

情報

5 種のウナギ病原菌の増殖温度

室賀清邦*・佐藤公一*・中井敏博*

(昭和 59 年 4 月 13 日受理)

Growth Temperature of Five Bacterial Pathogens for Eel

Kiyokuni MUROGA, Koh-ichi SATOH, and Toshihiro NAKAI

Fac. Applied Biological Science, Hiroshima University, Fukuyama 720 Japan

(Received April 13, 1984)

Range and optimum of growth temperature for *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio anguillarum*, and *V. vulnificus* were determined by testing 10 or 15 strains of each species with a temperature-gradient shaking incubator. *Aeromonas hydrophila*, *E. tarda* and *V. vulnificus* biogroup 1 grew optimally at temperatures between 30 and 35°C. *Vibrio anguillarum* and *V. vulnificus* biogroup 2 grew optimally at 25-30°C and *P. anguilliseptica* at 22-27°C. The differences in growth temperature among intra-species subgroups separated by serotype, virulence or biotype were also studied.

養殖ウナギの出血性敗血症の原因菌5種、すなわち *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio anguillarum* および *V. vulnificus* (biogroup 2) の増殖に及ぼす温度の影響について調べた。個々の菌種の増殖可能温度域あるいは増殖適温については既に報告されているが(保科, 1962; HOSHINA, 1962; WAKABAYASHI and EGUSA, 1973; 石原・楠田, 1981; 室賀ら, 1977; MUROGA and EGUSA, 1967; 室賀ら, 1976), それらの報告ではいずれも検査された株数が少なく、また実験方法が異なっており、菌種間の温度特性を比較し得るだけの十分な資料が揃っていない。そこで、本研究ではそれぞれの種について病原性あるいは血清型などを考慮して10株ないし15株を選び実験に供し、各菌種の増殖可能および増殖至適温度を明らかにした。

材料および方法

実験に供した菌株の由来および実験時のニホンウナギ (*Anguilla japonica*) に対する致死性の有無 (1 mg/100 g 魚体重, 筋肉内接種, 水温約 20°C) を Table 1 に示した。なお, *V. anguillarum* の場合にはウナギ由来

株が少なかったため、アユやブリ病魚由来株も供試菌株に含めた。また, *V. vulnificus* biogroup 1 はヒトの病原体として知られており、ここではオレゴン州立大学から分与を受けた4株を実験に供した。

実験のための培地としては Difco nutrient broth (NaCl 0.5%, pH 7.0) を用いたが, *V. anguillarum* の場合はその食塩濃度を 1.5% とし, *P. anguilliseptica* の場合は $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ を 0.1% 添加した。L 型試験管に分注した培地に前培養した各菌株を約 10^3 cells/ml となるよう接種し、振盪温度勾配培養機 (東洋, TN-3) を用いて培養し (振盪数 60 回/分), 分光光度計 (波長 530 nm) によりそれぞれの増殖量 (濁度) を経時的に測定した。

結果および考察

Fig. 1 に一定時間培養後のそれぞれの菌種の温度別増殖量をまとめた。菌株による差がかなり大きな菌種もあったが、平均的にみて対数増殖期の中期および終期と思われる培養時間における検査した菌株の平均増殖量を示した。これらの結果から求めた各菌種の増殖至適温度域、および長時間培養から得られた増殖可能温度域を Table 2 に示した。なお、至適温度域の幅は菌種により多少異なったが、便宜上ここでは一様に 5°C 幅とした。

* 広島大学生物生産学部

Table 1. Source and pathogenicity of the strains used.

