

平成23年度 財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構
「水質保全研究助成」 成果報告書

水浴場の糞便汚染の変動と バクテリオファージを用いた汚染源の推定

大阪教育大学 広谷博史

1. はじめに

夏季に水浴場で余暇を過ごすことは、若者や家族連れを中心に人気が高い。しかし、近年の娯楽の多様化や、ゲーム、パソコンといった室内型遊技の普及に伴い、水浴者は減少傾向にある。琵琶湖には20を越える水浴場があるが、全国的に見ても湖沼の水泳場は少なく、また水浴場は観光地としての側面を合わせ持つので、誘客を促進するためには良好な環境を維持し、水浴場の水質を保全することは重要な施策となる。琵琶湖の水浴場は、南湖の雄琴水泳場が昭和48年に、柳が崎水泳場が平成5年に、新唐崎水泳場が平成11年にそれぞれ休止し、今では北湖に限られている。これは、必ずしも南湖の水浴場水質が水浴に不適切となったわけではなく、道路や鉄道の整備によってより自然の残る湖北部に訪れることが容易になったことが要因であろう。しかし、手軽に自然を満喫するという観点からは、都市部に近い水浴場の環境をより向上させて湖水とのふれあいが可能となることが望ましい。

本研究は、琵琶湖の水浴場の水質向上に資する基礎データを得るために、北湖のなかで比較的南部に位置する水浴場の糞便汚染の現状把握と糞便汚染の由来の推定を試みるために行った。

2. 材料と方法

2-1 調査の概要

調査は琵琶湖の水浴場4カ所、及び流入河川1カ所で行った。汚染度合いの低い水浴場として近江舞子浜（大津市南小松）、松の浦（大津市木戸）、夏季にやや汚染が高くなると思われる水浴場として真野浜（大津市今堅田）、なぎさ公園（守山市今浜町）、流入河川の例として野洲川服部大橋（守山市服部町）に調査地点を設けた（図1）。2011年6月2日9:00から12:00に水浴場のみ4地点で予備調査を行い、水浴場の開設前として6月29日12:00から13:50、開設後として7月26日6:00から7:00、8月24日5:45から7:10及び11:30から12:55にかけて全地点で調査を行った。水浴場では湖岸から1mの表層、河川では流心の表層の試料を採取した。同時に水浴場の水浴者数を計数した。

また、水浴場の開設期間外として2011年12月13日6:00から7:40にも採水を行った。

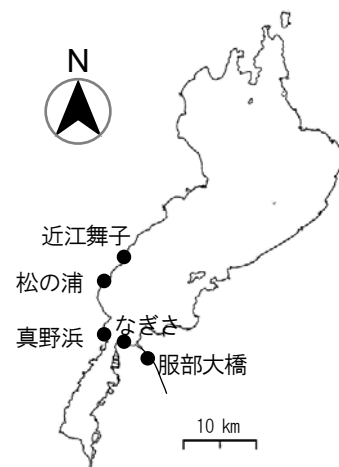


図1 調査地点

2-2 水質分析

持ち帰った試料は、TOCの測定を行った。680°Cの燃焼酸化法（島津製作所、TOC-V CSN）にて生じた全炭素の量から無機炭素量を減じて算出した。

2-3 微生物の測定

大腸菌群数と大腸菌数は、Colilert18 (Idexx) を用いて測定した。試料水100mLにColilert18粉末を溶解させ、QuantiTray2000 (Idexx) に移して密封し、37°Cで18時間培養した。黄変したウェル数を計数し、最確値法により大腸菌群数を算出した。また、365nmの紫外線を照射し、蛍光を発したウェルを計数し、最確値法により大腸菌数を算出した。

糞便性大腸菌群数は、試料を0.45µm孔径のメンブランフィルターでろ過した後、フィルターをmFC培地上に移し、45±0.2°Cで24時間培養後に生じた青色コロニーを計数した (AHPA, 2005)。mFC培地は、mFC基本培地 (Difco) に寒天を加えて加温溶解し、ロゾール酸を添加したものをを用いた。

