

材料および方法

1. 供試試料

2004年4月から10月の間に、東北から沖縄にある大学附属、国公立、私立等の病院内水道水（主にトイレや洗面所などの末端）を十分に放流後、滅菌容器（100ml 容）に採取し、合計271試料を調査対象とした。また、試料採取時に試験紙（アクアチェック LC, 日産化学工業）により遊離残留塩素の測定を行った。

2. 貧栄養細菌の分離同定

供試試料を1 ml ずつ2枚のシャーレに分注し、1枚は一般細菌を測定するために標準寒天培地（日水製薬）で混釈後、37°Cで24時間培養した。また、1枚は貧栄養細菌測定用としてR2A 寒天培地（和光純薬工業）を用いて混釈し、25°Cで7日間培養後、出現した集落を計数した。なお、残留塩素が検出されなかった試料は1,000倍まで希釈してから混釈した。

集落計数後、形態の異なる集落を1試料当たり最大数個鈎菌して再分離し、純培養株を得た。これらの菌株について色素産生性、グラム染色、OF 試験、オキシダーゼテスト（栄研化学）などを行い、成書²⁾に準拠して属レベルで菌種の同定を行った。なお、OF 試験ではPYP 基礎培地（日水製薬）にグルコース（和光純薬工業）を1%加えて調製し、25°C、7日間培養した。また、一部の分離株については、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌同定用キット、ノンファグラム S-1（和光純薬工業）を用いた。

結 果

1. 病院内水道水からの一般細菌の分離状況

一般細菌が分離された水道水は271試料中3試料（1.1%）と低率であった。なお、これらは大学附属病院が2試料（2.8%）、都府県立病院が1試料（3.6%）であった。これら試料の残留塩素をみると、いずれも0.1mg/l 未満であった。また、それぞれの菌数は大学附属病院では 7.5×10^3 CFU/ml および 6.4×10^3 CFU/ml、都府県立病

Table 1. Isolation of oligotrophic bacteria from hospital tap water.

Sampling area	No. of samples examined	No. of positive samples (%)
Tohoku	15	14 (93.3)
Kita-Kanto	5	5 (100.0)
Minami-Kanto	202	161 (79.7)
Koshin-etsu	15	13 (86.7)
Hokuriku	2	2 (100.0)
Tokai	6	5 (83.3)
Kinki	6	5 (83.3)
Chugoku	3	3 (100.0)
Shikoku	3	1 (33.3)
Kyusyu・Okinawa	14	13 (92.9)
Total	271	222 (81.9)

院では 4.0×10^4 CFU/ml であり、水道法水質基準（ 1.0×10^3 CFU/ml 以下）を大きく上回った。

2. 病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況

病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況を調査地域別にTable 1 に示した。全体では271試料中222試料（81.9%）から分離され、貧栄養細菌は非常に高率に生息していることが明らかになった。分離状況を地域別にみると、北関東、北陸および中国地方においては、試料数は少ないものの、採取したすべての試料から分離された。次に、東北および九州・沖縄地方での分離率が90%を超えて高く、前者では93.3%（15試料中14試料）、後者では92.9%（14試料中13試料）であった。また、甲信越地方では86.7%（15試料中13試料）、東海および近畿地方ではそれぞれ83.3%（6試料中5試料）、南関東では79.7%（202試料中161試料）といずれも高率に分離された。ところが、四国地方では試料数が3試料と少なかったが、このうち分離された試料はわずか1試料（33.3%）のみであった。

また、Table 2 には貧栄養細菌の分離状況を病院の規模を考慮した経営形態と遊離残留塩素濃度別に示した。貧栄養細菌は市立病院から96.4%（28試料中27試料）と最も高率に分離され、次に大学附属病院が83.3%（72試料中60試料）、都府県立病院が82.1%（28試料中23試料）、その他の病院が79.5%（112試料中89試料）および独立行政法人（国立）病院が74.2%（28試料中23試料）であった。

Table 2. Distribution of oligotrophic bacteria isolated from hospital tap water and the free residual chlorine concentration of the water samples.

Management form	No. of samples examined	No. of positive samples (%)	Free residual chlorine (mg/l)					NT*
			0	0.1-0.2	0.3-0.4	0.5-0.6	0.7-0.8	
University attachment	72	60 (83.3)	8	20	5	4	1	22
National	31	23 (74.2)	6	2	6	1	0	6
Prefecture	28	23 (82.1)	4	4	3	1	0	11
City	28	27 (96.4)	3	10	2	1	0	11
Others	112	89 (79.5)	2	16	29	10	5	27
Total	271	222 (81.9)	25 (11.9)	52 (23.4)	45 (20.3)	17 (7.7)	6 (2.7)	77 (34.7)

* : Not tested

病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況を遊離残留塩素濃度別にみると、未測定 of 77 試料を除き、0.1~0.2mg/l から 52 試料 (23.4%) と最も多く分離され、次に 0.3~0.4mg/l から 45 試料 (20.3%) 分離された。遊離残留塩素が 0.5~0.6 mg/l になると分離された試料は 17 試料 (7.7%) と少なくなり、さらに高濃度の 0.7~0.8mg/l ではわずか 6 試料 (2.7%) から分離されたに過ぎなかった。このように、貧栄養細菌の分離状況は残留塩素濃度が高くなるとともに分離率が低くなる傾向が認められた。また、水道法で定められた 0.1mg/l を維持しておらず貧栄養細菌が分離されたのは、222 試料中 25 試料 (11.3%) であった。分離率が最も高かった遊離残留塩素濃度 0.1~0.2 mg/l における病院別の分離率を比較すると、市立病院が 35.7% と最も高く、次に大学附属病院が 27.8% であった。都府県立病院とその他の病院ではそれぞれ 14.3%、国立病院が 6.5% であった。

病院内水道水中に生息する貧栄養細菌数を Fig. 1 に示した。全体では 1.0×10^4 CFU/ml ~ 9.0×10^6 CFU/ml が 96 試料 (43.2%) と最も多く、次に 1.0×10^1 CFU/ml ~ 9.0×10^3 CFU/ml が 54 試料 (24.3%)、 1.0×10^2 CFU/ml ~ 9.9×10^3 CFU/ml が 38 試料 (17.1%)、 1.0×10^3 CFU/ml ~ 9.9×10^3 CFU/ml が 30 試料 (13.5%) であっ

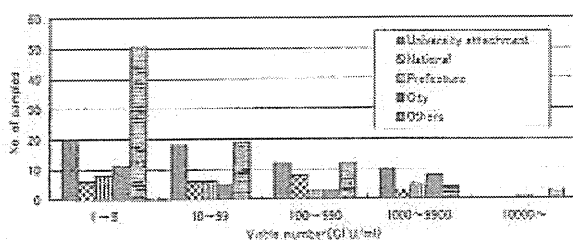


Fig. 1. Viable number of oligotrophic bacteria in hospital tap water.

た。さらに、 1.0×10^4 CFU/ml 以上の試料が 4 試料 (1.8%) あった。このように、菌数が多くなると分離試料数は少なくなった。また、分離試料数が最も多かった 1.0×10^4 CFU/ml ~ 9.0×10^6 CFU/ml について病院別に比較すると、その他の病院が 51 試料 (53.1%) と最も多く、次に大学附属病院が 20 試料 (20.8%)、市立病院が 11 試料 (11.5%)、都府県立病院が 8 試料 (8.3%)、国立病院が 6 試料 (6.3%) であった。

3. 病院内水道水から分離された貧栄養細菌

Table 3 には 222 試料の病院内水道水から分離された貧栄養細菌の同定結果を示した。分離された貧栄養細菌 538 株中 457 株 (84.9%) がグラム陰性桿菌であり、4 属に同定され、その内訳は *Methylobacterium* が 108 株 (23.6%) と最も多く、次に *Pseudomonas* が 71 株 (15.5%)、*Agrobacterium* と *Alteromonas* が各 2 株 (0.4%) であった。しかし、グラム陰性桿菌のうち 274 株

Table 3. Oligotrophic bacteria isolated from hospital tap water.

