

環境水の大腸菌群数評価における簡易型混合基質培地の有用性

○佐藤 洋一（日大工・土木）

1. 研究背景・目的

飲用水源となる環境水においては消化器系病原菌への備えが必要であり糞便性汚濁の指標として取扱が容易な大腸菌群数が採用されている。

大腸菌群数の測定は平板培地試験と液体培地試験（最確数試験）に区分され¹⁾ 平板培地試験の代表例であるデソキソコレート培地では最も多様な菌種を分離でき、また、液体培地では試料原液 1ml の混積が最大の供試量である寒天培地に対して倍濃度の培地 10ml に試料原液 10ml を接種することができるので極少数の大腸菌群を検出できる精度的な優位性を有しているが、これらの方法による検出菌中には腸内細菌科に属さない菌種も含まれており、厳密には糞便汚染の指標となっていない可能性が指摘されている²⁾³⁾。

環境水の大腸菌群数管理の基準については、水道 1 級を含む公共用水域の河川 AA 類型の大腸菌群数が 50MPN/100mL 以下と定められていることから、試験水 100mL 中をコロニー 50 個（すなわち 0.5MPN/mL）への対応が求められ最確数法による測定が採用されているが、この定量には、検出操作に時間と習熟を要することなど、定量技術の向上した現在では改善を考える要素が多分にある。

本稿は、主に食品衛生管理の分野で活用されている大腸菌検出用特定基質培地に着目し環境水質評価での有用性を考察するものであり、検出操作の簡便性に優れた簡易型混合基質培地である EC コンパクト

培地（以下、EC-C 培地と称する）を用いた検討を報告する。

2. 環境水管理における大腸菌指標

厚生労働省では、2003 年の厚生科学審議会答申を受けて「水質基準に関する省令」を公布し 2004 年から施行された。

ここでは水道水の細菌学的項目として従来の「大腸菌群」から「大腸菌」に指標微生物が変更になり、その後、 β グルクロニダーゼの検出による酵素基質培地による菌数測定が公定法に採用された。また、2018 年には厚生労働省専門委員会において、「糞便汚染は大腸菌群ではなく大腸菌を指標とし検水 100mL から検出されないこと」という新基準案が示された。

3. EC-C 培地の概要

酵素基質培地は 1970～1980 年頃から多くの検討がなされ、主として食品衛生管理での活用を目的として、大腸菌群の特徴である乳糖を分解する酵素である β ガラクトシダーゼの検出や大腸菌の特異酵素である β グルクロニダーゼを検出するための培地が開発されてきた³⁾。

こうした中で、従来法の欠点である操作の煩雑さや要練性を省略し、簡便で誰でも容易に精度を確保できる大腸菌群数簡易培地「コンパクトドライ CF」が開発された⁴⁾。

EC-C 培地は、この CF をベースに、簡易な操作性はそのまま β グルクロニダーゼ（大腸菌陽性）と β ガラクトシダーゼ（大腸

菌群陽性)の両酵素を識別検出するために開発された混合基質培地であり、それぞれの識別結果は培地上に青色コロニー：大腸菌、赤色コロニー：大腸菌群として定量される。

EC-C 培地を含めた特定基質地の性能については既に多くの評価事例があり^{5) 6) 7)}、いずれの結果も従来法との良好な相関性が報告されている。

4. 実験概要

4-1. 実験の目的

EC-C 培地は大腸菌と非腸管性大腸菌群を同時に定量でき、また、常温での取扱が可能で検水及び器具の前処理が不要であるなど極めて操作性に優れた特質を持っている。

本研究は、このような簡便な培地を用いて、実河川などの環境水中の大腸菌と大腸菌群の識別検出への適用を確認することを目的とし、また、環境水中の水質評価において重視すべき大腸菌群の温度別消長について、EC-C 培地による追跡・検討の可能性を考察した。

4-2. 実験の概要

実験に用いた検水は、日本大学工学部の学内を流れる準用河川徳定川の河川水を用いた。実験期間は農業排水の影響の少ない時期に配慮し4月20日に採水し同日から培養を開始した。

検水は1Lポリエチレンボトルで開栓保管とし、5℃、10℃、15℃、20℃の温度条件で管理を行った。これを48時間培養し、3、6、12、24、36、48時間経過後の菌数を計測した。

