

※※2023年7月改訂  
※2023年4月改訂

## 水中の大腸菌および大腸菌群検査用 特定酵素基質培地法—ピルビン酸添加XGal-MUG培地

※ **ECブルー-100P**  
**ECブルー-100**  
**ECブルー-10**

### ※※——はじめに——

厚生労働省令第101号（2003年5月30日）において水質基準に関する省令が改正され、上水から大腸菌が検出されないことが水質基準のひとつになりました。これに前後して厚生労働省告示第261号（2003年7月22日）および2001年版上水試験方法において大腸菌および大腸菌群検査用培地として、ECブルーが収載されました。本品は、特定酵素基質培地法の原理に基づいて開発されたもので、水中の大腸菌および大腸菌群の存在を特異的に検出するために使用されます。

培地組成中の蛍光基質MUG（4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド）は大腸菌が特異的に産生する酵素β-グルクロニダーゼにより分解され、蛍光色素を遊離するので、蛍光の有無を確認するだけで大腸菌の存在を確定できます。また、発色基質X-GAL（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）は、大腸菌群が特異的に産生するβ-ガラクトシダーゼにより分解され、培地が青～青緑色を呈するため、培地の色調変化から大腸菌群の存在を確定できます。

本品は、顆粒培地をアルミスティック包材（ECブルー-100P）およびディスプレイタイプの培養ボトル（ECブルー-100、ECブルー-10）に充てんし、電子線滅菌したものです。このため、培地調製の必要がなく、ECブルー-100Pでは検査試料に直接本品を添加・溶解するだけであり、ECブルー-100およびECブルー-10では、培養ボトルに直接試料を加え溶解するだけで検査を行うことができます。

### 【特長】

- 1 つの培地で大腸菌および大腸菌群を感度よく検出できます。
- 追加試験を必要とせず、大腸菌および大腸菌群の確定ができます。
- 培地の調製・滅菌が不要で、操作および判定は非常に簡単です。
- 24時間培養で判定できます。
- 培地は顆粒状であるため、溶解が容易です。
- 自家蛍光のない特殊ボトルを用いているため、大腸菌の判定が容易です。
- 使用目的により3種類の容器形態から選択が可能です。

### ※——本質〈キットの構成〉——

#### ※※ ECブルー-100P

分包滅菌顆粒培地…………… 100 mL用 (1.74 g) × 80 包

本品は、定性試験用に100 mL分の顆粒培地をアルミスティック包材に充てんし、電子線滅菌したものです。このため、培地を秤量・滅菌する必要がなく、そのまま使用することができます。検査用の容器（滅菌した培養容器）は、別途用意する必要があります。

#### ECブルー-100

ボトル入り滅菌顆粒培地…………… 100 mL用 (1.74 g) × 80 本

本品は、定性試験用に100 mL分の顆粒培地を透明なディスプレイボトルに充てんし、電子線滅菌したものです。このため、培地の秤量・滅菌や培養容器の準備の必要がなく、必要時すぐに使用できます。

#### ECブルー-10

ボトル入り滅菌顆粒培地…………… 10 mL用 (0.17 g) × 150 本

本品は、定量試験用(MPN試験用)に10 mL分の顆粒培地を透明なディスプレイボトルに充てんし、電子線滅菌したものです。このため、培地の秤量・滅菌や培養容器の準備の必要がなく、必要時すぐに使用できます。

### 【顆粒培地基本組成】

1 L分 = 17.4 g中

ペプトン…………… 5.0 g  
塩化ナトリウム…………… 5.0 g  
リン酸二水素カリウム…………… 1.0 g  
リン酸一水素カリウム…………… 4.0 g  
ラウリル硫酸ナトリウム…………… 0.1 g  
ピルビン酸ナトリウム…………… 1.0 g  
硝酸カリウム…………… 1.0 g  
イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド(IPTG)…………… 0.1 g  
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(X-GAL)…………… 0.1 g  
4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド(MUG)…………… 0.1 g

pH 7.1 ± 0.2

### —— 使用目的 ——

水中の大腸菌および大腸菌群の検出および定量。

### —— 測定方法〈測定原理〉 ——

大腸菌：大腸菌特有の酵素β-グルクロニダーゼにより、蛍光基質（MUG）が特異的に分解され、蛍光色素（4-メチルウンベリフェロン）を遊離します。この蛍光色素の遊離を366 nmのUV(紫外線)ランプ照射下で、蛍光の有無として判定します。

