

環境基準改正による大腸菌数測定に向けた 新たな分析手法の取り組みについて

今村 陸人¹・辻内 宏幸¹

¹株式会社近畿地域づくりセンター 水環境研究所 (〒612-8418京都府京都市伏見区竹田向代町14)

公共用水域の水質汚濁に係る環境基準において、「大腸菌群数」に代わり新たな衛生微生物指標として「大腸菌数」へ見直しがなされ、本指標の変更に伴い新たな測定方法および環境基準が令和4年4月から適用されることとなった。本稿では、測定データの信頼性および精度管理を目的に、基準改正に伴う新しい大腸菌数の測定方法の適用に向け取り組んだ調査検討について報告する。具体的には、新手法の工程に関する基礎的な検討、および、従来の大腸菌群数と、新項目の大腸菌数の結果の比較から、水域河川毎における傾向や特性について解析を行った。

キーワード 環境基準, 大腸菌数, 水質保全

1. はじめに

公共用水域における水質汚濁に係る生活環境の保全に関する環境基準¹⁾に、ふん便汚染の指標として「大腸菌群数」が設定されている。これは、公衆衛生上ふん便汚染の指標として大腸菌の選択が妥当であるものの、基準設定当時1971(昭和46)年の培養技術では、大腸菌のみを検出する技術がなかったためである。一方、この大腸菌群数の測定方法は、環境中に広く存在するふん便由来ではない土壌細菌なども計測されるため、過大評価となる問題が指摘されていた²⁾。しかし、近年測定技術の進歩により、簡便かつよりの確にふん便汚染を捉える大腸菌の培養技術が確立された。そのため「水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件」(2021年10月環境省告示第62号)の公布(2022年4月1日施行)³⁾にて、よりの確なふん便汚染を捉える新たな衛生微生物指標として「大腸菌群数」を「大腸菌数」へ見直すこととなった。

本稿は、環境基準の改正に伴う新たな指標となった大腸菌数について、データの信頼性や基礎的知見の把握を目的に、先行して取り組んだ分析手順の確立と、公共用水域における状況について検討した内容を報告する。

2. 新しい測定方法における分析手順の確立

大腸菌群数から大腸菌数への環境基準の見直しに係る変更に伴い、付表に記された測定方法は、特定酵素基質

培地法である。本法は、滅菌済みのろ過装置にて試料をろ過し、ろ過後のメンブランフィルターを培地の上に乗せ、使用する培地に示されている温度・培養時間にて、恒温器内で培養、規定時間後のコロニー数を計数し、大腸菌数を算出する方法である。しかし、この特定酵素基質培地法には、使用する培地や希釈水について詳細な記載はない。そのため(1)寒天培地、及び(2)希釈水の種類について、それぞれ比較検討を行い、正確に測定を行うための分析手順を確立した。

(1) 特定酵素基質寒天培地

測定方法に準じて、記載される組成を有するまたは同等以上の性能を有する特定酵素基質寒天培地には、XM-G寒天培地およびクロモアガーECC寒天培地の2種類を用いて比較を行った。これらの培地を候補選定した理由は、XM-G寒天培地は現在業務で分析を行っている大腸菌群数のBGLB培地と同じ社製で大腸菌群数との比較が容易にできること、また、クロモアガーECC寒天培地は、他の機関での使用歴に基づくことによる^{2,4)}。なお、特定酵素基質培地法では、青色のコロニーが大腸菌数として計測される(大腸菌以外の細菌は大腸菌群数とされるコロニーで主に赤色を呈す)。

13地点の試料について、それぞれ2連で繰り返し試験を行いその平均値を求めた。培地の種類別と大腸菌数の比較検討例を図-1 および写真-1 に示す。地点によっては若干差が見られたが、各培地間の大腸菌数は5%有意水準で有意な差は認められなかった。また、培養時間ではXM-G寒天培地が20時間±2時間に対し、クロモアガーECC寒天培地は24時間である。したがって、測定

