

糞便性大腸菌群数の測定における希釈水の検討

木瀬晴美 和波一夫 石井裕一

【要約】糞便性大腸菌群数の測定に用いる希釈水については、環境省通知では滅菌ペプトン水、上水試験方法ではリン酸塩緩衝液、下水試験方法では滅菌ペプトン水、工場排水試験方法では生理食塩水及びリン酸塩緩衝液が指定されている。これらの3種類の希釈水を用い、環境水(運河、河川)の糞便性大腸菌群数を比較した。その結果、3種類の希釈水による測定値差は8試料中1試料を除き認められなかった。

【目的】

試料中に細菌数が多いと予想されるときには、指定された希釈水で希釈検水を調整する必要がある(M-FC法ではフィルター上に出現するコロニー数は10~30個位が適当とされている)。表1に示すように、希釈水は各試験方法により生理食塩水、滅菌ペプトン水(以下、「ペプトン水」と表記)、リン酸塩緩衝液(以下「リン酸塩」と表記)と異なる。そこで糞便性大腸菌群数をM-FC法で測定し希釈水の比較検討をした。

【方法】

塩分が26psu程度の運河水と淡水域の河川水を試料(地点等は表2)とし、上記3種の希釈水で希釈検水を作成し、mFC寒天培地と直径47mm孔径0.45μmの界線入り滅菌済みメンブランフィルターを用いて測定した。希釈水の作成及び希釈検水の調整は下記による。

- ① 生理食塩水：塩化ナトリウム8.5gを精製水1Lに溶かして121℃、20分間、オートクレーブ滅菌する。
- ② ペプトン水：カゼイン製ペプトン1gを精製水1Lに溶かしてpHを6.8±0.2に調整した後、121℃、15分間、オートクレーブ滅菌する。
- ③ リン酸塩：リン酸二水素カリウム42.5gを精製水500mlで溶かして、これに水酸化ナトリウム溶液を滴下してpH7.2に調整し、精製水を加えて全量を1Lとする(リン酸塩溶液)。このリン酸塩溶液1mlを精製水1Lに溶かして121℃、15分間、オートクレーブ滅菌する。
- ④ 希釈検水の調整：各希釈水で検水を10倍希釈法により順次段階希釈し、選択した希釈検水をM-FC法でろ過する。

【結果の概要】

- (1) 運河水(4試料)と河川水(4試料)の糞便性大腸菌群数を希釈水別に測定した結果を図1に示した。
1元配置分散分析法により処理した結果、勝島運河1の試料以外は各希釈水間で有意な差は認められなかった(有意水準1%)。
- (2) 運河水における生理食塩水とペプトン水、生理食塩水とリン酸塩の糞便性大腸菌群数測定値(n=3~5の平均値)の相関関係を図2と図3に示した。生理食塩水とペプトン水の決定係数 R^2 は0.9834、生理食塩水とリン酸塩の決定係数 R^2 は0.9771であった。
- (3) 河川水における生理食塩水とペプトン水、生理食塩水とリン酸塩の糞便性大腸菌群数測定値(n=3~5の平均値)の相関関係を図4と図5に示した。生理食塩水とペプトン水の決定係数 R^2 は0.9884、生理食塩水とリン酸塩の決定係数 R^2 は0.9957であった。海水が混じる運河水と淡水の河川水とも高い決定係数であった。以上の結果から生理食塩水、ペプトン水、リン酸塩の各希釈水を使用しても8試料中7試料については有意差がないことが確認された。

ペプトン水は使用時に調整する必要があり作り置きできないという制約がある。リン酸塩は試薬調整が必要であり、作成するのにやや時間がかかる。それに対し、生理食塩水は作るのが容易で保存性が高い。多数の検体を測定するには、作成が簡便な生理食塩水が適していると考えられた。

表1 各試験方法の希釈水一覧

試験方法	希釈水
環境省通知	滅菌ペプトン水
上水試験方法 (2011年版)	リン酸塩緩衝希釈水
下水試験方法(下巻) (2012年版)	滅菌ペプトン水
用水・排水中の大腸菌群試験方法 (JIS K0350-20-10 2001)	生理食塩水 リン酸塩緩衝液
工場排水試験方法 (JIS K 0102 2013)	生理食塩水 リン酸塩緩衝液
衛生試験法・注解 (2010年版)	生理食塩水 リン酸塩緩衝食塩水

