= 調 査 =

各種大腸菌群検査用培地から検出される 菌の同定とその比較

中村 寛海^{*1, †}・小笠原 準^{*1}・安 福 潔^{*2}・有川健太郎^{*1, 3}
大山み乃り^{*1, 4}・阿部仁一郎^{*1}・長 谷 篤^{*1}

(^{*1} 大阪市立環境科学研究所, ^{*2} 大阪市保健所, ^{*3} 現 神戸市環境保健研究所,

^{*4} 現 沖縄県北部食肉衛生検査所)

(受付: 平成24年3月26日)

(受理: 平成24年6月21日)

Identification and Comparison of Isolates from Several Coliform Group Detection Agar Medium

Hiromi NAKAMURA^{*1, †}, Jun OGASAWARA^{*1}, Kiyoshi YASUFUKU^{*2},
Kentaro ARIKAWA^{*1, 3}, Minori OHYAMA^{*1},
Niichiro ABE^{*1} and Atsushi HASE^{*1}

(^{*1} Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences,

Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026; [†]Corresponding author)

(^{*2} Public and Welfare Centers in Osaka City, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-0051)

(^{*3} Kobe Institute of Health, Minatojima-Nakamachi, Chuo-ku, Kobe 650-0046)

(^{*4} Okinawa Prefectural Meat Inspection Office, Ominami, Nago, Okinawa 905-0015)

緒 言

食品の安全性を確保するために、食品中に存在する病原菌の存在を知ることは重要であるが、日常検査ですべての食中毒菌について調べるのは実用的ではない。大腸菌群および糞便系大腸菌群 (*E. coli*) は、食品の安全性を評価するための代表的な衛生指標菌であり、食品衛生法でさまざまな食品の成分規格として定められているとともに、その試験法が詳細に規定されている。しかしながら、昭和26年に制定された乳等省令（乳及び乳製品の成分規格等に関する省令）および昭和34年に制定された食品衛生法で規定された試験法の中には、制定以来一度も改定されていないものが存在する。迅速化・簡易化された機器や検出感度の高い培地が規格試験に適用できないといった問題点や、食品流通の国際化が進むなか、

輸出入時に必要となる検査法の整合性がとれないといった弊害が生じている¹⁾。

大腸菌群とはグラム陰性の無芽胞桿菌で、乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性の細菌群を指す。その中でも特に44.5℃で発育可能な菌群を *E. coli* すなわち糞便系大腸菌群としているが、これらは食品衛生学の領域でのみ使用される用語であり、細菌学上の分類によるものではない¹⁾。そのため、*E. coli* をあえてローマン体で記述し、細菌分類学上の大腸菌すなわち *E. coli*（イタリック体）と区別しているが、その表記が正しく認識されずに使用されることもあり、試験検査の現場のみならず、行政文書でも混乱が生じている¹⁾。このような状況を鑑み、平成17年に国立医薬品食品衛生研究所を中心として「食品からの微生物検査標準法検討委員会」が発足した⁹⁾。本委員会は、検査法に国際的な整合性をもたせることを大きな目的の一つとしている。衛生指標菌の検査ではヨーロッパ連合 (EU) で用いられている ISO (International Organization for Standardization) 法に統一することとしており、今後は国内でも ISO 法が食品微生物検査の標準法となることが予測される⁹⁾。

