海水中における魚類病原細菌の生存性

誌名	養殖研究所研究報告 = Bulletin of National Research Institute of Aquaculture
ISSN	03895858
著者名	佐古,浩
発行元	水産庁養殖研究所
巻/号	13号
掲載ページ	p. 45-53
発行年月	1988年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture No. 13, 45-53 (1988)

海水中における魚類病原細菌の生存性

佐古　浩

(1988年1月6日受理)

Survival of Fish Pathogenic Bacteria in Seawater

Hiroshi Sako*

Survivals of fish pathogenic bacteria in differently treated seawaters were studied. Culture of *Vibrio anguillarum*, *Streptococcus* sp., *Edwardsiella tarda*, *Pasteurella piscicida*, and *Nocardia kampachi* were inoculated into untreated seawater, autoclaved seawater, and filtered seawaters which were passed through membranes with 5.0, 1.2, 0.45, and 0.22 μm pore size. After inoculation viable cell numbers of bacteria were determined by the spread plating method at 24 h intervals during the incubation for 2 weeks at 20°C.

V. anguillarum, *Streptococcus* sp., *E. tarda*, and *P. piscicida* showed lower survival rates in untreated seawater than in autoclaved and 0.22 μm filtered seawaters. Higher survival rates of these four bacteria were observed in seawater filtered through smaller pore size. The survival of *N. kampachi* was not different among untreated and filtered seawaters.

These results indicate that biological factors as well as physicochemical factors strongly affect the survival of fish pathogenic bacteria in seawater.

Key words: survival · seawater · *Vibrio anguillarum* · *Streptococcus* · *Edwardsiella tarda* · *Pasteurella piscicida* · *Nocardia kampachi*

海産魚の病原細菌の海水中における生存性については，すでに多くの報告がある (Evelyn 1971, 楠田 1975, 1978, 楠田・中川 1978, 楠田・川合 1982, Toranzo *et al.* 1982, 伊丹・楠田 1984, Muroga *et al.* 1986)。魚の病原細菌の環境水中での生存性を疾病の流行様式に関与する要因の一つとしてみる場合には，実際の養殖環境中での生存性として検討することが大切である。しかし，これまでの研究ではろ過あるいは高圧滅菌した海水を用いて生存性を検討したものが多い。細菌の生存に影響を及ぼす海水中の要因としては，水温，塩分，pH，栄養分などの各種の理化学的要因のほかに，微生物などのいわゆる生物学的要因が考えられる。ヒトの病原菌などでは，無処理海水中では滅菌した海水中におけるよりも短期間に死滅することが古くから知られており (Carlucci and Pramer 1959, Nakamura *et al.* 1964)，魚の病原細菌についても，無処理海水中と滅菌海水中とでは異なる生存性を示す可能性がある。

そこで，ろ過あるいは加熱で作用が失われる生物学的要因が魚の病原細菌の生存性に及ぼす影響を明らかにするため，5種類の魚類病原細菌について無処理海水，ろ過および高圧滅菌海水中における生存性を比較検討した。また，魚の病原細菌の生存性に関与する要因のろ過に対する挙動を検

* 養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan)

討するため，種々の孔径のメンブランフィルターでろ過した海水中における魚類病原細菌の生存性を調べた。

本研究を行うにあたり，菌株の分与ならびに有益な助言を頂いた高知大学楠田理一教授に深謝の意を表する。

材料および方法

供試菌株 1984年に三重県のブリ (*Seriola quinqueradiata*) から分離した血清型Cに属する *Vibrio anguillarum* A-2株，1982年に三重県のブリから分離したα溶血 *Streptococcus* sp. SM2-11株，1982年に三重県のヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) から分離した *Edwardsiella tarda* PE-1株，1982年に三重県のブリから分離した *Pasteurella piscicida* N-2株および高知大学楠田教授から分与された *Nocardia kampachi* N-1株 (1961年高知県のブリ由来) の5菌株を用いた。これらの菌株はいずれも実験に供試するまで，10%の DMSO を保護剤として −80°C に凍結保存されていたものである。

