

水泳プールの水質及び飲料水検査における

大腸菌及び一般細菌の検査方法について

< 平成15年度版 >



愛知県学校薬剤師会

< はじめに >

「学校環境衛生の基準」の改正及び「愛知県プール条例施行規則等の一部改正」に伴う大腸菌群の測定方法及び一般細菌の検査についてその改正点及び検査方法について考えます。

今回の改正により大腸菌群及び一般細菌検査は以下の方法により毎月1回以上実施することとされました。

< 大腸菌群 >

乳糖ブイオン-ブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイオン培地(LB-BGLB)法(1)又は特定酵素基質培地(MMO-MUG)法(2)により培養を行うが、大腸菌群は、検出されてはならない。

1 LB-BGLB法

● 推定試験

検水50mlを3倍濃厚乳糖ブイオン培地(LB)に加え、孵卵器内で35℃ないし37℃で45ないし51時間培養し、ガスの発生を観察する。この時ガスの発生がなければ大腸菌群陰性である。

● 確定試験

上の推定試験においてガスの発生を観察したときは、直ちに当該発酵管中の菌液1白金耳量をブリリアントグリーン乳糖胆汁ブイオン培地(BGLB)に移植し、孵卵器内で45℃ないし51時間培養しガスの発生を観察する。このときガスの発生がなければ大腸菌群陰性である。

2 MMO-MUG法

ネジ口試験管に(乾燥滅菌済)MMO-MUG培地を分注し検水50mlを加え、直ちにネジ口栓を強く締め、試験管を上下に激しく振って培地を溶かした後、孵卵器内で24時間培養し、黄変の有無を観察する。このとき、検水の色が比色液より薄いときは大腸菌群陰性です。検査が短時間で実施できるのが特徴です。

比色液はO-ニトロフェノール4mg、ヘベス6.9g、ヘベスナトリウム塩5.3gを混合し、精製水を加えて1ℓとし、ネジ口試験管に分注して作る。

3 その他の方法

平成14年5月22日の事務連絡より、プール及び飲料水水質検査で学校環境衛生の基準の中で大腸菌群検査法にMMO-MUG法が導入されていますが、いかなる特定酵素基質培地法でもよいこととなりました。(詳細は検査方法の項を参照)

< 一般細菌数 >

標準寒天培地法により培養を行うが、一般細菌数はプール水にあつては1ml中200コロニー以下であること。また、飲料水にあつては1ml中100コロニー以下であること。

検水をメスピペットにより2枚以上のペトリ皿に1mlずつ採り、これにあらかじめ加熱溶解させた45ないし50℃に保った標準寒天培地を薬15ml加えて混和し、培地が固まるまで静置する。次にペトリ皿を逆さにして孵卵器内で35℃ないし37℃で22ないし26時間培養する。培養後、各ペトリ皿の集落数を数え、その値を平均して菌数とする。

ここで注目すべきは大腸菌群検査において今まで、水道法・上水試験法等で多少検査方法及び使用できる培地等に差があつたのですが、今後、上水試験法で認められたいかなる特定酵素基質培地法を用いて検査を行っても良いこととされました。

また、今までLB-BGLB法で検査されていたところが多かつたと思いますが、今回の改正等によってLB-BGLBよりMMO-MUG法あるいはその他の特定酵素基質培地法で行う方が比較的検査が早く簡単でやりやすいと考えられます。

< 大腸菌群 >

速やかに検査する。速やかに検査できない場合は1から5の冷暗所に保存し12時間以内に検査すること

1. LB - BGLB法

(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)

