養鰻環境における魚病細菌の生態に関する研究—I.

池水中の一般細菌について

若林久嗣・金井欣也・江草周三*

(昭和 51 年 4 月 15 日受理)

Ecological Studies of Fish Pathogenic Bacteria in Eel Farm—I. Isolation of Aerobic Bacteria from Pond Water

HISATSUGU WAKABAYASHI, KINYA KANAI and SYUZO EGUSA

Dept. Fish., Fac. Agric., University of Tokyo, Bunkyo-ku,
Tokyo, Japan

(Received April 15, 1976)

Pond water of eel farms in Yoshida, Shizuoka Prefecture was examined for the presence of fish pathogenic bacteria, especially for *Aeromonas* spp. and *Edwardsiella tarda*. One-tenth milliliter of a series of ten fold dilutions of pond water was spread over the surface of nutrient agar (Difco). Plate cultures were incubated for 4 or 5 days at about 25°C and colonies counted. Every colonies within a given area of the plate of suitable dilutions was subcultivated for identification.

The number of bacteria ranged from 10^2 to 10^5 cells/ml through the year, being at the maximum in September and at the minimum in January (Table 1 and Table 2). Aeromonads and enterobacteria were predominantly found in all samples. Aeromonads represented the majority in fall to spring and tended to decrease as the water temperature rose (Table 3 and Table 4). A total 232 aeromonads were consisted of 224 *A. hydrophila* and 8 *A. punctata*. Of 134 *A. hydrophila* and 5 *A. punctata*, which were injected to weatherfish for testing its pathogenicity, only 13 *A. hydrophila* proved able to kill fish without full (Table 6). Enterobacteria were classified to the rank of genus as follow: 78 *Citrobacter*, 46 *Enterobacter*, 9 *Edwardsiella*, 4 *Escherichia* and 45 others (Table 5). While many eels found to be infected with *Edwardsiella tarda* (WAKABAYASHI et al. 1973, 1975), pond water had rather few *E. tarda*.

魚病菌の多くは水を媒介に伝染し、また、あるものは池中に常在しながら条件が整ったときにそこに棲む魚に感染し発病させると考えられている。従って、このような魚病菌の水中における感染あるいは発病の条件を除去することによって病害を防除することができると考えられる。しかし、現実には養魚池における魚病菌の生態には不明の点が多く、感染ならびに発病の条件についても知見に乏しい。

養殖ウナギにおいても種々の細菌性流行病が発生し毎年多大の被害を与えているが、病原菌の生態、ことに池水中、底泥中あるいは構築物上など養殖環境における棲息状態などについては殆んど知られていない。そこで、これらを明らかにすることを目的にまず池水中の細菌について代表的魚病菌である *Aeromonas* spp., *Edwardsiella tarda* とそれらの類似菌を中心に調査した。

材料ならびに方法

調査は 1973 年から 1975 年にかけて静岡県吉田町のいくつかの養鰻池を対象に実施した。なお、調査対象池は同町の標準的な養鰻池で調査日前後に病気は発生していない。供試池水は各池の池壁近くの表層水を直接に滅菌試験管に採水した。これらは吉田町養鰻研究所に運び、直ちに同所の井水を高圧滅菌した希釈水で 10 倍階段希釈し、その 0.05 ml または 0.1 ml を普通寒天培地 (nutrient broth 'Difco' 8g, 食塩 5g, 寒天末 15g, 純水 1,000 ml, pH 7.2) に塗抹した。室温または 25°C で 4~5 日間培養した後、発育したコロニーを数え、それらを釣菌して性状試験に供した。但し微小コロニーは除外した。1973 年 7 月および 1974 年以降の調査では希釈の適当な平板培地上の任意の区画内の全てのコロニーを釣菌し性状試験に供したが、1973 年 9 月と 12 月の

* 東京大学農学部

調査では平板培地上のコロニーを肉眼的形状により大別し、その代表株についてのみ性状試験を行なった。

供試菌株はまずグラム鑑別（劉の方法）、チトクロームオキシダーゼ試験（日本製試験紙）、Hugh-Leifson 試験によって腸内細菌群、ビブリオ菌群、シュウドモナス菌群およびその他に大別した。さらに、腸内細菌群とビブリオ菌群については必要な試験項目を追加して種属の同定を行なった。同定の基準は *Bergey's manual* 第 8 版によった。

結 果

1973 年は予め定めた 6 池について 7 月 と 9 月 と 12 月に調査した。表 1 に各池の菌数を示した。これによると 7 月では菌数の常用対数値で 3.08~3.51 で各池の間の差がきわめて少なかった。これに対し 12 月は 2.75~4.11 と池間の差が大きかった。また、9 月は 7 月 および 12 月に比べて値が大きく、平均で $4.63 (4.3 \times 10^4 \text{ cells/ml})$ であった。1974 年は調査池を 2 池に減らしその代りに同じ池について餌場附近とその対岸の 2 地点を採水地点とし、また 5 月の調査では午前と午後の 2 回採

