

<報文>

特定酵素基質培地法で大腸菌数に影響を及ぼす因子\*

渡邊圭司\*\*・池田和弘\*\*・柿本貴志\*\*・見島伊織\*\*・梅沢夏実\*\*・木持 謙\*\*・田中仁志\*\*・川合裕子\*\*\*  
 ・木村久美子\*\*\*\*・和波一夫\*\*\*\*\*・石井裕一\*\*\*\*\*

キーワード ①特定酵素基質培地 ②大腸菌数 ③保存期間 ④保存温度 ⑤定点観測

要 旨

特定酵素基質培地法で大腸菌数を測定する際に、市販培地及びメンブレンフィルターの種類の違い、試料の保存温度及び保存期間が測定値に及ぼす影響を検討した。その結果、培地の種類、試料の保存温度及び保存期間は、大腸菌数に影響を及ぼした。また、定点観測による河川の大腸菌数の経日変化を調べたところ、5日間で大腸菌数がおよそ5倍変動した。以上の結果から、大腸菌数の測定における測定精度の管理及び測定値の代表性に関する基礎的知見が得られた。

1. 緒言

環境水中の病原微生物（クリプトスポリジウム、ジアルジア、赤痢菌、*Salmonella*属細菌、*Campylobacter*属細菌など）は、人が水に接することで感染する恐れがあり、そのリスク管理は行政機関の重要な課題である。埼玉県では、1996年に越生町で水道原水の汚染を原因としたクリプトスポリジウムによる集団下痢感染事故が起きている。それら病原微生物の主な発生源は、人や家畜のふん便である。公共用水域の水質調査では、1971年頃から現在まで長きにわたり、ふん便汚染の指標として大腸菌群数の測定が行われてきた<sup>1)</sup>。この大腸菌群数は、ブリアント・グリーン乳糖胆汁イオン培地最確数法(BGLB法)で算出される。しかし、BGLB法では、測定方法の原理上、ふん便汚染に全く関係のない河川や土壤中に生息している細菌の一部(*Aeromonas*属細菌など)も大腸菌群として計測されてしまうため、ふん便汚染の実態を過大評価しているという問題点が指摘されている。近年、大腸菌群数に比べより正確なふん便汚染の指標となる大腸菌数を、簡便かつ迅速に測定することができる特定酵素基質培地法が考案された。この方法は、大腸菌のみが保有するβ-グルクロニダーゼという酵素の反応を利用し、発色酵素

基質を使ってコロニーの呈色により大腸菌を検出する手法である。このような測定技術の進歩から、これまで長きにわたり公共用水域の生活環境項目及び水浴場の水質判定基準の測定項目であった大腸菌群数に替えて、大腸菌数を新たなふん便汚染の指標として環境基準項目に加えるべく、環境省を中心に現在検討が進められている<sup>2)</sup>。

このような背景を踏まえ、本稿では、特定酵素基質培地法による大腸菌数の測定に関し、市販の培地及びメンブレンフィルターの種類、試料の保存温度及び保存期間が測定値に及ぼす影響について検討を行った。また、河川の定点観測により、大腸菌数が1週間でどのように変動するのか経日変化を調べた。これらの検討を通じて、測定値に影響を及ぼす因子を明らかにし、特定酵素基質培地法で大腸菌数を測定する際の測定精度の管理及び測定値の代表性に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 方法

試料は、埼玉県内の河川を対象に、表層水をバケツで採取したものとした。採水地点、採水日及び調査項目は表1に示した。特定酵素基質培地法では、疎水性格子付き

\*Influential factors on quantitative determination of *Escherichia coli* using a chromogenic enzyme substrate medium

\*\*Keiji WATANABE, Kazuhiro IKEDA, Takashi KAKIMOTO, Iori MISHIMA, Natsumi UMEZAWA, Yuzuru KIMOCHI, Hitoshi TANAKA (埼玉県環境科学国際センター) Center for Environmental Science in Saitama

\*\*\*Yuko KAWAI (さいたま市健康科学研究センター) Saitama City Institute of Health Science and Research

\*\*\*\*Kumiko KIMURA (環境省環境調査研修所) National Environment Research and Training Institute

\*\*\*\*\*Kazuo WANAMI (東京都環境局) Bureau of Environment Tokyo Metropolitan Government

\*\*\*\*\*Yuichi ISHII (東京都環境科学研究所) The Tokyo Metropolitan Research Institute for Environmental Protection

メンブレンフィルター (HGMF) もしくはメンブレンフィルター (MF) を用いる方法があるが<sup>3)</sup>, 本稿では, メンブレンフィルターを用いる方法を採用した。メンブレンフィルターの仕様は, 直径47 mm, 素材が親水性セルロース混合エステル, 平均粒子保持径0.45 μm, 微生物検査用の格子入りのものとし, 各試験で同一のロットとなるようにした。培養温度及び培養時間は, 市販の特定酵素基質培地に添付の取扱説明書に従った。各試料について適宜希釈操作を行い, それぞれ5連で繰り返し試験を行った (定点観測は3連)。大腸菌のコロニーの計測には, ライトボックス及び拡大鏡 (3.5倍) を使用した。

