

放流水の大腸菌数測定法の比較検討

放流水の大腸菌数測定法の比較検討

論点 大腸菌数の測定法について

- 大腸菌数の測定法については複数の測定法が挙げられ、測定法によって検出下限値や操作方法、必要器材等も異なるため、放流水中の大腸菌数を測定するために適した方法を選定する必要がある。
 - ⇒ 全国下水処理場の大腸菌数実態調査時に実施した同一試料を複数の測定法で測定したデータを収集し、測定法による測定値のばらつきの傾向を整理した。

大腸菌数の測定法

■放流水の大腸菌数を測定する方法について、下水試験方法を参考に以下の3手法(平板培養法、メンブランフィルター法、最確数法)について、比較検討を行った。

大腸菌測定法;下水試験方法(下巻)第4章第2節 特定酵素基質培地法

方法	特徴	原理
平板培養法 (混釈平板法)	シャーレに一定量の検体(通常1mL)を入れ、これに約50℃で保温した培地を加え、シャーレを揺り動かして検体と培地を混和してから静置、培地を凝固させる。	大腸菌が特異的に保有・産生する酵素β-グルクロニダーゼが酵素基質X-GLUCに反応(分解)することで大腸菌が青色コロニーを形成する。
メンブラン フィルター法	試料をメンブランフィルター(MF)でろ過して細菌を補足した後、MFを培地の上にのせて培養する。懸濁物が少なく、夾雑物が少ない試料に適している。 ※疎水性格子付メンブランフィルター(HGMF)の使用については、ここでは推奨しない※。	
最確数法	特定酵素基質培地利用による最確数法は、大腸菌群以外の雑菌が多く、かつふん便汚染の少ない試料の検査に適する方法である。 <u>試験管法</u> :試料の同一希釈度のものを数本ずつ試験し、陽性となった本数により算出された最確数(MPN)から大腸菌数を求める方法である。	大腸菌が特異的に保有・産生する酵素β-グルクロニダーゼにより、合成蛍光酵素基質(MUG)が特異的に分解され、蛍光色素(4-メチルウンベリフェロン)が遊離し、紫外線照射下で淡青色～青紫色の蛍光を発する。

※ 「疎水性格子付メンブランフィルター法に関する注意喚起(H26.5.23 国土交通省 事務連絡)」

大腸菌数の測定法

■ 平板培養法(混釈平板法)の概要

<試料の希釈>

大腸菌群数が試料1mL当り300個以上あると思われる場合は、10倍希釈法により、希釈試料中の菌数がおおよそ30～200CFU/mL程度となるまで希釈操作を繰り返す。

①メスピペットを用いて試料1mLをシャーレ中央部に採取する。

②所定の温度に保温した液体状態の寒天培地を15mL程度注ぎ、直ちにフタをする。

③平らな板の上でシャーレを円をかくように動かして試料と培地を混合する。

④そのまま静置して培地を固化させる。

⑤培地が固まったら、インキュベーターにシャーレのふたの部分が下になるように倒置して培養する。

⑥培地の取扱い説明書に記載された温度、時間で培養し、形成されたコロニーを計数する。



写真-1 大腸菌群と大腸菌
(特定酵素基質寒天培地法)

青色コロニー:大腸菌

青色+赤色コロニー:大腸菌群

大腸菌数の測定法

■ メンブランフィルター(MF)法の概要

試料をメンブランフィルター(MF)によってろ過して、細菌を補足した後、メンブランフィルターを固化した寒天培地上にのせて培養する。**懸濁物が少なく、かつ、きょう雑菌の少ない試料に適した方法である。**

①吸引ろ過する試料は30mL以上とし、フィルター上のコロニーが50個以上になる場合にはあらかじめ試料を希釈する。(MF-エンドウ培地法による大腸菌群の記述)

