腸炎ビブリオに寄生溶菌性 *Bdellovibrio* の生理生態に関する研究

堀 江 進・小 林 哲 夫

(1981 年 4 月 15 日受理)

Biological and Ecological Studies on *Bdellovibrio*,
Parasitic and Lytic to *Vibrio parahaemolyticus*

Susumu HORIE* and Tetsuo KOBAYASHI*

A host sea water(HS) agar plate method for the isolation and enumeration of marine *Bdellovibrio*, parasitic and lytic to *Vibrio parahaemolyticus*, was developed in this work. A few *Bdellovibrio* strains were isolated from coastal sea water and the physiological properties of the isolates were investigated. In the growth curve of the *Bdellovibrio* isolates logarithmic multiplication phase, similar to that of common bacteria, was observed. The raw sea water samples were inoculated with about 10^7 /ml cells of *V. parahaemolyticus* (Biotype 1) and the related organisms (Biotype 2 and 3), respectively, and incubated at 25°C. After 2~4 days of incubation, population of these bacteria decreased approximately to 10^4 /ml, whereas temporal multiplication of the *Bdellovibrio* was observed. Using HS agar plate prepared with the Biotype 1, 2 or 3, respectively, 26 *Bdellovibrio* strains were isolated from coastal waters. These isolates showed highest lytic activity to *Vibrio* and *Pseudomonas* organisms among the marine bacterial flora. Lytic action of the isolates to the various terrestrial bacteria varied with the *Bdellovibrio* strains. The occurrence of some *Bdellovibrio* resistant strains was observed among the Kanagawa phenomenon negative *V. parahaemolyticus*.

Pseudomonas などのグラム陰性細菌に寄生し、これを溶菌する細菌が STOLP ら^{1,2)}によって発見されて以来、自然界における *Bdellovibrio* の生態などに関しいくつかの報告³⁻⁵⁾がみられる。とくに最近、宮本ら^{6,7)}はわが国における魚介類食中毒の最も重要な原因菌である腸炎ビブリオに寄生溶菌性を有する好塩性 *Bdellovibrio* が沿岸海水に分布することを明かにした。宮本らの分離菌株は腸炎ビブリオだけでなく近縁の *Vibrio* 属細菌にも寄生溶菌性を有するが *Staphylococcus aureus* や *Escherichia coli* などには寄生しないといわれる。また宮本らの大阪湾の調査によれば、*Bdellovibrio* は冬期には少いが、夏期には 10^3 /ml 前後の分布がみられた。これらの知見から海水フローラを形成する好塩細菌の生態において *Bdellovibrio* の存在はかなり重要な関連を有することが示唆された。

著者は沿岸海水を試料として海洋 *Bdellovibrio* の生理生態、とくに腸炎ビブリオとその類似細菌の生態に関連して種々検討し、若干の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

供試菌株 *Bdellovibrio* の分離および菌数測定のため、一般に宿主細菌として *Vibrio parahaemolyticus* Vp (一)

1 (以下Vp1とする)を用いた。また場合により *Vibrio alginolyticus* V13, *Vibrio* sp. (Biotype 3) V₃1 も用いた。*Vibrio* sp. (Biotype 3) は、堀江ら⁸⁾がかつて腸炎ビブリオの Biotype 3 として分類した腸炎ビブリオ類似菌である。また宿主域の検討のためつぎに記載する種々の菌株を用いた。*Proteus morganii* 甲野株は東京大学医科学研究所から、*Aeromonas* sp. AK 2 は千葉大学生物活性研究所から、魚病細菌の *Vibrio anguillarum* Va 1, *Edwardsiella tarda* E 16, *Aeromonas hydrophila* Y 62, *A. salmonicida* G 7272 は本学水族病理学研究室から、*V. anguillarum* Va 2 は神奈川県淡水増殖試験場から、*V. anguillarum* Va 3 は山梨県魚苗センターからそれぞれ分与された。その他の菌株は本研究室保存菌株あるいは著者らが分離したものである。

培地 宿主細菌ならびに *Bdellovibrio* の培養に用いた培地などはつぎの通りである。

希釈水: 海水をろ過し、121°C, 15 分間滅菌して用いた。

人工海水: 日高⁹⁾の報告による塩分組成に準じ、NaCl 30 g, KCl 0.7 g, MgCl₂·6H₂O 10.8 g, MgSO₄·7H₂O 5.4 g, CaCl₂·2H₂O 1.0 g, 井戸水 1,000 ml, pH 8.0 の組成を用いた。

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan-4, Minato, Tokyo 108).

