

塩素処理後の水中大腸菌群および *E. coli* 検出用LB-BGLB法と 4種の市販培地の評価と比較

塩素処理後の水中大腸菌群および*E. coli* 検出についての
LB-BGLB法と
4種の市販培地の評価と比較

本検討は3部から構成され、4種の市販酵素培地：コリラート、レディーカルト、ECブルー、LMXブイヨンについて評価した。

- I. **ATCC**菌株の保存菌株の塩素処理
- II. 表面水9検体の塩素処理
- III. 日本の上水試験法
(**LB-BGLB**法)を用いた異なった容量
2水検体 (**50ml** と **100ml**) の比較

I. ATCC保存菌株の塩素処理試験

BACTERIAL STRAINS	
Escherichia coli	ATCC 11775
Klebsiella pneumoniae	ATCC 13883
Rahnella aquatilis	ATCC 33071
Citrobacter freundii	ATCC 8090
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853
Acinetobacter calcoaceticus	ATCC 23055
Serratia marcescens	ATCC 13880
Kluyvera ascorbata	ATCC 33433
Enterobacter sakazakii	ATCC 29544
Enterobacter cloacae	ATCC 13047
Aeromonas hydrophila	ATCC 7966

ATCC保存菌株の塩素処理試験には以下の溶液を使用：

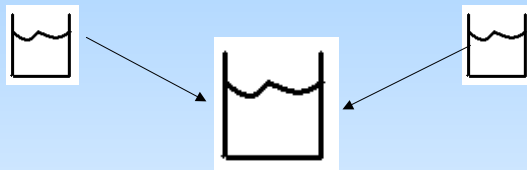
- **リン酸バッファー (PBS):** リン酸ニ水素カリウム (KH_2PO_4) 42.5 gを100ml脱精製水に溶かし、水酸化ナトリウム(4w/v%)を加えて、**pH7.2**に調節後、脱イオン水で1,000 mlに希釈
- **リン酸バッファー希釈液 (PBD):** リン酸バッファー1mlを脱精製水で1,000 mlに調製し、121℃で20分滅菌
- **オリジナル細菌懸濁液 (OBS)** すべての株を標準寒天 (PCA)に画線塗抹し、37℃で20～24時間培養。ループを使って細菌コロニーをいくつか釣菌し、リン酸バッファー希釈液 (PBD)に懸濁させた後、5000Gで20分遠心分離(2度繰り返す)。希釈後、PCA上のコロニーを計測。

- **生存微生物収集容器 (SOC)** : チオ硫酸ナトリウム溶液 (1mol/L) 0.5mlを蓋付きの100mlガラス容器に分注後滅菌
- **菌液の調製 (BS)**: 400mlリン酸バッファー希釈液 (PBD) を500 mlガラス容器に無菌的に分注し、McFarlandにしたがって細菌濃度が約 10^8 - 10^9 cfu/ml になるようにオリジナル細菌懸濁液 (OBS)を加え、20°Cの水浴中で保存する。この溶液の一部は塩素溶液と混合する直前にコロニー数測定
- **塩素溶液の調製 (CS)**: 400mlリン酸バッファー希釈液 (PBD) を500 mlガラス容器に無菌的に分注。次亜塩素酸ナトリウム溶液の残渣塩素濃度が0.3mg/Lになるようにリン酸バッファー希釈液 (PBD)を加えて希釈し、20°C水浴中で保存。この液の一部を取り、温度、pH、遊離残存塩素濃度、結合残存塩素濃度を測定

菌液で人為的に汚染させた検水の調製と接種

菌液 (BS)400ml:

塩素溶液 (CS)400ml:



15、30、60、120、300秒後に100 mlをそれぞれ生存微生物収集容器 (SOC)に移し、試験に供する(検水)。

0、120、300秒後の遊離残存塩素濃度と結合残存塩素濃度
300秒後の温度とpH

各接触時間(15、30、60、120、300秒)の検水50mlにリン酸バッファー希釈液450mlを加えて希釈し、各10mlを4種の市販培地とLB-BGLG法の試験管10本づつに接種する。

