



Title	道東の標津川, 伊茶仁川および古多糠川の細菌学的調査
Author(s)	笠井, 久会; KASAI, Hisae; 中村, 暢之 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 53(2), 75-82
Issue Date	2002-08
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21970
Type	departmental bulletin paper
File Information	53(2)_P75-82.pdf



道東の標津川、伊茶仁川および古多糠川の細菌学的調査

笠井 久会¹⁾・中村 暢之¹⁾・吉水 守¹⁾

Observations on Bacteria Collected in the Shibetsu, Ichani and Kotanuka Rivers in Eastern Hokkaido, Japan

Hisae KASAI, Nobuyuki NAKAMURA and Mamoru YOSHIMIZU

Abstract

The distribution and composition of heterotrophic bacteria and coliforms in the Shibetsu, Ichani and Kotanuka rivers (Hokkaido, Japan) were studied. There was little difference in the quality of water among the rivers. The number of viable bacteria in surface waters varied seasonally from 10^2 to 10^4 CFU/mL. The abundance of these bacteria was observed in the upper, middle and lower part of Shibetsu river. The taxonomic composition of the bacteria included *Pseudomonas*, *Aeromonas*, Enterobacteriaceae, *Achromobacter* and *Flavobacterium*/Cytophagaceae. At the river mouth, *Moraxella*, *Alteromonas* and *Vibrio* were isolated. Coliforms and *Escherichia coli* were isolated from all sampling stations, and their counts increased with a rise in water temperature.

Key words: Bacterial flora, River

緒 言

北海道東部に位置する標津町は、平成11年に北海道から水産物品質管理高度化推進モデル計画策定産地に指定されたのを契機に(北海道水産林務部, 2000), 漁獲から加工, 流通までが一体となった町単位での地域 HACCP を推進している(北海道標津町, 2000; 吉水, 2002)。本事業は、公認 HACCP システムとは異なるが、水産物を安全に消費者へ届けるために、漁獲—市場—加工場—運送の各工程で何が危害として考えられるかを検討し、未然に防ぐことを目的としている。

本報では、標津町地域 HACCP の推進に関連し、標津町内を流れる標津川、伊茶仁川および古多糠川の水質と一般生菌数、大腸菌群数および大腸菌数を周年観察し、流域による違いや季節ごとの比較を行い検討したので、その結果について報告する。

材 料 と 方 法

調査地点と調査項目

2001年の4, 6, 7, 8, 9, 10, 11月および河川の氷が融解したのちの2002年3月の計8回, Fig. 1に示した標津川の5地点(上流: Sr-1, 中流: Sr-2, 中下流: Sr-3, 下流: Sr-4, 河口: Sr-5), 伊茶仁川の2地点(中流: Ir-1, 下流: Ir-2), ま

た古多糠川の1地点(中流: Kr-1)において、表面海水を滅菌ポリビンおよび細菌検査用滅菌ハイロート採水器を用いて採取した。試料は氷冷して標津町ふれあい加工体験センターに運び直ちに試験に供した。なお、水温、pH、導電率、濁度、溶存酸素量、塩分濃度、全溶存固形物量、河口水の比重についてはUR-21 (HORIBA)を用いて測定した。硝酸態窒素、アンモニア態窒素についてはマリンアート水質検査試薬を用いて簡易的に測定した。化学的酸素要求量(COD)はアルカリ性過マンガン酸カリウム法による測定を行った(佐谷戸ら, 1973)。細菌検査は後述の方法により一般生菌数、大腸菌群数および大腸菌数の測定を行った。

一般生菌数、大腸菌群数および大腸菌数の測定法

一般細菌の生菌数は、淡水基礎培地(吉水ら, 1976)表面に採取した試料0.1 mLを塗抹し、25°Cで5日間好氣的に培養し、出現コロニー数から1 mLあたりの生菌数を測定した。なお、河口地点: Sr-5については海水平板培地(Yamamotoら, 1982)を用いた。また、標準寒天平板培地で37°C, 24時間好氣的に培養した場合の生菌数も測定した。

大腸菌群数はダルハム管入りLB培地で37°C, 48時間培養後、MPN法(5本法)により100 mL中の最確数として算出した。陽性試料についてはEC法による試験を行い、MPN法により大腸菌数を算出した。

¹⁾ 北海道大学大学院水産科学研究科生命資源科学専攻応用生物科学講座
(Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Division of Marine Biosciences, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

