

## 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—

和波 一夫 石井 真理奈 木瀬 晴美\*

(\*非常勤研究員)

#### 要 旨

水質汚濁防止法の規定に基づく公共用水域の水質測定では、大腸菌群数の測定方法として BGLB 培地最確数法が指定されている。この測定法では、糞便汚染指標菌のみならず水圏や土壌等からの自然由来の菌も測定している可能性が高いが、その実態は十分に把握されていない。大腸菌群とは、グラム陰性、無芽胞の桿菌であって、BGLB 培地では乳糖を分解して酸とガスを発生するものと定義されている。この定義による条件を満たす菌の中で、糞便由来でない菌の存在を確認するため、大腸菌群数を測定したのち、陽性管培養液から DNA を抽出し、16S-rRNA 塩基配列を解読して菌種の推定を行った。その結果、糞便由来でない菌種が陽性管に存在しており、それらの菌種は水圏や土壌由来のものと推測された。

キーワード：大腸菌群、大腸菌、BGLB 培地、ONPG-MUG 法、PCR-DGGE、16S-rRNA

## The survey of the coliform count in river water in Tokyo (2) Genetic analysis of coliform bacteria in the Tama river water

WANAMI Kazuo, ISHII Marina, KISE Harumi\*

(\* Associate researcher)

#### Summary

The usual method to test for the presence of pathogens in river water is to use the coliform count. The standard total coliform MPN test with BGLB medium is widely used as a biological indicator of water pollution. But our survey to various river waters resulted in much higher cell numbers than be expected. The reason can be thought that bacteria belonging to coliform group do not always derive from human and animal feces. Coliform bacteria ferment lactose and produce gas within 48 hours at 36°C. Coliform bacteria not only occur in the bowel of humans and warm blooded animals, but also in fresh surface water and soil. In order to examine this possibility, DNA was extracted from culture positive for total coliform tube, and 16S-rRNA was sequenced for estimation of species. The authors carried out the identification of bacteria which were detected by this method from the Tama river water. The result indicated that the bacteria designated as coliform group included not only human derived bacteria but also bacterial species which apparently derived from water, soil or plants.

Key word : coliform bacteria, E. coli, BGLB, ONPG-MUG, PCR-DGGE, 16S-rRNA

## 1 はじめに

大腸菌群とは、乳糖を分解して酸とガスを産生する通性嫌気性・グラム陰性・無芽胞性の桿菌群であり、衛生的に糞便性汚染の指標となる一群の細菌類の総称である。ただし、大腸菌群とされる細菌類の中には糞便と直接関係のない自然環境に存在するものも含まれている。

水道法の水質基準については2004年に改正が行われ、それまで基準項目であった大腸菌群に替わって大腸菌が基準項目となった。この測定は特定酵素基質培地法が指定されている。一方、環境基本法の水質汚濁に係る環境基準では、大腸菌群数が現在も基準項目となっており、その測定方法はBGLB最確数法が指定されている。このため、水質汚濁防止法にもとづく公共用水域の水質測定調査では、BGLB最確数法を用いて大腸菌群の測定が行われている。この測定法は、糞便汚染指標菌のみならず水圏や土壌等からの自然由来の菌種も測定しているのではないかという問題点が従前から指摘されている<sup>1)</sup>。しかしながら、公共用水域の大腸菌群の菌種は十分に把握されていないのが現状である。そこで、分子生物学的手法を用いて菌種を推定して、各菌種の由来等を検討することとした。なお、本文中の分子生物学的手法に関する専門用語については\*1、\*2のように右上に印をつけ、30頁に説明を付記した。

## 2 調査方法

### (1) 調査地点等

下水処理場放流水が流入していない多摩川・和田橋（青梅市和田2丁目）および多摩川・日野用水堰（八王子市平町）の2地点で調査を行った。また、河川水と比較するためH下水処理場放流水路（八王子市小宮町）1地点で調査を行った。2009年9月8日、10月13日、11月10日に採水を行った。水質一般項目については、工場排水試験方法（日本工業規格 JIS-K0102）に従って測定を行った。大腸菌群数の測定は、前報<sup>2)</sup>に記載した方法のうちBGLB最確数法（以下、BGLB法）と特定酵素基質培地法のONPG-MUG法で行い、大腸菌数の測定はONPG-MUG法で行った。

### (2) PCR-DGGE解析及び遺伝子配列解析

#### ア DNA抽出

BGLB法とONPG-MUG法による大腸菌群数及びONPG-MUG法による大腸菌数の測定で陽性反応した培養液をPCR-DGGE法<sup>\*1</sup>に用いる試料とした。陽性管培養液を希釈系列ごとに滅菌済みの遠心管に回収し、遠心分離（8,000rpm、10分間）後、上澄み液を除いた。滅菌精製水を入れ懸濁し、再度遠心分離（8,000rpm、10分間）後、上澄みを除いた。同様の操作を3回繰り返し、培地成分を除去した。洗浄して、得られた沈殿物をFast DNA Spin Kit for Soil（MP-BIO社製）を用いてDNA<sup>\*2</sup>を抽出し、スピンフィルターで精製した。

#### イ PCR条件の検討

細菌の16S-rRNA<sup>\*3</sup>をターゲットとしたPCR<sup>\*1</sup>を行った。プライマー（Primer、DNAを合成する際に必要な核酸の断片）セットはEUB-341F-GC、UNIV-520Rを採用した。テンプレート濃度を変えてPCRを行い、DGGE<sup>\*1</sup>解析に必要な増幅産物量が得られる条件を決定した。PCR増幅産物は3%アガロースゲル（寒天の主成分）の電気泳動（100V、20分間）を行い、産物が特異的な塩基長であることを確認した。

#### ウ PCR-DGGE及び電気泳動による確認

得られたPCR産物をD code system（Bio Rad社製）により、DGGE<sup>\*1</sup>解析した。10%ゲルを使用し、変性剤の濃度勾配は30～70%に設定した。60℃、130V、7時間の条件で電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイドで30分間染色し、TAE Buffer<sup>\*4</sup>で10分間脱色した後、紫外線蛍光下でバンド撮影を行った。