[†] 連絡先

^{*1} ☎543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

^{*2} ☎545-0051 大阪市阿倍野区旭町1-2-7-1000

^{*3} ☎650-0046 神戸市中央区港島中町4-6

^{*4} ☎905-0015 沖縄県名護市大南1-13-11

大腸菌群の検査に使用する寒天培地は、国内の公定法ではデソキシコレート寒天 (Desoxycholate; DESO) 培地が指定されているが、米国の食品検査のスタンダードである Food and Drug Administration の Bacterial Analytical Manual (FDA/BAM) 法¹⁰⁾ や ISO 法ではいずれもバイオレットレッド胆汁乳糖寒天 (Violet red bile lactose agar; VRB) 培地が指定されている。また、EU では大腸菌群に代わる衛生指標菌として Enterobacteriaceae を用いている。ISO 法の Enterobacteriaceae の分離培地には、大腸菌群用の VRB 培地の乳糖をブドウ糖に置き換えたバイオレットレッド胆汁グルコース寒天 (Violet red bile glucose agar; VRBG) 培地が使用される。国内でも 2011 年 10 月より新たに設定された生食用食肉の成分規格に Enterobacteriaceae (腸内細菌科菌群) が採用され、VRBG 培地を用いた検査が厚生労働省の通知により定められている⁷⁾。また、現在では多くの大腸菌群および大腸菌検査用の酵素基質培地が市販されている。大腸菌群および大腸菌検査は、これらの培地を使用することによって従来法に比べて簡易・迅速化されるとともに、検査成績も従来法のそれとほとんど異なることが証明されている⁶⁾。

本研究は、大腸菌群試験の公定法として国内で指定されている DESO 培地と欧米で広く用いられている VRB 培地、また腸内細菌科菌群の検出用培地として指定されている VRBG 培地、およびコロニーの色で大腸菌と大腸菌群との区別が可能な酵素基質培地を用いて、環境のふき取り材料や食品から大腸菌群 (腸内細菌科菌群) の検出を試み、分離される菌の同定およびその比較を目的とした。

材料および方法

1. 材料

平成 23 年 1 月に大阪市保健所食品衛生監視課が大阪市内の給食弁当製造施設 2 施設 (S 社および K 社) から採取し、当研究所に搬入した施設内のふき取り材料 30 検体および食品 7 検体を使用した。約 10 cm² の面積を滅菌綿棒でふき取り、10 ml の Buffered Peptone Water (BPW) (ニッスイ) に洗い出したものをふき取り材料とした。

2. 細菌検査法と分離菌株の同定

1) 大腸菌群、腸内細菌科菌群、大腸菌の測定⁴⁾

食品 25 g をストマッカー袋に無菌的に量り入れ、BPW を加え 250 g としてストマッカーにより均一化し、10 倍希釈液を調製した。さらに同 10 倍希釈液 10 ml に BPW を加えて 100 g とし、100 倍希釈液を調製した。ふき取り検体はふき取り液 (原液) 1 ml を 9 ml の BPW に加えて混和し、10 倍希釈液を調製した。ふき取り検体は原液と 10 倍希釈液、食品検体は 10 および 100 倍希釈液を各 1 ml 採り、無菌的に各 2 枚の滅菌シャーレに分注した。あらかじめ加温溶解後 44~47℃ に保温しておい

たデソキシコレート寒天 (DESO) 培地 (ニッスイ)、バイオレットレッド胆汁乳糖寒天 (Violet Red Bile Agar) (VRB) 培地 (OXOID)、バイオレットレッド胆汁グルコース寒天 (Violet Red Bile Glucose Agar) (VRBG) 培地 (OXOID)、XM-G 培地 (ニッスイ) をシャーレに分注、混釈し固化させた。固化後、DESO 培地、VRB 培地、VRBG 培地は同培地で重層した。DESO 培地は 35±1℃ で 20±2 時間、VRB 培地、VRBG 培地、XM-G 培地は 37±1℃ で 24±2 時間培養した。培養後、DESO 培地、VRB 培地および XM-G 培地に形成された赤色コロニーをそれぞれ大腸菌群、VRBG 培地に形成された赤色コロニーを腸内細菌科菌群としてカウントした。XM-G 培地に青色のコロニーが観察された場合は、これら大腸菌数としてカウントした。

2) 菌株の同定

各寒天平板から任意に 5 コロニー (5 コロニーがない場合は 3~4 コロニー) を釣菌し、普通寒天平板培地 (ニッスイ) および EMB 培地 (ニッスイ) に画線塗抹した。普通寒天平板培地は 37±1℃ で 24±2 時間、EMB 培地は 35℃ で 24±2 時間培養後、単一のコロニーを釣菌して普通寒天斜面培地およびブドウ糖寒天培地 (自家調製)^{4, 7)} に移植し、37±1℃ で 24±2 時間培養した。培養後、普通寒天斜面培地から菌塊を採取し、チトクロームオキシダーゼろ紙 (ニッスイ) を用いてオキシダーゼ試験を実施した。ブドウ糖寒天培地が黄変した場合、ブドウ糖分解性を陽性と判定した。普通寒天斜面培地上の菌株を TSI 高層斜面培地 (ニッスイ)、LIM 高層培地 (ニッスイ)、SC 培地 (ニッスイ) に移植して 37±1℃ で一晩培養し、これらの培地における性状と EMB 培地上のコロニーの形状で同じ性状を示した菌株を同一グループと見なして分類し、代表株を普通寒天斜面培地に移植し、API20E (日本ビオメリュー) を用いて菌種を同定した。