【試薬・器具等】

- 3倍濃厚LB発酵管 : 市販のLB培地を用い、使用法の3倍濃度となるように平底フラスコなどにとり加熱溶解する。容量25ml及び75mlの位置に刻線を付けた大試験管(外径約30mm)にダーラム管(参考 内径約6mm×高さ50mm)を入れ、加熱溶解した3倍濃厚LB培地を25mlの刻線まで入れ、メタルキャップをして、121 15分間高圧滅菌後、流水などで急冷する。
- BGLB発酵管 : 市販のBGLB培地を用い、使用法に従って平底フラスコなどで加熱溶解し、ダーラム管(参考 内径約6mm×高さ30mm)を入れた中試験管に10mlずつ分注し、メタルキャップをして、121 15分間高圧滅菌後、流水などで急冷する。
- EMB平板培地 : 市販のEMB培地を用い、使用法に従って平底フラスコなどで加熱溶解し、121 15分間高圧滅菌後、滅菌ペトリ皿に約15mlずつ分注し、静置して固まらせ、孵卵器に倒置し、蓋をずらして30分間表面を乾燥する。(用事調整)
- 普通寒天培地 : 市販の普通寒天培地を用い、使用法に従って平底フラスコなどで加熱溶解し、中試験管に5~10mlずつ分注し、メタルキャップをして121 15分間高圧滅菌し、試験管を斜めに静置して培地を固まらせる。
