

ウナギ病原菌エドワジエラの増殖を抑制する拮抗細菌

野口浩介^{*1}・岩田一夫^{*2}・前田昌調^{*1}

The antagonistic bacterium that represses the growth of eel pathogens, *Edwardsiella tarda*

Kohsuke NOGUCHI^{*1}, Kazuo IWATA^{*2}, Masachika MAEDA^{*1}

Abstract: *Edwardsiella tarda* shows the serious pathogenicity to many fishes. In particular eel aquaculture industry suffers a big damage with this pathogen. To repress its growth several drugs are using, but there are little effective to prevent this disease, because antibiotics resistance microbes are appeared. And vaccine under development is not yet in practical use. Therefore in this study antagonistic bacterium that represses pathogenic microbes in the process of microbial interactions was used for prevention of eel diseases. As a result, *E. tarda* infection to eel was restrained using bacteria EKZ-2 which was isolated in the coastal environment of Miyazaki City. Also, in eel aquaculture *in situ*, a difference was observed with the number of death in case of the bacterial dosage, which the survival number of the eel was much higher using EKZ-2 than that without EKZ-2. This results suggest that eel could be protected from the *E. tarda* infection by addition of antagonistic bacteria *in situ*.

Keywords: aquaculture, *Edwardsiella tarda*, antagonism, bacteria, eel

*Edwardsiella tarda*は多くの魚類に病原性をもち、特にウナギ、ヒラメ等の重要養殖魚種に大きな被害を及ぼす。また、人魚共通病原菌の疑いももたれている(BOCKEMUHL *et al.*, 1971)。この疾病では、薬剤効果の低い場合が多く、また抗生物質耐性菌の出現等も危惧されている。

このような薬剤効果の低い状況において、薬剤に依存しない養殖方法として、有用微生物を使用して病害微生物を防除する生物防除方法(バイオコントロール)が期待されている(前田, 2005)。

本研究では、*E. tarda*の増殖抑制作用を保持する拮抗細菌を探索し、この培養菌体をウナギ(*Anguilla japonica*)へ経口投与することにより、*E. tarda*感染症の発症が抑止可能であるかを検討した。

大型海藻クロメ(*Ecklonia kurome*)の遊走子から分離した細菌株EKZ-2株はグラム陰性で、運動性(+), チトクロームオキシダーゼ試験(+), ブドウ糖無発酵等の性状を示したため、OKUZUMI *et al.* (1981)の分類スキームにおいて *Pseudomonas* III/IVに属すると考えられた(Table 1)。また、塩分存在下における細菌株の増殖をZoBell2216E培地(ZoBELL, 1943)で3日間培養(温度22°C)して行ったところ、低塩分濃度(2.5g/L NaCl)でも増殖した(Fig. 1)。

次にEKZ-2株の、*E. tarda*に対する増殖抑制活性を検定した。方法としては、ZoBell2216E培地に供試菌と病原菌とを隣接して同時に画線接種し、病原菌の増殖が、病原菌単独接種対照区と比較し、遅滞するか否かによって判定した(前田, 2005)。この結果、EKZ-2株は抗*E. tarda*活性

^{*1} 宮崎大学農学部水産増殖学講座, 889-2192 宮崎市学園木花台1-1

Department of Environmental Sciences, University of Miyazaki, Gakuen-kibanadai, Miyazaki 889-2192, Japan

^{*2} 宮崎県水産試験場, 889-2162, 宮崎市青島6-16-3 Miyazaki Prefectural Fisheries Experiment Station, 6-16-3 Aoshima, Miyazaki 889-2162, Japan Corresponding author.

E-mail: gemaeda@cc.miyazaki-u.ac.jp
Tel: 0985-58-7221 Fax: 0985-58-7221

Table 1. *Edwardsiella*-static activity of the strain EKZ-2 and its tentative identification

Bacterial strain	<i>Edwardsiella</i> -static activity	Gram-stain	Motility	Cytochrome oxidase test	O-F test	Tentative identification
EKZ-2	+	-	+	+	-	Genus <i>Pseudomonas</i>

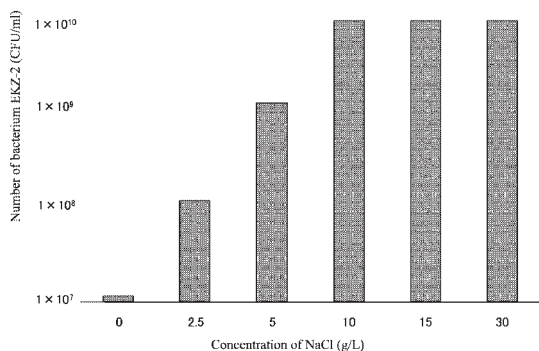


Fig. 1. Growth of the EKZ-2 strain in different NaCl concentrations for 3 days at 20°C through the method of plate count.

