＝技 術＝

食品の大腸菌群・*Escherichia coli* 数測定用 「ES コリマーク寒天培地」の評価

寺本忠司^{*1,†}・岡本一成^{*1}・浅本和徳^{*1}・今井一人^{*1}
山田尊士^{*2}・柳沼健史^{*2}・遠藤明彦^{*2}

(^{*1}株式会社ファルコライフサイエンス, ^{*2}栄研器材株式会社)

(受付 平成 15 年 1 月 14 日)

(受理 平成 15 年 8 月 29 日)

Evaluation of ES Colimark Agar for Enumeration of Coliforms and *Escherichia coli* in Food Samples

Tadashi TERAMOTO^{*1,†}, Issei OKAMOTO^{*1}, Kazunori ASAMOTO^{*1}, Kazuto IMAI^{*1},
Takashi YAMADA^{*2}, Takeshi YAGINUMA^{*2} and Akihiko ENDO^{*2}

(^{*1}Falco Life Science, 63-2 Higashi-takeyamachi, Kawabata-higashi-iru,

Higashi-takeyamachi-dori, Sakyo-ku, Kyoto 606-8393; [†]Corresponding author)

(^{*2}EIKEN KIZAI CO. LTD., 5-26-21 Oji, Kita-ku, Tokyo 114-0002)

ES Colimark agar contains two chromagenic substrates, 5-bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Magenta-GAL) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC). Various bacteria were tested for growth and colony color with ES Colimark agar. Also, for enumerating coliforms from viable bacteria, ES Colimark agar and Desoxycholate agar were compared in 413 food samples. Magenta colonies and dark blue to violet colonies that grew on ES Colimark agar were identified. The results of examination are as follows. 1) All gram negative bacteria (45 strains) that included coliforms grew on ES Colimark agar and appeared clearly in colorful colonies. 2) Coliforms were detected from 198 (47.9%) of 413 food samples by ES Colimark agar, significantly more than by Desoxycholate agar 48 (11.6%). 3) Bacteria of 150 magenta colonies that grew on ES Colimark agar and did not grow on Desoxycholate agar were identified as 12 species which included *P. agglomerans* (43 strains) and *E. cloacae* (27 strains). 4) Eighty-eight dark blue to violet colonies on ES Colimark agar were identified as *E. coli* (87 strains, 98.9%) and only 1 strain was not identified. These results confirmed that ES Colimark agar could detect coliforms more broadly than the conventional method. Therefore, ES Colimark agar was considered useful for food safety science.

Key words: ES Colimark agar, Coliform, *E. coli*, Enzymatic method

緒 言

食品細菌検査の大腸菌群は食品衛生学分野に用いられる用語であり、食品の腸管病原菌などの汚染あるいは安全性を評価する指標菌とされ、国際的に「乳糖を発酵し

て酸とガスを産生するグラム陰性通性嫌気性桿菌」と定義されている。この定義に基づいて 50 年前に制定されたわが国の大腸菌群検査の公定法は、「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」³⁾および「食品、添加物等の規格基準」⁴⁾である。食品の大腸菌群検査法は推定試験、確定試験および完全試験の順に行われ、その成績の結果は 4～5 日後に判明する²⁾。

1996 年に食品の大腸菌群迅速検査法として採用された合成酵素基質法における大腸菌群の定義は公定法の定

[†] 連絡先

^{*1} ☎606-8393 京都市左京区東竹屋町通川端東入ル
東竹屋町 63-2

^{*2} ☎114-0002 東京都北区王子 5-26-21

Table 1. Gram negative bacteria tested

No.	Strain	Number of strains	No.	Strain	Number of strains
1	<i>Cedecea davisae</i>	1	13	<i>Escherichia vulneris</i>	1
2	<i>Cedecea lapagei</i>	1	14	<i>Escherichia hermannii</i>	1
3	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	3	15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
4	<i>Citrobacter freundii</i>	4	16	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1
5	<i>Citrobacter koseri</i>	1	17	<i>Pantoea agglomerans</i>	3
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	18	<i>Salmonella Arizonae</i>	1
7	<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	19	<i>Serratia liquefaciens</i>	2
8	<i>Enterobacter cloacae</i>	7	20	<i>Serratia marcescens</i>	2
9	<i>Enterobacter gergoviae</i>	2	21	<i>Rahnella aquatilis</i>	1
10	<i>Enterobacter intermedium</i>	1	22	<i>Yersinia frederiksenii</i>	2
11	<i>Escherichia coli</i>	3	23	<i>Yersinia intermedia</i>	1
12	<i>Escherichia coli</i> O157	1			

