

研究報告

三重県内の河川における大腸菌群の 数種の培地による生育比較

岩崎誠二、地主昭博、松井孝悦

三重県内の大腸菌群数について、河川の常時監視結果を使用して解析を試みた。その結果、年間平均値は横ばいまたはやや増加の傾向であり、個々の値では夏期に増加、冬期に減少する1年周期の変動を示した。また、河川水から寒天平板培地で単離した大腸菌群を数種の培地で培養したところ、BGLB、LB-BGLBおよび特定酵素基質培地で70～80%が陽性を示し、m-FC、ECおよび特定酵素基質培地(蛍光)では陽性は10～20%であった。それらの大腸菌群をコロニーの形状で3種類に分類して生育試験を行ったところ、形状によって陽性の割合が異なっていた。

1. はじめに

河川水等の病原菌等による汚濁の指標として大腸菌群が環境基準の項目として設定されており、公共用水域の常時監視が実施されている。

大腸菌群とは、「乳糖を分解して酸とガスを産生する無孢子の好気性または通性嫌気性グラム陰性桿菌の総称」である。公共用水域の常時監視ではBGLB法が採用されているが、大腸菌群と定義されるものは自然界に幅広く分布していることが知られている。そのため、従来から指摘されているように¹⁾、本法の検査結果では人畜に由来する糞便による汚染を的確に把握できないおそれがある。

その観点から、まず県内の公共用水域の常時監視の結果を用いて大腸菌群数の経年変化、季節変動等の解析を行った。その上で、河川水の糞便による汚染の実態をより詳細に把握するために、現在我々は表1-1に示す6種の培地の他、糞便性連鎖球菌も指標に加え調査しているところである。それらの調査結果を正しく解析するためには、それぞれの培地が持つ特性を十分に把握しておくことが必要である。

そこで筆者らはまず河川水から大腸菌群を単離して、上記6種の培地で生育試験を行うことにより、培地の大腸菌群に関する検出能力を比

較したので報告する。

2. 調査方法

2.1 大腸菌群数の常時監視結果の解析

大腸菌群数の解析には、三重県における公共用水域の常時監視の結果を使用した。なお、大腸菌群数の常時監視ではBGLB培地による最確数法を使用している。また、数値は常用対数に変換して解析を行った。

2.2 大腸菌群の生育試験

県内の公共用水域の常時監視地点(10地点、8河川 表2-1)で採取した河川水から単離した大腸菌群を生育試験に使用した。単離は、デソキシコーレート寒天平板培地を使用した混釈培養で行なった²⁾。なお、混釈培養で生成したコロニーは再度、同培地で塗抹培養を行い細菌を純化した。(図2-1)。

純化した菌株は表1-1に示した培地で培養試験を行った。

3. 結果および考察

3.1 経年の変動

三重県の公共用水域の常時監視が開始されてから20年以上が経過している。その間大腸菌群

表1-1 大腸菌群の検出に使用した培地の諸性質^{3,4)}

培地名	本報での略称	組成、性状等	培養条件	検出機構	検出対象
BGLB	BGLB	ペプトン、乳糖、牛胆汁粉末等にトリリアントクレーンを含む液体培地	37°C, 48hr	乳糖を分解して発生したガスをダーラム管にて確認	大腸菌群
LB-BGLB	LB	肉エキス、ペプトン、乳糖等にBTBを含む液体培地(LB培地)	LBで37°C 48hr, BGLBで48hr	乳糖を分解して発生したガスをダーラム管にて確認	大腸菌群
特定酵素基質培地 (MMO-ONPG)	MMO	塩類の他、 α -ニトロフェノール- β -D-ガラクトピラニド(ONPG)および4-メチルウンベリフェリル- β -D-ガラクトピラニド(MUG)等を含む液体培地	37°C, 24hr	ONPG分解で α -ニトロフェノールが生成、黄色発色	大腸菌群
m-FC	m-FC	トリプトース、ホリハプトン、酵母エキス、乳糖、胆汁酸塩等に指示薬としてアゾリンブルーを含む寒天平板培地	44.5°C, 24hr	44.5°Cで生育を制限し、乳糖を分解して酸を生成したコロニーをアゾリンブルー変色で確認	糞便性大腸菌群
EC	EC	ペプトン、酵母エキス、乳糖、胆汁酸、塩類等を含む液体培地	44.5°C, 24hr	44.5°Cで生育を制限し、乳糖を分解して発生したガスをダーラム管にて確認	糞便性大腸菌群
特定酵素基質培地 (MMO-MUG)	MUG	特定酵素基質培地(MMO-ONPG)に同じ	37°C, 24hr	大腸菌(E.coli)に特異的に存在する酵素 β -グルコニダーゼによりMUGが分解、代謝物を366nm紫外線で蛍光確認	大腸菌

