

## 淡水中におけるアユ由来冷水病原菌の生存性

中居 裕, 原 徹

Survival of *Flavobacterium psychrophilum* from Ayu (*Plecoglossus altivelis*) in fresh water

YUTAKA NAKAI AND TORU HARA

アユの冷水病は、1987年に徳島県で発病が確認（若林・沢田，1992）されて以来、現在では全国に蔓延し、アユ養殖業に大きな被害をもたらしている（井上，2000）。本病原菌である *Flavobacterium psychrophilum* は12月の河川水中から遺伝子が検出されたとする報告（網田ら，2000）や、河川水中の培養菌体が36週間生存したとする報告（Vatsos et al., 2003）があることから、河川水中等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。前報（中居，2009）では、淡水（河川水）中で970日までは寒天培地上にコロニーを形成したが、1000日後にはコロニー形成が無かったことを報告した。それ以降の観察から、新たな知見が得られたので報告する。

キーワード：冷水病、河川水、生存性、VBNC

### 材料と方法

#### 1 供試菌株

CS-1株（1995年に体重12.9gのアユ病魚より分離）を用いた。遺伝子型（Izumi et al., 2003）はAR型であった。

#### 2 菌液調製

改変サイトファーガ液体培地（Wakabayashi and Egusa, 1974：以下MCYB）で15°C・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、それと同量の下記の供試水に再懸濁したものを供試菌液とした。供試前の菌数は $1.2 \times 10^7$  CFU/mLであった。

#### 3 供試水

当研究所下呂支所第5井戸用水（飛騨川の伏流水）を高圧蒸気滅菌後、供試した。

#### 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°C下に静置した。なお、その後、約1ヵ月ごとに改変サイトファーガ寒天培地（以下MCYA）に供試水と菌液の混合溶液0.1mLを接種して、15°Cで培養して、コロニー形成後にその数を測

定した。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。

なお、形成されたコロニーは、載せガラス凝集法による自発凝集性試験と遺伝子型の判別（Izumi et al., 2003）を実施した。

### 結 果

結果を図および第1・2表に示した。

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 $10^3$  CFU/mLの菌濃度を維持した。なお、1000日後以降は検出限界以下となった。なお、菌液の一部をスライドガラスに風乾・固定後、メチレンブルーで染色して形態を観察した結果、ほとんどの菌体の形態が球形化していた。

1000日後以降では、1031日後に再びコロニーが形成された。その総数は変動が激しく、1644日後までは概ね2桁で推移したが、1707日後、1934日後は3桁に上昇した。また、それ以降、4169日後まで1桁と2桁が交互に出現した。この状

態は、60 日後から 940 日後までの水準とほぼ同様の状態に戻ったことになる。なお、厳密な観察ではないが、培地に接種してからコロニーが視認できるまでの日数が7日以上かかり、中には 1 か月以上経過してからコロニー形成が認められることもあった。

1031 日後からは、黄色コロニーの他、白色のかかった黄色コロニーが出現した。全体としてその比率は 69%に達したが、経過日数との相関は見られず、観察日によって黄色コロニーが 100%の時(1311 日後、1539 日後、3785 日後、3957 日後)もあれば、逆に白色のかかった黄色コロニーが 90%以

上の時(1707 日後、1934 日後)もあった。なお、1061 日後に分離されたコロニーの遺伝子型を確認した結果、黄色、白色のかかった黄色コロニーのいずれも AR 型(Izumi et al., 2003)であった。

1061 日後と 3785 日後接種で形成された菌体の生理食塩水中における自発凝集性は、1061 日では黄色コロニーが凝集、白色のかかった黄色コロニーは非凝集、3785 日後では黄色コロニーが非凝集(その時は黄色コロニーのみ形成)であった。