腸球菌数は、Enterolert (Idexx) を用いて測定した。試料水100mLにEnterolert粉末を溶解させ、QuantiTray2000 (Idexx) に移して密封し、41°Cで24時間培養した。365nmの紫外線を照射し、蛍光を発したウェルを計数し、最確値法により腸球菌数を算出した。

FRNAファージは、宿主としてSalmonella typhi WG49 (HavelaarとHogeboom, 1984) を改変トリプトン寒天培地に加えたものと試料水を1:1に混合し、37°Cで24時間培養後に生じたプラーク数を計数した (GrabowとCoubrough, 1986)。改変トリプトン寒天培地の組成は、トリプトン10g/L、酵母エキス1g/L、グルコース1g/L、NaCl 8g/L、CaCl₂ 0.22g/L、カナマイシン200µg/L、ナリジクス酸100mg/L、寒天12g/Lであった。

2-4 糞便汚染源の推定

Salmonella typhi WG49平板の表面に生じたFRNAファージのプラークからファージを採取してmilli-Q水に混和し、95°Cで5分間RNAを抽出し、0°Cで2分間急冷した (Schwabら, 1997)。RT-PCRキット (タカラ, PrimeScript one step RT-PCR Kit Ver. 2) の酵素溶液にプライマー (Invitrogen) (表1) (Friedmanら, 2009) を加えたものに、RNA抽出液を入れ、サーマルサイクラーにて逆転写を50°Cで30分、伸長を94°Cで2分行い、生じたcDNAについて、変性を94°Cで30秒、アニーリングを60°Cで30秒、伸長を72°Cで1分のサイクルを30回繰り返すPCR法により増幅した。増幅されたcDNAは、0.1~2kbpのDNAマーカー (Gene Ladder 100, ニッポンジーン) とともに電気泳動を行い、増幅さ

表1 使用したプライマー

血清型類別	プライマー	配列	アンプリコンサイズ	由来
I	1F	CAAACCAGCATCCGTAGCC	142	主として動物
	1R	CTTGTCAGCGAACTTCTTRTA		
II	2F	ATGCCGTTAGGTTTAGRTGAC	471	主としてヒト
	2R	GCAATHGCAACCCCAATA		
III	3F	CTACTGCTGGTAATCTCTGGC	795	主としてヒト
	3R	CAACRCCGTTTRGTGGGATTTAC		
IV	4F	CTGTCCGCAGGATGTWACCA	1159	主として動物
	4R	GGCACTGTCCTGAATCCACG		

