土 壌 に お け る 低 温 性 大 腸 菌 群 の 分 布

(昭和 50 年 6 月 30 日受理)

堀 江 進* 臼 井 進*
神 白 智 子* 佐 伯 和 昭*

Quantitative Distribution of Psychrotrophic Coliforms in Soil

Susumu HORIE, Susumu USUI, Tomoko KAMISHIRO
and Kazuaki SAHEKI

(Tokyo University of Fisheries: Konan 4, Minato-ku, Tokyo)

In winter, samples of soil were collected from mountain area along the Otake-sawa, branch of the River Tama, from Tokyo and neighbouring areas and from the plateau area in Nagano Pref. Samples of water were also collected from the Otake-sawa. Presumptive coliform counts were obtained by enumerating typical red-coloured colonies formed in the desoxycholate agar plates after 24 hr incubation at 30°C. Of 49 soil samples examined, 31 gave a positive presumptive test, but the presence of coliforms was confirmed in only 22 samples. The number of coliforms in the positive soils was fairly low, only 2 samples had presumptive coliform counts greater than 1,000/g. On the other hand, 7 water samples showed rather consistent coliform counts, ranging from 32 to 310/100 ml. Presumptive coliform counts in desoxycholate agar were fairly reliable for water samples, but not so reliable for soil samples. Among 190 coliform strains isolated from winter samples, 179 strains (94%) were psychrotrophic and 151 (79%) of these were IMViC - - + +, motility positive and gelatine liquefaction negative (Group I). Of 20 soil samples examined in autumn, 19 gave a positive presumptive test, and 16 of these showed positive completed test. Among 113 coliform isolates in autumn 77 strains (68%) were psychrotrophic and 37 (33%) of these were Group I. It was revealed that the majority of coliform strains present in soil is psychrotrophic.

(Received June 30, 1975)

温血動物の腸管に存在する大腸菌群細菌は 40° 以上の高温に発育可能で、5° 以下の低温では発育しないのが一般である。しかし、冷蔵した牛乳¹⁾ や鮮魚²⁾ では、いわゆる低温性大腸菌群の増殖することが知られており、また著者ら³⁾ は東京都の山岳地の土壌、川水、川底の泥土について調査を行ったところ、これらの地域では低温性大腸菌群がきわめて容易に検出され、この種の細菌が広く分布していることを知った。しかしその調査では、試料を乳糖ブイヨンに接種し、5° で10日間培養し、低温菌を選択増菌する方法を採用しているので、試料中の大腸菌群数ならびに全体の大腸菌群フローラにおける低温性菌の占める割合などについては明かにしていない。本研究ではこのような点を検討する目的で、直接デソキシコ

レート寒天培地に接種する方法によって、山岳地、住宅地域、および高原地域などの土壌について調査を行い低温性大腸菌群の分布状態を観察したので報告する。

実験方法

試料の採集

試料の採取方法は堀江ら³⁾ の記載に準じた。1973年12月8日に東京都の多摩川支流の大岳沢の水源付近および上流において土壌9試料を採取した。なおこの調査では、土壌を採取した7地点で溪流の水を採取し、比較観察した。1974年1月24~25日に東京都およびその周辺の住宅地域などにおいて土壌24試料を、長野県の高原地域において土壌16試料を採集した。以上の冬期の試料のほか、秋期の試料として1974年9月24~25日に長野県の高原地域で土壌20試料を採集し、比較検討した。

* 東京水産大学：東京都港区港南4丁目

Scheme 1. Scheme for the determination of presumptive coliform counts and completed test of the isolates

大腸菌群の測定と菌株の分離

土壌の試料は、その 10 g をとり、リン酸緩衝生理食塩水 100 ml に入れ、ときどきサーモミキサーでかくはんしながら30分間処理したものを試料原液とし、原液および10倍希釈液の 1 ml をそれぞれ 5 枚のデソキシコレート寒天培地に混和し、冷却凝固した後さらに同培地 3~4 ml を加え薄層をかぶせた。一方、水の試料の場合には、採取当日にその100および 10 ml をミリポアフィルター (Type HA pore size 0.45 μ) でろ過し、これをデソキシコレート寒天平板培地の上にのせ、その上にさらに同培地 3~4 ml を流し込んで薄層をかぶせた。接種したデソキシコレート寒天培地を 30° で24時間培養した後、定型的赤色集落を数え、推定大腸菌群数とした。各試料の定型的集落の中から冬期の試料では20個またはそれ以下、秋期の試料では15個またはそれ以下から釣菌し、Scheme 1 の手順により完全試験を行った。

