研究論文

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

古川 隼 士*・川 畑 勇 人*・鈴 木 祥 広*

要 旨

本研究では、宮崎市の沿岸レクリエーション用水域を中心に、ふん便汚染の指標細菌であるふん便性大腸菌群（FC）および腸球菌（ENT）の実態調査を行った。調査期間は、梅雨期間と海水浴場開放期間を含む2009年6月～9月とした。沿岸水中のFCおよびENTの細菌数は、それぞれBDL（Below detection limits, 検出下限値以下） $\sim 6.3 \times 10^3$ CFU/100 mLおよびBDL $\sim 5.2 \times 10^2$ CFU/100 mLの範囲で検出され、調査日および調査地点によって大きく変動した。調査期間において、いずれのふん便性細菌についてもUSEPAの水質基準値を超えて検出される場合があった。また、両ふん便性細菌ともに前日降水量と高い正の相関（FC： $r = 0.83$, ENT： $r = 0.99$ ）を示した。逆に、塩分とは負の相関を示した（FC： $r = -0.60$, ENT： $r = -0.75$ ）。PCR法による腸球菌種の同定試験では、各調査地点から単離した腸球菌株のうち、主に人畜のふん便に由来するとされる *Enterococcus faecium* と *Enterococcus faecalis* が高頻度で同定された地点もあった。降雨時には、沿岸レクリエーション用水域の数地点は、人畜を起源とするふん便汚染を受けていることが示唆された。

キーワード：ふん便性細菌、沿岸レクリエーション用水域、ふん便性大腸菌群、腸球菌、PCR

1. はじめに

現在、沿岸環境における病原性微生物（病原性大腸菌、クリプトスポリジウム、ジアルジア、およびサルモネラ等）による汚染が問題視されており^{1, 2)}、先進国とされる日本や欧米においてさえも、ヒトへの感染・発症リスクは無視できないといわれている³⁻⁵⁾。沿岸環境における微生物学的水質の悪化は、水系感染症等の公衆衛生上の問題だけでなく、レクリエーション用水域、あるいは漁港・養殖場等の閉鎖に伴う経済的な損失についても影響を及ぼす可能性もある。アメリカ合衆国では、病原性微生物の存否、および潜在的风险の指標となるふん便指標細菌のガイドラインを設けており^{4, 6, 7)}、沿岸レクリエーション用水域におけるふん便性細菌の汚染状況等に関する知見・情報

が蓄積されている⁸⁻¹²⁾。また、実際に、沿岸域におけるモニタリング調査によって、ふん便性細菌の基準値を満たさなかった海水浴場は閉鎖勧告を受けている¹³⁾。その一方で、我が国では、海水浴場については開放期間の前にヒトへの健康リスクを鑑みて、ふん便性大腸菌群の調査が実施されているが、公衆衛生を目的とした細菌学的調査を継続的に実施した事例はそれほど多くなく^{14, 15)}、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・情報は乏しいのが現状である。したがって、真に安心・安全な沿岸環境を構築するためには、沿岸環境における衛生管理に関わるふん便性細菌汚染を調査し、現状を正確に把握することが重要である。

これまでの著者らの研究において、沿岸域におけるふん便性大腸菌群およびふん便性連鎖球菌は、一年間

* 宮崎大学工学部土木環境工学科 Takashi FURUKAWA, Hayato KAWABATA, Yoshihiro SUZUKI

2011年7月14日受付
2011年10月31日受理

の中でも、梅雨期間から夏期に高濃度で検出され、特に降雨後に濃度が高くなる傾向を示している¹⁵⁾。そこで本研究では、宮崎市内の沿岸レクリエーション用水域（海水浴場、サーフィンエリア）を中心に、ふん便指標細菌であるふん便性大腸菌群（FC）、および腸球菌（ENT）のモニタリング調査を行った。調査期間は、海水浴場の開放等によって沿岸域の利用人口が増加すると考えられる6月～9月とした。

