

原著論文 [Original Paper]

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

山田剛史・広谷博史*

(2014年3月14日受付, 2014年6月11日受理)

Fluctuation of fecal contamination on the beaches of Lake Biwa and application of microbial source tracking using bacteriophage

Takeshi Yamada and Hiroshi Hirotani*

摘 要

琵琶湖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。近江舞子浜（大津市南小松）、松の浦（大津市木戸）、真野浜（大津市今堅田）、なぎさ公園（守山市今浜町）の4ヵ所、及び流入河川として野洲川服部大橋（守山市服部町）の1ヵ所に調査地点を設け、2011年6月2日午後、6月29日午後、7月26日早朝、8月24日早朝と正午頃、12月13日早朝に水質調査を行った。同時に水浴場の水浴者数を計数した。

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、水温などの環境要因の関与が示唆された。大腸菌数には水浴者の影響は少ないと考えられた。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。F特異ファージはすべての地点で検出され、夏季の糞便汚染は動物に由来し、冬季の糞便汚染はヒト由来のものが主体であると推定された。冬季の試料を用いてF特異ファージの濃縮を試みた。

キーワード：水浴場，糞便性大腸菌群，汚染源推定

Abstract

Fecal indicators were measured on the beaches of Lake Biwa and tracking of contamination sources were performed using the bacteriophage serotyping method. Sampling stations were located at four beaches, i.e. Oumimaiko (Minamikomatsu, Otsu), Matsunoura (Kido, Otsu), Mano (Imakatata, Otsu), and Nagisa Park (Imahama, Moriyama). Another station was set up at Hattori Bridge (Hattori, Moriyama) on the Yasu River. The experiments were conducted in the morning on June 2, in the afternoon on June 29, early in the morning in July 26, early in the morning and around noon on August 24, and early in the morning on December 13, all in

2011. The number of bathers was also recorded during these times. Our findings suggested that coliforms and fecal coliforms were affected by environmental factors (e.g. water temperature), and that *E. coli* was not related to the amount of bathers on the beach. Although a significant positive correlation was found between *E. coli* counts and enterococci counts, enterococci counts were suggested to contain false-positive values. The percentage of the fecal contamination deriving from humans was assumed to be rather low in the summer and *vice versa* in the winter. An attempt to concentrate phage particles was also conducted.

Keywords: bathing water quality, fecal contamination, microbial source tracking

緒言

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もある。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向上させて湖水とのふれあいが可能となる施策が期待される。

水の糞便汚染状況は、糞便汚染を示す微生物指標を測定することによって評価されている。その指標として、水道水では大腸菌数が用いられるが、生活環境の保全に関する環境基準では大腸菌群数が用いられている。大腸菌群数として計数される細菌には、糞便汚染を示す細菌以外のものが含まれ、本来の汚染よりも高い数値（偽陽性）を示すことが知られている（金子，1996）。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。このように糞便汚染を検出するためにさまざまな指標が用いられているものの、それぞれ一長一短があり、より正確に糞便汚染を示す指標が待たれているのが現状である。

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を把握するとともに、夏季の糞便汚染の由来と水浴者数との関係の検討を行った。また、水浴場の汚染状況把握に役立てるため、大腸菌数と腸菌数との関係、ファージ濃縮操作のRT-PCR法による遺伝子増幅への影響についても、あわせて検討を行った。

材料と方法

調査の概要

調査は琵琶湖の水浴場4ヵ所、及び流入河川1ヵ所で行った。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地点で調査を行い、水浴場の開設前として6月29日12:00から

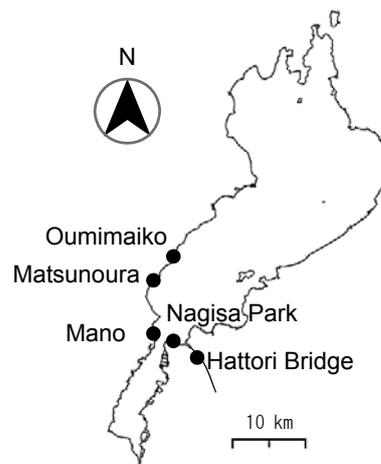


Fig. 1 Sampling stations around Lake Biwa

図1 琵琶湖における調査地点

Table 1 Primer sets used to detect F specific phages

表1 F特異ファージの検出に使用したプライマー

| FRNA group | Primer | Sequence | Amplicon (bp) | Assumed source |
|------------|--------|-------------------------|---------------|----------------|
| I | 1F | CAAACCAGCATCCGTAGCC | 142 | Mainly animal |
| | 1R | CTTGTTGAGCGAACTTCTRTA | | |
| II | 2F | ATGCCGTTAGGTTAGRTGAC | 471 | Mainly human |
| | 2R | GCAATHGCAACCCCAATA | | |
| III | 3F | CTACTGCTGGTAATCTCTGGC | 795 | Mainly human |
| | 3R | CAACRCCGTTTRGTGGGATTTAC | | |
| IV | 4F | CTGTCCGACGGATGTWACCA | 1159 | Mainly animal |
| | 4R | GGCACTGTCTGAATCCACG | | |

