

M-FC 法により検出される海水浴場水中の ふん便性大腸菌群について

津野 正彦

Study on the Fecal Coliforms of Beach Water by Membrane-Fecal Coliform Method

Masahiko TSUNO

1. はじめに

公共用水域に対するふん便汚染の指標細菌としては、BGLB 培地を使った MPN (最確数) 法による大腸菌群が採用されて今日に至っているが、水浴場水については昭和59年度からふん便汚染指標の特異性の高い M-FC 法によるふん便性大腸菌群に変更された。¹⁾

この M-FC 法では、M-FC 寒天培地を用いて $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、 24 ± 1 時間培養後の青色の光沢をもつコロニーをふん便性大腸菌群としているが、実際の測定に際してはこの青色の範囲が明確さを欠くため、個人差により測定精度や再現性に問題を生じている。

M-FC 法のフィルター上に出現したコロニーの色調や形態と菌種との関係についてはすでにいくつかの報告があるが²⁾³⁾、今回県内の海水浴場において M-FC 培地から得られた細菌群について追認する目的で調査したので報告する。

2. 実験材料及び方法

2.1. 材料

水浴場水は高知県夜須町手結海水浴場で1990年8月2日に採水し、滅菌メジュール瓶に採水後直ちに氷冷して持ち帰り実験に供した。

2.2. 培地及び同定キット

M-FC 培地は Difuco 社製 m-FC agar を、その他の培地は日水社製を、同定キットは API SYSTEM S. A. 製の API20E を用いた。

2.3. 実験方法

細菌の捕集はメンブランフィルター (ミリポア HA $0.45 \mu\text{m}$) 上に、吸引ろ過法により行った。培養は M-FC 寒天培地の入ったペトリ皿にメンブランフィルターを密着させ、 $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 0.5 時間行った。菌の分離及び同定はメンブランフィルター上に出現したコロニーを釣菌して普通寒天平板培地に画線塗抹後培養し、単離コロニーを普通寒天斜面培地で増菌してグラム染色及び各種培地、API20E に接種し、そのコロニーの形態及び生化学的性状により行なった。

鑑別培地での培養及び判定は以下の方法によった。EMB 培地は滅菌後シャーレーに約20ml分注し表面をよく乾燥させた後、画線塗抹して単離したコロニーの形態を調べた。デオキシコレート寒天培地での分離菌の発育の観察には、分離菌の適当な濃度の均質浮遊液を用いて混釈及び画線培養した。

普通寒天培地は滅菌後斜面にかため、菌株の短期的な保存及び各種の試験用とした。これは必要に応じて植え替えを行なった。

同定は、API20E に純培養菌を接種し、操作法に準じて $36^{\circ}\text{C} 20 \sim 22$ 時間培養後、判定して得られた7桁の数字を API20 プロファイルインデックス (1989) により同定した。

3. 実験成績及び結果

3.1. M-FC 法によるふん便性大腸菌群の鑑別

M-FC 培地を用いて 44.5°C で24時間培養し、出現したコロニーを典型 A, 典型 B, 中間型, 非典型的の4種類に分別した。本試験におけるコロニーの色調の分

表1 各菌株の特性と菌名

No.	増殖特性						M-FC培地	コロニー	特徴	E M B 地	デソキシコレート培地	菌名	
	44.5°C		37°C		24時間後								
LB	BGLB	EC	LB	BGLB	EC	LB	BGLB	EC	48時間後				
1	1	1	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-無色	E. coli
4	1	1	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-半透明	〇
6	2 Y	0	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-半透明	〇
9	1	1	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-半透明	〇
11	1	1	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	赤紫-透明	〇
20	2 Y	0	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	赤紫-透明	〇
23	1	1	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	うすい赤紫-半透明	〇
33	1	1	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-半透明	〇
40	1	1	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-半透明	〇
3	3 Y	0	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-半透明	〇
38	2 Y	0	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-半透明	〇
39	1	1	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	微ピンク-紫	〇
10	2 Y	0	2	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫黒-透明	〇
21'	2	0	2	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	赤紫-透明	〇
37	2 Y	2	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
14'	2	2	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	うすい紫-半透明	〇 or 〇
17'	2	0	2	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
24'	1 Y	0	2	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
28'	1 Y	2	1	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
2	3 Y	0	0	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
8	2 Y	0	0	2	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
7	2 Y	0	0	2	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
31	2 Y	1	2	3	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
32	2 Y	1	2	3	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
29'	1 Y	2	3	3	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
36'	3	0	0	1	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
12	2 Y	0	0	2	1	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
16	0	0	0	0	0	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
26	0	0	0	0	0	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
34	0	0	0	0	0	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
18	0	0	0	0	0	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
19	0	0	0	0	0	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
22	0	0	0	0	0	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
25	0	0	0	0	0	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇
30	0	0	0	0	0	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	濃青	紫	〇

LB培地：培地の黄変，ガス発生のないものはYで示した。
 0：陰性，1：24時間，2：48時間，3：72時間後における陽性を示した。
 M-FC：48時間後は44.5°Cで24時間培養後室温に1夜放置後の色調
 デソキシコレート培地：〇濃赤色コロニー
 △：0.2~0.3mm未満の赤色コロニー
 ×：肉眼で確認不可能の赤色~ダイダイ色コロニー
 -：4倍の拡大鏡で確認不可能のコロニー

色調表現 (例) 青-白：中心部青，周辺部白
 青-白：青が混じった色

類から典型Aは濃青～青, 典型Bは淡青～青白～青灰とし, 中間型は青緑～緑青または24時間では青味を帯びていないが室温放置により青味を帯びるもの(不明確なもの), 非典型は白乳～白黄及び中心部が狭い範囲で極うすく青味を帯び周辺部が白乳～白黄のものとした。なお当所では典型A, Bをふん便性大腸菌群として判定している。