#### エ バンド撮影とバンドの切り出し

バンド撮影は、次の条件で行った。ゲル撮影装置（BioDoc-It System：UVP社製）で波長365nm、露光時間は自動で撮影した。DGGEでバンドを形成したDNA断片を、マイクロピペットのチップを用いて切り出した。切り出したゲルは滅菌したTE Buffer<sup>\*5</sup>10μlに溶かして、シーケンシング（核酸の塩基配列）解析試料とし、解析時まで冷凍保存した。

#### オ 16S-rRNA塩基配列の解読と菌種の推定

冷凍保存していたシーケンシング用試料をプライマーセットEUB-341F、UNIV-520Rで再度増幅し、遠心式フィルター（MILLIPORE社製）により精製した後、シーケンシング用試料とした。シーケンシングには、ABI PRISM3130 Genetic Analyzer（Applied Biosystems社製）

を用いた。解読した塩基配列は、DDBJ\*6のBLAST\*7を使い、既知種の中から相同性の高い菌を検索した。

以上の作業については、株式会社ヤクルト本社中央研究所分析センターに委託して行った。

### 3 結果と考察

#### (1) 一般水質

水質の測定結果を表1に示す。河川水のBODは1mg/l以下であり環境基準に適合していた。その他の項目も次項(2)で述べる大腸菌群数を除いて良好な水質であった。下水処理場放流水路については、BOD1.5 mg/l以下の低い濃度であり、良好に処理されていると思われた。通常の処理方法では除去率が低い窒素・リンについては、河川水と比較すると高いが、全窒素は排水基準30mg/lの3分の1程度、全リンは排水基準3mg/lの5分の1程度であり、排水規制上の問題はなかった。

#### (2) 大腸菌群数

表2に大腸菌群数と大腸菌数の測定結果を示す。AA類型の和田橋の大腸菌群数は、環境基準(50MPN/100ml以下)に比べて9~98倍高かった。B類型の日野用水堰は、環境基準(5000 MPN/100ml以下)の0.7~2.6倍であった。下水処理場放流水路は環境基準タイプの指定はされていないが、参考までにB類型の環境基準と比較すると7~10倍高かった。

#### (3) PCR-DGGE 解析及び遺伝子配列解析による菌種推定

大腸菌群の測定上、BGLB法では乳糖を分解して酸とガスを発生するものと定義され、ONPG-MUG法ではβ-ガラクトシダーゼにより、ONPG(オルトニトロフェニルβ-D-ガラクトピノラシド)が分解され、黄色の呈色反応をするものと定義されている。また、ONPG-MUG法による大腸菌の定義は、β-グルクロニダーゼにより、MUG(4-メチルウンベリフェリルβ-D-グルクロニド)が分解され、紫外線照射で蛍光を発色するものとされている。以上の反応を示したものを陽性とした。測定試料番号は表3のように表記した。

遺伝子解析に用いる陽性管培養液(陽性管No.)と試料からのDNA抽出結果(濃度)を表4に示す。なお、表4ではBGLB法のエンドポイント、ONPG-MUG法の大腸菌群数のエンドポイント、大腸菌のエンドポイントに編みかけして区別した。

PCR-DGGE泳動結果を図1~3に示す。PCR-DGGEのバンドは、横並びの位置が同じ場合は同一菌種であると推定される。従って、切り出すバンドを選択する際の指標として横並び位置が同じものは省略した。また、MPN法による定量は、希釈率の高い陽性管の数に左右されることから、できるだけ希釈率の高いレーンから切り出しバンドを選択した。この条件下で切り出したバンドの16S-rRNA塩基配列を解読し、BLAST\*7検索して菌種の推定を行った。その結果を表5~7に示し、菌種について、性状由来・公定法による擬陽性反応の有無などを整理して表8に示した。これらの菌種の中で、糞便由来以外と推定されるものは、表9のとおりである。

表9 糞便由来でないと推定される菌種

<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Erwinia carotovora</i>
<i>Kluyvera intermedia</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i>
<i>Pectobacterium cypripedii</i>
<i>Pseudomonas gessardii</i>
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Yokenella regensburgei</i>

表 1 水質測定結果

2009年9月8日																	
項目	天候	採水時刻	pH	電気伝導率 (mS/m)	透視度 (cm)	水温 (°C)	気温 (°C)	BOD (mg/l)	COD (mg/l)	DO (mg/l)	SS (mg/l)	T-N (mg/l)	NO3-N (mg/l)	NO2-N (mg/l)	NH4-N (mg/l)	T-P (mg/l)	PO4-P (mg/l)
調査地点																	
多摩川・和田橋	晴	10:30	8.1	10.5	>50.0	20	28	0.6	1.2	9.1	0.6	0.66	0.63	0.00	0.00	0.00	0.00
多摩川・日野用水堰	曇	11:35	8.5	15.6	>50.0	23.2	29	0.6	1.8	8.8	3.5	1.25	1.25	0.01	0.00	0.00	0.00
H下水処理場放流水路	曇	12:00	6.8	67.8	>50.0	26.6	29.2	1.6	8.4	6.8	1.7	11.35	10.41	0.02	0.06	0.50	0.40
2009年10月13日																	
項目	天候	採水時刻	pH	電気伝導率 (mS/m)	透視度 (cm)	水温 (°C)	気温 (°C)	BOD (mg/l)	COD (mg/l)	DO (mg/l)	SS (mg/l)	T-N (mg/l)	NO3-N (mg/l)	NO2-N (mg/l)	NH4-N (mg/l)	T-P (mg/l)	PO4-P (mg/l)
調査地点																	
多摩川・和田橋	晴	9:10	7.4	9.37	>50.0	15.7	20.5	0.5	1.2	9.6	1.3	0.78	0.64	0.01	0.01	0.02	0.00
多摩川・日野用水堰	晴	10:15	7.6	13.6	>50.0	16.9	23.5	0.5	1.3	9.6	2.1	1.76	1.43	0.02	0.00	0.00	0.00
H下水処理場放流水路	晴	10:40	6.6	109	>50.0	24	24	1.3	8.9	7.1	1.2	11.35	8.89	0.02	0.01	0.59	0.50
2009年11月10日																	
項目	天候	採水時刻	pH	電気伝導率 (mS/m)	透視度 (cm)	水温 (°C)	気温 (°C)	BOD (mg/l)	COD (mg/l)	DO (mg/l)	SS (mg/l)	T-N (mg/l)	NO3-N (mg/l)	NO2-N (mg/l)	NH4-N (mg/l)	T-P (mg/l)	PO4-P (mg/l)
調査地点																	
多摩川・和田橋	晴	9:25	8.0	10	>50.0	13.4	18.5	0.5	1.1	10.6	0.5	0.60	0.60	0.01	0.00	0.01	0.00
多摩川・日野用水堰	晴	10:25	8.0	14.2	>50.0	14.7	20.5	0.6	1.2	10.6	1.9	1.10	1.10	0.03	0.00	0.02	0.00
H下水処理場放流水路	晴	10:50	6.8	127	>50.0	22.4	20.8	1.5	9.5	7.3	1.9	9.76	8.89	9.26	0.06	0.25	0.23

