4－1

水環境における微生物指標の現状と展望

芦　立　徳　厚（函館工業高専）

1．はじめに

表題の「水環境」は、飲料水、下水、環境水等われわれの周辺のすべての水の環境を指しているが、「微生物指標」は病原微生物汚染あるいは温血動物の排せつ物汚染の indicatorに限定して以下の議論を進めたい。

緩速ろ過と塩素消毒という２大技術によって、水道による伝染病の伝播は過去のものになったというのが、われわれの確信するところであった。緩速ろ過が急速ろ過に切り替わり、塩素消毒の再検討が叫ばれても、基本的なところでその確信は維持されている。しかし、われわれのまわりの水環境は、日に日に物騒さを増している。表１に、近年世界的に問題になっている水系感染症とその病原体の中で主要なものをリストアップして示した。中にはわが国で感染例や病原体検出の報告のないものもあるが、すでに存在しているのに医療・病原体検出の両面でそれを捕捉する体制の不備から見逃している可能性が大いにある。また今日現在、わが国に未侵入のものであっても、急激な国際化の進展は現状の維持をいつまでも許さないであろう。

表－１　最近問題になっている水系感染症と病原体

病　原　体	感　染　症
Bacteria	
Campylobacter jejuni	キャンピロバクター感染症
Campylobacter coli	〃
Yersinia enterocolitica	エルシニア胃腸炎
Y.pseudoturculosis	〃
Enterotoxigenic E.coli	大腸菌性腸炎
Enteroinvasive E.coli	〃
Enteropathogenic E.coli	〃
Enterohaemorrhagic E.coli	〃
Aeromonas hydrophila	エロモナス腸炎
A.sobria	〃
Protozoa	
Giardia lamblia	ジアルディア感染症
Cryptosporidium spp.	クリプトスポリジウム感染症
Echinococcus spp.	エキノコックス症
Viruses	
Rotavirus	ウイルス性胃腸炎
Norwalk virus	〃
Hepatitis A virus	A型肝炎
Hepatitis B virus	B型肝炎
Adenovirus	腸炎，咽頭炎
Coxsackie virus	髄膜炎
Echo virus	腸炎，髄膜炎
Poliovirus	灰白髄炎
Rotavirus	腸炎

このような状況の中で、われわれのまわりの水環境がどの程度の水系感染症の危険性を内包しているかを知ることは、医学だけでなく衛生工学の諸分野にとってきわめて重要である。

では、水環境の衛生学的評価はどのようにすべきであろうか。ある病原微生物を検出することはそれによる感染症の危険性を指摘するに過ぎない。病原微生物の種類は多く、それぞれの試験法は熟練を要する上に時間も費用もかかるから、病原微生物すべてを日常的に試験することは不可能である。そこで各種の病原微生物に必ず随行する試験の容易な微生物を見いだして指標とすることが必要となる。水環境に流入する可能性のある病原微生物の多くは、温血動物の腸管をその habitatとしている。したがって、腸管からの排泄物である糞便中に存在する細菌類は腸管由来の病原体と行動をともにすることになる。病原微生物の指標として糞便中の細菌が選ばれる理由は以上の事情によっている。

こういった論理によって歴史的に選ばれた微生物指標の代表が「大腸菌群」である。

大腸菌群は「ふん便汚染および病原菌汚染の指標の役割」を担って、現在も上下水道から環境基準まで幅広く用いられている。

水質環境基準においては、河川、湖沼、海域の類型分けに必要な項目として大腸菌群はＢＯＤ、ＣＯＤと同等の位置を占めている。環境基準の限られた項目の中で細菌指標に求められているのは、ふん便汚染という側面からみた環境水の水質評価や利水目的への適合性であろう。したがって、その指標細菌にはふん便汚染との密接な相関性が求められる。ところが、環境基準に基づく水域監視を開始してから現在まで一貫して大腸菌群の基準超過率が異常に高く他の