3.2. LB, BGLB, ECの各培地による確認試験

メンブランフィルター上に出現したコロニーをLB, BGLB, ECの各培地に接種し, 36℃及び44.5℃で24時間間隔で72時間まで培養して観察を行なった。結果は表2に示した。典型A, Bともに36℃培養では24時間で陽性となり中間型はBGLB培地では48時間で7/7株, LB及びECで4/7株, 72時間では各培地とも7/7株が陽性となった。非典型では1株のみが48時間までにLB及びBGLBにおいて陽性となった。

44.5℃培養の結果は表3に示したが, 24時間で陽性となるのは典型Aが10/14, 典型Bが3/5, 中間型及び非典型0/16であった。

3.3. API20Eによる同定結果

純培養菌1白金耳量を5mlの滅菌生理的食塩水に採り, ラボミキサーで均質浮遊液とした後API20Eに接種し, 必要なものには滅菌流動パラフィンを重ねた後36℃で20～22時間培養した。判定結果は7桁の数値にし, API20プロファイルインデックスで検索して同定した。

その結果は表4及び表1のとおりである。これによると, API20で同定できたのは35株のうち30株で, 菌種は*E. coli* I 9株, *Klebsiella pneumoniae* 14株, *Enterobacter sakazakii* 4株, *Acinetobacter spp* 3株の4種であった。

これをコロニーの類型別で見ると, 典型A 14菌株のうち*E. coli* I 9株, *K. pneumoniae* 5株, 典型Bは5株ともに*K. pneumoniae*, 中間型は7株のうち*K. pneumoniae* 3株, *Enterobacter sakazakii* 4株であった。非典型9株では*K. pneumoniae* 1株, *Acinetobacter spp* 3株と, その他のグラム陰性桿菌(未同定)5株であった。

4. まとめ

M-FC培地上に出現したコロニーを典型A, B, 中間型, 非典型に類別し, その純培養菌を各種の常用培地を用いて性状を調べた。また, API20Eを用いてM-FC培地により分離したコロニーについて菌種の同定を行なった。

表2 36℃におけるLB, BGLB, EC培地での増殖特性

培養時間	陽性株数					
	典型A	典型B	中間型	非典型	合計	
コロニー数	14	5	7	9	35	
LB培地	24	14	5	2	0	21
	48	14	5	4	1	24
	72	14	5	7	1	27
BGLB培地	24	14	5	7	1	27
	48	14	5	7	1	27
	72	14	5	7	1	27
EC培地	24	14	5	2	0	21
	48	14	5	4	0	23
	72	14	5	7	0	26

表3 44.5℃におけるLB, BGLB, EC培地での増殖特性

培養時間	陽性株数					
	典型A	典型B	中間型	非典型	合計	
コロニー数	14	5	7	9	35	
LB培地	24	8	0	0	0	8
	48	9(13)	2(5)	0(5)	0(1)	11(24)
	72	9(14)	2(5)	0(7)	0(1)	11(27)
BGLB培地	24	8	0	2	0	10
	48	8	3	3	0	14
	72	9	3	3	0	15
EC培地	24	10	3	0	0	13
	48	12	5	2	0	19
	72	12	5	3	0	20

() 内数字はLB培地で培地黄変しガス発生のないものを含む数

表4 M-FC培地により分離されたコロニーのAPI20Eによる同定

菌名	菌株数	コロニーの性状			
		典型A	典型B	中間型	非典型
<i>Escherichia coli</i>	9	9	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	5	5	3	1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	4	0	0	4	0
<i>Acinetobacter spp</i>	3	0	0	0	3
その他(未同定)	5	0	0	0	5
計	35	14	5	7	9

菌種の判明したものは35菌株中30株で, 菌種は*E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. sakazakii*, *Acinetobacter spp*の4種であった。*E. coli* 9株は全て典型Aに, *K. pneumoniae* 14株は典型～非典型までの類型すべてに見られた。

EC培地の44.5℃の発育能をみると典型A, Bでは24時間では13/19株, 48時間では17/19株が陽性であった。中間型～非典型の大腸菌群は24時間では0/8株, 48時間では2/8株が陽性であった。

今回の海水浴場の検査結果からは, 他の河川水における報告²⁾³⁾と比較し菌種の判明したのは4種と少なく結論づけるのには充分でないが, M-FC法の判定に際しては, 色調については典型Aに分類される濃青～青のコロニーをふん便性大腸菌群として数えることが重要と思われた。コロニーの大きさについては, 典型A中3株の直径約0.5mmのコロニーが*E. coli* 2株, *K. pneumoniae* 1株と同定されたことから, 微細なコロニーについても注意深く計数する必要があった。なお, 中間型に属する*K. pneumoniae*の1株は44.5℃, 24時間培養後室温で2～3時間放置により急激に青味

を帯びてくることから, 計数は迅速に行なう必要がある。

なお今後分離菌株をふやし継続して調査することが必要だと思われた。

参考文献

- 1) 環境庁水質保全局編：水質環境基準検討会報告書, 1983
- 2) 赤石尚一ら：メンブランフィルター法による河川水中のふん便性大腸菌群の検討, 札幌市衛生研究所年報, 11, 98-102, 1983
- 3) 尾藤朋子, 北原節子：MF(メンブランフィルター)法によるふん便性汚染指標細菌の測定に関する検討, 用水と廃水, 26(7), 44-49, 1984