に際して柔軟に適応できるよう勘案し、XM-G寒天培地を採用することとした。

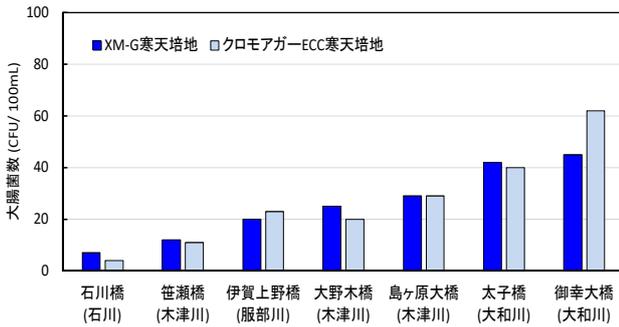
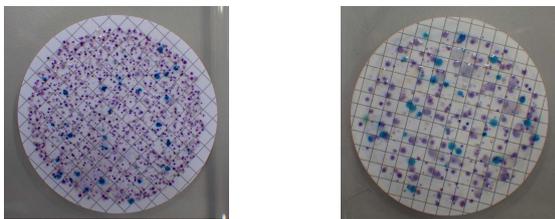


図-1 培地の種類別による大腸菌数の結果(一部抜粋)



(左:XM-G 寒天培地 右:クロモアガー-ECC 寒天培地)
青色のコロニーが大腸菌

写真-1 特定酵素基質寒天培地上のコロニーの様子

(2) 希釈水の種類

希釈水は、滅菌ペプトン水、滅菌リン酸塩緩衝希釈水、滅菌生理食塩水のいずれかと記載されている。XM-G寒天培地を用い、河川水5試料に対する3種類の希釈水の差について比較検討した。各希釈水の種類による大腸菌数の結果は図-2 に示すとおりである。これらのデータを元に希釈水の3種類に対して分散分析を行った結果、有意差は認められなかった。

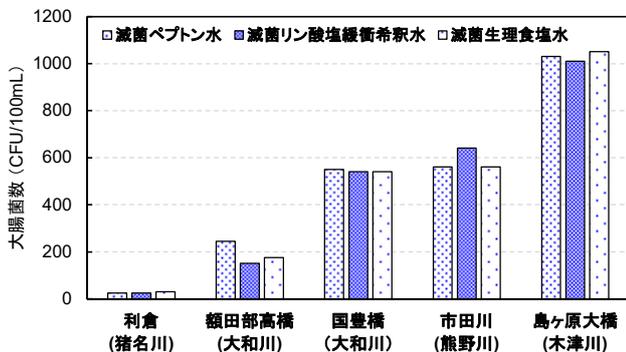


図-2 希釈水の種類別による大腸菌数の比較

さらに、分析手順上のメリット・デメリットについて列挙した比較では、表-1 に示すように、滅菌ペプトン水は保存期間が短く、滅菌生理食塩水は常時調製が必要

となる。一方、滅菌リン酸塩緩衝希釈水は高濃度溶液を作製できる上に保存期限も長く、コスト面や時間的な効率性において優れていると考えられた。よって、滅菌リン酸塩緩衝希釈水を使用することとした。

表-1 希釈水の比較

	メリット	デメリット
滅菌ペプトン水	—	・保存期間が短い ・測定時に毎回溶液調製と pH 調整が必要
滅菌リン酸塩緩衝希釈水	・長期保存可能 ・高濃度溶液を調製し使用時に希釈できる	・高濃度溶液の調製時のみ pH 調整が必要
滅菌生理食塩水	・試薬の入手が容易	・測定時に毎回溶液調製が必要

3. 公共用水域における大腸菌数測定

(1) 新指標への改正による課題

新しい指標となる大腸菌数の測定の特定酵素基質培地法は、これまでの大腸菌群数の測定方法のプリリアントグリーン・乳糖胆汁グイオン培地最確数法と全く異なる分析法である。さらに、これまでの最確数法による単位 MPN/100mLは、大腸菌数に用いる単位 CFU (Colony Forming Unit : コロニー形成単位) / 100mL に変わり、発育したコロニー(集落)数を数えて算出する(写真-2)。



(左:大腸菌数測定 右:大腸菌群数測定)

