

B-44 海浜の波打ち際において形成される安定泡沫に濃縮されるふん便性細菌の調査

○古川 隼士^{1*}・川畑 勇人²・高橋 寛敬²・吉田 照豊³・鈴木 祥広⁴

¹宮崎大学大学院農学工学総合研究科 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

²宮崎大学大学院工学研究科 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

³宮崎大学農学部生物環境科学科 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

⁴宮崎大学工学部土木環境工学科 (〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1-1)

* E-mail: furukawa@civil.miyazaki-u.ac.jp

1. はじめに

我が国の沿岸環境において、病原性細菌やウイルス汚染による人間への感染・発症リスクはそれほど低くないことが報告され始めてきている。特に海水浴場等のリクリエーションエリアでは、人間が直接的に細菌に暴露されるため、このエリアにおけるふん便性細菌の汚染状況を把握することは極めて重要である。アメリカでは、リクリエーションエリア等の利水・親水域の細菌学的安全性を確保するため、ふん便汚染指標となる大腸菌と腸球菌のモニタリング調査や検出方法の開発が積極的に推進されつつある^{1,2)}。しかしながら、我が国の海水浴場では、事前到大腸菌群の調査が義務付けられ調査が行われているものの、使用期間中あるいは期間外における調査はほとんど実施されていない。また、公衆衛生を目的とした沿岸環境の細菌学的調査を継続的に実施した事例は極めて少なく、河口・沿岸域におけるふん便性大腸菌群や腸球菌の環境動態についても不明な点が極めて多い。

ところで、河口・沿岸域では波打ち際に安定した泡沫が打上げられていることがしばしば見受けられ、その安定泡沫は特に荒天後に頻繁に形成される傾向にある(図1)。安定泡沫中には、懸濁物質や細菌をはじめとするさまざまな物質が濃縮されている可能性が高い。

そこで本研究では、海浜リクリエーションエリアを対象として、人間が暴露される可能性が高い波打ち際において、海水、浜砂、および形成された安定泡沫を採取し、ふん便性大腸菌群(FC)とふん便性連鎖球菌(FS)を測定した。

2. 調査および実験方法

2. 1 調査概要

宮崎県宮崎市の日向灘に面した海水浴場を含む4地点において、海水、砂、および安定泡沫を採取した。図2に調査地点と試料採取日をそれぞれ示す。地点Aは、夏季に海水浴場として利用されている。地点BとCは、いずれも宿泊施設の前にあるビーチであり、地点Bはサーフィン場として頻繁に利用されている。地点Dは、遊園地施設が隣接しており、施設内を流れる河川が加江田川に合流して流入する。

2. 2 試料採取

波打ち際の海水(以降、海水)は、波打ち際から水深50cm程度の表層水を手付きビーカーを用いて採取し、ポリエチレン容器に入れ保存した。波打ち際の浜砂(以下、浜砂)として、波打ち際の砂表面から上部5cmの砂を円筒状の容器を用いて採取し、密封できるビニール袋に入れ保存した。さらに、海水と浜砂を採取した場所の周辺に形成されている安定泡沫を採取し、ポリエチレン

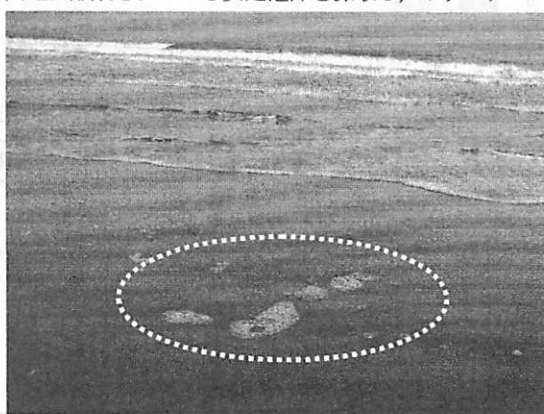


図1 波打ち際に打上げられた安定泡沫

容器に保存した。すべての試料は、実験室に持ち帰り、直ちに各菌種と各項目の分析に供した。

2. 3 細菌計数法

細菌計数に用いる器具はすべて高圧蒸気滅菌してから使用した。FC と FS の測定は、すべての試料においてメンブランフィルター法 (MF 法) で行い、1 試料につき 2 回測定した。FC と FS の測定には、それぞれ m-FC 培地 (DIFCO) と KF Streptococcus 培地 (DIFCO, KF 培地) を用いた。FC は、 $44.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ で 24 時間培養し、培養後のフィルター上に形成された青色のコロニーを計数した。FS は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 48 時間培養し、培養後のフィルター上に形成された赤色とピンク色のコロニーを計数した。

