

ゼラチン・ディスク法による 魚病細菌の保存について*

照屋忠敬

1. 目的及び内容

菌株保存において、性状を変化させないで長期的に保存することはなかなか困難なことである。現在、最も長期的に性状を変化させないで保存できる方法は、凍結乾燥保存と凍結保存であるといわれている。しかし、凍結乾燥法や凍結法は操作がかなり複雑で、しかも装置が高価なので小実験室では実行が難しい。

今回は、小実験室でも実行可能な乾燥法の一方法であるゼラチン・ディスク法を用いて魚病細菌の菌株の保存を試みた。

使用した魚病細菌は *Streptococcus* sp.、*Aeromonas salmonicida*、*Edwardsiella tarda*、*Vibrio anguillarum*、*Aeromonas hydrophila*、*Pasteurella piscicida*、 β -*Streptococci* であったが、一年後、ゼラチン・ディスクより再分離されたのは *Streptococcus* sp.、 β -*Streptococci*、*Edwardsiella tarda* であった。

御指導をいただいた宮崎大学農学部北尾忠利教授に御礼申し上げます。

2. 方法

(1) ゼラチン・ディスク用試薬

A液：ブドウ糖5gとスキムミルクを、蒸留水100mlに加え、よく混合してスクリーキャップ試験管に分注する。それを110°C10分間滅菌した後、急冷して4°Cに保存する。PHは7.2~7.4に調整。

B液：5%L-アスコルビン酸ナトリウム水溶液。使用前に濾過滅菌して用いる。

C液：20%ゼラチン(Difco)水溶液。スクリーキャップ試験管に分注し、121°C15分間滅菌、その後4°Cに保存する。

(2) 使用菌株及び前培養

使用菌株及び前培養の培地と培養温度は表-1に示した。使用菌株は宮大農学部水産衛生教室保存の魚病由米菌7種25株を用いた。

乾燥法はディスクの乾燥時に菌数の減耗がはげしいので、 10^9 ~ $10^{10}/ml$ 程度の菌量を必要とする。よって、前培養の平板培養の枚数は4~5枚程度必要である。 β -*Streptococci* は液体培地も併用した。

(3) ゼラチン・ディスク調製法

* 昭和56年度日本水産資源保護協会魚病研修 B₁コース報告の一部

表-1 使用菌株

No	菌名	スタムNo.	使用培地	培養温度
1	<i>Streptococcus</i> sp. (ハマチ)	NGS 8101	THA	30°C
2	"	MZS 8109	"	"
3	"	KGS 8115	"	"
4	<i>Aeromonas salmonicida</i>	MZS 8101	HI	20°C
5	"	MC 8102	"	"
6	"	MC 8103	"	"
7	<i>Edwardsiella tarda</i> (マダイ)	NG 8101	"	30°C
8	" (ヒラメ)	NG 8103	"	"
9	" (ウナギ)	MZ 81011	"	"
10	" (ヒラメ)	(PO8112)	"	"
11	<i>Vibrio anguillarum</i> (type A)	SG 8118	IHI	"
12	" (type B)	PT 81006	"	"
13	" (type C)	PT 81023	"	"
14	" (type KS)	KS - 1	"	"
15	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KGS 8101	HI	"
16	"	" 8105	"	"
17	"	" 8106	"	"
18	"	" 8107	"	"
19	"	" 8108	"	"
20	<i>Pasteurella piscicida</i>	HI 8148	2SNA	25°C
21	"	" 8149	"	"
22	"	" 8150	"	"
23	β -Sfretococci (アユ)	SGSA 8004	THA and TH	30°C
24	" (ニジマス)	MZS 8101	"	"
25	" (ティラピア)	KST - 2	"	"