河川水検体

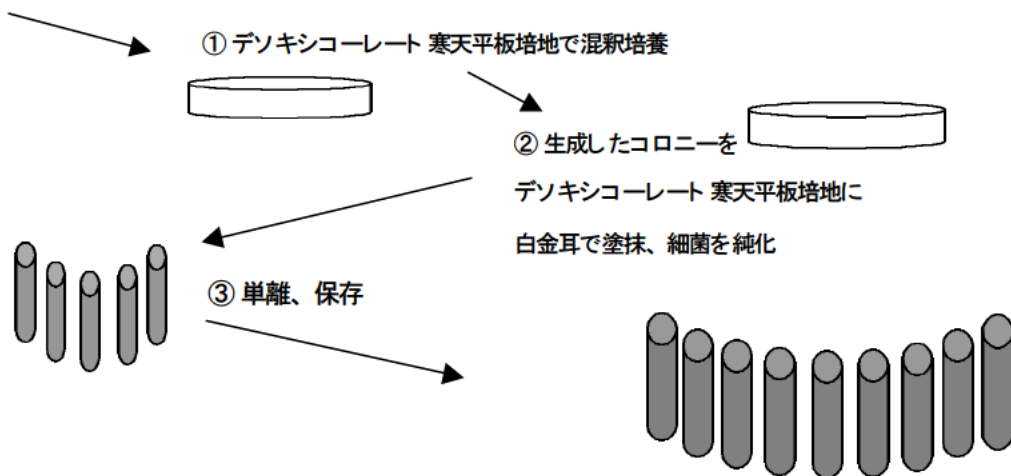


図2-1 大腸菌群の単離および試験方法

④ 表1-1の培地で培養試験

表2-1 調査対象の河川名および地点名

河川名	地点名	類型
志登茂川	今井橋	C
安濃川	御山荘橋	A
雲出川	雲出橋	A
坂内川	中部大橋	A
"	荒木橋	B
外城田川	大野橋	B
"	野依橋	C
宮川	岩出	A(補助地点)
一ノ瀬川	飛瀬浦橋	AA
五十鈴川	宇治橋	AA

数は年平均値で大部分の地点が横ばい、またはやや増加の傾向であった(図3-1および図3-2)。環境基準の適合率は例年、pH、BOD、SS等と比較して低い傾向であるが、図3-2の例示でも年間の平均値が環境基準を下回る年はまれであった。

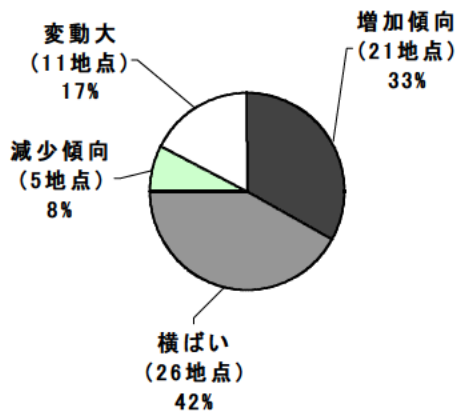


図 3-1 大腸菌群数の経年変動の増減傾向

3.2 月間の変動

図3-3は過去10年余りの常時監視の結果である。図から、毎回の測定値ではおおむね1年を周期とした変動があることが読みとれる。そこで大腸菌群の生育と環境温度との関係を明らかにする目的で、まず年間を水温により高温期、中温期、低温期の3期に分割した。そしてそれぞれの平均値を算出したところ、概ね高温期が

中、低温期と比較して高い値であった。それらの値について、一元配置分散分析法で差の有無を検定した。その結果、表3-1のとおり5%危険率ではほとんどの河川で期間間の有意差が確認された。

表3-1 季節別の大腸菌群数の一元配置分散分析による分析結果

危険率	0.05	0.01
今井橋		
御山荘橋	○	○
雲出橋	○	
中部大橋	○	○
荒木橋	○	○
大野橋	○	○
野依橋	○	
岩出	○	○
飛瀬浦橋	○	
宇治橋	○	○

