

— 論文 —

## アユ冷水病菌の増殖を抑制する拮抗細菌の分離\*

伊藤 敬<sup>†</sup>・仲居 裕<sup>‡</sup>・稲野 俊直<sup>\*\*</sup>・田口 智也<sup>\*\*</sup>・前田 昌調<sup>†</sup>

### 要 旨

本研究は、微生物間の拮抗作用を利用してアユ冷水病原菌である *Flavobacterium psychrophilum* の増殖を抑制することを目的としている。この研究の一環として、アユ飼育槽内や天然河川から細菌を分離し、*F. psychrophilum* の増殖阻害活性を測定した。分離した 97 細菌株において、水槽壁および水中に浸漬したスライドガラス表面から得た菌が、高い割合で活性を示し、中でも 7 株は強い病原菌の増殖阻害作用を示した。そして、これら 7 株の簡易性状試験を行なった結果、3 株は *Pseudomonas* I/II, 2 株は *Moraxella* 属の種と考えられ、残りの 2 株は同定することができなかった。なお、この同定に関しては 16SrRNA の解析について考察した。この 7 株の各々を配合飼料に 20%(v/w) の割合で混合した後、体重あたり 3% 量の本飼料を稚アユに 8 日間毎日投与した結果、4 株についてはアユの初期減耗がみられたが、飼育 4 日目以降では、死亡個体はなかった。一方、他の 3 株については、この初期減耗は見られなかった。

キーワード：冷水病，細菌，増殖阻害，バイオコントロール，アユ養殖

### 1. はじめに

冷水病の原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* は、グラム陰性の長桿菌であり、運動性マイナス、寒天培地上(改変サイトファーガ培地; Wakabayashi and Egusa, 1974)で黄色コロニーを形成する。羅病した魚体の症状では、貧血、体表の白濁、鰓蓋下部の出血、体表の潰瘍等による穴あきや、尾鰭の欠落等がみられるが、このような症状が顕著に認められずに斃死することもある。

冷水病の発生は、我が国では 1985 年頃からギンザケやニジマスにみられるようになった(若林ら, 1991)。アユでは 1987 年に徳島県の養殖場で本菌が確認された後(Wakabayashi *et al.*, 1994), 種苗への感染が拡大し、発生域が全国的に広がっている。アユは、全国 47 都道府県すべてに生息しており、生息地域約 700 箇所のうち 96.5% の地域で種苗放流が実施されている。羅病した種苗が放流されたために生じた冷水病の発生は、養殖環境中のみならず自然河川に生息するアユにおいても確認され(Wakabayashi *et al.*, 1994), アユ資源量減少の一因となっている。例えば、9 年間で釣り客が約 4 万 2,000 人から 1 万 7,000 人に減少し、遊漁料収入がピーク時の約 7,500 万円から 2,600 万円に減った漁協もある。そして、漁協の財政難、資金不足によるアユ放流量の減少、釣り集客力の減少などの悪循環が生じ

\* 2005 年 12 月 15 日 受領; 2006 年 4 月 3 日 受理  
著作権: 日本海洋学会, 2006

<sup>†</sup> 宮崎大学農学部生物環境科学科;  
〒 889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1  
連絡先 e-mail address: gmaeda@cc.miyazaki-u.ac.jp

<sup>‡</sup> 岐阜県河川環境研究所下呂支所;  
〒 509-2592 岐阜県下呂市萩原町羽根 2605-1 下呂総合庁舎

<sup>\*\*</sup> 宮崎県水産試験場小林分場;  
〒 886-0005 宮崎県小林市大字南西方字出之山 1091

ている。

アユ冷水病への対策としては、抗生物質スルフィゾールの投与や魚体の加温処理、塩水浴、ワクチン投与などが挙げられる。しかし、有効かつ実用的な方法がみつかっていない現状にあり、養殖および自然河川での発生件数は年を追うごとに増加している。なお、*F. psychrophilum*の至適増殖温度は15~18°Cであり、本菌は25°C以上での増殖は非常に遅いため、冷水病の発生は低水温期(18°C以下)に限定されると考えられていた。しかし、最近では、水温20°C以上の季節においても発生するようになってきている。