- LB発酵管 : 市販のLB培地を用い、使用法に従って平底フラスコなどで加熱溶解し、ダーラム管(参考 内径6mm×高さ30mm)を入れた中試験管に10mlずつ分注し、メタルキャップをして、121 15分間高圧滅菌後、流水などで急冷する。
- グラム染色液 : 市販品あり

【注意・参考事項】

残留塩素を含まない試料は、栓と首部をアルミ箔で覆い、乾熱滅菌(170 1時間)した共栓ガラス瓶の肩まで採取する。(市販のガス滅菌したポリ瓶でもよい。)残留塩素を含む試料にあつては、チオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)の0.02~0.05gを入れ、栓と首部をアルミ箔で覆い121 20分間高圧滅菌した100~120mlの共栓ガラス瓶の肩まで採取する。

検水50mlを傾斜法で発酵管に入れる。

発酵管を軽く振ったとき、泡状のガスが認められた場合もガス発生と判定する。

菌液1白金耳量をBGLB発酵管に移植する。

EMB平板上に独立集落が発生するように、1白金耳量を画線塗布する。(塗り始めは狭い範囲を往復して平板に強くこすりつけ菌液を薄めるようにする。)

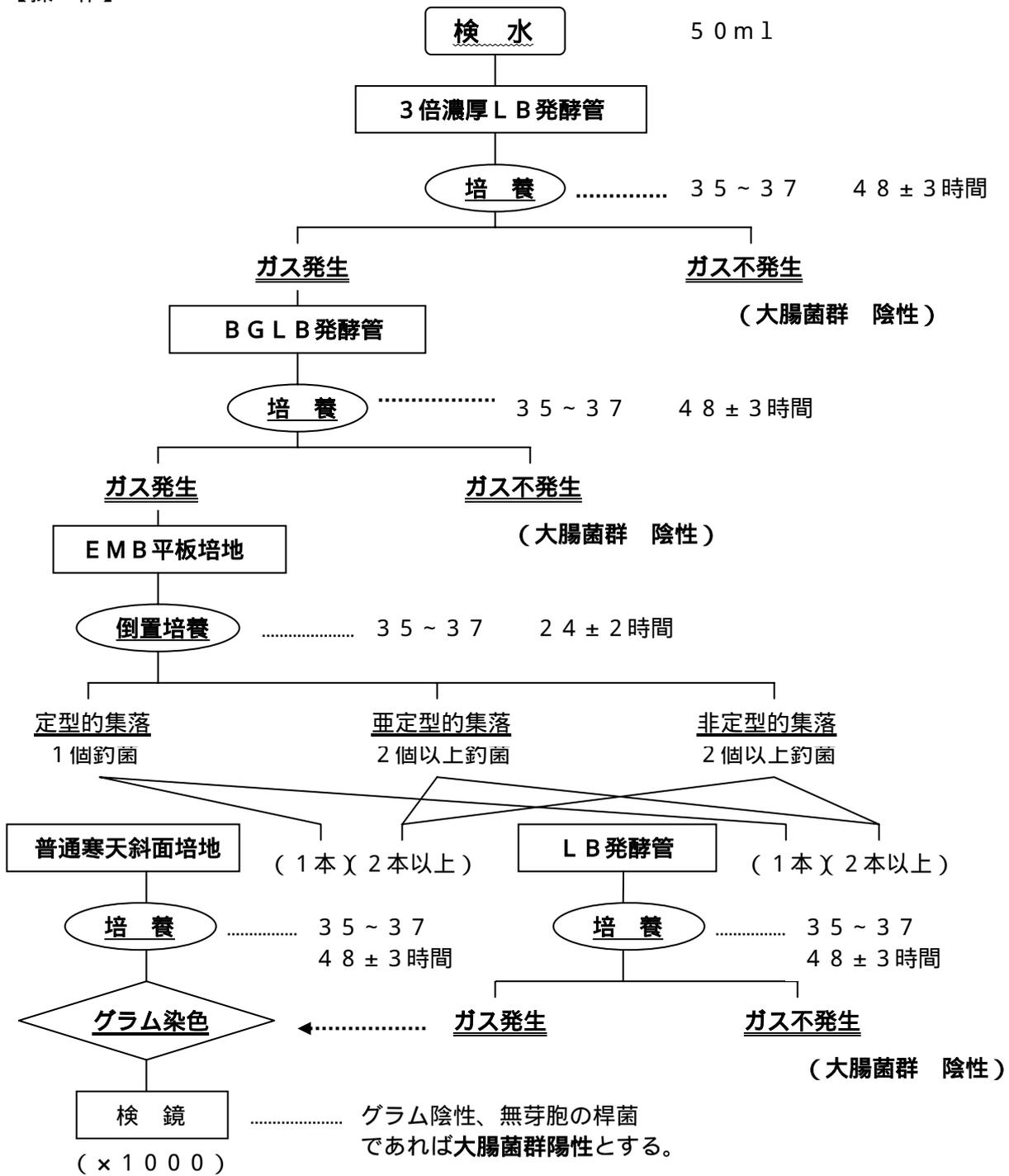
定型的集落(緑色金属光沢を示し、透過光線でさび色を呈する円形集落)及び亜定型的集落の形、色などは上水試験方法のカラー写真を参考にする。