写真-2 測定方法の違いによる結果の様子

そのため環境省は、新指標の設定に際して、水道での利用を考慮した新たな大腸菌数の基準も設定している(表-2)。すなわち、大腸菌群数と大腸菌数は異なるため、河川や湖沼(ダム)等の公共用水域の水質測定における新しい指標(分析項目)および測定方法の変更は、これまでの測定結果値と異なる数値を示す。また、本培地法は、試料中の菌数が多い場合、適切な範囲に計測数が収まるよう定められているため⁵⁾、あらかじめ予測して希釈を行わなければならない。このように、既存の数値データとの関連性や分析手順(希釈倍率など)への対応が課題であり、新しい基準値への改正による測定結果の判断は、

一層注視が必要となる。すなわち、正確な水質データを測定し管理するためには、事前に既存データとの関係を把握することが、分析において信頼性や精度を担保する上で非常に重要と考える。

表-2 大腸菌数及び大腸菌群数の環境基準値

類型	新指標 大腸菌数 ¹ (CFU/100mL)	旧指標 大腸菌群数 (MPN/100mL)
湖沼AA 河川AA	20 ² 以下	50 以下
湖沼 A 河川 A	300 以下	1,000 以下
河川 B	1,000 以下	5,000 以下

*1: 大腸菌数にかかる基準値については、90%水質値とする。

*2: 水道1級を利用目的としている地点については、大腸菌数100 CFU/100mL以下とする(環境省水・大気環境局水環境課の表をもとに一部改変)。

(2) 大腸菌群と大腸菌の関係

最初に、大腸菌群と大腸菌の関係について概要を述べる。大腸菌群とは、飲料水における環境衛生管理上の汚染指標菌として提案された。これは細菌分類学上の菌名ではなく、衛生学・衛生細菌学における定義であり、乳糖を分解してガスを産生する好気性又は通性嫌気性のグラム陰性桿菌(無芽胞)の総称である。その中には *Escherichia* をはじめ、これら性状を有する細菌群 *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* など大腸菌以外の細菌(主に土壌細菌群等)も多数含まれ、この細菌群を最確数法により算出した細菌数を大腸菌群数とする。一方、特定酵素基質培地法では、大腸菌群数として計数される細菌群のうち、大腸菌が特異的に持つ酵素βグルクロニダーゼにより青色の大腸菌コロニーを形成することから、それらを計数する方法である。図-3には、ふん便指標における大腸菌と大腸菌群の関係を示す。

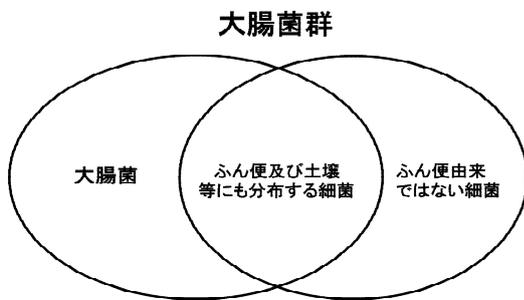


図-3 大腸菌と大腸菌群の関係

(3) 検討方法

検討試料は、ふん便汚染の新しい指標の適用に鑑みて、

近畿管内の各水系の河川・湖沼水を用いた。調査地点は大腸菌群数と比較できるように主に環境基準地点を選定した。また、大腸菌数が分析項目に含まれない河川類型の地点も水系全体を俯瞰するための有用なデータとして蓄積し、知見として活用するために含めた。延べ地点数は76地点である。表-3に示すように、2021年4月~2022年3月に実施し、総計197試料を測定した(なお、諸事情により生物活性の高い夏季のデータが取れなかったことは今後の課題とする)。

測定方法は、前章で検討し確立した分析手順に則り、大腸菌群数と新指標の大腸菌数について、量的な関係や比較検討を行い、それらの結果について考察を試みた。

表-3 対象測定試料数

月	4	5	6	7	10	11	12	1	2	3
湖沼AA	2	0	2	4	3	0	22	0	1	40
湖沼 A	3	4	0	0	1	0	5	1	1	2
河川AA	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
河川 A	5	8	11	1	8	6	14	6	17	21
河川 B	2	3	2	1	2	1	8	2	8	8
河川 C	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0

(4) 湖沼における結果および考察

湖沼のAA類型($n=74$)とA類型($n=17$)を対象に実施した結果を図-4に示す。当該管内水系におけるAA類型は主に琵琶湖であり、A類型はダム湖が対象である。

