

# 腸球菌および糞便性大腸菌の水質汚染指標性に関する検討

岡山大学医学部細菌学教室（指導：金政泰弘教授）

国府島泉・金谷誠久・口分田晃  
野田泰子・福原明宏・森 徳子  
金政泰弘

（昭和58年12月3日受稿）

**Key words:** *Enterococcus*, Fecal coli-form,  
Water pollution, Biological indicator

## 緒 言

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。しかし大腸菌群とは細菌分類学に基づくものでなく応用細菌学的概念での一群の細菌であり、人畜糞便とため人畜糞便の汚染指標として問題があることが指摘されている。われわれもすでに公共用水の大腸菌群測定の不合理を指摘し、それに代わるものとして腸球菌測定をとりあげその有用性について報告してきた<sup>1-7)</sup>。本研究では以前から汚染指標性が高いとされている糞便性大腸菌と腸球菌とを比較検討し、あわせてルチンとしての簡便性などについても比較考察を加えてみた。

## 材料および方法

**人糞便水の調製：**岡山大学附属病院臨床検査部に依頼して得た健康人30人の糞便を1エーゼずつ滅菌生理的食塩水（滅菌生食）に混合懸濁させ適当に希釈して使用した。

**腸球菌数および糞便性大腸菌数の測定：**人糞便水および河川水からの腸球菌数・糞便性大腸菌数の測定は最確数（MPN）を求める方法による。腸球菌数はBTBアザイドデキストロース培地（表3）を自製し、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°C48時間後に培地の黄変と混濁が認められた試験管数から

MPNを最確数表から求めた。糞便性大腸菌数の測定は市販のEC培地（日水製薬）を用い同様に検水を加え44.5±0.5°Cで24時間培養後菌増殖とガス産生の認められた試験管数からMPNを求めた。

**各種細菌のメンブランフィルター透過滅菌河川水および蒸留水での生残実験：**マウス由来の *Streptococcus faecalis* (*St. faecalis*) と *Streptococcus faecium* (*St. faecium*)（広島大学生物生産学部 橋本秀夫教授より分与）、さらに *Escherichia coli* (*E. coli*)（44.5°Cで生育）、*Salmonella typhi* (*Sal. typhi*)、*Shigella sonnei* (*Sh. sonnei*) は教室保存の標準株を供試した。培養はプレインハートインフュージョン培地による37°C振盪培養を行ない、菌数が約10<sup>9</sup>個/mlの菌液と滅菌生食で希釈し、pore size 0.2μmのメンブランフィルターで透過滅菌した河川水（乙井手堰、図4）に菌数が10<sup>2</sup>個/ml程度になるように添加した。そして25°Cに置き経時的に菌数測定を行なった。菌数計算は1検体につき3枚のプレートを用いてプレインハートインフュージョン寒天培地で混濁培養を行ない、37°C48時間後に出現した集落数の平均から計算した。また蒸留水中での生残には上記培養菌液を集菌し、滅菌生食で2回洗浄後（4°C）、滅菌蒸留水中に菌液が10<sup>2</sup>個/mlになるように添加し、同様に菌数計算を行なった。

**野外調査：**河川水からの腸球菌数および糞便

表1 人糞便中の腸球菌数と糞便性大腸菌数の比

	腸球菌数	糞便性大腸菌数	腸球菌数
	MPN/100ml	MPN/100ml	糞便性大腸菌数
A	790	80	9.9
B	330	20	16.5
C	1090	270	4.0

