



Title	和歌山県田辺湾におけるVibrio属細菌群の変動
Author(s)	宮崎, 亜希子; MIYAZAKI, Akiko; 絵面, 良男 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 46(2), 31-37
Issue Date	1995-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/24149
Type	departmental bulletin paper
File Information	46(2)_P31-37.pdf



和歌山県田辺湾における *Vibrio* 属細菌群の変動

宮崎亜希子¹⁾・絵面 良男¹⁾

Changes in Groups of Genus *Vibrio* in Tanabe Bay,
Wakayama Prefecture

Akiko MIYAZAKI¹⁾ and Yoshio EZURA¹⁾

Abstract

Vibrios isolated from samples of Tanabe Bay in Wakayama Prefecture during a prosperity and decline of red tide caused by *Gymnodinium mikimotoi* were examined physiological and biochemical features. A total of 118 strains were identified to the species level. The 112 strains were divided into 8 groups (group I to VIII), and 6 strains never belong to any groups. Group I (40 strains of *Vibrio alginolyticus*-like) was the predominant species followed by group II (27 strains of *V. harveyi*-like) and group IV (18 strains of *V. campbellii*-like). These three groups were found to be more 72% of total vibrios isolated from Tanabe Bay. Group III (*V. natriegens*-like), group V (*V. anguillarum*-like), group VI (*V. nereis*-like), group VII (unidentified group) and group VIII (unidentified group) were consisted of five to six strains in each. *V. alginolyticus*-like strains were isolated at a pre-blooming stage of *G. mikimotoi* and *V. harveyi*-like and *V. campbellii*-like strains were found throughout the sampling time.

Key Word: 海洋細菌, *Vibrio* 属, *Gymnodinium mikimotoi*, 赤潮

緒 言

1989年および1990年に和歌山県田辺湾における細菌相の変動について調査し、*Gymnodinium mikimotoi* 赤潮が発生しなかった1989年と同赤潮の発生した1990年とで、細菌相が著しく異なることを先に報告した(宮崎ら, 1995)。特に、赤潮非発生年の1989年には、沿岸海域に広く分布する *Vibrio* 属の出現が非常に少なく、発生年である1990年の半数以下であった。ところで、竹内ら(1990)は三重県五ヶ所湾において *G. mikimotoi* 細胞数の増加とともに *Vibrio* 属菌数が減少する傾向のあることを報告している。また、Romalde et al. (1990a, b) はスペイン沿岸における *Gymnodinium catenatum* 赤潮および *Mesodinium rubrum* 赤潮の消長に *Vibrio* 属内の特定の菌群が関与している可能性を示唆する結果を報告している。

そこで田辺湾における *G. mikimotoi* 赤潮の発生と *Vibrio* 属細菌の関連性を解明する目的で、1990年に同湾より分離した *Vibrio* 属菌株の分類学的検討を行い、種レベルでの関与の有無を検討した。

¹⁾ 北海道大学水産学部微生物学講座
(Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

実 験 方 法

供 試 菌

1990年6月12日から同年9月4日にかけて和歌山県田辺湾の定点4,6および17において採取した試料から分離され *Vibrio* 属に同定された計121菌株(宮崎ら, 1995)のうち継代可能な118菌株を供試した。また, 対照菌として *Vibrio alginolyticus* V-447, *V. anguillarum* NCMB828, *V. campbellii* ATCC25920, *V. fischeri* ATCC7744, *V. harveyi* NCMB1280, *V. parahaemolyticus* H-O-5, *V. proteolyticus* NCMB1326, *Photobacterium leiognathi* NCMB391を供試した。

供試菌の性状検査

供試菌の性状検査は主に坂崎(1967)の方法に準拠して行った。なお, 特記しないかぎり, 基礎培地としてSA寒天培地(Yamamoto et al., 1982)を用い, 他の供試培地も人工海水を用いて調製し, 培養温度は25°Cとした。

検査項目は次の通りである。集落形態, 20°Cおよび37°CにおけるBTBティポール寒天培地(日水製薬)での発育, インドール産生, Voges-Proskauer (VP) 反応, メチルレッド (MR) 試験, アミノ酸 (L-アルギニン, L-リシン, L-オルニチン) 脱炭酸反応 (Falkow 培地), 炭水化物 (L-アラビノース, D-イノシトール, シュクロース, サリシン) からの酸産生 (Barsiekow 改良培地), 高分子物質 (カゼイン, ツイーン 80, キチン, デンプン, アルギン酸ナトリウム, エスクリン) の分解, カタラーゼ産生, 10% 塩化ナトリウム耐性。なお, オキシダーゼ試験, ゼラチンとDNAの分解は前報(宮崎ら, 1995)の結果を使用した。

