

## 特定酵素基質培地法による 飲料水の大腸菌群試験法の検討について

沢田 孝子 川島 員登 佐藤 勇次 菊地 由生子

### 要 旨

飲用井戸水の大腸菌群検査について、酵素基質法のMMO-MUG法、X-GAL法及びLB-BGLB法の3方法による検出率、陽性を示した菌種等の比較検討を行なうとともに、MMO-MUG法、X-GAL法については培養時間による呈色反応、呈色後冷蔵保存した場合の色調の変化についても比較検討した。

酵素基質法はLB-BGLB法に比べ陽性率が高く、菌種により発色パターンが異なっていた。MMO-MUG法とX-GAL法の検査結果はよく一致し、X-GAL法は呈色後冷蔵保存しても色調が変化しないことから、MMO-MUG法のスクリーニング試験として使用可能であると考えられた。

### 1. 緒 言

厚生省は、平成4年12月に水道水質基準の大幅改正を行い(施行平成5年12月)、これに伴い上水試験方法も改正され、大腸菌群試験法として従来からの乳糖ブイヨン-ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法(LB-BGLB法)と併せて特定酵素基質培地法(MMO-MUG法)が採用された。従来のLB-BGLB法は推定試験、確定試験、完全試験と3段階の試験を要し最終結果が判明するまで最大7日間かかっていたが、MMO-MUG法は1日で結果を得ることが可能な迅速法である。

しかし、厚生省では水質管理の継続性の観点から、MMO-MUG法の導入にあたっては従来のLB-BGLB法との比較検討を1年程度行うよう指導しており、本市においても、平成6年度から飲料水の水質検査の一部についてMMO-MUG法を併用し比較検討を行ってきた。

また、MMO-MUG法と同じ発光酵素基質を含む大腸菌群及び大腸菌の同時検出用培地として、ラウリル硫酸-MUG-X-GAL(以下X-GAL)が市販されているが、これは培地がディスポの容器入りのため滅菌試験管を準備する手間が省け、価格もMMO-MUG培地の約1/3と安価であるという利点があり、MMO-MUG法のスクリーニング試験として使用できないか検討してきた。

今回、飲用井戸水等の大腸菌群検査について、MMO-MUG法、X-GAL法及びLB-BGLB法の3方法による検出率、陽性を示した菌種等の比較検討を行うとともに、MMO-MUG法とX-GAL法については、培養時間による呈色状況、培養後冷蔵保存した場合の色調の変化等についても比較検討したのでその概要について報告する。

### 2. 方 法

#### 2-1 試 料

飲用井戸水等の水質検査は、市民及び行政からの依頼により年間約1,000件程度行なっているが、毎週木曜日に検査依頼のあった検体について、MMO-MUG法、X-GAL法及びLB-BGLB法の3方法を併用して検査を行った。

### 2. 方 法

#### 2-1 試 料

平成7年度に行った大腸菌群検査974件のうち3方法を併用して検査を行ったのは305件(31.3%)である。

## 2-2 MMO-MUG法の検査方法

この方法は、大腸菌群が有する酵素である  $\beta$ -galactosidase により、培地に含まれる ONPG ( $\beta$ -Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) が分解され  $\beta$ -ニトロフェノールを生成し黄色を呈することにより大腸菌群の有無を判定する。また、同時に E.coli が有する特異酵素の  $\beta$ -glucuronidase により MUG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide) が分解され紫外線(波長366nm)の照射により青紫色の蛍光を呈することにより E.coli の有無を判定する。

培地はコリラート50P/A培地(アスカ純薬製)を使用した。検水50mlを滅菌済ねじ口試験管にとり、スナックパック入の培地を無菌的に入れ溶解させ、これを恒温器(TABAI; LCN-120)に入れ $36 \pm 1$ で培養した。培養時間は恒温器内で $36 \pm 1$ に達する時間を1時間加え25時間とし、黄色の呈色を標準比色液(コンパレーター)と比較し判定した。着色が薄く肉眼では判定困難な場合には28時間まで培養時間を延長し、吸光光度計(波長415nm)でコンパレーター(吸光度0.086)より濃い黄変を示すものを陽性とした。

