海産魚類消化管の細菌相—I.

マダイ・チダイの細菌相におよぼす餌料成分の影響

瀬良 洋・木俣正夫

(1971 年 7 月 31 日受理)

Bacterial Flora in the Digestive Tract of Marine Fish—I.

Bacterial Flora of Fish, Red Sea Bream Snapper and Crimson Sea Bream, Fed Three Kinds of Diets

Hiroshi SERA* and Masao KIMATA**

A comparison of the properties of the bacterial flora present in the digestive tracts of fish, red sea bream snapper and crimson sea bream, which were fed with three different diets (F-, C- and S-diet), was carried out.

The results were summarized as follows:

(1) Although there was a little variation in the numbers of bacteria in the digestive contents among the three dietary groups of fish, in morphological and biochemical properties the bacteria isolated resembled one another in spite of difference of diet.

(2) The majority of strains isolated from environmental sea water were different from those isolated from fish in the abilities to produce indol and to hydrolyse starch and casein. A dominant group having a certain definite property was not found among the strains isolated from C-diet.

(3) The growth of bacteria isolated from fish was not affected by bile or low pH value, while that of bacteria isolated from sea water and diet was affected.

It is suggested that the flora in the digestive tract are limited to only a few bacterial groups, since the environmental conditions in the digestive tract are so severe as to exclude the great majority of exotic bacteria.

魚類消化管内に多数の細菌が存在していることは周知のことである。これら細菌相については古くから腐敗、食中毒あるいは魚自身の疾病等に関連して詳細に研究されている。これらの報告^{1~6)}によると海産魚の消化管在住菌数は一定しないが、その細菌相はほとんど単一の特異的な genus *Vibrio* により構成されているらしい。しかしこれらの研究はすべて天然で捕獲された魚について調べられたものであるから、その変動および優勢種出現の原因は明らかでない。同一魚種でも個体により、あるいは生息場所によつて消化管在住菌の種類・菌数が変化することも考えられる。

魚類の栄養に関する研究は、消化酵素などの面から特に活発に行なわれているが、魚類消化管には数多くの細菌が存在し、そのフローラがほぼ一定しているといわれることから、これら細菌が何らかの役割を魚類の栄養におよぼしていることも考えられる。著者らは、それら細菌の、魚類の消化、吸収におよぼす栄養的役割を明らかにしようとして、まずマダイおよびチダイを成分の異なつた3種類の餌料で飼育した場合における消化管内の細菌数および細菌相について研究した。

* 京都大学農学部 (Dept. Fish., Fac. Agr., Kyoto Univ., Maizuru, Japan)

** 近畿大学農学部 (Dept. Fish., Fac. Agr., Kinki Univ., Osaka, Japan)

実験材料および方法

供試魚 1967 年宮津湾で飼養されていた体重 65~95 g, 全長 14~16 cm の 1 年魚のマダイ *Pagrus major* およびチダイ *Erynnis japonica* を 3~6 匹ずつ水槽 (32×62×40 cm³) で、絶えず新鮮な海水を流入させて蓄養した (水温約 26°C)。実験に先立ち魚を 5 日間絶食させた後、Table 1 に示すような組成のエサを日に 1, 2 度与え、一定期間飼育した。

細菌培養基および培養条件 培地成分としてキチン・グルコース・ペプトン・肉エキス・酵母エキス・魚の腸内容物抽出物および食塩などを種々の組合わせ、種々の濃度で調製して総従属栄養細菌数およびキチン分解細菌数を調べた予備実験の結果から、基礎培地として次の組成が選ばれた。すなわち再沈澱キチン 3 g, ペプトン 15 g, 肉エキス 5 g を 2.5% 食塩水で 1 l とした (pH 6.8~7.0)。なお、平板培養には 1.5% 寒天を加えたものを用いた。

また、予備実験の結果、嫌気的条件下で発育した細菌はすべて好気的条件下でも速やかに発育したので、細菌の培養は好気的条件下で行なった。

細菌の計数 魚の消化管内容物中の総従属栄養細菌数およびキチン分解細菌数を上記の培地で測定した。すなわち、供試魚を上記の各エサで一定日数 (5, 15, 25 日) 飼育し、最後のエサ投与 4 時間後に、各飼育魚 2 尾ずつを延べずい刺殺し、直ちに開腹、胃および腸内容物を無菌的にとりだした。内容物の一定量を 2.5% 食塩水で 10 倍希釈法により希釈し、各段階の希釈液 1 ml を混和法によつて平板上に接種し、22°C で培養した。総従属栄養細菌数は培養 2 週間後、平板上に出現した全集落数、キチン分解細菌数は周辺に透明帯を生じた集落数から計数した。計数値を消化管内容物湿重 1 g 当りの細菌数で表示した。