生物学的性状検査法

IMViC 型、運動性、ゼラチン液化、硝酸塩還元、チトクロムオキシダーゼなどの試験ならびに各種温度における発育試験は堀江ら⁹⁾の記載によった。

実験結果

分離菌株の群別

冬期に実施した大岳沢の水、土壌、東京都およびその周辺地域の土壌、長野県の高尾地域の土壌の試料について、デソキシコレート寒天培地により大腸菌群数を測定し、さらに分離した大腸菌群 190 株について、IMViC 型、運動性、ゼラチン液化性などの性状と 40° および 5° における発育試験の結果とを組み合わせで群別した。また秋期に行った長野県高尾地域の土壌についても同様に行い、分離した大腸菌群 113 株を群別した。分離菌株の群別の結果を冬期和秋期に分けて Table 1 に示した。

大腸菌群の測定結果

冬期に実施した大岳沢の渓流水および土壌の大腸菌群測定成績を Table 2 に示した。

水温は 5° またはそれ以下であった。水の 7 試料のすべてから大腸菌群が検出され、100 ml 中の推定大腸菌群数は 32 から 310 の範囲であった。デソキシコレート寒天培地の集落について完全試験を行ったところ、ほとんどすべてが大腸菌群に同定された。すなわちこのような渓流水の場合のデソキシコレート寒天培地による大腸菌群

Table 1. Coliform Distribution by IMViC Types, Motility, Gelatine Liquefaction, and Growth Temperature Test

Grouping by growth temperature test							Isolates in winter					Isolates in autumn				
							A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Growth at	40°C						—	—	+	+	+	—	—	+	+	+
	5°C	7~10 days					+		+		—	+		+		—
		6 days					+	—	+	—	—	+	—	+	—	—
Group	I	M	V	C	Mo	G										
I	—	—	+	+	+	—	151*				2	25	1	11		2
II	—	—	+	+	+	+	6					1		4		
III	—	—	+	+	—	—		4				1		5	2	1
IV	—	+	—	+	+	—	2			3	2	1		7	3	2
V	—	+	—	+	+	+										1
VI	—	+	—	+	—	—					1					
VII	—	—	—	+	+	—	2									
VIII	—	—	—	+	+	+	1									
IX	—	+	+	+	+	—						1		1		
X	—	+	+	+	+	+	1				1					
XI	—	+	+	—	+	—	1					1				
XII	+	—	+	+	—	—		1			1			1	1	
XIII	+	+	—	+	+	—								1		12
XIV	+	+	—	+	—	—										2
XV	+	+	—	—	+	—					1				6	12
XVI	+	+	—	—	—	—					3					3
XVII	+	—	—	—	+	—										1
XVIII	+	—	—	+	+	—	1									
XIX	+	+	+	+	—	—				6				1	3	
Total							165	5		9	11	30	1	31	15	36
							190					113				

* Figure represents number of strains isolated.

の測定においては、誤りの陽性がきわめて少なく正確性の高いことが示唆された。一方、土壌の場合には、9試料中5試料のみに大腸菌群が検出され、推定大腸菌群数は最高が710/gであった。陽性の5試料中3試料では完全試験の結果高い陽性率を示したが、2試料では陽性率が低かった。

分離菌株の群別をしたところ、水の大腸菌群フローラのほとんどすべてがIA群すなわちIMViC型が—++で、運動性を有し、ゼラチン液化性を欠き、5°で速やかに発育するが40°で発育しないものである。土壌の試料でもやはりIA群が多かった。