養殖環境中において、微生物によって病原微生物を抑制する生物防除に関する研究は、1989年に初めて、魚の成長促進効果と同時に病原菌の増殖を抑制する有用な機能を保持した微生物が報告されて以来(Maeda and Nogami, 1989)、現在までに同様の機能を有する微生物の探索と水産養殖への実用化例が100編近い論文で報告されている(Gatesoupe, 1999; Maeda, 2004; 前田, 2005)。このように急速に研究が進展している背景には、養殖における過剰な薬剤使用に対する消費者の不安感の増大などが挙げられる。同時に、薬剤耐性菌の出現により薬効が低減し、疾病防除の難しくなっている現状がある。これらの多くの生物防除研究は、海産魚介類の養殖現場において行なわれており、淡水魚養殖での微生物による防除方法の知見は乏しい現状にある。

本研究では、微生物の拮抗作用を利用し、薬剤やワクチンに依存しない淡水魚の疾病防除を目的として、アユ冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* の増殖を抑制する細菌を探索、分離した。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 細菌の分離

細菌は、宮崎県水産試験場小林分場のアユ飼育槽および近辺を流れる小川から分離した。

アユ飼育槽においては、飼育水と水槽壁から細菌を分離した。飼育水からの分離は、(1)水から直接採取する方法と、(2)滅菌したスライドガラスを水中に浸漬し、5日後スライドガラスを100 ml 滅菌蒸留水に静置

して実験室に持ち帰り、ガラス表面に付着した細菌を cell scraper で剥離して採取する方法とを採用した。

いずれの分離方法においても、採取した試水等を、滅菌した現場の河川水で $10^{-1}$ ~ $10^{-5}$ に段階希釈し、改変サイトファーガ寒天培地(Wakabayashi and Egusa, 1974)上に塗抹して、18°C下で培養、7日間後に増殖した細菌を分離した。使用した改変サイトファーガ培地の組成を次に示す。

Tripton (Difco Co. Ltd.)	2 g
Yeast Extracts (Difco Co. Ltd.)	0.5 g
Beef Extracts (Difco Co. Ltd.)	0.2 g
酢酸ナトリウム	0.2 g
塩化カルシウム	0.2 g
Agar (Difco Co. Ltd.)	15 g
蒸留水	1,000 ml
pH	7.2~7.4

### 2.2. *Flavobacterium psychrophilum* に対する分離菌株の拮抗作用の検定

実験に用いた冷水病菌 *F. psychrophilum* は、改変サイトファーガ寒天培地上において18°C下で培養した。分離した細菌の抗菌活性の検定は、Maeda (1999)の方法に基づいて行なった。すなわち、改変サイトファーガ寒天平板上で、分離菌を平行になるように2本(スミアの長さ4 cm, スミア間隔3 cm)塗抹した後、この寒天培地に冷水病の原因菌である *F. psychrophilum* (CS-1株)を、供試細菌の間に、長さ3 cmのスミアになるように塗抹した。同時に、対照区として *F. psychrophilum* のみを塗抹した平板培地を設定した。冷水病菌と供試菌とを接種したこれらの培地は18°Cで14日間培養した後、実験区及び対照区とにおける *F. psychrophilum* の増殖を比較することにより、供試菌の抗菌活性を検定した。この抗菌活性値(阻害率)は、対照区の病原菌スミアの横幅値に対する実験区の病原菌スミアの横幅値をもとにして百分率で算出した。なお、本抗病原菌試験では、供試菌を病原菌移植の7日前に接種する方法(抗菌試験Ⅰ)と、供試菌と病原菌とを同時に接種する方法(抗菌試験Ⅱ)とを行なった。

