

ノリ無基質糸状体の培養中に出現する細菌類の抑制法

福永 剛
(有明海研究所)

Bactericidal Method of Cultured Free-Conchocelis of *Porphyra* spp.

Takeshi FUKUNAGA
(Ariakekai Laboratory)

現在ノリ養殖に用いられている無基質糸状体（以下、フリー糸状体という。）の多くは、養殖漁場で見つけられた生長や色合いの良い葉体を母藻として採取されている。フリー糸状体の採取時には滅菌海水で母藻を十分洗浄して夾雑物を極力除去するものの、細菌類、真菌類、また他の藻類（珪藻、藍藻、緑藻）を完全に除去するのは困難である。これらの夾雑物は、通常の培養やカキガラへの移植（種入れ）ではほとんど問題がないが、漁業者に種として配布するために高栄養の条件下で大量培養する場合には、バクテリアが大量に繁殖し、培養が困難になる場合が多い。また、品種識別を目的としてDNAを抽出する場合には、これらの夾雑生物のDNAがコンタミすることでノリのDNAとの区別が困難になるなどの問題が生じている。

そこで、今回はフリー糸状体の純粋培養を目的とした試験の一環として、フリー糸状体に混在する細菌の数と種類を調べるとともに薬剤（抗菌剤）による細菌の抑制効果を検討した。

方 法

1.フリー糸状体および培養海水中の生菌数

供試したフリー糸状体：研究所内においてSWMⅢ改

表1 試験に使用したフリー糸状体

略号	株名	株の由来
A	BCA	1992年採取
B	NO-NG元株	1989年採取
C	NT	1989年採取
D	T14	1988年採取
E	FA89	1989年プロトプラスト培養中高生長個体を選抜

変培地を用いて100ml当たりの湿重量1～3gを19℃のインキュベーターで保存・培養していたフリー糸状体5株（表1）を用いた。

生菌数の測定：

①フリー糸状体

フリー糸状体の表面に付着している細菌数の計数は、以下の方法により行った。まず、フリー糸状体を滅菌ガーゼでよく吸水した後に約0.1gを秤量し、次いでこれに10mlの滅菌海水と破碎を促すため少量のガラスビーズを加えて十分磨りつぶし、懸濁液とした。以後は10倍階段希釈法を用いてZoBell 2216E寒天平板培地に混釈し、25℃で培養した。生菌数は、培養開始72時間後に培地上に発育してきたコロニーを数を数え、これをフリー糸状体湿重量1g当たりに換算して求めた。

②培養海水

培養海水の場合は、フリー糸状体と同様の方法で、1ml当たりの生菌数として求めた。

2.分離された細菌の種類

生菌数測定時にAおよびB株のフリー糸状体および培

表2 感受性試験に用いた薬剤

種類	薬剤名
ペニシリン系	ベンジルペニシリン アンピシリン
アミノグリコシド系	ストレプトマイシン カナマイシン
マクロライド系	ジョサマイシン
リンコマイシン系	リンコマイシン
テトラサイクリン系	テトラサイクリン オキシテトラサイクリン
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール
ポリペプチド系	コリスチン
キノロン系	ナリジクス酸

養海水から分離されたコロニーの中から無作為に30個を単離培養し、S.T.Cowan¹⁾の第一次鑑別表に従って性状検査を行い、属レベルまでの同定を行った。

3. 主な細菌に対する薬剤感受性

B株から分離された細菌の中から優占種であった *Corynebacterium* 属、*Flavobacterium* 属および *Staphylococcus* 属の3株について、表2に示した11薬剤に対する薬剤感受性試験（ディスク法）を行った。

4. 薬剤の殺菌効果の検討

薬剤感受性試験の結果から、特に感受性の高かったオキシテトラサイクリンとクロラムフェニコールを用いて殺菌効果の検討を行った。薬剤の濃度は0, 25, 50, 100, 500, 1000ppmとし、作用時間は10, 30, 60, 120, 720分とした。試験に供したフリー系状体は、前述のB株を用い、これを約0.01g秤量して所定の薬剤濃度と時間で作用させた後に、前述と同様の方法で生菌数を測定し、1g当たりの生菌数を求めた。また、薬剤処