ふん便汚染はヒト由来あるいは非ヒト由来（動物等）に大別される。水環境におけるふん便汚染によるヒトへの健康リスクはヒト由来のふん便性微生物の方が寄与率は高いといわれており、重要視されている¹⁶⁾。そこで、腸球菌種の中でも特にヒトの腸管内に多く存在し、ブタやウシ等の家畜動物からもたびたび検出される *Enterococcus faecium* と *Enterococcus faecalis* について、各調査地点から腸球菌株を単離・培養し、ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction：PCR）法によって菌種の同定を行った。これによって、沿岸域における人畜由来のふん便性細菌汚染の存否について評価した。

2. 材料と方法

2.1 調査概要

調査は、宮崎市沿岸域におけるレクリエーション用水域（海水浴場、サーフィンエリア、およびヨットハーバー）を中心に、全11地点（地点A～K）を対象として実施した（図1）。地点B、I、およびKは夏季において海水浴場として開放されている。地点A、およびE～G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。特に、地点Gは夏季にサーフィンの国際大会も開催されている地点である。地点CおよびDは、それぞれヨットハーバーおよび港であり、地点Jは宿泊施設前にあるビーチである。調査は、特に公衆衛生上重要であると考えられる梅雨期間から海水浴場開放期間を中心に、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。宮崎県の位置する九州南部の梅雨期間は2009年6月2日～7月12日（期間総雨量、283 mm）、宮崎市内の海水浴場開放期間は7月4日～8月31日であった。

2.2 試料採取と測定項目

沿岸水は波打ち際から約10 m 以内、水深約50 cm 程度の表層水を採取し、ポリエチレン容器に保存した。採取した試料は実験室に持ち帰り、直ちに FC および

図1 調査地点

ENT の測定に用いた。また、一般水質項目として、沿岸水の 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、電気伝導度計、CM-30S）、および濁度（カオリン、三菱化学、積分球式濁度計、SEP-PT-706D）を測定した。沿岸水の塩分は EC から算出し¹⁷⁾、水温は試料採取時に棒状温度計を用いて測定した。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を用いた¹⁸⁾。なお、調査エリア周辺には2ヶ所（宮崎、青島）の降水量観測地点があるが、両者の降水量に有意差がなく、エリア内には同等量の降雨があったと考えられるため、宮崎（観測地点）の降水量データのみを用いた（表1）。

表1 調査日および前日降水量

水質調査日	降水量観測日 (調査日前日)	降水量 (mm/day)
2009. 6. 4	2009. 6. 3	15.5
6. 11	6. 10	12
6. 24	6. 23	129.5
7. 1	6. 30	0.5
7. 8	7. 7	0
7. 23	7. 22	6
8. 2	8. 1	0
8. 19	8. 18	31
9. 9	9. 8	0

2.3 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た。10 mL あるいは100 mL の沿岸水試料をメンブランフィルター（孔径0.45 μm , Advantec）を用いて濾過した。細菌の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10 mL（最終容量）を濾過した。FC は mFC 寒天培地（DIFCO）上にフィルターを置き、 $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で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 membrane-Enterococcus Indoxyl- β -D-Glucoside 寒天培地（mEI 培地）にフィルターを置き、 $41.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 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。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。

2.4 PCR 法による腸球菌種の同定

各調査日において、腸球菌数が高く検出された地点について、フィルター上に形成された腸球菌株を単離し、PCR 法による腸球菌種の同定を行った。

mEI 培地上に形成されたシングルコロニーを Todd Hewitt 培地（TH 培地、寒天1.5 %、DIFCO）に釣菌し、 $37 \pm 1.0^\circ\text{C}$ で24時間培養した。培養後、TH 培地に形成されたシングルコロニーから DNA を抽出した。DNA 抽出は Insta Gene Matrix（Bio Rad）を用いて、付属の使用説明書に従った。この抽出した DNA をテンプレートとして用いて、PCR 法によって腸球菌種を同定した。*E. faecium* と *E. faecalis* の PCR 法による同定は、表 2 に示すプライマーをそれぞれ用いた^{19, 20)}。PCR 反応液は、2.0 μL の10 $\times$ Ex Taq Buffer (TaKaRa), 1.6 μL の dNTP Mixture (TaKaRa, 最終濃度：それぞれ0.2 mM), 各2.0 μL のプライマー (1.0 μM), 0.2 μL の TaKaRa Ex Taq HS (TaKaRa, 1.0 U), および8.0 μL の抽出 DNA に4.2 μL の滅菌蒸留水を加え、全量20 μL に調整した。PCR 反応はサーマル

