

水質の汚濁指標としての腸球菌群について

田 中 久 金 丸 佳 郎 沼 田 一

ま え が き

従来、河川等公共用水域における調査に際し、生活排水による汚濁の指標を示す一つとして、大腸菌群の算定がなされており、その環境基準値として、AA類型（水道1級・自然環境保全）50 MPN/100ml以下、A類型（水道2級・水産1級）1000MPN/100ml以下、B類型（水道3級・水産2級）5000MPN/100ml以下に設定されている。

しかしながら、わが国における大腸菌群数の各類型不適合率は50—70%と高率であり¹⁾、山梨水明と云われている本県においても23調査地点（48年度）中、大腸菌群数がB類型以内であった地点は7地点（30.4%）に過ぎず、AA類型の地点はみられなかった²⁾。

大腸菌群の算定で留意すべきことは、生活排水すなわち糞便等に由来する汚濁を知る目的にもかかわらず自然界にも広く存在する非糞便性由来の大腸菌群も同時に算定されていることである。

最近、人畜の腸管内の主要な常在菌である糞便レンサ球菌（Fecal Streptococci）と呼ばれる腸球菌群の一群が、大腸菌群に代わるべき汚染指標として注目され始めてきた。この点に関し、47年以降の県内河川324件について腸球菌群の分布状態の調査をすすめる、その意義について検討を加えたので報告する。

試 験 方 法

大腸菌群数：MPN法³⁾

腸球菌群数：

A) メンブランフィルター法（MF法）

ミリポア社製滅菌ホルダー付メンブランフィルター径37mm、0.45 μ （MHWG 03700）を使用して、検水1～10mlを濾過し、濾過の終わったMFを滅菌ピンセットでEF培地上に移し、37°C 48時間培養後、桃色・えび茶色または黄色の集落を算定した。

なお、MF上のコロニー数は出来得る限り150前後になるよう検液を滅菌食塩水にて希釈調製した⁴⁾

B) 平板法（EF法）

一検体につきペトリ皿二枚以上にEF寒天培地で混釈し、37°C 48時間培養後、えび茶色の集落数を求めて平均し、希釈検水の場合には、30～300個位の集落が得られたものを採用して算定した。

EF寒天培地ニッサン（腸球菌群分離培地）組成：55

g（1l分中）	
牛脳浸出液	200ml
牛心臓浸出液	250ml
ペプトン	10.0 g
ブドウ糖	10.0 g
リン酸一水素カリウム	2.5 g
窒化ナトリウム	0.25 g
ブロムチモールブルー	0.032 g
2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド	0.15 g
カンテン	15. g
	pH7.2 \pm 0.1

試 験 結 果

腸球菌検査法の検討

1) 培地の検討

河川水9件について、EF法により腸球菌群数を求めると共に、窒化ナトリウム0.05%を含み、腸球菌確認培地として用いられているSF液体培地“栄研”により、MPN法（10ml、1ml、0.1ml）で腸球菌群を算定し、両者による細菌数を比較検討した。

この結果は、表1に示したとおりEF法による腸球菌群数は最高63 \times 10³で一般に多いが、SF液体培地では最高542とEF法による最高値の約1/100程度であり、全検体のEF/SF比は8～116倍平均42倍であった。

2) MF法ならびにEF法の比較

MF法ならびにEE法により、河川水中の腸球菌群数

表1 SF液体培地ならびにEF平板培地による比較

測定地点	腸球菌群	SF培地	EF培地	EF/SF
		MPN/ 100ml	個/100ml	
2	塩川橋	240	22,300	93
		130	5,300	
7	二川橋	109	1,800	17
		542	5,100	
8	鎌田川流末	542	63,000	116
		240	18,100	
10	大月橋	540	4,400	8
11	桂川橋	49	2,200	45
一	猿橋	33	2,400	73

