

水の従属栄養細菌試験における培地並びに培養条件の検討

保坂三継*, 眞木俊夫*

Examination of Media and Culture Condition for Enumeration of Heterotrophic Bacteria in Water Samples

Mitsugu HOSAKA* and Toshio MAKI*

Keywords: 従属栄養細菌 heterotrophic bacteria, PGY寒天培地 PGY agar, R2A寒天培地 R2A agar, 標準寒天培地 plate count agar, 一般細菌 standard plate count bacteria

緒言

水中の細菌数を知るために一般細菌の試験がしばしば行われる。一般細菌とは、その試験方法から、標準寒天培地を用いて 36 ± 1 、 24 ± 2 時間培養したとき、培地に集落を形成する細菌と定義される¹⁾。すなわち、好気性あるいは通性嫌気性で従属栄養で発育する細菌のうち、温血動物の体温前後の温度下で高濃度に有機物を含む培地に短時間のうちに速やかにコロニーを形成することができる性質を備えた一部のグループを指し、腸内細菌や食品等の腐敗細菌など下水性の細菌にこうした性状のものが多い²⁾。その一方、水中には自然の水環境を本来の生息場所としている多数の従属栄養型の細菌が存在する。自然の水中には栄養源となる有機物量が非常に少なく、また水温も通常は温血動物の体温よりも低い。そのため、こうした環境を本来の生息環境とする細菌の大部分は、低濃度の有機物を利用して生活するように適応しており³⁾、かつ中温性である⁴⁾。これらの細菌群は、各種の水質試験方法⁵⁻⁹⁾において従属栄養細菌と称されている。従属栄養細菌は、自然環境中では有機物の分解やバイオフィルムの形成による微小環境の成立等を通じて、物質循環の過程に密接に関係している。利水の観点からは、消毒処理によって一般細菌が不検出であっても、それよりも遙かに数の多い従属栄養細菌の一部が生残している場合がしばしばあるため、消毒の効果判定に利用される。また、受水槽や高置水槽あるいは給配水系統での残留塩素の消失や水の長期滞留に伴う細菌の再増殖、スライム形成などの水質障害を引き起こす原因となる。そのため、大腸菌群や一般細菌のような、腸管病原微生物の指標とは異なった観点からの微生物的水質指標として試験の意義が認められてきている。

従属栄養細菌については寒天平板培養による試験方法が一般に行われているが、わが国では水の各分野の試験方法⁵⁻⁸⁾でいくつかの異なった方法が採用されており、統一されていない。世界的にも利用される米国の標準試験方法

Standard Methods⁹⁾でも、Heterotrophic Plate Countの名称の試験方法のなかに、わが国で言う一般細菌と従属栄養細菌にほぼ相当する試験方法が混在しており、採用する方法によって結果は全く異なったものとなる可能性がある。

このような状況の下で、今般、日本工業規格(JIS)として新たに水の従属栄養細菌の試験方法を策定することとなり、その基礎資料とするため、わが国で行われている従属栄養細菌の試験方法について検討したので、その結果を報告する。

材料及び方法

1. 試料水

広範な汚濁レベルの水について検討するため、汚濁の進んだ水として、都内下水処理場で活性汚泥処理/最終沈殿処理された処理水を砂ろ過した水(以下、下水処理水)を用いた。中程度の汚濁水としては、1,000CFU/mL以上の一般細菌が検出された受水槽の水(以下、タンク水)を用いた。さらに汚染の最も少ない水として当所実験室内の給水栓で採取した水道水(以下、給水栓水)を用いた。

2. 従属栄養細菌の培養条件

既存の各種水質試験方法における従属栄養細菌の試験は、表1に示す培地及び培養方法によって行うこととなっている。これをもとに、以下のような条件を設定した。

1) 培地 表1に示した各種試験方法のうち2つ以上の試験方法で採用されている培地として、標準寒天培地(JIS K0101, Standard Methods)、PGY寒天培地(上水試験方法、下水試験方法、衛生試験法・注解)及びR2A寒天培地(上水試験方法、Standard Methods)を選択した。これらの培地の組成を表2に示す。なお、Standard Methodsに示されているPlate count agarは標準寒天培地と同一組成であるので標準寒天培地として扱った。

