

メンブレンフィルター (MF) 法を用いる環境水中の大腸菌数の計測方法

齋藤 孝輔

日本ポール株式会社 応用技術研究所 (SLS)

はじめに

河川、湖沼、指定遊泳区域などの水生環境における微生物汚染は、人間の健康に対する脅威と考えられています⁽¹⁾。水系における糞便性大腸菌は、糞便性汚染の指標として一般的に使用されています⁽²⁾。水系における糞便性大腸菌レベルの許容限界は、国の環境機関によって管理されています⁽³⁾。

恒温動物に存在する大腸菌 (*Escherichia coli* (*E. coli*)) は、水質基準の指標として利用されています⁽⁴⁾。大腸菌は、同様の性質を持つ非病原性細菌群を含む他の大腸菌群とは異なり、糞便汚染がない場合にはほとんど検出されません⁽²⁾。大腸菌は、β-グルクロニダーゼ (GUD) 活性によって容易に検出することができます。このことは、大腸菌の94-96%がGUDを産生するためです⁽⁵⁾。大腸菌の検出は、X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronic acid) を加えた寒天培地を利用し、酵素-基質反応による発色物質が青色のコロニーを形成することにより観測することができます。

メンブレンフィルター (MF) 法は、汚染された水溶液中の微生物を検出する方法として、規制当局に承認されている方法です。従来の多くの方法と比較して、MF法は大量 (>100 mL) のサンプルを濃縮することができ、サンプル中のあらゆる微生物をメンブレン上で培養し、コロニー形成単位 (CFU) の定量化によって、サンプル中の微生物濃度を検出することができます。マイクロファンネルフィルターファンネルはガンマ線照射滅菌済みで、直径47 mmのメンブレンフィルターを内蔵しています。つまり、ファンネル部とメンブレンが一体型となっているため、メンブレンを取り付ける作業やファンネルの滅菌操作が不要なため、プロセスの効率化や交差汚染リスクの低減に寄与します。

本アプリケーションノートでは、GN-6メトリセルメンブレン (セルロース混合エステル) を使用したマイクロファンネルフィルターファンネル (孔径0.45 μm, P/N 4800) について、MF法による大腸菌回収率とコロニー形態が評価されています。

使用するサンプルと実験方法

1. サンプル調製

大腸菌 (ATCC 8739) の原液100 μLを培養液3 mLが入ったチューブに分注し、37°Cで一晩 (18~20時間) 培養しました。

培養後、菌液の濃度をMcFarland標準液と比較しました。比較により菌液の濁度は、2-4 (600-1200×10⁶ cells/mL) の濁度を示しました。

この大腸菌の溶液を連続希釈して、10⁶倍希釈液を調製しました。この希釈液4 mLを培養液4 mLが入ったチューブに分注し、300-600 cells/mLの濃度になるように調製しました。

2. 試薬の調製

培地の調製: 8 g の栄養培地 (BD*) を1 Lの超純水に溶解して調製しました。この溶液をオートクレーブで121°C、20分間滅菌し、さらに使用するまで4°Cで保存しました。

CHROMagar* ECC寒天培地プレートの調製: CHROMagar ECCの培地400 mLに相当する粉末を、製造元の指示に従い、超純水400 mLに添加しました。この溶液を121°Cで20分間オートクレーブ滅菌しました。滅菌後、溶液を60°Cまで冷却し、20 mLを各プレートの調製に使用しました。液体寒天培地をプレーティングする際には、気泡が入らないように注意しました。固化後、プレートを乾燥・反転させ、透明な袋に入れて4°Cで保存しました。

洗浄液 (ペプトン塩緩衝液 (pH 7.0)): ペプトン塩培地の粉末161 gを超純水10 Lに溶解し、ペプトン緩衝液を調製しました。この溶液をオートクレーブで121°C、20分間滅菌し、さらに使用するまで室温で保存しました。

