

水質汚濁における微生物の機能に関する研究

— 各種細菌群を利用した家畜排水追跡法とその応用について —

北海道大学工学部 芳 立 徳 厚

1. はじめに

水質汚濁制御を合理的に遂行するためには、水質の汚濁機構・浄化機構の解明が不可欠であることはいうまでもない。特に有機汚濁においては、河川に流入するまでの有機物の変化、河川への流入形態、河川中での有機物の変化等解明すべき課題が多い。一般的には有機物指標を基礎に、有機物のグルーピング、個々の有機物の詳細な分析などを通じて各方面でその解明が進められている。しかし有機汚濁そのものとその浄化機構に重要な役割を果している微生物の側面からの全面的な検討はほとんど手がつけられていない。

河川を対象と考えると、その水中に生息する微生物は次の二つに大別される。

- (1) 様々な排出源から河川に流入してきた微生物。その多くは河川という環境に適応できないため死滅・休眠の方向をたどる。
- (2) いわゆる「自浄作用」に関与する微生物。河床に着生するものは水中に浮遊し、有機物の分解、一部無機物の酸化等に参与する好気性微生物、底泥の分解に参与する嫌気性微生物などが含まれる。

筆者は石狩川水域を対象に(1)(2)に関連する微生物(主として細菌)について検討を加えているが、本稿では(1)に含まれる細菌群と有機汚濁機構解明へ積極的に利用する可能性について報告したい。

河川に流入してくる細菌には特定の排出源からのものも多く、ある細菌の存在によってある特定の排出源を想起することが可能なことがある。その一例として各種細菌群の同時定量によって家畜排水の河川への流入を追跡する方法とその応用について検討してみた。家畜排水は有機汚濁・富栄養化などに無視できない存在であるが、その流出率などに不明点が多い。また降雨による初期流出時における汚濁負荷の増大にも参与しているのではないかとわれているが現在ところろ々々を確かめる有効な手段はない。本研究がその空白を埋める一助になれば幸いである。

2. 家畜排水追跡の手法について

(1) FC / FS 法

この方法は試料のふん便性大腸菌(以下FCと略称)とふん便性連鎖球菌(以下FSと略称)を定量しその比率から人為汚染と家畜による汚染のいずれが大きいかを推定するもので Geldreich⁽¹⁾の提唱によって始まったものである。これは表1にみられるように人

表-1 温血動物のふん便中に含まれる両細菌数⁽¹⁾

	人間	牛	豚	鶏
ふん便性大腸菌(FC)	13	0.23	3.3	1.3
ふん便性連鎖球菌(FS)	3	1.30	84	3.4
FC / FS	4.4	0.2	0.04	0.4

間以外の温血動物のふん便にはFCに比してFSが大量に含まれていることに着目したものである。彼によればFC / FS比が4.0以上の場合は人間のみによる汚染、0.7以下が家畜のみによる汚染、0.7~4.0が両者の混合汚染としている。

なお我々の温血動物のふん便中でも両細菌間の関係が成立するかどうか調べてみたところ^{(2)~(4)}、温血動物全般としてみるとFSがFCより多いという傾向に変わりが無いが、動物の種類・個体差・気令等でかなりの変動がある。後に述べるが、このことが当手法の結果に疑問が多い一因になっているように思われる。

(2) FS / EnC 法

種々問題のあるFC / FS法より正確な方法として、筆者はふん便性連鎖球菌の中に家畜固有の菌群が存在

することに着目した新たな方法も考え

検討してみた。家畜のふん便には表2にも明らかなように、人間のふん便には全くないしほとんど存在しない

Streptococcus bovis, *S. equinus* などの菌種が存在する。この場合にも(1)

と同様に変動があるであろうが、温血

動物間に多少の差異・変動があっても

両菌種が全体として存在しなくなると

いうことはありえずまたこれらの菌種

が人間のふん便にほとんど存在しないというのも有利な

材料である。これらの菌種と *Enterococcus Group* とを

ほんのちがいで分離定量することができれば、家畜排水の

影響をより明確にすることができる。もちろんすべての

ふん便性連鎖球菌を種々の生理学的試験で分類すればよい

のであるが、日常的な試験ないしは統計的解析のため

多くのデータが必要な場合には不向きである。

そのため簡便な方法として二つの試験法を併用すること

により、分離定量の可能性を検討してみた。可能性の

ある試験法として次の二つを採用した。

③ 抗定試験として ADB 培地を用い、確定試験として EVA 培地を用いる方法 (以下 ADB-EVA 法と略称)

