

八郎湖水質調査事業

八郎湖水質調査事業における大腸菌群数および大腸菌数の推移と 分離された大腸菌の性状解析

高橋志保 熊谷優子 檜尾拓子 和田恵理子 今野貴之 八柳 潤

八郎潟の干拓事業によりできた八郎湖は、徐々に富栄養化が進み、水質汚濁の問題が顕在化している。当センターでは、八郎湖の水質保全対策の一環として水質環境基準調査を実施しており、調査実施項目の一つとして大腸菌群数を測定している。また、平成 24 年度からは、環境省が検討している「要測定指標」としての大腸菌数も併せて測定し、その推移を比較検討した。その結果、採水地点 5 カ所の大腸菌群数基準適合率は、33.3～66.7%であり、気温が高い時期に基準を超過する傾向にあった。一方、大腸菌数は大腸菌群数と比較して季節による大幅な変動は見られなかった。また、分離した大腸菌の生化学的性状試験や薬剤感受性試験等を実施したところ、下水処理水や生活雑排水の流入が少ないと思われる上流域由来の株と比較して、下流域由来の株ほど多様性を示しており、各種薬剤に対して多剤耐性を示す大腸菌株が存在した。このことは、ヒトの家庭生活環境が八郎湖流入河川に影響を及ぼしていることを示唆している。八郎湖流域河川等への汚濁負荷を少しでも減少させるためにも、下水道等への接続率の向上が望まれる。また、当センターとしても、適切に汚濁状況を把握できるよう、今後も調査を継続していく必要がある。

1. はじめに

八郎潟の干拓事業によりできた八郎湖には、約 20 の中小河川が流入している。湖水は主に干拓地の農業用水に利用されており、湖内では漁業が行われ、釣りなどの親水域としても利用されている。しかし、昭和 52 年に干拓事業が完了してから、八郎湖は徐々に富栄養化が進み、近年はアオコが大量発生するなど、水質汚濁の問題が顕在化している^{1, 2)}。

八郎湖流域の下水道等の整備率は平成 24 年度で 90%に達している³⁾が、下水道に接続されていない集落においては、下水処理水や生活雑排水等の環境中への排出なども考えられ、河川への汚濁負荷の一因となっていると推察される。

当センターでは、公共用水域水質監視事業として、八郎湖に流入する河川水や湖水の水質環境基準調査を実施している。調査実施項目の一つに、糞便汚染の指標として大腸菌群数があるが、大腸菌群数には、土壌などの自然環境に由来する細菌も含まれるため、直接的な糞便汚染の指標としては適切ではないと考えられている。

環境省では環境基準項目として導入を検討し

ている指標を「要測定指標」と位置付けており³⁾、大腸菌数もそれに含まれている。今後、大腸菌数に項目が変更された場合、検査方法も変更されるため、今回、両方法での結果の比較を行うと同時に、大腸菌群数の結果の推移や、分離される大腸菌の性状等を解析することで、ヒトの家庭生活が流入河川に影響を与えているのか検討した。

2. 調査方法

2.1 対象検体

公共用水域水質監視事業の水質調査のため、図 1 に示す八郎湖へ流入する河川 5 地点（馬場目川上流の杉沢発電所と下流の竜馬橋、井川下流の井川橋、豊川下流の豊川橋、馬踏川下流の馬踏川橋）から採水された検体を供試した。