このほか堀江ら¹⁰⁾の記載した改変 LYMAN and FLEMING 人工海水も用いた。

3% 食塩ブロス: ポリペプトン (大五栄養化学) 10 g, 肉エキス (ミクニ) 5 g, NaCl 30 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0。

普通寒天培地: ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0 を基本組成とし、場合により食塩を加えた。

アラビノース寒天培地: アラビノース 5 g, ポリペプトン 1 g, 酵母エキス (Difco) 1 g, NaCl 30 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, ブロムチモールブルー 0.04 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0。

PS 寒天培地 (Peptone-salt agar): 宮本ら⁹⁾の記載によった。

MTCBS 培地 (Modified TCBS medium): 佐伯ら¹¹⁾の記載によった。

75% 海水寒天培地: 申ら¹²⁾の記載によった。

HS (Host sea water medium): 宮本ら⁹⁾の記載によった。

HS 二層寒天平板: 宮本ら⁹⁾の記載によった。

HS 寒天平板: 上記 HS 二層寒天平板とは異り、下層寒天を流さず、直接試料をペトリ皿に注入し、宿主生菌混和寒天約 10 ml を注加し、混合しながら均等にひろげて平板とした。

宿主寒天平板: HS 寒天の場合に準じて宿主生菌混和寒天をつくり、この 10 ml をペトリ皿に流し平板としたものである。

宿主細菌の培養 一般に、HS および HS 寒天平板の宿主細菌として用いた Vp 1, VI 3, V₈ 1 は PS 寒天培地を用い 35°C で 24 時間培養した。また宿主寒天平板による溶菌試験においては、上記 3 株は 3% 食塩普通寒天培地を用いで 35°C 培養し、海水細菌分離菌株では 75% 海水寒天培地を用い、25°C で 24 時間培養した。その他の供試菌株については Table 3 に示した条件で何れも 24 時間培養した。

菌数測定 *Bdellovibrio* 生菌数 (plaque forming unit, 以下 PFU と略す) は上記 HS 寒天平板を用い、海水試料の PFU 測定の場合には 25°C で培養し、HS に純培養した *Bdellovibrio* の場合には 30°C で 4 日間培養し、ブラック数を算定した。*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Vibrio* sp. (Biotype 3) の生菌数測定には、場合に応じて 3% 食塩普通寒天培地、アラビノース寒天培地、あるいは MTCBS 培地を用い、表面塗抹法により、37°C で 24 時間培養した。海水の全生菌数測定には 75% 海水寒天平板を用い 25°C で培養した。

宿主寒天平板による溶菌試験 種々の細菌に対する *Bdellovibrio* 菌株の溶菌性を試験する場合には、それぞ

れの細菌を宿主とした宿主寒天平板をつくり、この平板を 10 位に分画し、これに試験 *Bdellovibrio* の HS 培養液の 1 白金耳を穿刺し、かつ画線し、30°C で 4 日間培養後に溶菌の有無を観察した。

海水分離菌株の同定 海水から分離した種々の細菌株の同定は堀江ら¹⁰⁾の報告によった。

結 果

腸炎ビブリオ溶菌性 *Bdellovibrio* 属細菌の分離 Table 1 に示したように、神奈川県三浦半島沿岸および本大学付近の海水から *Bdellovibrio* 5 株を分離した。分離方法は Fig. 1 によった。

Table 1. *Bdellovibrio* strains, P 1-5, isolated from sea water

Strain No.	Date of sampling	Sampling station	Sea water temp. (°C)
P 1	July 7, '78	Morito	25.0
P 2	July 7, '78	Kannonzaki	25.2
P 3	Sept. 11, '79	Morito	25.0
P 5	Dec. 29, '79	Harbour in T.U.F. ^{a)}	17.6
P 5	Aug. 17, '80	Kuruwa	23.5

a) T. U. F.: Tokyo University of Fisheries.

Fig. 1. Isolation procedure of *Bdellovibrio* by using HS agar.