④ *Enterococcus agar* (1170+2.20.0g 酵母エキス 5.0g 7% 2.0g K_2HPO_4 4.0g $NaNO_3$ 0.4g 寒天 10.0g 塩化ナトリウム 2.3.5+1172=14

14.5g $CaCl_2$ 0.1g 水 100ml) を用いる方法 (以下 EA 法と略称)

試料から二つの試験法で分離した菌株を表3に示す分類方法に従って分類を行った。

ADB-EVA 法について 表4に結果を示すようにすべての試料を通じて ADB 陽性 EVA 陽性の菌株は

Enterococcus Group であった。

EA 法について 図1に結果を示した。EA 法では *Enterococcus G.* 以外に *S. bovis G.* *S. lactis G.* なども検出されることがわかる。

EA 法によって検出された各菌株の

ADB-EVA 培地での培養所見を示したものが表5である。 *Enterococcus G.*

は検出されたすべての菌株が ADB-

EVA 培地ともに陽性であった。他の

菌種は ADB 培地ではすべて陽性であ

ったが EVA 培地で陽性となるものは

表2 温血動物のふん便中の連鎖球菌の分布⁽⁵⁾

		Source of the Fecal Samples			
		Human	Cow	Sheep	Pig
<i>Enterococcus group</i>	no. %	360 76.3	21 12.3	31 24.8	10 10.0
<i>S. salivarius group</i>	no. %	77 16.3	None	None	None
<i>S. bovis group</i>	no. %	None	104 61.2	50 40.0	32 32.0
<i>S. equinus group</i>	no. %	3 0.6	24 14.1	8 6.4	24 24.0
<i>Enterococcus biotypes group</i>	no. %	32 6.8	21 12.4	36 28.8	34 34.0
Total Streptococcal cultures	no.	472	170	125	100

表3 連鎖球菌のおよまかな分類方法

Catalase test	Growth at 45°C	Growth at 10°C	6.5% NaCl broth	40% bile broth	Group of Streptococcus
+	+	+	+	+	<i>Enterococcus Group</i> <i>Streptococcus fecalis</i> <i>S. fecalis</i> var. <i>liquefaciens</i> <i>S. fecalis</i> var. <i>zymogenes</i> <i>S. durans</i>
+	+	+	+	+	<i>S. bovis Group</i> <i>S. bovis</i> <i>S. equinus</i>
+	+	+	+	+	<i>S. lactis Group</i> <i>S. lactis</i> <i>S. cremoris</i>
+	+	+	+	+	Non-fecal streptococcus

表4 ADB-EVA 法検出菌の分類結果

試料	分離菌数	ADB+EVA+		ADB+EVA-	
		Ent.G.		Ent.G.	
石狩川 納内橋	13	10	10	3	1
旭川市内無名川	13	10	10	3	0
創成川北24条橋	12	11	11	1	0
創成川処理場流入水	6	4	4	2	0
ヒト 便	10	10	10	0	-
total	54	45	45	9	1

図1 EA法検出菌の分類結果

試料	分離菌数	<i>Enterococcus G.</i>	<i>S. bovis G.</i>	<i>S. lactis G.</i>
石狩川 納内橋	20	10	10	1
旭川市内無名川	18	10	10	0
創成川北24条橋	20	11	11	1
創成川処理場流入水	20	4	4	2
ヒト 便	19	10	10	0

なかった。

以上の結果から、ADB-EVA法は *Enterococcus* 属のみを選択的に検出し、EA法は *Enterococcus* 属以外のふん便性連鎖球菌も検出することが明らかになった。

なお *S. fecalis* var. *liquefaciens* はふん便以外に自然に由来するものが存在するという報告⁽¹⁾があるが、これは両試験法ともに検出される菌種なので大きな影響を与えないと考えてよい。

排出源の明確な河川で検討した結果が表-6である。

三河川は千早川の支流で養豚センターの排水の影響以外大きな汚染源のない小河川であるためEA法の菌数が大巾に上回っている。一方下水処理場の流入水、放流水、都市内小河川(創成川)などではヒトのふん便が圧倒的に多くふん便性連鎖球菌のほ