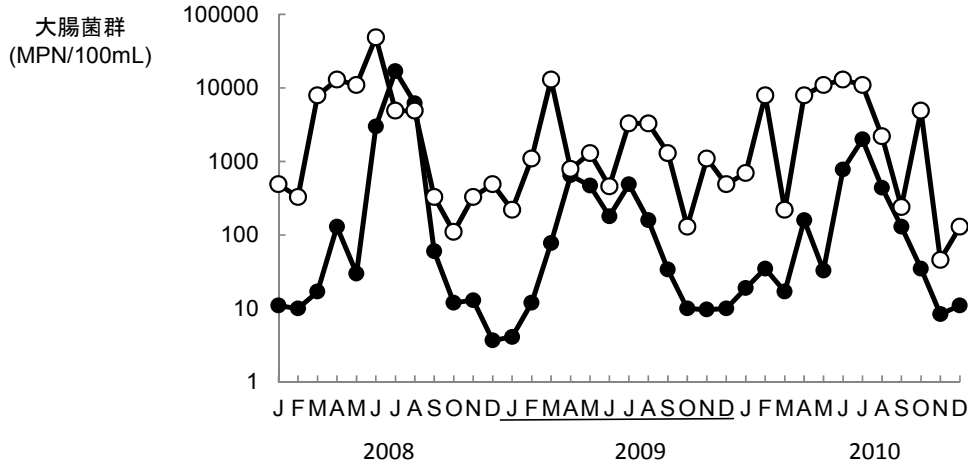


図2 琵琶湖北湖西岸 (●) と野洲川下流 (○) の大腸菌群数の経月変化

れてきたアンプリコンの相対的なサイズからプラークを形成したファージを血清型に分類した。

2-5 ファージの濃縮

試料水400mLに2.02gのMgCl₂を溶解し、セルロース混合エステル製メンブランフィルター（ミリポア, HA, 孔径0.45μm, 直径47mm）で吸引ろ過した後、0.5mMのH₂SO₄でフィルターのカチオンを洗浄し、5mLのNaOH溶液（pH 10.5）または肉エキス溶液（pH 9.5）で溶出を行った（Katayamaら, 2002）。溶出液は、milli-Q水で2倍に希釈した後、分析に供した。

3. 結果と考察

3-1 琵琶湖の水質の概要

滋賀県立琵琶湖環境科学センターのウェブサイト (<http://www.lberi.jp/>) に公表されている水質データベースから、琵琶湖の大腸菌群数の3年間の変化を調べた（図2）。北湖西岸の平均値は毎年おおむね7月頃に極大となり、12月頃に極小となる季節変化を示した。極大値と極小値の違いは100から1000倍となっていた。3年分のデータであるので、減少または増加のトレンドは不明である。一方、野洲川下流では、2008年6月に極大となり2010年11月に極小となるなど、季節変化をした可能性は認められるものの、全体としては湖水ほど明瞭な季節変化は認められなかった。値はおおよそ2桁の範囲内で変動した。大腸菌群は生活環境の保全に関する環境基準項目のひとつではあるものの、糞便汚染とは関わりのない細菌による偽陽性の懸念が指摘されており（金子, 1996）、湖水における季節変動は糞便汚染負荷の季節変動というよりも偽陽性をもたらす細菌の季節変動が原因であると考えるのが妥当であろう。

3-2 調査結果と水質の概要

水浴場の水質を判定する基準となる水浴場水質判定基準には、衛生的項目として大腸菌群数の代わりに糞便性大腸菌群数が用いられる。これは、大腸菌群と比べ高温条件で増殖できる細菌群のことで、糞便汚染に関する指標性が高らかに高い指標細菌と見なされている（金子, 1996）。本研究では、水浴場湖水と流入河川の大腸菌群数（図3）とともに糞便性大腸菌群数（図4）の変化を調べた。

