

酵素基質培地による下水試料の 大腸菌群及び大腸菌の測定

横浜市 ○村岡 麻衣子、折目 孝子

1 はじめに

酵素基質培地の登場により、糞便汚染の指標として確実性の高い大腸菌を簡便に、精度よく測定することが可能となった。上水分野では、実試料での検討を重ね、平成 16 年 4 月の水道法の水質基準改定の際には、大腸菌群に代わり、大腸菌が糞便汚染の指標として採用された。

下水道の分野では、平成 17 年 4 月の「下水処理水の再利用水質基準等マニュアル」において、再生水利用に関する技術上の基準として、大腸菌が項目に取り入れられた。しかし、再生水の元となる流入下水、処理水の大腸菌数については、報告例はわずかである¹⁾。

今回は、大腸菌と大腸菌群を区別して計数できる酵素基質培地の一種、クロモアガーECC (CHROMagar) の下水試料における特性を理解するために、公定法のデソキシコール酸塩培地 (栄研化学) を対照培地として、流入下水、処理水、放流水の大腸菌群を測定した。また、クロモアガーECC の測定結果から、下水処理工程における大腸菌の挙動を示した。

2 試料と方法

2-1 試料と調査期間

横浜市内の 5 つの水再生センターの流入下水、処理水、放流水をスポット採水して、大腸菌群及び大腸菌測定の試料とした。調査期間は 2006 年 5 月 10 日～2007 年 3 月 7 日で、月に 2 回程度、合計 19 回の試験をおこなった。流入の負荷の違いを考慮して、水再生センターを合流 (中部、南部、港北 A・B) と分流 (港北 C、都筑、西部) に分けて結果を整理した。

2-2 大腸菌群及び大腸菌の計数方法及びコロニーの分離・同定

適宜希釈した試料 1mL をクロモアガーECC (以下、クロモ) またはデソキシコール酸塩培地 (以下、デソ) で混釈・重層し、培養温度 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて、デソでは 18 時間、クロモでは 24 時間の培養後に計数をおこなった。

計数したコロニーの性状とそのカテゴリーを表-1 に示す。クロモでは、ピンク色と青色のコロニーを分けて計数し、青色のコロニーを大腸菌、ピンク色と青色のコロニーを合算したものを、クロモで計数した大腸菌群 (以下、クロモ大腸菌群) とした。

流入下水を接種した両培地のシャーレから、それぞれの培地に代表的な性状のコロニーを釣菌、純化後に腸内細菌同定キットのエンテオグラム (和光純薬工業) を用いて同定した。処理水と放流水からの分離菌種については、前回調査 (期間: 2004 年 10 月 6 日～2005 年 9 月 22 日) の結果を用いた。なお、前回調査の一部は、第 42 回下水道研究発表会に報告した²⁾。

3 結果と考察

3-1 大腸菌群測定におけるクロモアガー培地の特性

クロモ大腸菌群はデソ大腸菌群の値よりも高く、両者は有意な正の相関があった。2 つの培地による処理水、放流水の大腸菌群の測定結果を図-1 に示す。クロモ大腸菌群はデソ大腸菌群のおよそ 2 倍であり、分

表-1 計数方法

培地	コロニーの色・形状	計数カテゴリー
クロモ (クロモアガーECC)	①ピンク色	(大腸菌群)
	②青色	大腸菌
	①+②	クロモ大腸菌群
	白色	計数しない
デソ (デソキシコール酸塩培地)	直径0.5mm以上の赤～深紅色	デソ大腸菌群
	白～ピンク色	計数しない

流と合流の違いはみられなかった。処理水と放流水のデータをまとめて直線回帰をおこなうと、 $y = 1.82x + 36.0$ の式が得られ、相関係数 $r=0.936$ と非常に高かった。流入下水では、クロモ大腸菌群がデソ大腸菌群の1.8倍になるグループと1.3倍のグループに分かれ、前者は合流の中部、港北A・Bであり、後者は分流の3センターと合流の南部であった。流入下水の結果を図-2に示す。

3-2 両培地から分離されたコロニーの菌種

流入下水からの分離菌種を表-2に示す。クロモで大腸菌とされる青色コロニー10株のうち8株(80%)が大腸菌として同定され、大腸菌以外の大腸菌群とされるピンク色コロニー12株のうち9株(75%)が大腸菌群として同定された。処理水、放流水でも、同様に高い割合でコロニーが大腸菌または大腸菌群として同定されており、クロモは、対象とする菌を正確に検出できるという点で優れていた。処理水、放流水からの分離菌種を表-3に示す。

次にデソの分離菌種をみると、流入下水では定型のコロニー15株のうち12株(80%)が大腸菌群として同定された。処理水と放流水では、定型のコロニーが大腸菌群である割合は61.8%と流入下水と比べて低かった。経験として、流入下水のコロニーは大きくて、濃い赤色のタイプが多く、計数しやすい。一方、処理水、放流水では、様々な色調や大きさのコロニーが出現して計数する時に迷いやすい。今回の分離菌種の結果からは、流入下水では、計数したコロニーが真に大腸菌群である確率が高いが、処理水、放流水では大腸菌群以外のコロニーを計数している可能性が高いことが考えられた。