サイクラー（iCycler, Bio Rad）を用いて、以下に示す条件で行った。95 $^\circ\text{C}$ で4分間の熱変性処理後、95 $^\circ\text{C}$ で30秒、アニーリングを54 $^\circ\text{C}$ (*E. faecium*) あるいは62 $^\circ\text{C}$ (*E. faecalis*) で1分間、および72 $^\circ\text{C}$ で1分間を30サイクル行った。その後、最終伸長反応を72 $^\circ\text{C}$ 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(PowerPac Basic, Bio Rad)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

3.1 一般水質項目

表 3 に沿岸水試料の水温、pH、濁度、および塩分を示す。沿岸水の水温は、調査期間中において29.7～23.2 $^\circ\text{C}$ の間で変動した。pH は、いずれの地点においても8.1付近で安定していた。塩分は、地点 D、E、および F を除いて、平均で30 psu 以上であった。地点 D は宮崎港湾奥部であり、採取日によっては塩分が20 psu 以下を示す場合もあった。これは、地点 D が下水処理場の雨水吐き室の吐き口からの越流水が流入してくる地点付近であり、採取日によって塩分の変動が大きいことから、吐き口からの越流水の影響を受けている可能性が考えられる。濁度は、調査地点および調査日において大きく変動した。平均値で比較すると、地点 B において最大の 6.17 ± 4.35 度を示し、地点 A、D、E、および F においても、他地点より比較的高く5.0度以上であった。地点 A および B については理由が不明であるが、地点 D は雨水吐き室の吐き口からの影響、地点 E、および F については、河口に近い地点であるため（直線距離で500 m 以内）、淡水流入の影響を受けて濁度が高かったと考えられる。地点 C と K では、他の地点と比較して低い濁度であった。

3.2 沿岸水中の FC および ENT の細菌数

表 4 に各地点における沿岸水中の FC、および ENT の細菌数の測定結果を示す。沿岸水中の FC は、全調査地点において BDL $\sim 6.3 \times 10^3$ CFU/100 mL の範囲で検出された。FC の細菌数の平均でみると、FC が

表 2 プライマーの塩基配列 (16S rRNA)

菌 種	プライマー	配列 (5'-3')	増幅 DNA (bp)	参考文献
<i>E. faecium</i>	Efm-Forward	GAAAAACAATAGAAGAATTAT	215	19)
	Efm-Reverse	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA		
<i>E. faecalis</i>	Efs-Forward	GCCACTATTTCTCGACAGC	518	20)
	Efs-Reverse	GTCGTCCCTTTGGCAAATAA		

表3 各地点における一般水質項目

地点	水温 (℃)				pH				濁度 (度, カオリン)				塩分 (psu)			
	最大	最小	平均値	標準偏差	最大	最小	平均値	標準偏差	最大	最小	平均値	標準偏差	最大	最小	平均値	標準偏差
A	29.6	24.2	27.4	1.73	8.1	8.0	8.1	0.1	15.8	0.42	5.34	4.76	34.7	31.9	33.4	0.97
B	29.7	25.6	27.5	1.46	8.1	7.9	8.1	0.1	11.8	0.31	6.17	4.35	34.8	31.5	33.4	1.07
C	29.6	23.8	27.2	1.86	8.1	7.9	8.0	0.1	5.20	0.05	2.08	2.07	34.1	27.2	32.0	2.23
D	29.4	23.7	27.1	1.85	8.2	7.8	8.0	0.1	15.6	1.50	5.08	4.67	34.5	13.4	25.3	7.15
E	29.5	23.9	27.0	1.77	8.2	8.0	8.1	0.1	21.5	1.10	5.24	6.31	34.0	15.9	29.8	5.74
F	29.2	23.7	26.9	1.66	8.2	8.1	8.1	0.0	21.7	0.40	5.27	6.49	34.3	15.9	29.4	5.57
G	29.3	23.8	26.9	1.66	8.2	8.1	8.2	0.0	19.9	0.50	4.86	5.84	34.4	20.0	30.9	4.89
H	29.4	23.8	27.1	1.64	8.3	8.0	8.2	0.1	16.1	0.60	4.81	4.82	34.5	22.5	31.2	4.00
I	29.4	23.6	27.0	1.79	8.3	8.1	8.2	0.1	16.2	0.50	4.52	4.62	34.4	21.4	30.9	4.67
J	29.0	23.2	26.8	1.80	8.2	8.1	8.2	0.1	8.26	0.40	4.17	2.96	34.8	22.0	32.0	3.92
K	28.9	23.5	26.8	1.70	8.2	8.1	8.2	0.0	6.10	0.40	2.93	2.07	34.5	23.2	32.1	3.66

