

## 5. 大腸菌群検査法について

【微生物科】

戎谷 佐知子・田川 陽子・川本 歩  
木村 優子・本田 達之助

### 1. はじめに

環境衛生および食品衛生の分野では、糞便による汚染指標菌として大腸菌群を用いている。大腸菌群は乳糖を発酵してガスを産生するグラム陰性無芽胞の通性嫌気性桿菌と定義され、多種類の菌により構成されている。大腸菌群の検査法として、公定法ではBGLB培地によるブイヨン法、デソキシコレート寒天による平板法が用いられているが検査担当者の主観が入りやすく、判定に個人差がみられる。

そこで、当所分離した大腸菌群をこの二法により検査し、菌属による比較を行ったので報告する。

### 2. 材 料

1995年6月～9月の間に湖沼、海域、河川の検体から分離した12菌属235株の大腸菌群のうち5菌属127株を用いた。

### 3. 方 法

#### 1) 大腸菌群の分離同定

検体を適宜10倍段階希釈し、各希釈の1 mlを10 mlのBGLB培地に接種、37℃、48時間培養後ガスを産生したものを陽性とした。陽性検体をEMB培地に画線し、37℃、24時間培養後、集落形態別に2～3個ずつ釣菌し、同定を行った。生化学的性状テストはブドウ糖発酵性グラム陰性桿菌同定システム（IDテスト・EB-20：日水製薬）を使用した。

#### 2) 菌液の調製

保存菌株をBrain heart infusion brothに培養後30～300個/mlとなるように減菌生理食塩水で希

釈した。

#### 3) 5菌属の単独培養

37℃48時間培養後、ダーラム管内のガス産生量を測定した。また、各菌液1 mlをデソキシコレート寒天で混釈培養し、37℃、24時間培養後、コロニーの直径と色調とを観察した。

#### 4) 5菌属の代表的な株の混合培養

*Escherichia coli* (以下 *E. coli* と略) の代表的な株について調製した30～300個/mlの菌液と *Klebsiella pneumoniae* (以下 *K. pneumoniae* と略)、*Enterobacter cloacae* (以下 *E. cloacae* と略) *Serratia marcescens* (以下 *S. marcescens* と略)、および *Citrobacter freundii* (以下 *C. freundii* と略) の代表的な株について30～300個/mlに調製した菌液とを混和して3)と同様に培養した。

#### 5) BGLB 培地におけるガス産生株とガス非産生株との混合培養

*E. coli* (ガス産生株) と *S. marcescens* (ガス非産生株) の代表的な株について、接種菌量(個/ml)が $10^2$ と $10^2$ 、 $10^2$ と $10^4$ および $10^4$ と $10^2$ の組み合わせになるように菌液を調製し、3)と同様に培養した。

なお、調製した菌液は1 mlを標準寒天で混釈培養し、37℃、24時間培養後30～300個/mlとなったものを用いた。

### 4 結果および考察

1) 湖沼、海域、河川の検体から12菌属235株の大腸菌群を分離した。

特に多く分離されたのは、*Escherichia*、*Klebsiella*、*Enterobacter*、*Serratia*、*Citrobacter* の5菌属127株であった。(Fig 1)

Fig 1 大腸菌群の分離状況

大腸菌群	株数	分離率(%)
Klebsiella	50	21.3
Enterobacter	40	17.0
Serratia	25	10.6
Citrobacter	6	2.6
Escherichia	6	2.6
Hafnia	4	1.7
Rahnella	3	1.3
Cedecea	1	0.4
Morganella	1	0.4
Providencia	1	0.4
Salmonella	1	0.4
Aeromonas	4	1.7
その他(未同定を含む)	93	39.6
合計	235	100

2) *Escherichia* をはじめとする 5 菌属は、BGLB 培地でのガス産生性が高かったが、*Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* の中には、ガスを産生しない株があった。

また、デソキシコーレイト寒天では *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* は直径 1 mm 以上のコロニーを形成したが、*Enterobacter*, *Serratia* は直径 1 mm 未満のコロニーであった。(Fig 2, 3)

3) *Escherichia* をはじめとする 5 菌属の代表的な株の混合培養を行ったところ、BGLB 培地におけるガス産生量は、単独で培養したときと大差がなかった。

また、デソキシコーレイト寒天で形成されるコロニーの直径についても単独で培養したときと大差がなかった。(Fig 4, 5)

4) BGLB 培地におけるガス産生株とガス非産生株との混合培養を行ったところ、接種菌量 (個/ml) が  $10^2$  と  $10^2$ ,  $10^2$  と  $10^4$  および  $10^4$  と  $10^2$  の組み合わせでは、全てガスの産生が認められた。(Fig 6)

5) 大腸菌群の検査を行う際に、BGLB 培地で培養後、ダーラム管内のガス量がダーラム管の高さにして 5 mm 未満ないしは以上であるか、また、デ

Fig 2 BGLB培地におけるガス産生量 (ガス産生株/被検株 %)

大腸菌群	< 5 mm	5 mm ≤
Escherichia	0	100
Klebsiella	0	100
Enterobacter	8	92
Serratia	12	88
Citrobacter	33	67