3-3 下水試料の大腸菌と大腸菌群に占める割合

流入下水、処理水、放流水の大腸菌とデソ大腸菌群を図-3-1、3-2、3-3に示す。流入下水の大腸菌の値は22,000~180,000個/mLであり、デソ大腸菌群31,000~380,000個/mLよりも小さかったが、オーダーは変わらなかった。処理水では、デソ大腸菌群40~8,100個/mLに対して、大腸菌10~3,000個/mL、放流水では、デソ大腸菌群1~1,300個/mLに対して、大腸菌0~390個/mLであった。いずれの試料でも大腸菌の値は、デソ大腸菌群よりも低く、大腸菌群に占める大腸菌の割合は、流入下水、処理水、放流水の順に小さくなった。

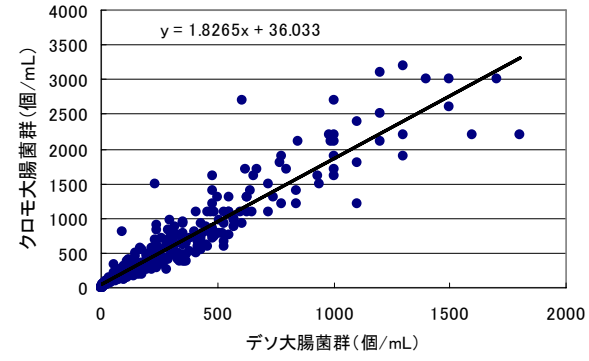


図-1 処理水、放流水の大腸菌群

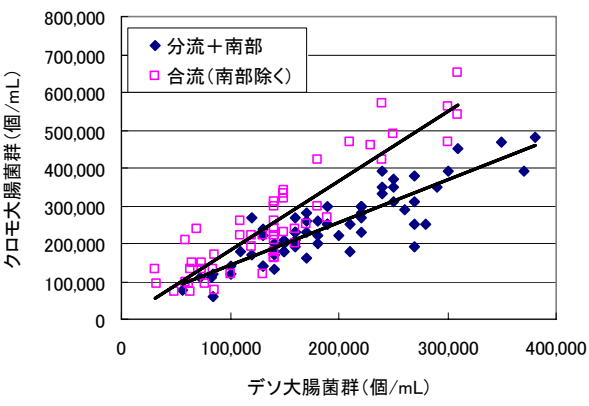


図-2 流入下水の大腸菌群

表-2 流入下水からの分離菌種

分離菌種		クロモアガー		デソ	
		青	ピンク	定型	非定型
大腸菌群	<i>Escherichia coli</i> (大腸菌)	8 (80.0)	0 (0)	2 (13.3)	0 (0.0)
	<i>Citrobacter freundii</i>	0 (0.0)	0 (0)	1 (6.7)	0 (0.0)
	<i>Enterobacter asburiae</i>	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<i>E. cloacae</i>	0 (0.0)	2 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0 (0.0)	2 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<i>K. zoenae</i>	0 (0.0)	0 (0)	1 (6.7)	0 (0.0)
	<i>K. pneumoniae</i>	0 (0.0)	4 (33.3)	8 (53.3)	0 (0.0)
	小計	8 (80.0)	9 (75.0)	12 (80.0)	0 (0.0)
大腸菌群以外または同定コードなし		2 (20.0)	3 (25.0)	3 (20.0)	3 (100)
合計		10 (100)	12 (100)	15 (100)	3 (100)

()内は、同定試験をおこなった菌株を100としたときの割合

表-3 処理水、放流水からの分離菌種

分離菌種		クロモアガー		デソ	
		青	ピンク	定型	非定型
大腸菌群	<i>Escherichia coli</i> (大腸菌)	23 (82.1)	1 (3.3)	6 (17.6)	0 (0.0)
	<i>Citrobacter freundii</i>	0 (0.0)	1 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<i>Citrobacter youngae</i>	0 (0.0)	1 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0 (0.0)	1 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<i>E. asburiae</i>	0 (0.0)	1 (3.3)	1 (2.9)	0 (0.0)
	<i>E. cloacae</i>	0 (0.0)	4 (13.3)	2 (5.9)	1 (6.7)
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (3.6)	0 (0.0)	5 (14.7)	2 (13.3)
	<i>K. zoenae</i>	1 (3.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<i>K. pneumoniae</i>	0 (0.0)	14 (46.7)	7 (20.6)	2 (13.3)
	<i>K. rhinoscleromatis</i>	0 (0.0)	1 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)
小計		25 (89.3)	24 (80.0)	21 (61.8)	5 (33.3)
大腸菌群以外または同定コードなし		3 (10.7)	6 (20.0)	13 (38.2)	10 (66.7)
合計		28 (100)	30 (100)	34 (100)	15 (100)