表4 各地点における沿岸水中のふん便性細菌数

調査地点	FC(CFU/100 mL)				ENT(CFU/100 mL)			
	最大	最小	平均値	標準偏差	最大	最小	平均値	標準偏差
A	11	0	5	4.5	7	0	2	2.5
B	63	0	10	21	3	0	1	1.1
C	10	1	3	3.3	10	0	2	3.2
D	6.3×10^3	0	1.5×10^3	2.3×10^3	230	0	65	78
E	3.1×10^3	1	3.6×10^2	1.0×10^3	5.2×10^2	0	60	1.7×10^2
F	6.5×10^2	0	97	2.1×10^2	3.2×10^2	0	39	1.1×10^2
G	9.8×10^2	1	1.6×10^2	3.3×10^2	1.3×10^2	0	27	51
H	2.0×10^2	0	37	73	1.2×10^2	0	14	39
I	2.4×10^2	0	29	79	1.2×10^2	0	13	38
J	1.3×10^2	0	39	54	41	0	8	13
K	75	0	13	25	30	0	5	9.7

最も高濃度で検出されていた地点は、地点D（宮崎港湾奥部）であり（ 1.5×10^3 CFU/100 mL）、この地点は、調査期間を通じてFCが高い細菌数で検出された。次いで、サーフィンエリアとして利用されている地点E、F、およびGにおいて高い細菌数で検出され、平均値はそれぞれ 3.6×10^2 CFU/100 mL、97 CFU/100 mL、および 1.6×10^2 CFU/100 mLであった。沿岸水中のENTは、全調査地点においてBDL～ 5.2×10^2 CFU/100 mLの範囲で検出された。ENTの細菌数の平均で見るとFCよりも1～2オーダー低い値で検出される傾向を示した。また、地点別にみるとFCと同様に地点Dでは調査期間を通じて他の地点よりも高い細菌数で検出され、平均値においても最も高い細菌数であった（65 CFU/100 mL）。また、地点E、F、およびGにおいてもFCと同様に比較的高い細菌数で検出される傾向であった。これらの3地点はいずれも河口に近い地点である。地点Eは、宮崎県内の中心市街地（宮崎市、都城市等）を流下する大淀川（一級河

川、流域面積：2,230.0 km²、流路延長：107.0 km）河口、地点FおよびGについても、宮崎市内の比較的都市化された地域を流下する清武川（二級河川、流域面積：179.9 km²、流路延長：45.9 km）河口に、それぞれ位置しており、河口から離れている他地点よりは、陸域からの淡水流入の影響を受けやすいと推測され、ふん便性細菌が高い値で検出される傾向にあったと考えられる。

調査期間中、いずれのふん便性細菌も調査地点・調査日によって、細菌数は大きく変動した。調査期間を通じて、FCおよびENTが高い細菌数で検出された地点D（宮崎港湾奥部）は、下水処理場の雨水吐き室の吐き口が隣接しており、そこからの越流水の影響によって、たびたび細菌数が高くなることがあり、両ふん便性細菌の平均細菌数が高くなったと推察される。