水質項目と甚だしく乖離していることが問題となっている。大腸菌群の不適合率の高さがそのままふん便汚染の深刻化と受け取れないところに問題があり、大腸菌群の存在とふん便汚染との対応関係に疑問が提起されている。しかし事態はこの段階に留まったまま放置されているので、類型に適合か否かの判定や経年的な水質改善の評価において、大腸菌群は全く無視され環境基準において有名無実の存在になりつつある。

飲料水水質基準については、当菌群がこれまで果たしてきた水系伝染病に対する防壁の役割は評価してもし過ぎることはない。しかし、著しく汚染された原水から供給される消毒剤耐性の高い病原微生物（原虫、ウイルス等）に対して飲料水の安全性を確保するためには、大腸菌群では不十分で、新たな追加指標の必要性が指摘されている。

一方、下水処理水再利用の水質基準案にも大腸菌群が加えられている。この場合、環境基準における大腸菌群のような存在に成り下がる心配はないか、事前に十分検討しておく必要がある。

本稿では、環境基準における大腸菌群の問題点を明らかにした後、環境基準における微生物指標の役割とそれにふさわしい指標細菌は何かについて論ずる。ついで現下の原水状況のもとで、飲料水の消毒効果の指標細菌として何が適当かにふれる。最後に、水の再利用における微生物基準の問題についても若干考察してみたい。

2．環境基準と大腸菌群

2.1 基準超過の現状

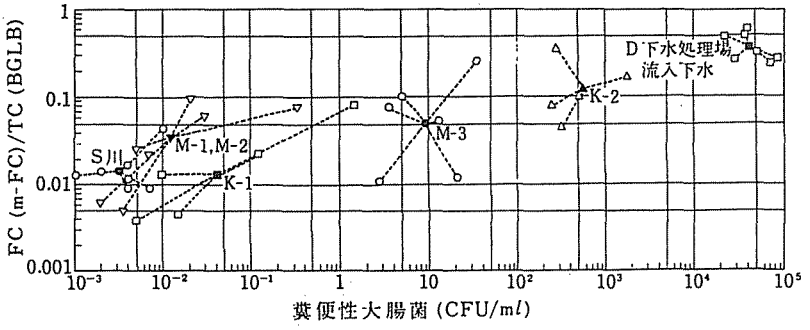
昭和46年度から53年度の８年間について、環境庁が集計したデータのなかの河川について概観すると、Ｂ類型ではＢＯＤの平均不適合率が32.0%に対して大腸菌群のそれは55.5%、Ａ類型ではＢＯＤ27.4%に対して大腸菌群69.0%、ＡＡ類型では34.0%対76.8%であった。いずれも、大腸菌群の不適合率はＢＯＤのそれを大幅に上回っている[1)]。

次にまだ人為汚染の少ない北海道の河川について、昭和59年１月から12月まで建設省が実施した水質調査の結果からＢＯＤと大腸菌群を抜きだして比較してみる。13河川29地点の基準の達成状況を概観すると、ＢＯＤに関してはＢ類型の一地点を除いてすべて基準内に収まっているのに対して、大腸菌群についてはＡＡ類型（７地点）のすべて、Ａ類型10地点中７地点、Ｂ類型12地点中９地点がそれぞれ基準を超過している[2)]。

2.2 基準超過の原因

ＢＯＤなどの有機物汚染指標と大腸菌群の示唆する汚染内容が 100%一致するものでないことは、言うまでもない。例えば、人あるいは温血動物のふん便による直接汚染の場合、大腸菌群数が多くてＢＯＤ濃度が低いということは有り得ることである。しかし、2.1に示した大腸菌群の基準超過の現状はその可能性をはるかに超えたところにあると言わざるを得ない。以下にその原因について検討してみたい。