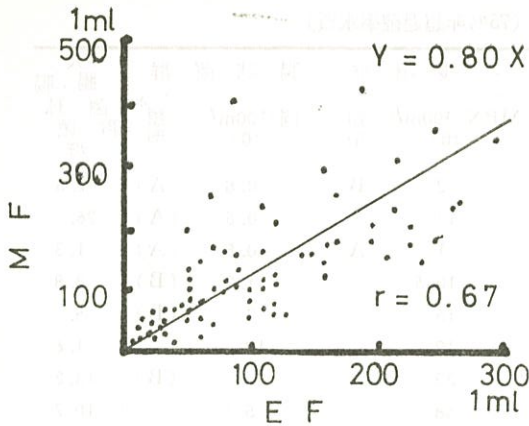


図1 MF法とEFとの相関関係

を算定し、両者を比較した結果は図1に示した。EF法による算定数300コ/mlの範囲内(N=105)での相関係数は

$$r=0.67 \quad (0.55 < \rho < 0.75)$$

の関係にあり、MF法は腸球菌菌数が少ない範囲内(300コ/ml)では一般的にEF法に比較して検出される菌数は多く

$$Y=0.80X$$

$$Y: \text{MF法} \quad X: \text{EF法}$$

の関係にあることを知った。

3) 腸球菌群の確認および菌型別分布

MF法により分離した集落95コ(地点: No. 4, 6, 8)をEF分離培地により腸球菌群を分離したのちSF液体培地に移植して48時間培養後、橋本⁵⁾⁶⁾の報告による腸球菌鑑別試験により *Streptococcus faecium* と *Streptococcus faecalis* の型別についての確認を行った。

この結果、分離集落95コ中、人由来と考えられる *St. faecalis* は59コ(62%)、ウシ・ブタ等の動物に由来すると考えられる *St. faecium* は36コ(38%)を占めていた。(表2)

生物学的性状についての試験⁵⁾

	<i>St. faecalis</i>	<i>St. faecium</i>
10°C, 45°Cでの発育	+	+
抵抗性		
60°C 30分加熱	+	+
6.5% NaCl	+	+
0.1% メチレン青牛乳	+	+
0.02% NaN ₃	+	+
β 溶血	-	-
ゲラチン 液化	-	-
TTC 試験	+	-
糖分解		
アラビノース	-/(+)	+
ソルビトール	+/(+)	-/(+)
マンニトール	+	±

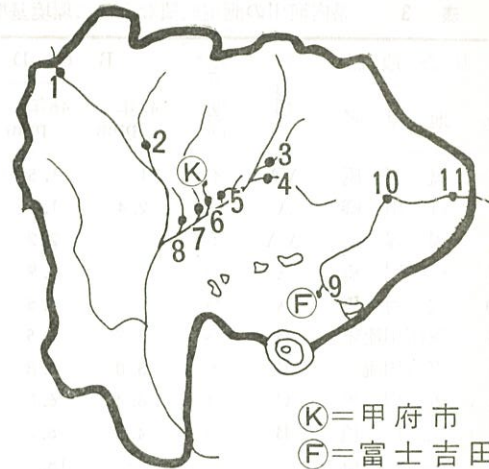


図2 調査地点

表2 腸球菌群の型別分類

地点	<i>St. Faecalis</i>		<i>St. Faecium</i>	
	集落数	比率%	集落数	比率%
4	22	75.9	7	24.1
8	23	57.5	17	42.5
6	14	53.8	12	46.2
計	59	62.1	36	37.9

4) 水質汚濁状況

県内河川11地点(富士川水系8地点相模川水系3地点一図2参照)について、生活環境項目であるBOD、大腸菌群ならびに腸球菌群(EF法)の算定結果(75%非超過確立水質成績値)は表3に示したとおりである。すなわち、笛吹川流域の各地点(No. 4, 8, 5, 3, 7, 6)についてみると、その汚濁負荷量⁷⁾(表4参照)に一致して、汚濁の進行が観察されており、BOD値によるA類型(2ppm以下)の地点はNo. 2, 4の二地点であり、B類型(3ppm以下)の地点はNo. 1の地点に過ぎず、これらの地点はいずれも都市排水の流入が少なく、各支川の上流に位置している。

一方、大腸菌群の成績をみると、B類型(5000 MPN/100ml以下)以内の地点は、No. 2, No. 1の二地点のみであり、都市排水が流入するため本県で最も汚濁が進行しているNo. 9, 6の地点は、 240×10^3 以上の高い大腸菌群数を示していた。

