魚病菌 *Vibrio anguillarum* に対する *Pseudomonas* sp. の溶菌および致死作用

福森文康・永山文男・堀江 進

(1982 年 10 月 29 日受理)

Lytic and Lethal Effect of Culture Supernatant of *Pseudomonas* sp.
against Fish Pathogenic *Vibrio anguillarum*

Fumiyasu FUKUMORI,* Fumio NAGAYAMA* and Susumu HORIE*

A *Pseudomonas* sp. (L 1-7) capable of lysing *Vibrio anguillarum*, important pathogenic organism of cultured fish, was isolated from pond water for fish culture and tank water for plankton culture. The high yield of lytic factor in the supernatant of strain L 1 culture was obtained by shaking culture at 25°C for 24 hours in the medium containing 1% meat extract, 0.5% polypepton, 0.4% yeast extract and 0.3% glucose at pH 7.0. The activity of the lytic factor was highest at around 45°C and a little lower at 30°C; it was inactivated by heating at 50°C for 4 hours or at 60°C for 15 minutes. Lytic factor produced by strain L 1-7 was found to show varying degree of activity against various gram negative organisms other than *V. anguillarum*, depending upon the difference in strains. Gram positive organisms such as *Bacillus subtilis* and the other *Bacillus* organisms were lysed more or less, whereas *Streptococcus faecalis* and *S. faecium* strains were completely insensitive to the lytic factor. It is then considered that no correlation exists between the lytic action of the organisms and gram reaction of the organisms examined. The culture supernatant of strain L 1 was not only able to lyse the *V. anguillarum* cells, but also found to show remarkable lethal action.

養殖魚の細菌感染症の中で、ビブリオ病は最も重要なものの一つであるが、本感染症の予防あるいは治療の手段として、これらの病原菌に対し溶菌作用あるいは致死作用を有する微生物を利用できれば、その意義は大であると考えられる。宮本ら^{1,2)}は、*Vibrio* 属細菌に寄生し、これを溶菌する *Bdellovibrio* 属細菌を海水から分離し、*Vibrio* 属細菌に対する天敵細菌の存在を明らかにした。つづいて堀江ら³⁾は海水 *Bdellovibrio* 属細菌の生態について報告している。さて、*Bdellovibrio* 属細菌は絶対寄生性であるため、その培養は簡易ではなく、その溶菌活性の利用には実用上問題がある。一方、細菌を溶菌する酵素を産生する細菌については、既にかなり多くの報告がみられるが、その中でグラム陰性細菌に対する溶菌酵素に関する研究は比較的少ない。徳山ら⁴⁾や MURAO ら⁵⁾は *Bacillus* 属の細菌が *Pseudomonas aeruginosa* などのグラム陰性桿菌を溶菌する酵素を産生することを報告しており、また近年 SUGAHARA ら⁶⁻⁸⁾もグラム陰性菌に対する溶菌酵素を産生する海水細菌について研究している。

著者らは、ビブリオ病の病原細菌である *Vibrio an-*

guillarum などに対する溶菌性物質を産生する *Pseudomonas* 属細菌を分離し、その溶菌活性について検討し、また顕著な致死作用を明らかにしたので報告する。

実験方法

供試菌株 *V. 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、*V. anguillarum* Va 6, 8, 13, 14, 18, 21, 25, 27 は第一製薬株式会社研究所から、*Proteus morganii* 甲野株は東京大学医科学研究所から、*Bacillus brevis* IAM 1031, *B. cereus* IAM 1110 *B. licheniformis* IAM 11054, *B. subtilis* IAM 1026, 1169, *B. megaterium* IAM 1032 は東京大学応用微生物研究所から、*B. subtilis* B 1401 および *Staphylococcus aureus* 209 p は日本缶詰協会研究所からそれぞれ分与された。その他の菌株はすべて本学食品微生物研究室保存菌株である。