海水の FC と FS は、それぞれ濾過量を 100mL とし、上記の手順に従って計数した。

2. 3. 1 砂試料の計数法³⁾

採取してきた試料 5g と滅菌済蒸留水 35mL を遠心分離管で混合し、ボルテックスミキサーを用いて 2 分間攪拌した。攪拌後、2 分間静置させた上澄を 10mL 採取し、MF 法によって FC と FS を計数した。

2. 3. 2 安定泡沫試料の計数法

安定泡沫は、夾雑物を取り除き、滅菌済生理食塩水を用いて泡沫を消泡させながら、約 50mL にメスアップした。その泡沫消泡水について、MF 法によって FC と FS を計数した。

2. 4 連鎖球菌同定キットによる菌種の同定

安定泡沫の各試料において、KF 培地に形成されたコロニー (約 10~20 株) を Todd Hewitt 培地 (DIFCO, TH 培地) に植菌し、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で 24 時間培養した。単離した菌株について、グラム陽性球菌同定キット (連鎖球菌用) api 20 Strep (BIOMERIEUX) を用いて菌種の同定を行った。

3. 結果と考察

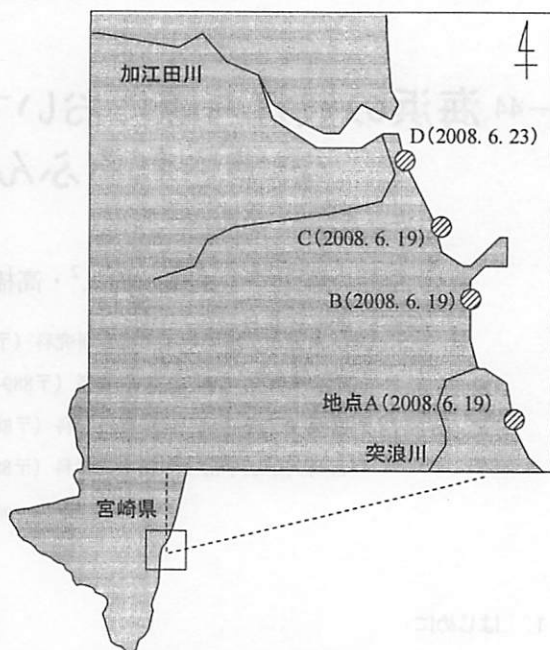


図2 調査地点 (試料採取日)

3. 1 各地点における菌数の計数結果

表1に海水、浜砂、および安定泡沫の FC と FS の計数結果を示す。海水の FC と FS は、それぞれ 2~97 CFU/100mL と 11~218 CFU/100mL の範囲で検出された。また、すべての地点において FC よりも FS のほうが高く検出された。浜砂は、FS のみ 0~4 CFU/g-dry の範囲で検出されたが、海水と比較してもその菌数は低く、本調査地点の浜砂中には、ふん便性細菌がほとんど存在していないことがわかった。これに対して、安定泡沫の FC と FS は著しく高く、FC と FS はそれぞれ 55~5450 CFU/100mL-泡沫液 と 12500~256000 CFU/100mL-泡沫液 の範囲で検出された。安定泡沫は、極めて高濃度に細菌が濃縮されていることがわかった。安定泡沫においても海水と同様に FC よりも FS のほうが高く検出された。また、安定泡沫の溶存有機炭素濃度 (DOC) を測定した結果、地点 A, B, C, および D で、それぞれ 8.2mg/L, 77.8 mg/L, 4.4 mg/L, および 11.4 mg/L であり、細菌と同

表1 各調査地点における海水、浜砂、安定泡沫の菌数

調査地点	海水		浜砂		安定泡沫	
	FC (CFU/100mL)	FS (CFU/100mL)	FC (CFU/g-dry)	FS (CFU/g-dry)	FC (CFU/100mL-泡沫液)	FS (CFU/100mL-泡沫液)
A	3	42	0	2	800	22100
B	13	146	0	4	5450	256000
C	2	11	0	0	55	12500
D	97	218	ND	ND	4200	99500