②1試料あるいは1希釈試料あたり、メンブランフィルターを2枚以上を利用して計数する。

③ファンネル中に試料を中に注入して吸引ろ過を行った後、滅菌りん酸塩希釈水を20～30mLずつ注ぎ、吸引ろ過してファンネル内を数回洗浄する。

④ろ過したメンブランフィルターをホルダーからはずし、シャーレに固化させた特定酵素基質寒天培地上にのせてから、シャーレのふたをする。

⑤インキュベーターにシャーレのふたの部分が下になるように倒置して培養する。

⑥培地の取扱い説明書に記載された温度、時間で培養し、形成されたコロニーを計数する。

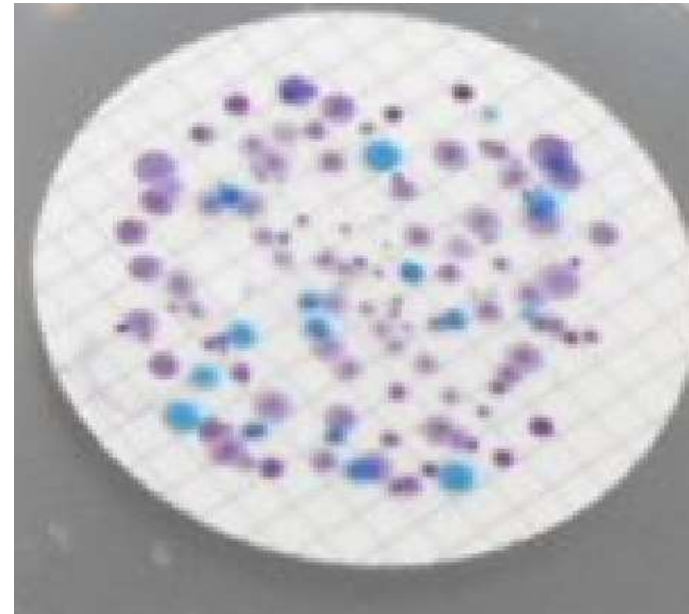


写真-2 大腸菌群と大腸菌
(メンブランフィルターによる
特定酵素基質寒天培地法)

青色コロニー:大腸菌

青色+赤色コロニー:大腸菌群

大腸菌数の測定法

■ 最確数法(MPN法)の概要

◆特定酵素基質培地利用による最確数法は、大腸菌群以外の雑菌が多く、かつふん便汚染の少ない試料の検査に適する方法である。

＜5本法＞試料の同一希釈度のものを数本ずつ試験し、陽性となった本数により算出された最確数(MPN)から大腸菌数を計数する方法である。

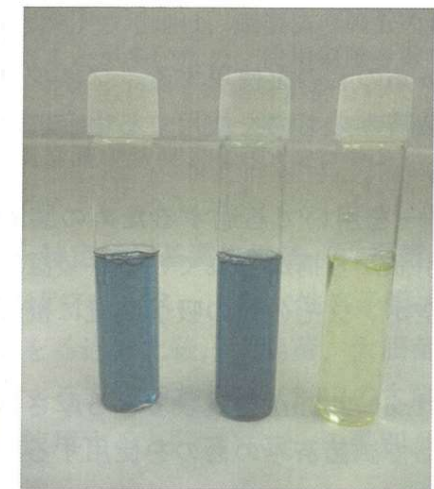
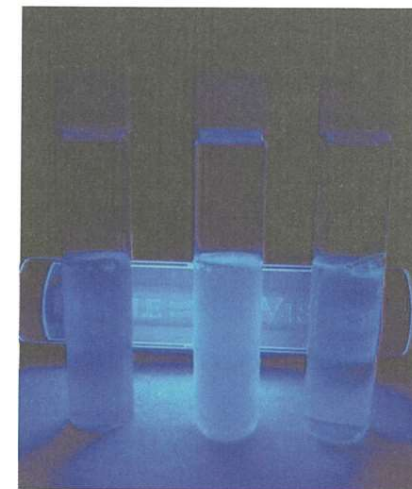
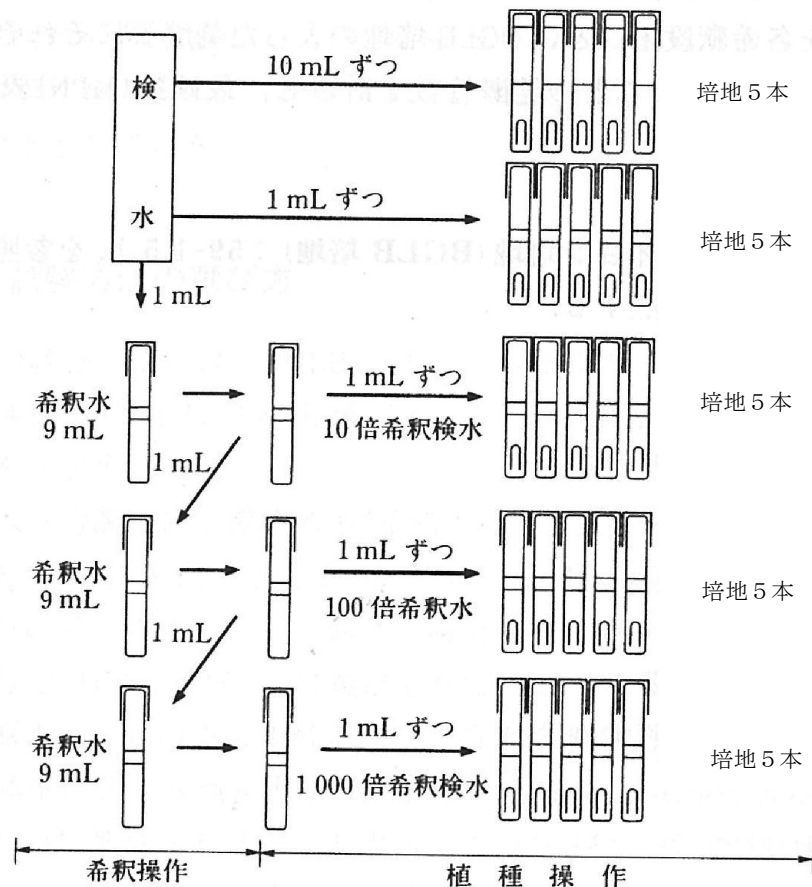