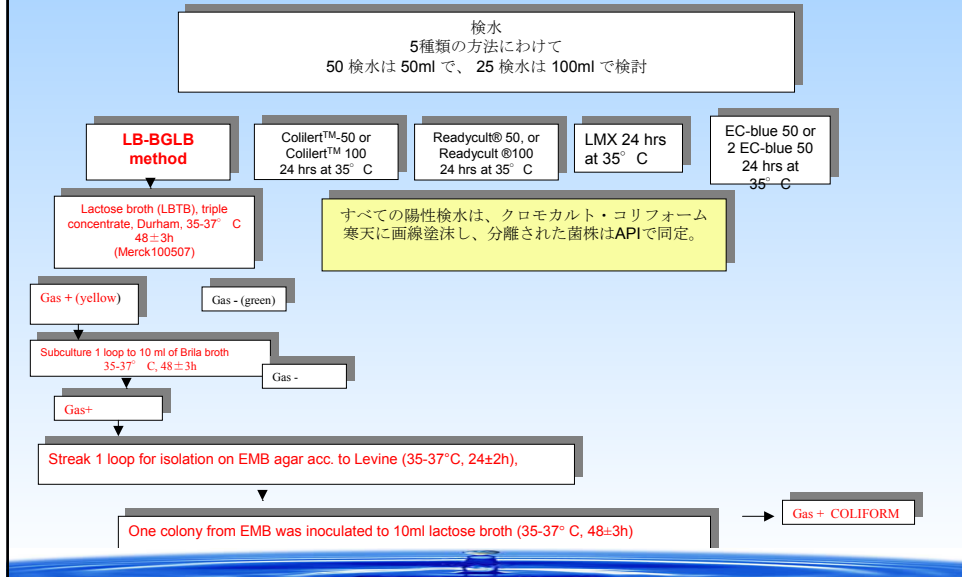
II. 地表水の塩素処理試験

- 地表水検水を異なる9箇所から採取し、第2部の試験に使用
- 検水は最終塩素濃度が0.05～1.0 mg/Lになるように塩素溶液（CS）を加えて調製
- 検水は塩素溶液に20、60、180、300、1800秒間接触させ、接種直前に遊離残存塩素濃度と総残存塩素濃度を測定。
- MPN結果は各塩素処理された地表水検体を4種の市販培地とLB-BGLB法に接種して算定。接種済の試験管は各々24、28、48時間培養後に観察。

III. 上水試験法(LB-BGLB 法)

- 本検討の第3部では検水をオーストリアの各地で採取し、日本の公定法であるLB-BGLB法を使用して*E. coli* と大腸菌群を測定し、4種の酵素法：コリラート、レディーカルト、LMX、ECブルーと比較した。
- 50個の検水は水50ml、25個の検水は水100mlを用いて検討した(表1)。

表1：上水試験法による検査
(LB-BGLB、コリラート、レディーカルト、ECブルー)



結果および検討

ATCC保存菌株の塩素処理試験

- 塩素処理は大腸菌群を損傷すると考えられるため、各種培地を使用した塩素処理した株の検出感度を試験。
- 菌数 10^7 - 10^9 cfu/ml の株はすべて約0.2 mg/L (塩素として) に15、30、60、120、300秒間接触すると塩素処理された。
- 塩素処理後、各希釈検体は各培地に付き10本の試験管に接種し、24時間培養後の陽性反応を観察。

塩素処理したATCC保存菌株に対する検出結果

- 結果は以下のとおり。 *E. coli* ATCC 11775、 *K. pneumoniae* ATCC 13883、 *R. aquatilis* ATCC 33071、 *P. aeruginosa* ATCC 27853、 *A. calcoaceticus* ATCC 23055、 *S. marcescens* ATCC 13880、 *A. hydrophila* ATCC 7966 は塩素の影響を受け15秒後には完全に不活性化し、細菌はいずれの培地にも培養24時間後には検出されなかった。
- 多少の差異が以下の株について確認された。 *C. freundii* ATCC 8090、 *K. ascorbata* ATCC 33433、 *E. sakazakii* ATCC 29544、 *E. cloacae* ATCC 13047

II. 地表水の塩素処理

- 第2部の検討において、地表水を9個所で採取し、MPN法による分析のために塩素溶液（CS）を添加して調製した。
- 塩素処理の後、各検水を培地1種につき10本に接種し、MPNの結果を培養時間24、28、48時間後に計測した。

表3.1 塩素処理および24時間、28時間、48時間培養後の検水中の大腸菌群の検出結果
(塩素処理20秒、1800秒後の陽性結果の数)

Watersites	Readycult		Colilert		EC-Blue		BOLB		LMX	
	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)
LIESINGBACH (129 cfu/ml, 0.14 CI)	10/10/10 E. sakazakii C. freundii E. coli	9/9/9 E. sakazakii C. freundii E. coli	5/10/10 E. sakazakii E. coli	8/9/10 E. sakazakii E. coli	7/7/9 E. sakazakii C. freundii E. coli	4/6/10 E. sakazakii C. freundii E. coli	10/10/10 E. sakazakii A. hydrophila E. coli	9/9/10 E. sakazakii E. coli	10/10/10 E. sakazakii E. coli	10/10/10 E. sakazakii A. hydrophila E. coli
ST. ANDRÄREE (132 cfu/ml, 0.25 CI)	0/1/4 A. hydrophila	0/1/4 A. hydrophila	0/0/0	0/0/2 E. enterobacter spp	0/4/6 A. hydrophila	0/1/2 A. hydrophila V. fluvialis	0/0/0	0/0/0	0/0/3 V. fluvialis	0/0/1 V. fluvialis
DONAU (63 cfu/ml, 0.05 CI)	0/0/2 V. fluvialis	0/0/1 V. fluvialis	0/0/0	1/2/3 P. shigelloides	3/4/4 V. fluvialis	1/1/1 V. fluvialis	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/3 V. fluvialis

