

大腸菌群測定法の水質汚染指標性の検討

岡山大学医学部細菌学教室
岡山大学医学部ウイルス学教室*
岡山大学医学部附属臨床検査技師学校**

赤塚和也*・森康己・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

(昭和53年8月1日受稿)

緒 論

水質検査には化学的検査項目以外に細菌学的検査項目が併行して行われていることは周知の事実である¹⁾。そして我国における現在の水質検査法²⁾では大腸菌群測定法が広く用いられている。すなわち上水試験法⁴⁾および工業用水(JIS)¹⁾ではLB培地—BGLB培地法(LB-BGLB法と略す)、下水試験法ではLB培地法(LB法と略す)、食品衛生法および公用水ではBGLB培地法(BGLB法と略す)を行うとされており、これらはいずれも最確数(MPN)を求める方法である。他方乳製品および工場排水(JIS)²⁾ではデスオキシコレート培地(DOC法と略す)を用いての集落数を求める方法も行われている。

これら諸種の方法のうち、上水試験法および工業用水(JIS)¹⁾に適用されているLB-BGLB法で算定される大腸菌群の検討を試みた。LB-BGLB法で算定される大腸菌群とは“乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性のグラム陰性無芽胞桿菌である”と定義され、この条件を満たす種属はEscherichia, Klebsiella, Enterobacter, Aeromonas, Erwinia, Serratia および Citrobacter 等が包含されている。しかしこれらの種属全てが人畜糞便由来のものではなく、水、植物または土壌に由来する種属も含まれていると言うことである。元来、水質検査における汚染指標菌とは人畜糞便由来の菌を検索することを目的としているのであるから、大

腸菌群測定結果をそのまま適用して汚染状況や汚染源の判定を行うと誤りを生ずることになりかねない。

我々は過去数年間に亘って児島湾⁵⁾、児島湖⁶⁾を初めとして県下河川^{7,8)}での汚染調査を行って来たが、その結果のなかで化学検査や現況に照して不当と思われるような高値の大腸菌群数を算定することがしばしばあった。そこで各種調査点での現行の大腸菌群測定で得られる測定結果の検討を、本測定法で算定される大腸菌群の種属分類を行うことにより、糞便汚染の指標性の良否について検討することとした。

