

## 種々の温度で培養した冷水病菌の生理特性およびアユへの病原性

菅原和宏

(環境グループ)

近畿大学大学院農学研究科・博士後期 2 年

冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* (Bernardet *et al.*, 1996) は、冷水病の原因菌として知られており、治療には投薬が行われてきた (Nematollahi *et al.*, 2003)。しかし、過度の投薬は、しばしば薬剤耐性菌の出現 (Bruun *et al.*, 2000) や、魚体や環境への薬の残留 (Cabello, 2006) が問題となる。そのため、投薬治療に代わる有効な手段として、最近注目されているのが加温処理である。これまでの研究で、著者らは 28 °C の MCY 液体培地および滅菌地下水では、冷水病菌は 2 日以内でコロニー形成能が消失することを明らかにした (Sugahara *et al.*, 投稿中)。しかし、28 °C に保置された冷水病菌がコロニー形成能を失ったとしても、冷水病菌が死滅したとは言い切れず、冷水病菌が再び増殖状態へ戻り、病原性を発揮する可能性は否定できない。

そこで本研究では、様々な温度での冷水病菌の生理状態を、コロニー形成能、細胞膜の構造安定性およびアユへの病原性から評価し、加温処理の有効性を検証した。

### 材料および方法

冷水病菌株 PH0424 を試験に用いた。菌株を MCY 液体培地 (0.2 % トリプトン、0.05 % 酵母エキス、0.02 % 肉エキス、0.02 % 酢酸ナトリウム三水和物、0.02 % 塩化カルシウム二水和物、pH

7.2) に接種し、15 °C で 24 時間振とう培養 (160 rpm) したものを前培養液として実験に供した。

様々な温度における冷水病菌の生残は、滅菌地下水を用いて調べた。滅菌地下水が 15 mL 入った L 字型試験管に菌の濃度が  $10^8$  CFU/mL になるように冷水病菌を接種した。L 字型試験管を温度勾配培養装置にセットし、15、23、28 および 33 °C で 10 日間振とう (30 rpm) した。1 試験区当たり 2 本の試験管を使用した。経時的に各試験管内の試料を一定量採取し、総菌数は直接計数法 (Porter & Feig, 1980)、コロニー数はドロップ法 (Hoben & Somasegaran, 1982) で求めた。液体培地を用いた生菌数の計数は most probable number (MPN) 法 (Rowe *et al.*, 1977) で求めた。冷水病菌の生死は、細胞膜の構造安定性を指標として細菌の生死を判定する LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes) を用いて評価した。

滅菌地下水に保置された冷水病菌の病原性は、アユへの攻撃試験により評価した。15、23、28 および 33 °C で 1、2 および 3 日間晒された冷水病菌液 20  $\mu$ L を、1 試験区当たり 25 尾のアユ (平均体重 4.3 g) の腹腔内に注射し、2 週間後のアユの死亡率を比較した。

### 結果および考察

滅菌地下水に保置された冷水病菌の総菌数、

コロニー数、MPN、LIVE/DEAD 生菌数および LIVE/DEAD 死菌数の経時変化を図 1 に示した。15 °C 区および 23 °C 区のコロニー数は、試験開始直後から緩やかに減少したが、試験終了時(10 日後)でもそれぞれ  $10^5$  および  $10^4$  CFU/mL 検出された。冷水病菌は至適温度範囲の場合、

滅菌河川水や滅菌湖水のような低栄養環境では長期間生存でき、病原性も維持することが報告されており (Madetoja *et al.*, 2003; Vatsos *et al.*, 2003)、本研究においても同様の傾向が認められた。それに対して 28 °C 区および 33 °C 区のコロニー数は、それぞれ 2 日後および 1 日後に検