を保持していることが判明した (Fig. 2).

*E. tarda*感染防除実験は有用細菌(EKZ-2)投与実験区と無投与区を設定して行った. 各区ともウナギ15尾ずつを供試し, 有用細菌投与区ではEKZ-2株培養液を50ml/kgの割合で配合飼料に

混合し, ウナギ(約30g/尾)に体重の3%相当の餌量として投与した. 無投与区では細菌無添加の配合飼料を投与した. 各区ともにウナギを2週間30°Cで給餌飼育した. その後, 病原菌*E. tarda*を 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/mlの濃度に希釈した後, ウナギ腹腔内に0.5mlの量で注射し, ウナギ斃死数を実験区と対照区とで比較した (Table 2). この結果, *E. tarda*の濃度を 10^4 CFU/mlに調整した場合, EKZ-2投与区では全尾が生存し, 細菌無投与区では15日間で11尾が斃死した (Fig. 3). この結果は, 拮抗細菌投与により, エドワジエラ症感染が防除されることを示唆している. さらに, 細菌投与区においては, 餌食い等の活動の低下が見られなかったことから, EKZ-2株のウナギへの悪影響はないか, あるいは少ないものと判断した.

続いて, 養鰻池におけるEKZ-2株投与実験を行った. 実験に使用した養鰻池ではハウス加温式養殖を行っており, 水温は約30°C, 1池(150 m³)当たり約2万尾のウナギを飼育している. 3日

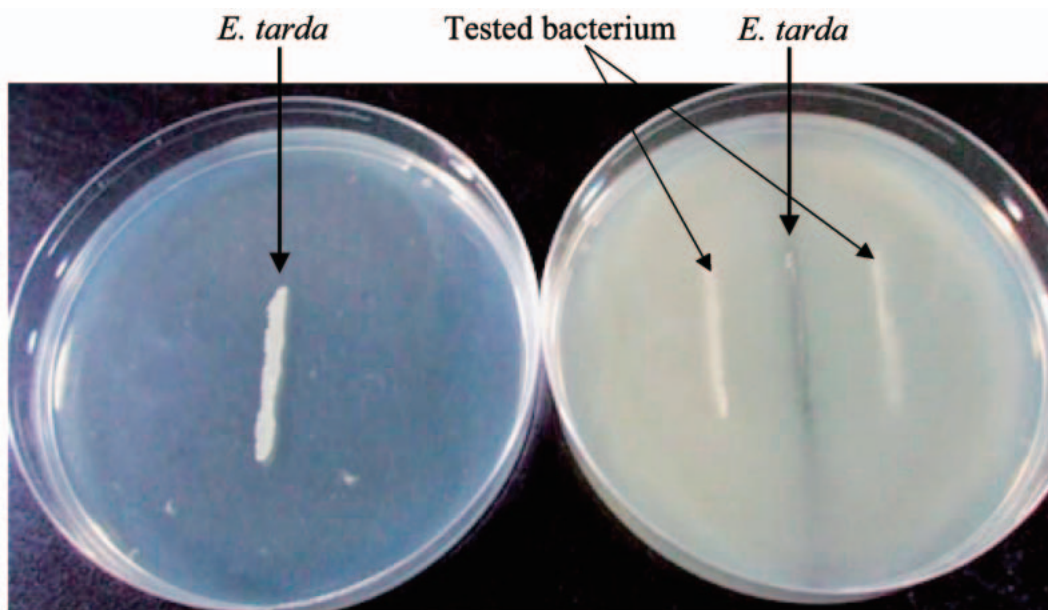


Fig. 2. Determination of *E. tarda*-static activity by the tested bacterium. Two smears of the tested bacterium and *E. tarda* are inoculated concomitantly in the same agar plate, in which *E. tarda* is placed between the two smears (right). Also *E. tarda* is inoculated alone on the agar plate as a reference (left).

Table 2. Survival number of eel after injection of the different concentration of *E.tarda*

Concentration of <i>E. tarda</i> (CFU/ml)	Survival number of eel	
	With the Strain EKZ-2	Without the Strain EKZ-2
10 ⁶	0	0
10 ⁵	6	4
10 ⁴	15	4

