

4) 特定酵素基質寒天培地による事業場排水中の大腸菌数の測定

永田武史 中堀靖範

要 旨

水質汚濁防止法等における事業場排水の規制においては、ふん便性の汚染に係る項目として従来、大腸菌群数が用いられてきた。1980年代以降、ふん便性を示す大腸菌のみを検出することが可能な培地の開発が進んだことから令和7年度(2025年度)より大腸菌群数による規制が大腸菌数による規制に変更された。

これまで本研究所においては事業場排水を対象とした大腸菌数の測定実績がなかったことから、令和6年度(2024年度)に搬入された73事業場の排水について大腸菌と大腸菌群を測定し、国が実施した実態調査との比較を行った。大腸菌群数または大腸菌数の規制基準超過が見られた4事業場のうち、大腸菌数と大腸菌群数との比が国の報告と比較して極端に小さい事例がみられた。

キーワード：大腸菌数，大腸菌群数，特定酵素基質培地，水質汚濁防止法

はじめに

グラム陰性無芽胞桿菌の一種であり、動物の腸内に生息する大腸菌は、他のふん便性の細菌と比較して動物の体内からの排出後の生残期間が短く、排出後増殖しないことなどから公共用水域におけるふん便性の汚染の指標として適切であるとされている¹⁾。しかしながら、本国において、水質汚濁に係る環境基準の設定(昭和46年12月28日環境庁告示第59号)及び、水質汚濁防止法(昭和45年法律第138号)に規定された特定事業場の排水基準の設定が行われた昭和45~46年(1970~1971年)時点では、大腸菌自体を簡便に測定する技術がなかったため、水環境におけるふん便性汚染の指標として比較的容易に測定できる大腸菌群数が採用された。ここで大腸菌群とは、大腸菌とよく似た性状の菌群であり、具体的にはグラム陰性無芽胞桿菌のうち、乳糖を分解して酸とガスを発生させる全ての菌を指す。大腸菌群に属する細菌類の中には、河川や土壌といった環境中に生息する種も多数存在することから、これまでも汚染実態を過大評価しているという問題が指摘されてきた^{1,2)}。

1980年代から1990年代にかけて、微生物が特異的に代謝する基質に色原体(発色もしくは発光物質)を標識した特定酵素基質を含有した培地(特定酵素基質培地)の開発及び普及が進み、大腸菌についても選択的に発色する特定酵素基質が開発された³⁾。そのことから、公共用水域における環境基準は令和4年度(2022年度)から大腸菌のみを対象とした大腸菌数が大腸菌群数に代わって

水質汚濁の指標となった⁴⁾。その後、水質汚濁防止法に基づく工場・事業場の排水基準も見直され、令和7年(2025年)4月1日付けで従来の大腸菌群数による規制から大腸菌数による規制(大腸菌群数3,000個/cm³から大腸菌数800CFU/mLに変更)に見直され、その測定にあたっては5-ブロモ-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とされた⁴⁾。

工場・事業場の排水規制の見直しにあたり、環境省は平成29年度から令和元年度(2017年度から2019年度)にかけて、下水道終末処理施設や旅館業、畜産業に係る施設等の排水実態調査を実施し、大腸菌群数と大腸菌数の測定値から大腸菌数と大腸菌群数の比を0.28と算出した⁴⁾。また、国土交通省は下水道終末処理施設の放流水について同様の調査を行い、大腸菌群数100個/mL以上3000個/mL以下の範囲の検体においては大腸菌数と大腸菌群数の比を0.29と算出した⁵⁾。

本県においては、県内の河川水については大腸菌数と大腸菌群数の測定を実施しており、大腸菌数と大腸菌群数の比は0.0049~0.1285の範囲であったことを報告している⁷⁾。一方、事業場排水については本研究所ではこれまで大腸菌数の測定実績がなかった。今回、事業場指導への参考となる知見を得ることを目的とし、特定酵素基質培地を用いた大腸菌数及び大腸菌群数の測定を実施し、環境省及び国土交通省の結果との比較を行うとともに業種別の傾向について調査した。

測 定

令和 6 年 (2024 年) 5 月から 12 月にかけて搬入された水質汚濁防止法及び熊本県生活環境の保全等に関する条例の対象となる 73 事業場の排水水について、大腸菌及び大腸菌群の測定を実施した。

大腸菌数の測定は、環境大臣が定める排水基準に係る検定方法 (昭和 49 年 9 月環境庁告示第 64 号) で引用される下水の水質の検定方法等に関する省令 (昭和 37 年厚生省・建設省令第 1 号, 令和 7 年 4 月 1 日改正施行) に基づき混釈法により実施し、培地には島津ダイアグノスティクス株式会社製 XM-G 寒天培地 (以下、「XM-G 培地」という。) を使用した。XM-G 培地には特定酵素基質として X-GLUC が含まれており、大腸菌が特異的に保有・産生する酵素 β -グルクロニダーゼにより分解される際に青色のコロニーが生成される。また、特定酵素基質として 5-ブロモ-6-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (MAGENTA-GAL) が含まれており、MAGENTA-GAL が、大腸菌群が特異的に保有・産生する酵素 β -ガラクトシダーゼにより分解される際に赤色のコロニーが生成される。この青色のコロニー数を XM-G 培地による大腸菌数、赤色及び青色コロニーの合計数 XM-G 培地による大腸菌群数として測定した。