2) 培養温度 20あるいは25を指定しているものと20~28の範囲を指定しているものが半々であるので、

* 東京都立衛生研究所環境保健部水質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

表1 既存の各種水質試験方法における従属栄養細菌試験方法

試験方法	培地	温度	培養日数
上水試験方法 ⁵⁾	PGY寒天培地	20±1	7日間
	R2A寒天培地	20~28	5~7日間
下水試験方法 ⁶⁾	PGY寒天培地	25	7日間
	CGY寒天培地	25	7日間
衛生試験法・注解 ⁷⁾	PGY寒天培地	20~25	5~7日間
JIS K0101*	標準寒天培地	25±1	5日間
Standard Methods**	Plate count agar	35 , 2日間 又は 20~28 , 5~7日間	
	R2A agar		
	NWRI agar		
	m-HPC agar		

* 工業用水試験方法⁸⁾** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters⁹⁾

表2 培地組成

	標準寒天培地	PGY寒天培地	R2A寒天培地
ペプトン*	5 g	2 g	
プロテースペプトン No.3 (又はポリペプトン)			0.5 g
カザミノ酸			0.5 g
粉末酵母エキス	2.5 g	1 g	0.5 g
ブドウ糖	1 g	0.5 g	0.5 g
溶性でんぷん			0.5 g
リン酸一水素カリウム			0.3 g
硫酸マグネシウム(7水塩)			0.05 g
ピルビン酸ナトリウム			0.3 g
寒天	15 g	15 g	15 g
精製水	1,000 mL	1,000 mL	1,000 mL
pH	7.0±0.1	7.0±0.1	7.2±0.1

*カゼインのパンクレアチン消化ペプトン(Tryptone, Trypticase など)

25 , 30 とし、さらに一般細菌との比較のために37 を加えた4段階で培養した。

3. 培養方法

1) 試料の調整と接種 下水処理水とタンク水ではリン酸緩衝希釈水⁵⁾で適当な段階まで10倍段階希釈を行い、それぞれの希釈段階の希釈試料水1 mLを用いて上記の3種類の各培地で混釈して平板に固めた。給水栓水については、接種水量を1 mL, 10 mL及び100 mL相当として混釈した。この際、接種水量10 mLでは試料水10 mLと2倍濃度の各培地10 mLを混釈した。また接種水量100 mL相当では、滅菌した孔径0.2 µmのポリカーボネート製メンブランフィルター(CORNING製)で試料水5,000 mLをろ過し、次いで、このフィルターを50 mLのリン酸塩緩衝希釈水中でポルテックスミキサーにより振盪洗浄し、フィルターに捕捉された菌体を洗い出して得た100倍濃縮液の1 mLを用いて各培地と混釈した。

2) 培養と計数 3種類の培地で混釈した平板を上記4段階の各温度で培養した。特に記する場合を除いて、培養開始から1~3日目及び6~8日目にコロニー数を計数し、シャーレ1枚につき30~300コロニーが出現した希釈段階の計数値の平均値を用いて1 mL当たりのコロニー数を算出した。なお、最大接種水量でも出現コロニー数が30個未満の場合はその最大水量での値を用いて計算した。

結果と考察

1. 各試料水の培養結果

1) 下水処理水 すべての培地と培養温度で培養開始1日目から多くのコロニーが出現した。特に25 と30 のPGY寒天培地とR2A寒天培地では、標準寒天培地で37 , 1日培養した一般細菌(6,000 CFU/mL)に比べて約7~8倍のコロニー(39,000~47,000 CFU/mL)が出現した。

コロニー数の増加は培養3日目まで盛んであったが、6日目以降は顕著な増加は見られなかった(図1)。

2) タンク水 1日目のコロニー数は、25 以下の温度では標準寒天培地を用いた場合(230~270 CFU/mL)にPGY寒天培地とR2A寒天培地(1~33 CFU/mL)よりも多かったが、30 以上ではPGY寒天培地とR2A寒天培地(2,700~6,300 CFU/mL)の方が標準寒天培地(1,900~2,500 CFU/mL)よりもコロニー数が多かった。