表3.2 塩素処理および24時間、28時間、48時間培養後の検水中の大腸菌群の検出結果
(塩素処理20秒、1800秒後の陽性結果の数)

Watersites	Readycult		Coliart		EC-blue		BGLB		LMX	
	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)	20 sec. (24/28/48h)	1800 sec. (24/28/48h)
LAXENBURGBACH (850 cfu/ml, 0.51 CI)	0/0/1 A. hydrophila	0/0/0	0/0/3 A. hydrophila	0/0/1 A. hydrophila	0/0/10 A. hydrophila	0/0/2 A. hydrophila	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
OBERLAA (48 cfu/ml, 0.09 CI)	0/0/9 A. hydrophila	0/0/6 A. hydrophila	1/1/1 A. hydrophila	1/1/3 A. hydrophila	7/7/10 A. hydrophila	6/6/8 A. hydrophila	0/0/0	0/0/0	0/0/6 A. hydrophila	0/0/4 A. hydrophila
AU/ Donau (380 cfu/ml, 0.25 CI)	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0
TULLN/ Donau (140 cfu/ml, 0.20 CI)	0/0/0	0/0/0	0/0/1 A. hydrophila	0/0/0	0/0/1 A. hydrophila	1/1/1 A. hydrophila	0/0/0	0/0/0	0/0/1 A. hydrophila	0/0/0
PINKA (96 cfu/ml, 0.06 CI)	1/1/1 Serratia spp	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/1/2	0/0/0	0/0/0	1/2/2 Serratia spp	0/0/4 Serratia spp A. hydrophila	1/1/1 Serratia spp E. cloacae E. sakazaki
EINSEKANKAL (1250 cfu/ml, 0.45 CI)	8/10/10 A. hydrophila E.coli E. sakazaki	0/0/3 A. hydrophila	8/9/10 E. sakazaki	2/4/9 E. sakazaki	10/10/10 A. hydrophila	8/9/10 A. hydrophila	5/9/10 A. hydrophila	0/0/2 A. hydrophila K. oxytoca	3/3/10 E.coli A. hydrophila	3/1/7 E.coli A. hydrophila

地表水の塩素処理に対する検出結果

- 表3の結果から、特に検水が非常に汚染されている場合、**E. coli** はすべての方法で24時間後に検出されると結論できる。
- 大腸菌群が存在していると、検討したすべての培地から24時間培養後に陽性結果が得られた。
- 別の検討結果によると、培養時間が24時間以上の場合、**アエロモナス**、**プレジオモナス**などのオキシダーゼ陽性細菌により生じる偽陽性の割合が高めにすることは注目すべき点である。**アエロモナス**の場合、酵素法はすべて例外なく同様の結果を示した。

地表水の塩素処理に対する検出結果

- 我々の検討結果から、Landre et al (1997)はコリラートでは偽陽性の大腸菌群反応はアエロモナスが仲介していると述べている。
- 得られたデータは*A. hydrophila* が非常に低い濃度で陽性の大腸菌群と同じ反応を引き起こすことを明確に示す。僅か1 cfu/mLの菌液で陽性反応を示すことが観察された。アエロモナスの中温菌群の別の菌からも同様の結果が得られた。
- 偽陽性の問題を解決するために、Alonso et al. (1996)と Geissler et al. (1998)は培地にセフスロジン 5 ~ 10 μ g/ml 加えるとアエロモナスとフラボバクテリウム属の発育を抑制すると示唆している。

III. 上水試験法 (LB-BGLB 法)

LB-BGLB法と各種酵素法を使用した大腸菌群
および*E. coli*の検出法の比較
(培養時間24時間と48時間、検水25個、検体量
100 mlの場合)

表4：LB-BGLB法と各種酵素法を使用した大腸菌群およびE. coliの比較検出法（培養時間24時間と48時間、検水量100 mlの場合）

Nr.	LBT B 1d	LBT B 2d	R C 1 d	R C 2 d	Fl u o r e s c e	EC + BI ue	EC - BI ue	Fluor escen s	Coli lert 2d	Coli lert 4d	Fluor escen s	L M X	L M X	Fluor escen s	Indol	Isolated strains
1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	E. coli, oxidase +, C. braakii, E. sakazakii
2	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	oxidase +, K. pneumoniae, Enterobacter spp.
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, C. freundii, K. pneumoniae
4	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	E. coli, C. braakii, S. ficaria
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	E. coli, C. braakii, Lecl. Adecarboxylata, oxidase +
6	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	Oxidase +
7	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	C. youngae, Enterobacter spp.
8	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	C. freundii, oxidase +
9	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	E. sakazakii
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, C. braakii, S. marcescens
11	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	oxidase +, C. freundii
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	oxidase +, C. youngae, E. amnigenus
13	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	oxidase +, C. youngae
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, K. pneumoniae, S. odorifera
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, E. aerogenes, K. terrigena
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca, C. youngae
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca, C. freundii
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, K. pneumoniae, C. freundii
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, C. freundii, Serratia spp.
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. sakazakii
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, K. pneumoniae
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, K. pneumoniae, K. Ornithinolytica
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, K. oxytoca, C. braakii
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, C. youngae
N+	16	24	2	2	1	16	22	12	2	24	7	1	2	17	21	Confirmed E. coli: 15 Confirmed coliform: 23

