

VII-4

自動細菌検査装置による消毒剤耐性指標細菌の検索

函館工業高専環境都市工学科	会員 芦 立 徳 厚
長岡技術科学大学環境システム工学課程	豊 嶋 拓
国立公衆衛生院水道工学部水質管理室	会員 相 沢 貴 子
北海道大学大学院工学研究科都市環境工学専攻	会員 真 柄 泰 基

1. はじめに

塩素消毒はもちろん、塩素消毒に代わる各種の消毒法においても最も重要なことは、消毒に対して耐性の高い病原体にその消毒法がいかに関与するか否かである。消毒剤耐性病原体に有効な消毒剤が見出されたとして、次に問題になるのは、消毒効果をルーチンに観測するためにどのような指標細菌を用いるかということである。最も望ましいのは、ターゲットとなる消毒剤耐性病原体と同等かそれを上回る消毒剤耐性を持った、検査方法の容易な指標細菌である。しかし、消毒剤耐性病原体がウィルスや原虫にまで及んでいる現在、細菌の中からその指標細菌を見出すことはきわめて困難な作業となる。その困難を少しでも克服するためには、消毒剤耐性指標細菌の検索の作業を可能な限り簡易化、自動化してゆくことが必要である。本研究は、その試みの一つとして、検索作業に「自動細菌検査装置」の導入を検討したものである。

2. 実験方法

2.1 自動細菌検査装置 自動細菌検査装置として、bioMerieux 社の「ATB Expression」を使用した。API プレートとしては ID32E を用いた。

2.2 実験方法 消毒剤耐性菌を検索する対象として、最も多様な細菌を含むと思われる都市下水が妥当と考え、函館市南部下水処理場の流入下水を試料水とした。用いた消毒剤は、塩素（次亜塩素酸ナトリウム使用）と二酸化塩素（亜塩素酸ナトリウムとクエン酸を反応させ、発生した二酸化塩素を純水に溶解）である。

病原体の多くは腸内から排泄されているので、腸内細菌の中から消毒剤耐性細菌を検索するのが先決と考え、分離培地として m-Endo, m-FC 培地を用いた。

2.3 実験手順 細菌分離から自動細菌検査装置による細菌種の同定までの実験手順は以下の通りである。

- ①流入下水を粗ろ過し、200ml ずつ 4 個の共栓三角フラスコに入れた。
- ②塩素、二酸化塩素をそれぞれ 0.5, 1 ppm ずつ共栓三角フラスコに添加し、60 分間静置した。
- ③試料水にチオ硫酸ナトリウムを加えて消毒剤を無毒化した後、 $10 \sim 10^4$ 倍に希釈してミリポアフィルターでろ過し、m-Endo, m-FC 培地上に載せ培養した。（m-Endo 培地 : 35°C, 24hr, m-FC 培地 : 44.5°C, 24hr）
- ④両培地で検出したコロニーを白金耳で集め、リン酸緩衝希釈水に懸濁させた。これをよく攪拌して第二次の消毒対象試料水とした。
- ⑤この試料水について、①②③の操作を繰り返した。
- ⑥検出したコロニーを白金耳で釣菌し、デソキシコレート培地上に画線して 35°C, 24hr 分離培養した。
- ⑦デソキシコレート培地上で増殖した独立コロニーを白金線で釣菌して、斜面標準寒天培地に移植し、35°C, 24hr 増菌培養した。
- ⑧斜面標準寒天培地上に増殖した細菌の適当量を 0.85% 生理食塩水 2ml に懸濁させ、デンシマットによって濁度を測定した。マクファーランド濁度が 0.5 になるように細菌懸濁液を調整した。
- ⑨⑧で調整した細菌懸濁液を、ID32E API プレート上の 32 のマイクロカップに電動ピペットを用いて 55 μ l ずつ分注した。このプレートを 35°C, 24hr 培養した後、自動細菌検査装置で細菌種の同定を行った。

キーワード 消毒剤耐性病原体, 消毒剤耐性指標細菌, 自動細菌検査装置, 塩素, 二酸化塩素
連絡先 〒042-8501 函館市戸倉町 14-1 函館工業高専環境都市工学科, Tel-Fax 0138-59-6484

