大分県の水環境における細菌学的調査

古川　隼士[1]・渋田　一輝[2]・藤堂　有香[2]

[1]都市・環境工学科，[2]都市システム工学科

近年，河川や沿岸域等の水環境において，ふん便に由来する病原性微生物によって汚染されることがたびたび問題となっており，ヒトへの感染・発症リスクはそれほど低くないといわれている．本研究では，病原性微生物の存否の指標となるふん便指標細菌の汚染状況を把握するために，大分県内の河川と沿岸域を対象に，ふん便性大腸菌群（FC）と腸球菌（ENT）のモニタリング調査を実施した．調査期間は2012年6月～12月とし，毎月一回の調査を実施した．各調査地点において，FC，およびENTはそれぞれBDL（Below detection limit，検出下限値以下）～1.0×10^4 CFU/100 mL，およびBDL～3.6×10^3 CFU/100 mLの範囲で検出された．いずれのふん便性細菌も調査地点，および調査日によって大きく変動した．沿岸域の調査地点は河川と比較して細菌数は低かった．

キーワード：ふん便汚染，水環境，ふん便性大腸菌群，腸球菌，細菌学的水質

１．はじめに

沿岸都市域では，上流域において，生活や産業活動等に利用され適切に処理された水を，再度取水し，水資源として利用する。利用した水は，上流域と同様に適切に処理されたあと沿岸域へと排出される。このような水利用システムにおいて，各種排水中に残存する汚濁物質，有機汚濁物質，あるいは微生物が河川や，沿岸域等にも流入する可能性がある．下水道や浄化槽の整備，あるいは工場排水等の規制によって，水環境の微量有害物質や微生物による汚染は劇的に低減・改善されたといえる今日においても，河川や湖沼等の陸水のみならず，沿岸域においても水系感染症を引き起こす病原性微生物（クリプトスポリジウム，ジアルジア，ノロウイルス，病原性大腸菌等）によって汚染されるという問題が発生している[1, 2]．このような病原性微生物による感染症事例[3, 4]，あるいは河川，沿岸域，および海域等の水環境における検出事例[5, 6]は，ここ数十年ほどの間に数多く報告されており，社会的な注目を集めている．

沿岸環境の公衆衛生が重要視されているアメリカでは，病原性微生物の存否，および潜在的リスクの指標であるふん便指標細菌のガイドラインを制定している[7, 8]．さらに，沿岸域レクリエーション用水域等の利水・親水域における細菌学的安全性を確保するために，ふん便性大腸菌群，大腸菌，および腸球菌のモニタリング調査や検出方法の開発に関する研究が積極的に推進され，知見・状況が蓄積されている[9-11]．我が国では，河川や沿岸域を対象とした細菌学的調査がスポット的に実施され，ふん便性細菌による汚染状況に関する報告がなされている[12-14]．しかしながら，全国的にみると，継続的に実施された調査事例はそれほど多くなく，知見・情報は乏しいのが現状である．

水環境における人間の健康リスクを管理するためには，その原因となる病原性微生物を直接検出することがもっとも評価しやすい[15]．しかしながら，多くの病原性微生物は，河川や沿岸域において極めて低濃度で存在している．そのため，これらの微生物を検出するためには，時間，コスト，および非常に高度な技術が要求されるといった制約があり，有効な検出方法の開発には至っていない[16, 17]．したがって，水環境における病原性微生物の存否，ふん便汚染状況は，ふん便汚染指標細菌と総称される代替微生物を用いるのが一般的である．古くから，全大腸菌群およびふん便性大腸菌群が，河川，沿岸域，および養殖場におけるふん便汚染指標細菌として広く用いられている．しかしながら，現在において，これらの細菌の生態，および環境中における挙動（生存性や増殖性）等について，病原性微生物と異なる点が多く存在することが指摘され，指標細菌としては限界があるといわれている[18]．そこで現在では，大腸菌や腸球菌が用いられることが多く，アメリカ環境保護庁もこれらの細菌をふん便汚染指標細菌として基準を制定している[7, 8]．

このような背景から本研究では，大分県内の河川，および沿岸レクリエーション用水域を対象として，ふん便性大腸菌群（FC）および腸球菌（ENT）の実態調査を実施し，大分県内におけるふん便汚染の汚染状況を把握すること

を目的とした.

