

1 2) 熊本県内河川における大腸菌及び大腸菌群の挙動

—特定酵素基質寒天培地を用いた疎水性格子付きメンブレン

フィルター法（HGMF 法）による調査結果（H23～H24）—

藤本 貴大 永田 武史 小笹 康人

要 旨

新たな環境基準として導入が検討されている、大腸菌数についての分析を熊本県内 33 地点の河川水に対して行い、HGMF 法による大腸菌数、大腸菌群数、従来法での大腸菌群数との比較を行った。

分析の結果、大腸菌群数に占める大腸菌数の比率は 0.0049～0.1285 の範囲であった。また、大腸菌群数については HGMF 法と従来の分析法との相関が 0.7995 であった。大腸菌数は水系によって違いが現れ、白川水系の白川合流前（黒川）、白川が流入する丹防橋（堀川）で他水系より高い傾向が見られた。

**キーワード：大腸菌数，大腸菌群数，特定酵素基質，
疎水性格子付きメンブランフィルター法**

はじめに

大腸菌は、し尿等による河川水等の環境水の汚染の指標とされ、大腸菌をはじめとした、乳糖を分解しガスを産生するグラム陰性の好気性または通性嫌気性の無芽胞桿菌の数（以下、「大腸菌群数」という。）は公共用水域の環境基準に定められている。本県では公共用水域の常時監視としてブリリアント・グリーン乳糖ブイヨン（BGLB）培地を用いた最確数による定量法（5 本法）により大腸菌群数の分析を行なっている。

BGLB 培地を用いた最確数による定量法（以下、「BGLB 法」という。）は操作が簡易で器具や試薬に係る費用も低いという長所を有するが、一方で分析精度が低く、再現性も良くないとされている。また、BGLB 法による測定結果は該当するグラム陰性菌に対するも

のであり、土壌等の自然中に存在する菌も含まれる。

そこで環境省においては、し尿等による汚染をより的確に把握するため、大腸菌に選択的に反応する酵素を含んだ培地（特定酵素基質寒天培地）を用いて大腸菌数の測定を行う分析法の導入を検討しており、平成 25 年度内に、大腸菌数の環境基準値（案）を作成する予定である¹⁾。このため、平成 23 年 3 月に環境省より測定法（暫定案）が示された¹⁾。

本研究は、大腸菌数についての研究例が全国的に少ないため²⁾、県内での現状を把握するため、暫定案に従い疎水性格子付きメンブレンフィルター法（以下「HGMF 法」という。）によって県内河川における大腸菌数、大腸菌群数を調査し、従来法である BGLB 法での大腸菌群数とそれぞれ比較しどの程度差が見られ

るか、また、水系及び採水月による違いについて検討を行ったので報告する。

調査方法

1 使用器材

特定酵素基質培地として、クロモアガー社製 ECC 培地を使用した。この ECC 培地には X-GLUC 及び Magenta-GAL の 2 種類の発色酵素基質が含まれている。大腸菌に特異的に含まれる β -グルクロニダーゼにより、X-GLUC が分解され、青色のコロニーとして発色する。また、大腸菌群（乳糖を分解するグラム陰性菌の総称）に含まれる乳糖分解酵素（ β -ガラクトシダーゼ）によって、Magenta-GAL が分解され、赤色のコロニーとして発色する。蒸留水 1ℓ に対して ECC 培地を 32.8g の割合で混合し、沸騰水浴中で加熱溶解させた後に滅菌シャーレに約 5mm の厚さになるように分注し凝固させたものを平板培地として使用した。

疎水性格子付きメンブランフィルターとして、GSI クレオス社製 ISO-Grid メンブランフィルターを使用した。このフィルターは孔径 0.45 μm であり、5cm×5cm の範囲を疎水性の格子で 1600 の区画 (40×40) に区切られている。各区画は一辺 1mm の正方形であり、格子の幅は 0.25mm である。

2 分析方法

環境省が提示した方法をもとに分析を行った。ファンネル付きのフィルターホルダーに保持されたメンブランフィルターに 1g/ℓ 滅菌ペプトン水約 45ml と河川水試料を適量 (5ml または 10ml) 注入し、吸引ろ過を行った。その後 1g/ℓ 滅菌ペプトン水約 30ml でファンネルを洗浄しながら、洗浄液も併せて吸引ろ過をした。

