

新たな衛生微生物指標としての大腸菌数の分析法に関する研究

水環境部

小林 奈央 千野根 純子 菊池 隆寛¹ 福田 悦子

(¹現環境森林部資源循環推進課)

1 はじめに

河川等のふん便汚染の指標としては、昭和46(1971)年に水質汚濁に係る環境基準の生活環境項目に指定されて以来、「大腸菌群数」が用いられてきたが、今日の大腸菌分析技術の向上を受け、よりの確にふん便汚染を捉えることができるようになったため、海外の基準と単位CFU(Colony Forming Unit:コロニー形成単位)を揃え、令和4(2022)年4月1日からより指標性の高い「大腸菌数」が適用されることとなった。環境省が告示した測定方法(告示法)¹⁾は、フィルターろ過やコロニーの計数等、これまでの大腸菌検査とは異なる特異的な手法を含むため、基準の適用にあたっては事前に分析可能な体制を整えておく必要がある。また、培地が高価であることや、フィルターろ過以降の操作を2回以上の繰り返し試験として行わなければならないことから、希釈倍率の目安をつけることがランニングコストや時間の縮減といった経済的な観点から重要となる。過去の大腸菌測定データを希釈倍率の目安とすることも考えられるが、環境省が実施した大腸菌数と大腸菌群数の相関性に関する調査では、両者の相関は見られなかったとされている。

そこで、告示法を元に標準作業手順書(SOP)素案を作成し、その素案に従い県内河川水等における大腸菌数を測定することで、素案の実用性を確認した。同時に、本県において大腸菌測定データの蓄積がある分析法で並行して測定し、結果の相関性を確認した。それにより、県内で測定されてきた過去の大腸菌測定データが今回作成する新たなSOPで測定する際の希釈倍率等の参考資料として利用できるのか検討した。

令和3(2021)年9月に行われた環境省の説明会で、将来的には工場排水でも大腸菌数の基準の適用を見据えているとの説明があったことを踏まえ、工場排水での実用性も併せて検討した。

2 調査内容及び方法等

2.1 試料

採水日と採水地点(検体名、河川名)を表1に示す。各地点とも500mL滅菌ポリ瓶を用いて、2本(予備を含む)を採水した。

2.2 分析法

告示法その他、過去の測定データがある分析法として従来の環境基準の大腸菌群数測定法であるBGLB培地-最確数法、及びクリプトスポリジウム指標菌の大腸菌数検査に用いているEC培地-最確数法を用いて測定した。

3 結果と考察

3.1 SOP素案の作成

3.1.1 培地の検討

告示法では酵素基質5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド(X-GLUC)を含む特定酵素基質寒天培地を使用することになっており、代表的な5種類の市販品を選択して検討した。その結果、繰り返し試験による変動係数の平均値及び標準偏差が最小で、他3種の培地と同等の結果を示した²⁾こと、ランニングコストが最小であったことから、日水製薬株式会社のXM-G寒天培地を選択した。

3.1.2 希釈液の検討

告示法に記載された滅菌ペプトン水、滅菌りん酸塩緩衝希釈水(PB)及び滅菌生理食塩水(生食)のうち、現在PBはBGLB培地-最確数法で、生食は工場排水のデソキシコレート寒天培地平板法で使用していることから、汎用性の高いこれら2つについて大腸菌液を用いて告示法により比較検討(n=3)した。その結果を表2に示す。計算上の想定値は 2.0×10^3 CFU/100mLであったため、より想定値に近い生食を選択した。

3.1.3 希釈系列の検討

告示法には、検水量は100mLとし、メンブランフィルター上のコロニー数が20~100個程度となるよう、10倍ごとに数段階の検水を調製するとの記載しかなく、妥当な希釈倍率の見当がつかなかったため、実際にクリプトスポリジウム指標菌である嫌気性芽胞菌のフィルター法検査に用いている希釈系列を参考に、×1、×2、×5、×20の10倍前後の4段階を検討した。また、令和3(2021)年8月に環境省から回答があったアンケート³⁾での、コロニーが

フィルター上に均一に点在して形成され、計数できる状態になっていればろ過水量を50mLとすることで2倍希釈したと見なしても構わないとの回答を基に、ろ過水量50mLを含む希釈倍率(×1、×2、×10、×20)に改め、告示法により比較検討(n=3)した。その結果を表3に示す。計算上の想定値は 2.6×10^2 CFU/100mLであり、僅かではあるが新たな希釈系列の方が想定値に近かった。加えて、準備する希釈液がすべて同量で済むことから、新たな希釈系列を採用することとした。想定値に近かった理由として、適当な希釈倍率がおおよそ10倍であったためと考える。

