

公共用水中の腸球菌測定法に関する基礎的検討

岡山大学医学部細菌学教室

国府島泉・森 康巳
塩出純二・中村 知明
寺坂 薫・志田 健太郎
平井 義一・金政 泰弘

岡山大学医学部附属臨床検査技師学校

赤塚 和也

(昭和58年3月29日受稿)

Key words : *Enterococcus*, Coli-form group,
Water pollution, Biological indicator

緒 論

現在わが国の水質検査の細菌学的検査項目には大腸菌群測定が採用されている。しかし大腸菌群には人畜糞便と無関係と考えられる *Erwinia*, *Aeromonas* などの菌が生物性状類似のために包含されており、人畜糞便の汚染指標として問題があることは衆知の事実である。

これまで我々はより適切な汚染指標菌の検索という目的で研究を行ない、大腸菌群測定の不合理性を指摘し腸球菌測定の有用性について検討し報告してきた^{1)~6)}。しかし水の腸球菌の検査法は種々の培地による各種方法が考案されているものの、大腸菌群測定のように公定法を決めている国が少なく、我国でも水の腸球菌測定については参考試験程度の記載にとどまっている^{7),8)}。そこで我々は橋本⁹⁾の推奨する那須¹⁰⁾のBTBアサイドデキストロース培地を用いた最確数法(MPN法)とStandard Methods for the Examination of Water and Wastewater¹¹⁾に記載されているm-エンテロコッカス培地¹²⁾を用いたメンブランフィルター法(MF法)との比較検討を行なってみた。

材料および方法

供試菌および培養：*Streptococcus faecalis* (*St. faecalis*), *Streptococcus faecium* (*St. faecium*), *Streptococcus pyogenes* (*St. pyogenes*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), (*Kl. pneumoniae*) *Enterobacter aerogenes* (*Ent. aerogenes*) の7種の菌を用いた。*Streptococcus* はブレインハートインヒュージョンブイヨン、その他のものは普通ブイヨンで37°C、24時間静置培養して集菌し、生理的食塩水で1回洗浄後、生理的食塩水中に菌数が $10^2 \sim 10^3$ 個/mlになるように懸濁し供試菌液とした。

各種 NaN_3 濃度の培地作成：BTBアサイドデキストロース培地の組成を表1に示し、処定量と記載した添加 NaN_3 は終濃度 0, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04, 0.045 および0.05%になるように加え、モルトン管に9mlずつ分注して121°C、15分間高圧滅菌を行なった。m-エンテロコッカス培地の組成は表2に示し、添加 NaN_3 濃度はBTBアサイドデキストロース培地の場合と同様に加え、

表1 BTBアザイドデキストロース培地の組成

ポリペプトン	20 g
酵母エキス	5 g
ブドウ糖	10 g
NaCl	5 g
BTB	0.032 g
NaN ₃	処定量
精製水	1000ml
PH. 7.0	

表2 m-エンテロコッカス培地の組成

トリプトース	20 g
酵母エキス	5 g
ブドウ糖	2 g
Na ₂ HPO ₄	4 g
NaN ₃	処定量
テトラゾリウムクロライド	0.1 g
寒天	10 g
精製水	1000ml
PH. 7.2	

121°C, 15分間高圧滅菌した。滅菌後 50~60°C に冷却した時に濾過滅菌したテトラゾリウムクロライド溶液 (0.25g/ml) を終濃度0.01%になるように加え、滅菌シャーレに分注し平板に固めた。

NaN₃ による生育阻害実験：供試菌液を各 NaN₃ 濃度の BTB アザイドデキストロース培地 5 本に 1ml ずつ加え 37°C, 48時間培養し 1 本でも培地の黄変と混濁がみられたものを生育し

たものと判定した。また各 NaN₃ 濃度の m-エンテロコッカス培地 2 枚の表面に滅菌メンブランフィルター (0.45μ) を置き、その表面に供試菌液 0.1 ml をコンラジ棒で拡げ 37°C, 48時間培養し、コロニーが 1 つでも出現したものを生育したものと判定した。

野外材料による MPN 法と MF 法の比較：

岡山県の三大河川である吉井川水系から熊山橋 (類型 B)・永安橋 (類型 B), 旭川水系から合同堰 (類型 A)・桜橋 (類型 B)・旭川大橋 (類型 B)・清内橋 (類型 C), 高梁川水系から湛井堰 (類型 A)・霞橋 (類型 B) の 8 地点を選び、昭和 52~57 年の 6 年間にわたり腸球菌数の測定を MPN 法と MF 法の両法により 300 例について行なった。MPN 法は NaN₃ 濃度 0.025% の BTB アザイドデキストロース培地を用い、検水の 3 段階 10 倍希釈系列ごと各 5 本の接種を行ない、37°C, 48 時間後に培地の黄変と混濁が認められた試験管数から検水 100ml 中の MPN を最確数表から求めた。MF 法は NaN₃ 濃度 0.04% の市販 m-エンテロコッカス培地 (Difco 製) を用い、検水 10~100ml をメンブランフィルター (0.45μ) で濾過したものを平板培地上に置き、37°C, 48 時間後に出現した赤~橙色のコロニー数により検水 100ml 中の菌数を求めた。