表1 調査地点, 採水日及び調査項目

河川名	地点名	採水日	調査項目
笹目川	笹目樋管	2016年 1月12日	コロニーの遺伝子解析
槻川	兜川合流点前	2017年 8月1日	培地の影響
		2017年 9月5日	
		2017年 10月3日	フィルターの影響
		2017年 11月7日	
小山川	一の橋	2017年 8月3日	培地の影響
		2017年 9月7日	
		2017年 10月5日	フィルターの影響
		2017年 11月8日	
中川	行幸橋	2017年 8月9日	培地の影響
		2017年 9月6日	
		2017年 10月4日	フィルターの影響
		2017年 11月6日	
荒川	御成橋	2017年 8月24日	培地の影響
		2017年 9月13日	
		2017年 10月6日	フィルターの影響
		2017年 11月6日	
元荒川	渋井橋	2017年 12月19日	保存期間と保存温度の影響
		2018年 1月9日	
元荒川	渋井橋	10月22日	定点観測による経日変化
		2018年 から 10月28日	

## 2.1 市販の特定酵素基質培地の種類と大腸菌数の測定値の関係

市販の特定酵素基質培地の種類が, 大腸菌数の計測値に影響するのか検討を行った。市販の特定基質酵素培地は, ESコリマーク寒天培地 (栄研化学), XM-G寒天培地 (日水製薬), クロモアガーECC寒天培地 (関東化学), クロモカルトコリフォーム寒天培地 (メルク) 及びPromediaアガートリコロール (エルメックス) の5種類を用いた。試料水は, 2017年の8月1日及び9月5日の槻川・兜川合流点前, 8月3日及び9月7日の小山川・一の橋, 8月9日及び9月6日の中川・行幸橋及び8月24日及び9月13日の荒川・御成橋で採取した計8試料とした。各培地の取扱説明書に従って培養を行い, 大腸菌数を計測した。

## 2.2 メンブレンフィルターの種類と大腸菌数の測定値の関係

メンブレンフィルターの種類が, 大腸菌数の計測値に影響するのかを検討した。市販のメンブレンフィルター

は, エステルメンブレンフィルタ (アドバンテック東洋), GN-6メトリセルMCEメンブレンフィルター (日本ポール), MF-ミリポアメンブレン (メルク) の3種類を用いた。試料水は, 2017年の10月3日及び11月7日の槻川・兜川合流点前, 10月5日及び11月8日の小山川・一の橋, 10月4日及び11月1日の中川・行幸橋及び10月6日及び11月6日の荒川・御成橋の計8試料とした。培地はクロモアガーECC寒天培地とし, インキュベーターで37°C, 24時間培養後, 大腸菌数を計測した。

## 2.3 試料の保存温度と保存期間が大腸菌数に与える影響

採水した試料の保存温度及び保存期間が大腸菌数の計測値に与える影響を調べた。採水は荒川・御成橋で行い, 1回目は2017年12月19日, 2回目は2018年1月9日に採取した。温度を5°C, 25°C, 35°Cに設定したインキュベーター3台を準備し, 保存開始から6日目までは毎日, 最後に9日目に測定を行い, 保存温度と保存期間が大腸菌数の計測値に与える影響を調べた。対照区の大腸菌数は, 試料搬入後直ちに試験を開始した保存開始前の0日目の試料の値とした。測定は, 培地をクロモアガーECC寒天培地及びメンブレンフィルターをMF-ミリポアメンブレンとし, インキュベーターで37°C, 24時間培養後, 大腸菌数を計測した。

## 2.4 定点観測による大腸菌数の経日変化

定点観測により, 大腸菌数がどのくらい経日変化するのか調べた。採水は元荒川・渋井橋で行い, 2018年10月22日から28日 (1週間) まで, 午前10時頃に行った。測定は, 培地をクロモアガーECC寒天培地及びメンブレンフィルターをMF-ミリポアメンブレンとし, インキュベーターで37°C, 24時間培養後, 大腸菌数を計測した。

## 2.5 統計解析

各データは, 初めにShapiro-Wilk検定により正規性を, Levene検定により等分散性を確認した。その後, 各データはその特徴に合わせてone way ANOVA, Kruskal-Wallis検定, Welch検定, Games-Howell検定及びSteel検定に供した。Steel検定及びGames-Howell検定では, 対照区を保存開始前の0日目 (採水当日) の大腸菌数とした。Steel検定は, オープンソースの統計解析ソフトであるR 3.6.0を, その他の検定についてはIBM SPSS Statistics 25 (日本IBM) を使用して解析を行った。

## 2.6 特定酵素基質培地で検出される細菌の同定

特定酵素基質培地による検出では, 様々な性状 (例えば色) のコロニーがフィルター上に検出される。ここでは, 得られた様々な色のコロニーからDNAを抽出し, 16S rRNA遺伝子の部分配列から, それらのコロニーがどのような細菌に属するのか相同性検索を行った。試料は2016年1月12日に笹目川・笹目樋管で採取したのものとし, リン