写真-3 大腸菌群と大腸菌

左: 蛍光: 大腸菌 右: 青緑色: 大腸菌群

図-1 希釈及び接種操作＜参考;河川水質試験方法(案)＞

大腸菌数の測定法

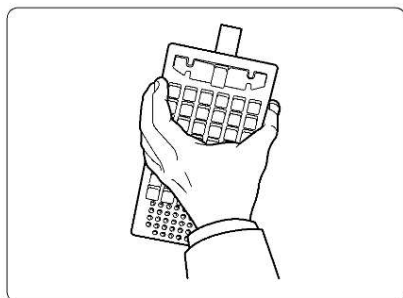
■ 最確数法(MPN法)の概要

◆特定酵素基質培地利用による最確数法は、大腸菌群以外の雑菌が多く、かつふん便汚染の少ない試料の検査に適する方法である。

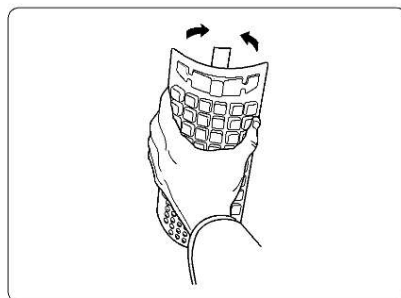
【参考】<QTトレイ>近年 普及しているアイデックス社独自のシステムであり、コリラート培地(商品名)を添加した試料をQTトレイ(大49個、小48個のウェルがついている)に試料を封入して培養する。

操作手順

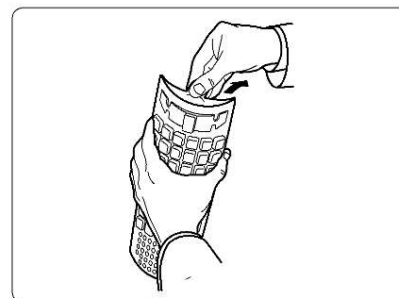
1. ウェル側を手のひらに向けて、トレイを垂直に持ってください。



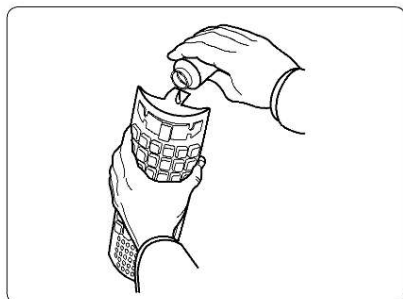
2. トレイが手のひらに向かって曲がるように、トレイの上部を強く握ってください。



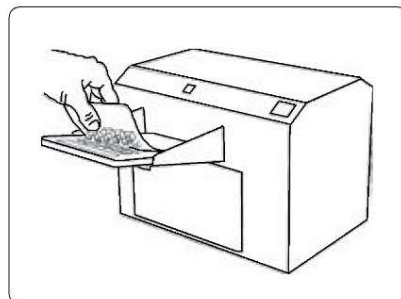
3. トレイのつまみをウェル側から引き離して、注入口を広げて下さい。トレイのつまみまたはトレイの内部に触れないようにしてください。