ND: Not Determined

表2 FS分離株の菌種同定

菌種	分離株	計	割合(%)
<i>Enterococcus</i> 属	A1, A2, A3, A4, A5 D1, D3, D4, D5, D6, D7, D9, D10, D11, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D19	21	43
<i>Streptococcus</i> 属	A8, A9 B1, B2, B3, B4, B5, B6, B8, B9, B12, B17	12	24
<i>Gemella</i> 属	A6 B7, B10, B18, B19, B20	6	12
<i>Lactococcus</i> 属	A7 B13, B14, B15	4	8
<i>Aerococcus</i> 属	B11, B16 D2, D8	4	8
<i>Globicatella</i> 属	A10 D12	2	4

様に有機物質も高濃度に濃縮されており、DOC 濃度と FC および FS は依存する傾向を示した。

各調査地点における菌数の特徴を比較すると、地点 C は、FC と FS が海水、浜砂、および安定泡沫のいずれにおいても最も低かった。海水の FC と FS は、地点 D において最も高く検出された。その一方で、安定泡沫は FC と FS とともに地点 B が最も高く検出され、それぞれ 5450 CFU/100mL-泡沫水と 25600 CFU/100mL-泡沫水であり、次いで地点 D、A、C の順であった。いずれの調査地点においても、海水、浜砂、および安定泡沫の菌数の特徴的な検出は認められず、検出割合はすべての地点で類似の傾向にあった。

3. 2 安定泡沫の連鎖球菌株の同定

表 2 に安定泡沫の FS の菌種同定結果を示す。安定泡沫の分離株は地点 A、B、および D の FS から、それぞれ 10 株、20 株、および 19 株、計 49 株を分離した (A1～A10, B1～B20, D1～D19)。安定泡沫の分離株からは、*Enterococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Lactococcus* 属、*Gemella* 属、*Aerococcus* 属、および *Globicatella* 属が同定され、安定泡沫中には多様な菌種が濃縮されることがわかった。最も多く同定された菌種は、*Enterococcus* 属であり全体の 43%を占めていた。*Enterococcus* 属はヒトを含む哺乳類の常在菌であり、外界での非増殖性と高生存性などから、古くから環境中のふん便汚染指標として用いられている菌種である⁹⁾。地点 D では、19 株中 16 株が人畜のふん便由来の *Enterococcus* 属であり、これは隣接した遊園地施設内を流れる河川と、その河川が合流する加江田川が流入するためであると考えられる。地点 B では、*Enterococcus* 属以外の *Streptococcus* 属 (たとえば *Streptococcus agalactiae*) が優先種 (10 株) であり、次いで *Gemella* 属 (5 株)、*Lactococcus* 属 (3 株) が同定された。したがって、地点 B における FS は、ほとんどが人畜由来のふん便性細菌ではないことが示唆された⁹⁾。

4. まとめ

(1) 海水中からは FC が 2～97 CFU/100mL、FS が 11～218 CFU/100mL で検出され、FS のほうが高く検出された。一方で、浜砂からは FS のみ検出されたが、海水と安定泡沫と比較して極めて低かった。

(2) 安定泡沫の FC と FS は著しく高く、波打ち際に形成される安定泡沫には、極めて高濃度の細菌が濃縮されていることがわかった。

(3) 安定泡沫中の FS 分離株からは、全部で 6 種類の菌種が同定され、人畜由来のふん便性細菌である *Enterococcus* 属が最も多く同定された。

謝辞

本研究は、(独) 農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」によって行われたものである。関係者各位に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Shibata, T., Solo-Gabriele, H. M., Fleming, L. E. and Elmir, S. (2004) Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment, *Water Research*, 38, 3119-3131.
- 2) Ahn, J. H., Grant, S. B., Surbeck, C. Q., DiGiacomo, P. M., Nezin, N. P. and Jiang, S. (2005) Coastal water quality impact of stormwater runoff from an urban watershed southern California, *Environmental Science & Technology*, 39, 5940-5953.
- 3) Byappanahalli, M., Fowler, M., Shively, D. and Whitman, R. (2003) Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a Midwestern coastal stream, *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4549-4555.
- 4) Manero, A., Vilanova, X., Cerda-Cuellar, M. and Blanch, A. R. (2002) Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of *Enterococci*, *Water Research*, 36, 2831-2835.