検体A, B, Cはそれぞれ30人の糞便を減菌生食に混合懸濁して適当に希釈し測定した。

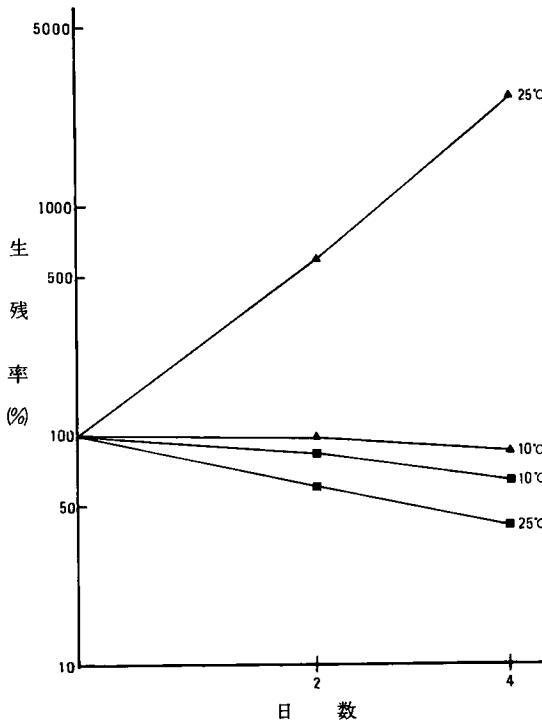


図1 人糞便水の腸球菌数・糞便性大腸菌数の経時的変化

■——■ 腸球菌数  
▲——▲ 糞便性大腸菌数

性大腸菌数測定のため図4の4地点を選び野外調査を行なった。旭川水系から乙井手堰・相生橋・桜橋、そして岡山市内を流れる西川の西川交差点下を選んだ。

## 結 果

人糞便中の腸球菌数と糞便性大腸菌数の比：人糞便中の細菌叢には個人差があるので30人の混合糞便水を調製し、腸球菌数および糞便性大腸菌数を測定し、両者の比を求めた。表1に示

すように腸球菌は糞便性大腸菌よりも4.0, 9.9, 16.5倍(平均10倍)存在していた。人糞便中には腸球菌の方が糞便性大腸菌よりも多いことが判明した。

人糞便水の腸球菌数・糞便性大腸菌数の経時的変化：図1に人糞便水の腸球菌数と糞便性大腸菌数の10°C, 25°Cにおける経時的変化を示している。10°Cで

は両者とも2日および4日後で、もとの菌数と大きな変化を示さなかった。25°Cでは腸球菌は少し減少するのに対して糞便性大腸菌は増殖して菌数が2日で6倍、4日で12倍になった。このように糞便性大腸菌は25°Cの条件で希薄な糞便水中で増殖することが示された。

各種細菌のメンブランフィルター濾過滅菌河川水および蒸留水中での生残：*St. faecalis*, *St. faecium*, *E. coli*, *Sal. typhi*, *Sh. sonnei*のメンブランフィルター濾過滅菌河川水中15°Cでの生残を図2に示す。消化器系病原菌の*Sal. typhi*, *Sh. sonnei*はすみやかに死滅し、4日でほとんど生残菌はなくなる傾向を示した。腸球菌では*St. faecalis*は上記の病原菌よりやや長く生残し、7日で1/10となりその後急速に死滅した。これに比べ*St. faecium*はやや長く生残した。しかし*E. coli*は増殖傾向を示し7日後には10倍に達した。

図3は培養した菌を集菌・洗浄し、栄養源を全く含まない蒸留水に投入してその生残を検討したものである。図2とは逆に*E. coli*は腸球菌よりも早く死滅した。このように腸球菌は栄養源の全くない条件でも良好な生残傾向を示したのに対して、*E. coli*は栄養条件により異なる生残を示した。

腸球菌数と糞便性大腸菌数の河川水からの検出状況：種々異なった状況にある地点として図4に示す4地点を選び河川水中の腸球菌数・糞便性大腸菌数の測定を行なった。旭川水系の乙井手堰(類型A)は上流には大きな市街はなく岡山市街に入る直前の地点であり、その下流の相生橋(類型B)・桜橋(類型B)は岡山市街の影響を受けている。また桜橋は満潮時には海水が入る汽水域でもある。西川は岡山市の中心部にあり生活排水の影響を強く受けている。表