2.2 大腸菌群数の測定

平成 22～25 年度の偶数月に採水された検体を、「水質汚濁に係る環境基準について」⁴⁾に示された最確数による定量法で測定した。

2.3 大腸菌数の測定

平成 24～25 年度に毎月採水された検体を、平

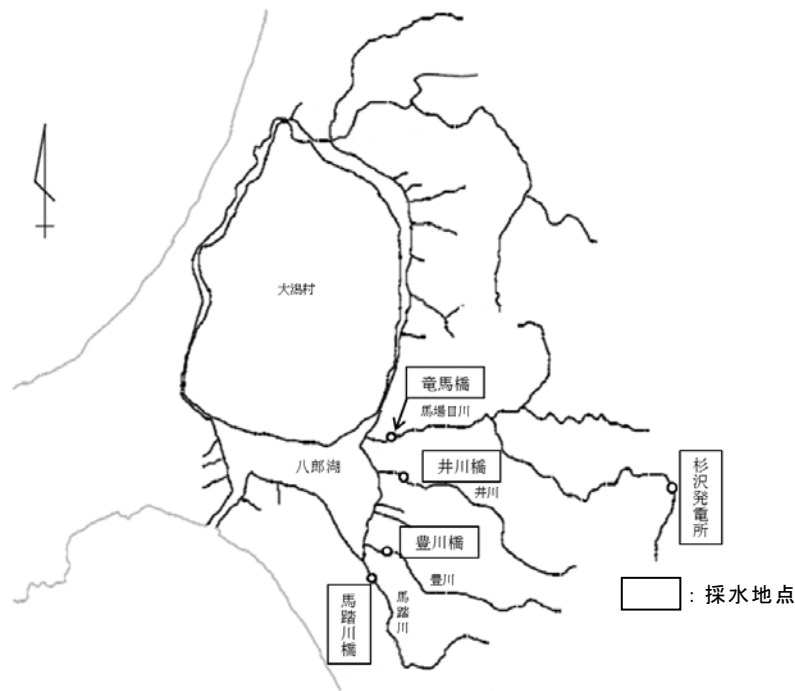


図1 公共用水域水質調査採水地点

成 23 年 3 月 24 日付け環水大水発第 110324001 号「要測定指標の測定の実施について（協力依頼）」の別添 2「要測定指標（大腸菌数）の測定について」に示された「4. 大腸菌の測定法（案）（平成 23 年 3 月版）第 2 メンブランフィルター法」に従って検査を実施した。特定酵素基質寒天培地にはクロモアガー-ECC 培地を使用した。

37℃、18～24 時間培養後、メンブランフィルター上に発育した青～濃青色のコロニーを大腸菌と判定し、菌数を測定した。メンブランフィルター上には、紫色のコロニーを形成する大腸菌群が多数発育することから、菌数の測定は、青～濃青色のコロニーが 10～30 個になった希釈段階のフィルター上のコロニー数を計測し、希釈段階を乗じたあと、平均数を求め、大腸菌数とした。

2.4 大腸菌の単離

大腸菌数の測定後、メンブランフィルター上の青色のコロニーを無作為に釣菌し、クロモアガー-ECC 培地で再分離した。分離された単コロニーを普通寒天培地で純培養し、生化学的性状試験や薬剤耐性試験に供する株とした。

2.5 単離した大腸菌の性状等について

2.5.1 生化学的性状試験

TSI 培地、LIM 培地、クエン酸塩培地、CLIG 培地を用い、37℃、18～24 時間（クエン酸塩培地は 4～7 日間）培養し、各性状を確認した。

2.5.2 薬剤耐性試験および MIC 測定試験

馬場目川の上流と下流とで結果を比較できることから、杉沢発電所と竜馬橋で採水された検体から分離された大腸菌計 209 株（杉沢発電所由来 80 株、竜馬橋由来 129 株）を対象菌株とした。非典型的な性状を示す株もあるため、供試するすべての菌株について、大腸菌の 95%が陽性を示す⁵⁾β-D-glucuronidase をコードする遺伝子 (*uidA*) の確認を行った。

米国臨床検査基準委員会（CLSI：Clinical and Laboratory Standards Institute）の指針を基に、薬剤添加ミュラーヒントン（MH）寒天平板と、対照として薬剤無添加 MH 寒天平板を作製した。対象とした薬剤と最終濃度は、アンピシリン（ABPC）32 μg/mL、カナマイシン（KM）64 μg/mL、テトラサイクリン（TC）16 μg/mL、ナリジクス酸（NA）32 μg/mL、スルファメトキサゾール（SMX）76 μg/mL の 5 剤である。

