

硝酸塩還元性細菌の簡便識別法

松本 宗人[※]・西鉢雄二郎[※]・萱島 隆之^{※※}

Muneto MATSUMOTO, Yuujiro NISHITAI and
Takayuki KAYASHIMA

A Rapid Method for the Differentiation of Nitrate Reducer by Reagent-Agar Overlay Technique

細菌類の硝酸塩還元性の検査は0.1%の硝酸塩を含むペプトン水培地に被検菌を培養した後、その培養液に試薬を加えて培地中に生成された亜硝酸を検出する液体培養法が常法とされている。⁽¹⁾従ってこの方法で自然環境中から硝酸塩還元性細菌を分離したり、あるいはその分布状況を調べるには、分離源試料から平板培養によって得られたすべてのコロニーについて、それぞれ液体培養で亜硝酸生成の有無を検出する非常に煩雑な作業が必要である。

このような煩わしさを解消するために、平板培養で生じたコロニー上に試薬を含む寒天液を重層して平板上の全コロニーの硝酸塩還元性の有無を識別する簡易な方法を考察した。

技法及び結果

方式は酒母中の清酒酵母純度測定に用いられるTTC重層法⁽²⁾などで行なわれる試薬寒天重層法によるものである。その概略は Fig. 1. に示すように、コロニーが生じた平板培養上に硝酸塩とジアゾ化発色試薬を含む寒天液を重層し、亜硝酸を生成したコロニーの発色により識別する。即ち

1. 適当に稀釈した試料より常法通り普通ブイヨン寒天培地で平板培養し、約30~100個程度のコロニーを生かせしめる。

2. 別に0.05%硝酸カリウムを含む1.5%寒天液を試験管あるいは三角フラスコ中に分注滅菌しておいたものを加熱溶解し、約45°Cに冷却保温しておく。

3. この寒天液 10ml に対しグリス・ロミン試薬*を約 100mg の割合に添加し、溶解混和する。

* α -ナフチルアミン 0.5g

※ 応用微生物学研究室
※※ 広島市東保健所公衆衛生課

スルファニール酸 5.0g
酒石酸 44.5g

4. コロニーの生じた平板上に試薬寒天混液約 8ml を静かに注ぎ込み、重層固化後室温に15~30分間静置する。
5. 硝酸塩還元性細菌のコロニー又はその周辺部は赤色または橙赤色を呈するが非還元性細菌は反応しない。

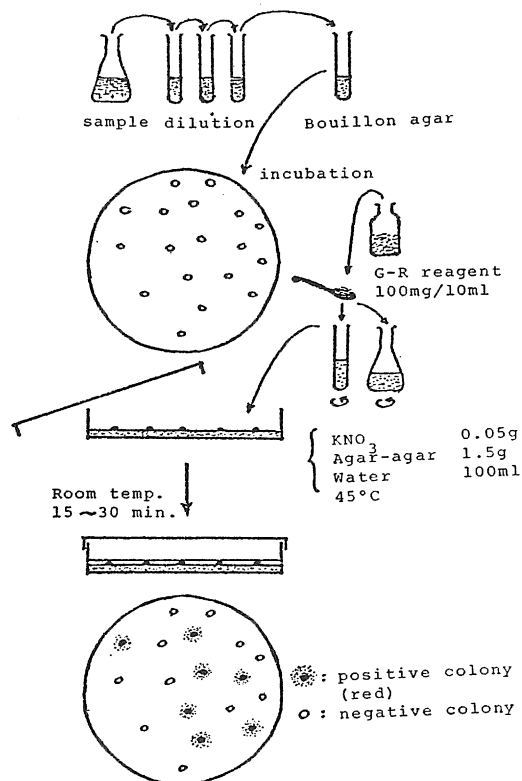


Fig. 1. Procedure of the reagent-agar overlay technique.