図より、これまで大腸菌群数を指標とした湖沼AA類型(琵琶湖)では、環境基準値を超過していた地点の多くが、大腸菌数を指標とすることで、全て環境基準値(100 CFU/100mL以下)を満たすことが明らかとなった。すなわち、近畿の水道水源である琵琶湖では、これまで大腸菌群数が高い値を示していたが、それらはふん便汚染によるものではなく、多くがふん便由来ではない細菌や土壌細菌によるものと考えられた。また、湖沼Aの猿谷ダム、大滝ダムでも同様に大腸菌数は低い値を示し、環境基準に照らし合わせると満足することが示された。

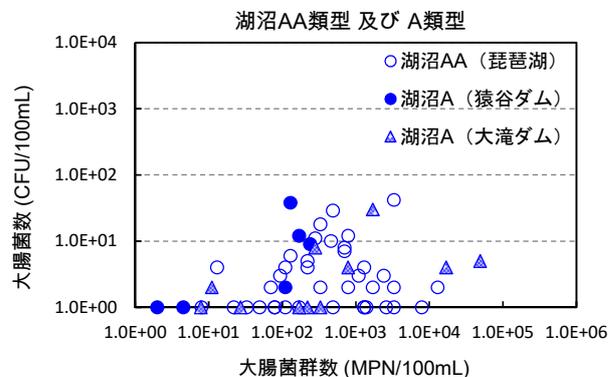


図-4 湖沼AA類型及びA類型における大腸菌数及び大腸菌群数の比較

(5) 河川における結果および考察

河川における大腸菌数と大腸菌群数との関係を図-5に示した。B類型とC類型では高い正の相関 ($r = 0.8202$) がみられ、汚濁が進むほど両者の関係には一定の相関が見られることを示唆している。一方、A類型 ($n=97$, AA類型を除く) の大腸菌数と大腸菌群数の全データのプロットは相関が低く、明確な特徴や関係が見られなかった。

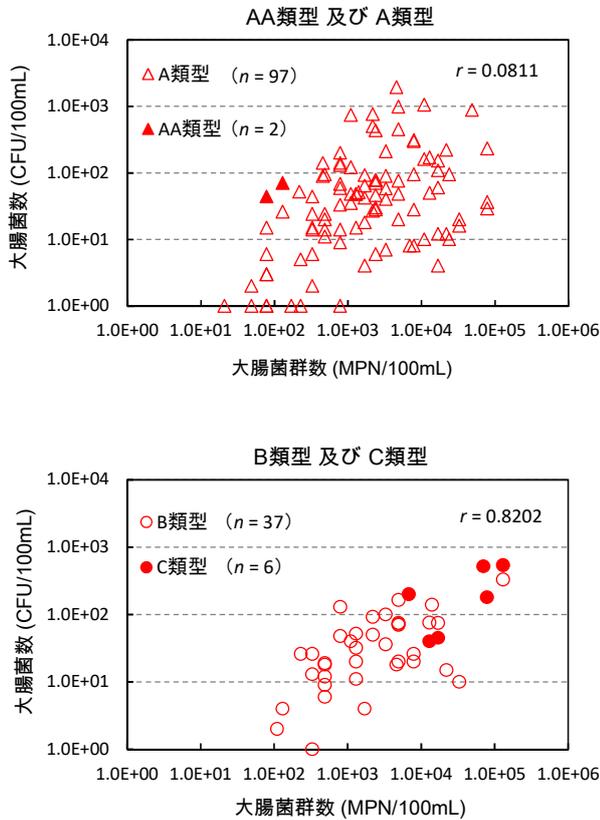


図-5 河川類型別(AA類型及びA類型, B類型及びC類型)における大腸菌数及び大腸菌群数の比較

調査地点が多いA類型の河川は、各々で調査月、調査回数が異なるため、全データではバラつき、明確な傾向が捉えられないと思われる。そこで、大腸菌数と大腸菌群数との関係を、各月における散布図の比較検討に加えて、調査地点間の特性を包括的に理解するため、階層的クラスター分析(正規化あり, ユークリッド距離・ウォード法)を行った。また、大腸菌数と大腸菌群数との関係は、湖沼や河川B, C類型を踏まえ、大腸菌群数は多いが大腸菌数は低い、大腸菌群数も多く大腸菌数も多い、どちらの関係も見られない等に分かれることが予想されたため、クラスター数が3程度になるようカットオフポイントを決定した。以下は、最も多くデータが得られた2022年3月 ($n=21$) の結果である。