THA : Todd Hewitt Agar

HI : Heart Infusion Agar

IHI : 1% NaCl add Heart Infusion Agar

2SNA : 2% NaCl and 0.3% Yeast extract add Nutrient Agar

TH : Todd Hewitt broth

A液はミキサーでよく混合し、C液は50°Cで融解した後、A、B、C液を各々35°Cのウォーターバスに保つ。A液を0.5 ml、B液を0.1 ml、C液を0.5 mlずつ小試験管に分注し、前培養で培養した菌をかき集め、 $10^9 \sim 10^{10}$ /ml程の菌液を作る。これを毛细管ピペットでパラフィンロシ（ロシを140°C~145°Cに保ったパラフィン中に入れ、5分間放置後、滅菌ガラスシャーレに入れる）に1滴づつ落す。これを五酸化リンかシリカゲルの入った、デシケーターか嫌気培養用ジャーで減圧乾燥しゼラチン・ディスクとする。乾燥後シリカゲル入り的小ビンに移し4°Cで保存する。

(4) 試し培養

ゼラチン・ディスク法は完全に無菌的に操作するのは困難なので、菌数が十分に存在するか、雑菌の混入がないかどうか、試し培養を行う必要がある。

試し培養は滅菌小試験管に0.1 mlの液体培地を入れ、それにゼラチン・ディスクを1~2枚入れる。これを35~37°Cのウォーターバスで5分加温溶解し、さらにミキサーで均等に浮遊液とする。この液を1滴、平板培地にとりコンラージ棒で広げ、その菌株の滴温で24時間培養する。

発育したコロニーの判定は宮大農学部水産衛生教室に保存している抗血清を用いてスライド凝集反応で調べた。

(5) 1年後の保存試験

1年後（1982年12月、ゼラチン・ディスク作製は1981年11月）、菌株の保存状態を試し培養と同じ方法で調べた。対照として1年前にクックドミート培地に接種した菌株についても再分離を試みた。

3. 結果及び考察

試し培養の結果は表-2に示した。

A. salmonicida、*V. anguillarum*、*Past. piscicida* は試し培養の分離コロニーがきわめて少なかった。*A. salmonicida* は低温菌であるためゼラチン・ディスク法の操作温度（35~37°C）では菌の減耗が激しいものと思われる。同じく、*V. anguillarum*、*Past. piscicida* も35~37°Cの温度域には弱いと思われる。又、*Past. piscicida* は前培養の時から菌の発育が悪く、多量の菌を集めることができなかったものも一因であろう。

β -*Streptococci* も前培養での菌の発育が悪かったが、平板と液体培地の併用である程度の量を得ることができた。前培養での増菌法の検討も必要と思われる。

Strepto. sp.、*E. tarda*、*A. hydrophila*、 β -*Streptococci* の試し培養はすべて培地全面に発育し、抗血清によるスライド凝集反応もすべて(+)であった。

1年後の菌株保存状態は表-3に示した。

1年後に菌の再分離がみられたのは *Streptococcus sp.*、 β -*Streptococci*、*E. tarda* であった。

Streptococcus sp. 及び β -*Streptococci* はクックドミート培地では再分離がみられず、

表-2 ゼラチン・ディスクの試し培養の結果

No	菌名	スタム No	コロニーの出現状況	抗血性	凝集反応
1	<i>Streptococcus</i> sp.	NGS 8101	+++	NGT7754(-)	+
2	"	MZS 8109	"	"	+
3	"	KGS 8115	"	"	+
4	<i>Aeromonas salmonicida</i>	MZS 8101	-	MIMATA	
5	"	MC 8102	±	"	+
6	"	MC 8103	+	"	+
7	<i>Edwardsiella tarda</i>	NG 8101	+++	北 研	+
8	"	NG 8103	"	"	+
9	"	MZ 81011	"	"	+
10	"	(PO8112)	"	"	+
11	<i>Vibrio anguillarum</i> A	SG 8118	"	PT-24	+
12	" B	PT 81006	+	PT-493	+
13	" C	PT 81023	±	PT-213	+
14	" KS	KS - 1	"	KS - 1	+
15	<i>Aeromonas hydrophila</i>	KGS 8101	+++	67-R-24	+
16	"	" 8105	+++	"	+
17	"	" 8106	"	"	+
18	"	" 8107	"	"	+
19	"	" 8108	"	"	+
20	<i>Pasteurella piscicida</i>	HT 8148	±	エヒメ	+
21	"	" 8149	"	"	+
22	"	" 8150	+	"	+
23	β -streptococci	SGSA8004	+++	ティラピア	+
24	"	MZS 8101	"	"	+
25	"	KST - 2	"	"	+