大腸菌群：大腸菌群がもつ酵素β-ガラクトシダーゼにより、発色基質（X-GAL）が分解され、プロモクロロインジゴを生じ、培地が青～青緑色を呈します。この呈色を自然光下で判定します。

### ※※/※—— 操作法 ——

#### 1. ECブルー-100P…………… 100 mL定性試験用

- 1) 滅菌した培養容器を用意します。上水試験方法および上水試験方法解説編を参考に無菌的に試料を採取し、滅菌した培養容器に100 mL分取します。
- 2) 培養容器に本培地1包（滅菌済み）を無菌的に加え、ふたを閉めた後、よく攪拌して培地を完全に溶解します。
- 3) 35～37℃で24～28時間培養した後、青～青緑色の呈色、紫外線ランプ（波長366 nm）照射下での蛍光の有無を判定します。

#### 2. ECブルー-100…………… 100 mL定性試験用

- 1) 上水試験方法および上水試験方法解説編を参考に、無菌的に試料を採取し、本品1本（滅菌済み）に100 mL添加します。この際、ボトルに100 mLの秤線をつけてますので添加量の目安になります。
- 2) キャップを閉め、よく攪拌して培地を完全に溶解します。
- 3) 35～37℃で24～28時間培養した後、青～青緑色の呈色、紫外線ランプ（波長366 nm）照射下での蛍光の有無を判定します。

#### 3. ECブルー-10…………… 10 mL定量試験用

- 1) 上水試験方法および上水試験方法解説編を参考に、無菌的に試料を採取して10倍希釈系の試料を調製します。
- 2) 本品1本につき、段階希釈した試料10 mLを無菌的に添加します。ボトルに10 mLの秤線をつけてますので添加量の目安になります。
- 3) キャップを閉め、よく攪拌して培地を完全に溶解します。
- 4) 35～37℃で24～28時間培養した後、青～青緑色の呈色、紫外線ランプ（波長366 nm）照射下での蛍光の有無を判定します。

### —— 操作上の留意事項 ——

- 1) 本培地には、以下の器具等が必要です。
  - ・ふ卵器（35～37℃）
  - ・波長366 nmのUV（紫外線）ランプ
  - ・滅菌した培養容器（ECブルー-100P使用の場合）
  - ・試験管ラック（ECブルー-10使用の場合）
- 2) 試料はよく混和した上、細菌汚染に注意して無菌的に採取してください。
- 3) 培地成分が褐色化したり、固化したものは使用しないでください。
- 4) 試料を加える際に、培地成分が飛散しないように注意してください。
- 5) ECブルー-100およびECブルー-10に試料を加える際には、キャップをあらかじめ緩めてから行ってください。
- 6) 酵素基質が分解し、偽陽性となる恐れがありますので、本培地は直射日光にあてないでください。
- 7) 腸管出血性大腸菌O157:H7は、β-グルクロニダーゼを産生しないため、本培地では大腸菌としての検出はできません。

### —— 試験結果の判定法 ——

- 1) 366 nmのUV（紫外線）ランプを照射し、蛍光がECブルー比色液より強い場合は大腸菌陽性と判定してください。
- 2) 自然光下で青～青緑色の呈色がECブルー比色液より強い場合は大腸菌群陽性と判定してください。

### ※※ [判定上の留意点]

- 1) 各施設で用意された滅菌培養容器を用いて検査を行う場合（ECブルー-100P使用の場合）は、ECブルー比色液を同じ培養容器に移し替えて判定してください。
- 2) 井戸水や河川水など、従属栄養細菌が多く存在するような検体では、培養後の培地に濁りを形成する場合があります。また、硬水では白濁することがありますが、判定には支障がありません。培地の濁度によって呈色反応が見づらい場合は、培養容器の底部や培養液上面の呈色を観察すると判定が容易です。
- 3) 大腸菌群の呈色は、典型的な青～青緑色の呈色のほか、緑色や黄緑色を呈する場合があります。
- 4) 培地に青～青緑色の呈色が認められない場合でも、蛍光を示す大腸菌もまれに存在するため、呈色が認められない試験容器についても蛍光の有無を確認してください。（参考：日本水道協会「上水試験方法2020年版Ⅳ.微生物編・V.生物編」）

### —— 性能 ——

試験菌株（6菌株）を1 cfu/本になるように各10本の本培地（ECブルー-10）、乳糖バイオン、BGLB培地に接種し、24時間培養後に呈色反応（大腸菌群）の陽性本数を確認したところ結果は以下の通りでした。また、本培地については、蛍光反応（大腸菌）の陽性本数を（ ）内に示しました。

