

大腸菌測定法の精度検討について

大腸菌測定法の提案（評価方法と評価基準）

下水の大腸菌測定法の提案を目的に、大腸菌の回収率、希釈水の種類や大腸菌濃度の違いが変動係数に及ぼす影響、および室間精度を評価し、公定法として許容値を満たす測定法を提示した。

表1 判定項目と目標値

環境基準の告示検討における判定項目と目標値		評価(判定)方法
真度(回収率)	70～120%	無菌処理水に大腸菌株を添加し、その定量値から回収率を算出
繰返精度	30%以内	3種類の希釈水を用い濃度調整を行った試料の定量値から算出
室間精度	35%以内	3つの分析機関の変動係数から算出

1. 公定法としての判定項目と目標値(許容値)
環境基準の告示検討における判定項目と目標値を参考に、真度(回収率)を70～120%、繰返精度(変動係数: CV)は30%以内、室間精度は35%以内として、以下の評価を実施。

2. 評価方法
- 1) 大腸菌の回収率: 無菌状態とした試料に大腸菌濃度が30CFU/mL程度となるよう菌株(バイオボール)を添加、各培地・手法にて定量し回収率を評価した。
 - 2) 希釈水の違いが変動係数 (CV) に及ぼす影響: 大腸菌濃度が30CFU/mL程度となるよう各希釈水 (生理食塩水、りん酸塩希釈水、滅菌蒸留水) で二次処理水を希釈し、各培地・手法にて定量値を得てCVを求めた。
 - 3) 大腸菌濃度の違いがCVに及ぼす影響: 二次処理水に次亜塩素酸ナトリウムを添加し大腸菌濃度を低濃度(約1～30CFU/mL)とした条件下において、各培地・手法にて定量値を得てCVを求めた。
 - 4) 室間精度の評価: 二次処理水、放流水のCVを5枚のシャーレ(n=5)の測定結果(混釈法のみ)より確認し、その結果を基に、3分析機関の分析室間での測定結果を比較することで室間精度を確認。