結 果

NaN₃ による生育阻害：表 3 は各 NaN₃ 濃度

表3 NaN₃ 各種濃度添加の BTB アザイドデキストロース培地での生育テスト

NaN ₃ (%)	0	0.01	0.015	0.02	0.025	0.03	0.035	0.04	0.045	0.05
<i>St. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>St. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>St. pyogenes</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kl. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ent. aerogenes</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ 生育, - 生育せず

表4 NaN₃各種濃度添加のm-エンテロコッカス培地での生育テスト

NaN ₃ (%)	0	0.01	0.015	0.02	0.025	0.03	0.035	0.04	0.045	0.05
<i>St. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>St. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>St. pyogenes</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kl. pneumoniae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ent. aerogenes</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+生育, -生育せず

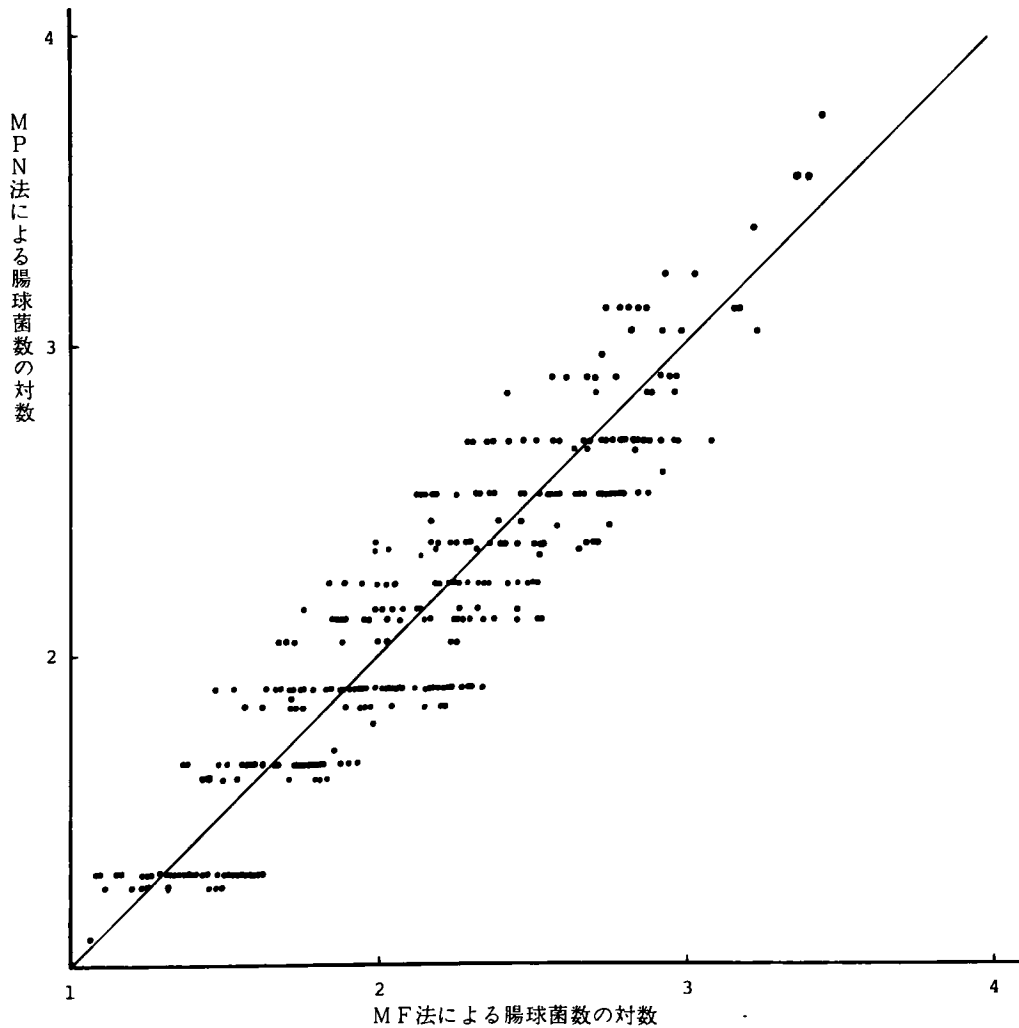


図1 MPN法とMF法により測定された腸球菌数の相関性

のBTBアザイドデキストロース培地における菌の生育を示している。腸球菌である *St. faecalis*, *St. faecium* は NaN_3 濃度が0.045%までは完全に生育したが、他の菌は NaN_3 濃度が0.02%で完全に生育を阻害された。この結果から NaN_3 濃度として0.025%が適当と考え、野外調査にもこの濃度のものを用いた。