コロニー数の増加は、標準寒天培地では20 , 25 , 37 では培養3日目まで盛んで、その後は顕著な増加を示さなかったが、30 では6日目まで増加が続いた。いずれの温度でも7日目には増加はほとんど停止した。PGY寒天培地の場合、37 では培養3日目まで盛んでその後は顕著な増加はほとんどなかったが、25 と30 では6日目まで増加が続いた。さらに、20 では8日目をすぎてもなおコロニー数の緩やかな増加が続き、13日目以降に至ってようやく停止した。R2A寒天培地でもほぼ同様なパターンとなり、25~37 では6日目までコロニー数の増加が続き、7日目には増加はほとんど停止したが、20 では13日目まで増加が続いた(図2)。

3) 給水栓水 培養開始1日目ではすべての培地と温度で接種水量1 mLの培養ではコロニーは出現しなかった(図3)。すなわち、通常、試料水1 mLを混釈する方法で行われる一般細菌数としては不検出だったが、接種水量10 mL及び100 mL相当ではコロニーが出現した。いずれの培地でも25 以上で出現コロニー数が多く、20 での出現コロニー数(0.0033~0.01 CFU/mL)に比べて約10倍(0.1 CFU/mL, 標準寒天培地, 25)から約120倍(0.39 CFU/mL, R2A寒天培地, 37)出現した。

コロニー数は、30 以上では培養6日目にはほぼ定常に近くなったが、25 では7~8日目に定常となった。20 ではPGY寒天培地とR2A寒天培地で9~10日目になってもわずかながら増加傾向にあった(図3)。

2. 培地による影響

従属栄養細菌の大部分は、本来、低濃度の有機物環境に

適応したものであり、標準寒天培地のような比較的高濃度に有機物を含む培地よりも、有機物濃度の低い組成の培地により高い計数値が得られることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。上水試験方法等で用いられているPGY寒天培地は元来そうした観点から処方された培地¹³⁾であり、成分としては標準寒天培地と同様であるが、その濃度は標準寒天培地の約4割程度となっている。R2A寒天培地も比較的多成分を含

むが低濃度に処方されている⁹⁾。今回の実験でも、標準寒天培地ではPGY寒天培地やR2A寒天培地に比べて、すべての温度条件で出現コロニー数が少なかった。特に下水処理水やタンク水の場合は、25と30の培養日数8日目のコロニー数で比較するとおよそ3倍から6倍の差がみられた(表3)。このことは、水の種類によっては培養温度を下げ、長期間の培養を行った場合でも、標準寒天培地ではコロニ