Gram stain	Cell form	Genus	No. of strains (%)
Negative	Rods	<i>Methylobacterium</i>	108
		<i>Pseudomonas</i>	71
		<i>Agrobacterium</i>	2
		<i>Alteromonas</i>	2
		Unknown	274
Subtotal			457 (84.9)
Positive	Rods	<i>Bacillus</i>	12
		<i>Corynebacterium</i>	5
		Unknown	29
Subtotal			46 (8.6)
Positive	Cocci	<i>Micrococcus</i>	4
		<i>Staphylococcus</i>	2
		Unknown	29
Subtotal			35 (6.5)
Total			538 (100.0)

(60.0%) は同定不能であった。また、グラム陽性菌では桿菌が46株(8.6%)、および球菌が35株(6.5%)であり、それぞれ *Bacillus* が12株(26.1%)と *Corynebacterium* が5株(10.9%)、*Micrococcus* が4株(11.4%)と *Staphylococcus* が2株(5.7%)の各2属に同定された。

考 察

これまでの水道水における細菌学的調査では、血液寒天培地やハートインフュージョン寒天培地などの富栄養培地を用いて37°C、24~48時間の培養条件が採用されている⁹⁾。調査対象が病原細菌のみの場合はこうした検査で十分であるが、バイオバーデン、すなわちそこに存在し、生育しうるすべての貧栄養細菌を対象とする場合には、こうした培地および培養条件では検出されにくいことがすでに知られている¹⁾。新谷の解説¹⁰⁾では、透析液中の貧栄養細菌の調査において SCDA 培地を用いて37°Cで48時間培養した場合と SMA 培地や R2A 培地のような貧栄養培地で比較的低温(23°C)で長時間(7日間)培養した場合では、検出菌数に10,000倍もの差が生じたことが示されている。また、歯科用水の調査においても同様な結果が示されており、このような貧栄養細菌は富栄養培地では発育しにくいこと、さらにこれらの生息環境を考慮すると、貧栄養で比較的低温条件の方が培養には適していることが示唆されている¹¹⁾。

今回の調査においても同様な結果が示された。すなわち、標準寒天培地を用いて36°Cで24時間培養する「一般細菌」の分離率は、わずか1.1%(271試料中3試料)と非常に低率であった。ところが、同一試料を R2A 培地により25°Cで7日間培養すると81.9%(271試料中222試料)と高率に「貧栄養細菌」が分離された。このように、培養条件を替えることによって細菌の分離率に大差が認められた。以上のように、通常の病院内水道水から水道法に定められた「一般細菌」が分離されることは非常に希であるが、「貧栄養細菌」は広く生息していることが明らかになった。

これら貧栄養細菌の生息状況を地理的にみると、

試料数が少なかった四国を除き、全国的には80~90%の高い分離率であり、顕著な差異は認められなかった。また、病院の規模を考慮して経営形態別に貧栄養細菌の分離率をまとめてみたが、独立行政法人(国立)で74.2%とわずかに低かったものの、その他は80~90%と大差はなかった。

さらに、遊離残留塩素濃度別の分離状況では、0.1~0.2mg/lで23.4%と最も高く、次に0.3~0.4mg/lで20.3%であった。遊離残留塩素が0.5~0.6mg/l、0.7~0.8mg/lと高濃度になるとそれぞれ7.7%、2.7%と分離率は次第に低下した。また、貧栄養細菌が分離された水道水のうち、水道法に定められた遊離残留塩素0.1mg/lを維持していなかったものは11.3%であり、予想外に低かった。このように、遊離残留塩素が存在する病院内水道水においても塩素抵抗性の貧栄養細菌が生残していることが明らかになった。一方、事務所ビル等の建築物における現状はすでに報告したとおりであり¹⁾、実験的にも分離株の塩素抵抗性が確認されている^{9)、10)}。

病院内水道水中の貧栄養細菌数は、 1.0×10^3 CFU/ml~ 2.8×10^4 CFU/mlと試料によってかなりの差がみられた。これをオーダーごとにみると、1桁台が96試料(43.2%)と最も多く、次に2桁台が54試料(24.3%)、3桁台が38試料(17.1%)、4桁台が30試料(13.5%)と菌数の増加に伴って漸次試料数は減少した。また、5桁台の試料が4試料(1.8%)もあった。現在のところ、これら貧栄養細菌数に関する規制基準はまったくない。先の水道法水質基準改定において、試験項目を「一般細菌」から「従属栄養細菌(貧栄養細菌)」へ移行することの是非について種々議論されたが、結局結論は先送りとなった¹¹⁾。今後の検討が待たれるところである。

分離された貧栄養細菌を同定した結果、84.9%がグラム陰性桿菌であり、大半を占めた。中でも *Methylobacterium* や *Pseudomonas* が優占種であったが、グラム陰性桿菌のうち60%は同定できなかった。このことは水道水中の貧栄養細菌に関する情報量が少ないことや分離株の生化学的活性が低いことによるものと考えられた。以前、著者らが行った調査では病院内水道水の74%が

ら *Methylobacterium* が分離されており¹²⁾、今回の調査結果同様、水道水中の優占種であった。Gallego らの報告¹³⁾でも、水道水から *Methylobacterium* を分離しており、新菌種の提案を行っている。また、O'Brien は塩素消毒された水道水中の *Pseudomonas* について報告している¹⁴⁾。現在、水道水中に生息する *Methylobacterium* 属菌については19菌種が報告されているが¹⁵⁾、性状試験だけでは種レベルでの同定はかなり困難である。著者らは16S rDNA の部分塩基配列の解析によってわが国の病院内水道水では *M. aquaticum* と *M. fujisawaense* が優占種であったことを別に報告した¹⁶⁾。こうした *Methylobacterium* は *Pseudomonas*¹⁷⁾ 同様、日和見感染の原因菌として報告されており¹⁸⁻²¹⁾、感染の可能性を有すると判断された。

厚生労働省は2005年2月1日付けで医療法施行規則の一部を改正する省令において、第20条第3号のなかで「滅菌手洗い」を「清潔な手洗い」に改訂した²²⁾。これまで、手術時の手洗い水については種々検討され、滅菌水と水道水において手洗いの効果に有意差がないとの報告^{6, 13, 20)}から、日本の病院においても感染対策に必要な経費削減のため、滅菌手洗い装置を廃止して水道水への切り替えが可能になった。こうした状況を否定するものではないが、塩素消毒された水道水中にも貧栄養細菌が広く生息していることを念頭に置く必要があると考えられた。

結 語

以上のように、残留塩素が検出される病院内水道水中にも貧栄養細菌が広く生息していることが判明した。全体的に菌数は少ないものの、日和見感染原因菌として注目される *Methylobacterium* や *Pseudomonas* が分離されていることから、水道水の衛生的維持管理状況によっては菌数の増加に伴う水質の劣化も予想され、易感染者が直接水道水を利用する場合にはこうした現状を十分に考慮する必要がある。

なお、本稿の内容は日本防菌防黴学会第33回

年次大会（東京）において発表した。

文 献

- 1) 古畑勝則, 小池和子, 松本淳彦 (1989) 飲料用タンク水から高頻度に分離された *Protomonas extorquens* の消長と塩素抵抗性. 日本微生物生態学会報, 4, 35-47.
- 2) Hornei, B., et al. (1999) Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zatmanii*. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 248-250.
- 3) Lee, C. H., Tang, Y. F., and Liu, J. W. (2004) Underdiagnosis of urinary tract infection by *Methylobacterium* species with current standard processing of urine culture and its clinical implications. *J. Med. Microbiol.*, 53, 755-759.
- 4) 石黒俊哉, ほか (2005) *Methylobacterium mesophilicum* による CAPD 腹膜炎の1例. 日本透析医学会雑誌, 36増刊1, 962.
- 5) 小迫芳正 (1996) 細菌の同定方法. 佐々木次雄 ほか編, バイオバーデン試験法及び環境微生物試験法, 財団法人規格協会, 東京, p.100-111.
- 6) 高尾佳保里, ほか (2003) 手術時手洗い水について, 滅菌水の必要性に関する検討. 環境感染, 18, 430-434.
- 7) 古畑勝則, 小池和子 (1990) 落下細菌測定時の培地および培養条件に関する一考察. 環境感染, 5, 11-16.
- 8) 新谷英晴 (2002) 医療機関と損傷菌, 貧栄養菌, 静止菌, 院内感染菌. 防菌防黴, 30, 95-103.
- 9) 古畑勝則 (2004) 水道水. 伊藤 武ほか編, 食品のストレス環境と微生物—その挙動・制御と検出—, (株)サイエンスフォーラム, 東京, p. 210-218.
- 10) Hiraishi, A., et al. (1995) Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2099-2107.
- 11) 松田和久 (2003) 水道法水質基準の見直し等について. 空気調和・衛生工学, 77, 809-814.
- 12) 古畑勝則, 小池和子 (1990) 院内環境から分離された *Methylobacterium extorquens* の性状と薬剤感受性. 環境感染, 5, 47-51.
- 13) Gallego, V., Garica, M. T., and Ventosa, A.