Table 2. Gram positive bacteria tested

No.	Strain	Number of strains	No.	Strain	Number of strains
1	<i>Bacillus cereus</i>	1	11	<i>Lactobacillus ruminis</i>	1
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	1	12	<i>Macrococcus luteus</i>	1
3	<i>Bacillus subtilis</i>	1	13	<i>Staphylococcus aureus</i>	2
4	<i>Enterococcus avium</i>	1	14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	15	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
6	<i>Enterococcus faecium</i>	1	16	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	17	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1
8	<i>Lactobacillus casei</i>	1	18	<i>Staphylococcus simulans</i>	1
9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	19	<i>Staphylococcus warneri</i>	1
10	<i>Lactobacillus lactis</i>	1	20	<i>Staphylococcus xylosus</i>	1

義と異なり、 β -galactosidase を産生するグラム陰性菌とされ、食品からの大腸菌群検出は合成酵素基質加寒天あるいは液体培地の使用によって1日で判定される⁵⁾。

応用細菌学における大腸菌 (*Escherichia coli*: *E. coli*) の区分は、医学細菌学における *E. coli* の定義⁶⁾ と異なり、IMViC システム (インドール反応, メチルレッド反応, VP 反応, クエン酸塩利用性) で行われ、*E. coli* は++--および-+-のパターンを示すものを指す。したがって、食品からの *E. coli* 検出には3~4日を要する。一方、発色酵素基質法における *E. coli* の定義は β -glucuronidase を産生するグラム陰性菌とされ、*E. coli* 検出は合成酵素基質加寒天培地あるいは液体培地の35℃で20~24時間培養後に発育した発色あるいはUV照射下で蛍光色を呈したもので判定される¹⁾。合成酵素基質法による大腸菌群および *E. coli* 検査法は、特別に新しい検査技術の習得を必要とせず、従来法のデスオキシコーレイト寒天培地の混釈法と同じ操作と作業で行われる。しかも、2種類の合成酵素基質を加えた寒天培地の使用によって大腸菌群数および *E. coli* 数を1日で同時に計測できる迅速性に優れた検査法である。

食品の大腸菌群および *E. coli* 数測定用 ES コリマーク寒天培地には2種類の合成酵素基質 5-bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Magenta-GAL) および 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC⁹⁾) が添加されている。ES コリマーク寒天培地

の混釈法では35℃で20時間培養後に発育したピンク~赤紫色集落を大腸菌以外の大腸菌群、青~青紫色集落を *E. coli* としてカウントする。

今回、ES コリマーク寒天培地におけるグラム陰性菌およびグラム陽性菌の発育および集落の発色能を調べるとともに、市販食品からの大腸菌群数測定を ES コリマーク寒天培地とデスオキシコーレイト寒天培地で比較した。さらに、デスオキシコーレイト寒天培地で大腸菌群陰性にもかかわらず、ES コリマーク寒天培地上で発育した赤紫色集落または青色や青紫色集落を分離し、菌種の同定を行った。

材料および方法

1. ES コリマーク寒天培地における各菌種の発育および集落の発色能試験

ES コリマーク寒天培地の発育および集落の発色能試験に供試した菌種を Table 1 および Table 2 に示す。供試菌は、*Enterobacter cloacae* 7 株、*Citrobacter freundii* 4 株、*E. coli* 4 株、*Klebsiella pneumoniae* 4 株など大腸菌群を含むグラム陰性菌合計 23 菌種 45 株および *Staphylococcus aureus* 2 株、*Staphylococcus epidermidis* 2 株などのグラム陽性菌合計 20 菌種 22 株である。

試験菌液は供試菌株をハートインヒュージョン寒天培地 (栄研化学) に画線塗抹し、35℃で18時間培養後、滅菌生理食塩水で MacFaland No. 1 に調製した。この調

Fig. 1. Procedure of coliform counting for food samples.