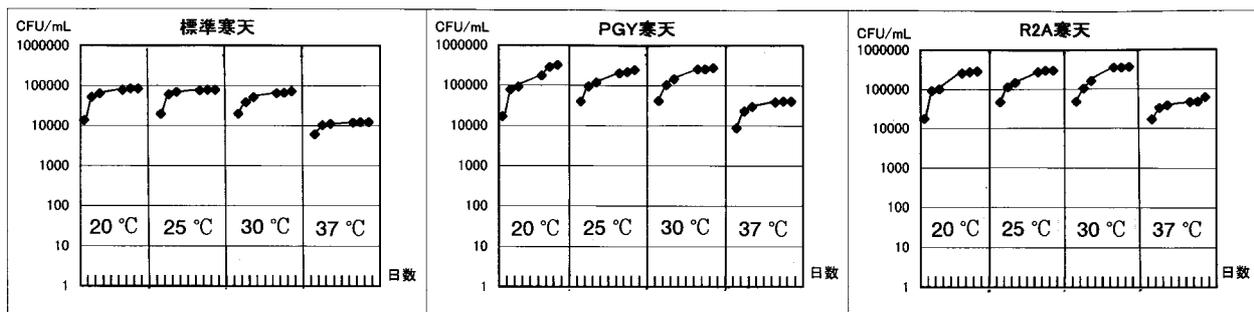


図1 下水処理水による培養結果

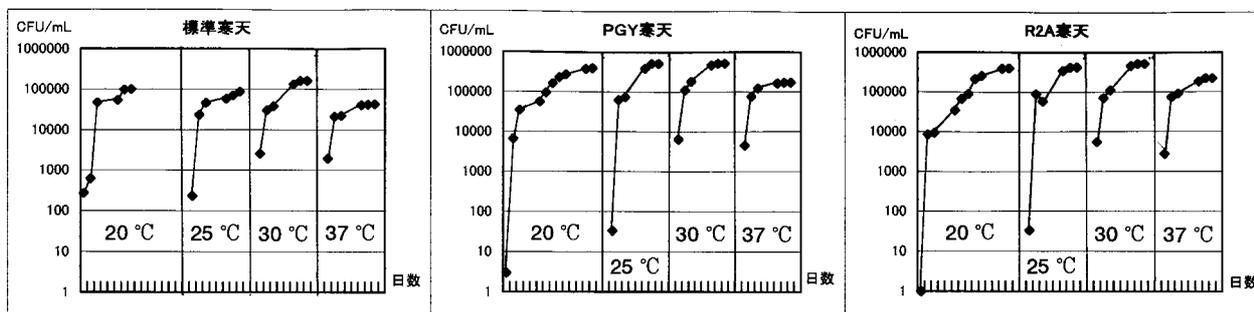


図2 タンク水による培養結果

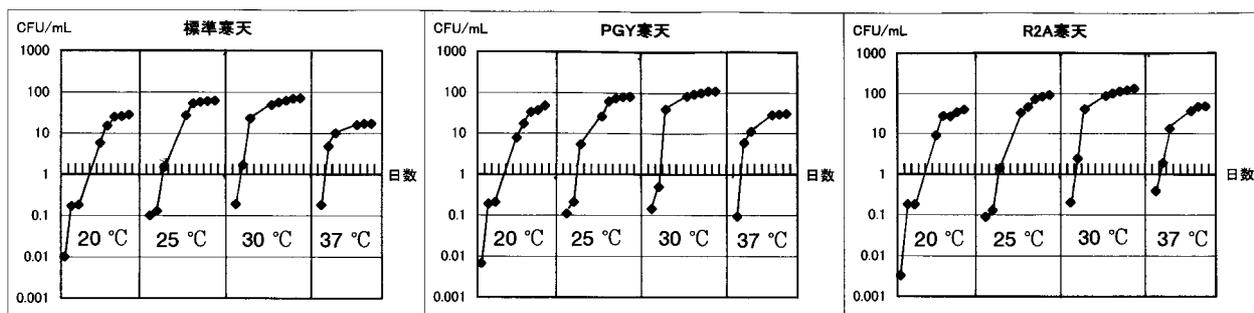


図3 給水栓水による培養結果

表3 標準寒天培地と他の培地における出現コロニー数の比較

培養温度	出現コロニー数の比 ^{*1}								
	下水処理水			タンク水			給水栓水		
	標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}	標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}	標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}
20	1	3.9	3.5	1	1.6	0.9	1	1.3	1.0
25	1	3.2	3.9	1	6.0	4.9	1	1.3	1.2
30	1	3.8	5.2	1	3.3	3.3	1	1.6	1.8
37	1	3.4	5.0	1	4.0	5.2	1	1.7	2.8

*1 培養8日目の各試料水、各温度ごとの標準寒天培地による出現コロニー数を1としたときの他の培地による出現コロニー数の割合

*2 標準寒天培地

*3 PGY寒天培地

*4 R2A寒天培地

一を形成できない従属栄養細菌が相当の割合で存在することを示している。したがって、従属栄養細菌の検出には標準寒天培地よりもPGY寒天培地あるいはR2A寒天培地が優れていることが確認された。

3. 温度による影響

従属栄養細菌の培養には37よりも低い温度が適していることが知られており、表1にあるように、現行の各種試験方法でも様々な温度が採用されているが、これまで検討例に乏しい³⁾。