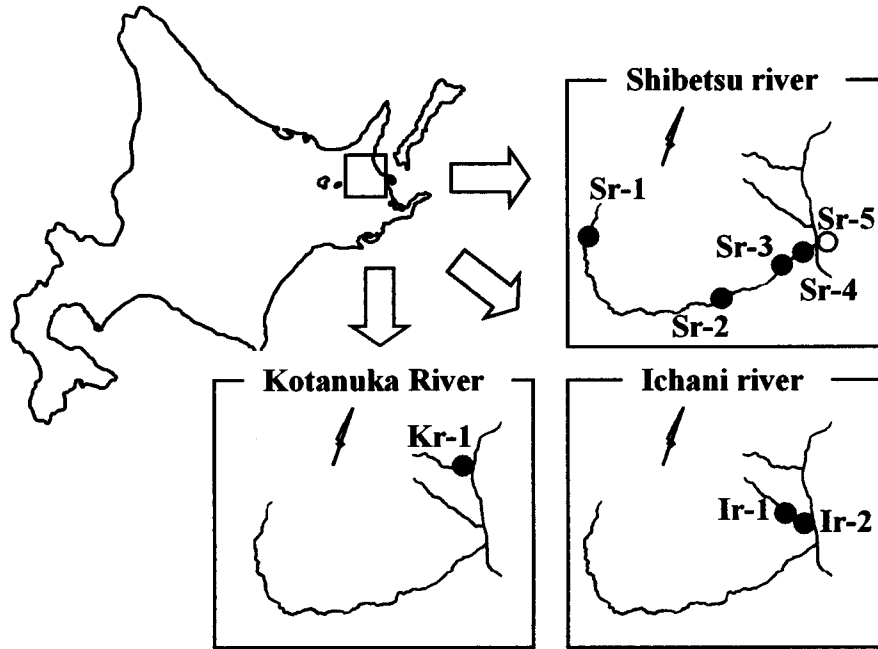


Fig. 1. Location of sampling stations in the three rivers examined.

細菌叢

生菌数測定に供試した最適希釈平板上の 30 コロニーを無作為に抽出し、純粋分離を行って供試菌株を得た。細菌叢は河川水については Shewan ら (1960), 河口地点: Sr-5 については 絵面・清水 (1990) の方法に従い、以下の形態学的性状および生化学的性状を検査し、属レベルの分類を行った。

形態学的性状については、分離菌株を 25°C で 48 時間培養後、定法に従い、グラム染色性、菌形、運動性、鞭毛の有無を観察した。生化学的性状については、前述と同様の培養菌体を供試して OF 試験、オキシダーゼ試験を行った。Sr-5 由来菌株については、上記試験に加え塩類要求性試験、カタラーゼ試験、DNA 分解性試験、ゼラチン分解性試験、寒天分解性試験を行った。

海水中での大腸菌の生残性に関する試験

供試海水として標津川河口より 1 km 沖合いの地点で採水した試料を用いた。供試菌株として *Escherichia coli* IFO-15043 株を用い、普通ブイヨン培地を用いて前培養を行った後に、供試海水に菌数が $10^3 \sim 10^4$ mg/L となるように加え、5, 10, 15 および 20°C に所定期間保持し、マッコンキー培地平板に塗抹して生菌数を算出した。

結 果

水質

2001 年の 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 月, 2002 年 3 月の標津川の水質を Fig. 2 に、溶存酸素量, COD の結果を Fig. 3 に、伊茶

仁川, 古多糠川の結果を Fig. 4 および Fig. 5 に示した。水温のピークは 8 月から 9 月にかけてであるが、溶存酸素量は夏から秋にかけて若干減少する傾向を示し、冬が明けたものの 3 月に上昇した。COD は水温のピークと同様の傾向を示したが顕著ではなく、採水点間に大きな差はみられなかった。他の数値も大差は見られなかったが (データは示していない), 標津川河口地点 (Sr-5) は汽水であるため他の地点とは大きく異なっていた。

一般生菌数

各河川水の生菌数を Table 1 に示した。各定点の生菌数は、標津川では $1.9 \times 10^2 \sim 8.7 \times 10^3$ CFU/mL, 伊茶仁川では $1.1 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^4$ CFU/mL, 古多糠川では $1.0 \times 10^3 \sim 1.8 \times 10^4$ CFU/mL の範囲で測定された。標準寒天培地を用いた場合、標津川では検出限界以下 $\sim 1.9 \times 10^3$ CFU/mL, 伊茶仁川では検出限界以下 $\sim 1.2 \times 10^3$ CFU/mL, 古多糠川では検出限界以下 $\sim 1.1 \times 10^3$ CFU/mL の範囲で測定された (Table 2)。

