

沿岸海水の腸球菌計数に適した培地の検討

宮崎大学工学部 ○川畑 勇人, 鈴木 祥広

宮崎大学院工学研究科 学生員 高橋 寛敬

宮崎大学農学部 吉田 照豊

1. はじめに

アメリカでは、娯楽、フィットネス、スポーツを目的に沿岸地域に滞在するなど、沿岸域での活動人口は年々増加している。一方では、沿岸域に潜む病原性細菌による感染症の発生も年々増加しており、沿岸都市域やレクリエーションエリアにおける細菌学的安全性が危惧され始めてきている。¹⁾ また、世界的に見ても水質保全技術・管理が最も進んでいる我が国の水環境において、ふん便に由来する病原性細菌・ウイルス汚染による人間への感染・発症のリスクは、それほど低くないことが報告され始めてきている。一見、清浄と判断されがちな沿岸都市域の水環境においても、細菌学的には高いリスクに遭遇している可能性を否定できない。安全・安心な沿岸都市の水環境を構築するためには、公衆衛生の観点からみた沿岸域の細菌学的調査が必要である。

そこで本研究では、人畜のふん便性汚染指標である腸球菌に着目し、現在、腸球菌計数に広く使われている KF *Streptococcus* 寒天培地 (KF 培地) と、AC 液体培地を改良した AC 寒天培地 (AC 培地)²⁾ を用いて腸球菌の検出法および菌種の同定法について比較し、沿岸海水を対象とした適切な腸球菌計数法を検討した。

2. 実験方法

2.1 試料採取

沿岸都市である宮崎市の沿岸域を調査対象とし、宮崎港、大淀川河口、突浪川の計 3 地点で採水した。ロープ付きバケツを用いて河川表層水を洗浄・滅菌済 1L ポリビンに採取した。採取した試料は直ちに実験室に持ち帰り、同一試料について、KF 培地と AC 培地を用いてメンブランフィルター法 (MF 法) によって計数した。

2.2 腸球菌採取

各地点の試料をろ過し、そのフィルターをそれぞれ AC 培地と KF 培地に載せ、AC 培地は 37℃、18 時間の後 45℃、24 時間培養し、KF 培地は 37℃、48 時間培養した。両培地とも赤色またはピンク色のコロニーを腸球菌と判定した。それぞれの試料について、シングルコロニーを釣菌し、Todd Hewitt 培地 (Difco, TH 培地) に単離して、37℃48 時間培養した。

2.3 レンサ球菌検出試験による *Enterococcus* の判定

Enterococcus 属の同定には、ラテックス凝集法を原理とした連鎖球菌抗原キットのレンサ球菌検出用 (BIORAD) を用いた。測定操作法に従い、1.5mL チューブに、抽出剤を 10mL 加え溶解させた抽出液 300 μ L 採取し、TH 培地のコロニー数個釣菌して、抽出液に懸濁させた後、15 分間酵素抽出反応させた。続いて、反応プレート上で、A, B, C, D, F および G までの各ラテックス試薬と被検菌株の抽出液を 1 滴ずつ滴下し、攪拌棒を用いて混和させ、1 分以内における凝集の有無から陽性・陰性を判定した。D 試薬に陽性を示した *Enterococcus* 属、すなわち D 群には *E.faecalis* と *E.faecium* および *E.durans* が含まれる。

2.4 性状試験 (api 20 strep) による菌種の同定

性状試験には、培養同定・一般細菌キットの api 20 strep (BIOMERIEUX) を用いた。測定操作法に従い、37℃、

キーワード: *Enterococcus*, *E.faecalius*, *E.faecium*, 同定

連絡先: 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1 宮崎大学 Tel 0985-58-7339

24 時間好気条件下で培養した。24 時間培養した後、判定表に従って判定した。

3. 実験結果

3.1 各地点・各培地のコロニー数

表 1 に各採水地点のコロニー数を示す。各地点とも AC 培地で検出されるコロニー数の 2～10 倍のコロニー数が KF 培地で検出された。

3.2 *Enterococcus* の存在割合

表 2 には、AC 培地、KF 培地それぞれで陽性コロニーを形成した菌株について、レンサ球菌試験で D 群判定された菌株、すなわち腸球菌の割合を示す。形成されたコロニーの 70～90%が腸球菌という結果になった。突浪川の KF 培地でのみ陽性が陰性を下回った。培地による腸球菌の検出割合の明らかな違いは見られなかった。