3. 評価結果

1)大腸菌の回収率

各種培地・手法による大腸菌の回収率は培地・手法が異なっても概ね**90%**で推移(図1)しており、許容値を満足した。

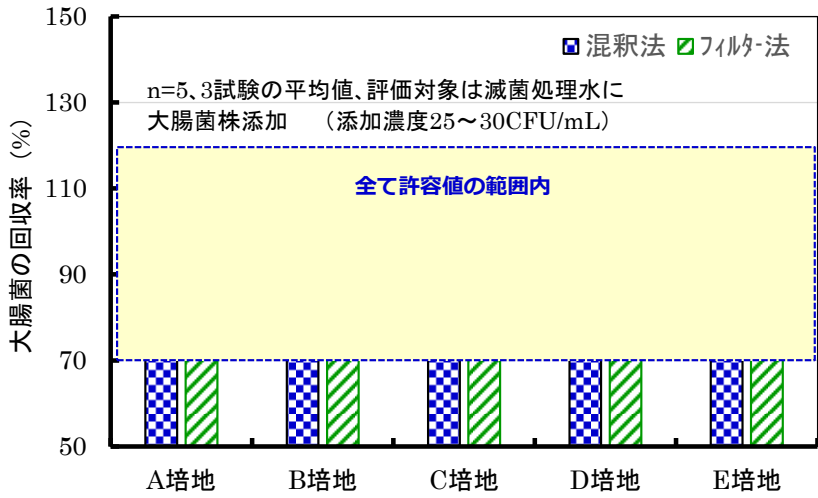


図1 各種培地・手法による大腸菌の回収率

2) 希釈水の違いがCVに及ぼす影響

混釈法、フィルター法ともにCVの許容値である**30%以下**(図2、3)であり、培地・手法と希釈水の違いがCVに与える影響は小さいことが明らかとなった。

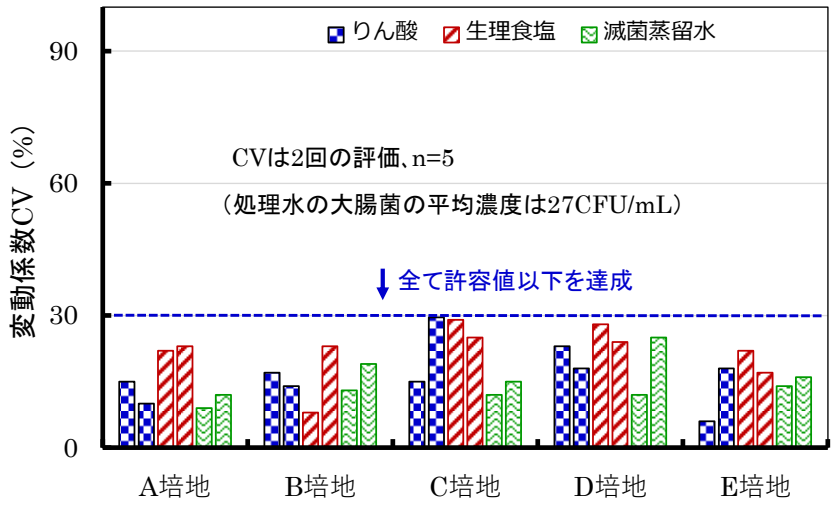


図2 培地と希釈水の違いによるCVの推移(混釈法)

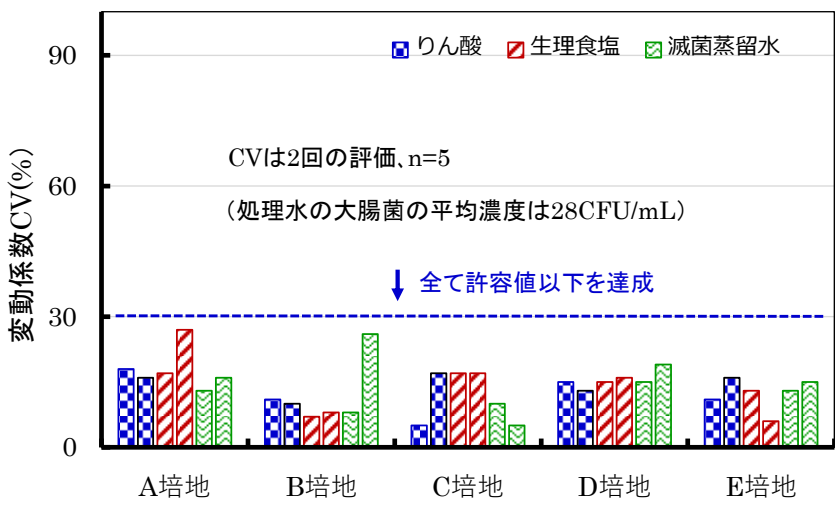


図3 培地と希釈水の違いによるCVの推移(フィルター法)

(A培地:加モルトリフォーム寒天培地、B培地:加モアガー-ECC寒天培地、C培地 :XM-G寒天培地、D培地:トリコール寒天培地、E培地: ESリマーク寒天培地)

大腸菌測定法の提案（濃度の影響と室間精度）

3) 大腸菌濃度の違いがCVに及ぼす影響

大腸菌濃度が約1~30 CFU/mLの低濃度域でのCVは、混釈法、フィルター法ともに検出濃度が10 CFU/mL以下の場合に高くなった(図4、5)。低濃度域でCVが影響を受けることが明らかとなった。

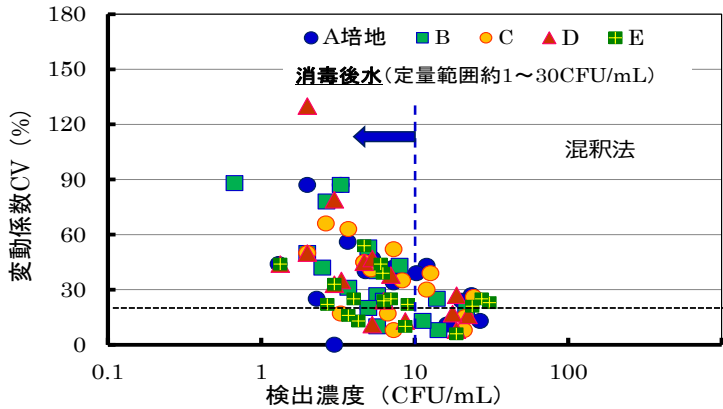


図4 各培地による検出濃度と変動係数の関係
(低濃度域での混釈法)