表 2 大腸菌群数等の測定結果

		(単位: MPN/100ml)								
試験項目	試験方法	多摩川・和田橋			多摩川・日野用水堰			H下水処理場放流水路		
		9月8日	10月13日	11月10日	9月8日	10月13日	11月10日	9月8日	10月13日	11月10日
大腸菌群数	BGLB	$3.3 \times 10^3$	$4.9 \times 10^3$	$4.6 \times 10^2$	$4.9 \times 10^3$	$1.3 \times 10^4$	$3.3 \times 10^3$	$4.9 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$	$4.9 \times 10^4$
	ONPG-MUG	$4.9 \times 10^3$	$7.9 \times 10^3$	$1.1 \times 10^3$	$7.0 \times 10^3$	$7.9 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	$4.9 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$	$4.9 \times 10^4$
大腸菌数	ONPG-MUG	$3.3 \times 10^1$	$3.3 \times 10^1$	$4.6 \times 10^1$	$1.7 \times 10^1$	$7.9 \times 10^1$	$7.9 \times 10^2$	$1.3 \times 10^4$	$4.9 \times 10^3$	$4.9 \times 10^3$

表 3 大腸菌群数等の試料番号

地点名	採取月日		
	9月8日	10月13日	11月10日
多摩川・和田橋	1-1	2-1	3-1
多摩川・日野用水堰	1-2	2-2	3-2
H下水処理場放流水路	1-3	2-3	3-3

表 4 陽性管培養液（陽性管No.）

9月8日【1回目試料】							
試料 1-1							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	100	1	10	100	
陽性管No.	1-1-1	1-1-2	1-1-3	1-1-4	1-1-5	1-1-6	
DNA濃度 (ng/μl)	33.8	63.7	25.8	230.0	155.1	105.2	
試料 1-2							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	100	1000	1	10	100
陽性管No.	1-2-1	1-2-2	1-2-3	1-2-4	1-2-5	1-2-6	1-2-7
DNA濃度 (ng/μl)	49.8	48.9	35.8	31.8	186.1	183.8	130.1
試料 1-3							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	100	1000	1	10	100
陽性管No.	1-3-1	1-3-2	1-3-3	1-3-4	1-3-5	1-3-6	1-3-8
DNA濃度 (ng/μl)	134.2	120.3	80.9	54.5	206.8	412.4	303.6
10月13日【2回目試料】							
試料 2-1							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	100	1	10	100	
陽性管No.	2-1-1	2-1-2	2-1-3	2-1-4	2-1-5	2-1-6	
DNA濃度 (ng/μl)	31.4	81.3	34.0	136.4	152.4	115.5	
試料 2-2							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	100	1	10	100	
陽性管No.	2-2-1	2-2-2	2-2-3	2-2-4	2-2-5	2-2-6	
DNA濃度 (ng/μl)	12.5	52.8	19.1	261.6	214.1	125.3	
試料 2-3							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	100	1000	1	10	100
陽性管No.	2-3-1	2-3-2	2-3-3	2-3-4	2-3-5	2-3-6	2-3-7
DNA濃度 (ng/μl)	38.9	40.7	45.9	7.8	240.2	267.0	238.5
11月10日【3回目試料】							
試料 3-1							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	100	1	10	100	
陽性管No.	3-1-1	3-1-2	3-1-3	3-1-4	3-1-5	3-1-6	
DNA濃度 (ng/μl)	78.2	58.8	3.8	157.1	29.7	50.0	
試料 3-2							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	1	10	100		
陽性管No.	3-2-1	3-2-2	3-2-3	3-2-4	3-2-5		
DNA濃度 (ng/μl)	15.8	28.2	322.9	65.9	11.6		
試料 3-3							
使用培地	ONPG-MUG				BGLB		
希釈倍率	1	10	100	1000	1	10	100
陽性管No.	3-3-1	3-3-2	3-3-3	3-3-4	3-3-5	3-3-6	3-3-7
DNA濃度 (ng/μl)	34.3	76	62.3	15.6	99.4	78.3	86.8

注) 陽性管No.の2桁目までの番号は表3に対応する。

BGLB法のエンドポイント、ONPG-MUG法のエンドポイントに編みかけた。ONPG-MUG法では3-2-2と希釈倍率の低い方が大腸菌数のエンドポイント。

表9のうち *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科。ヒトをはじめ多くの動物の腸管内や広く自然界に常在している細菌。腸内細菌科の細菌は全てグラム陰性菌で、通性嫌気性の桿菌であり、芽胞は作らない。)に属さないものは、*Aeromonas* 属、*Pseudomonas* 属、*Sphingomonas* 属 及び *Stenotrophomonas* 属であった。以下に、これらの特徴を述べる。