3.3 各調査地点における細菌数の変化

全調査地点のうち、公衆衛生上重要であると考えられる地点、海水浴場として開放される地点（地点B、

I, およびK), サーフィンエリアとして頻繁に利用されている地点(A, E, F, G, およびH), および各ふん便性細菌が高濃度で検出された地点Dについて, 各調査日における細菌数の変化を検討した. 図2に各地点における沿岸水中のFCおよびENTの細菌数の変化を示す. 海水浴場およびサーフィンエリアについてみると, いずれのふん便性細菌についても6月下旬と8月中旬の調査日において, 高い細菌数で検出された. 6月24日におけるFCおよびENTの細菌数は, いずれも地点Eにおいて最大値を示し, その細菌数は, それぞれ 3.1×10^3 CFU/100 mL および 5.2×10^2 CFU/100 mLであった. また, 8月19日では, 地点G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 9.8×10^2 CFU/100 mL および 1.1×10^2 CFU/100 mLであった. 高濃度のふん便

性細菌が検出された6月24日および8月19日の前日の降水量は, それぞれ129.5 mm/day および31.0 mm/dayであった. したがって, 降雨の影響によって, 陸域から高濃度のふん便性細菌が沿岸域に流入したものと考えられる. 細菌数の平均値が最も高かった地点Dは, FCおよびENTともに他地点よりも高濃度で検出される傾向を示した. 他地点と同様に, 降雨後において細菌数が高くなる一方で, 降水量がそれほど高くなかった調査日についてもFCとENTが高濃度で検出される場合があった. 地点Dは港として利用されており, 他の調査地点よりは比較的閉鎖的である. そのため, 降雨初期におけるフラッシュアウトによって雨水吐き室から流入したふん便性細菌が, 地点D付近に蓄積し, 降雨が記録されなかった調査日においても, FCとENTが検出された可能性が考えられる. この地点はレクリエーション用水域としては利用されていないが, この地点において高濃度で存在したふん便性細菌が周辺の沿岸域に拡散していく可能性も否定できない.

U. S. Environmental Protection Agency (USEPA) が制定している海域のレクリエーション用水域におけるFCとENTの水質基準は, それぞれ800 CFU/100 mL⁶⁾と104 CFU/100 mL⁴⁾となっている. FCについて比較すると, サーフィンエリアである地点EおよびGにおいて, それぞれ1回ずつ基準値を超過したが, 海水浴場である3地点はすべての調査日において基準値以下であった. 一方で, ENTについてはサーフィンエリアである地点E, F, G, およびHにおいて, 少なくとも1回以上は基準値以上で検出された. また, 海水浴場である地点Iにおいても6月の調査日において, 基準値以上の116 CFU/100 mLで検出されたが, これは海水浴場の開放期間外であった.

我が国における海水浴場等における水浴場水質判定基準は, FCについて設けられている²¹⁾. その判定基準は, FCの細菌数を用いて「適(不検出~100個/100 mL以下)」、「可(400個/100 mL以下~1,000個/100 mL以下)」、および「不適(1,000個/100 mLを超えるもの)」に区分される. 本調査期間におけるFCの細菌数は, いずれの調査日においても「適」, あるいは「可」に区分される結果となった.

3.4 各項目と細菌数との関係

FCとENTの細菌数と, 各項目(水温, pH, 濁度, 塩分, および前日降水量)との関連性について検討した(表5). FCとENTとの間には有意な正の相関関

図2 FCおよびENTの細菌数の変化

表5 各ふん便性細菌と各項目との関係

	FC (CFU/100 mL)	ENT (CFU/100 mL)	pH	水温 (℃)	塩分 (psu)	濁度 (度)	降水量 (mm/day)
FC	1						
ENT	0.65*	1					
pH	-0.30*	-0.22	1				
水温	0.09	-0.03	-0.20	1			
塩分	-0.60*	-0.75*	0.27*	-0.03	1		
濁度	0.29*	0.69*	-0.17	-0.01	-0.48*	1	
降水量	0.83*	0.99*	—	—	—	—	1

* $p < 0.01$

係が認められた ($r = 0.65$). 各ふん便性細菌と塩分との間には有意な負の相関関係を示した (FC : $r = -0.60$, ENT : $r = -0.75$). これまでの研究において, FC および ENT は塩分と中位以上の負の相関を示すことが報告されており^{22, 23)}, 本研究においても同様の傾向を示した. また, 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関係を示し, FC および ENT で, それぞれ $r = 0.83$ および $r = 0.99$ であった. アメリカにおけるモニタリング調査では, 降雨後に沿岸域においてふん便性細菌数が著しく高くなることが指摘されており^{24, 25)}, 海水浴場においては, ふん便性細菌が USEPA の基準値を上回って検出されることが報告されている²⁶⁾. また, 降雨によって都市排水や都市河川水等の陸域からの沿岸域への流出量が増加することが, 沿岸域の細菌学的な水質悪化に強く関連していることも示されている²⁶⁾. したがって, 宮崎市の沿岸レクリエーション用水域においても降雨による影響を受け, ふん便性細菌の濃度が上昇することが示唆された.

