



Title	消毒効果判定における被ストレス細菌の評価について
Author(s)	芦立, 徳厚
Description	第3回衛生工学シンポジウム（平成7年11月9日（木）-10日（金） 北海道大学学術交流会館） . 2 測定・評価 . 2-3
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 3, 101-106
Issue Date	1995-11-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/7891
Type	departmental bulletin paper
File Information	3-2-3_p101-106.pdf



2-3

消毒効果判定における被ストレス細菌の評価について

函館工業高専環境都市工学科

芦立 徳厚

1. はじめに

塩素消毒はもちろん、その問題点を解決すべく検討されている各種の代替消毒法においても、消毒に対して耐性の高い病原体（ウイルス、原虫等）が確実に死滅しているか否かを明示できる指標細菌が求められている。著者はこれに適う指標細菌として R2A培地を用いた有機栄養細菌をあげ、一般細菌もそれに代わりうることを明らかにしている。しかし、病原体の多くは腸内から排泄されているので、腸内細菌のなかで消毒耐性の高い指標細菌があればより望ましいことになる。これに適う可能性のあるものとして、被ストレス細菌を含めて検出する指標細菌試験法があげられる。まず、被ストレス細菌とは何かを次節で述べる。

2. 被ストレス細菌

被ストレス細菌(stressed bacteria)とは、様々な物理的・化学的条件によって圧迫を受けたり損傷したりしている細菌で未だ死には至っていない細菌をさしている。普通の培養条件では、細胞組織や新陳代謝系の損傷によって成長や、コロニーを形成することはできないため、存在している細菌の10%から多いときは90%も検出されないこともあるといわれている。その結果、指標細菌が不検出ないしは基準値以下となって、病原生物の存在を見逃す場合も生じてくる。

被ストレス細菌は、塩素消毒済みの水道水、下水処理水、鹹水、被汚染環境水、比較的きれいな表流水等様々な水に存在している。正常な細菌が被ストレス細菌になる原因としては、消毒操作、重金属イオンや毒性物質の存在に加えて、細菌の生息には不適當な水温、pH、太陽光などが考えられている。

これらの環境下では、病原細菌も同様に損傷を受ける。損傷後の病原細菌の毒力は一時的に減少あるいは消失するが、生息環境が好転すると損傷を修復して毒力を完全に取り戻す場合のあることが知られている。したがって、被ストレス指標細菌を計数することができれば、これら被ストレス病原細菌の存否の有力な指標となる。

これら被ストレス細菌は、培養初期に培養温度を低下させたり、培地の組成を変えたりすることによって検出が可能となる。大腸菌群については、m-T7培地が被ストレス細菌を良好に検出することが知られている。表1は、水道に関連する各種の水について、従来法のm-Endo培地とm-T7培地の大腸菌群検出数を比較した結果を示したものである。試料によっては、違っているものもあるが、傾向としては井戸水を含む原水では損傷を受けた大腸菌群は少なく、塩素処理を終えた水道各施設の水では損傷を受けたものが多いことがわかる。いずれにしてもこの結果は、従来の試験法が多く指標細菌を見逃していることを明らかにしている。消毒操作は細菌にとってまさに典型的なストレスであるので、消毒後の水に多くの被ストレス細菌が含まれるのは当然であろう。したがって、被ストレス細菌を含めて検出する指標細菌試験法によって、消毒耐性が低いと思われていた指標細菌と同じものであるにも関わらず、相対的に消毒耐性の高い指標細菌を手に入れる可能性が生まれてくることになる。

3. 実験方法

消毒剤としては、塩素と二酸化塩素について検討した。

塩素、二酸化塩素の消毒実験は以下のような操作で行った。滅菌済み褐色共栓300ml 三角フ

表1 水道に関連する各種の試料水中の被ストレス大腸菌群¹⁾

Location/Date	Type of water	Number of samples	Mean Coliforms/ 100 ml			% False negatives ^a
			m-Endo	m-T7	% Injury	
Midwest US/1986	After filtration	9	1.1	3.9	71	55
Midwest US/1986	Distribution	13	2.4	7.9	69	23
Northeast US/1985-86	Distribution	86	1.9	4.8	64	54
Northeast US/1985-86	Raw	86	14.5	16.8	14	—
Northeast US/1985	During treatment	320	1.4	1.9	26	24
Caribbean/1985	Cisterns	13	15.2	20.5	26	—
East US/1986	After treatment	4	2.0 ^b	209.0	99	100
Northwest US/1984-86	Small systems	552	62.0 ^c	139.0 ^c	55 ^d	—
Northwest US/1984-86	Small systems	45	3.1	6.3	51	—
Northeast US/1986	After chlorinated backwash	7	0.1	1.5	92	14
West US/1986-87	After unchlorinated backwash	133	2.4	8.1	70	40
West US/1986-87	After chlorinated backwash	37	0.03	13.4	99	97
Southeast/1986	Raw (surface)	24	598.0	2828.0	79	—
Southeast/1986	Well (mineralized)	51	254.0	505.0	49	—
Southeast/1986	Well	122	2.0	3.0	33	—
Southeast/1986	Distribution	280	1.0	4.0	75	—