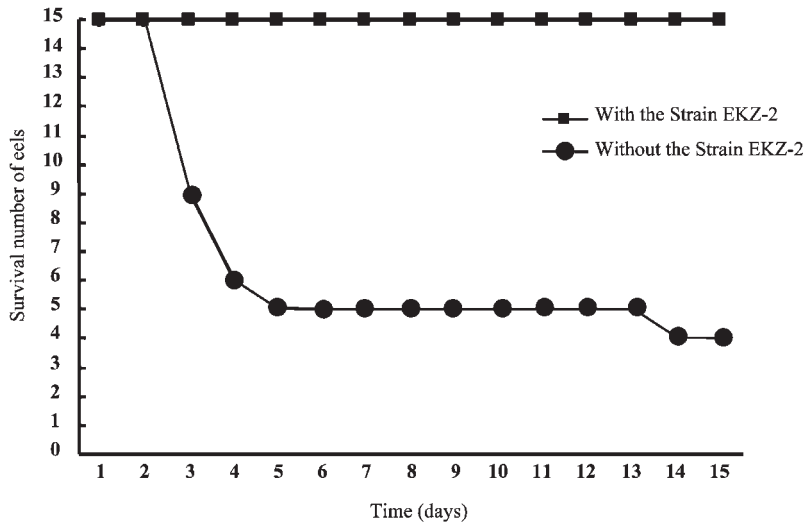


Fig. 3. Cumulative mortality of eel with and without oral administration of the *E. tarda*-antagonistic bacterium.

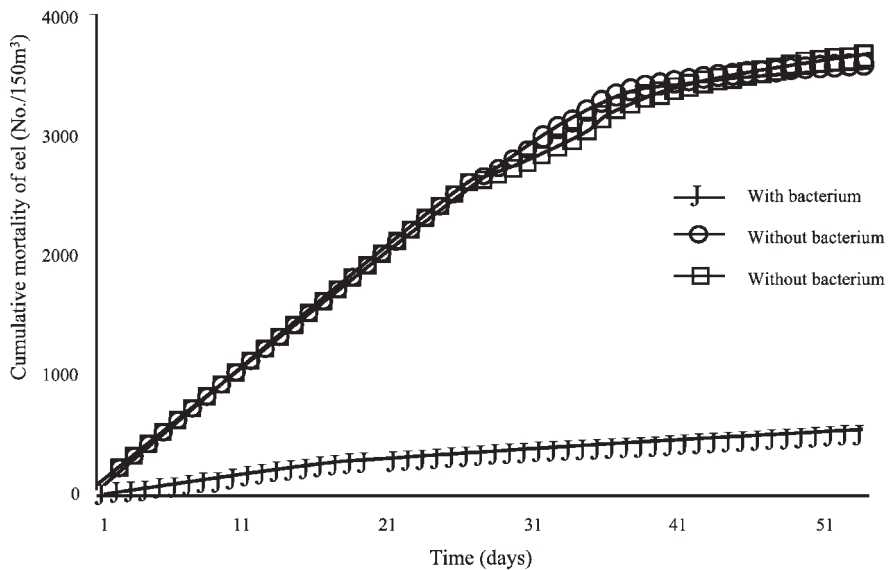


Fig. 4. Cumulative mortality of eel in pond trial after administration of *E. tarda*-antagonistic bacterium.

間培養したEKZ-2株(菌数約 10^8 CFU/ml)を50ml/kgの濃度で混合した配合飼料を約2ヶ月間ウナギへ投与し、生残尾数を対照生産区(菌無投与区)と比較した。この結果、EKZ-2株投与区では、細菌投与後53日間において約500尾の死亡が見られたのに対して、細菌無投与区では約3500尾が死亡した(Fig. 4)。

以上のように、ウナギ養殖において、細菌投与区と無投与区における死亡数では有意な差が見られたが、この結果は、ウナギ養殖池水への拮抗細菌の添加により*E. tarda*感染の防除されることを示唆している。

なお、*E. tarda*への増殖阻害作用を保持する拮抗細菌は少なく、DOPAZO *et al.*(1988)の研究でも、*E. tarda*抑制効果を保持する細菌はみられなかったと報告している。また水産養殖における生物防除剤の研究総説(MAEDA, 2004)においても、*E. tarda*に対する拮抗細菌の報告例はみられない。

謝辞

クロレラ工業、丸山功博士にはEKZ-2株大量培養のご協力をいただき、ここに深謝申し上げます。また、佐土原養鰻組合児玉正組合長からはウ

ナギ養殖施設の提供及び有益な助言をいただいた。

文献

- BOCKEMUHL, J., R. PAN-URAI and F. BURKHARDT (1971): *Edwardsiella tarda* associated with human disease. *Pathog. Microbiol.*, **37**, 393-401.
- DOPAZO, C. P., M. L. LEMOS, C. LODEIROS, J. BOLINCHES, J. L. BARJA and A. E. TORANZO (1988): Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 97-101.
- 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**, 1591-1598.
- ZOBELL, C. E. (1943): The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol.*, **46**, 39-56.

2006年12月13日受付

2007年2月1日受理