階層的クラスター分析の結果、デンドログラム(樹形図)は図-6のように示され、調査地点は3つのクラスターに分類された。これらを散布図に反映したものが図-7

である。3月の結果において宮前橋と島ヶ原大橋は、異なるグループとして分類されたが、別の月でも同様に他の調査地点と分かれる傾向がみられた。

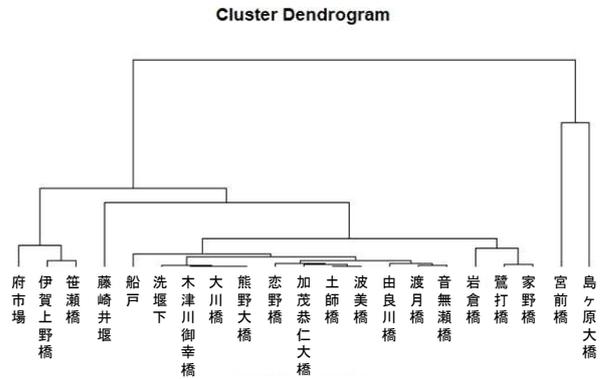


図-6 地点別クラスター分析結果(3月)

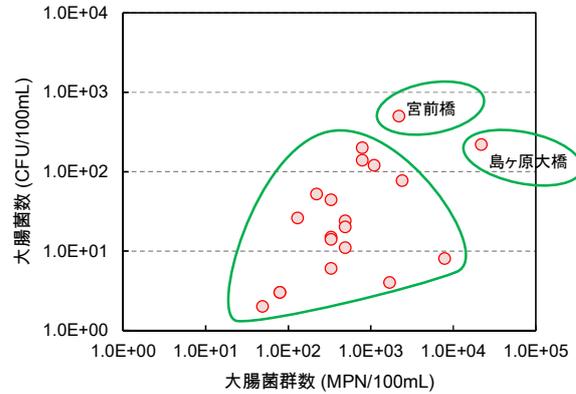


図-7 大腸菌数と大腸菌群数の関係(3月)

宮前橋は、桂川下流の地点で淀川三川合流の手前に位置し、本検討でも最も測定回数が多い地点である。この地点は、大腸菌数が多い月と少ない月が季節に関係なく混在する等、他のA類型とは異なる特徴を示すことも明らかとなった。この挙動の原因には、地点の上流に京都市内から流れる多くの支川が流入し、また、それらは典型的な都市河川で水質が汚濁していることに起因すると考えられた。実際に京都市のデータ⁶⁾によると、西高瀬川や鴨川の大腸菌数は高濃度で観測されることもあるため、これらの混入によっては宮前橋での大腸菌数の濃度にも影響すると示唆された。

一方、島ヶ原大橋は、これまで大腸菌群数が非常に高い濃度を示し、新基準の大腸菌数も環境基準を超える。本地点は木津川の中間地点に位置し、山間地を利用した家畜業(養豚, 牛, 養鶏)が行われている。ここでは家畜排泄物の積極的な利用に力を入れており、堆肥原料として水田土壌作りや有機栽培等に使用している⁷⁾。また、当地域での污水处理人口普及率の内訳を見ると下水

道や農業集落排水施設がそれぞれ約20%と低く、半数は合併処理浄化槽である⁸⁻¹⁰⁾。したがって、大腸菌数は汚水処理形態や面源負荷等の要因が影響したと考えられた。

すなわち、この分類された結果の解析では、外れ値となりやすい地点は、(1) 汚濁した流入支川の影響を受ける場所、(2) 下水道の未整備等によるふん便汚染が流入しやすい場所、(3) 家畜や野生動物のフン、堆肥などの影響を受けやすい場所であることがわかった。

