

環境水の潜在的な細菌増殖能の新規測定法

A New Detection Method for Ability of Bacterial Growth in Environmental Water

齋藤 紀行 菅原 直子 小林 妙子
渡邊 節 山田 わか

Noriyuki SAITO, Naoko SUGAWARA, Taeko KOBAYASHI
Setsu WATANABE, Waka YAMADA

環境水が感染症の原因となることがあり、環境水の感染症発生リスクを把握することは重要で、感染症の発生源、感染経路の究明あるいは感染症の発生防止対策の資質となる。リスク評価法として環境水の潜在的な細菌増殖能を測定する新規方法、ABG法、を考案し、河川水および海水について検討した結果、本方法がリスク評価に有用であることが示唆された。

キーワード：環境水、細菌増殖能

Keywords : environmental water, ability of bacterial growth

1 はじめに

環境中には多くの種類の微生物が生息している。微生物に汚染された河川水、湖沼水などの環境水が原因で発生する感染事例が度々報告されている¹⁾。実際に、多くの河川水・海水からサルモネラ、カンピロバクターあるいはノロウイルスなどの病原微生物が検出され^{2,3,4)}、これらが感染症の感染源となる危険性が指摘されている。しかし、環境水の感染リスクを科学的に検証した報告はない。

一般的に環境水の病原微生物汚染は、病原体保有動物の排泄物流入が原因で引き起こされる。しかし、病原微生物の多くは紫外線に弱く、また真水では発育できないなどから環境水中に流入した多くの病原微生物は容易に死滅あるいは不活化されるが、環境水中には細菌の栄養源となる多量の有機物が混入していることから一部の細菌は増殖して生息する。その結果、細菌が発育した環境水は感染リスクが高まり、感染源となりうる。すなわち、環境水の持つ潜在的細菌増殖能の高低が環境水の微生物リスクの高低につながる。潜在的細菌増殖能は環境水中に含まれる細菌の栄養源量に左右されるので、環境水中に細菌の栄養源となる溶存有機物量の測定が可能であれば微生物リスクの評価もできることになるが、環境水中に含まれる全ての有機物を科学的に分析することは困難である。もし、環境水が持つ潜在的細菌増殖能を直接測定できれば、環境水での病原細菌が繁殖する危険性、すなわち微生物リスクの評価が可能となり、食中毒あるいは感染症発生の原因究明あるいは予測に繋がり、発生予防に有効な資料になると思われる。

現在、水道水中の有機物質は細菌の二次増殖の原因となり水道水の細菌汚染を引き起こすとされていることから、水道水の細菌汚染防止に水道水の細菌二次増殖能(増殖ポテンシャル)を測定して判定する方法が利用されている。細菌の二次増殖は水道水に含まれる細菌の栄養源量、すなわち有機物質量と相関するとの考えから、生物分解性有機炭素(BDOC: Biodegradable organic carbon)あるいは同化性有機炭素(AOC: assimilable organic carbon)測定法が細菌汚染のリスク評価法として利用されている⁵⁾。AOC測定法は、特定の有機物を栄養源とする2種類の細菌(*Pseudomonas* sp., *Spirillum* sp.)を用い水道水中のAOC量を客観的に測定し、潜在的な細菌増殖能の評価に用いられることから、水道水以外の環境水の微生物リスクについても評価できる手法として近年注目され、応用されている。しかし、AOC測定法は使用器具あるいは操作による微量の有機物混入が検査結果に影響するため使用器材の厳密な管理及び手技が求められるなど煩雑な検査法である。また、検査対象となる河川水あるいは湖沼水は水道水と異なり大量の有機物の混入があることから、AOC測定に用いる2種類の細菌が適切とは思われない。

そこで、環境水の微生物リスクを簡便に測定できる方法の開発に取り組んだ。鳴瀬川と松島湾に採水定点を定め、定期的に採水しこれを環境水とし、これに大腸菌及び黄色ブドウ球菌を被検菌として添加し、環境水の菌発育能を調べた。この試験を菌の発育能(ability of bacterial growth: ABG)試験とした。同時にそれぞれの被検水について大腸菌・大腸菌群数を測定し、菌発育能と比較し、

ABG試験が環境水の潜在的細菌増殖能の簡易測定法として応用できるかについて考察した。

1 材料と方法

1) 使用細菌

黄色ブドウ球菌ATCC25923 (*Staphylococcus aureus*: SAと略)、大腸菌ATCC25922 (*E. coli*: ECと略)をハート・インフュージョンブイヨン(HI)に接種し、37°Cで20時間培養後、HIで1/1,000倍に希釈した液を使用菌液とした。