Species and strain		Type	Host	Year isolated	Pathogenicity for eel ^{a)}
<i>A. hydrophila</i>	ET-2		eel	1971	+
	ET-4				+
	ET-78052			1978	-
	ET-79069				+
	ET-79070			1979	+
	ET-79071				+
	ET-79072				+
	ET-79073				+
	ET-79075				+
ET-80033	1980	+			
<i>E. tarda</i>	NO. 63	virulent	environment (Water or mud)	1981	+
	NO. 156				+
	NO. 235			1982	+
	ET-82015				+
	ET-82016	avirulent	environment (Water or mud)	1981	-
	NO. 64				-
	NO. 70			-	
	NO. 81			-	
	NO. 101			-	
	NO. 233			1982	-
<i>P. anguilliseptica</i>	NCMB 1949	serotype K ⁺	eel	1971	+
	NCMB 1950				-
	ET-7601			1981 (Taiwan)	+
	EO-8104				+
	810314-4K1 ^{b)}	serotype K ⁻	eel	1971	-
	ET-2				-
	S-20			1975	-
	ET-7505				-
	ET-7701				-
Ric 1 ^{c)}	1981 (Scotland)	-			
<i>V. anguillarum</i>	ET-506	serotype J-O-1	eel	1975	+
	ET-78063				+
	ET-79003			1979	+
	PSh-8001	1980	+		
	HT-8105		1981	+	
	ET-208	1974		+	
	PT-493		serotype J-O-2	+	
	PT-77122			ayu	+
	PT-81015	+			
	PT-82018	1982	+		
	ET-78062	serotype J-O-3	eel	1978	+
	ET-79052				+
	ET-79063			1979	+
	PT-213	1974	-		
	HT-78001		1978		-
<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562	biogroup 1 ^{d)}	human	(USA)	-
	CDC B51				-
	79-08-9				-
	LSU 11-3M-30	biogroup 2	eel	1975	+
	ET-519				+
	KV-1 (ATCC 33149) ^{e)}			1976	-
	HM 1-3 ^{e)}				+
	ES-7601 (ATCC 33147)				+
ET-7617 (ATCC 33148)	1977	+			
ET-7717		+			

^{a)} Tested by intramuscular injection with 1 mg/100 g body weight.

^{b)} Presented by Dr. H. Y. CHUNG.

^{c)} Presented by Dr. D. J. STEWART.

^{d)} Presented by Oregon State Univ.

^{e)} Presented by Dr. R. KUSUDA.

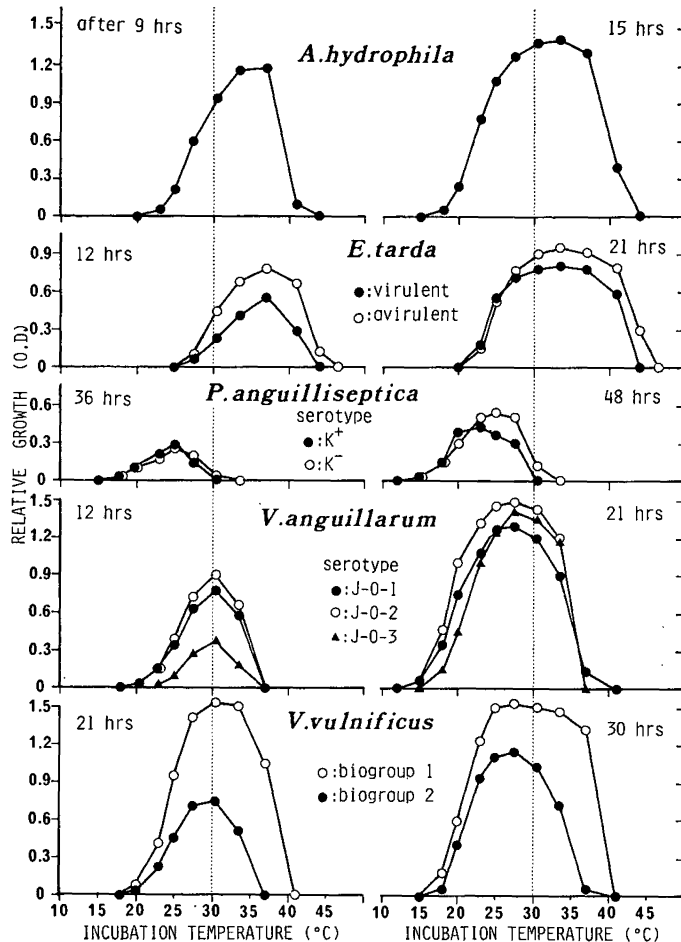


Fig. 1. Temperature growth curve of five pathogens for eel.

Table 2 の結果は、それぞれの菌種で過去に報告された結果と比べて特に大きな差異は認められなかった。ただし、*V. vulnificus* biogroup 2 の増殖適温について、室賀ら (1976) は 30~35°C と報告しているのに対し、本実験の結果では 24~29°C となっている点に違いがみられた。Fig. 1 に示された *V. vulnificus* biogroup 2 の結果をみると、培養時間が長くなるほど、増殖適温が低温側に移動しており、室賀ら (1976) の結果が 6 時間振盪培養の結果に基づいていることを考えると、この違いは主として測定時間の違いによるものであろうと判断される。