水した。その結果、表 2 にみられるように採水地点や採水時間による菌数の差は殆んど認められず、少なくともこれらの養鰻池では池水がよく攪拌されていると判断された。また 5 月のデータでは池間に明らかに菌数の差が認められるが、これは注水による希釈に起因したものと思われる。各調査月のデータを図 1 にまとめたが、これによると池水中の菌数は秋に最も多く、冬に最も少ない傾向が認められた。

表 3 は 1974 年 5 月の調査結果をやや詳しく示したもので、2 池、2 地点、2 時刻、各 2 サンプル、計 16 サンプルのそれぞれの菌数と菌群の構成を示した。第 1 池の午後の池水（サンプル番号 5~8）におけるエロモナス菌群（分類上のレベルからはビブリオ菌群とすべきであるが、後述のように *Vibrio* 属は検出されず、殆んど全てが *Aeromonas* 属であったので便宜上エロモナス菌群とした）の割合が他に比べてやや多い点以外は明らかな差は認め難く、おおむね類似の菌群構成が認められた。

調査全体を通しての菌群構成は表 4 にみられるように、腸内細菌群が高水温期に優勢で、低水温期に少な

表 1 養鰻池水中の細菌数 (1)

Table 1. Numbers of bacteria (log N per milliliter) in eel-culturing pond water (1)

Pond	July '73	Sep. '73	Nov. '73
1	3.34	4.08	4.00
2	3.51	4.70	4.11
3	3.30	4.70	3.04
4	3.08	4.72	2.86
5	3.45	4.51	2.75
6	—	5.08	3.49
Mean	3.34 (2.2×10^3)	4.63 (4.3×10^4)	3.38 (2.4×10^3)

Fig. 1. Seasonal change of numbers of bacteria in the eel-culture pond water.

図 1 養鰻池水中の細菌数の季節変化

表 2 養鰻池水中の細菌数 (2)

Table 2. Numbers of bacteria (log N per milliliter) in eel-culturing pond water (2)

Pond	Station	May '74		Aug. '74	Oct. '74	Jan. '75
		Morning	Afternoon			
1	a	3.50	3.51	3.70	3.78	2.81
1	b	3.37	3.36	3.02	3.68	2.80
2	a	2.91	2.93	3.35	3.70	2.86
2	b	2.99	2.86	—	—	2.84
Mean		3.19 (1.6×10^3)	3.17 (1.5×10^3)	3.36 (2.3×10^3)	3.72 (5.3×10^3)	2.83 (6.8×10^2)
Water temp.		19.0°C	21.1°C	30.3°C	20.0°C	4.4°C

表 3. 1974 年 5 月のある養鰻池水中の菌群構成

Table 3. Bacterial groups (numbers of colonies) isolated from the eel-culturing pond water in May 1974

Sample No.	Pond	Sta.	Time	Nos. of bacteria in the water	Nos. of colonies examined	Enterobacteria	Aeromonads	Pseudomonads	Others
1	1	a	am	2.9×10^3	28	3	5	4	16
2	1	a	am	3.5×10^3	30	1	10	0	19
3	1	b	am	3.1×10^3	27	4	2	4	17
4	1	b	am	1.8×10^3	16	4	0	0	12
5	1	a	pm	3.2×10^3	37	4	18	4	11
6	1	a	pm	3.2×10^3	40	7	24	2	7
7	1	b	pm	2.6×10^3	47	8	13	1	25
8	1	b	pm	2.0×10^3	48	6	20	5	17
9	2	a	am	8.1×10^2	25	8	7	4	6
10	2	a	am	8.0×10^2	21	5	4	8	4
11	2	b	am	1.0×10^3	23	11	5	4	3
12	2	b	am	9.7×10^2	25	11	5	5	4
13	2	a	pm	7.1×10^2	27	10	8	6	3
14	2	a	pm	1.0×10^3	25	9	6	7	3
15	2	b	pm	5.7×10^2	22	7	3	2	10
16	2	b	pm	7.4×10^2	21	5	5	3	8
Total					462	103 (22%)	135 (29%)	59 (13%)	165 (36%)

く、エロモナス菌群は逆に低水温期に優勢で、高水温期には少なく、両者の間に相補的な関係が認められた。

表 5 は腸内細菌群の種の構成をまとめて示したもので、年間を通じて *Citrobacter* spp. (殆んどが *C. freundii*) が優勢で、次に *Enterobacter* spp. (主として *E. cloacae*) が多く、魚病菌 *Edwardsiella tarda* は僅かしか検出されなかった。

表 4. 1973 年から 1975 年にかけての各調査における養鰻池水中の菌群構成

Table 4. Bacterial group (%) isolated from the eel-culturing pond water in 1973 to 1975