*Aeromonas* 属は、水系の常在菌で、河川や湖沼または河口付近の汽水域、沿岸海水などからも分離され、あらゆる水環境に存在している。

*Aeromonas hydrophila* は、ONPGの分解活性を持ち、菌株によっては乳糖利用性を持つ。この菌種は、水圏や土壌由来のことが多いので擬陽性の可能性が考えられる。この菌種による魚病が知られており、日本ではおもにウナギの病気として問題となるが、コイ、キンギョ、アユにも同様な魚病がある。ときにヒトの日和見感染(創傷感染)の原因となり、また、下痢などをおこす食中毒の原因にもなるので、厚生省で食中毒細菌として指定されている(1982年)<sup>3)</sup>。

*Pseudomonas* 属<sup>4)</sup>は100種ほどが知られており、水圏、土壌等自然界に広く分布し、その生息域は幅広い(土壌、淡水、海水など)。自然界における重要な分解者で、様々な有機化合物を分解する能力があるため、地球上の炭素循環に大きく貢献していると考えられている。低栄養素で発育できるものから、植物・動物に寄生するものまで知られており、そのうちごく一部の菌が、ヒトに病原性を示す。

*Sphingomonas* 属は、多環芳香族分解菌として多く報告されている細菌類である。*Sphingomonas paucimobilis* は、土壌や水圏由来のことが多い。*Stenotrophomonas maltophilia* は *Xanthomonas maltophilia* から改名されたものであり<sup>5)</sup>、土壌や汚水に生息する多剤耐性の細菌で本菌のみの感染では、それほど病原性を発揮しないといわれている<sup>6)</sup>。

腸内細菌科に属するが、*Erwinia carotovora*、*Kluyvera intermedia*、*Pectobacterium carotovorum*、*Pectobacterium cypripedii*、*Yokenella regensburgei* は土壌や水圏由来のことが多い。*Erwinia carotovora* の亜種である *Erwinia carotovora subsp. Carotovora* (Jones) Bergey et al. は、ハクサイ軟腐病の病原菌であり、宿主範囲が広く、ダイコン、トマト、ジャガイモ、

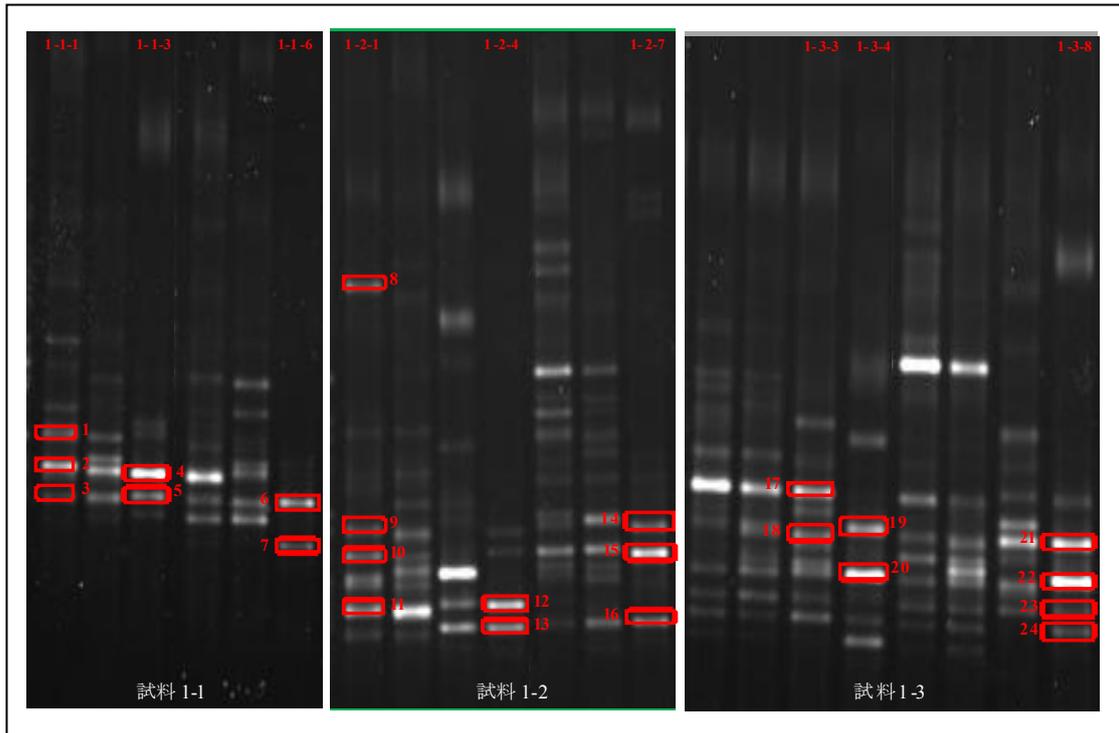


図1 9月8日試料 PCR-DGGE 泳動結果

表5 9月8日試料 菌種の推定 (16S-rRNA 塩基配列、BLAST 検索)

試料No.	測定方法	測定項目	陽性管No.	バンド	BLAST 近縁菌種名	相同率	ACCESSION
				No.			
1-1	ONPG-MUG	大腸菌	1-1-1	1	<i>Kluyvera intermedia</i> strain BOP1-1	156/159 (98%)	FJ719132
				2	<i>Citrobacter freundii</i> strain B25	159/159 (100%)	FJ494899
				3	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	149/150 (99%)	X94101
		大腸菌群	1-1-3	4	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	149/150 (99%)	X94101
				5	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	149/150 (99%)	X94101
	BGLB	大腸菌群	1-1-6	6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	129/129 (100%)	FJ823005
				7	<i>Aeromonas salmonicida</i> strain PA-283	159/159 (100%)	GQ266405
1-2	ONPG-MUG	大腸菌	1-2-1	8	<i>Pseudomonas gessardii</i>	159/159 (100%)	FJ943496
				9	<i>Escherichia coli</i>	162/162 (100%)	Z83205
				10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain Pm52	159/159 (100%)	EU862086
				11	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	159/159 (100%)	X74688
		大腸菌群	1-2-4	12	<i>Serratia fonticola</i> strain G116	158/159 (99%)	EF204295
				13	<i>Serratia fonticola</i> strain G116	159/159 (100%)	EF204295
				14	<i>Citrobacter werkmanii</i> strain Hb-0702	159/159 (100%)	GQ487558
	BGLB	大腸菌群	1-2-7	15	<i>Kluyvera intermedia</i>	159/159 (100%)	FJ719137
				16	<i>Aeromonas veronii</i>	159/159 (100%)	X74684
				17	<i>Escherichia coli</i>	162/162 (100%)	Z83205
1-3	ONPG-MUG	大腸菌	1-3-3	18	<i>Cronobacter sakazakii</i>	134/134 (100%)	GQ918494
				19	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain GS-4-08	159/159 (100%)	FJ816026
		大腸菌群	1-3-4	20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	159/159 (100%)	EU723828
				21	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain KNUC181	159/159 (100%)	EF474089
				22	<i>Pectobacterium cypripedii</i> strain gx-104	159/159 (100%)	FJ823047
	BGLB	大腸菌群	1-3-8	23	<i>Pectobacterium cypripedii</i> strain gx-104	159/159 (100%)	FJ823047
				24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	158/159 (99%)	FJ823263