3. MF法

マイクロファンネルフィルターファンネル (Pall, PN 4800) を、マイクロファンネルアダプター (Pall, PN 4890) を用いてラボラトリー・マニホールド (Pall, PN 4889) に設置しました。洗浄液100 mLと大腸菌溶液100 μ Lをマイクロファンネルフィルターファンネルに加え、60 kPaで吸引ろ過しました。吸引ろ過後、ファンネル上部を取り外し、滅菌したピンセットを利用して、メンブレンを回収し、CHROMagar ECCプレートに設置しました。100 mLの洗浄液と一緒に100 μ Lの培養液をメンブレンでろ過し、ネガティブコントロールを調製しました。MF法との対比として平板塗抹法による大腸菌検出を実施しました。平板塗抹法として、菌液100 μ Lを直接CHROMager ECCプレートに塗布した密度コントロールのプレートを準備しました。また、ネガティブコントロールとして、培養液100 μ Lを塗布したプレートを調製しました。

本試験は、マイクロファンネルフィルターファンネルの3ロット分から各10個と、平板塗抹法による密度コントロールのプレート10枚を使用しました。

各寒天培地を反転させ、37°C、24時間培養しました。培養後、プレート表面の写真撮影し、出現した青色コロニーを計数しました。この試験方法は、GUD活性により発色物質が生成され、目的のコロニーが青く見えることを利用したものです。

塗抹プレート、サンプル、コントロールの各セットについて、以下の式で平均値および変動係数 (CV) を算出しました。

$$cv = (SD \div \bar{x}) \times (100)$$

SD=標準偏差, \bar{x} =平均値

回収率は、各サンプルセットとコントロールについて、対応するプレートとの比較により算出しました。

この計算に使用する数式は以下のとおりです。

$$\text{回収率 (\%)} = (\text{メンブレン上の平均CFU}) \div (\text{塗抹プレート上の平均CFU}) \times 100$$

Figure 1

MF法の概要



マイクロファンネルフィルターファンネルをマニホールドにセットし、蓋を外します。



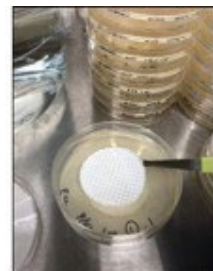
サンプル溶液をマイクロファンネルに入れ、吸引ポンプを稼働し、吸引ろ過を実施します。



サンプルをろ過した後、マニホールドのバルブを閉め、ファンネルをベースから取り外します。



滅菌ピンセットを用いてメンブレンをベースから取り外します。



メンブレンを寒天培地に置きます。



寒天培地を反転させ、37°Cで24時間インキュベーションします。

結果と考察

平板塗抹法による密度コントロールのプレートの平均回収率は、 31.9 ± 3.5 CFUであることが観測されました。マイクロファンネルフィルターファンネル3ロットの平均回収率は、 33.6 ± 4.1 、 31.9 ± 3.5 、 32.2 ± 5.1 CFUと観測されました (Table 1)。密度調製の塗抹プレートとサンプルプレートのCV値は11-16%と算出されました。一般的に10~20%のCVは“良好”とされており、本研究で得られたCV値は、大腸菌の捕捉としてのMF法の性能が適切であり、再現性があることを示しています。マイクロファンネルフィルターファンネルの3つのロット全てにおいて、回収率の計算値は、100%以上でした (Table 2)。

Table 1

MF法の寒天培地で観察された大腸菌のコロニー形成単位 (CFU) を平板塗抹法による密度コントロールと比較しました。データは、マイクロファンネルフィルターファンネル3ロットの $n=10$ を表します。

ロットNo.	平板塗抹法による密度コントロール	MF法 (GN-6メトリセル, 0.45 μ m)		
		1	2	3
テストNo.1	33	27	35	35
テストNo.2	33	36	33	28
テストNo.3	34	35	29	30
テストNo.4	35	27	29	26
テストNo.5	34	35	41	43
テストNo.6	29	30	30	35
テストNo.7	33	35	31	26
テストNo.8	35	37	30	36
テストNo.9	23	34	30	29
テストNo.10	30	40	31	34
平均	31.9	33.6	31.9	32.2
標準偏差	3.5	4.1	3.5	5.1
cV (%)	11.0	12.1	11.0	15.8

