

## 水環境での大腸菌の生存モデルに採用すべき水質項目の検討

岩手大学大学院連合農学研究科	学生会員	○米田	一路
山形大学農学部	正会員	西山	正晃
山形大学農学部	正会員	渡部	徹

## 1. はじめに

大腸菌は温血動物の腸管内に多数存在する上に、環境中では長期間生存できず、増殖もしないことから、ふん便汚染指標細菌として水環境のふん便汚染状況を推定するための数値モデルに利用されている<sup>1)</sup>。ところが近年、生活排水が流入する水域<sup>2)</sup>や水中で異常増殖した藻類が放出した有機物が存在するケース<sup>3)</sup>などで、大腸菌が長期間生存し、増殖さえも可能であることが報告されている。今後も、大腸菌を指標とした数値モデルで水環境のふん便汚染を評価・管理するためには、大腸菌の生存に水質が与える影響を把握したうえで、その水質を考慮した生存モデルを新たに開発することが望ましい。本研究では、湖沼を想定した条件で大腸菌の生存を評価する室内実験を行い、大腸菌の生存モデルに採用すべき水質項目を検討することを目的とする。

## 2. 実験方法

## 2. 1 大腸菌の生残性実験

大腸菌の生存に影響を与えることが報告されている水質項目として、温度、pH、溶存酸素、溶存有機物、SS、共存微生物の6つを取り上げる。このうち2項目を変化させ、どちらが大腸菌の生存により大きな影響を与えるのかを評価する室内実験を実施した（表1）。この実験では、10～2,000 mLの滅菌生理食塩水を滅菌したポリエチレン製容器に入れ、初期濃度が約 $10^4$  CFU/100 mLとなるように大腸菌標準株（NBRC3301株）を添加した後、暗所で7日間保管した。水中の大腸菌数は、実験開始から0, 1, 2, 4, 7日目にChromocult Coliform 寒天培地（Merck）を用いて測定した。

室内実験での条件として、温度は10, 20, 30℃とした。pHは5, 7, 9とし、HClとNaOHを用いて調整した。溶存酸素の影響は好気と嫌気状態の2条件で評価した。好気状態は試験水が入った容器を空気に開放し、嫌気状態は、酸素濃度1%以下かつ二酸化炭素濃度5%にできるアネロパック®・ケンキ（5%）（三菱ガス化学株式会社）で実現した。このとき、二酸化炭素ガス吸収による試験水のpH低下を防ぐため、滅菌生理食塩水の代わりにマッキルベイン緩衝液（pH5と7）とグリシン・水酸化ナトリウム緩衝液（pH9）を利用した。SSは濃度が0, 10, 20 mg/Lとなるようにカオリンを試験水に添加した。溶存有機物は、山形県の数珠ヶ沢池の水をガラス繊維製フィルター（孔径0.7 μm, Cytiva）で通水ろ過し、ろ液を凍結乾燥することで抽出した。抽出した溶存有機物は濃度が0, 2, 5 mg/Lとなるように試験水に添加した。共存微生物による影響として、「原生動物等による捕食」と「大腸菌以外の細菌との競合」を評価するため、前述の池水を無処理（捕食あり、競合あり）、孔径0.7 μmのガラス繊維フィルター（Cytiva）でろ過後（捕食なし、競合あり）、あるいは孔径0.2 μmのPTFEメンブレンフィルター（GVS）でろ過後（捕食なし、競合なし）に試験水として利用した。

## 2. 2 統計解析

上述した室内実験で得られたデータを用いて、Chick式<sup>4)</sup>で表される大腸菌の死滅増殖速度を最小二乗法で求めた。さらに、各条件の死滅増殖速度について二元配置分散分析を行うことで、2つの水質項目が大腸菌の生存に与える影響の大きさを比較評価した。

## 3. 結果および考察

表1に6つの水質項目のうち2つを組み合わせて変化させた室内実験における大腸菌の死滅増殖速度を示す。大腸菌は温度が高いほど速く死滅した。pH9（死滅増殖速度：0.12～4.23）ではpH5（-0.02～1.19）と7

キーワード 大腸菌, 死滅速度, 生存モデル, 水質項目, 水環境, 湖沼

住所：岩手県盛岡市上田3丁目18-8 Tel：0235-28-2907 Email：yoneda.i.22@gmail.com

表 1 2つの水質項目を組み合わせて変化させた室内実験における大腸菌の死滅増殖速度. 正（赤色）と負（青色）の値はそれぞれ死滅と増殖を意味する.