集落を白金耳で採り、LB発酵管と普通寒天斜面培地に移植する。

LB発酵管にてガスの発生を観察したときは、同一集落の普通寒天斜面培養菌についてグラム染色を行う。

グラム染色はHuckerの変法を用いる。常に対照として、同一スライドガラス上にブドウ球菌(グラム陽性)と大腸菌(グラム陰性)を塗末染色し検鏡する。ここに用いるブドウ球菌及び大腸菌は必ず新鮮培養菌を使用する。

【操作】

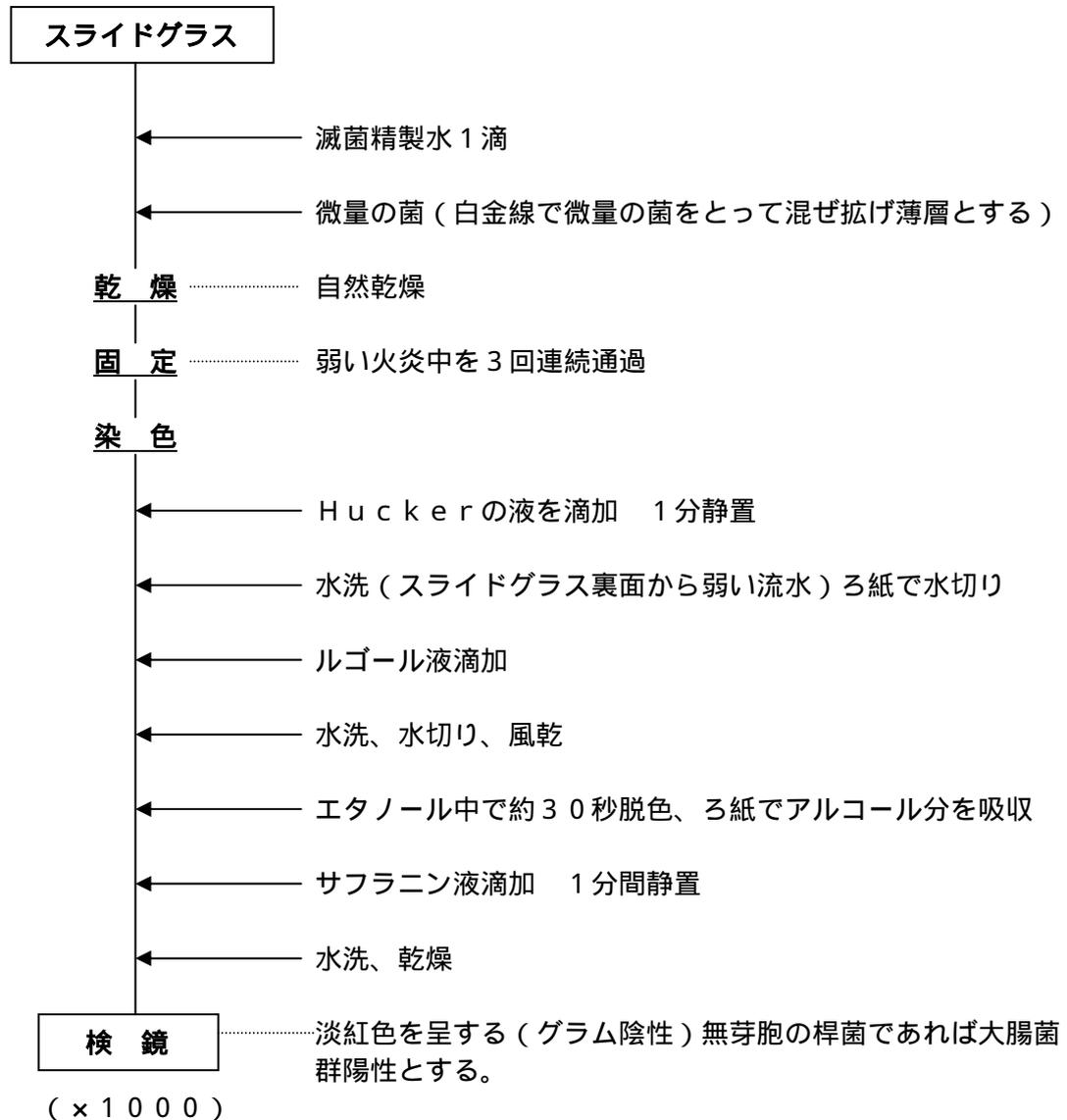


【成績書記載】 陰性、陽性のいずれかを で囲む。

【水質基準】 検出されないこと。

H u c k e r の変法

【操 作】



【試薬等】

Hucker の液： A 液 クリスタルバイオレット 0 . 3 g を 9 5 % エタノール 2 0 m l に溶解させたもの。

B 液 シュウ酸アンモニウム 0 . 8 g を精製水 8 0 m l に溶解させたもの。

A 液と B 液を混合、翌日ろ過し染色ビンに貯える。

ルゴール液： ヨウ素 1 g 及びヨウ化カリウム 2 g を精製水 3 0 0 m l に溶解させたもの。

サフラニン液： サフラニン約 2 . 3 g を純エタノール 1 0 0 m l に溶解させ、使用時これを精製水で 5 ~ 1 0 倍に希釈した液。

【注意・参考事項】

1) A 液を精製水で 1 0 倍に希釈し、その 2 0 m l と B 液 8 0 m l とを混合した液を用いてもよい。

2. MMO - MUG法 (特定酵素基質培地法)

【試薬等】

大腸菌群検査用試薬	: 市販品あり(参考 コリラート)
ピペット、ネジ口試験管	: 滅菌済みのもの。(50mlの遠心管でも可)
恒温器	: 35 ~ 37 で制御できるもの
比色管	: 市販品あり。(コリラート比色管等)
紫外線ランプ	: 長波長(360nm)紫外線照射ランプ

【注意・参考事項】

水中の大腸菌群の検出並びに大腸菌の同定を行うことができる。

操作はすべて無菌的に行う。

試薬の組成(コリラート50P/Aの場合)は、特異的に大腸菌群に利用される塩類、窒素源及び炭素源からなり、大腸菌群並びに大腸菌のそれぞれに特異的な酵素基質としてONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside) 及びMUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-Glucuronide) を含んでいる。ONPGが代謝され黄色の色素が遊離した場合、大腸菌群の存在を示し、MUGが代謝され蛍光色素が遊離した場合は大腸菌の存在を示す。