3.1.4 SOP素案の作成

以上の検討を元に作成したSOP素案のフロー図を図1に示す。

3.2 県内河川水等での大腸菌の測定

上記で作成したSOP素案に従い、県内河川水等を測定し、実用性を確認した。同時に、BGLB培地-最確数法及びEC培地-最確数法についても測定した。その結果を表1に示す。

工場排水1、2を除く測定結果について、大腸菌数/大腸菌最確数、及び大腸菌数/大腸菌群最確数の相関関係を調査した結果を図2及び図3に示す。

実施件数は9検体と少ないが、大腸菌数と大腸菌最確数については $R=0.96$ と強い相関が確認できた。従って、今後試験をするにあたり、過去のデータを参考にできる可能性が示された。一方で、大腸菌最確数のデータがあるのはクリプトスポリジウム検査の対象河川のみであり、汎用性は低いと考えられた。

大腸菌数と大腸菌群最確数については、 $R=0.41$ と相関性が低かったことから、環境省の調査結果と同様両者には整合性がなく、これまでのデータは参考にできないと考えられた。今回、基準の改正に至った理由の1つとして、大腸菌数と大腸菌群数には相関性がなく、ふん便汚染に関係のない細菌も大腸菌群数にカウントされてしまうといった課題があった。本県の結果も同様の理由と考えられた。

SOP素案に基づき県内河川水等においても検討結果と同様に測定することができ、実用性も確認できたので、SOP素案から大きく変更することなく、図1とほぼ同じ行程で最終的なSOPを作成した。

3.3 工場排水での大腸菌の測定

作成したSOPで工場排水を測定した結果を表1に示す。工場排水1において、大腸菌数が計数不良となっているが、その原因として2つの理由が考えられた。

第一に、浮遊物質量(SS)が61 mg/Lと高かったことが挙げられる。1倍においては100 mL全量を吸引る過できなかったほか、他の倍率においてもろ過に時間を要し、培養前からフィルター全体が青く染まってしまう、コロニーが判別できなかった。2倍の培養結果を図4に示す。この原因については明らかではないが、SSに含まれる何らかの成分が培地と反応したものと考えられた。

第二に、大腸菌群数が1300 個/cm²と高かったことが挙げられる。希釈倍率の最も高い20倍における培養結果を図5に示す。フィルター全体が大腸菌群数の紫のコロニーに染まり、大腸菌数の青いコロニーが滲ってしまった。

以上2つの結果を受け、SSが9 mg/Lと低めで、大腸菌群数が940 個/cm²と高めの別の検体(工場排水2)で大腸菌数のみ測定を試みた。その結果、図6に示すように河川水等と同様に測定できた。このことから、工場排水の測定ではSSの影響を多く受けることが示唆された。

4 まとめ

今回の検討により、SOP素案から最終的なSOPを作成し、新たな環境基準に対応できる分析環境を整えることができた。一方で、公共用水域常時監視により蓄積がある大腸菌群数のデータは、大腸菌数を測定する際の希釈倍率の決定等の参考資料として利用できないことが確認できた。今後、大腸菌群数しかデータの無い河川を検査する際、どのように希釈倍率の決定をするか検討する必要がある。

工場排水については、今回測定した2検体のみでも様々な問題点が浮上した。今回の告示法では大腸菌数のコロニーが20~100個となるように希釈することになっているが、SSや大腸菌群数等の影響により、目的である大腸菌数が計数できない場合には、試料の状況を勘案して希釈をする必要が出てくることも考え得る。現段階では環境省から具体的な提示はないが、今回の結果を踏まえ、今後は、今回作成したSOPに従って、実際に搬入のあった工場排水で適宜測定を実施し、基準の適用があった際に速やかに対応できるように検討を続けていく。

5 参考文献等

- 1) 環境庁、昭和46年12月告示第59号水質汚濁に係る環境基準について、付表10。
- 2) 渡邊圭司他、特定酵素基質培地で大腸菌数に影響を及ぼす因子、全国環境研会誌 Vol.44 No.3、135-142、2019。
- 3) 環境省、環境基準項目の「大腸菌群数」の「大腸菌数」への見直しに係るアンケートの「大腸菌数の測定方法」に対するご意見、ご質問事項及びその回答、2021年7月。