とんどが *Enterococcus* 属であるので両試験法の結果はほぼ一致している。すなわちADB-EVA法の検出菌は *Enterococcus* 属(Encと略称)、EA法の検出菌はふん便性連鎖球菌としてよいから、FS/Enc比が1.5以下の場合人間のみによる汚染、表2番目から3.0をこえると家畜による汚染がきわめて強いといえてよいであろう。なおFS/Enc法はその試験法が一方は平板法一方はMPN法であるためその間の誤差をある程度見込む必要がある。

3. 石狩川についての検討

2に述べた二つの方法を利用して石狩川の水質に与える家畜排水の影響を検討してみた。

図2は研究室の採水地点である。すべての地点について試験を行っているが今回検討の対象としたのは図に示すように石狩川上流と各支流に限定した。

1971年11月から1973年2月にわたって、ほぼ2ヶ月毎に採水した試料について試験を行った。なおFS、Encの試験方法は2に述べた通りであるが、FC試験はEC培地を用い44.5℃の高温培養によった。この外に有機培養細菌、一般細菌、大腸菌群などの試験も行い解析の参考とした。結果をFC/FS比、FS/Enc比として示したのが表-7で

表-5 EA法検出菌のADB-EVA法での培養所見

ADB broth EVA broth	+	+	+	total
	+	±	-	
<i>Enterococcus</i> G.	79	0	0	79
<i>S. bovis</i> G.	0	2	6	8
<i>S. lactis</i> G.	0	2	1	3

表-6 両試験法の判定例

試料	採水年月日	ADB-EVA (A)	EA (B)	(B)/(A)
三河川	'72. 4.10	17	160	9.4
"	'72. 5.17	24	190	7.9
加川下水処理場放流水	'71. 8. 3	3,300	3,000	0.91
"	'71. 9.17	230	230	1.0
"	'71.11.11	1,700	1,100	0.65
"	'72. 8. 8	1,600	2,200	1.4
"	'72.10. 7	2,800	2,300	0.82
創成川処理場流入水	'72. 5.17	7,900	11,000	1.4
創成川北24番橋	'72. 5.17	240	200	0.83
"	'73. 1.13	2,200	2,000	0.91

河川名	採水地点
1 石狩川	金鑑橋
41 雨竜川	雨竜橋
51 空知川	豊橋
81 夕張川	清機橋
82 千歳川	広機橋

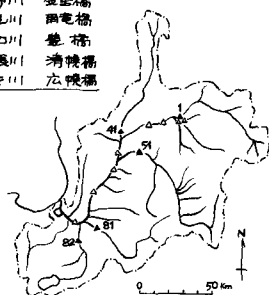


図-2 採水地点

表-7 試験結果

	'71.11.11	'72.1.22	'72.3.31	'72.6.7	'72.8.8	'72.10.7	'72.12.16	'73.2.22
15 府川流	0.04 9.0	1.2 3.6	0.01 2.9	0.30 0.79	0.85 2.7	2.6 1.5	0.31 1.3	0.08 1.0
41 雨竜川	0.22 3.1	0.09 0.41	0.07 1.3	0.83 2.4	0.35 0.92	0.28 1.5	0.56 2.0	0.98 1.0
51 空知川	0.04 1.7	0.63 1.1	1.4 0.69	0.85 1.9	1.3 1.2	1.9 1.4	1.2 2.2	3.8 1.5
81 夕張川	0.09 1.6	0.2 2.1	0.24 2.0	0.20 0.82	0.47 0.97	0.15 2.7	0.31 0.46	0.88 0.69
82 千歳川	0.15 1.8	- -	0.52 1.8	2.3 3.5	0.41 8.3	0.5 5.9	0.55 1.8	0.55 1.5

(左欄 FC/FS 右欄 FS/Enc)

である。

結果を解析する際の参考として表8に各河川流域の人口・家畜頭数とそれぞれの家畜のし尿BODの人口当量を示した。家畜としては他に馬、羊などがいるが、数がわずかなので除いた。

表-8 流域内の人口、家畜頭数、家畜人口当量（昭和45年度）

流域	人口 (人)	家畜頭数			家畜人口当量(人)				人口当量
		牛(千頭)	豚(千頭)	鶏(万羽)	牛	豚	鶏	合計	
1 石狩川上流	2.5	1.4	2.4	6.0	6.4	2.4	4.8	13.6	5.4
41 雨竜川	3.8	1.0	2.9	12.1	4.6	2.9	9.7	17.2	4.5
51 空知川	14.1	4.2	9.9	10.5	19.3	9.9	8.4	37.6	2.7
81 夕張川	10.0	1.0	3.9	17.3	4.6	3.9	13.8	22.3	2.2
82 千歳川	11.5	8.3	11.8	50.2	38.2	11.8	40.2	90.2	7.8