細菌叢

前記の定点のうち標津川では Sr-2, Sr-4, Sr-5, 古多糠川では Kr-1 より分離した株について属レベルの分類を行い、標津川における各季節 (4, 7, 10 月) の細菌叢を Fig. 6, 7, 8 に、古多糠川における各季節の細菌叢を Fig. 9 に示した。標津川中流, 下流域の細菌叢は季節にかかわらず *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*/Cytophagaceae, および *Coryneforms* により構成されていた。河口域の細菌叢は上記に *Moraxella*, *Alteromonas*, *Vibrio* が加わった。古多糠川は標津川中流および下流とほぼ同様の属組成であった。

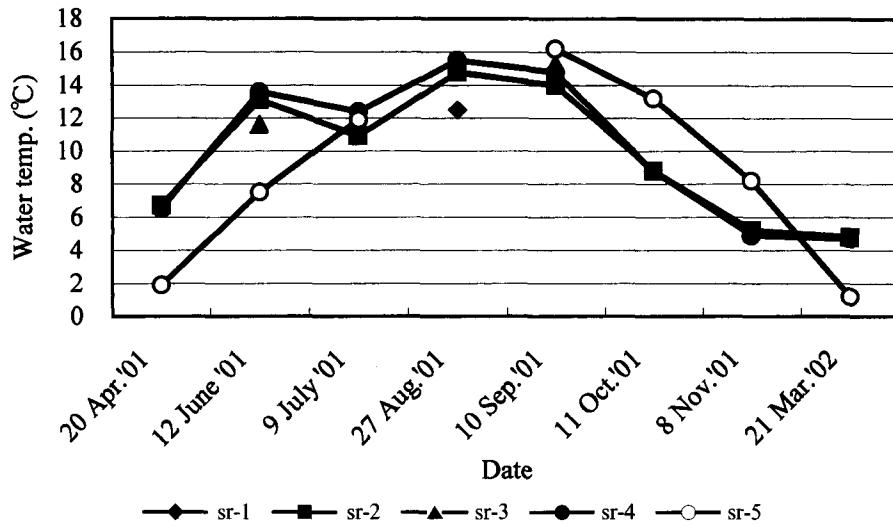


Fig. 2. Water temperatures at sampling stations in the Shibetsu river.

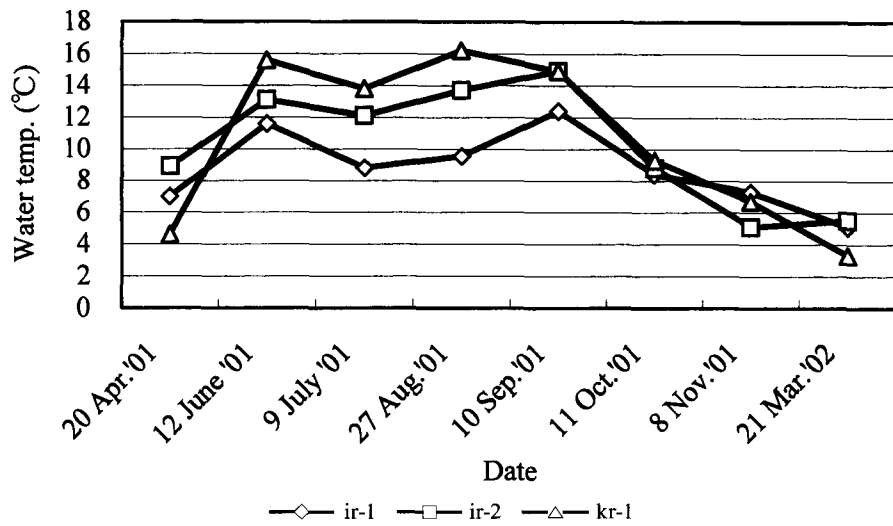


Fig. 3. Water temperatures at sampling stations in Ichani and Kotanuka rivers.