- (2005) *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 281-287.
- 14) O'Brien, J. R. (1992) An unusual yellow pigmented *Pseudomonas* species isolated from chlorinated municipal town water supply. *Microbios*, 69, 215-221.
- 15) Euzéby, J. P. (2005) List of bacterial names with standing in nomenclature-genus *Methylobacterium*. [http:// www. bacterio. cict. fr/ m/ methylobacterium. html](http://www.bacterio.cict.fr/m/methylobacterium.html).
- 16) Furuhashi, K., et al. (2006) Isolation and identification of *Methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility. *Microbiol. Immunol.*, 50, 11-17.
- 17) Holmes, B., et al. (1977) *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens, the hospital environment, and other sources. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 133-146.
- 18) 厚生労働省令第12号. 医療法施行規則の一部を改正する省令. 官報2005年2月1日, 第4024号.
- 19) 藤井 昭, ほか (2002) 手術時手洗いにおける滅菌水と水道水の効果の比較. *手術医学*, 23, 2-9.
- 20) 白石 正, 仲川義人, 長岡榮子 (2004) 術前手洗い水に関する細菌学的検討. *日病薬誌*, 40, 1133-1135.

また CLDM 投与の delayed treatment は、たとえ CLDM 感受性菌による膿瘍であっても、膿瘍中の菌数をほとんど減少させられないことが認められた。

2. *Legionella* 属細菌の水道水汚染とその non-culturable form について

岐阜大学医学部微生物学講座

山本啓之 江崎孝行

Department of Microbiology,

University of Maryland

C. Paszko-Kolva, R.R. Colwell

I. 緒言

Legionella 属細菌は冷却塔のみならず、水道配管系内からも検出されている。しかしその多くは、使用頻度が少なく、配管内で長期間にわたり水が滞留した試料である。我々は滞留状態となり易い水道配管系である実験室用洗眼器を対象として微生物調査を行い、その結果より *Legionella* の生息状態を考察した。

II. 方法

実験室内に設置された非常用洗眼器より水を採取し、直ちに実験に供した。pH, 塩素, CO₂ 濃度, アルカリ度などの化学的項目と、従属栄養細菌と *Legionella* の生菌数及び蛍光法による総菌数を調べた。また、試水中の原生動物の検出を行った。

III. 結果

調査した 40 試料で遊離塩素は検出されず、また 27 試料で濁りや着色が肉眼で認められた。*Legionella* は、蛍光抗体法により 32 試料 (10¹–10⁶ cell/ml) から検出されたが、生菌数では 3 試料 (10–10² CFU/100 ml) から検出されただけであった。従属栄養細菌は、32 試料で 10¹–10⁸ CFU/ml であった。また、19 試料でアメーバが検出され、そのうちの 1 試料には、*Acanthamoebae* が存在した。

IV. 考察

滅菌状態に近いと一般的に考えられている水道水も滞留状態に置かれると、感染症の原因となる微生物が増殖してくる。結果に示したように、*Legionella* の生菌数と蛍光抗体法による総菌数と

の落差は、この細菌が人工培地では発育しない状態 (non-culturable) にあるのではないかと考えられる。培地上では発育しないが宿主の体内では増殖するとされている viable but non-culturable という概念は、環境に存在する病原性細菌を調査する方法として培養法のみでは不十分であることを示唆している。

3. 麻疹・ムンプス・風疹混合ワクチン接種について

—特にムンプスに関する検討—

岐阜大学医学部小児科

浅野純一 佐々木俊也 高橋一浩

桑原尚志 近藤直実 折居忠夫

はじめに

麻疹・ムンプス・風疹混合ワクチン (以下 MMR ワクチン) は 1989 年 4 月よりわが国で広範囲に接種されるようになり MMR ワクチンによると思われる髄膜炎の発生が問題となり、厚生省の調査では同ワクチン接種後の髄膜炎の頻度は 2,000 人に 1 人であると報告された。今回著者らは岐阜県下における MMR ワクチン接種後の髄膜炎の頻度および同時期におけるムンプス自然感染後の髄膜炎の頻度につき検討した。

対象および方法

MMR ワクチン接種後の髄膜炎の頻度は平成元年 4/1–10/31 における県保健予防課の調査データによった。ムンプス自然感染後の髄膜炎の頻度は岐阜県下小児科関連病院に調査用紙を送付し平成元年 1/1–12/31 の外来および入院のムンプス症例につき検討した。

結果

結果を表 1 に示す。MMR ワクチン接種後の髄膜炎の頻度は、2,000 人に 1 人 (0.052%) であり、ムンプス自然感染後の髄膜炎の頻度は 13 人に 1 人 (7.3%) であった。以上より MMR ワクチン接種後の髄膜炎の頻度は、ムンプス自然感染後の髄膜炎の頻度の 0.052/7.3=1/140 であった。

尚、MMR ワクチン接種後の髄膜炎症例 6 例の経過、予後は全例良好であった。

2.3 マンション受水槽での残留塩素消失事例への対応について

町田保健所生活環境安全課

○大坪秀樹、奥村龍一、榎林亨、込富喜徳、宮崎奈々絵、長塚友次

1 はじめに

集合住宅や事務所・店舗などの受水槽は、水道法及び東京都小規模貯水槽等における安全で衛生的な飲料水の確保に関する条例により衛生確保を図っている。これら法令に基づく保健所での主な指導は自主管理の向上であり、これまで受水槽以下の残留塩素消失原因は、水槽の清掃不良や水槽内での水の長時間停滞など自主管理に問題がある施設で発生していた。

ところが今回、自主管理に問題ない施設で残留塩素消失事故が発生し、保健所で調査した結果、水道本管の残留塩素が低いことが原因のひとつであった。また、同様の事故は多摩地区の一部地域でも発生する可能性があることがわかった。そこで、都民が利用する全ての受水槽で安全で衛生的な水を確保するために、今回の事例を踏まえ今後の保健所の取り組みを検討したので報告する。

2 事故の概要

(1) 施設の概要

A分譲マンション（居住者66世帯約150人）、受水槽容量36m³（簡易専用水道）

(2) 事故発生の経緯

A分譲マンションの管理者から、「昨日から残留塩素が検出されない。近くの公園の直結栓を測定したところ、そこからも検出されない。」との電話通報があった。直ちに現場調査したところ、直結給水栓では水道法に規定する基準値0.1mg/lを保持していたものの、受水槽内では残留塩素がほとんど消失していた。その後、環境水道課を通じ水道局に通報し早期の塩素回復を要請するとともに、管理者に利用者への情報提供を指導した。

3 原因究明調査

(1) 施設維持管理状況調査

事故発生前と当日の残留塩素は表に示すとおりであった。また、平成14年度からこれまでの残留塩素測定記録を確認したところ、今回以外に塩素が消失したことはなく、入居者の変動による水使用量の減少もなかった。なお、水道法で規定する登録検査機関による検査も定期的を実施しており指摘事項はなかった。

表 事故発生前後の残留塩素

測定場所	事故発生二日前	事故当日
直結水(隣接公園)	記録なし	0.1
直結水(近隣住宅)	記録なし	0.1
受水槽内	記録なし	0.1未満
末端水	0.3	0.1未満

(単位:mg/l)

(2) 給水所及び管末での残留塩素状況調査

水道局提供の資料から、①事故発生の一週間前から管末での残留塩素が急速に低下していたこと、②管末の残留塩素が0.2mg/lを下回ってから塩素が追加されたこと、③昨年度の同じ時期には、0.25mg/lで塩素が追加されていたことなどがわかった。

(3) 水道管敷設状況調査

水道局及び町田市水道部からの情報提供により、町田市をはじめ多くの市町村では、都と市町村の水道事業一元化以前に敷設した水道管が多く、水道水停滞の原因となる“行き止まり管”が多数存在することがわかった。

4 今回の原因

原因究明調査から、マンションで残留塩素が消失した今回の事例は、以下の原因が複合して発生したものと考えられる。

①残留塩素が低下しやすい時期 毎年6月ころは残留塩素が低下しやすい時期であり、給水所ではその都度、塩素を追加注入しているものの、今回はそのタイミングが遅れた。

②行き止まり管の存在 行き止まり管では水が停滞するため、残留塩素が低下しやすい。

5 保健所の対応

自主管理による維持管理の向上を指導するだけでは、問題解決が困難な事例があることが判明したため、保健所では次のような対策を実施した。

(1) 施設設置者及び管理者への周知

週に1回、残留塩素を測定し記録を保管することや保健所への相談、また、残留塩素が消失する原因など受水槽の維持管理強化を求める通知を、簡易専用水道及び特定小規模貯水槽水道の全施設に送付した。また、保健所ホームページに関係情報を掲載した。

(2) 問題の共有化

環境水道課を事務局とし各保健所、水道局及び市町村水道部で構成する多摩地区貯水槽水道等連絡協議会の開催を要請し、今回の事故の対応状況を報告した。また、各地域の行き止まり管の情報提供や残留塩素が一定濃度で供給できる自動塩素注入装置への転換、また、関係機関の連携強化などを協議し、同様の事故の再発防止の必要な対策を検討した。