以上のことから, 沿岸環境におけるふん便性細菌は降雨等の天候による影響を受けて濃度が増減することが推察される. また, 都市化が進んだ地域を流下する河川の河口付近, および下水処理場の雨水吐き室のような点源汚染が隣接する地点においても, ふん便性細菌が高濃度で検出される傾向を示した. したがって, 今後はふん便性細菌の測定に加えて, 有機物汚染指標となる COD や栄養塩類 (窒素, リン等) についても分析し, より詳細にふん便汚染の挙動に関する検討を行う必要がある.

3.5 腸球菌種の同定

ふん便性細菌汚染の実態調査において, 各調査日の腸球菌が高い菌数で検出された地点から腸球菌株を単離・培養し, PCR 法によって腸球菌種を同定した.

対象とした *E. faecium* と *E. faecalis* は, 腸球菌種の中でも特にヒトの腸管内に多く存在しており, プタやウシ等の家畜動物からも検出される菌種である. 特に, ヒトの胃腸管内に限定すれば, 全腸球菌種に対する割合は, *E. faecium* と *E. faecalis* の 2 菌種で 9 割以上であることが示されている²⁷⁾ ことから, ふん便汚染指標として重要視されている菌種である. すなわち, これら 2 菌種の沿岸域における存在割合を知ることによって, 人畜に由来するふん便汚染について明らかにすることが可能である.

表 6 に各調査地点から単離した腸球菌株の同定結果を示す. なお, 今回は腸球菌が高濃度で検出された地点 D, F, G, I, J, および K からそれぞれ 80 株, 20 株, 40 株, 20 株, 20 株, および 40 株を単離して同定試験を行った. *E. faecium* は, 調査したすべての地点から検出され, 地点 K において最も高い割合である 60% を示した. *E. faecalis* は地点 D, G, および I において検出された. 地点 D を除いて *E. faecium* の方が *E. faecalis* よりも高頻度で検出された. *E. faecium* と *E. faecalis* を合計した存在割合でみると, 地点 J において最も低い 10% 程度であった. それに対して, 地点 D, I, および K においては, 40% 以上の存在割合であった. したがって, 地点 D, I, および K は人畜由来のふん便性細菌による汚染を強く受けてい

表 6 PCR 法による腸球菌種の同定

地点	単離 株数	菌株数	
		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
D	80	14 (18 %) *	21 (26)
F	20	3 (15)	0 (0)
G	40	4 (10)	2 (5)
I	20	7 (35)	1 (5)
J	20	2 (10)	0 (0)
K	40	24 (60)	0 (0)

* 括弧内は存在割合

ることが示唆された。

宮崎市沿岸域を対象としたふん便性細菌の実態調査、さらに遺伝子学的手法による人畜由来のふん便性細菌の存否の把握によって、沿岸域におけるふん便性細菌の汚染状況に関する情報を得ることができた。また、沿岸水の塩分濃度の変化によって、陸域由来の淡水が流入していることも推察できる。さらに、PCR法による腸球菌種の同定によって、人畜由来のふん便性細菌の存在を明らかにすることができた。しかしながら、沿岸域における細菌学的水質モニタリングのみでは、ふん便性微生物の汚染源を特定することは極めて困難である。したがって、沿岸域におけるふん便汚染の根本的な解決を図るためには、細菌学的水質調査に加え、遺伝子学的手法や生化学的手法を用いた汚染源追跡手法が極めて重要なツールとなる。ふん便性微生物汚染の追跡手法開発に関する研究は、著者らの研究を含め^{28, 29)}、世界中で積極的に推進されている^{1, 2, 16)}。沿岸域における公衆衛生の改善に寄与するためにも、ふん便性細菌による汚染状況に関する知見・情報の集積に加え、汚染源追跡に関する研究の今後のさらなる推進が必要である。

