

海産魚介類から分離された細菌に対するバチルス菌の溶菌作用

相川英明

Lytic Effect of *Bacillus* sp. against bacteria isolated from marine fish and shellfish

Hideaki AIKAWA *

緒 言

狂牛病 (BSE) の発生や産地表示の偽装事件, 輸入農産物からの残留農薬の検出など食の安全をめぐる問題が次々に発生し, 食品の安全・安心に対する消費者の関心が高まっており, 養殖魚の生産履歴開示や法令に基づく水産用医薬品の適正使用が求められるようになってきている¹⁾。

1980 年代以降, 人に対する抗微生物薬の不適切な使用を背景として, 薬剤耐性菌が世界的に増加している一方, 新たな抗菌薬の開発は減少している。動物における薬剤耐性菌の出現は動物分野の治療効果を減弱させるほか, 畜産物等を介して人に感染する可能性があり, これら薬剤耐性菌の問題は国際社会でも大きな課題となっていることから, 我が国は薬剤耐性対策アクションプランに取り組んでいる²⁾。

一方, 養殖業者は経営安定のため多魚種化を進めているが, 認可された水産用医薬品が少なく, 対応に苦慮していることから, 安全性を考慮した新しい防除対策, 例えば生物防除やプロバイオティックスの開発が求められている³⁾。

このような背景のもと, 有用微生物を利用して疾病を防除する対策方法 (バイオコントロール) が開発されつつあり⁴⁾, ガザミ *Portunus trituberculatus* の種苗生産においては実用化されている⁵⁾。

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⁶⁾, 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⁷⁾。他方, マダイ *Pagrus major*⁸⁾ およびヒラメ *Paralichthys olivaceus*⁹⁾ の種苗生産においては

飼育池の水質の改善を目的にバチルス菌の添加が行われている。

前報¹⁰⁾ では, クルマエビ養殖用の底質改善剤のバチルス菌 *Bacillus* sp. について淡水魚由来の魚病細菌に対する溶菌作用を確認したが, 今回, 海産魚介類から分離された細菌について, バチルス菌 *Bacillus* sp. による溶菌作用を調べるとともにその予防効果について考察した。

材料および方法

供試菌株

海水から分離され, 養殖環境下で発生する有機物の分解能力に優れたバチルス菌 *Bacillus* sp. の菌株うち, 前報¹⁰⁾ でアユのビブリオ病菌に溶菌作用を示した菌株 No. 2 および No. 10 を用いた。

溶菌対象細菌

溶菌対象細菌として, 神奈川県水産技術センター (以下, 当センター) が実施している魚病診断において, 養殖ヒラメから分離したエドワジエラ症の原因菌 *Edwardsiella tarda*, 養殖ブリから分離した連鎖球菌症の原因菌 *Streptococcus dysgalactiae*, 種苗生産施設において衰弱したサザエから分離されたビブリオ菌を供した。*Edwardsiella tarda* および *Streptococcus dysgalactiae* は公益社団法人日本水産資源保護協会から配布された魚類病原微生物に対する抗血清により同定した (表 1-1, 1-2)。サザエから分離されたビブリオ菌はグラム陰性, 短桿菌で TCBS 培地でのコロニーが黄色であった場合, *Vibrio* sp. とし¹¹⁾, さらに *Vibrio harveyi* を標的とした PCR 法¹²⁾ で陽性であったものを *Vibrio harveyi* と同定した (表 1-3)。

表 1-1 溶菌対象細菌（ヒラメ由来）

	宿主	部位	抗 <i>Edwardsiella tarda</i>		形態	分離年月日
			血清	グラム染色		
<i>Edwardsiella tarda</i> (a)	ヒラメ	腎臓	+	—	短桿	20170510
<i>Edwardsiella tarda</i> (b)	ヒラメ	腎臓	+	—	短桿	20181225

表 1-2 溶菌対象細菌（ブリ由来）

	宿主	部位	抗 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>		形態	分離年月日
			血清	グラム染色		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (a)	ブリ	腎臓	+	+	球菌	20170728
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (b)	ブリ	腎臓	+	+	球菌	20181225

