

## 大腸菌の特定酵素基質培地による測定比較

木瀬晴美・和波一夫・石井裕一

\*\*\*\*\*

【要 約】酵素基質法を利用した大腸菌、大腸菌群の検出培地4種(クロモアガーECC、XM-G、クロモカルト・コリフォームの寒天培地とコリラート18)を使用し、河川水と大腸菌の標準菌株等を検水として、大腸菌数の測定値とコロニーの色調の識別を比較検討した。その結果、培地により大腸菌コロニーの視認性に差がみられた。

\*\*\*\*\*

### 【目的】

平成15年、水道水の基準として従来の大腸菌群にかわって大腸菌が水質基準項目となった。その試験方法として採用された特定酵素基質培地法では大腸菌( $\beta$ -グルクロニダーゼ活性)と大腸菌群( $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性)が保有する酵素活性により酵素基質が分解され発色、発光する。**表1**に示すように、各培地の酵素基質の種類により大腸菌、大腸菌群のコロニーの発色の色調が異なる。今回、同一検水の大腸菌数を判定し、培地による発色の程度と菌数を比較検討した。

### 【方 法】

クロモアガーECC、XM-G、クロモカルト・コリフォームの3種の寒天培地と液体タイプのコリラート18で多摩川の河川水を測定した。寒天培地法では、ファンネル及びフィルターholダーを用い、直径47mm孔径0.45 $\mu\text{m}$ の界線入り滅菌済みメンブランフィルターで検水をろ過した後、同フィルターを各寒天培地に密着させた。各培地の指定される温度と時間で培養し、**表1**のコロニー色のものを大腸菌とした。コリラート18ではQTトレイ(容量が異なる大小2種類のウエルが配列されたトレイ)に特定酵素基質が入った検水を注ぎこみ、シーラーで密閉して培養した。培養後、UVランプを照射して蛍光を発するウエルを大腸菌とした。標準菌株はシスメックススピオメリュー社のBioBall HighDose 10KとBioBall MultiShot-550を使用した。

### 【結果の概要】

(1) 3種の寒天培地を比較すると、クロモアガーECCとXM-Gはコロニーの色調が明瞭に識別できた。クロモカルト・コリフォームは周辺がじんじんになり、大腸菌と大腸菌群の色調の識別がややしくなった(**写真1**)。コリラート18は蛍光発色が明確であった(**写真2**)。

(2) 多摩川原橋の大腸菌数を比較すると1月の検水ではクロモカルト・コリフォームの培地で大腸菌数が高い値を示したが、2月の検水では3種の寒天培地よりも、コリラート18が一番高い値を示した(**図1～2**)。一元配置分散分析法により処理した結果、1月の検水では4種の培地間では有意の差は認められなかつたが、2月の検水では有意の差が認められた(有意水準1%)。

(3)n=5で測定した標準菌株の大腸菌数は4種の培地とも、変動係数は20%前後であった。一元配置分散分析法により処理した結果、標準菌株はどの培地間でも有意の差は認められなかつた(**図3**)。一方、1月採水の多摩川原橋と多摩川原橋に標準菌株を添加した検水では、3種の寒天培地で変動係数は10.3%以下なのに對し、コリラート18は25～28%で3種の培地よりバラツキが大きかつた(**図4**)。

(4) 拝島橋は、変動係数が29～47%と大きなバラツキを示した(**図5**)。コロニー数が10個を下回るとバラツキが大きくなるためと推測された。菌数が少ないと想定される場合は検水量を多くする必要がある。 (5) 一元配置分散分析法により処理した結果、クロモアガーECCとXM-Gの2種の培地間では全ての検体において有意の差は認められなかつたが、寒天培地法の3種の培地間では有意の差が認められた(有意水準1%)。

上記のように特定酵素基質培地の種類によって菌数結果が異なることもあるので、トライアスロン国際基準のような大腸菌数目標値と水域の菌数状況を比較する場合は注意が必要である。

表 1 各培地の酵素基質と判定条件

発酵酵素基質	クロモアガーエック培地	XM-G寒天培地	クロモカルト・コリフォーム寒天	コリラート18
特殊酵素基質		X-GLUC MAGENTA-GAL	X-グルクロニド Salmon-GAL	ONPG MUG
コロニー色	大腸菌: 青 大腸菌群: 赤色	大腸菌: 青色 (青~青紫) 大腸菌群: 赤色(ビンク~赤紫)	大腸菌: 濃青色~紫色 大腸菌群: サーモンピンク~赤色	大腸菌: 紫外線照射により蛍光を発する 大腸菌群: 黄色
培養温度	37°C	35~37°C	35°C	36±1°C
培養時間	24時間	20±2時間	24時間	18時間
単位	CFU/100ml	CFU/100ml	CFU/100ml	MPN/100ml