また、同一の検体について改正前の同省令に基づく大腸菌群数を測定した。培地には栄研化学株式会社製デソキシコレート培地を用いた。

測定結果及び考察

今回測定を実施した 73 検体を事業場の代表特定施設等で分類したものを表 1 に示す。73 検体のうち大腸菌または大腸菌群が有意 (検体 1mL あたり 10 コロニー以上) に検出されたのは 25 事業場であった。

表 1 測定した検体の施設種類の内訳等

施設種類 (水濁法特定施設、条例排水施設)	検体数	大腸菌または大腸菌群 が有意に検出された検 体数	
下水道終末処理施設	13	5	
し尿処理施設 (501人槽以上の浄化槽)	23	5	
小規模し尿処理施設 (201人槽以上500人槽以下の浄化槽)	8	3	
野菜又は果実を原料とする 保存食料品製造業	3	3	
豚房施設	2	2	
その他	旅館業	7	1
	その他	17	6
計	73	25	

XM-G 培地で検出された大腸菌群のコロニー数 (青色コロニー数と赤色コロニー数の合計) とデソキシコレート培地で検出されたコロニー数との関係を図 1 に示す。両者の相関係数は 0.85 であり、ほぼ一次関数に近い関係であった。25 検体のうち、17 検体において XM-G 培地のほうがデソキシコレート培地よりも多く検出され、その比の平均値は 2.54 であった。東京都健康安全研究センターの福井ら⁸⁾の報告によれば、XM-G 培地で培養した場合、同一試料をデソキシコレート培地で培養した場合と比較して大腸菌群数が 1.4~2.8 倍の比で計測される結果が示されており、本測定の傾向は福井らの報告に一致する。

XM-G 培地で検出された大腸菌数 (青色コロニー数) とデソキシコレート培地で検出された大腸菌群数の関係を図 2 に示す。相関係数は 0.87、大腸菌数と大腸菌群数との比の平均は 0.084 であった。本研究における測定結果全体では、大腸菌数と大腸菌群数との比は環境省及び国土交通省が実施した調査結果(0.28~0.29)と比較して小さい値となった。大腸菌数及び大腸菌群数の検出状況についての業種別の傾向については、検体数が少ないこともあり、顕著なものは見られなかった。

測定した 73 事業場の検体のうち、排水基準である大腸菌群数 3,000 個/cm³ または大腸菌数 800 CFU/mL を超過したものは 4 検体であった。該当する事例について、図 2 上に記号 A~D を記し、事例の詳細について表 2 に示す。

4 事例のうち、大腸菌群数と大腸菌数の両方で排水基準不適合であったものは 1 事例(A)、大腸菌群数では基準不適合であったものの大腸菌数では適合であったものが 2 事例(B,C)、逆に大腸菌群数では適合だったものの大腸菌数では不適合であったものが 1 事例(D)であった。

事例 C については、大腸菌数と大腸菌群数との比が極端に小さかった (0.001)。当該事業場の立入時の野帳では、敷地境界の沢で採水し、沢水が排水経路に混入している可能性について記録されていた。このことから、事例 C については、敷地内の沢の土壌等に生息している大腸菌群が検出された可能性が示唆された。

ま と め

本研究において、73 事業場の排水について、XM-G 培地による大腸菌数、及びデソキシコレート培地による大腸菌群数測定を実施し、うち 25 検体で有意に大腸菌または大腸菌群が検出された。

大腸菌数と大腸菌群数の比の平均は 0.084 であり、環境省及び国土交通省が実施した排水実態調査の結果 (0.28~0.29) と比較して小さな値であり、また、事例 C といった非常に低い値を示した検体もあった。その原因として

は事業場排水への沢水の混入によりふん便性ではない大腸菌群が検出された可能性が考えられた。なお、大腸菌数及び大腸菌群数の検出状況については、業種別の顕著な傾向は見られなかった。

令和 7 年 4 月の排水基準の変更によって、従来の大腸菌群数での規制では不適合とされた排水において、大腸菌数では基準適合となる事例、またはその逆の事例が現れる可能性もあることも判明した。

大腸菌数は対象となる菌種がふん便性由来のものに限定されることから、大腸菌数の測定は従来の大腸菌群数の測定よりも事業場排水の適切な水質の把握及び施設管理に資すると考えられる。

文 献

- 1) 鈴木祥広, 西山正晃, 糠澤桂, 石井聡: 水環境学会誌, 41, 19-26 (2018).
- 2) 和田桂子 辻内宏幸, 今村陸人, 立花和昭: 水環境学会誌, 48, 1-10 (2025).
- 3) E. W. Frampton, L Restaino, N. Blaszkoj : *J. Food. Prot.*,

51, 402-404 (1988).