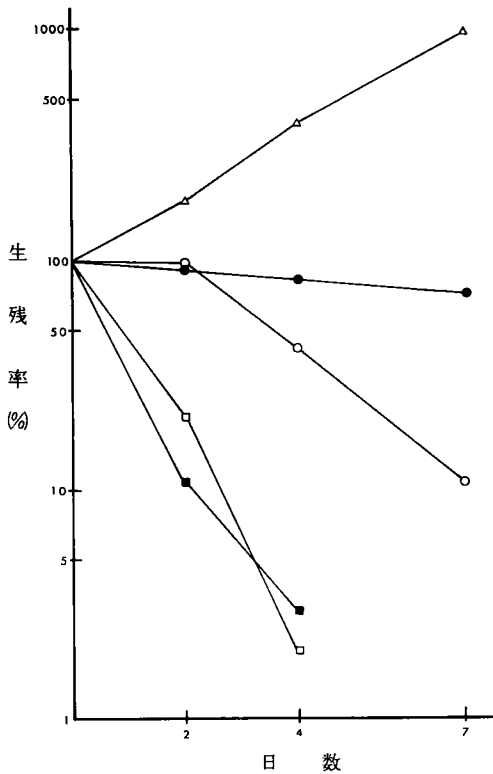


図2 各種細菌のメンブランフィルター透過滅菌河川水中での生残(15°C)

- *Streptococcus faecalis*
- *Streptococcus faecium*
- △—△ *Escherichia coli*
- *Shigella sonnei*
- *Salmonella typhi*

2は野外調査50例をまとめたものである。腸球菌数と糞便性大腸菌数との比は約0.5~20の範囲で検出され、乙井手堰は平均で3.02、相生橋で3.49、桜橋で3.09、西川では1.64であった。全体の平均では腸球菌は糞便性大腸菌の約2.3倍程度の数で河川水中から検出されることがわかった。また調査50例の腸球菌数と糞便性大腸菌数の対数による相関係数を求めてみると  $r = 0.71$ で相関性があることが判明した。

考 察

わが国の公共用水の水質検査に用いられている大腸菌群に代わる糞便汚染指標菌としては現在のところ腸球菌と糞便性大腸菌が考えられる。外国の例では、水浴場の水質基準の項目として

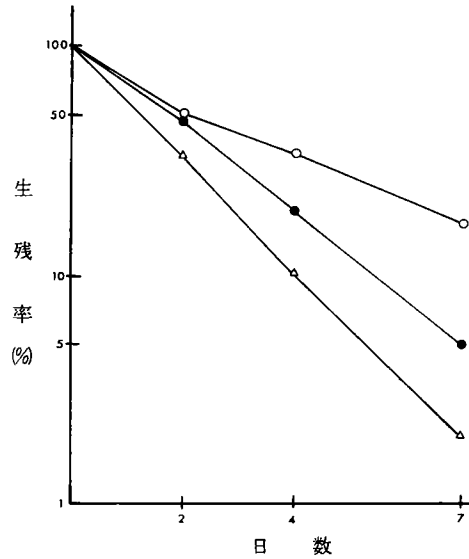


図3 各種細菌の蒸留水中での生残(25°C)

- *Streptococcus faecalis*
- *Streptococcus faecium*
- △—△ *Escherichia coli*

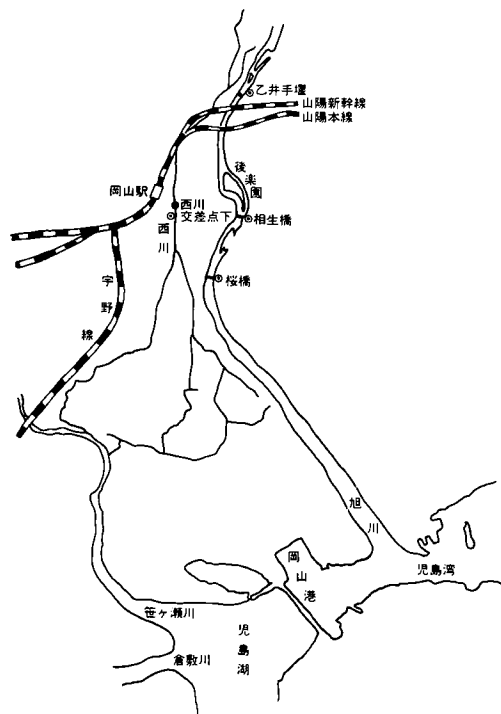


図4 調査地点

表2 腸球菌数と糞便性大腸菌数の河川水からの検出状況:

調査地点	調査年月日 年・月・日	腸球菌数 MPN/100ml	糞便性大腸菌数 MPN/100ml	$\frac{\text{腸球菌数}}{\text{糞便性大腸菌数}}$
乙 井 手 堰	S 56. 6. 22	490	330	1.48
	56. 8. 11	80	80	1.00
	58. 4. 20	170	130	1.31
	58. 5. 19	220	40	5.50
	58. 5. 23	80	20	4.00
	58. 6. 1	130	50	2.60
	58. 6. 6	170	20	8.50
	58. 6. 13	80	20	4.00
	58. 6. 23	230	130	1.77
	58. 6. 28	170	20	8.50
	58. 7. 5	790	40	19.75
	58. 7. 18	1300	140	9.29
58. 7. 19	170	330	0.52	
相 生 橋	S 58. 4. 20	1090	130	8.38
	58. 5. 23	490	230	2.13
	58. 5. 24	130	20	6.50
	58. 5. 30	90	50	1.80
	58. 6. 7	790	230	3.43
	58. 6. 20	1300	230	5.65
	58. 6. 23	330	130	2.54
	58. 6. 28	330	1700	1.94
	58. 7. 5	1300	170	7.65
	58. 7. 11	330	230	1.43
	58. 7. 12	490	340	1.44
	58. 7. 18	790	170	4.65
58. 7. 19	330	130	2.54	
桜 橋	S 56. 2. 16	80	40	2.00
	58. 4. 18	130	50	2.60
	58. 4. 20	220	110	2.00
	58. 4. 26	70	20	3.50
	58. 5. 30	50	50	1.00
	58. 6. 1	80	80	1.00
	58. 6. 6	790	230	3.43
	58. 7. 23	790	140	5.64
	58. 7. 4	130	40	3.25
	58. 7. 18	1410	330	4.27
58. 7. 19	330	230	1.43	
西 川	S 56. 2. 10	700	50	14.00
	56. 3. 7	490	50	9.80
	58. 4. 20	2400	1300	1.85
	58. 4. 25	330	490	0.67
	58. 4. 26	1090	490	2.22
	58. 5. 12	2400	790	3.04
	58. 5. 19	700	790	0.89
	58. 5. 24	790	230	3.43
	58. 6. 6	460	700	0.66
	58. 6. 28	1300	790	1.65
	58. 7. 4	700	490	1.43
	58. 7. 11	170	50	3.40
58. 7. 19	790	1300	0.61	

腸球菌が EC 諸国において、また糞便性大腸菌が EC 諸国および米国でとりあげられている<sup>8,9)</sup>。その他、EC 諸国ではサルモネラ菌、腸内ウィルスも項目として挙げられている。

腸球菌群に入る菌の種類については Hartman ら<sup>10)</sup>の見解をもとに橋本<sup>21)</sup>がまとめている。それによると Enterococcus group に入るのは *St. faecalis*, *St. faecalis subsp. liquefaciens*, *St. faecalis subsp. zymogenes*, *St. faecium*, *St. faecium subsp. durans*, *St. avium* である。糞便中にはこれ以外に Viridans group に属するものとして *St. bovis*, *St. equinus*, *St. mitis*, *St. salivarius* などがあり、前者とともに fecal Streptococci と呼んでいる。しかし Viridans group のものは外界で速やかに死滅することが知られており<sup>12,13)</sup>、汚染指標としての意味は薄い。

