



## 水中の大腸菌群および大腸菌検出用 特定酵素基質培地の紹介

エンテストジャパン株式会社 取締役技術部長 佐々木哲朗

### 1. はじめに

1992年に公布された水道水の水質基準(厚生省令第69号、平成4年12月21日)では、従来からの乳糖ブイオン培地およびブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイオン培地法(LB-BGLB培地法)に加えて、特定酵素基質培地法(MMO<sup>注1</sup>-MUG<sup>注2</sup>培地法)が追加採用された<sup>1)</sup>。

MMO-MUG培地の成分としては、2種類の合成酵素基質と数種類の無機塩類が目的とする細菌にとって必要最少限の栄養素として含まれている。さらに、その他のグラム陽性菌等の発育を抑制する成分が含まれている。2種類の合成酵素基質とは、大腸菌群を検出するための基質であるONPG<sup>注3</sup>と大腸菌を検出するためのMUGである。本培地を用いた試験は18~24時間以内に終了し、LB-BGLB培地法のような推定試験や確定試験等を必要としないのが特徴である。しかし、培地成分には詳細不明で一般では入手できない成分が含まれるので、自家調製が不可能であり、現在1社のみが製造し供給する輸入品に頼らざるを得ないという異例の事態が続いている。そこで、より安価な国内生産品の登場が期待されている<sup>2)</sup>。

ここ数年間に合成酵素基質培地が弊社の「コリターグ」をはじめ数社(表1:培地番号②~⑥)から発売され、実用評価試験結果<sup>3)</sup>なども報告されている。

これらを踏まえて日本水道協会水質試験方法等調査委員会は、「大腸菌群検査試薬の性能評価試験」として1997年に「標準菌株を用いた評価試験(1次分)」および1998年に「環境水を用いた評価試験(2次分)」の実施要領を開示した。これに対して4社(表1:培地番号②~⑤)が最終の2次試験まで実施しその試験結果を提出した。その結果は、1999年5月の第50回全国水道研究発表会<sup>4)5)</sup>で発表され、日本水道協会から検討結果の詳細が水道協会雑誌に投稿される予定である。また、この内の2培地が、西暦2000年改訂発行される、上水試験法に追加採用される予定となっている。

そこで、弊社の「コリターグ」を紹介する。

### 2. コリターグの概要

コリターグは飲料水や河川水、水泳プール水などの試料から大腸菌群および大腸菌を選択的に、より高感度に、しかも簡単な操作で迅速に検出できるように研究改良された液体培地である。

#### 2. 1. 品目・仕様

コリターグはγ線を照射した滅菌容器に液体培地が無菌的に分注されたもので、次の2種類の剤型の商品がある。

- 1)コリターグL-50:  
培地内容量50mL、検水量50mL
- 2)コリターグL-10:  
培地内容量10mL、検水量10mL

#### 2. 2. 反応機構

本培地は、ONPGとMUGの2種類の合成酵素基質が含まれている。大腸菌群に固有の酵素であるβ-ガラクトシダーゼが培地に含まれているIPTGによって活性化されONPGが加水分解され、o-ニトロフェノールが生成され、培地が黄変する(図1)。

また、MUGが大腸菌に固有の酵素であるβ-グルクロニダーゼによって加水分解され、4-メチルウンベリフェロンが生成され、培地に360nm付近の紫外線を照射することにより、青白色の蛍光を発する(図2)。

また、インドール源としてトリプトファンが添加されているので、培養後にコバック試薬を添加す

ることによってインドール産生性が試験できる。従来の乳糖含有培地では、乳糖の分解によって培地が酸性となり、トリプトファンゼが不活化されるためにインドール産生性を試験することができなかったが、乳糖の代わりにONPGを用いることにより試験が可能となった。

大腸菌の多くの菌種は、インドール陽性であることから、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ産生性および $\beta$ -グルクロニダーゼ産生性の試験と合わせることで試験結果の信頼性が一層高くなる。また、 $\beta$ -グルクロニダーゼ活性の弱い例外的な大腸菌や腸管出血性大腸菌のように $\beta$ -グルクロニダーゼ陰性菌の検索にも有効である。