魚の飼育に用いた海水および飼料中の細菌数についても同様である。

分離菌の性状検査 形態学的性状は基礎培地に細菌を接種し 22°C で 24 および 48 時間培養したものについて形態・グラム染色性・運動性および鞭毛の配列を常法によつて調べた。生化学的性状検査は、グルコースの酸酵性を HUGH and LEIESON⁷⁾ の方法によつて、澱粉・キチン・カゼインの分解性、アンモニア・インドールの生成を常法⁸⁾によつて、チトクロームオキシダーゼの活性を KOVACS⁹⁾ の方法によつて調べた。

増殖におよぼす水素イオン濃度の影響 pH 5.5 および 7.5 に調整し基礎培地に一定量の菌を接種し、1, 3, 8 日間培養後 LEITZ の光電比色計 (Model M) により filter A で濁度を測定し、増殖の程度を調べた。

増殖におよぼす胆汁の影響 基礎培地に胆汁末を添加 (2%) した場合と無添加の場合における細菌の増殖の程度を上記と同様の方法で調べた。

実験結果

Table 1. Component of diet.

Component	Dietary group		
	F-diet	S-diet	C-diet
	g/100 g-wet wt. of diet		
Fish meat paste	97 (89)*	72 (39)	82 (54)
Potato starch		25 (53)	
Chitin			15 (38)
Carboxymethyl-cellulose	3 (11)	3 (8)	3 (8)

* Figures in parenthesis indicate g/100 g-dry wt

飼育開始後 5, 15 および 25 日目の各群の魚の消化管内在細菌数を Table 2 に示す。エサの相違および飼育日数に関係なく胃および腸内容物中の総従属栄養細菌の大部分はキチン分解能を示したが、細菌数に関しては若干の変動が認められた。飼育水中の細菌もほとんどキチン分解細菌であつた。

次いで分離された従属栄養細菌 363 株 (25 日飼育の各魚群から得られたもの、飼育海水から得られたものおよび飼料の C-diet から得られたものであつて、いずれも計数の際に平板面に発生した全集落から無作為に 18~36 の集落を分離したものの総数である) について形態学

Table 2. Numbers of total heterotrophs (T. B.) and chitin-decomposing bacteria (C. B.) in the digestive tracts of fish*, the diet and the environmental sea water. (August, 1968)

Duration of feeding	Dietary group	Expt.	Stomach		Intestine	
			T. B.	C. B.	T. B.	C. B.
5 days	F-group	I	cells/g-wet wt. of digesta			
			1.3×10^5	2.2×10^4	1.5×10^5	2.5×10^4
	S-group	I			2.0×10^6	2.4×10^5
		II			1.1×10^7	2.8×10^6
	C-group	I	1.7×10^6	6.0×10^5	5.6×10^8	2.9×10^8
15 days		II	1.5×10^6	6.1×10^5	1.1×10^9	6.7×10^8
	F-group	I	2.0×10^4	6.3×10^3	1.7×10^6	9.0×10^5
		II	1.6×10^4	3.2×10^3	1.5×10^6	8.2×10^5
	S-group	I	1.5×10^6	1.1×10^6	6.7×10^6	5.0×10^6
		II	1.4×10^6	8.3×10^5	1.2×10^7	1.0×10^7
	C-group	I	8.0×10^6	5.2×10^6	6.4×10^7	4.8×10^7
		II	1.6×10^6	1.1×10^6	4.0×10^7	2.5×10^7
25 days	F-group	I	8.7×10^5	6.7×10^5	4.7×10^7	3.8×10^7
		II	$1.2 \times 10^{4**}$	7.2×10^2	$6.7 \times 10^{4**}$	2.4×10^4
	S-group	I	1.1×10^5	9.9×10^4	1.3×10^9	8.4×10^8
		II	8.0×10^5	6.7×10^5	7.5×10^8	6.0×10^8
	C-group	I	1.0×10^6	4.0×10^5	1.4×10^6	1.1×10^6
		II	$1.2 \times 10^{4**}$	9.0×10^3	3.7×10^6	2.3×10^6
Environmental sea water				T. B.	7.6×10^3	
				C. B.	6.4×10^3	
Diet-C				T. B.	1.2×10^5	
				C. B.	2.2×10^4	

