



Title	汚染指標細菌の消毒剤耐性について
Author(s)	芦立, 徳厚
Description	第10回衛生工学シンポジウム（平成14年10月31日（木）-11月1日（金） 北海道大学学術交流会館） . 1 水処理 . 1-6
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 10, 21-24
Issue Date	2002-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7091
Type	departmental bulletin paper
File Information	10-1-6_p21-24.pdf



芦 立 徳 厚 (函館工業高専環境都市工学科)

1. はじめに

塩素消毒は、水の微生物的安全性を確保し、水系感染症の発生または流行の防止に大きな役割を果たしており、水処理システムにおいて、必須プロセスとされているが、最近塩素に耐性のある病原微生物（細菌、ウイルス、原虫等）の存在が明らかになり問題となっている。これらが確実に死滅しなければ水系感染症が広まる恐れが出てくる。そのためにはこれら病原微生物の存否を示唆する指標細菌が必要となるが、その指標細菌は当然塩素消毒に対して、病原微生物と同程度かそれ以上の耐性を持ったものでなければならない。

著者は、この問題の糸口をつかむために、塩素添加前後の腸内細菌の分類を腸内細菌分類システム（API20E）によって行い、塩素添加前には大部分を占めていた *Escherichia coli* が添加後は全く検出されず、*Klebsiella oxytoca* 等の *Klebsiella* 属が多く検出されたという結果を得ている¹⁾。しかし、その時の実験のように流入下水を試料として用いる場合、細菌個々が全て分散して存在しているとは限らず、集塊を形成したり、夾雑物の内部に潜んでいたりして本来塩素耐性の無い細菌が生き残る可能性がある。その危険性を避けるためには、1次消毒で生き残った細菌のコロニーを集菌してその細菌群にたいして2次消毒をする必要がある。

本研究は、上記のことを考慮して、下水処理場から採取した流入下水に塩素を添加して、残存した細菌を塩素耐性細菌としその分類同定を行ったものである。

2. 研究方法

2.1 実験方法

- ① 試料は函館市南部下水処理場の流入下水を粗ろ過し、リン酸緩衝希釈水で10倍に希釈して使用した。
- ② 塩素は、食品添加物の次亜塩素酸ナトリウムを希釈して使用した。
- ③ 指標細菌検出には、*m-Endo* 培地（大腸菌群を検出）*m-Kleb* 培地（*Klebsiella* を検出）を用いた。
- ④ 細菌の分類同定は、bioMerieux社の自動細菌検査装置 ATB Expression を用いた。分類同定のフローシートを図-1に示した。

2.2 実験手順

- ① 先に述べた処理をした試料 200 ml を共栓三角フラスコに入れ、次亜塩素酸ナトリウムを塩素にして 1.0 ppm になるように添加した。20℃で60分間静置した後、3%チオ硫酸ナトリウム溶液を加えて塩素を分解した [第1次消毒実験]
- ② 消毒前と消毒後の試料を適宜希釈し、*m-Endo*