まず考えられる疑問は、ふん便汚染の無いところでも大腸菌群が検出されるのではないか、ということである。この疑問を解明するためには、大腸菌群が検出された地点でふん便性大腸菌が同時にどの程度検出されるかを調べてみるとよい。流入下水、汚濁河川、清浄河川の代表的な地点について、大腸菌群（BGLB法）とふん便性大腸菌（m-FC法）を同時に試験した。その結果から、大腸菌群（ＴＣ）に対するふん便性大腸菌（ＦＣ）の比を求め、ふん便性大腸菌との関係を示したのが図－１である。



図－１　ふん便性大腸菌と［ＦＣ／ＴＣ］比との関係

図中の白印は各地点の個々の試験結果で、黒印はその幾何平均値を示している。まず、糞便が直接水域に流入

した直後の様相を示すと考えられるD下水処理場の流入下水の FC/TC比の幾何平均値は0.36となった。筆者は他の下水処理場でも同様な結果を得ており[3]、新鮮な糞便汚染の試料水中では、大腸菌群の3〜4割をふん便性大腸菌が占めているといってよい。ところが、汚濁河川（K-2）、清浄河川下流部（M-3）とふん便性大腸菌が減少するに従い、FC/TC比も0.12、0.049と減少の一途をたどる。さらに人家の全く無いS川の支流部に至っては0.013（1000mL の試料水をろ過してもふん便性大腸菌が未検出の場合、計算から除外しているので実際はより低い値と推定される）ときわめて低い値となった。このことは、河川が清浄なほど、検出された大腸菌群の大部分を非ふん便性の大腸菌群（土壌や植物をhabitat としていると考えられる）が占めていることを物語っている。

大腸菌群は、「グラム陰性の桿菌で通性嫌気性、乳糖を分解して酸及びガスを発生し芽胞を形成しない」という定義に包含されるすべての細菌の総称である。大腸菌群として検出される可能性にある菌種をまとめたのが表－1である[4),5)]。表はまずその菌種の菌株のうち乳糖分解能を有する菌株の割合（%）を示している。大腸菌（Escherichia coli）以外にも、Klebsiella pneumoniaeやEnterobacter aerogenes をはじめ多くの菌種が乳糖分解能を有している。表中の次の欄はONPGテストの陽性率を示している。ONPGテストは乳糖分解酵素であるβ-D-ガラクトシダーゼが ONPG（o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド）をも加水分解して、弱アルカリ性下で黄色を呈することを利用して乳糖分解酵素活性を調べる試験法である。表中の数字は各菌種のONPGテスト陽性の菌株の割合（%）を示している。乳糖分解試験で酸産生の認められない菌株でもONPG陽性のものが少なくないので、K.rhinoscleromatis以外の菌種はすべて高い陽性率になっている。表の最下欄のAeromonasは非腸内細菌であるが、ONPGテスト陽性率はきわめて高い。

表－2　大腸菌群として検出される可能性のある菌種

	Lactose	ONPG
Escherichia coli	91.6	99
Arizona hinshawii	68.9	99
Citrobacter freundii	39.4	99
Citrobacter diversus	32.7	98
Klebsiella pneumoniae	98.7	99
Klebsiella oxytoca	*	
Klebsiella rhinoscleromatis	6.0	0
Klebsiella ozaenae	72.6	90
Enterobacter cloacae	76.3	99
Enterobacter aerogenes	92.5	100
Enterobacter agglomerans	40.5	98
Hafnia alvei	2.8	71
Aeromonas hydrophila		98
Aeromonas shigelloides		89

* Biochemically *K.oxytoca* is very similar to *K.pneumoniae*

これら大腸菌群として検出される可能性のある菌種のうち、E.coli以外の菌種は糞便以外に土壌、植物などからもよく検出される。さきに述べた清浄と思われる水域で検出される大腸菌群の主要構成菌種はこれらの菌種と考えられる。

したがって、糞便汚染の考えられない水域で基準値以上の大腸菌群が検出された場合、その値はまったく糞便汚染を意味しないか、せいぜい野生動物由来のわずかなE.coliが含まれているに過ぎないことが大部分と考えられる。したがって、その試料は人為汚染の無い自然水とするのが妥当ということになる。特に、腸内細菌ばかりか非腸内細菌のAeromonas まで混入する可能性があるということは、大腸菌群試験の致命的な欠陥と言わざるを得ない。