酸バッファーで100倍に希釈した。培地をクロモアガーECC寒天培地及びメンブレンフィルターをMF-ミリポアメンブレンとし、インキュベーターで37℃、24時間培養した。様々な色調の8菌株をランダムに白金耳で釣菌し、新しいクロモアガーECC寒天培地に塗抹し、37℃で24時間培養した。1.5mL容量のチューブ（エッペンドルフ）に滅菌超純水100 μLを入れ、単離した菌株を個別に白金耳で米粒大の量となるように懸濁した。DNeasy Blood & Tissue Kit（キアゲン）で各菌株のDNAを抽出した。それぞれの菌株のDNAから、F27modとR1492プライマー及びTaKaRa Ex Taq Hot Start Version（タカラバイオ）を用いて、16S rRNA遺伝子領域をTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch（タカラバイオ）により増幅した。得られたPCR産物は、QIAquick PCR Purification Kit（キアゲン）で精製を行った。精製後のPCR産物から、DTCS Quick Start Kit（AB SCIEX）及びF341とR907プライマーを用いてサイクルシーケンス反応及び精製を行い、遺伝子解析システム GenomeLab GeXP（AB SCIEX）で16S rRNA遺伝子の部分配

列（約400～500 bp）を読んだ。各菌株から得られた16S rRNA遺伝子の部分配列データを、DDBJのBLASTによる相同性検索に供した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 市販の特定酵素基質培地の種類と大腸菌数の測定値の関係

市販の特定酵素基質培地の種類と大腸菌数の関係を図1に示す。測定した8試料のうち、2017年の8月3日の小山川・一の橋、8月9日及び9月6日の中川・行幸橋、8月24日及び9月13日の荒川・御成橋の5試料に関しては、培地間で大腸菌数に有意な差が見られた（one way ANOVA及びKruskal-Wallis検定,  $p < 0.001 \sim 0.01$ ）。一方、2017年の8月1日及び9月5日の槻川・兜川合流点前、2017年9月7日の小山川・一の橋の3試料に関しては、培地間で大腸菌数に有意な差は認められなかった（one way ANOVA, Welch検定及びKruskal-Wallis検定,  $p = 0.054 \sim 0.764$ ）。繰り返し試験による各培地の大腸菌数の変動係数の平