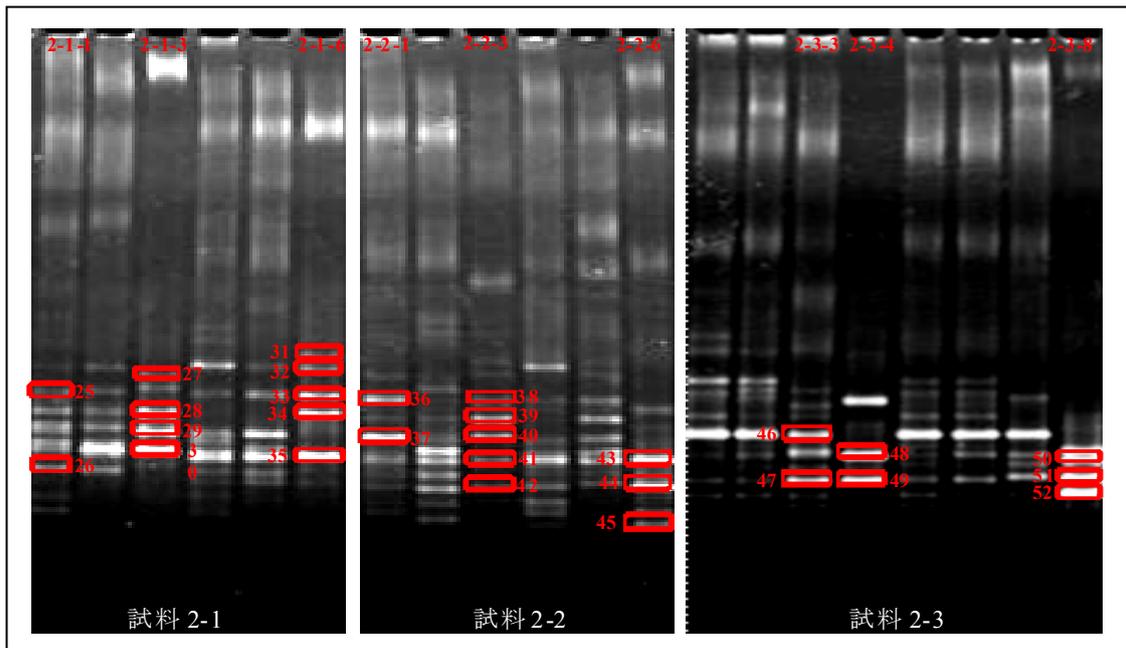


図2 10月13日試料 PCR-DGGE 泳動結果

表6 10月13日試料 菌種の推定 (16S-rRNA 塩基配列、BLAST 検索)

試料No.	測定方法	測定項目	陽性管No.	バンド	BLAST 近縁菌種名	相同率	ACCESSION
				No.			
2-1	ONPG-MUG	大腸菌	2-1-1	25	<i>Raoultella ornithinolytica</i> isolate IPB7	134/134 (100%)	AM232730
		大腸菌群	2-1-3	26	<i>Citrobacter freundii</i> strain B25	134/134 (100%)	FJ494899
				27	<i>Escherichia coli</i>	134/134 (100%)	FJ797395
				28	<i>Escherichia coli</i> strain ES21	133/134 (99%)	FJ789743
				29	<i>Escherichia coli</i>	134/134 (100%)	Z83205
	30			<i>Serratia proteamaculans</i> strain Q42-3	134/134 (100%)	EU104734	
	BGLB	大腸菌群	2-1-6	31	<i>Klebsiella ornithinolytica</i> strain 590681	134/134 (100%)	Y17662
				32	<i>Citrobacter braakii</i> isolate CCM33B	134/134 (100%)	FN433049
				33	<i>Klebsiella ornithinolytica</i> strain 590681	134/134 (100%)	Y17662
				34	<i>Citrobacter braakii</i> isolate CCM33B	134/134 (100%)	FN433049
35				<i>Enterobacter aerogenes</i>	134/134 (100%)	FJ823005	
2-2	ONPG-MUG	大腸菌	2-2-1	36	<i>Klebsiella ornithinolytica</i> strain 590681	134/134 (100%)	Y17662
		大腸菌群	2-2-3	37	<i>Escherichia coli</i>	134/134 (100%)	Z83205
				38	<i>Klebsiella ornithinolytica</i> strain 590681	134/134 (100%)	Y17662
				39	<i>Citrobacter braakii</i> isolate CCM33B	134/134 (100%)	FN433049
				40	<i>Yokenella regensburgei</i>	132/134 (98%)	AB519797
	41			<i>Klebsiella oxytoca</i> strain GS-4-08	134/134 (100%)	FJ816026	
	BGLB	大腸菌群	2-2-6	42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	134/134 (100%)	Y17657
				43	<i>Klebsiella oxytoca</i> strain GS-4-08	134/134 (100%)	FJ816026
				44	<i>Aeromonas veronii</i>	127/130 (97%)	X74684
				45	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	133/134 (99%)	AP006725
46				<i>Escherichia coli</i>	134/134 (100%)	Z83205	
2-3	ONPG-MUG	大腸菌	2-3-3	47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	134/134 (100%)	Y17657
		大腸菌群	2-3-4	48	<i>Enterobacter aerogenes</i>	134/134 (100%)	FJ823005
				49	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain H3	134/134 (100%)	FJ009375
	50			<i>Escherichia vulneris</i>	130/131 (99%)	AF530476	
	BGLB	大腸菌群	2-3-8	51	<i>Escherichia vulneris</i>	134/134 (100%)	AF530476
				52	<i>Escherichia vulneris</i>	134/134 (100%)	AF530476

