

富浦湾養殖場海泥から分離された *Streptococcus* 属について(予報)

村田 靖彦

緒言

近年千葉県においても、養殖ハマチに連鎖球菌症の流行がみられるようになった。そこでこの病原菌*Streptococcus* 属の伝播、感染機構を解明する手がかりを得るために、本症流行直後の富浦湾養殖場の海泥および海水から *Streptococcus* 属の分離を試み、分離された菌の性状を調べ、他県流行地のものおよび類似の腸球菌と比較検討したのでここに報告する。

材料及び方法

採泥の場所は富浦湾養殖場およびその周辺で図-1に示すとおりである。採泥はエクマンバーチによって行ない直ちに約10 gを1/2滅菌長期保存海水に入れ、そ

の抽出液の 0.5mlをMembrane filter でろ過した。この filter をBHI agar (日水) 上に置き25℃ 24hr. 培養し得られたコロニーを選んでEF培地(日水)上で黄色又は赤色に発育したものを、メチレンブルー染色により連鎖球菌であることを確認し性状検査の材料とした。海水は1mlをMembrane filter でろ過し、泥と同じ操作を行なった。又同時にハマチ病魚より分離した連鎖球菌(T-1)も併せて検査に供した。

形態学的性状、生物学的性状、生化学的性状に関する検査は、村田(1978)¹⁾に示した方法と同じで、これらのほとんどは、Cowan & Steel(1974)²⁾の manual およびHarrigan et al(1976)³⁾によって行なった。