○:有意差あり

高温期、すなわち夏期は河川の水量が増加する傾向にあるので、人畜の糞便に由来する大腸菌群の排出量が一定であれば、大腸菌群数はむしろ減少することが予想される。にもかかわらず夏期に大腸菌群が増加するという事は、BGLB法が天然に由来する細菌群をも計測していることを示唆するものである。したがって、人畜の糞便による汚染の状況を把握するためには、BGLB法他、糞便性大腸菌群に限定して検出するm-FC法なども使用することが必要である。

3.3 培地による生育の差異

大腸菌群を検出する培地および培養方法は数多く提案されている。そして、それぞれの手法ごとに、検出される大腸菌群の内容も異なっている。そのため、各手法は目的に応じて使い分けなければならない。したがって、測定の結果に正当な評価を与えるためには、使用する培地の特性を把握しておく必要があると考えられる。

そのため本研究ではまず図2-1の手順でデソキシコーレート寒天平板培地を使用して河川水から大腸菌群に属する細菌を180株単離した。それらの細菌を表1-1の培地で培養し生育の試験を行った。その生育の状況は、図3-4および表3-1のとおりであった。単離した大腸菌群に対し、LB、BGLB、MMOは70~80%が陽性であり、

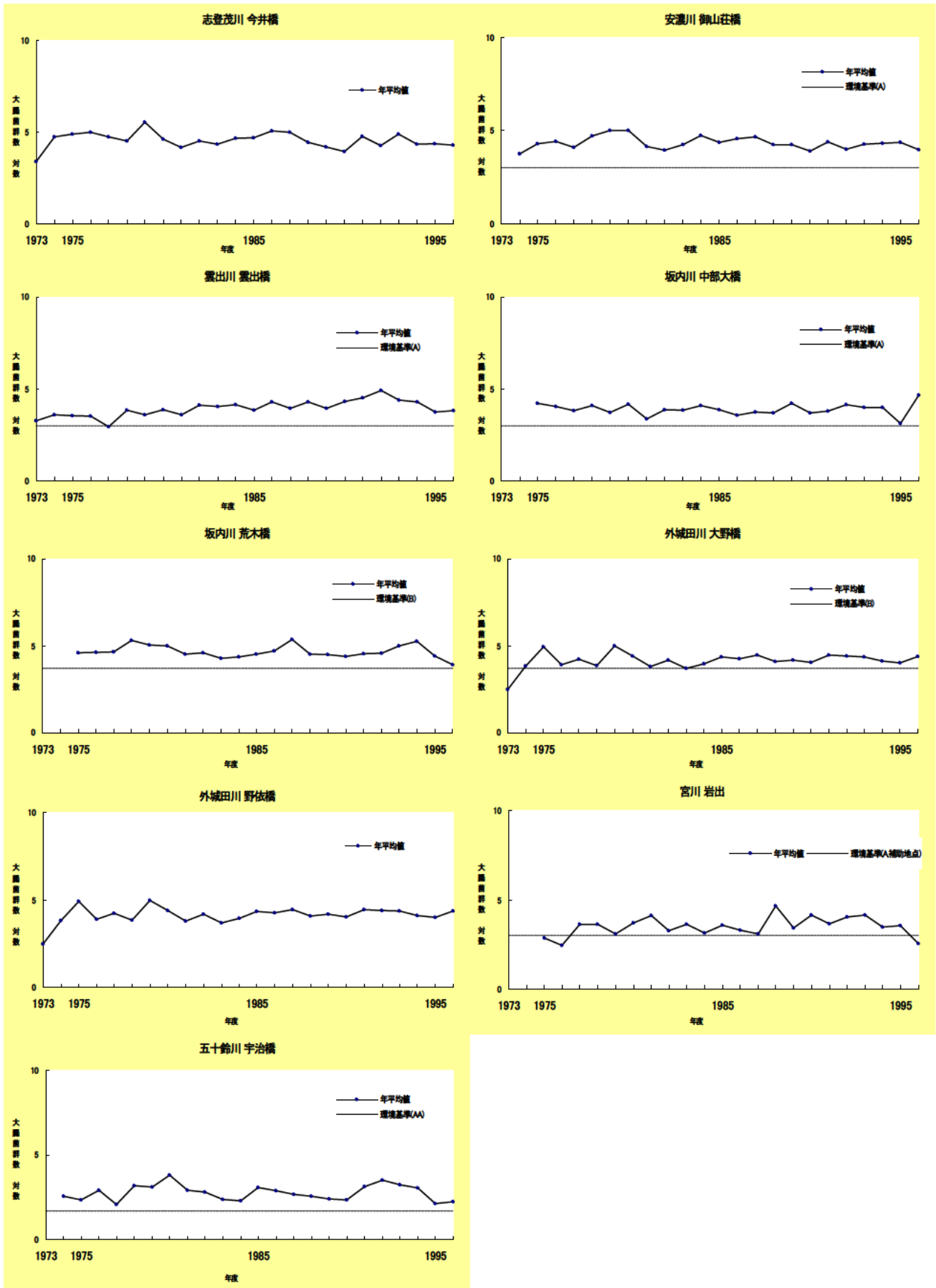


図3-2 大腸菌群数の常時監視結果の経年変化

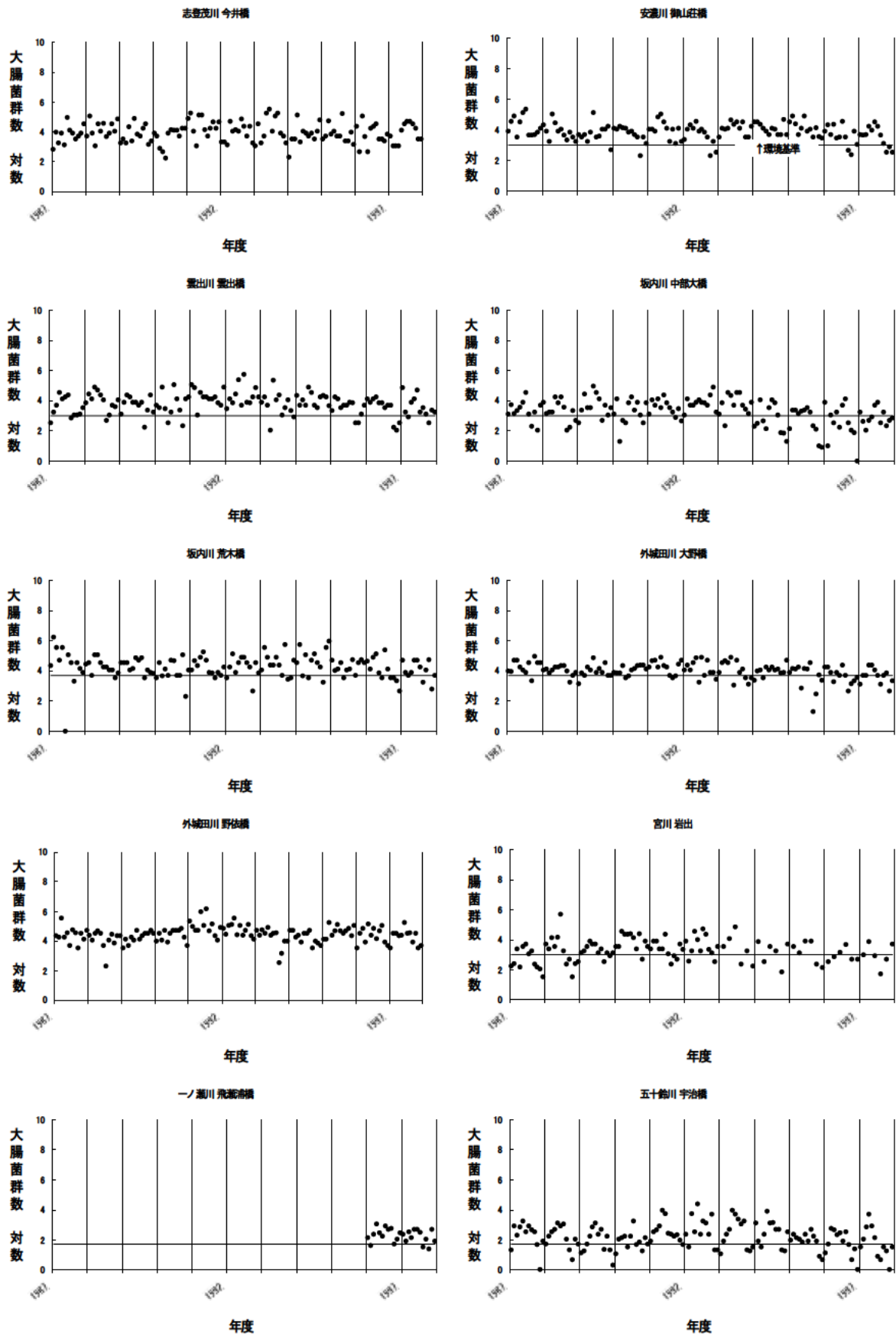


図3-3 大腸菌群数の常時監視における測定値の変動

大腸菌群を広く検出していた。これに対し、主として糞便性大腸菌(群)を検出するm-FC、EC、MUGは10~20%程度で、BGLB等と比較して選択性が大きいことが確認された。