培地など 使用した希釈水、培地、緩衝液などは次の

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

通りである。

希釈水：1% 食塩水を用いた。

1% 食塩水道水：脱塩素水道水に1% 食塩を溶解した。

ブロス：ポリペプトン（大五栄養化学）10g，肉エキス（ミクニ）5g，蒸留水 1000 ml，pH 7.0。場合により食塩を加えた。

ブドウ糖酵母エキスブロス（GY ブロス）：ポリペプトン 10g，酵母エキス（Difco）3g，ブドウ糖 5g，食塩 3g，蒸留水 1000 ml，pH 7.0。

普通寒天培地：ブロスに寒天 15g を加えた。

ブドウ糖酵母エキス寒天培地（GY 寒天培地）：GY ブロスに寒天 15g を加えた。

PY 寒天培地 No. 1：ポリペプトン 2g，酵母エキス 1g，寒天 7g，1% 食塩水道水 1000 ml，pH 7.0。

PY 寒天培地 No. 2：ポリペプトン 5g，酵母エキス 2.5g，寒天 7g，1% 食塩水道水 1000 ml，pH 7.0。

リン酸緩衝液：0.1 M 食塩水溶液 10 ml に、0.05 M リン酸カリウム緩衝液（pH 6.5）140 ml を加えた。

生菌混和平板 試験菌の 24 時間培養液 0.1 ml を寒天平板上に塗布し，24 時間培養し，菌苔をうずまき白金耳でかきとり，1% 食塩水道水に濃厚（約 10^{10} /ml）に浮遊させた。この 1 ml をベトリ皿に注入し，これに溶解して約 45°C に保った PY 寒天培地 No. 2 15 ml を加え，混和し，固化した。これを乾燥した後実験に供した。

分離菌株の溶菌試験 分離菌株の 1% 食塩加ブロス，25°C，24 時間培養液 1 白金耳を生菌混和平板に穿孔し，かつ画線した。これを 25°C で 24 時間培養後，穿孔線の周囲の溶菌の有無を観察した。

溶菌性菌株の性状試験 特記しない限り，接種菌としてブロスの 30°C，24 時間培養液を用い，培養は 30°C で行った。

種々の食塩濃度における増殖試験は，1% 食塩加ブロス 25°C，24 時間培養液を各食塩濃度のブロスに接種し，25°C で 24 時間培養後観察した。種々の温度における増殖試験は，ブロスの 25°C，24 時間培養液をブロスに接種し，種々の温度で 24 時間培養後観察した。運動性試験は SIM 培地（Difco）及び懸滴標本によった。インドール産生試験は SIM 培地（Difco）を用いた。メチルレッド試験はブドウ糖リン酸ペプトン水（ポリペプトン 5g， K_2HPO_4 5g，ブドウ糖 5g，蒸留水 1000 ml pH 7.0）を用い，4 日培養後観察した。Voges-Proskauer 試験には VP 半流動培地（栄研）を用いた。チトクロムオキシダーゼ試験は KOVACS¹⁰⁾ の方法によった。硝酸塩還元試験には 0.1% 硝酸カリウム加ブロスを用い，Manual of Microbiological Method¹¹⁾ の方法によ

た。硫化水素産生試験は SIM 培地（Difco）及び TSI 培地（栄研）によった。ブドウ糖からのガス産生試験は TSI 培地（栄研）によった。カゼインの分解及びゼラチン液化試験は奥積ら¹²⁾の方法によった。デンプン加水分解試験には 0.2% 可溶性デンプンを加えた普通寒天培地を用い，2 日及び 4 日培養後試験した。ウレアーゼ試験は尿素培地（日本製薬）を 100°C，20 分間加熱したものを用い，24 時間培養後観察した。フェニルアラニンデアミナーゼ試験にはフェニルアラニン・マロン酸塩培地（日本製薬）を用いた。卵黄反応試験には Macfarlane らの培地¹³⁾を用いた。色素産生試験には King A 及び King B 培地（栄研）を用いた。硝酸塩からのガス産生試験には硝酸塩ブロス（ポリペプトン 5g，肉エキス 3g， KNO_3 1g，蒸留水 1000 ml pH 6.8）を用い，14 日間培養した。アミノ酸脱炭酸試験には Decarboxylase Base Moeller 培地（Difco）を用いた。炭素源利用試験には Simmons の基礎培地を用いた。炭水化物分解試験には Hugh and Leifson¹⁴⁾の培地を用いた。