2) 培地

SAの菌数測定用培地としてはマンニット食塩培地(日水)、EC用としてはBTB乳糖寒天培地(日水)を使用した。

3) 採水時期および地点

採水定点: 鳴瀬川上流は漆沢ダム(上流)、鳴瀬川中流は大崎市三本木北町地区(中流)、鳴瀬川下流東松島市樋場地区(下流)、松島湾はP1, P2, P3, P4, P5, P6の6ポイントを採水定点とした。

採水期間: 鳴瀬川については平成16年4月から平成18年3月に、松島湾は平成17年8月と10月に実施した。

4) 菌発育能(ABG)試験と生菌数測定

各採水200mlを6,000rpmで30分間遠心、上清をメンブランフィルター(0.22μm)でろ過し、ろ液を70°Cの水浴で30分間加温、これを被検水とした。

被検水を滅菌フラスコ2個に各50ml分注し、それぞれにSAあるいはECの菌液を1ml添加し、25°Cで培養した。培養後0, 1, 4および7日目に各フラスコから被検水を採り10倍段階希釈、その25μlを増菌培地に塗布し、37°Cで培養後発育した集落を数え、被検水の1ml当たりの生菌数(発育集落数: cfu)を算定した。菌添加試験の対照として、滅菌精製水(DW)およびリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4: PBS)を用いた。

5) 大腸菌数と大腸菌群数

各採水100mlを滅菌容器にとり、これにコリラート(アスカ純薬)1包装を添加し混合して溶解させた。これを、97個のウエルがあるQTトレイに注入・封入し、35°Cで18時間培養し、大腸菌群数は黄色となったウエル数で、大腸菌数はUVランプ照射で蛍光色となったウエル数を判定表に従ってMPN値(/100ml)を求めた。

2 結果

1) DWおよびPBSでの菌発育性

最終濃度が 6.6×10^3 cfu/mlになるように調整したSA菌液と、 3.1×10^4 cfu/mlに調整したEC菌液をDWあるいはPBSに添加し、35°Cで培養し、1, 4, 7日目にそれぞれについて菌数を測定し、結果を図1に示した。DWではSA, ECとも漸次減少し、7日目にはECは 5×10^2 cfu/mlと添加菌量の60分の1以下に、SAは5 cfu/mlとなった。PBSでは、ECは 6.1×10^4 cfu/mlと減少は認められなかったが、SAはDWでの動態と同じ傾向を示した。

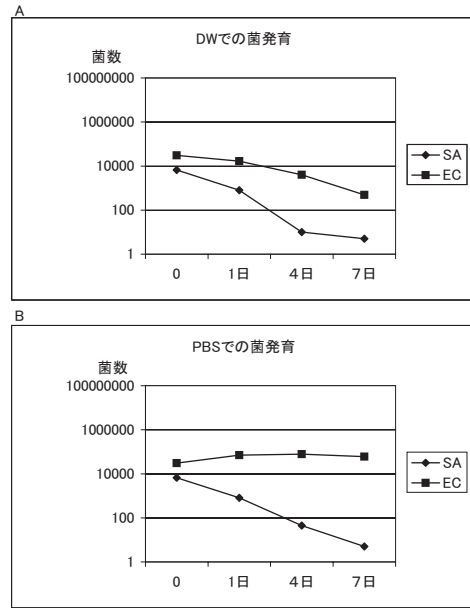


図1 DWおよびPBSでの菌発育性

2) 環境水でのABG試験

鳴瀬川の上流(4月から12月)、中流(4月から3月)、下流(4月から3月)で採取した河川水についてSAおよびECを用いて実施したABG試験の結果を図2に示した。採水したほとんどの河川水で、ECは培養7日目まで増殖する傾向を示し、SAは全体的に減少する傾向を示した。しかし、12月の河川水は上流、中流、下流ともECを旺盛に増殖させ、更にSAでも増殖傾向を示した。同様の傾向が1月の下流水でも観察された。