供試菌の同定

性状検査結果に基づいて供試菌株を群別するとともに, 対照菌株との比較, Baumann et al. (1984), West and Colwell (1984), Bergey's manual of determinative bacteriology 9th ed. (Holt et al., 1994) の記載性状に準拠して同定を試みた。

結果および考察

本実験の供試菌株は前報(宮崎ら, 1995)で *Vibrio* 属と同定された菌株である。すなわち, グラム陰性桿菌で大部分が極毛による運動性を有し, オキシダーゼ陽性でグルコースを発酵的に分解する通性嫌気性で発育にNa⁺あるいは海水を必要とする。供試菌118菌株はTable 1に示した性状に基づいて112菌株が8群に群別され, 6菌株は群を形成しなかった。各群の特徴と同定の結果は次のとおりである。

I群(40菌株)は拡散集落を形成し, 37°Cで培養したBTBティポール寒天培地上で黄色コロニーを形成し, 40°Cで発育し, VP反応陽性, アルギニン脱炭酸反応陰性, リシン脱炭酸反応陽性, エスクリンを分解せず, シュクロースから酸を産生し, 10%塩化ナトリウムに耐性であった。以上の性状は対照菌 *V. alginolyticus* V-447株とほぼ一致することおよびWest and Colwell (1984)による同種の記載性状とも一致することから, I群は *V. alginolyticus* またはその類似菌で構成されていることが明らかになった。一般に, *V. alginolyticus* は水温20°C以上の水温の高い沿岸域に広く分布し, 動物プランクトンや魚介類等から分離されることもある (Baross and Liston, 1970; Kamplmacher et al., 1972; Kaneko and Colwell, 1973)。

II群(27菌株)はVP反応陰性, MR試験陽性, リシン・オルニチン脱炭酸反応陽性, シュクロースから酸を産生し, 10%塩化ナトリウムに耐性を示さなかった。これら以外の性状を含め, 対照

Table 1. Characteristics of the groups of vibrios.

Characteristics	Group (Number of strains)									Reference strain							
	I (40)	II (27)	III (6)	IV (18)	V (6)	VI (5)	VII (6)	VIII (4)	Others (6)	V. al.	V. an.	V. ca.	V. fi.	V. ha.	V. pa.	V. pr.	P. le.
Swarming	+	d	d	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	d	d	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth on BTB teepol agar at 37°C	+	+	+	-	-	d	-	-	d	+	-	+	-	+	+	+	+
Yellow colony on "	+	+	d	-	-	d	-	-	d	+	-	-	-	+	-	-	-
Growth at 40°C	+	d	d	d	-	-	-	+	d	+	-	+	-	+	+	+	+
Na ⁺ or seawater requirement	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	-	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	+	+	d	+	d	+	-	-	d	+	+	+	-	+	+	+	-
Voges-Proskauer (VP) reaction	+	-	-	-	d	-	-	-	d	+	+	-	-	-	-	+	+
Methyl red (MR) test	d	+	d	d	d	-	-	-	d	-	+	+	+	+	+	+	+
Arginine decarboxylase	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	-	-	d	-	-	-	d	+	-	+	+	+	+	+	+
Ornithine decarboxylase	d	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	+	-	+	+
Hydrolysis of:																	
Casein	+	+	+	+	d	-	d	d	d	+	+	+	-	+	+	+	-
Gelatin	+	+	+	+	+	d	d	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+
DNA	+	+	+	+	+	+	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+	+	-	d	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+
Chitin	+	+	+	+	d	-	+	d	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+	d	-	-	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+
Alginate	d	d	d	d	d	-	-	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Esculin	-	+	d	+	d	+	-	+	d	-	-	+	+	-	-	-	-
Acid from:																	
Arabinose	-	-	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	±	±	+	-	+	+
Salicin	d	d	d	-	-	+	-	d	d	+	-	+	+	±	+	-	-
10% NaCl tolerance	+	-	-	-	-	-	-	+	d	+	-	-	-	-	-	+	-

d: different results in the groups. ±: weakly positive. V.al.: *V. alginolyticus* (V-447), V.an.: *V. anguillarum* (NCMB828), V.ca.: *V. campbellii* (ATCC25920), V.fi.: *V. fischeri* (ATCC7744), V.ha.: *V. harveyi* (NCMB1280), V.pa.: *V. parahaemolyticus* (H-O-5), V.pr.: *V. proteolyticus* (NCMB1326), P.le.: *Photobacterium leiognathi* (NCMB391).

