

B-50 沿岸域レクリエーション用水域における ふん便性細菌の実態調査

○古川 隼士^{1*}・川畑 勇人²・鈴木 祥広²

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

²宮崎大学工学部土木環境工学科 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

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

1. はじめに

沿岸域には、人間の生活や農業・畜産業、その他の産業活動など、陸域において様々な過程で使用された水が処理され、あるいはその一部は未処理のまま流入する。その結果として、汚濁物質、有害汚染物質、あるいは病原性微生物も沿岸域に流入する可能性がある。しかも沿岸域の一部は、海水浴場やヨットハーバー等のレクリエーションエリアとして重要な役割を果たしているため、人間が直接的あるいは間接的に汚染物質や病原性微生物に暴露される場合も考えられる。このような背景において、先進国とされる日本や欧米の沿岸域においてさえ、病原性微生物の汚染による人間への感染・発症のリスクは、それほど低くないことが報告されている¹⁾。したがって、沿岸環境における公衆衛生の改善や細菌学的安全性を確保するためには、病原性微生物の存否の指標となるふん便性細菌の汚染状況を把握することが極めて重要である。

沿岸環境の公衆衛生が重視されているアメリカでは、沿岸域においてふん便汚染指標細菌である大腸菌や腸球菌のガイドラインを制定している。さらに、レクリエーションエリア等の利水・親水域における細菌学的安全性を確保するために、大腸菌や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²⁾。一方、我国では最近において、下水処理場や河川におけるふん便性細菌の実態調査・研究に関する報告がなされはじめてきた^{3,4)}。しかしながら、海水浴場等のレクリエーションエリアについては、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、沿岸域におけるふん便指標細菌の汚染状況等に関する知見・情報はそれほど多くないのが現状である。

そこで本研究では、宮崎市内のレクリエーションエリアを対象に、特に利水・親水域の利用人口が増加する夏季において、ふん便汚染指標細菌であるふん便性大腸菌群 (FC) と腸球菌 (ENT) のモニタリング調査を実施した。

2. 実態調査

(1) 調査概要

調査は、宮崎県宮崎市の太平洋に面した全11地点を対象とした (図1)。地点2, 9, および11は夏季において海水浴場として開放されている。地点1, 5~8は、サーフィンエリアとして年間を通じて利用されている。また、地点3および4は、それぞれヨットハーバーおよび港であり、地点10は宿泊施設前にあるビーチである。調査は2009年の6月4日~9月9日の期間において、計9回実施した。宮崎県における梅雨期間は6月2日~7月12日 (期間総雨量, 283mm)、海水浴場開放期間は7月4日~8月31日であった。

(2) 試料採取と測定項目

沿岸水試料は、波打ち際から10m以内、水深約50cm程度の表層水を採取し、ポリエチレン容器に保存した。採

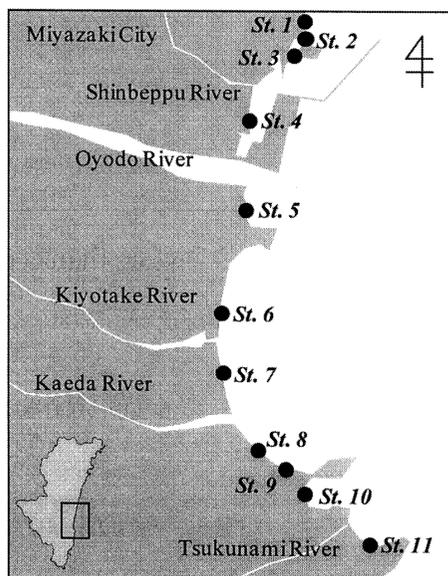


図1 調査地点

取した試料は、実験室に持ち帰り、直ちにふん便性細菌と一般水質項目を測定した。ふん便性細菌として、FCおよびENTを測定した。一般水質項目として、pH（東亜電波工業，ガラス電極式水素イオン濃度計，HM-30G），電気伝導度（EC，東亜電波工業，CM-30S），および濁度（三菱化学，積分球式濁度計，SEP-PT-706D）を測定し，塩分はECから算出した。水温は試料採取時に棒状温度計を用いて測定した。また，採取日の前日降水量は気象庁のホームページ上に公開されているデータを用いた。

(3) 細菌計数方法

FCとENTの測定はメンブランフィルター法によって行った。沿岸水試料は，10mLあるいは100mLをメンブランフィルター（孔径0.45 μ m，Advantec）を用いてろ過した。細菌濃度が高いと思われる試料については，必要に応じて10～100倍希釈し，希釈した試料10mL（最終容量）を濾過した。FCはmFC培地（Difco）上にフィルター上の青色のコロニーを24時間水浴培養後，フィルター上の青色のコロニーを計数した。ENTはmEI培地上にフィルターを載せ，41.0 \pm 1.0 $^{\circ}$ Cで24時間培養後，フィルター上の青色のコロニーを計数した。沿岸水試料の細菌数は3連のものを平均し，100mLあたりに換算した。