* Red sea bream snapper, *Pagrus major*, and crimson sea bream, *Erynnis japonica*, were used in this experiment

** Yeast were isolated from these samples (see Table 3)

的・生化学的性状を調べた結果を Table 3 に示す。

胃・腸からの分離株のほとんどはグラム染色陰性・無孢子・単極毛の桿菌で、ペプトンからアンモニアを生成し、グルコースからは酸のみを生じ、キチンを分解し、チトクロームオキシダーゼ活性を示した。飼育海水からの分離株は魚からの分離株と多くの性質で類似しているが、インドール生成能およびカゼイン・デンプン分解能を有する点で後者とは異なっていた。また餌料 (C-diet) からのものは特定の性質をもつグループによつて構成されてはいなかった。なお、餌料、胃および腸から酵母がそれぞれ 1, 10 および 2 株分離された。

以上のことから消化管から分離された細菌は特異的性質をもつと考えてもよいであろう。消化管の特異的環境に対してこれらの細菌が何らかの特性をもつかどうかを調べるのに胃において pH 値が低いことと腸内における胆汁に注目し、それらの要因が細菌の増殖にどのような影響を示すかを検討した。その効果の尺度として次に示すような S. b., S. h. 値を用いた。

Table 3. Morphological and biochemical properties of the strains isolated from digestive contents of fish of these dietary groups, the environmental sea water and the diet.

Characteristics examined	Number of strains isolated from							Diet-C
	Stomach			Intestine			Sea water	
	F-group	S-group	C-group	F-group	S-group	C-group		
Total number of bacteria	48	48	39	43	54	67	30	21
Gram negative	40	48	36	37	54	66	30	17
Shape (Rod Cocci	40	48	36	37	54	66	30	16
	8	0	3	6	0	1	0	5
Motile	39	48	35	35	54	66	30	13
Flagellation: single polar peritrichous	37	48	33	31	54	64	30	11
	2	0	1	1	0	2	0	1
Cytochrome oxidase	40	48	37	21	54	64	30	11
NH ₃ from peptone	48	48	39	43	54	66	30	21
Indol formation	1	0	1	3	0	2	30	2
Hugh and Leifson's test:								
Fermentation of glucose	39	48	32	32	54	66	30	11
Oxidation of glucose	0	0	0	3	0	0	0	1
Gas production	1	0	1	2	0	1	0	2
Hydrolysis of chitin	35	48	34	31	54	64	30	9
casein	4	1	7	5	0	3	27	2
starch	1	0	4	2	0	3	30	1
Yeast	9	0	1	2	0	0	0	1

Table 4. Effect of H⁺ concentration and bile salt on the growth of strains isolated from fish, the diet and the environmental sea water.

Source of isolates	Total strains examined	Bile salt		H ⁺ concentration	
		S. b. <0.5	S. b. ≥0.5	S. h. <0.5	S. h. ≥0.5
Stomach	145	26	119	10	135
Intestine	166	25	141	9	157
Diet-C	22	19	3	8	14
Sea water	30	22	7	15	15

$$S. b. = \frac{\text{Optical density of basal culture containing 2\% bile}}{\text{Optical density of bile-free basal culture}}$$

$$S. h. = \frac{\text{Optical density of basal culture at pH 5.5}}{\text{Optical density of basal culture at pH 7.5}}$$

$$S. b. \text{ 値} = \frac{\text{胆汁添加 (2\%) 液体培養での濁度}}{\text{胆汁無添加液体培養での濁度}}$$

$$S. h. \text{ 値} = \frac{\text{pH 5.5 における液体培養の濁度}}{\text{pH 7.5 における液体培養の濁度}}$$

培養 1, 3 および 8 日目に S. b., S. h. 値を測定したが, 胃・腸・飼育水および餌料からの分離株間における S. b. および S. h. 値の相違が 3 日目に最も顕著にあらわれたので, 培養 3 日目の結果を Table 4 に示す。魚の消化管から分離した菌の 82~85% および 93~95% がそれぞれ S. b., S. h. 値が 0.5 以上である。飼育水および餌料からの分離株のそれぞれ 77%, 86% が S. b. 値 0.5 以下であり, それぞれ 50%, 36% が S. h. 値 0.5 以下であつた。これらのことは消化管から分離された株の増殖は胆汁や低い pH 値であまり影響されないことを示している。