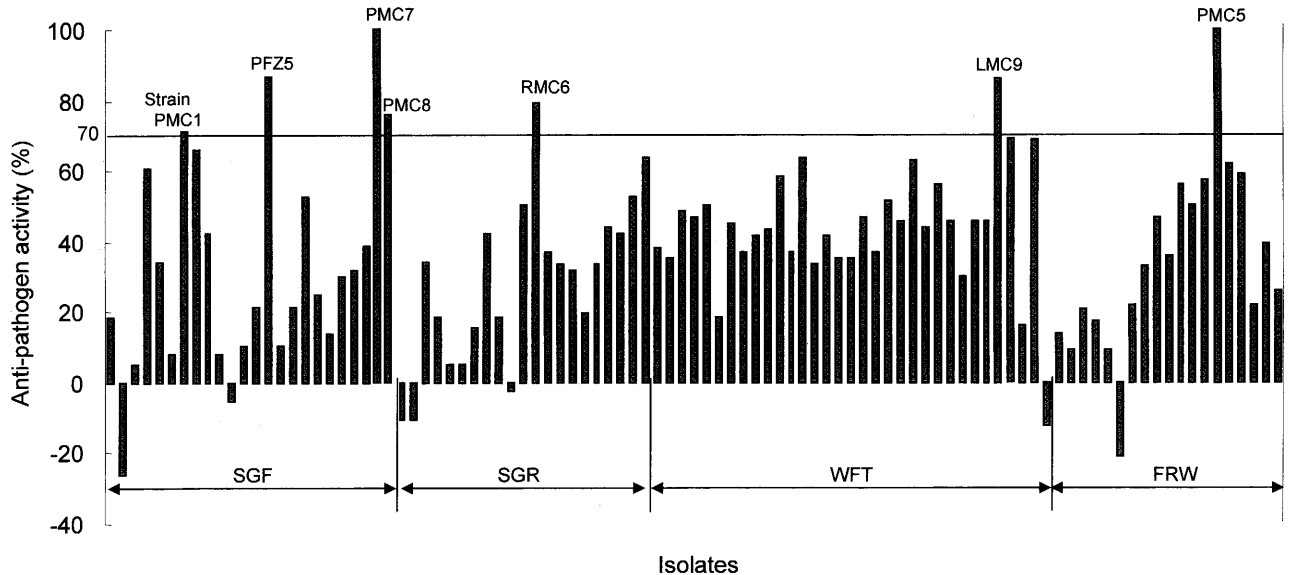


Fig. 1. Anti-pathogen activities of the isolated bacteria against *Flavobacterium psychrophilum*.

SGF: Isolates from slide glass in fish-rearing water

SGR: Isolates from slide glass in water of the river near to the fish-rearing place

WFT: Isolates from the wall of the fish tank

FRW: Isolates from fish-rearing water

### 2.3. 拮抗細菌の簡易性状試験

強い抗菌活性の見られた分離菌株は、Okuzumi *et al.* (1981) の簡易同定法に基づき、グラム染色性、運動性、形態、色素産生能、チトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖発酵の項目を調べ、その結果より属にいたるまでの同定を行なった。

### 2.4. 拮抗細菌のアユ生残におよぼす影響試験

分離菌株の中で、拮抗作用の強い7株についてのアユ生残への影響を調べた。すなわち、塩素イオンを除去した水道水 1.5 L 量を 2 L ビーカー中に入れ、平均体重 0.2 g の稚アユを 10 尾ずつ飼育した。各試験区は 2 個設定し、毎日、体重当りの 3% の配合飼料に拮抗細菌の菌液 (約  $10^9$  cells  $\text{ml}^{-1}$  の菌液を配合飼料に 20% (v/w) の割合で添加) を混合して与え、同時に配合飼料のみを与える対照区を設定した。また、ビーカー内の飼育水については、毎日朝と夕方、サイホン方式によ

て換水を行ない、エアレーションによる酸素供給も行なった。飼育は 8 日間行ない、稚アユの斃死尾数を測定することにより、拮抗細菌 7 株の稚アユの生残に及ぼす影響を調べた。なお、供試菌株の培養には ZoBell 2216E (商品名: Marine Agar, Difco Co. Ltd.) 培地を使用した。