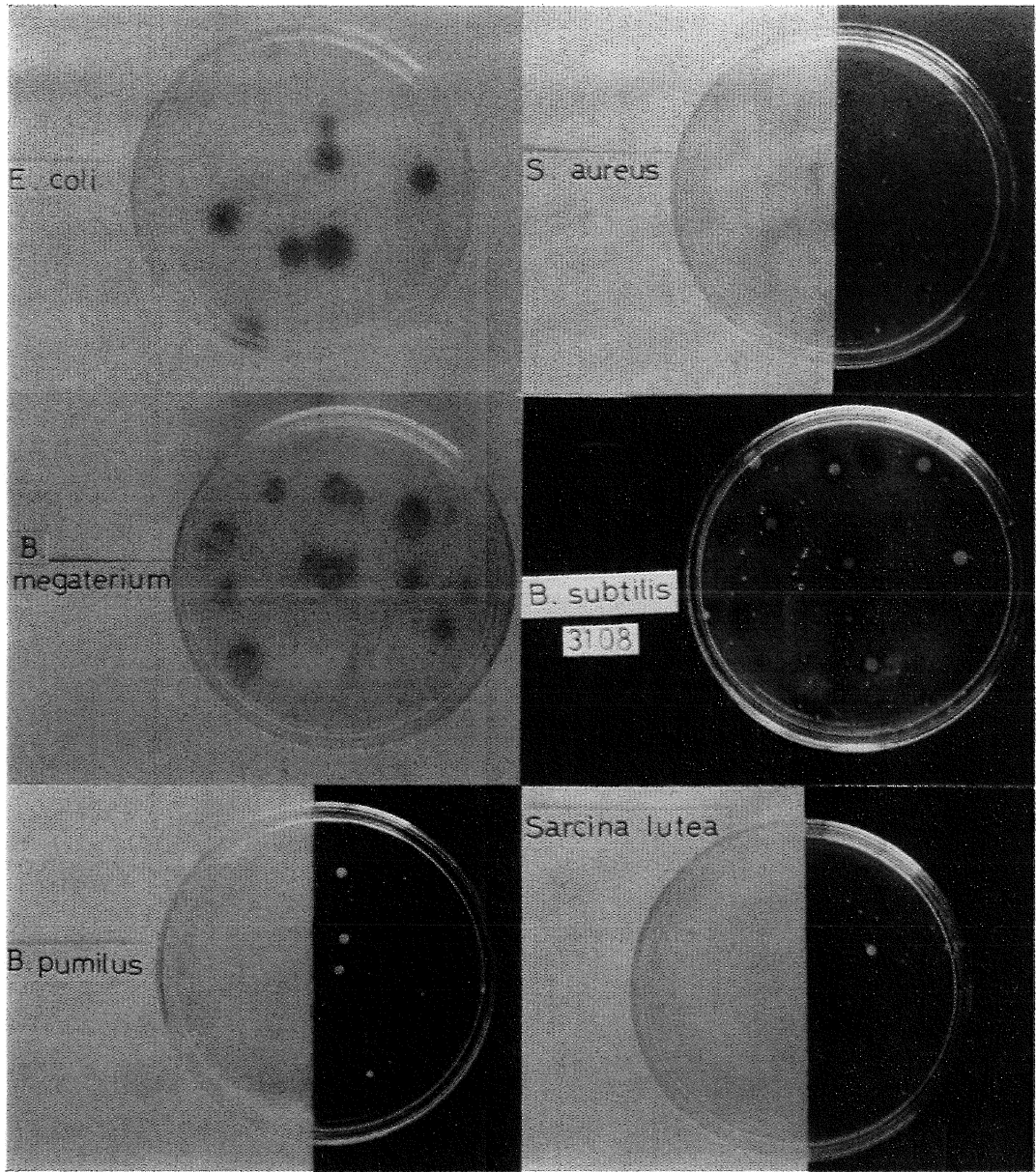


Fig. 2. The result of the differentiation test.

この方法を幾つかの菌株に適用した結果を Fig. 2. に示した。 *E. coli*, *St. aureus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* IFO 3108 は硝酸塩還元性陽性であり、 *B. pumilus*, *Sarcina lutea* は陰性である。

しかし、硝酸塩還元性細菌中のすべてのコロニーがこの方法によって陽性の呈色反応を示すのではなく、液体培養法では硝酸塩還元性陽性の結果を示した菌株であっても、平板重層法を行なうと一部のコロニーは陰性を示

す場合があった。即ち *B. subtilis* IFO 3108 は平板上のすべてのコロニーが陽性であったが、 *B. subtilis* IFO 3009 では Fig. 3. に示すように寒天平板内部に生じたコロニーは陽性であるが、寒天表面上にできたコロニーは陰性を示した。これは同一種の菌であってもその生育環境の相異によって呼吸系を異にし、表面コロニーは硝酸塩呼吸を行わず従って亜硝酸の生成がなかったものと思われる。このような傾向は納豆菌などの枯草菌