LB-BGLB法と各種酵素法を使用した大腸菌群およびE. coliの比較検出法（培養時間24時間と48時間、検水量100 mlの場合）

(確認済みE. coli 15株および確認済み大腸菌群23株)

Method	LBTB	Readycult	EC blue	Colilert	LMX
Coliform/24 h	16	22	16	20	18
Coliform/48 h	24	23	22	24	23
Confirmed coliform	23	23	23	23	23
Fluorescence	-	16 Clear fluorescence Indole reaction as confirmation	12 Clear fluorescence 1 weak fluorescence 13 samples are positive	7 Clear fluorescence 5 weak fluorescence 12 samples are positive	17 Clear fluorescence Indole reaction as confirmation
Confirmed E. coli	15	15	15	15	15

結果および考察

上水試験法(LB-BGLB 法)

- コリラート を使用した場合 *E. coli* を含むことを確認済みの検水15検体中、7検体は明らかな蛍光を示し、5検体は弱い反応を示した。
- レディーカルトでは16検体、そしてLMXでは17検体が明らかな蛍光を示した。
- インドール反応により *E. coli* の存在が確認でき、偽陽性の結果を削除できた。
- ECブルー を使用した場合12検体は明らかな蛍光を示し、弱い蛍光は1検体のみであった。

上水試験法(LB-BGLB 法)

LB-BGLB法と各種酵素法を使用した大腸菌群および *E. coli* の検出法の比較—培養時間24時間と48時間、検水50検体、検体量50mlの場合

表5：LB-BGLB法と各種酵素法を使用した大腸菌群およびE. coliの比較検出法（培養時間24時間と48時間、水検体量50 mlの場合）

Nr.	LBTB 1d	LBTB 2d	RC 1d	RC 2d	FL	EC-Blue 1d	EC-Blue 2d	FL	Colli-let 1d	Colli-let 2d	FL	LMX	LMX	FL	Indole	Isolated strains
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Citrobacter youngae
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Pasteurella spp.
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Citrobacter youngae
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Citrobacter spp.
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Not detectable
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	K. pneum. Pneumodae
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Pantoea spp.
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Citrobacter freundii
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Enterobacter sakazaki
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Enterobacter spp
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Coilform, not detectable
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Vibrio cholera
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Stenomonas maltophilia
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Not detectable
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	oxidase +

表5：LB-BGLB法と各種酵素法を使用した大腸菌群およびE. coliの比較検出法（培養時間24時間と48時間、検水量50 mlの場合）

Nr.	LBTB 1d	LBTB 2d	RC 1d	RC 2d	FL	EC-Blue 1d	EC-Blue 2d	FL	Colli-let 1d	Colli-let 2d	FL	LMX	LMX	FL	Indole	Isolated strains
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli oxidase +
27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter cloacae, Plesiomonas shethii
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter cloacae
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazaki, Citrobacter koseri
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, oxidase +
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter cloacae, Pseudomona aeruginosa
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter cloacae, Serratia liquefaciens, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Enterobacter spp., Bacillus
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Klebsiella oxytoca, Escherichia hermannii, Proteus vulgaris
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter amnigenus, Citrobacter freundii, Serratia marcescens
36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter cloacae, Providencia rettgeri
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Pantoea spp., Aeromonas hydrophila
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, P. aeruginosa, Citrobacter braakii, Serratia marcescens
39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	oxidase +, Citrobacter braakii, Citrobacter freundii, Serratia odorifera, Klebsiella
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, E. fergusonii, Klebsiella oxytoca, Citrobacter braakii
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter braakii, Klebsiella pneumoniae, Plesiomonas shethiioides, Pseudomonas fluorescens
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Citrobacter braakii, Citrobacter youngae, oxidase +
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Citrobacter braakii, Serratia liquefaciens, oxidase +
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E. coli, Enterobacter sakazaki, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, oxidase +
46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Enterobacter cloacae, oxidase +
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Enterobacter cloacae, Serratia liquefaciens, oxidase +
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Klebsiella terrigena, Enterobacter spp.
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	35	32	35	17	31	36	17	33	35	13	33	35	15	23	Confirmed E. coli: 15 Confirmed Coilforms: 30	

LB-BGLB法と各種酵素法を使用した大腸菌群および*E. coli*の比較検出法（培養時間24時間と48時間、検水量50 mlの場合）

要約: (確認された *E. coli* 15 菌株 及び確認された 大腸菌群 30 菌株)

方法	LBTB	レディーカルト	EC ブルー	コリラート	LMX
大腸菌群/24 h	26	32	31	33	33
大腸菌群/48 h	35	35	36	35	35
確認された大腸菌群	30	30	30	30	30
蛍光	-	17	17	13	15
確認された <i>E.coli</i>	15	15	15	15	15

