

デソキシコーレイト寒天培地及び BGLB 発酵管を用いた 大腸菌群定量試験法の比較

吉野典孝 千葉雄介 大塚佳代子 藤原茜 鹿島かおり 島田慎一

Comparison of desoxycholate agar with BGLB medium for quantitative coliforms method

Noritaka Yoshino, Yusuke Chiba, Kayoko Otsuka, Akane Fujiwara, Kaori Kashima, Shin-ichi Shimada

はじめに

埼玉県では、野菜を原因食品とした腸管出血性大腸菌食中毒が過去2年間で2件発生している¹⁾。これを受け、保健所から生食用野菜の大腸菌群汚染実態を把握するための大腸菌群定量試験の依頼があった。我々は食品衛生法に基づく「食品、添加物等の規格基準」²⁾に規定されているデソキシコーレイト寒天培地を用いた大腸菌群定性試験法を参考に大腸菌群定量試験を行ってきた。

デソキシコーレイト寒天培地は集落の色によって大腸菌群を判定するため、発育した集落の色が不明瞭な場合には判定に苦慮することが多い。一方、BGLB発酵管はガス発生の有無によって大腸菌群を判定するため、BGLB発酵管を用いることで判定が容易になると考えた。

今回、デソキシコーレイト寒天培地を用いた大腸菌群定量試験法を計数法、BGLB発酵管を用いた大腸菌群定量試験法を最確数法として、菌株及び生食用野菜等を用いて両試験法を比較した。

試験方法

1 大腸菌群菌株を用いた検討

(1) 菌液の調製

Escherichia coli, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia liquefaciens* を Trypticase Soy Broth (TSB 培地) で一夜培養後、その培養液をリン酸緩衝液 (PB) で希釈し、菌数を 10^3 cfu/mL 程度に調製したものを菌原液とした。さらに菌原液を PB により $10 \sim 10^4$ 倍希釈した希釈液を以下の試験に用いた。

(2) 大腸菌群定量試験

1) 計数法

菌原液の $10 \sim 10^4$ 倍希釈液各 1 mL を滅菌シャーレ各 2 枚に接種し、デソキシコーレイト寒天培地を約 15 mL 加え、混釈、重層し、 35°C で 20 時間培養後、暗赤色の定型的集落数を計測した。

2) 最確数法

菌原液の $10^2 \sim 10^4$ 倍希釈液各 1 mL を BGLB 発酵管各 3 本

に接種し、 35°C で 48 時間培養後、ガス発生の有無を確認した。

3) 大腸菌群数の算定

計数法は計測した集落数を大腸菌群数 (cfu/mL) とした。最確数法はガス発生が認められた BGLB 発酵管数について、最確数表により算出された係数に 10 倍したものを大腸菌群数 (cfu/mL) とした。

(3) 生菌数の測定

菌原液の $10 \sim 10^4$ 倍希釈液各 1 mL を滅菌シャーレ各 2 枚に接種し、標準寒天培地で混釈し、 35°C で 20 時間培養後、集落数を計測した。

2 生食用野菜等を用いた検討

生食用野菜等の試験法の手順を図1に示した。

(1) 供試検体

せん切りキャベツ (3 検体), ロメインレタスマックス

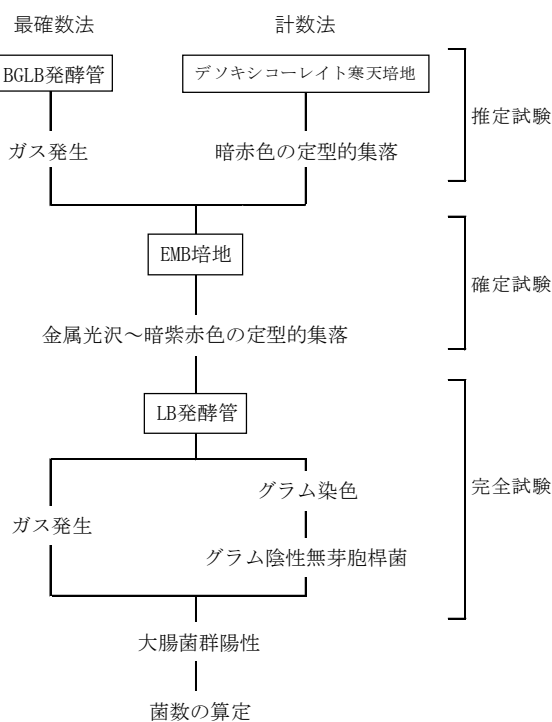


図1 生食用野菜等の試験法の手順

(2 検体), オニオンサラダ (2 検体), コールスローサラダ, サーモン生春巻, エビ生春巻, ラップサンド (照り焼きチキンと卵サラダ) 及びラップサンド (バジルとチキン) の計 12 検体を供試した.

