

37) 細菌性出血性腹水病菌選択培地の開発 (選択剤の選定)

山本充孝

【目的】

アユの細菌性出血性腹水病菌 (シュードモナス病) 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本菌の特異的検出手法の開発の必要があり、前報では基礎培地の選定を行った。そこで、本試験では、本菌の発育には影響を与えず、一般細菌の発育を効果的に抑制する選択剤およびその濃度を検討した。

【方法】

供試菌株：アユ病魚由来の *Pseudomonas plecoglossicida* FPC941、SG970718、SG020710、SG030107 の 4 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約 10³CFU/mL になるように希釈したものを試験懸濁液として用いた。

供試薬剤：供試薬剤には、*P. plecoglossicida* に感受性を示さない薬剤、ストレプトマイシン (SM)、アンピシリン (ABPC)、塩酸オキサテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP) の 4 剤を用いた。SM、ABPC、OTC については、それぞれ 0, 100, 200µg/mL になるように、CP については 0, 10, 25, 50, 100, 200µg/mL になるように添加した培地を作製した。

各培地における生菌数の測定：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、48 時間後に、コロニーの大きさを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) で計測して平均値を求めて測定した。

【結果および考察】

P. plecoglossicida の発育に対する各供試薬剤濃度の影響を基礎培地である HI 寒天培地に添加して検討した結果を表 1 および表 2 に示した。SM では、200µg/mL 添加で FPC941、SG030107 株の発育コロニー数が 30%、59% に減少した。ABPC では、200µg/mL 添加で FPC941 株の発育コロニー数が 88% になった以外は影響は認められなかった。OTC では、200µg/mL 添加で SG970718、SG020710、SG030107 株の発育コロニー数が 77~79% になった。CP では、200µg/mL 添加では何れの株においても発育コロニー数が減少し、42% 以下になった。50µg/mL 添加では FPC941、SG970718 株において 58~62% に減少した。

供試薬剤濃度の *P. plecoglossicida* コロニーの成長への影響を表 3 および表 4 に示した。SM および OTC では、200µg/mL 添加でコロニーの大きさが減少した。ABPC では、200µg/mL 添加で対照と比較してコロニーが大きくなる傾向が認められた。CP では、100µg/mL 以上の添加でコロニーの大きさが減少した。

これらの結果から、選択培地として用いることができる薬剤濃度は、SM および APPC においては 100µg/mL 以下、OTC においては 200µg/mL 以下、CP においては 25µg/mL 以下とする必要があると思われる。

表 1. *Pseudomonas plecoglossicida* の発育に対する供試薬剤濃度の影響

薬剤	菌株	コロニー数 (CFU/plate)		
		薬剤濃度 ($\mu\text{g/mL}$)		
		0	100	200
SM	FPC941	121	124	36
	SG970718	81	82	77
	SG020710	96	115.5	87
	SG030107	99	117	58
ABPC	FPC941	121	138	107
	SG970718	81	100	91
	SG020710	96	114	111
	SG030107	99	110	110
OTC	FPC941	121	127	115
	SG970718	81	69	64
	SG020710	96	82.5	73.5
	SG030107	99	98	78

培養 : 30°C、2 日

表 2. *Pseudomonas plecoglossicida* の発育に対するグラムフェニコール濃度の影響

薬剤	菌株	コロニー数 (CFU/plate)					
		薬剤濃度 ($\mu\text{g/mL}$)					
		0	10	25	50	100	200
CP	FPC941	267.5	201.5	253.5	166	196	76.5
	SG970718	99	103.5	77.5	57	42.5	9
	SG020710	315.5	318	327	236	244.5	131.5
	SG030107	62	74.5	62	61	43.5	15.5

培養 : 30°C、2 日

表 3. *Pseudomonas plecoglossicida* のコロニー成長に対する供試薬剤濃度の影響

薬剤	菌株	コロニーの直径 (mm)		
		薬剤濃度 ($\mu\text{g/mL}$)		
		0	100	200
SM	FPC941	3.36	2.91	1.93
	SG970718	2.69	2.44	2.40
	SG020710	2.96	2.67	2.71
	SG030107	3.16	2.84	2.47
ABPC	FPC941	3.36	4.06	5.77
	SG970718	2.69	2.80	3.62
	SG020710	2.96	3.02	4.15
	SG030107	2.88	3.87	4.66
OTC	FPC941	3.36	3.12	2.36
	SG970718	2.69	2.30	1.43
	SG020710	2.96	2.48	1.55
	SG030107	2.88	3.03	2.16

培養 : 30°C、2 日

表 4. *Pseudomonas plecoglossicida* のコロニー成長に対するグラムフェニコール濃度の影響

薬剤	菌株	コロニーの直径 (mm)					
		薬剤濃度 ($\mu\text{g/mL}$)					
		0	10	25	50	100	200
CP	FPC941	2.69	2.64	2.66	2.69	2.38	2.31
	SG970718	2.16	2.10	2.31	2.25	1.99	1.69
	SG020710	2.78	2.66	2.70	2.64	2.38	2.36
	SG030107	2.24	2.27	2.38	2.19	2.15	1.72

培養 : 30°C、2 日