HS 二層寒天平板と HS 寒天平板とのブラック形成能の比較 *Bdellovibrio* P 1 の HS 保存菌液 0.1 ml を試験管の HS 10 ml に接種し、30°C で 24 時間培養した（以下、これを P 1 培養液という）。この培養液を段階希釈し、HS 二層寒天平板および HS 寒天平板とにそれぞれ接種し、30°C で培養し、経日的にブラックの形成を比較したところ、HS 二層寒天平板に比べ、HS 寒天平板ではブラックの出現が早く、鮮明でその数も大であった。この結果により、本研究では PFU の測定に HS 寒天平板を採用した。

HS における *Bdellovibrio* 増殖におよぼす温度の影響 P 1, P 3, P 4 の培養液をそれぞれ HS に接種し、均一に混合し、これを滅菌試験管に 10 ml ずつ無菌的に分注し、その 5 本ずつを各温度で培養し、経日的に 1 本ずつを取り出し PFU を測定し、その結果を Fig. 2-1~3 に示した。P 1 の場合には 1 日培養後を比較すると 30°C の菌数が最高で、25°C および 35°C がそれについた。しかし、2 日培養後には 30°C の菌数は既に減少し、20°C の菌数が最高となり、25°C がこれについた。15°C では緩慢な増殖を示したが、40°C では死滅した。P 3 では 1 日培養後の菌数は 25~35°C がほぼ同じで最高値を示し、その後急速に減少した。2 日培養後には 20°C が最高の菌数を示し、また 3 日後には 15°C が最高値を示した。本菌は 10°C でもある程度増殖した。P 4 の場合には、接種菌量の小さい関係とも考えられるが、最高菌数に達するに要する時間が長くなっており、30°C で 2 日、20°C で 3 日、25°C では 5 日であった。また 10 日

Fig. 2-1. Effect of temperature on the growth of P 1.

Fig. 2-2. Effect of temperature on the growth of P 3.

Fig. 2-3. Effect of temperature on the growth of P 4.

後には 10°C でかなり高い菌数に達した。なお 35°C では全く増殖がみられなかった。

HS における *Bdellovibrio* の増殖と海水濃度の関係 自然海水を蒸留水で希釈し、100%, 75%, 50%, 25%, 10% 海水液をつくり、それぞれを用いた HS 100 ml 中

に P1 培養液 1 ml ずつを接種し、30°C で培養し、経日的に菌数を測定した結果を Fig. 3 に示した。1~2 日培養後の結果をみると、50 から 100% 海水の場合にはほぼ同じ菌数であったのに対し、25% 海水ではかなり増殖が抑制された。また 10% 海水の場合には死滅していった。

Fig. 3. Effect of sea water content on the growth of *Bdellovibrio* (P1) in HS.

Fig. 4. Effect of NaCl concentration on the growth of *Bdellovibrio* (P1) in HS prepared with an artificial sea water.

***Bdellovibrio* の増殖におよぼす食塩濃度の影響** 人工海水の組成の中で食塩濃度を 0 から 7% の範囲において変え、HS 中における P1 の増殖を比較した。すなわち 7 種類の HS 各 100 ml 中に P1 培養液 1 ml を接種し、これらを 30°C で培養し、その結果を Fig. 4 に示した。1~4% ではほとんど差異がなく、1 日でほぼ最高菌数に達した。これに対し、5% での増殖は 1 日培養後にかなり遅れていたが、2 日後にはかなり追いついた。食塩 0% と 7% では死滅の経過をたどった。

HS における *Bdellovibrio* の増殖曲線と宿主細菌の死滅曲線 P2 および P3 培養液の 10 倍希釈液 1 ml をそれぞれ HS 100 ml に接種し、混合し、これらを無菌的に試験管に 10 ml ずつ分注し、30°C で培養し、4 時間ごとに試験管 1 本ずつをとり出し、PFU および宿主生菌数を測定し、その結果を Fig. 5 に示した。P2 と P3 のいずれにおいても菌数の対数的増加は培養 4 時間から 16 時間の間におこり、16 時間から 24 時間にかけて最高値を保った。一方、宿主生菌数は 16 時間から 24 時間にかけて激減した。

HS における宿主生菌数と *Bdellovibrio* の増殖 P5 の培養液の 10^4 倍希釈液 1 ml を、宿主生菌数を異にした各 HS 100 ml に接種し、それぞれを無菌的に試験管に 10 ml ずつ分注し、30°C で静置培養し、また一方、L 字管に 6 ml ずつ分注し、30°C で振盪培養し、経日的に P5 および宿主生菌数を測定し、静置培養の結果を Fig. 6 に、振盪培養の結果を Fig. 7 に示した。静置培養においては、1~2 日培養後の P5 の菌数をみると宿

Fig. 5. Lethal effect of *Bdellovibrio* on *V. parahaemolyticus* in autoclaved sea water.

Fig. 6. Effect of density of host cells on the growth curve of *Bdellovibrio* (P5) in static culture.

