

## 資料

# 飲料水の大腸菌検査における ONPG 陽性培養液中の腸内細菌科 に属する細菌について

山本陽子, 湯川利恵, 石野珠紀, 沖津忠行

## Investigation of Family *Enterobacteriaceae* in ONPG Positive Cultured from Drinking Water Tested for *Escherichia coli*

Yoko YAMAMOTO, Rie YUKAWA, Tamaki ISHINO  
and Tadayuki OKITSU

水道法(昭和32年法律第177号)第4条に基づく水質基準に関する省令が廃止され, 新たな水質基準に関する省令(平成15年厚生労働省令第101号)が平成16年4月1日から施行された。今回の改正の中で, 細菌学的項目および基準のうち従来の「大腸菌群が検出されないこと」が削除され, 新たに「大腸菌が検出されないこと」が追加になり同時に大腸菌の検査法が特定酵素基質培地法に統一された。特定酵素基質培地法では, 培地に接種された検体中に大腸菌群が存在した場合, 培地が黄変し, さらに大腸菌が存在した場合には紫外線照射下で培地が蛍光を発する。

今回, 新しい水質基準に対応するために, 我々が平成16年4月1日から飲料水の大腸菌検査に導入した特定酵素基質培地による検査において, 大腸菌または大腸菌群陽性と判定された培養液中の腸内細菌科 (*Family Enterobacteriaceae*) に属する細菌 (以下, 腸内細菌とする) について調査した。

調査は平成16年5~7月の間に, 当分室で飲料水の水質基準適合検査の依頼を受けた380検体について実施した。特定酵素基質培地としてコリラート(アスカ純薬)を使用し, これに検体を接種して36℃24時間培養後, ONPG (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) 陽性培養液について, DHL寒天培地(日水)を用い常法<sup>1)</sup>によって腸内細菌を分離培養した。培養後, 分離培地上

の肉眼で形態が区別可能な集落の代表株各々1株を釣菌し, TSI培地, SIM培地, リジン脱炭酸試験用培地およびVP半流動寒天培地(栄研)に接種した。これらの培地による確認試験<sup>1, 2)</sup>を実施するとともに, 市販簡易同定キット(IDテストEB20, 日水)を一部併用して分離株の属または種レベルまでを同定した。ONPG陽性かつ紫外線照射下で蛍光を認めたMUG(4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide)陽性培養液からの分離株は, すべてハートインヒュージョン寒天培地培養液をコリラート培地に各々接種培養後, 蛍光の有無を観察した。

供試した380検体中ONPG陽性は75検体(19.7%), うち8検体(2.1%)がMUG陽性であった(表1)。すなわち, 細菌学的項目が大腸菌群から大腸菌に変更されたことによって, 当該項目での水質基準不適合の割合はおよそ10分の1に減少した。

表1 飲料水の大腸菌検査結果(平成16年5~7月)

検査結果*	検体数				
	5月	6月	7月	計	
ONPG 陽性	MUG 陽性	0	5	3	8
	MUG 陰性	23	35	9	67
ONPG 陰性	89	115	101	305	
合計	112	155	113	380	

\*ONPG陽性かつMUG陽性は大腸菌陽性, その他は大腸菌陰性

ONPG陽性培養液75検体から釣菌した分離株数は118株で, 同一検体から2, 3, 4, 5および6種類の複数の分離株を釣菌した検体数が各々17, 2, 3, 2および1検体であった。118株のうち106株が腸内細菌に同定され, 残り12集落は *Aeromonas* 属菌7株, *Pseudomonas* 属菌1株および同定不能4株であった。同定できた114株について, ONPG陽性培養液のMUG結果別に一覧で示した(表2)。ONPG陽性かつMUG陽性培養液から分離された20株について, 各々コリラート培地で培養をした結果, MUG陽性であった分離株は大腸菌 (*Escherichia coli*) の7株だけで, MUG陽性が大腸菌の存在を証明できることを確認できた。

一方, 今回の供試検体では8検体の培養液がONPG陽性かつMUG陽性で大腸菌陽性と判定されたが, そのうち2検体からは大腸菌が分離できなかった(表3)。このことは検体中の大腸菌の菌量が他の腸内細菌よりも少量であったことが理由と思われるが, ヒト等の哺乳動物の糞便汚染指標菌として高い指標性を有する大腸菌と混在する他の腸内細菌も, 大腸菌と同様に指標菌としての有用

表2 ONPG 陽性培養液から分離された菌種または菌属

菌種または菌属	ONPG陽性培養液	
	(MUG陽性)	(MUG陰性)
腸内細菌科菌		
<i>Cedecea</i> 属		1
<i>Citrobacter amalonaticus</i>		1
<i>Citrobacter freundii</i>	3	8
<i>Citrobacter</i> 属	1	19
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	4
<i>Enterobacter amnigenus</i>		1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1
<i>Enterobacter sakazakii</i>		1
<i>Enterobacter</i> 属		8
<i>Escherichia coli</i>	7	
<i>Hafnia alvei</i>	2	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>		8
<i>Klebsiella ozaenae</i>		1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		8
<i>Klebsiella</i> 属		10
<i>Kluyvera ascorbata</i>		1
<i>Kluyvera cryocrescens</i>		3
<i>Proteus</i> 属	2	5
<i>Salmonella</i> BGIII		1
<i>Serratia ficaria</i>		1
<i>Serratia fonticola</i>		1
<i>Serratia liquefaciens</i>		1
<i>Serratia marcescens</i>		1
<i>Aeromonas</i> 属		
<i>Aeromonas caviae</i>		3
<i>Aeromonas hydrophila</i>		1
<i>Aeromonas sobria</i>		3
<i>Pseudomonas</i> 属	1	
計	20	94

性を無視できない場合があることを示唆するものと言えよう。従来の細菌学的項目であった大腸菌群にはこれらの腸内細菌も含まれることから、特に水道事業者でない一般家庭の井戸水等の水質検査においては、大腸菌群の検査結果を併せて提供することも検討すべき課題であると思われた。

(平成17年7月22日受理)

表3 大腸菌陽性培養液 (ONPG 陽性且つ MUG 陽性) からの分離株

番号	検体番号	分離月日	分離株
1	42	6月1日	<i>Pseudomonas</i> 属
			<i>Enterobacter cloacae</i>
2	1	6月14日	<i>Enterobacter aerogenes</i>
			<i>Enterobacter aerogenes</i>
			<i>Escherichia coli</i>
			<i>Citrobacter</i> 属
3	11	6月14日	<i>Escherichia coli</i>
			<i>Proteus</i> 属
			<i>Escherichia coli</i>
4	43	6月29日	<i>Escherichia coli</i>
			<i>Citrobacter freundii</i>
			<i>Proteus</i> 属
5	45	6月29日	<i>Citrobacter freundii</i>
			<i>Hafnia alvei</i>
			<i>Hafnia alvei</i>
			<i>Citrobacter freundii</i>
6	23	7月26日	<i>Escherichia coli</i>
7	40	7月27日	<i>Escherichia coli</i>
8	59	7月27日	<i>Escherichia coli</i>

## 文 献

- 1) 善養寺浩, 坂井千三, 寺山 武, 工藤泰男, 伊藤 武: 腸管系病原菌の検査法, pp.24-96, 医学書院, 東京 (1985)
- 2) Edited by John G H et al.: Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed., pp.175-192, Williams & Wilkins, Baltimore (1994)