(4) 腸球菌種の同定

腸球菌は，大腸菌とともに水環境におけるふん便汚染の重要な指標細菌としてUSEPAが推奨している。そこで，各調査日において，腸球菌数が高かった地点から腸球菌株を単離し，PCR法による菌種の同定を行った。ターゲットとした腸球菌種は，腸球菌の中でも特に人畜の腸管内に多く存在しているとされる *Enterococcus faecium* と *Enterococcus faecalis* とした。

腸球菌数が高かった地点において，mEI培地上に形成された青色のコロニーをTodd Hewitte培地（Difco，寒天1.5%）に釣菌し，37.0 \pm 1.0 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。この単離株を用いてPCR法によって，*E. faecium*と*E. faecalis*の同定を行った。PCR反応に用いたプライマーは*E. faecium*がJacksonら⁹⁾，*E. faecalis*がLiuら⁹⁾のプライマーをそれぞれ用いた。PCR反応溶液は滅菌蒸留水を4.2 μ L，10 \times Ex Taq Buffer（TaKaRa）2 μ L，dNTP Mixture（TaKaRa）1.6 μ L，Primer（F）2 μ L，Primer（R）2 μ L，TaKaRa Ex Taq HS（TaKaRa）0.2 μ L，template DNA 8 μ L，合計20 μ Lとした。PCR反応は以下に示す条件で行った。95 $^{\circ}$ Cで4分間の変性処理後，95 $^{\circ}$ Cで30秒，アニーリングを54 $^{\circ}$ C（*E. faecium*）あるいは62 $^{\circ}$ C（*E. faecalis*）で1分間，および72 $^{\circ}$ Cで1分間を30サイクル行った。その後，最終伸長反応を72 $^{\circ}$ Cで5分間行った。PCR反応後，1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い，エチジウムブロマイドで染色してPCR増幅産物を確認した。

3. 結果と考察

(1) FCおよびENTの細菌数

図2 (a) に沿岸水中のFCの細菌数を示す。FCは全調

査地点において0～6.3 \times 10³ CFU/100mLの範囲で検出された。細菌数の平均値でみると，FCは地点4（宮崎港）において最も高い値を示しており，この地点は調査期間を通して最も高い値を示した。次いで，サーフィンエリアである地点5および7において，FCは比較的高い値で検出された。

図2 (b) に沿岸水中のENTの細菌数を示す。ENTは全調査地点において0～5.2 \times 10² CFU/100mLの範囲で検出され，細菌数の平均でみても，FCより1オーダー低い値で検出された。地点別においても，FCと同様に地点4において最も高い細菌数を示し，地点5および7でも他の地点と比較して高い細菌数であった。いずれのふん便性細菌についても，調査地点によって細菌数は大きな変動を示すことがわかった。

(2) 各調査日における細菌数の変化

本調査地点（全11地点）のうち，公衆衛生上重要であると考えられる地点について，ふん便性細菌数の調査日における変化を検討した。海水浴場として開放される地点2，9，および11，ならびにサーフィンエリアとして利用されている地点1，5～8における，沿岸水中のFCおよびENTの細菌数の調査日における変化についてそれぞれ図3 (a) および (b) に示す。いずれのふん便性細菌も6月下旬と8月中旬の調査日において，細菌数が高くなる傾向を示した。6月24日におけるFCおよびENTの細菌数は，いずれも地点5において最大値を示し，その細菌数は，それぞれ3.1 \times 10³ CFU/100mLおよび5.2 \times 10² CFU/100mLであった。また，8月19日では，地点7において高い細菌数を示し，そのFCおよびENTの細菌数は，それぞれ9.8 \times 10² CFU/100mLおよび1.1 \times 10² CFU/100mLであった。