容器を激しく振り、転倒混和を繰り返し、試薬を溶解させる。ごく少量の溶け残りがあっても培養中に溶解される。

腐食土由来などの物質が含まれている検水では最初から色が付いている場合があるが、この場合は反応後同一試料をコントロールブランクとして比較する。

試験管から約13cm離して暗所で紫外線照射を行う。ポータブル型の紫外線ランプ(長波長360nm)を使用する場合は、約5cmの距離から照射する。

大腸菌の100mlあたりの菌数を算出するためには、この方法とは別に菌数測定用検査を行う。



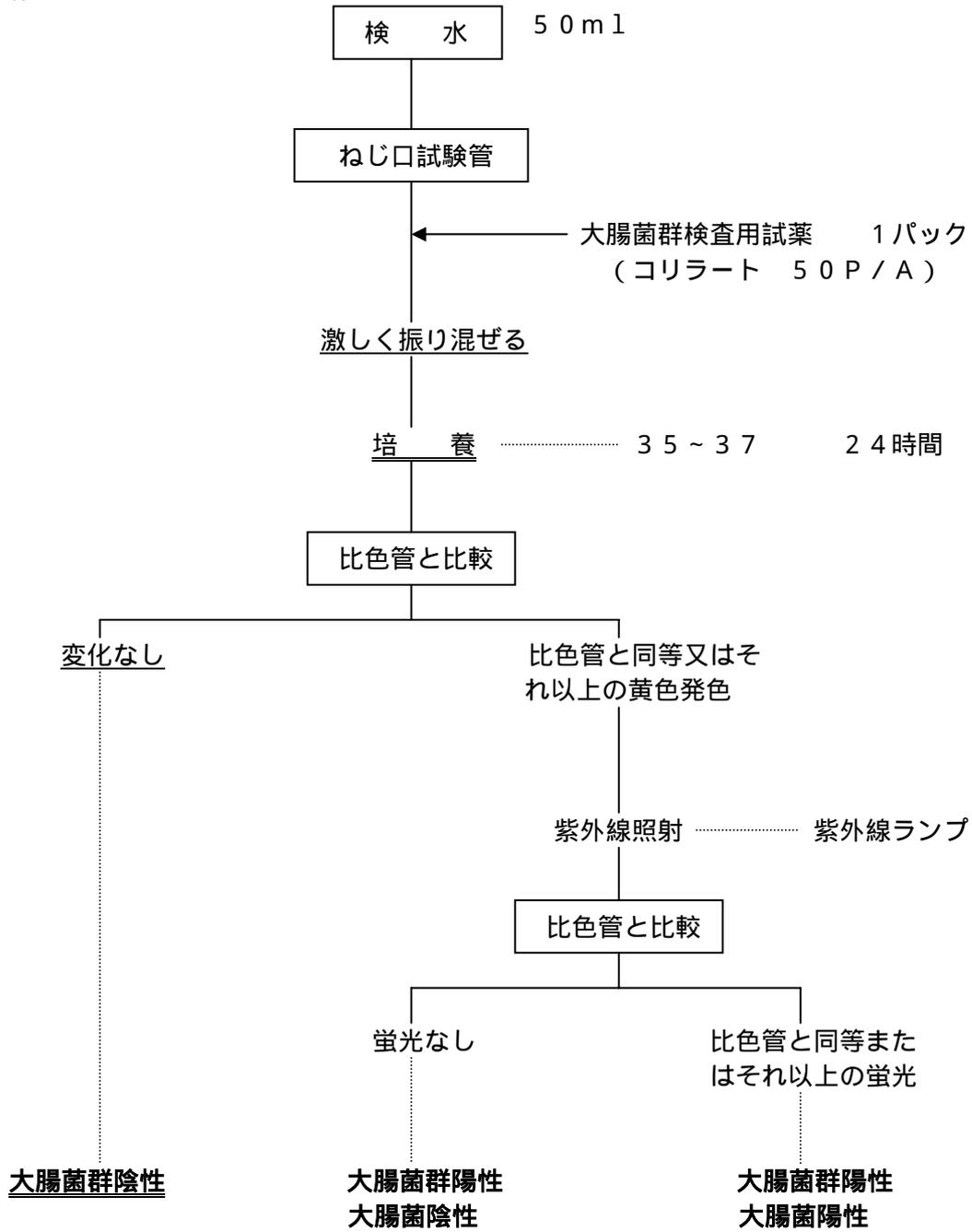
左はポリプロピレン製の滅菌遠心管(50ml)とコリラート50P/A

検水50mlとコリラートを入れ激しく混和する。

左下は遠沈管立てにたてたところ、この状態で右下孵卵器にいれ35~37で24時間培養する



【操作】



【成績書記載】

陰性、陽性いずれかを で囲む。

【水質基準】

検出されないこと。



< 陽性と判定する黄色濃度の下限を示す比色液 >



< 大腸菌陽性の場合の例 >

3. その他の方法

平成14年5月22日の事務連絡より、プール及び飲料水水質検査で学校環境衛生の基準の中で大腸菌群検査法にMMO-MUG法が導入されていますが以下に示すようないかなる特定酵素基質培地法でもよいこととなりました。

【上水試験法(614~617P参照)】

<特定基質培地法>