(2) 試料液の調製

検体 25 g と PB225 mL を滅菌ストマッカー袋にとり, 1 分間ストマッキングし, これを試料液とした. さらに試料液を PB により $10 \sim 10^4$ 倍希釈した希釈液を以下の試験に用いた.

(3) 推定試験

1 (2) 大腸菌群定量試験 1) 計数法及び 2) 最確数法と同様の方法で行った.

(4) 確定試験

デソキシコーレイト寒天培地は計測した集落のうち代表的な集落を 5 つ, BGLB 発酵管はガス発生を認めたものを EMB 寒天培地に塗抹し, 35°C で 24 時間培養した.

(5) 完全試験

EMB 培地における金属光沢〜暗紫赤色の集落を乳糖ブイヨン発酵管 (LB 発酵管) に移植し 35°C で 48 時間培養後, ガス発生の有無を確認した. また, グラム染色を実施し, グラム陰性無芽胞桿菌であり, ガス発生を認めたものを大腸菌群陽性とした.

(6) 大腸菌群数の算定

計数法は完全試験によって大腸菌群と判定した集落の割合をデソキシコーレイト寒天培地に発育した暗赤色集落数に乘じ, 得られた値を大腸菌群数 (cfu/g) とした. 最確数法は完全試験により大腸菌群陽性となった BGLB 発酵管数について 1 (2) 大腸菌群定量試験 3) 大腸菌群数の算定と同様の方法で算定し, 大腸菌群数 (cfu/g) とした.

3 BGLB 発酵管及び LB 発酵管のガス産生性の比較

計数法により検出し, ID テスト (日水製薬) により同定した大腸菌群 11 菌株 (*C. freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Kluyvera ascorbata* を各 1 株, *S. liquefaciens*, *Rahnella aquatilis*, *Klebsiella pneumoniae* を各 2 株) を供試した. 各菌株を TSB 培地で, 35°C で一夜培養後, BGLB 発酵管及び LB 発酵管に接種した. 接種後 35°C で 48 時間培養し, ガス産生性を確認した.

結果

1 大腸菌群菌株を用いた検討

大腸菌群検出能力を比較するとともに, 培地成分による発育阻害の有無を確認するため, 大腸菌群菌株について計数法及び最確数法とあわせて生菌数の計測を実施した.

各定量法によって得られた大腸菌群数及び生菌数を表 1 に示した.

E. coli 及び *K. oxytoca* は計数法, 最確数法及び生菌数でそれぞれ $1.3 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^3$ cfu/mL, $2.4 \times 10^3 \sim 4.9 \times 10^3$ cfu/mL と同様の値を示した.

表1 各定量法によって得られた大腸菌群数及び生菌数

菌名	計数法 (cfu/mL)	最確数法 (cfu/mL)	生菌数 (cfu/mL)
<i>E. coli</i>	1.5×10^3	4.6×10^3	1.3×10^3
<i>K. oxytoca</i>	4.7×10^3	2.4×10^3	4.9×10^3
<i>C. freundii</i>	6.3×10^3	1.5×10^2	5.6×10^3
<i>E. cloacae</i>	1.1×10^4	2.1×10^2	1.5×10^4
<i>S. liquefaciens</i>	5.6×10^3	ND	7.0×10^3

ND: 不検出

C. freundii は計数法で 6.3×10^3 cfu/mL, 生菌数で 5.6×10^3 cfu/mL に対して最確数法で 1.5×10^2 cfu/mL, *E. cloacae* は計数法で 1.1×10^4 cfu/mL, 生菌数で 1.5×10^4 cfu/mL に対して最確数法で 2.1×10^2 cfu/mL であり, 最確数法の値が計数法及び生菌数と比較して少なかった. また, *S. liquefaciens* においては計数法で 5.6×10^3 cfu/mL, 生菌数で 7.0×10^3 cfu/mL であったが, 最確数法では不検出であった.

2 生食用野菜等を用いた検討

計数法及び最確数法によって得た生食用野菜等の大腸菌群数を表 2 に示した.