考 察

魚類消化管内の細菌数は多少の変動はあるが, 特に餌料の種類に関係していない。細菌の形態学的・生化学的性質は餌料の相違によつてほとんど影響されず, 消化管内ではきわめて特異的な種により構成されていることは明らかである。このことは天然で捕獲された魚類について調べられた結果とよく一致している。しかし消化管内に酵母が混在していた一部の試料では細菌数も少なく細菌相が多様性を示していた。これは消化管内で酵母が異常に増殖すると細菌の増殖が抑制されるものと思われるが詳細は今後の研究に俟つ。

飼育水から分離された菌の多くはインドール生成能とカゼイン・デンプン分解能の性質において魚から分離された菌と異なる。またキチン含有餌料からの分離菌も多くの性質において魚からの分離菌と異なつていた。従つて海水および餌料中の細菌の多くは消化管内環境により淘汰されたものと考えられる。

本実験で調べたマダイ・チダイの消化管内の細菌の性質は, クロダイ¹⁰⁾, スズキ¹¹⁾ やその他の数多くの海産魚⁶⁾ の消化管内に存在する細菌の性質ときわめて類似していた。これらの結果から有胃魚においては消化管内の細菌は餌料・魚種に関係なく, 消化管内の環境により大部分の外来性の細菌は淘汰され, 消化管内の環境によく適合した特定の細菌群のみになると推察される。天然で捕獲された細菌に対する胆汁酸の抵抗性に関する Aiso ら⁵⁾ の研究によると胆汁酸抵抗性は全ての腸からの分離菌について認められたが, 胃からの分離菌については 44% にすぎなかつた。本実験では胃からの分離菌も腸のそれと同様にほとんど大部分が胆汁に対し抵抗性を示す点で, Aiso らの結果と幾分異なつていた。この相違は摂餌後の時間の長さによるものかも知れない。

陸上動物の腸内に固有なフローラは胆汁酸に対して抵抗性を有することはよく知られた事実である。魚類の消化管は陸上動物のそれとは種類において全く異なつていますが, 胆汁酸抵抗性という点で両者とも共通した性質を示していることは興味深い。

終りに臨み, 本研究に関して終始, 有益なる助言を頂いた本教室石田祐三郎講師に感謝申し上げる。

要 約

成分の異なる 3 種の餌料 (F-, C- および S-Diet) で飼育したマダイ・チダイの消化管内の細菌相について調べ, 次に示す結果を得た。

1. 消化管内の細菌数は若干変動したが, 特に餌料の相違には関係なかつた。これらの優勢株の形態的・生化学的性状も餌料の相違に関係なく共通していた。
2. 消化管内から分離された細菌の大部分はグラム陰性, 無孢子, 単極毛の桿菌で, ペプトンからアンモニアを生成し, グルコースから酸のみを生じ, キチンを分解し, チトクローム活性を示した。飼育水からのものは前者と多くの点で類似していたが, インドール生成能およびカゼイン・デンプン分解能を有する点で異なつていた。餌料 (C-diet) からのものは多様で特定の性質をもつグループによつては構成されていなかった。

飼育水や餌料から分離された菌は胆汁や低い pH 値で増殖が抑制されたが, 消化管から分離された菌の増殖はこれらの因子に影響されなかつた。

以上の結果から, 外来性の細菌の大部分は消化管内の特異的環境において淘汰され, きわめて限られた細菌群のみが消化管内で生残し, 増殖するものと考えた。

文 献

- 1) J. LISTON: *J. gen. Microbiol.*, **15**, 305~314 (1956).
- 2) J. LISTON: *ibid.*, **16**, 205~216 (1957).
- 3) J. LISTON: *ibid.*, **12**, i (1955).
- 4) U. SIMIDU and K. HASUO: *ibid.*, **52**, 347~354 (1968).
- 5) K. AISO, U. SIMIDU and K. HASUO: *ibid.*, **52**, 361~364 (1968).
- 6) 奥積昌世・堀江 進: 本誌, **35**, 93~100 (1969).
- 7) R. HUGH and E. LEIFSON: *J. Bacteriol.*, **66**, 24~26 (1953).
- 8) W. F. HARRIGAN and M. E. MCCANCE: *Laboratory Methods in Microbiology*, Academic Press, New York (1966).
- 9) K. KOVACS: *Nature*, **178**, 703 (1956).
- 10) 木俣正夫・瀬良 洋: 昭和 42 年度近畿支部例会発表.
- 11) K. OKUTANI: *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst.*, Kyoto Univ., **10**, 1~47 (1966).