供試海水 三重県度会郡南勢町五ケ所湾内にあるブリ養殖場の表層水を 3 *l* の滅菌ガラス瓶に採水して実験室に運び実験に供した。なお，供試海水 0.1 m*l* を用いて今回供試した魚病細菌の検出を試みたが，いずれも検出されなかった。

接種菌液の調整 *V. anguillarum* は食塩および寒天の濃度がそれぞれ2%および1.5%になるように修正した1/2濃度の普通寒天 (日水)，*E. tarda* および *Streptococcus* sp. は食塩および寒天の濃度がそれぞれ0.5%および1.5%になるように修正した1/2濃度のブレインハートインヒュージョン (BHI) 寒天 (日水)，*P. piscicida* は食塩および寒天の濃度がそれぞれ2%および1.5%になるように修正した1/2濃度の BHI 寒天を用いて 25°C で24時間，*N. kampachi* は1%小川培地 (日水) を用いて 25°C で7日間培養した。各培養菌を白金耳でかきとり，滅菌海水に懸濁したのちに遠心分離法 (5,000 rpm, 10分間) で2回洗浄し，所定の菌濃度に調整して接種菌液とした。なお，*N. kampachi* は遠心洗浄前にガラス製ホモジナイザーで 1,000 rpm 10秒間磨砕して菌塊を分散した。

無処理，ろ過ならびにオートクレーブ海水中での生存性 供試海水を 200 m*l* 容の三角コルベンに 100 m*l* ずつ分注したものを無処理海水，これを 121°C で15分間高圧滅菌したものをオートクレーブ海水とした。また，供試海水を孔径 0.22 μm のミリポアメンブランフィルター (MF-ミリポア GS) でろ過したのち，同様のコルベンに 100 m*l* ずつ分注したものをろ過海水とした。これらの海水に，供試菌株の接種菌液を 1 m*l* 接種した。接種菌量は海水 1 m*l* あたり *V. anguillarum* は 2.6×10^6, *Streptococcus* sp. は 2.0×10^6, *E. tarda* は 2.8×10^6, *P. piscicida* は 3.2×10^6, *N. kampachi* は 7.4×10^4 cfu であった。各コルベンを 20°C の恒温室に暗条件下で静置し，接種菌の生菌数を24時間ごとに14日間調べた。なお，新鮮な供試海水を用いるために，採水後2.5時間以内に供試菌株を接種した。

各種孔径のろ過海水中での生存性 供試海水の無処理海水ならびに孔径が 5.0, 1.2, 0.45 および 0.22 μm のミリポアメンブランフィルター (MF-ミリポア SM, RA, HA および GS) でろ過した海水をそれぞれ 200 m*l* 容の三角コルベン5個に 100 m*l* ずつ分注した。これらに接種菌液を 1 m*l* 接種した。接種菌量は海水 1 m*l* あたり *V. anguillarum* は 1.3×10^6, *Streptococcus* sp. は 1.3×10^6, *E. tarda* は 2.9×10^6, *P. piscicida* は 3.0×10^6, *N. kampachi* は 3.6×10^4 cfu であった。各コルベンを 20°C の恒温室に暗条件下で静置し，接種菌の生菌数を24時間ごとに14日間調べた。なお，供試海水の採水から供試菌株の接種までは3時間以内に終了した。

生菌数の測定　供試菌株を接種した海水の 0.1 m*l* または滅菌海水で10倍段階希釈した 0.1 m*l* を，*V. anguillarum* ではビブリオ寒天（日水）平板に接種して 25°C で48時間，*Streptococcus* sp. では接種菌の培養に用いたのと同様の BHI 寒天平板で 37°C で48時間，*E. tarda* では SDS を0.01%添加した TSI 寒天（日水）平板（楠田・石原 1981）で 37°C で48時間，*P. piscicida* では接種菌の培養に用いたのと同様の BHI 寒天平板で 25°C で72時間，*N. kampachi* では 1 %小川培地平板で 25°C で14日間培養後のコロニー数と希釈倍数から各海水中の生菌数を求めた。なお，必要な場合は抗血清を用いてコロニーが接種菌であることを確認した。

