

水環境の細菌汚染指標である大腸菌と腸球菌の塩分耐性の比較

宮崎大学工学部 (学) ○山下裕大 (学) 花ヶ崎宣昌 (正) 鈴木祥広

宮崎大学農学部 吉田照豊

1. はじめに

沿岸域には大都市から中小都市が多数隣接する。沿岸都市域の水環境では、人間活動による生活雑排水や下水処理水あるいは家畜やペット等の動物の糞などが流出し、病原性微生物が存在する可能性がある。一方で、沿岸域は水産資源やレクリエーションの場であり、人間活動にとって重要なエリアでもある¹⁾。そのため、沿岸域の水環境の衛生学的な安全と安心の確保は極めて重要である。現在我が国では、糞便汚染指標菌として、環境基準、排水基準および水産用水基準等で、大腸菌群数が用いられている。しかしながら、大腸菌群測定は、人畜糞便に由来する菌以外に、水、植物、土壌などに生息している菌が多数混入するという問題点が指摘されている。このような背景において、大腸菌群に変わる糞便汚染指標菌として、糞便性大腸菌群および腸球菌が注目されている。すでに、公衆浴場やプール、海水浴場では、大腸菌群でなく、人畜起源に特定される糞便性大腸菌群が汚染指標菌として採用されている。一方、大腸菌は、低濃度栄養物存在下、滅菌河川水および糞便水において増殖するが、腸球菌は増殖しないこと²⁾、糞便性大腸菌群数は *Escherichia coli* 以外の菌が混入すること³⁾ が報告され、汚染指標としての有用性が認識されつつある。また、腸球菌は、温血動物の腸管内に存在し、欧米では、糞便汚染指標菌となっている細菌である。沿岸域は、塩分が急激に変化するエリアであることから、塩分濃度が環境水中の細菌の挙動に大きく寄与していると考えられる。しかしながら、細菌の塩分変動に関する研究は極めて乏しく、沿岸都市域では衛生学的な管理が徹底されていないのが現状である。そこで本研究は、大腸菌 (*E.coli*) と腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) について、塩分濃度の異なる水中での細菌数の変化を明らかにすることにより、大腸菌と腸球菌の塩分耐性に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 供試細菌

E.coli JM109 および *E.faecalis* をそれぞれ Todd Hewitt 培地 (Difco, TH 培地) 250mL に移植し、それぞれ 37°C, 25°C で 24 時間培養した。増殖した菌体は遠心分離 (6,000rpm, 10 分間) で集菌し、滅菌した 0.2% 食塩水で 2 回洗浄した。続いて再度、遠心分離で菌体を集菌した後、滅菌 0.2% 食塩水 200mL に再懸濁させた。このそれぞれの細菌懸濁液を分光光度計 (島津製作所製, 665nm) で測定し、懸濁液の吸光度が 0.500 (細菌数約 10^{10} CFU/100mL) となるように 0.2% 食塩水で希釈し、実験に供した。

2.2 塩分耐性試験

人工河川水 (塩分濃度 0psu) と 2 倍濃度の人工海水 (塩分濃度 70psu) を、300mL 三角フラスコに塩分濃度が 1psu, 10psu, 20psu, 35psu, 70psu となり、全量が 200mL となるようにそれぞれ混合させ、高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分間) したものを培地とした。これに細菌懸濁液 1mL をそれぞれの培地に加え、25°C で培養した。細菌懸濁液を加えてから、0 時間後、6 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後にそれぞれの培地から適量分取し、細菌数を測定した。

2.3 細菌計数法

(1) 大腸菌

試料を適度に生理食塩水 (0.85% 食塩水) で希釈し、滅菌メンブランフィルター (φ47mm, 0.45 μm) で濾過した。その後、濾紙を m-FC 培地 (Difco) に置き、44.5°C で 24 時間水浴培養し、発現したコロニーを計数した。細菌数は 2 連のコロニー数を平均し、100mL 当りに換算して算出した。

(2) 腸球菌

試料を適度に生理食塩水 (0.85% 食塩水) で希釈し、滅菌メンブランフィルター (φ47mm, 0.45 μm) で濾過した。その後、濾紙を KF-streptococcus 培地 (Difco) に置き、37°C で 48 時間培養し、発現した桃～赤色のコロニーを計数した。細菌数は 2 連のコロニー数を平均し、100mL 当りに換算して算出した。

3. 結果と考察

3.1 大腸菌 の塩分耐性

キーワード：大腸菌, 腸球菌, 塩分耐性

連絡先：〒889-2192 宮崎市学園台西 1-1, TEL. 0985-58-7339, FAX. 0985-58-7334

各塩分における大腸菌数の経時変化を図-1に示す。塩分 1psu 細菌数は、初期の菌数 (4.0×10^7 CFU/100mL) で、ほぼ一定であり、48 時間で減少はみられなかった。これに対して塩分 70psu の場合には、菌数が実験開始後 6 時間において、約 1 オーダー減少し (細菌数: 7.0×10^6 CFU/100mL), 48 時間後には約 2 オーダー減少 (細菌数: 2.3×10^5 CFU/100mL) した。塩分 10, 20psu については、48 時間で約 1.0×10^7 CFU/100mL まで減少した。塩分 35psu は、70psu と同様に、48 時間後には約 2 オーダー減少 (4.7×10^5 CFU/100mL) した。大腸菌の菌数は、高塩分条件で時間が経過するとともに減少する傾向を示した。このことから、水環境における大腸菌の挙動は、塩分による影響を受けることが示唆された。