製菌液を滅菌生理食塩水で、 10^{-6} まで10倍段階希釈を行った。各10倍段階希釈液の0.02 mlをESコリマーク寒天平板培地（栄研器材）に滴下してコンラージ棒で塗抹し、35°Cで16, 18, 20, 22および24時間培養毎に発育の有無、集落の色調を調べた。また、20時間培養時

に発育した集落の直径をノギスで計測した。

2. 食品からの大腸菌群数測定法

材料は市販食肉（牛肉、豚肉、鶏肉など）、生鮮魚介類、弁当、サラダ、惣菜など合計413検体を用いた。食品の大腸菌群数測定法をFig. 1に示す。食品10 gに滅菌リン酸緩衝生理食塩水（エルメックス）90 mlを加え、ストマッカーで30秒間処理したものを試料原液とした。試料原液1 mlを滅菌生理食塩水9 mlに接種し、10倍段階希釈液を作製した。各10倍段階希釈液の1 mlを滅菌シャーレ2枚に接種し、それぞれにデスオキシコーライト寒天培地（栄研器材）およびESコリマーク寒天培地（栄研器材）15~20 mlを加え、混釈後、35°Cで20時間培養を行った。デスオキシコーライト寒天培地で赤色集落をEMB寒天培地（日水）に画線塗抹し、35°Cで24時間培養後、大腸菌群の定型的集落を釣菌して普通寒天斜面培地（栄研化学）および乳糖ブイヨン（栄研器材）に接種し、35°Cでそれぞれ24および48時間培養後、グラム陰性桿菌で乳糖ブイヨンからのガス産生を認めたものを大腸菌群陽性としてカウントした。また、ESコリマーク寒天培地でピンク〜赤紫色および青〜青紫集落を大腸菌群とカウントした。

3. 分離菌株の菌種同定

ESコリマーク寒天培地のみに発育した10検体から赤紫色集落150株を分離した。なお、分離菌は5個以上の赤紫色および青・青紫集落を認めたESコリマーク寒

Table 3. Growth and color of Gram negative bacteria colony on ES Colimark agar incubated for 20 hr

No.	Strain	Color of colony	Diameter of colony (mm)	No.	Strain	Color of colony	Diameter of colony (mm)
1	<i>Cedecea davisae</i>	Magenta	1.5	23	<i>Escherichia coli</i>	Violet	2.0
2	<i>Cedecea lapagei</i>	Magenta	1.5	24	<i>Escherichia coli</i> O157	Magenta	2.0
3	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Magenta	2.5	25	<i>Escherichia coli</i>	Violet	2.0
4	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Magenta	3.0	26	<i>Escherichia coli</i>	Violet	2.2
5	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Magenta	2.5	27	<i>Escherichia vulneris</i>	Magenta	2.2
6	<i>Citrobacter freundii</i>	Pink	5.0	28	<i>Escherichia hermannii</i>	Magenta	2.5
7	<i>Citrobacter freundii</i>	Magenta	2.0	29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Magenta	1.5
8	<i>Citrobacter freundii</i>	Magenta	2.0	30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Magenta	2.2
9	<i>Citrobacter freundii</i>	Magenta	2.0	31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pink	1.5
10	<i>Citrobacter koseri</i>	Magenta	2.0	32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Magenta	2.9
11	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Magenta	3.0	33	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Magenta	2.3
12	<i>Enterobacter amnigenus</i>	Magenta	2.0	34	<i>Pantoea agglomerans</i>	Pink	1.0
13	<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	3.0	35	<i>Pantoea agglomerans</i>	Magenta	0.5
14	<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	2.5	36	<i>Pantoea agglomerans</i>	Pink	2.0
15	<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	1.0	37	<i>Rahnella aquatilis</i>	Magenta	1.5
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	3.0	38	<i>Salmonella Arizonae</i>	Magenta	1.0
17	<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	2.5	39	<i>Serratia liquefaciens</i>	Magenta	2.0
18	<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	2.5	40	<i>Serratia liquefaciens</i>	Magenta	1.0
19	<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	2.0	41	<i>Serratia marcescens</i>	Magenta	1.0
20	<i>Enterobacter gergoviae</i>	Magenta	1.0	42	<i>Serratia marcescens</i>	Magenta	1.0
21	<i>Enterobacter gergoviae</i>	Magenta	1.5	43	<i>Yersinia frederiksenii</i>	Magenta	1.0
22	<i>Enterobacter intermedium</i>	Magenta	1.5	44	<i>Yersinia frederiksenii</i>	Magenta	1.4
				45	<i>Yersinia intermedia</i>	Magenta	2.0

Table 4. Growth and color of Gram negative bacteria colony on ES Colimark agar incubated for 20 hr