冬期に行った東京都およびその周辺地域の成績をTable 3に示した。

24試料中、推定大腸菌群測定値が得られたのは14試料であったが、完全試験の結果、大腸菌群の存在が確認されたのはわずか6試料で、しかも完全試験における陽性率は2試料を除いて非常に低かった。分離菌株の大部分は5°で発育し、40°で発育しない種類であった。

冬期の長野県高原地域における成績をTable 4に示した。

16試料中、12試料において推定大腸菌群測定値が得られ、そのうち11試料で完全試験の結果大腸菌群が検出された。推定大腸菌群数の最高値は2250/gであった。分離菌株を群別したところ、IA群が大部分を占めており、典型的な中温細菌といえるものは検出されなかった。

秋期の長野県高原地域の土壌についての成績をTable

Table 2. Enumeration of Coliforms in Waters and Soils Collected along the Otake-sawa in Winter and Grouping of the Isolates

Water							Soil				
Station No.	Temperature (°C)	Presumptive coliform count per 100 ml	Completed test		Grouping test		Presumptive coliform count per g	Completed test		Grouping test	
			No. of colonies tested	No. of colonies positive	No. of strains tested	No. of strains of each group		No. of colonies tested	No. of colonies positive	No. of strains tested	No. of strains of each group
1							0				
2							710	20	20	10	IA-10
3	5.0	32	20	20	10	IA-10	17	9	1	1	XIIB-1
4	5.0	310	20	20	9	IA-9	180	20	18	10	IA-7, IIIB-3
5	3.2	88	20	16	10	IA-10	0				
6	3.0	68	20	17	10	IA-10	0				
7	2.5	88	20	19	10	IA-10	0				
8	2.8	290	20	19	10	IA-9 IIIB-1	5	3	1	1	IA-1
9	4.0	56	20	19	10	IA-8 VIIA-1 VIIIA-1	55	20	19	10	IA-1, XVE-1 XVIE-3, XIIE-1 XIXD-4

5 に示した。

推定大腸菌群数も完全試験における陽性率も試料によりまちまちであったが、20試料中16試料で大腸菌群が検出された。Table 1 に示したように分離菌113株中、IA群は25株で冬期の場合に比べるとはるかに少なかった。しかし、5°で発育する菌株は77株を占めており、典型的の中温細菌といえるものは36株であった。

考 察

デソキシコレート寒天培地による大腸菌群測定は溪流水試料の場合に高い選択性がみられ、Table 2 における推定大腸菌群数は信頼性の高い数値である。冬期で水温の低い関係から分離菌株が低温発育性を有する点は推測されたことではあるが、ほとんどすべての菌株が IA 群であるという目立った現象がみられた。冬期の土壌のデソキシコレート寒天培地による推定大腸菌群の測定値の正確性は試料によりかなりまちまちであったが、完全試験の成績と組み合わせることにより大腸菌群の数的分布状態の概況を知ることは可能である。冬期の長野県高原地方は特に気温が低く、当然凍結しているので Warseck ら⁴⁾、矢野ら⁵⁾、堀江ら⁶⁾の述べるように大腸菌群は凍結による損傷を受け、生残菌の中にもデソキシコレート寒天培地における集落形成能を失っているものが多いことを考えに入れておかねばならない。土壌中の大腸菌群数については Taylor⁷⁾、Randall⁸⁾ らの報告にもあるが、概して菌数はかなり小さいとされている。本調査でも検出されない試料がかなり多く、また陽性の試料においても推定大腸菌群数が 1000/g を超えるものはまれであっ

た。冬期の土壌試料における大腸菌群の群別をみると概して IA 群が多数を占めている点が目立っている。IMViC - - + + 型の中でもゼラチン液化菌あるいは非運動性の種類はきわめて少数であることが観察された。

秋期の高原の土壌の場合には冬期に比べ、はるかに菌群に分散が認められる。すなわち113株中 IA 群は25株にすぎず、冬期には非常に少なかったインドール陽性の菌群もかなり多く見いだされた。このような成績から IA 群は他の大腸菌群細菌に比べて寒冷に対し抵抗性が高いことが推察される。

