輸送中あるいは輸送後飼育中に起きる魚の 斃死に関する細菌学的研究—I.*

斃死の一原因について

米 康夫・平野克己

(1970年8月24日受理)

A Bacteriological Study on the Death of Fish During Transportation or Keeping After Transportation—I. The Cause of the Death

Yasuo YONE** and Katumi HIRANO***

In the previous report¹⁾, YONE inferred that the death of fish during transportation or while keeping after transportation is mainly attributable to infection. The present study was carried out to demonstrate that the inference is correct.

The present paper deals with the isolation of bacteria from the liver of red sea bream (*Chrysophrys major*) which died during keeping after the "keep on closed system" and the pathogenicity of the isolates.

The results obtained can be summarized as follows:

- 1) The adding of chlortetracycline (CTC) and nitrofurantoin derivatives suppressed the increase of bacterial count and the consumption of dissolved oxygen by bacteria in the sea water in polyethylene cases.
- 2) The mortality in the CTC group was lower than that in the non-added group.
- 3) Numerous bacteria existed in the liver of dead fish in the non-added group, but bacteria was not detected in those in the CTC group.
- 4) Of the isolates distinguished into thirteen groups, those belonging to groups V, IX, and X showed pathogenicity.
- 5) Organisms belonging to group X were isolated from the majority of livers of dead fish in the non-added group and accounted for 87 percent of the total isolates from the liver. On the other hand, group V was isolated from only one. Organisms belonging to groups V and X were also isolated from the sea water in polyethylene cases of the non-added group.
- 6) The conclusion that the death of fish during the keeping after the "keep on closed system" is caused by the infection of pathogens is led from the above results.

従来行なわれた活魚輸送に関する研究は、主として酸素の補給、麻酔による酸素消費の抑制、緩衝剤による pH 低下の防止および活性炭あるいはイオン交換樹脂などによる有害化学物質の除去などである。しかしこれらの研究成果にもとづく処理を行なつても輸送中あるいは輸送後に魚の斃死が起こることがある。

著者の1人(米)はこの斃死の一原因は細菌によるものであらうと推測し、密閉式活魚輸送に抗菌剤を使

* 昭和44年10月、日本水産学会秋季大会(仙台)で講演発表した。

** 九州大学農学部附属水産実験所 (Fish. Res. Lab., Kyushu Univ., Tsuyazaki, Fukuoka, Japan)

*** 宮崎大学農学部水産増殖学科 (Dept. Fish. Faculty of Agriculture, Miyazaki, Japan)

用してみたところ、斃死を減少することができた¹⁾。したがって本研究では著者らの推測を確認するために、24 時間密閉収容後飼育中に斃死したマダイの肝臓からの菌分離と分離菌株の病原性について検討したところ、病原性菌を多数分離し、密閉輸送後飼育中に起きる斃死の一原因が細菌によるものであることを立証したので報告する。なお本研究経費の一部は昭和 41・42 年度文部省科学試験研究費で支弁した。

実験方法

36 l 容ポリエチレン袋に 9 l の海水を入れ、これに総体重約 200 g のマダイ (平均体重 9.7 g, 20 尾) をタモ網を用いて移した後、27 l の酸素を充填して密閉し、25°C の流水中に 24 時間静置した。なお対照区として収容水に chlortetracycline (以下 CTC と略す) を 30 ppm 溶解した区を設けた。密閉収容中は一定時間毎に収容水の溶存酸素量および細菌数を測定した。

密閉収容 24 時間後に開封し、魚を水温 23.5~25.5°C の流水に移して 120 時間、生残魚の外観変化を観察すると共に、斃死尾数を記録した。

生菌数測定および菌株の分離 斃死直後のマダイから肝臓を無菌的にとり出し、殺菌乳鉢ですりつぶして、常法通り 3% 食塩加ペプトン水で 10 倍液階希釈液をつくり、平板混濁法で 25°C, 72 時間培養後の発生集落を算定した。また肝臓の 10 倍希釈液 1 滴を平板培地表面に塗抹し、25°C, 24 時間培養後発生した集落をすべて釣菌した。なお開封直後の収容水中の生菌数測定と菌株分離も同じ方法で行なつた。生菌数測定と菌株分離には ZOBELL 2216 E 培地を用いた。