第 1 表 淡水に接種後の生菌数の推移 (1000 日後まで)

| 経過日数 | 生菌数 (CFU/mL)      | 経過日数 | 生菌数 (CFU/mL)      | 経過日数 | 生菌数 (CFU/mL)      | 経過日数 | 生菌数 (CFU/mL)      |
|------|-------------------|------|-------------------|------|-------------------|------|-------------------|
| 0    | $1.2 \times 10^6$ | 242  | $9.3 \times 10^2$ | 523  | $8.8 \times 10^2$ | 783  | $1.1 \times 10^2$ |
| 32   | $1.0 \times 10^4$ | 271  | $7.2 \times 10^2$ | 554  | $1.1 \times 10^3$ | 808  | $4.1 \times 10^2$ |
| 60   | $2.0 \times 10^2$ | 314  | $3.6 \times 10^2$ | 593  | $1.5 \times 10^3$ | 877  | $3.2 \times 10^2$ |
| 91   | $1.8 \times 10^3$ | 343  | $6.3 \times 10^2$ | 623  | $4.9 \times 10^2$ | 908  | $4.2 \times 10^2$ |
| 120  | $1.7 \times 10^3$ | 372  | $1.7 \times 10^3$ | 654  | $2.3 \times 10^2$ | 940  | $1.9 \times 10^2$ |
| 151  | $1.3 \times 10^3$ | 411  | $8.3 \times 10^2$ | 683  | $2.2 \times 10^3$ | 970  | $8.0 \times 10^1$ |
| 181  | $1.7 \times 10^3$ | 441  | $2.0 \times 10^3$ | 714  | $1.1 \times 10^3$ | 1000 | 10>               |
| 210  | $8.7 \times 10^2$ | 481  | $1.0 \times 10^3$ | 745  | $3.5 \times 10^3$ |      |                   |

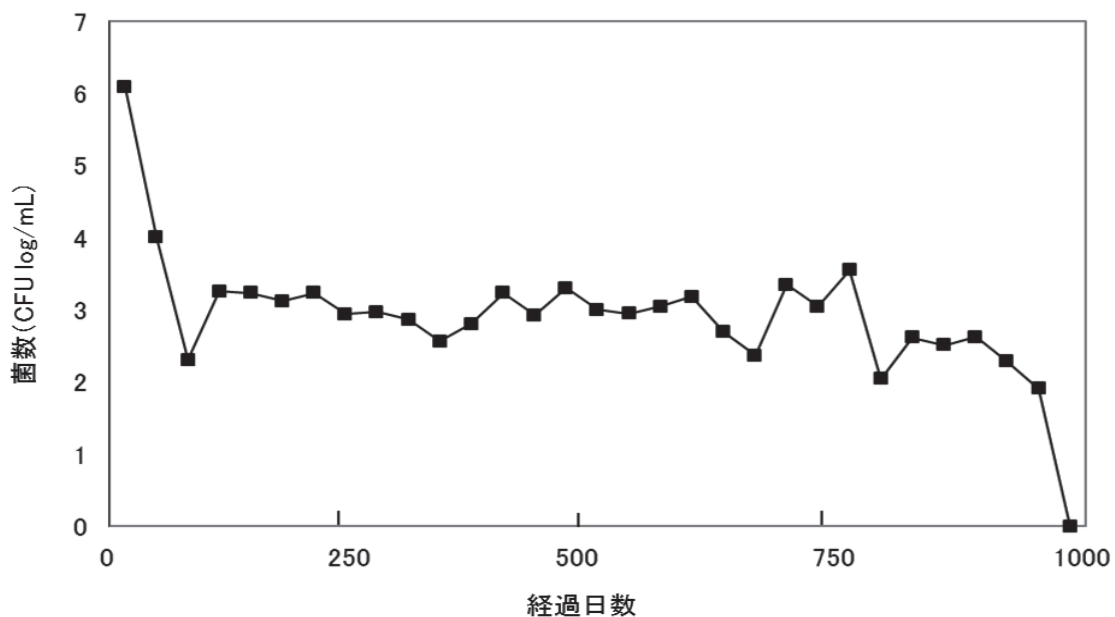


図 淡水に接種後の生菌数の推移 (1000 日後まで)