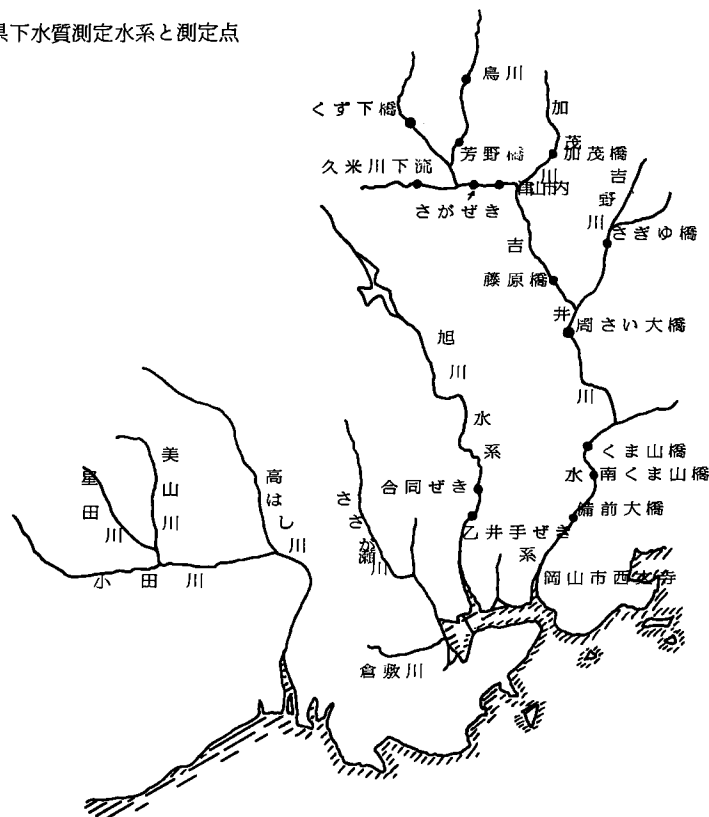
調査地点および方法

調査地点

調査地点は図1に示す如く、岡山県下の主要河川の各地点、すなわち旭川水系、吉井川水系、小田川支流の美山川および星田川水系である。

旭川水系は県下最大の河川で下流に岡山市街地があり、都市下水、工業排水等の影響を受ける河川である。さらに上流は旭川ダムを擁し、農畜産排水の影響を受けているのは勿論のことである。吉井川水系はその本流、支流の長さは県下で最も長く、上流に津山市が存在するものの主として穀倉地を貫流して最もきれいな川とされている。小田川支流の美山川、星田川については美山川ではその上流が美星町から端を発し、以後山間部を貫流し小田川にそそいでおり、星田川は星田池から端を発し、養豚場が山林中に散在するいわゆる山岳畜産地を流下している。この美山川、星田川は矢掛町に及んで合流し小田川

図1 岡山県下水質測定水系と測定点



に流れ込んでいる。特殊材料については人工糞便水、人里離れた山頂池、溪流等さらに生活排水等を適宜検査対象とした。

検査方法

検査方法は法令もしくは日本工業規格¹⁾で定められている方法に則った(表1)。

大腸菌群測定で陽性を示す菌の選別には、まずLB培地で2~3本/5本程度に陽性を示す検水量をLB培地50~100本に接種し、その陽性管をBGLB培地に移植する。BGLB培地で陽性を示した管よりドルガルスキー改良(BTB)培地で分離培養を行って、生ずる集落中乳糖分解(本培地上で黄変集落)菌のみを釣菌して、再びBGLB培地に移植し、陽性であることを再確認した上で、これらの菌を同定の対照とした。菌同定のための確認培地はTSI培地、SIM培地、シモンズクエン酸培地、リジン脱炭酸培地、尿素培地、VP-MR培地およびDNA培地を使用し、他にチトクロームオキシダーゼ試験を行って、生物学的性状から菌属同定を行った²⁾。

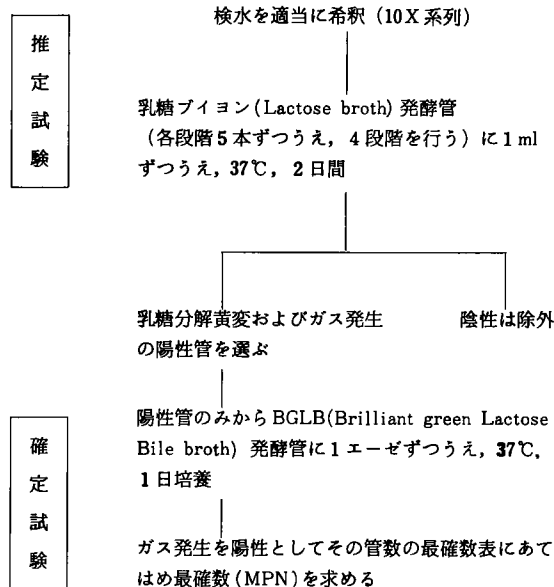
結 果

I. LB-BGLB法による大腸菌群測定

LB-BGLB法による大腸菌群測定結果を表2に示した。

旭川水系では下流に行くに従い、岡山市の都市下水の影響を受けつつ、汚染が進んでいるのが菌数の上からうかがえる。すなわち、測定値には多少のばらつきがあるものの下流特に岡山市街地の影響を受ける相生橋、桜橋附近では4,000~10,000という高値を得た。逆に乙井手堰は岡山市上水道の取水場所で水量も多く清澄な所とされており、この地点では1,300という低値を得た。吉井川水系についてみると上流の溪流に近い鳥川で460という値が得られ、逆に津山市の影響を受ける地点では13,000以上の値を得た。しかし農山村を流れる各地点では概ね2,000~4,000という値を得たが、現場の状況から考えると想像以上に高い値を得たものと考えられる。美山川は上流に美星町があり、この市街地の影響を受け9,000~10,000以上という高値を得た。そのような地点から山間部を通過する間に川巾が徐々に広くなり、水量も徐々にあるが増加し菌数はやや減少している。さらに美山小学校附近になると民家の影響を受け