理によるフリー系状体の損傷程度は、蛍光顕微鏡下で、無処理の系状体と比較してその影響を観察した。

結 果

1. フリー系状体および培養海水中の生菌数

フリー系状体および培養海水中の生菌数を表3に示した。生菌数はフリー系状体中が $10^5 \sim 10^8$ CFU/g・wetbasis、培養海水が $10^2 \sim 10^5$ CFU/mlであった。

この結果から、フリー系状体自体にかなりの数の細菌が附着しているのが分かった。

表3 フリー系状体および培養海水中の生菌数

株名	系状体 (CFU/g・wetbasis)	培養海水 (CFU/ml)
A	2.5×10^7	5.4×10^2
B	7.1×10^5	1.1×10^3
C	7.6×10^8	2.6×10^5
D	1.6×10^8	4.8×10^3
E	1.2×10^8	1.2×10^4

表4 フリー系状体および培養海水の細菌相

株名	系状体から分離された細菌			培養海水から分離された細菌		
	種類	コロニー数	出現率 (%)	種類	コロニー数	出現率 (%)
A	<i>Corynebacterium</i>	27/30	90	<i>Corynebacterium</i>	21/30	70
	<i>Flavobacterium</i>	2/30	6.7	<i>Flavobacterium</i>	3/30	10
	その他	1/30	3.3	<i>Staphylococcus</i>	4/30	13.3
B	その他			その他	2/30	6.7
	<i>Corynebacterium</i>	13/30	43.3	<i>Corynebacterium</i>	24/30	80
	<i>Flavobacterium</i>	4/30	12.1	<i>Flavobacterium</i>	4/30	13.3
	<i>Staphylococcus</i>	6/30	20	その他	2/30	6.7
	<i>Micrococcus</i>	2/30	6.7			
	その他	5/30	16.7			

表5 分離菌に対する薬剤感受性

薬剤名	<i>Corynebacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Staphylococcus</i>	効果
ベンジルペニシリン	-	+++	+++	-
アンピシリン	-	++	+++	-
ストレプトマイシン	++	-	+++	-
カナマイシン	++	+++	-	-
ジョサマイシン	-	++	+++	-
リンコマイシン	-	-	+++	-
テトラサイクリン	++	+++	+++	+
オキシテトラサイクリン	+++	+++	+++	++
クロラムフェニコール	+++	+++	+++	++
コリスチン	-	-	-	-
ナリジクス酸	-	-	-	-

表6 オキシテトラサイクリンの濃度別-処理別
付着細菌数 (×10³CFU/g)

処理濃度 (ppm)	0	25	50	100	500	1000
0	1442	1442	1442	1442	1442	1442
10	1500	28	23	44	51	240
30	860	100	60	730	11	16
60	2600	840	36	1000	10	8.5
120	1600	180	420	210	15	<1
720	650	860	580	37	82	44

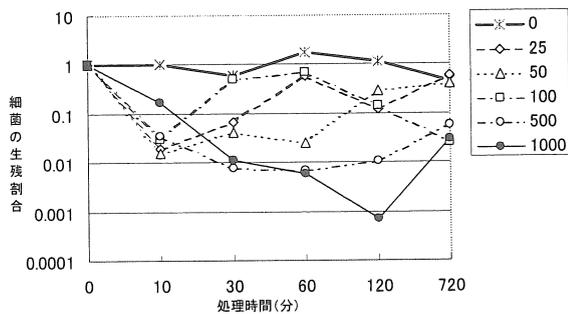


図1 オキシテトラサイクリンによる
フリー系状態付着細菌抑制効果

2.分離された細菌の種類

供試菌株の同定結果を表4に示した。最も多く出現したのはグラム陽性のCorynebacterium属で、ついでグラム陰性のFlavobacterium属が多かった。これはA, B株のフリー系状態と培養海水に共通の傾向であった。この他にはグラム陽性菌のStaphylococcus属やMicrococcus属が確認された。