Randall⁸⁾、Geldreich ら⁹⁾ は IMViC - - + + の菌型が土壌においては特に重要な位置にあると述べている。しかし、本調査ではそのような現象は認められず、- - + + の菌型が数的に最も重要な部分を占めた。このような成績の違いは一つには測定と分離における培地の種類や培養条件によるものであろう。

冬期の分離大腸菌群190株中、40°で発育不能のものは170株に及んだ。また秋期の分離菌113株中では31株が含まれている。

Burman¹⁰⁾ は糞便に存在する大腸菌群は一般に42°で発育可能であるが、河水、下水などには42°で発育できない大腸菌群細菌がかなり多いと述べている。このような汚染された河水あるいは下水中の大腸菌群の中で大きな部分を占める低温性菌株が自然界の土壌ならびに溪流水などに由来する可能性は、本研究の結果からも十分考えられるところである。

Table 3. Enumeration of Coliforms in Soils Collected in Tokyo and Neighbouring Areas in Winter and Grouping of the Isolates

Station		Presumptive coliform count per g	Completed test		Grouping test	
No.	Location		No. of colonies tested	No. of colonies positive	No. of strains tested	No. of strains of each group
1	Wood, Yokosuka	<10				
2	Wood, Yokosuka	<10				
3	Roadside, Yokosuka	74	20	0		
4	Wood, Miura	4	2	1	1	XVIII A-1
5	Wood, Yokosuka	4	2	0		
6	Wood, Yokosuka	6	3	0		
7	Wood, Yokosuka	56	10	0		
8	Grassplot, Yokosuka	40	9	1	1	IV A-1
9	Garden, Ota-ku, Tokyo	4	2	0		
10	Garden, Ota-ku, Tokyo	<10				
11	Garden, Ota-ku, Tokyo	14	7	0		
12	Garden, Ota-ku, Tokyo	<10				
13	Wood, Yokohama	196	17	16	10	IA-9, IVE-1
14	Wood, Yokohama	<10				
15	Grassplot, Abiko	92	20	16	10	IA-7, IIA-1, IE-1, XA-1
16	Wood, Abiko	<10				
17	Wood, Hino	<10				
18	Wood, Hino	8	4	0		
19	Wood, Fujisawa	58	14	1	1	IVE-1
20	Wood, Fujisawa	136	12	5	5	IE-1, VIE-1, XE-1, XIXD-2
21	Garden, Meguro-ku, Tokyo	<10				
22	Roadside, Meguro-ku, Tokyo	<10				
23	Wood, Zushi	<10				
24	Wood, Zushi	10	5	0		

Table 4. Enumeration of Coliforms in Soils Collected in the Plateau Area of Nagano Pref. in Winter and Grouping of the Isolates

Station		Presumptive coliform count per g	Completed test		Grouping test	
No.	Location		No. of colonies tested	No. of colonies positive	No. of strains tested	No. of strains of each group
1	Wood, Karuizawa	<10				
2	Wood, Karuizawa	18	6	1	1	IA-1
3	Wood, Minenochaya	14	5	1	1	IA-1
4	Wood, Minenochaya	<10				
5	Wood, Minenochaya	<10				
6	Wood, Minenochaya	2,250	20	20	10	IA-10
7	Wood, Komoro	28	10	6	6	IA-6
8	Wood, Komoro	54	13	0		
9	Wood, Lake Matsubara	70	17	13	10	IA-6, IIA-4
10	Wood, Lake Matsubara	4	2	1	1	IA-1
11	Wood, Koumi	36	15	8	8	IA-4, IIA-1, IVD-3
12	Wood, Koumi	1,480	20	16	10	IA-9, VIIA-1
13	Wood, Usuda	78	20	18	9	IA-9
14	Wood, Usuda	14	5	1	1	IA-1
15	Garden, Shionada	<10				
16	Riverside bank, Shionada	46	11	4	4	IA-2, IVA-1, XIA-1

Table 5. Enumeration of Coliforms in Soils Collected in the Plateau Area of Nagano Pref. in Autumn and Grouping of the Isolates