表 1-3 溶菌対象細菌（サザエ由来）

	宿主	部位	TCBS培地での コロニーの色	抗 <i>Vibrio harveyi</i>		形態	OF	分離年月日
				PCR	グラム染色			
<i>Vibrio</i> sp. (a)	サザエ	中腸腺	黄色	—	—	短桿	F	20171120
<i>Vibrio</i> sp. (b)	サザエ	血リンパ	黄色	—	—	短桿	F	20171120
<i>Vibrio harveyi</i> (a)	サザエ	血リンパ	黄色	+	—	短桿	F	20171120
<i>Vibrio harveyi</i> (b)	サザエ	中腸腺	黄色	+	—	短桿	F	20171201

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 5 g、酵母エキス 5 g、溶菌対象細菌の加熱死菌体を湿重量 1 g、寒天 15 g および海水 1,000mL の組成⁶⁾で平板培地を調整した。

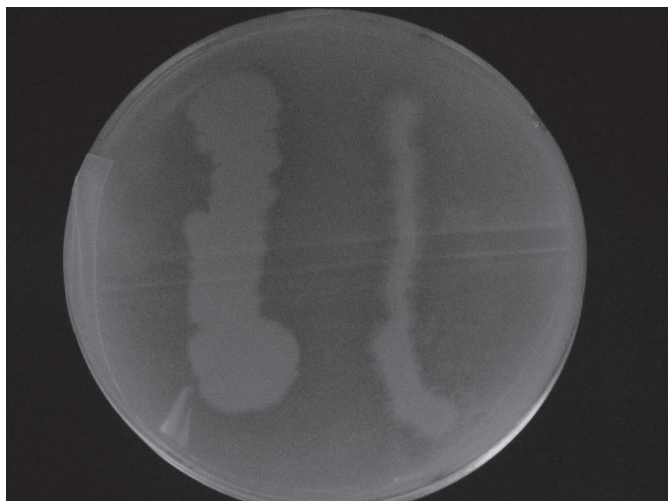


図 1 溶菌斑 *Bacillus* sp. のコロニー縁辺部が溶菌していることが分かる

溶菌作用

溶菌対象細菌ごとに加熱死菌体を懸濁した上記の平板培地に供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. 2 菌株をそれぞれ塗抹し、15℃および 20℃で

は 6 日間、25℃では 2 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。

結 果

培養温度 15℃、20℃および 25℃において供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. の溶菌作用は No. 2 と No. 10 の菌株間での違いは見られず同じ結果であったためひとつの表にまとめた (表 2)。

グラム陽性菌の *Streptococcus dysgalactiae* に対しては 15℃を含むすべての培養温度において溶菌が認められた。一方、グラム陰性菌の *Edwardsiella tarda*、*Vibrio* sp. および *Vibrio harveyi* に対しては 15℃では溶菌は見られず、20℃および 25℃で溶菌が認められた。

考 察

本研究の供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. は、リゾチーム活性を示し、溶菌酵素を産生することが明らかとなっている¹⁰⁾。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¹³⁾。

表2 培養温度と *Bacillus* sp. (No. 2, No. 10) の溶菌作用

溶菌対象細菌	培養温度(°C)		
	15	20	25
<i>Edwardsiella tarda</i> (a)	±	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i> (b)	±	+	+
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (a)	+	+	+
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (b)	+	+	+
<i>Vibrio</i> sp. (a)	±	+	+
<i>Vibrio</i> sp. (b)	±	+	+
<i>Vibrio harveyi</i> (a)	±	+	+
<i>Vibrio harveyi</i> (b)	±	+	+

＋：*Bacillus* sp. が増殖し溶菌が認められた。

±：*Bacillus* sp. が増殖したが溶菌しなかった。

本研究の培養温度 15°Cにおいては、グラム陽性菌の *Streptococcus dysgalactiae* の溶菌が認められたのに対して、グラム陰性菌の *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp. および *Vibrio harveyi* の溶菌は見られず、グラム陽性菌とグラム陰性菌との間で結果が異なった。このことは、外膜のあるグラム陰性菌に対しては溶菌しないことを示しているため、培養温度 15°Cにおける供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. の主な溶菌作用はリゾチームによって生じると考えられた。

一方、本研究の培養温度 20°Cおよび 25°Cにおいて供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. はグラム陰性菌をも溶菌したことについては、バチルス菌はグラム陽性菌に加えてビブリオ属、シュードモナス属などのグラム陰性菌を溶菌すること¹⁴⁾、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⁶⁾、供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. 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。