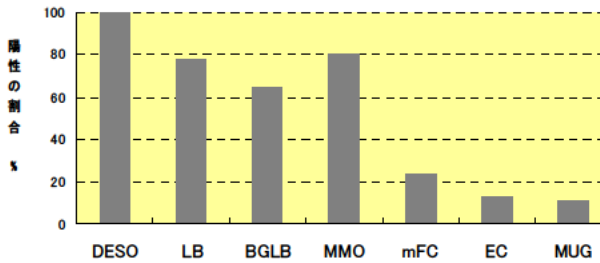


図3-4 単離した大腸菌群の培地別の生育状況

また、陽性となる割合が同等の場合であっても相互に陽性、陰性を取り違えることがあった。

表3-2で、たとえばLBとBGLBの組み合わせでは、LBは40株陰性であったが、うち13株はBGLBでは陽性であった。逆に、BGLBで64株陰性であるが、うち37株はLBで陽性であった。

表3-2で取り違えが最も少なかったのはECとMUGの組み合わせであった。MUGで検出される細菌はほとんど *Escherichia. coli* であると言われている⁴⁾。このことから、ECは*E. coli*をかなりの確に定量できると思われる。一方、m-FCは*E. coli*の他に糞便性大腸菌に属する細菌を限定して検出することができることとされているので、糞便による汚染を評価する上ではこれも重要な試験法であるといえる。

3.4 大腸菌群のコロニーの形状と各種培地での生育性

混釈培養でデソキシコーレート寒天平板培地に出現するコロニーの形状はさまざまであり、その形状は細菌の種別と何らかの関連性を持つことが予想される。そこでコロニーの大きさ、着色状態と細菌の種類との関連を把握するために、上記の180株を次の3種に分類した。

L : コロニーが1~2mm以上の大型のもの (Large)

S : コロニーが1mm以下の小型のもの (Small)

F : コロニーが広り色が薄いもの (Faint)

これらS、L、Fごとに、図3-4の結果を再集計

したのが図3-5である。これより、LB、BGLB、MMOではいずれの培地であっても陽性の割合の傾向としては、L>F>Sの順であった。Lでは80%前後、Sでも50~70%程度は陽性であった。一方、m-FCではLが36%陽性に対し、Fは19%、Sでは13%であり、LB等と比較してコロニーの形状によって差が見られた。また、EC、MUGではLでそれぞれ22、26%あるのに対し、Fではいずれも10%前後、Sでは大部分の株が陰性であった。