ここまでの考察で人為汚染の考えられない清浄な水域に出現する大腸菌群についてはほぼ説明し得たと思うが、糞便汚染を確実に受けている汚濁河川でもFC/TC比が低下する現象についてはどうであろうか。この場合自然由来の大腸菌群の流入という理由では説明がつかないほど大腸菌群の濃度が高いので、別な要因を考慮するする必要がある。この要因を解明するためには、水域に流入した大腸菌群の構成細菌が水中でどのような挙動を示すかを知ることが重要と思われる。

大腸菌群を含む試料水による室内実験やその前後の大腸菌群構成細菌の分類同定を行った結果[6)]、水温が常温の場合、大腸菌群は水中でかなり増殖すること、構成細菌の中では非ふん便性のEnterobacterやKlebsiella等の増加率が高いことが明らかになった。このことから、糞便汚染を受けた河川におけるFC/TC比の減少は、大腸菌群の増殖に伴う非ふん便性大腸菌の比率の増大（E.coliの比率の減少）が原因と考えられる。

大腸菌群が、その構成菌種に非ふん便性のものを多く含んでいたり、水中で急激に増殖した

りすることを種々の調査や実験から明らかにした。これらが単独に、あるいは複合して、実際にはふん便汚染が無視しうるか軽微であるにもかかわらず、大腸菌群数としては大きな数字となることが、けた外れの基準超過率を生み出す原因と考えられる。

2.3 環境基準における微生物指標の役割と指標細菌の選択

生活環境の保全に関する水の環境基準は、ｐH、ＢＯＤ（ＣＯＤ）、ＳＳ、ＤＯ、大腸菌群の５項目で基準値が定められている。ｐH、ＳＳ、ＤＯを項目として選択した意図は自明のことなのでここではふれない。ＢＯＤ・ＣＯＤは有機物汚染の程度を定量的に知りたいためであろう。そうすると、残る大腸菌群に期待されている指標性は、病原菌汚染の危険性の程度であり、それとかなりの部分で重複する糞便汚染の度合ということになる。前節で述べた通り、大腸菌群がこの期待に応えてないことは明白である。その結果、年度毎の各水域の汚染状況の評価において、大腸菌群に関しては言及もされないという状況に陥っている[7]。このことは、水域の汚染状況が病原菌汚染や糞便汚染の側面から評価されていないということを意味しており、環境基準によって守られるべき我々の生活や各種の産業が不完全にしか監視されていないということになる。また、大腸菌群の試験に投入される膨大な労力と経費を結果的に無駄なものにしているという点からみると、国民全体が大きな損失を被っているとも言わざるを得ない。

以上の観点から、筆者は可及的速やかに、環境基準の微生物指標を大腸菌群から適切な他の指標細菌に変更すべきであると考える。

さきに述べたような、環境基準における微生物指標細菌の役割から導き出される指標細菌が具備すべき条件は以下のようになる。

①大部分の病原微生物の供給源である温血動物のふん便中に大量に存在し、ふん便汚染の無い自然環境には存在しないこと
②水環境に流入後、病原微生物よりやや長く生存すること
③水環境で病原微生物よりはるかに長く生存したり、増殖したりしないこと
④短時間で結果が得られ、判定が容易で、選択性と精度の高い試験法があること

これらを満足する指標細菌の第一候補は、ふん便性大腸菌であろう。すでに国際的には広く採用されてきており、わが国でも水浴場の基準に採用されている。上記の条件に基づいて個々に検討してみると、①については全く問題ない。②については対比する病原微生物にもよるが特に問題はない。③については、非ふん便性の大腸菌群ほどではないが、環境条件によっては水中で増殖することがあり、若干問題がある。④についても、後に述べる一部のE.coliの検出漏れの可能性を除けば、問題どころかきわめて優れた試験法を持った指標細菌である。④の一部を除けば、さきにあげた大腸菌群の欠陥部分をクリアーした優れた指標細菌である。