供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. は淡水魚由来の魚病細菌を溶菌すること、この菌を添加した生産施設ではアユの細菌性疾病は発生しないことからバチルス菌 *Bacillus* sp. の魚病細菌に対する溶菌作用が示唆されている¹⁰⁾。また、同施設ではバチルス菌 *Bacillus* sp. を添加することにより汚泥の減少が観察されている¹⁵⁾。

バチルス菌の投与により、チャイロマルハタの連鎖球菌症¹⁶⁾、クルマエビのビブリオ病⁷⁾ に対する抗病性の向上に加えて、ソウギョの免疫力¹⁷⁾、コイ¹⁸⁾ およびヨーロッパヘダイ¹⁹⁾ の成長についても向上することが明らかにされている。また、ヨーロッパスズキの種苗生産時のアルテミアへの投与でビブリオ病の予防効果も確認されている²⁰⁾。

当センターのヒラメの仔稚魚期の水槽へ供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. を添加したところ、細菌疾病は発生せず、水質悪化が原因と推察される大量死も発生しないこと（私信）、供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. はヒラメ由来の *Edwardsiella tarda* には 20°C以上で溶菌作用を示したことから、ヒラメの初期飼育の飼育環境の改善と細菌性疾病の予防に参与している可能性が示唆される。

2015 年以降、当センターの種苗生産施設のサザエの一部には衰弱個体が見られており、これらから *Vibrio* 属細菌が分離される事例もある。現在のところその原因は不明となっている²¹⁾ が、何らかの原因でサザエが衰弱した結果、二次的な *Vibrio* 属細菌の日和見感染によって死亡が起きた可能性が考えられている²²⁾。

供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. は衰弱したサザエ由来のビブリオ菌に対して培養温度 20°C以上で溶菌作用を示したこと、バチルス菌 *Bacillus* sp. を添加することにより汚泥が減少する¹⁵⁾ ことから、サザエの水槽へ添加することで *Vibrio* 等の細菌による日和見感染の予防や汚泥の減少による飼育環境の改善効果が期待される。

また、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²³⁾ 上、供試菌株のバチルス菌 *Bacillus* sp. は海水由来¹⁵⁾ でもあるので、飼育水槽に添加したバチルス菌はその系に定着して、魚病を予防する可能性も考えられる。

溶菌酵素を大量に得るために供試菌のバチルス菌 *Bacillus* sp. を大量培養して、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ことなども考えられるので、海産魚介類の陸上養殖、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。

引用文献

- 1) 舞田正志(2004) : HACCP管理下における水産用医薬品の適正使用, 魚病研究, 39, 118.
- 2) 大曲 貴夫(2017) : 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン2016—2020, 日本内科学会雑誌, 106, 2259-2264.
- 3) 延東真(2004) : 薬事法改正後の魚病対策の問題点, 魚病研究, 39, 115-116.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 相川英明・山本裕康(2010) : 魚病細菌に対するバチルス菌の溶菌作用, 神奈川県水産技術センター研究報告, 4, 39-41.
- 11) 石丸克也(2019) : ビブリオ病, 「養殖ビジネス」, 緑書房, 東京, 21-25.
- 12) Ana Cano-Gomez et al(2015) : A multiplex PCR-based protocol for identification and quantification of *Vibrio harveyi*-related species, Aquaculture, 437, 195-200.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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ミナー業績発表会講演要旨集, 25.
- 16) Liu et al (2012) : Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*, Fish & Shellfish Immunology, 33, 699-706.
- 17) Li et al (2012) : Effects of *Bacillus* preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), Fish Physiology and Biochemistry, 38, 1585-1592.
- 18) Wang et al (2006) : Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology, 127, 283-292.
- 19) Avella et al (2010) : Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. Aquaculture, 305, 12-19.
- 20) Touraki et al (2012) : Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia nauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 2425-2433.
- 21) 水研機構増養殖研究所(2019) : 太平洋ブロック地域合同検討会, 平成30年度水産増養殖関係研究開発推進会議「魚病部会」議事概要, 28.
- 22) 東京大学大学院農学生命科学研究科 : 種苗生産場でのサザエの死亡例調査, 平成28年度海洋アライアンスイニシャティブ報告書, https://www.oa.u-tokyo.ac.jp/study/pdf/OAI16_7.pdf; (2019.8.1取得) .
- 23) 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.