No.	Station Location	Presumptive coliform count per g	Completed test		Grouping
			No. of colonies tested	No. of colonis positive	
1	Wood, Komoro	<10			
2	Wood, Komoro	5,700	15	1	IC-1
3	Wood, Miyota	1,000	15	0	
4	Wood, Miyota	350	7	0	
5	Wood, Karuizawa	122	15	9	IA-2, IC-1, IIIA-1, IVC-5
6	Wood, Karuizawa	26	11	0	
7	Wood, Minenochaya	1,860	15	8	IA-6, IVC-2
8	Wood, Minenochaya	550	15	10	IA-4, IIC-1, IIIC-4, XIID-1
9	Wood, Minenochaya	1,120	15	11	IA-3, IB-1, IIA-1, IIC-2, XIA-1, XVD-3
10	Wood, Minenochaya	6,150	15	1	IIC-1
11	Wood, Saku	590	15	12	IIIE-1, XVD-3, XVE-5, XVIIIE-3
12	Wood, Saku	146	15	3	IE-1, XIIC-1, XIIIE-1
13	Riverside bank, Shionada	10	4	2	XIIIC-1, XIXC-1
14	Riverside bank, Shionada	72	15	4	IIIC-1, XIIIE-1, XIXD-2
15	Wood, Kasatori-toge	1,300	15	8	IA-4, IVE-1, XIIIE-2, XIXD-1
16	Wood, Kasatori-toge	370	15	14	IA-2, IC-9, IE-1, IXC-1, XVIIIE-1
17	Wood, Daimon	68	15	5	IA-1, IVD-2, XIVE-2
18	Wood, Daimon	232	15	14	IA-1, XIIIE-6, XVE-7
19	Wood, Maruko	5,850	15	5	IA-2, IVA-1, IVD-1, IXA-1
20	Wood, Maruko	650	15	6	IIID-2, IVE-1, VE-1, XIIIE-2

要 約

自然界の土壌および水における大腸菌群をデソキシコレート寒天培地に 30° で培養する方法で測定し、かつ大腸菌群フローラを形成する菌株を IMViC 型、運動性、ゼラチン液化性、40° および 5° における発育能などの組み合わせにより分類した。

冬期に東京都大岳沢の水、土壌、東京都とその周辺地域および長野県高原地域における土壌について調査したところ、推定大腸菌群数は渓流水で 32~310/100 ml、土壌では陰性の試料がかなり多く、陽性の試料でも 1000/g を超えるものはまれであった。冬期の分離大腸菌群 190 株中、5° に発育可能な低温性菌は 179 株もあり、その中 151 株は IMViC 型 - - + +、運動性を有し、ゼラチン非液化性のもの（I 群）であった。また秋期に長野県高原地域の土壌を調査したところ、分離大腸菌群 113 株中、5° で発育するものは 77 株に達し、その中、I 群に属するものは 37 株であった。自然界の土壌などに分布する大腸菌群フローラの大部分が低温性菌株によって占められていることが示唆された。

文 献

- 1) Panes, J. J., Thomas, S. B.: J. Appl. Bact., **31**, 420 (1968).
- 2) 佐伯和昭, 堀江 進, 慶野一夫: 食衛誌. **12**, 95 (1971).
- 3) 堀江 進, 荒木敏明, 佐伯和昭: 同上. **13**, 405 (1972).
- 4) Warseck, M., Ray, B., Speck, M. L.: Appl. Microbiol., **26**, 919 (1973).
- 5) 矢野信礼, 森地敏樹: 食衛誌. **12**, 408 (1971).
- 6) 堀江 進, 山形 誠, 井上広志, 和泉 力: 同上. **15**, 110 (1974).
- 7) Taylor, C. B.: J. Hyg., Camb., **49**, 162 (1951).
- 8) Randall, J. S.: *ibid.*, **54**, 365 (1956).
- 9) Geldreich, E. E., Huff, C. B., Bordner, R. H., Kabler, P. W., Clark, H. F.: J. appl. Bact., **25**, 87 (1962).
- 10) Burman, N. P.: *ibid.*, **24**, 368 (1961).