3.3 性状試験による菌種の同定

図 1 には、性状試験で *E.faecalis*, *E.faecium*, *E.durans* と同定された菌株の割合を示す。どの地点でも KF 培地よりも AC 培地で多く *E.faecalis* が検出された。腸球菌の割合はレンサ球菌検出試験結果の値と少し差が生じたが、どちらの結果においても培地の違いによる腸球菌の検出割合の差は確認されなかった。

4. まとめ

- (1) 同一試料において、KF 培地で形成されるコロニー数すなわち細菌数は、AC 培地と比較して 2～10 倍も多くなる。
- (2) AC 培地と KF 培地で形成されたコロニーは、いずれも 70～90%と、高い割合で腸球菌として判定された。
- (3) AC 培地よりも KF 培地の方が大幅に高く細菌数が検出され、形成されたコロニー数に対する腸球菌数の割合はほぼ同等であることから、腸球菌を計数する場合には、KF 培地の方が安全サイドから高感度に検出できることがわかった。

これらの結果から、腸球菌計数には KF 培地が適していると判断される。

参考文献

- 1) Sunderland D., et al (2007) Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts in recreational beach waters, WATER RESEARCH, **41**,3483-3489
- 2) 国府島 泉, 平井 義一 (1990) 公共用水の腸球菌検査における KF streptococcus 寒天培地の評価, 日本水産学会誌, **26**, 6-9

表 1 各地点・培地におけるコロニー数

	AC培地 (CFU/100mL)	KF培地 (CFU/100mL)
宮崎港	152	1020
大淀川河口	8	88
突浪川	63	112

表 2 *Enterococcus* の存在割合

	AC培地	KF培地
宮崎港	90%	70%
大淀川河口	80%	85%
突浪川	80%	35%

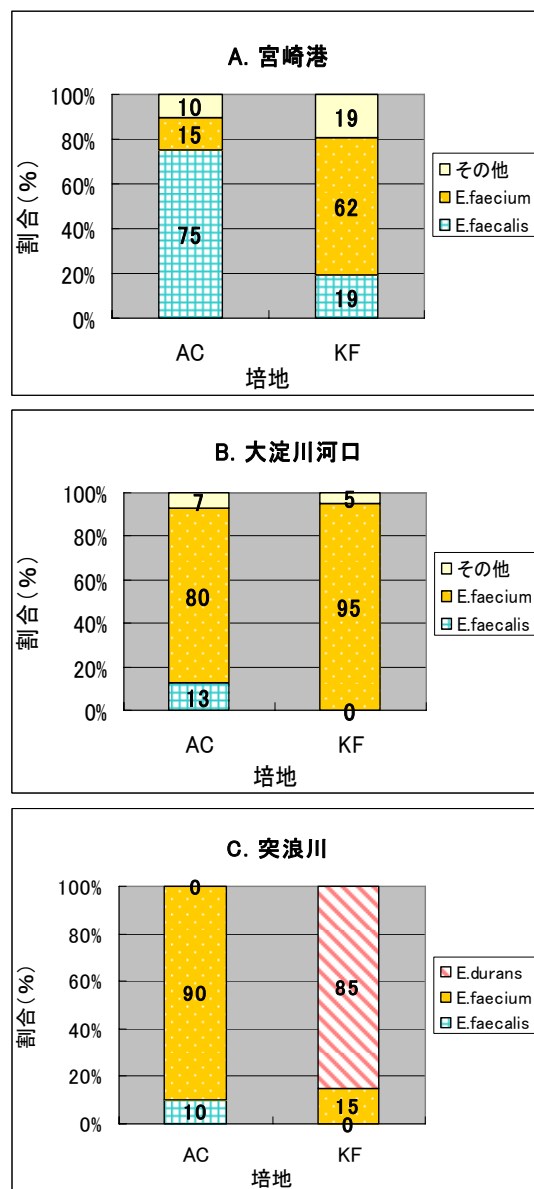


図 1 性状試験結果