表1 大腸菌群測定法 (LB・BGLB法)



高くなることが考えられるが、8月は極端に高く、5,000という値が得られた。この原因については明らかでない。星田川は星田池から端を発し、やさご橋附近まで溪流に近い条件であるため全体的に490以下という値を得るが、この地点から下流は民家の影響を直接受け20,000という高値を得た。新栄橋は汚染された美山川と比較的きれいな星田川の合流地点である。またこの附近になると矢掛町の都市下水の影響も受け6,000という値を得た。その後、小田川に流れ込むが、矢掛町の住民排水の影響を直接受け(排水口の1例に160,000という高値があった)9,000~90,000と非常に高い値を示した。

特殊材料には畜牛場および豚舎排水口、牛糞、豚糞それに人糞等の強糞便汚染材料を供試した。逆に山頂小池(径5 m 捷息生物なし)、山頂溪流(巾50cmの溪流)、緑葉樹(潤葉)および草(緑草)などのような糞便汚染の可能性の考えられない種々の材料をも検査対照とした。前者の材料の場合にはかなりの高値を示すことは納得出来るが、後者の材料の場合でもかなりの菌が測定でき、糞便以外に由来する大腸菌群が多数存在する可能性を示している。

II 大腸菌群測定で算定される菌の分類

大腸菌群測定結果は一部では現状に合った例も存在するが大部分の例は高値を示しており、人畜糞便

の汚染が余り考えられないような地点の検水や特殊材料でもかなりの菌数を示している。そこで我々はLB-BGLB法で算定される菌には人畜糞便に無縁の菌が多数含まれることを考え菌分類を試みた。

大腸菌群のカテゴリーに含まれる菌種は表3に示すような菌種であるので便宜上3群に分けた。すなわち人畜糞便由来菌(人由来菌と略)として *Escherichia* および *Klebsiella pneumoniae* を含めた。中間型に *Enterobacter (cloacae, aerogenes)* を含む)を配したがこれらは人由来菌に含めるべきと言う研究者もいるが、我々は文献的考察などから中間型とした。次に元来植物病原菌である *Erwinia*、水中、冷血動物に生息している *Aeromonas*、土壌、植物等に寄生する *Serratia*、*Citrobacter* さらに *Klebsiella*-like 菌(ドルガルスキー改良培地上で *Klebsiella pneumoniae* と非常によく似ていて、乳糖を分解する菌であるが、若干生物学的性状が異なり窒素固定の能力を有する。)を植物、水および土壌由来の菌であるため外界由来菌とした。

我々の設定した分類表に基づいて各調査地点について菌分類を行い、表4に一部の例の菌分類の百分率を示した。特殊材料の人工糞便水(人糞)は新鮮材料を使ったという欠点はあるが、ほぼ100%人由来菌で占められ、そのうちの90%は *Escherichia* が占めていた。豚舎排水口では人由来菌が65%、外

表2 LB-BGLB法による大腸菌群数測定結果抜粋(1)

