=原 著=

水質検査における酵素基質培地の適用と本培地により 検出された大腸菌群の菌種の検討

上 田 修[†]・鈴木敦子・松江隆之・池田なほみ
市瀬正之・天野祐次・寺山 武

(東京都予防医学協会)

(受付 平成 15 年 4 月 30 日)

(受理 平成 15 年 8 月 7 日)

Evaluation of Fluorogenic and Chromogenic Substrate Medium for Detection of Coliform Bacteria in Potable Water and Investigation of Genus and Species of the Bacteria Isolated through This Medium

Osamu UEDA[†], Atsuko SUZUKI, Takayuki MATSUE, Nahomi IKEDA,
Masayuki ICHINOSE, Yuuji AMANO and Takeshi TERAYAMA

(Tokyo Health Service Association, 1-2 Sadohara-cho, Ichigaya,
Shinjuku-ku, Tokyo 162-8402; [†] Corresponding author)

Test samples of water presented for the potability test were examined in XGM medium, and using the 112 samples that indicated positive for the coliform bacteria group, the results were compared with those obtained with LB medium. Furthermore, the strains of the coliform bacteria group isolated from XGM medium were subjected to identification tests to determine the bacterial type, and the characteristics of the strains isolated were also examined in the LB medium. With respect to the status of detection of organisms of the coliform bacteria group from potable water in each fiscal year, significant differences were noted depending on the test method employed. When the test results for the 112 samples that indicated positive for the coliform bacteria group in XGM medium were compared with those obtained in LB medium, the agreement rate was only 65.2%. When strains of the coliform bacteria group isolated in the XGM medium were subjected to identification tests to determine the bacterial type, the following results were obtained: *Enterobacter* represented 29.6%, *Citrobacter* 25.9%, *Escherichia* 13.2%, *Aeromonas* 11.6%, *Klebsiella* 7.9%, and *Serratia* 5.3%. Out of the 189 isolated strains of the coliform bacteria group isolated from the XGM medium, 114 strains showed positive result in LB medium, and the agreement rate was 60.3%.

Key words: Coliform bacteria, Potable water, LB medium, XGM medium

緒 言

水質基準に関する省令では、飲料適否判断の一つに「大腸菌群は検出してはならない」と規定し、大腸菌群試験は水質検査において重要な試験項目として位置づけら

れている。1992 年の上水試験法の改訂⁷⁾により、大腸菌群試験法として従来法である乳糖ブイヨン-ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地（以下、LB-BGLB）法に加え、Minimal Medium *o*-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside-4-methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronide（以下、MMO-MUG）法が採用されることになった。従来法の LB-BGLB 法では、大腸菌群の検出に 4 日間以上

[†] 連絡先

〒162-8402 東京都新宿区市ヶ谷砂土原町 1-2

を要するのに対して MMO-MUG 法では、大腸菌群が 24 時間培養で判定されることから迅速性に優れた試験法として広く採用されるようになった^{4,6)}。上水試験方法の解説編⁸⁾によると、従来法の LB-BGLB 法もこれまでの試験実績、経費の低廉性などの面で廃止することができず MMO-MUG 法とともに 2 つの試験法を公定法として認可したとされている。さらに 2001 年には、特定酵素基質培地法に酵素基質として 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-GAL)⁹⁾ を使用した X-GAL-MUG (以下、XGM) 法が追加採用された⁷⁾。本法は河川水や水道水、食品の大腸菌群試験で良好な成績が得られることが報告されている^{10,11,16)}。また、飲用温泉水において洩³⁾は、検水の pH、H₂S および銅濃度に注意すれば適用可能であると指摘している。一方、発色酵素基質を用いた試験法と、従来法による大腸菌群試験で判定される結果との間に有意差の生ずることが指摘されている^{4,14,17)}。

我々は、飲料適否試験目的で供試された検査材料を対象に、従来法の推定試験で用いる乳糖ブイヨン培地（以下、LB 培地）と XGM 培地の比較検討を行った。また、XGM 培地を通して分離された大腸菌群について同定試験を行い、菌種を把握するとともに、それら菌株の LB 培地における性状を検討した。