## 2-3 LB-BGLB 法の検査方法

上水試験法に基づいて、LB培地、LB-BGLB培地、EMB培地、標準寒天培地(いずれも日水製薬製)により推定試験、確定試験及び完全試験の3段階の検査を行なった。

## 2-4 X-GAL 法の検査方法

この方法は、 $\beta$ -galactosidaseにより増殖基質及び酵素基質として培地に含まれるX-GAL(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)が分解され、インドキシル基が遊離し青色を呈することにより大腸菌群の有無を判定し、MUGはMMO-MUG法と同様  $\beta$ -glucuronidaseにより分解されて紫外線の照射により青紫色の蛍光を呈することにより E.coli の有無を判定する。坂崎<sup>1)</sup>の報告によれば、ラウリル硫酸塩によってグラム陽性菌の発育を阻止するため培地の選択性はMMO-MUG法より強く、基質として培地に含まれるX-GALは比較的安定で偽陽

性反応の見られないことが特徴であるとされている。

培地はPro-mediaXM-50培地(エルメックス社製)を使用し、培地入プラスチック容器に検水50mlを無菌的に取り溶解させ、MMO-MUG法と同様に培養し25時間後に青色を呈したものを陽性とした。着色が薄く判定困難な場合には同培地のマニュアルに従って48時間まで培養時間を延長し判定した。

## 2-5 菌株の同定

LB-BGLB法及びMMO-MUG法で陽性だった検体は、グラム陰性桿菌同定用キット(API20E, bio-Merleux社製)により菌株の同定を行なった。

菌株は、MMO-MUG法の陽性管及びLB-BGLB法の確定試験の陽性管からEMB培地に画線し36で24時間培養し、出現した集落を標準寒天斜面培地で再分離した。

形成した集落から少量の検体を採り精製水入り試験管に浮遊させ同定キットのプレートに注入し、24時間培養後菌種を同定した。

## 2-6 培養時間による色調の変化等の検討

平成8年4月～7月に大腸菌群が陽性だった45検体をMMO-MUG法及びX-GAL法により再度検査し、培養後22時間から28時間まで2時間ごとに吸光光度計で吸光度(波長:MMO-MUG法415nm, X-GAL法655nm)を測定し、培養時間による呈色状況について検討した。

また、業務の関係から28時間培養後に陽性判定できない場合に、検体を冷蔵保存し翌日陽性判定できないか検討するため、直ちに4以下に冷却し冷蔵保存し、48時間後の吸光度を測定し色調の変化を調べた。同時に28時間経過した陽性管からEMB培地及び標準寒天斜面培地で再分離し菌株の同定も行なった。

## 3. 結果および考察

### 3-1 3方法による検査結果の比較

3方法による検査結果の比較を表1に示す。

3方法の陽性一致数は305検体中74件、陰性一致

は190件となっており，合計の一致率は86.6%であった。3方法の不一致数は305検体中41件であり，このうちLB-BGLB法とMMO-MUG法の結果が一致していたものは7件，LB-BGLB法とX-GAL法の結果が一致していたものは8件，MMO-MUG法とX-GAL法の結果が一致していたものは26件であった。

表1 3方法による検査結果の比較

BGLB法	MMO法	Xgal法	検体数	計	一致率(%) (不一致率)
+	+	+	74	264	86.6
-	-	-	190		
+	+	-	2	41	13.4
-	-	+	5		
+	-	+	5		
-	+	-	3		
-	+	+	22		
+	-	-	4		

305検体における3方法それぞれの陽性数は，LB-BGLB法では85件(陽性率27.9%)，MMO-MUG法では101件(33.1%)，X-GAL法では106件(34.8%)であり，LB-BGLB法での陽性率は他の2方法に比べ明らかに低い結果となっていた。

これについて古畑<sup>2)</sup>らは，MMO-MUG法で陽性反応を呈した菌株の中にLB-BGLB法でガス非産生株が存在すること，また，大腸菌群以外の菌種でMMO-MUG法が疑似陽性を呈する菌種があると報告している。

LB-BGLB法及びMMO-MUG法で陽性を示した検体の中から71検体について菌株の同定を行ったところ，分離された菌種(同定確率が80%以上)と各検査法における陽性数の内訳は表2のとおりであった。

分離された菌種は，Enterobacter属が35.4%と多く，Klebsilla属が27.4%，E.coliが17.7%，Citrobacter属が8.1%分離され，その他Serratia，Pasteurella，Kluyveraもわずかに分離された。

E.coli，Citrobacter属は，LB-BGLB法，MMO-MUG法及びX-GAL法の3方法とも100%陽性を示した。

Klebsilla属はMMO-MUG法で2検体が陰性であったが，平田<sup>3)</sup>らはKlebsilla属の中には陽性発現を開始するまで比較的長時間を要するものがあると報告しており，本調査においてもこの2検体とも28時間培養の時点では陰性であったが，その後48時間まで培養を続けると黄変した。