吸引ろ過後、メンブランフィルターをホルダーから外し、平板培地に貼り付け、37℃で 24 時間培養した。

培養後、青色のコロニーが発生した区画を数え、大腸菌数を以下の式より算出した。

$$a = [N \ln\{N/(N-x)\}] \times 100/V \tag{1}$$

a : 試料 100ml 中の大腸菌数[MPN/100ml]

N : 区画総数 (=1600)

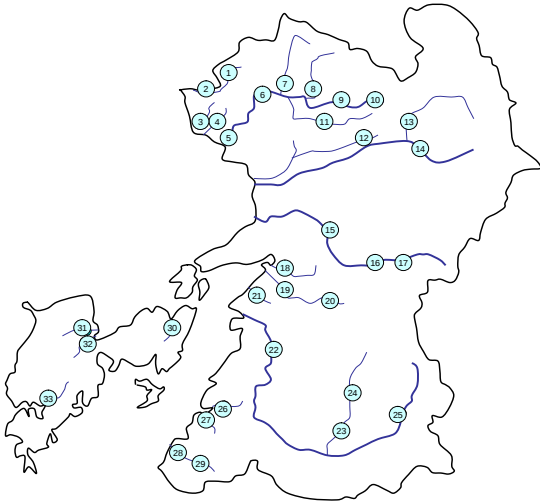
x : コロニーが発育している区画の数

V : ろ過に用いた試料の量(ml)

また、青色及び赤色のコロニーが発生した区画の合算値から(1)式より、大腸菌群数を算出した。

3 調査地点・期間

調査地点は環境監視地点のうち、当所が大腸菌群数を測定している 33 地点について、平成 23 年 10 月から平成 25 年 3 月にかけて BGLB 法と並行して HGMF 法による分析を行った。調査地点の位置について図 1 に示す。期間中の調査回数は 1 地点につき 5~18 回であり、検体数は 327 だった。



No	地点名	河川	No	地点名	河川	No	地点名	河川
1	助丸橋	関川	12	丹防橋	堀川	23	川辺大橋	川辺川
2	杉本橋	関川	13	白川合流前	黒川	24	藤田	川辺川
3	波筆家橋	菜切川	14	妙見橋	白川	25	一房ダム	球磨川
4	行末橋	行末川	15	乙女橋	緑川	26	柘橋	佐敷川
5	新大浜橋	菊池川	16	船津ダム	緑川	27	広瀬橋	湯の浦川
6	菰田橋	菊池川	17	津留橋	緑川	28	鶴田橋	水俣川
7	宗方	吉田川	18	上砂川橋	砂川	29	桜野橋	水俣川
8	袋田	上内田川	19	氷川橋	氷川	30	倉江橋	教良木川
9	木庭橋	菊池川	20	白岩戸橋	氷川	31	法泉寺橋	広瀬川
10	念仏橋	菊池川	21	第二大鞠橋	大鞠川	32	草積橋	亀川
11	藤巻橋	合志川	22	坂本橋	球磨川	33	一町田橋	一町田川

図 1 調査地点図

調査結果及び考察

1 調査結果の概要

大腸菌群数について全 327 検体の BGLB 法と HGMF 法との分析値との関係を図 2 に示す。2 つの手法間の相関係数は 0.7995 であった。

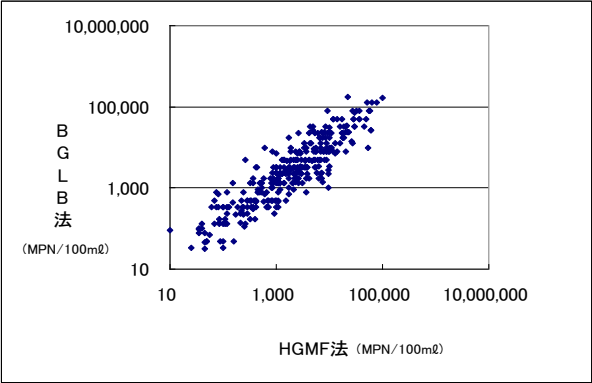


図 2 大腸菌群数の BGLB 法と HGMF 法での相関

各地点における、HGMF 法による大腸菌数及び大腸菌群数の調査結果（最小値，最大値，幾何平均値），BGLB 法による大腸菌群数の調査結果（最小値，最大値，幾何平均値）を表 1 に示す。なお，同一地点の測定値において値が大きく変わるため，本研究では大腸菌数，大腸菌群数の平均値についてのみ幾何平均値を用いた。