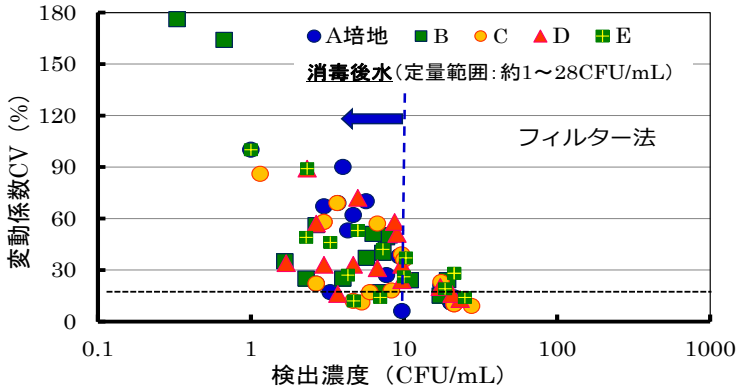


図5 各培地による検出濃度と変動係数の関係
(低濃度域でのフィルター法)

4) 室間精度の評価結果

評価結果を図6に示す。1分析機関当たり1試料5回の大腸菌測定を実施し、その平均値を用いて3つの分析機関で変動係数によって室間精度を評価した結果、5培地（平板法）で概ね35%以内となった。14試料のうちA処理場2月放流水のA培地について39.2%となった。コロニーの視認性や培地温度による変動の可能性も考えられたが具体的な原因は不明ではあった。また、測定回数を重ねるごとに変動係数も低下しており、測定技術を習熟することで精度が確保できるものと考えられる。

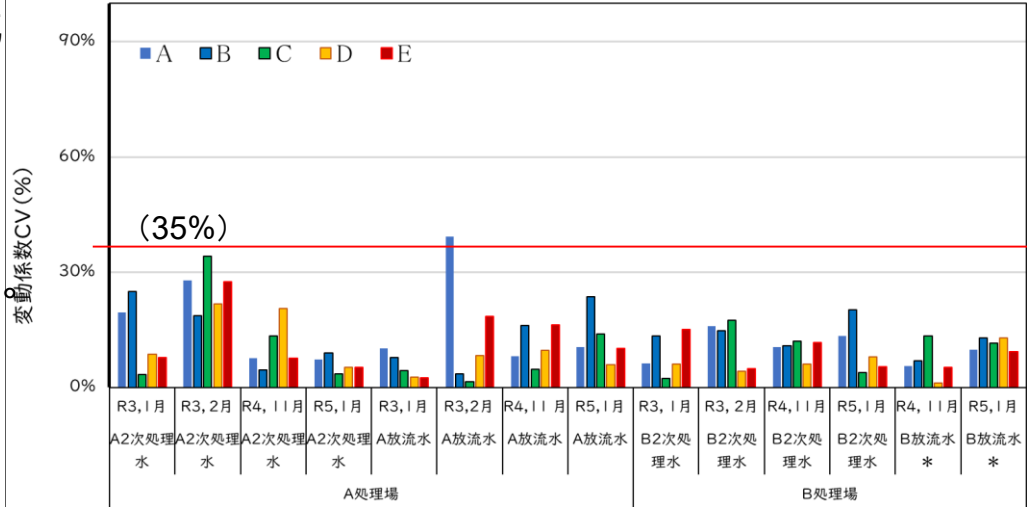


図6 3分析機関での室間精度

大腸菌測定法の提案（濃度の影響と室間精度）

4. 判定結果
上記の評価結果に基づく判定結果を表1に示す。5種類の特定酵素基質培地を利用し、混釈法、メンブレンフィルター法での評価を行ったが、真度(回収率)、繰返精度、について各許容値を満足できることが確認された。室間精度については概ね目標値を満足できることが確認された。

表2 判定結果

環境基準の告示検討における判定項目と目標値		5培地による混釈法、フィルター法の判定結果
真度(回収率)	70～120%	○
繰返精度	30%以内	○
室間精度	35%以内	○

大腸菌測定法の提案（留意事項）

5. その他留意事項

1) 検出コロニーの同定

培地A～Eにおける典型コロニーの大腸菌(*E.coli*)の陽性率は90～100%であり、培地が異なることで偽陽性(大腸菌以外の細菌)の割合に若干の違いが生じる可能性があった(表3)。