^a “% False Negatives” represents the percentage of coliforms that failed to produce colonies of m-Endo medium but were enumerated on m-T7

^b MPN values

^c Values are % positive for coliforms

^d Estimate

ラスコに検水を200ml採り、これに濃度既知の次亜塩素酸ナトリウム溶液か二酸化塩素水を所定の濃度になるように加えた。密栓して混和した後、20℃の恒温器内に静置した。0, 5, 30, 60分経過後、三角フラスコから残留消毒剤濃度を測定するために100mlを別な容器に採った後、直ちに滅菌済み3%チオ硫酸ナトリウムを5 ml加えて無毒化し細菌試験に供した。検水としては、各種細菌をある程度含みかつ消毒剤をあまり消費しないように、函館市内の清浄河川水に下水処理場の流入水を5%添加したものをを用いた。細菌試験は、従来法として、大腸菌群（以下TCと略す）がm-Endo培地MF法、ふん便性大腸菌（以下FCと略す）はm-FC培地MF法によった。被ストレス細菌を検出する試験法として、TCについてはm-T7寒天培地を用い35℃、24hr培養、FCについてはm-FC寒天培地を用い35℃、2hr培養後、44.5℃、22hr培養をそれぞれ行った後、出現したコロニーをカウントした（以下S-m-FC法と略す）。

各培地に出現したコロニーが、それぞれ確かにTC、FCであるかを確認するため、図1示す手順に従って実験を行った。いずれの場合も白金線を用いてコロニーから釣菌し各培地に移植した。LB培地からBGLB培地への移植には白金耳を用いた。図に示す条件で培養後、その培地での増殖の有無とダーラム管によるガス発生の有無を観察した。

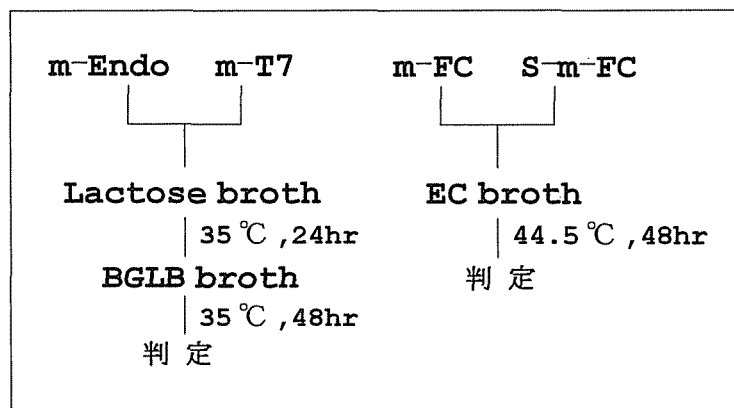


図1 コロニー確認のための実験手順

4. 実験結果と考察

塩素消毒と二酸化塩素消毒の消毒経過をFCについて示したのが、図2、3である。S-m-FC法で検出されたFCには従来法のm-FC法で検出されるFCに加えて、被ストレスFCが含まれ