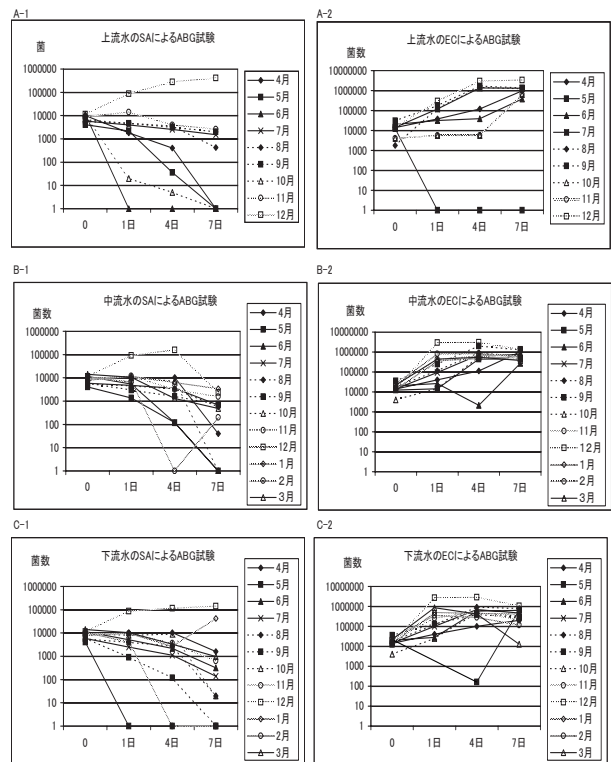


図2 河川水でのABG試験

松島湾の6定点について8月及び10月に採取した海水について実施したABGの結果を図3に示した。8月の海水では採水ポイントの違いによる菌数変化に差異は認められず、SAは菌の減少が、ECは菌の増殖が認められた。一方、10月の海水ではSAは8月の場合と同様に菌減少が認められたが、ECは採水ポイントによって異なった挙動を示した。すなわち、P5では8月と同様に菌の増殖が認められたが、それ以外のポイントでは菌の減少が認められた。

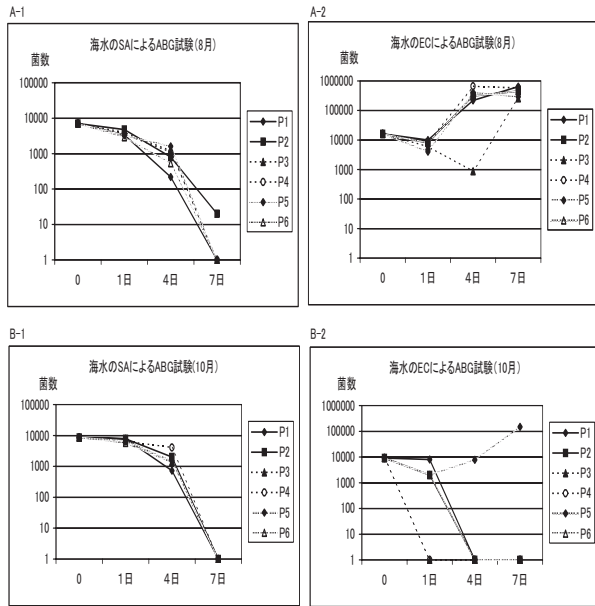


図3 海水でのABG試験

3) 大腸菌数と大腸菌群数

鳴瀬川の上流、中流、下流で採取した月毎の河川水の大腸菌および大腸菌群MPN値の結果を図4に示した。

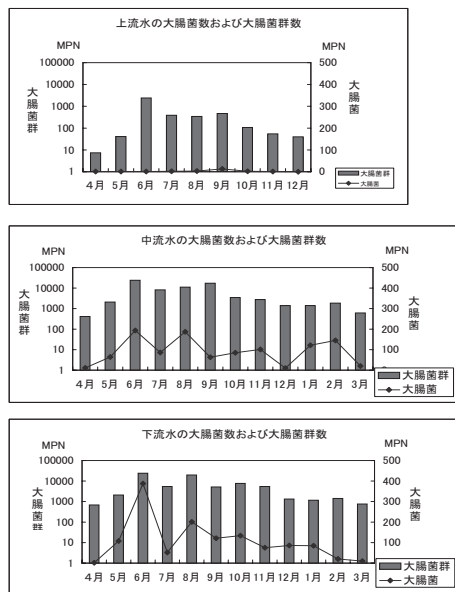


図4 河川水中の大腸菌数および大腸菌群数

大腸菌群のMPN値が1,000を超えるのは、上流では6月の1ヶ月であったが、中流および下流では6月から2月までの10ヶ月間であった。大腸菌数は、上流では9月に3.0MPNが検出されただけであったが、中流、下流では5月から2月まで100MPN前後の値を示した。特に6月は下流で400MPNと高値を示した。

松島湾の6ポイントについて8月、10月に測定した大腸菌および大腸菌群MPN値の結果を図5に示した。P5の大腸菌・大腸菌群MPN値は他のポイントより高値を示しそれぞれ100, 3,500以上であった。