結果および考察

上水試験法(LB-BGLB 法)

- *E. coli* を含むことを確認済みの検水15検体中、コリラートでは13検体が、明らかな蛍光を示し、レディーカルトとECブルーでは17検体で、LMXは15検体で検出。(はっきりした青い蛍光)

GUD- インドール

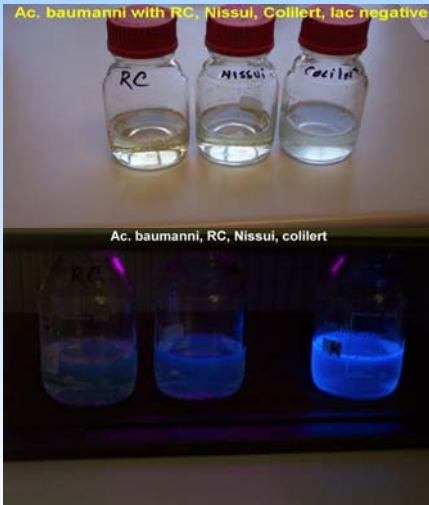
β-グルコニダーゼ陽性 グラム陰性菌のまとめ

Organism	% Phenotypically Positive
<i>Escherichia coli</i>	94-97%
<i>Escherichia non-E. coli</i>	0%
<i>Shigella</i> spp.	40-67%
<i>Salmonella</i> spp.	17-29%
<i>Yersinia, Citrobacter, Flavobacter, Bacteroides</i>	Occasional species positive

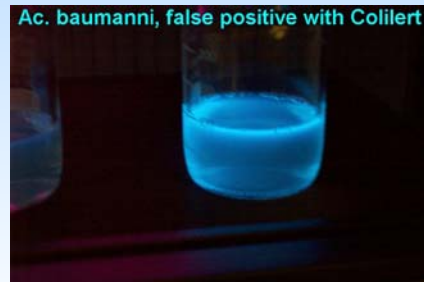
GUD- インドール

- Augoustinos et al. (1993) はMUG培地から**GUD**陽性 *E. coli* 95.7%分離し、さらにGUD酵素を産生できる *Shigella* および *Salmonella*の菌株を見つけた。
- Alonso et al. (1996) は、GUD産生能力のある *Klebsiella oxytoca*、*Serratia fonticola*、*Yersinia intermedia* 数株を見つけた。
- フラボバクテリウム属、スタフィロコッカス属、ストレプトコッカス属、クロストリジウム属のある菌株も**GUD**を産生することが分かっていることも言及する必要がある。

GUD- インドール



Acinetobacter anitratus (Ac. baumannii)
(レディカルト, ECブルー、コリラート)



- ヨーロッパ飲料水指導要領(LTTC)に記載の大腸菌群および*E. coli*の菌数算定公定法を別法と比較した (Schet et al., 2002).
- それにより、コリラートは良好な手法ではあるが、大腸菌群の幅広いグループを計数し、その結果高めの数値となる一方、*E. coli*菌数算定では低めの値と偽陰性の結果を示したことが分かった。

- **LMX**ブイヨンとコリラートによる大腸菌群および *E. coli* の**P/A**検査数の評価がイギリスの環境部シリーズに発行されている(**Lee et al., 1995**)。
- **4種**の**P/A**検査をイギリスの公定法と比較し、メンブラン法よりも多くの大腸菌群が検出できることを確認した。さらに**LMX**ブイヨンの結果が判定が最も容易であった。

- この検討の結論：大腸菌群と *E. coli* 両方についてすべての点で優れた**P/A**法はなかった。採取地による生態上の違いが目立ったことも一因である。
- ある特定の**P/A**法を使用前には、地理的な地域毎に正当性を確認することが重要である。

- **ECブルー** の場合、細菌の発育と偽陽性の結果は一般的に多かった。
- **ECブルー**は唯一、ピルビン酸ナトリウムを含む製品で、別の検討においても同様の結果であったためこの現象の原因である可能性がある。
- 我々の見解では、大腸菌群の検出には**24**時間培養で十分である。

酵素法を用いた水中大腸菌群と ***E. coli***
の検出に対するピルビン酸ナトリウム
添加剤の影響

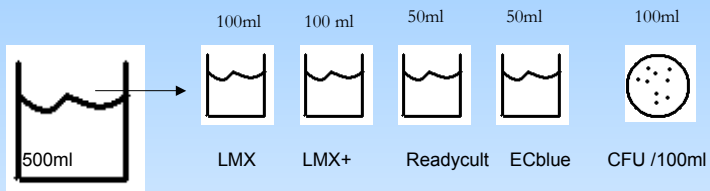
- **Chang et al. (1993)** は *E. coli* に汚染された人工海水にピルビン酸ナトリウムを添加すると、新鮮な普通寒天培地に使用した場合、*E. coli* の回収率が格段に改善されたと報告している。
- 別の検討によると、自家製培地にピルビン酸ナトリウムを添加すると、有毒な H_2O_2 を分解してストレスの多い菌が回収された。