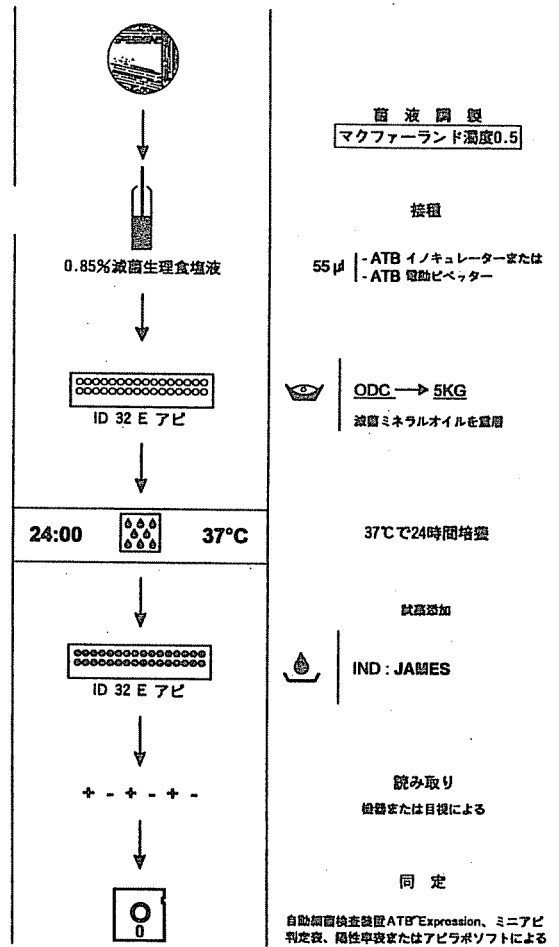


図-1 分類同定の手順

培地及び *m-Kleb* 培地で培養した。

(35°C、24 hr)

- ③ 両培地に出現したコロニーのうち代表的なものを釣菌し、⑤以下の操作を行って分類同定を行った。
- ④ 両培地上に出現した全てのコロニー(③のコロニーを含む)を釣菌し、リン酸緩衝希釈水に懸濁する。これをよく攪拌して2次消毒対象試料とした。
- ⑤ ①～③と同じ操作を繰り返す。

[第2次消毒実験]

- ⑥ 出現したコロニーを釣菌し、純菌株を得るために、EMB 培地上に画線し 35°C、24 hr 培養した。
- ⑦ EMB 培地上の分離独立したコロニーを釣菌し、斜面寒天培地で 35°C 24 hr 増菌培養した。
- ⑧ 増殖したコロニーを釣菌し、0.85% 滅菌生理食塩水 2 ml に懸濁させて、マクファーランド濁度が 0.5 となるよう菌液を調整した。
- ⑨ ⑦の菌液を ID32E API プレート上のマイクロカップに 55 μ l ずつ分注し 37°C、24hr 培養した。

- ⑩ API プレートを自動細菌検査装置 ATB Expression にかき、細菌の菌種をコンピュータ判定する。(ID32E API の生化学テスト項目は巻末に示す)

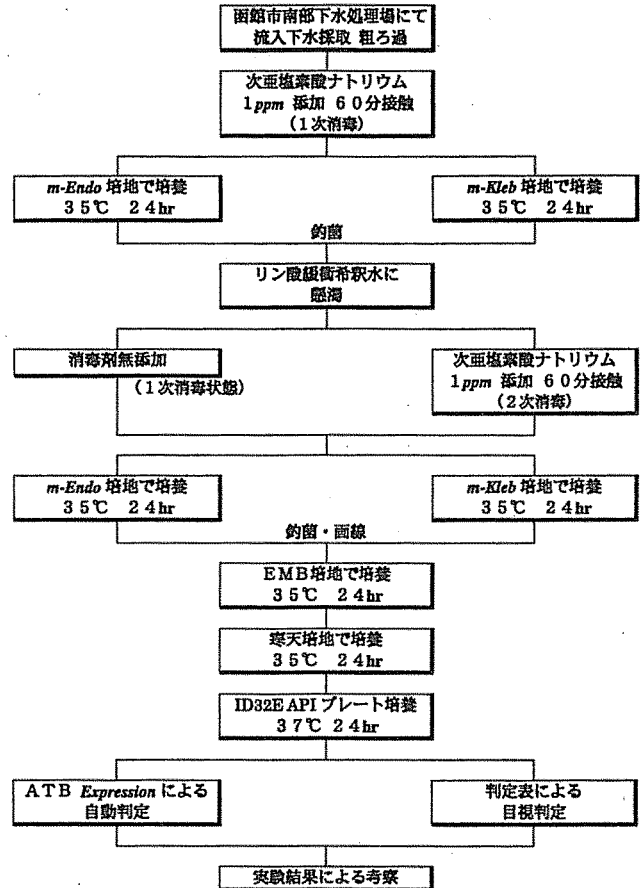


図-2 消毒実験の手順

3. 実験結果と考察

下水処理場流入下水を10倍に希釈した試水に塩素 1ppm を加えた前後の大腸菌群と *Klebsiella* の細菌数を図-3に示した。

大腸菌群と *Klebsiella* の生存率はそれぞれ 0.10%、0.052%となり、大腸菌群の方が *Klebsiella* より生存率が上回った。大腸菌群を検出するために用いている *m-Endo* 培地で検出される細菌群の中に *Klebsiella* も含まれるので、この結果は