２．実験方法と材料

(1) 調査概要

調査は，大分市内の志生木川，大野川，および大分川（小野鶴橋，舞鶴橋），別府市内の朝見川，および春木川，ならびに沿岸レクリエーションエリアである大志生木海水浴場，神崎海水浴場，および田ノ浦ビーチを対象とした（図 - 1）．2012年6月から12月までの期間に，計7回の調査を実施した.

(2) 試料採取と測定項目

河川水は，表層水を採取しポリエチレン瓶に保存した．沿岸水は波打ち際から約10 m以内の水深約50 cmの表層水を採取しポリエチレン瓶に保存した．採取した試料は実験室に持ち帰り，直ちに各種項目の分析に使用した.

分析項目は，FCおよびENT，ならびに一般水質項目として水温，pHおよび濁度を測定した．水温は試料採取時に棒状水温計を用いて測定した．pHおよび濁度は，水試料を実験室に持ち帰ってから分析した．降水量は気象庁のホームページ上に公開されている日降水量データを用いた[19].

(3) 細菌計数法

FCおよびENTの計数はメンブランフィルター法に従って実施した．メンブランフィルター（孔径0.45 μm，Advantec）をろ過器に設置し，10 mLあるいは100 mLの試料水をろ過した．細菌の濃度が高いと思われる試料については10～100倍希釈し，希釈した試料10 mL（最終容量）をろ過した．FCは，mFC寒天培地（DIFCO）にフィルターを置き，44.5±0.2 ℃で24時間水培養後，フィルター上の青色のコロニーを計数した．ENTは，クロモカルト腸球菌寒天培地（MERCK MILLIPORE）にフィルターを置き，37.0±1.0 ℃で24時間培養後，フィルター上の紫色のコロニーを計数した．各細菌数は，3連のものを平均し100 mLあたりに換算した．FCおよびENTの検出下限値はいずれも1.0 CFU/100 mLであり，それ以下の細菌数はBDL（Below detection limits：検出下限値以下）として示した.

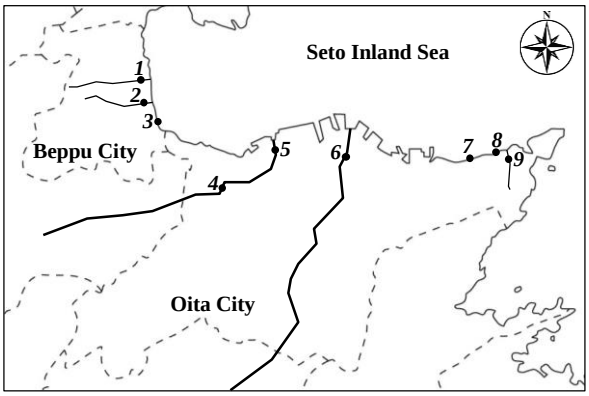

図 - 1 調査地点（1：春木川，2：朝見川，3：田ノ浦ビーチ，4：大分川（小野鶴橋），5：大分川（舞鶴橋），6：大野川，7：神崎海水浴場，8：大志生木海水浴場，9：志生木川）

３．結果および考察

(1) 一般水質項目

表－1に各調査地点の水試料の水温，pH，および濁度を示す．水試料の水温はすべての地点において8.2～29.4の範囲で変動した．冬季の採取日において，河川水の水温は10 ℃を下回ることがあった．水温の平均値は春木川が最も高かった．pHは，7.0～8.7の範囲であった．濁度は，平均値で比較すると，地点によって大きく変動した．濁度の平均値が最も高かった地点は大野川であり，最大値は9.3度であった．また，各地点の濁度は，調査日によっても変動した.

