthalmus cantonensis</i>							
June 19, 1980	1.0×10^8	2.0×10^8	4.5×10^7	2.5×10^8	4.5×10^7	4.0×10^8	/
Aug. 1, 1980	1.8×10^8	2.5×10^8	2.2×10^8	1.6×10^8	2.7×10^8	4.0×10^8	3.8×10^9
June 10, 1981	2.0×10^8	2.5×10^8	1.5×10^8	/	1.5×10^8	1.0×10^8	/

Viable counts were performed with Trypticase Soy Agar (TSA), Brain Heart Infusion Agar (BHIA), MacConkey Agar (MA), Cooked Meat Agar (CMA), Reinforced Clostridial Agar (RCA) and Brucellar Agar (BA) made up in 50% sea water after incubation at 20°C for 7 days. BBL anaerobic jar and Gas-Pak anaerobic envelopes were employed for anaerobic incubation. Counts are the results obtained from a few samples which mixed intestinal contents of several fish.

Table 6. Diurnal and seasonal variations of viable aerobic counts of the mud, and changes of the counts in the medium prepared with different concentrations of sea water

Sampling date	Sampling time	Viable counts (cfu/g dry mud)		
		0% SW*	50% SW	100% SW
May 10, 1979	10 a.m.	/	2.8×10^7	/
	2 p.m.	/	2.9×10^6	/
May 22, 1979	10 a.m.	/	1.8×10^7	/
	2 p.m.	/	8.0×10^6	/
Aug. 22, 1979	10 a.m.	8.4×10^5	1.5×10^7	6.9×10^7
	2 p.m.	6.4×10^5	6.0×10^6	4.7×10^7
Nov. 2, 1979	10 a.m.	/	1.0×10^7	/
	2 p.m.	/	6.6×10^6	/

* sea water.

Viable counts are the results obtained from a mud sample which was collected with sterilized gauze from ca 10 m² of surface layer of a mud flat.

は異なった結果を示した。腸では両魚種とも、実験 1 および 2 とも *Vibrio* または *Vibrio* とコリネ型細菌が大半を占め、腸は胃に比べ *Vibrio* の占める割合が増加するもの、特にトビハゼでは胃のフローラと類似した。なお、実験 1 と 2 の間で見られたフローラの違いが季

節的な相違によるか否かは夏のデータもなく、また供試菌株の分離が一貫性を欠くこと (供試菌株が最適希釈平板培養以外の平板培養からも分離された) も考えられるので、今回は検討が困難である。

ムツゴロウとトビハゼの腸における塩分濃度別のフロ

Table 7. Aerobic bacterial flora in the gills, stomach cavity and intestinal tract of the mudskipper fishes

Scientific name of isolates	Number of isolates								
	Gills			Stomach cavity			Intestinal tract		
	Exp 1	Exp 2	Total	Exp 1	Exp 2	Total	Exp 1	Exp 2	Total
<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>									
<i>Vibrio</i>	29	2	(31)	5	1	(6)	16	14	(30)
<i>Aeromonas</i>	0	2	(2)	0	0	(0)	0	0	(0)
<i>Enterobacteriaceae</i>	2	0	(2)	2	0	(2)	0	0	(0)
<i>Pseudomonas</i>	0	4	(4)	1	0	(1)	0	0	(0)
<i>Acinetobacter</i>	0	5	(5)	1	0	(1)	0	0	(0)
<i>Flavobacterium</i> Gp I	0	0	(0)	0	2	(2)	0	1	(1)
<i>Flavobacterium</i> Gp II	0	2	(2)	0	0	(0)	0	0	(0)
Coryneforms	8	8	(16)	51	14	(65)	22	9	(31)
<i>Bacillus</i>	2	0	(2)	2	0	(2)	1	1	(2)
<i>Micrococcus</i>	0	3	(3)	1	7	(8)	2	1	(3)
<i>Staphylococcus</i>	2	1	(3)	3	2	(5)	2	2	(4)
Total	(43)	(27)	(70)	(66)	(26)	(92)	(43)	(28)	(71)
<i>Periophthalmus cantonensis</i>									
<i>Vibrio</i>	0	7	(7)	1	13	(14)	5	18	(23)
<i>Pseudomonas</i>	1	0	(1)	1	0	(1)	0	0	(0)
<i>Alteromonas</i>	0	9	(9)	1	1	(2)	0	0	(0)
<i>Flavobacterium</i> Gp I	0	0	(0)	1	0	(1)	0	0	(0)
<i>Flavobacterium</i> Gp II	0	1	(1)	0	0	(0)	0	0	(0)
Coryneforms	4	2	(6)	12	0	(12)	5	1	(6)
<i>Bacillus</i>	3	0	(3)	0	0	(0)	0	0	(0)
<i>Micrococcus</i>	0	3	(3)	0	0	(0)	0	0	(0)
<i>Staphylococcus</i>	1	0	(1)	0	1	(1)	1	0	(1)
Unidentified	1	0	(1)	1	0	(1)	0	0	(0)
Total	(10)	(22)	(32)	(17)	(15)	(32)	(11)	(19)	(30)

