

FIG. 3. Phylogenetic tree, based on neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987), derived from an alignment comprising 16 S rDNA 5' end partial region sequences (439bp). *Nocardia abscessus* (AY544980) served as the out group. The data set was resampled 1,000 times by using the bootstrap option and the percentage values are given at the nodes. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide position.

CFU were measured. The CT value was calculated by multiplying the residual chlorine concentration killing 99.99% of bacteria by the exposure time.

RESULTS

Phylogenetic analysis of tap water-derived yellow-pigmented bacteria by partial 16S rDNA sequence analysis

Phylogenetic trees based on the 16S rDNA sequences of the test strains and related bacteria are shown in Figs. 1-3. According to these trees, 12 isolates (Y-2, Y-6, Y-7, Y-8, Y-11, Y-13, Y-25, Y-27, Y-37, Y-56, Y-74 and Y-81) belonged to the *Sphingomonas ursincola* and *S. natatoria* group. Three isolates (Y-21, Y-38 and Y-84) were most related to the previously known species of the genus *Asticcacaulis* with less than 97.0% similarity values, and those levels of similarity were novel species. Y-44 was identified as *Sphingopyxis willfariensis*, and Y-57 was identified as *Porphyrobacter donghaensis*. Y-51 and Y-63 clustered with species of the genera *Novosphingobium* and *Sphingomonas* respectively.

Y-10 was clustered with *Sphingomonas adhaesiva*. Y-3, Y-5 and Y-34 clustered with *Sphingomonas* species, but they could not be identified clearly. Y-1 and Y-20 were identified as *Mycobacterium frederiksbergense*.

Comparison with species identified by 16S rDNA sequence analysis and that of using the API20NE system

The results of identification by 16S rDNA sequence analysis are shown in Table 2. Twelve strains (48.0%) were identified as *Sphingomonas ursincola/natatoria* by the 16S rDNA analysis, which was the highest population, followed by 2 strains (8.0%) identified as *Mycobacterium frederiksbergense*. One strain each (4.0%) was identified as *Sphingomonas adhaesiva*, *Sphingopyxis willfariensis* and *Porphyrobacter donghaensis*.

Some species identified using the API20NE system were shown in Table 2. When identification probability (ID%) were more than 80%, two strains each (8.0%) were respectively identified as *Brevundimonas vesicularis*, *Sphingomonas paucimobilis* and

Moraxella spp.. One strain each (4.0%) was identified as *Aeromonas salmonicida* and *Pasteurella haemolytica* respectively. The other strains were not identified clearly.

The identification results by sequence analysis and biochemical property testing were not consistent in any of the strains, clarifying that accurate identification results cannot be obtained by biochemical property testing alone.

Chlorine resistance of test strains

When 25 isolates were exposed to 0.1 mg/l residual free chlorine for 1 minute, the medium became turbid in 22 isolates (88.0%), showing their survival. No turbidity of medium was noted in 3 strains (12.0%), indicating that the bacteria were completely killed. Table 3 shows the 99.99% CT values of 6 strains. *M. frederiksborgense* (Y-1 strain) was most resistant to chlorine with the CT value of 32 mg·min/l, followed by *S. ursincola/natoria* (Y-7 strain) with the CT value of 3.3 mg·min/l. The CT values of Y-5 (*Sphingomonas* sp.), Y-27 (*S. ursincola/natoria*) and Y-21 (*Asticacaulis* sp.) were within a range of 0.9-0.1 mg·min/l. Among the 6 strains, resistance of the Y-10 strain (*S. adhaosiva*) was the weakest, and the CT value was 0.03 mg·min/l.

DISCUSSION

Out of oligotrophic bacteria isolated from hospital tap water, yellow chromogenic bacteria were subjected to identification, and many of these strains belonged to the gram-negative genus *Sphingomonas*. Although surveys of oligotrophic bacteria in tap water have been reported (Carter et al., 2000), no study has identified isolates in detail. Many oligotrophic bacterial strains produce various water-insoluble pigments, which are important properties for differentiation. Oligotrophic yellow chromogenic bacteria in tap water identified as *Pseudomonas* sp. (O'Brien, 1992) and *Flavobacterium* sp. (Reasoner, et al., 1989) based on the pigment colors have been reported, but our report is the first study which identifies the genus *Sphingomonas*. The most frequently identified species in this study, *Sphingomonas ursincola/natoria*, was proposed as a new *Sphingomonas* species by Yabuuchi et al. (1999, 2002). A gram-positive bacteria, *Mycobacterium frederiksborgense* was also identified. *M. frederiksborgense* is an acid-fast bacterium newly named by Williamson et al. (2001). Isolation of non-tuberculous mycobacteria from tap water has been reported (Miyamoto et al., 2000), and its influence is a health matter. Chang et al. (2002) detected non-tuberculous mycobacteria in hospital tap water at

a rate of 20.4%, showing the risk of infection in hospitals.

Chlorine resistance of isolates was also investigated in this study. Mir et al. (1997) compared the chlorine resistance of 6 isolates from water samples collected from water purification processes in which residual chlorine was present, and found that gram-positive bacteria, such as *Bacillus* sp. and *Micrococcus* sp., were more resistant to chlorine than gram-negative *Pseudomonas* sp.. In our study, the CT value (99.99%) of gram-positive *M. frederiksborgense* was the highest (32 mg·min/l), in good accordance with the findings reported by Mir et al. (1997). Since the CT value of *E. coli* was about 0.01 mg·min/l, the chlorine resistance of *M. frederiksborgense* may be more than 1,000 times that of *E. coli*. Strong chlorine resistance of acid-fast bacteria has been clarified by Grabow et al. (1983, 1984). They exposed *M. fortuitum* to 0.4 mg/l residual free chlorine for 15 minutes, but most of the seeded bacteria at 10⁸ CFU/ml were not killed. We previously reported that *Methylobacterium* widely present in tap water was relatively resistant to chlorine among gram-negative bacteria (Hiraishi et al., 1995; Furuhashi et al., 2006). In the *Sphingomonas* spp. investigated in this study, the CT value (99.99%) of some strains was 3.3 mg·min/l, showing that their chlorine resistance was as strong as that of *Methylobacterium*, although the bacteria were gram-negative, and their isolation from tap water containing residual chlorine was convincing.

Kelley et al. (2004) recently detected *Sphingomonas* spp. on a shower curtain, and recommended its rapid removal in consideration of the possibility that it could be a pathogen causing opportunistic infection. When Oie et al. (2006) investigated microbial contamination of the ultrasonic nebulizer solution used in hospitals, *Sphingomonas* spp. was isolated. Thus, they recommended a thorough bactericidal treatment taking a shorter time. Similarly, the possibility of *Sphingomonas* spp. isolated from hospital tap water to cause opportunistic infection cannot be ruled out. Since complete elimination of this species from tap water is impossible at present, recognition of its presence in tap water, and specific considerations for handling tap water in hospitals are necessary.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported in part by Health and Labour Sciences Research Grants (H18-Kenki-Ippan-008) from the Ministry of Health, Labour and Welfare.

REFERENCES

- Carler, J. T., Rice, E. W., Buchberger, S. G., and Leo, Y. (2000) Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system. *Wat. Res.*, **34**, 1495-1502.
- Chang, C-T., Weng, L-Y., Liao, C-Y., and Huang, S-P. (2002) Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3159-3161.
- Furuhata, K., and Fukuyama, M. (2006) Isolation of Oligotrophic Bacteria from Hospital Tap Water (in Japanese). *Rokin Robai*, **34**, 323-328.
- Furuhata, K., Kato, Y., Goto, K., Hara, M., Yoshida, S., and Fukuyama, M. (2006) Isolation and identification of *Methylbacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility. *Microbiol. Immunol.*, **50**, 11-17.
- Grabow, W. O. K., Gauss-Müller, V., Prozesky, O. W., and Deinhardt, F. (1983) Inactivation of Hepatitis A virus and indicator organisms in water by free residuals. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 619-624.
- Grabow, W. O. K., Coulbrough, P., Illner, C., and Bateman, B. W. (1984) Inactivation of Hepatitis A virus, other enteric viruses and indicator organisms in water by chlorination. *Wat. Sci. Tech.*, **17**, 857-864.
- Hiratsuki, A., Furuhata, K., Matsumoto, A., Koike, K. A., Fukuyama, M., and Tabuchi, K. (1995) Phenotypic and genotypic diversity of chlorine-resistant *Methylbacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 2099-2107.
- Holmes, B., Owen, R. J., Evans, A., Mainick, H., and Wilcox, W. H. (1977) *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens, the hospital environment, and other sources. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**, 133-146.
- Kelley, S. T., Theisen, U., Angerent, I. T., Amand, A. St., and Pace, R. (2004) Molecular analysis of shower curtain biofilm microbes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4187-4192.
- Mir, J., Morató, J. and Ribas, F. (1997) Resistance to chlorine of freshwater bacteria strains. *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 7-18.
- Miyamoto, M., Yamaguchi, Y., and Sasatsu, M. (2000) Distribution of *Legionella* and nontuberculous mycobacteria in environment (in Japanese). *Kankyokansen*, **15**, 127-132.
- O'Brien, J. R. (1992) An unusual yellow pigmented *Pseudomonas* species isolated from chlorinated municipal town water supply. *Microbios*, **69**, 215-221.
- Oto, S., Makieda, D., Ishida, S., Okano, Y., and Kamiya, A. (2006) Microbial contamination of nebulization solution and its measures. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 503-507.
- Reasoner, D. J., Balannon, J. C., Geldreich, E. L., and Barnick, J. (1989) Nonphotosynthetic pigmented bacteria in a potable water treatment and distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 912-921.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- Willumsen, P., Karlson, U., Slackebbrandt, E., and Kroppenstedt, R. M. (2001) *Mycobacterium frederiksborgense* sp. nov., a novel polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1715-1722.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Naka, T., Suzuki, S., and Yano, I. (1999) Proposal of *Sphingomonas subarificiens* (van Bruggen, Jochimsen and Brown 1990) comb. nov., *Sphingomonas nataria* (Sly 1985) comb. nov., *Sphingomonas ursincola* (Yurkov et al. 1997) comb. nov., and emendation of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.*, **43**, 339-349.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Fujiwara, N., Naka, T., Matsunaga, I., Ogura, H., and Kobayashi, K. (2002) Emendation of the genus *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1999 and junior objective synonymy of the species of three genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, in conjunction with *Blastomonas ursincola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1485-1496.