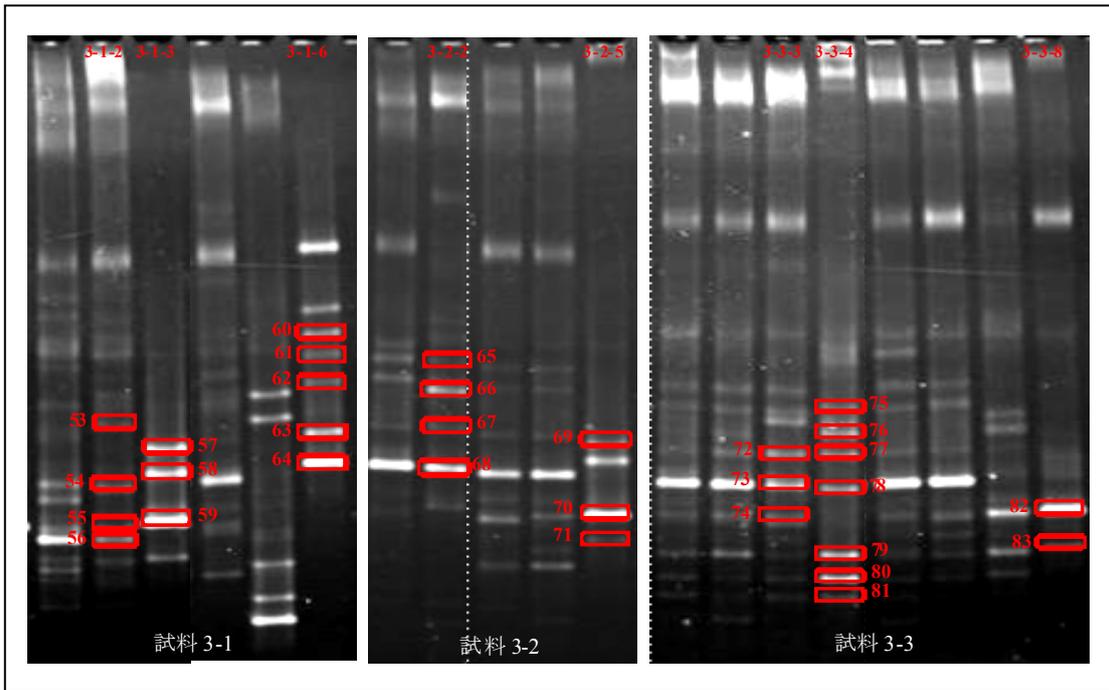


図3 11月10日試料 PCR-DGGE 泳動結果

表7 11月10日試料 菌種の推定 (16S-rRNA 塩基配列、BLAST 検索)

試料No.	測定方法	測定項目	陽性管No.	バンド	BLAST 近縁菌種名	相同率	ACCESSION
				No.			
3-1	ONPG-MUG	大腸菌	3-1-2	53	<i>Erwinia carotovora</i> strain DSM 30168	127/127 (100%)	AJ233411
				54	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	126/126 (100%)	FJ593035
				55	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain TCCC11321	126/126 (100%)	FJ393309
				56	<i>Klebsiella terrigena</i> strain ATCC33257T	131/131 (100%)	AB482265
	BGLB	大腸菌群	3-1-6	57	<i>Erwinia carotovora</i> strain DSM 30168	127/127 (100%)	AJ233411
				58	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	126/126 (100%)	FJ593035
				59	<i>Erwinia carotovora</i> strain DSM 30168	126/126 (100%)	AJ233411
				60	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain ES38	131/131 (100%)	FJ789751
				61	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain ES38	131/131 (100%)	FJ789751
				62	<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain ES38	131/131 (100%)	FJ789751
3-2	ONPG-MUG	大腸菌 大腸菌群	3-2-2	63	<i>Citrobacter braakii</i> isolate CCM33B	131/131 (100%)	FN433049
				64	<i>Klebsiella terrigena</i> strain ATCC33257T	131/131 (100%)	AB482265
				65	<i>Shigella flexneri</i> strain A6	129/131 (98%)	GQ304782
				66	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain Pm52	159/159 (100%)	EU862086
	BGLB	大腸菌群	3-2-5	67	<i>Escherichia coli</i>	160/160 (100%)	Z83205
				68	<i>Erwinia psidii</i> strain 8423	120/122 (98%)	EU490596
				69	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ANSE3	131/131 (100%)	GU296673
				70	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ANSE3	131/131 (100%)	GU296673
3-3	ONPG-MUG	大腸菌	3-3-3	71	<i>Aeromonas hydrophila</i>	130/131 (99%)	X74677
				72	<i>Escherichia coli</i> strain ES21	129/129 (100%)	FJ789743
		大腸菌群	3-3-4	73	<i>Escherichia coli</i>	160/160 (100%)	Z83205
				74	<i>Enterobacter aerogenes</i> strain LCR78	131/131 (100%)	FJ976587
				75	<i>Providencia alcalifaciens</i> strain DSM	154/159 (96%)	EU587047
				76	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain Pm52	159/159 (100%)	EU862086
				77	<i>Citrobacter braakii</i> isolate CCM33B	131/131 (100%)	FN433049
				78	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	131/131 (100%)	EU723828
	BGLB	大腸菌群	3-3-8	79	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	131/131 (100%)	Y17657
				80	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	131/131 (100%)	EU723828
3-3	ONPG-MUG	大腸菌	3-3-3	81	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain Kp 5-1	131/131 (100%)	FJ823263
				82	<i>Klebsiella oxytoca</i>	160/160 (100%)	FJ827153
3-3	BGLB	大腸菌群	3-3-8	83	<i>Aeromonas hydrophila</i>	160/160 (100%)	X87271

