

○岸本 満<sup>1,2</sup>、渡邊 晶次<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>名古屋学芸大院・栄養科学、<sup>2</sup>名古屋学芸大・健康栄養研、<sup>3</sup>朝日メンテナンス工業(株))

## 目的

微生物器材中の細菌を分離同定し、器材の細菌分配特性と黄色ブドウ球菌増殖抑制の有無を把握する。

## 背景

ノロウイルス等消化器系感染症はヒトの糞便およびトイレ環境が感染源になるリスクが高く、清潔な環境を維持することは重要。公共施設及び商業施設のトイレについては管理者、利用者ともにその衛生状態に対する関心は高く、特に病院、高齢者施設、保育園、幼稚園、小学校等の免疫弱者が生活する施設では確実な除菌、殺菌、そして悪臭抑制が求められる。CBS®(クリーンバイオシステム®;ホテイ産業研究所)で用いる微生物器材(商品名:バイオプレート、マーキュリーほか)は土壌由来好気性細菌を利用して便器等の汚れ、悪臭除去を行う用具として開発された。本微生物器材の増殖抑制そして悪臭抑制に対する効果を検証する。

## 微生物器材

ホテイ産業研究所 <http://www.e-hotei.com/>

バイオプレート(小便器用)

ミニバイオプレート(小便器用)

マーキュリー(ハイタンク用)

バイオボール(小便器内下部用)

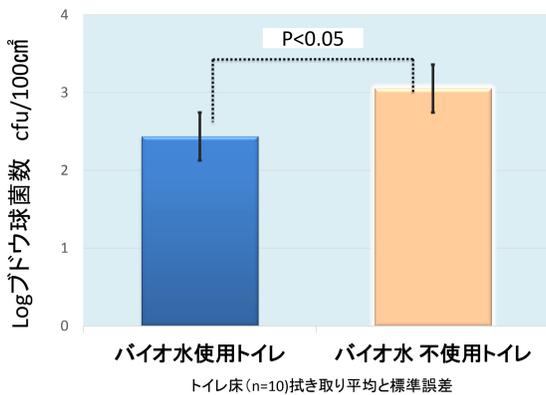
## 1. 「バイオ水」のブドウ球菌生育抑制効果

### ①実験方法

微生物器材マーキュリーを12~24時間水道水に浸漬した「バイオ水」を3~6週間使用/不使用して清掃したトイレ床を各10カ所、100cm<sup>2</sup>ふき取り、黄色ブドウ球菌用測定プレートSTX(3M®)上に増殖したコロニー数を計測。

### ②結果

バイオ水不使用のトイレ床のブドウ球菌数が有意に多かった。



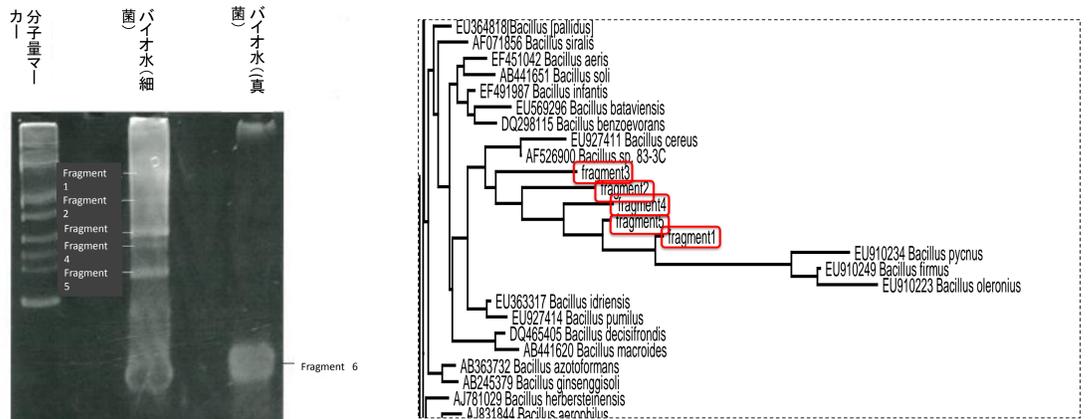
## 2. 「バイオ水」の微生物の解析

### ①実験方法

微生物器材の微生物担体を20°Cで16時間、滅菌脱イオン水に浸漬、フィルターろ過し培養、増殖した微生物菌叢を、細菌は16SrRNA遺伝子により、真菌は28SrRNA遺伝子によるPCR-DGGE解析を行った。塩基配列をSequencher ver. 3.1.1で解析BLASTsearchにより、近縁の種の塩基配列を推定し、ClustalWにて系統樹解析、TreeViewにて系統樹を作成。

### ②結果

細菌のフラグメント1~5はBacillus属菌のグループに系統化された。真菌は1つのフラグメントが得られたが、真菌のフラグメントから塩基配列及び系統樹の解析はできなかった。バイオ水ろ過済みフィルターのうちポテトデキストロース寒天培地で培養したフィルターはコロニー形成の確認が出来なかった。



## 3. 「バイオ水」細菌の同定

### ①実験方法

SCD寒天培地上で生育したコロニー5株を単離し、16SrRNA遺伝子の増幅、塩基配列を確認した。すなわち、27F及び1492Rを用いてコロニーダイレクトPCR、電気泳動で増幅産物を確認後、ゲルろ過精製、PCR産物の濃度を測定。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)によるシーケンス後反応産物を精製、ABI PRISM 3100にて塩基配列を確認、各塩基配列をSequencher ver.3.1.1で解析し、BLAST searchにより最も近い菌種の塩基配列を推定し、同定した。