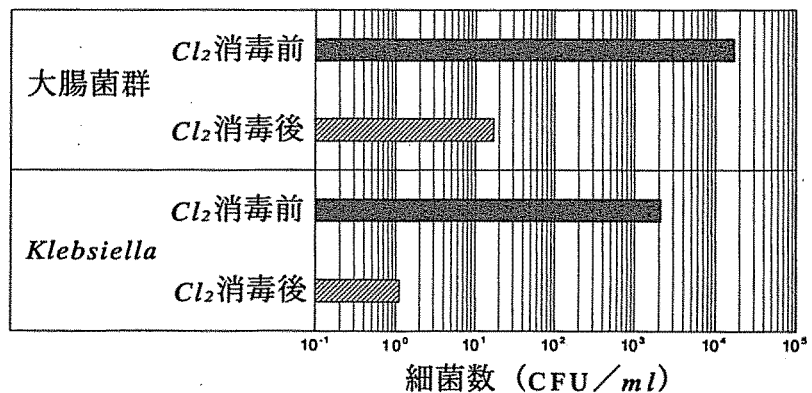


図-3 塩素消毒前後の細菌数

Klebsiella より塩素耐性のある菌種が大腸菌群に含まれていることを示唆している。

第1次、第2次消毒後、*m-Kleb* 培地と *m-Endo* 培地に出現したコロニーを分類同定した結果を表-1、表-2に示した。消毒を2次にわたって行う理由は冒頭に述べたとおりであるが、以下の結果は、塩素耐性菌を絞り込む効果ももたらしたといえよう。

表-1に *m-Kleb* 培地上のコロニーの分類同定結果を示した。表からも明かなように、第1次、第2次消毒後に生き残った菌種は全く同一で菌株数の割合もほぼ同一であった。特に、*Klebsiella planticola* は第1次、第2次とも大きな割合で出現したことから、塩素にきわめて耐性のある菌種と考えられる。

表-1に *m-Endo* 培地上のコロニーの分類同定結果を示した。第1次消毒後に検出された菌種は6種、第2次消毒後に検出された菌種は5種で同一の菌種は2種のみであった。

第1次消毒後に、塩素消毒に弱いと考えられている *Escherichia coli* が最も多く検出されたこ

とは、冒頭に述べた第1次消毒の試料では、細菌が集塊を形成したり、夾雑物の内部に潜んでいたりして本来塩素耐性の無い細菌が生き残った可能性が推測される。ただ、第2次消毒後も *Escherichia coli* が2株検出されたことは、*Escherichia coli* にも塩素耐性のある血清型があることを示唆している。*Klebsiella planticola* は4株検出され、*m-Kleb* 培地の結果と一致する結果となった。*Enterobacter cloacae* は最も多く検出され、当節冒頭に述べた、大腸菌群の中に存在すると予測された *Klebsiella* を上回る塩素耐性菌種は当菌種である可能性が高い。

本実験で、*Klebsiella planticola* や *Enterobacter cloacae* の塩素耐性が明らかになったが、あくまでも塩素1ppm添加の結果にすぎない。より強い塩素耐性を持った指標細菌の追及が今後の課題である。

参考文献 1) 芦生徳厚：塩素代替消毒法の消毒効果とその指標細菌について、第2回衛生工学シンポジウム（1994）

2) APHA,AWWA and WEF:Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20thEd.(1998)

表-1 分類同定結果 (*m-Kleb* 培地)