生菌浮遊液 試験菌の 24 時間培養液 1 ml を 300 ml 容綿栓三角フラスコ中の液体培地 100 ml に接種し，24 時間培養後，4°C で 10000 rpm，5 分間遠心沈殿し，リン酸緩衝液に浮遊させ，再び遠心沈殿を行い，菌体をリン酸緩衝液に浮遊させ，菌数を $10^7 \sim 10^8$ /ml とした。

V. anguillarum のアセトン乾燥菌体の調製 *V. anguillarum* Va 21 の 1% 食塩加ブロス 25°C，24 時間培養液 1 ml を，綿栓坂口フラスコ中の 1% 食塩加ブロス 100 ml に接種し，25°C 前後で 1 夜振盪培養した。その培養液を 4°C で 10000 rpm，5 分間遠心沈殿し，菌量の 11 倍の冷アセトン（-15°C）を加え，よく攪拌し，4°C に 1 夜保ち再び遠心沈殿を行い，菌体を少量の冷エーテル（-15°C）に浮遊させた。これを遠心沈殿し，菌体を室温で約 2 時間減圧乾燥した後，容器に密封し低温に保存した。以下これを乾燥菌体と称することとした。

溶菌活性の測定 培養液の溶菌活性の測定には，培養液を 4°C で 10000 rpm，5 分間遠心沈殿し，その上澄液に 0.2 N 塩酸を加え，pH を 6.5 とし，これに蒸留水を加え全量を 1.2 倍量とし，これを試料液とした。*V. anguillarum* の乾燥菌体をリン酸緩衝液に 1 mg/ml の濃度に浮遊させ，その 4 ml に上記試料液 1 ml を加えたものを L 字管に注入し，濁度を測定した後，直ちに 37°C で Monod 式振盪培養器により振盪し，30 分後の濁度を測定した。一方，試料液のかわりに，培養に用いた培地 1 ml を加えたものを対照とした。このとき溶菌活性は次の式で表わすものとした。

$$\frac{(\text{反応開始時濁度}-\text{反応 30 分後濁度})-(\text{対照の反応開始時濁度}-\text{対照の反応 30 分後濁度})}{\text{反応開始時濁度}} \times 100 (\%)$$

なお、濁度の測定には島津ボシュロム分光光度計「スペクトロニック 20-A」を用い、660 nm の OD 値を求めた。

結果および考察

V. anguillarum 溶菌細菌の分離 1980年8月18日に

山梨県魚苗センターにおいて採取した養殖池の水および同年9月13日に本学水族養殖学研究室の餌料用プランクトン培養水槽から採取した水を試料とした。ペトリ皿に試料液の原液、10倍および100倍希釈液のそれぞれ1 ml を注入し、これに *V. anguillarum* Va 2 の1%食塩水道水の浮遊液 (約 10^{10} /ml) をそれぞれ1 ml ずつ

Table 1. Characteristics of isolates, *Pseudomonas* sp. L 1-7

Gram stain	—	Inositol	—
Shape	Rod	Sorbitol	—
Motility	+	β -alanine	+
Flagellum	Polar	Arginine	+
Indole production	—	Valine	+
Methyl red	—	Acetate	+
Voges-Proscauer reaction	—	Alginate	—
Cytochrome oxidase	+	Citrate	+
Nitrate reduction	—	Fumarate	+
Hydrogen sulfide production	—	Malate	+
Gas from glucose	—	Maleate	±
Gelatin liquefaction	+	Lactate	+
Casein hydrolysis	+	Propionate	+
Starch hydrolysis	—	Pyruvate	+
Catalase	+	Oxalate	±
Urease	—	Succinate	+
Phenylalanine deaminase	—	Tartrate	±
Egg yolk reaction	+	Acid from	
Fluorescent pigment	+	Glucose (aerobic)	+
Luminescence	—	Glucose (anaerobic)	—
Denitrification	—	Arabinose	+*
Decarboxylase of		Ramnose	—
Arginine	+	Ribose	+
Lysine	—	Xylose	+*
Ornithine	—	Galactose	+*
Growth in NaCl (%)		Mannose	+
0	++	Sorbose	—
0.5	++	Cellobiose	—
1	++	Lactose	—
2	+ or ++	Maltose	—
3	+	Melezitose	—
5	±	Melibiose	+*
7	—	Raffinose	—
Growth at (°C)		Sucrose	—
5	—	Trehalose	—
20	±	Adonitol	—
25	+ or ++	Dulcitol	—
30	++	Glycerol	+
35	+ or ++	Inositol	—
37	+ or ++	Mannitol	+
40	—	Sorbitol	—
Carbon sources for growth		Dextrin	—
Glucose	+	Inulin	—
Arabinose	—	Methyl-D-glucoside	—
Sucrose	±	Breakdown of	
Trehalose	—	Esculin	—
Adonitol	—		