人口当量の算出は大野⁽⁶⁾の資料に基づき、し尿BOD換算(人間139人/日)で豚10人、牛46人、鶏0.8人として求めた。もちろんこれらすべてが河川に流出してくるわけではないが、各河川流域の家畜し尿による潜在的な負荷量と人間のそれとの関係をこれから知ることができる。

この結果によると家畜排水の影響が大きいと推定される流域は、千歳川を筆頭に石狩川上流がそれに次ぎ以下雨竜川、空知川、夕張川の順になっている。

以上のデータをもとに、まず筆者が提案したFS/Enc法の妥当性について検討してみた。家畜排水の河川への流出率が流域によって極端な差

がないとすれば、人口に対して家畜頭数の多い流域では当然河川水中のFS/Enc比も平均的に高くなることが予想される。図3はこのことを確かめたもので、横軸に家畜し尿負荷人口当量も人口で除した値、縦軸に各流域毎のFS、Encの幾何平均によるFS/Enc比もとりプロットしたものである。図からわかるように家畜し尿負荷の割合の増大とともにFS/Enc比も増加しており、この手法の妥当性がうなずける。

一方FC/FS法の結果もみると(表7)FS/Enc比と一致している部分もあるが、全体としてFC/FS比が0.7以下すなわち家畜排水のみの影響という判定がみえず、表8やFS/Enc比などからみて疑問が多い。この方法は全く異なる細菌群の比を利用しているため、個体差・年令差・飼料による差などを受けやすく排出源自体で不安定な要素があること、一般にFCの方がFSより死滅速度が大きいといわれていることから、流下過程を経るとFC/FS比が低めに傾く可能性などが原因と考えられる。

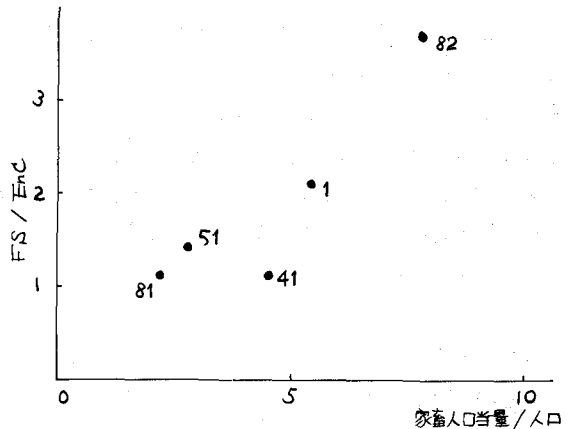
各河川の特徴

<1 金星橋 石狩川上流> 千歳川に次いで家畜負荷の割合が大きい、絶えず影響を与えているというよりは降雨時の初期流出による影響が大きいといえる。特に降雨直後に採水を行った7.11.11の例はほとんど家畜排水のみの比率になっている。

<41 雨竜橋 雨竜川> 石狩川上流とほぼ同様の傾向。

<51 豊橋 空知川> 当河川はFS/Enc比が低く、FC/FS比が高いという傾向をもっている。これは他の河川に比べてFCが常に多いことが原因で、図4からも明らかのように千歳川などの他の河川ではFCは大腸菌群全体の1割程度であるが、空知川は常に4割前後を占めている。FS/Enc比が低いことと合せて人間のし尿による強い汚染の疑いがある。

図-3



く81 清幌橋 夕張川> 当河川はFS/Enc 比が一般に低いので家畜排水の影響は大きくない河川という事が、対応するFC/FS 比がほとんど0.7以下で、他の河川以上にFS/Enc 比との不一致が著しい。