対象菌株を滅菌生理食塩水に McFarland 0.5 となるように浮遊させ、区画した各平板に植菌し、発育した菌株について最小発育阻止濃度（MIC：minimum inhibitory concentration）測定

試験に供した。MIC 測定試験にはドライプレート‘栄研’を用い、ピペラシリン (PIPC)、セファゾリン (CEZ)、セフォチアム (CTM)、セフォタキシム (CTX)、セフトジジム (CAZ)、セフェピム (CFPM)、フロモキシセフ (FMOX)、セフポドキシム (CPDX)、スルバクタム/アンピシリン (S/A)、アズトレオナム (AZT)、イミペネム (IPM)、メロペネム (MEPM)、ゲンタマイシン (GM)、アミカシン (AMK)、ミノサイクリン (MINO)、ホスホマイシン (FOM)、スルファメトキサゾールトリメトプリム (ST)、レボフロキサシン (LVFX) の 18 薬剤について実施した。

3. 結果と考察

3.1 大腸菌群数（最確数法）

各地点の類型、大腸菌群数水質環境基準は表 1 のとおりである。各採水地点の大腸菌群数の推移を図 2-1、図 2-2 に示した。4 年間の基準適合率は、杉沢発電所 50.0%、竜馬橋 62.5%、井川橋 58.3%、豊川橋 66.7%、馬踏川橋 33.3%で、各地点とも気温が高い時期に基準を超過していた。

表 1 各地点の類型及び大腸菌群水質環境基準

採水地点	類型	環境基準
杉沢発電所	AA	50 MPN/100 mL 以下
竜馬橋	A	1,000 MPN/100 mL 以下
井川橋	A	1,000 MPN/100 mL 以下
豊川橋	B	5,000 MPN/100 mL 以下
馬踏川橋	A	1,000 MPN/100 mL 以下

MPN : Most Probable Number (最確数)

3.2 大腸菌数（メンブランフィルター法）

100 mL あたりの各採水地点の大腸菌数の推移を図 3 に示した。各採水地点の大腸菌数は、平成 25 年 11 月の豊川橋の結果を除き、0～500 個/100 mL の幅で変動していた。

3.3 単離した大腸菌の性状等について

3.3.1 生化学的性状試験

表 2 に大腸菌の典型的な生化学的性状を示す。分離されたコロニーが典型的な性状を示した割合は、杉沢発電所 69.5%、竜馬橋 55.4%、井川橋 35.5%、豊川橋 54.2%、馬踏川橋 49.6%

であり、杉沢発電所以外の下流域の採水地点ほど、非典型的な性状を示すコロニーが存在していた。そのため、非典型的な性状であっても大腸菌と思われる分離株についてはすべて凍結し、保存株とした。