水系	調査地点	年・月	BOD (ppm)	LB・BGLB (MPN/100)
特殊材料	人工糞便水	52, 1	—	92000
	人工豚糞便水	52, 1	—	490
	人工牛糞便水	52, 1	—	20
	一宮畜牛場	52, 1	—	790
	牛舎水留り	52, 1	—	7900
	豚舎	52, 1	—	22000
	豚舎排水口	52, 8	—	790000
	人工糞便水(A)	52, 12	—	49000
	人工糞便水(B)	52, 12	—	13000
	山頂小池	50, 1	—	400
	山頂溪流	50, 1	—	600
緑葉樹	50, 1	—	700	
草	50, 1	—	15600	
旭川水系	合 同 堰	51, 3	3.5	400
	”	51, 5	1.1	7800
	玉 柏	51, 1	—	170
	中 原 橋	51, 1	—	330
	乙 井 手 堰	51, 1	2.1	1300
	相 生 橋	51, 7	3.5	4900
	”	52, 1	—	3200
	桜 旭 川 大 橋	51, 5	1.6	13000
吉井川水系	鳥 川	51, 8	—	460
	芳 野 橋	51, 8	2.0	2300
	葛 下 橋	51, 8	2.1	4900
	久 米 川 下 流	51, 8	—	4900
	嵯 峨 堰	51, 8	2.1	4900
	”	52, 1	—	700
	津 山 市 内	51, 8	—	13000
	”	52, 1	—	28000
	加 茂 橋	51, 8	—	3300
	藤 原 橋	51, 8	—	10900
	鷺 湯 橋	51, 8	—	4900
	周 匝 大 橋	51, 8	—	2200
	熊 山 橋	51, 8	—	3900
	”	52, 1	—	330
	南 熊 山 橋	51, 5	2.5	4900
備 前 大 橋	51, 5	0.7	2300	
永 安 橋	52, 1	—	330	

表2. LB - BGLB 法による大腸菌群数測定結果抜粋 (2)

水系	調査地点	年・月	BOD (ppm)	LB・BGLB (MPN/100)
美 山 川 水 系	美 星 市 街 地	52, 8	2.6	92000
	”	52, 11	2.9	17000
	下 田 橋	52, 8	1.2	2200
	”	52, 11	1.8	9200
	宇 田 上	52, 8	0.6	1400
	”	52, 11	1.6	1300
	宇 田 下	52, 8	0.8	4900
	”	52, 11	0.9	1300
	夫 婦 橋	52, 8	0.6	790
	”	52, 11	1.0	790
	鬼ヶ嶽ダム下	52, 8	0.9	230
	”	52, 11	1.4	45
美山小学校上	52, 8	0.8	36000	
”	52, 11	0.5	4900	
星 田 川 水 系	星 田 池	52, 8	1.8	0
	”	52, 11	1.8	20
	星 田 池 下	52, 8	1.4	330
	”	52, 11	1.3	110
	ダ ム 上 流	52, 8	0.9	490
	”	52, 11	1.0	230
	や さ こ 橋	52, 8	0.3	490
	”	52, 11	0.5	490
西 河 面	西 河 面	52, 8	1.2	24000
	”	52, 11	1.2	2400
	”	52, 11	1.2	2400
小 田 川 水 系	新 栄 橋	52, 8		6800
	”	52, 11		3500
	矢 掛 町 排 水 口	52, 11		160000
	小 田 川	52, 8		92000
	”	52, 11		16000

表3 大腸菌群測定で算定される菌分類

Escherichia (coli の type I, II および III)	}	人畜糞便由来 (人由来)
Klebsiella (主として pneumoniae)		
Enterobacter (cloacae および aerogenes)		中 間 型
Erwinia	}	植物・水および土壌由来 (外界由来)
Aeromonas		
Serratia		
Citrobacter		
Klebsiella-like		