Isolation and Identification of *Methylobacterium* Species from the Tap Water in Hospitals in Japan and Their Antibiotic Susceptibility

Katsunori Furuhashi^{*1}, Yuko Kato², Keiichi Goto³, Motonobu Hara³, Shin-ichi Yoshida⁴, and Masafumi Fukuyama¹

¹College of Environmental Health, Azabu University, Sagami-hara, Kanagawa 229–8501, Japan, ²Food Research Laboratories, Mitsui Norin Co., Ltd., Fujieda, Shizuoka 426–0133, Japan, ³School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagami-hara, Kanagawa 229–8501, Japan, and ⁴Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Fukuoka 812–8582, Japan

Received August 22, 2005; in revised form, October 20, 2005. Accepted October 20, 2005

Abstract: Contamination of tap water by *Methylobacterium* species has become a serious concern in hospitals. This study was planned to examine the distribution of *Methylobacterium* species inhabiting tap water used in Japanese hospitals and antibiotic sensitivity of the isolates in 2004. Species identification of 58 isolates was performed based on the homology of a partial sequence of 16S rDNA. The dominant *Methylobacterium* species in hospital water were *M. aquaticum* and *M. fujisawaense*. To examine the biochemical properties of these isolates, a carbon source utilization was tested using an API50CH kit. The phenotypic character varied widely, and was not necessarily consistent with the results of phylogenetic analysis based on the partial 16S rDNA sequence, suggesting that the biochemical properties are not suitable for identification of *Methylobacterium* species. The isolates were also subjected to antibiotic sensitivity tests. They were resistant to 8 antibiotics, but highly sensitive to imipenem (MIC₅₀=1 µg/ml) and tetracycline (MIC₅₀=8 µg/ml). These findings concerning the isolates revealed the presence of *Methylobacterium* species with resistance to multiple antibiotics in hospital tap water.

Key words: *Methylobacterium* spp., Antibiotic susceptibility, Tap water, Hospital

The investigations of the water used for handwashing before surgery have revealed the absence of a significant difference on the effects of handwashing using sterilized water and tap water (5). Consequently, there has been a move to save on the costs for infection control by removing equipment installed for sterilized water and switching to the use of tap water. Although the chlorine sterilization of tap water is mandatory in Japan, *Methylobacterium* species resistant to the residual chlorine of disinfectants widely inhabit tap water piped through water supply facilities such as water tanks of high-rise buildings (7, 11). In 1990, Furuhashi et al. (6) isolated *Methylobacterium* strains from hospital tap water in high frequency, showing that hospital tap water is not free from the contamination.

The genus *Methylobacterium* was initially proposed by Patt et al. in 1976 (16), and 19 species have been

reported so far (4). This pink pigment-producing bacteria is commonly isolated from various natural environments, including aqueous environments. The *Methylobacterium* strains may be environmental indigenous bacteria, and have been considered to have weak pathogenicity.

However, *Methylobacterium* species have also recently been attracting attention as opportunistic pathogens in the clinical field (19), and isolation from clinical materials has been reported (12, 14). Hospital tap water is considered to be a source of *Methylobacterium* infection, and sufficient monitoring of this genus is necessary. Under these circumstances, the expansion of *Methylobacterium* infection due to the change of water for washing hands from sterile water to tap water is a concern.

With the aim of contributing to hygienic control, this study investigates the distribution of *Methylobacterium* species in hospital tap water, and their drug sensitivity.

*Address correspondence to Dr. Katsunori Furuhashi, College of Environmental Health, Azabu University, 1–17–71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229–8501, Japan. Fax: +81–42–754–6215. E-mail: furuhata@azabu-u.ac.jp

Abbreviations: MIC, minimum inhibitory concentration; UPGMA, unweighted pair group method average.

Materials and Methods

Bacterial strains and cultivation. In 2004, 271 samples of tap water in hospitals in 13 prefectures of Japan were cultured on R2A agar medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) at 30 °C for 7 days. Totally 58 colonies with pink pigmentation which were formed by Gram-negative rod-shaped bacteria were collected and stored at -80 °C. The 58 strains were confirmed to belong to genus *Methylobacterium* according to the definition given by Patt et al. in 1976 (16). The stored strains were cultured on R2A agar medium at 30 °C for 7 days and used for further study. Residual free chlorine concentrations in tap water was simultaneously assayed by the colorimetry method with the Aquacheck LC (Nissan Chemical Industries, Ltd., Tokyo).

Biochemical tests. Forty-nine biochemical properties were tested using API50CH (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) according to the attached instructions. AUX medium (bioMérieux) was used as the test medium, and positive reaction was judged based on the turbidity of the medium after incubation at 30 °C for 14 days. The results were analyzed using analytical software, Bio Numerics 3.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), and a phylogenetic tree was prepared using the UPGMA method (18).

Identification by partial 16S rDNA sequencing. Genomic DNA was extracted and purified using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) following the protocols of the manufacturer. Using the extracted DNA solution as the template for PCR, of a 5' end partial region about 500-bp of the 16S rRNA gene was amplified by PCR using a MicroSeq 500 16S rDNA PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif., U.S.A.). The PCR products were purified using PCR Kleen Spin Columns (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., U.S.A.). The sequencing reactions of the PCR products were performed using a MicroSeq 500 16S rDNA sequencing Kit (Applied Biosystems) and the reaction products were purified with AutoSeq G-50 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Uppsala, Sweden). A model ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) was used for sample electrophoresis and data collection. The obtained sequence data were compared with reference data from GenBank, and a phylogenetic tree was prepared by the neighbor-joining method of Saitou and Nei (1987) (17). Identification of the species was performed by the more than 99% similarity of the partial sequence of 16S rDNA.

Susceptibility testing. Drug sensitivity tests were performed using E-test (AB BIODISK, Dalvågen,

Solna, Sweden) according to the kit instructions. Antibiotics tested were ampicillin (ABPC), cefuroxime (CXM), gentamicin (GM), erythromycin (EM), vancomycin (VCM), tetracycline (TC), imipenem (IPM), chloramphenicol (CP), ofloxacin (OFLX) and fosfomycin (FOM). A bacterial suspension of each test strain (0.5 ml) was dripped on R2A agar medium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (60 ml in a 150-mm dish (Corning, Inc., U.S.A.)) and smeared over the surface using a Conradi stick, and an E-test strip was closely attached to the medium. The plates were cultured at 30 °C for 7 days, and the growth inhibition zone formed around the strip was observed. MIC was judged by macroscopically reading the graduation at the point where the end of the growth inhibition zone and the strip crossed.

Results

Diversity of Biochemical Properties of Tap Water-Derived *Methylobacterium* Strains

The free residual chlorine concentrations of hospital tap water where 58 strains were isolated are shown in Table 1. The 58 strains were tested for 49 biochemical properties (Table 2). Fifty-four strains were positive for

Table 1. The free residual chlorine concentrations of hospital tap water where 58 strains of *Methylobacterium* spp. were isolated

0	Free residual chlorine (mg/liter)					Total
	0.1-0.2	0.3-0.4	0.5-0.6	0.7-0.8	UN ^a	
6	13	17	2	2	18	58

^a Unknown.

