

新しい糞便汚染指標の研究

八戸高専 ○小倉 優大
正会員 矢口 淳一

1. はじめに

大腸菌群は、水域の糞便汚染の指標として大腸菌の導入が検討された当時大腸菌のみを簡便に効率よく検出する方法が存在しなかったために導入され、大腸菌の代替指標として広く用いられてきた。しかし、近年大腸菌ではなく大腸菌群を指標としていることに起因する問題点が報告されている。そこで大腸菌、糞便性連鎖球菌をターゲットにリアルタイム PCR 法を適用して遺伝子レベルでターゲットのみを迅速かつ特異的に検出する方法を検討し、新しい糞便汚染指標の研究開発を行った。

2. 実験方法

2.1 リアルタイム PCR

大腸菌および糞便性連鎖球菌のリアルタイム PCR は MiniOpticon システム (Bio-rad 社) で行った。大腸菌については、大腸菌の選択的検出に使用される β -グルクロニダーゼ酵素をコードする *uidA* 遺伝子をターゲットとして、IQ Supermix (Bio-rad 社) を使用し、Frahm & Obst¹⁾ が用いたプライマーおよびプローブを使用して、Reverse Primer のみ濃度を 300 (nM) に変更した。糞便性連鎖球菌については、SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-rad 社) を使用し、すべての *Enterococcus* 属に共通するリボソーム RNA の 23S-rRNA 遺伝子領域をターゲットとするプライマー²⁾ を使用した。また DNA の抽出は、QIAamp DNA Stool 抽出キット (Qiagen 社) を使用した。抽出方法は同社のプロトコールに従った。水域および生活排水処理施設の調査では、採水したサンプルをポリカーボネイトフィルター (Advantec 製、孔径 0.4 μ m、直径 47mm) を使用して 10~400 倍にろ過濃縮し、ガラスビーズを用いてミニビードビーダー (家田貿易 Model 3110BX、4800RPM、60sec) でろ紙を粉碎後、QIAamp DNA Stool 抽出キットを用いる方法で DNA を抽出した。

2.2 生活排水処理施設および水域の調査

2011 年 7 月 14 日、10 月 6 日、11 月 28 日に八戸高専生活排水処理施設 (長時間エアレーション法、処理水量 330m³/日) の曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水をグラブ採水して大腸菌および糞便性連鎖球菌を計数した。大腸菌の計数は、EC-MUG

培地 (Difco) による MPN 法³⁾ とリアルタイム PCR 法により行った。また、大腸菌群、糞便性大腸菌群の計数をそれぞれ MF-Endo 寒天培地 (Difco) および M-FC 培地 (Difco) によるメンブレンフィルタ法⁴⁾ で行い、大腸菌数と比較した。糞便性連鎖球菌の計数は、M-E 寒天培地 (Difco) によるメンブレンフィルタ法⁵⁾ とリアルタイム PCR 法によって行った。また 2011 年 6 月 21 日、10 月 11 日、12 月 19 日に青森県八戸市の新井田川と八戸港湾地区など 4 地点でサンプルを採水し、生活排水処理施設の調査と同様の方法で大腸菌、大腸菌群、糞便性大腸菌群および糞便性連鎖球菌を計数した。ここで MPN 法による大腸菌の計数では、10mL の試料が必要な場合には培地の濃度を 2 倍にして使用し、100mL の試料が必要な場合にはポリカーボネイトフィルター (Advantec 製、孔径 0.2 μ m、直径 47mm) を使用してサンプルをろ過し、ろ紙を培地に添加して培養した。

3. 実験結果

3.1 生活排水処理施設の調査

図 1 には 7 月 14 日に調査した八戸高専生活排水処理施設の曝気槽流入水、最終沈殿池流出水、処理水のそれぞれについてメンブレンフィルタ法、MPN 法、PCR 法によって計数した大腸菌群、糞便性大腸菌群および大腸菌の計数結果を示した。曝気槽流入水、最終沈殿池流出水では PCR 法による大腸菌の計数値は、大腸菌群と糞便性大腸菌群の中間に位置し、MPN 法で計数された大腸菌数より 1 オーダー程度大きかった。一方処理水では大腸菌群と PCR 法の大腸菌は検出されたが、糞便性大腸菌群と MPN 法の大腸菌は検出されず、曝気槽流入水と最終沈殿池流出水とは異なり大腸菌群や糞便性大腸菌群の計数値と PCR 法の大腸菌の計数値との間に大きな違いが見られた。10 月 6 日、11 月 28 日の調査でも 7 月の調査とほぼ同様の傾向が見られ、処理水では PCR 法では 1×10^3 個/100mL のオーダーで検出されたが、MPN 法や糞便性大腸菌群は検出されなかった。また図 2 には 7 月 14 日に調査したメンブレンフィルタ法、PCR 法により計数した糞便性連鎖球菌の計数結果を示した。PCR 法による糞便性連