群細菌や酢酸菌にも見られた。

なお本法の技法を決定するに先立って以下のような種々の方法を試みた。1. 硝酸塩を添加したブイオン寒天培地に平板培養してコロニーを作らせた後、試薬寒天を重層する方法。2. 1. の試薬寒天の代りに液体試薬を注入する方法。3. 普通ブイオン寒天平板上にコロニーを作らせた後硝酸塩寒天を重層し、更に試薬寒天を重層するかあるいは液体試薬を注入する方法。4. 3. の硝酸塩寒天の代りに硝酸塩水溶液を注入し、次に試料寒天または液体試薬を重層する方法。しかしこれらの結果はそれぞれ平板全面が赤色を呈したり、呈色不鮮明、発色速度がおそい、あるいは操作が煩雑など不利の点が多く最も簡単で明瞭な結果を与える上記の方法を採用した。

また、この平板法と従来の液体培養法による試験結果とを比較するために、コロニーを生じた平板培養より可及的に全コロニーを液体培地に釣菌した後、試薬寒天を重層して陽性コロニーを計測し、液体培養は48時間培養後判定に供した。本実験には中海より採取した水を試料とし、各平板中のコロニー数は釣菌を容易にするため15～50個のものを選出した。その結果は Table 1. に示すように、陽性コロニー数は両法共よく一致するかあるいは平板法の方がやゝ大きな値を示した。また陰性微小コロニー中には液体培地での生育が極めて微弱なものやほとんど生育が認められぬものがあった。

Fig. 4. は中海より採取した水を試料とし普通ブイオン寒天平板法で全生菌数を測定した後、試薬寒天を重層したもので赤色コロニーは硝酸塩還元性陽性、白色コロニーは同じく陰性の菌を示し、全生菌数に対する硝酸塩還元性陽性菌数を容易に知ることができる。これらの赤色コロニーより釣菌し液体培養による試験を行なった結

果いずれも硝酸塩還元性は陽性であった。しかし非呈色コロニーより釣菌したものはその大部分が液体培養では生育せず釣菌移植が不能であった。このことは前の実験でも認められたが特にグリス・ロミン試薬の毒性および pH 2.2～2.4 の強い酸性によって菌が死滅したのではないかと考え、より酸性度の低い発色試薬の調製を試みた。そのため水酸化ナトリウムを添加して pH をそれぞ

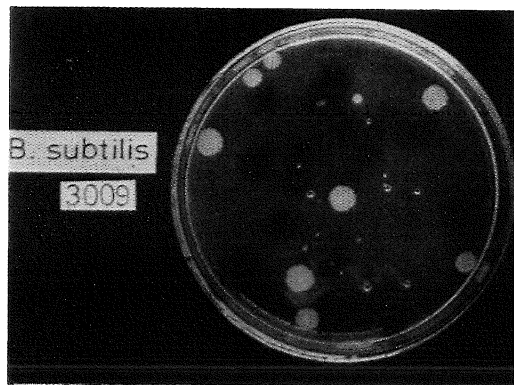


Fig. 3. *B. subtilis* IFO 3009

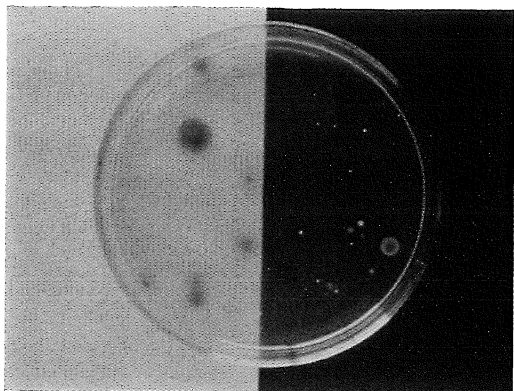


Fig. 4. Natural water (Lake Nakanoumi)

Table 1. Comparison of the results of plate and conventional liquid culture method.