結　　果

無処理，ろ過ならびにオートクレーブ海水中での生存性　供試菌の無処理，0.22 μm ろ過ならびにオートクレーブ海水中における生菌数の経時変化を Fig. 1 に示した。*V. anguillarum* は無処理海水中においては 2 日後から生菌数の減少がみられ，7 日後には検出限界以下となった。しかし，0.22 μm ろ過およびオートクレーブ海水中では14日後においても 10^5 cfu/m*l* 以上の生菌数を保った。*Streptococcus* sp. は無処理海水中においては 3 日後から生菌数の減少がみられ，14日後には 1.4×10^2 cfu/m*l* と接種時の $1/10^4$ 以下の生菌数となった。一方，0.22 μm ろ過海水では14日後に 1.4×10^5 cfu/m*l*，オートクレーブ海水では 3.8×10^4 cfu/m*l* となり，無処理海水にくらべて100倍以上の生菌数を保った。*E. tarda* は無処理海水中においては 3 日後から生菌数の減少がみられ，6 日後には検出限界以下となった。一方，0.22 μm ろ過海水中では 7 日後，オートクレーブ海水中では 9 日後に検出限界以下となった。*P. piscicida* は無処理海水中においては 2 日後から生菌数の減少がみられ，4 日後には検出限界以下となった。また，0.22 μm ろ過海水中においては 6 日後に検出限界以下となったが，オートクレーブ海水中では14日後においても 3.5×10^3 cfu/m*l* と接種時の $1/10^3$ の生菌数が認められた。*N. kampachi* は無処理海水中では11日後，0.22 μm ろ過海水中では 9 日後に検出限界以下となった。一方，オートクレーブ海水中では 3 日後には検出限界以下となった。

各種孔径のろ過海水中での生存性　供試菌の無処理ならびに孔径が 5.0, 1.2, 0.45 および 0.22 μm のメンブランフィルターでろ過した海水中における生菌数の経時変化を Fig. 2 に示した。*V. anguillarum* は無処理海水中においては 7 日後に検出限界以下となった。孔径が小さなフィルターを用いたろ過海水中ほど生菌数の減少がゆるやかで，検出限界以下となったのは 5.0 μm ろ過では 8 日，1.2 μm ろ過では 9 日，0.45 μm ろ過では14日後であった。これに対して，0.22 μm ろ過では14日後においても 2.7×10^4 cfu/m*l* と接種時の 1/40 以上の生菌数が認められた。*Streptococcus* sp. は無処理海水中においては14日後に 1.2×10^2 cfu/m*l* の生菌数となった。また，孔径の小さなフィルターでろ過した海水中ほど生菌数が高く維持される傾向にあったが，各ろ過海水中の生菌数の差は最大で20倍と小さかった。*E. tarda* は無処理および 5.0 μm ろ過海水中では 4 日後，1.2 および 0.45 μm ろ過海水中では 5 日後，0.22 μm ろ過海水中では 6 日後に検出限界以下となった。また，同一経過時間における生菌数は孔径の小さなフィルターでろ過した海水中ほど高い値となった。*P. piscicida* は 0.22 μm ろ過海水中では 5 日後，その他のろ過海水および無処理海水中では 4 日後に検出限界以下となった。また，同一経過時間における生菌数は孔径の小さなフィルターでろ過した海水中ほど高い値となった。*N. kampachi* は無処理およびいずれのろ過海水中においてもゆるやかに減少し，各海水中での生残曲線に顕著な差は認められなかった。