出限界値以下となっ

た。

28 °C 区および 33 °C 区の冷水病菌は、コロニー形成能を失っても、細胞膜の構造安定性は保たれていた(図 1)。

培養はできなくても、生理活性が保たれている状態の細菌は

viable but

non-culturable

(VBNC)と呼ばれ、環境条件の悪化など、ス

トレス下に置かれると

VBNC 状態へ移行す

る場合がある (Colwell *et al.*, 1985)。本研究

において、コロニー形成能を消失したが細胞

膜の構造安定性は保

たれていた冷水病菌

は、従来の VBNC の

判断基準から考えると

VBNC 状態へ移行し

たと言える。

VBNC 状態の細菌

は、液体培地への接

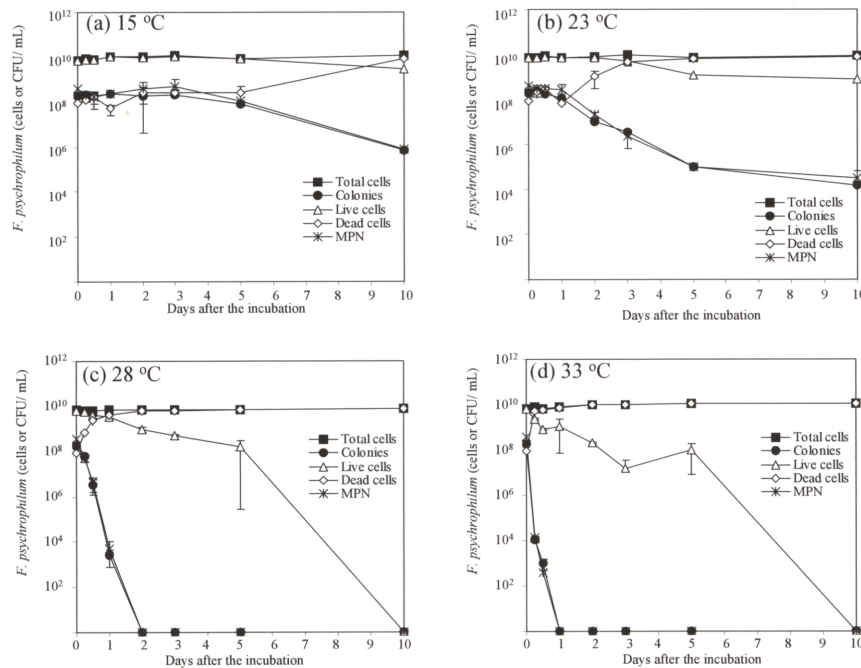


図1 滅菌地下水中で種々の温度で培養した冷水病菌数

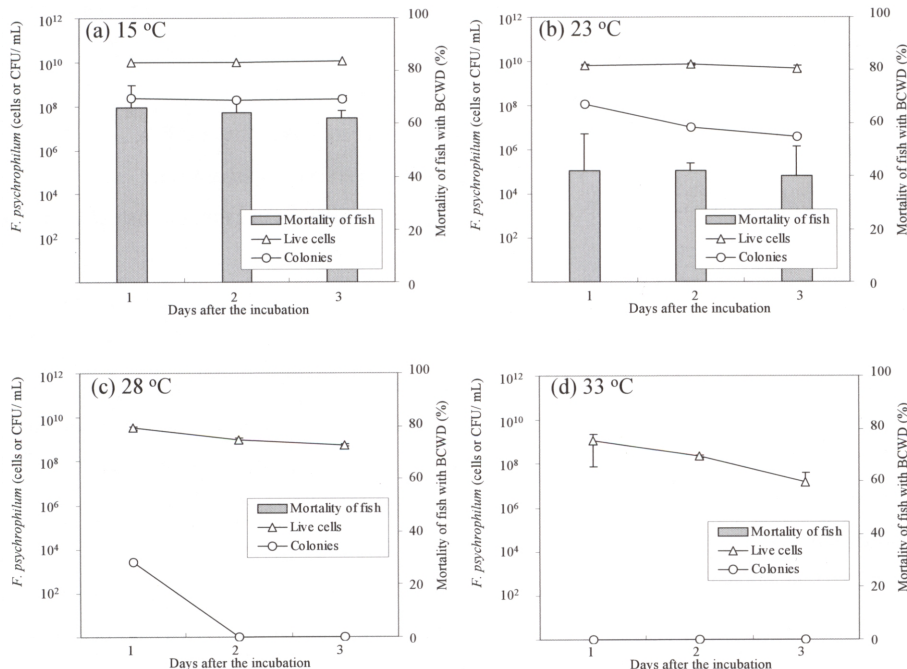


図2 滅菌地下水中で種々の温度で培養した冷水病菌の生菌数およびコロニー数と、その菌をアユに注射した際のアユの死亡率

種 (Vatsos *et al.*, 2002)、動物体内への接種 (Magariños *et al.*, 1994) などにより蘇生する可能性が指摘されている。本研究では、液体培地への接種とアユへの感染実験によって VBNC 冷水病菌が蘇生するかを調べた。滅菌地下水中で保置した冷水病菌の生菌数を、MCY 液体培地を用いた MPN 法で計数したところ、MCY 寒天培地を用いたコロニーカウントとほぼ同様の値を示した (図 1)。コロニーカウントで検出されなかった VBNC 冷水病菌は、MPN 法でも検出されなかった (図 1)。このことから、VBNC 冷水病菌は液体培地へ接種しても増殖状態へ移行しないことが明らかとなった。

次に、滅菌地下水に保置された冷水病菌をアユに接種して病原性の有無を調べたところ、15 °C および 23 °C に保置された冷水病菌は、注射されたアユの多くが冷水病に感染して死亡した (図 2)。しかし、28 °C および 33 °C で保置された冷水病菌を注射されたアユには、冷水病による死亡は認められなかった。このことから、たとえば細胞膜の構造安定性が保たれていたとしても、コロニー形成能を失った VBNC 状態の冷水病菌には、アユへの病原性がないと考えられた。このことは、28 °C の加温処理は、冷水病の治療および再発防止に非常に有効であることを示している。

#### 参考文献

Bernardet J.F., Sergers P., Vancanneyt M., Berthe F., Kersters K. & Vandamme P. (1996) Cutting a Gordian Knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978).

- International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 128-148.
- Bruun M.S., Schmidt A.S., Madsen L. & Dalsgaard I. (2000) Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture* **187**, 201-212.
- Cabello F.C. (2006) Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* **8**, 1137-1144.
- Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A. & Palmer L.M. (1985) Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology* **3**, 817-820.
- Hoben H.J. & Somasegaran P. (1982) Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 1246-1247.
- Madetoja J., Nystedt S. & Wiklund T. (2003) Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 217-223.
- Magariños B., Romalde J.L., Barja J.L. & Toranzo A.E. (1994) Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 180-186.
- Nematollahi A., Decostere A., Pasmans F. & Haesebrouck F. (2003) *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases* **26**, 563-574.
- Porter K.G. & Feig Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* **25**, 943-948.
- Rowe R., Todd R. & Waide J. (1977) Microtechnique for most-probable number analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **33**, 675-680.
- Vatsos I.N., Thompson K.D. & Adams A. (2003) Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Diseases of Aquatic Organisms* **56**, 115-126.