本法は、大腸菌群の乳糖発酵性に関与するβ-ガラクトシターゼの有無で大腸菌群を判定する方法である。β-ガラクトシターゼ活性を調べる酵素基質には、ONPG(ο-ニトロフェニルβ-D-ガラクトピラノシド)及びXGal(5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルβ-D-ガラクトピラノシド)があり、それぞれガラクトピラノシドの分解により遊離した発色物質で判定する。用いる酵素基質によりONPG法、XGal法に分かれる。なお、両方とも大腸菌が同時に判定できるようMUG(4-メチルウンベリフェニルβ-D-グルクニド)が含まれている。

A. ONPG法

酵素基質として培地に含まれているONPGが大腸菌群によって分解され、黄色を呈するο-ニトロフェノールを遊離する反応を利用した方法である。

ONPG法に用いる培地は、MMO(最小培地ONPG)-MUG培地とIPTG添加ONPG-MUG培地がある。

- (1) MMO-MUG培地
- (2) IPTG添加ONPG-MUG培地

B. XGal法

酵素基質として培地に含まれているXGalが大腸菌群によって、分解され、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルを遊離し、これが酸素と結合して青色を呈するインヂゴとなる反応を利用した方法である。

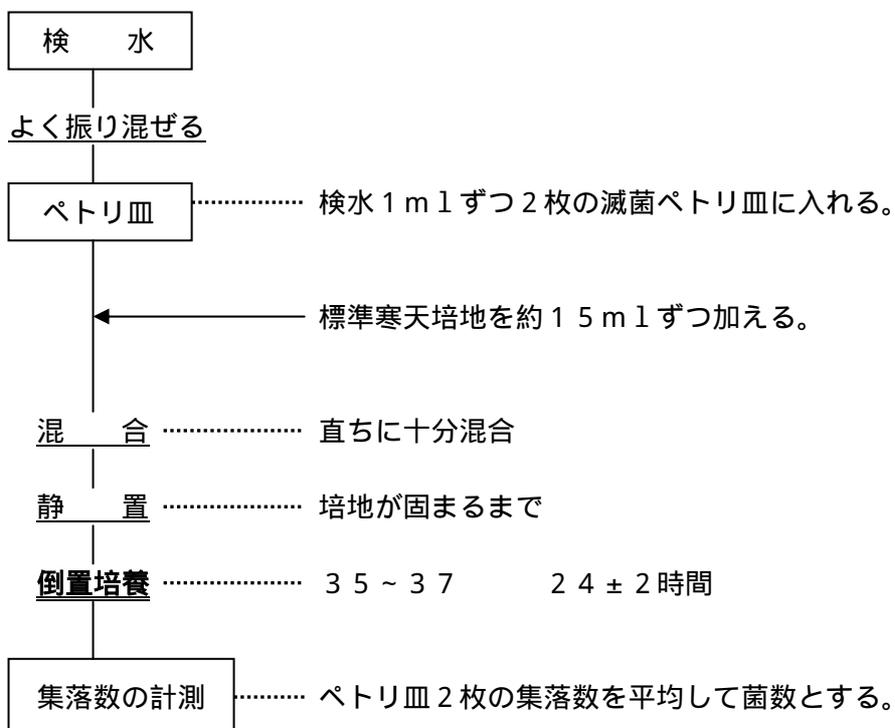
- (1) XGal-MUG培地
- (2) ビルビン酸添加XGal-MUG培地