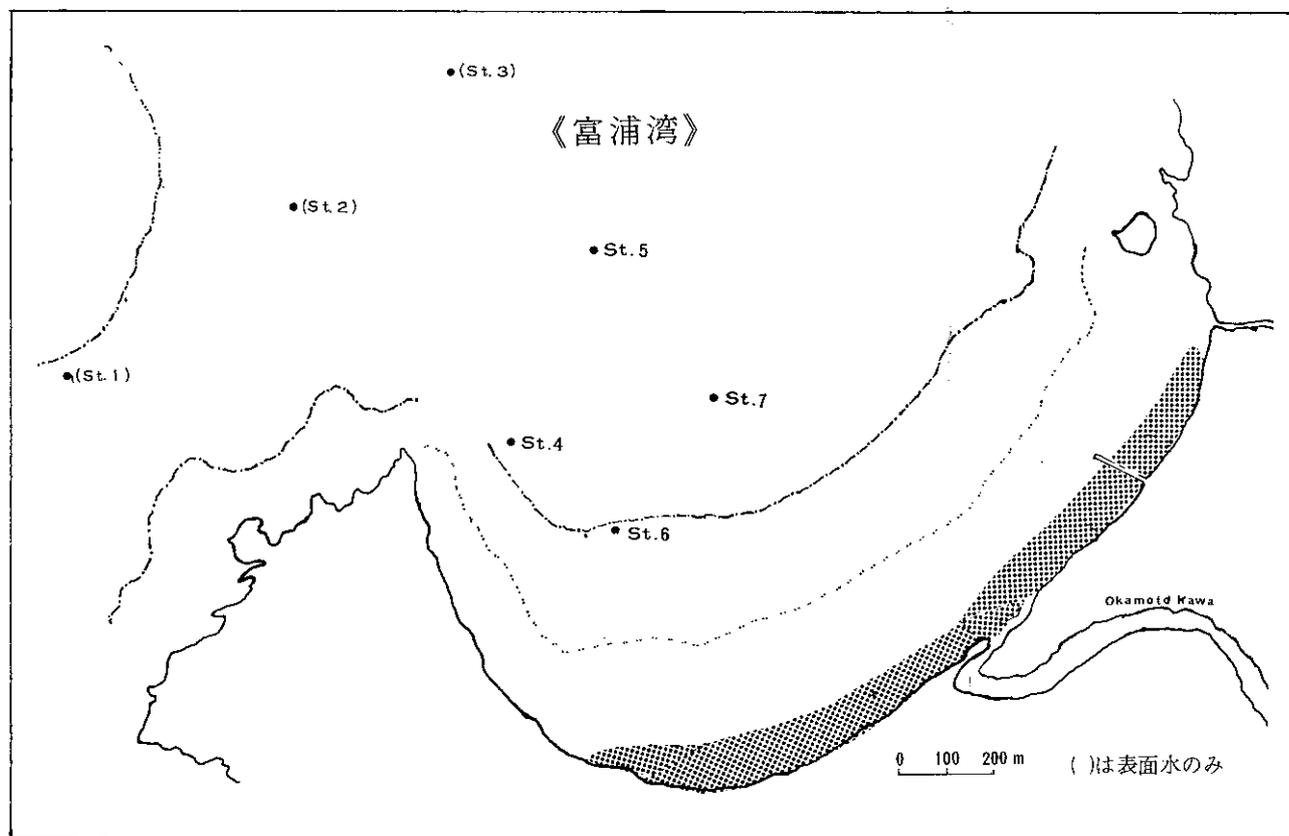


図1 採泥点図

結果及び考察

Streptococcus 属が分離されたのは St.5 の海泥中から2株だけであり、Tm-1はEF培地上で0.2mm~0.3mmの真円の黄赤色小コロニーで、Tm-2は0.2~0.5mmの赤色小コロニーであった。その性状は次のとおりである。

各種温度での発育：この結果は図-2に示した。すなわち、25℃がピークであり、比較的よく発育し、T-1株に比べて、高温に強い傾向を示した。

各種pHでの発育：この結果は図-3に示した。すなわちpH6~10でよく発育し、T-1株と比べるとpH10で異なった。

各種塩分濃度での発育：この結果は図-4に示した。すなわち魚病細菌(T-1)が塩分濃度が高くなる程発育が悪くなるのに対し、泥からの分離菌(Tm-1, Tm-2)は、塩分濃度が高くなってもあまり発育はかわらなかった。

生物学的性状：この結果は表1に示した。形態は、単または二連鎖で、その他の性状は、魚病細菌(T-1)と同じであった。

表1 分離菌の形態および各種培地での発育

Test	Tm-1	Tm-2	T-1
Cell form	Cocci	Cocci	Cocci
Size	約1.0μm	約1.0μm	約0.7μm
Gram	+	+	+
Motility	-	-	-
Growth of:			
BHI agar	+	+	+
Blood agar	+	+	+
Nutrient agar	+	+	+
MacConkey agar	-	-	-
SS agar	-	-	-
BTB Teepol agar	-	-	-
Ogawa medium	-	-	-
Endo agar	+	+	+
10% Bile agar	+	+	+
40% Bile agar	+	+	+
EF agar	yr	r	r
PEA agar	+	+	+
Growth in:			
0.1% MB milk	+	+	+
SF broth	-	-	-
Growth at:			
10℃	+	+	+
45℃	+	+	+
6.5% NaCl	+	+	+
pH 9.6	+	+	+

Cocci; 球状, r; 赤色, yr; 黄赤色

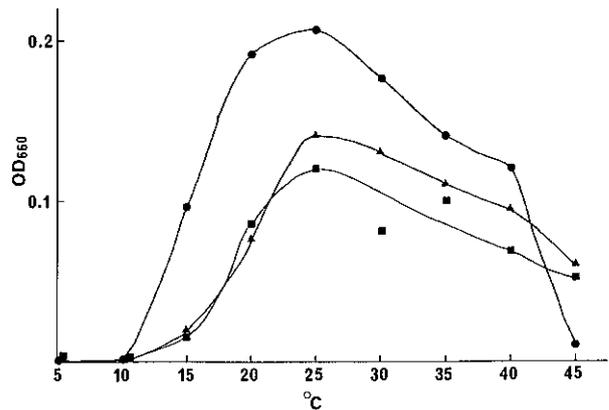


図2 分離菌の各温度における発育 (●; T-1, ▲; Tm-1, ■; Tm-2)

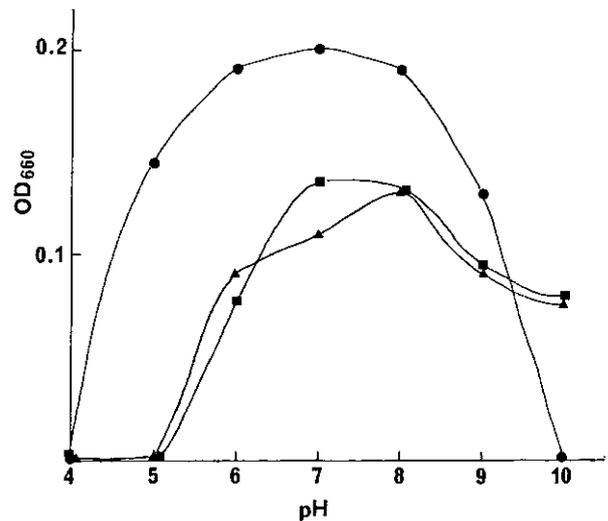


図3 分離菌の各pHにおける発育 (●; T-1, ▲; Tm-1, ■; Tm-2)