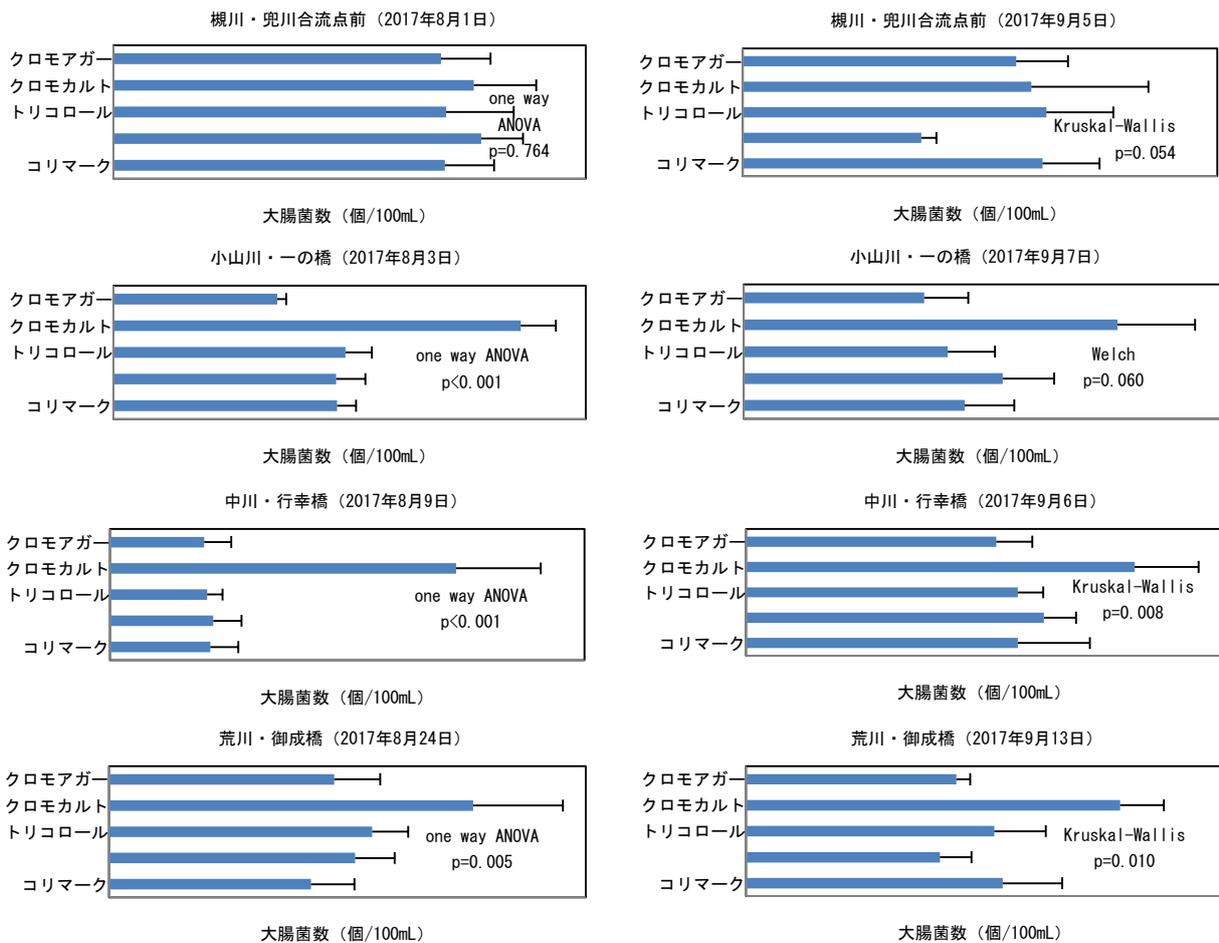


図1 市販の特定酵素基質培地の種類と大腸菌数の関係

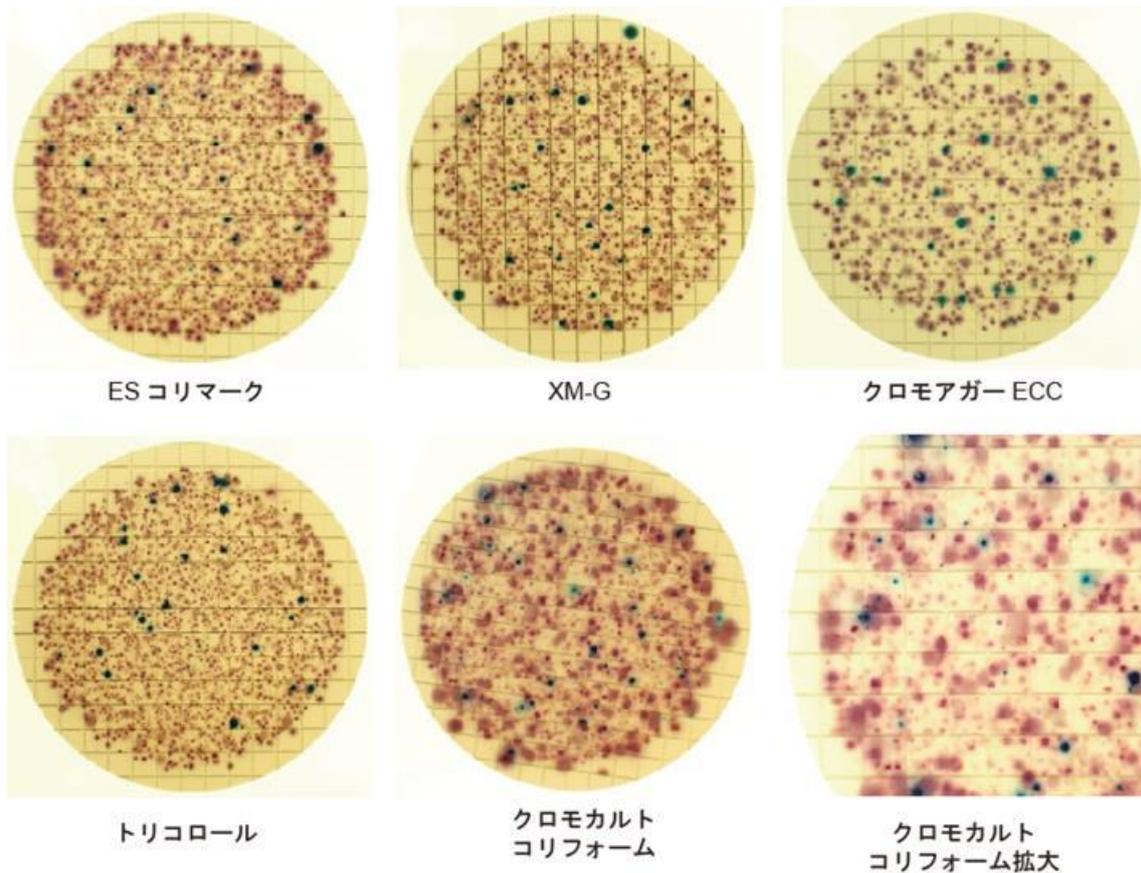


図2 市販の特定酵素基質培地上のコロニーの様子 (2017年8月24日の荒川・御成橋の試料)