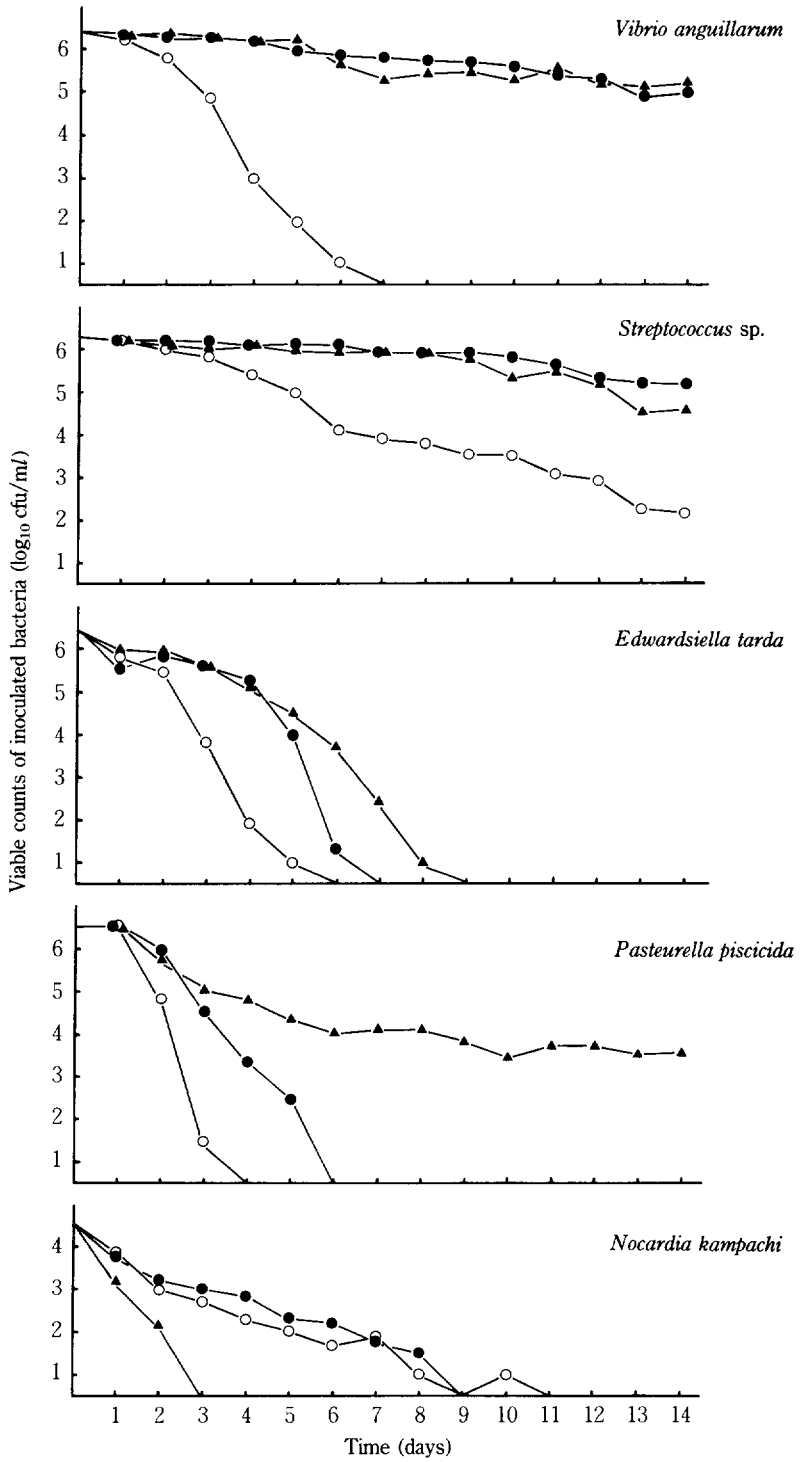

Fig. 1 Survival of inoculated bacteria in untreated (○), 0.22 μm filtered (●) and autoclaved (▲) seawater at 20°C.