2) 検出コロニーの滲み

大腸菌の高濃度試料では、コロニーとそれ以外のコロニーが重なり、発色の識別による判定が困難となる。特に、フィルター法ではコロニーを生成させ計数するエリアが小さい(混釈法のシャーレ径が90mmに対し、フィルター径は47mm)ことから、コロニーの重なりが生じやすい(写真1)。

表-3 各培地における検出コロニーの同定結果

培地	同定数	同定結果	<i>E.coli</i> の割合 (%)	腸内細菌の割合 (%)
A	20	<i>E.coli</i> (19)、 <i>E.coli</i> ・ <i>K.ascorbata</i> 混合(1)	100	100
B	20	<i>E.coli</i> (17)、 <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonaticus</i> 混合(1)、 <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonaticus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1)、不明(1)	95	95
C	20	<i>E.coli</i> (20)	100	100
D	20	<i>E.coli</i> (16)、 <i>E.coli</i> ・ <i>S.flexneri</i> 混合(1)、 <i>E.coli</i> ・ <i>S.dysenteriae</i> 混合(1)、 <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonaticus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1)、 <i>E.hermannii</i> (1)	95	100
E	20	<i>E.coli</i> (17)、 <i>E.coli</i> ・ <i>C.amalonaticus</i> ・ <i>Y.frederiksenii</i> 混合(1)、 <i>C.freundii</i> (1)、不明(1)	90	95

()内は同定株数、*E.coli*との混合同定分については、*E.coli*として評価

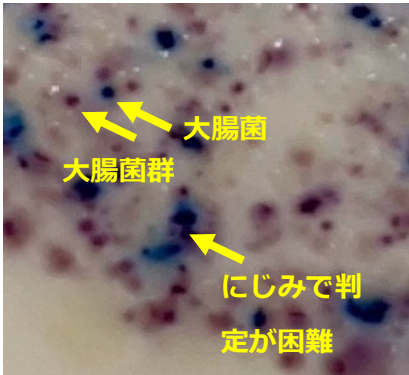


写真1 高濃度・フィルター法でのコロニーの(にじみ例)

大腸菌(群)の定量試験（培地組成の例）

評価を行った5種の特定酵素基質培地の組成

培地A

ペプトン 3.0 g
塩化ナトリウム 5.0 g
リン酸二水素ナトリウム 2.2 g
リン酸一水素二ナトリウム 2.7 g
寒天 10.0 g
ソルビトール 1.0 g
ピルビン酸ナトリウム 1.0 g
タージトール 7 0.15 g
トリプトファン 1.0 g
合成基質混合物 0.4 g

培地B

ペプトンと酵母エキス 8.0g
塩化ナトリウム 5.0g
特殊酵素基質混合物 4.8g
寒天 15.0 g

培地C

ペプトン 10.0g
ピルビン酸ナトリウム 1.0g
L-トリプトファン 1.0g
D-ソルビトール 1.0g
塩化ナトリウム 5.0g
リン酸二水素ナトリウム 2.2g
リン酸一水素ナトリウム 2.7g
硝酸カリウム 1.0g
ラウリル硫酸ナトリウム 0.2g
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-8-D-グルクロニド (X-GLUC) 0.1g
5-ブロモ-6-クロロ-3-インドリル-8-D-ガラクトピラノシド (MAGENTA-GAL) 0.1g
カンテン 15.0g

培地D

ペプトン 10.0g
ピルビン酸ナトリウム 1.0g
L-トリプトファン 1.0g
D-ソルビトール 1.0g
塩化ナトリウム 5.0g
リン酸二水素ナトリウム 2.2g
リン酸一水素ナトリウム 2.7g
硝酸カリウム 1.0g
ラウリル硫酸ナトリウム 0.2g
発色酵素基質等混合物 0.2g
カンテン 15.0g

培地E

ペプトン 10.0g
酵母エキス 3.0g
塩化ナトリウム 5.0g
ラウリル硫酸ナトリウム 0.1g
ピルビン酸ナトリウム 1.0g
リン酸塩 0.5g
合成酵素基質 0.4g
カンテン 15.0g