■—■ *Bdellovibrio*, ●—● *V. parahaemolyticus*, ○- - -○ *V. parahaemolyticus* (Control)

主菌数 10^6 /ml の HS で最も高く、 10^7 /ml がこれに付いた。これに対し、宿主菌数 10^6 /ml の HS における P 5 の増殖は著しく遅れていたが、3 日後には 10^8 /ml の HS と同程度に達した。P 5 の増殖最高菌数は概して宿主菌数と類似していたが、宿主菌数 10^6 /ml の HS ではやや低い数値にとどまった。また宿主の死滅状態を比較すると、 10^7 /ml の HS において死滅が最も顕著で、その他の HS での死滅率は比較的小さかった。とくに 10^6 /ml では2日培養後での菌数の減少はほとんどみられなかった。一方、振盪培養においては静置の場合と異なり、 10^6 /ml において P 5 の増殖が著しく速かであるのに対し、 10^6 /ml 以下の場合には静置培養に比べ、むしろ増殖が

遅くなる傾向を示した。また宿主細菌の死滅も 10^6 /ml で最も大きく、 10^7 /ml、 10^8 /ml がこれに付いた。

HS における *Bdellovibrio* の増殖とその接種菌量の関係 P 5 の培養液の10倍段階希釈液各1 ml を HS 100 ml に接種し、これをそれぞれ試験管に10 ml/ずつ分注し、 30°C で培養を行ない、経目的に P 5 の菌数を測定し、その結果を Fig. 8 に示した。1日培養後の P 5 の菌数はそれぞれの接種菌量に応じた差がみられたが、2日後には接種菌量による差異はほとんどなくなり、ほぼ最高菌数に達した。すなわち、HS の接種菌量 10^6 /ml のような小さい場合であっても2日培養後には 10^7 /ml 以上に達することがわかった。

Fig. 7. Effect of density of host cells on the growth curve of *Bdellovibrio* (P5) in shaking culture.

■—■ *Bdellovibrio*, ●—● *V. parahaemolyticus*, ○---○ *V. parahaemolyticus* (Control)

メンブランフィルターによる海水中の *Bdellovibrio* の選択 9月26日に、三浦半島沿岸の逗子市付近の3ヶ所で海水を採取し、これらの海水試料を3種の孔径(1.2 μ m, 0.8 μ m, 0.45 μ m)のメンブランフィルターでろ過し、それぞれのろ液中のPFUと全生菌数を測定し、ろ過による一般細菌フローラと*Bdellovibrio*の選別の状況を観察し、その結果をTable 2に示した。海水の一般生菌数は 10^5 /ml前後であるのに対し、PFUは 10^4 /ml程度にすぎないが、0.45 μ mでろ過するとそのろ液において両者の数値がきわめて接近することがわかった。すなわち海水フローラから*Bdellovibrio*を選択分離する一つの補助的手段として、0.45 μ mのろ過は有効とみられ

る。

自然海水に加えられた腸炎ビブリオおよび類似菌の死滅状態 6月18日に葉山町森戸で海水試料を採取し、これを滅菌綿栓三角フラスコ4本に100 mlずつ分注し、その中3本にそれぞれVp 1, VI 3, V₈ 1の濃厚菌液(約 10^8 /ml) 10 mlをそれぞれ接種し、残りの1本を対照試験用とした。これをそれぞれ試験管に10 mlずつ分注し、25°Cに放置し、経日的に接種菌の生菌数ならびにPFUを測定した。PFU測定のためのHS寒天平板に用いた宿主細菌は、海水試料に接種したものと同一の菌株を用いた。接種菌のVp 1その他の菌数測定にはMTCBS培地を用い、培養温度を37°Cとした。本培地

Fig. 8. Effect of inoculum size of *Bdellovibrio* cells on the growth curve in HS.

Fig. 9-2. Lethal effect of raw sea water on *V. alginolyticus* (V1 3).

Fig. 9-1. Lethal effect of raw sea water on *V. parahaemolyticus* (Vp 1).

Fig. 9-3. Lethal effect of raw sea water on *Vibrio* sp. (Biotype 3, V₃ 1).