* Negative for L 5.

Table 2. Lytic activity of isolates on various organisms

Organism		Medium and incubation temperature for harvest	L						
			1	2	3	4	5	6	7
<i>Vibrio anguillarum</i>	Va	1	+	+	+	+	±	+	+
		3	+	+	±	+	—	+	+
	NA 25°C	6	+	±	+	+	±	+	+
		8	+	+	+	+	+	+	+
		13	+	+	+	+	±	+	+
		14	+	+	+	+	±	+	+
		18	+	+	+	+	±	+	+
		21	+	+	+	+	+	+	+
		25	+	+	+	+	+	+	+
		27	+	+	+	+	±	+	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vp(+)	1	±	干	干	±	—	—	干
		2	±	±	±	±	±	±	±
		3	±	±	±	±	±	±	±
		4	±	干	干	—	干	干	干
		5	±	干	干	干	—	干	干
	Vp(—)	1	干	+	干	干	干	±	—
		2	±	干	干	±	—	±	—
		3	±	干	干	±	—	干	—
		4	±	+	±	±	—	±	—
		5	±	±	±	±	—	±	—
20	±	干	±	±	±	±	干		
<i>Vibrio alginolyticus</i>	VI	1	+	+	+	+	—	±	+
		2	—	+	—	—	—	干	+
		4	—	+	—	—	—	干	+
		5	—	+	—	—	—	干	+
<i>Vibrio</i> sp. (Biotype 3)	V ₃	1	±	±	±	±	±	±	±
		2	±	干	±	±	+	±	干
		3	±	±	±	±	±	±	±
		4	±	±	±	±	±	±	±
		5	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio</i> sp.	VB	1	干	干	干	干	干	干	干
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Y	62	—	干	—	—	—	—	—
<i>Aeromonas salmonicida</i>	G	7272	±	±	±	±	±	±	±
<i>Pseudomonas</i> sp.	P	1	—	干	±	干	—	±	干
		2	—	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—	—
		4	—	—	—	—	—	—	—
		5	—	干	干	—	干	±	±
<i>Photobacterium</i> sp.	N	1	干	干	干	干	干	干	干
		2	干	干	干	干	干	干	干
		3	干	干	干	干	干	干	干
		4	—	—	—	—	—	—	—
		5	干	干	干	干	干	干	干
<i>Escherichia coli</i>	C	1	—	—	—	—	—	—	—
		3	—	—	—	—	—	—	—
		15	±	±	±	±	±	±	±
<i>Citrobacter</i> sp.	C	8	—	—	—	—	—	—	—
		17	干	干	±	±	±	±	±
		20	—	—	—	—	—	—	—
		29	干	±	±	±	±	干	±
		33	—	—	—	—	—	—	—

Table 2. (Continued)