均値及び標準偏差は、ESコリマーク寒天培地が $20.5 \pm 6.0\%$ 、XM-G寒天培地が $15.4 \pm 5.6\%$ 、クロモアガーECC寒天培地が $16.8 \pm 7.6\%$ 、クロモカルトコリフォーム寒天培地が $20.6 \pm 9.2\%$ 及びアガートリコロールが $17.1 \pm 4.9\%$ であり、培地間で大きな差は見られなかった。以上の結果より、試料によっては、使用する培地の種類により大腸菌数の計測値に違いが生じることが示された。特に、クロモカルトコリフォーム寒天培地を使用した場合、他の培地と比較して大腸菌数が高い値を示す試料が多く見られ、特に、2017年8月3日の小山川・一の橋の試料では、培地間の大腸菌数の平均の最大値（クロモカルトコリフォーム寒天培地を用いた場合の1824 CFU/100mL）と最小値（クロモアガーECC寒天培地を用いた場合の496 CFU/100mL）の差が最も大きく、その差は1328 CFU/100mLであった。このように、クロモカルトコリフォーム寒天培地は、試料によって他の培地と比べて大腸菌の検出感度が高いことが示された。しかし、クロモカルトコリフォーム寒天培地を使用した場合は、他の培地と比べて赤色を呈した大腸菌群のコロニーがにじんでいるものが多く見られ、一方、青色を呈した大腸菌のコロニーは極小のものが多く見られるため（図2）、他の培地を使用した場合

と比べ、大腸菌のコロニーの計測に時間を要した。クロモカルトコリフォーム寒天培地以外の4種類の培地では、大腸菌数に大きな違いが見られなかった。木瀬<sup>4)</sup>も、3種の特定酵素基質寒天培地（クロモアガーECC寒天培地、XM-G寒天培地及びクロモカルトコリフォーム寒天培地）で大腸菌数を比較したところ、クロモカルトコリフォーム寒天培地は大腸菌と大腸菌群の色調の識別がややくいこと、試料によっては3種の培地間で大腸菌数に有意な差が見られたことを報告している。以上の結果は、公共用水域の水質測定で大腸菌数の90%値や幾何平均値を算出する際には、同一種の特定酵素基質培地を用いて計測された値を用いること、また、データ同士を比較する際にも、同一の培地を使用して算出されたデータなのかなどに注意する必要があることを示唆している。

### 3.2 メンブレンフィルターの種類と大腸菌数の測定値の関係

メンブレンフィルターの種類と大腸菌数の測定値の関係を図3に示した。測定した8試料のうち、2017年11月7日の槻川・兜川合流点前の1試料のみ、メンブレンフィルターの種類と大腸菌数に有意な差が見られたが（Kruskal-Wallis検定、 $p=0.006$ ）、大腸菌数の平均の