3.2 腸球菌の塩分耐性

各塩分における腸球菌数の経時変化を図-2に示す。大腸菌の場合と同様に、塩分 1psu の腸球菌は、初期の菌数 (6.0×10^7 CFU/100mL) でほぼ一定であり、48 時間で減少はみられなかった。また、いずれの塩分の場合においても、24 時間までは、菌数に大きな変化はみられなかった。ところが、48 時間後では、塩分 10, 20, 35psu で約 1 オーダーから 2 オーダーの減少がみられ、塩分が高くなるほど菌数は減少した。塩分 70psu については、48 時間で 1.7×10^7 CFU/100mL まで減少した。このことから、腸球菌は塩分に長時間曝露されることによって塩分に依存して減衰することがわかった。12 時間周期で干満を繰り返す沿岸域において、河川水や排水に存在する腸球菌が海水との混合によってどの程度の影響を受けるかは不明であるが、菌数の測定においては塩分影響も考慮すると考えられる。

大腸菌は塩分 10psu 以上において、6 時間後にすでに減少し始めたのに対して、腸球菌は、24 時間までは塩分による菌数の減少はほとんど認められなかったことから、これら二つの汚染指標細菌を比較すると、腸球菌の方が、塩分耐性が高いことが明らかであった。このことから、腸球菌は、大腸菌と比較して塩分耐性が強いことが示唆された。沿岸都市域において、糞便性大腸菌群数あるいは腸球菌群数の測定による水質汚染あるいは衛生学的安全性を評価する場合には、海水混合による塩分影響について考慮する必要がある。

4. まとめ

- (1) 大腸菌の菌数は、高塩分条件で、時間が経過するとともに減少する傾向を示したことから、水環境における大腸菌の挙動は塩分による影響を受けることが示唆された。
- (2) 腸球菌は、塩分に長時間曝露されることによって塩分に依存して減衰することがわかった。
- (3) 腸球菌は、大腸菌と比較して塩分耐性が強いことが示唆された。

参考文献

- 1) Noble, R. T., Leecaster, M. K., McGee, C. D., Weosberg, S. B., Ritter, K.: Comparison of bacterial indicator analysis methods in stormwater-affected coastal waters, Wat. Res. Vol. 38, pp. 1183-1188, 2004.
- 2) 国府島泉 (1992) 水質汚染指標菌としての大腸菌および腸球菌の低濃度栄養物存在下における増殖性, 日本公衛誌, 39(5), 278-283.
- 3) 国府島泉 (1989) 腸球菌の水質汚染指標性の検討—腸球菌検査法の改良—, 用水と排水, 31(11), 982-986.

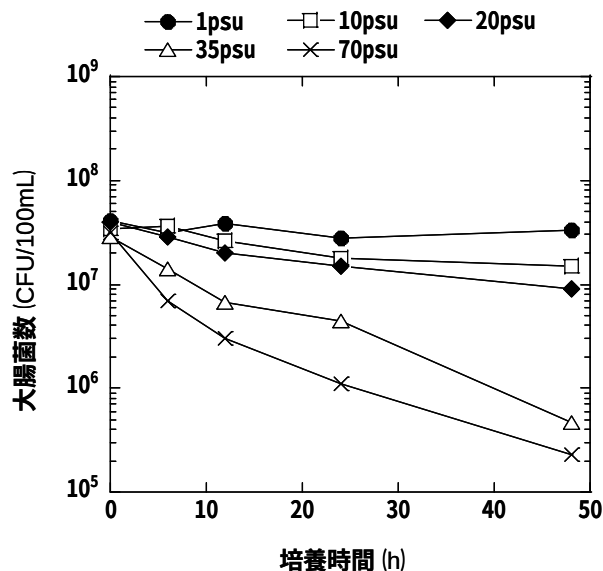


図-1 塩分濃度の異なる条件下における大腸菌数の経時変化。

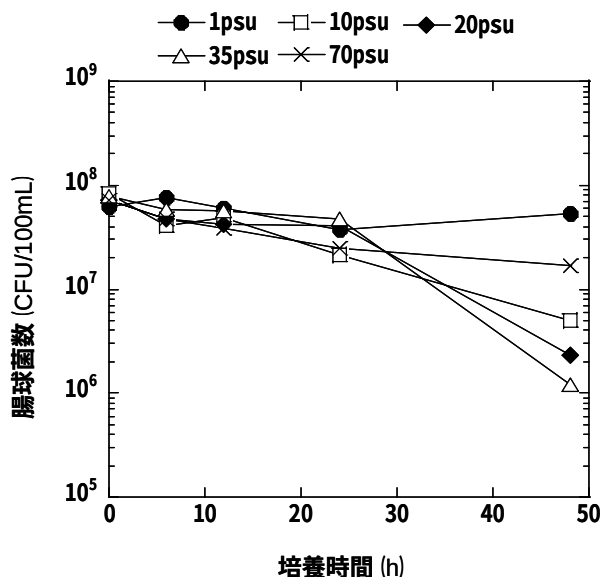


図-2 塩分濃度の異なる条件下における腸球菌数の経時変化。