4. トレイのつまみにかからないように直接、Colilertと検体の混合液を注いでください。小さいウェルを2～3回軽くたたき、気泡を抜いてください。



5. 検体の入ったトレイをシーラーのゴム製シートの上に、ウェル側を下に向けてセットしてください。



6. シーラーの取扱説明書に従って、密封してください。

7. Colilertの取扱説明書に従って、培養してください。

8. 大小の陽性ウェル数を数え、添付の最確数(MPN)表を使用してMPNを求めてください。†

9. 検体及びトレイの廃棄は高圧滅菌してください。



写真-4 大腸菌群と大腸菌
(QTトレイによる最確数法:コリラート)

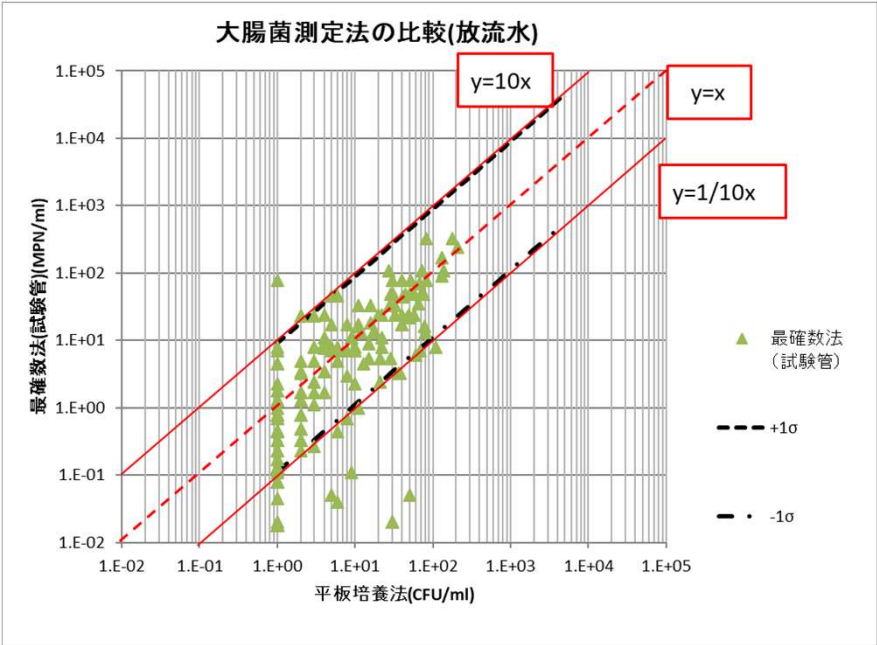
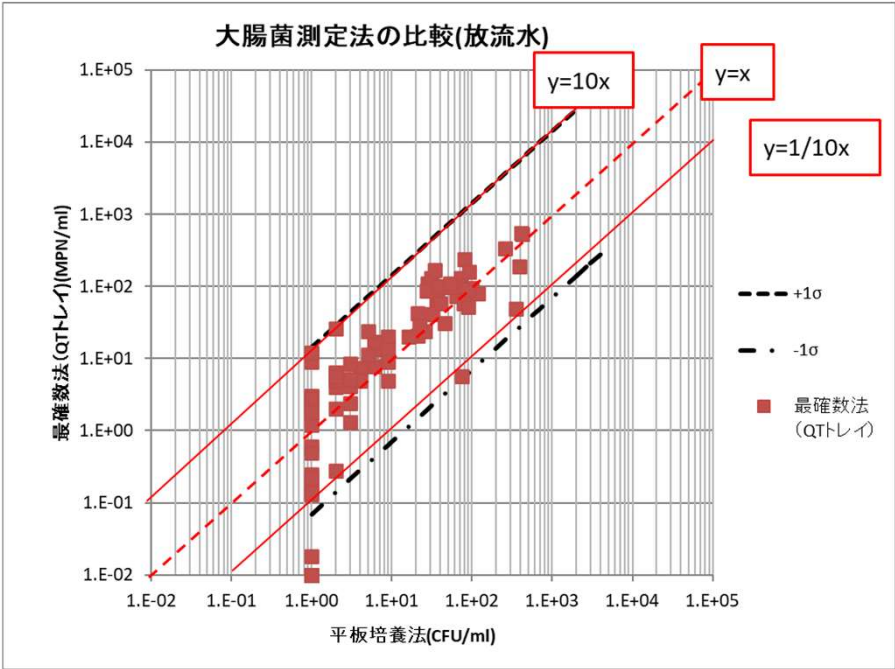
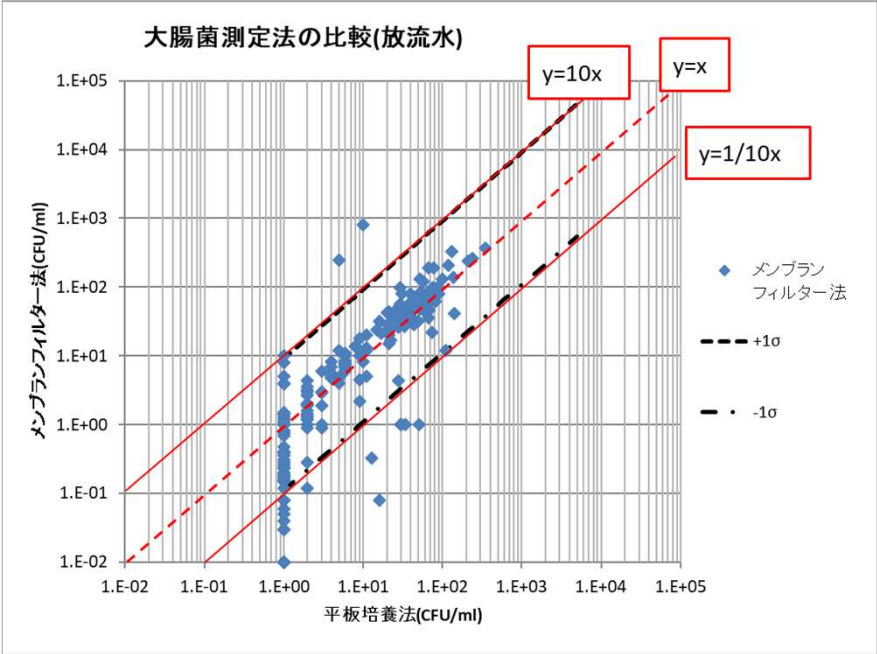
上段: 蛍光: 大腸菌