- 発育せず
- ± 十数ヶ発育
- + 数十ヶ発育
- ++ ほぼ全面に発育
- +++ 全面に発育

表-3 ゼラチン・ディスクの1年後の保存状態

No.	菌名	スタムNo.	抗血清	ゼラチンディスク	クックドミート
1	<i>Streptococcus</i> sp.	K G S 8 1 0 1	NGT7754	+	発育せず
2	"	M Z S 8 1 0 9	(-)	+	"
3	"	K G S 8 1 1 5		+	"
4	<i>Aeromonas salmonicida</i>	M Z S 8 1 0 1	MIMATA	発育せず	+
5	"	M C 8 1 0 2		"	+
6	"	M C 8 1 0 3		"	発育せず
7	<i>Edwardsiella tarda</i>	N G 8 1 0 1	NG 8102	+	+
8	"	N G 8 1 0 3		+	+
9	"	M Z 8 1 0 1 1		+	+*
10	"	P O 8 1 1 2		+	+*
11	<i>Vibrio anguillarum</i> A	S G 8 1 1 8	PT-24	発育せず	+
12	" B	P T 8 1 0 0 6	PT-493	"	+
13	" C	P T 8 1 0 2 3	PT-213	"	発育せず
14	" KS	K S - 1	K S - 1	"	"
15	<i>Aeromonas hydrophila</i>	K G S 8 1 0 1	67-R-24	+	+*
16	"	K G S 8 1 0 5		発育せず	+
17	"	K G S 8 1 0 6		"	+
18	"	K G S 8 1 0 7		"	発育せず
19	"	K G S 8 1 0 8		"	+
20	<i>Pasteurella piscicida</i>	H T 8 1 4 8		発育せず	発育せず
21	"	H T 8 1 4 9		"	"
22	"	H T 8 1 5 0		"	"
23	β - <i>Streptococci</i>	SGSA 8 0 0 4	K S T - 2	+	発育せず
24	"	M Z S 8 1 0 1		+	"
25	"	K S T - 2		+	"

+ 再分離された菌が抗血清に凝集

* コンタミ有り

ゼラチン・ディスク法は適していると思われる。E. tardaはクックドミートでも保存できた。

A. salmonicidaは再分離できず、低温菌であるA. salmonicidaにはゼラチン・ディスク法は不適であろう。V. anguillarumやA. hydrophilaも再分離できなかった。

Past. piscicidaはゼラチン・ディスク及びクックドミートにも保存できず、現行の凍結法が良いと思われる。

4. 成果の要約

魚病細菌7種25株を用いてゼラチン・ディスク法で菌の保存について実験を行ってみた結果、Streptococcus sp.、 β -Streptococcii、E. tardaは一年後も再分離されたが、A. salmonicida、A. hydrophila、V. anguillarum、Past. piscicidaは再分離されなかった。

5. 残された問題点

魚病細菌は水族由来なので、操作段階で35~37°Cの温度域をつかうゼラチン・ディスク法には問題があると思われる。又、ゼラチン・ディスク法は保存菌数を $10^9 \sim 10^{10}/ml$ と多量を必要とするが、Past. piscicidaなどのように前培養の難かしい細菌では不向であると思われる。

参考文献

小原 寧・山井志朗 (1980) ゼラチン・ディスクによる菌株の保存法 メディアサークルVol. 25, No.4 P 95

医科学研究所学友会 (1976) 細菌学実習提要 (改訂5版) P 159~164 丸善 東京