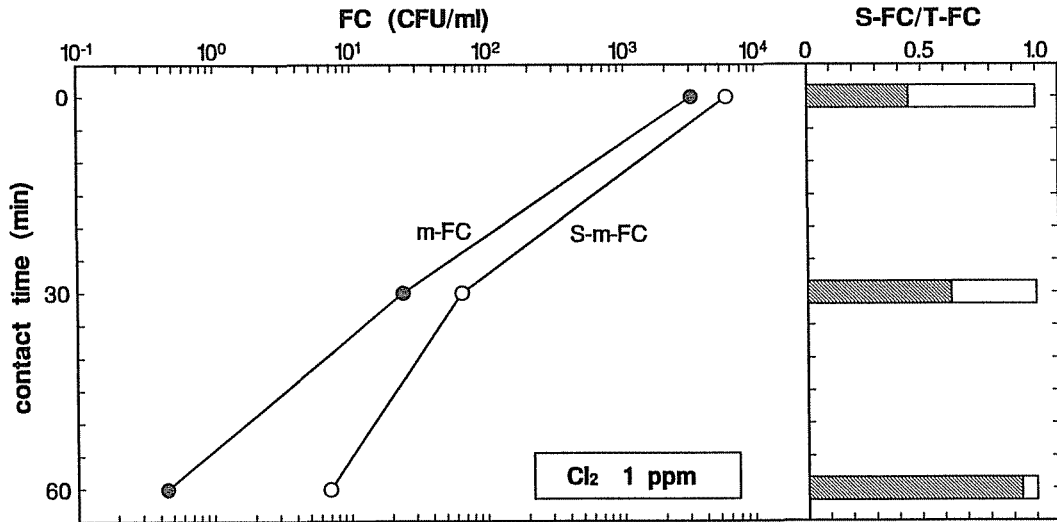


図2 塩素 1 ppm 添加の消毒経過

ているわけであるから、当法で検出されたFCを総ふん便性大腸菌 (T-FCと略す) と呼ぶことにする。一方、被ストレスふん便性大腸菌数 (S-FCと略す) は、S-m-FC法の検出菌数からm-FC法の検出菌数を差し引けばよいことになる。両図には二法によるFCの減少経過と被ストレスFCの占める割合の変化が示されている。両図とも、接触時間0分すなわち消毒剤と接触する前の段階でも、被ストレス細菌がかなりの割合を占めていることを示している。このことは、下水中の細菌の一部が何らかのストレスの履歴をもって処理場に流入してくることを物語っている。塩素 1 ppm 添加の場合、m-FC法では、半対数グラフ上でFCはほぼ直線的に減少してゆくが、S-m-FC法では、減少が緩慢な方向に変化している。その原因は時間の経過とともにS-FCの割合が増加するからで、60分後にはT-FCの93%にも達している。

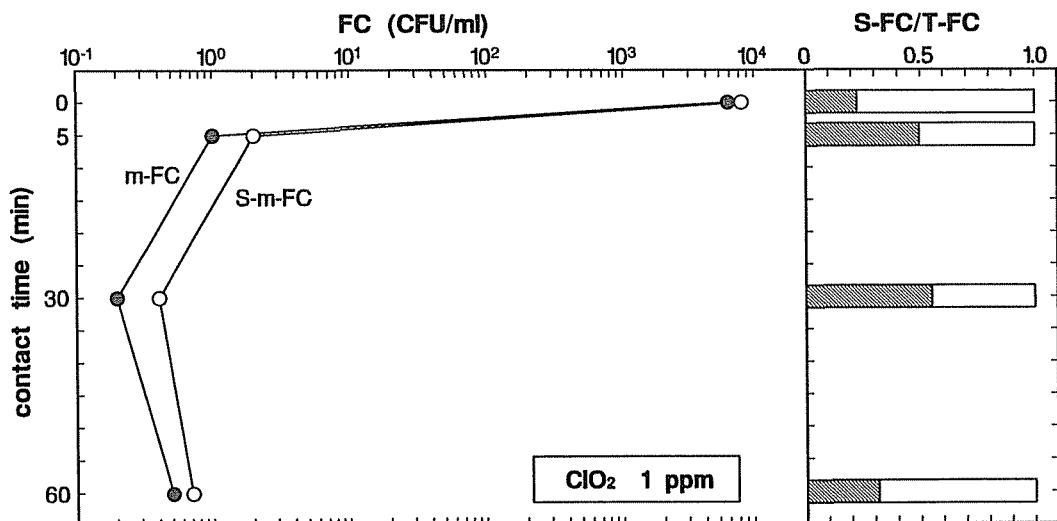


図3 二酸化塩素 1 ppm 添加の消毒経過

一方、二酸化塩素 1 ppm 添加の場合は、接触時間5分ですでに検出限界ぎりぎりの菌数まで

減少する傾向は、m-FC法、S-m-FC法とも大差なく、S-FCの占める比率も60分後には3割以下であった。この両者の差は、両消毒剤の消毒力の違いが生み出しているものと思われる。このことは、塩素の場合、細菌を死滅させたつもりでも多くの被ストレス細菌が残存している可能性があるのに対し、同濃度の二酸化塩素の場合、その強力な殺菌力から、細菌を被ストレス細菌の状態に留めず死滅に至らしめることを物語っている。

以上の考察は、S-m-FC法で検出された細菌が真のふん便性大腸菌であることが前提であるので、そのことを確認する必要がある。図1に示す手順に従って得られた結果を図4、5に示した。EC培地で増殖し、ガス発生した場合は+、増殖のみでガス発生の無かった場合は±、増殖の認められなかった場合は-で結果を示している。m-FC培地の場合、通常は青色または灰色の周辺部を持った青色のコロニーをFCとしてカウントしているが、これに灰色のコロニーを加えて検討した。