(2) 試料水中のふん便性細菌数

表－2に各調査地点の水試料のFCとENTの細菌数を示す．FCの細菌数は，調査期間においてBDL～1.0×10^4 CFU/100 mLの範囲で検出された．しかしながら，FCは複数回の調査日，およびいくつかの調査地点において計数不可，すなわちメンブランフィルター法による計数上限値を超えて検出されることがあった．この際に用いた水試料の希釈倍率とコロニーの密集状態を考慮すると，計数不可であった水試料中には少なくとも10^3 CFU/100 mL以上のFCが存在していたと推察された．各調査地点のFCの平均値を比較すると，最も高い濃度で検出された地点は春木川であり，そ

表-1 一般水質項目

	Station	Water temperature (°C)			pH			Turbidity (degree, kaolin)		
		max	min.	mean	max	min.	mean	max	min.	mean
1	Haruki River	29.4	15.3	23.7	8.7	7.9	8.4	8.1	2.0	4.2
2	Asami River	23.7	11.1	19.4	8.6	8.1	8.3	7.0	2.3	4.2
3	Tanoura Beach	26.3	14.6	21.3	8.4	8.0	8.2	5.0	0.1	2.1
4	Oita River (Onozuru)	24.5	8.2	18.2	8.3	7.8	8.0	4.3	1.5	3.1
5	Oita River (Maizuru)	26.1	9.2	18.2	8.1	7.2	7.7	8.3	1.7	4.6
6	Ohno River	25.4	9.1	19.1	7.9	7.1	7.6	9.3	1.6	5.3
7	Kouzaki Beach	24.8	11.0	20.4	8.4	7.8	8.1	5.4	1.2	4.0
8	Oshiuki Beach	25.8	13.6	20.9	8.4	7.2	7.9	4.5	0.0	1.4
9	Shiuki River	21.3	15.1	19.2	8.0	7.0	7.3	4.1	0.2	1.3

表-2　FCとENTの各地点における細菌数

	Station	FC (CFU/100 mL)			ENT (CFU/100 mL)		
		max*	min.	mean	max	min.	mean
1	Haruki River	1.0×10^4	5.9×10^2	5.8×10^2	1.3×10^3	56	8.4×10^2
2	Asami River	4.4×10^3	2.6×10^2	2.5×10^3	3.6×10^3	28	1.1×10^3
3	Tanoura Beach	49	BDL	11	8	BDL	3
4	Oita River (Onozuru)	3.6×10^2	20	2.0×10^2	7.7×10^2	31	2.7×10^2
5	Oita River (Maizuru)	2.3×10^3	20	8.2×10^2	5.5×10^2	2	1.6×10^2
6	Ohno River	3.9×10^2	13	1.8×10^2	5.0×10^2	7	1.2×10^2
7	Kouzaki Beach	1.9×10^2	BDL	47	36	BDL	9
8	Oshiuki Beach	39	BDL	11	28	BDL	6
9	Shiuki River	6.6×10^2	60	2.8×10^2	3.6×10^2	18	1.6×10^2

*ただし，計測不可であった調査日の細菌数を除く

の濃度は5.8×10^3 CFU/100 mLであった．また，調査期間において最も高い濃度で検出された地点も春木川であった．沿岸水試料のFCは，河川水試料と比較して低濃度であった．特に，田ノ浦ビーチと大志生木海水浴場では，期間を通して低濃度であり，その細菌数は50 CFU/100 mLを超えて検出されることはなかった．

ENTの細菌数は，調査期間においてBDL～3.6×10^3 CFU/100 mLの範囲で検出され，FCと比較して1～2オーダー低い濃度で検出される傾向を示した．ENTの平均値が，最も高かった調査地点は朝見川であり，次いで，春木川であった．ENTの細菌数についても，FCと同様に河川水試料の方が高濃度で検出された．

