

II-434 ふん便汚染指標としてのふん便性連鎖球菌の評価と応用

函館工業高等専門学校 土木工学科 正員 芦立 徳厚
 俱知安町役場 河村 彰紀
 株式会社 竹中土木 中川 康之

1 はじめに

着目する水域ないしは水試料の評価において、ふん便汚染を受けているか否かが多くの場合決定的な意味を持つことは言うまでもない。そのためには、適切なふん便汚染指標が必要であるが、現環境基準の大腸菌群はふん便汚染と質的量的に密接な相関性をもった指標として用いることは不適当であり、早急に代替指標を選択し変更すべきことをすでに明らかにした¹⁾²⁾。代替指標の第一候補はふん便性大腸菌と考えられるが、提起されている試験法には若干の問題点もあり、他の指標細菌も検討の対象とする必要がある。

本研究は、ふん便性連鎖球菌をとりあげふん便汚染の指標に適した菌種の選択と妥当な試験法の開発ならびに当細菌の特性を利用した応用法について検討を行ったものである。

2 研究方法

実験材料となる試水は、ふん便そのものを含むものからふん便汚染の可能性のきわめて薄いものまで幅広く採水地点を選定した。ふん便の影響の大きいものから採水地点をあげていくと、全量家庭からの下水を受け入れる分流式下水処理場の流入水（S-1）、活性汚泥法による処理水〔塩素消毒前〕（S-3）、都市内汚濁小河川の中下流部（K-2, K-3）、軽微ないしは時期的な汚染を受ける諸地点（O-2, M-3, K-1, SD-3）の順となる。一方、人や家畜のふん便による汚染がほとんど考えられない地点として清浄河川（M-1, M-2, SN-2）湖沼（O-1, O-3）があげられる。試水は滅菌メジウム瓶に直接採水し実験室に持ち帰って直ちに試験を行った。ふん便性連鎖球菌の分類方法やフラスコ実験の手順については、次節で述べる。

3 結果と考察

ふん便性連鎖球菌（fecal streptococci）は表1に示す菌種の総称である。いずれも人間を含む温血動物の腸管を habitat としているが、*S. bovis* *S. equinus* は牛、馬、豚など家畜のふん便によく見いだされることが知られている。*S. faecalis* subsp. *liquefaciens* は人畜のふん便以外に植物、昆虫、土壌からも検出されることが報告されており、この点が唯一のふん便汚染指標としてふん便性連鎖球菌を用いることの障害となっている。

ふん便性連鎖球菌の試験方法は数多くあるが、定量方法で大別するとMPN法とMF（メンブランフィルター）法となる。これまで多用されてきた前者の代表的な試験法はAzide dextrose broth (ADB)を推定試験とし、Ethyl violet azide broth (EVA)を確定試験とするものであり、培養温度は35±0.5℃である。後者についてはm-Enterococcus 寒天を用いる方法（同じく35±0.5℃培養）が代表的である。両試験法を同時に行った数地点について、4-8回の観測データの平均菌数（m-EA法）と変動係数との関係を示したのが図1である。10 CFU/ml のオーダを除いてMPN法の変動係数がMF法のそれを上回っており、ふん便性連鎖球菌のより正確な定量のためにはMF法が望ましいといえることができる。10 CFU/ml オーダの逆転現象は、たんにデータが少ない故かもしれないが、非ふん便性連鎖球菌の影響の可能性も考えられる。MF法の media としてはKF Streptococcus 寒天が推奨されている（Standard methods）が、当地では検討の結果、非ふん便性連鎖球菌の増殖を促進する傾向が見いだされたので用いなかった。

この検討の際に m-EA 法も非ふん便性連鎖球菌の排除が完全でないことが明らかになった。これには、35℃という培養温度が関与していると考えられるので、ふん便性連鎖球菌がすべて45℃で増殖できることを利用して m-EA法の培養温度を45℃に上げることを検討してみた。数地点について、35℃と45℃の両温度で同時に試験した結果を表2に示した。ふん便そのものの試料といえる流入下水（S-1）では両者の値はきわめて近いが、汚濁河川（K-2）になると半分以下となり、清浄河川（SN-2）ではオーダが一桁下がる。

この結果から、45℃培養が非ふん便性連鎖球菌の排除に有効との推測が成り立つが、これを確認するために図

表1 ふん便性連鎖球菌

Enterococcus Group	
<i>S. faecalis</i>	Group D
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i>	
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>zymogenes</i>	
<i>S. faecium</i>	
<i>S. bovis</i>	Group Q
<i>S. equinus</i>	
<i>S. avium</i>	

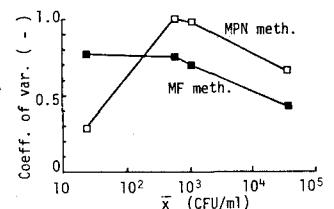
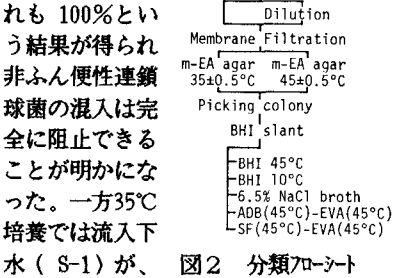


図1 MPN法とMF法の比較

2のフローシートに従って両培養温度で検出されたコロニーの分類を行った。BHI培地（45℃、10℃）と6.5% NaCl存在下での増殖の有無を分類の基準としたが、同時にADB, SF, EVA培地（いずれも45℃）での増殖の有無も試験して分類の参考とした。分類結果を表3に示す。ふん便性連鎖球菌は *Enterococcus Group*, *S. bovis-S. equinus Group* であるので、分類総菌数に対するその割合を求めると、45℃培養ではい



