

放流水の大腸菌数測定法の比較検討

大腸菌数の測定法

- 委員意見を踏まえ、大腸菌数の測定方法の比較による評価を行った。

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°C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を培地の上ののせて培養する。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。 試験管法;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の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。

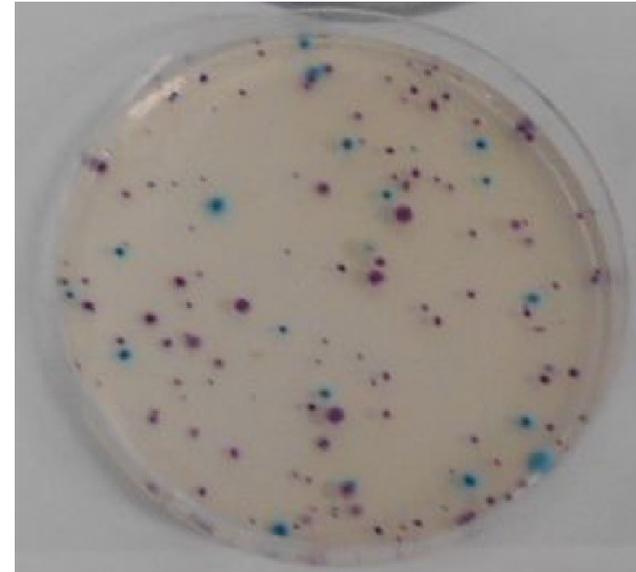


写真-1 大腸菌群と大腸菌
(特定酵素基質寒天培地法)

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。

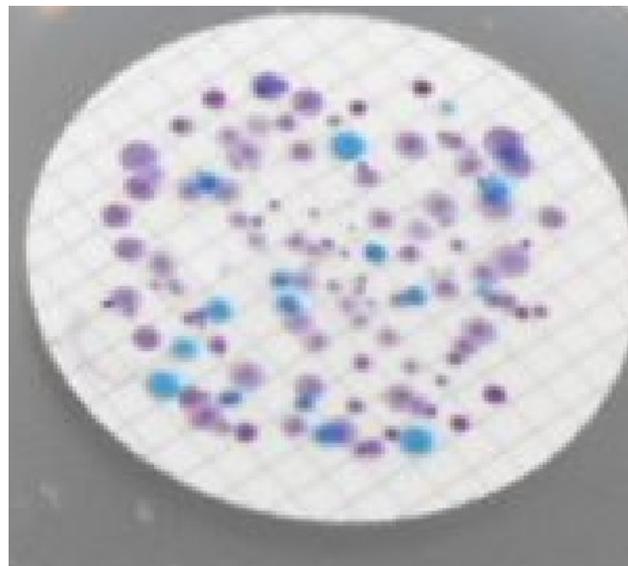


写真-2 大腸菌群と大腸菌
(メンブランフィルターによる
特定酵素基質寒天培地法)

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。

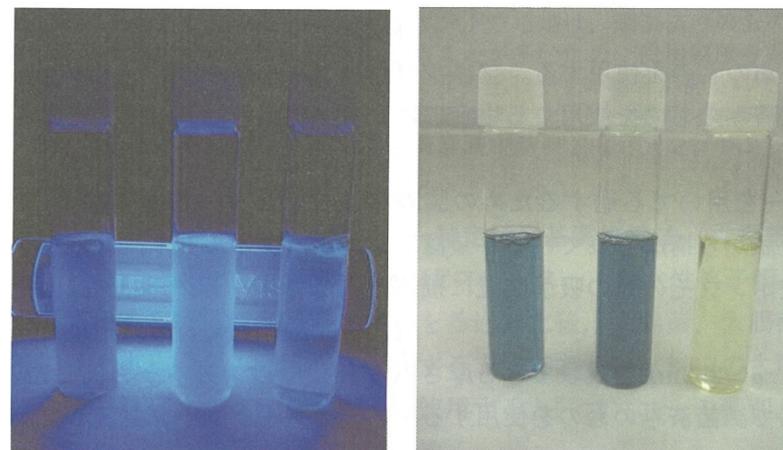
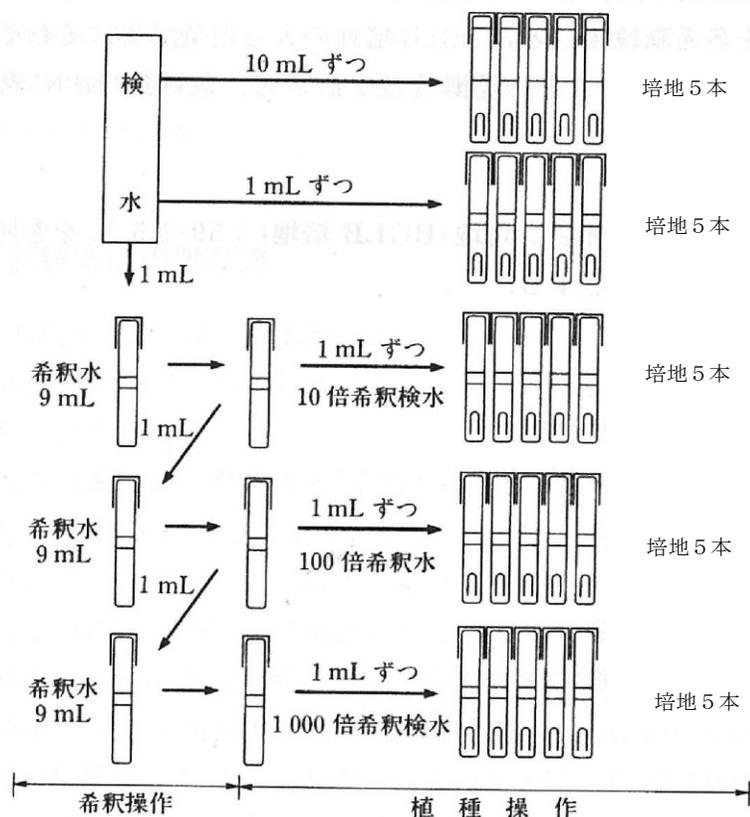