材料および方法

1. 検査材料

2001 年 9 月から 2002 年 3 月までに当協会に飲料適否試験を目的として依頼された 3,716 件について XGM 培地にて検査を行い、大腸菌群陽性を示した 112 検体を対象とした。その 112 検体の XGM 培地培養液の 1 白金耳量を LB 培地に接種後、36±1℃、24～48 時間培養し、ラクトース分解、ガス産生のものを LB 培地における大腸菌群陽性として、XGM 培地との比較を行った。同時に、XGM 培地で大腸菌群陽性となった 112 検体から DHL 寒天培地に画線塗抹し、36±1℃、24 時間培養し、得られた 246 株を普通寒天培地に純培養した。これら菌株を XGM 培地に再接種し、再度大腸菌群陽性を示した 189 株について菌種の同定試験を行うとともに LB 培地での性状比較試験を行った。分離した 246 株のうち XGM 培地で大腸菌群陰性を示した 57 株については今回の検討には含めていない。

2. 使用培地

2.1 LB 培地

上水試験方法の推定試験用培地である。

2.2 XGM 培地

XGM 培地は、EC ブルー 50 (日水製薬) を用いた。試験は添付のマニュアルに従って行った。すなわち、本培地を含む専用容器に検水 50 ml を加え、36±1℃、24 時間培養後、培養液が青緑色から培養容器の底部が青～緑

色を呈したものを大腸菌群陽性と判定した。同時に、大腸菌群陽性となったものに波長 365 nm の UV ランプを照射して培養液が青色蛍光を発したものを大腸菌群陽性とした。

普通寒天培地に純培養した分離菌株による XGM 培地での判定には、滅菌精製水 50 ml を XGM 培地に添加し、滅菌小試験管に 5 ml ずつ分注したものを使用した。5 ml の XGM 培地に分離菌株を 1 白金耳量接種後、前述と同様に判定した。なお、5 ml 量の XGM 培地でも性状結果に相違がないことは事前に検討済みである。

3. 菌種の同定

普通寒天培地に純培養した分離菌株のうち、XGM 培地での再試験にて大腸菌群陽性を示した 189 株について同定試験を行った。同定試験は成書^{12,15)}に従った。

結 果

1. XGM 培地と LB 培地による検査成績の比較

1998 年から 2001 年までに、当協会に検査依頼された飲料水からの大腸菌群検出状況を Table 1 に示した。1998 年から 2000 年までは、LB-BGLB 法で、2001 年からは XGM 培地により検査を行った。1998 年から 2000 年までの LB-BGLB 法による大腸菌群陽性率は、1.1% から 1.5% の範囲を推移していたが、2001 年の XGM 培地による陽性率は 2.9% であり、本法は、LB-BGLB 法に比べ有意に高い陽性率を示した ($p < 0.01$)。

2. XGM 培地陽性検体から LB 培地に接種した際の大腸菌群の判定結果

2001 年 9 月から 2002 年 3 月までに XGM 培地により検査した 3,716 検体のうち、大腸菌群陽性を示したものは 112 検体で、陽性率は 3.0% であった (Table 2)。水の種類別に見た大腸菌群陽性率は、水道原水では 40.7%、水道水では 0.8%、井戸水では 37.3%、その他が 9.6% であった。その他の水には、湧き水、ウォータークーラー水、給湯水、ミネラルウォーターなどが含まれている。

LB 培地における培養結果と比較するため、XGM 培地で大腸菌群陽性を示した 112 検体の培養液から 1 白金耳量を LB 培地に接種して培養した結果、73 検体が

Table 1. Detection of coliform bacteria from potable water (1998～2001)

Year	No. of sample	No. of positive	%
1998	6,197	65	1.1
1999	5,145	76	1.5
2000	7,340	86	1.2
2001	7,054	207	2.9
Total	25,736	434	1.7

Note: 1998～2000: LB-BGLB method.

2001: Chromogenic substrate (XGM) method.