6 今後の取り組み

(1) 行き止まり管に接続する受水槽を持つ施設への重点指導

水道局からの情報提供を受け残留塩素が消失する可能性がある施設を抽出し、現場調査により必要な維持管理及び問題発生時の対応策の周知徹底を図る。

(2) 市水道部との連携強化

光化学スモッグ対策と同様、事前対応措置として自動測定器により定点測定している地点の残留塩素測定値の提供を受け、リアルタイムで地域の状況を把握し問題発生に備える体制を整備する。

(3) 受水槽を利用する都民に向けた事業展開

保健所では、施設設置者や管理者に対しては受水槽の維持管理方法などを指導している。しかしながら、利用者にはどのような状態の水を飲用しているか、安全な水の供給にはどんな維持管理が必要かなどの情報提供が不足している。今後、インターネットなどを活用して飲用水の衛生に関する地域情報を発信していく。

7 まとめ

水道局では平成16年度から「安全でおいしい水プロジェクト」を実施している。今回の事例は、そこで推進する塩素注入量の低減化が原因のひとつであった。また、水を供給する者（水道局・市水道部）と水道水の衛生を担う福祉保健局・保健所との間で、健康危機発生時の対応に温度差が感じられた。今後、水道事業体との連携をさらに深め情報交換をしながら共通の認識の下で、飲料水による健康被害の発生防止を図っていかなければならない。

最後に、今回のような“発生時に原因特定ができない健康危機”では、多くの可能性のなかから原因を絞り込み、被害拡大を防止する必要がある。また、その発生時は現場で可能な限りの情報を収集することが重要である。これに加えて、収集した情報を正確に評価し被害の拡大を防ぐことができる資質を備えた職員の育成が不可欠である。

水道水中の残留塩素について

露木 敏勝

平成8年7月から平成9年7月にかけて東京女子医科大学看護短期大学の水道水中の残留塩素濃度の季節変動および通水量に対する残留塩素濃度の変動を、DPD法を用いた残留塩素計により測定を行い、以下のことを明らかにした。

- 1) 残留塩素は通水開始後約1ℓまでは低濃度であるが、以降急激に変化し、3ℓ位通水すると長時間通水した後の濃度レベルに近くなる。
- 2) 残留塩素濃度が施行規則の規定値を満たしたのは、冬季の1月の測定の時のみであり、4月では既に施行規則の下限値の三分の一程度の低濃度であった。5月下旬以降は遊離残留塩素は0.01mg/ℓ以下、全残留塩素は0.11mg/ℓ以下の値であり、一年のかなりの期間残留塩素は施行規則規定値をはるかに下回る低濃度であった。

はじめに

水道水は消毒がしてあり、安心して飲める水である。それは水道水を作るとき、原水中のさまざまな汚染物質を酸化分解するためと水系感染症の防除のためつまり消毒殺菌のための2つの目的で塩素が加えられているからで、水道水中に含まれる遊離の塩素や結合をした酸化力をもつ有効塩素を残留塩素という。この塩素であるが水道水中に含まれるカルキ臭(塩素臭)のもとになっており、カルキ臭は汚れた水に多いアンモニアと塩素が反応して生成するクロラミンという物質、特にトリクロラミンによる。カルキ臭は残留塩素濃度が0.4mg/ℓが閾値とされており、0.4mg/ℓ以下であればおいしい水の要件となる¹⁾。換言すれば、カルキ臭がすれば水道水中の残留塩素は水質基準以上であり消毒効果が持続していることになる。

浄水方式の主な方法は緩速ろ過法と急速ろ過法の2つである。緩速ろ過法は、原水を一日5~6mのスピードでゆっくりと大きな池の砂層でろ過することにより水質を浄化するもので、浄化力は砂表面に付着した微生物の分解作用による自然の浄

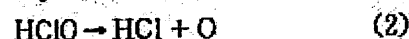
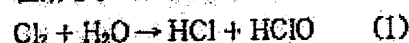
化力に依存する浄水方式で、得られた水はうまいと評価されている。この方法は、イギリスで開発された技術で日本でも初めはこの方法が採り入れられた。しかし水道水の需要の増大に伴い緩速ろ過法では浄水量が不足となり、原水に濁りがある場合も浄水でき取水から給水までにかかる時間が緩速ろ過法の約6分の1で済む急速ろ過法に変わってきた。急速ろ過法は、アメリカで開発された技術で日本では1912年(明治45年)京都の蹴上浄水場で最初に採用された。急速ろ過法は、原水中の固形物を硫酸バンド、アルミニウム塩や鉄塩などの凝集剤を用いて凝集沈殿処理をし、その上澄み液を急速ろ過池の砂に導いてろ過する方法で、急速ろ過後細菌に対する安全を保障するために塩素による消毒が行われ、残存する細菌の死滅と配水管内での再汚染防止が計られている(後塩素処理)。この急速ろ過法は、緩速ろ過法の欠点であった広い面積の浄水場や人力を必要とせず、かなりの濁水であっても短時間で処理できるので急速に広まったが、浄化力の点では劣っていたため種々の薬品に依存している方法である。

残留塩素には遊離残留塩素と結合残留塩素とがあり、両者の合計が全残留塩素である。遊離残留塩素とは、塩素剤が水に溶けて生成する次亜塩素酸(HClO)・次亜塩素酸イオン(OCl⁻)のことで反応しやすい状態にあり、それだけ殺菌力も強い。結合残留塩素とはモノクロラミン(NH₂Cl)・ジクロラミン(NHCl₂)などアンモニアと結合した酸化力をもつ有効塩素をいい、ゆっくり反応するため殺菌力は弱いが残留性は高い。水道水中の残留塩素については、1957年(昭和32年)成立の水道法第22条を受けて、水道法施行規則第16条で「給水栓(蛇口)における水が、遊離残留塩素を0.1ppm(=mg/ℓ)(結合残留塩素の場合は0.4ppm)以上保持するように塩素消毒をすること」と定められており、通達で「水の消毒は塩素によるものとする」となっている。また、1993年(平成5年)12月1日から新たな水質基準²⁾が施行され、同時に、水質基準とはならなかったものの厚生省の通知によってより質の高い水道水を供給するための快適水質項目と呼ばれる13項目に目標値が設定され、残留塩素は1mg/ℓ程度以下と設定されている。残留塩素量は時間の経過とともに変化するので、その場で分析するのであるが、残留塩素の測定目的は、細菌の増殖抑止の指標である。すなわち、水中の大腸菌や一般細菌の量を短時間で測定できないので、殺菌剤の塩素が残っていればこれらの菌類が増殖していないとの判断から残留塩素を測定し水の飲用安全性の指標としている。なお、残留塩素の基準値については、欧米での設定値は日本が0.1または0.4mg/ℓ以上と下限値を定めているのに対し上限値制をとっており、米・仏では遊離残留塩素の上限値を0.1mg/ℓとしており、日本の下限値制に関する議論がされている³⁾。

通常の浄水方法のうち、沈殿、濾過では水中の細菌類を完全に除去することは難しく、水道水の消毒は、飲料水の安全を確保するため水中の病原生物を完全に除去するとともに配水系統の病原菌汚染から水道水を守るため不可欠なことである。水道水の消毒剤としては、液化塩素、次亜塩素酸ナトリウムまたは次亜塩素酸カルシウム等の塩素

剤以外による消毒は認められていない。通常は液化塩素が用いられ減圧気化して注入されているが、小規模浄水場では液化塩素より高価であるが取り扱いや安全性を考慮して次亜塩素酸ナトリウムが使われている。なお、理論的に0℃の液体塩素1ℓは464ℓの塩素ガスを発生する。

塩素を水に注入すると



となり(2)式で単体の激しく反応する酸素(過激酸素)を発生してほかのものに強い酸化作用を及ぼす。この酸素が酸化・漂白したり細菌中の酵素の働きを阻害することにより殺菌を行う。しかし(1)式の次亜塩素酸は強い酸化作用により管を直接に腐食させ、塩酸は水の中のアルカリ分を中和して水を酸性に傾けさせる。

また工場排水や生活排水などによって水が汚れている河川から水道原水を取水して水道水を作るときは、

- (1)アンモニア性窒素や有機物等を酸化分解する。
- (2)水中にいる一般細菌や大腸菌群などを死滅させる。
- (3)藻類や小型動物を死滅させる。
- (4)水の中に溶けている鉄やマンガンを不溶性の酸化物として除去する。

