

蒸留水・淡水・人工海水中のアユ由来冷水病原菌の生存性

中居 裕

Survival of *Flavobacterium psychrophilum* from ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*)
in distilled water, fresh water and artificial sea water

YUTAKA NAKAI

冷水病原菌は12月の河川水中から遺伝子が検出されたとする報告¹⁾や、河川水中の培養菌体が36週間生存したとする報告²⁾があることから、河川水中では長期間生存する可能性が考えられる。しかし、それ以上の生存性は検討されていない。さらに、内陸部のアユ種苗生産施設においてふ化後の飼育に用いられる人工海水中での生存性については検討されていない。これらの知見は、河川およびアユ種苗生産施設での冷水病原菌の生態を考える上での基礎的知見として把握すべきことと思われる。

本研究は、上記の未検討の知見を得る目的で実施した。

キーワード：冷水病、河川水、人工海水、生存性

方 法

1. 供試菌株

CS-1株（1995年に体重12.9gのアユ病魚より分離）

2. 供試水

蒸留水：全自動蒸留水製造装置（GSR-200：アドバンテック東洋株式会社製）で作製した。

淡水：当所下呂支所第五井戸用水（飛騨川の伏流水）

人工海水（10/7アレン処方）：以下の処方で作製した。

NaCl:4.23g MgCl₂:0.383g KCl:0.116g CaCl₂:0.18g

MgSO₄:0.526g NaHCO₃:0.033g 上記淡水:100mL

なお、蒸留水・淡水は高圧蒸気滅菌、人工海水は濾過滅菌後、供試した。

3. 菌液調製

供試菌株を改変サイトファーガ液体培地³⁾（以下MCYB）で15℃・3日間静置培養し、菌液を27170g、20分間の遠心沈殿後、上清を捨て、それと同量の上記の淡水に再懸濁したものを供試菌液とした。供試前の菌数は1.2×10⁷ CFU/mLであった。

4. 菌液と供試水の混合およびその後の培養

供試水9mLと菌液1mLを混合後、15℃下に静置した。なお、人工海水については、菌液と混合後に所定の濃度（1/7アレン処方）となるように前述の淡水を用いて調製した。その後、約1ヵ月ごとにMCYAに供試水と菌液の混合溶液0.1mLを接種して、15℃で培養後、菌数測定を行った。なお、MCYA培養で3回連続して検出限界（10CFU/mL）未満となった場合、供試菌は死滅したと判断し、その後の実験を行わなかった。

結 果

結果を図・表に示した。

蒸留水区は、接種32日後に約1/1000に菌数が減少し、60日後には検出限界以下となった。

淡水区は、接種32日後に約1/100に菌数が減少し、60日後には約1/10000に菌数が減少したが、91日後以降970日後まで、ほぼ10³CFU/mLの菌濃度を維持した。1000日後は検出限界以下となった。

人工海水区は、接種32日後に約1/1000に菌数が減少し、

表 供試水に接種後の生菌数の推移

経過日数	生菌数 (CFU/mL)		
	蒸留水区	淡水区	人工海水区
0	1.2×10^6	1.2×10^6	1.2×10^6
32	1.3×10^3	1.0×10^4	1.5×10^3
60	10 <	2.0×10^2	1.0×10^2
91	10 <	1.8×10^3	5.3×10^3
120	10 <	1.7×10^3	7.0×10^2
151	NT	1.3×10^3	5.7×10^3
181	NT	1.7×10^3	2.3×10^2
210	NT	8.7×10^2	1.2×10^3
242	NT	9.3×10^2	1.3×10^2
271	NT	7.2×10^2	10 <
314	NT	3.6×10^2	10 <
343	NT	6.3×10^2	10 <
372	NT	1.7×10^3	NT
411	NT	8.3×10^2	NT
441	NT	2.0×10^3	NT
481	NT	1.0×10^3	NT
523	NT	8.8×10^2	NT
554	NT	1.1×10^3	NT
593	NT	1.5×10^3	NT
623	NT	4.9×10^2	NT
654	NT	2.3×10^2	NT
683	NT	2.2×10^3	NT
714	NT	1.1×10^3	NT
745	NT	3.5×10^3	NT
783	NT	1.1×10^2	NT
808	NT	4.1×10^2	NT
877	NT	3.2×10^2	NT
908	NT	4.2×10^2	NT
940	NT	1.9×10^2	NT
970	NT	8.0×10^1	NT
1000	NT	10 <	NT

NT: 未実施

60日後には約1/10000に菌数が減少したが、91日後以降242日後まで、 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mLの菌濃度を維持した。しかし、淡水区がほぼ 10^3 CFU/mLの菌濃度を維持したのに比べると、その間の菌濃度の変動は大きかった。271日後以降は検出限界以下となった。