4. ま と め

本研究では、宮崎市の沿岸レクリエーション用水域を中心に、ふん便性細菌であるFCおよび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) FC および ENT の細菌数は、それぞれ BDL $\sim 6.3 \times 10^3$ CFU/100 mL および BDL $\sim 5.2 \times 10^2$ CFU/100 mL の範囲で検出され、調査日および調査地点によって大きく変動した。
- (2) 海水浴場あるいはサーフィンエリアとして頻繁に利用されている地点における、各ふん便性細菌の細菌数の変化を検討したところ、海水浴場開放期間においては、FC および ENT の細菌数が USEPA の基準値を超えることはなかった。しかしながら、サーフィンエリアではいずれの細菌数もたびたび基準値を超過して検出される場合があった。
- (3) 各ふん便性細菌と前日降水量に極めて高い正の相関関係があった(FC: $r = 0.83$, ENT: $r = 0.99$)。逆に、各ふん便性細菌と塩分濃度との間にも有意な負の相関関係が認められた(FC: $r = -0.60$, ENT: $r = -0.75$)。したがって、沿岸域のふん便性細菌は天候等の影響を受けて、変動することが考えられる。また、河口、お

よび点源汚染付近の地点は、両ふん便性細菌が高濃度で検出される傾向を示した。

- (4) PCR 法による *E. faecium* と *E. faecalis* の同定結果から、これら2種類の腸球菌種が40~60%の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) 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**, (12), 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**, (1), 71-79, 2004.
- 3) Cabelli, V. J., Dufour, A. P., McCabe, L. J. and Levin, M. A.; Swimming-associated gastroenteritis and water quality, Am. J. Epidemiol., **115**, (4), 606-616, 1982.
- 4) U. S. Environmental Protection Agency.; Ambient water quality criteria for bacteria -1986, EPA A440/5-84-002. Office of Water, Washington, DC., 1986.
- 5) Alexander, L. M., Heaven, A., Tennant, A. and Morris, R.; Symptomatology of children in contact with sea water contaminated with sewage, J. Epidemiol. Community Health, **46**, (4), 340-344, 1992.
- 6) U. S. Environmental Protection Agency.; Quality criteria for water. EPA-440/976023. Office of Water, Washington, DC., 1976.
- 7) U. S. Environmental Protection Agency.; Bacterial water quality standards for recreational waters (freshwater and marine waters), EPA-823-R-03-008, Washington DC., 2003.
- 8) 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**, (15), 275-3282, 2003.
- 9) Delille, D. and Gleozon, F.; Distribution of enteric bacteria in Antarctic seawater surrounding the Port-aux-Français permanent station (Kerguelen Island), Mar. Pollut. Bull., **46**, (9), 1179-1183, 2003.
- 10) Noble, R. T., Leecaster, M. K., McGee, D. C., Weiberg, S. B. and Ritter, K.; Comparison of bacterial indicator analysis methods in stormwater-affected coastal waters, Water Res., **38**, (5), 1183-1188, 2004.
- 11) 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**, (13), 3119-3131, 2004.
- 12) Chigbu, P., Gordon, S. and Strange, T.; Influence of inter-annual variation in climatic factors on fecal coliform level in Mississippi Sound, Water Res., **38**, (20), 4341-4352, 2004.
- 13) Morrison, C. R., Bachoon, D. S. and Gates, K.W.; Quantification of enterococci and bifidobacteria in Georgia estuaries using conventional and molecular methods, Water Res., **42**, (14), 4001-4009, 2008.