菌 *V. harveyi* NCMB1280 株の性状を比較するとエスクリンの分解性を除き、一致していたことから、II 群は *V. harveyi* またはその類似菌と同定された。*V. harveyi* も水温が高く、比較的富栄養な海域に分布する傾向があり (Shilo and Yetinson, 1979), また、本種のうち発光性を有するものは動物プランクトンや魚介類の腸内常在性のものが多い (Nealson and Hastings, 1979; 日高ら, 1982)。

III 群 (6 菌株) は VP 反応陰性で、アルギニン・リシン・オルニチン脱炭酸反応陰性、シュクロースから酸を産生し、10% 塩化ナトリウム存在下で発育しなかった。これらの性状と一致する対照菌株はなく、Baumann et al. (1984) と West and Colwell (1984) の記載する *V. natriegens* の性状とキチンの分解性以外はほぼ一致することから、III 群は *V. natriegens* 類似菌と考えられた。*V. natriegens* は沿岸域に限らず広く分布している (Baumann et al., 1984)。

IV 群 (18 菌株) は 37°C で BTB ティポール寒天培地に発育せず、インドールを産生せず、VP 反応陰性、アルギニン・リシン・オルニチン脱炭酸反応陰性で、10% 塩化ナトリウム存在下で発

Table 2. Occurrence of the groups of vibrios in Tanabe Bay, 1990.

Date	Station	Depth (m)	Number of strains	Group									
				I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	Others	
Jun. 26	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
"	4	8	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
"	4	mud	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Jul. 10	4	mud	12	4	3	0	0	0	0	5	0	0	0
"	17	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jul. 17	4	0	7	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0
Jul. 24	4	0	11	9	0	0	0	0	0	0	0	0	2
"	4	8	14	0	9	0	0	4	0	0	0	0	1
"	17	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aug. 7	4	0	11	0	10	0	1	0	0	0	0	0	0
"	4	8	4	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0
"	6	0	24	23	0	1	0	0	0	0	0	0	0
"	17	0	4	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0
Aug. 21	4	0	6	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
Sep. 4	4	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
"	4	8	12	0	4	0	7	1	0	0	0	0	0
"	4	mud	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
"	6	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Total			118	40	27	6	18	6	5	6	4	6	
(%)				33.9	22.9	5.1	15.3	5.1	4.2	5.1	3.4	5.1	

育しなかった。本菌群の性状は対照菌 *V. campbellii* ATCC25920 株とはリシン脱炭酸反応とシュクロースからの酸産生で異なるが他は良く一致したことから *V. campbellii* 類似菌と同定された。本菌種は沿岸海水のみならず外洋の表面水、中層水からも分離されている (Baumann and Baumann, 1977)。

V 群 (6 菌株) は拡散集落を形成せず、40°C で発育せず、VP 反応陽性、アルギニン脱炭酸反応陽性、シュクロースから酸を産生し、サリシンを分解せず、10% 塩化ナトリウム耐性を示さない。これらの性状は対照菌 *V. anguillarum* NCMB828 株とほぼ一致していることから、本菌群は *V. anguillarum* またはその類似菌と同定された。*V. anguillarum* は魚類ピブリオ病原菌であるが、水温 20~25°C の沿岸海水から分離される (Tajima et al., 1988; Muroga et al., 1986)。

VI 群 (5 菌株) はインドールを産生し、VP 反応陰性、アルギニン脱炭酸反応陽性、ツィーン 80・キチン・デンプンを分解せず、エスクリンを分解するなどの性質は *V. nereis* の記載性状 (West and Colwell, 1984) にほぼ一致していた。この菌種は沿岸域海水から少数ながら検出されることがある (Baumann et al., 1971; Baumann and Baumann, 1977; Venkateswaran et al., 1989)。