第2表 淡水に接種後の生菌数の推移(1000日後以降)

| 経過日数 | コロニー数 (0.1mL/plate) |           |              | 自発凝集性 (生理食塩水) |            |
|------|---------------------|-----------|--------------|---------------|------------|
|      | 総数                  | うち黄色コロニー  | うち白色がかりのコロニー | 黄色コロニー        | 白色がかりのコロニー |
| 1000 | 0                   | 0(-)      | 0(-)         | NT            | NT         |
| 1031 | 28                  | 5(17.9)   | 23(82.1)     | NT            | NT         |
| 1061 | 53                  | 21(39.6)  | 32(60.4)     | +             | -          |
| 1091 | 79                  | 33(41.8)  | 46(58.2)     | NT            | NT         |
| 1122 | 51                  | 9(17.6)   | 42(82.4)     | NT            | NT         |
| 1153 | 77                  | 26(33.8)  | 51(66.2)     | NT            | NT         |
| 1185 | 36                  | 13(36.1)  | 23(63.9)     | NT            | NT         |
| 1213 | 23                  | 7(30.4)   | 16(69.6)     | NT            | NT         |
| 1252 | 27                  | 7(25.9)   | 20(74.1)     | NT            | NT         |
| 1311 | 19                  | 19(100)   | 0(0)         | NT            | NT         |
| 1346 | 7                   | 3(42.9)   | 4(57.1)      | NT            | NT         |
| 1441 | 42                  | 11(26.2)  | 31(73.8)     | NT            | NT         |
| 1539 | 40                  | 40(100)   | 0(0)         | NT            | NT         |
| 1644 | 25                  | 4(16.0)   | 21(84.0)     | NT            | NT         |
| 1707 | 127                 | 9(7.1)    | 118(92.9)    | NT            | NT         |
| 1934 | 149                 | 2(1.3)    | 147(98.7)    | NT            | NT         |
| 2159 | 6                   | 5(83.3)   | 1(16.7)      | NT            | NT         |
| 3785 | 33                  | 33(100)   | 0(0)         | -             | NT         |
| 3957 | 6                   | 6(100)    | 0(0)         | NT            | NT         |
| 4169 | 19                  | 8(42.1)   | 11(57.9)     | NT            | NT         |
| 計    | 847                 | 261(30.8) | 586(69.2)    |               |            |

NT：未実施 ( ) 内は黄色コロニーと白色がかりのコロニーとの比率 (%)

## 考 察

淡水への接種 1000 日後以降のコロニー数の急減と、コロニー出現数の変動は、本研究で用いた手法の誤差範囲を大きく逸脱するものと考えられた。その理由として考えられることは以下のとおりである。

1000 日後の菌体の形態が球形化していた。飢餓状態に置かれた *Flavobacterium* 属細菌は球形化(小型化)することが知られている(Kjeiieberg and Hermansson, 2004)。菌液中の栄養状態は、ごくわずかに混入した培地成分の他に栄養は無い(他に、死んで溶菌された菌体成分が栄養となることは考えられる)ため、球形化の原因は飢餓環境にあると考えられる。

細菌が自然環境中、または自然環境を模した実験条件下で、VBNC(viable but nonculturable 生きてはいるが培養できない)細菌細胞になることが知られている(Colwell and

Grimers, 2004)。本研究の実験条件で自然環境を模した項目は飢餓環境であり、その場合、細菌が VBNC に移行する事は多くの研究例がある(Colwell and Grimers, 2004)。また、VBNC 状態となった細菌は、栄養状態の改善によりコロニー形成能が回復することが知られている(Roszak et al., 1984)。1000 日後以降のコロニー出現数の変動は、VBNC 状態となった供試菌が寒天培地に触れることによりコロニー形成能を回復するものの、VBNCの状態が常に変動しているために、コロニー形成能を回復する供試菌の割合も変動しているものと考えられた。1000 日以降では形成までかなりの時間を要したコロニーも珍しくなかったことから、その時間は VBNC 状態の菌体が寒天培地上でコロニー形成能を回復するのに要する時間と考えられた。なお、すべての生残菌が VBNC 状態になったかどうかは不明であるが、1000 日後に一旦コロニー形成が見られなくなった後に、コロニー数の回復が見られていることから、生残菌のうち少なくともかなりの割合