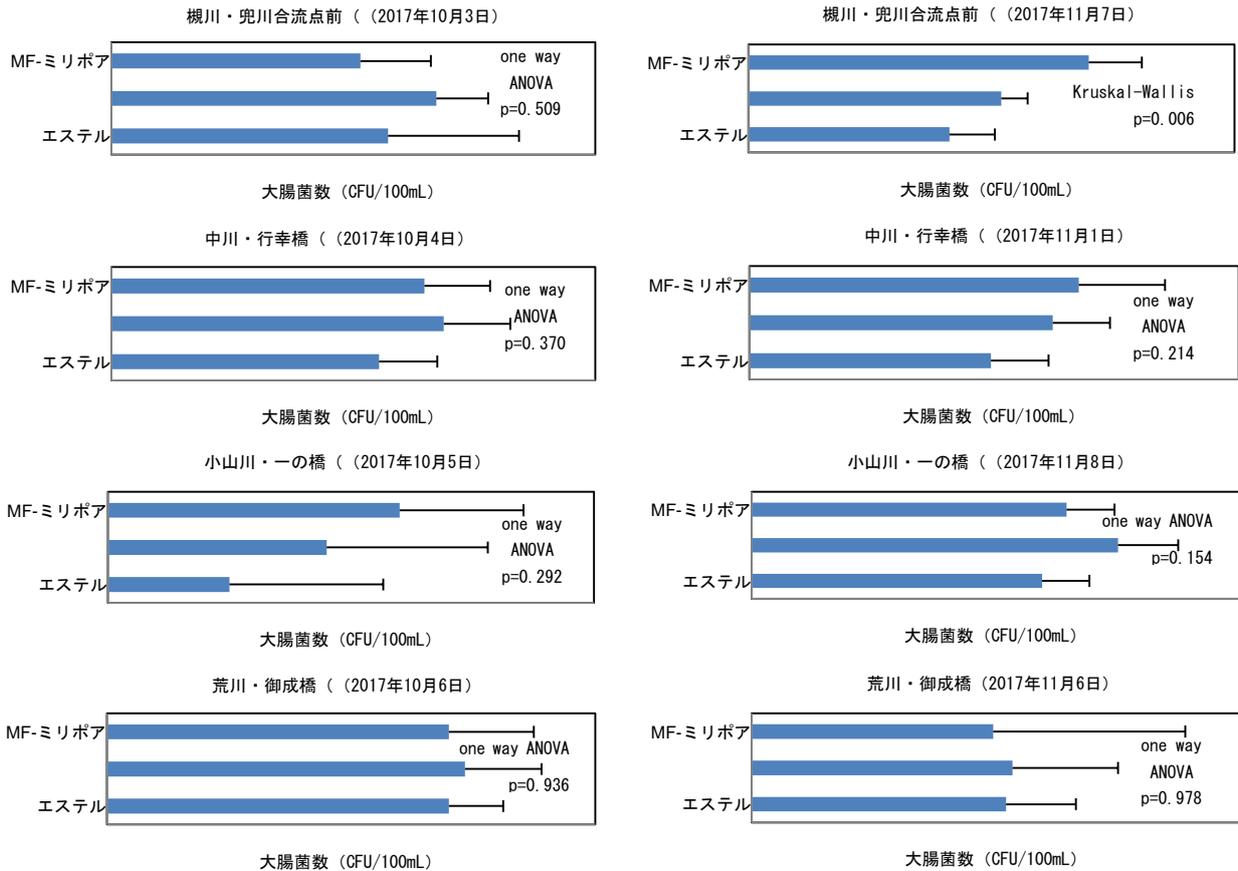


図3 メンブレンフィルターの種類と大腸菌数の関係

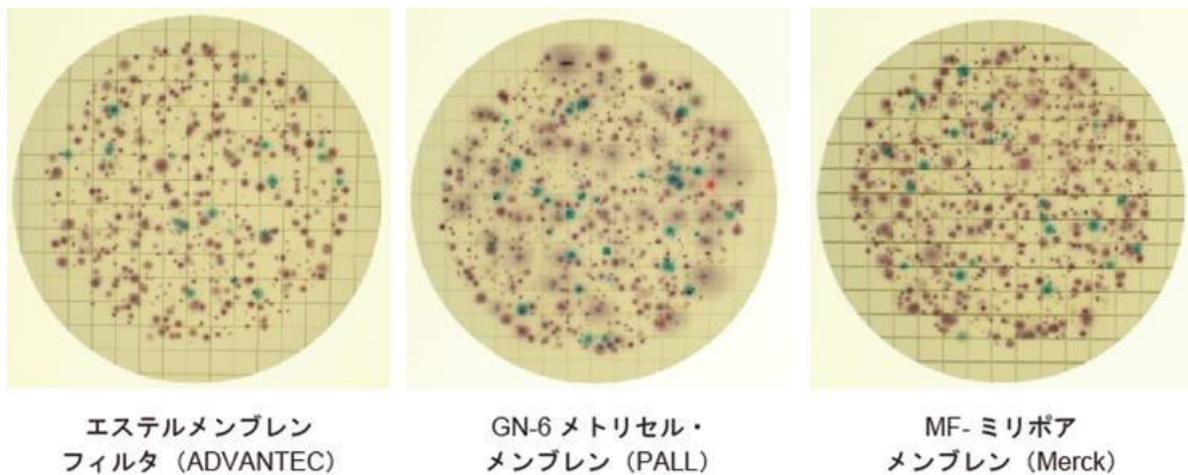


図4 各メンブレンフィルター上のコロニーの様子 (2017年11月8日の小山川・一の橋の試料)

最大値 (MF-ミリポアメンブレンを使用した場合の210 CFU/100mL) と最小値 (エステルメンブレンフィルタを使用した場合の124 CFU/100mL) の差は86 CFU/100mLで、大腸菌数はおよそ1.7倍の違いであった。繰り返し試験による各メンブレンフィルターを使用した場合の大腸菌数の変動係数の平均値及び標準偏差は、エステルメンブ

レンフィルタが37.7±34.8%, GN-6メトリセルMCEメンブレンが27.1±19.4%及びMF-ミリポアメンブレンが31.6±19.8%であり、メンブレンフィルター間で大きな差は見られなかった。以上の結果より、メンブレンフィルターの種類が大腸菌数の測定値に及ぼす影響は小さいことが明らかとなった。しかし、GN-6メトリセルMCE