表4. LB・BGLB法で算定される大腸菌群の菌属分類の占有率

由来分類		人由来		中間型		外界由来				
調査地点	MPN/100	E.	Kleb.	Ent.	Unknown	Er.	A.	Ser.	C.	Kl-like
人工糞便水	—	90.2	9.8	—	—	—	—	—	—	—
豚舎排水口	—	60.5	4.0	5.3	—	—	—	7.9	13.2	9.2
鳥川	460	2.7	12.0	29.7	8.5	5.4	5.4	2.4	8.1	25.8
葛下橋	4900	37.7	8.0	32.1	3.6	—	—	—	3.6	17.0
嵯峨堰	4900	8.3	11.1	39.2	4.2	8.3	—	—	16.7	12.2
加茂橋	13000	4.5	18.4	13.6	9.0	9.1	—	—	2.3	43.0
熊山橋	3900	5.9	16.5	17.0	—	25.5	5.0	—	10.0	20.0
美星市街地	92000	33.3	36.7	16.7	3.3	3.3	—	—	3.3	3.3
ダム上流	490	5.6	11.7	5.6	—	—	—	5.6	44.4	27.2
新栄橋	3500	33.3	5.6	14.8	33.3	—	—	—	—	12.9
掛畑	170	—	6.5	60.9	—	17.4	—	—	—	15.2
生石橋	20	—	6.2	28.2	—	30.8	20.5	—	—	14.3

Abbreviation; E. — Escherichia, Kleb. — Klebsiella.
Ent. — Enterobacter, Er. — Erwinia.
Aer. — Aeromonas, Ser. — Serratia.
C. — Citrobacter, Kl-like — Klebsiella-like

界由来菌が30%を占め中間型が5%であった。

野外調査例で吉井川水系の鳥川、嵯峨堰、加茂川、熊山橋の各地点では人由来菌がいずれも20%以下で Escherichia は数%前後の値を示すに過ぎなかった。葛下橋では附近の民家の影響を受けてか Escherichia の占める割合が極端に多く、人由来菌が37%であった。美山川の上流、美星市街地は人由来菌が70%を占め、Escherichia と Klebsiella の割合もほぼ半数で、外界由来菌は極端に少なく、住民排水の影響が直接に及んでいるため、このような結果になったものと思われる。その逆の現象が星田川ダム上流地点で見られ、人由来菌が15%前後で、外界由来菌が70%を占め、特に Citrobacter が40%前後も占有していた。両河川の合流点である新栄橋は矢掛町の影響を受け40%が人由来菌で、そのうち Escherichia が30%占めていた。表5は表4のような分類を行った後、その由来に従ってまとめたものである。人および家畜に関係している特殊材料は70~100%が人由来菌で、人畜系の影響を受けていない地点では70~100%が外界由来菌であった。野外調査では都市および住民排水の影響を受ける地点、すなわち吉井川水系の葛下橋、美山川の美星市街地等では40~70%の人由来菌が占め、外界由来菌が10~20%占めていた。その他の地点、すなわち農山村地、穀倉

地を貫く河川での各地点は40~50%の外界由来菌により占められていた。従って LB-BGLB 法で算定される数値の中には人由来菌に無関係な菌(外界由来菌)が相当な割合で含まれていることになり、それらの菌が測定値を引き上げているものと思われた。

考 察

水質検査は化学的検査項目と細菌学的検査項目が併行して行われており、我国における細菌学的検査には大腸菌群測定が行われている。

水質調査における細菌学的検査の目的には二つのケースが考えられ、その一つは Personal health service の場からの食品衛生対策を目的とした上水、用水の菌検索であり、他の一つは Environmental health service の場におけるもので、ヒトをとり巻く環境をより健康的なものに保つために行うものである。すなわち国民生活の水準が高度になるにつれて要求される快適な生活環境の保全という意味での微少な尿尿汚染の発見、下水や尿尿処理の良否の判定または富栄養化の他面的な把握の目的が含まれている。このような事象を考慮して、糞便汚染指標菌としての条件⁵⁾を考えて見ると、概略この条件に沿うものとしては大腸菌群、大腸菌(E.coli type 1)、腸球菌等の測定が上げられる。