3) 菌株の塩基配列解析と相同性検索による菌種同定

分離された一部の菌株については、16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) の塩基配列 (シーケンス) を解読し、そのシーケンスとデータベース上のシーケンスとの相同性検索により菌種同定を試みた。すなわち、ブレインハートインフュージョン (BHI) 培地 (日本ベクトンディッキンソン) で 37℃、18 時間培養後の菌液から DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。16S rDNA は Bacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ) を用いて増幅し、得られた約 1.5 kb の増幅産物を QIA quick PCR purification kit (QIAGEN) で精製した。キット添付の 4 種プライマー (F1, F2, R1, R2) と BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, USA) で当該領域のシーケンスを解読した。相同性検索は EMBL-EBI が提供する FASTA-Nucleotide

Table 1. Coliforms (Enterobacteriaceae) and *Escherichia coli* colony count in the samples using each culture media

Sample No. and sample name	Culture media and colony count* ¹				
	DESO* ²	VRB	VRBG* ³	XM-G (Red colony)* ⁴	XM-G (Blue colony)* ⁵
S-12 (Swab) Inner side of vacuum cooler	2.0×10 ³	3.1×10 ³	4.9×10 ³	40	No colony
K-4 (Swab) Pull of four door refrigerator	1.5	3.1×10 ²	3.7×10 ²	5.5	No colony
K-5 (Swab) Inner side of four door refrigerator	16.5	1.8×10 ²	1.6×10 ²	No colony	No colony
K-9 (Swab) Inner side of vacuum cooler	45	4.3×10 ²	8.1×10 ²	22	60
K-14 (Swab) A tap of double sink in the room of treatment raw materials	1.0×10 ²	4.3×10 ²	4.3×10 ²	49	No colony
K-15 (Swab) Pull of cooler chamber	3.2×10 ²	No colony	2	No colony	No colony
K-17 (Food) Onion and chicken egg soup (scallion, carrot, onion, chicken), grated Japanese radish, pickle of leaf mustard	9.0×10 ²	1.8×10 ³	1.7×10 ³	30	No colony

*¹ Number of colony count per 1 ml (Swab), or 1 g (Food)*² Desoxycholate medium*³ Enterobacteriaceae colony count*⁴ Coliforms colony count*⁵ *Escherichia coli* colony count

similarity search (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/nucleotide.html>) を用いて行った.

結 果

検査した37検体（ふき取り材料30検体，食品7検体）のうち，ふき取り材料6検体と食品1検体から大腸菌群（腸内細菌科菌群）または大腸菌が検出された．Table 1に大腸菌群陽性検体とその大腸菌群（腸内細菌科菌群）数および大腸菌数を示した．菌数はふき取り水1 ml，食品1 g当たりで示した．S社では真空冷却機の内部から大腸菌群あるいは腸内細菌科菌群が検出された．K社では，4枚扉冷蔵庫の取手および内部，真空冷却機の内部，下処理槽2槽シンクの水道栓，冷蔵チャンパーの取手と食品から大腸菌群あるいは腸内細菌科菌群が検出された．K社の真空冷却機の内部からは大腸菌が60個検出された．今回使用した4種類のいずれかの培地上に30以上の大腸菌群のコロニーが検出された7検体のうち，DESO培地では2検体（K-4，K-5），VRB培地およびVRBG培地ではそれぞれ1検体（いずれもK-15），XM-G培地では4検体（K-4，K-5，K-9，K-15）でコロニー数が30未満となった（Table 1）．