で帯黄緑色の集落を Vp 1, 黄色集落を V1 3, 緑色の集落を V₃ 1 とした。対照の海水については全生菌数と PFU を測定した。実験結果を Fig. 9-1~3 に示した。3 菌株ともに $10^7/\text{ml}$ 程度の接種菌量であるが、1 日後の菌数を比較すると Vp 1 と V1 3 ではほとんど変化していないのに対し、V₃ 1 では顕著な死滅がみられた。しかしその後は Vp 1 も V1 3 も急速に減少し、2 日から 8 日

にかけては 3 菌株とも $10^4/\text{ml}$ 前後の菌数で顕著な差異はみられなかった。一方、PFU の消長をみると、1 日および 2 日後に Vp 1 接種海水において PFU の上昇が最も大きく、V₃ 1 がこれに次いだ。4 日後には 3 菌株とも PFU は下降して $10^4/\text{ml}$ 前後で大差はみられなくなった。

Table 2-1. Effect of filtration on the recovery of *Bdellovibrio* from sea water

Filter (μ m)	Station number		
	1	2	3
Control	$6.0 \times 10^{8a)}$ (100) ^{b)}	1.9×10^8 (100)	2.7×10^8 (100)
1.2	4.8×10^8 (79.1)	1.1×10^8 (61.3)	1.6×10^8 (57.4)
0.8	4.4×10^8 (73.5)	5.4 (29.0)	1.5×10^8 (55.1)
0.45	2.1×10^8 (34.1)	5.0 (26.9)	1.0×10^8 (36.8)

a) PFU per ml.

b) Percentage.

Table 2-2. Effect of filtration on the recovery of total bacterial count from sea water

Filter (μ m)	Station number		
	1	2	3
Control	$1.1 \times 10^{8a)}$ (100) ^{b)}	1.4×10^8 (100)	8.9×10^4 (100)
1.2	4.0×10^4 (36.0)	1.0×10^4 (7.1)	1.5×10^4 (16.9)
0.8	8.7×10^3 (7.9)	2.4×10^3 (1.7)	1.4×10^3 (1.5)
0.45	2.1×10^2 (0.2)	1.0 (<0.1)	7.0 (<0.1)

a) Total bacterial count per ml.

b) Percentage.

***Bdellovibrio* の種々のグラム陰性桿菌に対するブラック形成の比較** 種々のグラム陰性桿菌を宿主細菌とした HS 寒天平板に P 1 培養液の希釈液を接種し、それぞれのブラック数を測定した。実験に用いた宿主細菌の増殖培地の食塩濃度と培養温度ならびに HS 寒天平板の培養温度と PFU の測定結果を Table 3 に示した。ブラックが確認された菌株のうち、*V. parahaemolyticus* Vp 1 が 610 で最も多く、*Aeromonas* sp. AK-2, *V. alginolyticus* VI 3 がこれにつき、また鮮魚の腐敗細菌である *Pseudo-*

monas および海水細菌の *Photobacterium* などで比較的高い PFU 値が得られた。一方、*E. coli* その他の腸内細菌科などの非好塩性の菌株ではブラックの形成が全くみられなかった。

腸炎ビブリオおよびその類似菌を宿主とした HS 寒天平板による海水 *Bdellovibrio* の分離とその宿主域 7月 8 日および 8 月 17 日に、それぞれ三浦半島相模湾沿岸の 3 地点で海水試料を採取し、Vp 1, VI 3, V_s 1 を宿主細菌とした HS 寒天平板を用い、PFU を測定し、その

Table 3. Comparison of PFU values obtained with various host organisms

Strain	Host organism		HS agar	
	NaCl % of medium	Incubation temp. °C	Incubation temp. °C	PFU/plate
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Vp 1	3.0	35	30	610
<i>V. alginolyticus</i> VI 3	3.0	35	30	400
<i>V. anguillarum</i> Va 1	0.5	25	25	66
<i>Vibrio</i> sp. P 8401	0.5	25	25	3
<i>Edwardsiella tarda</i> E 16	0.5	25	25	23
<i>Aeromonas</i> sp. AK 2	3.0	30	30	440
<i>Photobacterium phosphoreum</i> 12085	3.0	20	25	224
<i>Photobacterium</i> sp. FAO 17	3.0	20	25	133
<i>Pseudomonas</i> sp. III/IV-H 106	3.0	25	25	271
<i>Pseudomonas</i> sp. III/IV-NH 112	0.5	25	25	143
<i>Pseudomonas</i> sp. I/II 210	0.5	25	25	0
<i>Moraxella</i> sp. 182	0.5	25	25	0
<i>Escherichia coli</i> CH 5	0.5	35	30	0
<i>Citrobacter freundii</i> CM 1	0.5	35	30	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CL 4	0.5	35	30	0
<i>Enterobacter cloacae</i> IL 147	0.5	30	30	0
<i>Proteus morganii</i> Kono	0.5	35	30	0

Table 4. Comparison of PFU value of sea water samples obtained by 3 HS agar different in host organisms

Sampling		Host organism in HS agar		
Date	Station	Vp 1	VI 3	Vs 1
Jul. 8	Sajima	310 ^{a)}	135	95
	Kuruwa	4	9	0
	Morito	80	10	2
Aug. 17	Sajima	51	23	25
	Kuruwa	4	4	5
	Isshiki	22	11	8

^{a)} Figures show PFU value per ml.