キーワード：リアルタイム PCR、DNA、大腸菌、糞便性連鎖球菌

連絡先：〒039-1192 青森県八戸市大字田面木字上野平 16 番地 1 TEL 0178-27-7305

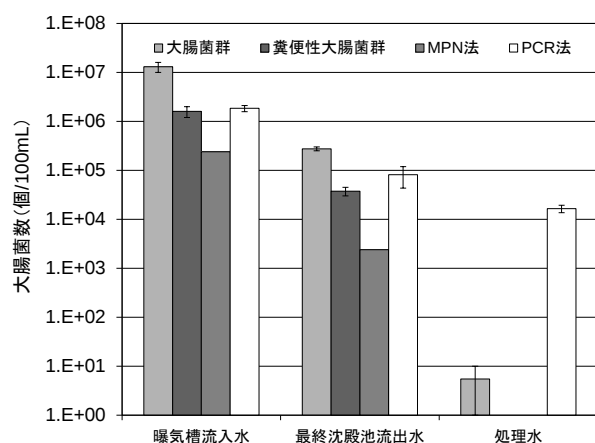


図 1 生活排水処理施設の大腸菌数

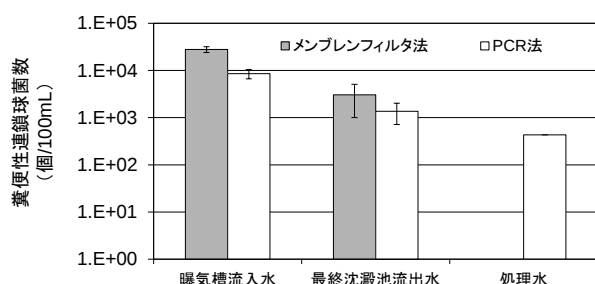


図 2 生活排水処理施設の糞便性連鎖球菌数

鎖球菌の計数値は、曝気槽流入水、最終沈澱池流出水ではメンブレンフィルタ法による計数値よりやや小さくなった。さらに処理水ではメンブレンフィルタ法では検出されなかったが、PCR 法では 1×10^2 個/100mL のオーダーで検出された。10 月 6 日、11 月 28 日の調査でも 7 月の調査と同様の結果が得られ、処理水では PCR 法で $1 \times 10^2 \sim 10^3$ 個/100mL のオーダーで検出されたが、メンブレンフィルタ法では検出されなかった。また水域の調査では、MPN 法と PCR 法による大腸菌の計数値と、メンブレンフィルタ法と PCR 法による糞便性連鎖球菌の計数値との間にそれぞれ 1~2 オーダーの差が見られた。

3. 2 指標性の評価

生活排水処理施設と水域の調査結果から大腸菌と糞便性連鎖球菌それぞれについて PCR 法と従来用いられていた他の指標の計数結果の相関を求めた。表 1 には大腸菌の各指標間の決定係数を示した。PCR 法と MPN 法とで計数した大腸菌数の間の決定係数は 0.875 と高く、2 つの指標は相関していた。大腸菌群、糞便性大腸菌群についても PCR 法との相関を求めた結果、大腸菌群は決定係数 0.839、糞便性大腸菌群は 0.915 とどちらも高い値を示し、従来指標との間に高い相関があることが分かった。4 つの指標はいずれも互いに相関していることが決定係数から示された。また図 3 にはメンブレンフィルタ法と PCR 法による糞便性連鎖球菌数の関係を示

した。決定係数は 0.811 と高い相関が見られた。PCR 法による計数値は大腸菌、糞便性連鎖球菌ともに他の指標との間に高い相関が認められ、相関係数はいずれも 0.9 以上となった。

4. まとめ

PCR 法は、排水処理施設や水域で大腸菌と糞便性連鎖球菌を迅速に計数することができた。しかし排水処理施設の処理水では、MPN 法やメンブレンフィルタ法で検出されない場合でも $1 \times 10^2 \sim 10^3$ 個/100mL 程度検出され、過大評価につながる可能性も示唆された。PCR 法は大腸菌、糞便性連鎖球菌共に他の従来指標との間に高い相関が認められ、迅速な計数方法として新しい糞便汚染指標となる可能性が示された。今後 PCR 法の指標性についてさらに検討するために、水域などの実際の水環境で調査を継続していく必要がある。

【参考文献】

- 1)Frahm,E. and Obst,U., Journal of Microbiological Methods,Vol.52,pp.123-131,2003
- 2)日本水道協会:上水試験法 解説編,2001 年度版, pp.836 -852,1996
- 3) 木暮一啓:生きてはいるが培養できない病原細菌に挑む, 科学, Vol.69,No.6,pp.508-516, 1999

表 1 各指標間の決定係数 R^2 (大腸菌)

	大腸菌群	糞便性大腸菌群	MPN法	PCR法
大腸菌群		0.905	0.933	0.839
糞便性大腸菌群	0.905		0.943	0.915
MPN法	0.933	0.943		0.875
PCR法	0.839	0.915	0.875	

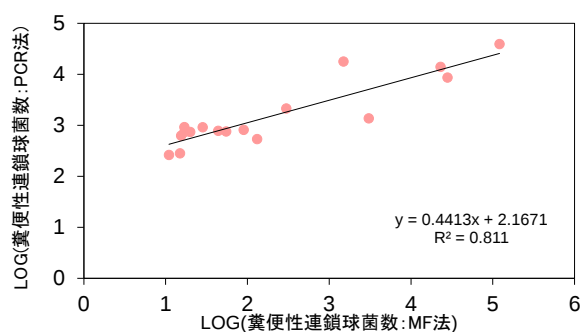


図 3 メンブレンフィルタ法と PCR 法の関係 (糞便性連鎖球菌)