表5. 大腸菌群に算定される菌の由来分類の占有率

調査地点	MPN/100	人由来菌(%)	中間型(%)	外界由来菌(%)
人工糞便水(A)	++	100.0	0	0
“(B)	++	72.3	19.1	8.5
豚舎排水口	++++	64.5	5.3	23.7
山頂小池	400	0	0	100.0
山頂溪流	600	0	28.6	71.4
緑草樹	700	0	11.1	88.9
草	15600	0	42.3	57.7
鳥川	460	14.7	38.2	47.1
葛下橋	4900	45.7	35.7	20.6
嵯峨堰	4900	19.4	43.4	37.2
加茂橋	13000	22.9	22.6	54.5
熊山橋	3900	22.4	17.0	51.6
美星市街地	92000	70.0	20.0	10.0
ダム上流	490	44.5	5.6	50.0
新栄橋	3500	51.8	48.2	0
掛畑	170	6.5	60.9	32.6
生石橋	20	6.2	28.2	65.6

表6. 大腸菌群数の環境基準 (MPN/100)

環境基準	河川	湖沼	海域
AA	50以下	50以下	—
A	1000以下	1000以下	1000以下
B	5000以下	5000以下	—
C	—	—	—

我々は過去、海⁸⁾、汽水⁶⁾を初めとして河川水^{7*)}の大腸菌群測定の見直しを行った。さらに今回は河川水を中心に調査例を増し検討を重ねた。これらの調査地点のBOD、COD値などの化学検査はかなり改善されている結果を得たにもかかわらず大腸菌群測定値は依然として改善されておらず、また岡山県のまとめた調査報告書¹¹⁾からも同様のことが示唆されている。さらに大腸菌群数の環境基準(表6)にこれらの測定値をあてはめてみても全般的にこれらの基準値より高値を示す地点が多かった。これは現在の環境基準が厳しすぎるのか、現行の大腸菌群測定に問題があるのか、またその両者に起因するものかということになる。上記のように我々の調査結果にも岡山県報告にも不合理な点が指摘されるので、この大腸菌群測定(LB-BGLB法)で算定される菌の分離同定を行い、この大腸菌群は必ずしも糞便汚染指標菌のみで構成されていない事の実例を示した。我々が設定した分類に基づいて菌分類を行った検

討してみると、都市排水、住民排水に直接関連する地点での検水では、大腸菌群のうち人畜由来菌の占める割合が概ね高く指標性の高いことを示している。逆に農山村を流れる河川よりの検水は外界由来菌が非常に大きい割合を占め、指標性が低く環境基準に合致しない場合の原因の一端を担っていることを示している。これらの事実は特殊材料である人糞水が人由来菌のみよりなり、逆に糞便汚染の考えられない特殊材料でもかなりの大腸菌群数を数え、その大部分が外界由来菌である事実がよく物語っている。しかし我々の設定した分類にも問題は残る。それはEnterobacterを中間型として分類し、試料によってはこれが大きな割合を占める例がしばしばあることである。Enterobacterはむしろ人由来菌に包含してしまう方がよいと指摘する坂崎の意見もあり、この意見に従えばかなり指標性の高くなる調査例もある。しかし森ら(未発表)によると河川水中ではEnt. aerogenesおよびEnt. cloacaeは長期生存

するのみならず、条件によってはしばしば菌数増加を示すことがあると述べている。このような観点に立つとやはり中間型として処理した方が妥当であるとの結論に達する。そこで中間型に属する菌を人由来菌と外界由来菌に二分して考察する方式をとると前述の傾向は増々倍加されることになり、極端に糞便汚染指標性のない調査例が多く見られるようになる。

糞便汚染指標菌の条件としては第一に「人畜排泄物中に常に大量に存在する菌であり、これら大量に存在する菌はなるべく網羅して検出出来ることが望ましい。」第二に「人畜排泄物以外には存在しないような菌が望ましい。土壌、植物または水中に常在して生存、増殖するような菌は判定を混乱に陥れる。」である。結局大腸菌群測定によって検出される菌には、第二条件に合致しない多数の菌が含まれるということである。そこで、人由来菌のみを残して、外界由来菌を取り除く方法として次のような方法がある。その一つは外界由来菌は低温発育を至適とする考えに立ち、37℃と低温培養(20℃)で得られるMPNの差を求めるという方法、他の一つは Eijkman らの「Fecal coliは他種のcoliよりも高温(44~46℃)で発育する」という理論に基づいた EC (Escherichia coli) 培地による EC 法の両法が考えられる。またその他の汚染指標菌としては腸球菌があげられ、欧米では従来の方法とこの腸球菌測定とが併行して行われている。従って、我々も本来の目的である「何