結果を Table 4 に示した。6 試料のうち 4 試料が *V. parahaemolyticus* を宿主細菌とした HS 寒天平板で最高の PFU を示した。また 8 月 17 日の海水試料からは *Bdellovibrio* 菌株を分離した。これらの菌株は、HS 寒天平板の宿主細菌として Vp 1 を用いたものを Bd I, VI 3 のものを Bd II, Vs 1 のものを Bd III として群別し、これらの分離菌 26 株について種々の細菌に対する溶菌性を試験した。三浦半島相模湾沿岸海水から 8 月に 22 株、10 月に 19 株の一般海水細菌を分離し、これら計 41 株についての溶菌試験結果を Table 5 に示した。海水分離菌株に対する溶菌性は *Bdellovibrio* の菌株により差異はみられるが、ほとんどの菌株は大部分の *Vibrio* および *Pseudomonas* 菌株を溶菌したのに対し、*Flavobacterium-Cytophaga* に対しては全く溶菌を示さなかった。また *Moraxella-Acinetobacter* の菌株に対しても概して溶菌しなかった。V 2 および Ps 2 の 2 菌株は Bd I および Bd II ではほとんど溶菌されなかったのに対し、Bd III では 8 株中 6 株が溶菌した。Bd I-5 は大部分の *Vibrio* 菌株に対し溶菌を示さず、また *Pseudomonas* の全株を溶菌しなかった。Bd I-7 および I-9, II-9, III-7, III-8 は *Pseudomonas* 6 株に対し全く溶菌を示さない点で注目された。

つぎに当研究室保存菌株に対する溶菌試験を行った結果を Table 6 に示した。*Bdellovibrio* 菌株により宿主域がかなりまちまちであったが、すべての *Bdellovibrio* 菌株は *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* ならびに *S. faecium* などのグラム陽性菌に対しては溶菌を示さず、逆に、ほとんどすべての *Vibrio* 属細菌を溶菌した。その他の細菌に対する溶菌は *Bdellovibrio* の菌株によりまちまちであったが、概して大腸菌群の多くは大部分の *Bdellovibrio* 菌株に感受性を示さなかった。しかし、Bd I-6, II-6 および II-7 は多くの大腸菌群株を溶菌した点で注目される。

神奈川現象陽性および陰性腸炎ビブリオ菌株に対する

Bdellovibrio 溶菌試験 神奈川現象 (以下、神現と略す) 陽性の 20 株および陰性の 19 株のほか、*V. alginolgticus* 5 株、*Vibrio* sp. (Biotype 3) の 5 株に対する *Bdellovibrio* 9 株の溶菌試験を行い、2 日培養後の溶菌の結果を Table 7 に示した。すべての神現陽性株は、ほとんどの *Bdellovibrio* 菌株により溶菌されたのに対し、神現陰性株の中には、ほとんどの *Bdellovibrio* 菌株に溶菌されないものが 3 株あり、このほか *Bdellovibrio* 菌株により溶菌がまちまちのものが数株あった。すなわち、この実験に関する限り、神現陰性株の方に溶菌作用に対し感受性のない菌株の存在がみつめられた。比較試験に供した *V. alginolgticus* の 5 株はほとんどの *Bdellovibrio* 菌株により溶菌されたが、*Vibrio* sp. (Biotype 3) の溶菌は *Bdellovibrio* 菌株によりまちまちであった。

考 察

Bdellovibrio の増殖温度範囲は Fig. 2 に示したように菌株によって差異がある。夏期の分離菌株である P 1 および P 3 は、35°C でもかなり良好に増殖したが、冬の分離株である P 4 は 35°C で阻止された。宮本⁹⁾の冬期に分離した海洋 *Bdellovibrio* 菌株も 35°C では増殖しなかったと報告されている。やはり夏と冬の分離株の間では、35°C 付近で差異がみられるのであろう。これに対し、低温における増殖ならびに増殖至適温度に関しては、本実験の夏と冬の菌株の間に明瞭な差異はみられなかった。

Bdellovibrio の増殖におよぼす食塩濃度の影響をみたところ、1~4% で良好な増殖を示し、5% 以上で阻害がみられた。これらの成績から P 1 の増殖に好適な塩分濃度範囲は比較的広いようである。