3. 実験結果と考察

実験結果を表1、表2に示した。表中の検出希釈度の欄はその細菌のコロニーを得た希釈度を示している。できるだけ異なる細菌を見出すため、色調の異なるコロニーを選択するようにしている。塩素消毒の結果における *Klebsiella planticola* などはその良い例である。一方、二酸化塩素消毒の結果では、低い希釈度の試料からしか細菌が得られなかったが、これは二酸化塩素の消毒力の大きさを示している。

m-FC 培地からは、*Escherichia coli* が圧倒的に多く検出されたが、これは当培地が糞便性大腸菌群の選択培地であることから当然といえるが、m-Endo 培地でも他の細菌の混じって耐性細菌として検出されている結果をみると、これまで *E. coli* は消毒剤に弱いという

表1 塩素耐性細菌の同定結果

同定細菌名	検出培地	検出希釈度						消毒剤 添加濃度
		10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
<i>Escherichia coli</i>	m-FC	○						1 ppm
<i>Escherichia coli</i>		○						1 ppm
<i>Escherichia coli</i>		○						1 ppm
<i>Escherichia coli</i>		○						1 ppm
<i>Escherichia coli</i>						○		0.5ppm
<i>Escherichia coli</i>					○			0.5ppm
<i>Acinetobacter baumannii</i>				○				0.5ppm
<i>Acinetobacter baumannii</i>				○				0.5ppm
<i>Klebsiella planticola</i>	m-Endo						○	1 ppm
<i>Klebsiella planticola</i>							○	1 ppm
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>						○		1 ppm
<i>Klebsiella planticola</i>					○			1 ppm
<i>Klebsiella planticola</i>					○			1 ppm
<i>Klebsiella planticola</i>					○			1 ppm
<i>Klebsiella planticola</i>					○			1 ppm
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>			○					1 ppm
(<i>Kluyvera ascorbata</i>)					○			0.5ppm
(<i>Escherichia coli</i>)					○			0.5ppm
<i>Acinetobacter baumannii</i>					○			0.5ppm

表2 二酸化塩素耐性細菌の同定結果

同定細菌名	検出培地	検出希釈度						消毒剤 添加濃度
		10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	
<i>Escherichia coli</i>	m-FC	○						1 ppm
<i>Escherichia coli</i>				○				0.5 ppm
<i>Escherichia coli</i>				○				0.5 ppm
<i>Escherichia coli</i>				○				0.5 ppm
<i>Escherichia coli</i>			○					0.5 ppm
<i>Escherichia coli</i>			○					0.5 ppm
<i>Escherichia coli</i>			○					0.5 ppm
<i>Escherichia coli</i>			○					0.5 ppm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	m-Endo		○					1 ppm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			○					1 ppm
<i>Escherichia coli</i>			○					1 ppm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		○						1 ppm
<i>Klebsiella planticola</i>		○						1 ppm
(<i>Escherichia coli</i>)		○						1 ppm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		○						1 ppm
<i>Citrobacter amalonaticus</i>		○						1 ppm
<i>Escherichia coli</i>		○						1 ppm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		○						1 ppm

通説は見直す必要があるかもしれない。いずれの実験結果でも *Klebsiella* 属が目立つが、細胞膜の外側膜に粘液質の莢膜を持つという当細菌の特徴が消毒剤耐性を高めていると思われる。

自動細菌検査装置による同定結果のデータベースとの一致度は、Excellent, Very Good, Good, Doubtful, Unacceptable の5段階で評価されるが、良好な評価といえる前三者の割合は、塩素消毒では83%であるのに対して、二酸化塩素消毒では59%と低下した。これは、より強力な二酸化塩素消毒が細菌の物質代謝系に損傷を与えて、APIプレートの生化学試験に擾乱を与えている可能性がある。消毒剤耐性細菌の検索に自動細菌検査装置を用いることはきわめて有効なので、今後腸内細菌以外に検索の領域を広げてゆきたい。