なお、試薬、器具、操作方法は省略してあります。

< 一般細菌 >

速やかに検査する。速やかに検査できない場合は1から5の冷暗所に保存し12時間以内に検査すること

【操作】



【成績書記載】

菌数 0 → 0
菌数 9.9 以下 → 小数点以下は切り捨て
菌数 100 以上 → 四捨五入し、上位より2桁を有効数とする
(例: 142は140)
菌数 300 以上 → 300 以上

【水質基準】

1 ml の検水で形成される集落数が100以下であること。
ただし、水泳プールにおいては1 ml 中集落数は200以下であること。

【試薬等】

- 標準寒天培地 : 市販の標準寒天培地を用い、使用法に従って平底フラスコなどで加熱溶解し、121 15分間高圧滅菌する。50 前後に保っておくこと。
(市販品によっては121 20分高圧滅菌もあるので確認すること)
なお、培地は変質の恐れがあるので、加熱溶解を繰り返して用いないこと
- 滅菌シャーレ : 深型、1検体につき2枚。
(ペトリ皿)
- メスピペット : 2 ml 用を用意し乾熱滅菌しておく。

【注意・参考事項】

残留塩素を含まない試料は、栓と首部をアルミ箔で覆い、乾熱滅菌（170℃ 1時間）した共栓ガラス瓶の肩まで採取する。（市販のガス滅菌したポリ瓶でもよい。）残留塩素を含む試料にあっては、チオ硫酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）の0.02～0.05gを入れ、栓と首部をアルミ箔で覆い121℃ 20分間高圧滅菌した100～120mlの共栓ガラス瓶の肩まで採取する。

乾熱滅菌した2mlのメスピペットを用いて検水を採り、2枚の滅菌ペトリ皿（蓋に試料名をつける）にそれぞれペトリ皿の蓋をわずかに開けて1mlずつ入れる。

標準寒天培地を約1.5mlずつ加えた後、ペトリ皿の蓋に付着しないように注意してよく混合する。（落下細菌等の混入にも注意！）

対照として滅菌ペトリ皿に培地のみを注加、培養してペトリ皿・培地の無菌及び操作が完全か否かを確認する。

ペトリ皿は蓋についた凝固水が平板上に落ちないように逆さにして培養する。

培養後集落数を数え、その値を平均して菌数とする。

5倍率のルーペを用いると便利である。



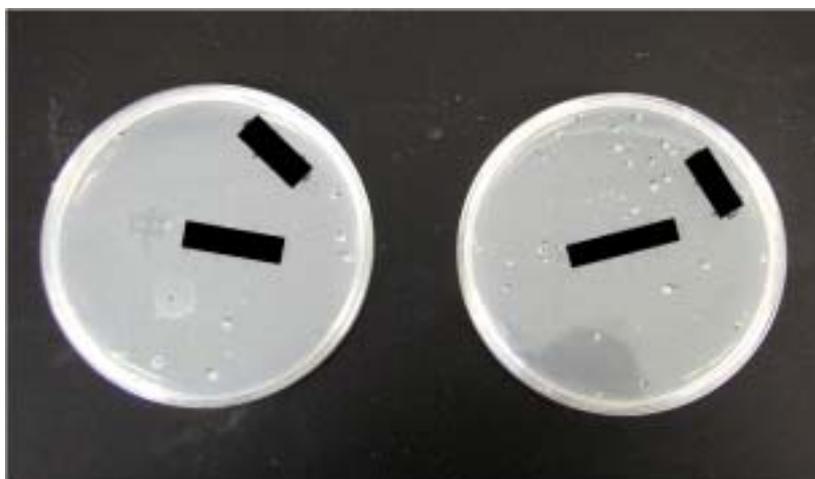
< 乾熱滅菌器とホットスターラー >



< ウォーターバス >



< 高圧蒸気滅菌器 >



< 24時間培養後の集落 >

< 操作手順の図解 >

注意！！

最初の準備段階として標準寒天培地を精製水で溶かして高圧蒸気滅菌器にかける。(かなり時間がかかるので最初に準備すること)