HS における *Bdellovibrio* 菌株の増殖曲線を作成して Fig. 5 に示したが、両菌株とも接種後 4 時間から 16 時間にわたり、一般細菌の増殖曲線と同じような対数的増殖がみられ、またその末期から定常期にかけて宿主細菌の急速な死滅が起っている。そして定常期から死滅期にかけて宿主生菌数のわずかな上昇がみられた。P 2 の場合をみると、定常期には 10^7 /ml を越えている一方で、宿主生菌数は 10^3 /ml 程度まで下っているの、P 2 はその高い菌数を維持することが困難となり死滅しはじめ、それがまた宿主細菌の再増殖を誘発することが推測される。*Bdellovibrio* が対数的増殖を示した点については、本実験の偶発的現象であるのか、あるいは一般的にこのような現象がみられるのか、*Bdellovibrio* の増殖が通常の 2 分裂方式とは異なる点を考えると興味のもたれる問題である。

HS における宿主生菌数の大小为 *Bdellovibrio* の増殖におよぼす影響を静置培養と振盪培養とで比較したとこ

Table 5. Lytic activity of 26 *Bdellovibrio* strains on the marine bacteria isolated

Host bacteria	<i>Bdellovibrio</i>																									
	Bd I													Bd II												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Vibrio</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moraxella-Acinetobacter</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gram positive cocci	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	6	7	8	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

a) Signs show degree of size of lytic zone. +: large size, ±: small size, -: very small size, --: no lysis.

b) (): not clear.

Table 6. Host range of 19 *Bdellovibrio* strains isolated

Host bacteria	Bdellovibrio																		
	Bd I									Bd II									Bd III
	1	2	3	4	5	6	7	9	1	2	3	4	6	7	1	5	6	7	8
<i>Escherichia coli</i> C 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> C 15	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> C 8	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> C 11	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> C 20	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> C 34	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp. C 14	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp. PR 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Proteus morganii</i> E 16	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Edwardsiella tarda</i> MX 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moraxella</i> sp. MX 2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Moraxella</i> sp. AC 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acinetobacter</i> sp. N 2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Photobacterium</i> sp. N 4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Photobacterium</i> sp. Y 62	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aeromonas hydrophila</i> G 7272	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aeromonas salmonicida</i> P 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. I/II P 3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. I/II P 3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. III/IV-NH PN 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. III/IV-H PH 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. III/IV-H PH 2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio anguillarum</i> Va 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio anguillarum</i> Va 2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio anguillarum</i> Va 3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio anguillarum</i> Vp 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> Vp 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> V1 3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i> V ₃ 1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio</i> sp. (Biotype 3) SF 9	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i> SF 101	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i> SF 202	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

a) Signs show degree of size of lytic zone. + : large size, + : small size, ± : very small size, - : no lysis.

b) () : not clear.

ろ、宿主生菌数が $10^6/\text{ml}$ 以下の場合には静置と振盪でとくに顕著な差異はみられなかったが、 $10^6/\text{ml}$ の場合には静置培養で増殖が著しく遅延したのが目立った。逆に $10^8/\text{ml}$ 以下では振盪培養による増殖促進効果がないので、通常の *Bdellovibrio* の増菌培養には $10^7/\text{ml}$ 前後の宿主菌数の HS ならば、静置培養が適当であろう。

沿岸の自然海水に *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, および *Vibrio* sp. (Biotype 3) を $10^7/\text{ml}$ 程度に加えたところ、Biotype 3 は 1 日で顕著に減少したが、他の 2 菌株は 1 日では減少しなかった。しかし、2~4 日後には、いずれも明瞭に減少し、 $10^4/\text{ml}$ 前後になった。PFU は 3 株とも 2 日後に最高値に達し、その後減少したが、その最高値は *V. parahaemolyticus* の場合が他の 2 株よりかなり高かった。この場合 PFU の測定に用いた HS 寒天平板の宿主細菌が同一ではないので、PFU 値の比較にはこの点を配慮してみる必要があろう。いずれにしても自然海水に *Vibrio* のような細菌が異常に多量混入した場合には、これに対応して天敵細菌である *Bdellovibrio* などがそれらを栄養源として 1~2 日で急速に増殖し、両者の激しい競り合いの結果、生態系はやがて平衡状態に戻るであろう。