大腸菌群（腸内細菌科菌群）が検出された7検体から各培地当たり5コロニーを釣菌し，EMB培地上のコロニーの色調，形態，金属光沢の有無とオキシダーゼ試験，グルコース分解能試験，TSI培地，LIM培地，SC培地上での性状に基づき，同じ性状を示した菌株を同一

グループとみなし127株から78株を選択した．次に，これらの菌株をAPI20Eで解析したところ，78株は18菌種に同定された（Table 2）．同定された菌種は，DESO培地が11種類，VRBおよびVRBG培地が8種類，XM-G培地が3種類で，DESO培地から最も多種数の菌が分離された．*Aeromonas*はDESO培地からのみ分離された．*Enterobacter cloacae*と*Klebsiella oxytoca*が7検体中4検体（S-12，K-4，K-9，K-17）で培地の種類を問わず検出された．XM-G培地で青色コロニーを形成した菌株はAPI20Eで*Pantoea* spp.と同定されたが（Table 2，検体番号K-9），VRB培地からも本菌種と同じコード番号を示す菌株が分離された．これら2株について16S rDNAのシーケンスを解読し，相同性検索を行ったところ，両株のシーケンスは*Escherichia coli*と99.8%以上のidentityを示した．

考 察

大腸菌群検査には液体培地を使用する方法と寒天培地を使用する方法があるが，寒天培地は主に菌数の測定を目的として用いられる⁶⁾．寒天培地を用いた菌数測定の際にはコロニー数が30～300であれば正規分布することから，この範囲を統計的に有意と考える³⁾．本研究は，寒天培地を用いた大腸菌群検査で各培地に主に発育する菌種を同定し，その比較を行うことを目的とした．そのため，コロニー数が30以上のプレートを含むサンプルから検出された菌について解析を行った．

Table 2. Strain identification and number of isolates detected each culture media

Sample No. and sample name	Culture media				
	DESO*1	VRB	VRBG	XM-G (Red color colony)	XM-G (Blue color colony)
S-12 (Swab) Inner side of vacuum cooler	<i>Enterobacter cloacae</i> 5/5*2	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Hafnia alvei</i>	4/5 1/5	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia hermannii</i>	5/5 1/5 No colony
K-4 (Swab) Pull of four door refrigerator	<i>Klebsiella oxytoca</i> 1/3 <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia liquefaciens</i> 1/3	<i>Klebsiella oxytoca</i> 1/3 <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pantoea</i> spp.	2/5 1/5 2/5	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pantoea</i> spp.	3/5 2/5 2/5 No colony
K-5 (Swab) Inner side of four door refrigerator	<i>Enterobacter amnigenus</i> 1/5 <i>Aeromonas caviae/sobria</i> 2/5 <i>Serratia odorifera</i> 1/5 <i>Citrobacter freundii</i> 1/5	<i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Raoultella terrigena</i> <i>Pantoea</i> spp. <i>Leclercia adecarboxylata</i>	2/5 1/5 1/5 1/5	<i>Enterobacter amnigenus</i> No colony <i>Pantoea</i> spp.	4/5 No colony 1/5 No colony
K-9 (Swab) Inner side of vacuum cooler	<i>Enterobacter cloacae</i> 1/5 <i>Escherichia coli</i> 4/5	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pantoea</i> spp./ <i>Escherichia coli</i> *3 <i>Citrobacter freundii</i>	2/5 2/5 1/5	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i>	5/5 5/5 <i>Pantoea</i> spp./ <i>Escherichia coli</i> *3
K-14 (Swab) A tap of double sink in the room of treatment raw materials	<i>Rahnella aquatilis</i> 5/5	<i>Enterobacter amnigenus</i>	5/5	<i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Enterobacter amnigenus</i>	5/5 5/5 No colony
K-15 (Swab) Pull of cooler chamber	<i>Rahnella aquatilis</i> 3/5 <i>Ewingella americana</i> 1/5 <i>Serratia plymuthica</i> 1/5	No colony	<i>Pantoea</i> spp. <i>Serratia liquefaciens</i> <i>Kluysvera</i> spp.	2/4 1/4 1/4 No colony	No colony
K-17 (Food) Onion and chicken egg soup (scallion, carrot, onion, chicken), grated Japanese radish, pickle of leaf mustard	<i>Klebsiella oxytoca</i> 5/5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5/5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	5/5 5/5 No colony

Strains identified from several media are in boldfaced.