分離菌の群別 分離菌を群別するため白糖分解性、H₂S 産生能、運動性、インドール産生能、ゼラチン液化能などについて性状検査を行なつた。白糖分解性は W. A. ティボール寒天培地で 25°C, 24 時間培養後に試験した。H₂S、インドール産生および運動性は 3% 食塩加 SIM 高層培地で 25°C, 24 時間培養後に試験した。なおインドール産生能の判定は KOVAC の方法によつた。ゼラチン液化能は 3% 食塩加ゼラチン高層培地で 25°C, 5 日間培養後の液化の有無で判定した。

分離菌株の病原性確認 各分別群から数株ずつ無作為にとり出し、3% 食塩加普通寒天斜面培地に 25°C で培養した。24 時間培養後の生育した菌を 3% 食塩加ペプトン水 3 ml にけん濁し、そのけん濁液を体重 100 g 当り 0.5 ml の割合でマダイの背部筋肉に注射した。菌接種後 120 時間、接種部位の状態を観察すると共に斃死数を記録し、斃死した場合および接種部位が潰瘍症状を呈した場合、その菌株は病原性ありとした。なお菌をけん濁しない 3% 食塩加ペプトン水のみを同じように注射した場合は斃死することもあり、また接種部位に異常が生ずることもなかつた。

供試魚 供試したマダイは福岡県宗像郡津屋崎近海で吾智網を用いて採捕した 0 才魚である。採捕後、少なくとも数日間室内の小型ガラス張水槽で予備飼育し、健康と思われるものを選んで実験に供した。

実験結果

密閉中における収容海水の細菌数と溶存酸素量の変動 収容水の細菌数は Fig. 1 の左図に明らかなように CTC 無添加の場合、時間が経過するにしたがつて急激に増加したが、CTC 添加区では収容後 18 時間までは開始時の菌数とほぼ同じで CTC の静菌効果が明らかに認められた。しかし 18 時間以後は CTC の破壊減少が原因してか菌数が急激に増加した。

収容水中の溶存酸素量は Fig. 1 の右図にみられるように、密閉後 12 時間目に無添加区は 7.4 ml/l、添加区 10.3 ml/l と最高値を示したが、その後急激に減少し、24 時間後には 2.2 ml/l および 3.2 ml/l となり、マダイの酸素必要量の最低限度近くになつたので開封し魚を水槽に移した。

開封後の斃死率と斃死魚の症状 開封後水槽に収容中斃死するものが出た。開封後 120 時間までの斃死率は Table 1 に示すように、無添加区の 40% に対し添加区のそれは 15% で、明らかに CTC の斃死防止効果が認められた。なお、この結果は輸送後の斃死の一原因が細菌によるものであろうという著者らの推測を裏付けるものである。斃死魚はいずれも脱鱗し、表皮が剝離した症状を呈し、また少数例に眼球突出が

見られた。

斃死魚肝臓の生菌数および分離菌株数 開封後斃死した魚の内 Table 1 に示す**印の魚 8 尾の肝臓を生菌数測定と菌分離に供した。その結果 Table 2 に示すように、無添加区の供試斃死魚 6 尾の内 5 尾の肝臓に 1 g 当り $6.9 \times 10^5 \sim 3.5 \times 10^8$ の菌が存在し、また 144 株の菌株を分離できた。しかし添加区の供試斃死魚 2 尾の肝臓には菌の存在を全く認めなかった。また著者らは健康と思われる飼育魚の肝臓から菌分離を数回試みたが、菌の存在を一度も認めなかった。

分離菌株の群別 分離菌 144 株について白糖分解性、 H_2S 産生能、インドール産生能、運動性、ゼラチン液化能を検査し、Table 3 に示す 13 群に分けてみた。CTC 無添加区の斃死魚肝臓から分離された菌株は、この群別法による I, II, V, VI, VIII, X, XI および XIII 群に属するものであった。そして II, V, VI, X および XIII 群の菌は CTC 無添加区の収容水中にも存在していた。このことは斃死魚肝臓中の細菌は収容水に由来したものであることを示すと考える。

分離菌株の病原性 各分別群の病原性を検討した結果、Table 3 に示すように V, IX および X 群に明らかな病原性が認められた。特

Table 1. Number of fish died during keep on closed system*.