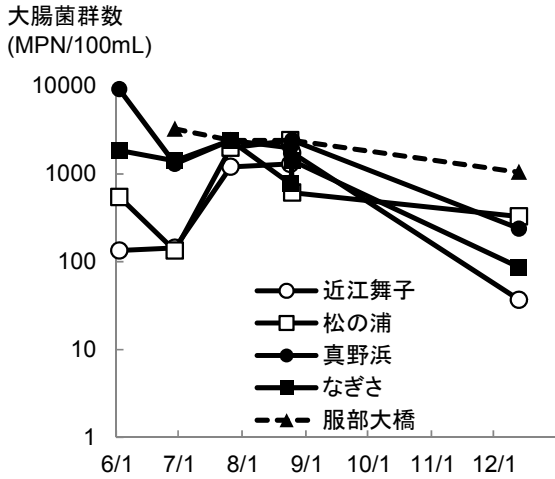


図3 大腸菌群数の変動

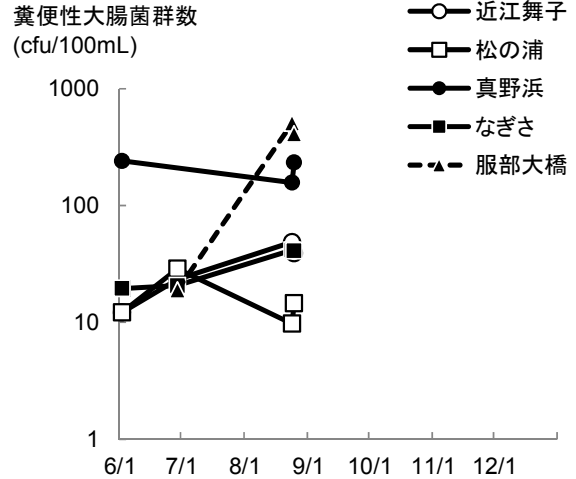


図4 糞便性大腸菌群数の変動

水浴場の大腸菌群数は、夏季に高く冬季に減少するという傾向が認められた。変動幅は報告されている北湖西岸の平均値より少なかった。流入河川に設けた地点である服部大橋においても冬季にやや減少したが、値は公表されている例年の計数値より高くなった。この違いは、公表されているものは公定法に従いBGLB発酵管を用いて最確数によって定量しているが、本研究はでコリラート18を用いた特定酵素基質法の最確数によって定量したという測定方法の違いが原因であると考えられる。一般に特定酵素基質法は培養によってガス発生を検知するより感度が高いことが知られている。この傾向は特に清浄な水域で顕著である (HirotsaniとYoshimura, 2005)。8月24日には早朝と午後に計測を行ったが、その差は水浴者の多少に関わらず小さく (表2)、水浴者の影響はあまりないと考えられた。

糞便性大腸菌群数の計数は12月には行わなかったが、夏季の変動は湖水よりも流入河川で大きかった。8月24日における早朝と午後との違いも小さくなく、水浴者の影響は少ないと考えられた。大腸菌群や糞便性大腸菌群は水温や天候などの影響を受けることが知られている (Hirotsaniら, 1992) ので、ここでもさまざまな環境要因の影響を大きく受けていると考えられた。

大腸菌数の変動には、大腸菌群数や糞便性大腸菌群数の変動とは異なり季節に伴う傾向は認められなかった (図5)。逆転している場合もあったものの、おおむね近江舞子、松の浦といった北にある地点の値が小さくなった。また、大腸菌群数や糞便性大腸菌群数と比べると、8月24日の早朝と午後の違いが大きく、松の浦、真野浜、なぎさでは、2倍から3.2倍に増加した。しかし、水浴者が最も多い近江舞子ではやや減少していたため、必ずしも水浴者の影響とは言えない。流入河川の

表2 水浴者数

	近江舞子	松の浦	真野浜	なぎさ
6月29日午後	36	0	2	4
7月26日早朝	3	0	0	0
8月24日早朝	0	0	0	0
8月24日午後	462	6	32	38
12月13日早朝	0	0	0	0

表3 FRNAファージの変動と汚染由来推定に供した点数

	近江舞子	松の浦	真野浜	なぎさ	服部大橋
6月2日午後	0	0	4	56	-
6月29日午後	0	0	0	0	0
7月26日早朝	0	0	4(2)	2(1)	46(10)
8月24日早朝	0	0	0	0	18(10)
8月24日午後	3(3)	0	1(1)	0	1(1)
12月13日早朝	0	0	0	4(4)	1(1)

6月2日には服部大橋の試験は行わなかった。

数値はプラーク数 (pfu/50mL, ただし8月24日午後のみpfu/100mL) を表す。

かっこ内は糞便汚染由来分析に供した点数を表す。

地点である服部大橋で減少した理由は不明である。

腸球菌数は、7月26日がいずれの地点も高く、おおむね12月になると減少した(図6)。そのため、季節的な変動も考えられたが、大腸菌群と有意な正の順位相関($\rho=0.61$, $n=25$, $P<0.01$)が認められ(図7)、大腸菌と同様に糞便汚染の存在を的確に示していると考えられる。大腸菌は少ないが腸球菌数は多いという事例はあるがその逆はないため、腸球菌数においては偽陽性が含まれる場合があることが示唆された(Hirotani and Yoshino, 2010)。腸球菌数も8月24日の早朝と午後の差が大きかったが、松の浦と服部大橋で大きく減少し、真野浜となぎさで増加した。近江舞子では変化が認められなかった。