のような目的で塩素処理が行われている。

この酸化剤としての塩素は、環境汚染による水質悪化が高まる1960年代から、原水中のアンモニア性窒素の硝酸化や細菌類を処理するためのいわゆる前塩素処理(現在は中塩素処理に移っている)として多用されてきており河川の汚れの進行とともに使用量が増大している。すなわち、塩素剤はコストがかからず、殺菌力も強力で消毒効果が確実であり、水中に残留することにより消毒効果が長続きするので用いられており、塩素注入はコレラ、赤痢、腸チフスやパラチフス等細菌による消化器系の伝染病の抑止に効果を上げた。つまり、水道水の消毒に使う程度の塩素の濃度では、飲用による人体への影響がなく、塩素は水道水の消毒剤として優れた多くの能力をもっており、各

種の水質汚染物質に対する処理剤としての効果も絶大であるということで使用されている。

一方、残留塩素により水道水は腐食性が高くなり絶えず水と接触している銅管や銅管などの給水管やタンクの腐食を促進する作用があり、鉄が酸化沈殿し水酸化第二鉄（赤錆）となることが原因で引き起こされる赤水現象が発生することになり、メタリン酸ソーダなどのリン酸塩系やケイ酸塩系の赤水防止剤が使われている。

また、水が土壌透過することにより原水中に含まれる天然物質であるフミン質などの有機物と塩素が反応して発ガン性物質であるトリハロメタンが発生することが問題になっている。また、下水や尿尿の処理水や生活雑排水にも有機物は含まれているから河川水の繰り返し使用する場合には更にトリハロメタンが発生する。トリハロメタンは、メタン (CH_4) の4個の水素のうち3個がハロゲンに置き変わった化合物で、水道水質基準²⁾では健康に関連する29項目の中に、総トリハロメタン ($0.1\text{mg}/\ell$ 以下) のほかにクロロホルム ($0.06\text{mg}/\ell$ 以下)、ジプロモクロロメタン ($0.1\text{mg}/\ell$ 以下)、プロモジクロロメタン ($0.03\text{mg}/\ell$ 以下) およびプロモホルム ($0.09\text{mg}/\ell$ 以下) のトリハロメタンの4つの成分ごとにも基準値が定められており合計5項目になっている。なお、塩素処理によって生じる有機塩素化合物のうちトリハロメタンは2割に過ぎず、トリハロメタン以外の塩素化合物としてクロロ酢酸類・クロラール類・クロロアセトン類・クロロアセトニトリルが報告されているがまだ5割以上の不明な有機塩素化合物があると報告³⁾されている。なお、前述した物質のうちクロロアセトンを除いたものは水質基準の監視項目になり指針値が設定されている。

水道水中の残留塩素濃度は、配水・給水施設の給水領域の末端の給水栓での濃度が下限値以上であることを要しており、配水・給水中にロスが生じるため配水・給水施設における塩素濃度はかなり高いものとなる。従って、配水・給水施設付近の給水栓における塩素濃度は高く、配水・給水施設から離れれば離れるほど低くなる。配水管から分かれて、家庭やビルに引き込まれている管が給

水管で、水道とは一戸建住宅の場合、給水栓までつまり水が出るところまでをさす。ビルや共同住宅では水道の給水圧が低いため4階建て以上の建築物においては1階か地下に設けた受水槽に水道の水を貯水し、そこから揚水ポンプにより屋上などの高置水槽に送りそこから各給水栓へ給水するのであるが、水道の責任は受水槽への入り口までであり、その先は使用者や設置者の責任となっており受水槽の容量により維持管理方法が異なる。厚生省による「建築物における衛生的環境の確保に関する法律」施行規則により法の規制を受けるのは、受水槽の容量が 10m^3 を超えるビルや共同住宅などの水道事業のみから水の供給を受ける給水設備で、簡易専用水道に該当し設置者が法律上の管理義務を負い、施行規則により遊離残留塩素や水質検査が義務づけられている。これらの施設は平成7年末で163,357ヵ所⁴⁾ある。また、受水槽の有効容量 10m^3 以下の給水施設は法的義務の対象外となっているため管理が不十分なため衛生上の問題が懸念されるものもある。既に述べてきたように、水道水の安全性を確保するために塩素が加えられており、塩素が残留していることが水をそのまま飲用できる証しといえる。河川水を原料とする水道水は、季節や天候などによってまた原料水源の混合割合によって原水の水質が変化し、これに対応する浄化を行うため当然のことながら水質が変化し、残留塩素は年間を通じて一定ではなく変動をしている。ビルや共同住宅では、ほとんどの施設において水槽からの給水方式をとっており、給水栓の残留塩素は一戸建住宅のように配水・給水施設からの距離や供給される水道水の水質によるというよりも、受水槽から給水栓までの状態に依存している。実際の給水栓での遊離残留塩素は少なめで $0.2\sim 0.4\text{mg}/\ell$ 、多めで $0.5\sim 0.8\text{mg}/\ell$ のところが多いといわれているが、給水栓での水質が受水槽入口の水質と同様であるか、給水栓で規定値が確保されているか等は安全性の面から非常に重要なことである。本学においても、ミネラルウォーター等のボトル水を飲用している者もいるが、多くの者が水道水を飲用に供しており、その安全性の確保のため管理・検査がなされている。

と思うが知らされていない。そこで、本学における給水栓での残留塩素濃度や季節変動を測定し、水道水の貯留による残留塩素への影響を調べた。

1. 測定について

残留塩素濃度の測定は、東京女子医科大学看護短期大学の3階の研究室の給水栓からの水道水を対象とし、測定器はUSEPA（米国環境保護庁）承認のDPD法を用いた残留塩素計を用いた。掘割式の地階を含め6階建ての校舎の給水施設は、地下受水槽の容量が22㎡、屋上の上屋に設置されている鉄板性高置水槽の容量は5㎡である。測定は1996年（平成8年）7月から翌年7月までで、通水開始からの通水量に対する残留塩素濃度の測定以外は、開栓時に高置水槽から給水栓までに滞留していた水をすべて排出させるに十分な通水を行い、高置水槽内の水道水が直ちに給水栓に至るようにしてから採水した。通水量に対する残留塩素濃度の測定においては、採水間隔と採水量は通水開始から累積通水量2ℓまでは0.2ℓずつ、2ℓ以降は0.4ℓずつ採水した。また図には採水開始時の通水量と採水終了時の通水量の中間の値を代表値として表した。

2. 残留塩素の変動

図1は、通水開始からの通水量に対する残留塩素濃度を示したもので、(A)は1月、(B)は4月の測定例である。○印は遊離残留塩素、●印は全残留塩素、□印は水温を表す。なお、前述した通り全残留塩素と遊離残留塩素の差が結合残留塩素となる。残留塩素は、いずれも通水1ℓあたりまでは低濃度で、以降急激に変化している。給水幹管内の残留塩素濃度が高くても、給水栓付近の枝管内の水道水の残留塩素量は低く、特に遊離残留塩素は0.1mg/ℓという下限値よりはるかに低い0.02mg/ℓ以下であった。著者は水道水中の鉄濃度から通水開始

直後の1ℓの水は使用しないほうがよいことを示した⁹⁾が、残留塩素からも同じことがいえる。また、3ℓ位通水すると残留塩素濃度は長時間通水したときの水すなわち高置水槽内の水に近いレベルになっていた。

図2は5月下旬から6月下旬までの1カ月間の残留塩素濃度と水温の変化を示したものである。水温は約5度変化しているが、遊離残留塩素は0～0.02mg/ℓとほぼ一定の値をとっていた。全残留塩素は0.06～0.14mg/ℓの間で変化しているが、変化に傾向はみられず0.1mg/ℓ前後の濃度となっており、全体的には大きな変化はみられないといえる。

表1は、残留塩素濃度および水温の季節による変動を示したものであり、表の値は各月の下旬に測定したものである。冬季の1月のみ遊離残留塩素0.1mg/ℓ以上、全残留塩素0.5mg/ℓ以上という施行規則を満たしているが、他は基準値よりはるかに低い値であり、春季の4月では既に下限値の三分の一程度の濃度であり、これより以降さら