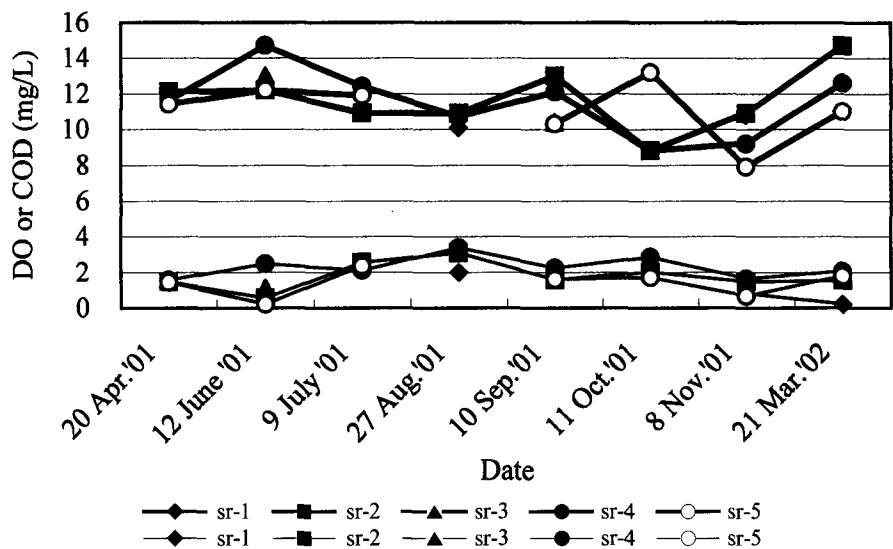


Fig. 4. Dissolved oxygen (mg/L) and chemical oxygen demand (mg/L) at sampling stations in the Shibetsu river.

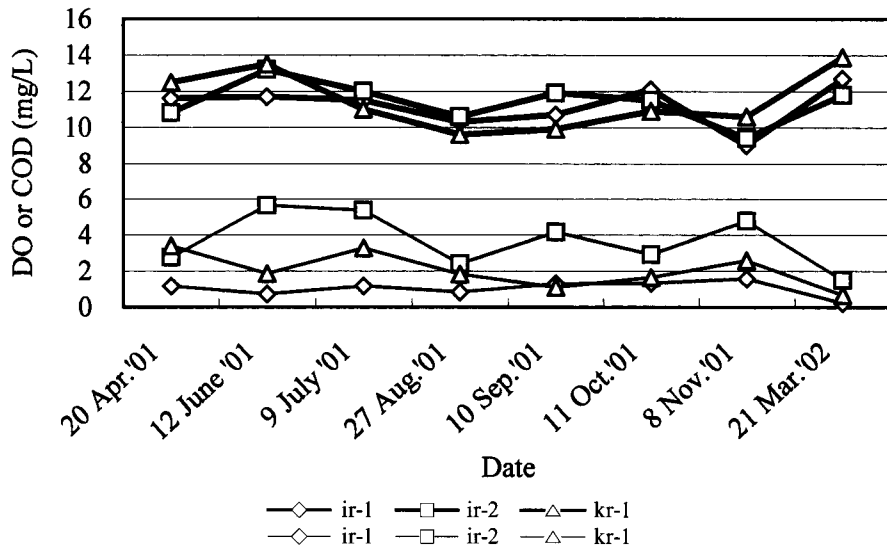


Fig. 5. Dissolved oxygen (mg/L) and chemical oxygen demand (mg/L) at sampling stations in Ichani and Kotanuka rivers.

Table 1. Viable bacterial counts (CFU/mL) in the Shibetsu, Ichani and Kotanuka rivers using FWA and SA.

River	Sampling Station	Sampling date							
		20 Apr. '01	12 June '01	9 July '01	27 Aug. '01	10 Sep. '01	11 Oct. '01	8 Nov. '01	21 Mar. '02
Shibetsu	Sr-1 (FWA)	NT*	NT	NT	1.7×10^3	NT	NT	7.6×10^2	1.1×10^3
	Sr-2 (FWA)	4.8×10^3	4.7×10^3	2.1×10^3	6.5×10^3	5.0×10^3	1.3×10^3	6.0×10^3	8.7×10^3
	Sr-3 (FWA)	NT	2.2×10^3	NT	NT	2.2×10^3	NT	NT	NT
	Sr-4 (FWA)	2.5×10^3	8.7×10^3	5.2×10^3	4.7×10^3	5.6×10^3	1.3×10^3	7.9×10^3	2.4×10^4
	Sr-5 (SA)	4.0×10^2	7.3×10^2	1.9×10^2	NT	1.2×10^3	NT	1.5×10^3	1.0×10^4
Ichani	Ir-1 (FWA)	3.9×10^3	2.1×10^3	4.1×10^3	5.8×10^3	5.1×10^3	1.1×10^3	1.0×10^3	3.6×10^2
	Ir-2 (FWA)	2.6×10^3	7.2×10^3	2.2×10^4	1.1×10^4	3.6×10^3	1.5×10^3	7.0×10^3	7.5×10^1
Kotanuka	Kr-1 (FWA)	1.8×10^4	7.7×10^3	5.2×10^3	4.9×10^3	4.4×10^3	1.0×10^3	1.4×10^3	5.0×10^1

* : Not tested.

Table 2. Viable bacterial counts (CFU/mL) in the Shibetsu, Ichani and Kotanuka rivers using standard method agar.