水質項目	水質項目 条件	温度 (°C)			pH			溶存酸素		溶存有機物 (mg/L)			SS (mg/L)		
		10	20	30	5	7	9	嫌気	好気	0	2	5	0	10	20
pH	5	0.21	0.28	1.19											
	7	0.18	0.42	1.02											
	9	1.42	1.37	4.23											
溶存酸素	嫌気	0.49	0.57	-0.06	0.51	0.57	0.23								
	好気	0.63	0.06	-0.14	0.49	0.63	0.36								
溶存有機物 (mg/L)	0	0.18	0.42	1.02	0.28	0.42	1.37	0.57	0.06						
	2	0.09	-1.23	-3.37	-1.12	-1.23	-0.18	-0.46	-1.34						
	5	0.18	-1.11	-4.70	-1.38	-1.11	-1.26	-0.83	-1.36						
SS (mg/L)	0	0.18	0.42	1.02	0.28	0.42	1.37	0.57	0.06	0.42	-1.23	-1.11			
	10	0.17	0.32	0.85	0.32	0.32	1.57	-0.09	0.27	0.32	-0.78	-0.87			
	20	0.20	0.36	0.81	0.41	0.36	1.27	-0.06	0.10	0.36	-1.12	-0.35			
共存微生物	無処理	0.18	0.69	1.46	0.87	-0.69	1.07	0.28	0.69	0.69	1.02	-0.64	0.69	0.83	0.84
	0.7µmフィルター	-0.04	0.06	0.22	0.20	0.06	0.30	-0.02	0.06	0.06	-0.20	-0.28	0.06	0.08	0.10
	0.2µmフィルター	-0.05	-0.11	-0.36	-0.02	-0.11	0.12	-0.24	-0.11	-0.11	-1.01	-0.98	-0.11	-0.04	-0.17

(-0.11~1.02) よりも大きかったことから、富栄養化湖沼のように植物プランクトンや藻類の光合成の影響で pH が高くなりやすい水環境では、大腸菌の生存期間は短くなるのが分かる。嫌気条件は、溶存有機物を添加した条件（嫌気で-0.83~0.57, 好気で-1.36~0.06）でのみ大腸菌の生存に影響を与えた。溶存有機物を添加した場合、ほぼすべての条件で大腸菌が増殖した。この結果は、溶存有機物を多く含む生活排水が流入する水域で大腸菌が増殖したという報告<sup>2)</sup>と一致する。SS 濃度の変化による大腸菌の死滅・増殖速度への影響は確認されなかった。これは暗所で実験を行ったためであろう。原生動物等による捕食と他細菌との競合が無い場合（0.2µm フィルター処理）、既往研究<sup>3)</sup>と同様にほぼすべての条件で大腸菌が増殖した (-1.01~0.12)。一方で、微生物の活動が活発になる 20°C と 30°C の条件では、共存微生物による大腸菌の増殖抑制効果が確認できた（無処理で 1.46, 0.7µm フィルター処理で 0.22, 0.2µm フィルター処理で-0.36）。

表 2 には、各水質項目が大腸菌の生存に与える影響の大きさの比較結果を示す。この結果を整理すると、暗所における大腸菌の生存には、共存微生物が最も大きな影響を与え、その次に温度、pH、溶存有機物が影響を与えることが分かる。一方で、SS と溶存酸素の影響は無視できる。このことから、暗所の水環境における大腸菌生存モデルには、共存微生物、温度、pH、溶存有機物を優先的に採用すべきである。

今後は、太陽光の影響を考慮して同様の実験を行い、明所における大腸菌生存モデルで優先的に採用すべき水質項目の検討も行う予定である。

### 参考文献

- 1) Liu et al. (2015) *Sci. Total Environ.*, **502**, 632–640. 2) Orosz-Coghlan et al. (2007) *Water Environ. Res.*, **78(3)**, 227–232. 3) Bouteleux et al. (2005) *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **71(2)**, 734–740. 4) Chick (1908) *Journal of Hygiene*, **8(1)**, 92–158. 5) Ishii et al. (2021) *Lett. Appl. Microbiol.*, **72** 133–140.

表 2 2つの水質項目が大腸菌の生存に与える影響の大きさ（二元配置分散分析で求めた効果量）の比較.

系列 (水質項目 1×水質項目 2)	効果量	
	水質項目 1	水質項目 2
温度×pH	0.26*	0.34*
温度×溶存酸素	0.69*	0.05
温度×溶存有機物	0.32*	0.27*
温度×SS	0.72*	0.01
温度×共存微生物	0.10*	0.58*
pH×溶存酸素	0.31*	0.04
pH×溶存有機物	0.09*	0.63*
pH×SS	0.62*	0.00
pH×共存微生物	0.02*	0.88*
溶存酸素×溶存有機物	0.20*	0.58*
溶存酸素×SS	0.00	0.23*
溶存酸素×共存微生物	0.68*	0.10*
溶存有機物×SS	0.41*	0.03
溶存有機物×共存微生物	0.29*	0.44*
SS×共存微生物	0.00	0.97

\*p<0.05