

36) 細菌性出血性腹水病菌選択培地の開発 (基礎培地の検討)

山本充孝

【目的】

アユの細菌性出血性腹水病 (シュードモナス病) は養魚場で発生し、深刻な被害を与えている。しかし、本菌は病魚以外から分離された例がなく、元来どこに存在しているか不明である。これを明らかにするには環境水や天然アユから本菌を特異的に検出できる手法を開発する必要がある。そこで、本菌だけを分離できる選択培地の開発を目的として本試験では、本菌の発育には影響を与えず、一般細菌の発育を抑える基礎培地を検討した。

【方法】

供試菌株：アユ病魚由来の *Pseudomonas plecoglossicida* FPC941 株を用いた。前培養は保存菌株をハートインフュージョン(HI)寒天培地で 25℃・24 時間培養後、滅菌生理食塩水に懸濁して希釈したものを試験懸濁液として用いた。

供試培地：供試培地には、HI 培地、改変 *Cytophaga*(MCY)培地、MacConkey(MC)培地、デゾキシコレート(DC)培地、セトリマイド(CM)培地、NAC 培地、感性測定 (SD) 培地の計 7 種の寒天培地を用いた。

基礎培地の検討は、それぞれの培地における本菌の発育をコロニー形成数およびコロニーの大きさを比較して行った。また、それぞれの培地における環境水中の一般細菌の発育も検討した。

①各培地における生菌数およびコロニーの大きさの測定：コロニー形成数は、試験懸濁液 0.1ml を各平板培地 2 枚に接種し、コンラージ棒で均一に展開し、30℃で 48 時間培養後、平板培地表面に発育したコロニー数を計測し、平板 2 枚の平均値として示した。また、コロニーの大きさは、48 時間後、各培地の任意の独立した 20 ずつのコロニー直径を万能投影機(Nicon Profile Projector V-12)で計測し、平均値を求めた。

②各培地における一般細菌の生菌数の測定：一般細菌の生菌数の測定は、検水として、アユ飼育地下水池排水、コイ科魚類飼育湖水池排水を階段希釈して 0.1ml を各平板培地 2 枚に接種して 30℃で培養し、7 日後に発育コロニー数を計数した。

【結果および考察】

コロニー形成数は、HI 培地において最も多かった。HI 培地に発育した菌数を 100% とすると改変 CY 培地で 91.6%と同等の発育菌量となった他は、何れも菌数が減少した (表 1)。また、発育したコロニーの直径は HI 培地と比較した場合、改変 CY 培地だけが、明らかに小さかったが、その他の培地においてはコロニーの発育に違いは認められなかった (表 2)。

また、地下水、湖水中の細菌の中で、各培地においてコロニーを形成する一般細菌数は HI 培地を基準にすると MCY 培地では HI 培地よりも多くなったが、MC、DC 培地では発育阻止効果が認められた (表 3)。

以上のことから、*Pseudomonas plecoglossicida* の各培地におけるコロニー形成数、コロニーの成長、一般細菌の発育阻止効果を考慮すると基礎培地としては HI 培地が最も適していると考えられた。

表 1. 各培地における *Pseudomonas plecoglossicida* のコロニー形成数

	HI 培地	MCY 培地	MC 培地	DC 培地	CM 培地	NAC 培地	SD 培地
生菌数 (CFU/plate)	359	329	226	283	0	0.5	271
試験培地 / HI 培地 *100	-	91.6	63.0	78.8	0.0	0.1	75.5

培養：30℃、2日

表 2. 各培地に発育した *Pseudomonas plecoglossicida* の 48 時間後にコロニーの直径

	HI 培地	MCY 培地	MC 培地	DC 培地	CM 培地	NAC 培地	SD 培地
コロニーの直径 (mm)	2.88	2.28	2.88	2.96	-	-	2.87
±STD	±0.41	±0.22	±0.62	±0.22	-	-	±0.13

培養：30℃、2日

表 3. 地下水および湖水中の細菌の中で各培地に発育した一般細菌生菌数の 48 時間後にコロニーの直径

	地下水		湖水	
	一般細菌生菌 数 (CFU/mL)	対 HI 培地比*	一般細菌生菌 数 (CFU/mL)	対 HI 培地比*
HI 培地	36,800	-	2,100	-
MCY 培地	227,000	6.17	16,300	7.76
MC 培地	5,000	0.14	900	0.43
DC 培地	9,000	0.24	860	0.41
CM 培地	0	0	0	0
NAC 培地	0	0	0	0
SD 培地	30,000	0.82	1,500	0.71

* 対 HI 培地比 = 試験培地生菌数 / HI 培地生菌数