次に考えられるのが、ふん便性連鎖球菌である。ふん便性連鎖球菌（fecal streptococci）は Enterococcus Group(Streptococcus faecalis,S.faecalis subsp.liquefacienns,S.faecalis subsp.zymogenes,S.faecium),S.bovis,S.eqinus,S.aviumの総称である。いずれも人間を含む温血動物の腸管をhabitatとしているが、S.bovis・S.eqinusは牛、馬、豚など家畜のふん便によく見いだされることが知られている。S.faecalis subsp.liquefaciennsは人畜のふん便以外に植物、昆虫、土壌からも検出されることが報告されており、この点が①の条件に抵触する。②③については、20－25℃の室内実験（試料：流入下水添加河川水）において、ふん便性大腸菌が12から24時間にかけて一桁近い増殖をみせるのに対して、ふん便性連鎖球菌は24時間までほとんど当初と変わらない値で推移しその後急激に減少するという、指標細菌として理想的な推移を示す[8]。④については、簡便で判定の容易な試験法（m-Enterococcus寒天培地を用いるＭＦ法）があるが、培養期間が長く（48時間）、ふん便性大腸菌と同じように高い培養温度（45℃）が一部のふん便性連鎖球菌の増殖を阻害している可能性のあることなどが問題点である[8]。

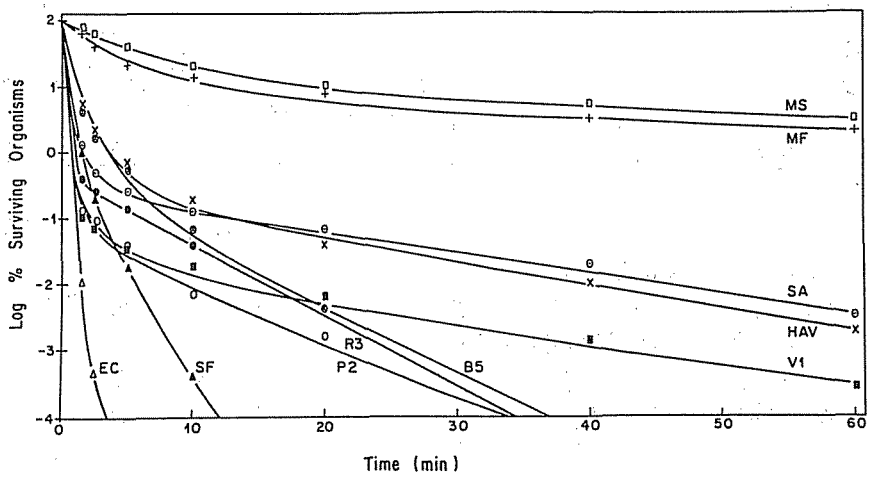
この他に、嫌気性有芽胞桿菌であるClostridium perfringens の採用提案がなされている[9]が、これも①④に問題がある。

筆者は、①から④のすべての条件を完全に満足する指標細菌が存在しない現段階では、相対的に優れたものを選択するしかないと考える。その意味では、欠点の少ないふん便性大腸菌が最も妥当ということになるであろうが、試験法の改良によって欠陥を少しでも克服できないか

という期待を持っている。またふん便性連鎖球菌もその指標細菌の特性に捨てがたいものがあり、同様に試験法の改良に望みをつなぎたい。いずれであっても、無用の存在と化している環境基準における微生物指標の地位を大腸菌群に代わって回復してくれることは間違いないので、早急に改定されることを望みたい。