FRNAファージは、松の浦を除く地点でいずれかの調査で検出されたが、検出数には特段の傾向は認められなかった(表3)。6月29日にはいずれの地点からも検出されなかったが、このときは宿主の状態が悪く、他調査において汚染の激しい河川で採取した試料からもファージが検出されなかったので、どの地点にもFRNAファージが存在しなかったわけではないと考えるのが妥当であると思

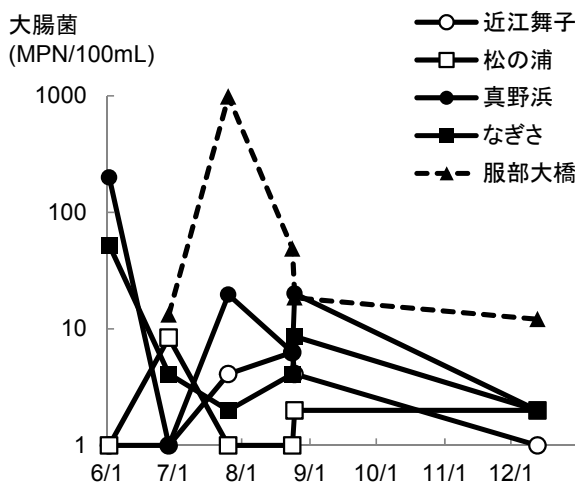


図5 大腸菌の変動

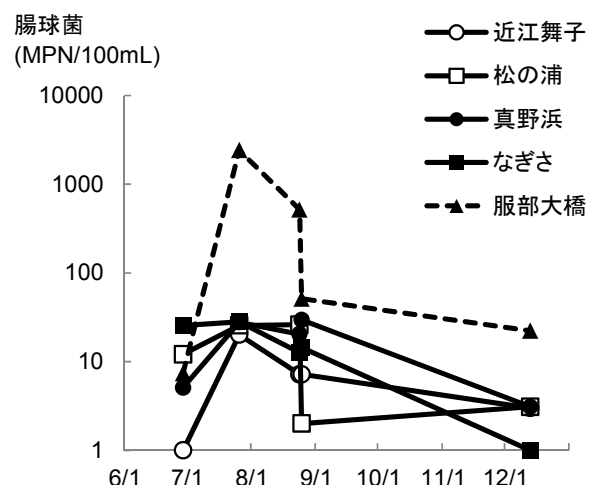


図6 腸球菌の変動

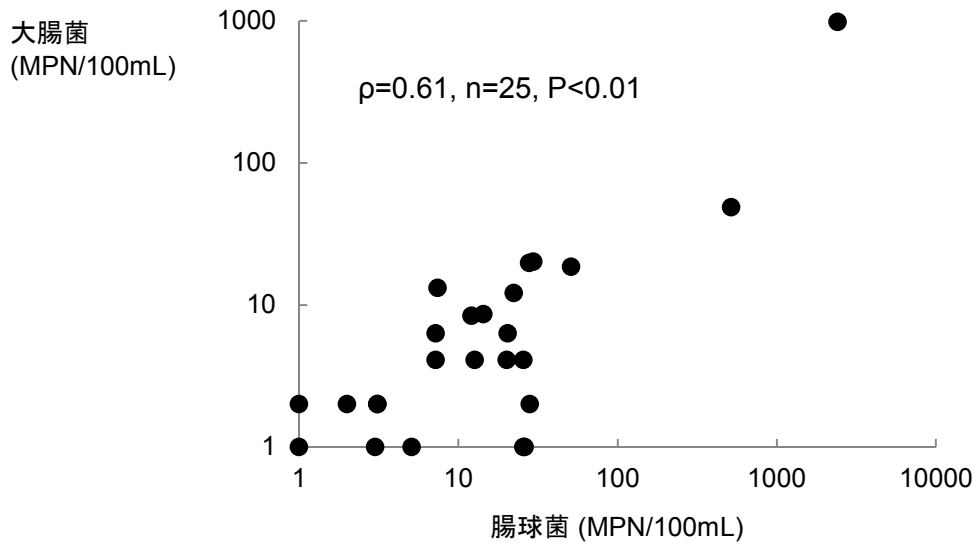


図7 大腸菌と腸球菌の相関

われる。真野浜となぎさには、近江舞子と松の浦より多くのFRNAファージが存在すると思われた。服部大橋のFRNAファージが最も多いと思われたが、8月24日午後や12月13日などには少なくなっており、時期により大きく変動すると思われた。

現場のTOCは、いずれの場合も1.8から3.7mg/L程度の値を示し、異常に高い数値や特段の傾向、または指標との相関は認められなかった(表4)。

3-3 糞便汚染の由来

7月26日以降の調査で検出されたFRNAファージを用いて、糞便汚染の推定を試みた。宿主細菌が生育した寒天平板上で、ファージが宿主細菌を溶菌させた区画をプラークという。ひとつのプラークはひとつのファージ粒子から生じたものなので、プラーク数は試料のファージ粒子数と一致するとともに、プラークの中には単一のファージに由来するクローンが大量に存在する。そこで、プラーク中に多量に存在する同一種類のファージから遺伝子RNAを抽出し、既知のI型からIV型までの血清型に対応する遺伝子配列を持つか否かを調べた。したがって、FRNAファージが検出されない試料では推定を行うことができず、またプラーク数が少ない場合は推定の精度が低下すると思われる。

FRNAから推定した糞便汚染の由来は、8月24日の試料を調べてわかったものは、すべてI型のヒト以外の動物由来であると推定された(表5)。一方、7月26日と12月13日は、II型となり、ヒト以外の動物由来であると推定された。