Table 2. Positive characteristics of *Methylobacterium* spp. isolated from the tap water in hospitals using the API50CH test

No.	Characteristics	No. of positive strains (%)
1	Glycerol	42 (77.8)
2	Erythritol	3 (5.6)
3	D-Arabinose	14 (25.9)
4	L-Arabinose	23 (42.6)
5	Ribose	1 (1.9)
6	D-Xylose	17 (31.5)
7	L-Xylose	4 (7.4)
10	Galactose	12 (22.2)
11	Glucose	9 (16.7)
12	Fructose	31 (57.4)
16	Dulcitol	3 (5.6)
37	Glycogen	1 (1.9)
41	D-Lyxose	13 (24.1)
43	D-Fucose	17 (31.5)
44	L-Fucose	5 (9.3)
47	Gluconate	31 (57.4)
48	2-Ketogluconate	2 (3.7)

n=54 strains.

some properties, and 4 strains were negative for all properties. Positive reaction was detected only in 17 (34.7%) of the 49 biochemical properties, and the number of positive properties was generally low. The properties shared by most strains were the utilization of

glycerol (42 strains, 77.8%), followed by fructose and gluconate (31 strains each, 57.4%), and L-arabinose (23 strains, 42.6%), D-xylose and D-fucose (17 strains each, 31.5%), D-arabinose (14 strains, 25.9%), D-lyxose (13 strains, 24.1%), galactose (12 strains, 22.2%) and glu-

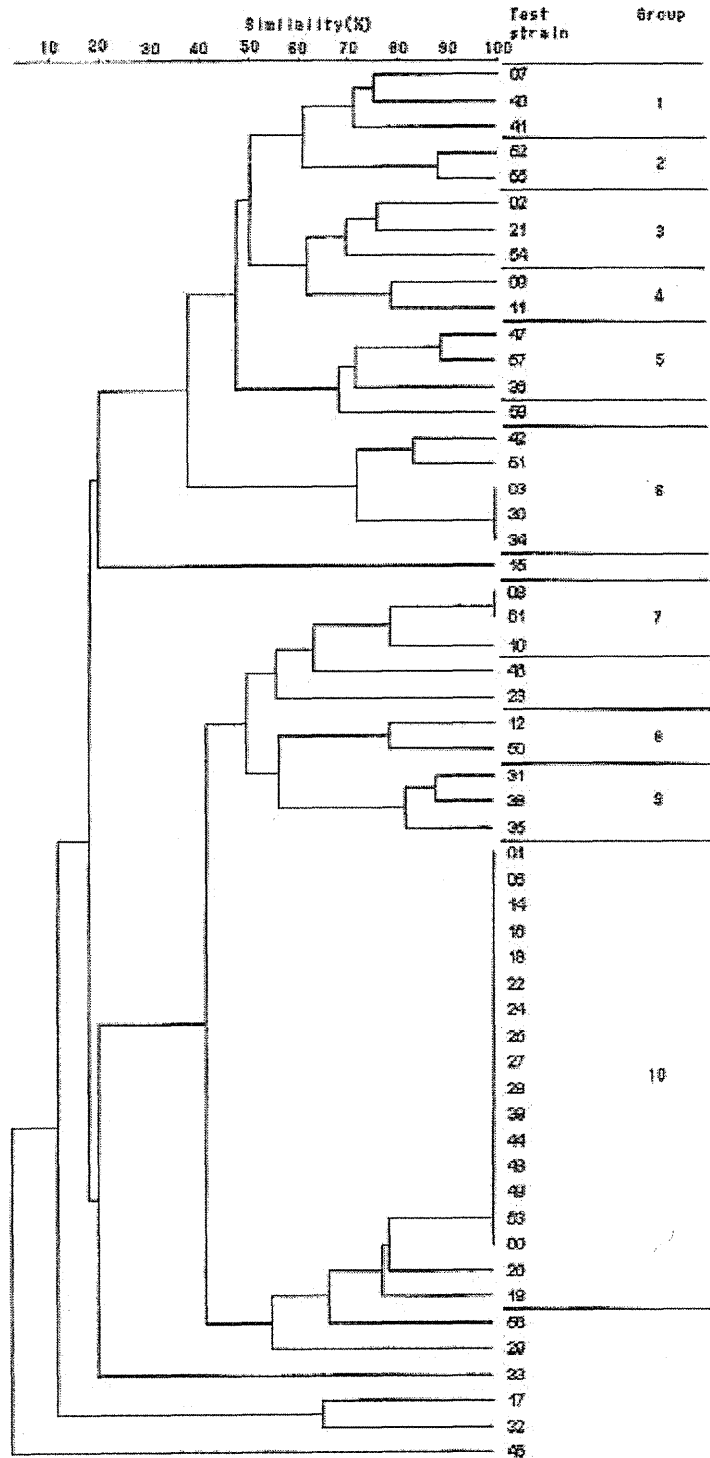


Fig. 1. Dendrogram of 54 *Methylobacterium* strains isolated from hospital tap water based on 49 biochemical characteristics.

cose (9 strains, 16.7%). In addition, positive reaction for L-fucose was detected in 5 strains (9.3%), L-xylose in 4 (7.4%), erythritol and dulcitol in 3 each (5.6%), 2-ketogluconate in 2 (3.7%), and ribose and glycogen in 1 each (1.9%).

The results of cluster analysis based on the biochemical properties are presented as a dendrogram in Fig. 1. When the strains were grouped at a similarity of 70%, 48 strains (82.8%) were grouped into 10 clusters (Groups 1 to 10), but 10 strains (17.2%) were not grouped with any strains, showing considerable diversity. The highest number of strains (18 strains, 33.3%) was included in Group 10, and the similarity of characteristics was 100% in 16 of these strains. Five strains (9.3%) were included in Group 6, and the similarity was 100% in 3 strains.

Identification of Tap Water-Derived *Methylobacterium* by 16S rDNA Sequence Analysis

From the results of the similarity analysis based on the partial sequence of 16S rDNA, 36 of the test strains (62.1%) were identified as *Methylobacterium* species (Table 3). *M. aquaticum* and *M. fujisawaense* were most frequently identified (11 strains each, 19.0%), followed by 6 strains (10.3%) each of *M. mesophilicum* and *M. radiotolerans*. One strain (1.7%) each were identified as *M. aminovorans* and *M. hispanicum*. Multiple candidate species were considered for 13 strains (22.4%), and determination based only on the results of this study was difficult. *M. rhodinum* and *M. suomiense* were candidates for 3 strains (5.2%).

The results of phylogenetic analysis of the isolates compared with sequence data of known species are shown in Fig. 2. Arbitrarily, the species were divided into Group A, with very high homology with allied species, and Group B with low homology with allied

species. Group A consisted of 12 species: *M. zatmanii*, *M. thiocyanatum*, *M. rhodesianum*, *M. lusitanum*, *M. populum*, *M. aminovorans*, *M. suomiense*, *M. rhodinum*, *M. chloromethanicum*, *M. extorquens*, *M. dichloromethanicum* and *M. organophilum*, and 15 isolates (25.9%). Group B consisted of 6 species: *M. hispanicum*, *M. radiotolerans*, *M. fujisawaense*, *M. nodulans*, *M. aquaticum* and *M. mesophilicum*, and 43 isolates (74.1%).

Because the similarities of 9 strains (15.5%) (Strain No. 6, 8, 18, 22, 23, 26, 30, 31, 61) to the sequences of type strains (Fig. 2) were low (less than 99%), the possibility of their being new species was considered for these unidentified strains.

On comparison of these identification results with the above biochemical property clusters, strains identified to be the same species belonged to multiple biochemical property clusters (Table 3), showing that identification based on biochemical properties alone is difficult.

MIC Distributions of Tap Water-Derived *Methylobacterium* Species

Table 4 shows the ranges of MIC, 50% MIC values (MIC₅₀), and 90% MIC values (MIC₉₀) of 10 antibiotics for the test strains. On comparison of the MIC₉₀ of the drugs tested, IPM showed the highest antibacterial activity (1 µg/ml) among the 10 drugs, followed by TC (8 µg/ml) and GM (128 µg/ml), but the MIC₉₀ of the other drugs was the highest concentration tested (>32 µg/ml, >256 µg/ml, >1,024 µg/ml).

The range of MIC of TC, EM and GM was wide and the distribution was unimodal. The susceptibility was also various in ABPC, VCM, CP, and OFLX, and the number of strains in the highest concentration of MIC tested was 16 strains (>256 µg/ml, 27.6%), 41 strains

Table 3. *Methylobacterium* species identified by 16S rDNA sequence analysis, and their groups by biochemical properties

Species	No. of strains (%)	Groups of characteristics ^a
<i>M. aquaticum</i>	11 (19.0)	3, 10, UC ^b , NC ^c
<i>M. fujisawaense</i>	11 (19.0)	1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, UC
<i>M. mesophilicum</i>	6 (10.3)	1, 2, 6, NG
<i>M. radiotolerans</i>	6 (10.3)	3, 4, 5, 6, UC
<i>M. aminovorans</i>	1 (1.7)	10
<i>M. hispanicum</i>	1 (1.7)	7
<i>M. rhodinum</i> or <i>M. suomiense</i>	3 (5.2)	10
<i>M. lusitanum</i> or <i>M. populum</i> or <i>M. rhodesianum</i> or <i>M. thiocyanatum</i> or <i>M. zatmanii</i>	9 (15.5)	3, 10
<i>M. extorquens</i> or <i>M. chloromethanicum</i> or <i>M. dichloromethanicum</i>	1 (1.7)	UC
<i>Methylobacterium</i> sp.	9 (15.5)	6, 7, 9, 10, UC
Total	58 (100.0)	

^a Groups in Fig. 1.

^b Unclassified.

^c No growth.