Table 2. Comparison of detection rate of coliform bacteria from potable water by XGM medium and LB medium (2001.9~2002.3)

Water sample	X-GAL-MUG medium				LB medium	Rate of coincidence (%)
	No. of sample	No. of positive	%	No. of strain	Lac ⁺ a)Gas ⁺	
Raw water for water supply	81	33 (10) ^{b)}	40.7	50	24	72.7
Tap water	3,266	25 (10)	0.8	38	17	68.0
Well water	67	25 (12)	37.3	40	9	36.0
Others	302	29 (22)	9.6	61	23	79.3
Total	3,716	112 (54)	3.0	189	73	65.2

Note: a) Lactose. b) () Number of samples with more than two isolated species.

Fig. 1. Distribution of genus of coliform bacteria isolated from potable water by XGM medium.

大腸菌群陽性を示した。XGM 培地と LB 培地における大腸菌群陽性一致率は 65.2% と低い値を示した。水の種類別に見ると、井戸水の 36.0% を除き、70% 前後の一致率であった。

3. XGM 培地より分離された大腸菌群菌属分布

XGM 培地で陽性を示した 112 検体から分離された大腸菌群 189 株について菌種の同定試験を行った結果を Fig. 1 に示した。最も多く分離された大腸菌群は *Enterobacter* 属、56 株で全体の 29.6% を占めていた。次いで *Citrobacter* 属が 49 株で 25.9% であった。以下、*Escherichia* 属が 13.2%、*Aeromonas* 属が 11.6% の順であった。分離株の半数以上が *Enterobacter* 属と *Citrobacter* 属の 2 菌属で占められていた。

4. 菌属別の XGM 培地と LB 培地における大腸菌群判定基準の一致率

XGM 培地から分離された大腸菌群が、LB 培地でも大腸菌群陽性となるか調べる目的で、XGM 培地を通して分離された菌株 189 株を LB 培地に接種し、菌属別に性状を比較した (Table 3)。XGM 培地と LB 培地の両培地で大腸菌群と判定されたものは 189 株中 114 株で、両者の一致率は 60.3% であった。菌属別に見ると、最も高い一致率を示したものは *Escherichia* 属の 100%、次

Table 3. Characterization with LB medium of coliform bacteria isolated from potable water by XGM medium

Identification	X-GAL-MUG medium	LB medium	Rate of coincidence (%)
	No. of strain	No. of positive	
<i>Enterobacter</i> spp.	56	33	58.9
<i>Citrobacter</i> spp.	49	35	71.4
<i>Escherichia</i> sp.	25	25	100.0
<i>Aeromonas</i> spp.	22	4	18.2
<i>Klebsiella</i> spp.	15	14	93.3
<i>Serratia</i> spp.	10	2	20.0
<i>Hafnia</i> sp.	5	0	0.0
<i>Leclercia</i> sp.	3	0	0.0
<i>Budvicia</i> sp.	1	1	100.0
<i>Kluyvera</i> sp.	1	0	0.0
<i>Pantoea</i> sp.	1	0	0.0
<i>Rahnella</i> sp.	1	0	0.0
Total	189	114	60.3

いで *Klebsiella* 属の 93.3% であった。分離株数の多い *Enterobacter* 属と *Citrobacter* 属はそれぞれ 58.9%、71.4% であった。これに対し、*Aeromonas* 属や *Serratia* 属ではそれぞれ 18.2%、20.0% と極端に低い一致率であった。

5. XGM 培地を通して分離された大腸菌群の菌種別の LB 培地における性状

分離菌株 189 株について、LB 培地における性状を菌種別に示した (Table 4)。

Enterobacter 属では、最も分離株数の多かった *E. cloacae* は LB 培地での反応結果にばらつきが認められ、XGM 培地との一致率も 55.3% と低率であった。これに対し、*E. amnigenus*、*E. aerogenes* は高い一致率を示した。