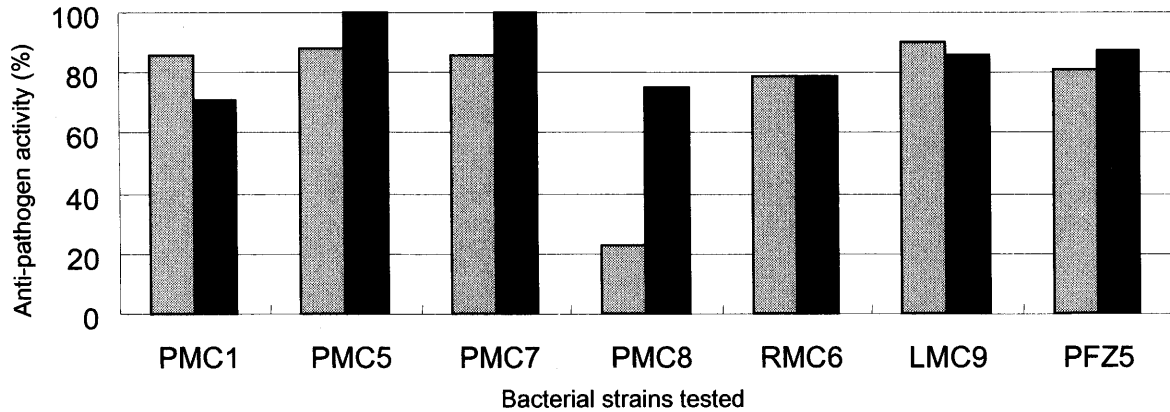
## 3. 結果

### 3.1. 細菌の分離

アユ飼育槽水中から 41 株、アユ水槽壁から 32 株、付近を流れる小川水中から 24 株、計 97 の細菌株を分離した。

### 3.2. 抗病原菌試験

菌株を寒天平板培地上に並行に移植して行なった抗菌試験 I (供試菌を病原菌移植の 7 日前に接種) では、分



**Fig. 2.** Anti-pathogen activities of bacteria tested against *Flavobacterium psychrophilum*.

Gray bar: Bacteria tested and *F. psychrophilum* were inoculated to the test agar medium at the same time.  
Black bar: Bacteria tested were inoculated first and after 7 days the *F. psychrophilum* was inoculated to the agar plate.

**Table 1.** Anti-pathogen activities of bacteria against *Flavobacterium psychrophilum* isolated from the surface of slide galasses immersed in water, fish-rearing tank wall and fish-rearing water.

Places of isolation	No. of isolates	No. of isolates holding anti-paghogen activity			
		Anti-pathgen activity			
		30-40%	41-50%	51-60%	61%-
Slide glass (in fish rearing water)	24	4 (17)*	1 (4)	1 (4)	6 (25)
Slide glass (in stream water)	21	6 (29)	3 (14)	2 (10)	2 (10)
Wall of fish tank	33	8 (24)	13 (39)	3 (9)	5 (15)
Fish-rearing water	19	3 (16)	2 (11)	3 (16)	2 (11)

\* Numeral in parentheses indicates percentages of anti-pathogen bacteria in the number of isolates.

離した 97 株中、スライドガラス表面 (PMC1, PMC7, PMC8, PFZ5 株, RMC6) とアユの飼育水中 (PMC5 株) より分離した 6 株、飼育水槽壁より分離した 1 株 (LMC9 株) との 7 株は *F. psychrophilum* の増殖を強く阻害した (阻害率 70%以上)(Fig. 1)。また、この 7 株についての抗菌試験 II (供試菌と冷水病菌とを同時に

接種) でも、強い冷水病菌の増殖阻害効果がみられた (Fig. 2)。

なお、養殖水槽壁および、養殖水中や小川水中に浸漬したスライドガラス上より分離した菌株の中で、抗菌力を保持する菌の割合を Table 1 に示したが、水槽壁およびスライドガラスから分離した菌群が、水中から

Table 2. Tentative identification of anti-pathogen bacteria.