()内は、同定試験をおこなった菌株を100としたときの割合

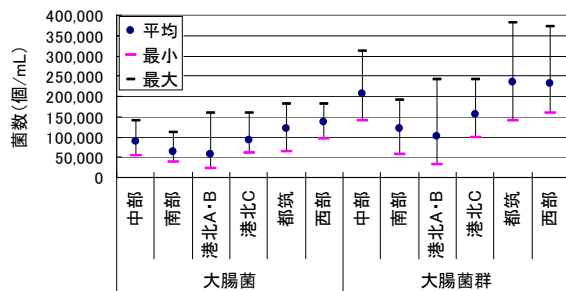


図-3-1 流入下水の大腸菌及び大腸菌群数

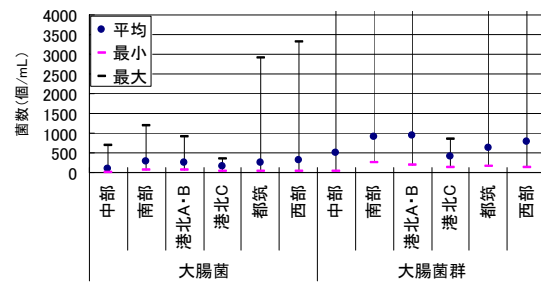


図-3-2 処理水の大腸菌及び大腸菌群数

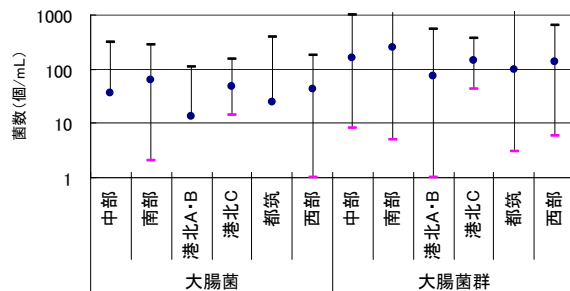


図-3-3 放流水の大腸菌及び大腸菌群数

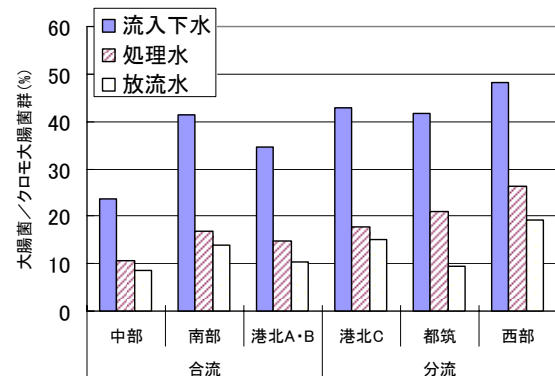


図-4 クロモ大腸菌群に占める大腸菌の割合

上記の傾向は、クロモ大腸菌群に占める大腸菌の割合

をみるとより顕著であった。各センターにおける処理工程ごとの大腸菌の割合を図-4 に示す。大腸菌の割合は、分流センターの流入下水で 40%を越え、合流のセンターで低い傾向があった。処理水では 10.5～26.4%と大腸菌の割合は大きく低下し、放流水では、さらに 8.7～19.6%に下がった。このように大腸菌の割合が低下するのは、大腸菌群よりも大腸菌の方が、活性汚泥処理や塩素消毒によって除去されやすいことを示すと推察された。

4 まとめ

- 酵素基質培地の一種クロモアガーECC で測定した大腸菌群の値は、デソの大腸菌群よりも高く、両者は有意な正の相関があった。
- クロモアガーECC から分離したコロニーは大腸菌または大腸菌群として同定される割合が高く、対象の菌を正確に検出できるという培地の信頼性は高かった。
- 下水試料の大腸菌は、公定法の大腸菌群の値より低く、大腸菌群に占める大腸菌の割合は下水処理工程により低下した。

5 今後の課題

大腸菌は、公定法で測定する大腸菌群よりも下水処理によって除去されやすい可能性が示された。消毒と大腸菌除去について明らかにしたうえで、大腸菌を下水処理の指標として用いれば、下水処理水の放流先の生態系により影響の少ない消毒方法に変更できる可能性もある。一方で、大腸菌がどの程度なら衛生的な安全性が保たれるかという面での調査も必要だろう。

(参考文献)

- 1) 桜井健介ら: 下水及び下水処理水中の大腸菌の実態—大腸菌群と大腸菌の比較、第 43 回下水道研究発表会講演集、p905-907
 - 2) 村岡麻衣子、折目孝子: 酵素基質培地による下水処理水の大腸菌群数測定の検討、第 42 回下水道研究発表会講演集、p10-12
- 連絡先: 〒231-0803 横浜市中区本牧十二天 1-1 TEL045-621-4343 横浜市環境創造局 環境施設部水再生水質課