Organism	Medium and incubation temperature for harvest		L						
			1	2	3	4	5	6	7
<i>Enterobacter</i> sp.	C 14		—	—	—	—	—	—	—
	23	NA	—	—	—	—	—	—	—
	26	30°C	—	干	干	干	干	干	干
	34		±	±	±	±	±	±	±
	37		—	—	—	—	—	—	—
<i>Edwardsiella tarda</i>	E 16	NA 30°C	—	—	—	—	—	—	—
<i>Proteus morganii</i>	KONO	NA 35°C	—	—	—	—	—	—	—
<i>Acinetobacter</i> sp.	AC 1	NA 25°C	—	—	—	—	—	—	—
<i>Moraxella</i> sp.	MX 1	SNA 25°C	干	干	干	干	干	干	干
	2		±	±	±	±	±	±	±
<i>Bacillus brevis</i>	IAM 1031	GYA 35°C	—	±	±	±	±	±	±
<i>B. cereus</i>	IAM 1110		干	干	干	干	干	干	干
<i>B. licheniformis</i>	IAM 11054		干	±	+	+	±	+	±
<i>B. megaterium</i>	IAM 1032		±	±	±	±	±	±	±
<i>B. subtilis</i>	IAM 1026		+	+	+	+	+	+	+
	IAM 1169		+	+	+	+	+	+	+
	B 1401		+	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	SF 1	GYA 35°C	—	—	—	—	—	—	—
	101		—	—	—	—	—	—	—
	151		—	—	—	—	—	—	—
<i>S. faecium</i>	201		—	—	—	—	—	—	—
	401		—	—	—	—	—	—	—
	501		—	—	—	—	—	—	—

NA, 1% NaCl Nutrient Agar.

SNA, 3% NaCl Nutrient Agar.

GYA, Glucose Yeast Agar.

Lytic activity was determined by clear zone formation.

+, ±, 干, — shows degree of clear zone formation.

加え、さらに加温溶解し約 45°C に保った PY 寒天培地 No. 1 の 10 ml を流し込み、混和して平板とした。これを 25°C で 3 日間培養し、溶菌をおこした集落から菌株を分離した。これらの菌株についてそれぞれ溶菌性を確認し、前者の試料から *V. anguillarum* 溶菌細菌 L1~3 を、後者の試料から L4~7 得た。

分離菌株の性状試験 L1~7 の性状試験の結果を Table 1 に示した。これらの菌株はいずれもグラム陰性の桿菌で、極毛性鞭毛を有し、オキシダーゼ陽性で、ブドウ糖を酸化的に分解し、かつ蛍光色素を産生するもので *Pseudomonas* 属に同定された。これらの 7 株は、炭水化物の分解の点で僅かの差異はみられるものの、概してそれらの性状は酷似している。また塩分の要求性はみられず、5°C 及び 40°C では増殖せず、増殖の至適温度は 30°C 前後にある。

生菌混和平板を用いた種々の細菌に対する溶菌試験 供試菌株の培養は、Table 2 に示した培地及び温度で行った。L1~7 の種々の細菌株に対する溶菌能を試験した結果を Table 2 に示した。L1~7 の全菌株は *V.*

anguillarum の供試菌株に対し強い溶菌を示した。他の *Vibrio* 属菌に対しては、菌株により差異がみられた。またその他のグラム陰性菌に対する溶菌もまちまちであった。なおグラム陽性の *Bacillus* 属の細菌に対し溶菌を示した点が注目される。即ち L 菌による溶菌の有無は、試験菌のグラム染色性との関連性がないように見受けられる。

溶菌活性物質産生のための培養条件の検討 L1 を用いて、溶菌活性物質の産生のため至適条件を検討した結果、培地としてはポリペプトン 0.5%、肉エキス 1%、酵母エキス 0.4%、ブドウ糖 0.3%、pH 7.0 の組成が優れていることを認め、これを溶菌活性物質産生用培地とした。また、静置培養よりも振盪培養が優れ、培養温度は 25°C が適温であった。

L1 の増殖曲線と溶菌活性物質産生量の関係 溶菌活性物質産生用培地に L1 を接種し、25°C で振盪培養し、濁度の上昇に伴う培養液の溶菌活性の変化を観察し、その結果を Fig. 1 に示した。L1 の増殖による濁度の上昇は 8 時間培養前後で始まり、20 時間を過ぎるあたりで

最高値に近づいた。一方、溶菌活性は 12 時間を過ぎるところから現われ、増殖に伴い急上昇し、18 時間培養後には溶菌活性は最高値に達した。この場合 L1 の増殖曲線

Fig. 1. Relationship between the growth of pseudomonas sp. L 1 and lytic factor production. Growth (OD) was determined at 660 nm. Lytic activity was determined in phosphate buffer (pH 6.5). ○—○, Growth; △---△, Lytic activity.