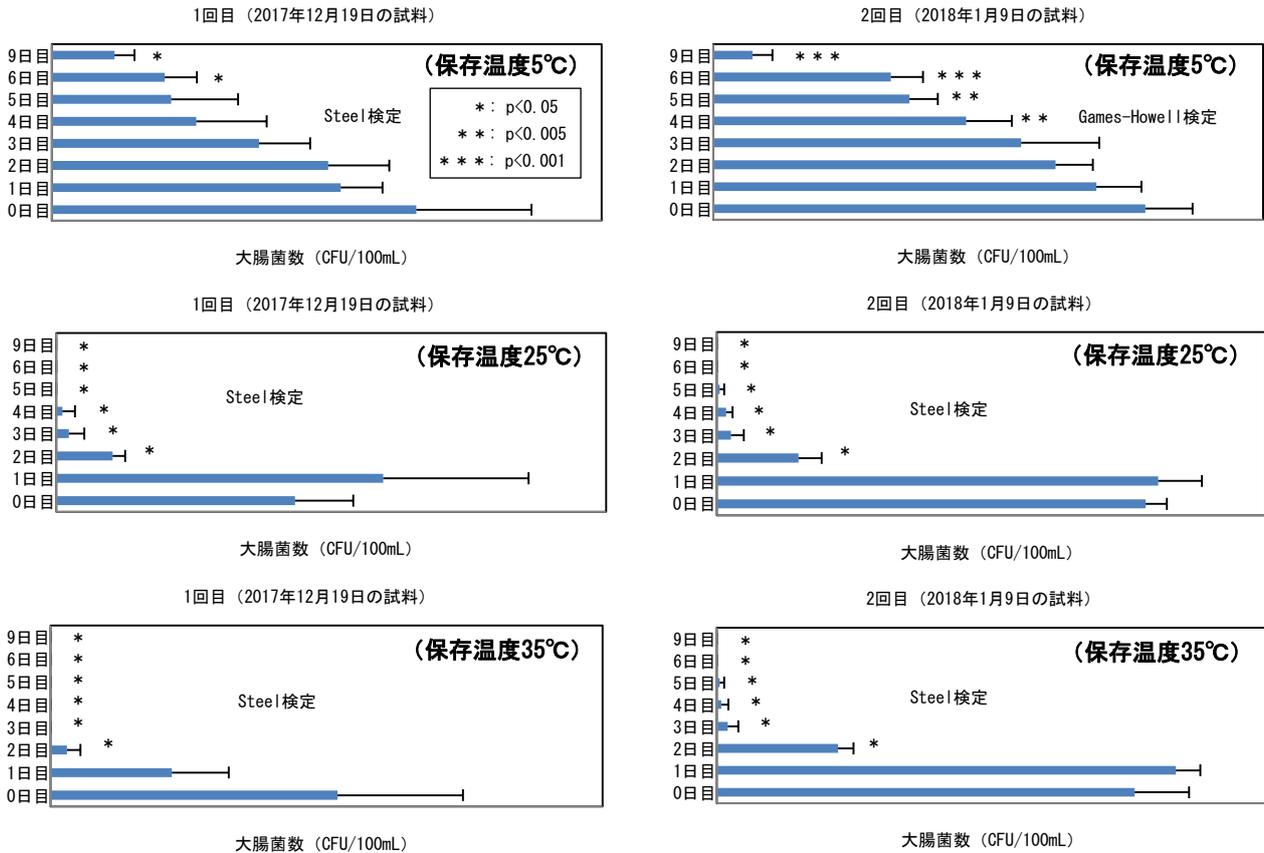


図5 大腸菌数と試料保存温度及び保存期間の関係

メンブレンは、試料によって赤色を呈した大腸菌群のコロニーがにじみ（図4）、青色を呈した大腸菌のコロニーの判別を難しくするケースがあった。

### 3.3 試料の保存温度と保存期間が大腸菌数に与える影響

試料の保存温度と保存期間が大腸菌数に与える影響を図5に示した。どの保存温度でも、保存開始後1日目（24時間後）までは、保存開始前の0日目（採水当日の対照区）との間で大腸菌数に有意な差は見られなかった（Steel検定及びGames-Howell検定,  $p=0.171\sim0.999$ ）。一方、試料の保存温度が25°C及び35°Cでは、保存開始後2日目以降には大腸菌数が半数以下に減っていた。試料の保存温度が5°Cの場合は、1回目の試験（2017年12月19日の荒川・御成橋の試料）では保存開始後5日目まで（Steel検定,  $p=0.099\sim0.932$ ）、2回目の試験（2018年1月9日の荒川・御成橋の試料）では保存開始後3日目まで（Games-Howell検定,  $p=0.182\sim0.707$ ）、保存開始前の0日目の大腸菌数と比較して有意な差が認められなかった。木瀬ら<sup>5)</sup>は、4°Cで保存した場合の保存開始後2日目の大腸菌の生残率は、初日菌数の33~90%であったのに対し、20°Cで保存した場合は11~52%であったこと

を報告している。以上の結果は、特定酵素基質培地法による大腸菌数の測定では、採水した試料はクーラーボックス等に入れて実験室に持ち帰り直ちに測定試験を開始することが望ましいが、直ちに測定試験を開始できない場合は試料を冷蔵保存（5°C以下）し、保存した後は24時間以内に培養を開始することで保存開始前と同等の値を得ることができることを示した。

### 3.4 定点観測による大腸菌数の経日変化

定点観測による大腸菌数の経日変化を図6に示した。元荒川・渋井橋で、大腸菌数の経日変化を1週間モニタリングしたところ、大腸菌数に有意な差が見られた（Kruskal-Wallis検定,  $p=0.004$ ）。5日間の期間で、大腸菌数の最小値（2018年10月23日の試料の407 CFU/100mL）と最大値（2017年10月28日の試料の2153 CFU/100mL）で1746 CFU/100mLの差（約5倍の値の違い）が見られた。以上の結果より、公共用水域の大腸菌数の測定では、試料によっては採水日が数日前後することで、大腸菌数が数倍異なる計測値となる可能性が示唆された。