No.	Strain	Color of colony	No.	Strain	Color of colony
1	<i>Bacillus cereus</i>	—	12	<i>Micrococcus luteus</i>	—
2	<i>Bacillus licheniformis</i>	—	13	<i>Staphylococcus aureus</i>	—
3	<i>Bacillus subtilis</i>	—	14	<i>Staphylococcus aureus</i>	—
4	<i>Enterococcus avium</i>	—	15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	—	16	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	—
6	<i>Enterococcus faecium</i>	—	17	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	—
7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	—	18	<i>Staphylococcus hominis</i>	—
8	<i>Lactobacillus casei</i>	—	19	<i>Staphylococcus sciuri</i>	—
9	<i>Lactobacillus fermentum</i>	—	20	<i>Staphylococcus simulans</i>	—
10	<i>Lactobacillus lactis</i>	—	21	<i>Staphylococcus warneri</i>	—
11	<i>Lactobacillus ruminis</i>	—	22	<i>Staphylococcus xylosus</i>	—

天培地を対象とした。また、青色および青紫色集落を認められた 30 検体から 88 株を分離した。これらの分離菌はカジトン培地（栄研化学）に保存した。

分離菌の菌種同定および生化学的性状試験にはカジトン培地から EMB 寒天培地で再分離した菌株を用い、乳糖ブイヨンからの酸およびガス産生、ES コリブルー培地（栄研器材）で 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-GAL) および 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) の分解性を調べるとともにバイオテスト 1 号（栄研化学）で菌種の同定を行った。

結 果

1. 各菌種の ES コリマーク寒天培地における発育および培養時間と集落の色調変化

大腸菌群を含むグラム陰性菌 45 株およびグラム陽性菌 22 株を ES コリマーク寒天培地で 35°C、20 時間培養後に発育した集落の色調および集落の直径を Table 3 および Table 4 に示す。

グラム陰性菌 45 株は ES コリマーク寒天培地の 20 時間培養後にピンク色 4 株、赤紫色 38 株および青紫色 3 株に分かれて集落を形成した。また、その集落の大きさはいずれも直径 0.5~5 mm であった。一方、グラム陽性菌 22 株はすべて ES コリマーク寒天培地に発育しなかった。

グラム陰性菌 45 株の ES コリマーク寒天培地における培養時間の経過と集落の色調変化を Table 5 に示す。グラム陰性菌 45 株の ES コリマーク寒天培地における 18 時間培養では、*C. davisae*, *E. aerogenes* など 29 株は赤紫色集落を、*E. coli* 3 株は青紫色集落を、*C. freundii* 1 株、*E. gergovaie* 2 株、*S. marcescens* 2 株など 9 株はピンク色集落を形成し、これらの合計 41 株は大腸菌群陽性と判定された。残りの *C. amalonaticus*, *K. pneumoniae*, *P. agglomerans*, *Y. frederiksenii* の計 4 株は 18 時間培養では無色集落であり、大腸菌群陰性と判定された。しかし、これらの 4 株も 20 時間培養後にはピンク色もしくは赤紫色を呈し、すべて大腸菌群陽性と判

定された。

2. 食品からの大腸菌群検出状況

市販食品 413 検体からの ES コリマーク寒天培地とデスオキシコーレイト寒天培地による大腸菌群検出状況を Table 6 に示す。ES コリマーク寒天培地およびデスオキシコーレイト寒天培地の両方またはどちらかで大腸菌群陽性と判定された検体数は 413 検体中 198 検体 (47.9%) で、それぞれの培地別の陽性数は 191 (46.2%) および 143 (34.6%) 検体であった。ES コリマーク寒天培地による大腸菌群陽性数はデスオキシコーレイト寒天培地より 48 検体 (11.6%) 多かった。ES コリマーク寒天培地およびデスオキシコーレイト寒天培地の両方またはどちらかで大腸菌群陽性と判定された 198 検体のうち両方で陽性と判定されたものが 136 検体、ES コリマーク寒天培地のみで陽性であったものが 55 検体、逆にデスオキシコーレイト寒天培地でのみ陽性と判定されたものが 7 検体であった。