実験条件の設定においては、大腸菌群中の大腸菌は高温発育(37℃)、外界由来菌は

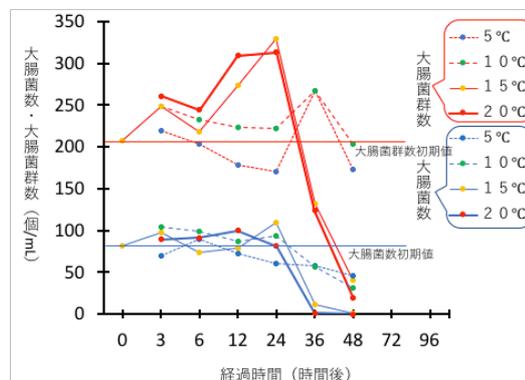


図-1 大腸菌及び大腸菌群数の経時変化

低温発育(20℃)を至適とするという報告⁸⁾、大腸菌数の減少は通常河川で24時間程度、汚濁河川は48時間以上で始まるとの報告⁹⁾を参考に温度条件、培養時間を設定した。

4-3. 測定結果

図-1及び表-1測定結果を示す。

実験開始時に測定した検水は、採水時水温15℃で青色コロニー数：81、赤色コロニー数：126で、総菌数に占める大腸菌の割合は39%であった。河川等環境水中の大腸菌群数に占める大腸菌の割合は、概ね10%程度であるとの複数の調査報告がある^{10) 11) 12) 13) 14)}ことを踏まえると、徳定川の大腸菌は相当高い比率を占めている。また、下水中においては、大腸菌数の割合が3～4割である¹⁴⁾との報告もあり、徳定川の検水は、自流が少ない小河川で採水地点がアパート・住宅密集地の流下直後であることの影響が大きいなど特異な試料的特徴があると考えられる。

培養状況に関しては、各温度条件の大腸菌数は全条件において24時間経過まで菌数の大きな変動は見られず、24時間経過後は高い温度条件ほど急速に菌数を減少させた。大腸菌群数においては、高温側の2条件(15℃、20℃)で24時間経過まで菌数の増加が見ら

表-1 大腸菌及び大腸菌群数の経時変化

経過時間 (時間後)		0	3	6	12	24	36	48	合計
5℃	大腸菌 (青)	-	70	90	72	61	58	46	397
	大腸菌群 (赤)	-	150	113	107	109	209	127	815
	総菌数 (計)	-	220	203	179	170	267	173	1212
10℃	大腸菌 (青)	-	104	99	87	93	56	31	470
	大腸菌群 (赤)	-	144	134	137	129	211	172	927
	総菌数 (計)	-	248	233	224	222	267	203	1397
15℃	大腸菌 (青)	81	98	74	79	110	12	1	374
	大腸菌群 (赤)	126	151	144	195	220	120	39	869
	総菌数 (計)	207	249	218	274	330	132	40	1243
20℃	大腸菌 (青)	-	89	91	100	81	1	0	362
	大腸菌群 (赤)	-	172	153	209	232	123	19	908
	総菌数 (計)	-	261	244	309	313	124	19	1270

れた。その後、菌数増加の大きかった条件については急速に菌数を減少させた。

増殖菌数については、最大増殖時の総菌数で 200~300 個程度と高温条件で多い傾向があり、延菌数総計は温度条件によらず 1200~1400 個の範囲で概ね一定と判断できる状況にあった。

5. 考察

大腸菌は基本的な生残環境が哺乳動物の腸管内であるため温度条件 20℃以下では増殖しない⁸⁾ことが指摘されている。今回の結果も同様の結果となった。また、土壌や川床泥の中には低温性大腸菌群が広く分布し容易に検出されるとの報告¹⁵⁾がある。今回の実験で増殖の見られた大腸菌群についても川床泥等から供給された菌であるものと考えることができる。

増殖時間についても既往報告⁹⁾と同様に 24 時間をひとつの節目とした状況が確認された。

増殖菌数については、河川水中に新たな有機物の供給がなければ菌数は横ばいになるとの報告¹⁶⁾があり、培養に供したポリ容器中の有機物量で菌数が制限された可能性が考

えられる。

24 時間経過後の菌数の減少速度が高温条件のものが急速であることについては、試料の保管温度と生残率に関する同様の報告¹⁷⁾がある。また、培養温度の上昇に伴い増殖可能な細菌類の選択性が高まることで菌数が減少するとの報告¹⁸⁾もあるが、高温条件ほど菌の増殖活性が高いと仮定すると容器中の有機物の消費が早いことで急速に菌数が減少した可能性も考えられる。