と溶菌活性の曲線が平行して上昇してゆく点が注目される。

溶菌活性測定値に及ぼす温度の影響 試料液の溶菌活性測定温度を変えて測定した結果を Fig. 2 に示した。溶菌活性の測定値は、増殖の至適温度である 30°C 付近では比較的 low, 最大値は 45°C 付近で得られることが分った。

種々の温度における溶菌活性の変化 L1 培養上澄液

Fig. 2. Effect of temperature on lytic factor activity. Lytic activity was determined in phosphate buffer (pH 6.5).

Fig. 3. Stability of lytic factor at different temperature. Lytic activity was determined in phosphate buffer (pH 6.5). ●—●, 5°C; ○---○, 35°C; △—△, 43°C; ▲—▲, 50°C; □—□, 60°C.

を孔径 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過し、その 1.25 ml ずつを小試験管に分注し、種々の温度に保ち、経時的に各温度のろ過液を取り出し、溶菌活性を測定した。結果を Fig. 3 に示した。60°C では15分間でほとんど活性が失われており、50°Cでは活性が失われるまで4時間を要した。一方、5°C、35°C 及び 43°C では、8時間経過しても溶菌活性の顕著な減少は見られなかった。

L1 培養上澄液の種々の細菌に対する溶菌試験 種々の細菌の生菌浮遊液を用いて、L1 培養上澄液による溶菌試験を行った結果を Table 3 に示した。溶菌活性は *Vibrio* 属のほか、*Aeromonas*, *Moraxella* などの菌株で高い値を示したのに対し、腸内細菌科の各菌株では溶菌は全く見られなかった。

L1 培養上澄液の生菌に対する致死作用 *V. anguillarum* Va 21, *E. coli* C1, *B. subtilis* B 1401 の生菌浮遊液を用い、前記の溶菌活性の測定の場合と同様に L1 の試料液を加え、37°C で振盪し、経時的に生菌数の変化を観察した。生菌数の測定には、Va 21 及び C1 の場合は 1% 食塩加普通寒天平板を、B 1401 の場合には GY 寒天平板を用いた。実験結果を Fig. 4 に示した。

Va 21 においては、30 分間で対照の $1/10^2$ 以下に、1 時間では $1/10^4$ 以下になり、さらに2時間後には $1/10^5$ 以下になった。Table 3 によれば Va 21 に対する溶菌活性は 56 となっており、これは 30 分間の処理で濁度が 56% 減少したことを示している。一方、Fig. 4-1 に

Table 3. Lytic activity of *Pseudomonas* sp. L1 culture to cell suspension of various organisms

Organism		Lysis (%)
<i>Vibrio anguillarum</i>	Va 1	29
	Va 21	56
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vp(-) 20	37
<i>Vibrio alginolyticus</i>	V1 1	30
<i>Vibrio</i> sp.	V ₈ 1	50
<i>Vibrio</i> sp.	VB 1	5
<i>Pseudomonas</i> sp.	P 1	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Y 62	0
<i>Aeromonas salmonicida</i>	G 7272	37
<i>Escherichia coli</i>	C 1	0
<i>Citrobacter</i> sp.	C 8	0
<i>Enterobacter</i> sp.	C 14	0
<i>Proteus morganii</i>	KONO	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	E 16	0
<i>Acinetobacter</i> sp.	AC 1	4
<i>Moraxella</i> sp.	MX 2	30
<i>Bacillus subtilis</i>	B 1401	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	209 P	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	L 1	0

Lytic activity was determined in phosphate buffer (pH 6.5).

Fig. 4-1. Lethal effect of filtrate of *Pseudomonas* sp. L1 culture on *V. anguillarum* Va 21. Lethal effect was determined in phosphate buffer (pH 6.5). ○---○, Va 21 control; ●—●, Va 21 test.

Fig. 4-2. Lethal effect of filtrate of *Pseudomonas* sp. L1 culture on *B. subtilis* B 1401. Lethal effect was determined in phosphate buffer (pH 6.5). ○---○, B 1401 control; ●—●, B 1401 test.