各地点におけるFCとENTの細菌数を概観すると，いずれのふん便性細菌についても，その細菌数は各調査地点によって大きく変動した．別府市の2河川（春木川，朝見川）では，比較的高濃度のふん便性細菌が検出される傾向を示した．海水浴場の3地点（田ノ浦ビーチ，神崎海水浴場，大志生木海水浴場）は，FCおよびENTが高濃度で検出されることはほとんどなく，細菌学的な水質は良好であることが示唆された．

(3) ふん便性細菌の季節的変化

図－2および図 - 3に各調査日におけるFCおよびENTの細菌数の季節的変化について示す．FCについては，細菌数が高すぎて計数不可であった調査日についてはプロットしていない．調査期間を通して，いずれのふん便性細菌も春木川と朝見川において他の地点と比較して，高濃度で検出された．FCは計数不可であった6月と7月の調査日も含めると，6月～10月の期間で高い傾向を示した．ENTについても，調査地点によって多少の変動はあるものの，7月～10月の期間において高くなる傾向であった．その一方で，11月と12月の調査日では，春木川と朝見川を除く全調査地点において，ふん便性細菌数が低く検出される傾向を示した．

アメリカ環境保護庁は，沿岸・海域のFCおよびENTの基準値をそれぞれ800 CFU/100 mLおよび104 CFU/100 mLとしている[7, 8]．海水浴場の3地点について，基準値と比較してみると，調査期間を通して，いずれのふん便性細菌の基準値を超えて検出されることはなかった．一方で，河川水についてみてみると，春木川と朝見川では6月の調査日を除くすべての調査日においてENTの基準値である61 CFU/100 mLを超えて検出された．これら2河川は非常に高いふん便汚染を受けていることがわかった．また，大分川の2地点と大野川においても，たびたび基準値を超えて高