*1 Desoxycholate medium

*2 Number of strains identified/Number of isolates from each culture media

*3 Identification of *Pantoea* spp. using API 20E, *Escherichia coli* by 16S rDNA sequence

大腸菌群は、食品衛生学の領域でのみ使用される用語であり、*Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*など多くの腸内細菌科の菌属を含むが、*Aeromonas*など腸内細菌科には属さない菌属も含まれている⁶⁾。今回、DESO培地を用いた場合のみ*Aeromonas*が分離されたが (Table 2, 検体番号K-5), VRB, VRBG, XM-G培地に比べてDESO培地からは*Aeromonas*のみならず、多様な菌種が分離された。*Aeromonas*は食中毒菌の一種であるが、腸内細菌科には属さず、オキシダーゼ陽性であるため腸内細菌科菌群の検査では陰性となり、厳密には糞便汚染の指標菌ではないと考えられる。このように大腸菌群は必ずしもヒトや動物の糞便汚染と結び付かず、特に未加熱の食品では衛生学的にはあまり意味がないとされている⁵⁾。実際に、かいわれ大根やもやしを検査した際に多数検出される大腸菌群は野菜の正常細菌叢であり、糞便汚染の指標とすることを疑問視する意見もある⁸⁾。しかしながら、大腸菌群は加熱処理された食品に対して加熱処理の不十分さ、あるいは加熱後の二次汚染を評価するための指標としては有用である⁵⁾。

今回の調査でEnterobacteriaceae (腸内細菌科菌群)の検出に用いたVRBG培地で分離された菌種は、VRB培地とほぼ同じであった (Table 2)。腸内細菌科菌群は、乳糖非分解の*Salmonella*, *Shigella*や下痢原性大腸菌の一部、また、耐熱性が高く加熱処理の適切な指標となる*Klebsiella*や*Citrobacter*を確実に検出することを目的として、ヨーロッパでは1960年代から用いられてきた¹¹⁾。今回の調査では、VRBおよびVRBG培地は検出可能な菌種の多様性はDESO培地に劣るものの、1サンプル (Table 1, K-15)を除いて菌数はDESO培地とほぼ同じか少し高い傾向が認められた (Table 1)。VRBおよびVRBG培地は加熱処理や加熱後の二次汚染を知るための指標菌の検査用培地としてDESO培地と同じように有用と考えられる。

EUでは2006年から新しい食品の微生物規格基準が施行されているが、この中には大腸菌群と糞便系大腸菌群による規制がなく、すべて大腸菌と腸内細菌科菌群に置き換えられた¹⁾。また、米国でも糞便系大腸菌群は糞便汚染の指標性が低いとの考えから近年検査件数は減少傾向である¹⁾。このように国際的には、糞便汚染指標として大腸菌を重視する傾向にある。また、国内では2011年10月から生食用食肉の成分規格に腸内細菌科菌群の検査が導入されていることから⁷⁾、今後、衛生指標菌として大腸菌群や*E. coli*に代わり大腸菌や腸内細菌科菌群が用いられるようになると予想される。

今回、K社のふきとり材料であるK-9 (真空冷却機の内部)においてのみXM-G培地上で青色を呈したコロニーが分離され (Table 1)、これは*Pantoea* spp.と同定された (Table 2)。同一サンプルよりDESOおよびVRBG培地で分離された菌株をAPI20Eで解析したところ、いずれの菌株も*Escherichia coli*と同定されたが、