菌株名	本培地	乳糖バイオン	BGLB培地
<i>E.coli</i> ATCC 11775	10 (10)	7	6
<i>C.freundii</i> ATCC 8090	10 (0)	9	1
<i>E.cloacae</i> ATCC 13047	4 (0)	0	0
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 13883	7 (0)	3	0
<i>A.hydrophila</i> JCM 1027	0 (0)	0	0
<i>R.aquatilis</i> JCM 1683	7 (0)	1	0

### —— 使用上または取扱い上の注意事項 ——

#### 1. 一般的な注意事項

- 1) この添付文書をよく読み、記載された操作法に従って使用してください。
- 2) 容器が破損したものと異物が混入したものは使用しないでください。
- 3) 使用期限が過ぎたものは、品質を保証できませんので使用しないでください。
- 4) ケースから取り出したときに、光の影響により顆粒培地の色調が変化することがありますが性能上問題はありません。

#### 2. 危険防止上の注意事項

微生物の取扱いは常に感染の危険がありますので、取扱いにあたっては熟練した人の指導のもとに、バイオハザード対策を実施した上で使用してください。

#### 3. 廃棄上の注意事項

使用後の培地・容器・器材等はオートクレーブ等で滅菌処理したのち、廃棄物に関する規定に従って処理してください。

### ※—— 貯法・使用期限 ——

#### 【貯法】

遮光して室温に保存。

#### 【使用期限】

ECブルー-100P 製造後2年間  
ECブルー-100 製造後2年間  
ECブルー-10 製造後1年間

### ※※/※—— 包装 ——

ECブルー-100P 100 mL用 × 80 包…………… Code 05592  
ECブルー-100 100 mL用 × 80 本…………… Code 05593  
ECブルー-10 10 mL用 × 150 本…………… Code 05613

#### 【別売関連製品】

ECブルー-100 比色液Ⅱ 100 mL用 × 1 本…………… Code 06514  
ECブルー-10 比色液 10 mL用 × 1 本…………… Code 06516

貯法：遮光して冷蔵（4～10℃）保存。

使用期限：製造後1年間。

### ※—— お問い合わせ先 ——

〒110-0005 東京都台東区上野3-24-6  
島津ダイアグノスティクス株式会社 カスタマーサポート担当  
電話：03(5846)5707

### ※製造販売元

## 島津ダイアグノスティクス 株式会社

東京都台東区上野3-24-6 〒110-0005 TEL 03(5846)5611(代)  
(SY3G23)

Test for *Escherichia coli* and Coliforms in water  
Specific Enzyme Substrate Culture Medium Method  
(Xgal method / Xgal-MUG medium with Sodium Pyruvate)

**\* EC Blue 100P**  
**EC Blue 100**  
**EC Blue 10**

**\*\* Background**

Both The Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) in 2003 and Japan Water Works Association (JWWA) in 2001 officially approved EC Blue as one of the official methods for detection of *Escherichia coli* and Coliforms in water. EC Blue was developed based on the Specific Enzyme Substrate Culture Medium Method that is used specific enzyme substrate for detection of *E. coli* and Coliforms in water.

Colorimetric enzyme substrate, Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) in the medium is decomposed to bring out Blue/Blue-Green color by  $\beta$ -galactosidase specifically generated by coliforms. Also MUG (4-Methyl-Umbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronide) in the medium is decomposed by  $\beta$ -Glucuronidase that *E. coli* generates specifically, to isolate a fluorescence substrate of 4-Methyl-Umbelliferone.

EC Blue series are packed into aluminum stick pouch (EC Blue 100P), a disposable bottle (EC Blue 100) or a disposable tube (EC Blue 10). These packages are sterilized by electron irradiation; therefore preparation of medium is not necessary. Test procedure of EC Blue 100P is very simple that only add it into test sample. Also test procedure of EC Blue 100 and 10 is simple that add sample water into these bottles (tubes).

**Features**

- 1) One medium can detect both *E. coli* and Coliforms sensitively.
- 2) It can confirm *E. coli* and Coliforms without any additional test.
- 3) Preparation and sterilization of medium are not necessary. Operation and judgment is very simple.
- 4) It can be judged after 24 hours incubation.
- 5) Medium is granule and easy to dissolve in water.
- 6) It is easy to confirm *E. coli* because special bottle without generating fluorescence is used (EC Blue 100 and 10).
- 7) It is selectable from 3 different types of package according to test purpose.

**\* Kit Composition**

**\*\* EC Blue 100P**

Sterilized granule medium in aluminum stick pouch ···· For 100 mL (1.74 g) × 80 pouches

Granule medium is packed into aluminum stick pouch and sterilized by electron irradiation; therefore preparation of medium is not necessary. A sterilized container for testing is necessary separately.