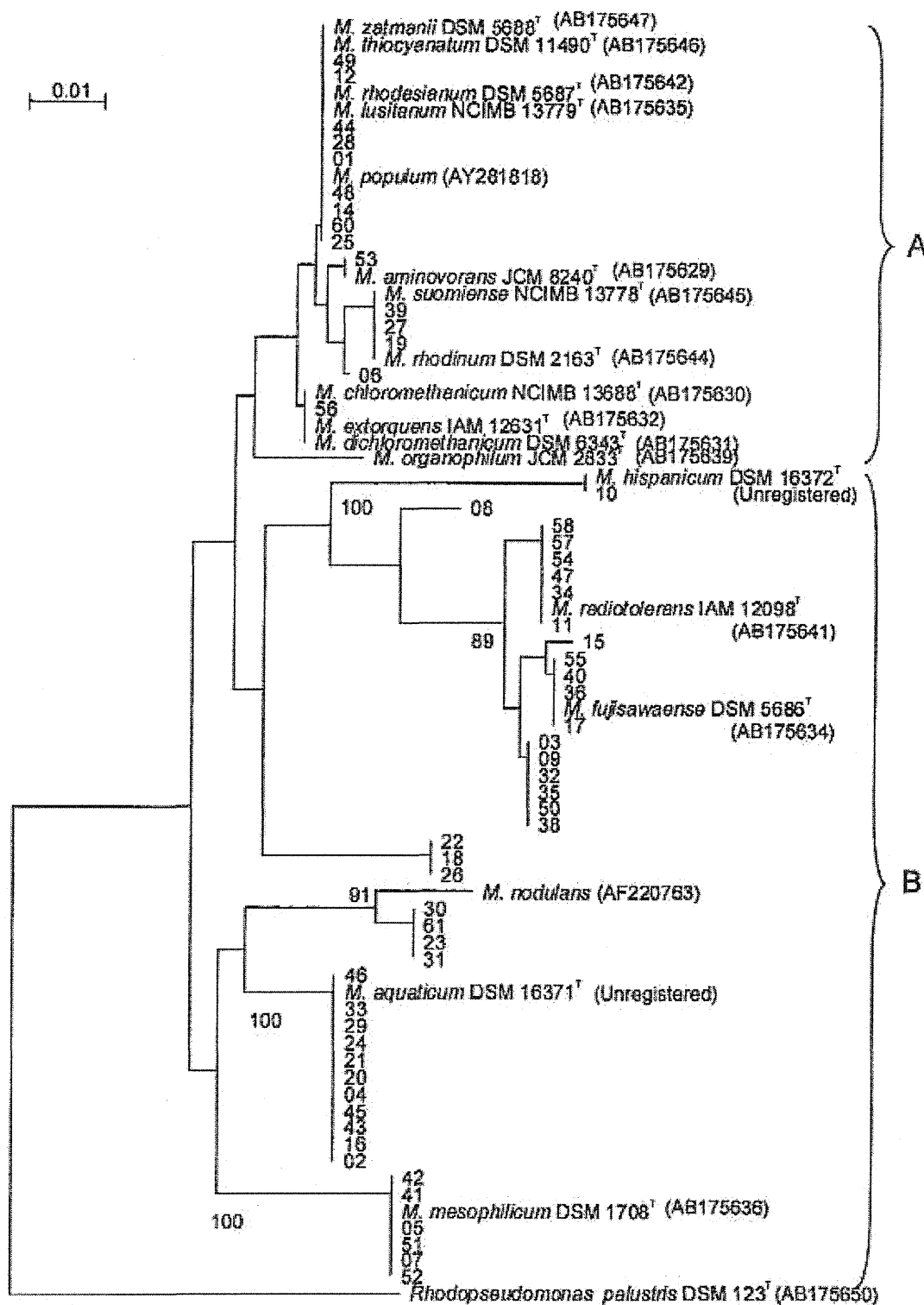


Fig. 2. Distance matrix tree showing phylogenetic relationships among the *Methylobacterium* strains within the type strains. *Rhodospseudomonas palustris* was used as a member of outgroups. The scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide position.

Table 4. Susceptibility of *Methylobacterium* strains isolated from the tap water in hospitals to 10 antimicrobial agents using the E-test

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
Ampicillin	8 - >256	128	>256	
Cefuroxime	1 - >256	128	>256	
Gentamicin	1 - >256	16	128	
Erythromycin	0.032 - >256	4	>256	
Vancomycin	8 - >256	>256	>256	
Tetracycline	0.064 - 32	2	8	
Imipenem	0.032 - 8	0.25	1	
Chloramphenicol	1 - >256	256	>256	
Ofloxacin	0.25 - >32	8	>32	
Fosfomycin	2 - >1,024	64	>1,024	

n = 58 strains.

(>256 $\mu\text{g/ml}$, 70.7%), 21 strains (>256 $\mu\text{g/ml}$, 36.2%) and 20 strains (>32 $\mu\text{g/ml}$, 34.5%) respectively, showing high resistance. In contrast, IPM, CXM and FOM showed bimodal MIC distribution. Regarding the number of drugs for which the MIC value was the highest concentration tested, there were 7 drugs for 1 strain (1.7%), followed by 6 drugs for 3 strains (5.2%), 5 drugs for 2 strains (3.4%), 4 drugs for 9 strains (15.5%) and 3 drugs for 8 strains (5.2%), showing that many strains were multidrug resistant. As a result, the susceptibility varied in all drugs, and sensitivities varied markedly among the strains. Excluding IPM and TC, the cumulative MIC distribution of the other drugs was considerably shifted to the resistance side (higher concentration of MIC).

The drug sensitivities of these test strains were not related to species. There was no association between the drug sensitivity and the site of isolation or the free residual chlorine concentration in the tap water from which the bacteria were isolated.

Discussion

The objective of this study was to elucidate which species of *Methylobacterium* inhabit tap water in hospitals. Since *Methylobacterium* species were isolated from various samples, including aqueous environments (11, 15), it was showed that the bacteria were widely distributed in natural environments. Because of the diversity in the properties among the strains, new species have been reported continually since 2000 (1, 8, 13). Currently, 19 species belong to the genus *Methylobacterium* (4). This study showed that various *Methylobacterium* species inhabit hospital tap water in Japan, and that *M. aquaticum* and *M. fujisawaense* are dominant. *M. aquaticum* was isolated from tap water in

Spain by Gallego et al. (8) and reported as a new species in 2005. *M. fujisawaense* was proposed as a new species by Green et al. in 1988 (10), and it was found that these bacteria were isolated in Fujisawa, Kanagawa Prefecture, Japan, by Kouno and Ozaki.

In the phylogenetic analysis, since the strains belonging to Group B formed 74.1%, it became clear that there are many strains belonging to Group B in tap water, and it was in agreement with results reported by Hiraishi et al. (11). These isolates were investigated with regard to the relationship with the isolated areas and the residual chlorine concentration in tap water, but no marked tendencies were noted in geographical differences or with regard to chlorine resistance.

Since the strains belonging to Group A had a high homology with the partial sequence of 16S rDNA, more detailed investigation is necessary for identification of the species. The 9 strains (No. 6, 8, 18, 22, 23, 26, 30, 31, 61) suggested to be new species could be divided into 4 groups.

Excluding strain 12 and 56, all other strains belonging to Group A were included in phenotypic Group 10 in Fig. 1, suggesting that the phenotypes of Group A species are similar. Although 5 strains (No. 16, 18, 22, 24, 26) belonging to Group B were also included in phenotypic cluster 10, no 16S rDNA group-specific or species-specific phenotypic characteristics were found. Based on the above findings, it may be difficult to identify *Methylobacterium* species based on the biochemical properties alone.

The isolation of *Methylobacterium* species from clinical materials has been known from the past (9). Because *Methylobacterium*-associated sepsis has recently been noted occasionally in AIDS patients (20) and bone marrow-transplanted patients (2), it has attracted attention as an etiological agent of opportunistic infection (19). Thus, information on the drug sensitivity of clinical isolates is important for therapy. Brown et al. (3) reported that in drug sensitivity tests of 15 clinical isolates and 3 standard strains, 100% of the strains were sensitive to amikacin and gentamicin even at a low concentration, but 9 isolates (60%) were resistant to β -lactams due to β -lactamase production. Zaharatos et al. and ourselves performed a similar drug sensitivity test of clinical isolates with imipenem and meropenem, using an E-test, and the MIC of imipenem was 0.25–1 $\mu\text{g/ml}$, showing high sensitivity, but the MIC of meropenem was >32 $\mu\text{g/ml}$, showing very strong resistance (21).

In the present study, the tap water-derived isolates exhibited strong resistance to 8 drugs, including the β -lactams except for imipenem and tetracycline. Regarding imipenem, the MIC₅₀ was 1 $\mu\text{g/ml}$, showing high

sensitivity, as reported by Zaharatos et al. (21). However, the MIC₅₀ of gentamicin was 128 µg/ml, showing low sensitivity, in contrast to the results of Brown et al. (3). Brown et al. obtained MIC using the agar plate dilution method, but we used the E-test, and the difference may have been due to methodological differences. Since a high resistance to β-lactams such as ampicillin and cefuroxime was noted, β-lactamase production by the test isolates was investigated using the disc method. β-Lactamase production was detected in 51.7% of the test isolates (data not shown), and it was in agreement with results reported by Brown et al. (3). Since *Methylobacterium* strains were multidrug resistant, it will also be necessary to elucidate the tolerance mechanisms.

As mentioned above, since the classification of *Methylobacterium* species is unclear in many regards, it is thought that a reconsideration of the taxonomy based on gene techniques will be even more necessary from now on.

From the fact that *Methylobacterium* species which are pathogenic bacteria of opportunistic infection inhabit hospital tap water in Japan, careful follow-up study is necessary to draw a conclusion that tap water can be used in stead of sterilized water for handwashing before surgical operations.