計数法では 9 検体で大腸菌群を検出し, No. 7 の 6.6×10^4 cfu/g が最も多く, No. 9 の 2.9×10^2 cfu/g が最も少なかった. 最確数法では 7 検体で大腸菌群を検出し, No. 7 の 4.6×10^3 cfu/g が最も多く, No. 2 及び No. 3 の 3.6×10^1 cfu/g が最も少なかった. 計数法及び最確数法の両方で大腸菌群を検出した 6 検体のうち 4 検体は, 計数法で最確数法の大腸菌群数の約 10 倍以上の値を示し, 最も値の差が大きかった No. 6 は 63 倍であった. 計数法でのみ大腸菌群を検出した検体は, No. 9, No. 11 及び No. 12 の 3 検体であった. また, No. 8 はデソキシコーレイト寒天培地及び BGLB 発酵管ともに発育しなかった.

計数法でデソキシコーレイト寒天培地に発育した暗赤色集落のうち, 完全試験の LB 発酵管でガス発生が認められた割合が 50% 以下の検体は 4 検体あった. 一方, 最確数法は BGLB 発酵管でガス発生を認めたものすべてが LB 発酵管でガス発生を認め, 大腸菌群と判定した.

3 BGLB 発酵管及び LB 発酵管のガス産生性の比較

計数法により検出した大腸菌群菌株の BGLB 発酵管と LB 発酵管におけるガス産生性について表 3 に示した.

大腸菌群 11 菌株のうち 7 菌株は BGLB 発酵管, LB 発酵管ともにガス発生を認めた. *S. liquefaciens* 及び *R. aquatilis* の 2 株中 1 株, *C. amalonaticus*, *E. cloacae* では BGLB 発酵管でガス発生を認めず, LB 発酵管でガス発生を認めた.

考察

大腸菌群菌株を用いた検討において, 計数法で得た大腸菌群数は生菌数と大きな差が認められなかったことから, 本検討で用いた大腸菌群菌株はデソキシコーレイト寒天培地の成分による発育阻害を受けずに発育したと考えられた.

表2 各定量法によって得られた生食用野菜等の大腸菌群数

No.	検体名	計数法 (cfu/g)	最確数法 (cfu/g)	判定率※	
				計数法	最確数法
1	せん切りキャベツ	1.9 × 10 ³	9.3 × 10 ²	20%	100%
2	せん切りキャベツ	ND	3.6 × 10 ¹	0%	100%
3	ロメインレタスマックス	3.0 × 10 ²	3.6 × 10 ¹	80%	100%
4	オニオンサラダ	2.7 × 10 ⁴	2.4 × 10 ³	60%	100%
5	コールスローサラダ	6.6 × 10 ²	2.3 × 10 ²	60%	100%
6	サーモン生春巻	2.7 × 10 ⁴	4.3 × 10 ²	100%	100%
7	エビ生春巻	6.6 × 10 ⁴	4.6 × 10 ³	100%	100%
8	せん切りキャベツ	ND	ND	-	-
9	ロメインレタスマックス	2.9 × 10 ²	ND	40%	-
10	オニオンサラダ	ND	ND	0%	-
11	ラップサンド(照り焼きチキンとタマゴサラダ)	6.2 × 10 ³	ND	100%	-
12	ラップサンド(バジルとチキン)	1.8 × 10 ⁴	ND	100%	-

ND : 不検出
 - : 対象検体無し
 ※ : 完全試験陽性 / 推定試験陽性

表3 BGLB発酵管とLB発酵管のガス産生性

No.	菌名	BGLB発酵管	LB発酵管
1	<i>C. freundii</i>	+	+
2	<i>C. amalonaticus</i>	-	+
3	<i>E. aerogenes</i>	+	+
4	<i>E. cloacae</i>	-	+
5	<i>K. ascorbata</i>	+	+
6	<i>S. liquefaciens</i>	+	+
7	<i>S. liquefaciens</i>	-	+
8	<i>R. aquatilis</i>	-	+
9	<i>R. aquatilis</i>	+	+
10	<i>K. pneumoniae</i>	+	+
11	<i>K. pneumoniae</i>	+	+

最確数法においては *E. coli* 及び *K. oxytoca* で計数法及び生菌数とほぼ同じ菌数であったが、*C. freundii* 及び *E. cloacae* は計数法及び生菌数と比べて大腸菌群数が少なく、*S. liquefaciens* は検出されなかった。最確数法は菌種によって BGLB 発酵管のガス発生に差が認められたことから、大腸菌群検出能力に差があると推察された。