Time elapsed after transfer (hours)	Number of dead fish	
	Non-added group	CTC group
0 ~ 24	2	1
24 ~ 48	2**	2**
48 ~ 72	3**	0
72 ~ 96	1**	0
96 ~ 120	0	0
Mortality (%)	40(8/20)	15(3/20)

* Fish were transferred from a closed polyethylene case to a aquarium and were kept on running water at 23.5~25.5°C.

** Presented for counting and isolation of bacteria from liver.

Fig. 1. Change in bacterial count and dissolved oxygen in the sea water with CTC or not during keep of fish on closed system*.

Colonies grown on ZOBELL 2216 E agar plate were counted after 72 hour-incubation at 25°C. Dissolved oxygen in sea water was determined by WINKLER's method.

* 20 of fish were kept in a closed polyethylene case containing 27 l of oxygen and 9 l of sea water with CTC or without for 24 hours at 25°C. Average body weight of fish used was 9.7 g.

Table 2. Bacterial count in and number of isolates from liver of fish died during keeping after keep on closed system.

Groups	Time elapsed after transfer (hour)	Bact. count/g liver	No. of isolates
Non-added	33~34	0	0
	47~48	1.8×10^2	9
	55~56	1.2×10^3	45
	57~58	3.5×10^3	48
	57~58	3.2×10^3	39
	94~95	6.9×10	3
CTC	25~26	0	0
	26~27	0	0

Liver was taken out of body by asepticism and then was braied in mortar. Liver paste was diluted with sterile pepton solution containing 3% NaCl and was given for counting and isolation of bacteria. Counting and isolation were carried out after 72 hour- and 24 hour-incubation at 25°C using ZOBELL 2216 E agar medium.

Table 3. Pathogenicity and number of isolates grouped basing on distinctive characters.

Group	Sucrose	H ₂ S production	Indol production	Motility	Liquefaction of gelatin	Pathogenicity*	No. of fish having bact. in liver/5 fish	No. of isolates from		
								Liver	Sea water of non-added group	Sea water of CTC group
I	(-)**	-	-	-	+	-	1	2	0	24
II	(-)	-	-	-	-	-	1	5	1	26
III	-	-	-	-	+	-	0	0	0	3
IV	-	-	-	-	-	-	0	0	4	19
V	-	-	+	+	+	+	1	6	20	0
VI	-	-	+	+	-	-	1	1	6	0
VII	+	-	+	+	+	-	0	0	1	0
VIII	+	-	+	+	-	-	2	6	0	0
IX	-	-	-	+	+	+	0	0	19	0
X	-	-	-	+	-	+	4	120	2	0
XI	-	+	-	-	+	-	1	1	0	0
XII	+	-	-	+	+	+	0	0	2	0
XIII	(-)	-	-	+	-	-	1	3	2	0

* Bacteria grown on nutrient agar slant containing 3% NaCl after 24 hour-incubation at 25°C were suspended in a 3 ml of pepton solution containing 3% NaCl. Bacterial suspension was injected intramuscularly on a back portion of fish at a level of 0.5 ml per 100 g body weight. When the fish died or when the inoculated portion ulcerated, the bacteria was regarded as pathogen.

** Didn't grow on W. A. Teepol agar medium.

に X 群の菌は肝臓中に菌が存在した 5 尾の斃死魚の内 4 尾から分離され、また分離株数もきわめて多く (120 株)、肝臓からの全分離菌株数の 83.3% を占めた。一方 V 群の菌は肝臓に菌が存在した 5 尾の斃死魚の内 1 尾のみから分離され、わずかに 6 株であつた。IX 群の菌は収容水からのみ分離された。したがつて CTC 無添加区斃死魚の主死因は X 群に属する細菌によるといえる。一方 CTC 添加区の収容水にも多数多種類の細菌が存在したが、すべて病原性のない I, II, III および IV 群に属する菌で、無添加区の収容水の菌叢とは異なる菌叢であつた。