References

- 1) Aken, B.V., Peres, C.M., Doty, S.L., Yoon, J.M., and Schmoor, J.L. 2004. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1191–1196.
- 2) Brown, M.A., Greene, J.N., Sandin, R.L., Hiemenz, J.W., and Simmott, J.T. 1996. *Methylobacterium* bacteremia after infusion of contaminated autologous bone marrow. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 1191–1192.
- 3) Brown, W.J., Sautter, R.L., and Crist, A.F., Jr. 1992. Susceptibility testing of clinical isolates of *Methylobacterium* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 1635–1638.
- 4) Euzéby, J.P. 2005. List of bacterial names with standing in nomenclature-genus *Methylobacterium*. <http://www.bacterio.cict.fr/m/methylobacterium.html>
- 5) Fujii, A., Nishimura, C., Kasuda, H., Matsuda, K., and Yamazaki, K. 2002. Comparison of sterile water and tap water in efficacy of surgical hand scrubs. *J. Jpn. Assoc. Operating Room Tech.* **23**: 2–9 (in Japanese).
- 6) Furuhashi, K., and Koike, K.A. 1990. Characteristics and antibiotics susceptibility of *Methylobacterium extorquens* isolated from drinking water and air in the hospital. *Kankyokansen* **5**: 47–51 (in Japanese).
- 7) Furuhashi, K., and Koike, K.A. 1993. Isolation of *Methylobacterium* spp. from drinking tank-water and resistance of isolates to chlorine. *Jpn. J. Public Health* **40**: 1047–1053 (in Japanese).
- 8) Gallego, V., García, M.T., and Ventosa, A. 2005. *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov. isolated from drinking water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 281–287.
- 9) Gräf, W., and Bauer, I. 1973. Red bacterial growth (*Corynebacterium rubrum* nov. spec.) in tap water systems. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd.* **236**: 513–530.
- 10) Green, P.N., Bousfield, J.J., and Hood, D. 1988. Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zammitii* sp. nov., and *M. fujiisawaense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 124–127.
- 11) Hiraishi, A., Furuhashi, K., Matsumoto, A., Koike, K.A., Fukuyama, M., and Tabuchi, K. 1995. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2099–2107.
- 12) Hornei, B., Lineberg, E., Schmidt-rotte, H., Mraß, M., Weber, K., Heits, F., Frosch, M., and Solbach, W. 1999. Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zammitii*. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 248–250.
- 13) Jourand, P., Giraud, E., Bna, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., and De Lajudie, P. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2269–2273.
- 14) Lee, C.H., Tang, Y.H., and Liu, J.W. 2004. Underdiagnosis of urinary tract infection by *Methylobacterium* species with current standard processing of urine culture and its clinical implications. *J. Med. Microbiol.* **53**: 755–759.
- 15) O'Brien, J.R., and Murphy, J.M. 1993. Identification and growth characteristics of pink pigmented oxidative bacteria, *Methylobacterium mesophilicum* and biovars isolated from chlorinated and raw water supplies. *Microbios* **73**: 215–227.
- 16) Patt, T.E., Cole, G.C., and Hanson, R.S. 1976. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Microbiol.* **26**: 226–229.
- 17) Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
- 18) Sokal, R.R., and Michener, C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationship. *Univ. Kansas Sci. Bull.* **28**: 1409–1438.
- 19) Truant, A.L., Gulati, R., Giger, O., Satishchandran, V., and Caye, J.G. 1998. *Methylobacterium* species: an increasingly important opportunistic pathogen. *Lab. Med.* **29**: 704–710.
- 20) Truant, A.L., Gulati, R., Giger, O., Satishchandran, V., and Caye, J.G. 1998. *Methylobacterium* bacteremia in AIDS. *Clin. Microbiol. Infect.* **4**: 112–113.
- 21) Zaharatos, G.J., Dascal, A., and Miller, M.A. 2001. Discordant carbapenem susceptibility in *Methylobacterium* species and its application as a method for phenotypic identification. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2037–2038.

【報文】

病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況

古畑 勝則*, 福山 正文

Isolation of Oligotrophic Bacteria from Hospital Tap Water

Katsunori FURUHATA* and Masafumi FUKUYAMA

Department of Microbiology, College of Environmental Health, Azabu University
1-17-71, Fuchinobe, Sagamihara, Kanagawa 229-8501, Japan

To investigate the distribution of oligotrophic bacteria in hospital tap water, tap water samples were subjected to pour culture at 25°C for 7 days using R2A agar medium. Bacteria were detected in 222 of 271 samples (81.9%) collected nationwide, mainly in the Kanto district, revealing that oligotrophic bacteria are present at a very high frequency in hospital tap water. The distribution was investigated in relation to the geography or form of hospital management, but no marked tendency was noted. The number of isolated oligotrophic bacteria varied from 1.0×10^1 CFU/ml to 2.8×10^1 CFU/ml among the samples, but the number was less than 1.0×10^1 CFU/ml in 54 samples accounting for the highest ratio (21.3%). Of 538 oligotrophic isolates, 457 isolates (84.9%) were gram-negative rods, and 108 isolates (23.6%) were *Methylobacterium*, ranking the highest, followed by 71 isolates of *Pseudomonas* (15.5%). However, it was not possible to identify 274 isolates (60.0%). Gram-positive rods, *Bacillus* and *Corynebacterium*, and cocci, *Micrococcus* and *Staphylococcus*, were also isolated, although the frequencies were low. Based on these findings, it should be noted that hospital tap water contains oligotrophic bacteria which may cause opportunistic infections in susceptible patients.

(Accepted 16 February 2006)

Key words : Oligotrophic bacteria (貧栄養細菌)/Tap water (飲料水)/Hospital (病院).

緒 言

日本の水道水では塩素消毒が義務付けられていることから消化器系病原微生物などは殺菌されている。しかしながら、建築物において受水槽等の給水施設を経由した後に配水される水道水中には残留塩素に抵抗性を示す様々な貧栄養細菌が広く生息していることはすでに報告したとおりである¹⁾。こうした細菌は36°C、24時間の培養条件で試験される水道法の水質基準項目である一般細菌としては検出されないため、その生息が十分に認識されているとは言い難く、病院内の水道水における貧栄養細菌の生息状況は明らかにされてい

い。

これら貧栄養細菌のなかでも *Methylobacterium* 属菌は日和見感染原因菌として臨床材料からの分離報告が散見される^{2,3)}。本菌感染症の場合はその感染源が水道水の可能性もあることから、易感染者が病院内の水道水を直接利用することなどにより *Methylobacterium* 属感染症の拡大が危惧される。

そこで著者らは上述のことを加味し、微生物生態学的視点から病院内水道水における貧栄養細菌の生息実態を調査した。

材料および方法

1. 供試試料

2004年4月から10月の間に、東北から沖縄にある大学附属、国公立、私立等の病院内水道水（主にトイレや洗面所などの末端）を十分に放流後、滅菌容器（100ml 容）に採取し、合計271試料を調査対象とした。また、試料採取時に試験紙（アクアチェック LC、日産化学工業）により遊離残留塩素の測定を行った。

2. 貧栄養細菌の分離同定

供試試料を1ml ずつ2枚のシャーレに分注し、1枚は一般細菌を測定するために標準寒天培地（日水製薬）で混釈後、37°Cで24時間培養した。また、1枚は貧栄養細菌測定用としてR2A 寒天培地（和光純薬工業）を用いて混釈し、25°Cで7日間培養後、出現した集落を計数した。なお、残留塩素が検出されなかった試料は1,000倍まで希釈してから混釈した。

集落計数後、形態の異なる集落を1試料当たり最大数個鈎菌して再分離し、純培養株を得た。これらの菌株について色素産生性、グラム染色、OF 試験、オキシダーゼテスト（栄研化学）などを行い、成書³⁾に準拠して属レベルで菌種の同定を行った。なお、OF 試験ではPYP 基礎培地（日水製薬）にグルコース（和光純薬工業）を1%加えて調製し、25°C、7日間培養した。また、一部の分離株については、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌同定用キット、ノンファグラム S-1（和光純薬工業）を用いた。

結 果

1. 病院内水道水からの一般細菌の分離状況

一般細菌が分離された水道水は271試料中3試料（1.1%）と低率であった。なお、これらは大学附属病院が2試料（2.8%）、都府県立病院が1試料（3.6%）であった。これら試料の残留塩素をみると、いずれも0.1mg/l 未満であった。また、それぞれの菌数は大学附属病院では 7.5×10^3 CFU/ml および 6.4×10^3 CFU/ml、都府県立病

Table 1. Isolation of oligotrophic bacteria from hospital tap water.

Sampling area	No. of samples examined	No. of positive samples (%)
Tohoku	15	14 (93.3)
Kita-Kanto	5	5 (100.0)
Minami-Kanto	202	161 (79.7)
Koshin-etsu	15	13 (86.7)
Hokuriku	2	2 (100.0)
Tokai	6	5 (83.3)
Kinki	6	5 (83.3)
Chugoku	3	3 (100.0)
Shikoku	3	1 (33.3)
Kyusyu・Okinawa	11	13 (92.9)
Total	271	222 (81.9)

院では 4.0×10^4 CFU/ml であり、水道法水質基準（ 1.0×10^3 CFU/ml 以下）を大きく上回った。

2. 病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況

病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況を調査地域別にTable 1 に示した。全体では271試料中222試料（81.9%）から分離され、貧栄養細菌は非常に高率に生息していることが明らかになった。分離状況を地域別にみると、北関東、北陸および中国地方においては、試料数は少ないものの、採取したすべての試料から分離された。次に、東北および九州・沖縄地方での分離率が90%を超えて高く、前者では93.3%（15試料中14試料）、後者では92.9%（14試料中13試料）であった。また、甲信越地方では86.7%（15試料中13試料）、東海および近畿地方ではそれぞれ83.3%（6試料中5試料）、南関東では79.7%（202試料中161試料）といずれも高率に分離された。ところが、四国地方では試料数が3試料と少なかったが、このうち分離された試料はわずか1試料（33.3%）のみであった。

また、Table 2 には貧栄養細菌の分離状況を病院の規模を考慮した経営形態と遊離残留塩素濃度別に示した。貧栄養細菌は市立病院から96.4%（28試料中27試料）と最も高率に分離され、次に大学附属病院が83.3%（72試料中60試料）、都府県立病院が82.1%（28試料中23試料）、その他の病院が79.5%（112試料中89試料）および独立行政法人（国立）病院が74.2%（28試料中23試料）であった。

Table 2. Distribution of oligotrophic bacteria isolated from hospital tap water and the free residual chlorine concentration of the water samples.