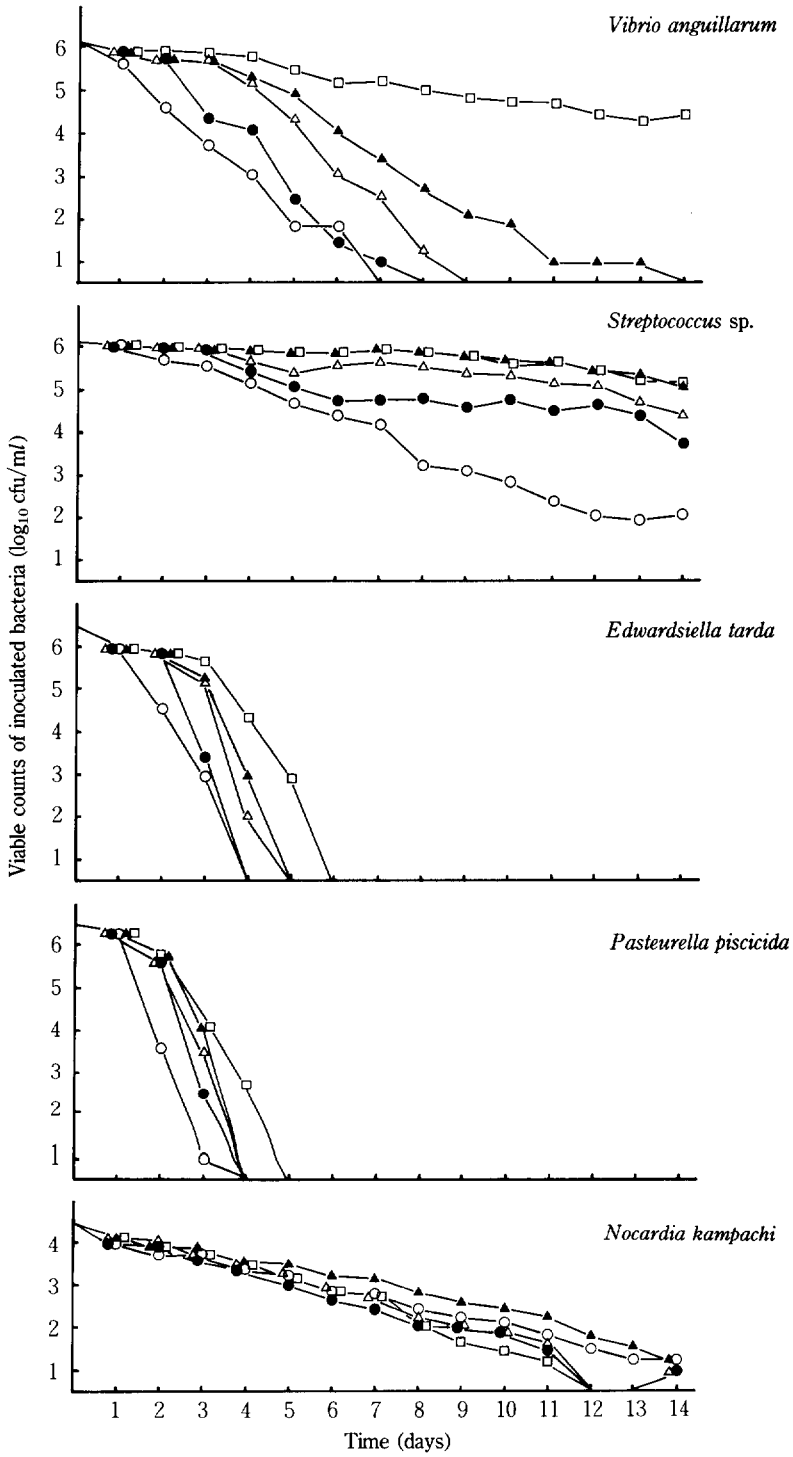

Fig. 2 Effect of filtration on viable counts of inoculated bacteria in seawater at 20°C. ○; untreated, ●; 5.0 μm filtered, △; 1.2 μm filtered, ▲; 0.45 μm filtered, □; 0.22 μm filtered seawater.