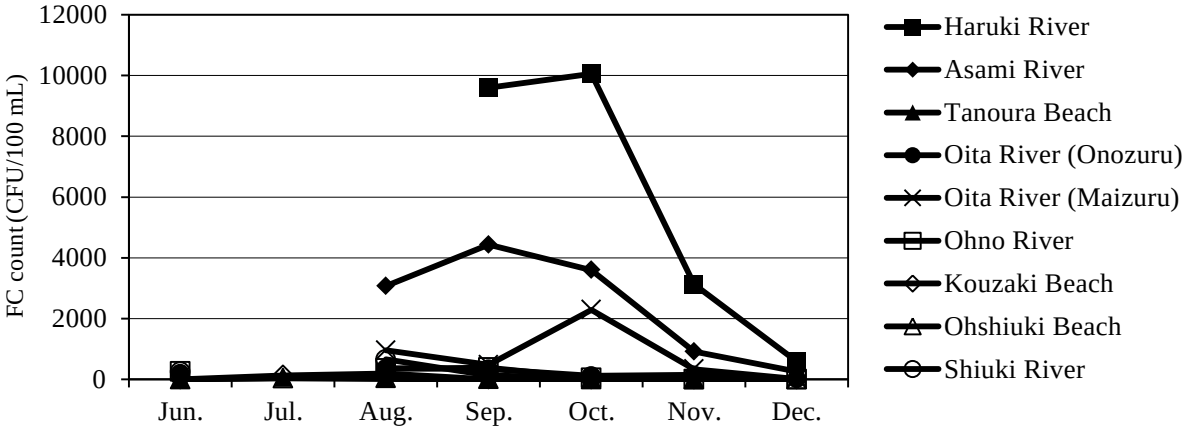

図 - 2　FC の各採取日における細菌数の変化

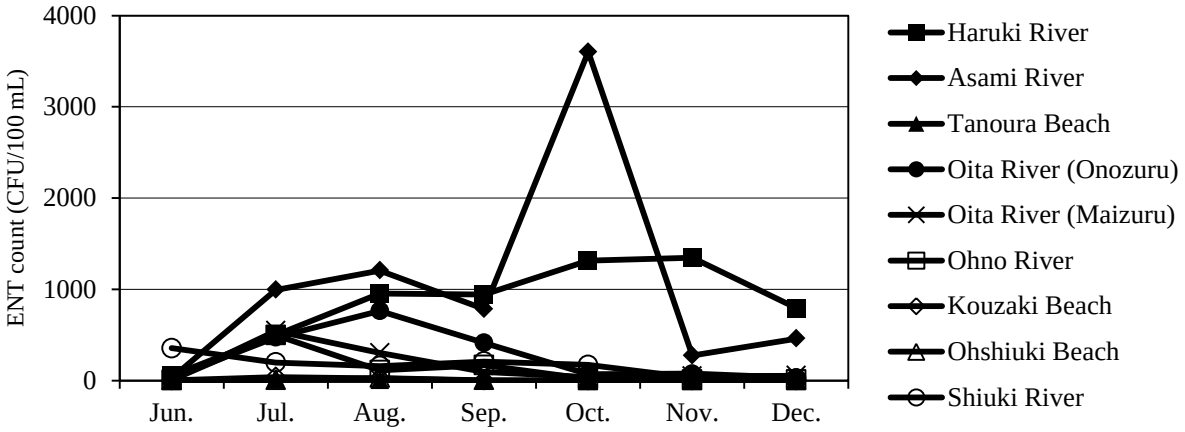

図 - 3　ENT の各採取日における細菌数の変化

濃度でENTが検出された.

(4) ふん便性細菌と各項目との関係

FCとENTの細菌数と各項目（水温，pH，濁度，前日降水量）との関連性について検討した．FCとENTとの間には高い正の相関が認められた（r=0.89）．しかしながら，FCあるいはENTと各項目との間にはほとんど相関関係がなかった．調査回数が少なかったため，厳密な関連性を検討することは困難であったが，河川や沿岸域におけるふん便性細菌の汚染状況を，これらの項目で推定することは適当でないということが示唆された.

これまでの研究において，アメリカの沿岸域において，雨水の流出による影響を受けて，沿岸水中のふん便性細菌の濃度が増加することが報告されている[20]．今回の調査期間において調査日前日にほとんど降雨が記録されておらず，その影響を検討することができなかった．本調査によって，大分県（大分市，別府市）の河川，沿岸域を対象にふん便性細菌の実態調査による人畜由来のふん便性細菌の存否の把握により，ふん便性細菌の汚染の状況を知ることができた．しかしながら，調査回数あるいは調査地点数は十分とは言えないため，今後，大分県内の水環境におけるふん便性細菌の継続的なモニタリング調査が重要である.

４．まとめ

本研究では，大分県内の河川，沿岸域を対象にふん便指標細菌であるFCとENTのモニタリング調査を実施した．得られた知見を以下に示す.

（１）調査期間において，試料水中のFC，およびENTの細菌数は，それぞれBDL～1.0×10^4 CFU/100 mL，およびBDL～3.6×10^3 CFU/100 mLの範囲で検出された．FCとENTの細菌数は調査日あるいは調査地点によって大きく変動した.

（２）いずれのふん便性細菌も別府市内の2河川（春木川，朝見川）において極めて高濃度で検出されており，これら2地点は高いふん便汚染を受けていることがわかった.

（３）海水浴場の3地点（田ノ浦ビーチ，神崎海水浴場，大志生木海水浴場）は，調査期間を通してふん便性細菌濃度は低く，アメリカ環境保護庁の水質基準を超えて検出されることはなかった.

（４）各調査地点において，FCとENTの細菌数は6月～10月において高くなり，11月と12月には低くなる傾向を示した.