Fig. 4-3. Lethal effect of filtrate of *Pseudomonas* sp. L1 culture on *E. coli* C1. Lethal effect was determined in phosphate buffer (pH 6.5).
○---○, C1 control; ●—●, C1 test.

よれば、30 分間で生菌数は 1% 以下に減少していることが分った。したがって L1 培養上澄液中には、Va 21 に対する溶菌作用だけでなく、それにもましてきわめて大きな殺菌作用のあることが明らかである。また *B. subtilis* B 1401 に対しても殺菌作用が認められたが、Va 21 の場合ほどは顕著でなかった。一方、*E. coli* に対しては殺菌作用は認められなかった。

本研究結果によれば、*Pseudomonas* sp. L1 は肉エキス、酵母エキス、ブドウ糖などを含む特定の組成の培地中で 1 日培養すると、その培養上澄液中に *V. anguillarum* 溶菌活性物質を産生し、その物質は *V. anguillarum* に対し強い殺菌作用を有することが分った。本活性物質は 50°C において短時間に失活するもので、細菌に対する溶菌酵素ではないかと推察される。この種の殺菌性物質がビブリオ病の予防あるいは治療に利用されるよう研究の発展が期待される。

要 約

魚の養殖池及び餌料プランクトン培養水槽の水から、魚病菌 *Vibrio anguillarum* を溶菌する細菌 *Pseudomonas*

sp. L1~7 を分離した。L1 を用いて検討した処、本菌の培養上澄液には *V. anguillarum* 溶菌活性物質が産生されるが、その産生のためには肉エキス 1%、ポリペプトン 0.5%、酵母エキス 0.4%、ブドウ糖 0.3%、pH 7.0 の培地を用い、25°C で 24 時間振盪培養するのが最適であることが分った。本溶菌活性は 45°C 付近で最高で、30°C ではやや低く、50°C では 4 時間で失活した。また *V. anguillarum* 以外の *Vibrio* 属はじめその他のグラム陰性菌に対する溶菌はまちまちであった。一方、グラム陽性菌である *Bacillus* 属菌株を溶菌する点が注目される。本培養上澄液は、*V. anguillarum* を溶菌するだけでなく、きわめて顕著な殺菌作用を有するので、ビブリオ病の予防あるいは治療への利用研究が期待される。

文 献

- 1) S. MIYAMOTO and K. KURODA: *Japan. J. Microbiol.*, **19**, 309-317 (1975).
- 2) 宮本三郎: 阪市医誌, **28**, 501-519 (1979).
- 3) 堀江 進・小林哲夫: 日水誌, **47**, 1209-1222 (1981).
- 4) 徳山龍明・浅野浩司: 日大農獣報, **33**, 223-236 (1976).
- 5) S. MURAO and Y. TAKAHARA: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 2305-2316 (1974).
- 6) I. SUGAHARA, K. HAYASHI, T. KIMURA, M. MATSUOKA, and K. FUJITA: *Bull. Fac. Fish., Mie Univ.*, No. 3, 17-28 (1976).
- 7) I. SUGAHARA, K. HAYASHI, T. KIMURA, and K. KATO: *Bull. Fac. Fish., Mie Univ.*, No. 5, 25-49 (1978).
- 8) I. SUGAHARA, K. HAYASHI, T. KIMURA, and N. HAZUMI: *Bull. Fac. Fish., Mie Univ.*, No. 6, 49-56 (1979).
- 9) I. SUGAHARA, K. HAYASHI, T. KIMURA, Y. SUZUKI, H. TOYODA, and A. MATSUOKA: *Bull. Fac. Fish., Mie Univ.*, No. 7, 9-27 (1980).
- 10) N. KOVACS: *Nature*, **178**, 703 (1956).
- 11) Society of American Bacteriologist: *Manual of Microbiological Methods*, McGraw Hill Book Co., New York, 1957, pp. 153-154.
- 12) 奥積昌世・堀江 進・木村正幸・赤堀正光・川前政幸: 食衛誌, **14**, 81-89 (1973).
- 13) 坂崎利一: 新培地学講座, 上, 近代出版, 東京, 1978, pp. 384-385.
- 14) R. HUGH and E. LEIFSON: *J. Bacteriol.*, **66**, 24-26 (1953).