表 2 大腸菌の典型的な生化学的性状

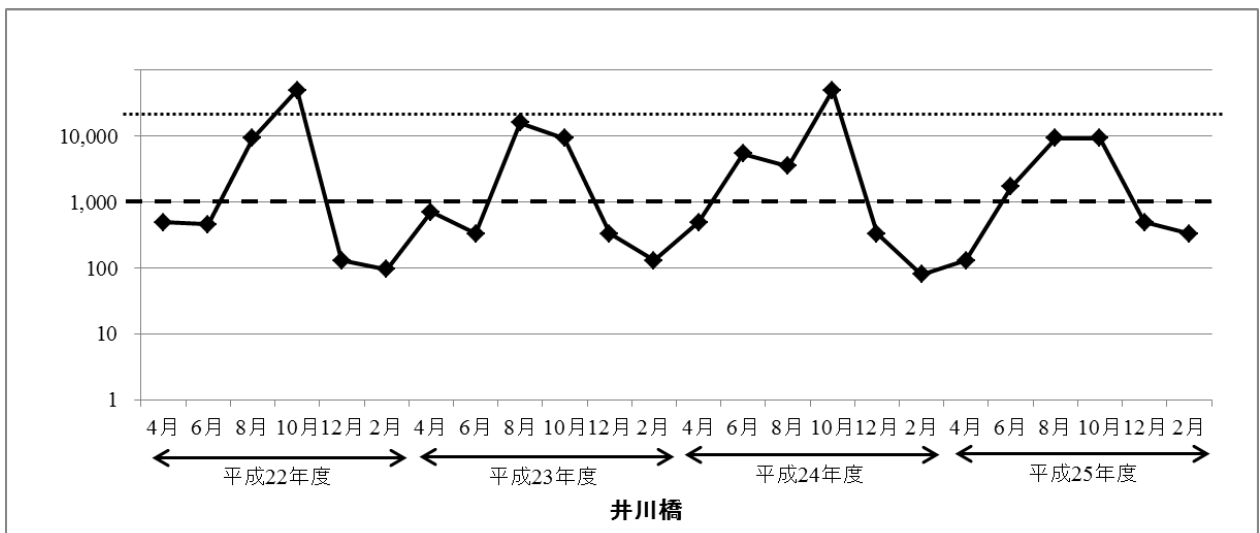
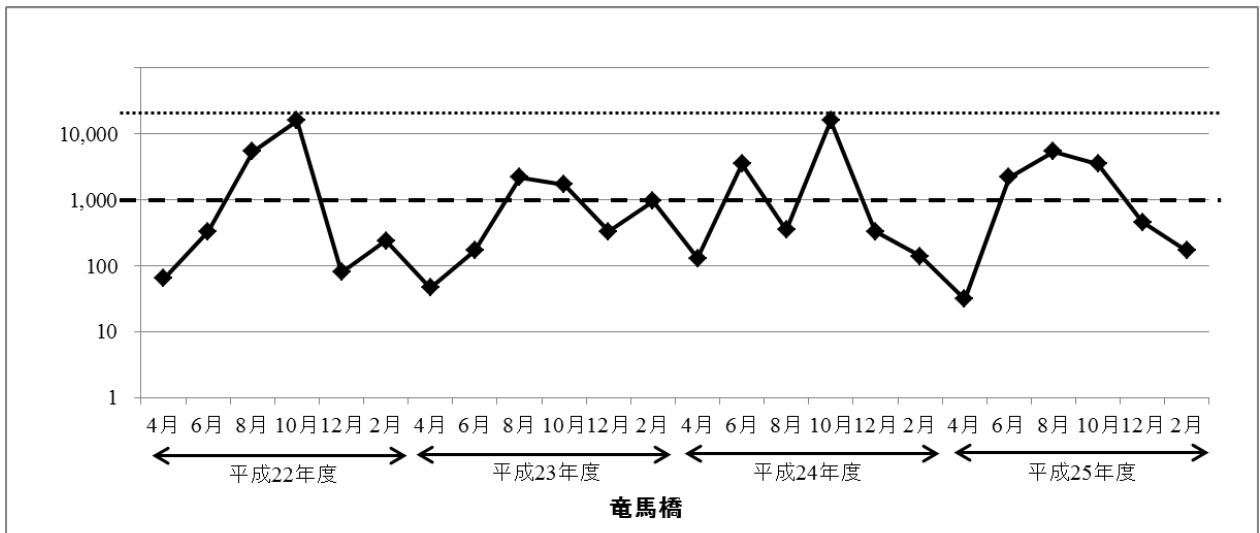