- 本検討ではピルビン酸ナトリウムの添加により酵素法による検査において *E. coli* と大腸菌群の回収率が改善されるかどうかを調査した。
- **52** の水検体を **4** 種の酵素培地、**LMX**、レディーカルト、ピルビン酸ナトリウム添加 **LMX**、**EC** ブルー を用いて調査した。
- 水検体は採取したと冷却後に検査した。

LMX, LMX+, Readycult and ECblue

- **Fluorocult® LMX acc. to MANAFI and OSSMER:(g/litre)**
Tryptose 5.0; sodium chloride 5.0; sorbitol 1.0; tryptophan 1.0; di-potassium hydrogen phosphate 2.7; potassium dihydrogen phosphate 2.0; lauryl sulfate sodium salt 0.1; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-GAL) 0.08; 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide (MUG) 0.05; 1-Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranoside 0.1.
- **Readycult® : g / snap pack** :Tryptose 0.25; sodium chloride 0.25; sorbitol 0.05; tryptophan 0.05; di-potassium hydrogen phosphate 0.135; potassium dihydrogen phosphate 0.1; lauryl sulfate sodium salt 0.005; X-GAL 0.004; MUG 0.0025; IPTG 0.005.
- **LMX+:** **ピルビン酸ナトリウム1.0 添加 LMX**

材料及び方法

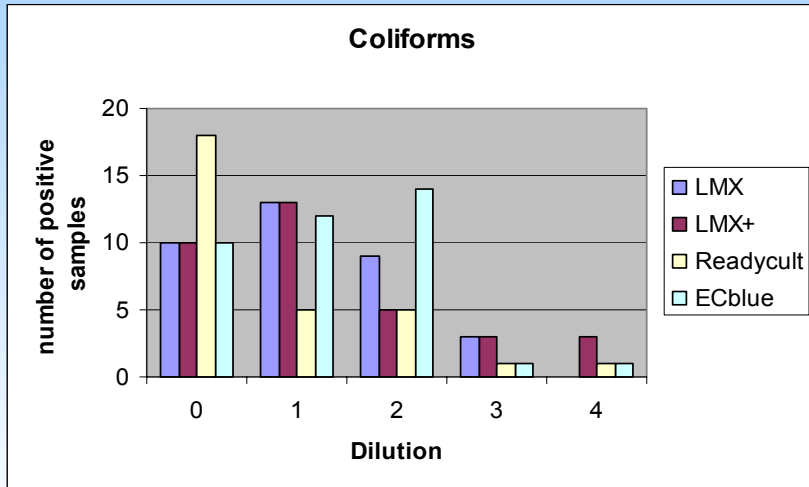


すべての検体は陽性

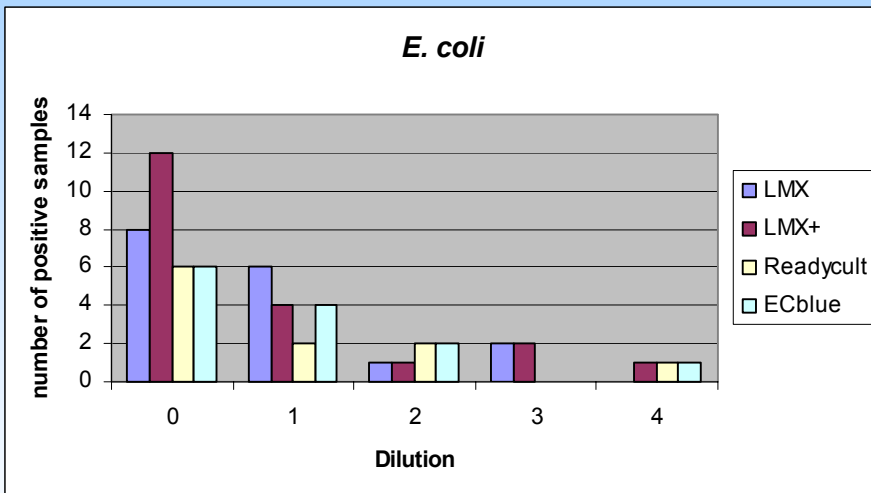
すべての検体は陰性



結果

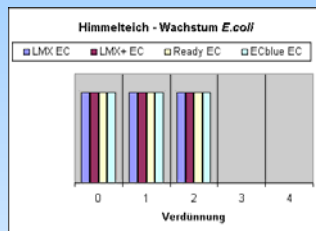
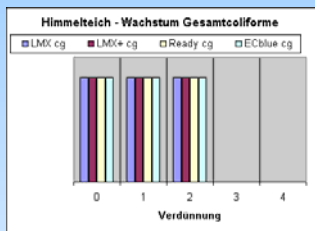