3.主な細菌に対する薬剤感受性

薬剤感受性試験の結果を表5に示した。3株に共通して感受性を示した薬剤は、今回試験に供した11種類の薬剤のうちテトラサイクリン, オキシテトラサイクリンおよびクロラムフェニコールの3種であった。

4. 薬剤の殺菌効果の検討

各処理区における生菌数の変化を表6, 7に示した。また, 薬剤の抑制効果を見るために浸漬処理前の生菌数を1として, その後の生菌数の推移を割合で整理したものを図1, 2に示した。なお, グラフ化に際して, 検出限界以下は生菌数を便宜上1×10³CFU/g・wetbasisとして計算した。

オキシテトラサイクリンについては, 1000ppm, 120分の処理で明らかな細菌数の減少が認められたが,

表7 クロラムフェニコールの濃度別-処理別
付着細菌数 (×10³CFU/g)

処理濃度 (ppm)	0	25	50	100	500	1000
0	722	722	722	722	722	722
10	610	850	1200	540	360	1500
30	430	540	130	470	640	730
60	1200	310	760	230	450	320
120	390	390	210	1600	690	790
720	980	290	590	540	430	160

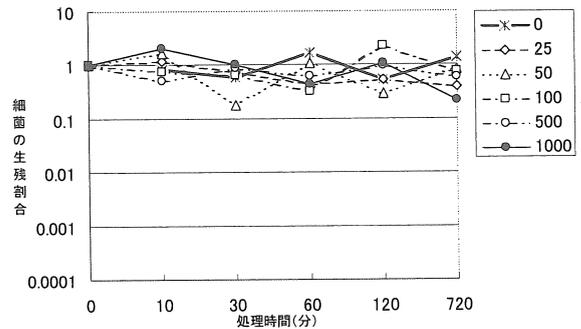


図2 クロラムフェニコールによる
フリー系状態付着細菌抑制効果

クロラムフェニコールの場合は, 減少がみられず効果は少ないと判断された。また, 両剤の処理による損傷は, 全く認められなかった。

考 察

今回はフリー系状態の無菌化を目的として, フリー系状態に付着する細菌の種類と数を調べるとともに薬剤(抗菌剤)の感受性と実用性を検討した。その結果, フリー系状態の株分けなどの操作は無菌的に行われているものの, 糸状体自体に多数の細菌が付着していることが分かった。しかも, 今回調べた2株において細菌相がほぼ一致していたこと, また, 通常海水の細菌相と異なりグラム陽性菌の占める割合が非常に高かったことから, フリー系状態保存株特有の細菌相を形成しているものと考えられた。また, 薬剤感受性試験や殺菌効果の検討からオキシテトラサイクリンを使用することで抑制効果が認められ, しかも薬剤処理によるフリー系状態の損傷も認められなかったことから, 抗菌剤処理による細菌の抑制は可能であると考えられた。今後はさらに効果的な手法を検討するとともに, 他の藻類や真菌類などの除去を試みて, どの程度の夾雑物を排除すればDNA解析の材料として使用できるかを検討する必要がある。

要 約

- 1) 培養中におけるフリー糸状体の無菌化を目的として、フリー糸状体に付着する細菌の数とその種類を調べるとともに薬剤（抗菌剤）の感受性を検討した。
- 2) フリー糸状体および培養海水中の生菌数はフリー糸状体で $10^5 \sim 10^8$ CFU/g・wetbasis, 培養海水で $10^2 \sim 10^6$ CFU/mlであった。
- 3) フリー糸状体と培養海水に共通して最も多くみられたのはグラム陽性の*Corynebacterium*属で、ついでグラム陰性の*Flavobacterium*属が多かった。
- 4) 出現頻度の高い3株に共通して強い感受性を示した

薬剤は、オキシテトラサイクリンとクロラムフェニコール、次いでテトラサイクリンの3種であった。

- 5) オキシテトラサイクリン1000ppm, 120分の処理で細菌数の減少が認められた。しかし、クロラムフェニコールの処理では減少がみられず効果はないと判断された。また、薬浴によるフリー糸状体への影響は見られなかった。

文 献

- 1) S.T.Cowan :医学細菌同定の手引き（坂崎利一訳），近代出版，東京，1984，pp. 62-164.