**EC Blue 100**

Sterilized granule medium in the bottle ······ For 100 mL (1.74 g) × 80 bottles

Granule medium is packed in special disposable bottle and sterilized by electron irradiation; therefore there is no need of medium preparation and a sterilized container.

**EC Blue 10**

Sterilized granule medium in the tube ···· For 10 mL (0.17 g) × 150 tubes

Granule medium is packed in special disposable tube and sterilized by electron irradiation; therefore there is no need of medium preparation and a sterilized container.

**Composition of the medium** For 1 liter = 17.4 g

Peptone ······	5.0 g
Sodium chloride ······	5.0 g
Monopotassium phosphate ······	1.0 g
Dipotassium phosphate ······	4.0 g
Sodium lauryl sulfate ······	0.1 g
Sodium pyruvate ······	1.0 g
Potassium nitrate ······	1.0 g
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) ······	0.1 g
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (Xgal) ······	0.1 g
4-Methyl-Umbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG) ······	0.1 g
	pH 7.1 ± 0.2

**Purpose of Test**

Detection of *E. coli* and Coliforms in water (EC Blue 100 and 100P), Quantitative test (MPN) of *E. coli* and Coliforms in water (EC Blue 10)

**Detection Principle**

**Coliforms** : Colorimetric enzyme substrate, Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) in the medium is decomposed to bring out Blue/Blue-Green color by  $\beta$ -galactosidase specifically generated by coliforms. Result is judged under natural light.

***E. coli*** : MUG (4-Methyl-Umbelliferyl- $\beta$ -D-Glucuronide) in the medium is decomposed by  $\beta$ -glucuronidase that *E. coli* generates specifically, to isolate a fluorescence substrate of 4-Methyl-Umbelliferone that fluorescent under UV lamp (366 nm).

**\*\* Operating Procedure**

**1. EC Blue 100P ······ For 100 mL qualitative test**

- 1) Prepare sterilized culture tube (bottle) . Dispense 100 mL of clean caught specimen from collection bottle into sterilized culture tube (bottle).
- 2) Add one pouch of EC Blue 100P into the culture tube (bottle). Tighten the cap and well swirl for dissolving the medium in water sample.
- 3) Judge color change (Blue - Blue Green) of the medium after 24-28 hours incubation at 35 - 37°C. Check fluorescence under 366 nm UV lamp (for detection of *E. coli*).

**2. EC Blue 100 ······ For 100 mL qualitative test**

- 1) Prepare EC Blue 100 (bottle) and dispense 100mL of test sample into the bottle under sterilized condition. The bottle is graduated in 100 mL mark on circumference.
- 2) Tighten the cap and well swirl for dissolving the medium in water sample.
- 3) Judge color change (Blue - Blue Green) of the medium after 24-28 hours incubation at 35 - 37°C. Check fluorescence under 366 nm UV lamp (for detection of *E. coli*).

**3. EC Blue 10 ······ For 10 mL quantitative (MPN) test**

- 1) Prepare 10-fold dilution series aseptically (refer to MPN method in the official documents issued).
- 2) Dispense diluted 10 mL sample in each tube. The tube is graduated in 10 mL mark on circumference.
- 3) Tighten the cap and well swirl for dissolving the medium in water sample.
- 4) Judge color change (Blue - Blue Green) of the medium after 24-28 hours incubation at 35 - 37°C. Check fluorescence under 366 nm UV lamp (for detection of *E. coli*).

**Precaution for use**

- 1) Preparation of Apparatus and Materials
  - Incubator (35 - 37°C)
  - UV lamp (366 nm)
  - Sterilized culture tube or bottle (for EC Blue 100P)
  - Tube rack (for EC Blue 10)
- 2) Be careful to avoid any contamination and collect specimen aseptically.
- 3) Do not use the product when medium color is changed to brown or medium becomes solidified.
- 4) Be careful to avoid any scattering of medium when add or dispense specimen into the tube or the bottle.
- 5) When dispense the specimen into EC Blue 100 or EC Blue 10, unscrewed the cap of bottle or tube beforehand.
- 6) Keep the products away from direct sunlight, because colorimetric enzyme substrate may be decomposed by sunlight and it may give false positive result.
- 7) *E. coli* O-157 cannot be detected as *E. coli* by EC Blue series, because *E. coli* O-157 does not generate  $\beta$ -Glucuronidase.