結果



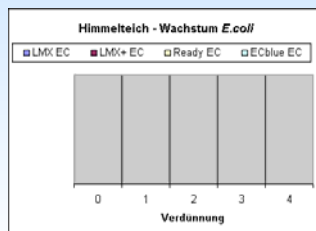
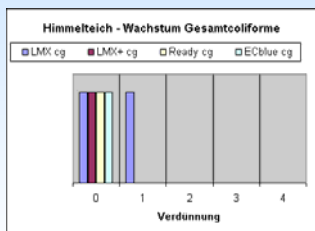
大腸菌群

E. coli



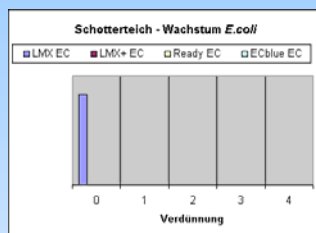
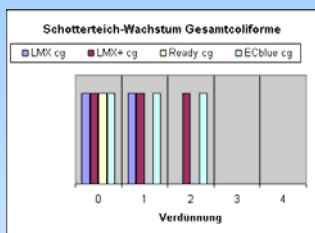
冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



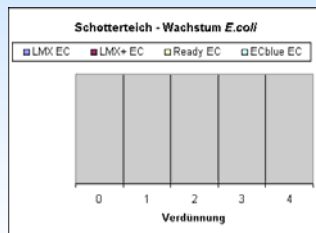
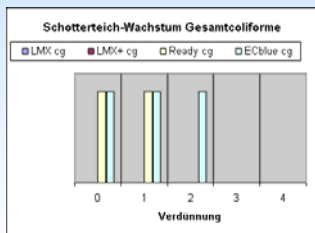
大腸菌群

E. coli



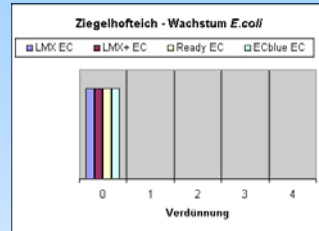
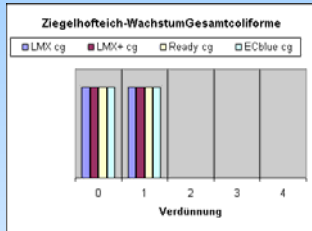
冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



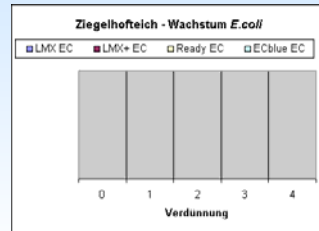
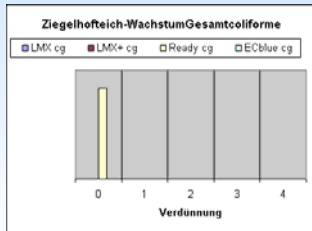
大腸菌群

E. coli



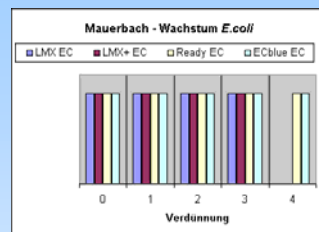
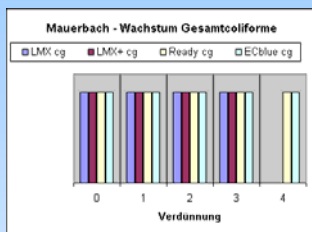
冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



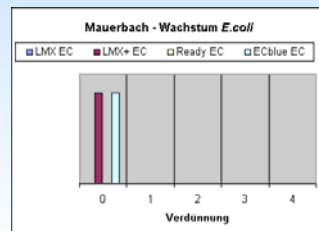
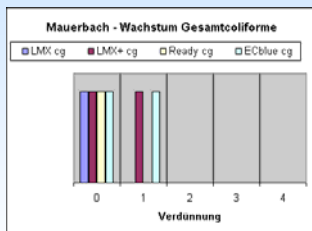
大腸菌群

E. coli



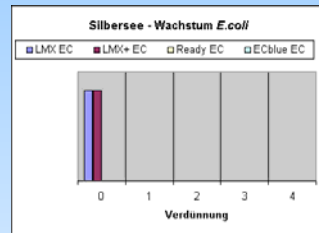
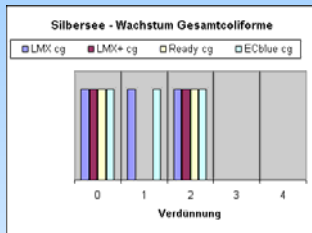
冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



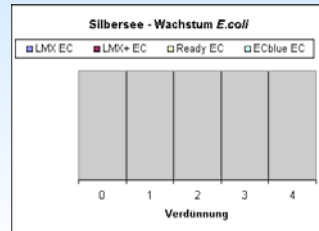
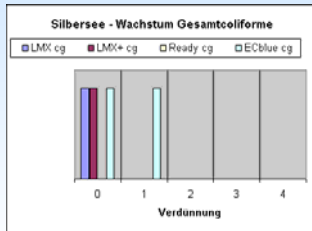
大腸菌群