塩素 1 ppm 添加の結果をみると、S-m-FC法については、消毒前後に関わらず、青色を含むコロニーはほぼFCとみなしてよいという傾向に変わりはない。消毒後に若干±や-が増えているが、同時に行ったm-FC法の結果でも青色を含むコロニーに若干±が含まれており、FC検出法としての妥当性において、S-m-FC法に問題はないと考えられる。

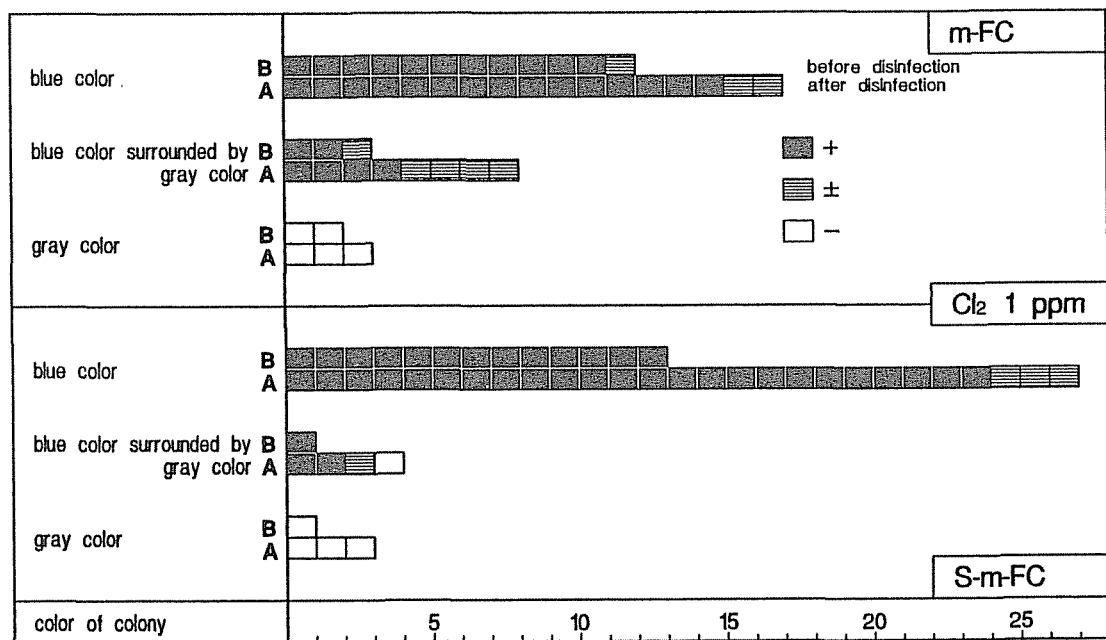


図4 塩素消毒下に出現したコロニーの確認結果 (FC)

ところが、二酸化塩素を 1 ppm 添加した場合の様相はかなり異なるものとなった (図5)。すなわち、消毒前は塩素の場合とほぼ同様であったが、消毒後青色コロニーにFC+がかなり現れたり、灰色コロニーにFC+が現れたりという現象がみられた。これは、S-m-FC法だけの現象でなく、m-FC法でも同様であった。このことは、二酸化塩素の強力な酸化力が細菌の酸生成能に影響を与えている可能性を示唆しており、コロニーの判定基準に問題を投げかけている。

二酸化塩素消毒については、大腸菌群でも同様な結果が得られている (図6)。m-Endo法においては、金属光沢を帯びた暗赤色のコロニーを大腸菌群としており、二酸化塩素添加前はその判定基準とおりの結果になっている。ところが、添加後は、金属光沢の無い暗赤色コロニーや非定型の赤色コロニーの中に大量のTC+が現れる結果となった。また、m-T7法においても、