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。

水質分析

持ち帰った試料は、全有機炭素 (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。

微生物数の測定

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。

F特異ファージ数は、Salmonella typhi WG49 (Havelaar と Hogeboom, 1984) を宿主として加えた改変トリプトン寒天培地に試料水を1:1の割合で混合し、37°Cで24時間培養した後、生じたプラーク数を計数することにより算出した (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とした。

糞便汚染源の推定

7月26日以降の調査で検出されたF特異ファージを用いて、糞便汚染源の推定を試みた。宿主細菌が生育した寒天平板上に生じたプラークは、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単一クローンのファージからRNA遺伝子を抽出し、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。

Salmonella typhi WG49平板の表面に生じたF特異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抽出液を加え、サーマルサイクラーにて逆転写を50°Cで30分、同酵素の失活処理を94°Cで2分行い、生じたcDNAを、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。増幅された産物を、0.1~2kbpのDNAマーカー (Gene Ladder 100, ニッポンジーン) とともに電気泳動し、その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。

ファージの濃縮

12月13日に採取した各地点の試料水に含まれるファージを陰電荷膜法で濃縮した。すなわち、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。

結果と考察

調査結果と水質の概要

水浴場湖水と流入河川の大腸菌群数とともに糞便性大腸菌群数の変化を調べた。

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（図2）。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によれば，北湖西岸の大腸菌群数は同様の季節変動をし，極大値と極小値の違いは100から1000倍となっていた。本研究で得られた変動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，本研究ではコリラート18を用いた特定酵素基質法の

Table 2 Numbers of bathers on beaches at Lake Biwa in 2011

表2 2011年の琵琶湖水浴場の水浴者数

| Dates | Oumimaiko | Matsunoura | Mano | Nagisa Park |
|---------------------|-----------|------------|------|-------------|
| 6/2 morning | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6/29 afternoon | 36 | 0 | 2 | 4 |
| 7/26 early morning | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 8/24 early morning | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8/24 noon | 462 | 6 | 32 | 38 |
| 12/13 early morning | 0 | 0 | 0 | 0 |

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（Hirofumi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（図3）。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（Hirofumiら，1992）ので，水浴者の影響よりも水温や天候の影響を大きく受けていると考えられた。