写真-3 大腸菌群と大腸菌

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

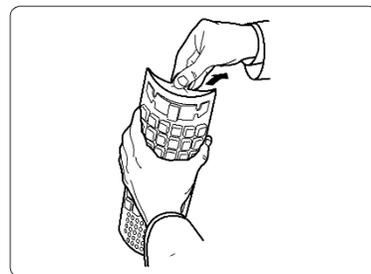
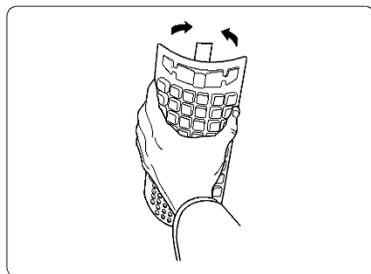
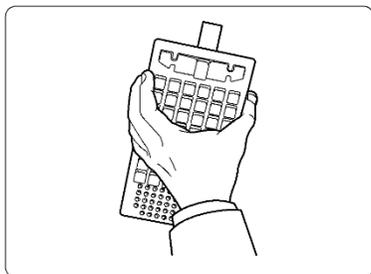
■ 最確数法(MPN法)の概要

◆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. 検体が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。

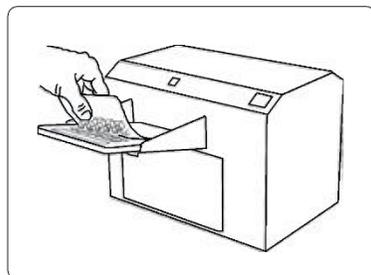
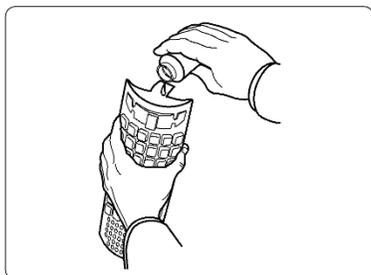


写真-4 大腸菌群と大腸菌
(QTトレイによる最確数法:コリラート)
上段:蛍光:大腸菌
下段:黄色:大腸菌群

■最確数法

- ✓ 特定酵素基質培地は水道水質基準の検査方法として採用されているものの、この培地を用いた最確数法については、海水において擬陽性を生じる事例の報告があり、環境基準の大腸菌数の見直し検討では採用されていない。環境基準では特定酵素基質寒天培地を用いたメンブランフィルター法(MF法)が採用されている。
- ✓ 運転管理上、公共用水域へ放流する放流水の大腸菌数は環境基準と比較できる方が利便性が高いと考えられる。(なお、排水基準を見直す場合の検定方法は環境省において検討されている。)
- ✓ 放流水(消毒後)の大腸菌数が比較的高く検出される場合があり、塩素消毒で損傷している大腸菌も検出できる可能性もあるが、消毒効果を過小評価する可能性も考えられる。
- ✓ 流入水を測定する場合は、希釈倍率を高く設定することになり、最確数法の長所は活かさない。
- ✓ 培養後の判定は色で判断しやすく、判定方法が簡便である。
- ✓ QTトレイという商品を用いると、分析材料費は高価であるが、操作が簡便であり分析操作に必要な人工はMF法より少ないと考えられる。

■ 平板培養法(混釈平板法)とメンブランフィルター法(MF法)