本培地にはトリプトースが窒素源や発育素として添加され、さらに培地のpHが6.2に調製されているので、飲料水や河川水、プール水中にまれに存在する細胞壁に損傷を受けた大腸菌群および大腸菌でも、その損傷細胞が復活、増殖する。その際、培地中のトリメチルアミン-N-オキサイド(TMAO)がトリメチルアミン(TMO)に還元され、培地がpH7~8に自動調製され、ONPGやMUGの加水分解が促進し培地色の変化が明瞭となり、35~37°C、16~20時間培養後に大腸菌群および大腸菌を検出することができる。

### 2. 3. 比較試験結果

第50回全国水道研究発表会の報告<sup>4)5)</sup>では、表2のとおり塩素処理した環境水で陰性となったデータの回数は、コリターグは2回で公定2法よりも少なく、48時間後にはすべて陽性に転換した。また、コリターグは24時間培養でも従来のMMO-MUG培地よりも全般に高い検出率を示すことが認められた。

弊社の評価試験結果では、環境水およびその塩素処理後の試料を24時間培養した場合にMMO-MUG培地と比較すると、表3のとおり検出感度が高く、原水CおよびDで単離された菌種は、*Citrobacter deversus*であった。G. W. Chang<sup>6)7)</sup>は、コリターグが合成酵素基質以外にトリプトースやIPTG、TMAOなどが含まれ、pHの自動調整機能があるので、損傷性の細菌が回復しやすいことが考えられると報告している。コリターグは、公定2法のLB-BGLB培地やMMO-MUG培地で見落としがちだった大腸菌群および大腸菌も検出できることが確認された。

### 3. おわりに

環境水や塩素処理後の試料では、共存する細菌や爽雑物の影響を含めて目的とする細菌の全ての挙動を検証することは不可能である。しかし、弊社では今後、判定された大腸菌群および大腸菌を菌種レベルで同定し、できうる限り幅広い細菌の培地内の挙動などを検証し、その結果を逐次報告していく予定である。今回紹介したコリターグは、能率的でかつ経済的な検査に十分寄与するものと確信する。

#### 参考文献

- 1)厚生省生活衛生局水道環境部監修:上水試験方法・解説(社)日本水道協会p. 489 (1993)
- 2)古畑勝則:防菌防黴, 22(2), p. 109(1994)
- 3)中山宏他:日本食品微生物学会雑誌, 13(2), p. 63(1996)
- 4)宮川徹也他:第50回全国水道研究発表会講演要旨集, p. 628(1999)
- 5)宮内孝夫他:第50回全国水道研究発表会講演要旨集, p. 630(1999)
- 6)G. W. Chang他:Applied and Environmental Microbiology, p. 535, Vol. 55(1989)
- 7)G. W. Chang 他:US pat. 5411867, Am. Soc. of Microbiologist Annual Meeting Abstract(1992)

表1 合成酵素基質を配合した市販培地

| 培地番号          | ①MMO-MUG培地         | ②コリターグ             | ③                   | ④            | ⑤        | ⑥            |
|---------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------|----------|--------------|
| 製品形態          | 滅菌パック(容器)入り粉末      | 滅菌容器入り液体           | 滅菌容器入り粉末(顆粒)        | 粉末(顆粒)       | 滅菌容器入り粉末 | 粉末(顆粒)       |
| 培地の滅菌法        | ?                  | ろ過滅菌               | γ線照射滅菌              | —            | γ線照射滅菌   | —            |
| 事前滅菌処理試験用滅菌容器 | 不要<br>別途必要         | 不要<br>不要           | 不要<br>不要            | 用時滅菌<br>別途必要 | 不要<br>不要 | 用時滅菌<br>別途必要 |
| 使用時の培地pH      | 7.3±0.1            | 6.2±0.1            | 記述なし                | 7.1±0.1      | 記述なし     | 7.3±0.1      |
| インドール反応       | 不可                 | 可                  | 可                   | 記述なし         | 記述なし     | 可            |
| 内容成分(g/L)     | 14.2335g/L         | 12.85g/L           | 17.0g/L             | 17.4g/L      | 17.0g/L  | 17.0g/L      |
| 合成基質-1        | ONPG <sup>注3</sup> | ONPG               | X-GAL <sup>注4</sup> | X-GAL        | X-GAL    | X-GAL        |
| 合成基質-2        | MUG <sup>注2</sup>  | MUG                | MUG                 | MUG          | MUG      | MUG          |
| その他の特記成分      | —                  | IPTG <sup>注5</sup> | 非公開                 | IPTG         | —        | IPTG         |
|               | —                  | トリプトース             |                     | トリプトース       | トリプトース   | トリプトース       |
|               | —                  | トリプトファン            |                     | —            | —        | トリプトファン      |
|               | ソラニウム              | —                  |                     | ペプトン         | ソルビトール   | ソルビトール       |
|               | アムホテリンB            | —                  |                     | ピルビン酸Na      | —        | —            |

