

魚病細菌に対するバチルス菌の溶菌作用

相川英明・山本裕康

Lytic Effect of *Bacillus* sp. against Fish Pathogenic microorganism

Hideaki AIKAWA*・Hiroyasu YAMAMOTO*

緒 言

魚介類養殖における疾病制御にはフィルター、紫外線および薬剤による飼育水の殺菌処理などで飼育環境から病原微生物を排除する方法があるが、これらの処理をしても水中の細菌数の減少は一時的で元の数まで復元すること、殺菌処理により細菌群集の拮抗作用が減少し、特定の細菌が急速に増加することなどから疾病の制御が難しくなっている。また、近年は食の安全という観点から養殖魚に対する消費者の関心が高まり、薬剤の使用は減少傾向にある¹⁾。

一方、新しい魚病対策として、有用微生物を利用して飼育環境に疾病を顕著化しない対策方法が開発されつつあり¹⁾、ガザミ *Portunus trituberculatus* の種苗生産においては既に実用化している²⁾。

バチルス菌 *Bacillus* sp. は海底堆積物中で優占し、溶菌作用を持つ微生物として知られており³⁾、閉鎖循環式水槽を用いたクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* 養殖ではビブリオ菌 *Vibrio* sp. の増殖を抑制することが報告されている⁴⁾。他方、マダイ *Pagrus major*⁵⁾ およびヒラメ *Paralichthys olivaceus*⁶⁾ の種苗生産においてはバチルス菌によって構成されるクルマエビ養殖用の底質改善剤を飼育水に添加して飼育池の水質の改善が試みられている。

神奈川県のアユの種苗生産を実施している神奈川県内水面種苗生産施設（以下、生産施設）では、閉鎖循環式水槽に上記の底質改善剤を添加し、水槽内の汚泥の減少が観察され、種苗生産過程においてアユの細菌性疾病が発生していない⁷⁾。

そこで、生産施設で使用しているクルマエビ養殖用の底質改善剤のバチルス菌について異なる塩分濃度における魚病細菌に対する溶菌作用を調べ、バチルス菌 *Bacillus* sp. による細菌性疾病の予防効果について考察した。

材料および方法

供試菌株

溶菌作用の供試菌株として、クルマエビ養殖用の底質改善剤のバチルス菌 *Bacillus* sp. 3菌株 (No. 2、No.10およびEB-2) を用いた。溶菌対象細菌として、

アユの冷水病の原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* (以下、冷水病菌)、アユの細菌性出血性腹水病の原因菌 *Pseudomonas plecoglossicida* (以下、シュードモナス病菌)、アユのビブリオ病の原因菌 *Vibrio anguillarum* (以下、ビブリオ病菌) を供した。

培地

溶菌対象細菌を100℃、30分間処理して加熱死菌体とした。ペプトン5g、酵母エキス5g、溶菌対象細菌の加熱死菌体を湿重量約1g、寒天15gおよび蒸留水1,000mLの組成³⁾に、塩分濃度が0、0.5、1および3%となるよう食塩0~30g加えて培地を調整した。

溶菌作用

溶菌対象細菌の加熱死菌体を懸濁し、塩分濃度0、0.5、1および3%に調整した平板培地に供試菌株 *Bacillus* sp. 3菌株をそれぞれ塗抹し、28℃では2日間、18℃では6日間培養して集落周辺に形成した溶菌斑（図1）の有無から溶菌を判定した。



図1 溶菌斑

2010. 02. 17 受理 神水セ業績No. 09-007

脚注* 内水面試験場

リゾチーム活性

リゾチームの産生を調べるため、市販のリゾチーム活性の測定用のマイクロコッカスルテウス *Micrococcus luteus* (生化学工業製)³⁾ を溶菌対象細菌の代わりに懸濁した塩分濃度が0、0.5、1および3%の培地に供試菌株 *Bacillus sp.* 3菌株をそれぞれ塗抹し、上記の条件で培養して溶菌斑からリゾチーム活性の有無を判別した。