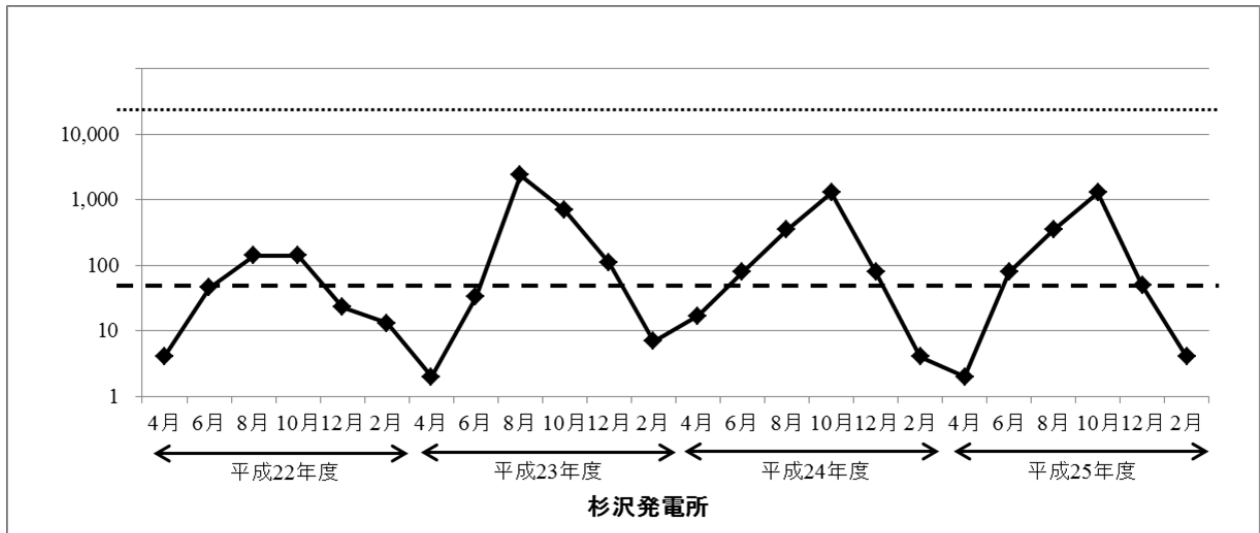
TSI 培地	斜面／高層	黄／黄
	ガス	+
	H ₂ S	—
LIM 培地	リジン	+
	インドール	+
	運動性	+
クエン酸塩培地		—
CLIG 培地	斜面／高層	赤／黄
	蛍光	+

