

河口・沿岸水からの腸球菌の単離・同定に関する基礎的検討

宮崎大学大学院	学生員	○古川	隼士
宮崎大学農学部	非会員	吉田	照豊
宮崎大学工学部	正会員	鈴木	祥広

1. はじめに

沿岸域は、海水浴場やヨットハーバーのようなレクリエーションエリアとして重要な役割を果たしているため、人間が病原性細菌やウイルスに直接的、あるいは間接的に暴露される危険性が高いエリアとしても認識できる。したがって、沿岸環境におけるふん便汚染は、人間の健康リスクにとって極めて深刻な脅威となる。このような背景から、近年では沿岸環境の公衆衛生や細菌学的な安全性を確保するために、PCR やフィンガープリント法等を用いたふん便性細菌の汚染源追跡に関する研究が積極的に行われている¹⁾。著者らは、先端的な分子生物学的解析手法であるパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)を水環境に適用させ、ふん便細菌の汚染源追跡手法としての有用性を検討している²⁾。PFGE は、同一菌種間の遺伝子構造の比較が可能であり、疫学分野における感染経路の追跡標準法として確立されつつある手法である。しかしながら、沿岸域を対象として、PFGE によるふん便汚染指標細菌の相同性・類似性を解析するためには、その前段階として沿岸域からターゲットとなるふん便汚染指標細菌のみを正確に単離・同定することが極めて重要となる。そこで本研究では、PCR 法と一般生化学性状試験を併用して、腸球菌の *Enterococcus faecium* と *Enterococcus faecalis* をふん便汚染の指標細菌として定義し、河口・沿岸水試料からの単離・同定について検討した。

2. 実験材料および方法

2. 1 腸球菌の計数および単離

河口・沿岸水試料は、宮崎港湾奥部(採取日 2009. 1. 16)、清武川河口(2009. 2. 23)、および加江田川河口(2009.3.30)から採取し、ポリエチレン瓶に保存した。すべての試料は実験室に持ち帰り、ただちに実験に供した。腸球菌の計数はメンブランフィルター法によって実施した。試料を孔径 0.45 μ m のメンブランフィルターに通水させ、フィルターを mEI 培地上に置き、41℃で 24h 培養した。培養後、フィルター上に形成された青色のコロニーを計数した。腸球菌の単離は、フィルター上のコロニーを Todd Hewitt 培地(寒天 1.5%, DIFCO)上に釣菌し、37℃で 24h 培養した。腸球菌は、宮崎港湾奥部と清武川河口から 100 コロニーずつ、ならびに加江田川河口から 77 コロニーを単離した。培養後、それぞれの単離株について PCR 法と生化学性状試験によって菌種を同定した。

2. 2 PCR 法による菌種の同定

PCR 法による同定には、*E. faecium* (プライマー①³⁾、②⁴⁾) と *E. faecalis*⁵⁾ とともに既存のプライマーを用いた。*E. faecium* については 2 種類のプライマーについて検討した。反応条件は *E. faecium* のプライマー①では、94℃, 1min → 94℃, 30sec ; 69℃, 30sec ; 72℃, 1min を 30 サイクル → 72℃, 5min とした。プライマー②では、95℃, 4min → 95℃, 30sec ; 54℃, 1min ; 72℃, 1min を 30 サイクル → 72℃, 5min とした。*E. faecalis* は 94℃, 4min → 94℃, 30sec ; 62℃, 30sec ; 72℃, 1min を 30 サイクル → 72℃, 5min とした。反応後、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して PCR 増幅産物を確認した。

2. 3 生化学性状試験による菌種の同定

PCR 法によって *E. faecium* と *E. faecalis* と同定されたすべての菌株は、さらにグラム陽性球菌同定キット Api 20 Strep (bioMérieux) を用いて菌種の同定を行った。実験方法および手順はキットの使用説明書に従った。

3. 結果と考察

3. 1 腸球菌数と一般水質項目

表 1 に各採取地点の腸球菌数、pH、EC、濁度、および EC から算出した塩分濃度を示す。採取日が異なるが、塩分濃度が低い清武川河口において腸球菌数が高く検出され、塩分濃度が比較的高い加江田川河口において菌数が低かった。宮崎港湾奥部は塩分濃度が高いにもかかわらず、菌数が高く検出されており、これは下水処理場の雨水吐き室が隣接し、その吐き口からの越流水中に腸球菌が多く含まれていたことが考えられる。

キーワード：腸球菌、菌種同定、河口・沿岸域、PCR、生化学性状試験

連絡先：〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1, TEL.0985-58-7339, FAX.0985-58-7344

表1 腸球菌数と一般水質項目

	腸球菌数 (CFU/100mL)	pH	EC (mS/cm)	濁度 (mg/L)	塩分濃度 (psu)
宮崎港湾奥部	188	8.01	44.6	3.76	28.8
清武川河口	432	7.61	3.4	15.65	1.9
加江田川河口	4	8.07	32.8	8.41	21.3

3. 2 PCR による菌種の同定結果

図1にPCR法による菌種の同定結果を示す。プライマー②を用いた場合、*E. faecium*は宮崎港湾奥部、清武川河口、および加江田川河口からそれぞれ23株、42株、および19株同定された。また、プライマー①を用いた場合は、各採取地点においてそれぞれ1株、1株、および5株同定され、これらすべての菌株はプライマー②でも同様に陽性を示した。一方で、*E. faecalis*は、宮崎港湾奥部と清武川河口からそれぞれ4株と12株が同定されたが、加江田川河口からは同定されなかった。