表1 測定結果

	採水日	検体名	河川名	大腸菌数	大腸菌最確数	大腸菌群最確数
				CFU/100mL	MPN/100mL	MPN/100mL
1	7月5日	清洲橋	思川	117	70	7000
2	7月19日	刈込湖		2.5	<1.8	130
3	7月26日	川堀付近	那珂川	38	17	13000
4	8月2日	高橋大橋	渡良瀬川	103	79	4600
5	8月11日	湯ノ湖		0.5	<1.8	70
6	10月25日	上御田橋	田川	21.5	23	940
7	11月1日	筋違橋	志渡沢川	37.8	23	4600
8	11月1日	横山橋	田川	10.5	4.5	1700
9	11月30日	工場排水1		計数不良	6300	>1600
10	11月9日	工場排水2		21		
11	12月21日	草川	鬼怒川	80	33	1300

表2 希釈液の比較検討結果 (大腸菌数)

	×1	×2	×5	×20	CFU/100mL	平均値
生食1	>100, >100	>100, >100	>100, >100	52, 57	1.0×10^3	1.2×10^3
生食2	>100, >100	>100, >100	>100, >100	55, 56	1.1×10^3	
生食3	>100, >100	>100, >100	>100, >100	62, 64	1.2×10^3	
PB1	>100, >100	>100, >100	>100, >100	33, 36	6.9×10^2	8.0×10^2
PB2	>100, >100	>100, >100	>100, >100	34, 42	7.6×10^2	
PB3	>100, >100	>100, >100	>100, >100	45, 51	9.6×10^2	

表3 希釈倍率の比較検討結果 (大腸菌数)

	×1	×2	×5	×10	×20	CFU/100mL	平均値
現1	>100, >100	>100, >100	34, 34		14, 16	1.7×10^2	2.0×10^2
現2	>100, >100	>100, >100	34, 35		6, 12	1.7×10^2	
現3	>100, >100	>100, >100	43, 54		10, 12	2.4×10^2	
新1	>100, >100	>100, >100		21, 23	3, 6	2.2×10^2	2.2×10^2
新2	>100, >100	>100, >100		19, 23	7, 8	2.1×10^2	
新3	>100, >100	>100, >100		16, 28	13, 17	2.2×10^2	

