

酵素基質培地による下水処理水の

大腸菌群数測定の見直し

横浜市環境創造局 水再生水質課 ○村岡 麻衣子、井上 智

1. はじめに

放流水の大腸菌群は、下水道法施行令によりデソキシコール酸塩培地（以下、デソ培地）を用いて測定する。この方法では、大腸菌群が乳糖を分解して生じる酸で培地が赤変する原理により、「直径 0.5mm 以上の赤～深紅色の定型的コロニー」を計数することになっている。しかし、実際の試料では、種々の形態を示すコロニーが形成されるため、計数するコロニーの判定に迷うことが少なくない。

さらに、土壌由来の細菌や、環境中でも増殖できる細菌が含まれることから、糞便汚染の指標として大腸菌群を用いること自体に、疑問がもたれている¹⁾。水道法では平成 16 年 4 月に水質基準の改定がおこなわれ、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ることになった。

水道法の基準の改定には、酵素基質培地を用いた手法の確立により、簡便に、精度よく大腸菌を検出できるようになったことが背景にある。酵素基質培地には、大腸菌群や大腸菌の持つ酵素と反応して発色する基質が含まれている。酵素反応を基本原理とするため、特異性が高く、大腸菌群と大腸菌を分けて検出できるという利点がある。

今回、酵素基質培地の下水処理水への適用を検討するため、横浜市内 5 つの水再生センターの処理水と放流水の大腸菌群数を、市販の酵素基質培地の一つである、クロモアガー ECC (CHROMagar)（以下、クロモアガー培地）とデソ培地（栄研化学）で測定した。また、それぞれの培地から分離したコロニーを同定し、出現する菌種の傾向を調査した。

2. 試料と方法

2-1 クロモアガー培地とデソ培地を用いた下水処理水の大腸菌群数の計数

市内 5 つの水再生センター（合流式：中部、南部、北部第二水再生センター、分流式：港北、西部水再生センター、以下、水再生センターを略す）の処理水と放流水を、2004 年 10 月 6 日（中部は 8 月 25 日）～2005 年 3 月 22 日に週一回の頻度で採水して、比較検討の試料とした。

試料を滅菌りん酸緩衝液で適当な段階まで 10 倍希釈した後、1ml をガラスシャーレに取り、クロモアガー培地、またはデソ培地を約 10ml 注ぎ、混釈した。それぞれの培地で重層して、36℃のふらん器で、デソ培地は 18 時間培養後、クロモアガー培地は 24 時間培養後に計数をおこなった。

クロモアガー培地では、赤色のコロニーは大腸菌群、青色のコロニーは大腸菌 (*E.coli*)、着色しないコロニーは他のグラム陰性細菌とされている。このため、計数の際には、赤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、青色と赤色のコロニーを合算したものを大腸菌群とした。

2-2 分離コロニーの同定

クロモアガー培地、デソ培地のシャーレから、代表的な性状のコロニーをそれぞれ 43 株、33 株鉤菌して、EMB 培地（栄研化学）に画線塗抹して、約 24 時間培養した。その後、標準寒天培地（栄研化学）に植え継いで純粋培養をおこなったコロニーを、腸内細菌同定キットのエンテオグラム（和光純薬工業）、またはグラム陰性菌同定キットのノンファグラム S-1（和光純薬工業）を用いて同定をおこなった。

3. 結果

3-1 クロモアガー培地とデソ培地で計数した処理水、放流水中の大腸菌群数

クロモアガー培地では、淡いピンク色、青色、紫色および白色のコロニーが観察された。形状は、直径 1mm 以下の小さな点状のタイプと、不定形に薄く広がるタイプが多くみられた。小さいコロニーは計数しにくい場合もあったが、色は鮮明であり、判定に迷うことはなかった。

ほとんどの試料で、クロモアガー培地とデソ培地は、同じ希釈倍率で計数することができ、検出できる大腸菌群数は同一のオーダーであった。

図 1 に、二つの培地で計数した処理水、放流水中の大腸菌群数の散布図を示す。得られたプロットは、1 対 1 の直線付近に集まり、有意な正の相関があった ($r^2=0.7979$)。直線回帰をおこなうと、 $y=1.02x+36.1$ (y : クロモアガー培地の計数値、 x : デソ培地の計数値) となった。プロットが 1 対 1 の直線から大きく外れる原因を考察するため、デソ培地の計数値に対するクロモアガー培地の計数値の比 (クロモアガー/デソ比) をとった。比が 2 以上または 0.5 以下になる場合について、降雨量や処理状況等を確認したが、特に原因となるものはなかった。

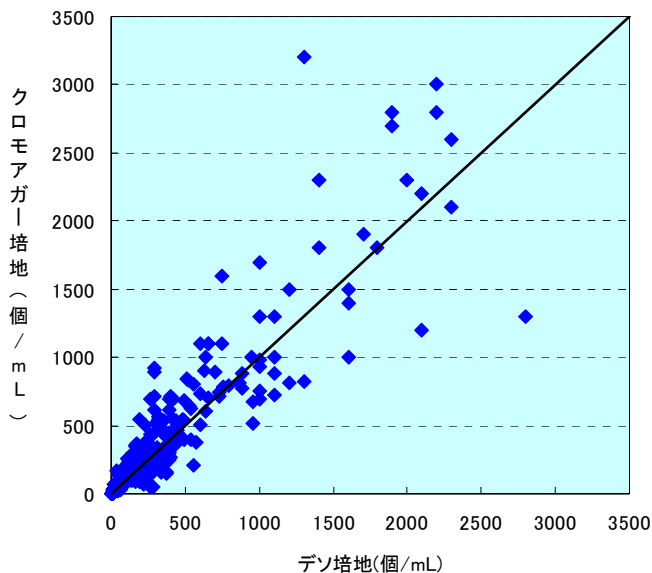


図1 下水処理水中の大腸菌群数の散布図

表 1 に、各水再生センターのクロモアガー/デソ比を示す。合流式である中部、南部、北部第二では、比が 1.2 から 1.6 と、クロモアガー培地の計数値の方が大きかった。逆に、分流式の港北と西部では、それぞれ 1.0 と 0.8 とデソ培地の計数値の方が大きい傾向があった。なお、水再生センターによらず、処理水と放流水では、ほとんど差がなく、クロモアガー/デソ比は塩素消毒には影響を受けないものと考えられた。