6. まとめ

大腸菌及び大腸菌群の測定は、食品衛生管理や医学の分野で先行的に種々の検討・議論がなされてきた経緯がある。簡易型混合基質培地である EC コンパクト培地についても、食品衛生管理における大腸菌及び大腸菌群定量での活用を主眼において開発された。

今回の検討では、環境水の大腸菌群数評価においても、EC-C 培地を活用することで、非常に簡易に、大腸菌と大腸菌群を分離して定量が可能であり、また、菌の増殖条件や増殖の特性などについても従来法による計測結果と同様の結果を追跡することが可能である結果が得られ、今後の有効な活用に期待が

持てることが示唆された。

今回の検討は、機器の制約から温度条件のレンジが狭く、大腸菌増殖の至適条件である36℃及びそれ以上の高温域での検討が未実施である。今後、追加検討を実施していく。

謝辞

菌体の培養や定量に関わる実験・検証には多大な時間と手間がかかり、また、その多くは熟練を要する作業である。

簡易培地の開発によって、現在では簡便な手法が確立されつつあるが、今回のような検討には従来法による評価との対比が必要であり、本報でも数多くの既往文献を引用・参照させて頂いた。

これら成果を蓄積し有用な情報を提供していただいた諸兄に敬意と謝意を表します。

参考資料

- ・1) JIS K0350-20-10
- ・2) 中村ら、各種大腸菌群検査用培地から検出される菌の同定とその比較、日本食品微生物学会雑誌 vol. 29(3)、164-169、2012
- ・3) 水落、意外と盲点一検査培地の選択／識別の基本原理の理解、日本食品微生物学会雑誌 vol. 31(2)、64-69、2014
- ・4) 寺村ら、食品での大腸菌群数測定用簡易培地(コンパクトドライCF)の評価、日本食品微生物学会雑誌 vol. 21(3)、201-206、2004
- ・5) 広谷、特定酵素基質法による河川の糞便汚染の測定と評価、河川整備基金助成事業1988
- ・6) 古畑ら、糞便汚染指標としての大腸菌検出に関する基礎的検討、麻布大学雑誌第11・12巻・2005
- ・7) 伊予ら、浄化槽における糞便性指標細菌

の計数のための採水・希積分注器の基礎的検討、浄化槽研究 vol. 19 No. 2 2007

- ・8) 赤塚ら、大腸菌群測定法の水質汚染指標性の検討、岡山大学医学部資料 1974
- ・9) 田中ら、環境水の異なる保存温度での細菌数の経時変化、長崎県衛生公害研究所報46、2000
- ・10) 谷本ら、河川水の大腸菌群検査方法と汚濁の指標性について、水質汚濁研究 第5巻 第4号 213-223 1982
- ・11) 石井ら、都内河川の大腸菌群数に関する研究(3) —江戸川における大腸菌群と大腸菌の挙動—、東京都環境科学研究所年報2010
- ・12) 藤本ら、熊本県内河川における大腸菌及び大腸菌群の挙動 —特定酵素基質寒天培地を用いた疎水性格子付きメンブレンフィルター法(HGMF法)による調査結果、熊本県資料、2012
- ・13) 和波、都内沿岸域における衛生指標細菌類の実態、東京都環境科学研究所資料、2014
- ・14) 芦立、水環境における微生物指標の現状と展望、衛生工学シンポジウム論文集、1: 116-121 1993
- ・15) 堀江ら、土壌における低温性大腸菌群の分布、食衛誌. Vol. 26、No. 6 1985
- ・16) 中野、浄化槽処理水中の大腸菌群と大腸菌の環境中での消長、大阪府立公衛研所報第54号 2016
- ・17) 木瀬ら、環境水の大腸菌の生残性について、東京都環境科学研究所年報2016
- ・18) 石井ら、東京湾内湾における衛生指標細菌の発生源の推定 ～簡易培地を用いた環境水中大腸菌数測定の試行～、食衛誌. Vol. 16、No. 5 October 1975