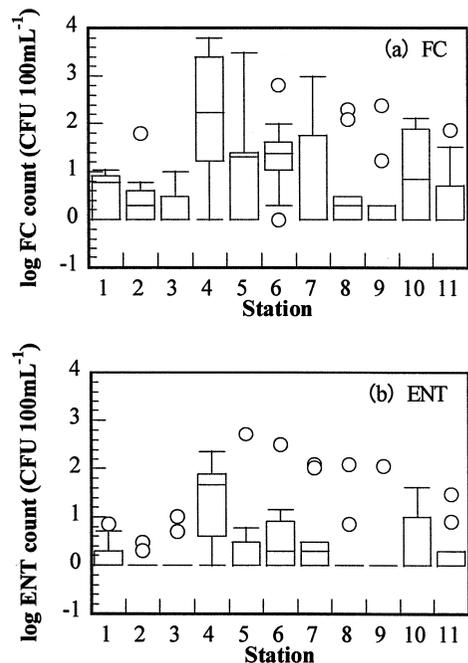


図2 各調査地点におけるふん便性細菌数

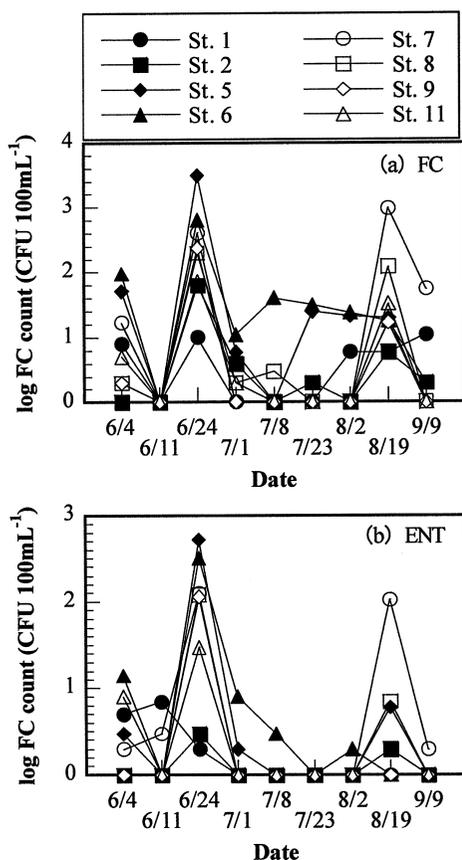


図3 各調査日における細菌数の変化

(3) 各項目と細菌数との関係

FCとENTの細菌数と各項目（前日降水量、水温、pH、塩分濃度、および濁度）との相関関係について検討した。いずれのふん便性細菌も前日降水量と極めて高い正の相関を示した（FC： $r=0.83$ ，ENT： $r=0.99$ ）。沿岸域のふん便性細菌数は、降雨による影響を受け増加することがわかった。また、塩分濃度とは有意な負の相関を示した（FC： $r=-0.60$ ，ENT： $r=-0.75$ ）。したがって、沿岸環境におけるふん便性細菌は、晴天時では海水による希釈効果によって細菌数は減少し、降雨時には、河川等を通じて陸域からの影響を受け、細菌数が増加することが示唆された。

(4) *E. faecium*と*E. faecalis*の同定

表1に各調査地点から単離した腸球菌株の*E. faecium*と*E. faecalis*の同定結果を示す。腸球菌種の同定は各調査日において菌数が高い値を示した地点4、6、7、9、10、および11において実施した。*E. faecium*は今回調査したすべての地点において検出され、*E. faecalis*は地点4、7、および9において検出された。*E. faecium*と*E. faecalis*を合計した存在割合をみると、地点10において最も低く10%程度であった。その一方で、地点4、9、および11では高い存在割合であり、これらの地点は人畜を起源としたふん便性

表1 *E. faecium*と*E. faecalis*の同定結果

Stations	No. of isolates	No. of Strains	
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
4	80	14	21
6	20	3	0
7	40	4	2
9	20	7	1
10	20	2	0
11	40	24	0

細菌による汚染を受けている可能性が高いことが高いことが示唆された。

4. まとめ

- (1) 調査期間中のFCおよびENTの細菌数は、それぞれ $0\sim 6.3\times 10^3$ CFU/100mLおよび $0\sim 5.2\times 10^2$ CFU/100mLの範囲で検出され、各地点において細菌数は大きく変動した。
- (2) レクリエーションエリアとして利用されている地点において、サーフィンエリアでは高い細菌数を示す地点もあったが、一方で、海水浴場の細菌数はいずれの地点においても低かった。
- (3) 両ふん便性細菌も塩分濃度と有意な負の相関を示し、前日降水量とは高い正の相関を示した。沿岸域の細菌数は降雨による影響を強く受けることが示唆された。
- (4) *E. faecium*と*E. faecalis*の同定結果から、両腸球菌種が高い割合で存在する地点があり、これらの地点は人畜を起源としたふん便性細菌の影響を受けていることがわかった。

参考文献

- 1) Cabelli, V. J., Dufour, A. P., McCabe, L. J. and Levin, M. A. (1982) Swimming-associated gastroenteritis and water quality, *Am. J. Epidemiol.*, **115**, 606-616.
- 2) 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, *Wat. Res.*, **38**, 3119-3131.
- 3) Savichtcheva, O., Okayama, N. and Okabe, S. (2007) Relationships between Bacteroides 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators, *Wat. Res.*, **41**, 3615-3628.
- 4) 古川隼士, 田中昭彦, 吉田照豊, and 鈴木祥広 (2010) 沿岸域における河川水中のふん便性細菌の挙動に関する基礎的検討, *環境技術*, **39**, 42-48.
- 5) Jackson, C. R., Fedorka-Cray, P. J. and Barrett, J. B. (2004) Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3558-3565.
- 6) Liu, D., Wang, C., Swaitlo, E. J. and Lawrence, M. L. (2005) PCR amplification of species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*, *Res. Microbiol.*, **156**, 944-948.