- ✓ 大腸菌数が、30CFU/mL以上の試料であれば特定酵素基質寒天培地種類間、混釈法、MF法で定量値に差異は無く、変動係数も概ね30%以内であった。大腸菌数が10CFU/mL以下の試料は、変動係数が大きくなることが示された。
- ✓ しかしながら、想定される放流水の大腸菌数の基準値を管理するためには、混釈法で十分対応可能である。
- ✓ 混釈法は現行の大腸菌群数のデソ法と培地の種類は異なるものの、同様の培養操作で対応が可能であり、下水処理場としてはなじみのある操作である。
- ✓ MF法では検水量を増加させることによって、フィルター上に残存する夾雑物も増加し、コロニーの色、形状が判定しにくくなる可能性がある。
- ✓ 環境基準の大腸菌数の測定は特定酵素基質寒天培地を用いたMF法が採用されており、混釈法は同様の特定酵素基質寒天培地を用いる方法である。

大腸菌数の測定法の特徴比較

測定法	平板培養法(混釈平板法)	メンブランフィルター法	最確数法
検出下限	1CFU/mL	1CFU/100mL	1MPN/100mL
	・試料1mL中に大腸菌が1CFU以上存在すれば検出できる	・試料中の大腸菌数が少ない場合でも、ろ過する試料量を増やすことで検出が可能になる 1CFU/100mLより少ない場合でも、ろ過量を増やすことで検出できる可能性がある	・試料中の大腸菌数が少ない場合でも、試料100mL中に大腸菌1MPNの検出が可能である
	○	◎	◎
再現性	・測定精度は概ね許容範囲である※1) ・塩素消毒後試料の10CFU/mL以下の試料では変動係数は大幅に上昇する※2)	・測定精度は概ね許容範囲である※1) ・塩素消毒後試料の10CFU/mL以下の試料では変動係数は大幅に上昇する※2)	・大腸菌数の少ない試料についてであるが、変動が大きい場合がある※1) ・塩素消毒後試料の10CFU/mL以下の試料では変動係数は大幅に上昇する また、寒天培地を用いた方法より、比較的高い結果となる事例がみられた※2)
	◎	◎	○

※1)平成29年度 第2回下水道における水系水質リスク検討会 資料4 国土技術政策総合研究所 <過年度に実施した国総研における大腸菌関係調査>

※2)平成29年度 第2回下水道における水系水質リスク検討会 資料5 土木研究所先端材料資源研究センター 説明資料 <特定酵素基質培地法による大腸菌の定量評価>

大腸菌数の測定法の特徴比較

測定法	平板培養法(混釈平板法)	メンブランフィルター法	最確数法
作業時間※1	<ul style="list-style-type: none"> ・現行の大腸菌群数のデソ法と概ね同じ作業である ・メンブランフィルター法と比較して簡便である ・参考作業時間:21分/検体※1 	<ul style="list-style-type: none"> ・平板培養法の作業に、複数段階希釈検水のろ過作業が加わる 参考作業時間:(21分※1+ろ過作業)/検体 	<ul style="list-style-type: none"> ・試験管法を用いた場合は、参考作業時間:38分/検体※2 ・QTTレイを用いた場合は操作は簡便である
	◎	○	試験管:△ (QTTレイ:◎)
主な消耗品等概算費用※3, ※4	<ul style="list-style-type: none"> 希釈段階3段階想定 ・約400円/検体※3 (培地:約254円) シャーレ(6枚):約144円) 	<ul style="list-style-type: none"> 希釈段階3段階想定 ・約1,010円/検体※3 (培地:約254円) シャーレ(6枚):約144円) MF(6枚):約612円) 	<ul style="list-style-type: none"> ・希釈段階5段階5本法培地入り試験管25本:約4,270円/検体※3 ・QTTレイ(2枚):希釈段階2段階想定約2,720円/検体※3
	(文献事例)	(文献事例)	(文献事例)
	・概算費用:60~190円※4	・概算費用:230~300円※4	・概算費用:1,200~4,900円※4
◎	○	△	

※1)出典)平成25年度環境計測工程資料(一般社団法人日本環境測定分析協会),大腸菌群数<厚生省、建設省令第1号(昭和37年)別表第1 計数法>

※2)出典)平成25年度環境計測工程資料(一般社団法人日本環境測定分析協会),大腸菌群数<環境庁告示第59号(昭和46年)別表第2 1(1)ア 備考4 最確数法による定量法>

※3)シャーレ、培地等は2~5社のカタログ価格等の平均値

※4)宇留賀友輝他,大腸菌数分析方法の比較検討,第58回下水道研究発表会,日本下水道協会

表 大腸菌数測定法の比較

項目	平板培養法(混釈平板法)	メンブランフィルター法	最確数法
検出下限	○	◎	◎
再現性	◎	◎	○
作業時間	◎	○	△~◎
費用	◎	○	△
総合評価	◎	○	△



特定酵素基質寒天培地を用いた平板培養法(混釈平板法)が、下水処理場で比較的導入しやすい測定法と考えられることから、大腸菌数の測定法として採用する方針とする。