また，HGMF 法による大腸菌群数に占める大腸菌数の比率も併せて表 1 に示す。なお，幾何平均値の算出に際し，大腸菌数または大腸菌群数が不検出（N.D.）であったデータについては，報告下限値である 1MPN/100ml として算出した。

大腸菌群数について HGMF 法及び BGLB 法の幾何平均値を比較した結果，両者の比は 0.3861～1.5808 の範囲で，平均値は 0.7729 であり，同一地点においては HGMF 法による大腸菌群数の値が BGLB 法に比べ低くなる傾向が見られた。その理由について，それぞれの分析法で検出する菌種が異なるためと考えられるが，詳細は不明である。

大腸菌群数については生活環境の保全に関する環境基準が定められている（AA 類型：50 MPN/100ml，A 類型：1,000 MPN/100ml，B 類型 5,000 MPN/100ml）。

今回調査を行った地点で，環境基準の類型指定がされている 31 地点のうち，AA 類型では 7 地点中 0 地点，A 類型では 20 地点中 3 地点，B 類型では 4 地点中 2 地点で HGMF 法による大腸菌群数の幾何平均値が環境基準を下回っており，内訳は新大浜橋（A 類型），坂本橋（A 類型），川辺大橋（A 類型），波華家橋（B 類型），上砂川橋（B 類型）の 5 地点であった。なお，BGLB 法による大腸菌群数の幾何平均値では，AA 類型では 7 地点中 0 地点，A 類型では 20 地点中 1 地点，B 類型では 4 地点中 1 地点で環境基準を下回っており，内訳は川辺大橋（A 類型）及び波華家橋（B 類型）の 2 地点であった。AA 類型の河川で両分析法において環境基準を下回った地点が 0 なのは，AA 類型の環境基準が 50MPN/100ml と大変厳しく，達成は困難であるためこのような結果になったと考えられた。

幾何平均値で比較した場合，HGMF 法による大腸菌群数に占める大腸菌数の比率は 0.0049～0.1285 の範囲であった。比率についてほとんどの地点が 0.05 未満であったが，黒川の白川合流前及び川辺川上流の藤田については，それぞれ 0.1285 及び 0.0678 と高い値を示した。一方，一番低かったのは氷川の白岩戸で 0.0049 次いで湯の浦川の広瀬橋で 0.0071 であった。

和波ら²⁾は，東京都内河川を調査した結果，大腸菌

群数に占める大腸菌数の割合は 5%程度であったと報告しており，それと比較すると本県では大腸菌群数に占める大腸菌数の比率は東京都の河川に比べ低い地点が多いことがわかった。なぜこのような結果になったかの要因等についての検討は今後の課題とし，本県での調査を続ける。

大腸菌数については，白川水系である白川合流前及び白川の河川水が流入している丹防橋においては，大腸菌数が他の水系と比べ比較的高い値を示した。白川合流前（黒川）は調査地点の中で最も大腸菌数の幾何平均値が高く，大腸菌群数に占める大腸菌数の割合も最も高かった。

2 大腸菌数，大腸菌群数の変動について

調査地点のうち，調査回数が 10 回を超えている地点の大腸菌数，大腸菌群数及び水温との相関を図 3～5 に示す。

HGMF 法による大腸菌群数と水温の相関係数は 0.5339，BGLB 法による大腸菌群数と水温の相関係数は 0.3720 であり正の相関が見られ，水温の高くなる春から夏にかけて数が増加し，水温の低下する秋から冬にかけて数が減少していた。大腸菌数に関しては相関係数が -0.0355 と水温との相関は見られなかった。

草積橋及び坂本橋においては，他の地点と異なり，大腸菌数や大腸菌群数が特異的に高い値を示す調査月があった。

そこで，この 2 地点について大腸菌数や大腸菌群数と他の生活環境項目及び気象状況との関係について検討を行った。

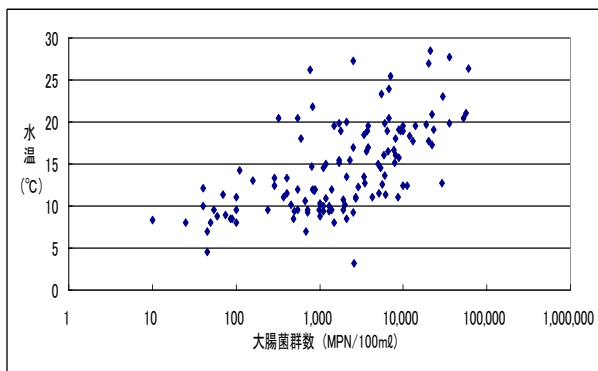


図 3 水温と大腸菌群数 (HGMF 法)