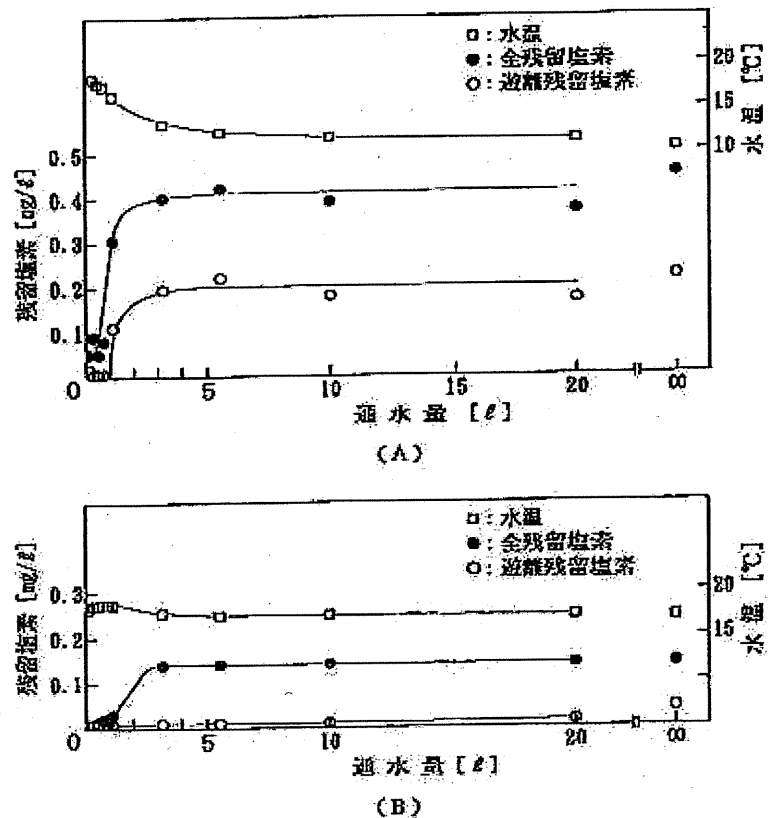


図1 残留塩素と水温の変動

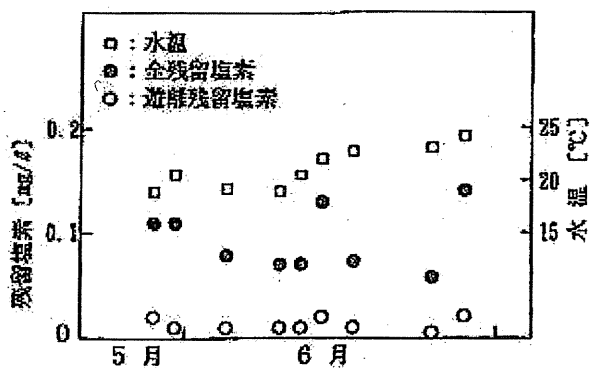


図2 5月・6月における残留塩素と水温

表1 残留塩素と水温

年	月	残留塩素[mg/l]		水温[°C]
		遊離	全	
1996	7	0.00	0.03	28.2
1997	1	0.22	0.54	10.4
	4	0.03	0.14	17.0
	5	0.01	0.11	20.0
	6	0.01	0.10	23.7
	7	0.00	0.04	26.5

に低い値となっており一年のうちかなりの期間において下限値をかなり下回っているという結果であった。同じ新宿区内の都庁付近の平成9年5月採水の水質検査結果では残留塩素が0.6mg/l⁷⁾であり、本学にも同レベルの水が配水されているはずであるが、給水栓からの水には大きな差異が生じている。安全性確保のためには供給水の遊離残留塩素濃度が0.2mg/l以下の状態が発生することは好ましくない⁸⁾ということなので、今回の一連の残留塩素の測定値からいえば安心できない状況にあるようである。もちろん遊離残留塩素ゼロイコール細菌が増殖していると短絡的解釈は無謀であるが、増殖している可能性を否定できないことも確かなことである。当然のことながら、水道は施行規則の下限値より高濃度の塩素を含む水が受水槽に入ってくるわけだから、受水槽や高置水槽に貯留中に塩素が消費あるいは抜けてしまったということになる。消費は主に鉄サビや水アカによるが、一般的に言って管の内部や管と管との接合部に鉄サビが発生していることは確かなこと

である。揚水ポンプの水あげ口が底の方にありポンプ自体もさびていたり、鉄板製の高置水槽にサビが生じていることも否定できないところである。また、受水槽や高置水槽に水アカがたまっている可能性も否定できない。貯留中の塩素抜けもかなりの量に上るとみられる。特に高置水槽では高置水槽の水位が下がるとリレーの働きで揚水ポンプが作動し、受水槽の水が汲み上げられるようになっているが、水の使用量が少ない日が続けば受水槽からの水の流入はなく、気温の影響を直ちに受ける鉄板製の水槽に長い間同じ水が滞留しているわけである。受水槽も同様で、受水槽の容量に対して使用量が少なければ水が循環しきらずに滞留して塩素抜けが生じることになり、塩素を多く含んだ新しい水の流入も少なく、残留塩素濃度が低いままという結果になる。以上のことが複合的に作用して低残留塩素状態を生じていると考えられる。

結言

水道水中の遊離残留塩素と全残留塩素および水温の測定を行い、以下のことを明らかにした。

- 1) 残留塩素濃度は通水開始後約1ℓまでは低く、以降急激に変化し、3ℓ位通水すると長時間通水した後の濃度レベルに近くなる。
- 2) 残留塩素の水道施行規則の規定値を満たしたのは、冬季の測定の時のみで、春季の4月下旬では既に下限値の三分の一程度まで低くなっていた。一年のかなりの期間、残留塩素濃度は規定値よりはるかに低かった。

引用文献

- 1) 厚生省：おいしい水研究会報告(1985)
- 2) 厚生省令第69号：水質基準に関する省令(1992)
- 3) 日本水質研究会：いま、水が危ない、土曜美術社(1991)
- 4) 中西準子：塩素処理で生成する第二の発ガン物質—水道水中のクロロ酢酸—、水情報 vol.9 No.10(1989)
- 5) 厚生省生活衛生局水道環境部調べ

- 6) 露木敏勝：水道水中の鉄分について，東京女子医科大学看護短期大学研究紀要，17，pp89-92 (1995)
- 7) 東京都水道局：水道ニュース№380 (1997)
- 8) 佐藤・高間：水道工学概論、コロナ社 (1977)
- 9) 柏谷光昭：化学で探る飲料水の世界、化学工業日報社 (1993)

On the Variation of Residual Chlorine in Water

Toshikatsu TSUYUKI

An experimental study was made of variation of residual chlorine in water at T. W. M. C. School of Nursing from July, 1996 to July, 1997. Free and total residual chlorine were determined by means of chlorine colorimeter using DPD method.

The results were as follows:

- 1) Both the residual chlorine were low concentration till outflow of about one liter water, then varied greatly. After water had been flowed about three liter, the concentration of residual chlorine were nearly equal to that of water in the tank on roof of the schoolbuilding.
- 2) In January, the concentration of residual chlorine were higher than Regulations for the Enforcement of the Law of Water. In April, the residual chlorine were about a third of minimum value of the Regulations. On and after the latter part of May, free were below 0.01mg/ℓ and total were below 0.11mg/ℓ. Therefore both the residual chlorine are much lower than the Regulations for the major part of a year.



Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? ☆

Martin J. Allen^{a,*}, Stephen C. Edberg^b, Donald J. Reasoner^c

^a *Awwa Research Foundation, 6666 W. Quincy Avenue, Denver, CO 80235, USA*

^b *Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA*

^c *U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA*

Presented at the NSF International/World Health Organization symposium on HPC Bacteria in Drinking Water, April 22–24, 2002, Geneva, Switzerland.

Abstract

While the literature documents the universal occurrence of heterotrophic plate count (HPC) bacteria in soils, foods, air, and all sources of water, there is a lingering question as to whether this group of organisms may signal an increased health risk when elevated populations are present in drinking water. This paper reviews the relevant literature on HPC bacteria in drinking water, the lack of clinical evidence that elevated populations or specific genera within the HPC flora pose an increased health risk to any segment of the population, and the appropriate uses of HPC data as a tool to monitor drinking water quality changes following treatment. It finds no evidence to support health-based regulations of HPC concentrations.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: HPC; Drinking water; Heterotrophic bacteria

1. Introduction

1.1. Terminology

The term “heterotrophic bacteria” includes all bacteria that use organic nutrients for growth. These bacteria are universally present in all types of water, food, soil, vegetation, and air. Under this broad definition, primary and secondary bacterial pathogens are included, as are coliforms (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*).

Heterotrophic plate count (HPC) bacteria represent those microbes isolated by a particular method, whose variables include media composition, time of incubation, temperature of incubation, and means of medium inoculation.

Other terms that have been used to describe this group of bacteria in water include “standard plate count”, “total viable count”, “total count”, “plate count”, “total bacterial count”, “water plate count”, “colony count”, “aerobic mesophilic viable count”, and “autochthonous flora”. All of these terms describe the same general bacterial group, i.e., the population of bacterial colonies produced on an agar-based medium under defined incubation temperature and time. With the 16th edition of *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, “Heterotrophic Plate

☆ The views expressed are those of the authors and do not necessarily reflect those of the Awwa Research Foundation or the U.S. Environmental Protection Agency.

* Corresponding author.

Count” was the term selected to designate this group of bacteria in water.