Fish samples in Exp (Experiment) 1 and 2 were caught alive on May 13, 1980 and October 28, 1979 for *B. pectinirostris* and on May 8, 1980 and October 28, 1979 for *P. cantonensis*, respectively. Strains were isolated with 50% sea water agar from 30-300 colonies per agar plate in the main and also from other plates. Isolates were identified according to Shimizu¹³⁾ and Bergey's Manual.^{11,12)}

ーラを Table 8 に示す。腸から各塩分濃度で分離したフローラはムツゴロウとトビハゼでは似た傾向を示し、0% 海水ではその大半がコリネ型細菌で *Vibrio* は分離されなかったが、50 および 100% 海水では逆に大部分が *Vibrio* で、その他コリネ型細菌や *Enterobacteriaceae* なども分離された。前述のように、0% 海水での生菌数は 50 および 100% 海水での生菌数に比べ極めて少なく、従って腸内では *Vibrio* が優占し、また 50% 海水での生菌数は 100% 海水での生菌数に比べ著しく多いことから、これら *Vibrio* は 100% 海水よりも低い塩分で発育する菌株が優占すると言えた。なお、器官別のフローラを調べる実験での腸内フローラは、50% 海水培地であるにもかかわらずコリネ型細菌が多数分離される場合があった。これは今回の菌株が最適希釈平板から分離されたのに対し、器官別のフローラを調べる実験では最適希釈平板培養以外の平板培養からも分離されたためと考えられる。

ムツゴロウとトビハゼの腸における嫌気培養でのフロ

ーラを Table 9 に示す。腸から嫌気培養で分離された菌株は両試魚とも *Vibrio* の他コリネ型細菌や *Enterobacteriaceae* も多く、また偏性嫌気性菌は分離されなかった。前述のように、嫌気培養菌数は好気培養菌数に比べ著しく少なく、また好気培養でのフローラは *Vibrio* が優占し、従って好気培養で分離される *Vibrio* の中には嫌気培養では発育できない菌株が多数存在すると言え、このことについては分離菌株で確認もしている。一方、嫌気培養での分離菌株はすべて好気培養でも発育した。

干潟泥から時刻、時期および塩分濃度別に分離したフローラを Table 10 に示す。干潟泥における時刻別のフローラ、特に 50% 海水で分離したフローラについては、午前と午後の泥温差および泥の乾燥度合 (Table 2 参照) の大きかった春 (5 月 22 日) と夏 (8 月 22 日) では、午後は午前 비해フローラを構成する菌種の数が増減し *Vibrio* やコリネ型細菌の占める割合が増加したが、秋 (11 月 2 日) では午前と午後の差はあまりなかった。

50% 海水を用い分離した菌株の時刻別のフローラに

ついで、春では *Vibrio* やコリネ型細菌、夏では *Vibrio* が優占したが、秋では *Vibrio* は検出されず大半がコリネ型細菌で、季節によるフローラの変動が認められた。

Table 8. The flora of bacteria isolated aerobically from the intestinal tract of the mudskipper fishes with the medium prepared with different concentrations of sea water

Scientific name of isolates	Number of isolates		
	0% SW*	50% SW	100% SW
<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>			
<i>Vibrio</i>	0	12	5
<i>Enterobacteriaceae</i>	0	1	0
<i>Acinetobacter</i>	0	1	0
Coryneforms	15	0	1
<i>Staphylococcus</i>	0	0	2
Total	(15)	(14)	(8)
<i>Periophthalmus cantonensis</i>			
<i>Vibrio</i>	0	17	17
<i>Enterobacteriaceae</i>	1	0	0
Coryneforms	12	1	1
<i>Micrococcus</i>	1	0	0
<i>Staphylococcus</i>	0	1	0
Total	(14)	(19)	(18)

* sea water.