また，古畑<sup>2)</sup>らは，Enterobacter属は25～50%がガス非産生株であり，MMO-MUG法で黄変を呈する最少接種菌数のオーダーもEnterobacter属は，Klebsilla属，E.coli，Citrobacter属に比べ高いと報告しており，本調査でもEnterobacter属は，LB-BGLB法では分離した22検体のうち12検体(54%)しか陽性を示さず，また，MMO-MUG法及びX-GAL法でも2検体が陽性を示さなかった。

その他Serratia属の中にもLB-BGLB法では陰性であるがMMO-MUG法及びX-GAL法では陽性であるという疑似陽性反応を呈する菌種がみられた。

表2 分離された菌種と3方法での陽性数の内訳

菌種	総数	BGLB	MMO	X G A
Escherichia coli	11	11	11	11
Enterobacter cloacae	13	9	12	13
Enterobacter amnigenus	7	2	6	7
Enterobacter intermedius	1	0	1	1
Enterobacter sakazaki	1	1	0	1
Citrobacter freundii	5	5	5	5
Klebsiella pneumoniae	10	9	10	10
Klebsiella oxytoca	6	6	5	6
Klebsiella ornithinolytica	1	1	0	1
Pasteurella multocida	1	1	1	0
Pasteurella spp	1	0	1	1
Serratia liquefaciens	3	1	3	3
Serratia marcescens	1	0	1	1
Kluyvera spp	1	1	1	1
計	62	48	58	61

### 3-2 LB-BGLB法とMMO-MUG法の比較

LB-BGLB法とMMO-MUG法の結果の比較を表3に示す。

陽性一致数は305検体中76件，陰性一致数は195

件で合計の一致率は88.9%であり、不一致数は34件(11.1%)であった。MMO-MUG法が陽性でLB-BGLB法が陰性だったものは25件あり、このうちLB-BGLB法の推定試験から陰性だったものが3件、確定試験の段階で陰性になったものが7件、完全試験の段階で陰性になったものが15件であった。

MMO-MUG法が陰性でLB-BGLB法が陽性だったものは9件であった。

表3 LB-BGLB法とMMO-MUG法の比較

BGLB法			MMO法	検体数	計 (一致率)
推定	確定	完全			
+	+	+	+	76	271 (88.9%)
-			-	184	
+	-		-	10	
+	+	-	-	1	
+	+	-	+	15	34 (11.1%)
+	-		+	7	
-			+	3	
+	+	+	-	9	

### 3-3 LB-BGLB法とX-GAL法の比較

LB-BGLB法とX-GAL法の比較を表4に示す。

表4 LB-BGLB法とX-GAL法の比較

LB-BGLB法			XGAL法	検体数	計 (一致率)
推定	確定	完全			
+	+	+	+	79	272 (89.2%)
-			-	180	
+	-		-	12	
+	+	-	-	1	33 (10.8%)
+	+	-	+	15	
+	-		+	5	
-			+	7	
+	+	+	-	6	

陽性一致数は305検体中79件、陰性一致数は193件で合計の一致率は89.2%となっており、不一致数は32件(10.8%)であった。X-GAL法が陽性でLB-

BGLB法が陰性だったものは27件あり、このうちLB-BGLB法の推定試験から陰性だったものが7件、確定試験の段階で陰性になったものが5件、完全試験の段階で陰性になったものが15件であった。

X-GAL法が陰性でLB-BGLB法が陽性だったものは6件であった。

### 3-4 MMO-MUG法とX-GAL法の比較

MMO-MUG法とX-GAL法の陽性一致数は305検体中96件、陰性一致数は194件で合計の一致率は95.1%であり、LB-BGLB法との一致率に比べ高くなっている。不一致だった15件の培養時間による判定結果と分離された菌種の内訳は、表5のとおりである。表の中で(±)と表したものは肉眼で判定困難だったものである。

表5 MMO-MUG法とX-GAL法の不一致検体の内訳

	MMO法		X-GAL法		菌種
	28h	48h	28h	48h	
	-		+		Enterobacter cloacae
	±	+	±	+	Enterobacter cloacae
	-		+		
	-	±	±	+	
	-		±	+	
	±	+	±	+	Enterobacter amnigenus
	±	+	±	+	Klebsiella ornithinolytic
	±	+	±	+	Enterobacter cloacae
	-		+		Enterobacter sakazaki
	-		+		
	-		+		
	±	+	±	+	Klebsiella oxytoca
	+		-	±	Enterobacter amnigenus
	+		-		Pasteurella multocida
	+		-		
	+		-		