結 果

培養温度28℃および18℃、塩分濃度0～3%の条件では供試菌株 *Bacillus sp.* 3菌株の全ての増殖が認められた(表1, 2)。

培養温度28℃について塩分濃度別にみると冷水病菌に対して塩分濃度0%では1菌株(No.2)の、塩分濃度0.5%以上で3菌株の溶菌が認められた。シュードモナス病菌、ピブリオ病菌に対しては塩分濃度0～3%で3菌株の溶菌が認められた。マイクロコッカスルテウスに対しても塩分濃度0～3%で3菌株が溶菌したため、培養温度28℃の条件では塩分濃度0～3%でリゾチーム活性があると判断された(表1)。

表1 塩分濃度と溶菌作用 28℃ 2日間培養

溶菌対象細菌	バチルス菌	塩分濃度 (%)			
		0	0.5	1	3
冷水病菌	No. 2	+	+	+	+
	No. 10	-	+	+	+
	EB-2	-	+	+	+
シュードモナス病菌	No. 2	+	+	+	+
	No. 10	+	+	+	+
	EB-2	+	+	+	+
ピブリオ病菌	No. 2	+	+	+	+
	No. 10	+	+	+	+
	EB-2	+	+	+	+
マイクロコッカスルテウス	No. 2	+	+	+	+
	No. 10	+	+	+	+
	EB-2	+	+	+	+

+: バチルス菌が増殖し溶菌が認められた。

-: バチルス菌が増殖したが溶菌しなかった。

一方、培養温度18℃について塩分濃度別にみると、シュードモナス病菌に対しては塩分濃度0～3%で3菌株の溶菌が認められた。マイクロコッカスルテウスに対しても塩分濃度0～3%で溶菌したため、培養温度18℃の条件では塩分濃度0～3%でリゾチーム活性があると判断された。冷水病菌に対しては2菌株(No.10、EB-2)では塩分濃度0～3%で溶菌は認められず、1菌株(No.2)のみ塩分濃度3%で溶菌が認められた。ピブリオ病菌に対しては塩分濃度0～3%で溶菌は認められない菌株(EB-2)、塩分濃度0～3%で溶菌した菌株(No.2)と1%以上で溶菌が認められた菌株(No.10)があった。培養温度18℃の条件では塩分濃度と溶菌対象細菌との組み合わせによっては溶菌が認められなかった(表2)。

表2 塩分濃度と溶菌作用 18℃ 6日間培養

溶菌対象細菌	バチルス菌	塩分濃度 (%)			
		0	0.5	1	3
冷水病菌	No. 2	-	-	-	+
	No. 10	-	-	-	-
	EB-2	-	-	-	-
シュードモナス病菌	No. 2	+	+	+	+
	No. 10	+	+	+	+
	EB-2	+	+	+	+
ピブリオ病菌	No. 2	+	+	+	+
	No. 10	-	-	+	+
	EB-2	-	-	-	-
マイクロコッカスルテウス	No. 2	+	+	+	+
	No. 10	+	+	+	+
	EB-2	+	+	+	+

+: バチルス菌が増殖し溶菌が認められた。

-: バチルス菌が増殖したが溶菌しなかった。

考 察

培養温度28℃および18℃、塩分濃度0～3%の条件では供試菌株 *Bacillus sp.* 3菌株の全てが増殖し、リゾチーム活性を示したので、溶菌酵素を産生することが明らかとなった。

供試菌株の培養温度と溶菌との関係については、18℃では28℃に比べ溶菌が観察されるまで日数を要したこと、28℃では溶菌が認められたのに対し、18℃では溶菌が認められない菌株があったことから、18℃では供試菌株の溶菌活性が低下したものと考えられた。バチルス菌が産生する溶菌酵素の至適温度は45～50℃⁸⁾であることから、供試菌株も28℃よりも高い温度域で溶菌活性が高くなるものと考えられた。リゾチームは細菌細胞壁を分解する酵素で、グラム陽性菌には作用を示すが、グラム陰性菌では外膜がリゾチームの細胞壁到達を阻害するため作用はみられないとされている⁹⁾。バチルス菌はグラム陽性菌に加えてピブリオ属、シュードモナス属などのグラム陰性菌を溶菌することが報告され⁸⁾、供試菌株もグラム陽性菌のマイクロコッカスルテウスおよびグラム陰性菌の溶菌対象細菌を溶菌したこと、溶菌はいくつかの酵素の複合作用によって引き起こされることから³⁾、供試菌株の溶菌はリゾチーム以外の溶菌酵素も作用していたものと推察された。