Bacteria were isolated from intestinal contents of the mudskipper fishes which were caught alive on October 29, 1979. Strains were isolated from 30-300 colonies per agar plate.

夏における塩分濃度別のフローラについては、0% 海水ではコリネ型細菌と *Pseudomonas* が、100% 海水では *Vibrio* が分離され、50% 海水では *Vibrio* が優占したが *Pseudomonas* やコリネ型細菌その他も分離された。前述のように、干潟泥の生菌数は 100 および 50% 海水では高い値を示したが、0% 海水では極めて低く、すなわち今回の試料では *Vibrio* が優占し、また 100% 海水は 50% 海水より生菌数は著しく高いことから、これら *Vibrio* は 100% 海水で発育できる菌株が優占すると言えた。

分離菌株の発育温度、塩化ナトリウム要求性および

Table 9. The flora of bacteria isolated anaerobically from the intestinal tract of the mudskipper fishes

Scientific name of isolates	Number of isolates	
	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	<i>Periophthalmus cantonensis</i>
<i>Vibrio</i>	5	3
<i>Enterobacteriaceae</i>	2	6
Coryneforms	2	6
<i>Bacillus</i>	0	1
<i>Staphylococcus</i>	2	0
Total	(11)	(16)

Bacteria were isolated from *B. pectinirostris* on August 26, 1980 and from *P. cantonensis* on August 1, 1980. Strains were isolated from 30-300 colonies per agar plate.

Table 10. Diurnal and seasonal variations of aerobic bacterial flora of the mud, and changes of the flora in the medium prepared with different concentrations of sea water

Scientific name of isolates	Number of isolates								
	May 22, 1979			Aug. 22, 1979			Nov. 2, 1979		
	10 a.m.	2 p.m.	Total	10 a.m.	2 p.m.	Total	10 a.m.	2 p.m.	Total
<i>Isolated with 0% sea water medium</i>									
<i>Pseudomonas</i>	/	/	/	0	2	(2)	/	/	/
Coryneforms	/	/	/	2	1	(3)	/	/	/
Total	/	/	/	(2)	(3)	(5)	/	/	/
<i>Isolated with 50% sea water medium</i>									
<i>Vibrio</i>	3	7	(10)	5	7	(12)	0	0	(0)
<i>Aeromonas</i>	0	1	(1)	0	0	(0)	0	0	(0)
<i>Pseudomonas</i>	3	1	(4)	2	1	(3)	0	2	(2)
<i>Alteromonas</i>	4	0	(4)	2	0	(2)	0	1	(1)
<i>Flavobacterium Gp II</i>	2	1	(3)	0	0	(0)	0	0	(0)
<i>Micrococcus</i>	0	0	(0)	0	0	(0)	1	0	(1)
Coryneforms	6	6	(12)	1	1	(2)	8	8	(16)
Unidentified	2	0	(2)	1	0	(1)	1	0	(1)
Total	(20)	(16)	(36)	(11)	(9)	(20)	(10)	(11)	(21)
<i>Isolated with 100% sea water medium</i>									
<i>Vibrio</i>	/	/	/	4	5	(9)	/	/	/
Total	/	/	/	(4)	(5)	(9)	/	/	/

Strains were isolated from 30-300 colonies per agar plate.

Table 11. Some characteristics of isolates used in this experiment

Characteristics	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aalteromonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium</i> Gp I	<i>Flavobacterium</i> Gp II	<i>Coryneforms</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	Unidentified
	(184)* ¹	(3)	(6)	(18)	(18)	(6)	(4)	(6)	(195)	(9)	(19)	(18)	(6)
Growth at 37 °C	99* ²	100	100	78	94	50	100	33	97	100	100	100	100
42°C	76	100	50	50	39	0	100	0	79	89	16	33	67
Growth in 0% NaCl	9	100	100	56	0	83	75	33	93	100	100	100	67
O/F test (F%)	100	100	100	0	0	0	0	0	80	100	0	100	0

*¹ Number of isolates used in this experiment.

*² Percentage of positive isolates.