次に各菌種内におけるタイプ別の比較をしてみる。*E. tarda* の場合、非病原株の方が病原株より全般的に増殖が速く、また非病原株の増殖可能温度域は病原株のそ

れに比べ、より高温域にまで広がっている。皆川ら (1983) は、ウナギ養殖池における *E. tarda* の動態について調査し、夏期に病原株の出現率がやや低くなることを報告しているが、これは Fig. 1 に示した結果からみて、高温時の非病原株の増殖が病原株のそれを上回るためではないかと考えられる。

P. anguilliseptica については K 抗原の存在に基づき 2 つのグループに分けたが、K⁻ 型の増殖適温および増殖可能温度域は K⁺ 型のそれらに比べやや高かった。

V. anguillarum については J-O-1~J-O-3 の 3 つの血清型に分けて比較してみたが、血清型による差は特に認められなかった。

V. vulnificus biogroup 1 は biogroup 2 に比べ増殖速度が速く、また、より高い温度域に増殖適温があった。

Table 2. Range and optimum of growth temperature for five pathogens in shake culture.^{a)}

Species	Type	Growth temperature range (°C)	Incubation period	Optimum growth temperature (°C)	Incubation period to attain the stationary phase
<i>A. hydrophila</i>		6.5-41	72 hrs	30-35	15 hrs
<i>E. tarda</i>	virulent	15-41	78 hrs	30-35	21 hrs
	avirulent	15-44	78 hrs	31-36	21 hrs
<i>P. anguilliseptica</i> ^{b)}	serotype K ⁺	6.5-27.5 ^{d)}	264 hrs	20-25	48 hrs
	serotype K ⁻	6.5-30.5	264 hrs	23-28	48 hrs
<i>V. anguillarum</i> ^{e)}	serotype J-O-1	6.5-33.5 ^{e)}	84 hrs	24-29	21 hrs
	serotype J-O-2			25-30	21 hrs
	serotype J-O-3			26-31	21 hrs
<i>V. vulnificus</i>	biogroup 1	15-37	84 hrs	29-34	21 hrs
	biogroup 2	18-37 ^{f)}	84 hrs	24-29	30 hrs

a) Difco nutrient broth (NaCl 0.5%, pH 7.0).

b) MgCl₂·6H₂O was added to the medium (0.1%).

c) NaCl was added to the medium (1.5%).

d) Two strains grew at 30.5°C.

e) Four strains grew at 37°C.

f) Two strains did not grow at 37°C.

Fig. 1 に見られるように、37°C で 21 時間あるいは 30 時間培養した時、biogroup 1 は十分増殖していたのに対し biogroup 2 はほとんど増殖せず、この温度における両者の発育には大きな差がみられた。

最後に、菌種間の比較を行うと、Fig. 1 および Table 2 に示した実験結果から、調べた 5 種の細菌は、増殖至適温度が 30~35°C にある *A. hydrophila*, *E. tarda* および *V. vulnificus* biogroup 1, 至適温度が 25~30°C にある *V. anguillarum* および *V. vulnificus* biogroup 2, そして至適温度が 22~27°C にある *P. anguilliseptica* の 3 グループに分けることができよう。

最後に、菌株を分与して下さった米国オレゴン州立大学の Dr. R. J. SEIDLER, 英国ヘリオット・ワット大学の Dr. D. J. STEWART, 台湾大学の Dr. H. Y. CHUNG (鍾虎雲), 高知大学の楠田理一教授 および 徳島県水産試験場の城 泰彦博士に感謝致します。

文 献

保科利一 (1962): ウナギの鱧赤病に関する研究. 東京水産大学特別研究報告, 6(1), 1-104.

HOSHINA, T. (1962): On a new bacterium, *Paracolobacterium anguillimortiferum* n. sp. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 28, 162-164.

石原秀平・楠田理一 (1981): 種々の環境水中における *Edwardsiella tarda* の発育性および生存性. 日水誌, 48, 483-488.

皆川武夫・中井敏博・室賀清邦 (1983): 養鰻環境中における *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, 17, 243-250.

MUROGA, K. and S. EGUSA (1967): *Vibrio anguillarum* from an endemic disease of ayu in Lake Hamana. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 33, 636-640.

室賀清邦・西淵光昭・城 泰彦 (1976): 養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio*-II. 生理学的性状および病原性. 魚病研究, 11, 147-151.

室賀清邦・中井敏博・沢田達男 (1977): 養殖ウナギの赤点病に関する研究—IV. 原因菌 *Pseudomonas anguilliseptica* の生理学的性状. 魚病研究, 12, 33-38.

WAKABAYASHI, H. and S. EGUSA (1973): *Edwardsiella tarda* (*Paracolobacterium anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 39, 931-936.