VRB培地の菌株はXM-G培地の菌株と同様に*Pantoea* spp.と同定された (Table 2)。*Pantoea* spp.は腸内細菌科に属するが、1989年に*Enterobacter*属や*Erwinia*属から独立した比較的新しい属であることから²⁾、大腸菌よりもむしろ*Enterobacter*や*Erwinia*に近縁であると思われる。*Pantoea* spp.と同定されたVRBとXM-G培地からの分離菌株について、IMViC試験⁶⁾を実施した結果、典型的な大腸菌の性状 (インドール反応陽性、メチルレッド陽性、VP反応陰性、クエン酸利用能陰性)を示した。さらにTSI培地、SIM培地上で硫化水素を産生せず、 β -グルクロニダーゼを保有していたことからこれらはいずれも大腸菌と考えられた。この結果は、両菌株の16S rDNAの相同性検索の結果でも明らかであった。API20Eでの両者の鑑別はVoges-Proskauer (VP) 反応のみであったことから、大腸菌でなく*Pantoea* spp.と同定された原因として、本キットによる両菌株のVP反応の判定がわかりにくかったことが一因と考えられた。XM-G培地は、大腸菌群陽性7検体のうち4検体で30未満となり (Table 1)、今回使用した大腸菌群検査用培地の中では最も陽性検出数が少なかったことから、大腸菌群の検出性能としてはDESO, VRBおよびVRBG培地に劣るかもしれない。しかしながら、糞便汚染の指標となる大腸菌を直接カウントできる培地としての利用価値は高い。

真空冷却機は加熱調理食品を内部から均一に急速冷却することを目的として、近年給食施設などの大量調理施設において導入されるようになった。内部汚染を防ぐため、真空解除時の給気系に除菌フィルターが装備された製品が一般的であるが、今回調査を行った2施設とも真空冷却機の内部から大腸菌群が、さらにK社では大腸菌が検出された。加熱調理食品のみの使用に限定されるため、清掃などが疎かになっている実態が考えられることから、定期的な清掃、必要に応じた消毒などを指導した。

要 約

大阪市内の給食弁当製造施設2社から施設内のふき取りおよび食品を採取し、国内の公定法で指定されているデソキシコレート (DESO) 培地、Food and Drug Administration (FDA) 法およびInternational Organization for Standardization (ISO) 法において大腸菌群の試験法で指定されているバイオレットレッド胆汁乳糖寒天 (VRB) 培地、ISO法において腸内細菌科菌群の試験法で指定されているバイオレットレッド胆汁グルコース寒天 (VRBG) 培地およびXM-G培地の4種類を用いて大腸菌群 (腸内細菌科菌群) の検出と分離菌種を比較した。その結果、DESO培地から最も多様な菌種が分離されたが、これらの中には腸内細菌科に属さない菌種も含まれており、厳密には糞便汚染の指標となっていない可能性がある。VRBおよびVRBG培地を用いた検査では腸内

細菌科に属する菌種に関してはDESO培地と同じように検出されており、これらの菌数はDESO培地と同じか高くなる傾向が認められた。以上より、VRBおよびVRBG培地はこれまで国内の公定法として使用されてきたDESO培地と同様に、衛生指標菌検査に有用と考えられる。

文 献

- 1) 浅尾 努: 日本の衛生指標菌試験法のあるべき姿. 日本食品微生物学会雑誌, **26**, 163-167 (2009).
- 2) Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., and De Ley, J.: Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., **39**, 337-345 (1989).
- 3) 春田三佐夫: 食品の微生物学的検査, 特に生菌数の測定と大腸菌群の検査—その2—, モダンメディア, **23**, 36-46 (1977).
- 4) ISO 21528-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*—Part 2: Colony-count method (2004).
- 5) 小久保彌太郎編, 現場で役立つ食品微生物 Q&A. p. 198-199, 中央法規出版, 東京 (2005).
- 6) 小久保彌太郎: 2. 汚染指標菌 2. 大腸菌群, 糞便系大腸菌群, 大腸菌. 食品衛生検査指針微生物編2004. 厚生労働省監修. p. 129-145, 社団法人日本食品衛生協会, 東京 (2004).
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: 生食用食肉の腸内細菌科菌群の試験法について. 平成23年9月26日, 食安発0926第1号 (2011).
- 8) 奥田俊郎, 岡崎充宏. 野菜に定着している細菌種について. 第21回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集. 22-23 (2001).
- 9) 食品からの微生物標準試験法検討委員会: <http://www.nihs.go.jp/fhm/kennsahou-index.html> (accessed on 2012-3-6).
- 10) US food and drug administration: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm> (accessed on 2012-4-14).
- 11) World Health Organization: 6. Role of indicator organisms. Microbiological aspects of foodhygiene. World health organization technical report series No. 598, p. 50-52 (1976).