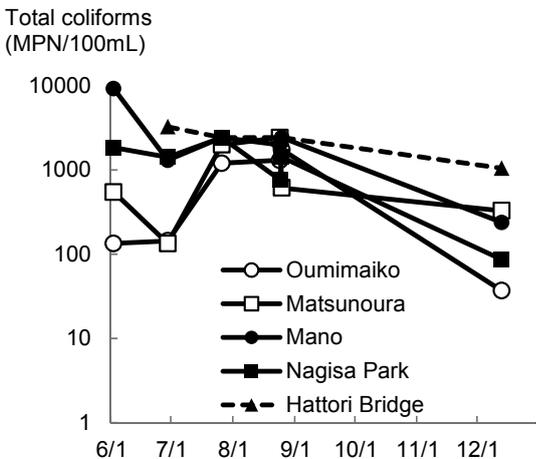


Fig. 2 Fluctuation of total coliforms at Lake Biwa in 2011

図2 2011年の琵琶湖の大腸菌群数の変動

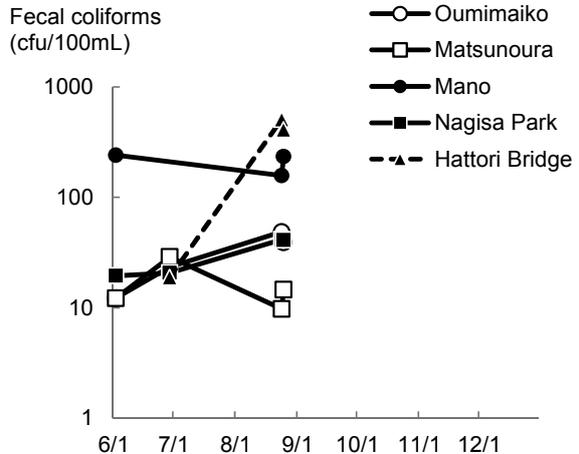


Fig. 3 Fluctuation of fecal coliforms at Lake Biwa in 2011

図3 2011年の琵琶湖の糞便性大腸菌群数の変動

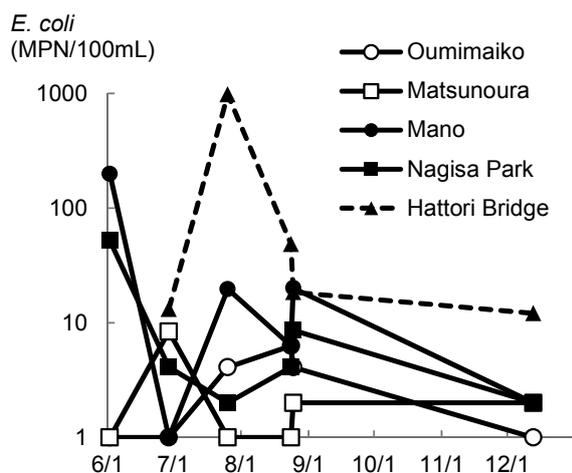


Fig. 4 Fluctuation of *E. coli* at Lake Biwa in 2011
 図4 2011年の琵琶湖の大腸菌数の変動

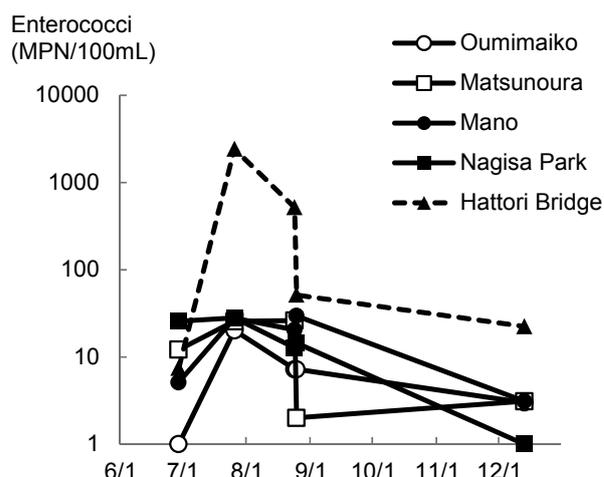


Fig. 5 Fluctuation of enterococci at Lake Biwa in 2011
 図5 2011年の琵琶湖の腸球菌の変動

大腸菌数の変動は、大腸菌群数や糞便性大腸菌群数よりも、地点ごと、調査ごと双方で変動が大きく、季節変化に伴う傾向は認められなかった(図4)。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5)。そのため、季節的な

変動も考えられたが、大腸菌と有意な正の順位相関 ($\rho = 0.61, n=25, P<0.01$) が認められ(図6)、大腸菌と同様に糞便汚染指標として用いることが可能であることを示唆している。しかし、大腸菌は少ないにもかかわらず、相当数の腸球菌が検出される場合があった。これは、大腸菌数が低いことから糞便汚染の程度は高くないと考えられ、糞便汚染とは関係はないものの腸球菌と性質が類似した細菌が腸球菌の偽陽性として計数された可能性が考えられた。逆に大腸菌だけが多い事例は認められなかった。腸球菌に偽陽性が含まれる可能性については報告過去に例がある(Hirotani and Yoshino, 2010)。小河川の調査で腸球菌が他の指標項目と関連性を持たない報告があるが(上野ら, 2013)、偽陽性の多寡が本研

Table 3 Fluctuation of F specific phage counts at Lake Biwa in 2011 and numbers of plaques subjected to source tracking
 表3 F特異ファージの変動と汚染由来推定に供した点数

| Dates | Oumimaiko | Matsunoura | Mano | Nagisa Park | Hattori Bridge |
|---------------------|-----------|------------|------|-------------|----------------|
| 6/2 morning | 0 | 0 | 4 | 56 | - |
| 6/29 afternoon | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7/26 early morning | 0 | 0 | 4(2) | 2(1) | 46(10) |
| 8/24 early morning | 0 | 0 | 0 | 0 | 18(10) |
| 8/24 noon | 3(3) | 0 | 1(1) | 0 | 1(1) |
| 12/13 early morning | 0 | 0 | 0 | 4(4) | 1(1) |

No sample was taken in June 2, morning.

Data are shown in plaque counts (pfu/50mL, except at 8/24 noon by pfu/100mL).

Figures in parenthesis show the number of plaques subjected to source tracking.