糞便性大腸菌は、Eijkman らが Fecali coli Type として提唱したもので比較的高温 (46°C) で発育すると報告したものを基礎にしており、現在では EC 培地や FC 培地を用いて 44.5°C で培養を行ない検出出来るものである。EC 培地 44.5°C で検出される菌としては、1956年の応用細菌学会大腸菌群小委員会が提示した大腸菌群に分類されるものでは *E. coli I*, *E. coli II* の一部 (EC テストの分類では *E. coli IV*), *Kl. aerogenes I* (学名 *Kl. pneumoniae*) の一部 (EC テストの分類では *Kl. aerogenes IV*) などがあり、その他にも培養時間を長くすると生育してくるものがある<sup>14,15)</sup>。

ところで公共用水の糞便汚染指標菌としての条件には次のような条件、(1) 糞便中に大量に存在する菌であり、糞便中以外には存在しない菌である。(2) 水中での生残は消化器系病原菌よりも長く生残するがやがて死滅する。不当に長く生残したり、増殖するものは適さない。(3) 操作が簡便で検出しやすい。) が挙げられるがこれらについて腸球菌と糞便性大腸菌を実験結果から考察した。

1) に関してまず糞便中に大量に存在するということであるが、人糞便中の腸球菌数は糞便性大腸菌数の10倍程度多く存在していた。絶対量では腸球菌・大腸菌は $10^5 \sim 10^8$ 個/g程度存在するといわれる<sup>16)</sup>。糞便中以外には存在しない菌であることに関しては、腸球菌は糞便で汚染さ

表3 BTB アザイドデキストロース培地の組成

ポリペプトン	220g
酵母エキス	5g
ブドウ糖	10g
NaCl	5g
BTB	9.032g
NaN <sub>3</sub>	0.25g
蒸留水	1000ml

pH 7.0

れた水や土壌からのみ検出され、人の生活と無関係な場所からは検出されないといわれており<sup>17,18)</sup>、われわれもそれを確認している<sup>6)</sup>。しかし、Geldreich ら<sup>12)</sup>は腸球菌には昆虫や植物由来のものがあるというが、彼らの調査ではその混入率が10%以下のものが多くさほど大量ではない。このことに関してはわが国での状況をより詳しく検討・追試する必要がある。

2) に関して、糞便水中25°Cで糞便性大腸菌が糞便中に残存する栄養源や嫌気性菌の死滅による栄養源を利用して増殖を示しているが、鈴木<sup>19)</sup>も人工海水中に投入した人糞便中の大腸菌の増殖を認めている。しかし、腸球菌は増殖を示さなかった。さらにメンブランフィルター戸過滅菌水中15°Cで、*E. coli*が河川水中の栄養源と混入した微小の培地成分を利用して増殖をすることが示された。このことに関して、島崎<sup>13)</sup>も滅菌井戸水、滅菌大便加井戸水および海水などで *E. coli* の増殖を認めており、堀江<sup>20)</sup>は、滅菌下水や微小濃度の有機栄養物質を含有した滅菌井戸水中でも *E. coli* の増殖と長い生残を報告している。一方、腸球菌の生残性に関しては消化器系病原菌である *Sal. typhi*, *Sh. sonnei* よりもやや遅く死滅する良好な傾向を示した。しかし逆に Geldreich ら<sup>12)</sup>は腸球菌、糞便性大腸菌、*Sal. typhimurium* などの生残を検討し、腸球菌の死滅が糞便性大腸菌、*Sal. typhimurium* よりも遅いことを問題点としている。彼らの糞便性大腸菌の生残性は図3の蒸留水中における生残性に近いものである。われわれの結果から言えることは、糞便性大腸菌は糞便中や微小濃度の栄養源の混入した水中で増殖することが示され、逆に全く栄養源のない状態ではすみやかに死滅する相反する性質がある。それに比して腸球菌