VII 群 (6 菌株) は VP 反応、MR 試験、アミノ酸脱炭酸反応、炭水化物からの酸産生などいずれも陰性であり、*V. marinus* の記載性状 (West and Colwell, 1984) に近似していたが、リシン脱炭酸反応、硝酸塩の還元性、発育温度などで異なり、同種と同定するのは困難であった。同様に VIII 群 (4 菌株) も *V. pelagius* biovar 2 の記載性状 (West and Colwell, 1984) に近似の性質を有

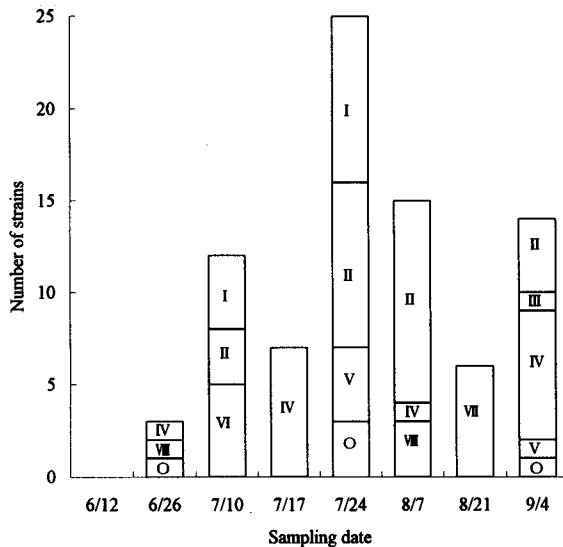


Fig. 1. Occurrence of the groups of vibrios at Station 4 in Tanabe Bay, 1990.

- I: Group I (*V. alginolyticus*-like)
- II: Group II (*V. harveyi*-like)
- III: Group III (*V. natrigens*-like)
- IV: Group IV (*V. campbellii*-like)
- V: Group V (*V. anguillarum*-like)
- VI: Group VI (*V. nereis*-like)
- VII: Group VII (unidentified group)
- VIII: Group VIII (unidentified group)
- O: Non grouping strains

していたが、40°Cでの発育、10%塩化ナトリウム耐性その他で異なり同種とは同定できなかった。また、群を形成しなかった6菌株については供試した対照菌株および *Vibrio* 属と *Photobacterium* 属菌種の記載性状 (West and Colwell, 1984; Bauman et al., 1984; Holt et al., 1994) のいずれとも一致するものはなかった。

以上の群別の結果を供試菌株の由来別に整理して、Table 2 に示した。供試菌 118 菌株中で、*V. alginolyticus* 類似菌 (I 群) が 33.9%、*V. harveyi* 類似菌 (II 群) が 22.9%、*V. campbellii* 類似菌 (IV 群) が 15.3% と多く、この 3 菌群で全体の 72.1% を占めた。この傾向は富栄養化の比較的進んだ地域でも観察されており、亜熱帯のホンコン沿岸では *V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus*、*V. harveyi*、*V. vulnificus*、*V. campbellii* の順に検出され (Chan et al., 1986)、瀬戸内海 (広島湾、備讃瀬戸、燧灘、伊予灘、周防灘) では *V. harveyi*、*V. pelagius* biovar 1、*V. splendidus*、*V. alginolyticus* の順に優勢であるという報告 (Venkateswaran et al., 1989) と類似の傾向を示している。

ところで Romalde et al., (1990a, b) はスペイン沿岸における *Mesodinium rubrum* 赤潮発生中の海水の細菌相が *V. alginolyticus*、*V. tubiashii*、*V. anguillarum* 各類似菌で占められていたことから、*M. rubrum* とこれら *Vibrio* 属 3 菌種間に何らかの相互作用があることを示唆している。一方、同海域における *Gymnodinium catenatum* 赤潮発生時には *Vibrio* 属細菌が全く検出されず、*Moraxella-Acinetobacter* 属が優勢であったと報告している (Romalde et al., 1990a)。そこで定点 4 で採取した試料由来の *Vibrio* 属内各群の出現状況を Fig. 1 に示した。I 群 (*V. alginolyticus* 類似菌) は *G. mikimotoi* の増加期に出現した。一方、II 群 (*V. harveyi* 類似菌) と IV 群 (*V. campbellii* 類似菌) は *G. mikimotoi* 赤潮最盛期以外のいずれの時期にも出現した。他の各群は菌株数が少なく、出現傾向は不明であった。