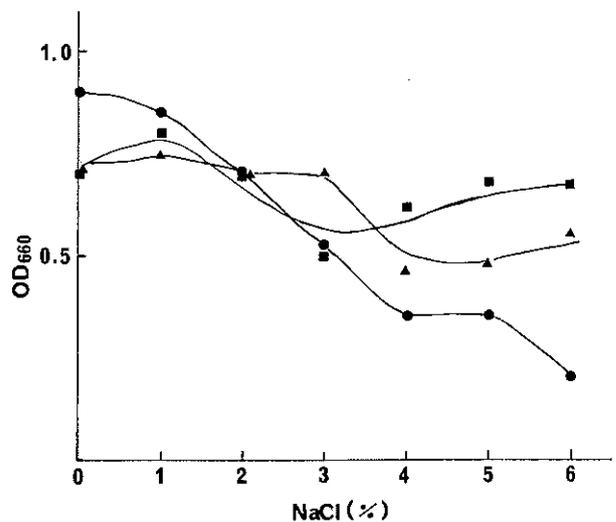


図4 分離菌の各塩分濃度における発育 (●; T-1, ▲; Tm-1, ■; Tm-2)

生化学的性状：この結果は表2-3に示した。すなわち、Tm-1、Tm-2はPT testで陽性、Arginine加水分解、Arginine脱炭酸で陰性を示し、T-1株と異なった。糖分解では、ArabinoseはTm-1で陽性、Tm-2、T-1で陰性、XyloseはTm-1、T-1で陰性、Tm-2で陽性となり、Melibiose、RoffinoseでT-1株と異なった。

今回の海泥からの分離菌は、10°C, 45°C, 6.5% NaCl, pH9.6, 0.1%メチレンブルーミルクで発育することから、Bergey's manual⁴⁾記載の *Streptococcus faecalis*, *S. faecium* の腸球菌に類似する。しかし、同じグループに入るハマチ連鎖球菌症菌(T-1)とは形態、その他いくつかの基本的性状の相異から、同一のものとは考えられない。和歌山水試⁵⁾の報告例をみると、やはりよく似た菌が海泥から分離されており、これらの類似菌と考えられる。

次に *S. faecalis*, *S. faecium*, 和歌山水試海泥分離

菌の性状との比較を表-4に示した。40% Bileでの発育は、*S. faecalis*, *S. faecium* と異なる。PT test, TTC還元では、*S. faecalis* と同様陽性である。又チロシン分解ではWakayama M-1~3は陽性であり他と異なる。したがって、多少の性状でいざれとも、異なっていることがわかる。

海泥、海水中および餌料中の *Streptococcus* 属の研究は、ハマチ連鎖球菌症病原菌の感染経路の究明の観点から、和歌山水試⁵⁾、高知水試⁶⁾、宮崎水試⁷⁾などで実施されているが、今のところはっきりとした結論はでないようである。

堀江⁸⁾は汚染指標としての腸球菌検査法について論じており、沿岸近くでは、これら腸球菌の存在の可能性もある。また魚類腸管には、*S. faecium* が多いことも鹿江⁹⁾が報告している。今回分離した菌は、*S. faecalis*, *S. faecium* と多少性状が異なるが、本来の起源がこれら腸球菌に由来することも考えられる。

表2 分離菌の生化学的性状

Test	Tm-1	Tm-2	T-1
Catalase	—	—	—
Cytochrome oxidase	—	—	—
Hugh-Leifson test	F	F	F
Indole	—	—	—
MR test	+	+	+
VP reaction	+	+	+
Citrate utilization	—	—	—
H ₂ S	—	—	—
Casein digestion	—	—	—
Litmus milk	A	A	A
Nitrate	—	—	—
Urease	—	—	—
MB reduction	—	—	—
Gluconate	—	—	—
Bile dissolution	—	—	—
PT test	+	+	—
TTC test	+	+	+
Hydrolysis of:			
Gelatin	—	—	—
Starch	—	—	—
Tyrosin	—	—	—
Hippurate	—	—	—
Esculin	+	+	+
Arginine	—	—	+
Decarboxylation of:			
Lisine	—	—	—
Arginine	—	—	+
Ornithine	—	—	—