今回の実験でも、水や培地の種類に係わらず、8日間培養後のコロニー数は、25～30の温度で培養した場合、37でのコロニー数を常に上回っていた(表4)。その倍率は水の種類によって異なり、下水処理水では約5～7倍、タンク水と給水栓水では約2～4倍であった。このことは、水の種類、すなわち水中の従属栄養細菌叢の由来によって若干の差があるものの、ヒトの体温よりも低い温度環境である水中に適応している従属栄養細菌は、37の下では長期間培養してもコロニー形成できないものが大半であることを示している。しかし、20では下水処理水の場合には37よりも多いコロニー数が出現したが、タンク水と給水栓水のR2A寒天培地では37よりも少ないコロニー数となった。すなわち、用いる培地と試験対象となる水の種類によっては20での培養が必ずしも良好な結果を与えない可能性がある。これらのことから、従属栄養細菌の培養温度としては25～30が適していることが示された。しかし現行の試験方法で28を越える培養温度を採用しているものがないことや25を指定している既存試験方法との整合を考えると、現段階では培養温度としては25を選択するのが妥当と考えられた。30での培養については、今回の実験で従属栄養細菌の計数に好適である可能性が強く示唆されたので、今後さらに検討する必要がある。

4. 培養日数による影響

平田ら¹⁰⁾はPGY寒天培地よりもさらに低濃度の有機物の培地(1/10濃度の標準寒天培地)でより長期間(10～14日間)培養した方がより多くのコロニー数が得られることを報告している。しかし、培養期間が長期化すると、培地の乾燥や真菌の発生など、コロニー計数に支障が生じる恐れがある⁴⁾。また微生物生態学的な調査研究として行う場

合は別として、水の性状を知るための水質試験の一環として従属栄養細菌の試験を行うのであれば、なるべく短期間に結果が得られることが望ましい。

今回の実験では、ほとんどの培養で7日間ないし8日間の培養でコロニー数が定常に達した(図1, 2, 3)。例外的に、タンク水や給水栓水を用い、PGY寒天培地とR2A寒天培地で20培養を行った場合、8日目以降もコロニー数が増加しつづけ、特にタンク水ではおよそ2週間後の培養で最大のコロニー数が得られた(図2)。このことは、20という培養温度では試料によってはより長期間の培養が必要であるようにも受け取れる。しかし、この時の最終コロニー数は、同培地による25及び30培養で得られたコロニー数に及ばなかった。すなわち、培養温度を25ないし30に設定すれば、7～8日間の培養で十分であり、且つより多くのコロニー数を検出することができる。

7日ないし8日の培養の必要性について、最終的な出現コロニー数の評価の観点から検討してみる。水中の従属栄養細菌の出現頻度分布が対数正規分布であると仮定したとき、最終コロニー数に対する許容誤差を10%すなわち0.1とするための、測定コロニー数の最終コロニー数に対する比は0.79である¹⁰⁾。今回の実験では、8日目のコロニー数に対する7日目のコロニー数の比は、3種類の試料水のすべての培養条件の組み合わせ(36通り)のうち83%がこの値を上回っていた。さらに従属栄養細菌の培養条件として適当であることが示されたPGY寒天培地とR2A寒天培地による25～30の培養では92%がこれを上回っていた(表5)。すなわち、PGY寒天培地あるいはR2A寒天培地を用いて25～30で培養し、7日目のコロニー数を計数すれば、9割以上の培養で最大コロニー数との差が10%以下となり、実質的に最大コロニー数と同等の結果が得られることが示された。さらに、検査作業の実務上の条件として作業可能日数を考慮した場合、週休2日を前提とすると、1週間のうちの検査実施可能日数は8日間培養の場合は4日であるが、7日間培養では平日の毎日、検査の実施が可能である。一方、現行の試験方法には培養期間を5日間と指定したり、あるいは5～7日間のような範囲を指定している試験方法もある^{5, 7, 9)}。しかし、今回の実験から6日目のコロニー数でも8日目のコロニー数との差が10%を越え

表4 37 と他の培養温度における出現コロニー数の比較

培養温度	出現コロニー数の比 ^{*1}								
	下水処理水			タンク水			給水栓水		
	標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}	標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}	標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}
20	6.8	7.8	4.7	2.3	0.9	0.4	1.5	1.1	0.6
25	6.4	6.1	5.0	2.0	3.1	1.9	3.4	2.5	1.5
30	5.9	6.6	6.2	3.8	3.1	2.4	3.6	3.3	2.3
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*1 培養8日目の各試料水、各培地ごとの37における出現コロニー数を1としたときの他の培養温度における出現コロニー数の割合