Citrobacter 属では、*C. freundii* の一致率が 76.2% と他の菌種に比べ比較的高い傾向にあった。

E. coli と同定されたものは 25 株あり、LB 培地と XGM 培地における性状の一致率は 100% で、そのすべてが波長 365 nm において青色蛍光が確認された。

本来、河川水などの常在菌である *Aeromonas* 属について見ると、*A. hydrophila* は LB 培地の反応結果にば

Table 4. Characteristics in LB medium by individual species coliform bacteria isolated from potable water by XGM medium

Identification	No. of strain	LB medium				Rate of coincidence (%)
		Lac ⁺ a)Gas ⁺	Lac ⁺ Gas	Lac Gas ⁺	Lac Gas	
<i>Enterobacter cloacae</i>	47	26	9	2	10	55.3
<i>Enterobacter amnigenus</i>	5	4		1		80.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2				100.0
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	1			1	50.0
<i>Citrobacter freundii</i>	42	32	6		4	76.2
<i>Citrobacter diversus</i>	5	2	3			40.0
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	1			1	50.0
<i>Escherichia coli</i>	25	25				100.0
<i>Aeromonas hydrophila</i>	16	3	4	2	7	18.8
<i>Aeromonas caviae</i>	4		1		3	0.0
<i>Aeromonas sobria</i>	2	1			1	50.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	8				100.0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	5				100.0
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1	1				100.0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1		1			0.0
<i>Serratia marcescens</i>	8				8	0.0
<i>Serratia fonticola</i>	1	1				100.0
<i>Serratia rubidaea</i>	1	1				100.0
<i>Hafnia alvei</i>	5		1		4	0.0
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	3		2		1	0.0
<i>Budvicia aquatica</i>	1	1				100.0
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1		1			0.0
<i>Pantoea agglomerans</i>	1		1			0.0
<i>Rahnella aquatilis</i>	1		1			0.0
Total	189	114	30	5	40	60.3

Note: a) Lactose.

らつきが認められ、一致率も 18.8% と低率であった。

Klebsiella 属では、*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ornithinolytica* において LB 培地と XGM 培地との性状一致率が 100% を示した。

Serratia 属では、*S. marcescens* が最も多く分離されたが、LB 培地と XGM 培地との性状一致率は 0% であった。

その他、Table 4 に示したような菌種が少数ながら認められた。これら菌種については大部分が LB 培地でガス非産生であった。

考 察

上水試験法では、大腸菌群試験法として酵素基質培地法 (MMO-MUG 法) と LB-BGLB 法のいずれも公定法として認可されており、どちらの検査法を採用するかは検査機関に一任されている。乳糖の分解の結果で生じる酸とガスにより判定を行う LB-BGLB 法と、乳糖分解に関与する酵素である β -galactosidase の存在を判定する酵素基質培地法とは、それぞれ異なった定義に基づく検査システムである。そのため、検査方法の違いにより

大腸菌群の判定結果に違いが生ずることがある^{13, 14, 17)}。酵素基質培地法で定義される大腸菌群の方が結果として多くの菌種を含むことになる。

我々は、検査方法の違いによる大腸菌群の判定結果の差異、XGM 培地と LB 培地における菌種間での反応結果の違いについて調査した。今回は、基礎的検討を主としたことから接種菌量^{3, 5)}や、他の酵素基質培地との比較は行っていない。また、LB-BGLB 法のうち LB 培地で試験し、確定試験および完全試験は行っていない。

年度別に見た飲料水からの大腸菌群の検出状況では、LB-BGLB 法により検査を行った年度と XGM 培地により検査を行った年度の大腸菌群陽性率に有意差が認められた。このような明確な検査成績の違いは、XGM 培地と LB 培地の反応原理の違いよると考えられる。XGM 培地と LB 培地の一致率の検討では、XGM 培地陽性検体の培養液から 1 白金耳量を LB 培地に移植する方法と比較し、一致率 65.2% と低い結果となった。木村ら⁶⁾は、酵素基質培地と LB 培地にそれぞれ検水を添加して検討した結果、MMO-MUG 培地と LB 培地との反応結果の一致率は 77.8% であったと報告している。また、中