最も多くの指標細菌が同定された清武川は、塩分濃度が低く、大部分が河川水であったことがわかる。これに対して、塩分濃度が比較的高かったほかの二地点は指標細菌の割合が低かった。これは、海水による希釈、あるいは海水等の他起源の腸球菌が存在し、相対的に *E. faecium* と *E. faecalis* の割合が減少したためであると考えられる。

3. 3 生化学性状試験による菌種の同定結果

PCR法によって *E. faecium* と *E. faecalis* に陽性を示した菌株について、生化学性状試験を実施した。図2の(a)に *E. faecium* 陽性菌株、(b)に *E. faecalis* 陽性菌株の結果をそれぞれ示す。宮崎港湾奥部の *E. faecium* は23株すべてが、生化学性状試験においても同菌種として同定された。しかしながら、清武川河口と加江田川河口の *E. faecium* は、それぞれ7株と4株が異菌種として同定された。また、宮崎港湾奥部と清武川河口の *E. faecalis* についても、それぞれ2株と1株が異菌種であった。PCR法と生化学性状試験のいずれにも陽性を示した菌株は、*E. faecium* と *E. faecalis* において、それぞれ73株と13株であった。したがって、*E. faecium* が河口・沿岸域の環境水中に多く分布していることが推察されるため、人畜由来のふん便汚染の指標細菌として適していることがわかった。

4. まとめ

(1) いずれの地点からも *E. faecium* と *E. faecalis* が検出されており、河口・沿岸域は人畜由来のふん便汚染を受けている可能性が高い。

(2) 河口・沿岸域からは、*E. faecalis* よりも *E. faecium* が高い割合で同定されたことから、ふん便汚染の指標細菌として *E. faecium* が適している。

(3) 塩分濃度が比較的高い地点では、指標細菌の割合が減少しており、海水による希釈、あるいは海水等の他起源の腸球菌が存在したためであると考えられる。

参考文献

- 1) Armed, W., Stewart, J., Garden, T., Powell, D., Brooks, D., Sullivan, D. and Tindale, N. (2007) *Wat. Res.*, **41**, 3771-3779.
- 2) 高橋寛敬, 鈴木祥広, 吉田照豊 (2008) 土木学会第63回年次学術講演会講演概要集, 307-308.
- 3) Cheng, S., McCleskey, F. K., Gress, M. J., Petroziello, J. M., Liu, R., Namdari, H., Beninga, K., Salmen, A. and DelVecchio, V. G. (1997) *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1248-1250.
- 4) Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J. and Barrett, J. B. (2004) *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3558-3565.
- 5) Liu, D., Wang, C., Swaitlo, E. J. and Lawrence, M. L. (2005) *Res. Microbiol.*, **156**, 944-948.

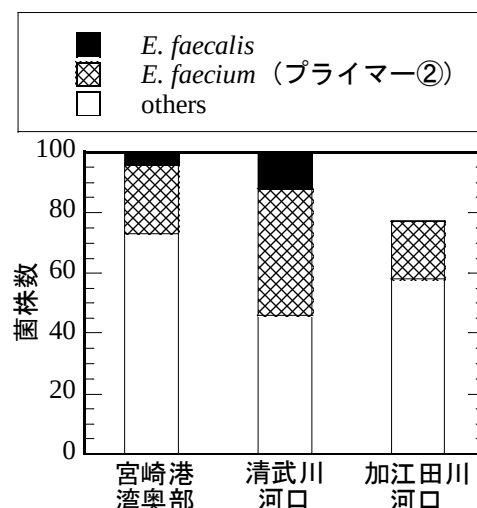


図1 PCR法による菌種同定

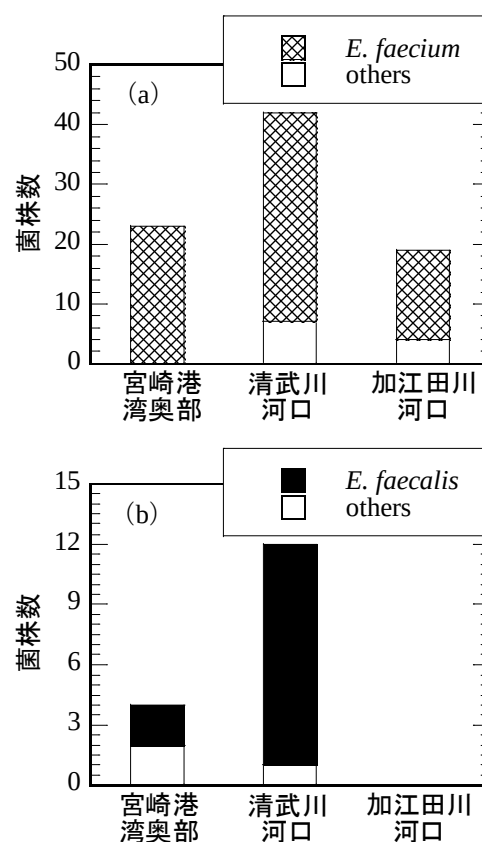


図2 生化学性状試験による菌種同定