上水試験法では、MMO-MUG法は28時間を超えると偽陽性となることから、培養時間の延長は28時間までとされている<sup>4)</sup>のに対し、X-GAL法では、培地のマニュアルにより48時間まで安定であるとされている。このため、MMO-MUG法は28時間培

養の時点で(+)のものを陽性とし、X-GAL法は48時間培養の時点で(+)のものも陽性と判定した。これを陽性判定までの培養時間を同じにすると、MMO-MUG法が陰性でX-GAL法が陽性だった5件(表中 印)についても結果が一致し、2方法の一致率は96.7%になる。

この5検体から分離された菌種は、Enterobacter属が3株、Klebsilla属が2株であった。

### 3-5 大腸菌(E.coli)の判定

MMO-MUG法とX-GAL法の陽性管について、紫外線(波長366nm)の照射により青紫色の蛍光を確認しE.coliの有無を判定したところ、菌株の同定検査でE.coliが分離された11株のうち1株が蛍光を発しなかった。この菌株の同定はできなかったが、伊藤<sup>5)</sup>らは、E.coliの中でも腸管出血性大腸菌O-157:H7は  $\beta$ -glucuronidase活性がなく、紫外線の照射により蛍光を示す菌種は分離されていないと報告している。今回、O-157:H7の標準菌種をMMO-MUG法とX-GAL法で培養したところ、培地は約18時間後に陽性を示したが、紫外線の照射では蛍光を示さなかった。

坂崎<sup>1)</sup>は、E.coliの約5%は  $\beta$ -glucuronidase活性がないと報告しており、その陰性菌はMMO-MUG法でもX-GAL法でも見逃されてしまうことになるが、X-GAL法は培地にトリプトファンが加えられているため、Kovacsインドール試薬の添加によりインドールが産出され培地表面が赤変しE.coliの検出率は99%に向上するといわれている。

### 3-6 培養時間による色調の変化

培養時間による呈色の経時変化は、検査した45検体についてMMO-MUG法、X-GAL法とも同じような傾向がみられ、次の4つのパターンに大別できた。

- (1) 培養後22時間ですでに吸光度がピークに達し、48時間培養後には退色傾向がみられる。
- (2) 培養後26時間から28時間に吸光度がピークに達し、48時間培養後までほとんど色調の変化がない。

(3) 培養後28時間まで吸光度はゆるやかに上昇し48時間培養後まで更に上昇する。

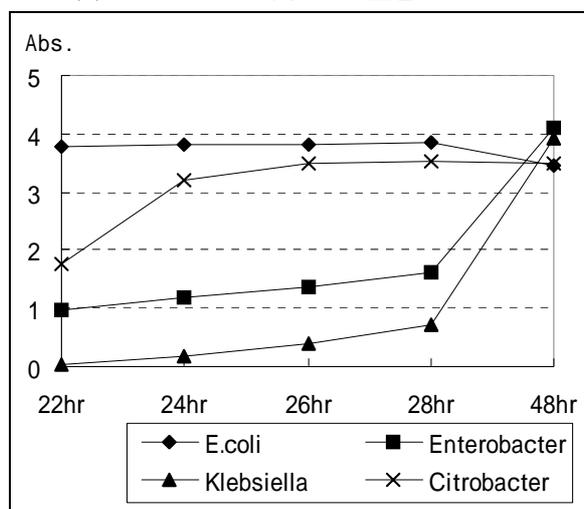
(4) 培養後24時間までほとんど呈色せず28時間後から急に吸光度が上昇する。

分離された菌種(同定確率が80%以上)は、(1)はすべてE.coliであり、(2)は同定できた株は少なかったがCitrobacter属、Klebsilla属が分離された。(3)は大部分がEnterobacter属であったが、Citrobacter属、Klebsilla属が僅か分離され、(4)はEnterobacter属、Klebsilla属であった。

平田<sup>3)</sup>らは、呈色反応が開始するまでの時間は菌種によって異なるが、その後の吸光度の上昇は菌種によらず1~2時間と短いと報告しているが、今回の検査結果では、Enterobacter属はゆるやかなカーブで呈色反応が進み、28時間後も上昇を続けていた。

菌種による代表的な呈色パターンを図-1に示す。

図1 MMO-MUG法による呈色パターン



呈色反応開始までの時間は、45検体中11検体でX-GAL法の方が早かったが、MMO-MUG法は陽性の判定をコンパレータと比較するため容易であるのに対し、X-GAL法は、淡黄色から青緑色への変色を肉眼で判定するためには、培養時間が24時間を超える程度発色が濃くならないと判定が難しい検体もあった。