夕張川の採水点は主要汚染源が集中している夕張市から50km程度下流にあり、この流下過程で先に述べたようにFCが相対的に減少することがその原因と推定される。

く82 広幌橋 千代川> これまで述べたすべての河川を上回る家畜排水の影響の強い河川である。

しかし冬期すなわち水温の低い時に一様にFS/Enc 比が低いことは奇異なので、図5に示すように水温とFS/Enc 比の関係をプロットしてみた。全体として水温が低下するに従いFS/Enc 比も減少している。この傾向は石狩川上流、雨竜川などでもみられた。これは*S. bovis*、*S. equinus* などが低温にまわめて弱い⁽¹⁾ということが主因と考えられるが、本来冬期間は家畜排水の流出が少いことも考えられ、FS/Enc 法はこの点の解答を与えない弱点も持っていることがわかった。

4. おわりに

家畜排水追跡の手法として新たな方法を提案し、実際河川への応用を試み以下の知見を得た。

- (1) 家畜排水追跡の手法としては Geldreich らの提案するFC/FS 法に比して、ふん便生連鎖球菌内の菌群構成を利用するFS/Enc 法の方が優れていることがわかった。
- (2) 石狩川上流・各支流を対象にFS/Enc 法を用いて家畜排水の河川水質に与える影響を検討した結果、各河川の特徴をかなり明らかにすることができた。
- (3) 降雨初期に家畜排水が多量に河川に流入していると思われる二つの例を見出した。
- (4) FS/Enc 法は低温時に問題があり、冬期間の適用に注意を要する。

なおこれまでのところ定性的な把握にとどまっているが、次の諸点を通じて定量化も可能で、これらを通じて家畜排水の流出率などの算定もできるのではないかと考えている。

a) Enc, *S. bovis*, *S. equinus* などの河川水中での消長。これは定性的な段階でも問題になるが、今回検討した例はすべて流下日数が1日程度の河川なのであまり大きな影響はないと考えている。

b) 流量も同時測定することによって各菌群の総流下量を求めておく。

c) 試験間隔を統計処理が可能か密度とする。

また家畜排水流入の定量化は必然的に人間によるし尿の形で汚染の定量化も可能にする。

今後これらの課題もさらに追求していくとともに、現在すすめているパルプ廃水によって発生する“みずね

図4 大腸菌群とFCの関係。

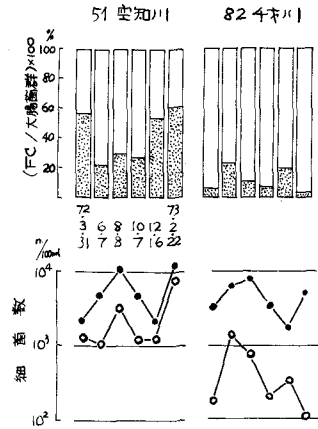
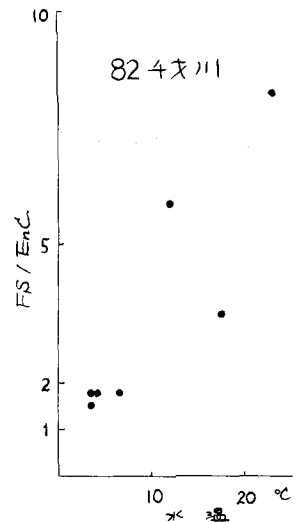


図5 水温とFS/Encとの関係。



た”発生の機構や自浄作用に関する細菌の把握などを通じて水質汚濁における微生物の機能も明らかにしていきたい。

〈謝辞〉 本研究をすすめるにあたり実験に協力してくれた山本哲也君、採水等に協力してくれた橘治国助手適切な助言をいただいた那須義和助教授に深く感謝します。

参考文献

- (1) E.E. Geldreich and B.A. Kenner ; J.W.P.C.F., 41, R339 (1969)
- (2) 越智勇一・光岡知足 ; 日本獣医学雑誌, 20, 45 (1958)
- (3) “ ” ; 日誌研報 No.2, 91 (1964)
- (4) 内田和夫・片岡弘毅・光岡知足他 ; 日本獣医学雑誌, 27, 215 (1965)
- (5) B.A. Kenner, H.F. Clark and P.W. Kebler ; A.J.P.H., 50, 1553 (1960)
- (6) 大野 茂 ; 用水と廃水, 10, 557 (1968)
- (7) 芥立徳厚・近藤光雄・山本哲也 ; 第23回全国下水道研究発表会講演集, p204 (1972)
- (8) “ ” “ ” ; 第9回日本水処理学会第9回大会講演要旨集, 28 (1972)
- (9) 芥立徳厚・山本哲也 ; 第10回下水道研究発表会講演集, p310 (1973)