本報の結果から、田辺湾における *G. mikimotoi* 赤潮発生過程に *Vibrio* 属細菌が関与するものと仮定すれば、関与の可能性があるものは *V. alginolyticus* があげられる。また、前報 (宮崎ら, 1995) の結果から、同赤潮発生中に主要菌相となる *Moraxella-Acinetobacter* 群も合わせ、*G. mikimotoi* と各菌株との混合培養によって、細菌と赤潮藻間の相互作用を解明する必要がある。

謝 辞

本研究は水産庁のマリンバイオテクノロジーによる赤潮被害防止技術開発試験研究費によって行われた。

文 献

- Baross, J. and Liston, J. (1970). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.*, **20**, 179-186.
- Baumann, P., Baumann, L. and Mandel, M. (1971). Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckeia*. *J. Bacteriol.*, **107**, 268-294.
- Baumann, P. and Baumann, L. (1977). Biology of the marine enterobacteria: genera *Beneckeia* and *Photobacterium*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**, 39-61.
- Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J.V. (1984). Genus I. *Vibrio*. pp. 518-538. Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds). *Bergey's manual systematic bacteriology*, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Chan, K., Woo, M.L., Lo, K.W. and French, G.L. (1986). Occurrence and distribution of halophilic vibrios in subtropical coastal waters of Hong Kong. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1407-1411.
- 日高富男・河口貴史・崎田 勲 (1982). 漁場海域における微生物生態系の解析—IV. 琉球島弧周辺海

- 水中の発光細菌の菌種別分布。鹿大水産紀要, 31, 219-234.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (eds) (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.), 787 p. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Kamplmacher, E.H., van Noorleijansen, L.M., Mossel, D.A.A. and Groen, F.J. (1972). A survey of the occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* on mussel and oysters in estuarine waters in the Netherlands. *J. Appl. Bacteriol.*, 35, 431-438.
- Kaneko, T. and Colwell, R.R. (1973). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.*, 113, 24-32.
- 宮崎垂希子・東 悦子・絵面良男 (1995). 和歌山県田辺湾における細菌相の変動。北大水産彙報, 46, 19-30.
- Muroga, K., Iida, M., Matsumoto, H. and Nakai, T. (1986). Detection of *Vibrio anguillarum* from waters. *Bull. Jpn. Soc. Fish.*, 52, 641-647.
- Nealson, K.H. and Hasting, J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.*, 43, 496-518.
- Romalde, J.L., Toranzo, A.E. and Barja, J.L. (1990a). Changes in bacterial populations during red tide caused by *Mesodinium rubrum* and *Gymnodinium catenatum* in North West Coast of Spain. *J. Appl. Bacteriol.*, 68, 123-132.
- Romalde, J.L., Barja, J.L. and Tranzo, A.E. (1990b). Vibrios associated with red tides caused by *Mesodinium rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3615-3619.
- 坂崎利一 (1967). 培地学各論 (1). 232 p. 納谷書店, 東京.
- Shilo, M. and Yetinson, T. (1979). Physiological characteristics underlying the distribution patterns of luminous bacteria in the Mediterranean Sea and Gulf of Elat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 577-584.
- Tajima, K., Ezura, Y. and Kimura, T. (1988). Detection of *Vibrio anguillarum* in Otsuchi Bay as fish culture environments. *Fish Pathol.*, 22, 237-242.
- 竹内俊博・渡辺弘一・柴原敬生・中西克之 (1990). 五ヶ所湾における赤潮発生と細菌相及び環境要因との関係。p. 108-116. 石田祐三郎・畑 幸彦編, 平成元年度赤潮対策技術開発試験報告.
- Venkateswaran, K., Nakano, H., Okabe, T., Takayama, K., Matsuda, O. and Hashimoto, H. (1989). Occurrence and distribution of *Vibrio* spp., *Listonella* spp., and *Clostridium botulinum* in the Seto Inland Sea of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 559-567.
- West, P.A. and Colwell, R.R. (1984). Identification and classification of Vibrionaceae-an overview. p. 285-363. Colwell, R.R. (ed.). *Vibrios in the environment*. John Wiley & Sons. New York.
- Yamamoto, H., Ezura, Y. and Kimura, T. (1982). Effect of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Nippon Suisan Gakkaishi* 48, 1427-1431.