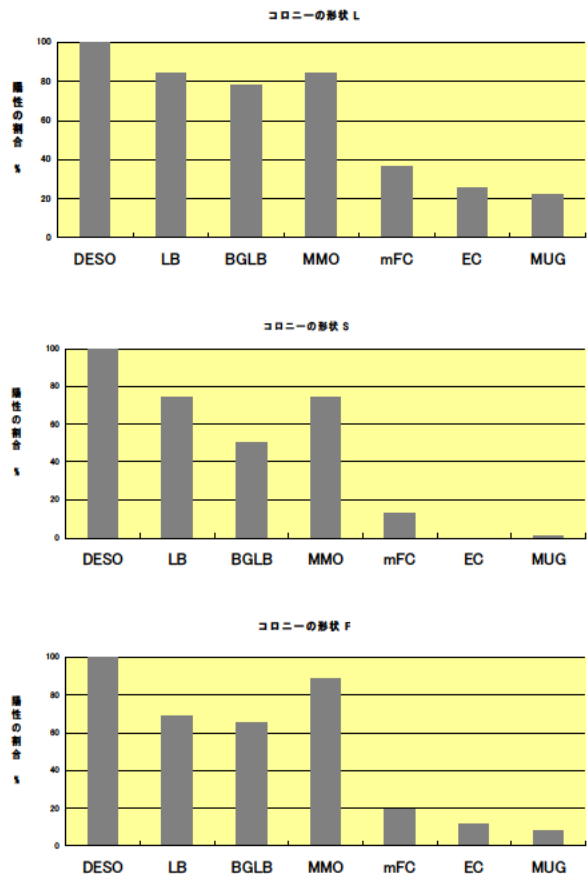


図3-5 コロニーの形状別にみた生育状況

F型のコロニーはL、Sに比べ少なかったのでFの陽性の割合については有意な値でないおそれがある。しかしながら、SとLではEC、MUGの陽性の割合に差があるのは明らかである。EC、MUGで生育する細菌はほとんど*E. coli*であると仮定すれば、本研究で単離した180株では、*E. coli*はL型には2割程度存在するが、S型にはほとんど存在しないことが推察できる。

これらの結果から、さらに多くの試験を行うことにより、コロニーの形状から大腸菌群の内

表3-2 単離した大腸菌の培地による生育の違い

<凡例> LB、BGLBとも陽性 LB陽性、BGLB陰性

		BGLB											
BGLB	+	116	/										
BGLB	-	64	/										
LB	+	140	103	37									
LB	-	40	13	27									
MMO	+	145	114	31									
MMO	-	35	2	33									
mFC	+	43	36	7									
mFC	-	137	80	57									
EC	+	23	21	2									
EC	-	157	95	62									
MUG	+	20	18	2									
MUG	-	160	98	62									

SN比 _(db)	mFC	EC
mFC	***	1.87
MUG	3.26	4.04

<計算手順>

2種類の誤りのある入出力表を作成する

2種類の誤りのある入出力表
出力

入力	0	1	計	誤り率
0	n_{00}	n_{01}	n_0	$p = n_{01}/n_0$
1	n_{10}	n_{11}	n_1	$q = n_{10}/n_1$
計	r_0	r_1	n	

標準誤り率を算出する

標準誤り率
 $p_0 = 1 / (1 + (1/p - 1) * (1/q - 1))$

標準化した入出力表

出力

入力	0	1	計
0	$1 - p_0$	p_0	1
1	p_0	$1 - p_0$	1
計	1	1	2

標準SN比を算出する

SN比
 $0 = -10 \log [1 / (1 - 2p_0)^2 - 1]$

<計算例>

(MUG, ECのSN比)

2種類の培地相互の生育関係

EC

MMO-MUG	-	+	計	誤り率
-	154	6	160	$p = 0.0375$
+	3	17	20	$q = 0.1500$
計	157	23	180	

標準誤り率

$p_0 = 0.0766$

標準化した入出力表

EC

MMO-MUG	-	+	計
-	0.923	0.077	1
+	0.077	0.923	1
計	1	1	2

SN比

$0 = 4.04 \text{ (db)}$

図3-6 SN比の計算手順および計算例

容を推定することが可能であると思われる。

3.5 SN比を利用した培地の生育性の評価

本研究の3-3および3-4で述べたように、従来の培地の検出力の試験では、検出された割合の比較にとどまっているものが大部分である。それらの研究では、誤陽性、誤陰性の存在は確認されているものの、定量的な評価はほとんど行われていない。

しかしながら、表3-2から、2種の培地の関係で、陽性の割合は同等であっても、その検出の内容は必ずしも一致していない。したがって、単に陽性の割合を比較しただけでは培地の生育の特性を十分に把握することはできないと思われる。

表3-2でたとえばECとm-FCの関係に注目した場合、ECが+、- データの入力側、m-FCが出力側であるデジタルシステムとしてみることができ。すなわちECから+の信号を23個入力したところ、m-FC側から21個を+、2個を-と出力したものである。このような入出力の関係は品質工学では、たとえば不良品検知システムにおける良、不良品の選別能力の評価などにみられる。

品質工学においてこのようなシステムのよしあしは、SN比という概念を用い評価することができる⁵⁾。SN比とは次の式で表わされる信号の入出力関係の良さを表す尺度である。

$$\text{SN比} = 10 \log \left[\frac{\text{信号の大きさ}}{\text{ノイズの大きさ}} \right]$$

この定義から理解されるとおり、SN比が大きいほどエラーが少ない、良好な入出力関係である。計数値でのSN比の計算手順は図3-6のとおりである。

先に述べたとおり、SN比は一般に機械系システムの誤作動の評価などに利用されている。それらの誤作動は通常、培地の相互の取り違えと比較してはるかに少ない。そこで本研究では比較的取り違え数が少なかったm-FC、EC、MUGの3培地の組み合わせの評価を行った。