**Interpretation**

- 1) For *E. coli*: When confirm Blue-Blue Green color change; check fluorescence additionally under 366nm UV lamp. If fluorescence of the sample is stronger than EC Blue comparator under 366nm UV lamp, determine the test result as "*E. coli* positive".
- 2) For Coliforms: If color of cultured medium (Blue - Blue Green) is darker than EC Blue color comparator under natural light, determine the test result as "Coliforms positive".

**\*\* Precaution for interpretation**

- 1) In case a sterilized culture tube (bottle) is used for the test (EC Blue 100P users), EC Blue color comparator recommended to transfer into the same culture tube (bottle) for judgment of the test result.
- 2) In case well water and / or river water that containing many heterotrophic bacteria is tested, cultured medium after incubation might be turbid. Also hard water might be turbid, but it may not be interfere judgment. In case there are some difficulties to read color reaction, observe the bottom of culture tube (bottle) or top surface of the medium for judgment.
- 3) Color change of coliform are typically Blue - Blue Green, but in some cases, medium will be colored to Green or Yellow Green by some Coliforms.
- 4) Check fluorescence even if there is no color change (Blue-Blue Green) of the medium. Because some rare *E. coli* show only fluorescence.

**Performance**

Inoculate 6 tested strains into 10 tubes of EC Blue 10, LB and BGLB media with 1cfu/tube. Test result (color change) after 24 hours incubation is listed on the right. (For Coliforms detection)

Also fluorescence of those media is indicated in brackets (For *E. coli* detection, EC Blue only).

Name of tested strains	EC Blue	LB	BGLB
<i>E. coli</i> ATCC 11775	10 (10)	7	6
<i>C. freundii</i> ATCC 8090	10 (0)	9	1
<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	4 (0)	0	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	7 (0)	3	0
<i>A. hydrophila</i> JCM 1027	0 (0)	0	0
<i>R. aquatilis</i> JCM 1683	7 (0)	1	0

**Warning and Direction for use**

**1. General Precautions**

- 1) Read and follow precisely warning and direction for use described on this package insert and /or label.
- 2) Do not use this product that contains any foreign materials or particle caused by damaged container.
- 3) Do not use the product after its expiry date. Quality of the product is not warranted after its expiry date.
- 4) After opening the case, color of granule medium may be changed by effectiveness of lights. Performance of EC Blue is not be influenced by this medium color change.

**2. Precautions for danger**

- 1) When if medium or reagent touched eyes or mouths, immediately wash with plenty of water, and consult a physician.
- 2) Manipulations with microorganisms involve always certain risks of laboratory-acquired infections. Manipulations should be practiced under the supervision of key specialist with biohazard protection measures.
- 3) Any laboratory equipment and test reagent, medium that touched with specimen should be regarded as infectious in the laboratory.

**3. Precautions for disposal of waste**

Any media, reagents and materials used must be sterilized by autoclaving or boiling in water. Also dispose these waste as industrial or medical waste according to the local laws and regulations related to dispose.

**\* 4. Limitation of Warranties**

If EC Blue has proven to defective, Shimadzu Diagnostics or Shimadzu Diagnostics's authorized distributor will replace or refund at the purchase price of the product.

**\* Storage and Shelf life**

**Storage**

Keep at Room Temperature (1 -30°C), in dark

**Shelf life**

EC Blue 100P	Two (2) years after manufacturing
EC Blue 100	Two (2) years after manufacturing
EC Blue 10	One (1) year after manufacturing

**\*\* Package**

EC Blue 100P For 100 mL × 80 pouches ······	<a href="#">Code 05592</a>
EC Blue 100 For 100 mL × 80 bottles ······	<a href="#">Code 05593</a>
EC Blue 10 For 10 mL × 150 tubes ······	<a href="#">Code 05613</a>

**\* Related products**

EC Blue 100 color comparator II For 100 mL × 1 bottle ····	<a href="#">Code 06514</a>
EC Blue 10 color comparator For 10 mL × 1 tube ······	<a href="#">Code 06516</a>

Storage: Keep at 4 -10°C, light shielding  
Shelf life: One (1) year after manufacturing

**\* Further information**

Customer Support Section,  
Shimadzu Diagnostics Corporation  
3-24-6, Ueno, Taito-ku, Tokyo 110-0005 Japan  
TEL: +81-3-5846-5707  
contact@sdc.shimadzu.co.jp

\* Manufactured by

**Shimadzu Diagnostics Corporation**

3-24-6, Ueno, Taito-ku, Tokyo 110-0005, Japan

\*\* Revised: July 2023  
\*\* Revised: April 2023  
(SY3G23)