River	Sampling Station	Sampling date							
		20 Apr. '01	12 June '01	9 July '01	27 Aug. '01	10 Sep. '01	11 Oct. '01	8 Nov. '01	21 Mar. '02
Shibetsu	Sr-1	NT*	NT	NT	1.1×10^2	NT	NT	1.5×10^1	6.1×10^2
	Sr-2	$< 5.0 \times 10^0$	4.2×10^2	8.7×10^2	1.7×10^3	2.9×10^2	3.0×10^2	4.2×10^2	4.1×10^2
	Sr-3	NT	2.7×10^2	NT	NT	1.8×10^3	NT	NT	NT
	Sr-4	$< 5.0 \times 10^0$	1.7×10^2	1.1×10^3	1.9×10^3	1.6×10^3	2.0×10^2	5.9×10^2	5.0×10^2
	Sr-5	4.5×10^1	1.1×10^2	1.5×10^1	NT	1.2×10^2	1.0×10^1	2.6×10^2	1.0×10^3
Ichani	Ir-1	$< 5.0 \times 10^0$	1.0×10^1	1.4×10^2	1.2×10^2	1.6×10^2	4.5×10^1	5.0×10^1	3.6×10^2
	Ir-2	$< 5.0 \times 10^0$	2.8×10^2	1.0×10^3	1.1×10^3	1.2×10^3	1.1×10^2	5.4×10^2	7.5×10^1
Kotanuka	Kr-1	$< 5.0 \times 10^0$	4.7×10^2	6.5×10^2	5.5×10^2	8.1×10^2	1.6×10^2	1.9×10^2	5.0×10^1

* : Not tested.

大腸菌群数および大腸菌数

各河川水の大腸菌群最確数を Table 3 に、大腸菌最確数を Table 4 に示した。各定点の大腸菌群数は標津川では 1.8 以下~3,500/100 mL、伊茶仁川では 1.8 以下~2,400/100

mL、古多糠川では 26~1,600/100 mL と測定された。春は少なく、夏場にピークを示し、秋から冬にかけて減少するという季節的な変化を示した。また地域的には牧場が集中する中流が最も高い値を示し、次いで下流、河口、上流の順となった。大腸菌数は大腸菌群数と比較しておよそ 1/10 の

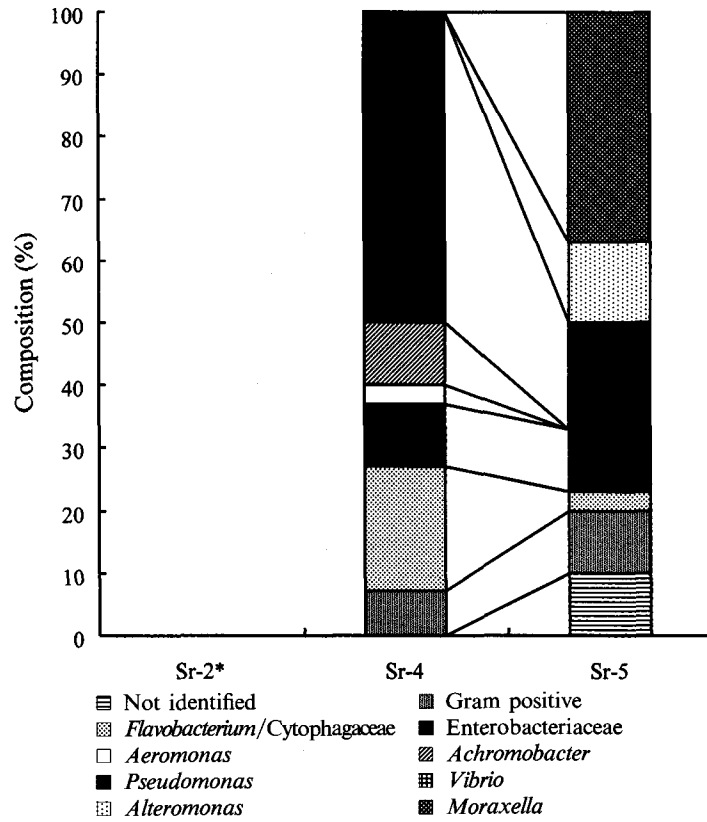


Fig. 6. Generic composition (%) of bacteria isolated from the Shibetsu river on 20 April 2001.
*: Not tested.