その結果は表3-2のとおりである。ECとMUGは3通りの組み合わせの中ではSN比が最も高い値を示した。すなわちECとMUGは、他の組み合わせと比較して、検出される関係がよく一致していた。言いかえれば、3-3および3-4の考察と同様、ECは大腸菌を的確に定量できる培地であると言える。またm-FCとECおよびm-FCとMUGの比較で合計の取り違え数では前者の方がわずかに少なかったものの、取り違え数の分配の違いにより、SN比では後者がやや大きい結果となった。

いずれにせよ、SN比で培地の特性を解析した結果でも、これら3種の培地の特性に関しては、3-3および3-4で考察した内容とほぼ同様の結果が得られた。

3.6 糞便性連鎖球菌

以上は大腸菌群に関する結果であるが、これ以外に糞便の汚染の指標としては糞便性連鎖球菌が知られている。糞便性連鎖球菌と糞便性大腸菌との存在比から糞便による汚染原因を推定することが可能である⁴⁾。加藤ら⁶⁻⁷⁾は、県内の公共用水域の糞便性連鎖球菌を調査し、糞便性大腸菌との存在比から糞便性汚濁の内容を推定した。その上で、水温による大腸菌群の増減の傾向を把握するためには、糞便性大腸菌群および糞便性連鎖球菌の試験を実施してそれらの存在比を観測してゆくことが重要であることを指摘している。

以上の知見を元に、現在我々は河川の糞便による汚染に関する調査を行っているところである。

4. まとめ

三重県内の公共用水域の大腸菌群を調査したところ、つぎのとおりであった。

(1) 公共用水域63地点の常時監視結果で、年間平均値は横ばいまたは増加の傾向にあり、測定値は1年を周期とした増減の変動があった。

(2) 上記10地点の河川水から単離した大腸菌群を大腸菌群の検査用培地(BGLB、LB、MMO)で培

養したところ70~80%が陽性であった。一方、糞便性大腸菌(群)の検査用培地(m-FC、EC、MUG)では10~20%が陽性であった

(3) (2)で単離した細菌で、コロニーの形状が小さいものは糞便性大腸菌(群)である割合は低かったが、大型のものでは20~40%が陽性を示し、コロニーの形状から大腸菌群の内容がある程度推測できることが示唆された。

(4) 培地の検出の特性をSN比で評価したところ、ECとMUGの類似性が高かった。

2) 並木 博:工場排水試験方法, pp.445-448, 日本規格協会(1993)

3) 環境庁企画調整局企画調整課:環境基本法の解説, pp.433-435, ぎょうせい(1993)

4) 厚生省生活衛生局水道環境部:上水道試験法解説編, p.575, 日本水道協会(1993)

5) 田口玄一:品質工学講座3品質評価のためのSN比, 57-63, 日本規格協会(1988)

6) 加藤 進, 松岡行利, 志村正美, 菅瀬宗博, 渡辺将隆, 白井宣一郎, 宮村典仁, 長井喜久, 上田俊夫, 汚濁指標細菌の挙動からみた河川汚濁の現状(第1報), 三重県環境科学センター - 研究報告, 2, 39-43(1980)

7) 加藤 進, 松岡行利, 金丸 豪, 園部 実, 主要河川におけるフン便性汚濁指標細菌の分布, 三重県環境科学センター - 研究報告, 3, 39-43(1982)

参考文献

1) 例えば、芦立徳厚:水質環境基準項目としての大腸菌群の評価、用水と廃水, 30, (3), 17-26 (1988)

Comparison of Growth in Several Cultures with Coliform Isolated from Riverwater in Mie Prefecture

IWASAKI Seiji, JINUSHI Akihiro and MATSUI Takayoshi

The amount of coliform in public waters in Mie prefecture was assessed using the results of continuous monitoring. The annual average was tending to increase or remain stable near environmental quality standards. The amount of coliform increased in summer and decreased in winter.

Coliform was isolated from riverwater using an agar plate medium, and the strains that were obtained were tested for growth using several media.

Seventy percent to 80% of the strains proved positive with BGLB, LB-BGLB and Minimal Medium ONPG, while 10 to 20% proved positive with m-FC, EC and Minimal Medium MUG. Different positive ratio were observed, according to the shape of colonies that appeared on the agar plate medium.