第1次消毒後	菌株数
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	3
<i>Klebsiella planticola</i>	11
<i>Klebsiella terrigena</i>	1
第2次消毒後	菌株数
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>	5
<i>Klebsiella planticola</i>	9
<i>Klebsiella terrigena</i>	1

表-2 分類同定結果 (*m-Endo* 培地)

第1次消毒後	菌株数
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	2
<i>Klebsiella planticola</i>	4
<i>Klebsiella terrigena</i>	2
<i>Enterobacter asburiae</i>	1
<i>Salmonella arizonae</i>	1
第2次消毒後	菌株数
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Klebsiella planticola</i>	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	7
<i>Citrobacter freundii group</i>	1
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1

※ ID32E API の生化学テスト項目

カップ No.	テスト 項目	基 質	反応/酵素	成 績	
				陽 性	陰 性
1.0	ODC	L-オルニチン-塩酸塩	オルニチン デ カルボ キシラゼ	赤色 / オレン ジ色	黄色 / 黄色 - オレンジ色
1.1	ADH	L-アルギニン-塩酸塩	アルギニン ジヒド ローゼ		
1.2	LDC	塩酸リジン	リジン デ カルボ キシラゼ	青色 - 紫色	黄色 - 緑色
1.3	URE	尿素	ウリアゼ	ピンク - 紫色	黄色 / 黄色 -
1.4	LARL	L-アラビトール	酸性化	黄色 / 緑色 - 黄色	青色 / 青色 - 緑色
1.5	GAT	D-ガラクトン酸	酸性化		
1.6	SKG	5-ケトグルコン酸カリウム	酸性化		
1.7	LIP	リッポン酸-5-アミノインドキシル	リッポン -ゼ	青色	無色
1.8	RP	ピルピルン酸ナトリウム	酸性化	黄色	赤色 / オレンジ色
1.9	β GLU	p-ニトロフェニル- β -D-グルコシド	β -グルコシターゼ	黄色	無色
1.A	MAN	D-マンニトール	酸性化	黄色 / 緑色 - 黄色	青色 / 青色 - 緑色
1.B	MAL	D-マルトース	酸性化		
1.C	ADO	アドニット	酸性化		
1.D	PLE	パラチノース	酸性化		
1.E	β GUR	p-ニトロフェニル- β -D-グルクロシド	β -グルクロシターゼ	黄色	無色
1.F	MNT	マロン酸ナトリウム	炭素源利用性	青色 - 緑色 / 青色	黄色 / 淡い緑色
0.0	IND	L-トリプトファン	インドール産生	James 試薬 1 滴 / 直後に読み取り ピンク色 / 赤 色 無色 / 黄色 / ベージュ色	
0.1	β NAG	5-アミノ-4-クロロ-3-インドキシル	N-アセチル- β -グルコサミナーゼ	青色	無色
0.2	β GAL	p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラ	β -ガラクトシターゼ	黄色	無色
0.3	GLU	ブドウ糖	酸性化	黄色 / 緑色 - 黄色	青色 / 青色 - 緑色
0.4	SAC	白糖	酸性化		
0.5	LARA	L-アラビノース	酸性化		
0.6	DARL	D-アラビトール	酸性化		
0.7	α GLU	p-ニトロフェニル- α -D-グルコシド	α -グルコシターゼ	黄色	無色
0.8	α GAL	p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラ	α -ガラクトシターゼ		
0.9	TRE	トレハロース	酸性化	黄色 / 緑色 - 黄色	青色 / 青色 - 緑色
0.A	RHA	L-ラムノース	酸性化		
0.B	INO	イノシトール	酸性化		
0.C	CEL	D-セロビオース	酸性化		
0.D	SOR	D-ソリビトール	酸性化		
0.E	α MAL	p-ニトロフェニル- α -D-マルトサイト	α -マルトシターゼ	黄色	無色 / ごく淡 い黄色
0.F	AspA	L-アスパラギン-4-ニトロアニリド	L-アスパラギン酸アリアルアミターゼ	黄色	無色 / ごく淡 い黄色