Management form	No. of samples examined	No. of positive samples (%)	Free residual chlorine (mg/l)					NT*
			0	0.1-0.2	0.3-0.4	0.5-0.6	0.7-0.8	
University attachment	72	60 (83.3)	8	20	5	4	1	22
National	31	23 (74.2)	8	2	5	1	0	6
Prefecture	28	23 (82.1)	4	4	3	1	0	11
City	28	27 (96.4)	3	10	2	1	0	11
Others	112	89 (79.5)	2	16	29	10	5	27
Total	271	222 (81.9)	25 (11.3)	52 (23.4)	45 (20.3)	17 (7.7)	6 (2.7)	77 (34.7)

* : Not tested

病院内水道水からの貧栄養細菌の分離状況を遊離残留塩素濃度別にみると、未測定 of 77 試料を除き、0.1~0.2mg/l から 52 試料 (23.4%) と最も多く分離され、次に 0.3~0.4mg/l から 45 試料 (20.3%) 分離された。遊離残留塩素が 0.5~0.6 mg/l になると分離された試料は 17 試料 (7.7%) と少なくなり、さらに高濃度の 0.7~0.8mg/l ではわずか 6 試料 (2.7%) から分離されたに過ぎなかった。このように、貧栄養細菌の分離状況は残留塩素濃度が高くなるとともに分離率が低くなる傾向が認められた。また、水道法で定められた 0.1mg/l を維持しておらず貧栄養細菌が分離されたのは、222 試料中 25 試料 (11.3%) であった。分離率が最も高かった遊離残留塩素濃度 0.1~0.2 mg/l における病院別の分離率を比較すると、市立病院が 35.7% と最も高く、次に大学附属病院が 27.8% であった。都府県立病院とその他の病院ではそれぞれ 14.3%、国立病院が 6.5% であった。

病院内水道水中に生息する貧栄養細菌数を Fig. 1 に示した。全体では 1.0×10^3 CFU/ml ~ 9.0×10^4 CFU/ml が 96 試料 (43.2%) と最も多く、次に 1.0×10^1 CFU/ml ~ 9.0×10^2 CFU/ml が 54 試料 (24.3%)、 1.0×10^2 CFU/ml ~ 9.9×10^3 CFU/ml が 38 試料 (17.1%)、 1.0×10^3 CFU/ml ~ 9.9×10^4 CFU/ml が 30 試料 (13.5%) であっ

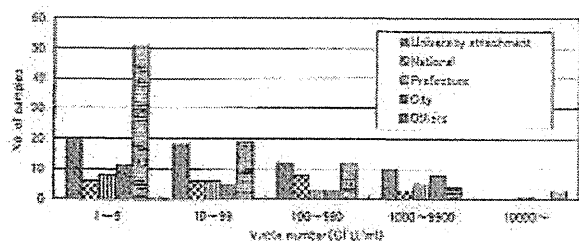


Fig.1. Viable number of oligotrophic bacteria in hospital tap water.

た。さらに、 1.0×10^1 CFU/ml 以上の試料が 4 試料 (1.8%) あった。このように、菌数が多くなると分離試料数は少なくなった。また、分離試料数が最も多かった 1.0×10^3 CFU/ml ~ 9.0×10^4 CFU/ml について病院別に比較すると、その他の病院が 51 試料 (59.1%) と最も多く、次に大学附属病院が 20 試料 (20.8%)、市立病院が 11 試料 (11.5%)、都府県立病院が 8 試料 (8.3%)、国立病院が 6 試料 (6.3%) であった。

3. 病院内水道水から分離された貧栄養細菌

Table 3 には 222 試料の病院内水道水から分離された貧栄養細菌の同定結果を示した。分離された貧栄養細菌 538 株中 457 株 (84.9%) がグラム陰性桿菌であり、4 属に同定され、その内訳は *Methylobacterium* が 108 株 (23.6%) と最も多く、次に *Pseudomonas* が 71 株 (15.5%)、*Agrobacterium* と *Alteromonas* が各 2 株 (0.4%) であった。しかし、グラム陰性桿菌のうち 274 株

Table 3. Oligotrophic bacteria isolated from hospital tap water.

Gram stain	Cell form	Genus	No. of strains (%)
Negative	Rods	<i>Methylobacterium</i>	108
		<i>Pseudomonas</i>	71
		<i>Agrobacterium</i>	2
		<i>Alteromonas</i>	2
		Unknown	274
Subtotal			457 (84.9)
Positive	Rods	<i>Bacillus</i>	12
		<i>Corynebacterium</i>	5
		Unknown	29
Subtotal			46 (8.6)
Positive	Cocci	<i>Micrococcus</i>	4
		<i>Staphylococcus</i>	2
		Unknown	29
		Subtotal	
Total			538 (100.0)

(60.0%)は同定不能であった。また、グラム陽性菌では桿菌が46株(8.6%)、および球菌が35株(6.5%)であり、それぞれ *Bacillus* が12株(26.1%)と *Corynebacterium* が5株(10.9%)、*Micrococcus* が4株(11.4%)と *Staphylococcus* が2株(5.7%)の各2属に同定された。

考 察

これまでの水道水における細菌学的調査では、血液寒天培地やハートインフュージョン寒天培地などの富栄養培地を用いて37°C、24～48時間の培養条件が採用されている⁹⁾。調査対象が病原細菌のみの場合はこうした検査で十分であろうが、バイオバーデン、すなわちそこに存在し、生育しうるすべての貧栄養細菌を対象とする場合には、こうした培地および培養条件では検出されにくいことがすでに知られている¹⁾。新谷の解説⁸⁾では、透析液中の貧栄養細菌の調査においてSCDA培地を用いて37°Cで48時間培養した場合とSMA培地やR2A培地のような貧栄養培地で比較的低温(23°C)で長時間(7日間)培養した場合では、検出菌数に10,000倍もの差が生じたことが示されている。また、歯科用水の調査においても同様な結果が示されており、このような貧栄養細菌は富栄養培地では発育しにくいこと、さらにこれらの生息環境を考慮すると、貧栄養で比較的低温条件の方が培養には適していることが示唆されている¹⁾。

今回の調査においても同様な結果が示された。すなわち、標準寒天培地を用いて36°Cで24時間培養する「一般細菌」の分離率は、わずか1.1%(271試料中3試料)と非常に低率であった。ところが、同一試料をR2A培地により25°Cで7日間培養すると81.9%(271試料中222試料)と高率に「貧栄養細菌」が分離された。このように、培養条件を替えることによって細菌の分離率に大差が認められた。以上のように、通常の病院内水道水から水道法に定められた「一般細菌」が分離されることは非常に希であるが、「貧栄養細菌」は広く生息していることが明らかになった。

これら貧栄養細菌の生息状況を地理的にみると、

試料数が少なかった四国を除き、全国的には80～90%の高い分離率であり、顕著な差異は認められなかった。また、病院の規模を考慮して経営形態別に貧栄養細菌の分離率をまとめてみたが、独立行政法人(国立)で74.2%とわずかに低かったものの、その他は80～90%と大差はなかった。

さらに、遊離残留塩素濃度別の分離状況では、0.1～0.2mg/lで23.4%と最も高く、次に0.3～0.4mg/lで20.3%であった。遊離残留塩素が0.5～0.6mg/l、0.7～0.8mg/lと高濃度になるとそれぞれ7.7%、2.7%と分離率は次第に低下した。また、貧栄養細菌が分離された水道水のうち、水道法に定められた遊離残留塩素0.1mg/lを維持していなかったものは11.3%であり、予想外に低かった。このように、遊離残留塩素が存在する病院内水道水においても塩素抵抗性の貧栄養細菌が生残していることが明らかになった。一方、事務所ビル等の建築物における現状はすでに報告したとおりであり¹⁾、実験的にも分離株の塩素抵抗性が確認されている^{8) 10)}。

病院内水道水中の貧栄養細菌数は、 1.0×10^4 CFU/ml～ 2.8×10^4 CFU/mlと試料によってかなりの差がみられた。これをオーダーごとにみると、1桁台が96試料(43.2%)と最も多く、次に2桁台が54試料(24.3%)、3桁台が38試料(17.1%)、4桁台が30試料(13.5%)と菌数の増加に伴って漸次試料数は減少した。また、5桁台の試料が4試料(1.8%)もあった。現在のところ、これら貧栄養細菌数に関する規制基準はまったくない。先の水道法水質基準改定において、試験項目を「一般細菌」から「従属栄養細菌(貧栄養細菌)」へ移行することの是非について種々議論されたが、結局結論は先送りとなった¹¹⁾。今後の検討が待たれるところである。