しかしながら、大腸菌群は地点No. 4, 7等でみると、一般的に汚濁負荷量またBOD値と必ずしも一致せず、No. 4の地点は市街地面積15ha汚濁負荷量560kg/日と最も少ないにもかかわらず、大腸菌群数は 13×10^3 と高く、No. 7の地点は汚濁負荷量・BOD値が他の地点に比し最も高いにもかかわらず 28×10^3 と比較的に低い

表 3 県内河川の測定成績ならびに環境基準類型 (75%非超過確率水質)

No.	調査地点 地名	該当類型	達成期間	B O D			大腸菌群		腸球菌群		大腸腸球菌群
				47年 ppm	48年 ppm	類型	MPN/100m ^l × 10 ³	類型	個/100m ^l × 10 ³	類型 ^{**}	
2	塩川橋	AA	イ	1.7	1.5	A	2	B	0.8	(A)	2.5
4	日川橋	A	ロ	2.4	1.9	A	13	—	0.5	(A)	26.
1	国界橋	AA	イ	—	2.2	B	1	A	0.8	(A)	1.3
11	桂川橋	A	ハ	—	3.9	C	10.5	—	1.2	(B)	8.8
10	大月橋	A	ハ	—	4.5	C	15	—	3.	(B)	5.
8	鎌田川流末	B	ハ	3.3	4.5	C	19	—	12.	—	1.6
5	平等川流末	B	イ	3.0	4.8	C	32	—	2.4	(B)	13.3
3	重川橋	C	ロ	6.4	6.0	D	58	—	5.4	—	10.7
7	二川橋	B	ハ	4.8	6.3	D	28	—	6	—	4.7
9	昭和橋	—	—	—	18.	E<	240<	—	20	—	12.3
6	濁川橋	D	ハ	19.5	21.	E<	240<	—	31	—	7.7

* イ 直ちに達成
 ロ 5年以内で及格的すみやかに達成
 ハ 5年をこえる期間で及格的すみやかに達成
 ** 大腸菌群数による類型を適用

註) 類型指定: 富士川水系, 相模川水系 (No.2, 1, 11, 10) 昭和48年3月
 笛吹川水域 (No.4, 8, 5, 3, 7, 6) 昭和49年4月

表 4 笛吹川水域の背景状況

No.	支流域区分	内容 支流域内 市町村面積 (ha)	市街地 面積 (ha)	流域人口 (48年4 月)(人)	汚濁源	
					排水量 (m ³ /日)	負荷量 (kg/日)
4	日川	9,053	15	6,810	2,861	560
8	鎌田川	3,436	1,451	24,972	10,304	1,485
5	平等川	3,150	18	17,675	3,799	1,004
3	重川	11,275	122	48,081	13,975	2,604
7	荒川	17,170	746	113,894	61,963	5,371
6	濁川	2,720	729	82,869	51,150	3,389

成績であった。

これに反し、腸球菌群の場合 No.8 地点を除き、指定類型でみると BOD 値と一致した汚濁状況を示し、特に No.4 地点は大腸菌群数の約 1/26 と腸球菌群数は極めて低く、その背景状況に一致した成績であった。なお高い腸球菌群数を示した No.8 地点は市街地面積が最も広く、また汚濁負荷量も高い地点であった。

BOD、大腸菌群数ならびに腸球菌群数の季節的変動を表 5 に示した。47年および48年の成績において、夏季(7, 8, 9月)と冬季(12, 1, 2月)を比較した場合、BOD 値は一般的に冬期に高く、細菌数は逆に夏季に高い傾向を示し、特に大腸菌群数は 1.1~23.4倍 平均 4.9倍と高い数値を示した。これに対し腸球菌群数は 0.2~6.7倍 平均 2.2倍と季節的変動は少なかった。

考 察

かつて桑原ら⁸⁾は北毎道の河川について大腸菌群の菌型別分布を調査、温泉街汚染の影響を受けない上流や支流では Escherichia coli の出現率は 24.3±6.4%、下流では 51.6±5.1%と高率に上昇することを報告、また金丸ら⁹⁾は本県の公共用水域の菌型別分布について調査を行ない、糞便由来の Escherichia coli I は河川水で 47.8%、湖水で 17.2%みられたことを報告している。