表1 各水再生センターのクロモアガー/デソ比

処理方式	水再生センター	試料	クロモアガー/デソ比		
			最低	平均	最高
合流式	中部	処理水	0.4	1.4	3.2
		放流水	0.4	1.6	5.0
	南部	処理水	0.5	1.3	2.9
		放流水	0.3	1.3	2.7
	北二	処理水	0.5	1.2	2.0
		放流水	0.5	1.2	2.5
分流式	港北	処理水	0.4	1.1	1.5
		放流水	0	1.0	4.0
	西部	処理水	0.2	0.8	1.4
		放流水	0.2	0.8	1.5

3-2 クロモアガー培地とデソ培地から分離された菌種

クロモアガー培地で青色を示した 22 株とピンク色を示した 20 株、およびデソ培地から分離した 32 株について、同定試験をおこなった。表 2 に、二つの培地から分離した菌種とその割合を示す。クロモアガー培地で大腸菌とされる青色のコロニーのうち、77%が大腸菌 (*E.coli*) として同定された。また、大腸菌群とされるピンク色のコロニーは、大腸菌群の *Klebsiella* 属が多くを占め、同定したコロニーの 90%が大腸菌群であった。青色とピンク色のコロニーをあわせると、88%が大腸菌群であった。デソ培地から分離した株では、*K.oxytoca*、*K.pneumoniae*、*E.coli* 等 44%が大腸菌群であったが、*Aeromonas spp.* 等の大腸菌群以外の細菌が 1/3 を占めた。大腸菌群以外を大腸菌群としてしまう誤陽性の確率は、クロモアガー培地では少なかった。

3-3 下水処理水中の大腸菌群に対する大腸菌の割合

クロモアガー培地で、大腸菌群のうち大腸菌が占める割合を算出した。大腸菌の割合は処理水で平均約 19%、放流水で平均 15%であり、放流水で割合が低下する傾向があった。また、分流式である西部の処理水と放流水は、平均でそれぞれ 25%、26%と大腸菌の占める割合が高かった。塩素消毒後の放流水において、培地に生ずるコロニー数が少ないときには、大腸菌が検出されないこともあった。これは、平板培養法の検水量が 1ml と限られていることから生じる問題である。このため、大腸菌群の代わりに大腸菌を放流基準とする場合は、酵素基質培地を用いた(最確数)MPN 法など、検水量の多い培養方法も検討する必要があると考えられる。

表2 クロモアガー培地とデソ培地から分離された菌種

分類	分離菌種	クロモアガー		デソ
		青	ピンク	
大腸菌群	<i>Escherichia coli</i> (大腸菌)	17 (77.3)	1 (5.0)	3 (9.4)
	<i>Citrobacter freundii</i>	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)
	<i>E.asburiae</i>	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)
	<i>E.cloacae</i>	0 (0)	1 (5.0)	1 (3.1)
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (4.5)	0 (0)	7 (21.9)
	<i>K.ozaenae</i>	1 (4.5)	0 (0)	0 (0)
	<i>K.pneumoniae</i>	0 (0)	12 (60.0)	3 (9.4)
	<i>K.rhinoscleromatis</i>	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)
	小計	19 (86.3)	18 (90.0)	14 (43.8)
大腸菌群以外	<i>Aeromonas spp.</i>	0 (0)	0 (0)	4 (12.5)
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0 (0)	0 (0)	1 (3.1)
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0 (0)	1 (5.0)	1 (3.1)
	<i>Serratia liquefaciens</i>	0 (0)	1 (5.0)	0 (0)
	<i>S.rubidaea</i>	0 (0)	0 (0)	1 (3.1)
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0 (0)	0 (0)	1 (3.1)
	<i>V.vulnificus</i>	0 (0)	0 (0)	1 (3.1)
	<i>Yersinia freder./intermedia</i>	1 (4.5)	0 (0)	0 (0)
小計	1 (4.5)	2 (10.0)	9 (28.0)	
同定不能	2 (9.1)	0 (0)	9 (28.1)	
合計	22 (100)	20 (100)	32 (100)	

()内は同定試験した菌株を100とした時の割合を示す

4. まとめ

- 今回検討に用いたクロモアガー培地は、従来のデソ法と同一のオーダーで大腸菌群数を計数することができ、両者の計数値の相関も高かった。
- クロモアガー培地から分離したコロニーの 88%が大腸菌群として同定され、大腸菌群の占める割合は、デソ培地よりも高かった。
- 大腸菌群のうち大腸菌の占める割合は、水再生センターにより異なったが、処理水で平均 19%、放流水で平均 15%であった。

参考文献

- 1) 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)

連絡先：横浜市環境創造局 環境施設部水再生水質課

〒231-0803 横浜市中区本牧十二天 1-1 TEL045-621-4343