分離された貧栄養細菌を同定した結果、84.9%がグラム陰性桿菌であり、大半を占めた。中でも *Methylobacterium* や *Pseudomonas* が優占種であったが、グラム陰性桿菌のうち60%は同定できなかった。このことは水道水中の貧栄養細菌に関する情報量が少ないことや分離株の生化学的活性が低いことによるものと考えられた。以前、著者らが行った調査では病院内水道水の71%が

ら *Methylobacterium* が分離されており¹¹⁾、今回の調査結果同様、水道水中の優占種であった。Gallego らの報告¹²⁾でも、水道水から *Methylobacterium* を分離しており、新菌種の提案を行っている。また、O'Brien は塩素消毒された水道水中の *Pseudomonas* について報告している¹³⁾。現在、水道水中に生息する *Methylobacterium* 属菌については19菌種が報告されているが¹³⁾、性状試験だけでは種レベルでの同定はかなり困難である。著者らは16S rDNA の部分塩基配列の解析によってわが国の病院内水道水では *M. aquaticum* と *M. fujiisawaense* が優占種であったことを別に報告した¹⁴⁾。こうした *Methylobacterium* は *Pseudomonas*¹⁵⁾ 同様、日和見感染の原因菌として報告されており¹⁶⁾、感染の可能性を有すると判断された。

厚生労働省は2005年2月1日付けで医療法施行規則の一部を改正する省令において、第20条第3号のなかで「滅菌手洗い」を「清潔な手洗い」に改訂した¹⁷⁾。これまで、手術時の手洗い水については種々検討され、滅菌水と水道水において手洗いの効果に有意差がないとの報告^{8), 18), 19)}から、日本の病院においても感染対策に必要な経費削減のため、滅菌手洗い装置を廃止して水道水への切り替えが可能になった。こうした状況を否定するものではないが、塩素消毒された水道水中にも貧栄養細菌が広く生息していることを念頭に置く必要があると考えられた。

結 語

以上のように、残留塩素が検出される病院内水道水中にも貧栄養細菌が広く生息していることが判明した。全体的に菌数は少ないものの、日和見感染原因菌として注目される *Methylobacterium* や *Pseudomonas* が分離されていることから、水道水の衛生的維持管理状況によっては菌数の増加に伴う水質の劣化も予想され、易感染者が直接水道水を利用する場合にはこうした現状を十分に考慮する必要がある。

なお、本稿の内容は日本防菌防黴学会第33回

年次大会（東京）において発表した。

文 献

- 1) 古畑勝則, 小池和子, 松本淳彦 (1989) 飲料用タンク水から高頻度に分離された *Protomonas extorquens* の消長と塩素抵抗性. 日本微生物生態学会報, 4, 35-47.
- 2) Hornei, B., et al. (1999) Systemic infection of an immunocompromised patient with *Methylobacterium zatmanii*. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 248-250.
- 3) Lee, C. H., Tang, Y. F., and Liu, J. W. (2004) Underdiagnosis of urinary tract infection by *Methylobacterium* species with current standard processing of urine culture and its clinical implications. *J. Med. Microbiol.*, 53, 755-759.
- 4) 石黒俊哉, ほか (2005) *Methylobacterium mesophilicum* による CAPD 腹膜炎の1例. 日本透析医学会雑誌, 36増刊1, 962.
- 5) 小迫芳正 (1996) 細菌の同定方法. 佐々木次雄 ほか編, バイオバーデン試験法及び環境微生物試験法, 財団法人規格協会, 東京, p.100-111.
- 6) 高尾佳保里, ほか (2003) 手術時手洗い水について, 滅菌水の必要性に関する検討. 環境感染, 18, 430-434.
- 7) 古畑勝則, 小池和子 (1990) 落下細菌測定時の培地および培養条件に関する一考察. 環境感染, 5, 11-16.
- 8) 新谷英晴 (2002) 医療機関と損傷菌, 貧栄養菌, 静止菌, 院内感染菌. 防菌防黴, 30, 95-103.
- 9) 古畑勝則 (2004) 水道水. 伊藤 武ほか編, 食品のストレス環境と微生物—その挙動・制御と検出—, 財団法人サイエンスフォーラム, 東京, p. 210-218.
- 10) Hiraishi, A., et al. (1995) Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2099-2107.
- 11) 松田和久 (2003) 水道法水質基準の見直し等について. 空気調和・衛生工学, 77, 809-814.
- 12) 古畑勝則, 小池和子 (1990) 院内環境から分離された *Methylobacterium extorquens* の性状と薬剤感受性. 環境感染, 5, 47-51.
- 13) Gallego, V., Garica, M. T., and Ventosa, A.

- (2005) *Methylobacterium hispanicum* sp. nov. and *Methylobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from drinking water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 281-287.
- 14) O'Brien, J. R. (1992) An unusual yellow pigmented *Pseudomonas* species isolated from chlorinated municipal town water supply. *Microbios*, 69, 215-221.
- 15) Fuzoby, J. P. (2005) List of bacterial names with standing in nomenclature-genus *Methylobacterium*. <http://www.bacterio.cict.fr/m/methylobacterium.html>.
- 16) Furuhashi, K., et al. (2006) Isolation and identification of *Methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility. *Microbiol. Immunol.*, 50, 11-17.
- 17) Holmes, B., et al. (1977) *Pseudomonas paucimobilis*, a new species isolated from human clinical specimens, the hospital environment, and other sources. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27, 138-146.
- 18) 厚生労働省令第12号. 医療法施行規則の一部を改正する省令. 官報2005年2月1日, 第4024号.
- 19) 藤井 昭, ほか (2002) 手術時手洗いにおける滅菌水と水道水の効果の比較. *手術医学*, 23, 2-9.
- 20) 白石 正, 仲川義人, 長岡榮子 (2004) 術前手洗い水に関する細菌学的検討. *日病薬誌*, 40, 1133-1135.

また CLDM 投与の delayed treatment は、たとえ CLDM 感受性菌による膿瘍であっても、膿瘍中の菌数をほとんど減少させられないことが認められた。

2. *Legionella* 属細菌の水道水汚染とその non-culturable form について

岐阜大学医学部微生物学講座

山本啓之 江崎孝行

Department of Microbiology,

University of Maryland

C. Paszko-Kolva, R.R. Colwell

I. 緒言

Legionella 属細菌は冷却塔のみならず、水道配管系内からも検出されている。しかしその多くは、使用頻度が少く、配管内で長期間にわたり水が滞留した試料である。我々は滞留状態となり易い水道配管系である実験室用洗眼器を対象として微生物調査を行い、その結果より *Legionella* の生息状態を考察した。

II. 方法

実験室内に設置された非常用洗眼器より水を採取し、直ちに実験に供した。pH, 塩素, CO₂濃度, アルカリ度などの化学的項目と、従属栄養細菌と *Legionella* の生菌数及び蛍光法による総菌数を調べた。また、試水中の原生動物の検出を行った。

III. 結果

調査した 40 試料で遊離塩素は検出されず、また 27 試料で濁りや着色が肉眼で認められた。*Legionella* は、蛍光抗体法により 32 試料 (10¹~10⁶ cell/ml) から検出されたが、生菌数では 3 試料 (10~10² CFU/100 ml) から検出されただけであった。従属栄養細菌は、32 試料で 10¹~10⁵ CFU/ml であった。また、19 試料でアメーバが検出され、そのうちの 1 試料には、*Acanthamoebae* が存在した。

IV. 考察

滅菌状態に近いと一般的に考えられている水道水も滞留状態に置かれると、感染症の原因となる微生物が増殖してくる。結果に示したように、*Legionella* の生菌数と蛍光抗体法による総菌数と

の落差は、この細菌が人工培地では発育しない状態 (non-culturable) にあるのではないかと考えられる。培地上では発育しないが宿主の体内では増殖するとされている viable but non-culturable という概念は、環境に存在する病原性細菌を調査する方法として培養法のみでは不十分であることを示唆している。

3. 麻疹・ムンプス・風疹混合ワクチン接種について

一特にムンプスに関する検討—

岐阜大学医学部小児科

浅野純一 佐々木俊也 高橋一浩

桑原尚志 近藤直実 折居忠夫

はじめに

麻疹・ムンプス・風疹混合ワクチン (以下 MMR ワクチン) は 1989 年 4 月よりわが国で広範囲に接種されるようになり MMR ワクチンによると思われる髄膜炎の発生が問題となり、厚生省の調査では同ワクチン接種後の髄膜炎の頻度は 2,000 人に 1 人であると報告された。今回著者らは岐阜県下における MMR ワクチン接種後の髄膜炎の頻度および同時期におけるムンプス自然感染後の髄膜炎の頻度につき検討した。

対象および方法

MMR ワクチン接種後の髄膜炎の頻度は平成元年 4/1~10/31 における県保健予防課の調査データによった。ムンプス自然感染後の髄膜炎の頻度は岐阜県下小児科関連病院に調査用紙を送付し平成元年 1/1~12/31 の外来および入院のムンプス症例につき検討した。

結果

結果を表 1 に示す。MMR ワクチン接種後の髄膜炎の頻度は、2,000 人に 1 人 (0.052%) であり、ムンプス自然感染後の髄膜炎の頻度は 13 人に 1 人 (7.3%) であった。以上より MMR ワクチン接種後の髄膜炎の頻度は、ムンプス自然感染後の髄膜炎の頻度の 0.052/7.3=1/140 であった。