Isolates	Anti-pathogen activity(%)	Gram staining	Motility	Oxidase test	O-F test	Genus names
PMC1	71	-	+	-	o	NI
PMC5	100	-	+	-	o	<i>Pseudomonas</i> I/II
PMC7	100	-	+	-	o	NI
PMC8	76	-	-	+	o	<i>Moraxella</i>
PFZ5	87	-	-	+	o	<i>Moraxella</i>
LMC9	86	-	+	+	o	<i>Pseudomonas</i> I/II
RMC6	79	-	+	+	o	<i>Pseudomonas</i> I/II

NI: Not identified

PMC, PFZ: Isolates from the slideglass in fish-rearing water (but PMC5 was isolated from fish-rearing water)

LMC: Isolates from the wall of the fish tank

RMC: Isolates from water of the river near to the fish-rearing place

分離した菌群よりも高い割合で病原菌に対する阻害作用を示した。

### 3.3. 拮抗細菌の簡易性状試験

Fig. 1において強い拮抗作用を示した拮抗細菌7株の中で、3株はグラム陰性、運動性: +, チトクロームオキシダーゼテスト: -, ブドウ糖の好氣的分解を示したため *Pseudomonas* I/IIに該当すると考えられた。2株はグラム陰性、運動性: -, チトクロームオキシダーゼテスト: +であったため *Moraxella* 属の種あるいは近縁種と考えられ、残りの2株は本方法では同定することができなかった (Table 2)。

### 3.4. 拮抗細菌の稚アユの生残におよぼす影響

上記の強い拮抗作用を示した細菌7株を配合飼料に混合し、体重あたり3%量の本飼料をアユに毎日投与した。その結果、4株についてはアユの初期減耗がみられたが、飼育4日目以降では、死亡個体はなかった。一方、他の3株については、この初期減耗は見られなかった。(Fig. 3)。

## 4. 考察

現在、アユ冷水病原菌 *F. psychrophilum* に対して強い拮抗作用を示した上記7株について、16SrRNA塩基配列の異同の解析を行なっているが、7菌株中6菌株は既知の細菌種とは一致しないと考えている。

水産増養殖環境中における病原菌と抗病原菌との間の拮抗作用は、自然界では常に進行している現象であり、この拮抗作用を利用した病害微生物の防除方法は生物学的防除 (バイオコントロール) と呼ばれている。本研究において、養殖水中から抗冷水病菌の機能をもつ細菌株を多数採取できた。これらの細菌は微生物間の相互作用において、冷水病菌の感染伝搬を防止する可能性がある。また、魚類がこれらの細菌を摂食した場合、有効細菌の抗菌作用により、消化管において病原菌の増殖を抑制することも考えられるが、このような事例は、前田 (2005) の総説において、海産有用細菌による病原菌の防除として報告されている。一方、淡水環境中におけるバイオコントロールの報告例は少ないが、本研究により、病原菌の増殖を抑制する細菌は淡水中にも多く存在することが明らかとなった。この結果により、淡水魚養殖環境中においても、拮抗細菌を利用した疾病防除ができるものとする。今後は、本研究で確保した拮抗細菌を用いて、アユに限らず、魚介類の無投薬養殖実現を目標に研究を進めていく。