2.1 草積橋（亀川）の事例

草積橋における大腸菌数は，期間中 9 回の調査で，概ね 10～240 MPN / 100 ml であったが，平成 24 年 6 月の調査時において，10,000 MPN/100ml という特異的な値を示した。大腸菌群数についても，概ね 820～10,000

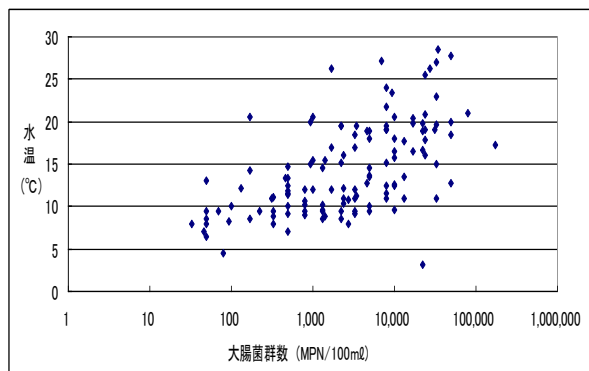


図 4 水温と大腸菌群数 (BGLB 法)

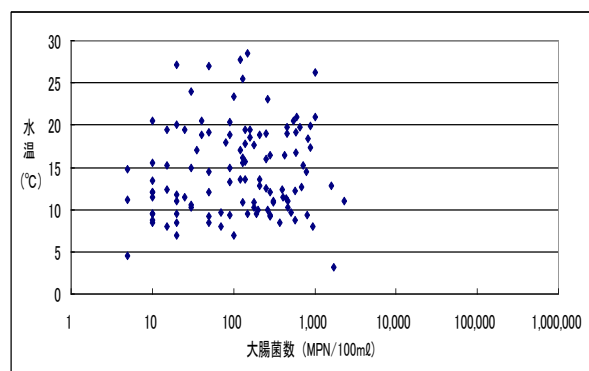


図 5 水温と大腸菌数 (HGMF 法)

MPN / 100 ml であったものが、平成 24 年 6 月は 78,000 MPN / 100 ml と最も高い値を示した。

各調査月における大腸菌数、HGMF 法による大腸菌群数、生活環境項目 (BOD, COD, SS) 及び採水前 24 時間の降水量、採水前 1 週間の降水量 (本渡アメダスデータ) の値を表 2 に示す。

表 2 草積橋の調査結果

調査 年月日	大腸菌数	大腸菌群数	水温 (°C)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	SS (mg/L)	24h 降水量 (mm)	1週間 降水量 (mm)
2011/10/11	200	10,000	25	0.8	2.4	4	0	0
2011/12/6	170	2,900	12	0.5	0.7	1	0	23
2012/2/21	140	820	8	0.5	1.5	1	0	9
2012/4/18	10	1,000	20	0.5	2.1	4	0	6
2012/6/5	10,000	78,000	22	0.8	3.1	9	9	10.5
2012/8/1	120	17,000	29	0.5	2.1	5	0	10.5
2012/10/3	240	8,300	25	0.6	2.8	5	0	24
2012/12/11	80	1,200	8.5	0.5	1.6	2	0	18
2013/2/20	60	1,400	9.5	0.5	2.0	4	0	59

注) 大腸菌数、大腸菌群数の単位: MPN/100ml

BOD, COD, SS のいずれについても、平成 24 年 6 月の値はその他の月の平均値よりもやや高い値であった。平成 24 年 6 月については採水前 24 時間で 9mm の降水があった。調査日前の一週間の降水量は 10.5mm であった。平成 25 年 2 月には、24 時間降水量が 0mm、調査日前の一週間の降水量は 59mm あったが、大腸菌

数は 60 MPN / 100 ml、大腸菌群数は 1,400 MPN / 100 ml と高くはなかった。以上のことから、平成 24 年 6 月の特異的な値は採水前 24 時間の降水が要因となったと考えられる。