合が VBNC になったと推察される。また、VBNC 状態の細菌は固形培地上ではコロニーを形成することはできないが、代謝活性を保っている状態である (Colwell and Grimers, 2004)。このことは、本研究の実験条件である飢餓環境において、供試菌はその環境下で生存するために、常に適応するように対応していることを示すものと考えられる。本研究で観察されたコロニー色の変化や生理食塩水中での自発凝集性の喪失は、飢餓環境への対応の結果であると考えられる。従って、VBNC 状態となった供試菌の状況は常に変化して、その反映としてコロニー数が変動するものと考えられた。

*F. psychrophilum* の全ゲノム配列は判明しており、バイオフィーム形成に関する遺伝子を有することが明らかとなっている (Duchaud et al., 2007)。バイオフィームを構成する細菌は、バイオフィーム外側の環境水と接することのない内部においては常に飢餓状態であると推測されている (Kjelleberg and Hermansson, 2004)。本研究では、*F. psychrophilum* が飢餓状態で 10 年以上の長期にわたり生存能を有することを明らかにした。このことは、河川環境下で存在すると想定される本菌を含んだバイオフィーム内においても、飢餓状態に耐性があるという特性が本菌の生存性に大きく影響するものと考えられることから、本菌が河川環境中で長期にわたり生存する可能性が大きいと考えられる。

## 要 約

1. 淡水中における冷水病原菌の生存性を継続調査した。
2. 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  $10^3$ CFU/mL の菌濃度を維持した。
3. 1000 日後以降では、1031 日後に再びコロニーが形成されたものの、その総数は変動が激しく、1644 日後までは概ね 2 桁で推移したが、1707 日後、1934 日後は 3 桁に上昇し、それ以降、4169 日後まで 1 桁と 2 桁が交互に出現した。
4. 上記の挙動を示した理由として、供試菌の多くが VBNC 状態に移行したためと推察された。
5. 本研究の結果、冷水病原菌は飢餓状態で 10 年以上の長期にわたり生存することが明らかとなり、河川環境中でも長期にわたり生存する可能性が示された。

## 文 献

- 網田健次郎, 星野正邦, 本間智晴, 若林久嗣. 2000. 河川における *Flavobacterium psychrophilum* の分布調査. 魚病研究, 35: 193-197.
- Colwell, Rita R., and D. Jay Grimers (遠藤圭子訳). 2004. 培養できない微生物たち. 学会出版センター. 東京. 329pp.
- Duchaud, E. M. Boussaha, V. Loux, J. Bernardet, C. Michel, B. Kerouault, S. Mondot, P. Nicolas, R. Bossy, C. Caron, P. Bessieres, J. Gibrat, S. Claverol, F. Dumetz, M. L. He´naf and A. Benmansour. 2007. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Nature Biotech. 25: 763-769.
- 井上 潔. 2000. アユの冷水病, 海洋と生物. 126: 259-262.
- Izumi, S., Futoshi Aranishi and H. Wakabayashi. 2003. Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. Dis. Aquat. Org. 56: 207-214.
- Kjelleberg, S., and M. Hermansson. 1984. Starvation-Induced effects on bacterial surface characteristics. Psychrophilic marine vibrio under long-term nutrient starvation. Appl. Environ. Microbiol. 48: 497-503.
- 中居 裕. 2009. 蒸留水・淡水・人工海水中のアユ由来冷水病原菌の生存性. 岐河環研研報, 54: 15-17.
- Pacha, R. E. 1968 Characteristics of *Cytophaga psychrophila* (Borg) isolated during outbreaks of bacterial cold-water disease. Appl. Environ. Microbiol. 16: 97-101.
- Rozsak, D. B., D. J. Grimes and R. R. Colwell. 1984. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol. 30: 334-338.
- 徳島県水産試験場. 1996. 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.
- Vatsos Ioannis N, D. Thompson, Alexandra Adams. 2003. Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. 1974. Diseases of Aquatic Organisms. 56: 115-126.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa. 1974. Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish disease in Japan. Nippon Suisan Gakkaishi. 40, 751-757.
- 若林久嗣, 沢田健蔵. 1992. アユの冷水病について. 平成 4 年度日本魚病学会春季大会講演要旨.