	Jul. '73	Sep. '73	Nov. '73
Enterobacteria	58%	29%	15%
Aeromonads	0	29	44
Pseudomonads	7	2	2
Others	36	30	32
	May '74	Oct. '74	Jan. '75
Enterobacteria	22%	28%	3%
Aeromonads	30	44	53
Pseudomonads	13	3	5
Others	35	25	39

表 6 は *Aeromonas* 属細菌の種の構成と病原株の割合を示したものである。なお、供試菌株は前記調査の 1974 年 10 月と 1975 年の 1 月のものの他に 1975 年 5 月と 10 月に分離されたものも含めた。また、病原性試験は体重 10-30 g のドジョウに対し、体重 100 g 当り供試菌の 24 時間培養の湿菌重量 1 mg を各 3 尾宛背部筋肉に注射して行なった。表中、 $\pm$ は 3 尾とも死亡したもの、+ は 1-2 尾の死亡または患部の形成の認められたもの、- は全く異常の認められなかったものを示す。その結果、養鰻池水中のエロモナス菌の殆んどは *Aeromonas hydrophila* で、*A. punctata* はごく僅かにすぎないこと、また *A. hydrophila* の大部分は非病原性ないしは弱病原性であり、*A. punctata* は供試菌株数の少ない点に問題を残すが全て非病原性であったことが注目された。

考 察

水中細菌は環境衛生学や生態学の立場から上下水道、河川湖沼、海洋などについて古くから研究されているが、養魚池については殆んど研究がない。その理由の一つとして養魚池のように魚の出入れ、換水、投餌など人為的な要因の強く働いている環境では安定したデータが

表 5. 養鰻池水から分離された腸内細菌

Table 5. Enterobacterial species isolated from the eel-cultured pond water

Species	Numbers of cultures examined						Total
	July '73	Sep. '73	Nov. '73	May '74	Oct. '74	Jan. '75	
<i>Edwardsiella tarda</i>	2	4	2	1	0	0	9 (5%)
<i>Escherichia coli</i>	2	0	0	2	0	0	4 (2%)
<i>Citrobacter</i> spp.	18	8	10	32	7	3	78 (43%)
<i>Enterobacter</i> spp.	3	0	1	38	3	1	46 (25%)
Others	9	3	1	30	2	0	45 (25%)
Total	34	15	14	103	12	4	193

表 6. 養鰻池水から分離されたエロモナス菌の種と病原性

Table 6. Species of *Aeromonads* isolated from the eel-cultured pond water and its pathogenicity

Species	Pathogenicity	Oct. '74	Jan. '75	May '75	Oct. '75	Total
<i>Aeromonas hydrophila</i>	++ + —	31	3 12 15 } 30	10 50 44 } 104	59	224 (97%)
<i>Aeromonas punctata</i>	++ + —	1	0	0 0 5 } 5	2	8 (3%)

得られにくいことにあると思われる。本調査においても表1表2にみられるように池間の菌数に10倍以上の差がある場合があり、また、表3にみられるように、菌群構成の割合にも15%位の誤差が認められ、精度を高めるためにはサンプリングサイズをもっと大きくしなければならない。しかしながら見方によっては同じ調査時の池間の菌数に10倍もの差がある場合はむしろ少なく、また同じ養鰻池の菌数では採水地点や採水時間による差も殆んど認められない。従って池替や投薬などの極端な人為的操作による影響に十分の考慮を払えば一定の法則を見出し養魚池の環境管理に役立てることも可能かと思われる。このような観点からは表3の第1池において午後のエロモナス菌群が午前に比べ、また第2池のそれに比べ明らかに多いことは興味ある点であるが原因を明らかにすることはできなかった。

今回の調査において池水中から検出された魚病菌は *Aeromonas hydrophila* と *Edwardsiella tarda* の2種であり、供試培地に発育可能な養殖ウナギの既知病原菌 *Vibrio anguillarum* と *Pseudomonas anguilliseptica* は検出されなかった。筆者らの吉田町における養殖ウナギの細菌性流行病の調査では *Edwardsiella*

tarda 感染魚の割合が最も大きかったが、(若林・江草 1973, 1975) 池水中からの *E. tarda* の検出はむしろ稀で本菌が池水中に常在するものであるか否かについては今後の検討を必要とすると思われる。また、もう一つの魚病菌 *A. hydrophila* は明らかに池水中に常在しており何らかの条件下でウナギに感染し発病させられると思われるが、表6にみられるように病原株は比較的少なく、今後さらに病原株と非病原株を識別して両者の動向を詳しく調べることは条件性病原菌の感染、発病の機序を明らかにする上できわめて有意義であろう。

謝 辞

本研究は吉田町養鰻研究所の御協力によって行なわれた。所員の方々に謝意を表する。

引用文献

- 若林久嗣・江草周三 (1973): 静岡県吉田地区における養殖ウナギにおける細菌感染について、本誌, 8 (1), 91-97.
 若林久嗣・江草周三 (1975): 再び静岡県吉田地区における養殖ウナギにおける細菌感染について—とくに鰻病菌について、本誌, 9 (2), 193-198.