考　　察

魚の病原細菌5種について，ブリ養殖場で採取した海水とこれを孔径 0.22 μm のメンブランフィルターでろ過あるいは 121°C, 15分間高圧滅菌した海水中に接種したときの生菌数の経時変化を比較して検討したところ，*V. anguillarum*, *Streptococcus* sp., *E. tarda* および *P. piscicida* の4菌種は，無処理海水中の方が滅菌海水中よりも生菌数の減少が速かった。0.22 μm ろ過はウイルスやある種の細菌が通過することが知られているが，ろ過滅菌法として広く用いられている方法であり，微生物とともにある程度以上の大きさの懸濁物も除去され，熱による海水成分の変化はない。121°C, 15分間のオートクレーブは高圧滅菌に通常用いられている方法であり，微生物は死骸として懸濁物とともに残存するが，熱によって海水中の易熱性成分が変化する。これらのことから，前記4菌種の生菌数の減少が無処理海水中の方がろ過および高圧いずれの滅菌海水中よりも速い原因としては，細菌の栄養源となる懸濁物などの濃度よりも，ろ過や高圧滅菌で除去あるいは死滅する微生物などのいわゆる生物学的要因の影響が大きいことが示唆された。なお，*P. piscicida* はろ過海水とオートクレーブ海水中における生存性が大きく異なっていたことの原因としては，微生物，プランクトン等由来の易熱性の抗菌物質の関与なども考えられるが，明らかでない。一方，*N. kampachi* は無処理海水中と 0.22 μm ろ過海水中における生菌数の減少の傾向に差はみられなかったので，懸濁物や微生物の影響は小さいと考えられた。なお，オートクレーブ海水中ではこれらの海水中よりも生菌数の減少が速かったことの原因としては，加熱による海水中の成分の変化なども考えられるが，明らかでない。

本実験での魚の病原細菌の海水中での生残曲線は，逆S字型，対数的死滅型のほか不規則な変化を示す場合などがあり，容器内における魚類病原細菌の死滅過程にはいくつかの要因が複雑に関与していることが示唆される。死滅速度が一定でない場合が多く，生残曲線の勾配を示すことは難しい。しかし，およその死滅速度を比較するため，対数的死滅を示すものと仮定して生菌数が1/10に減少するのに要する時間（D値，単位日）を最小2乗法により試算し Table 1 に示した。これによると *N. kampachi* を除く4菌種のD値は，無処理海水中では滅菌海水中よりもかなり小さな値をとる。また，無処理海水中におけるD値の5菌種間の差は最大で5.3倍であり，滅菌海水中における菌種間の差が11.5～11.6倍なのに比べて小さい。すなわち，無処理海水中では滅菌海水中におけるほど菌種間に生存性の差はみられず，海水の理化学的性質に対して抵抗性のある菌種でも，ろ過

Table 1. Decimal reduction time of inoculated bacteria in untreated, 0.22 μm filtered and autoclaved seawater at 20°C.

Tested bacteria	Decimal reduction time* (day)		
	Untreated seawater	0.22 μm filtered seawater	Autoclaved seawater
V. anguillarum	1.0	9.3	9.3
Streptococcus sp.	3.2	12.7	8.7
E. tarda	0.9	1.5	1.6
P. piscicida	0.6	1.1	4.8
N. kampachi	2.5	2.9	0.8

* Calculated from changes of viable cell number showed in Fig. 1.

あるいは高圧滅菌で除かれる生物学的要因の影響を受けてすみやかに死滅することがわかる。

魚の病原細菌の海水中における生存性については，*Vibrio* (Evelyn 1971，楠田 1975，1978，Toranzo *et al.* 1982，伊丹・楠田 1984，Muroga *et al.* 1986)，*Pasteurella* (楠田 1978，Toranzo *et al.* 1982)，*Nocardia* (楠田・中川 1978) および *Streptococcus* (楠田・川合 1982) などで検討され，*V. anguillarum* や *Streptococcus* sp. は長期間生存できるが，*P. piscicida* や *N. kampachi* は短期間で死滅し，菌種によって生存性に差があることが知られている。今回の実験における魚類病原細菌の滅菌海水中での生存性については，*P. piscicida* および *N. kampachi* は 0.22 μm ろ過海水とオートクレーブ海水中とで異なる生存性を示したが，いずれの場合も *V. anguillarum* や *Streptococcus* sp. よりも死滅速度が速く，既往の報告と一致した傾向を示した。さらに，海水の温度 (楠田・川合 1982，Muroga *et al.* 1986)，塩分 (伊丹・楠田 1984)，魚肉エキスなどの栄養分の濃度 (Evelyn 1971，楠田 1978) や，実験に用いる菌株の保存状況 (楠田 1978)，懸濁菌数 (Toranzo *et al.* 1982) などが生存性に影響することも明らかにされている。今回の実験では，これらのほかにろ過あるいは高圧滅菌によって除かれる生物学的要因が魚の病原細菌の生存性に関与していることが明らかとなった。