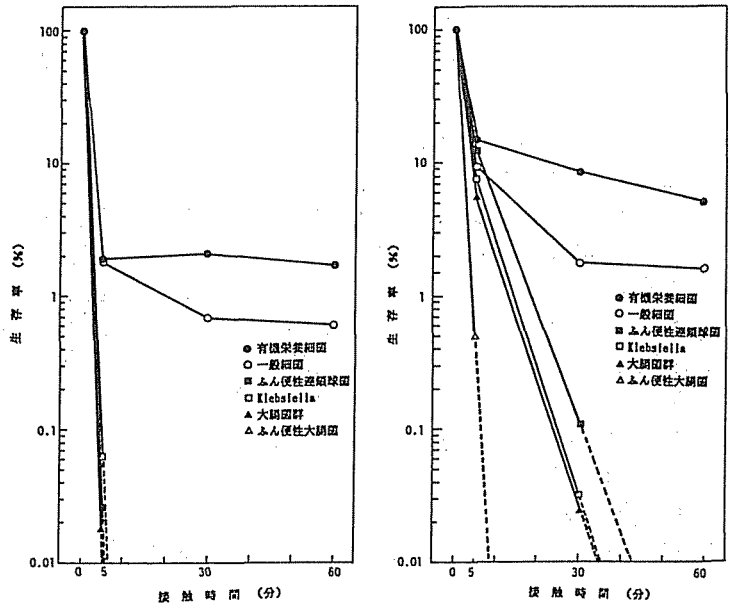
3．飲料水の消毒効果指標微生物

上流の下水が大量に流入する水源を原水とせざるを得ないような浄水場においては、原水中に表－1にあげたような病原体が存在しているものとして浄水処理を行う必要がある。最終的な障壁は消毒工程であるので、その消毒が有効か否かを判定する指標の役割はきわめて重要である。図－2は南西アフリカ，ウインドホークの水再生プラントをフィールドにこの分野のデータを精力的に出しているGrabowらの実験データである[10]。この図は、各種の微生物が植種された水道水に塩素を添加したときの生存曲線である。この中で、病原微生物は、SA-11ウイルスやA型肝炎ウイルスを先頭にいずれも塩素に対する耐性が高い。E.coliは短時間で死滅してしまうので、大腸菌(E.coli)のいないことが、病原体不在の保証とはならないことをこの図は示している。すなわち、消毒の有効性を判定する指標としては、病原微生物の生存率を上回る、この図でいえばM.fortuitum（ミコバクテリア）のような微生物が最適である。



図－2 Average survival curves of organisms exposed to chlorine (Table 1) in seeded tap water. Numbers/mℓ of organisms at 0 min: *E. coli* E25 (EC) 1 x 10^6, *S. faecalis* (SF) 5 x 10^5, *M. fortuitum* (MF) 5 x 10^4, phage MS2 (MS) 1 x 10^6, phage VI 1 x 10^6, HAV 1 x 10^4, poliovirus (P2) 5 x 10^5, coxsackievirus (B5) 9 x 10^4, SA-11 virus (SA) 6 x 10^4, reovirus (R3) 5 x 10^4

筆者は下水と河川水の混合試料に、塩素と代替消毒剤として注目されている二酸化塩素を添加して（両消毒剤とも 2 ppm添加）同様の実験を行い、図－3のような結果を得ている[11]。両消毒剤とも、大腸菌群などの糞便汚染指標細菌のグループと一般細菌などの生菌数指標のグループに傾向が分かれる。前者の消毒剤耐性は低く後者は高い。Grabowらの図と重ね合わせて考えると、消毒剤耐性の高い病原微生物が消毒工程まで到達する可能性のある浄水場では、大腸菌群だけで消毒効果を判定するのはきわめて危険ということになる。この場合、一般細菌の結果を重視する必要があり、より消毒剤耐性の高い有機栄養細菌の同時試験が望ましい。



図－3　各指標細菌の消毒経過（左 ClO_2, 右Cl_2）

4．水の再利用における微生物基準

下水処理水の再利用のために微生物基準をとりいれた最近の例としては、建設省・高度処理会議提案の「下水処理水の修景・親水利用水質検討マニュアル（案）」がある。

ここで想定している親水用水利用は、水路における魚取り、ボート遊び、魚釣り等、人体と再利用水との接触が部分的・間接的なもので、水浴のような全身的・連続的な接触を前提とする利用は対象としていない。ただ、転倒などによって偶発的に全身が接触したり、誤って再利用水を飲み込んだりすることもありえないことではないので、当マニュアル（案）はそのような場合でも十分な安全性が保たれることを基本にしているとしている。