*2, *3, *4 表3参照

表5 培養8日目を基準とした培養日数と出現コロニー数の比較

培養温度	日数	出現コロニー数の比 ^{*1}								
		下水処理水			タンク水			給水栓水		
		標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}	標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}	標準 ^{*2}	PGY ^{*3}	R2A ^{*4}
20	6	0.93	0.53	0.89	0.55	0.34	0.38	0.23	0.24	0.34
	7	0.99	0.91	0.96	0.98	0.59	0.75	0.60	0.52	1.04
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	6	0.98	0.82	0.92	0.67	0.75	0.81	0.47	0.35	0.45
	7	1.00	0.88	1.00	0.81	0.98	0.98	0.93	0.82	0.63
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	6	0.89	0.93	0.95	0.81	0.90	0.88	0.80	0.84	0.77
	7	0.92	0.94	0.95	1.00	0.98	1.00	0.92	0.93	0.91
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	6	0.98	0.94	0.75	0.95	0.94	0.82	0.94	0.93	0.63
	7	1.00	0.98	0.77	0.98	1.00	1.00	1.00	0.97	0.98
	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*1 各試料水, 各培地, 各温度における培養8日目の出現コロニー数を1としたときの他の培養日数における出現コロニー数の割合

*2, *3, *4 表3参照

るものが4割以上あり, これよりも短い5日間の培養では10%を越えるものが大半となることは明らかである。さらに実務的な問題として, 5日間培養では1週間のうち3日, また6日間培養では4日しか試験が実施できない。以上のことから, 培養日数としては, 現行の多くの試験方法で採用されている7日間の培養を採用することが合理的であると判断される。

結 論

従属栄養細菌の計数に及ぼす培地や培養温度, 培養期間等の影響について, わが国で通常行われる試験方法を参考に比較検討した。その結果, PGY寒天培地とR2A寒天培地が, 広い範囲の水質の水に適用できる従属栄養細菌計数用の培地として適していると考えられた。また25~30の培養で常に良好な結果が得られることから, 既存試験方法との整合を考慮して培養温度としては25が選択された。さらに, 上記の培地と温度による培養を行った場合, 7日間の培養で最終コロニー数と同等の値が得られることが判明した。また実務的にも培養期間を7日とすることで合理的に検査日程を組むことが可能であり, 最も好ましいと考えられた。

以上のことから, PGY寒天培地又はR2A寒天培地を用い, 25で7日間培養する方法が, 下水処理水から水道水までの広範囲な水試料の従属栄養細菌試験方法として最も適していると結論した。またこの結果を以て, JIS規格における新たな従属栄養細菌試験方法として提案した。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局水道環境部長通知(平成4年12月21日付衛水第264号)別表1
- 2) 上野英世: 水, 25(2), 35-37, 1983.
- 3) 倉芳太郎, 石田祐三郎, 小田国雄, 飯田才一: 日本水産学会誌, 47(6), 769-775, 1981.
- 4) 上水試験方法解説編1993年版, 562-566, 1993, (社)日本水道協会, 東京.
- 5) 厚生省生活衛生局水道環境部監修: 上水試験方法1993年版, 453-485, 1993, (社)日本水道協会, 東京.
- 6) 建設省都市局下水道部・厚生省生活衛生局水道環境部監修: 下水試験方法(上巻)1997年版, 604-605, 1997, (社)日本下水道協会, 東京.
- 7) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解2000, 954-955, 2000, 金原出版株式会社, 東京.
- 8) JIS K0101 工業用水試験方法, 291-292, 1998, 日本規格協会, 東京.
- 9) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, 9-34-9-41, 2000, APHA, AWWA and WEF.
- 10) 平田強, 秋山和義, 田口勝久: 水道協会雑誌, 54(10), 11-16, 1985.
- 11) 倉芳太郎, 小田国雄, 飯田才一: 日本水産学会誌, 47(2), 183-89, 1981.
- 12) 倉芳太郎, 石田祐三郎, 門田元: 汚濁河川における好気性従属栄養細菌の動態, 微生物生態研究会編, 微生物の生態11, 3-14, 1983, 学会出版センター, 東京.
- 13) 桜井善雄: 日本水処理生物学会誌, 7(2), 21-27, 1971.