はいかに富栄養化した河川水中でもその栄養要求性から増殖することはまずないと考えられ、しかも消化器系病原菌よりやや遅い良好な生残性を示した。

3) に関して菌数測定に用いる MPN 法は簡便である。その他の方法としてメンブランフィルター法があるが、これはやや簡便さに劣る<sup>7)</sup>。腸球菌と糞便性大腸菌の MPN 法による測定について比較してみると次のようなことが挙げられる。(a) 器具としては腸球菌測定ではダーラム発酵管が不用であり簡便である。培地については、BTB アザイドデキストロース培地<sup>21,22,23)</sup>は簡単に作製され(表3)、また混合粉末培地として製品化することも可能である、しかも BTB アザイドデキストロース培地は橋本<sup>22)</sup>が述べているように  $\text{NaN}_3$  のすぐれた制菌作用により  $100^\circ\text{C}$ 、30分、1回の常圧滅菌で充分であり、われわれもそれを確認し実用している。(b) 糞便性大腸菌の検出には鈴木が推奨する直接法<sup>15)</sup>(EC培地  $44.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  24時間培養)を用いたが、腸球菌の  $37^\circ\text{C}$  48時間培養に比べて短時間に結果が得られるという利点をもっているが、培養温度の  $44.5^\circ\text{C}$  は特に厳密さを要することが知られている<sup>14,15)</sup>。精度の高い恒温器、蓋付の恒温槽を用い、培養管はなるべく深く没入させ、蓋の開閉も極力さけて、一時的な培養管の温度低下もさげなければいけないなど細心の注意が必要である。これに反して、腸球菌は  $35\sim 37^\circ\text{C}$  であれば少々の誤差はかまわず、普通の孵卵器で事足りる。(c) 検体中に菌数が多く存在することは検出しやすいという点から重要なことである。Litsky ら<sup>24)</sup>は Connecticut 川の調査を行ない、腸球菌数と大腸菌数の相関係数は  $+0.84$  で腸球菌が大腸菌の平均7.6倍存在していたと報告している。われわれが行なった野外調査例を表2に示した。一般河川から検出される腸球菌数と糞便性大腸菌数は相関係数  $+0.71$  で糞便汚染指標菌として両者に相関があり、菌数において腸球菌は糞便性大腸菌よりも平均2.3倍多く存在していた。

以上1)~3)についての考察から、腸球菌は公共用水の糞便汚染指標菌として完全ではないけれども、糞便性大腸菌よりはすぐれていると結

論された。

腸球菌が汚染指標菌として考えられたのは古く、すでに1928年 Mallmann によりプールの汚染指標菌として有用であるとの報告がなされている。その後多くの有用性を支持する報告およびよりよい選択培地の考案・改良もなされ今日に至っている。わが国でも水や食品の汚染指標菌として腸球菌を取り上げることを提案した報告はあるが実現されていない。われわれはぜひとも公共用水の汚染指標菌として腸球菌の導入を提言したい。今後はさらに海域における調査も行ない、また水質確保のための基準設定への検討<sup>6)</sup>もさらに詳しく行ないたいと考えている。

## 要 約

腸球菌および糞便性大腸菌の水質汚染指標性の検討を行ない次のようなことが判明した。

- 人糞便中に腸球菌は糞便性大腸菌の約10倍多く存在していた。
- 糞便水を  $25^\circ\text{C}$  におくと糞便性大腸菌は増殖したが、腸球菌は増殖しなかった。
- メンブランフィルター濾過滅菌河川水中で *E. coli* は微小濃度の栄養源を利用しているものと考えられる増殖を示した。一方、消化器系病原菌 (*Sal. typhi*, *Sh. sonnei*) は4日程度ですみやかに死滅するが、腸球菌はそれよりやや遅く死滅する良好な生残性を示した。
- 野外調査を行ない河川水から腸球菌・糞便性大腸菌の検出を行なった結果、50例による両者の相関係数は  $+0.71$  で糞便汚染指標菌として相関性があることが示され、量的には腸球菌が糞便性大腸菌の2.3倍多く検出された。
- 検査における手技の簡便性を考察すると糞便性大腸菌の検出は培養温度 ( $44.5^\circ\text{C}$ ) の管理がわずらわしく、ルチンとしては不向きであると考えられた。