### ②結果

- 菌株1(S1): *Bacillus circulans*
- 菌株2(S2): *Paenibacillus lautus*
- 菌株3(S3): *Bacillus abyssalis*
- 菌株4(S4): *Paenibacillus sp.*
- 菌株5(S5): *Paenibacillus sp.*

## 4. 微生物器材からの細菌の分配~「バイオ水」中の菌数変化~

### ①実験方法

- 1) バイオ水の調整: 水道水20L入りポリタンクにマーキュリーを浮かべ、室温25°Cで静置、24時間毎に水を入れ替え。
- 2) 一般生菌、従属栄養細菌、芽胞菌の菌数計測
  - A サンプルング: 試験開始からそれぞれ24時間、7日間、14日間、21日間、28日間経過時のポリタンク中の水20Lをメンブレンフィルター法(孔径0.45µm)で水中の細菌を回収。
  - B 培養: <一般生菌> メンブレンフィルターを標準寒天培地にて37°Cで48時間培養。  
<従属栄養細菌> メンブレンフィルターをPGY培地にて37°Cで1週間培養。  
<芽胞菌> 滅菌生理食塩水1mlでメンブレンフィルター表面を洗浄し、その洗浄液を各耐熱処理条件に従って熱処理、標準寒天培地にて混釈し37°Cで48時間培養。

### ②結果

1日経過時の放出細菌数に対し、菌数減少は見られるものの28日経過後においても一般生菌、従属栄養細菌、芽胞菌を確認。20L中に放出される菌数は少ないが、長期間細菌を供給、分配する器材である。

培養菌種	日数	1日目		7日目		14日目		21日目		28日目	
		#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2	#1	#2
一般生菌(cfu/20L/1d)		72	72	23	25	21	65	88	19	20	14
従属栄養細菌(cfu/20L/1d)		40	42	17	26	28	29	5	10	26	23
芽胞菌(cfu/20L/1d)		0	0	0	0	6	1	2	5	4	6

\*芽胞菌の耐熱処理条件: ・1日間経過後...100°C、10分間 ・7日間経過後...80°C、10分間 ・14、21、28日間経過後...60°C、10分間

## 5. 「バイオ水」細菌の黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制

### ①実験方法

*Staphylococcus aureus* (NBRC14462)と単離同定菌株S1~S5、および*Bacillus*属等標準株3株をSCDブイオンで増菌培養後、それぞれ黄色ブドウ球菌用測定プレートSTX(3M®)および生菌数測定用測定ACプレート(3M®)で菌数測定。増菌液はSCDブイオンで段階希釈し、濃度の異なる希釈菌液各2mlを混合し24時間35°Cで培養後、増殖した*S.aureus*数を計測した。Controlと比較して*S.aureus*増殖菌数が減少した割合を増殖抑制率として対数比で計算した。

### ②結果

単離同定株5株のうちS2:*Paenibacillus lautus*とS4:*Paenibacillus sp.*で*S.aureus*増殖抑制率が高い組み合わせがあった。S2株は標準株 *Paenibacillus lautus* (NBRC15380)と同菌種だが、標準株には*S.aureus*増殖抑制傾向は見られなかった。標準株*Bacillus circulans* (NBRC13262)も増殖抑制率が高く、同菌種のS1:*Bacillus circulans*も同様に増殖抑制が高い傾向がみられた。

菌株等	培養前後の菌濃度 Log cfu/ml	培養前 → 培養後		<i>S.aureus</i> 増殖抑制率 (Log/Log)
		<i>S.aureus</i> Log cfu/ml	<i>S.aureus</i> Log cfu/ml	
Control	0.00	2.38	7.83	----
S1 : <i>Bacillus circulans</i>	0.00	1.37	7.68	----
	4.48	2.72	7.26	7.3%
S2 : <i>Paenibacillus lautus</i>	5.48	1.72	5.98	22.2%
	6.81	2.72	6.30	19.5%
S3 : <i>Bacillus abyssalis</i>	7.81	1.72	4.04	47.4%
	6.54	2.72	7.94	-1.4%
S4 : <i>Paenibacillus sp.</i>	7.54	1.72	6.25	18.7%
	5.15	2.72	6.96	11.0%
S5 : <i>Paenibacillus sp.</i>	6.15	1.72	5.56	27.6%
	6.46	2.72	7.65	2.2%
<i>Bacillus circulans</i> NBRC13262	7.46	1.72	6.57	14.4%
	5.08	2.38	5.22	33.3%
<i>Paenibacillus lautus</i> NBRC15380	6.08	1.37	5.26	31.5%
	7.36	2.38	7.96	-1.7%
<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> NBRC15660	8.36	1.37	7.49	2.5%
	5.71	2.38	7.29	6.8%
	6.71	1.37	7.05	8.3%

## 6. まとめ

1. 本微生物器材で調製した「バイオ水」はブドウ球菌を増殖抑制した。
2. PCR-DGGE解析の結果「バイオ水」微生物は*Bacillus*属菌に系統化された。
3. 5単離株は*Bacillus*属(2株)および*Paenibacillus*属(3株)だった。
4. 微生物器材は水中で28日間、連続して細菌を供給・分配する機能がある。
5. S2、S4株(*paenibacillus*属)は*S.aureus*増殖抑制率高く(-2Log以上)、S1株(*Bacillus circulans*)も高い傾向だった。トイレ悪臭はアンモニア産生菌(ブドウ球菌等)の増殖が原因であることから、本微生物器材の悪臭軽減の背景にはブドウ球菌増殖抑制作用があると推測される。

名古屋学芸大学大学院  
環境衛生学研究室  
Email: mkishi@nuas.ac.jp

朝日メンテナンス工業(株)  
統轄本部 バリュース推進部  
Email: s.watanabe@asahi-mtn.co.jp