汚染指標菌としての大腸菌群について Haues らは¹⁰⁾その不検出が浄水水質の細菌的安全性を保証するという意味では良き指標であるが、原水中においては必ずしも糞便性汚染の程度を正確に示しているとは限らず、この理由として大腸菌群が広く自然界に分布していることと水中に侵入した場合、ある条件下で増殖を起すという二つの欠点を持つことに原因していると述べた。又、大腸菌群ならびに腸球菌群の死滅曲線を求めた実験において前者は 1%下水濃度の条件下で、最高値は実験開始時の 3.4~8.3倍に増殖することを認め、後者の場合、増殖は認められなかったと報告している。

実際、今回の調査において、夏季(7, 8, 9月)ならびに冬季(12, 1, 2月)における河川水中の細菌数は BOD 値と異なり、大腸菌群の場合、夏季において著しく増加し、冬期細菌数の 1.1~23.4倍と高く、この傾向は汚染の進行が比較的少ない地点で著しく、一方、腸球菌群数は 0.2~6.7倍 平均 2.2倍に過ぎなかった。

表5 夏季および冬季における成績値の比較

調査地点				B O D ppm			大腸菌群 MPN/100ml			腸球菌群 個/100ml		
				A	B	A/B	A	B	A/B	A	B	A/B
2	塩	川	橋	1.2	1.5	0.8	5,220	223	23.4	790	118	6.7
4	日	川	橋	1.2	2.5	0.5	14,200	1,670	8.5	340	190	1.8
1	国	界	橋	1.3	2.0	0.7	1,130	980	1.2	1,400	370	3.8
11	桂	川	橋	3.6	2.8	1.3	8,050	7,030	1.1	1,470	630	2.3
10	大	月	橋	1.8	2.4	0.8	19,100	3,470	5.5	2,400	1,500	1.6
8	鎌	田	川	3.7	3.0	1.2	19,900	7,480	2.7	7,100	4,400	1.6
5	平	等	川	3.4	3.6	0.9	46,000	8,930	5.2	3,360	1,010	3.3
3	重	川	橋	4.2	8.7	0.5	45,800	15,300	3.0	2,750	5,330	0.5
7	二	川	橋	3.7	5.2	0.7	15,700	12,300	1.3	1,200	6,860	0.2
9	昭	和	橋	4.6	9.6	0.5	90,000	85,500	1.1	12,700	12,500	1.0
6	濁	川	橋	12.2	19.9	0.6	146,000	134,000	1.1	193,000	184,000	1.0

A: 夏季 (7, 8, 9月) 平均成績値 B: 冬季 (12, 1, 2月) 平均成績値

橋本⁶⁾によると、腸球菌群は汚染指標菌として大腸菌群よりすぐれているとし、その理由として、次のことを挙げている。

- (1) 腸球菌群は大腸菌群よりも糞便汚染と密接な関係があるといわれること。
- (2) 腸球菌群は一般に外界では増殖出来ないで、糞便による汚染の程度と平行して存在するといわれること。これに対して大腸菌群は少量の有機物の存在下でも増殖出来るため汚染と平行しないおそれがあること。
- (3) 指標菌が自然界において病原菌と同じ程度か、それより少し抵抗力を有することが望ましいが、この条件に腸球菌群は適していること。
- (4) 糞便由来の腸球菌のタイプが人と動物では異なるといわれる特性を有していること。

特に最近、腸球菌群は Sodinm azide を含む選択培地の使用により、腸球菌群の同定を容易にしたことから水質等の糞便汚染の指標菌として大きな意義を帯びてきた¹¹⁾。

腸球菌の検査法として1946年 Winter & Sandholzer によって紹介された推定試験培養基は NaN_3 0.04% を含むため腸球菌の発育を阻害し、実際の数値より少くなることが指摘されている。今回、河川中の腸球菌群選択培地として市販の E F 寒天培地 (NaN_3 濃度 0.02%) ならびに S F 液体培地 (NaN_3 濃度 0.05%) を用い比較検討を試みた所、後者は腸球菌の発育が強く阻害され E F/S F 腸球菌群数比は 8—116倍平均42倍を示し、一般的に NaN_3 濃度 0.02~0.025% が望ましいこと⁶⁾等からみて、以後、腸球菌群選択培地として E F 寒天培地を使用した。