表4 水浴場のTOC (mg/L)

	近江舞子	松の浦	真野浜	なぎさ	服部大橋
6月29日午後	2.1	2.2	2.8	3.7	2.3
8月24日早朝	2.8	3.1	2.2	2.2	1.8
8月24日午後	1.8	1.8	1.9	1.9	2.0

表5 FRNAファージの血清型の割合

	近江舞子		松の浦	真野浜	なぎさ		服部大橋	
7月26日早朝	-		-	不明	不明		II	不明
8月24日早朝	-		-	-	-		I	不明
8月24日午後	I	不明	-	I	-		I	
12月13日早朝	-		-	-	II	不明	不明	

検出された血清型の割合をセル内部面積の割合で示した。

3-4 ファージの濃縮

前述のように、FRNAファージの血清型を利用した糞便汚染の由来は、検査に用いたファージ数の多い方が精度が高くなる。しかし、琵琶湖水浴場は予測したよりもFRNAファージの密度が低かったため、試料の濃縮を行いより多くのプラークを得ることができるかどうかを検討した。

濃縮前はなぎさと服部大橋にのみファージが検出されたが、濃縮操作を行ったところ、松の浦と真野浜にもファージの存在が確認できた(表6)。濃縮をしない状態では、松の浦からはファージが検出されることはなかったが、濃縮により真野浜より多くのプラークを検出することができた。しかし、濃縮倍率が8倍であることを考慮すると、なぎさでは収率は30%以下ということになる。松の浦、真野浜、服部大橋では収率が100%を越える。収率のばらつきの原因は不明である。また、唯一濃縮前後ともに由来の推定が可能であったなぎさでは、FRNAファージの型組成が濃縮前は主にII型であったのが濃縮後には主にIII型に変わっている。組成が変化することは、フィルターからの溶出液として肉エキスをを用いたため、肉エキスの成分がPCRによるDNAの増幅を阻害している可能性が考えられる。溶出液として有機物を含まないNaOH液を用いた際には、ファージの回収ができなかった。溶出液によって濃縮率またはPCRの収率が影響を受けることが考えられるので、今後検討が必