表2 調査地点と採水日

調査地点名	採水日	繰返実験(n)
運河		
勝島運河 1	2013/4/23	n=5
勝島運河 2	2013/7/1	n=5
勝島運河 3	2013/10/1	n=5
勝島運河 4	2013/12/2	n=3
河川		
秋川 東秋川橋	2013/8/6	n=3
平井川 多西橋	2013/8/6	n=3
多摩川 多摩川原橋 1	2013/6/25	n=5
多摩川 多摩川原橋 2	2014/2/25	n=5

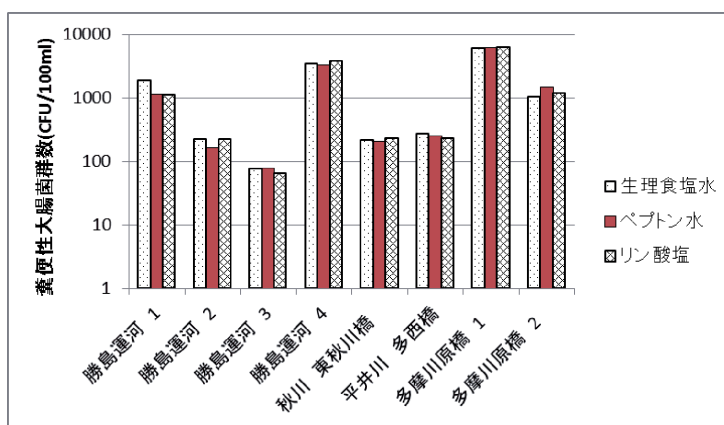


図1 地点別の希釈水の関係

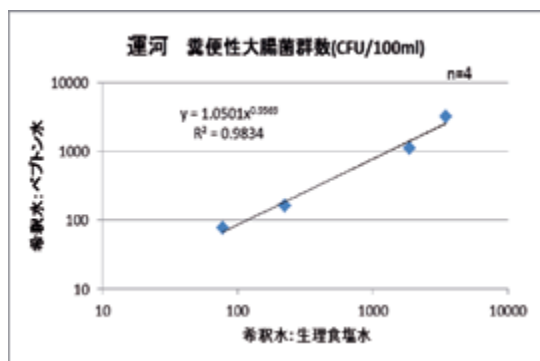


図2 生理食塩水とペプトン水による糞便性大腸菌群数

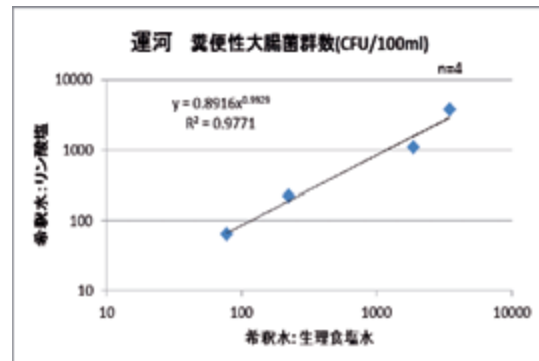


図3 生理食塩水とリン酸塩による糞便性大腸菌群数

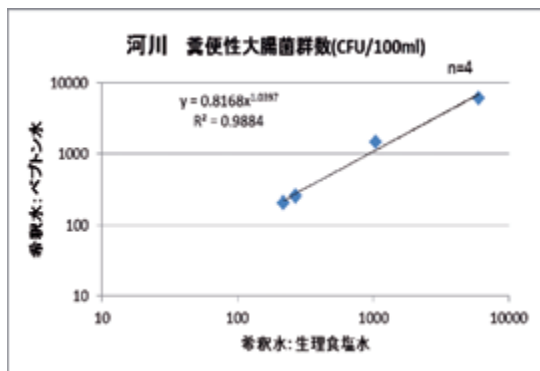


図4 生理食塩水とペプトン水による糞便性大腸菌群数

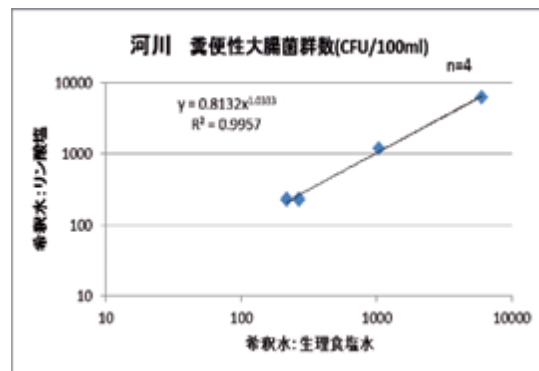


図5 生理食塩水とリン酸塩による糞便性大腸菌群数