- 14) 山本 攻：大阪市におけるし尿海洋投棄処分と大阪市立衛生研究所が果たした役割, 生活衛生, **51**, (3), 178-184, 2007.
- 15) 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**, (8), 493-499, 2010.
- 16) Field, K. G., and Samadpour, M.; Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality, Water Res., **41**, (16), 3517-3538, 2007.
- 17) 松山 優治：3-6 塩分, 地球環境調査計測辞典 第3巻 沿岸域編, 竹内均 編, 221-222, 1986, フジ・テクノシステム, 東京, 2003.
- 18) 国土交通省気象庁：気象統計情報, 気象庁,(オンライン), <<http://www.jma.go.jp/jma/menu/report.html>>, (参照 2011-06-10).
- 19) Jackson, C. R., Fedorka-Cray P. J., and Barrett, J. B.; Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci, J. Clin. Microbiol., **42**, (8), 3558-3565, 2004.
- 20) Liu, D., Wang C., Swiatlo E. J., and Lawrence, M. L.; PCR amplification of species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identify of *Enterococcus faecalis*, Res. Microbiol., **156**, (9), 944-984, 2005.
- 21) 環境省水・大気環境局：水浴場水質調査結果, 環境省,(オンライン), <http://www.env.go.jp/water/suiyoku_cho/index.html>, (参照2011-06-10).
- 22) Lipp, E. K., Farrah, S. A. and Rose, J. B.; Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community, Mar. Pollut. Bull., **42**, (4), 286-293, 2001.
- 23) Troussellier, M., Got, P., Bouvy, M., M'Boup, M., Arfi, R., Lebihan, F., Monfort, P., Corbin, D. and Bernard, C.; Water quality and health status of the Senegal River estuary, Mar. Pollut. Bull., **48**, (9-10), 852-862, 2004.
- 24) Reeves, R. L., Grant, S. B., Mrse, R. D., Copil Oancea, C. M., Sanders, B. F., and Boehm, A. B.; Scaling and management of fecal indicator bacteria in runoff from a coastal urban watershed in southern California, Environ. Sci. Technol., **38**, (9), 2637-2648, 2004.
- 25) Ahn, J. H., Grant, S. B., Surbeck, C. Q., DiGiacomo, P. M., Nezhlin, N. P., and Jiang, S.; Coastal water quality impact of stormwater runoff from an urban watershed in southern California, Environ. Sci. Technol., **39**, (16), 5940-5953, 2005.
- 26) Dorfman, M.; Testing the Waters: a Guide to Water Quality at Vacation Beaches, National Resource Defense Council, 2006.
- 27) 国府島泉：水質汚染指標としての腸球菌の菌種分類, 日本水処理生物学会誌, **27**, (1), 107-110, 1991.
- 28) Furukawa, T., Takahashi, H., Yoshida, T., and Suzuki, Y.; Genotypic analysis of enterococci isolated from fecal-polluted water from different sources by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for application to microbial source tracking, Microbes Environ., **26**, (2), 181-183, 2011.
- 29) Furukawa, T., Yoshida, T., and Suzuki, Y.; Application of PFGE to source tracking of fecal pollution in coastal recreation area: A case study in Aoshima Beach, Japan, J. Appl. Microbiol., **110**, (3), 688-696, 2011.

Monitoring of Fecal Bacteria in a Coastal Recreation Area during Summer Months

Takashi FURUKAWA*, Hayato KAWABATA*, Yoshihiro SUZUKI*

* Department of Civil and Environmental Engineering, Faculty of Engineering, University of Miyazaki

ABSTRACT

Fecal coliform (FC) and enterococci (ENT), frequently used as fecal indicators were monitored in the coastal recreation area of Miyazaki, Japan, from June to September 2009. The FC and ENT counts in coastal water were found to range from Below detection limits (BDL) to 6.3×10^3 CFU/100 mL and from BDL to 5.2×10^2 CFU/100 mL, respectively. These counts varied depending on the numbers of sampling days and stations, and exceeded the criteria for marine recreation water recommended by the US Environmental Protection Agency during sampling events. Both bacteria showed a significant positive correlation with rainfall (FC: $r = 0.83$, ENT: $r = 0.99$), and a negative correlation with salinity (FC: $r = -0.60$, ENT: $r = -0.75$). In the identification test of enterococcal strains using PCR, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* were detected at high frequencies in some stations. Our findings demonstrate that during heavy rains, some stations in the coastal recreation area could be affected by fecal pollution from human and livestock feces with the inflow of inland water.

Key Words : Fecal bacteria, Coastal recreation areas, Fecal coliform, Enterococci, PCR