海水中における細菌の生存に関与する要因のうちで，易熱性あるいはろ過により除去されるものとしては易熱性の抗菌物質，バクテリオファージ，細菌，原生動物ならびにプランクトンなどが想定される。そこで，その大きさを推定するために種々の孔径のメンブランフィルターでろ過した海水を用いて魚類病原細菌の生存性を検討したところ，*V. anguillarum* では孔径の小さなフィルターでろ過した海水中ほど生菌数の減少が緩やかになる傾向がみられた。フィルターの孔径に応じて生物以外の懸濁物も除去されるが，孔径の小さなフィルターでろ過した海水中ほど生存性が高まっているので，無処理海水中には *V. anguillarum* の生存に影響を及ぼす大きさの異なるいくつかの要因が存在するものと思われる。その大きさは，*V. anguillarum* は 0.22 μm ろ過海水中では14日後でも高い生菌数を維持したことから，孔径 0.22 μm のフィルターを通過しない大きさと考えられる。なお，バクテリオファージについてはデトリタスなどに付着している場合や，宿主細菌に感染した状態では孔径 0.22 μm のフィルターを通過しないと考えられるが，調べた範囲では *V. anguillarum* A-2 株を溶菌するバクテリオファージは無処理海水中からも分離されなかった。したがって，この大きさに相当し細菌の生存に影響を及ぼす可能性のある生物学的要因としては，細菌に寄生して溶解する *Bdellovibrio* (宮本 1979)，細菌を溶解する捕食性細菌 (Miyamoto *et al.* 1976，花岡 1981)，細菌と拮抗作用のある細菌 (Sieburth 1967)，細菌を捕食する原生動物 (Yamamoto *et al.* 1982) などが想定される。しかし，細菌を捕食するアメーバなどの原生動物がほとんど除去されると思われる孔径 5.0 μm のフィルターでろ過した海水中においても，*V. anguillarum* は無処理海水に近い生残曲線を示し，0.45 μm ろ過海水と 0.22 μm ろ過海水中の生菌数の差が大きかったことから，細菌レベルの大きさの生物学的要因の影響が大きいと考えられた。そこで，各ろ過海水中における細菌類の存在の有無を調べたところ，孔径 0.45 μm のフィルターでろ過した海水中にまで *Bdellovibrio* のような寄生性細菌と一般細菌いずれもが存在することがわかった。堀江・小林 (1981) は海水中から *V. anguillarum* などの魚類病原細菌を溶解する *Bdellovibrio* を分離している。このことから，*V. anguillarum* は寄生性の細菌や一般細菌による溶解あるいは拮抗作用などを受けやすい菌種であると推察された。*Streptococcus* sp. はフィルターの孔径の違いによって生残曲線に顕著な差はみられなかったが，5 μm ろ過海水中と無処理海水中とでは生菌数の差が大きいので，5 μm 以上の大きさの要因の関与が大きいと推定される。これには原生動物などが考えられる。このように，*Streptococcus* sp. では *V. anguillarum* に比べて細菌レベルの大きさの要因の影響が小さいことを示唆す

る結果が得られたが，これは *Bdellovibrio* や捕食性細菌の溶菌スペクトラムがグラム陰性菌にほぼ限られる (Miyamoto *et al.* 1976, 宮本 1979, 花岡 1981, 堀江・小林 1981) などの生物学的要因の側の宿主選択性にもとづくものかもしれない。*E. tarda* と *P. piscicida* はフィルターの孔径が小さいほど生菌数が高く維持される傾向にあり，生物学的要因も関与していると考えられたが，検出限界以下となるまでの日数に大きな差はみられなかった。これはこれらの菌種が海水の理化学的性質に対する抵抗性が弱く比較的すみやかに死滅していくので，生物学的要因の影響が顕著にみられなかったためであろう。14日間にわたる実験期間中には，容器内の海水の生物学的ならびに理化学的性状は，採水時と異なったものになると思われる。それにもかかわらず，孔径の小さなフィルターでろ過した海水中ほど魚類病原細菌の生菌数は高く維持され，生残曲線には一貫して階層性がみられた。これは，フィルターの孔径を小さくするにしたがって，フィルターを通過する微生物群の多様性が減少することと密接に関係があると推察され，魚の病原細菌の生存に海水中の多様な微生物群が関与していることがうかがわれる。したがって，今後は接種した魚類病原細菌以外の微生物群の挙動ならびに個々の影響などについて検討する必要があると考える。一方，*N. kampachi* は無処理海水中と各ろ過海水中とで生菌数に顕著な差はみられず，生物学的要因の影響は小さいものと考えられた。