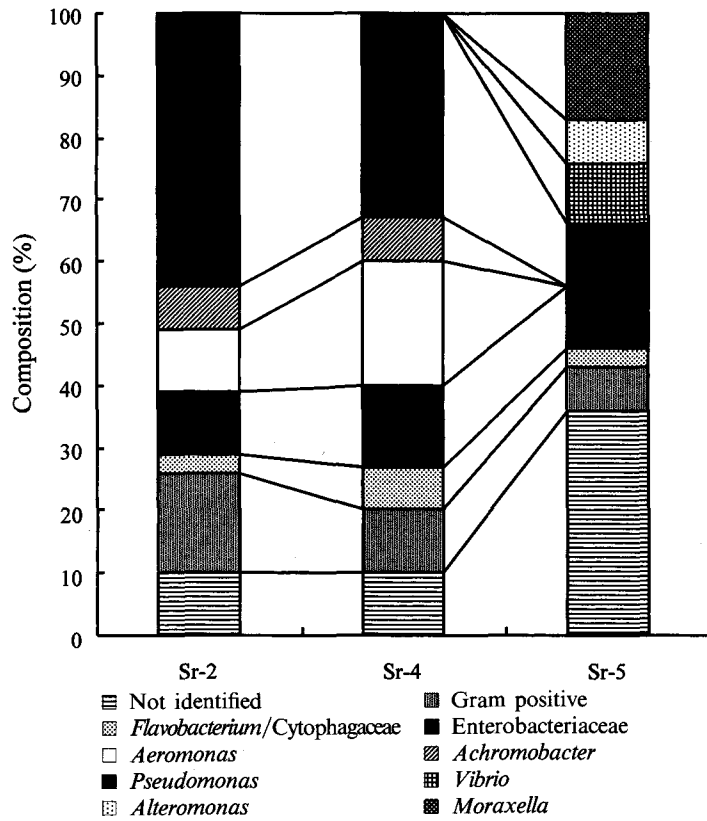


Fig. 7. Generic composition (%) of bacteria isolated from the Shibetsu river on 9 July 2001.

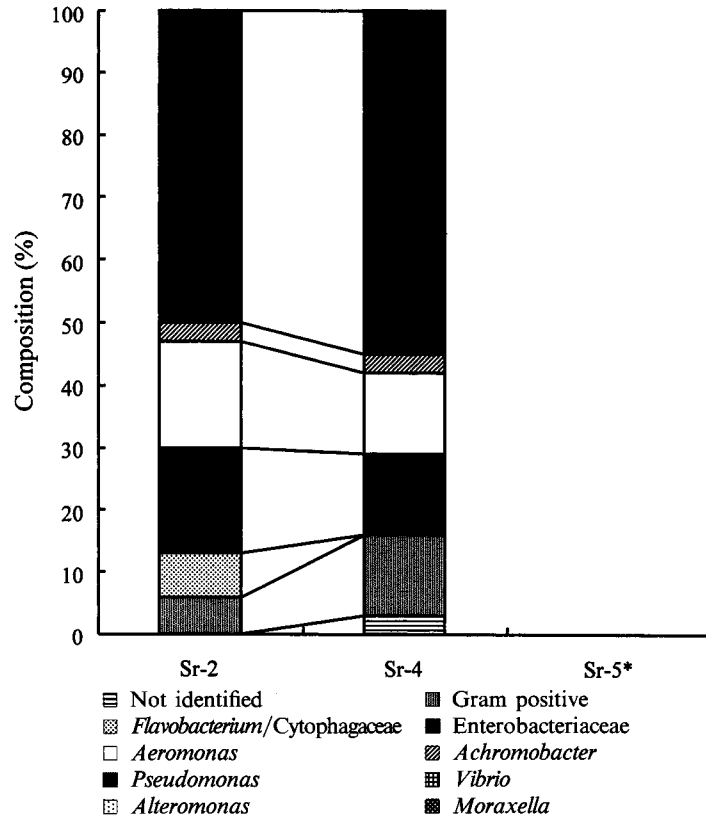


Fig. 8. Generic composition (%) of bacteria isolated from the Shibetsu river on 11 October 2001.
*: Not tested.