- 4) 環境省: 水質汚濁に係る環境基準の見直しについて (お知らせ) <https://www.env.go.jp/press/110052.html> (2025 年 9 月時点).
- 5) 環境省: 令和 5 年度 大腸菌群数の排水基準の見直しに係る検討会会議資料 https://www.env.go.jp/press/press_02036.html (2025 年 9 月時点).
- 6) 国土交通省: 下水道における水系水質リスク検討会 会議資料 https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/sewerage/mizukokudo_sewerage_tk_000447.html (2025 年 9 月時点).
- 7) 藤本貴大, 永田武史, 小笹康人: 熊本県保健環境科学研究所報, 42, 103-108 (2012).
- 8) 福井理恵, 下島優香子, 西野由香里, 黒田寿美代, 山崎華恵子, 畠山薫, 鈴木淳, 貞升健志: 東京健安研七々報, 71, 153-157 (2020).

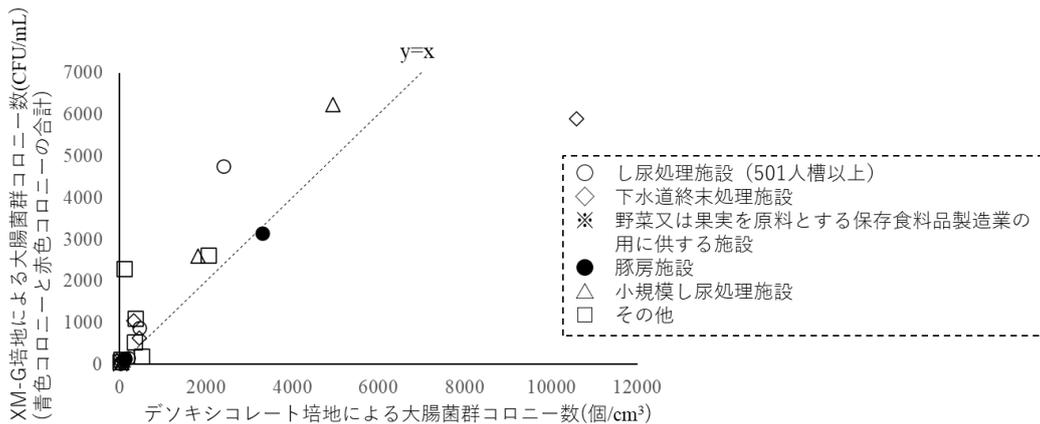


図 1 デソキシコレート培地と XM-G 培地における大腸菌群数の関係 (グラフ内の破線は両培地における大腸菌群数の比が 1:1 に対応)

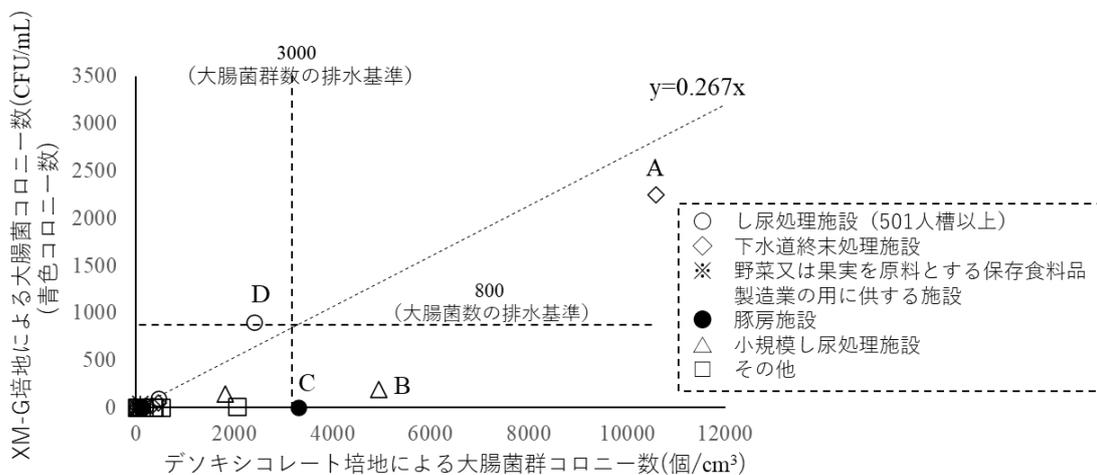


図 2 大腸菌群数 (デソキシコレート培地) と大腸菌数の関係 (図中 A~D は表 2 に示した事例の事業場の結果を示す。)

表 2 大腸菌群数が 3000 個/cm³ または大腸菌数が 800 CFU/mL 以上検出された事例

事業場	施設種類	大腸菌群数		大腸菌数		大腸菌数/大腸菌群数
		測定結果 (個/cm ³)	判定	測定結果 (CFU/mL)	判定	
A	下水道終末処理施設	10600	不適合	2250	不適合	0.212
B	小規模し尿処理施設 (201人槽以上500人槽以下の浄化槽)	4950	不適合	197	適合	0.040
C	豚房施設	3300	不適合	3	適合	0.001
D	し尿処理施設 (501人槽以上の浄化槽)	2400	適合	905	不適合	0.377