山ら¹¹⁾は、XGM法とLB-BGLB法の比較を木村らと同様の方法で検討した結果、一致率は92.6%と高い値であったと報告している。我々の行った方法は、従来法の推定試験段階に用いるLB培地のみの使用であり、確定試験および完全試験を行っていたとしたら、65.2%よりもさらに低い一致率になると予想され、他者に比べ非常に低い一致率であった。その要因として、LB培地とXGM培地の比較方法が異なることが考えられる。

XGM培地陽性検体から検出された大腸菌群189株の菌属分布では、*Enterobacter*属と*Citrobacter*属が全体の半数以上を占めた。今回、酵素基質培地により検出された大腸菌群の菌属はこれまでに報告^{6, 11)}されているものとはほぼ同様の傾向であった。

菌属間でのXGM培地とLB培地の一致率の検討では、*Enterobacter*属58.9%、*Citrobacter*属71.4%、*Escherichia*属100%、*Aeromonas*属18.2%、*Klebsiella*属93.3%、*Serratia*属20%であった。

菌種間においても乳糖分解能とガス産生能の違いにより、酵素基質培地とLB培地との反応様式に違いが生じる結果となった。*E. cloacae*は成書¹²⁾によれば乳糖分解能95%以上、ガス産生能99%以上とされているが、本調査での分離株においてはLB培地での乳糖分解能とガス産性能にばらつきが認められた。これに対して、*E. amnigenus*、*E. aerogenes*に関しては高い一致率が示された。*Aeromonas*属については、本来、河川水など、自然水中における常在菌であり、分類学的にも腸内細菌科に該当しない菌種であるが、本菌は β -galactosidaseを100%近く保持しているため、酵素基質培地においては、大腸菌群の範疇に含まれることになる。しかし、*A. hydrophila*などは分類上、乳糖分解能が20%程度なので、LB培地との比較では18.8%という低い一致率となった。*Serratia*属については、*S. marcescens*が最も多く分離され、XGM培地で β -galactosidase陽性となったもののLB培地では乳糖分解能、ガス産生能ともに陰性を示し一致率は0%であった。本菌についても分類学上の乳糖分解能は数%であるので、LB培地の判定においては、大腸菌群として認められない菌種の一つと言えよう。*S. fonticola*、*S. rubidaea*については、分類学上の乳糖分解能はそれぞれ95%、100%であるので、XGM培地とLB培地の両者どちらにおいても大腸菌群として認められた。

乳糖はまず細胞膜透過酵素によって細胞内に取り入れられ、 β -galactosidaseによりブドウ糖とガラクトースに分解され、代謝される。しかし、この細胞膜透過酵素が欠けると β -galactosidaseが存在していても乳糖は分解されないため酸とガスは産生されない。したがって、LB-BGLB法では大腸菌群に該当しない乳糖非分解菌であっても、 β -galactosidaseを指標とした特定酵素基質培地法では大腸菌群に該当するため、乳糖分解性に基づく大腸菌群よりも多くの菌種が含まれる結果となり、両

培地における一致率が低くなる原因の一つと言えよう。

現在、第二世代培地¹⁴⁾として酵素基質培地は、迅速化や簡便化の求められていた大腸菌群試験において幅広く利用されるようになった。酵素基質培地は検査の長期化や煩雑性を伴う従来法に比べ、24時間以内に判定でき、感度も良好で、なおかつ食品分野や上水試験において問題となっている損傷菌の検出にも役立っており非常に優れた大腸菌群検査法^{1, 2)}であると思われる。しかし、現時点において従来法による検査を行っている機関もあり、検査機関により検査結果が異なる事態を招いていることは否定できない。年度別に見た飲料水からの大腸菌群検出状況でも示したように、採用する検査方法により大腸菌群検査結果に有意差が認められるのは問題である。現在、こうした大腸菌群検査の煩雑性を考慮し、厚生労働省では、糞便汚染指標として大腸菌を基準として認定する方向で検討を進めているとの報告もある。今後の課題として、糞便汚染指標菌としての定義を含め大腸菌群検査法の統一化を早急に図っていくべきである。