E.coli



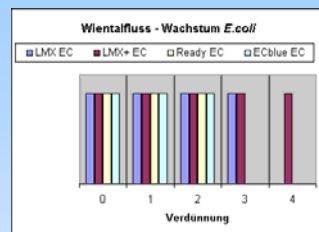
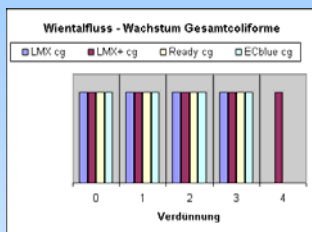
冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



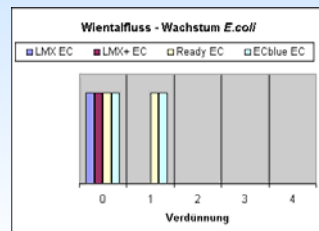
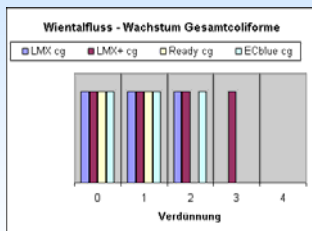
大腸菌群

E.coli



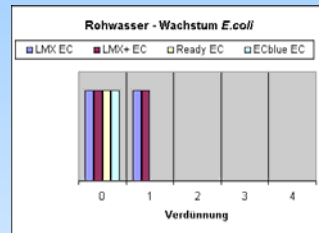
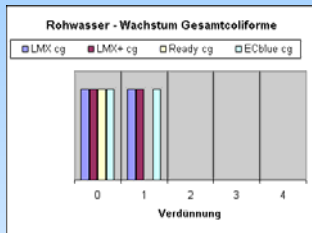
冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



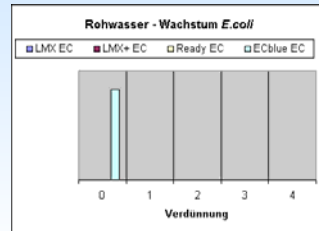
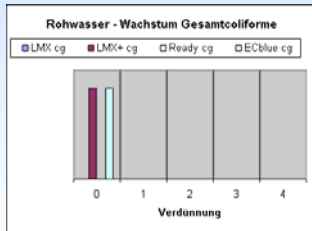
大腸菌群

E.coli



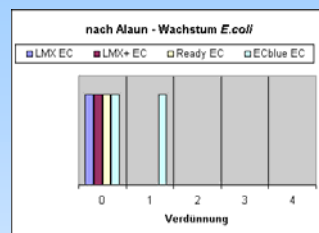
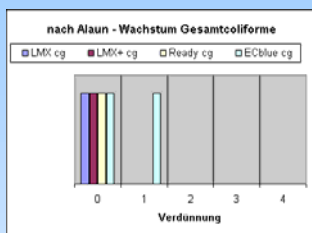
冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



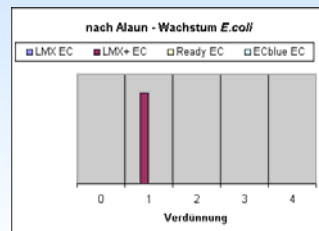
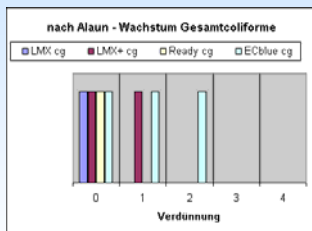
大腸菌群

E.coli



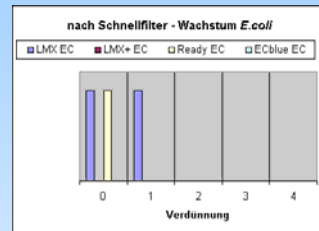
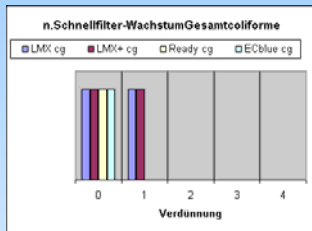
冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



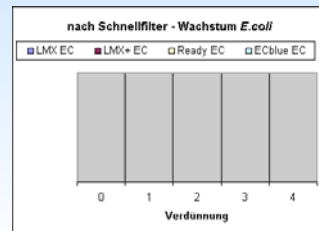
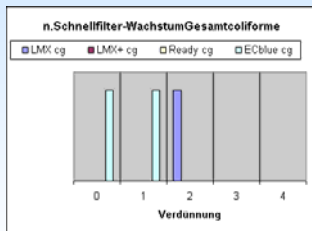
大腸菌群

E. coli



冷却後の大腸菌群

冷却後の *E. coli*



結論

- 酵素法はLB-BGLB法と同様に良好で迅速な結果を出せることに疑問の余地はない。
- 一方、インドール確認試験は偽陽性の割合を削減でき、推奨できる。

結論

- ピルビン酸ナトリウムの添加は菌の回収率を改善できるが、共存菌により偽陽性が多くなる。
- 大腸菌群の検出には**24**時間培養で十分である。
- ある特定の**P/A**法を使用前には、地理的な地域毎に正当性を確認することが重要である。