沿岸海水から *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* および *Vibrio* sp. (Biotype 3) の各菌株を宿主とした HS 寒天を用いて *Bdellovibrio* を分離し、それぞれ Bd I, II, III 群として群別したところ、これら 3 群は類似の宿主域をもつことが観察された。しかし、海水細菌の V2 あるいは Ps2 などに対する溶菌をみると Bd I, II と III の間に差異があるようにも思われる。海水の細菌フローラの中で、これらの *Bdellovibrio* に溶菌を受けやすいのは *Vibrio* や *Pseudomonas* を中心とした極毛性のグラム陰性桿菌群で、*Flavobacterium*-*Cytophaga* や *Moraxella*-*Acinetobacter* などは概して溶菌されないようである。グラム陽性の球菌は感受性がないようであり、また大腸菌群などの陸生細菌を溶菌する *Bdellovibrio* は少なかった。

V. parahaemolyticus の神奈川現象陽性株と陰性株の海洋 *Bdellovibrio* に対する態度はきわめて興味あるところである。本研究の結果では陽性株と陰性株の間に明瞭な差異はみられなかった。しかし陰性株の中の数株のみが *Bdellovibrio* に抵抗性を示した点が注目される。いずれにしても神現陰性株の中には *Bdellovibrio* に対し抵抗性の大きな菌株と小さな菌株が混在しているようである。このように *Bdellovibrio* 抵抗性に差異のあることは、自然海水の微生物生態系に重要な関連をもつことになろう。海水において陽性株が陰性株に比べて極端な劣勢であることに、*Bdellovibrio* その他の天敵生物がどのように関与しているのか、非常に興味のもたれるところ

ではあるが、これに関しては今後の検討に待たねばならない。

要 約

腸炎ビブリオに寄生し、これを溶菌する *Bdellovibrio* 細菌を沿岸海水から分離し、その性状を検討した。また *Bdellovibrio* の測定、分離のため HS 二層寒天平板法を改変し、HS 寒天平板法を考案した。*Bdellovibrio* 分離菌株は $20\sim 30^\circ\text{C}$ でよく増殖し、1~4% の食塩を要求した。 30°C の増殖曲線をみると、一般細菌のような対数増殖期があり、その末期から定常期にかけて宿主細菌の急速な死滅がみられた。沿岸の自然海水に腸炎ビブリオおよびその類似菌を $10^7/\text{ml}$ 程度加えたところ、2~4 日で $10^4/\text{ml}$ 程度に減少した。これに対し、海水中の *Bdellovibrio* は一時的に増殖した。*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Vibrio* sp. (Biotype 3) を宿主とした HS 寒天平板を用い沿岸海水から *Bdellovibrio* を分離し、宿主域を検討した処、海水細菌フローラの中で *Vibrio* や *Pseudomonas* に対し最も明瞭な溶菌を示した。概して大腸菌群などの陸生細菌に対する溶菌は *Bdellovibrio* の菌株によりまちまちであった。腸炎ビブリオの神奈川現象陽性株と陰性株の溶菌を比較した処、陰性株の一部に *Bdellovibrio* 抵抗株がみられた。

おわりに、種々指導助言を賜った大阪市立環境科学研究所宮本三郎博士に厚く御礼申し上げる。また本研究に協力された山下洋一、小林進一、小久保利昭、北村達夫、ラム・チ・ミ・ハンの諸氏に深謝する。

なお本研究の一部は文部省科学研究費補助金によった。

文 献

- 1) H. STOLP and H. PETZOLD: *Phytopathol. Z.*, **45**, 364-390 (1962).
- 2) H. STOLP and M. P. STARR: *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **29**, 217-248 (1963).
- 3) F. E. DIAS and J. V. BHAT: *Appl. Microbiol.*, **13**, 257-261 (1965).
- 4) R. MITCHEL and S. YANKOFKY: *Nature*, **215**, 891-893 (1967).
- 5) V. I. TAYLOR, P. BAUMANN, J. L. REICHEL, and R. D. ALLEN: *Arch. Microbiol.*, **98**, 101-114 (1974).
- 6) S. MIYAMOTO and K. KURODA: *Japan. J. Microbiol.*, **19**, 309-317 (1975).
- 7) 宮本三郎: 阪市医誌, **28**, 501-519 (1979).
- 8) 堀江 進・佐伯和昭・小嶋秩夫・奈良正人・関根 隆: 日水誌, **30**, 786-791 (1964).
- 9) 日高富男: 鹿児島大学水産学部紀要, **14**, 127-180 (1965).

- 10) 堀江 進・奥積昌世・木村正幸・赤堀正光・川
前政幸：食衛誌，**13**, 410-417 (1972).
417-423 (1966).
- 11) 佐伯和昭・堀江 進・小川紀彦：日水誌，**32**,
12) 申 錫雨・堀江 進・奥積昌世・小林義久：日
水誌，**42**, 1041-1053 (1976).