F; 醗酵, A; 酸性

表3 分離菌の各種糖類の利用性

Test	Tm-1	Tm-2	T-1
Gas from carbohydrates	—	—	—
Acid from:			
Arabinose	+	—	—
Xylose	—	+	—
Rhamnose	—	—	—
Glucose	+	+	+
Mannose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Cellobiose	+	+	+
Lactose	—	—	—
Sucrose	+	+	—
Trehalose	+	+	+
Melibiose	+	+	—
Starch	—	—	—
Dextrin	+	+	+
Raffinose	+	+	—
Melzitose	—	—	—
Glycogen	—	—	—
Mannitol	+	+	+
Glycerol	—	—	—
Sorbitol	—	—	—
Salicin	+	+	+
Esculin	+	+	+
Inositol	—	—	—
Dulcitol	—	—	—
Adonitol	—	—	—

表4 分離菌と類似菌の比較

	T-1	Tm-1	Tm-2	S.faecalis	S.faecium	Wakayama			
						M-1	M-2	M-3	M-4
EF agar	r	yr	r	r	y	r	y	y	y
40% Bile	+	+	+	-	-				
0.04% PT	-	+	+	+	-				
SF	-	-	-	+	+	-	-	-	-
60°C 30min	+	+	+			+	+	+	+
Hydrolysis of:									
Tyrosine	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Decarboxylation of:									
Arginine	+	+	+	+	-	+	+	+	-
TTC Test	+	+	+	+	-	+	(+)	-	-
Acid from:									
Arabinose	-	+	-	-	+	-	+	+	-
Raffinose	-	+	+	-		+	+	+	-
Sucrose	-	+	+		+	+	+	+	+

r : 赤色, yr : 黄赤色, y : 黄色, () : 弱い

この報告は、方法についても検討する必要がある、又わずかの菌株についての検査が行なわれたにすぎないため、十分論議出来ないのでは予報としたが、海泥中で腸球菌類似のものの存在が確認されたので、今後これら詳しい分布、季節的変動、病原性について検討する予定である。

要 約

- 1) 連鎖球菌症流行直後、富浦湾ハマチ養殖場周辺で、*Streptococcus* 属の分離を試みた。
- 2) その結果養殖場下の海泥からEF培地で発育する2株の *Streptococcus* 属を分離し、それらの性状について調べた。
- 3) 性状検査の結果、魚病菌より高温に強く、pH 10、高塩分でもよく発育した。又PT test 陽性、40%Bile 陽性、SF培地陰性を示した。
- 4) これらの性状を、病魚よりの分離菌、*S. faecalis*, *S. faecium*, 和歌山水試海泥分離菌 M1~4 と比較したところ、どのものとも多少性状を異にした。
- 5) わずかな菌株についての検査であったが、ハマチ養殖場の海泥中のみで腸球菌類似の菌が確認されたので、さらに詳しい調査が必要と考えられた。

文 献

- 1) 村田靖彦：富浦湾養殖ハマチより分離された

- Streptococcus* 属について、本誌Vol. 37, (1978)
- 2) Cowan, S. T. : Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd ed., Cambridge University Press, London. (1974)
- 3) Harrigan, W. F. and Margaret E. McCance : Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press. (1974)
- 4) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams and Wilkins, Baltimore. (1974)
- 5) 和歌山県水産試験場：昭和51年度指定調査研究総合助成事業「病害研究」報告書（ブリの類結節症、ノカルデア症、連鎖球菌症）(1977)
- 6) 高知県水産試験場：昭和51年度指定調査研究総合助成事業、魚病研究V, (1977)
- 7) 宮崎県水産試験場：「病害防除研究」昭和51年度指定調査研究総合助成事業（ブリの類結節症、ノカルデア症、連鎖球菌症）(1977)
- 8) 堀江 進：汚染指標細菌とその検査法 日水誌, Vol. 35, No.8 P. 818-829, (1967)
- 9) 鹿江雅光他：腸球菌に関する研究, I. 冷血動物由来腸球菌について、食衛誌 8, 513-517 (1967)