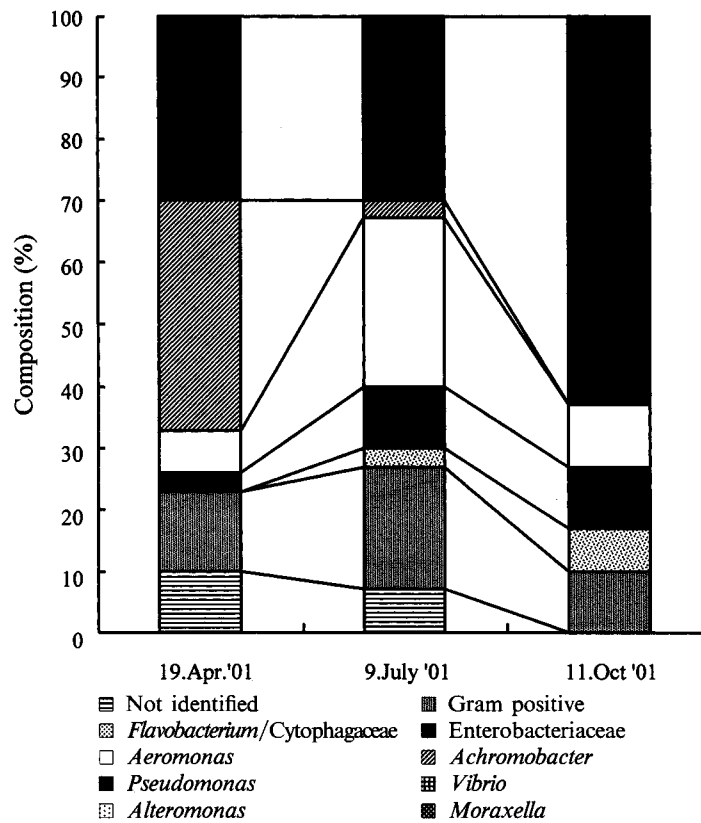


Fig. 9. Generic composition (%) of bacteria isolated from the Kotanuka river.

Table 3. Coliform counts (MPN/100mL) in the Shibetsu, Ichani and Kotanuka rivers.

River	Sampling Station	Sampling date							
		20 Apr. '01	12 June '01	9 July '01	27 Aug. '01	10 Sep. '01	11 Oct. '01	8 Nov. '01	21 Mar. '02
Shibetsu	Sr-1	NT*	NT	NT	13	NT	NT	1.8	NT
	Sr-2	6.8	37	2200	490	3500	2400	9.2	240
	Sr-3	NT	280	NT	NT	950	NT	NT	NT
	Sr-4	7.3	240	1300	1700	490	170	170	220
	Sr-5	9.3	130	13	NT	27	<1.8	70	430
Ichani	Ir-1	4	4.5	120	790	110	20	2	70
	Ir-2	<1.8	49	2400	110	20	<18	140	130
Kotanuka	Kr-1	26	1600	1300	140	220	210	79	33

*: Not tested.

Table 4. *Escherichia coli* counts (MPN/100mL) in the Shibetsu, Ichani and Kotanuka rivers.

River	Sampling Station	Sampling date							
		20 Apr. '01	12 June '01	9 July '01	27 Aug. '01	10 Sep. '01	11 Oct. '01	8 Nov. '01	21 Mar. '02
Shibetsu	Sr-1	NT* ¹	NT	NT	7.8	NT	NT	1.8	NT
	Sr-2	<1.8* ²	17	700	140	150	110	<1.8	4
	Sr-3	NT	40	NT	NT	210	NT	NT	NT
	Sr-4	7.8	240	270	68	330	20	49	130
	Sr-5	4.5	130	13	NT	27	>1.8	46	22
Ichani	Ir-1	<1.8	4.5	120	790	45	20	<1.8	8.3
	Ir-2	<1.8	49	220	18	20	<18	70	9.4
Kotanuka	Kr-1	17	1600	1300	330	220	170	27	17

*¹: Not tested.

*²: After incubating using LB broth, gas+ tubes were incubated using EC broth.

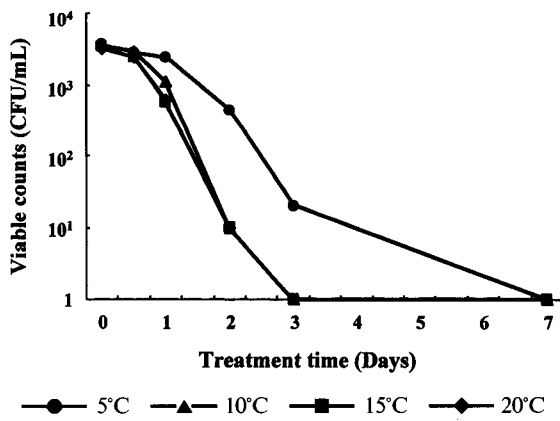


Fig. 10 Survivability of *Escherichia coli* in seawater.