表 8 推定菌種一覧

推定菌種名	グラム陰性	芽胞の有無	酸性&ガス発生	糞便由来情報	糞便性大腸菌群	疑陽性
<i>Aeromonas hydrophila</i>	○	×	○	×		○
<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ANSE3	○	×	○	×		○
<i>Aeromonas salmonicida</i> strain PA-283	○	×	○	×		○
<i>Aeromonas veronii</i>	○	×	○	×		○
<i>Citrobacter braakii</i> isolate CCM33B	○	×	○	○	○	
<i>Citrobacter freundii</i> strain B25	○	×	○	○	○	
<i>Citrobacter werkmanii</i> strain Hb-0702	○	×	○	○	○	
<i>Cronobacter sakazakii</i>	○	×	○	腸	○	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	○	×	○	○	○	
<i>Enterobacter aerogenes</i> strain LCR78	○	×	○	○	○	
<i>Enterobacter aerogenes</i> strain TCCC11321	○	×	○	○	○	
<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain H3	○	×	○	○	○	
<i>Erwinia carotovora</i> strain DSM 30168	○	×	○	環境		○
<i>Erwinia psidii</i> strain 8423	○	×	○	環境		○
<i>Escherichia coli</i>	○	×	○	○	○	
<i>Escherichia coli</i> strain ES21	○	×	○	○	○	
<i>Escherichia vulneris</i>	○	×	○	○	○	
<i>Klebsiella ornithinolytica</i> strain 590681	○	×	○	○	○	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	○	×	○	○	○	
<i>Klebsiella oxytoca</i> strain GS-4-08	○	×	○	○	○	
<i>Klebsiella oxytoca</i> strain KNUC181	○	×	○	○	○	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	○	×	○	○	○	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NTUH-K2044	○	×	○	○	○	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain Kp 5-1	○	×	○	○	○	
<i>Klebsiella terrigena</i> strain ATCC33257T	○	×	○	○	○	
<i>Kluyvera intermedia</i>	○	ND	○	環境		○
<i>Kluyvera intermedia</i> strain BOP1-1	○	ND	○	環境		○
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	○	×	○	環境		○
<i>Pectobacterium cypripedii</i> strain gx-104	○	×	○	環境		○
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	○	ND	v	○*	○	
<i>Providencia alcalifaciens</i> strain DSM	○	ND	×	○	○	
<i>Pseudomonas gessardii</i>	○	×	×	× (水)		○
<i>Raoultella ornithinolytica</i> isolate IPB7	○	×	○	○*	○	
<i>Raoultella ornithinolytica</i> strain ES38	○	×	○	○*	○	
<i>Serratia fonticola</i> strain G116	○	×	○	○*	○	
<i>Serratia proteamaculans</i> strain Q42-3	○	×	○	○*	○	
<i>Shigella flexneri</i> strain A6	○	×	○	○	○	
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	○	×	○	環境, ○*		○
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain Pm52	○	×	○	胸膜液		○
<i>Yokenella regensburgei</i>	○	ND	ND	昆虫		○

注) V : variable 変異種、 *Plesiomonas shigelloides* は、  
株により乳糖を分解するものとし、ないものが存在する。  
乳糖の分解速度は遅い。  
\* : 水圏や土壌にも生息する。

ニンジンなど多くの茎葉菜類、果菜類に感染する。栽培終了後は被害株残渣と共に土中に残り、土と共に飛散する<sup>7)</sup>。

以上のように陽性管には、糞便由来でないと推定される菌種も存在することが分かった。

(4) BGLB 法と ONPG-MUG 法の検出差

BGLB 法では、希釈率の高い培養管の多くから *Aeromonas hydrophila* が検出されている。擬陽性の反応を示す可能性のあるこの菌は、ONPG-MUG 法では不検出であった。一方、*Erwinia carotovora* と *Pectobacterium carotovorum* の 2 種の菌種は、BGLB 法の培養管からはほとんど検出されていない。ONPG-MUG 法の陽性管で検出された *Providencia alcalifaciens* は、ヒト糞便から検出されるが、乳糖は分解しない。高野敬志ら<sup>8)</sup> が、水道原水、水道浄水、地下水、河川水について行った大腸菌群試験では、ONPG-MUG 法と BGLB 法の測定方法による結果が一致しない試料 (ONPG-MUG 法では陽性、BGLB 法では陰性) からの分離菌種は *Enterobacter agglomerans*、*Enterobacter cloacae*、*Kluyvera ascorbata* 等であった。このように BGLB 法と ONPG-MUG 法は菌種によって陽性反応が異なることがあるので、両法の大腸菌群数が大きく異なるときは菌種構成による影響を受けている可能性も考えられる。

(5) 大腸菌陽性管中の菌種

ONPG-MUG 法の測定で大腸菌陽性と判定された陽性管中の推定菌種は、表 5 の測定項目・大腸菌・陽性管 No.1-1-1、1-2-1、1-3-3、表 6 の大腸菌・陽性管 No.2-1-1、2-2-1、2-3-3、表 7 の大腸菌・陽性管 No.3-1-2、3-2-2、3-3-3 の各行に記したものであり、大腸菌 (*Escherichia coli*) 以外の菌種が多種共存していた。なお、No.1-1-1、No.2-1-1、No.3-1-2 については、いずれも和田橋の検体であるが、*Escherichia coli* が推定菌種のなかに現れていない。これは PCR-DGGE の切出しバンド数の制約によりこのような結果となったのか、あるいは擬陽性菌種のみで構成されていたか、理由は不明である。

(6) 各地点の比較

PCR-DGGE のバンドから切り出した範囲内ではあるが、表 5~7 の推定菌種を比較すると、各地点の菌種構成は異なり、同じ地点でも調査月によって菌種構成は異なった。推定菌種のうち糞便性由来ではないと考えられる菌