### 3-7 冷蔵保存した場合の色調の変化

28時間培養後直ちに4 以下に冷却し冷蔵保存したものと、培養を続けたものの48時間後の吸光度の変化を表6に示す。

表6 48時間後の吸光度の変化

吸光度	MMO-MUG法		X-GAL法	
	冷蔵	培養	冷蔵	培養
上昇したもの	20	31	3	24
変化ないもの	24	6	42	19
低下したもの	1	8	0	2

MMO-MUG法では、45検体中20検体(44.4%)が冷蔵保存しても吸光度が上昇し続けた。このことから、休日等により28時間培養後に陽性判定できない場合に、恒温器の温度を36 で28時間培養後4 以下に冷却するように設定し、翌日に陽性判定することは、偽陽性になるものがあり難しいと思われる。

これに対しX-GAL法では、42検体(93.3%)が冷蔵前の色調と変わらず安定しており、休日前にスクリーニング試験としてX-GAL法で検査し、陽性だった検体について再度MMO-MUG法で確認試験することは可能であると考えられた。

28時間を超え培養を続けると、MMO-MUG法は31検体(68.9%)で吸光度が上昇し、特にEnterobacter属が分離された検体は、28時間を超えると急激に上昇した。また、E.coliが分離され早い培養時間から呈色を示した検体は、28時間を超え培養を続けると逆に吸光度が低下する傾向がみられた。

X-GAL法についても、培養時間は48時間まで可とされているが、28時間を超え培養を続けると24検体(53.3%)で吸光度が上昇した。このことから、X-GAL法においても、培養時間は28時間までで陽性判定すべきと考えられた。

#### 4. 結 語

飲用井戸水等の大腸菌群検査について、MMO-MUG法、X-GAL法及びLB-BGLB法の3方法の検出率、陽性を示した菌株等の比較検討を行なったところ、2つの酵素基質法は従来のLB-BGLB法に比べ陽性率は高かった。これは飲用井戸水中にEnterobacter属が多く検出され、この約半数がLB-BGLB法では陽性を示さないためと推定された。

MMO-MUG法とX-GAL法は、陽性判定までの培養時間を同じにすると一致率は96.7%と検査結果はよく一致した。また、培養時間による呈色状況も似たような傾向を示し、菌種による呈色のパターンはE.coliは呈色発現が早く、Enterobacter属はゆるやかなカーブで呈色し28時間経過後も吸光度は上昇した。

培養後冷蔵保存すると、MMO-MUG法では約半数について吸光度が上昇し続けたが、X-GAL法では色調に変化がなく安定していた。

X-GAL法は、上水試験法に定める公定法ではないことから飲用水検査には使用できないが、MMO-MUG法と検査結果はよく一致し、また培地がディスプレイの容器入りで価格も安価であること、冷蔵保存しても色調に変化がなく安定していることから、緊急時あるいはMMO-MUG法のスクリーニング試験として使用することは可能であると考えられた。

#### 5. 文 献

- 1)坂崎 利一：アスカニュース，第022号，1995.
- 2)古畑勝則，松本淳彦：東京都衛生研究所年報，42，194-201，1991.
- 3)平田 強，他：水道協会雑誌，61，27-33，1992..
- 4)厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法，日本水道協会，489-494，1993.
- 5)伊藤 武，甲斐明美：メディアサークル，36(5)，149-161，1991.

# Examination of Coliform Group Tests for Drinking Water Using Specific Enzyme Substrate Culture Medium Methods

Takako Sawada, Kazuto Kawashima, Yuji Sato and Yuko Kikuchi

With regards to coliform group tests for well water for drinking, 3 methods, MMO-MUG and X-GAL, which are enzyme substrate methods, and LB-BGLB, were compared in terms of detection rate of E.coli and its strains proving positive. Furthermore, the MMO-MUG and X-GAL methods were compared in terms of color reaction by culture time and changes in color tones when media were cooled and preserved after coloration. Positive rates were higher for the enzyme substrate methods as compared with the LB-BGLB method and coloring patterns differed according to strains of E.coli. The results of tests using the MMO-MUG and X-GAL methods corresponded well with each other. With the X-GAL method, no changes in color tones were observed when media were cooled and preserved after coloration. It is therefore considered that the X-GAL method can be used as a screening test for the MMO-MUG method.