Sample	Plate culture colony count		Liquid culture Tube number	
	+	-	+	-
A	5	42	5	41
B	7	28	4	24
C	7	33	7	25
D	6	34	2	38
E	4	22	3	23
F	3	20	4	18
G	4	16	4	16
H	2	13	2	13
I	5	19	5	19
J	19	11	20	10

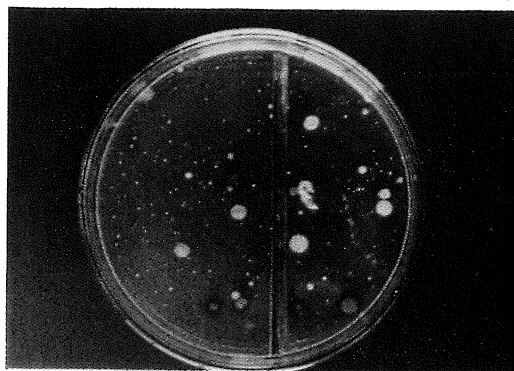


Fig. 5. Comparison of the color reaction left : pH 2.2 ; right : pH 4.0

れ2.2から5.4に調整したグリス・ロミン試薬の発色域を調べたところ、発色の限界は pH 4.5 付近であった。しかしこの試薬を寒天と共にブイヨン寒天上に重層すると pH 値が0.2程度上昇するため pH 4.0 を発色の限界とみなし、グリス・ロミン試薬の酒石酸の一部を酒石酸ナトリウムに置き換え pH 4.0 の改良グリス・ロミン試薬を調製した。成分は次の通りである。

α-ナフチルアミン	0.5g
スルファニール酸	5.0g
酒石酸	8.5g
酒石酸ナトリウム	36.0g

pH 2.2 の 試薬寒天と pH 4.0 のものとの呈色を河川水試料について比較した結果は、Fig. 5 に示す様に pH 4.0 の試薬による呈色は pH 2.2 のものと比べ幾分橙色がかかった色相となるが、生菌に対する毒性ははるかに緩和され、呈色コロニーからは勿論、大部分の非呈色コロニーからも釣菌移植することができた。また液体培養による試験結果も呈色コロニーからのものはすべて陽性、非呈色コロニーからのものは陰性を示した。従って硝酸塩還元性細菌の分離を目的とする場合は pH 4.0 のグリス・ロミン試薬寒天を使用することが望ましく、単に硝酸塩還元性細菌の分布状況を調べる場合は pH 2.2 の試薬寒天を重層する方がより鮮明な色相を与えるため識別が容易である。

考 察

この簡易平板識別法は従来の液体培養法よりも迅速か

つ簡単な方法で硝酸塩還元性細菌の識別ができ、特にその分布状況等の研究を進める上で非常に便利である。しかし直径が 0.1 mm 以下のコロニーの場合発色の確認が困難であること、重層後発色迄に要する時間に多少の相異が見られること (10~30分)、また *B. subtilis* の場合のように生育条件により陰性化することも見られ、まだ若干の問題点は残されている。

要 約

細菌類の硝酸塩還元性識別法として便利で多数の試料の取り扱いに有効な試薬寒天平板重層法を考案した。

この方法の特長は平板培養で生じたコロニーに直接試薬を反応させ呈色を見ることにより硝酸塩還元性の有無を識別し、それぞれの菌株についての液体培養を要しないので検査時間、労力、培地等が大幅に節減できる。

pH 値を4.0に修正したグリス・ロミン試薬を調製し、識別検査を行なった後のコロニーからの釣菌、培養を可能にした。

本報告の要約は昭和50年度日本農芸化学会西日本支部大会 (昭和50年10月・広島市) において発表した。

文 献

1. Society of American Bacteriologists: Manual of Microbiological Methods, p. 153, McGraw-Hill, New York (1957).
2. M. Ogur, R. S. John & S. Nagai, *Science* **125**: 928 (1957). S. Nagai, *ibid.* **130**: 1188 (1959).

Summary

A rapid plate method is described for the differentiation of nitrate reducer in lieu of the conventional liquid culture method. The method includes an ordinary plate culture with bouillon-agar, subsequent treatment with overlaying agar containing nitrate and Griss-Romin reagent on the plate culture, and counting of red colonies developed. With a considerable saving of time, trouble, and culture media, easy estimation of the population ratio of nitrate reducer in the natural environment was attained by this method. By modifying the pH value of the original Griss-Romin reagent from 2.2 to 4.0, more viable cells were able to be picked up with less reagent injury from the plate after the differentiation test.