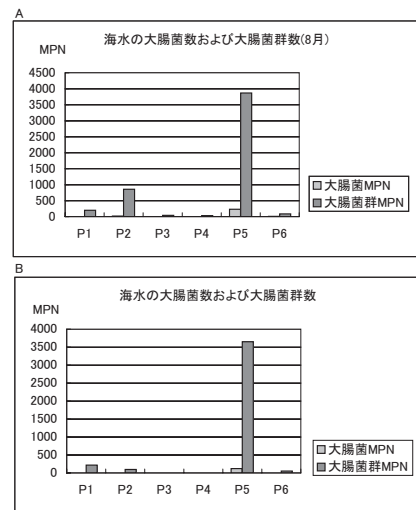


図5 松島湾の各ポイントにおける大腸菌数および大腸菌群数

考 察

大腸菌、黄色ブドウ球菌は発育に炭素源、窒素源等の栄養分および無機物を要求する従属栄養細菌である。大腸菌は無機窒素、脂肪酸を栄養源とし発育できるが、黄色ブドウ球菌は無機窒素だけでは発育できず、アミノ酸を栄養源として要求する⁶⁾。食中毒原因菌である腸炎ビブリオ、赤痢菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌あるいはエロモナスは大腸菌と、感染症の原因となる連鎖球菌、腸球菌は黄色ブドウ球菌と同じ栄養要求性である。河川、湖沼あるいは海などの環境水には植物あるいは動物由来の様々な化学物質が流入するので、細菌が増殖できる栄養分が混入している可能性は十分考えられる。

本研究では、環境水に溶存する栄養分を細菌学的に測定する方法として、ECおよびSAを用いたABG測定を考案し、環境水として河川水および海水を検査対象として実施した。同時に、大腸菌数および大腸菌群数も測定し相関性を比較した。河川水は鳴瀬川の上流、中流、下流を、海水は松島湾内6ポイントから採取し被検水とし、DWおよびPBSを対照とした。その結果、DWおよびPBSでは両菌とも増殖せず、PBSでは7日目まで生存し続けたが、DWでは急激な菌減少が認められた。河川水およ

び海水では、ECは対照と異なりいずれの河川水および海水において菌数が100倍から1000倍の増殖が認められたが、SAはほとんど河川水および海水では増殖できず、DWと同じように菌減少が認められた。すなわち、ほとんどの河川水および海水にはECが増殖するための栄養分が溶存するがSAが増殖するアミノ酸等の栄養分は溶存しないことが示唆された。

しかし、鳴瀬川でのABG測定の結果において、12月に採取した上流、中流、下流の河川水ではECと同様にSAも菌数の増加が認められ、他の月とは異なった挙動を示した。大腸菌数および大腸菌群数を比較すると、上流の河川水は中流および下流に比べ両菌数とも少ないものの、12月のそれらの値は他の月と比較しても明確な差異があるとは思われなかった。

一方、松島湾の各ポイントについて8月と10月のSAおよびECのABG測定の結果を比較した。8月の両者のABGは河川水の挙動と同じであった。10月は、SAのABGの挙動は8月と同様であったが、ポイントP1、P2、P3、P4およびP6でのECは菌添加7日目に菌が検出されなくなり、8月の結果と異なる挙動を示した。ポイントP5のECは8月の結果と同じであった。大腸菌数・大腸菌群数も、P5では大腸菌群数はMPN3,500以上の高値を示し、大腸菌数も低値であるが2ヶ月間検出されている。ポイントP5は高城川が流入する沿岸部に近い場所で、河川水の影響が直接反映される場所であるが、他の5カ所のポイントは比較的河川の流入水の影響の少ない場所で海藻が繁茂する場所であった。すなわち、10月のポイントP5以外で採水した海水がECの増殖を明確に抑制していることが確認された。これは、海水中にECの栄養分がないか、あるいはECの発育を抑制する物

質があると考えられる。8月の海水が通常の状態とすると、10月の海水にはECの増殖を抑制する物質が存在すると考えられた。

以上のように、河川水および海水について潜在的細菌増殖能をSA、ECを用いたABG法で測定した結果、ABG法が河川水、海水の定常の状態と変動した状態を区別できることが示され、ABG法は環境水の質を細菌学的に判定できる有用な測定法であると思われる。しかも、検査法に使用する物品等の準備および判定法は容易であることから、更にデータの積み重ね、使用菌の検討、化学的水質検査との比較、客観的な判定法の工夫を行うことで、環境水をはじめ様々な水の細菌学的検査法として広く利用できると思う。

参考文献

- 1) 平田強, 大村達男, 石橋良信, 下原悦子, 廣谷博史: 水環境学会誌, 20, 124 (1997)
- 2) 平田強, 保坂三継, 矢野一好, 八木田健司, 泉山真司, 遠藤卓朗: 水環境学会誌, 26, 1 (2003)
- 3) 齋藤紀行, 名村真由美, 渡邊節, 川野みち, 田村広子, 佐々木美江, 山口友美, 畠山敬, 御代田恭子, 秋山和夫, 鈴木隆志: 宮城県保健環境センター年報 平成15年度, 22, 130 (2004)
- 4) 植木洋, 菊地菜穂子, 山木紀彦, 後藤郁男, 沖村容子, 秋山和夫: 宮城県保健環境センター年報 平成15年度, 22, 54 (2004)
- 5) 上水試験方法 解説編, 日本水道協会, 935 (2001)
- 6) 工藤肇, 中村正夫, 菅野治重編: 微生物学/臨床微生物学, 19 (1989)