生食用野菜等を用いた検討において、最確数法は計数法と比べて大腸菌群数を少なく検出する傾向が認められた。最確数法は大腸菌群菌株を用いた検討と同様に菌種ごとの大腸菌群検出能力に差が生じ、結果として計数法と比較して大腸菌群数が少なくなったと考えられた。

また、デソキシコーレイト寒天培地に発育した暗赤色集落のうち、完全試験の LB 発酵管で陰性となる集落を複数認めた。一方、BGLB 発酵管でガス発生を認めたものはすべて大腸菌群陽性であったことから、BGLB 発酵管でガスを産生する大腸菌群は LB 発酵管においてもガスを産生すると考えられる。

今回、計数法において 12 検体中 9 検体で大腸菌群陽性であり、計数法及び最確数法で 3.6 × 10¹ ~ 6.6 × 10⁴ cfu/g

の大腸菌群を検出した。東京都では、サラダ等未加熱そうざいの大腸菌群数について、「一斉収去検査に基づく措置基準」³⁾として 3000 cfu/g を超えるものと定めており、この基準を 12 検体中 5 検体が超過していた。達ら⁴⁾が実施した市販野菜サラダの大腸菌群数検査において、デソキシコーレイト寒天培地で大腸菌群を検出した検体数が 100 検体中 82 検体と、高い陽性率であった。また、大腸菌群数についても 1.0 × 10³ cfu/g 以上検出された検体が 39 検体であった。これらのことから、生食用野菜は大腸菌群に汚染されている割合が高いと推察された。

ガス産生性の比較において、No. 6, 7 の *S. liquefaciens* 及び No. 8, 9 の *R. aquatilis* は BGLB 発酵管でガス産生試験の結果が異なったことから、ガス産生能が一律でない大腸菌群が存在することを確認した。LB 発酵管においても、同一菌種でガス産生能が一律でないもの⁵⁾が報告されており、大腸菌群のガス産生能によって計数法及び最確数法の大腸菌群数に影響が出ることが示唆された。また、栄養豊富な LB 発酵管では大腸菌群の発育が良く、ガス産生能が高くなるという報告がある^{6,7)}。BGLB 発酵管及び LB 発酵管で異なる栄養成分として肉エキスがあり、BGLB 発酵管は含有していないが、LB 発酵管は含有している。このことから、肉エキスの有無がガス産生試験の結果に影響を与えたと考えられる。

本検討で BGLB 発酵管と LB 発酵管でガス発生の有無が異なった *C. amalonaticus*, *E. cloacae*, *R. aquatilis* は、上田らによると同一菌種で LB 発酵管における性状、ガス発生の有無が異なる、あるいはガス発生がない菌種であった⁵⁾。このことから、同じ菌種であってもガス産生能が異なる菌株が存在し、BGLB 発酵管を用いる最確数法はガス産生能の差が検査結果に影響を与えることが示唆された。

以上から、最確数法は BGLB 発酵管でガス産生能のない大腸菌群の検出が難しく、多種類の大腸菌群が存在する食

品等において定量試験を行うことは難しいと思われる。そのため、幅広く大腸菌群を検出するには計数法が適切であると考えられる。

参考文献

- 1) 厚生労働省 4. 食中毒統計資料
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html, 2019年7月19日参照
- 2) 昭和34年12月28日厚生省告示第370号（最終改正：平成29年7月19日厚生労働省告示第252号）「食品、添加物等の規格基準」
- 3) 東京都福祉保健局：食品衛生関係事業報告平成29年版 保健所における監視指導事業
http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/foods_archives/publications/foodDygiene/index.html, 2019年7月19日参照
- 4) 遠牧子, 内川輝美, 森末裕希, 他：市販野菜サラダの細菌汚染状況及び発酵酵素基質法による大腸菌群・大腸菌群数検査法の評価. 日本調理科学会誌, 41, 344-347, 2008
- 5) 上田修, 鈴木敦子, 松江隆之, 他：水質検査における酵素気質培地の適用と本培地により検出された大腸菌群の菌種の検討. 食品微生物学会雑誌, 20(3), 111-116, 2003
- 6) 須藤貴之, 諸藤圭, 齋藤明美, 他：大腸菌群試験法～完全試験に用いる乳糖ブイヨン発酵管について～. 第33回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 84, 2012
- 7) 坂田恭平, 古井悠賀, 田村彩, 他：組成の異なる完全試験用乳糖ブイヨン発酵管の比較. 第31回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会・研究会抄録, 11-12, 2019