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。

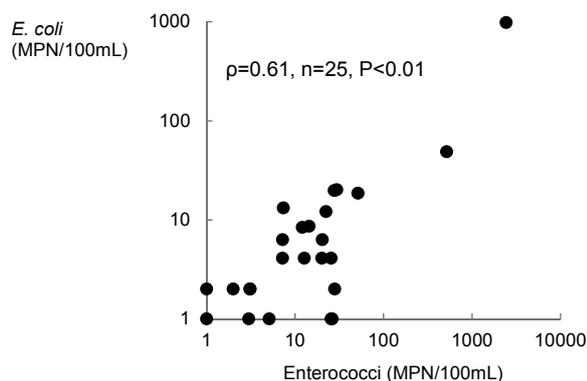
Fig. 6 Correlation between *E. coli* and enterococci

図6 大腸菌と腸球菌の相関

究との違いの原因である可能性が考えられる。腸球菌の8月24日の早朝と午後の変化を調べたところ、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。

F特異ファージは、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、このとき使用した宿主は成育が悪く、他調査において汚染の激しい河川で採取した試料を同様に成育が悪い状態の宿主で調べた際もファージが検出されなかったため、F特異ファージがどの地点にも存在しなかったわけではなく、検出されなかっただけである可能性もある。真野浜となぎさには、近江舞子と松の浦より多くのF特異ファージが存在すると思われた。7月26日早朝と8月24日早朝には服部大橋で最も多くの数のF特異ファージが検出されたが、8月24日午後や12月13日などには他地点と同様か少なくなっており、時期により大きく変動することが明らかとなった。

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)。

Table 4 TOC (mg/L) at beaches at Lake Biwa in 2011

表4 2011年の琵琶湖水浴場のTOC (mg/L)

| Dates | Oumi-maiko | Matsunoura | Mano | Nagisa Park | Hattori Bridge |
|--------------------|------------|------------|------|-------------|----------------|
| 6/29 afternoon | 2.1 | 2.2 | 2.8 | 3.7 | 2.3 |
| 8/24 early morning | 2.8 | 3.1 | 2.2 | 2.2 | 1.8 |
| 8/24 noon | 1.8 | 1.8 | 1.9 | 1.9 | 2.0 |

糞便汚染の由来

7月26日以降の調査で検出されたF特異ファージを用いて、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に生じたプラーク中に多量に存在する単クローン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ため、F特異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考えられる。

F特異ファージから糞便汚染の由来を推定したところ、8月24日の試料を調べてわかったものは、すべてI型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、ヒト由来であると推定された。

ファージの濃縮

前述のように、F特異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、本研究のようにF特異ファージの密度が低い場合でも、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12月13日に採取した試料を用いて検討した。

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

Table 5 Percentage of F specific phages assumed to derive from human source

表5 F特異ファージの血清型分類によって汚染がヒト由来と推定された割合

| Dates | Oumimaiko | Matsunoura | Mano | Nagisa Park | Hattori Bridge |
|--------------------|-----------|------------|------|-------------|----------------|
| 7/26 early morning | - | - | 不明 | 不明 | 40% |
| 8/24 early morning | - | - | - | - | 0% |
| 8/24 noon | 0% | - | 0% | - | 0% |
| 7/26 early morning | - | - | - | 75% | 不明 |

Table 6 F specific phage counts and serotypes before and after concentration of phage particles
表6 濃縮前後のF特異ファージ数と組成

| | | Oumimaiko | Matsunoura | Mano | Nagisa Park | Hattori Bridge |
|---------------------------------------|--------------|-----------|------------|---------|-------------|----------------|
| Before concentration (per 50mL) | Group I | | | | 0 | 0 |
| | Group II | | | | 3 | 0 |
| | Group III | | | | 0 | 0 |
| | Group IV | | | | 0 | 0 |
| | Unknown | | | | 1 | 1 |
| | Total | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 |
| | Human source | Unknown | Unknown | Unknown | 75% | Unknown |
| After concentration (per 400mL) | Group I | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Group II | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Group III | | 14 | 6 | 9 | 12 |
| | Group IV | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Unknown | | 6 | 1 | 0 | 3 |
| | Total | 0 | 40 | 7 | 9 | 25 |
| | Human source | Unknown | 35% | 86% | 100% | 48% |

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、F特異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。組成が変化した理由としては、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、肉エキスの成分が特定の血清型のDNAのPCRによる増幅を阻害して収率に影響を与え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。由来がヒトか動物かの推定を行う上では大きく結果が異なることはなかったが、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。

まとめ

琵琶湖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、水温などの環境要因の関与が示唆された。大腸菌数には水浴者の影響は少ないと考えられた。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。F特異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、冬季の糞便汚染は、ヒト由来のものが主体であると推定された。F特異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。

謝辞

本研究は、財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構の水質保全研究助成を受けて行った。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。感謝を申し上げる。

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.
- 上野加寿紀, 和田桂子, 宗宮功, 広谷博史 (2013) 木津川上流の小河川におけるふん便汚染指標細菌の現状把握, *環境技術*, 42(8), 489-495.
- 金子光美 (1996) 水質衛生学, 技報堂出版, 東京, 579pp.