3.3.2 薬剤耐性試験および薬剤感受性試験

表 3 に各薬剤添加 MH 寒天平板に対する耐性パターンを示す。杉沢発電所由来の大腸菌では、SMX のみに耐性を示したのが 6 株、AMPC および SMX の 2 剤に耐性を示したのが 1 株であった。SMX 添加 MH 寒天平板に発育した菌株は、対照とした薬剤無添加 MH 寒天平板と比較し、発育が悪かった。杉沢発電所由来の株は、KM、TC、NA 添加 MH 寒天平板には発育しなかった。竜

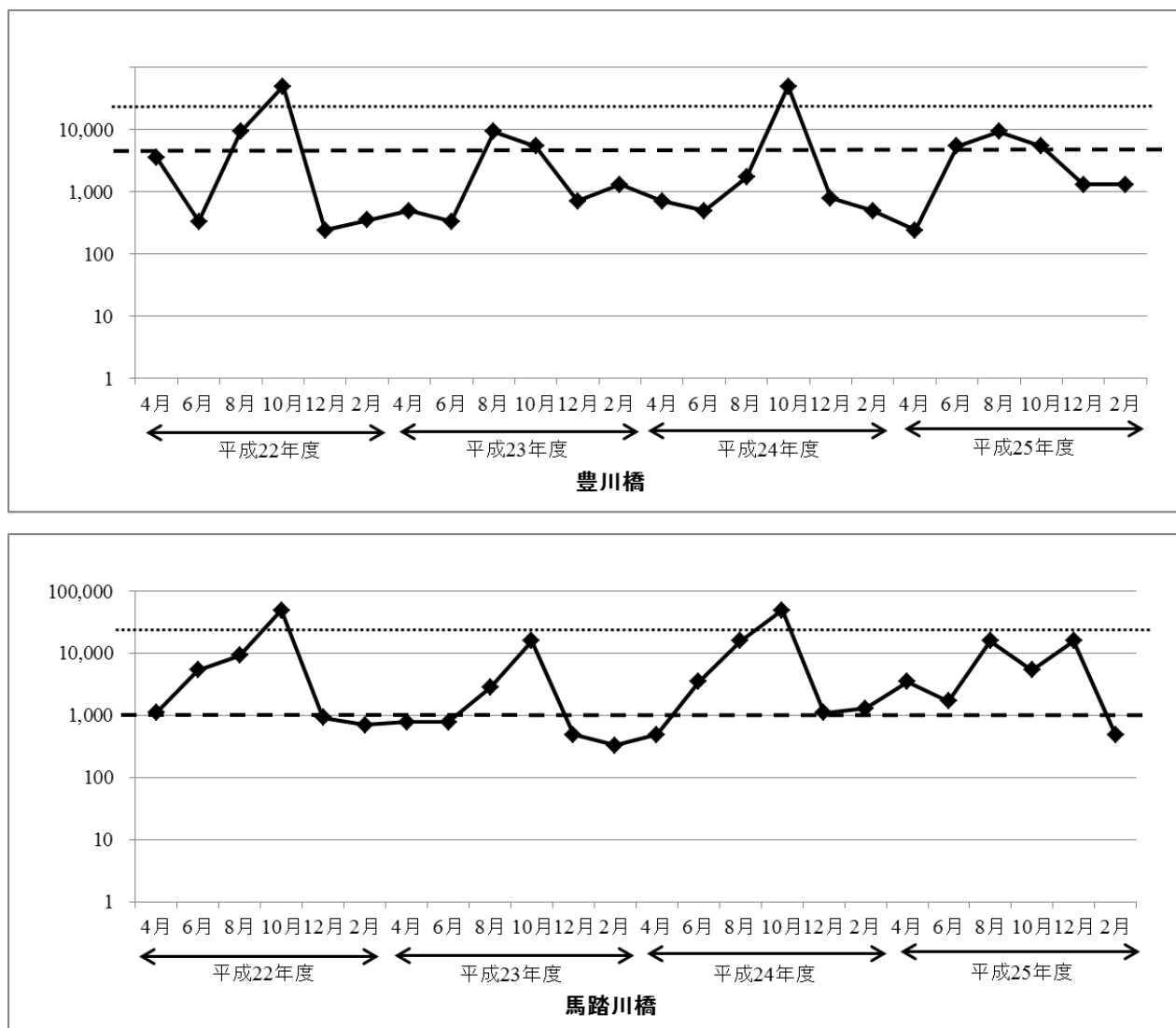
表 3 各薬剤添加 MH 寒天平板に対する耐性パターン

耐性パターン		杉沢 発電所	竜馬橋
5 剤すべてに耐性なし		73	99
いずれかに耐性		7	30
内 訳	1 剤	AMPC	3
		KM	1
		TC	3
		NA	8
		SMX	6
	2 剤	AMPC,NA	2
		AMPC,SMX	1
	3 剤	AMPC,TC,SMX	2
		AMPC,NA,SMX	2
		KM,TC,SMX	1
		TC,NA,SMX	1
	5 剤	AMPC,KM,TC,NA,SMX	1
合 計		80	129



--- : 水質環境基準
 : 測定上限値* (MPN 24,000 / 100 ml)
 * : このラインを超えるデータは、最確数法にてすべての試験管が陽性となった検体

図 2-1 各採水地点の大腸菌群数の推移



----- : 水質環境基準

..... : 測定上限値* (MPN 24,000 / 100 ml)

*: このラインを超えるデータは、最確数法にてすべての試験管が陽性となった検体

図 2-2 各採水地点の大腸菌群数の推移

馬橋由来の大腸菌では、1 剤のみに耐性を示した株が 21 株、2 剤以上への多剤耐性を示した株が 9 株であり、そのうち 1 株は 5 剤すべてに耐性を示した。SMX 添加 MH 寒天平板に発育した菌株は、対照とした薬剤無添加 MH 寒天平板と比較し、同等に発育した株と、発育が悪い株が存在した。