Table 2

MF法における大腸菌の回収率を示しました。データは、3種類のロット ($n=10$) のマイクロファンネルフィルターファンネルを使用した場合の平均回収率です。

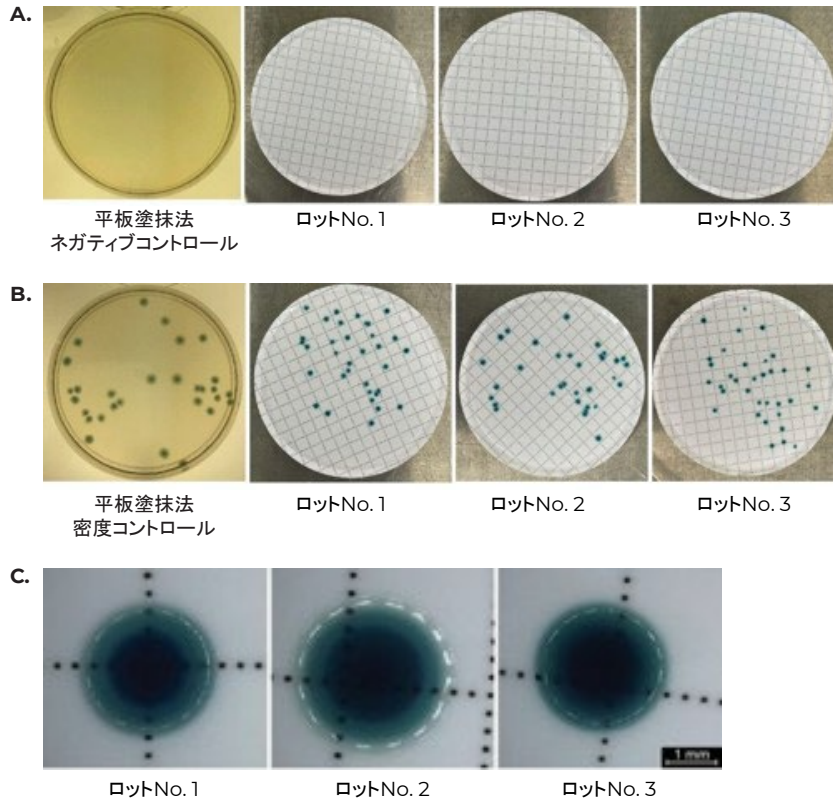
ロットNo.	1	2	3
回収率(%)	105.3	100.0	100.9

メンブレンのグリッド線によるコロニーの形態変化はなく、典型的なコロニー形態が観察されました (Fig. 2)。

Figure 2

MF法によるGN-6メンブレン上で観察された大腸菌コロニーの写真

- A) 平板塗抹法によるネガティブコントロールとMF法によるネガティブコントロールに使用した3ロット分のメンブレン
- B) 平板塗抹法による密度コントロールとMFによる大腸菌サンプルを使用した3ロット分のメンブレン
- C) メンブレンのグリッド線上に生育したコロニーの拡大画像



概要

本アプリケーションノートでは、マイクロファンネルフィルターファンネルを用いたMF法による大腸菌の回収率を評価しました。この試験結果から、マイクロファンネルフィルターファンネルを用いたMF法は、大腸菌のコロニー形態に影響を与えずに培養することができ、サンプルからの大腸菌の捕捉と正確な定量が可能であることが示されました。さらに、マイクロファンネルフィルターファンネルを用いたMF法が、大腸菌の迅速な検査に有効であることが示されました。

参考文献


1. Brunkard JM et al, Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with drinking water-United States, 2007–2008. MMWR Surveill. Summ. 60: 38-68, 2011.
2. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. Washington, D.C, 1995.
3. National Technical Advisory Committee. Water Quality Criteria. Federal Water Pollution Control Administration, Dept. of Interior. Washington, DC, 7-14, 1968.
4. ST Odonkor *et al.*, *Escherichia coli* as an indicator of bacteriological quality of water: an overview. Microbiology research, 4, e2, 2013.
5. Martins Perin L *et al.*, Glucuronidase activity of *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses. Braz J Microbiol, 41: 819-23, 2010.



ラボラトリー事業部
〒163-1325 東京都新宿区西新宿6-5-1
お問い合わせ: labcustomersupport-jp@pall.com

ポールのWebサイトはこちらから:
<https://www.pall.com/jp/ja/laboratory.html>

お問い合わせは、<https://www.pall.com/jp/ja/laboratory.html>の
サイトの下にある「お問い合わせ」をクリックしてください。

© Copyright 2022, Pall Corporation. Pall, , MicroFunnel, MetriceIIは、Pall Corporationの商標です。® は米国で登録された商標を示します。BDIは、Becton Dickinson社の商標です。CHROMagerは、Dr A. Rambachの商標です。