考 察

本研究で CTC の使用は密閉収容後 18 時間まで収容水での細菌の増殖を抑制した。また CTC 添加区の収容水中の溶存酸素量は無添加区の収容水中のそれより高い値を示すようである。他方著者らは別に行なつたマダイの活魚輸送試験で海洋性の *Pseudomonas*, *Vibrio* に対しきわめて強い静菌力をもつ新ニトロフラン剤が Fig. 2 および 3 に示すように、収容水中の細菌の増殖を強力に抑制すると共に、収容水中の溶存酸素量を高く保持することをみた。これらの結果は溶存酸素の消費が魚によるのみでなく細菌によることが大きいことを示し、静菌剤の使用は直接的な病原菌による魚の斃死を防止するだけでなく、細菌による酸素消費を減少し輸送時間を延長することになる。

本研究で (1) CTC 添加区の斃死率が無添加区のそれより低かつたこと、(2) CTC 添加区の斃死魚肝臓には菌の存在が認められなかつたが、無添加区の斃死魚肝臓に多数の菌が存在し分離されたこと、(3) 無添加区の斃死魚肝臓から分離された菌の約 87% は病原性をもつ菌で、同一群に属する菌が収容水中からも分

Fig. 2. Change in bacterial count and dissolved oxygen in sea water with a nitrofurantoin derivative, nf-1802, during keep of fish on closed system.

15 of fish with 400 g in total body weight were kept in a closed polyethylene case. Number of dead fish at end of experiment was 12 in non-added group, 3 in 1 ppm group. But no fish died in 20 ppm group.

Fig. 3. Change in bacterial count and dissolved oxygen in sea water with a new nitrofurantoin derivative, MKM, during keep of fish on closed system.

離されたことなどから、密閉収容後飼育中に起きる斃死の一原因は病原性細菌によるものであると断定して差支えないと考える。

なおそれらの病原性細菌は密閉収容時に魚をタモ網

で取扱つて生じた外傷（スレ）から体内に侵入したものと考える。

34 時間内に斃死した CTC 無添加区の 1 尾と CTC 添加区の 2 尾の肝臓には菌が全く認められなかつた。その斃死の原因は本研究の範囲内では明らかでないが、この斃死は BLACK のいう after planting mortality であつたかもしれない²⁾。

要 約

活魚輸送中あるいは輸送後飼育中に起きる斃死が主として病原性細菌によると推測して、マダイを密閉収容し、開封後飼育中に斃死した魚の肝臓から菌を分離し、分離菌の病原性確認を行なつて次の結果をえた。

1. 収容海水に chlortetracycline あるいは nitrofurantoin 誘導体を溶解した場合、収容水中の細菌の増殖および溶存酸素の消費は抑制された。
2. 開封後飼育中の斃死率は CTC 無添加区が 40% で、CTC 添加区の 15% に対し高率を示した。
3. 無添加区の斃死魚肝臓には 1 g 当り $6.9 \times 10^6 \sim 3.5 \times 10^8$ の菌が存在したが、CTC 添加区の斃死魚肝臓には菌の存在が認められなかつた。
4. 13 群に分けた分離菌株の内、病原性をもつものは V, IX および X 群に属する菌であつた。その中で X 群の菌は無添加区の供試斃死魚肝臓のほとんど全部から全分離菌株数の約 87% を占めるほど多数分離された。それに比べ V 群の菌は一つの肝臓から分離されたにすぎなかつた。なお V および X 群の菌は無添加区の収容水からも分離された。一方、IX 群の菌は収容水から分離されたが、肝臓からは分離されなかつた。
5. 以上の結果から密閉収容後、飼育中に起きる斃死の一原因は病原性細菌によるものと結論する。

終りに本研究を行なうに当り御協力をいただいた古川哲二、池浦ミユキ両技官、天野文夫、永島隆義両氏に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 上田和夫・古市政幸・米 康夫：昭和 40 年日本水産学会秋季大会（清水）講演。
- 2) E. C. BLACK: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 14, 117~134 (1957).