種の数 (BGLB 法と ONPG-MUG の両法あわせて) は、表 10 のとおりである。和田橋の 9 月調査では 3 菌種、10 月調査では 0 菌種、11 月調査では 2 菌種であり、日野用水堰の 9 月調査では 4 菌種、10 月調査では 2 菌種、11 月調査では 4 菌種であった。10 月調査では両地点とも糞便由来でないと考えられる菌種数の割合が低かった。各調査日の前 1 週間の降雨総量 (気象庁八王子地点) をみると、9 月調査では 6mm、10 月調査では 162mm、11 月調査では 1.5mm であり、10 月は他月に比べ降雨総量が著しく多かった。ただし、10 月調査日時点では、前 1 週間の降雨による濁りの影響はすでになくなっており、透視度は高かった。また、川床は、増水による剥離作用の影響を受けて藻類などの付着物が平常時に比べて非常に少ない状態であった。つまり、増水によって付着物や堆積物が取り除かれた、いわゆるフラッシュアウト後の河川が澄んだ状態であった。フラッシュアウトによる大腸菌群菌種構成の変化を解明するためには、川床に付着する菌種構成を調べていくことが必要である。

表 10 非糞便性菌種数の割合

		9月	10月	11月
多摩川・和田橋	非糞便性菌種数	3	0	2
	菌種数	5	7	7
	非糞便性菌種数/菌種数	0.6	0.0	0.3
多摩川・日野用水堰	非糞便性菌種数	4	2	4
	菌種数	8	8	5
	非糞便性菌種数/菌種数	0.5	0.3	0.8
H下水道処理場放流水路	非糞便性菌種数	1	0	2
	菌種数	6	5	9
	非糞便性菌種数/菌種数	0.2	0.0	0.2

4 おわりに

大腸菌群数の測定上の問題点を明らかにするため、多摩川の河川水等を試料として、分子生物学的方法を用いて菌種の推定を行った。その結果、糞便由来でない菌種が複数存在し、これらの菌種による擬陽性反応の可能性があることが示唆された。一方、糞便由来と推定される菌種も多く認められ、BGLB 法では陽性反応を示さないが、ONPG-MUG 法では糞便由来と推定される菌種も認められた。公共用水域の水質測定において糞便由来と自然由来の菌種のどちらがより大腸菌群数の測定値に影響しているかを明らかにすることは、今後の課題である。

## 参考文献

- 1) 上野英世：大腸菌群数の周辺，用水と廃水， Vol. 1 9, No. 5, 555-565 (1977).
- 2) 和波一夫ら：都内河川の大腸菌群数に関する研究 (1) 多摩川における大腸菌群数と大腸菌の挙動，東京都環境科学研究所年報, 9-19 (2010).
- 3) [http://www.weblio.jp/content/Aeromonas+hydrop\\_hila](http://www.weblio.jp/content/Aeromonas+hydrop_hila) <http://micro.fhw.oka-pu.ac.jp/microbiology/g-negative/aeromonas.html>.
- 4) Sophie Verhille, Nader Baida, Fouad Dabboussi, Monzer Hamze, Daniel Izard, and Henri Leclerc. *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 1559 - 1572, (1999).
- 5) Norberto J. Palleroni and John F. Bradbury. *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43: 606 - 609. (1993).
- 6) <http://ej.islib.jp/ejournal/1543102784.html>
- 7) [http://www.nrs.pref.yamaguchi.lg.jp/hp\\_open/a1720160/00000008/seitai\\_nanpu.pdf](http://www.nrs.pref.yamaguchi.lg.jp/hp_open/a1720160/00000008/seitai_nanpu.pdf)
- 8) 高野敬志ら：「特定酵素基質法」および「LB-BGLB法」による大腸菌群試験結果および陽性分離菌から考察した両試験方法の一致率について，北海道衛生研究所報，第 45 集，54-57 (1995).

## 用語説明

\*1 **PCR-DGGE 法**：PCR は polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応) の略記で、DNA を増幅するための原理。手法を指す場合は PCR 法と呼ばれる。DGGE は Denaturing gradient gel electrophoresis (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) の略記で、同じ長さの二本鎖 DNA 断片を塩基配列の違いに基づいて分離する電気泳動法である。この特徴を利用して、遺伝子の変異の検出や微生物群集構造解析など、DNA 多型の解析をする。

\*2 **DNA** (デオキシリボ核酸)、**RNA** (リボ核酸)：ともにヌクレオチドの重合体である核酸。DNA は主に核の中で情報の蓄積・保存、RNA はその情報の一時的な処理を担い、必要に応じて合成・分解される。RNA 合成は専ら DNA を鋳型とした酵素 RNA ポリメラーゼによる転写によって行われる。

\*3 **16S-rRNA**：rRNA は、細胞のリボソーム小サブユニットを構成する RNA\*2 であり、バクテリアでは大きさによって 23S、16S、5S rRNA に分類される。rRNA はウイルスを除く全生物に存在し、タンパク質合成に関わる重要な分子であるため、進化速度が比較的遅く、種のレベルにおいて高い相同性を示すことが知られている。16S rRNA の塩基配列を用いて系統解析や環境中における細菌の群集構造解析が行われている。

\*4 **TAE Buffer**：TAE 緩衝液は、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (通常はトリス (Tris) と省略) と酢酸 (Acetate)、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) からなる緩衝液で、アガロースゲル電気泳動で核酸を分離するのに用いられる。

\*5 **TE Buffer**：TE 緩衝液はトリス (Tris) とエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) からなる緩衝液で、DNA や RNA の分解を防ぐ目的で添加される。

\*6 **DBJ**：(DNA Data Bank of Japan、日本 DNA データバンク) の略記で、日本の国立遺伝学研究所が作成している DNA の塩基配列の配列データベース

\*7 **BLAST**：(Basic Local Alignment Search Tool) は、DNA の塩基配列あるいはタンパク質のアミノ酸配列のシーケンスアライメント (DNA、RNA、タンパク質の一次配列 一次構造の類似した領域を特定できるように並ぶように並べたもの) を行うためのアルゴリズムプログラム