なお、91日後以降に見られた人工海水区のコロニーは、淡水区のものに比べて小さいものが目立った。

考 察

淡水区は、菌濃度を1/100~1/10000に減らしながらも970日後まで生菌を確認できたことから、滅菌淡水中では2年以上の長期間にわたり生存可能と判断された。河川環境中では、種々の微生物が存在するため、その競合は当然起こり、また水温や水質の変動が刻一刻と起こる等、本研究の条件とは大きく異なる。しかし、970日生存したこと

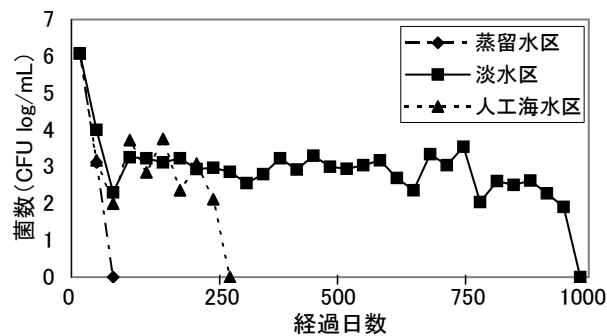


図 供試水に接種後の生菌数の推移

は、河川環境下における冷水病原菌がアユのいない秋から春にかけて生存し続ける可能性を示すものと思われる。

人工海水区も242日後までは生菌が確認できたことから、淡水区ほどではないが、比較的長期間生存が可能と判断された。冷水病原菌は1%の塩分では増殖できない株もあり⁴⁾、塩分を好む細菌ではないと考えられる。しかし、内陸部のアユ種苗生産施設でふ化後2~3ヵ月飼育水として使用される1/7アレン処方人工海水中では、その期間内は生存し続ける可能性が示唆された。ただし、人工海水区のコロニーは淡水区のコロニーに比べて微小であったことから、人工海水中では長期間生存しているものの、淡水に比べて何らかの影響でコロニー形成に悪影響が出ている可能性が考えられた。

蒸留水区は、淡水区・人工海水区に比べてかなり早く(60日後で検出限界以下)生菌が認められなくなることから、冷水病原菌は滅菌蒸留水中では長く生存できないことが示唆された。ところで、蒸留水中の生存性に関しては、1日後には検出限界以下⁵⁾、1時間後には検出限界以下²⁾の報告がある。これら報告に比べて、本研究の生存期間は32日とかなり長い。その理由として、本研究の場合、菌液調製に淡水を使ったため、蒸留水区に淡水が10%混入したことが影響したものと考えられる。本研究では、淡水中の生存性の検討を重視したため、供試菌と蒸留水の接触を避けて菌液調製を行った。菌液調製に蒸留水を使用すれば、より短期間で死滅したと思われる。

試験管内の冷水病原菌が、淡水中で1000日、人工海水中で242日の生存を示したことは、河川およびアユ人工種苗生産施設内での本菌の長期にわたる生存性の可能性を示唆するものであり、本菌の生態研究上、念頭に置くべき知見と思われる。

要 約

1. 冷水病原菌の河川およびアユ種苗生産施設での冷水

病原菌の生態解明の一端を明らかにするため、蒸留水・淡水（河川水）・人工海水中の生存性を検討した。

2. 蒸留水区は60日後には検出限界以下となった。
3. 淡水区は、970日後まで、ほぼ 10^3 CFU/mLの菌濃度を維持したが、1000日後以降は検出限界以下となった。
4. 人工海水区は、242日後まで、 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mLの菌濃度を維持したが、271日後以降は検出限界以下となった。
5. 試験管内の冷水病原菌が、淡水中で1000日間、人工海水中で242日間生存したことは、河川および人工種苗生産施設内での本菌の長期にわたる生存性の可能性を示唆した。

文 献

- 1) 網田健次郎, 星野正邦, 本間智晴, 若林久嗣. 河川に

おける *Flavobacterium psychrophilum* の分布調査. 魚病研究 2000;35(4): 193-197.

- 2) Vatsos I, N, Thompson D. Adams A. Strvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Dis. Aquat. Org.* 2003;56:115-126.
- 3) Wakabayashi H. Egusa S. Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish disease in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1974;40:751-757.
- 4) Pacha, R.E. Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 1968;16:97-101.
- 5) 徳島県水産試験場. 冷水病菌の水中での生存性. 平成8年度全国湖沼河川養殖研究会アユ冷水病研究部会提出資料 1996.