It is important to understand that while the term “heterotrophic bacteria” denotes all bacteria requiring organic nutrients for growth, all HPC methods enumerate only a fraction or subpopulation of heterotrophic bacteria in any water, food, soil, vegetation, air, etc. Further, it is not possible to know which percentage of the subpopulation of heterotrophic bacteria is enumerated by any HPC method, and it is not possible to differentiate which of the subpopulation includes potential pathogens.

1.2. HPC media and methods

Through the years, many “standard methods” have been used to enumerate the very broad range of genera that comprise HPC populations in drinking water. Examples of such methods and their respective developmental histories are described in “Monitoring Heterotrophic Bacteria in Potable Water” (Reasoner, 1990).

Based on decades of research with a variety of HPC media and methods, the following observations have been made:

1. Although often referred to as non-selective media, all media used for HPC determinations, along with respective time and temperature conditions, are “selective” for those bacteria that can grow under those specific conditions.
2. There is no single medium or method that will recover or enumerate all bacteria in the water being analyzed.
3. Many heterotrophic bacteria that are present in water are not culturable at present.
4. The choice of culture medium, temperature, and incubation time are important with regard to HPC results from a given water sample.
 - Both high-nutrient and low-nutrient media are used for HPC determinations.
 - High-nutrient media are better for enumeration of bacteria from animals and humans.
 - Low-nutrient media are better for enumeration of water-based bacteria (autochthonous) found in aquatic systems, including drinking water. The most commonly employed heterotrophic medium is R2A. It was designed specifically as a

low-nutrient, low-ionic strength formulation to isolate bacteria that have a water-based, rather than mammalian lifestyle (Reasoner, 1990).

- New methods that employ fluorescent substrates have been developed (Jackson et al., 2000). Fluorescence permits more rapid results and has the potential for automation.
5. Time and temperature of incubation are very significant variables. Table 1 presents examples of variable differences on the resulting cfu/ml (Reasoner, 1990).
 - High-temperature incubation (35–37 °C) and short incubation time (34–48 h) favor the growth of bacteria from animals and humans.
 - Low-temperature incubation (20–28 °C) and longer incubation time (5–7 days) favor the growth of water-based bacteria.
 6. All bacterial pathogens and opportunistic pathogens are heterotrophic bacteria, some of which can grow on media used for determining standard plate counts or heterotrophic plate counts in drinking water. However, it is necessary to use selective or

Table 1

Comparison of HPC results using different media (adapted from Reasoner, 1990)

Temperature (°C)	Method (cfu/ml)		
	PP	SP	MP
35	3137 (SPC)	–	4273 (m-HPC)
20	170 (SPC)	440 (R2A)	510 (m-HPC)
20	–	4000 (R2A)	12 (m-HPC)
	–	1000 (R2A)	110 (m-HPC)
35	–	20 (R2A)	6 (m-HPC)
	–	4 (R2A)	<1 (m-HPC)
35	277 (SPC)	–	283 (m-HPC)
20	1123 (NA)	–	1217 (m-HPC)
	1192 (NA)	–	1192 (R2A)
35	22 (SPC)	200 (R2A)	32 (m-HPC)
28	80 (SPC)	360 (R2A)	140 (m-HPC)
20	22 (SPC)	90 (R2A)	47 (m-HPC)
35	53 (SPC)	–	66.7 (m-HPC)
	53 (SPC)	–	57.1 (R2A)
26	590 (SPC)	1550 (R2A)	–
22	100 (YEA)	710 (YEA)	–
	440 (R2A)	–	–
	100 (YEA)	3900 (R2A)	–

cfu, colony-forming units.

Media: SPC=standard plate count agar; NA=nutrient agar; YEA=yeast extract agar; R2A medium; m-HPC medium; m-HPC was published originally as m-SPC medium.

differential media to distinguish pathogens and opportunistic pathogens from non-pathogens.

7. There are differences between pour-plate, spread-plate, and membrane filtration methods.
 - The pour plate method generally yields lower bacterial counts regardless of medium or time of incubation and is generally limited to 0.1 to 1.0 ml sample volume.
 - The spread plate method generally yields higher counts than other methods but is limited to a 0.1 to 1.0 ml sample volume.
 - The membrane filtration method is more flexible because it allows for the analysis of sample volumes greater than 1.0 ml.
 - Different methods and media will produce markedly different HPC concentrations (see Table 1).

2. Heterotrophic bacteria genera

As described above, the genera enumerated by any HPC method are highly variable since the cultivation medium of choice, incubation temperature, incubation time, origin (river, surface water reservoir, treated and disinfected drinking water, etc.), season of the year, and age of the water sample have a significant effect on which genera will grow under these selected conditions. This same variability applies to the analysis of food, dairy, and other environmental determinations.

As mentioned above, the bacteria that fit the scientific definition of heterotrophic bacteria (use of organic nutrients as the energy source) include *Mycobacterium avian* complex and *Legionella* and may not grow on HPC media. Accordingly, if one wishes to determine if these genera are present in drinking water, specific methods tailored to their specific growth requirements must be employed.

2.1. HPC genera found in drinking water

There is a significant body of information in the literature on genera that comprise HPC populations enumerated in drinking water using different methods. Table 2 includes genera often reported in the literature (LeChavallier et al., 1980; Herson and Victoreen, 1980; Briganti and Wacker, 1995).

Table 2
HPC genera commonly found in drinking water

<i>Acinetobacter</i>	<i>Methylomonas</i>
<i>Actinomycetes</i> ^a	<i>Micrococcus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Mycobacterium</i> ^a
<i>Aeromonas</i> ^a	<i>Moraxella</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i> ^a	<i>Nitrobacter</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Nitrosomonas</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Nocardia</i> ^a
<i>Beggiatoa</i>	<i>Proteus</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>P. cepacia</i>
<i>Crenothrix</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>Desulfovibrio</i>	<i>P. maltophilia</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Gallionella</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	

In addition to the above genera, HPC populations from drinking water include many pigmented (orange, yellow, pink) organisms that are difficult to speciate.

^a Generally not recovered by HPC methods as referenced in *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition.

2.2. HPC genera found in food

All of the HPC genera found in drinking water are also common in foods, and humans ingest large numbers of these microorganisms daily. While the upper range of HPC populations in drinking water average 5000–10,000 cfu/ml (Reasoner, 1990), HPC populations in food are consistently log concentrations higher (Wadhwa et al., in press). This difference is because food provides distinctly different physical and physiological conditions than drinking water. With higher concentrations of carbohydrates, protein, and ionic strength, food is much closer to the human physiological state than drinking water, which is essentially devoid of nutrients and ionic strength. Accordingly, microbes that can multiply in humans and cause disease can grow in foods but do not multiply in drinking water. Virtually all foods contain many thousands times more bacteria than drinking water. Table 3 provides examples of microbial genera and densities found in foods.

Wadhwa et al. (in press) concluded, based on both observed microbial content and the potential presence

Table 3
Examples of microbial indicators and densities found in food
(Wadhwa, 2002)

Indicator/genus	Food	Density (cfu/g)
Acrobic plate count	ground beef	8×10^3
Acrobic mesophillic bacteria	retail white cabbage	10^6
	retail lettuce	10^6
	retail cucumber	10^5
	retail green pepper	10^4
<i>Aeromonas</i> spp.	green leaf lettuce	7.3×10^3
	spinach	5.1×10^3
Acrobic plate count	packaged carrot sticks	10^6

of large numbers of pathogens or their indicators in food, that food is more of a health risk than drinking water. They also stated that naturally occurring bacteria (HPC or autochthonous flora) do not have virulence factors, making their numbers in drinking water irrelevant to health risk except in the most severely immunocompromised subpopulations, who are fully aware of their medical condition and need to exercise appropriate dietary and other preventive measures. (Edberg, 1997).

3. Association of health risk and HPC bacteria

As noted earlier, the broad definition of HPC bacteria includes a wide range of bacterial genera, which may include primary and secondary pathogens. Specific HPC genera that some consider as opportunistic pathogens enumerated by HPC methods include *Aeromonas*, *Klebsiella*, and *Pseudomonas*. Because of this fact, regulatory health agencies and some microbiologists suggested that HPC bacteria be considered a health-based drinking water parameter. In 1984, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Drinking Water, drafted the document "Drinking Water Criteria Document on Heterotrophic Bacteria" (unpublished). EPA did not move forward on promulgating an HPC-based regulation because there was insufficient clinical evidence that the addition of a maximum limit on HPC populations would provide a higher level of public health protection than that afforded by existing regulations (Reasoner, personal communication).