2.2 坂本橋 (球磨川) の事例

坂本橋における大腸菌数は、期間中 18 回の調査で、概ね不検出(N.D.)~210 MPN / 100 ml であったが、平成 24 年 7 月の調査時において大腸菌数が 1,000 MPN/100ml という比較的高い値を示した。大腸菌群数についても、概ね 10~2,500 MPN / 100 ml であったものが、平成 24 年 7 月は 60,000 MPN / 100 ml と最も高い値を示した。

各調査月における大腸菌数、HGMF 法による大腸菌群数、生活環境項目 (BOD, COD, SS) 及び採水前 24 時間の降水量、採水前 1 週間の降水量 (一勝地アメダスデータ) の値を表 3 に示す。

表 3 坂本橋の調査結果

調査 年月日	大腸菌数	大腸菌群数	水温 (°C)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)	SS (mg/L)	24h 降水量 (mm)	1週間 降水量 (mm)
2011/10/5	N.D.	1,700	20	0.7	0.8	1	1.5	21.5
2011/11/22	90	1,800	19	0.8	1.8	2	0	65.5
2011/12/7	10	410	13	0.5	1.0	2	0	22
2012/1/18	10	240	9.5	0.8	1.8	2	0	19
2012/2/1	N.D.	10	8.3	0.7	1.6	2	0	0
2012/3/7	210	2,100	14	0.6	1.8	5	0	60
2012/4/10	N.D.	110	14	0.6	1.2	1	0	0
2012/5/15	40	540	21	0.5	1.3	3	13	25
2012/6/5	N.D.	830	22	0.9	2.3	3	4.5	11.5
2012/7/17	1,000	60,000	26	0.5	2.7	57	18	300
2012/8/7	20	2,500	27	0.6	1.3	4	0	9.5
2012/9/12	N.D.	770	26	0.5	1.5	3	0	9.5
2012/10/16	10	320	21	1.0	1.7	2	0	0
2012/11/14	130	2,300	16	0.5	1.8	3	21.5	50.5
2012/12/4	50	880	12	0.5	1.8	3	5	22.5
2013/1/9	10	60	8.8	0.5	1.1	2	0	0
2013/2/13	50	490	8.5	0.5	1.6	7	15	30
2013/3/6	10	70	11	0.5	1.0	4	0	31.5

注) 大腸菌数、大腸菌群数の単位: MPN/100ml

平成 24 年 7 月の調査時には採水前 24 時間の降水量が 18mm あり、大腸菌数や大腸菌群数とともに SS が特異的に高い値であった。

平成 24 年 7 月の調査では、調査日の一週間前から上流域で大規模な降水 (人吉のアメダスデータでは 7 月 11 日から 7 月 14 日にかけて 201.5mm の降水) があり、河川の SS が増加し、それにともない大腸菌数及び大腸菌群数が増大したと考えられた。

一方、平成 24 年 11 月の調査では、採水前 24 時間の降水量が 21.5mm と 7 月より多かったが、上流域の人吉における調査日前の一週間の降水量は 37mm と低く、

大腸菌や大腸菌群は増加しなかった。

まとめ

本研究では、特定酵素基質を用いた HGMF 法による大腸菌数及び大腸菌群数の調査を行い、従来法である BGLB 法との比較及び地点や調査月による結果の差異の要因について検討を行った。

大腸菌群数における HGMF 法と BGLB 法の 2 種類の分析手法間の相関係数は 0.7995 であった。また、大腸菌群数についての HGMF 法と BGLB 法の幾何平均値の比は平均 0.77 であり、HGMF 法が BGLB 法よりやや低い値を示す傾向が見られた。

HGMF 法によって分析された大腸菌数の大腸菌群数に占める比率は 0.0049～0.1285 の範囲であり、大腸菌数の占める比率から大腸菌群の大部分は土壌等自然由来のものが多く、し尿等による汚染に由来するものではない可能性が示唆された。大腸菌群数による環境基準に対する評価では、浄化槽の発達、下水道の普及、

農業の化学肥料化等が進んだ現在において過去の基準では現状にそぐわず、し尿等による汚染の程度を適切に表していない可能性があることが本調査でも示された。

草積橋（亀川）と坂本橋（球磨川）の事例を比較した結果、亀川のような小規模河川では採水前 24 時間の降水が大腸菌数や大腸菌群数の増大に影響しているが、球磨川のような集水域の大きな河川では、一週間前の降水が大腸菌数や大腸菌群数の増大に影響していることがわかり、河川の規模により大腸菌数の変動の要因が異なることが明らかとなった。