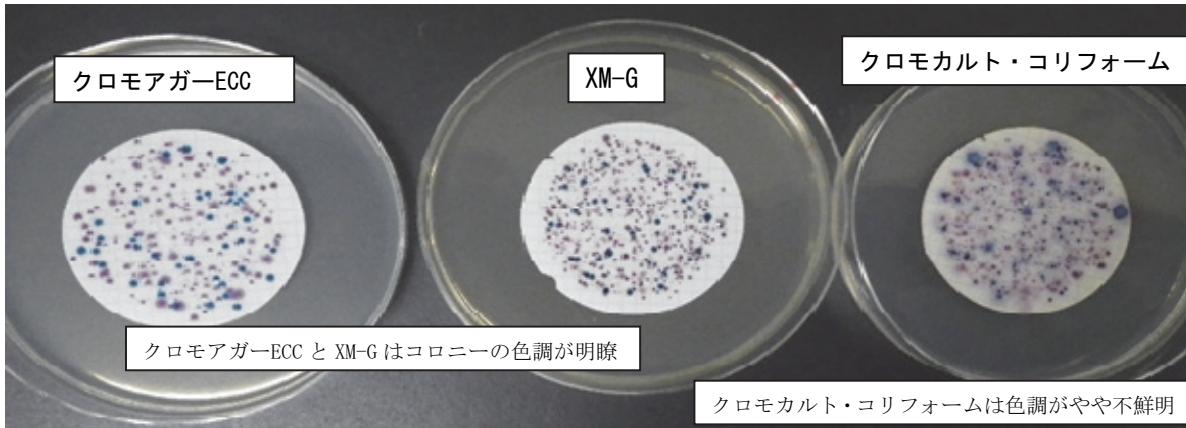


写真1 コロニーの色調の比較

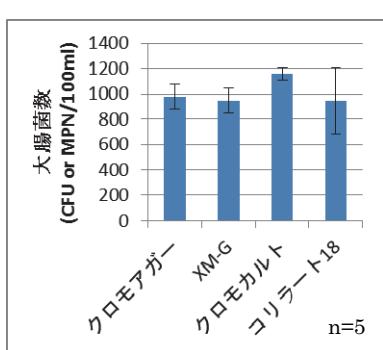


図1 多摩川原橋(2015/1/12)

4種の培地間で有意差：無し

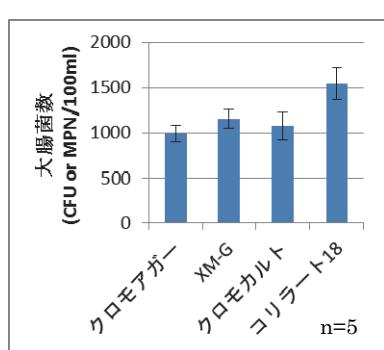


図2 多摩川原橋(2015/2/23)

4種の培地間で有意差：有り

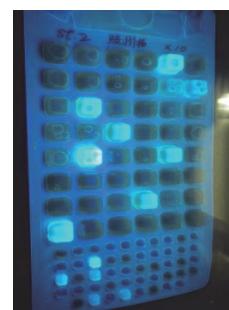


写真2 コリラート18

(蛍光発色が大腸菌)

図2、図4に示すように検水によっては培地の有意差やバラツキが認められた。

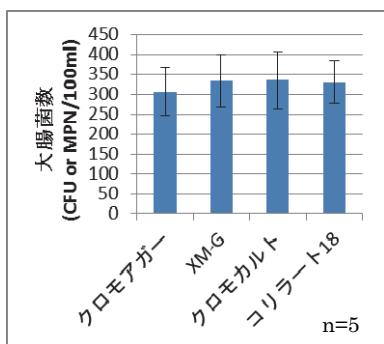


図3 標準菌株(2015/1/12)

標準菌株はどの培地間でも有意差は認められなかった。

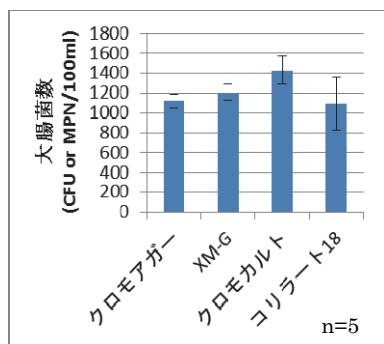


図4 多摩川原橋(2015/1/12)に標準菌株を添加

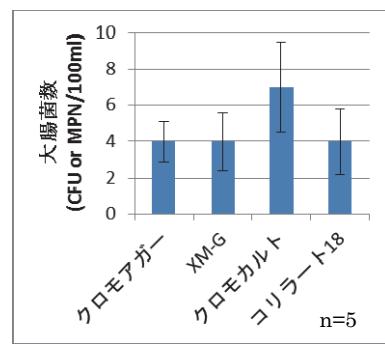


図5 拝島橋(2015/1/12)

コロニー数が10個を下回るとバラツキが大きくなるので、検水量を多くする必要ある。