

38) 細菌性出血性腹水病菌選択培地の開発 (合剤の検討)

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、前報では本菌の発育には影響与えず、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の検討を行った。その後の試験において、ストレプトマイシン(SM)、アンピシリン(ABPC)はアユ養魚場等の飼育排水中の一般細菌に対して耐性株が多く、選択効果が低いことから除外した。本試験では、アユ飼育水からの分離を試みた際にいくつかの検水において真菌が繁茂して判定不能となったことから、抗真菌剤および選択剤の組み合わせを検討した。

【方法】

供試菌株：アユ病魚由来の *Pseudomonas plecoglossicida* FPC941、SG941219A、SG970718、SG020710、SG030107の5株を用いた。

供試薬剤：①抗真菌剤の検討；本選択培地に添加する抗真菌剤としてクリスタルハイレット(CV) 5 μ g/mL、アンホテリシンB(AMPH-B) 80 μ g/mL、シクロキシミド(CHX) 50 μ g/mLの3剤の *P. plecoglossicida* に対する影響を検討した。

②薬剤の併用による影響の検討；供試培地には、これまでの試験において *P. plecoglossicida* の発育には影響せず、環境水中の一般細菌の発育を抑える薬剤として、塩酸チシテトラサイクリン(OTC) 100 μ g/mL、クララムフェニコール(CP) 10 μ g/mLを用いた。

各培地における生菌数の測定：前培養はハートインフュージョン(HI)寒天培地で25 $^{\circ}$ C・24時間培養後、約10³CFU/mLになるように滅菌生理食塩水に懸濁したものを試験懸濁液として用いた。生菌数の測定は、試験懸濁液0.1mLを各平板培地2枚に接種し、均一に展開し、30 $^{\circ}$ Cで48時間培養後、発育したコロニー数を計測した。

選択培地における一般細菌の発育阻止効果の検討：培養は、2地点の河川水、4つのアユ養魚場の飼育水または飼育排水の計8種の検水を用い、希釈して0.1mLを各培地に接種して30 $^{\circ}$ Cで5日間行った。発育阻止効果は、検水1mL中に各培地においてコロニーを形成する細菌数を比較して評価した。

【結果および考察】

P. plecoglossicida の発育に対する抗真菌剤の影響を検討した結果を表1に示した。CVは、SG941219A株の発育を完全に阻害した。AMPH-Bは、供試した *P. plecoglossicida* すべての発育を阻害した。CHXは、発育を阻害する傾向は認められなかったことから、抗真菌剤として有効と思われた。次に *Pseudomonas plecoglossicida* の発育に対する供試培地の影響はOTC-CP培地、OTC-CP-CHX培地ともにSG941219A株では発育を完全に阻害した。その他はOTC-CP-CHX培地においてSG970718株の発育を80%に減少させた以外は大きな阻害は認められなかった(表2)。SG941219A株はOTC感受性株であるが、1994年以降、県内ではOTC感受性株は確認されていないことから、本培地は環境水からの分離に用いることができると考えられた。

供試培地における環境水中の一般細菌の発育は薬剤無添加の培地では、10⁴~10⁵CFU/mLの細菌が培地に発育したが、OTC-CP-CHX培地ではその発育を0.021~0.31%に抑制しており、非常に高い一般細菌の発育阻止効果が認められた。

これらのことから、OTC-CP-CHX培地は環境水中から *P. plecoglossicida* を非常に簡便で効率よく検出するために有効な選択培地であると思われた。

表 1. *Pseudomonas plecoglossicida* の発育に対する抗真菌剤の影響

菌株	コロニー数 (CFU/plate)			
	供試薬剤および濃度 ($\mu\text{g/mL}$)			
	対照	CV ($5\ \mu\text{g/mL}$)	AMPH-B ($80\ \mu\text{g/mL}$)	CHX ($50\ \mu\text{g/mL}$)
FPC941	202	200	0	189
SG941219A	225.5	0	0	225.5
SG970718	177.5	144	0	193
SG020710	127.5	132.5	0	143
SG030107	278.5	262.5	0	277.5

培養条件: 30°C 、2 日

表 2. *Pseudomonas plecoglossicida* の発育に対する供試薬剤の影響

菌株	供試培地		
	コロニー数 (CFU/plate)		
	HI (対照)	OTC-CP ^{*1}	OTC-CP- CHX ^{*1}
FPC941	135	128	133
SG941219A	296	0	0
SG970718	315.5	319.5	253
SG020710	151	164	138
SG030107	279	297.5	271

^{*1} 供試濃度: OTC; $100\ \mu\text{g/mL}$, CP; $10\ \mu\text{g/mL}$, CHX $50\ \mu\text{g/mL}$
 培養条件: 30°C 、2 日

表 3. 供試培地における環境水中の一般細菌の発育抑制効果

	供試培地		
	コロニー数 (CFU/mL)		
	HI (対照)	OTC-CP	OTC-CP- CHX
河川水-1	6.4×10^4	1.1×10^3	1.5×10^2
河川水-2	7.4×10^4	1.3×10^3	1.4×10^2
A 業者飼育水	3.3×10^5	3.0×10^3	1.4×10^2
B 業者飼育水	4.7×10^5	5.9×10^3	1.4×10^3
B 業者排水	4.8×10^5	2.3×10^3	1.8×10^2
C 業者排水	6.4×10^5	2.6×10^3	6.9×10^2
D 業者飼育水	4.7×10^5	1.8×10^3	1.0×10^2
D 業者排水	5.8×10^5	2.2×10^3	5.0×10^2

培養条件: 30°C 、5 日