が糞便汚染のものさしとして一番適切であるか」を検討するために三者の比較検討を急いでおりの機会に報告したい。

現在水質汚染指標に常用されている大腸菌群測定(LB-BGLB法)による測定結果値は不当と思える程高い場合がしばしばあり、人畜糞便由来以外の菌種も算定されているのではないかとの疑問を生じる。この点を解明するために本測定法で算定される菌の分離を行って検討した。

菌分類において人由来菌以外に外界由来菌(Erwinia, Aeromonas, Serratia, Citrobacter および Klebsiella-like など)と目される菌が含まれることが判った。そして調査事例中にはこの外界由来菌で実状に促さない大腸菌群数を示す場合が多々あることも判明した。すなわち、大腸菌群測定(LB-BGLB法)は都市排水や住民排水等の影響が大なるところではよい指標性が望めるが、山間部、農山村などを流れる所ではあまり望めなかった。従って、腸球菌等の他の指標菌測定と併用すれば実状に促した指標性が生じるものと思われる。

本稿を終えるにあたり、調査研究に御協力下さった岡山大学医学部附属臨床検査技師学校の古木美子、国政千万里子、文屋孝子の皆様方に感謝致します。なお本研究は文部省科学研究費(特定研究)によるものであることを附記致します。

結 語

文 献

- 1) 日本工業標準調査会審議：工業用水試験法，JIS KOIO，日本規格協会，1973.
- 2) 日本工業標準調査会審議：工業排水試験法，JIS KOIO 2，日本規格協会，1973.
- 3) 日本薬学会編：衛生試験法注解1973，金原出版，東京，1973.
- 4) 日本水道協会編：上水道試験方法，日本水道協会，1965.
- 5) 金政泰弘，片山健，赤塚和也，原弘，俵寿太郎：岡山医学会雑誌，86.23-28，1974.
- 6) 金政泰弘，片山健，岡部昭延，森康己：岡山医学会雑誌，85，601-605，1973.
- 7) 金政泰弘，赤塚和也，藤原清，森康己：昭和51年度文部省科学研究費による特定研究“人間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，179-188，1977.
- 8) 金政泰弘，赤塚和也，藤原清，森康己：昭和51年度文部省科学研究費による特定研究“海洋環境保全の基礎的研究”研究集録集，82-88，1977.
- 9) 小酒井望編：微生物検査，医学書院，東京，1974.
- 10) 岡山県環境部監修：水質関係法令集，1975.
- 11) 岡山県監修：昭和50年度公共用水域の水質測定結果，1975.

**Evaluation of the standard total coli-form MPN test
for the biological examination of water pollution**

by

**Kazuya AKATSUKA*, Yasumi MORI, Izumi KOUJIMA,
Yoshikazu HIRAI, Hiroshi HAMADA, Masufumi ABE,
Shigenobu ABE, Shozo KUKIDA, Akihide NAGATA,
Kiyoshi FUJIWARA**, Hideo HAYASHI and Yasuhiro KANEMASA**

**Department of Microbiology and Department of Virology*,
Okayama University Medical School, Okayama**

The standard total coli-form MPN test is widely used as a biological indicator of water pollution. But our applications of the test to various field works resulted in much higher cell numbers than be expected. The reason can be thought to be that bacteria belonging to coli-form group do not always derived from human and animal feces.

In order to examine this possibility, the authors carried out the isolation and identification of bacteria which were detected by this method from various kinds of specimens. The result indicated that the bacteria designated as coli-form group included not only human- and animal-derived bacteria but also bacterial species which apparently derived from plants, soil or water, e.g. *Erwinia*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Citrobacter* and so forth.

Therefore, a method is demanded by which one can estimate quantitatively only bacteria associated with human and animal feces.