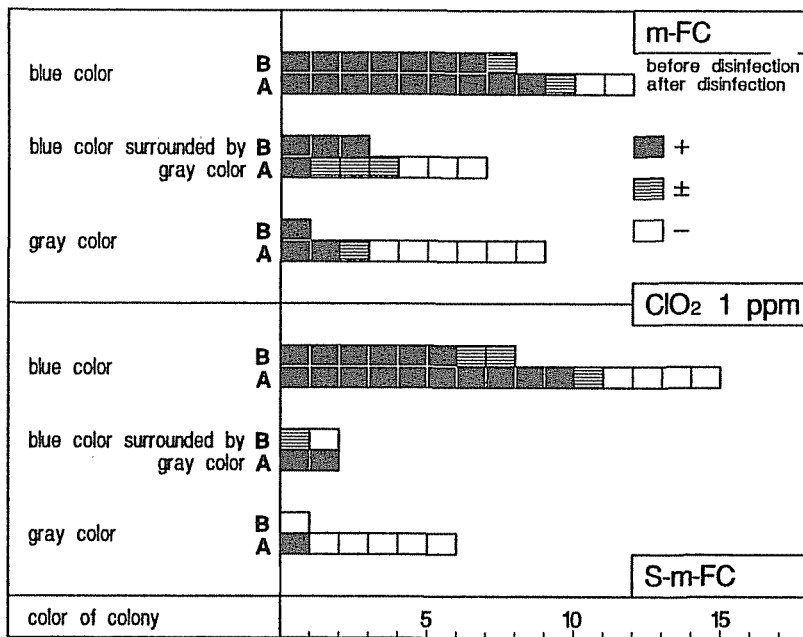


図5 二酸化塩素消毒下に出現したコロニーの確認結果 (FC)

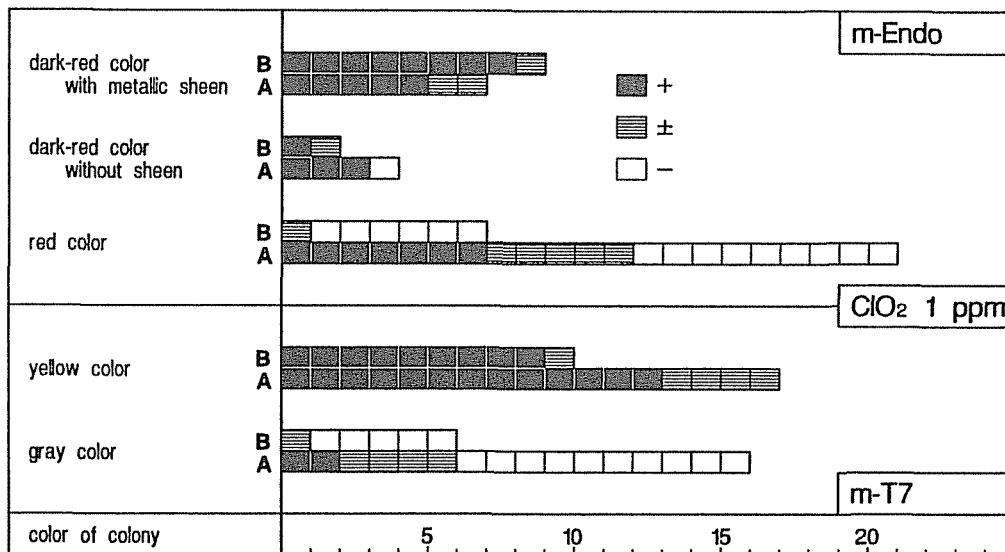


図6 二酸化塩素消毒下に出現したコロニーの確認結果 (TC)

二酸化塩素添加前は、本来の判定基準とおり黄色コロニーがTC+で、灰色コロニーがTC-であった。しかし、二酸化塩素添加後は黄色コロニーにTC±が増加し、灰色コロニーにTC+が現れる結果となった。

これらの結果は、消毒剤添加が指標細菌の判定基準の基になっている生理機能にも影響を与える可能性のあることを示唆している。したがって、消毒法を変更するときは、事前に採用する指標細菌の判定基準まで立ち入って検討する必要があるといえよう。

5. おわりに

被ストレス指標細菌検出法は、従来の指標細菌検出法を上回る菌数を検出する能力があり、消毒に対して耐性のある病原体の指標としてそれなりに有効だが、有機栄養細菌や一般細菌のレベルには及ばない²⁾。今後、ふん便性連鎖球菌など他の指標細菌の被ストレス細菌の試験法の検証と対象とする水の種類や消毒法によって指標細菌をどのように選択し組み合わせていくかが課題となろう。

参考文献

- 1) McFeters,G.A.:1990.Enumeration,Occurrence,and Significance of Injured Indicator Bacteria in Drinking Water p.491 in McFeters G.A.(editor), *Drinking Water Microbiology*, Springer-Verlag,New York.
- 2) 芦立徳厚他：紫外線の消毒特性と消毒効果指標細菌の選択に関する研究，土木学会第49回
年講，II - B486,1994
- 3) 芦立徳厚他：消毒効果判定における被ストレス細菌の評価，土木学会第50回年講，II - B521,
1995
- 4) APHA,AWWA,and WPCF:1992, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*(18th edition)
Washington,D.C.