その後、45～50 程度までさますとともに、ウォーターバスで45～50 で保温し培地が固まらないようにしておく。

準備が終わったら以下の操作手順をふみ倒置培養する。

倒置培養の意味??

落下細菌の影響を防ぐ意味と、培地が固まる時シャーレの蓋の内側に蒸気が付着し冷める過程で水滴となり、そのまま放置すると培地表面に落ち培養した集落が重なり1つの巨大コロニーを形成してしまうことを防ぐ意味があります。



ペトリ皿を2枚取り出す



消毒



ピペットで検水をとる



1ml ずつ入れる



消毒



寒天培地



口をバーナーであぶる



と同



約1.5ml ほど入れる



十分混合する。口をバーナーであぶる



蓋(アルミ箔)をする



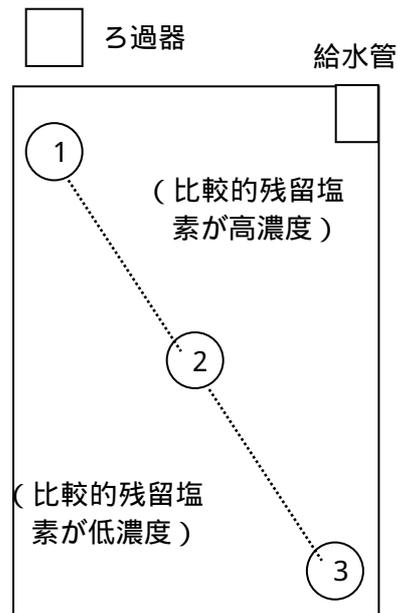
と同

培養後コロニーの数を数える。

< 参考資料 >

プール水の水質検査

	検査項目	検査回数
プール水	遊離残留塩素濃度	1日午前1回以上 午後2回以上
	水素イオン濃度	1日1回以上
	濁度	月1回以上
	過マンガン酸カリウム消費量	
	大腸菌群	
	一般細菌	
循環水 浄化後の	濁度	年1回以上
プール水	総トリハロメタン	年1回以上



遊離残留塩素濃度の測定は、プール全体の濃度が把握できる3地点（水面下20cm）に、プールの形状に応じて適切な地点を加える。
毎月の水質検査の採水地点はおおむねの水面下20cmとする。

プール水の水質検査方法

項目	方法	詳細
遊離残留塩素濃度	D P D法 又は、これと同等以上の精度を有する方法	
水素イオン濃度	水道法水質基準（ ）に定める検査方法 又は、上水試験方法	ガラス電極法又は比色法
濁度 注1) 注2)		比濁法、透過光測定法 積分球式光電光度法、 散乱光測定法又は透過散乱法
過マンガン酸カリウム消費量		滴定法
一般細菌		標準寒天培地法
大腸菌群	水道法水質基準（ ）に定める検査方法	L B - B G L B法 M M O - M U G法
総トリハロメタン	水道法水質基準（ ）に定める検査方法	P T - G C - M S法 H S - G C - M S法 P T - G C法

水道法（昭和32年法律第177号）第4条第2項の規定に基づく水質基準に関する省令（平成4年厚生省令第69号）

注1）濁度でプール水の濁度は0.5度以下が確認できる方法で行う。

注2）濁度でろ過器出口からの水の濁度は0.1度以下が確認できる方法で行う。

水泳プールの水質及び飲料水検査における大腸菌及び一般細菌の検査方法について

平成15年 5月17日

愛知県学校薬剤師会

情報委員会（担当 木全勝彦）