The U.S. Food and Drug Administration (FDA) examined the possible health effects of HPC concentrations in regards to bottled water. The FDA first

examined the role of HPC human disease in 1973 and failed to issue a regulation. In 1993, the FDA reviewed the subject again in detail and wrote: "FDA still believes that, when bottled waters are free of microorganisms that are of public health significance (i.e., indicated by the absence of coliforms) and are bottled under sanitary conditions in compliance with good manufacturing practices (CGMP) regulations, the presence of heterotrophic bacteria that are part of the flora in those bottled waters normally will not pose a health risk because these organisms do not colonize the digestive tract of humans" (Federal Register, 1993).

The question remains, since the 1984 EPA draft document, whether there is more recent and compelling clinically based information to consider HPC bacteria as an indicator of increased health risk. Several epidemiological studies (Calderon, 1988, 1991; Payment et al., 1991) examined the concentration of HPC bacteria in drinking water and possible health effects. In a point-of-use study (Calderon and Mood, 1988) and a point-of-entry study (Calderon and Mood, 1991), no association between adverse health and HPC was noted. Payment et al. (1991) found that there was an association between HPC and gastroenteritis but not between the amount of drinking water and disease. Colford (2002) suggests that this anomaly may have been the result of the lack of double blinding (i.e., each consumer knew which group they were a member of—drinking water treated or not treated) of the study. A more recent Australian epidemiological study (Hellard et al., 2001) found no clinical correlation with elevated HPC populations in drinking water, but earlier studies yielded equivocal results.

3.1. Cytotoxicity and invasiveness of HPC bacteria

For a heterotrophic bacterium to pose a health risk when consumed in drinking water, it must be present at an infectious dose (i.e., sufficient concentrations) and be capable of infecting a human host. The capability of a microorganism to cause disease is often referred to as virulence. Frank or primary pathogens possess a wide range of virulence factors, which enable them to circumvent human defense mechanisms (Duncan and Edberg, 1995). Because epidemiological and animal infectivity studies are complex, difficult to control, expensive, and yield

circumstantial evidence, Edberg et al. (1997) directly examined HPC bacteria with regard to cytotoxicity and invasiveness factors that directly relate to the probability of a microorganism successfully causing disease.

HPC bacteria in tap water and bottled water were enumerated using R2A medium. R2A isolates were subsequently inoculated onto 5% sheep blood agar, since it is physiologically equivalent to the human condition and HPC bacteria capable of causing infection (possessing virulence factors) should grow on blood agar. Those R2A isolates that did grow on blood agar were inoculated into the human colonic adenocarcinoma cell line (CACO-2_{BBc} (C2_{BBc})) to determine their invasiveness. With respect to cytotoxicity, the cfu/ml counts on blood agar were between 10^{-2} and 10^{-3} less on blood agar than found on R2A agar. Of the 85 R2A isolates that grew on blood agar, only 10 demonstrated invasiveness. The bacteria isolated in this study did not possess significant virulence characteristics associated with a human health threat.

Other investigators (Lye and Dufour, 1991; Payment et al., 1994; Edberg, 1996; Edberg et al., 1996) reported similar results, i.e., few virulence factors such as α , β , γ hemolysis, adherence, and invasiveness. Smith et al. (2001) examined the ability of HPC to express virulence in highly immunosuppressed mice and found these factors lacking.

3.2. Opportunistic pathogens

Certain heterotrophic bacteria are considered opportunistic pathogens, i.e., capable of causing disease only in compromised human hosts. Several of these microorganisms can be found in source waters and in treated drinking water and can be enumerated on HPC media. Microorganisms most often called opportunistic pathogens in drinking water include *Pseudomonas*, *Klebsiella*, and *Aeromonas*. It is important to understand that the basis for these genera being opportunistic pathogens is associated entirely with nosocomial (hospital-acquired) infections, not ingestion from consumption of drinking water. In hospitals, the route of transmission is not drinking water but medical devices. Duncan (1988) provides an excellent review of this difference and can be used as a model for other potential opportunistic pathogens that may be found in drinking water.

The determination that a specific microorganism is truly an opportunistic pathogen associated with drinking water and the decision by public health agencies to regulate specific microorganisms that may be found in drinking water can only be made if specific criteria indicate that a microorganism poses a health risk.

These criteria include the following:

1. There is a clinical history of an organism causing disease from ingestion of drinking water.
2. There is epidemiological evidence that drinking water, rather than food or other vectors, is a major source of disease.
3. There is sufficient evidence that the target organism, i.e., opportunistic pathogen, is found in water in sufficient concentrations and possesses virulence factors capable of causing disease in humans.
4. There is sufficient evidence that the target organism is not readily removed or inactivated by conventional water treatment processes (coagulation–filtration–disinfection).
5. There is sufficient evidence that the target organism, if surviving conventional treatment, will be viable, virulent, and present in sufficient numbers to cause disease.
6. There are robust analytical methods for the target organism, which have acceptable sensitivity, specificity, and reproducibility to accurately measure the presence of the target organism in treated drinking water.
7. The performance criteria of analytical method(s) for the target organism have been certified by the public health agency, and there is intra-laboratory performance on which to base this certification.
8. There is sufficient evidence that the target organism is present in high concentrations in these same waters.

On the basis of these criteria, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas* should not be considered opportunistic pathogens in drinking water.

3.2.1. *Klebsiella*

While the genus *Klebsiella* is enumerated by HPC methods and is a coliform, it does not fulfill the criteria noted above and should not be considered an opportunistic pathogen from drinking wa-

ter. In a review of waterborne *Klebsiella* and human disease (Duncan, 1988), the author stated the following:

Klebsiella occurs widely in nature and is often present in surface water used for human consumption or for recreational purposes. The organism can survive in water distribution systems despite chlorination. Many strains give rise to positive fecal coliform tests, even when they are the only organisms present in the water sample. The public health significance of *Klebsiella* in water is therefore an important concern. In the past, *Klebsiella* was thought to be a significant pathogen in the community causing serious primary pneumonia, but such cases are now extremely rare. Serious *Klebsiella* infections are today commonly seen only in hospital patients whose resistance has been impaired by their primary disease condition. There is no evidence that waterborne *Klebsiella* play any significant part in the epidemiology of these hospital-acquired infections. *Klebsiella* in water supplies should therefore not be considered a hazard to human health.

Duncan's analysis of *Klebsiella* applies to other potential opportunistic drinking water pathogens.

3.2.2. *Pseudomonas*

The genus *Pseudomonas* is also routinely enumerated in HPC determinations and considered by some to be an opportunistic pathogen when found in drinking water. In a 1997 review, "*Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of Risk from Drinking Water" (Hardalo and Edberg, 1997) analyzed all reports of this bacterium as a gastrointestinal pathogen and concluded:

Pseudomonas aeruginosa is an ubiquitous environmental bacterium. It can be recovered, often in high numbers, in common food, especially vegetables. Moreover, it can be recovered in low numbers in drinking water. A small percentage of clones of *P. aeruginosa* possess the required number of virulence factors to cause infection. However, *P. aeruginosa* will not proliferate on normal tissue but requires previously damaged organs. Further narrowing the risk to human health

is that only certain specific hosts are at risk, including patients with profound neutropenia, cystic fibrosis, severe burns, and those subject to foreign device installation. Other than these very well defined groups, the general population is refractory to infection. Because of its ubiquitous nature, it is not practical to eliminate *P. aeruginosa* from our food and drinking water, but attempts to do so would produce disinfection byproducts more hazardous than the species itself. Moreover, because there is no readily available sensitive and specific means to detect and identify *P. aeruginosa* available in the field, any potential regulation governing its control would not have a defined laboratory test measure of outcome. Accordingly, attempts to regulate *P. aeruginosa* in drinking water would not yield public health protection benefits and could, in fact, be counterproductive in this regard.

3.2.3. *Aeromonas*

Aeromonas is another genus naturally found in drinking water. It may or may not be isolated on HPC media (Payment et al., 1994) methods and has been suggested as an opportunistic pathogen when present in drinking water. Similar to the above analysis as to why neither *Klebsiella* nor *Pseudomonas* is an opportunistic pathogen when present in drinking water, *Aeromonas* also fails to meet most, if not all, of the above criteria as a gastrointestinal pathogen by ingestion.

In a review paper by Edberg and Allen (in preparation) entitled "Issues for Microbial Regulations: *Aeromonas* as a Model," the authors provide data to make the following observations:

1. A small percentage of *Aeromonas hydrophila* isolates can cause gastroenteritis and enteritis and produce modest, self-limited infection. Although most cases are food-borne, the few waterborne cases were associated with ingestion of untreated drinking water from shallow wells. These waters are also very high in assimilable organic carbon concentrations.
2. The concentration of *A. hydrophila* from food is much higher, by several logs, when compared to water sources. The species *A. hydrophila* is the most important. Only a small percentage of *A.*