### 3.5 特定酵素基質培地法で検出された細菌の同定

図7に示した特定酵素基質培地上のメンブレンフィル

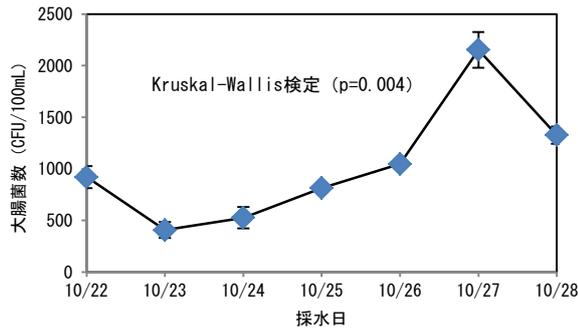


図6 元荒川・渋井橋の大腸菌数の1週間の経日変化

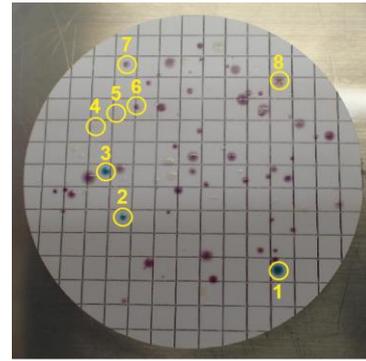


図7 16S rRNA遺伝子解析に供したコロニー（番号は表2の菌株番号に対応）

表2 各菌株の16S rRNA遺伝子解析による相同性検索の結果

菌株番号	コロニーの色調	最も相同性の高かった細菌名 (Accession number)	塩基配列の長さ (bp)	相同性 (%)
1	青	<i>Escherichia coli</i> Ec1-Bat (MK418911)	422	100
2	青	<i>Escherichia coli</i> Ec1-Bat (MK418911)	464	100
3	青	<i>Escherichia coli</i> YHE-35 (KR010977)	423	99
4	白	<i>Pseudomonas otitidis</i> W5-3 (MG905280)	508	100
5	白	<i>Pseudomonas otitidis</i> W5-3 (MG905280)	464	100
6	赤	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966T (X74677)	505	100
7	薄赤	<i>Enterobacter roggenkampii</i> DSM 16690 (CP017184)	464	99
8	茶	<i>Cronobacter sakazakii</i> Hc3 (MG238591)	464	99

ターから、青色を呈した3菌株、白色を呈した2菌株及び赤色を呈した3菌株の合計8菌株を単離した。各菌株の16S rRNA遺伝子の部分配列を基に相同性検索を行った結果を表2に示した。青色を呈した3菌株は、大腸菌 (*Escherichia coli*) と99~100%の高い相同性を示した。白色を呈した2菌株 (特定酵素基質培地法では大腸菌にも大腸菌群にも属さない) は、*Pseudomonas otitidis*と100%の相同性を示した。赤色を呈した大腸菌群に分類される3菌株は、それぞれ*Aeromonas hydrophila*と100%、*Enterobacter roggenkampii*と99%及び*Cronobacter sakazakii*と99%の相同性を示した。以上の結果より、特定酵素基質培地上に生じた青色を呈した菌株は全て大腸菌であるが、赤色を呈した大腸菌群には、以前から指摘されているように非腸内細菌で自然由来と考えられる*Aeromonas*属細菌などが含まれることが確認された。和波ら<sup>6)</sup>は、PCR-DGGE法による菌叢解析を行ったところ、BGLB法で検出される陽性管の大腸菌群の中に、ふん便由来でない菌種

(*Aeromonas*属細菌など) が存在しており、それらの菌種は水圏や土壌由来のものと推測されると報告している。

#### 4. まとめ

メンブレンフィルターを使用した特定酵素基質培地法により大腸菌数の測定を行う際に、計測値に影響を及ぼす因子の検討を行った。実験結果から得られた要点を以下にまとめる。

- ・特定酵素基質培地では、使用する培地の種類によって

大腸菌数に違いが生じる試料があったことから、データの取得及びデータの比較を行う際は、培地が同一種類となるようにする必要がある。

- ・メンブレンフィルターの種類の違いは大腸菌数の計測値にほとんど影響しなかった。
- ・大腸菌数の測定は、実験室に試料を持ち帰った後24時間以内に試験 (培養) を開始すれば、試料搬入後直ちに試験を開始したものと同等の値を得ることができた。
- ・試料の保存温度を5℃以下 (冷蔵保存) にすることで、大腸菌数は数日間 (1~2日程度) 安定に維持された。
- ・河川の定点観測は、大腸菌数が数日間で数倍変動する (本稿では5日間で約5倍変動) 可能性があることを示した。

以上のように、特定酵素基質培地法による大腸菌数の計測に関し、測定精度の管理及び測定値の代表性に関する基礎的知見を得ることができた。

#### 5. 引用文献

- 1) 環境庁告示59号：水質汚濁に係る環境基準について
- 2) 環境省：中央環境審議会水環境部会生活環境項目環境基準専門委員会 (第9回) 配布資料，  
[https://www.env.go.jp/council/09water/post\\_102.html](https://www.env.go.jp/council/09water/post_102.html)
- 3) 環境省：環水大発第110324001号別添2，要測定指標 (大腸菌数) の測定について
- 4) 木瀬晴美 他：大腸菌の特定酵素基質培地による測

- 定比較. 東京都環境科学研究所年報, 42-43, 2015
- 5) 木瀬晴美 他: 環境水の大腸菌の生残性について.  
東京都環境科学研究所年報, 72-73, 2016
- 6) 和波一夫 他: 都内河川の大腸菌群数に関する研究  
(2) -多摩川の大腸菌群の遺伝子解析-. 東京都環境科学研究所年報, 20-30, 2010