発育した株の MIC は、CLSI の判定基準に照らし合わせ、それぞれ感性 (S)、中等度耐性 (I)、耐性 (R) と判定した。杉沢発電所由来の耐性株 7 株については、対象としたすべての薬剤に対して感性 (S) の範囲であった。

竜馬橋由来の耐性株については、30 株のうち 18 株が対象としたすべての薬剤に対して感性 (S)、6 株が 1 剤もしくは 2 剤に中等度耐性 (I)、6 株が 1～8 剤に耐性 (R) であった。

耐性 (R) を示した菌株のデータを表 4 に示す。これらの薬剤耐性遺伝子の有無を確認したところ、No.1～3 については TEM 型 β ラクタマーゼ産生性の株であった。7～8 剤に耐性を示した No.4～6 については CTX-M 型の基質拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL: Extended-spectrum β -lactamases) を産生する耐性遺伝子を保有していた。

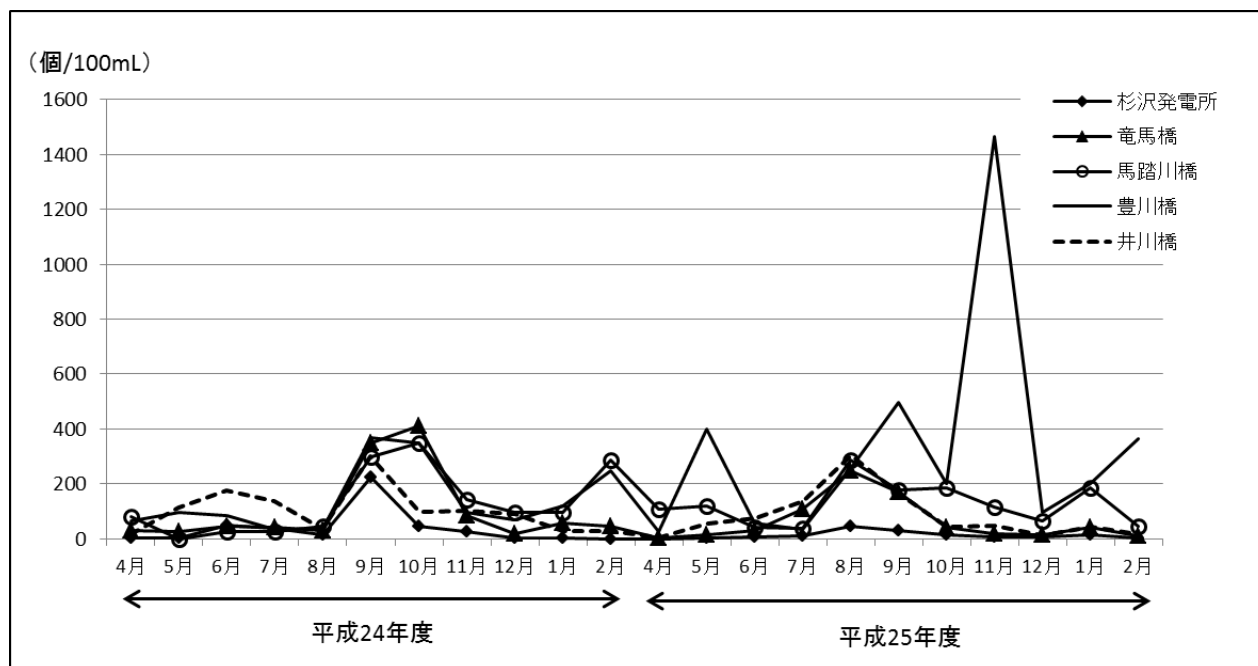


図3 各採水地点の大腸菌数の推移

表4 耐性株の薬剤感受性試験結果（一部抜粋）

No.	PIPC	CEZ	CTM	CTX	CAZ	CFPM	CPDX	S/A	AZT	ST	LVFX
1	R (>64)							I (8/16)			
2	I (32)	I (4)						I (8/16)		R (>38/2)	
3	R (>64)	I (4)						I (8/16)		R (>38/2)	R (>4)
4	R (>64)	R (>16)	R (>16)	R (32)		I (16)	R (>4)	R (>8/16)	R (16)		
5	R (>64)	R (>16)	R (>16)	R (32)		I (16)	R (>4)	R (>8/16)	R (16)		
6	R (>64)	R (>16)	R (>16)	R (>32)	I (8)		R (>4)	R (>8/16)	R (16)		R (>4)