以上の調査結果から，大分県内の水環境においてもふん便性細菌による汚染を受けていることがわかった．今後は，継続的により詳細なふん便性細菌のモニタリング調査が重要である.

参考文献

1) Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., and Lukasik, J., Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5796-5803, 2002.

2) Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R., and Mazumder, A., Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods, *J. Environ. Manage.*, 73, 71-79, 2004.

3) Blackburn, B. G., Craun, G. F., Yoder, J. S., Hill, V., Calderon, R. L., Chen, N., Lee, S. H., Levy, D. A., and Beach, M. J., Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water --- United States, 2001-2002, *MMWR*, 53, 23-43, 2004.

4) Robertson, L. J., Forberg, T., Hermansen, L., Gjerde, B. K., Alvsvåg, J. O., and Langeland, N., *Cryptosporidium parvum* infections in Bergen, Norway, during an extensive outbreak of waterborne Giardiasis in autumn and winter 2004, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2218-2220, 2006.

5) Rutjes, S. A., Italiaander, R., van den Berg, H., Lodder, W. J., and de Rota Husman, A. M., Isolation and detection of Enterovirus RNA from large-volume water samples by using

nucliSens minimag system and real-time nucleic acid sequence-based amplification, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 3734-3740, 2005.

6) Pintó, R. M., Abad, F. X., Gajardo, R., and Bosch, A., Detection of infectious Astroviruses in water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1811-1813, 1996.

7) U. S. Environmental Protection Agency, Ambient water quality criteria for bacteria -1986. EPA A440/5-84-002, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1986.

8) U. S. Environmental Protection Agency, Bacterial water quality standards for recreational waters (freshwater and marine waters), EPA-823-R-03-008, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C., 2003.

9) Haack, S. K., Fogarty, L. R., and Wright, C., *Escherichia coli* and enterococci at beaches in the Grand Traverse Bay Lake Michigan: sources, characteristics, and environmental pathways, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 3275-3282, 2003.

10) Shibata, T., Solo-Gabriele, H. M., Fleming, L. E. and Elmir, S.; Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment, Water Res., 38, 3119-3131, 2004.

11) Ahn, J. H., Grant, S. B., Surbeck, C. Q., DiGiacomo, P. M., Nezlin, N. P., and Jiang , S., Coastal water quality impact of stormwater runoff from an urban watershed in southern California, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 5940-5953, 2005.

12) 古川隼士，川畑勇人，鈴木祥広., 沿岸レクリエーションエリアにおけるふん便性細菌汚染の調査，環境技術, 39, 493-499, 2010.

13) 古川隼士，甲斐竜輔，土手裕，鈴木祥広., 宮崎県青島海水浴場における細菌学的調査，水環境学会誌，34, 197-201, 2011.

14) 古川隼士，川畑勇人，鈴木祥広., 夏季における沿岸レクリエーション用水域のふん便性細菌の調査，環境技術, 41, 138-145, 2012.

15) Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., and Lukasik, J., Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5796-5803, 2002.

16) Lemarchand, K., Mason, L., and Brousseau, R., Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water, *Crit. Rev. Microbiol.*, 30, 145-172, 2004.

17) Maynard, C., Berthiaume, F., Lemarchand, K., Harel, J., Payment, P., Bayardelle, P., Masson, L., and Brouseau, R., Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8548-8557, 2005.

18) Sobsey, M. D., Schwab, K. J., and Handzel, T. R., A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male specific RNA coliphages, *J. Am. Water Works Assoc.*, 82, 52-59, 1990.

19) 気象庁: http://www.jma.go.jp/jma/index.html（参照 2013. 02. 01）.

20) Brownell, M. J., Harwood, V. J., Kurz, R. C., McQuaig, S, M., Lukasik, J., and Scott, T. M., Confirmation of putative stormwater impact on water quality at a Florida beach by microbial source tracking methods and structure of indicator organism populations, *Water Res.*, 41, 3747-3757, 2007.

（2013. 9. 30受付）