文献

- 1) 環境省：環境省水・大気環境局水環境課長通知，
環水大水発第 110324001 号，平成 23 年 3 月 24 日
- 2) 和波一夫，石井真理奈，木瀬晴美：東京都環境科学研究所年報， 9-19 （2010）

表 1 各地点調査結果

地点名	環境基準 類型	調査回数	大腸菌数 [MPN/100mL]			大腸菌群数 (HGMF法) [MPN/100mL]			大腸菌数/大腸菌群数 (HGMF法)			大腸菌群数 (BGLB法) [MPN/100mL]		
			最小	最大	幾何平均	最小	最大	幾何平均				最小	最大	幾何平均
木庭橋	AA	9	10	60	27	100	6,400	770	0.0351			130	3,300	783
念仏橋	AA	6	N.D.	15	4	35	1,100	264	0.0168			33	490	167
妙見橋	AA	17	20	890	145	290	36,000	2,980	0.0488			490	49,000	3,960
津留橋	AA	18	N.D.	140	14	40	14,000	419	0.0334			46	7,900	489
藤田	AA	8	N.D.	60	11	35	1,400	167	0.0678			31	1,300	223
市房ダム	AA	18	N.D.	160	10	N.D.	8,000	277	0.0351			33	10,000	410
桜野橋	AA	9	N.D.	160	29	120	7,600	1,150	0.0251			330	4,900	994
助丸橋	A	10	90	600	214	1,000	56,000	6,420	0.0333			490	79,000	8,780
杉本橋	A	10	20	890	262	710	53,000	6,940	0.0377			330	172,000	10,500
新大浜橋	A	8	N.D.	30	13	80	4,300	610	0.0210			230	13,000	1,580
菰田橋	A	6	90	950	291	2,600	27,000	6,190	0.0470			2,500	13,000	5,150
藤巻橋	A	18	30	2,300	220	980	36,000	5,560	0.0396			3,300	49,000	10,200
丹防橋	A	9	110	1,200	312	880	59,000	6,800	0.0458			1,400	79,000	11,500
白川合流前	A	17	90	1,700	471	500	23,000	3,670	0.1285			790	49,000	6,630
乙女橋	A	6	30	70	46	410	16,000	1,670	0.0278			490	33,000	3,260
船津ダム	A	6	N.D.	90	15	220	36,000	1,080	0.0136			490	79,000	2,290
氷川橋	A	9	N.D.	1,000	40	120	19,000	1,230	0.0324			130	17,000	1,980
白岩戸	A	5	N.D.	30	9	1,000	3,500	1,860	0.0049			490	4,900	1,670
坂本橋	A	18	N.D.	1,000	14	10	60,000	576	0.0245			93	27,000	1,310
川辺大橋	A	9	N.D.	70	14	35	4,100	306	0.0458			49	4,900	451
梶橋	A	9	10	310	52	150	14,000	1,570	0.0329			170	49,000	1,850
広瀬橋	A	9	N.D.	50	11	330	8,500	1,560	0.0071			330	17,000	1,610
鶴田橋	A	9	N.D.	150	32	240	6,900	1,240	0.0257			130	13,000	2,230
倉江橋	A	9	10	150	41	240	10,000	1,410	0.0292			230	10,000	1,950
法泉寺橋	A	9	30	280	86	830	30,000	3,740	0.0230			790	70,000	3,570
草積橋	A	9	10	10,000	159	820	78,000	4,240	0.0376			330	130,000	6,000
一町田橋	A	9	40	470	103	70	61,000	2,060	0.0499			130	27,000	2,340
波華家橋	B	9	10	740	79	450	18,000	2,710	0.0291			940	27,000	3,770
行末橋	B	9	20	750	143	2,200	100,000	9,430	0.0151			1,700	170,000	13,900
上砂川橋	B	9	N.D.	1,700	104	80	62,000	2,890	0.0358			330	130,000	7,160
第二大鞆橋	B	9	110	580	273	1,700	52,000	10,700	0.0255			1,700	130,000	12,300
宗方		6	20	240	111	590	26,000	4,170	0.0266			460	14,000	4,020
袋田		6	80	240	110	990	18,000	3,710	0.0298			1,700	17,000	4,800