値を示した。

海水中での大腸菌の生残性

海水中での大腸菌 *E. coli* の消長を Fig. 10 に示した。時間の経過とともに生菌数は減少し、10°C、15°C および 20°C では 3 日目で検出限界以下となったが、5°C では 5 日間保持後も大腸菌の生存性が確認された。

考 察

北海道最東部に位置する人口約 6,500 人の標津町はオホーツク海に面した漁業と酪農が盛んな町である。特に、秋サケは一昨年まで 7 年連続で全国一という漁獲量を誇っている。平成 11 年に北海道から水産物品質管理高度化推進モデル計画策定産地に指定されたのを契機に、漁獲から加工、流通までが一体となった町単位での地域 HACCP を推進している。本事業は、公認 HACCP システムとは若干異なるが、水産物を安全に消費者へ届けるために、漁獲—市場—加工場—運送の各工程で何が危害として考えられるかを検討し、未然に防ぐことを目的とし、産地の顔が見え、トレーサビリティの可能な優れた方法である (吉水, 2002)。

標津漁港は標津川河口間近にあり、潮の流れからも河川水が漁港内に流入する可能性が考えられる。さらに、伊茶仁川、古多糠川、薫別川など多くの河川の河口があり、それら河川は多くの牧場の間を流れてくる。漁港近辺の河川の水質および細菌を調査することは、地域 HACCP を推進する上で重要な基礎データとなる。このような背景のもと、標津川、伊茶仁川および古多糠川の水質、一般細菌数およびその種類を 1 年間調査し比較した。

水質面では大きな差がみられなかったが、各定点の一般生菌数は、古多糠川を除いて春は少なく、夏から秋にかけてピークを示し、冬に再び減少するという季節的な変化を示した。また地域的には下流に行くにしたがって増加する傾向がみられたが、函館市内を流れる亀田川ほど顕著ではなかった(データは示していない)。細菌叢は各定点とも同様の属組成となったが、水温の低い春および秋は *Pseudomonas* 属の割合が増える傾向がみられた。標津川の河口地点は、生菌数および細菌叢を海水寒天培地および海洋細菌の簡易同定法で検討したため単純に比較できない。以上より、道東の河川は流域に大きな都市がないために、水質、生菌数および細菌叢に流域ごとのばらつきが見られないものと考えられた。

一方、大腸菌群数ならびに大腸菌数は、下流に行くに従い高い値を示す傾向がみられ、大腸菌数は大腸菌群数のおよそ 1/10 の値を示した。大腸菌群数ならびに大腸菌数を測定する場合、通常は推定もしくは確定試験を行う必要があるが、本報では測定地点が多数あるため、LB 培地で 48 時間培養し、ガスを発生したものをカウントして大腸菌群数を割り出した。さらに、ガス発生管を EC 培地に移植し、ガス発生が認められたものから大腸菌数を求めた。そのため、確定試験などを行うとそれぞれの数値が低くなることが予測されるが、夏場は 100 mL あたり 10^{2-3} 程度の大腸菌群が海洋に流入していることが示された。国立感染症研究所の厚生科学研究事業報告 (2000) では、1998~1999 年の屠殺場への搬入牛の O-157 保菌率が 6.5% とされ、乳牛 (1.8%) は肉牛 (黒毛和種 13.5%) より低いものの、場合によっては何らかの対策を講じる必要があると考える。さらに大腸菌の海水中での生存性が、5°C で 5 日と比較的長かったことから、大腸菌が河川から根室海峡に出たあとの

消長についても観察する必要があると考える。

謝 辞

本研究の一部は、標津町地域 HACCP 推進委員会からの水産学研究費、標津漁港、標津町内主要河川水質環境調査によって実施した。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 絵面良男・清水 潮 (1990) 水質・微生物編. pp. 9-20, 日本海洋学会 (編), 沿岸環境調査マニュアル II, 恒星社厚生閣, 東京.
- 国立感染症研究所 (2000) 病原微生物検出情報, **21**(5), 1-2.
- 佐谷戸安好・澤村良二・竹下隆三・中沢泰男・長澤金蔵・濱田 昭 (1973) 繁用衛生試験法と解説, 南山堂, 東京.
- 北海道標津町 (2000) 標津町地域 HACCP 推進マニュアル策定報告書.
- 北海道水産林務部 (2000) 北海道水産物品質管理高度化モデル計画.
- Shewan, J. M., Hobbs, G. and Hodgkiss, W. (1960) The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish. *J. appl. Bact.*, **23**, 463-468.
- Yamamoto, H., Ezura, Y. and Kimura, T. (1982) Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 1427-1431.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 (1976) サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究 I, 飼育魚の腸内細菌叢. 日本誌, **42**, 91-99.
- 吉水 守 (2002) 標津川におけるサケ加工への HACCP 導入. 農林統計調査, **52**(3), 17-22.