れも100%という結果が得られ、非ふん便性連鎖球菌の混入は完全に阻止できることが明らかになった。一方35℃培養では流入下水（S-1）が、図2 分類フローシート84%、汚濁河川（K-2）が96%、清浄河川（SN-2）が56%となって非ふん便性連鎖球菌の混入が避けられないことは明白である。

以上の結果から、厳密なふん便汚染の指標としては、45℃培養のm-EA法が望ましいということになる。ただ、45℃という培養温度が一部のふん便性連鎖球菌の増殖を阻害するようになると、ふん便性大腸菌におけるm-FC法と同様の問題点をもつことになるので検討が必要であろう。

現環境基準の大腸菌群がふん便汚染を正しく反映しない原因の一つに水中で当菌群が大幅に増殖する事実を明らかにしたが²⁾、ふん便性連鎖球菌についても水中での挙動を確かめる必要がある。

実験は流入下水と清浄河川水を種々の割合で混合した1500mlの試料水を三角フラスコに入れ、20ないし25℃の恒温水槽中でスターラー攪拌した。0, 3, 6, 12, 24, 48時間後に試料水を採取しふん便性連鎖球菌（m-EA法他）、ふん便性大腸菌（m-FC法）の細菌数を測定した。

典型的な二例について、0時間の細菌数を1.0として各細菌の推移を示したのが図3、4である。いずれの結果も、ふん便性大腸菌が12から24時間にかけて一桁近い増殖をみせるのに対し、ふん便性連鎖球菌は24時間までほとんど当初の値と変わらない値で推移しその後急激に減少する。人間にとって脅威となる病原菌は環境水中に流入後直ちに減衰するので、ふん便性連鎖球菌のこの推移はふん便汚染指標として理想的と言える。

また、24時間内ではほとんど増減しない性質に着目して、高感度のトレーサーとして利用することも可能と考えられる。

4 おわりに

ふん便汚染指標としてふん便性連鎖球菌を用いる可能性について検討した結果、m-*Enterococcus* 寒天を用いて45℃で培養すると厳密なふん便汚染指標となることを見いだした（*S. faecalis* subsp. *liquefaciens* の問題は残る）。当細菌は水中での挙動も病原菌汚染指標として最適で、トレーサーとして用いる応用法も考えられる。

【参考文献】1）芦立：第41回年講、II-361（1986） 2）芦立：用水と廃水、30（3）229（1988）

表2 m-EA法検出菌数に与える培養温度の影響

Sample	Date	Wat. temp. (°C)	m-EA (CFU/ml) 35°C	m-EA (CFU/ml) 45°C	35°C/45°C
S-1	62. 9. 7	19.9	6.3x10 ⁴	4.1x10 ⁴	0.65
	62.11. 4	11.2	1.5x10 ⁴	1.2x10 ⁴	0.80
K-2	62.10.12	17.9	2.0x10 ²	7.5x10 ¹	0.38
	62.12.21	5.0	4.5x10 ²	1.6x10 ²	0.36
SN-2	62.10.22	0.7	1.3x10 ⁰	2.6x10 ⁻²	0.02
	62.12.10	1.8	5.5x10 ⁻²	9.0x10 ⁻³	0.16

表3 35, 45℃ m-EA法検出菌の分類結果

	BHI 45°C	BHI 10°C	6.5% NaCl	ADB 45°C	EVA 45°C	SF 45°C	EVA 45°C	SN-2 35°C	SN-2 45°C	K-2 35°C	K-2 45°C	S-1 35°C	S-1 45°C
<i>Enterococcus Group</i>	+	+	+	+	+	+	+	3	5	11	20	13	14
	+	+	+	+	+	+	+	0	2	6	2	0	5
	+	+	+	+	+	+	+	1	0	0	1	0	0
	+	+	+	+	+	+	+	2	0	0	0	0	0
	+	+	+	+	+	+	+	4	3	3	1	0	4
	+	+	+	+	+	+	+	1	7	3	1	5	0
	+	+	+	+	+	+	+	2	0	0	0	0	0
<i>S. bovis, S. equinus Group</i>	+	-	-	+	+	+	-	0	0	0	0	1	0
	+	-	-	+	+	+	+	0	1	1	0	0	0
	+	-	-	+	+	+	+	0	0	0	0	2	0
	+	-	-	+	+	+	+	0	0	0	0	0	2
	+	-	-	+	+	+	+	1	0	0	0	0	0
<i>S. lactis Group</i>	-	+	-	+	+	+	+	1	0	0	0	0	0
	-	+	-	+	+	+	+	2	0	0	0	0	0
	-	+	-	+	+	+	+	0	0	0	0	1	0
	-	+	-	+	+	+	+	1	0	1	0	0	0
	-	+	-	+	+	+	+	7	0	0	0	0	0
Nonfecal streptococci	-	-	-	+	-	-	-	0	0	0	0	1	0
	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	2	0

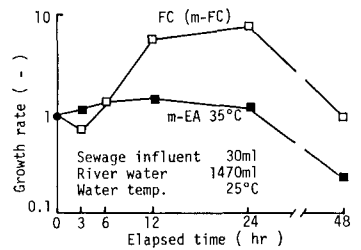


図3 各細菌の水中での推移（1）

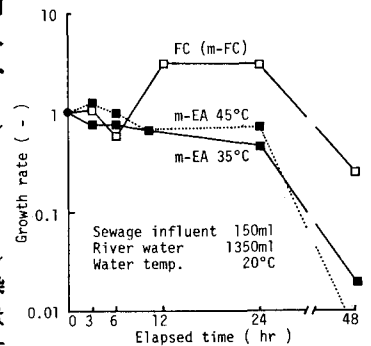


図4 各細菌の水中での推移（2）