O/F 試験 今回の実験で用いた菌株の発育温度, 塩化ナトリウム要求性および O/F 試験の結果を Table 11 に示す。供試菌株のうち, *Acinetobacter* と *Flavobacterium* グループ II を除く菌株の大半が 37°C で発育し, 中温性であった。塩分要求性については *Vibrio* と *Aalteromonas* の大半が塩化ナトリウム無添加では発育せず好塩性で, 逆にコリネ型細菌などグラム陽性細菌では大半が発育に塩化ナトリウムを必要とせず, 非好塩性であった。O/F 試験については, 特に消化管内から多数分離された *Vibrio* ではそのすべてが, およびコリネ型細菌では 80% が発酵性で, すなわち通性嫌気性であった。

なお, 供試菌株数が特に多かった *Vibrio* とコリネ型細菌の発育温度, 塩化ナトリウム要求性および O/F 試験の結果を菌株が分離された供試魚の各器官および干潟泥それぞれについて検討したが, これら試料間の性状の有意な差異は認められなかった。

考 察

ムツゴロウの胃の生菌数はトビハゼの胃, あるいはムツゴロウの腸の生菌数と比べて著しく少なかったのに対し, トビハゼでは胃と腸の生菌数の間には顕著な差は認められなかった。Sera and Ishida^{14,15)} は胃の発達したマダイと未発達のカワハギの胃内フローラについて研究し, 胃の発達したマダイでは低い pH による細菌の淘汰が著しいことを明らかにしている。今回認められた両魚種間の胃または胃と腸の間の生菌数の差異も胃の発達程度や胃の pH の違いに起因すると考えられる。事実ムツゴロウではより発達した胃を持ち, 腸との区別も明りょうであったのに対し, トビハゼの胃は短い円筒形で, 腸との区別も困難であった。なお, 腸の生菌数もムツゴロウはトビハゼに比べ少なかったが, これについても胃液や胃の生菌数の大小が直接的にあるいは間接的に

影響することが考えられる。

胃と腸の時期別の生菌数については, ムツゴロウでは秋は春や夏に比べ著しく低かったが, トビハゼではこの両時期の間の有意な差はなかった。前報¹⁶⁾ で述べたように, 実験室的にはムツゴロウは約 22°C, トビハゼでは約 18°C 以下になると陸上から水中に移行する。今回, 供試魚の採取を行った 10 月下旬の泥温は 20-22°C であり, 事実干潟上ではトビハゼは摂食活動を行っていたが, ムツゴロウは観察されず, すてに水中生活 (巢穴での生活) に移行し, 従って日常的な摂食活動は行われないと考えられた (ただし, 天気の良い 22°C 以上の時には摂食活動が行われるかも知れない)。Sera and Ishida¹⁴⁾ は絶食したマダイの腸では生菌数は少なく, 摂餌後の時間の経過に伴い生菌数は指数的に増加することを報告し, すなわち今回ムツゴロウで見られた秋における胃と腸の生菌数の減少については摂食活動との関連性が推察された。

塩分濃度別の生菌数 (大半が *Vibrio* により構成) については, 干潟泥では 100% 海水で最高値を示したが, ムツゴロウ・トビハゼの腸ではともに 50% 海水が最も高く, 腸内フローラ (特に *Vibrio*) は生息環境とは異なった特異なフローラを構成していることを示唆する。この理由については以下のように考える。すなわち, 前報¹⁷⁾ で述べたようにムツゴロウとトビハゼの巢穴中の海水塩分濃度は 50% 海水に近いこと, これら魚類 (特にトビハゼ) を水中でのみ飼育すると 100 あるいは 75% 海水中でも死亡する魚体が認められること, 従ってこれら両生魚は通常 100% 海水よりもかなり希釈された海水中で水中生活を営んでいると考えられること, またこれら両生魚を 100% 海水あるいは希釈海水で飼育すると浸透圧調節のための“水飲み”が認められることなどから, 腸の生菌数が希釈海水で最高値を示したのは第一義的に

はこの水飲みにより供給されるであろう環境水に支配されているためと考える。しかし、腸液による希釈も考慮する必要がある。ところで ZoBell¹⁸⁾ は海水や海泥の生菌数は希釈海水よりも 100% 海水で最高値を示すとし、他方 Simidu and Hasuo¹⁹⁾ は海産魚（魚市場より購入したインガレイ）の皮ふの生菌数は 75% 海水と同じ塩濃度の人工海水で最高値を示したと、従って海産魚の皮ふや消化管などの細菌は環境水とは無関係に一般に 100% 海水よりも低い塩分で最高の生菌数を示すことも考えられる。