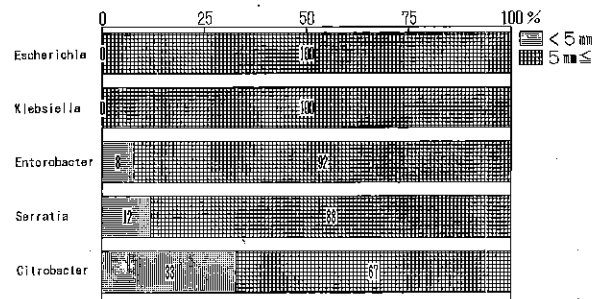
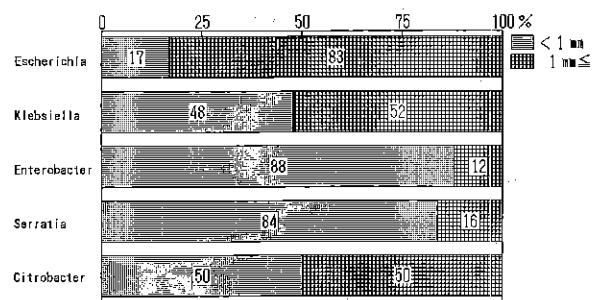


Fig 3 デソキシコーレイト寒天におけるコロニーの直径 (コロニー形成株/被検株 %)

大腸菌群	< 1 mm	1 mm ≤
Escherichia	17	83
Klebsiella	48	52
Enterobacter	88	12
Serratia	84	16
Citrobacter	50	50



ソキシコーレイト寒天で培養後、コロニーの直径が 1 mm ないしは以上であるか、ということは一ひとつの指標となると考えられる。しかし、ガスを産生しない大腸菌群や、デソキシコーレイト寒天で極微小なコロニーを形成する大腸菌群が存在するので、このことを考慮にいれなければならない。

## 5. まとめ

1) 湖沼、海域、河川の検体から 12 菌属 235 株の

Fig 4 BGLB培地におけるガス産生量（ガス産生株／被検株 %）

大腸菌群	< 5 mm	5 mm ≤
A	0	100
B	0	100
A+B	0	100
A	0	100
C	8	92
A+C	0	100
A	0	100
D	12	88
A+D	0	100
A	0	100
E	25	75
A+E	0	100

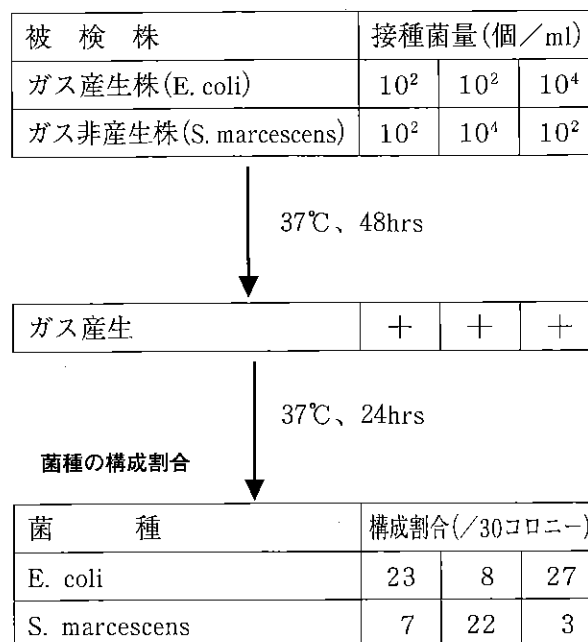
- A Escherichia coli (6K101)  
 B Klebsiella pneumoniae (6K103)  
 C Enterobacter cloacae (811901)  
 D Serratia marcescens (61201)  
 E Citrobacter freundii (6K102)

Fig 5 デンキシコーライト寒天におけるコロニーの直径（コロニー形成株／被検株 %）

大腸菌群	< 5 mm	5 mm ≤
A	100	0
B	0	100
A+B	100	0
A	100	0
C	100	0
A+C	100	0
A	100	0
D	100	0
A+D	86	14
A	100	0
E	0	100
A+E	0	100

- A Escherichia coli (6K101)  
 B Klebsiella pneumoniae (6K103)  
 C Enterobacter cloacae (811901)  
 D Serratia marcescens (61201)  
 E Citrobacter freundii (6K102)

Fig 6 ガス産生株とガス非産生株との混合培養  
接種菌量の組み合わせ



大腸菌群を分離した。

2) 大腸菌群の検査を行う際に、BGLB培地で培養後、ダーラム管内のガス量がダーラム管の高さにして5mm未満ないしは以上であるか、また、デソキシコーライト寒天で培養後、コロニーの直径が1mm未満ないしは以上であるか、ということはひとつの指標となると考えられる。

## 6. 文 献

- 1) 坂崎利一：細菌分類学と食品微生物学. 日食衛誌. 11, 1～7 (1994)
- 2) 寺本忠司, 坂崎利一：食品及び環境材料から分離されたいわゆる大腸菌群の分類学的解析. 食衛誌. 25, 322～328 (1984)