要 約

飲料適否試験目的で供試された検査材料をXGM培地により試験し、大腸菌群陽性を示した112検体を用いてLB培地との比較を行った。また、XGM培地を通して分離された大腸菌群の菌株について同定試験を行い、菌種を把握するとともに、それら菌株のLB培地における性状を検討した。

年度別に見た飲料水からの大腸菌群検出状況では、採用する検査方法の違いにより有意差が認められた。

XGM培地において大腸菌群陽性を示した112検体を用いてLB培地による大腸菌群検査を比較した結果、両者一致率は65.2%と低い値を示した。

XGM培地陽性検体から大腸菌群を分離し、菌種同定を行った結果、*Enterobacter*属が全体の29.6%を占め、次いで*Citrobacter*属25.9%、以下、*Escherichia*属13.2%、*Aeromonas*属11.6%、*Klebsiella*属7.9%、*Serratia*属5.3%であった。

XGM培地において大腸菌群陽性を示した分離菌株189株のうち、LB培地で陽性を示したものは114株、両者一致率は60.3%であった。

文 献

- 1) Edberg, S. C., Allen, M. J., Smith, D. B. and The National Collaborative Study: National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1595-1601 (1988).
- 2) Edberg, S. C., Allen, M. J., Smith, D. B. and The National Collaborative Study: National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detec-

- tion of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with presence-absence techniques. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 1003-1008 (1989).
- 3) 瀧 祐一, 宮崎 正, 緒方喜久代, 帆足喜久雄, 牧野芳大: 発色酵素基質培地の飲用温泉水への適用. 日本食品微生物学会雑誌, **15**(3, 4), 153-160 (1998).
- 4) 古畑勝則: 水道水の大腸菌群試験方法として新たに採用された特定酵素基質培地法について. 防菌防黴学会雑誌, **22**, 109-116 (1994).
- 5) 萩原博和, 小野貴子, 佐藤恭子, 人見隆弘, 矢野信禮: 発色基質酵素を用いた大腸菌群検出用培地の検討. 第15回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, p. 47 (1994).
- 6) 木村智子, 肥留川仁志, 山口マリ子, 大道正義長, 谷川修司: 特定酵素基質培地法 (MMO-MUG 法) を使用した飲料水中の大腸菌群検査. 臨床検査, **40**, 101-104 (1996).
- 7) 厚生省生活衛生局水道環境部監修: 上水試験方法. p. 489-494, 日本水道協会 (2001).
- 8) 厚生省生活衛生局水道環境部監修: 上水試験方法 (解説編). p. 836-849, 日本水道協会 (2001).
- 9) Manafi, M., Kneifel, W. and Bascomb, S.: Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. Microbiol. Rev., **55**, 335-348 (1991).
- 10) 村上和保, 石橋 称: 発色酵素基質培地による食品の大腸菌群検出に関する検討. 日本食品微生物学会雑誌, **14**(3), 149-154 (1997).
- 11) 中山 宏, 堀川和美, 牛尾剛士, 松永健興, 矢入政俊, 竹中重幸, 大津隆一: X-GAL-MUG 法による水の大腸菌群検査法の有用性. 日本食品微生物学会雑誌, **13**(2), 63-67 (1996).
- 12) 坂崎利一, 田村和満: 腸内細菌 (下巻), 第三版. p. 1-302, 近代出版 (1992).
- 13) 坂崎利一: 細菌分類学と食品微生物学. 日本食品微生物学会雑誌, **11**(1), 1-7 (1994).
- 14) 坂崎利一: 新世代の細菌用培地および同定試薬. モダンメディア, **46**(8), 219-225 (2000).
- 15) 坂崎利一ほか: 新訂食水系感染症と細菌食中毒, p. 70-77, 中央法規出版 (2000).
- 16) 勢戸和子, 田口真澄, 小林一寛: 大腸菌群および大腸菌検査におけるフルオロカルト・ラウリル硫酸 X-GAL プライムの評価. 日本食品微生物学会雑誌, **13**(2), 69-73 (1996).
- 17) 寺本忠司: 大腸菌群および大腸菌. 食品と微生物, **9**(4), 211-216 (1993).