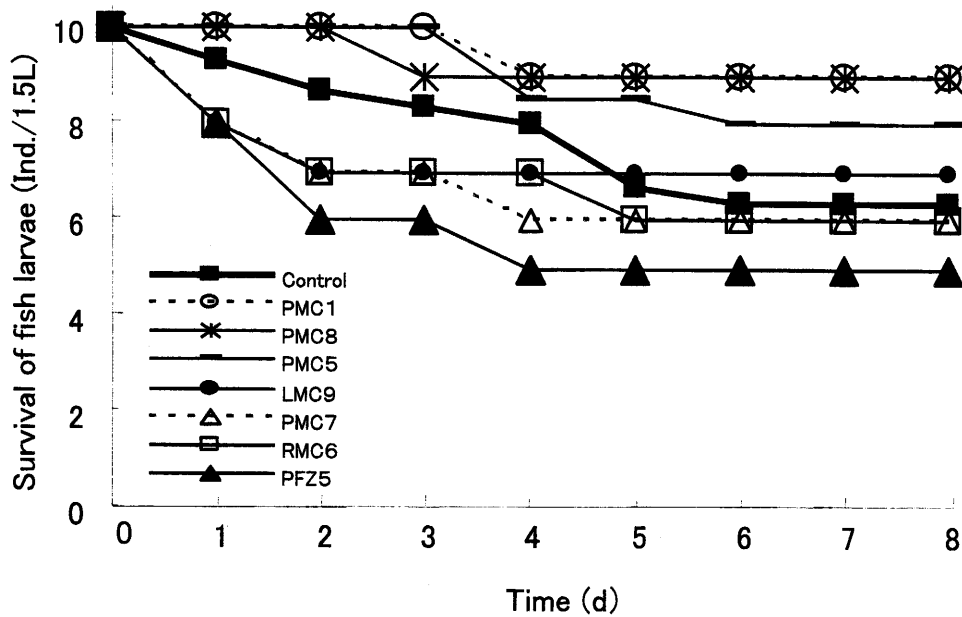


Fig. 3. Survival of fish larvae under the feeding regime of the bacteria tested.

### References

- Gatesoupe, F. J. (1999): The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, **180**, 147-165.
- Maeda, M. and K. Nogami (1989): Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture. p. 395-398. In *Current Topics in Marine Biotechnology*, edited by S. Miyachi *et al.*, Japan. Soc. Mar. Biotechnol., Tokyo.
- Maeda, M. (1999): *Microbial Processes in Aquaculture*. Biocreate Press, Tokyo, Derby, 102 pp.
- Maeda, M. (2004): Interactions of microorganisms and their use as biocontrol agents in aquaculture. *La Mer*, **42**, 1-19.
- 前田 昌調 (2005): 海産微生物の拮抗作用と魚介類飼育への利用. *海の研究*, **14**, 7-20.
- Okuzumi, M., S. Okuda, and M. Awano (1981): Isolation of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria from *Scomber japonicus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1,591-1,598.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa (1974): Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **40**, 751-757.
- 若林 久嗣, 堀内 三津幸, 文谷 俊雄, 星合 愿一 (1991): 日本で発生したギンザケ稚魚の冷水病. *魚病研究*, **26**, 211-212.
- Wakabayashi, H., T. Toyama, and T. Iida (1994): A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **29**, 101-104.

Antagonistic Activities of Bacteria against the Pathogen of  
Cold-water Disease,  
*Flavobacterium psychrophilum*

Kei Itoh<sup>†</sup>, Yutaka Nakai<sup>‡</sup>, Toshinao Ineno<sup>\*\*</sup>, Tomoya Taguchi<sup>\*\*</sup>,  
and Masachika Maeda<sup>†</sup>

**Abstract**

The aim of this research is to control the cold-water disease of sweet fish, Ayu, caused by *Flavobacterium psychrophilum*, using the antagonism of microorganisms. For this study 97 bacterial strains were isolated from the breeding tank of Ayu and the adjacent natural stream. The isolates from the surface of the tank wall and the glass slide immersed both in fish-rearing water and natural stream for 5 days showed the antagonistic activities at a higher level than other isolates. Among them seven bacterial isolates inhibited the growth of *F. psychrophilum* strongly, and three isolates were considered to belong to genus *Pseudomonas* I / II and 2 isolates belonged to genus *Moraxella*, as a result of identification with the method of Okuzumi *et al.* (1981), although 2 remaining isolates were not identified. Mixing the culture fluid of each strain with the artificial feed (20% v/w) and giving this to the sweet fish every day in the amount of 3% of fish body weight, the number of deaths of the sweet fish did not exceed the number in the control experiment using three strains (PMC1, PMC5 and PMC8), but for the other four strains fish, survival was lower than those of the control experiment.

**Key words:** cold-water disease, bacteria, antagonism, biocontrol, Ayu aquaculture

(Corresponding author's e-mail address: gcmaeda@cc.miyazaki-u.ac.jp)

(Received 15 December 2005; accepted 3 April 2006)

(Copyright by the Oceanographic Society of Japan, 2006)

<sup>†</sup> Department of Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan

<sup>‡</sup> Gifu Prefectural Research Institute for Freshwater Fish and Aquatic Environments, Gero Branch, 2605-1 Hane, Hagiwara, Gifu 509-2592, Japan

<sup>\*\*</sup> Miyazaki Prefectural Fisheries Experimental Station, Kobayashi Branch, Kobayashi-city, Miyazaki 886-0005, Japan