以上のことから腸球菌は糞便性大腸菌よりも公共用水の汚染指標として有用であると結論された。

## 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, 荻田祥三, 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”研究報告集録集, 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, 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, **95**, 1053—1062, 1983.
7. 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: 公共用水中の腸球菌測定法に関する基礎的検討. 岡山医学会雑誌, **95**, 575—585, 1983.
8. European Communities: Hygiene of bathing water. Council Directive No.76/160/EEC. *Digest Health Legislation* **27**, 709—717, 1976.
9. "Criteria for primary content recreation", Water Quality Criteria, Report of National Technical Advisory Committee to the Secretary of the Interior, 11—14, 1968.
10. Hartman, P.A., Reinbold, G.W. and Saraswat, D.S.: Indicator organisms — A review. Toxonomy of the fecal streptococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 197—221, 1966.
11. 橋本秀夫: レンサ球菌の分類と病原性, 魚病研究, **17**, 1—10, 1982.
12. Geldreich, E.E. and Kenner, B.A.: Concept of fecal streptococci in stream pollution: *J. Water Pollut. Control Fed.* **41**, 335, 1969.
13. 島崎保家: 水における腸球菌. モダンメディア, **16**, 299—306, 1970.
14. 佐々木諭: *Escherichia coli* 検出法としての EC Test, メディアサークル, **47**, 13—18, 1963.
15. 鈴木 昭: *Escherichia coli* 検出法としての EC Test の食品 への応用について, モダンメディア, **11**, 21—36, 1965.
16. 光岡知足: 腸内細菌叢とその意義. 臨床と細菌, **2**, 197—239, 1975.
17. Mallman, W.L. and Litsky, W.F.: Survival of selected enteric organisms in various types of soil. *Am. J. Public Health* **41**, 38—44, 1951.
18. 堀江 進: 飲食品の汚染指標としての腸球菌に関する研究 I. 腸球菌の分布についての観察. 日本水産学会誌, **25**, 294—299, 1959.
19. 鈴木 昭: かきなどにおける大腸菌および大腸菌群について, モダンメディア, **16**, 268—277, 1970.
20. 堀江 進: 飲食品の汚食品の汚染指標としての腸球菌に関する研究 IX. 水, 食品における腸球菌の生存能ならびに発育能. 日本水産学会誌, **26**, 614—622, 1960.
21. 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.
22. 橋本秀夫: 汚染指標菌としての腸球菌について, メディアサークル, **41**, 1—9, 1963.
23. 橋本秀夫: 畜産食品における腸球菌. モダンメディア, **16**, 32—40, 1970.
24. Litsky, W.L., Mallmann, W.L. and Fifield, C.W.: Comparison of the most probable numbers of *Escherichia coli* and enterococci in river waters: *Am. J. Public Health.* **45**, 1049—1053, 1955.

**Studies on the applicability of enterococci and coli-form groups  
as indicators of water pollution**

**Izumi KOUJIMA, Tomohisa KANATANI, Akira KUMODE, Yasuko NODA,  
Akihiro FUKUHARA, Noriko MORI and Yasuhiro KANEMASA**

**Department of Microbiology, Okayama University Medical School Okayama 700, Japan**

**(Director: Prof. Y. Kanemasa)**

The applicability of using enterococci and coli-form groups as indicators of water pollution was assessed. In human feces, enterococci were 10 times more numerous than coli-forms. Suspension of feces in sterile 0.85% NaCl solution at 25°C did not result in enterococci growth. Coli-form groups, however, grew remarkably well. Enterococci were incapable of growth and died in filtration-sterilized river water. On the contrary, coli-form groups demonstrated significant growth. The pathogenic enterobacteria (*Sal. typhi*, *Sh. sonnei*) died within four days, faster than enterococci. A 50-case field sample presented a correlation coefficient of +0.71 between the number of enterococci and coli-form groups. This indicated that enterococci and coli-form groups both serve as indicators of fecal water pollution. Enterococci numbered 2.3 times more than coli-forms. Coli-form group detection was not suitable for routine work, as it requires incubation at 45.5°C. These results indicate that enterococci are applicable for the indication of water pollution and more available than coli-form groups.