尚、MMR ワクチン接種後の髄膜炎症例 6 例の経過、予後は全例良好であった。

23 マンション受水槽での残留塩素消失事例への対応について

町田保健所生活環境安全課

○大坪秀樹、奥村龍一、榎林亨、込宮喜徳、宮崎奈々絵、長塚友次

1 はじめに

集合住宅や事務所・店舗などの受水槽は、水道法及び東京都小規模貯水槽等における安全で衛生的な飲料水の確保に関する条例により衛生確保を図っている。これら法令に基づく保健所での主な指導は自主管理の向上であり、これまで受水槽以下の残留塩素消失原因は、水槽の清掃不良や水槽内での水の長時間停滞など自主管理に問題がある施設で発生していた。

ところが今回、自主管理に問題ない施設で残留塩素消失事故が発生し、保健所で調査した結果、水道本管の残留塩素が低いことが原因のひとつであった。また、同様の事故は多摩地区の一部地域でも発生する可能性があることがわかった。そこで、都民が利用する全ての受水槽で安全で衛生的な水を確保するために、今回の事例を踏まえ今後の保健所の取り組みを検討したので報告する。

2 事故の概要

(1) 施設の概要

A分譲マンション（居住者66世帯約150人）、受水槽容量36m³（簡易専用水道）

(2) 事故発生の経緯

A分譲マンションの管理者から、「昨日から残留塩素が検出されない。近くの公園の直結栓を測定したところ、そこからも検出されない。」との電話通報があった。直ちに現場調査したところ、直結給水栓では水道法に規定する基準値0.1mg/lを保持していたものの、受水槽内では残留塩素がほとんど消失していた。その後、環境水道課を通じ水道局に通報し早期の塩素回復を要請するとともに、管理者に利用者への情報提供を指導した。

3 原因究明調査

(1) 施設維持管理状況調査

事故発生前と当日の残留塩素は表に示すとおりであった。また、平成14年度からこれまでの残留塩素測定記録を確認したところ、今回以外に塩素が消失したことはなく、入居者の変動による水使用量の減少もなかった。なお、水道法で規定する登録検査機関による検査も定期的を実施しており指摘事項はなかった。

表 事故発生前後の残留塩素

測定場所	事故発生二日前	事故当日
直結水(隣接公園)	記録なし	0.1
直結水(近隣住宅)	記録なし	0.1
受水槽内	記録なし	0.1未満
末端水	0.3	0.1未満

(単位:mg/l)

(2) 給水所及び管末での残留塩素状況調査

水道局提供の資料から、①事故発生の一週間前から管末での残留塩素が急速に低下していたこと、②管末の残留塩素が0.2mg/lを下回ってから塩素が追加されたこと、③昨年度の同じ時期には、0.25mg/lで塩素が追加されていたことなどがわかった。

(3) 水道管敷設状況調査

水道局及び町田市水道部からの情報提供により、町田市をはじめ多くの市町村では、都と市町村の水道事業一元化以前に敷設した水道管が多く、水道水停滞の原因となる“行き止まり管”が多数存在することがわかった。

4 今回の原因

原因究明調査から、マンションで残留塩素が消失した今回の事例は、以下の原因が複合して発生したものと考えられる。

①残留塩素が低下しやすい時期 毎年6月ころは残留塩素が低下しやすい時期であり、給水所ではその都度、塩素を追加注入しているものの、今回はそのタイミングが遅れた。

②行き止まり管の存在 行き止まり管では水が停滞するため、残留塩素が低下しやすい。

5 保健所の対応

自主管理による維持管理の向上を指導するだけでは、問題解決が困難な事例があることが判明したため、保健所では次のような対策を実施した。

(1) 施設設置者及び管理者への周知

週に1回、残留塩素を測定し記録を保管することや保健所への相談、また、残留塩素が消失する原因など受水槽の維持管理強化を求める通知を、簡易専用水道及び特定小規模貯水槽水道の全施設に送付した。また、保健所ホームページに関係情報を掲載した。

(2) 問題の共有化

環境水道課を事務局とし各保健所、水道局及び市町村水道部で構成する多摩地区貯水槽水道等連絡協議会の開催を要請し、今回の事故の対応状況を報告した。また、各地域の行き止まり管の情報提供や残留塩素が一定濃度で供給できる自動塩素注入装置への転換、また、関係機関の連携強化などを協議し、同様の事故の再発防止の必要な対策を検討した。

6 今後の取り組み

(1) 行き止まり管に接続する受水槽を持つ施設への重点指導

水道局からの情報提供を受け残留塩素が消失する可能性がある施設を抽出し、現場調査により必要な維持管理及び問題発生時の対応策の周知徹底を図る。

(2) 市水道部との連携強化

光化学スモッグ対策と同様、事前対応措置として自動測定器により定点測定している地点の残留塩素測定値の提供を受け、リアルタイムで地域の状況を把握し問題発生に備える体制を整備する。

(3) 受水槽を利用する都民に向けた事業展開

保健所では、施設設置者や管理者に対しては受水槽の維持管理方法などを指導している。しかしながら、利用者にはどのような状態の水を飲用しているか、安全な水の供給にはどんな維持管理が必要かなどの情報提供が不足している。今後、インターネットなどを活用して飲用水の衛生に関する地域情報を発信していく。

7 まとめ

水道局では平成16年度から「安全でおいしい水プロジェクト」を実施している。今回の事例は、そこで推進する塩素注入量の低減化が原因のひとつであった。また、水を供給する者（水道局・市水道部）と水道水の衛生を担う福祉保健局・保健所との間で、健康危機発生時の対応に温度差が感じられた。今後、水道事業体との連携をさらに深め情報交換をしながら共通の認識の下で、飲料水による健康被害の発生防止を図っていかなければならない。

最後に、今回のような“発生時に原因特定ができない健康危機”では、多くの可能性のなかから原因を絞り込み、被害拡大を防止する必要がある。また、その発生時は現場で可能な限りの情報を収集することが重要である。これに加えて、収集した情報を正確に評価し被害の拡大を防ぐことができる資質を備えた職員の育成が不可欠である。

水道水中の残留塩素について

齋木 敏勝

平成8年7月から平成9年7月にかけて東京女子医科大学看護短期大学の水道水中の残留塩素濃度の季節変動および通水量に対する残留塩素濃度の変動を、DPD法を用いた残留塩素計により測定を行い、以下のことを明らかにした。

- 1) 残留塩素は通水開始後約1ℓまでは低濃度であるが、以降急激に変化し、3ℓ位通水すると長時間通水した後の濃度レベルに近くなる。
- 2) 残留塩素濃度が施行規則の規定値を満たしたのは、冬季の1月の測定の時のみであり、4月では既に施行規則の下限値の三分の一程度の低濃度であった。5月下旬以降は遊離残留塩素は0.01mg/ℓ以下、全残留塩素は0.11mg/ℓ以下の値であり、一年のかなりの期間残留塩素は施行規則規定値をはるかに下回る低濃度であった。

はじめに

水道水は消毒がしてあり、安心して飲む水である。それは水道水を作るとき、原水中のさまざまな汚染物質を酸化分解するためと水系感染症の防除のためつまり消毒殺菌のための2つの目的で塩素が加えられているからで、水道水中に含まれる遊離の塩素や結合をした酸化力をもつ有効塩素を残留塩素という。この塩素であるが水道水中に含まれるカルキ臭(塩素臭)のもとになっており、カルキ臭は汚れた水に多いアンモニアと塩素が反応して生成するクロラミンという物質、特にトリクロラミンによる。カルキ臭は残留塩素濃度が0.4mg/ℓが閾値とされており、0.4mg/ℓ以下であればおいしい水の要件となる¹⁾。換言すれば、カルキ臭がすれば水道水中の残留塩素は水質基準以上であり消毒効果が持続していることになる。

浄水方式の主な方法は緩速ろ過法と急速ろ過法の2つである。緩速ろ過法は、原水を一日5~6mのスピードでゆっくりと大きな池の砂層でろ過することにより水質を浄化するもので、浄化力は砂表面に付着した微生物の分解作用による自然の浄

化力に依存する浄水方式で、得られた水はうまいと評価されている。この方法は、イギリスで開発された技術で日本でも初めはこの方法が採り入れられた。しかし水道水の需要の増大に伴い緩速ろ過法では浄水量が不足となり、原水に濁りがある場合も浄水でき取水から給水までにかかる時間が緩速ろ過法の約6分の1で済む急速ろ過法に変わってきた。急速ろ過法は、アメリカで開発された技術で日本では1912年(明治45年)京都の蹴上浄水場で最初に採用された。急速ろ過法は、原水中の固形物を硫酸バンド、アルミニウム塩や鉄塩などの凝集剤を用いて凝集沈殿処理をし、その上澄み液を急速ろ過池の砂に導いてろ過する方法で、急速ろ過後細菌に対する安全を保障するために塩素による消毒が行われ、残存する細菌の死滅と配水管内での再汚染防止が計られている(後塩素処理)。この急速ろ過法は、緩速ろ過法の欠点であった広い面積の浄水場や人力を必要とせず、かなりの濁水であっても短時間で処理できるので急速に広まったが、浄化力の点では劣っていたため種々の薬品に依存している方法である。