PIPC : ピペラシリン

CEZ : セファゾリン

CTM : セフォチアム

CTX : セフォタキシム

CAZ : セフトアジジム

CFPM : セフェピム

CPDX : セフポドキシム

S/A : スルバクタム / アンピシリン

AZT : アズトレオナム

ST : スルファメトキサゾール・トリメトプリム

LVFX : レボフロキサシン

4. 考察

4年間の大腸菌群数の推移は、どの採水地点でも夏季を中心に環境基準を超過していることが多かったが、河川への糞便汚染が季節変動的に起こるとは考えにくい。また、下水処理水や生活雑排水等の流入が少ない馬場目川上流にあ

る杉沢発電所においても、環境基準適合率は50.0%でしかない。このことから、大腸菌群数の結果のみで、環境基準超過の原因が糞便汚染であったと結論付けられるものではないと思われる。気温あるいは水温が高くなり、土壌など自然環境由来の細菌が増殖するのに適した環境

となること、大腸菌群数が増加する一因にもなっていると考えられる。

一方、大腸菌数は、大腸菌群数と必ずしも同じ挙動を示すわけではなく、年間を通してある程度の幅で変動しており、特定の時期に増加するなどの傾向は見られなかった。現段階では大腸菌数の基準値が設定されていないため、今回の結果が環境基準の適合範囲に含まれるのかは判断できない。しかし、大腸菌群数ほどの大きな変動は見られないことから、汚染指標として結果の比較がしやすいと考える。

また、採水地点ごとに大腸菌数を比較すると、馬場目川上流域にある杉沢発電所では大きな変動は見られず、平成 24 年 9 月を除き 50 個/100 mL 以下で推移しているが、各河川の下流域にある地点では、上流域より大腸菌数は明らかに多く、変動が大きい。加えて、薬剤感受性試験において、杉沢発電所由来の株は対象とした薬剤すべてに対して感性を示したのに対し、竜馬橋由来の株は高度耐性を示しただけではなく、詳細なデータは示さないが、当該株が産生する CTX-M 型 ESBL と、市販鶏肉や医療機関受診者から分離される大腸菌が産生する CTX-M 型 ESBL の遺伝子型が同一であった。さらに、竜馬橋由来の大腸菌株の生化学的性状および薬剤耐性パターンは多様であり、単一の由来ではないことが

窺える。このような結果から、河川下流域の汚濁負荷には、下水や生活雑排水の流入といった、ヒトの家庭生活環境が影響を及ぼしているものと推察される。

今回、八郎湖流入河川の水質調査結果をまとめたことにより、ヒトの家庭生活環境が八郎湖流入河川に影響を及ぼしていることが示唆された。八郎湖流域河川等への汚濁負荷を少しでも減少させるためにも、下水道等への接続率の向上が望まれる。また、当センターとしても、適切に汚濁状況を把握できるよう、今後も調査を継続していく必要がある。

参考文献

- 1) 秋田県：八郎湖に係る湖沼水質保全計画（第 2 期）。平成 26 年 3 月。
- 2) 秋田県生活環境部環境管理課：平成 24 年版環境白書（本編）。平成 25 年 2 月。
- 3) 環境省水・大気環境局水環境課長：環水大水発第 110324001 号 要測定指標の測定の実施について（協力依頼）。平成 23 年 3 月 24 日。
- 4) 環境省：環境省告示 78 号 水質汚濁に係る環境基準について。平成 21 年 11 月 30 日。
- 5) 坂崎利一：新訂 食水系感染症と細菌性食中毒，中央法規出版株式会社，2000，210-219。