このマニュアル（案）では微生物指標として大腸菌群を採用しているが（修景用水 1000個/100mL以下、親水用水 50/100mL以下）、当案の解説資料[12]では、大腸菌群を選択した理由として「大腸菌群はいうまでもなく腸管系の感染症に対する安全性の指標として（選定された）」と述べている。この場合の大腸菌群の供給源は大部分下水処理水そのものであるから、環境基準の場合と異なり非ふん便性大腸菌群の混入については考慮する必要はないだろう。また、大腸菌群の増殖についても、下水処理場から出る直後に試験を行うのであれば同様に考慮する必要はない。ただ、修景・親水用水を利用する河川に固有な流量がある場合や修景・親水水域の全域を監視区域とする場合は大腸菌群の問題点が露呈する可能性がある。特に大腸菌群の増殖は水温の高い夏季に起こるので、その結果、親水用水が最も利用されると考えられる時期に目標水質をクリヤーできない事態が生じることになる。

大腸菌群が再利用水の微生物指標として妥当でないもう一つの理由は、2．で述べたように消毒剤に対する耐性が低いことである。下水処理水は必ず消毒という工程を経て再利用水になるわけであるから、微生物基準が目標水質以下であれば病原性の細菌やウィルスの危険性がないという保証を意味するものであってほしいわけである。ところが、大腸菌群では、その数が少なかったりゼロだったりしても、消毒剤に強い細菌やウィルスがいないという保証にはならない。

以上をまとめると、下水処理水の再利用基準においても、大腸菌群を用いることは好ましくないということになる。

5．おわりに

水環境における微生物指標の選択は、微生物が本来持っている変動性に惑わされずに本質を見極めなければならないという困難な仕事である。また、その余地があると述べた個々の試験法の改良も容易な仕事ではない。今後とも、真摯な努力がますます求められていると言えよう。

【参考文献】

1) 環境庁水質保全局：全国公共用水域水質年鑑(1980)
2) 芦立徳厚：水質環境基準項目としての大腸菌群の評価，用水と廃水，30(3)，229(1988)
3) 芦立徳厚（微生物生態研究会編）：微生物の生態5「水質汚染における衛生学的指標細菌」，p.148－163，学会出版センター(1978)
4) APHA·AWWA·WPCF：Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 17th Ed.，American Public Health Association (1989)
5) API System S.A.：Differentiation of Enterobacteriacene and Some Other Gram Negative Bacteria by Biochemical Tests Provided on API 20E (1982)
6) 2)と同様
7) 岡久宏史：公共用水域の水質について，下水道協会誌，29(3)，6(1992)
8) 芦立徳厚他：ふん便汚染指標としてのふん便性連鎖球菌の評価と応用，第43回土木学会年次学術講演会概要集，II，904(1988)
9) 平田　強：糞便汚染に関する指標微生物の水環境における挙動，文部省科学研究費一般研究C昭和62，63年度研究成果報告書(1989)
10) Grabow，W.O.K. et al：Inactivation of hepatitis A virus，other enteric viruses and indicator organisms in water by chlorination. Water Science and Technology 17，657(1984)
11) 芦立徳厚他：二酸化塩素の消毒特性と消毒効果指標細菌の選択に関する研究，第48回土木学会年次学術講演会概要集，II，1220(1993)
12) 小越真佐司：下水処理水の修景・親水利用水質検討マニュアル（案），下水道協会誌，29(3)，40(1992)
13) 芦立徳厚：飲料水の安全確保のための細菌指標と監視システムの開発に関する工学的研究，文部省科学研究費一般研究C昭和59，60年度研究成果報告書(1986)