今回の実験から，魚の病原細菌の海水中における生存には，海水の理化学的性質だけでなく生物学的要因が強く関与していることが明らかとなり，海水の理化学的性質に対して抵抗性のある菌種でも生物学的要因の影響を受けてすみやかに死滅するものがあることがわかった。しかし，今回のバッチ培養法における実験では，生物学的要因の影響が過大に評価されている可能性もあるので，今後は連続培養法における *in vitro* での検討を行うとともに，環境生態系における魚の病原細菌の生存性に関与する生物学的要因を中心に研究を進めていきたい。

文　　献

Carlucci, A. F. and D. Pramer 1959. Factors affecting the survival of bacteria in sea water. Appl. Microbiol. **7**: 388-392.

Evelyn, T. P. T. 1971. First record of vibriosis in Pacific Salmon cultured in Canada, and taxonomic status of the responsible bacterium, *Vibrio anguillarum*. J. Fish. Res. Board Can. **28**: 517-525.

花岡正季 1981. 海水より分離した腸炎ビブリオ捕食性細菌の生物学的性状. 阪市医誌 **30**: 229-246.

堀江 進・小林哲夫 1981. 腸炎ビブリオに寄生溶菌性 *Bdellovibrio* の生理生態に関する研究. 日水誌 **47**: 1209-1222.

伊丹利明・楠田理一 1984. アユ病魚から分離された *Vibrio anguillarum* の各種塩分濃度における生存性ならびに病原性. 水産大研報 **32**: 33-39.

楠田理一 1975. 魚類，甲殻類の病原微生物. 海洋の生態系と微生物 (日本水産学会編)，恒星社厚生閣，東京，pp. 85-96.

楠田理一 1978. 養殖生物の病害. 浅海養殖と自家汚染 (日本水産学会編)，恒星社厚生閣，東京，pp. 77-86.

楠田理一・中川敦史 1978. ブリのノカルディア病. 魚病研究 **13**: 25-31.

楠田理一・石原秀平 1981. ウナギ筋肉内に接種した *Edwardsiella tarda* の消長について. 日水誌 **47**: 475-479.

楠田理一・川合研二 1982. ブリ連鎖球菌の特性. 魚病研究 **17**: 11-16.

Miyamoto, S., K. Kuroda, M. Hanaoka and Y. Okada 1976. Isolation of a small rod with lytic activity against *Vibrio parahaemolyticus* from fresh sea water. Japan. J. Microbiol. **20**: 517-527.

宮本三郎 1979. 海洋性 *Bdellovibrio* に関する生理，生態学的研究. 阪市医誌 **28**: 501-517.

Muroga, K., M. Iida, H. Matsumoto and T. Nakai 1986. Detection of *Vibrio anguillarum* from waters. Bull.

Japan. Soc. Sci. Fish. **52**: 641-647.

Nakamura, M., R. L. Stone, J. E. Krubsack and F. P. Pauls 1964. Survival of *Shigella* in sea water. Nature **203**: 213-214.

Sieburth, J. M. 1967. Inhibition and agglutination of arthrobacters by pseudomonads. J. Bacteriol. **93**: 1911-1916.

Toranzo, A. E., J. L. Barja and F. M. Hetrick 1982. Survival of *Vibrio anguillarum* and *Pasteurella piscicida* in estuarine and fresh waters. Bull. Eur. Ass. Fish Path. **2**: 43-45.

Yamamoto, H., Y. Ezura and T. Kimura 1982. Evaluation of biological agent affecting on the survival of *Vibrio parahaemolyticus* in sea water. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. **48**: 1433-1439.