腸における嫌気培養菌数は両試魚とも好気培養菌数に比べて著しく少なく、また嫌気培養での分離菌株からは偏性嫌気性菌は分離されなかった。これらの結果は腸管の長さが短いトビハゼはもとより著しく長いムツゴロウでさえ、腸内フローラ（大部分が *Vibrio* により構成）は酸化還元電位がより高い菌株によって構成されていることを示唆する。これは水飲みにより腸管内には常時酸素が供給されているためと考えられ、従って他の海産魚の腸でも同様の傾向を示す。¹⁻⁴⁾ 一方、嫌気培養で分離した腸内フローラは *Enterobacteriaceae* が高い割合を占めたが、淡水魚^{20,21)} や淡水飼育したボラ⁴⁾ とサケ類²²⁾ の消化管内からは *Enterobacteriaceae* が著しく高い割合で検出され、すなわちムツゴロウ・トビハゼは汽水域に生息するが故に淡水魚としてのフローラの性状をも示すのであろうか。

干潟泥のフローラは時刻や時期で変動し、その優占種も *Vibrio*、コリネ型細菌およびその他の菌群も見られた。これら菌群は当然のことながら摂食とともに消化管内に搬入される。すなわち、通常海産魚や淡水魚の消化管内フローラとしてはほとんど認められないコリネ型細菌がムツゴロウやトビハゼの消化管内から多数分離されたのはこの干潟細菌を反映したと言える。一方、フローラを構成する菌種の数は鰓、胃および腸の順に減じ、特に腸内フローラは他の海産魚同様に *Vibrio* が優占した。すなわち、供試魚の腸内フローラは生息環境と密接に関連するものの、消化管内の物理的・化学的要因により選択される。これらの要因についてはこれまでに述べてきた pH、塩分、酸素などの他に、すでにその重要性が明らかにされている胆汁¹⁾ が検討されねばならない。

以上のように、ムツゴロウとトビハゼの消化管内フローラは生息環境や消化管内環境に支配されていることが示唆されたが、フローラの構成を支配すると考えられるもう一つの要因、すなわち食性との関連性については今後検討したい。

文 献

- 1) 瀬良 洋, 石田祐三郎: 微生物の生態 2—相互作用をめぐって (微生物生態研究会編), 学会出版センター, 東京, 1975, pp. 53-70.
- 2) 清水 潮: 微生物の生態 2—相互作用をめぐって (微生物生態研究会編), 学会出版センター, 東京, 1975, pp. 71-86.
- 3) R. W. Horsley: *J. Fish. Biol.*, **10**, 529-553 (1977).
- 4) 坂田泰造: 微生物の生態 10—微生物生態論の諸側面 (微生物生態研究会編), 学会出版センター, 東京, 1982, pp. 11-31.
- 5) Y. Suehiro: *Japan. J. Zool.*, **10**, 1-303 (1942).
- 6) 道津喜衛, 的場 実: アニマ, **5**(8), 15-23 (1977).
- 7) 奥積昌世, 堀江 進: 日本誌, **35**, 93-100 (1969).
- 8) 森井秀昭: 日本誌, **38**, 1177-1183 (1972).
- 9) N. Bain and J. M. Shewan: In "Identification Methods for Microbiologists" (ed. by B. M. Gibbs and D. A. Shapton), Academic Press, London/New York, 1986, pp. 79-84.
- 10) 坂崎利一: 新細菌培地学講座, 近代出版, 東京, 1978, pp. 332-335.
- 11) N. R. Krieg and J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1984.
- 12) P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore/London/Los Angeles/Sydney, 1986.
- 13) 清水 潮: 海洋生物資源の探索と利用—未利用微生物・動植物の探索と育種 (内藤敦編), シーエムシー, 東京, 1986, pp. 69-82.
- 14) H. Sera and Y. Ishida: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **38**, 633-637 (1972).
- 15) H. Sera and Y. Ishida: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **38**, 651-652 (1972).
- 16) O. Tamura, H. Morii, and M. Yuzuriha: *J. exp. Biol.*, **65**, 97-107 (1976).
- 17) H. Morii, K. Nishikata, and O. Tamura: *Comp. Biochem. Physiol.*, **63A**, 23-28 (1979).
- 18) C. ZoBell: *J. Mar. Res.*, **4**, 42-75 (1941).
- 19) U. Simidu and K. Hasuo: *J. gen. Microbiol.*, **52**, 347-354 (1968).
- 20) T. J. Trust, J. T. MacInnes, and K. H. Bartlett: *Microbial Ecology* (ed. by M. W. Loutit and J. A. R. Miles), Springer-Verlag, Berlin, 1978, pp. 250-254.
- 21) 吉永 守, 神山和義, 木村喬久, 坂井 稔: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 1281-1290 (1976).
- 22) 吉永 守, 木村喬久, 坂井 稔: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **42**, 91-99 (1976).