表4は各 NaN_3 濃度m-エンテロコッカス培地における菌の生育を示している。腸球菌は NaN_3 濃度0.05%でも完全に生育したが、他の菌では *St. pyogenes* が0.03%まで生育したものの、その他は0.01%でも生育を阻害された。この結果は市販のm-エンテロコッカス培地の NaN_3 濃度が0.04%であることが極めて適切であることを示している。

野外材料によるMPN法とMF法の比較：

図1は野外材料300例のMPN法とMF法による腸球菌数測定の結果を両対数グラフにプロットしたものである。MPN法では測定菌数値の求め方からして、ある程度同じ菌数群として得られ、菌数が少ない時は特にその傾向が著明である。MF法は菌数の多い場合は算定に難点があるが菌数の多少にかかわらず正確な値を与えてくれる。しかしMPN法とMF法の測定値はほぼ $y=x$ の直線に近似され、また相関係数 $r=0.88$ と高い相関を示した。

考 察

公共用水の水質汚染指標として腸球菌測定を導入しているのはヨーロッパやアメリカにいくつかの例があるが、確実な方法や数値を示しているのはEC諸国の水浴場における例がみられるのみで、その場合100個/100 mlを上げている。方法としてはLitsky法¹³⁾によるMPN法またはMF法を用いて行なうことになっている。わが国では水質汚染指標としての腸球菌測定の公定法はないが、食品衛生面においては測定法が食品衛生検査指針¹⁴⁾に記載されている。これは堀江らの開発したアザイドクエン酸培地によるMPN法¹⁵⁾であり、特に冷凍食品の汚染指標として腸球菌測定がすぐれていると考えられている。堀江はまたアザイドエスクリン寒天培地を考案して、それによるコロニー計算法も確立し

ている。そして両法を用いて冷凍魚介類について検討し、よい相関がみられたと報告している。

我々は公共用水の糞便汚染指標としての腸球菌測定の有用性を検討する目的の一環として、BTBアザイドデキストロース培地を用いたMPN法とm-エンテロコッカス培地を用いたMF法の比較検討を行なった。まずはじめに腸球菌の選択性に対する最も適切な NaN_3 濃度を検討し、BTBアザイドデキストロース培地を用いたMPN法の NaN_3 濃度は橋本も推奨している0.025%が最もよいと結論された。橋本は那須¹⁰⁾の考案した NaN_3 濃度0.02%の培地では多種多様の菌が存在したり菌量の多い試料では NaN_3 の抑制作用が十分でないとして述べている。一方、m-エンテロコッカス培地によるMF法の NaN_3 濃度は、市販培地の濃度の0.04%が適切であると考えられた。このように液体培地においては NaN_3 による腸球菌以外の菌の生育抑制は低濃度でよく、寒天培地上にメンブランフィルターを置きその上に菌を培養するMF法ではやや高濃度のものを必要とした。

ところで腸球菌の選択培地は多種考案されており、これに関して多くの報告があるが、^{10),17),18)} 公共用水の試験に最も適したものを決定する必要がある。諸外国との統一性も考慮することが必要であろう。我々の長年行なってきた検査経験から、例数を多くこなさなければならないルチンワークには手技の簡単なMPN法が便利であり、そして腸球菌数が多い場合は本法による算定で十分正確な値が得られると考える。しかし、いかに適正な希釈系列を使用するかは経験がおおいに左右する点はある。また菌数の少ない場合、MPN表から算定するとある菌数群に収れんすることは不可避で正確さはまぬがれない。したがって菌数が少ない場合の腸球菌測定ではMF法による測定の方が正確なことが多く、互いに一長一短がある。しかし全般を通じて両法は高い相関 ($r=0.88$) がみられることは事実である。要は両法を併用するか、上に述べたように菌数を推定して両法を使い分けることも一法である。

結 論

水の腸球菌検査法を検討する目的で BTB アザイドデキストロース培地を用いた MPN 法と m-エンテロコッカス培地を用いた MF 法を比較検討した。

腸球菌の選択に用いられる NaN_3 濃度の適性値を両培地において検討したところ、BTB アザイドデキストロース培地による MPN 法では NaN_3 濃度 0.025%, m-エンテロコッカス培地による MF 法では NaN_3 濃度 0.04% が最適であることがわかった。この NaN_3 濃度の培地を用