供試菌株は海水由来であるが、アユ養殖および種苗生産の飼育環境と同じ、18℃、塩分濃度0%および0.5%で増殖してシュードモナス病菌に対してはすべての菌株が溶菌し、ピブリオ病菌に対してNo.2の菌株が溶菌した。供試したバチルス菌を生産施設では飼育水に添加してアユの飼育を行っているが、細菌性疾患は発生していない⁷⁾。このことは本試験で確認した魚病細菌に対する溶菌作用が関与している可能性が示唆された。

生産施設では循環式飼育水槽は紫外線照射などによる飼育水の殺菌をせず、取り上げまで飼育水を交換しないでアユの飼育を行っている。また、バチルス菌を添加することにより汚泥の減少が観察されている⁷⁾。他方、バ

チルス菌は芽胞を形成すると熱や消毒剤など、種々の物理・化学因子に対して強い抵抗性を示すことが知られている¹⁰⁾。これらのことから、生産施設の循環式飼育水槽に添加したバチルス菌はその系に定着して、魚病を予防している可能性も考えられる。今後、生産施設の循環式飼育水槽から添加したバチルス菌が分離されれば、定着した菌株が明らかになるものと思われる。

18℃、塩分濃度0～1%の条件では溶菌が認められなかった冷水病の対策としては、循環式飼育水槽は飼育水の加温が可能なので、加温飼育¹¹⁾との併用により供試したバチルス菌の溶菌作用を積極的に活用する手法が考えられる。

供試したバチルス菌が溶菌酵素を大量に産生する培養条件を明らかにし、その培養液を飼育水に添加して溶菌酵素を直接、魚病細菌に作用させる手法なども考えられるので、アユの養殖、種苗生産においてバチルス菌の溶菌作用は新しい魚病対策として期待される。

謝 辞

本研究について有益な助言をいただいた元ヤクルト本社の故大村浩氏、元日本クロレラの織田邦明氏、財団法人 神奈川県内水面漁業振興会の手代木享祐氏に深謝申し上げます。

引用文献

- 1) 前田昌調 (2005) : 海産微生物の拮抗作用と魚介類の飼育, 海の研究, **14**, 7-20.
- 2) 野上欣也・前田昌調 (1991) : 水産魚介類種苗生産環境における微生物の挙動と管理, 「海洋微生物とバイオテクノロジー (清水潮編)」, 技報堂出版, 東京, 169-183.
- 3) 菅原庸 (1991) : 溶菌・抗菌作用をもつ微生物, 「海洋微生物とバイオテクノロジー (清水潮編)」, 技報堂出版, 東京, 184-194.
- 4) 望月秀郎・竹内俊郎 (2008) : 閉鎖式循環式水槽におけるクルマエビの成長・消化およびビブリオ菌抑制に及ぼすプロバイオティクスの影響, 水産増殖, **56**, 281-294.
- 5) 宮下盛・瀬岡学 (2005) : マダイ・チダイ, 「水産増養殖システム1 海水魚 (熊井英水編)」, 恒星社厚生閣, 東京, 45-81.
- 6) 村田修 (2005) : ヒラメ, 「水産増養殖システム1 海水魚 (熊井英水編)」, 恒星社厚生閣, 東京, 83-109.
- 7) 相川英明 (2009) : 養殖用底質改善剤使用菌株の溶菌活性, 第24回神奈川県水産技術センター業績発表会講演要旨集, 25.
- 8) 徳山龍明・浅野浩司 (1976) : Bacillus sp. No.S-7の生産する溶菌酵素-I, 日本大学農獣医学部学術研究報告, **33**, 223-235.
- 9) 光山正雄 (1999) : 非特異的生体防御因子, 「標準微生物学 (平松啓一・山西弘一編)」, 医学書院, 東京, 16-24.
- 10) 朽久保邦夫 (1999) : バシラス属と感染症, 「標準微生物学 (平松啓一・山西弘一編)」, 医学書院, 東京, 249-255.
- 11) 若林久嗣 (2004) : 細菌性冷水病, 「魚介類の感染症・寄生虫病 (江草周三)」, 恒星社厚生閣, 東京, 177-183.