以上より、新たな指標の大腸菌について、散布図を作成し階層的クラスタ分析を組み合わせることで、その特徴をより明確に理解し要因等を考察することができた。

4. まとめ

基準改正に伴う新しい大腸菌数の測定方法の適用に向け、測定データの信頼性および精度管理を目的に、分析手順の確立と、近畿管内の水系における地点の大腸菌数と大腸菌群数について、その傾向や特性について検討を行った。

分析手順の確立では、培地や試薬の検討を通じて、コロニー計測などの技術経験を積むことができた。さらに、新しい指標への先行的な取り組みによって、試料に含まれる菌種の組成や環境条件等により細菌数の挙動が異なるケースも散見されたものの、各調査測定地点の過去のデータより、希釈倍率をおおよそ推定できることが示唆された。

大腸菌数と大腸菌群数との関係の検討では、湖沼はこれまで土壌細菌等による影響によって正しくふん便汚染が計測できなかったことが明らかとなった。また、近隣に下水道未整備地域や酪農地域など大腸菌汚染の要因が考えられる河川では、新しい指標によってより明確な汚染実態の把握が期待できる。さらに、未知の試料についても、試料が採取される地点の河川類型や、河川を取り巻く条件(土地利用や汚水処理形態等)から、大腸菌数の範囲についておおよその希釈倍率等の設定が可能であると思われる。大腸菌数の年間調査結果は、年12回の測定値のうち、最大値1つを除外できる90%値評価とされている。今回は生物活性の高い夏季のデータを取得できなかったものの、得られた測定結果は、河川の水質汚濁に関するデータとして有効な判断材料になり、水辺環境の保全における他の項目との考察や解析、また、排水対策

などの河川行政への基礎検討資料として貢献できると思われる。今後も新しい環境基準の指標データの蓄積をしていくとともに、他の水質項目との関係についても解析し、測定精度の管理、および、測定値の代表性など、水環境における幅広い知見を得ることに努めていきたい。

参考文献

- 1) 環境庁：告示59号 水質汚濁に係る環境基準について。
- 2) 渡邊圭司, 池田和弘, 柿本貴志, 見島伊織, 梅沢夏美, 木持謙, 田中仁志, 川合裕子, 木村久美子, 和波一夫, 石井裕一：2019. 特定酵素基質培地法で大腸菌数に影響を及ぼす因子. 全国環境研究会誌 44(3), 63-70.
- 3) 令和3年度水・大気環境局長通知：2021. 水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行及び地下水の水質汚濁に係る環境基準についての一部を改正する件の施行について. 2021年10月7日.
- 4) 藤田勇, 杉山修, 萩原英明, 柳下正美：2014. 中川水再生センターにおける大腸菌の挙動及び測定法の課題について. 東京都下水道局技術調査年報, Vol.38.
- 5) 環境省：2021. 中央環境審議会水環境・土壌農薬部会生活環境項目環境基準専門委員会, 水質汚濁に係る生活環境の保全に関する環境基準の見直しについて(第2次報告案) 別紙1. 令和3年3月.
- 6) 京都市：2021. R1年度公共用水域及び地下水の水質測定結果. 京都市環境政策局環境企画部環境指導課.
<https://www.city.kyoto.lg.jp/kankyo/page/0000278608.html> (2022年4月28日時点)
- 7) 伊賀市：2007. 伊賀市バイオマスタウン構想. 伊賀市産業振興部農林政策課.
<https://www.city.iga.lg.jp/0000002074.html> (2022年4月27日時点)
- 8) 三重県：2021. 市町別の汚水処理人口普及率の状況(みえの下水道2021-2022). 三重県県土整備部下水道経営課/三重県県土整備部下水道事業課.
<https://www.pref.mie.lg.jp/GESUI/HP/14429013042.htm> (2022年4月28日時点)
- 9) 伊賀市：2019. 伊賀市下水道事業経営戦略2019. 伊賀市上下水道部. <https://www.city.iga.lg.jp/0000004379.html> (2022年4月28日時点)
- 10) 伊賀市：2022. 伊賀市生活排水処理施設整備計画. 伊賀市上下水道部下水道課. <https://www.city.iga.lg.jp/0000004242.html> (2022年4月28日時点)