下段: 黄色: 大腸菌群

放流水の大腸菌数測定法の違いによる結果の比較

■ 平板培養法との測定結果の比較(放流水)

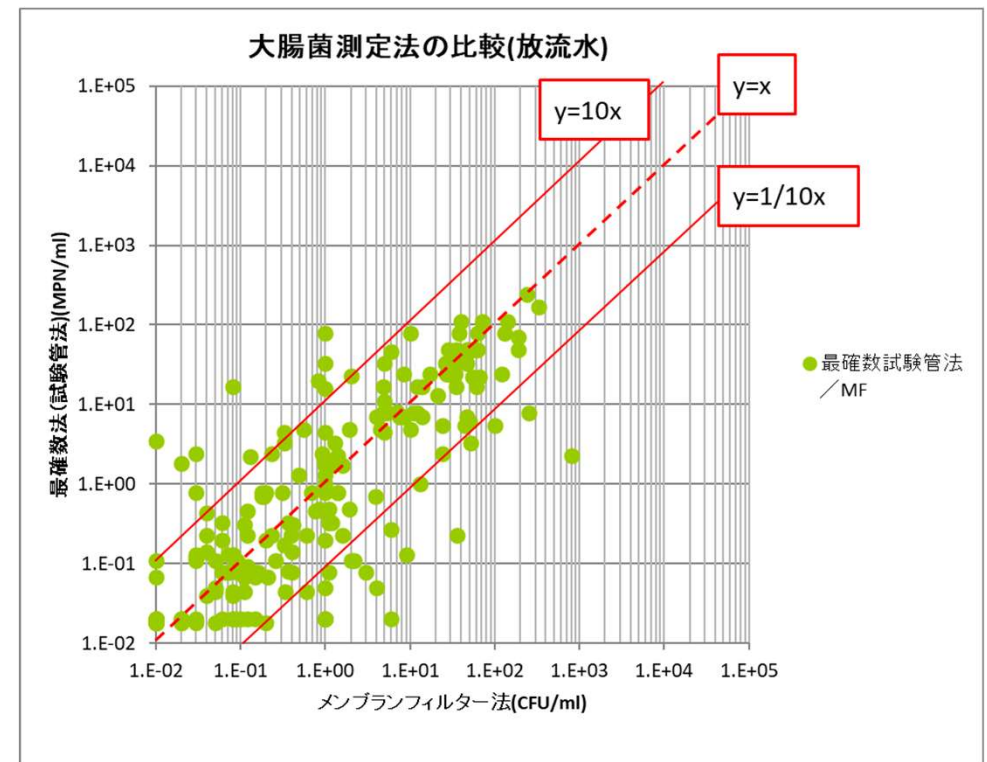
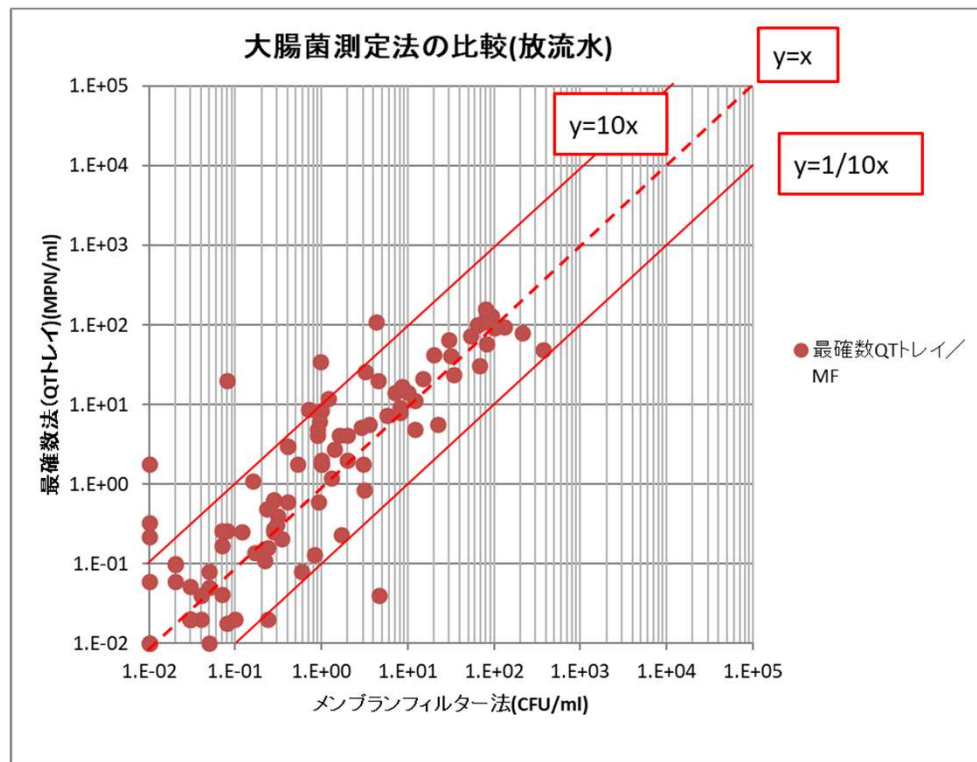
- 検出下限値以上の測定結果について結果を示した。
なお、各方法の検出下限値は原則は以下のとおりとした。
平板培養法:1CFU/mL、MF法:0.01CFU/mL
最確数法;QTトレイ法:0.01MPN/mL、
試験管法:0.018MPN/mL
- 各測定方法を同じ試料及び同じ分析機関で測定したデータのみを抽出して整理した。
- 平板培養法と最確数法(QTトレイ)及び、平板培養法とメンブ
ランフィルター(MF)法については、同程度の測定結果が得られて
いた。
- 平板培養法と最確数法(試験管法)については、ややばらつき
がみられているものの、同程度の結果も多く、大きく外れている
ものは少なかった。



放流水の大腸菌数測定法の違いによる結果の比較

■MF法と最確数の測定結果の比較(放流水)

➤ MF法と最確数法(QTトレイ)の測定結果及び、MF法と最確数法(試験管法)の測定結果をみると、ばらつきがみられているものの大きく外れているものは少なかった。



放流水の大腸菌数測定法の検討結果のまとめ

■結果

- 平板培養法と最確数法(QTトレイ)及び、平板培養法とメンブランフィルター法については、同程度の測定結果が得られていた。
- 平板培養法と最確数法(試験管法)の測定結果については、ややばらつきがみられているものの同程度の結果が多く、大きく外れているものは少なかった。

■まとめ

- 結果より、平板培養法による測定結果は、偏った傾向にあるものは少ない。
- また、現行の基準である大腸菌群数の測定法は、デソキシコール酸塩培地を用いた平板培養法である。
- 大腸菌数については、特定酵素基質寒天培地を用いた平板培養法を採用することができれば、培地の種類を変更することで測定が可能となることから、現場での対応は比較的容易であると考えられた。