いて (m-エンテロコッカス培地は市販品) 野外調査を行ない 300 例より両法の相関性を検討したところ相関係数は $r=0.88$ と高く、どちらの方法を用いてもさしつかえないことが判明した。しかし、操作の簡便性からは MPN 法がすぐれており、サンプル中の腸球菌数が少ない場合は MF 法が正確であると考えられた。

謝 辞

腸球菌の各種標準株をご分与して下さった広島大学生物生産学部の橋本秀夫教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. 赤塚和也, 森 康巳, 国府島泉, 平井義一, 浜田博司, 安部益文, 安部重信, 荃田祥三, 永田哲英, 藤原清, 林 英生, 金政泰弘: 大腸菌群測定法の水質汚染指標性の検討, 岡山医学会雑誌, **90**, 1309—1317, 1978.
2. 金政泰弘, 片山 健, 赤塚和也, 原 弘, 俵寿太郎: 児島湾の水質調査について(1), 岡山医学会雑誌, **86**, 23—28, 1974.
3. 金政泰弘, 片山 健, 岡部昭延, 森 康巳: 児島湖の水質調査, 岡山医学会雑誌, **85**, 601—605, 1973
4. 金政泰弘, 赤塚和也, 藤原 清, 森 康巳: 水質汚染指標菌としての大腸菌群測定に対する検討, 昭和51年度文部省科学研究費による特定研究“人間の生存にかかわる自然環境に関する基礎的研究”研究報告集録, pp. 179—188, 1977.
5. 金政泰弘, 赤塚和也, 藤原 清, 森 康巳: 水質汚染指標菌としての大腸菌群測定に対する検討, 昭和51年度文部省科学研究費による特定研究“海洋保全の基礎的研究”研究集録集, pp. 82—88, 1977.
6. 森 康巳: 腸球菌の水質汚染指標性に関する検討 (岡山医学会雑誌に投稿中)
7. 日本水道協会編: 上水試験方法, 日本水道協会, 1970.
8. 日本下水道協会編: 下水試験方法, 日本下水道協会, 1974.
9. 橋本秀夫: 畜産食品における腸球菌, モダンメディア, **16** (6), 32—40, 1970.
10. 那須昭夫: 魚介類の食品衛生学的研究 第2報腸球菌の検査方法に関する研究, 日本衛生学雑誌, **8**, 173—181, 1954.
11. American Public Health Association: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 13th Ed., 1971.
12. Slanetz, L.W. and Bartley, C.H.: Numbers of Enterococci in Water, Sewage, and Feces Determined by the Membrane Filter Technique with an Improved Medium., *J. Bacteriol.* **74**, 591—595, 1957.
13. Litsky, W., Mallmann, W.L. and Fifield, C.W.: A New Method for the Detection of Enterococci in Water., *Am. J. public. Health.* **43**, 873—880, 1953.
14. 厚生省環境衛生局編: 食品衛生検査指針 I, 検査法別, 日本食品衛生協会, 1973.
15. 堀江 進, 佐藤史郎, 宮鍋美和子: 食品の腸球菌最確数 (MPN) 測定 of 改良法, 食品衛生学雑誌, **12**, 198—202, 1971.
16. 堀江 進, 佐藤史郎, 森田 享, 井上広志, 和泉 力, 山形 誠: アザイドエスクリン寒天平板培地による冷凍食品の腸球菌検査法, 食品衛生学雑誌, **15**, 105—109, 1974.

17. 宮林 晃：食品衛生に関する腸球菌の研究 第 1 報日常食品の汚染指標としての腸球菌検査術式に関する研究, 千葉医学会雑誌, **33**, 107—116, 1957.
18. Hartman, P.A., Reinbold, G.W., Saraswat, D.S.: Media and Methods for Isolation and Enumeration of the Enterococci, *Adv. Appl. Microbiol.*, **8**, 253—289, 1966.

Fundamental studies on enterococci as a pollution indicator of water

Izumi KOUJIMA, Yasumi MORI, Junji SHIODE,

Tomoaki NAKAMURA, Kaoru TERASAKA, Kentaro SHIDA,

Yoshikazu HIRAI, Yasuhiro KANEMASA and Kazuya AKATSUKA

Department of Microbiology and School for Medical Technology,

Okayama University Medical School.

In order to develop an enterococci assay method as a pollution indicator of water or waste water, the most probable number (MPN) method using BTB azide dextrose and the membrane filter (MF) method using m-enterococcus agar were compared as to usefulness and simplicity. The appropriate concentration of NaN_3 in the media to permit selective growth of enterococci was determined to be 0.025% NaN_3 in the case of the MPN method, and 0.04% in the case of the MF method. Three hundred specimens from river water were tested by the MPN and MF methods. The correlation coefficient between the results was high enough to draw the conclusion that both methods were useful. The MPN method can be recommended as a simple procedure, and the MF method as an accurate assay, especially when specimens contain small numbers of bacteria.