表6 濃縮によるFRNAファージ数と組成

		近江舞子	松の浦	真野浜	なぎさ	服部大橋
濃縮前 (50mL中)	I型				0	0
	II型				3	0
	III型				0	0
	IV型				0	0
	不明				1	1
	合計	0	0	0	4	1
濃縮後 (400mL中)	I型		0	0	0	0
	II型		0	0	0	0
	III型		14	6	9	12
	IV型		0	0	0	0
	不明		6	1	0	3
	合計	0	40	7	9	25

要である。いずれにせよ、12月13日試料について推定された汚染源はヒト以外の動物が主体であると考えられた。

水浴者は減少傾向にあるものの、ヨットや釣りなどの親水的な娯楽活動は、逆に盛んになってきている。水浴場は観光地としての側面を合わせ持つこともあり、琵琶湖を遊び泳げる場と位置づけ今後もいっそうの環境の保全を進めていく必要がある。

4. まとめ

北湖のうち比較的南部に位置する水浴場の糞便汚染指標の測定を行い、糞便汚染の由来の推定を試みた。その結果、大腸菌群数と糞便性大腸菌群数は季節変動を示し、水温などの要因の関与が示唆された。大腸菌数と腸球菌数には有意な正の相関が認められたが、腸球菌数に偽陽性が含まれる可能性があった。FRNAファージはすべての地点で検出され、季節や他の指標との関係は認められなかった。夏季の糞便汚染はヒト以外の動物に由来すると推定され、周辺の都市環境や水浴者自身による汚染の寄与は少ないと考えられた。一方、冬季にはヒト由来の糞便汚染が主体であると推定された。FRNAファージの濃縮を試みたが、収率が一定とならない上にファージ組成が濃縮前後で変わるため濃縮方法の検討が必要である。

5. 謝辞

Salmonella typhi WG49株は東京大学大学院工学系研究科片山浩之准教授に分譲を受けた。調査にあたっては大阪教育大学大学院山田剛史氏に協力いただいた。

6. 参考文献

- AHPA-AWWA-WPCF (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed.
- S. D. Friedman, E. M. Cooper, L. Casanova, M. D. Sobsey, F. J. Genthner (2009) A reverse transcription-PCR assay to distinguish the four genogroups of male-specific (F+) RNA coliphages, *J. Virol. Methods*, 159, 47-52.
- W. O. K. Grabow and P. Coubrough (1986) Practical direct plaque assay for coliphages in 100-ml samples of drinking water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52(3), 430-433.
- A. H. Havelaar and W. M. Hogeboom (1984) A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.*, 56(3), 439-447.
- H. Hirotani, Y. Matsui, C. Sese, and H. Kagawa (1992) Positive correlations between catchment areas and densities of bacteria in the upper reaches of a river, *Wat. Sci. Tech.*, 26(7-8), 1965-1972.
- H. Hirotani and M. Yoshimura (2005) Using *E. coli* as a microbial indicator for water quality index in the river waters. 1st IWA-ASPIRE (Asia Pacific Regional Group) Conference and Exhibition, Singapore, July, Proceedings 6F-1.
- H. Hirotani and M. Yoshino (2010) Microbial indicators in natural biofilms developed in the riverbed. *Water Sci. Tech.* 62(5), 1149-1153.
- H. Katayama, A. Shimasaki, and S. Ohgaki (2002) Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(3), 1033-1039.
- K. J. Schwab, M. K. Estes, F. H. Neill, and R. L. Atmar (1997) Use of heat release and an internal RNA standard control in reverse transcription-PCR detection of Norwalk virus from stool samples, *J. Clin. Microbiol.* 35(2), 511-514.
- 金子光美 (1996) 水質衛生学, 技報堂出版, 東京, 579pp.