注1: Minimum Medium ONPG

注2: 4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド

注3: o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド

注4: 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド

注5: イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド

図1 大腸菌群のβ-ガラクトシダーゼ反応

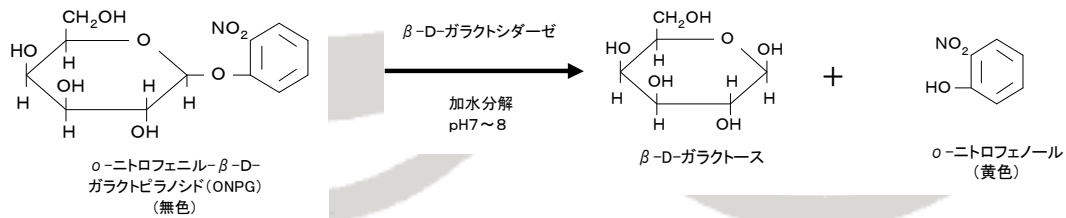


図2 大腸菌のβ-グルクロニダーゼ反応

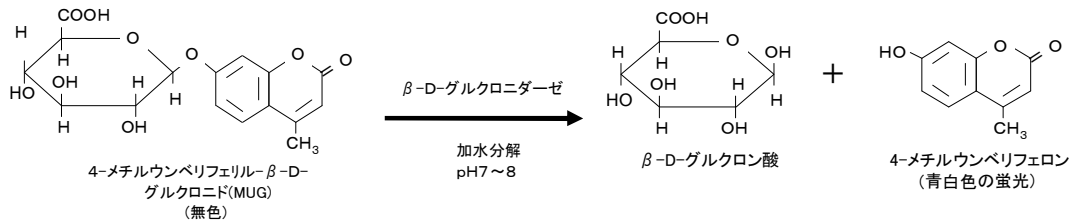


表2 陰性となった回数

|     | MMO 法陰性 | LB 法陰性 | コリターゲット |         |         |
|-----|---------|--------|---------|---------|---------|
|     |         |        | 陰性      | 48hr 陽性 | 48hr 陰性 |
| D 社 | 4       | 6      | 2       | 2       | 0       |

表3 環境水中の大腸菌群および大腸菌の検出感度比較

| 反応/原水              | A               | B    | C    | D    | E    | F    | G    | H    | 平均値  | 偏差    |
|--------------------|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 大腸菌群 <sup>注6</sup> | — <sup>注8</sup> | 1.50 | 8.24 | 7.04 | 0.94 | 1.00 | 1.44 | 0.71 | 2.98 | 3.154 |
| 大腸菌 <sup>注7</sup>  | -               | 1.80 | 1.89 | 1.00 | 1.00 | 1.20 | 3.08 | 1.69 | 1.67 | 0.727 |

注6:MMO-MUG 培地で24時間培養後の ONPG 陽性反応の MPN と1としてコリターゲット法の検出感度比を計算

注7:MMO-MUG 培地で24時間培養後の MUG 陽性反応の MPN を1としてコリターゲット法の検出感度比を計算

注8:MMO-MUG 培地と比較すると感度差が非常に大きい菌の混在が確認されたため、平均値の計算から除外した