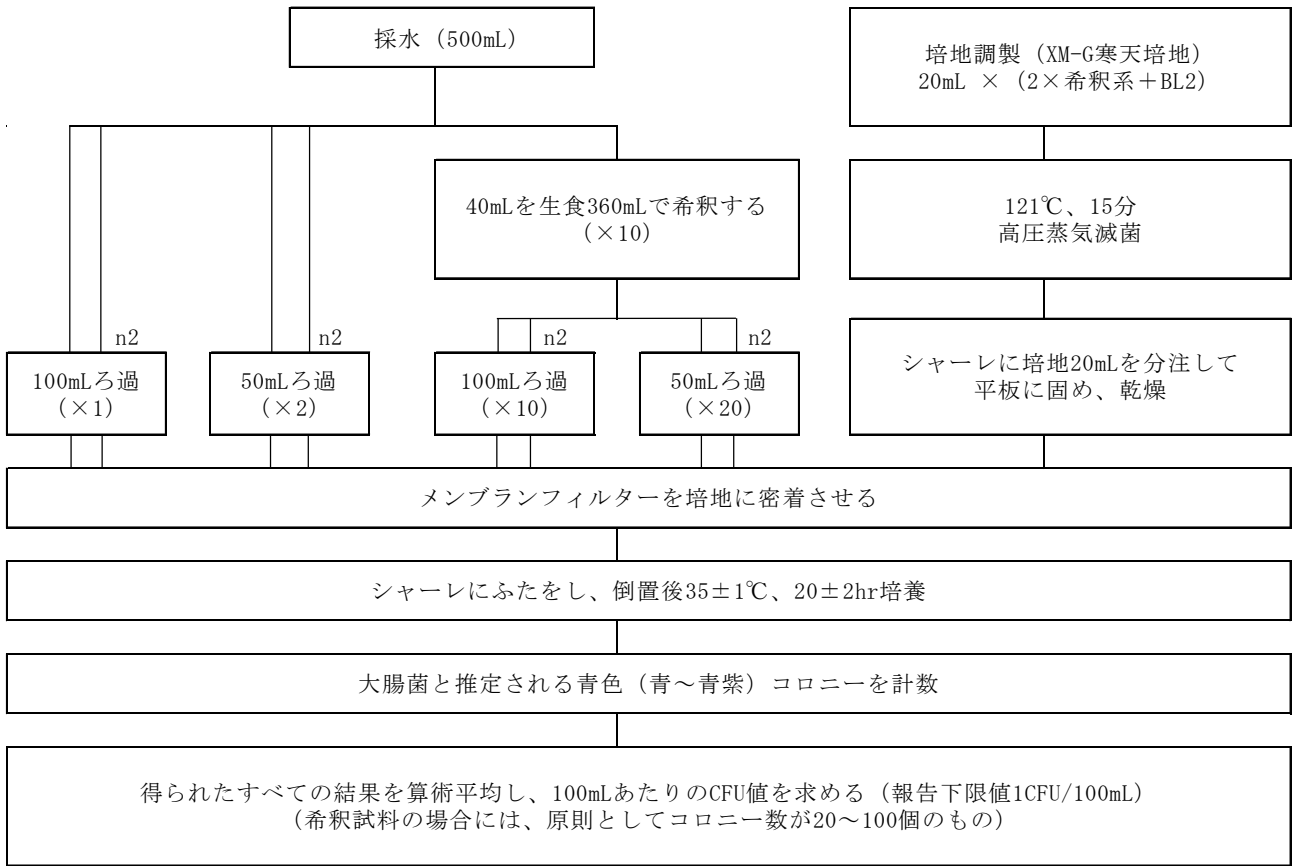


図1 SOP 素案フロー図

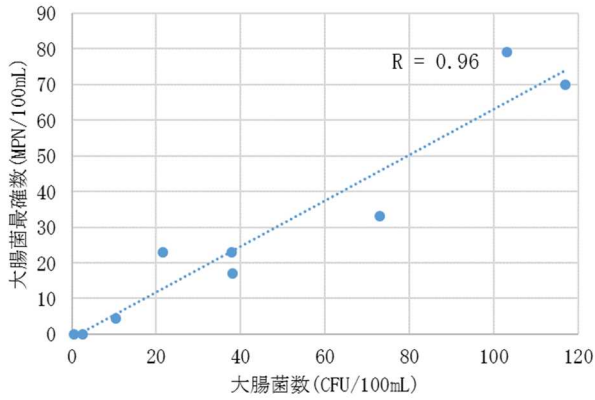


図2 大腸菌数/大腸菌最確数

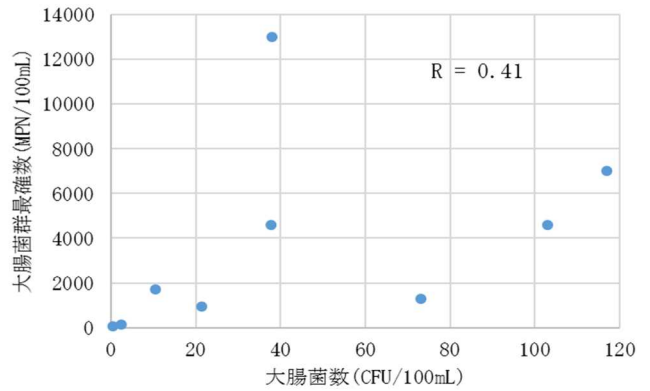


図3 大腸菌数/大腸菌群最確数

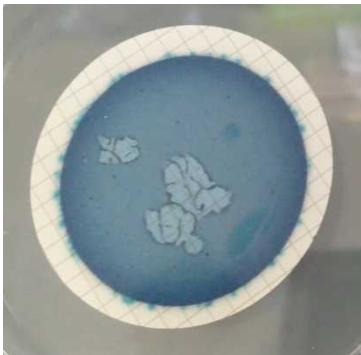


図4 工場排水1 (x2)

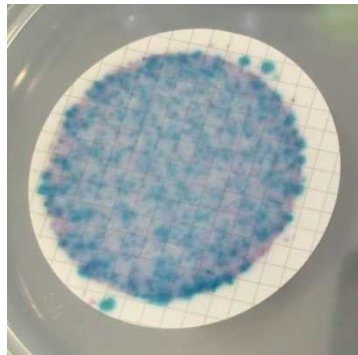


図5 工場排水1 (x20)

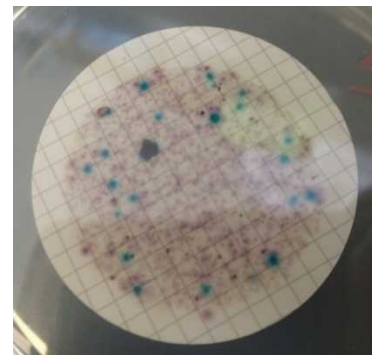


図6 工場排水2 (x1)