河川中の腸球菌群検査法として Slanetz^{12,13)}は選択培

地と Membrane Filter 法 (MF法) を併用して良好な成績を得たことを報告、また田口^{4,14)}は大腸菌の試験法として、普通寒天法、MPN 法、MF法、デスオキシコーレート寒天法について比較検討し、デスオキシコーレート寒天培養法と Membrane Filter 法は近似値をもって接近すること、MPN 法は過剰な集落算定の成績が生じることを報告し、応用培地としてデスオキシコーレート培地が使用簡単、鑑別容易で適当に思われると報告している。

一方、島崎ら¹⁵⁾は大腸連鎖球菌の検査にあたり Membrane Filter 法について検討を加え、この方法はフィルター上に集落が形成されるので培地表面で菌が発育する場合と事情が異なること、フィルターの径がシャーレの径に比較して遥かに小さく、高濃度に汚染された集落の計測にあたって問題があり、その MF 用培地はその目的に適した培地を使用すべきことを強調している。

今回、E F 寒天培地を用い混釈培養による平板法ならびに MF 法とについて比較実験を試みた結果、両者の間に相関 ($r=0.67$) が認められたが、E F 平板法は操作が簡便であること、集落が容易に鑑別出来ること、また汚染が高い試料に対しても集落の計測が容易であること等から、河川等の腸球菌群検査法として適当な方法と考えている。

E F 平板法により県内河川11地点について腸球菌群数を求めた結果 $0.5 \times 10^3/100\text{ml} \sim 31 \times 10^3/100\text{ml}$ の範囲内にあり大腸菌群数と異なって BOD 値ならびに汚濁負荷量の増加傾向と一致して腸球菌群数が増加することがみとめられ、BOD 環境基準類型と腸球菌群数類型 (大腸菌群数に準じて類型基準を適用) は、極めてよく一致していた。

また分離した集落について腸球菌鑑別試験を試みた結

果、人の糞便由来と考えられる *Streptococcus faecium* は 62%、ウシ、ブタ等の動物の糞便由来と考えられる *Streptococcus faecalis* は 38%を占めていた。

結 論

水質の汚濁指標として腸球菌群の検査法ならびに県内河川中の分布状況について検討、腸球菌群は指標菌としてすぐれており、水質の汚濁状況を知る有効な手段であると認められた。

- (1) 水中の腸球菌群検査法として、市販の E F 寒天培地を用い、混濁培養にする平板法について検討の結果本法は操作が簡便であり、かつ集落が容易に鑑別出来ること、また集落算定が容易であることを認めた。
- (2) 腸球菌群数は大腸菌群数と異なり BOD 値ならびに汚濁負荷量と一致し、その汚染状況を適確に示していた。
- (3) 夏季ならびに冬期における細菌数を比較した結果大腸菌群数は夏季において著しく高く、平均 4.9 倍、一方、腸球菌群数は平均 2.2 倍と季節の変動は比較的少なかった。

文 献

- 1) 帆足健八, 環境技術, 2, 14 (1973)
- 2) 山梨県, 昭和48年度公共用水域水質測定結果

(1974)

- 3) 日本分析化学会北毎道支部編, 水の分析, 283 化学同人 (1969)
- 4) 田口勝久, 水道協会雑誌 304, 42 (1960)
- 5) 橋本秀夫, メディヤサークル 54, 163 (1960)
- 6) 橋本秀夫, 同誌 41, 111 (1963)
- 7) 山梨県, 昭和48年度 環境基準類型指定調査報告書 (笛吹川水域)
- 8) 桑原驥児, 用水廃水ハンドブック, 39, 産業用水調査会 (1969)
- 9) 金丸佳郎ほか 3 名, 第 8 回 山梨県公衆衛生研究発表会 (昭和48年 6 月)
- 10) N. B. Haues et al, Jour. New. Engl and WWA 80 (1), 6 (1966), ——水道協会雑誌 393, 84 (1967) より引用
- 11) 柳沢文徳, 食品衛生学 204 續文堂 (1962)
- 12) L. W. Slanetz et al, Publ. Hlth. Rep. 70, 67 (1955)
- 13) L. W. Slanetz & C. H. Bartley, J. Bact. 74, 591 (1957)
- 14) 田口勝久, 水道協会雑誌 307, 22 (1960)
- 15) 島崎保家ほか 2 名, 日本獣医畜産大学紀要 19, 9 (1971)