両培地で大腸菌群陽性と判定された 136 検体における大腸菌群菌数の相関係数は 0.88 と良好な相関が認められた。その相関図を Fig. 2 に示す。

3. ES コリマーク寒天培地からの分離菌の菌種

ES コリマーク寒天培地のみで大腸菌群陽性と判定された検体、すなわち赤紫色集落が認められた分離菌 150 株および青~青紫色集落が認められた分離菌 88 株の菌種について同定した。

1) 赤紫色集落

ES コリマーク寒天培地のみで大腸菌群陽性と判定された赤紫色集落 150 株（10 検体から分離）の菌種を Table 7 に示す。分離菌で最も多い菌種は *Pantoea agglomerans* 43 株であり、次いで、*E. cloacae* 27 株、*E. coli* 16 株であった。

菌種の決定された 150 株の乳糖ブイヨンからの酸とガス産生、ES コリブルー培地による X-GAL および MUG 分解性を Table 8 に示す。従来法で大腸菌群となる乳糖ブイヨンからのガス産生は 150 株のうち 113 株

Table 5. Color of colonies at various incubation times on ES Colimark agar

Strain	Incubation time (hr)				
	16	18	20	22	24
<i>Cedecea davisae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Cedecea lapagei</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Colorless	Colorless	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Citrobacter freundii</i>	Pink	Pink	Pink	Magenta	Magenta
<i>Citrobacter freundii</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Citrobacter freundii</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Citrobacter freundii</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Citrobacter koseri</i>	Pink	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter cloacae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter gergoviae</i>	Pink	Pink	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter gergoviae</i>	Pink	Pink	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Enterobacter intermedium</i>	Pink	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Escherichia coli</i>	Violet	Violet	Violet	Violet	Violet
<i>Escherichia coli</i> O157	Pink	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Escherichia coli</i>	Violet	Violet	Violet	Violet	Violet
<i>Escherichia coli</i>	Violet	Violet	Violet	Violet	Violet
<i>Escherichia vulneris</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Escherichia hermannii</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Colorless	Colorless	Pink	Magenta	Magenta
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Pantoea agglomerans</i>	Colorless	Pink	Pink	Magenta	Magenta
<i>Pantoea agglomerans</i>	Colorless	Colorless	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Pantoea agglomerans</i>	Colorless	Pink	Pink	Magenta	Magenta

Table 5. Continued

Strain	Incubation time (hr)				
	16	18	20	22	24
<i>Rahnella aquatilis</i>	Pink	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Salmonella Arizonae</i>	Pink	Pink	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Serratia liquefaciens</i>	Pink	Pink	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Serratia liquefaciens</i>	Pink	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Serratia marcescens</i>	Pink	Pink	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Serratia marcescens</i>	Pink	Pink	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Yersinia frederiksenii</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Yersinia frederiksenii</i>	Colorless	Colorless	Magenta	Magenta	Magenta
<i>Yersinia intermedia</i>	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta	Magenta
Positive (%)	39/45	41/45	45/45	45/45	45/45
	86.7%	91.1%	100%	100%	100%

Table 6. Comparison of coliform positive number on ES Colimark agar and Desoxycholate agar about 413 food samples

		Desoxycholate agar		Total
		Number of positive	Number of negative	
ES Colimark agar	Number of positive* ¹	136	55	191
	Number of negative* ²	7	215	222
Total		143	270	413

*¹: Detected coliforms *²: No detected coliforms

(75.3%)であった。一方、合成酵素基質法のβ-galactosidase産生によるX-GALの分解は、150株(100%)で、すべて大腸菌群陽性となった。また、β-glucuronidase産生によるMUG陽性数は18株であり、その内訳は*E. coli* 16株と*P. agglomerans* 2株であった。

2) 青～青紫色集落

表に示さないが、ES コリマーク寒天培地から分離された青～青紫色集落 88 株 (30 検体から分離) の菌種は*E. coli* 87 株 (98.9%) と同定不能 1 株であった。

考 察

食品衛生学分野で用いられる大腸菌群は、食品の腸管病原菌の汚染あるいは安全性の指標菌と意義づけられる。食品の大腸菌群検査の公定法は乳糖からの酸とガス産生ならびにグラム陰性の無芽胞性桿菌であることなどを推定、確定、完全試験の3段階で行うため最終結果が得られるまでに4～5日を要する。一方、合成酵素基質法は大腸菌群に含まれるすべての菌種がβ-galactosidaseを産生することにより合成酵素基質の結合部を切断して赤紫色や青色を発色することを利用している。この反応を利用することによって合成酵素基質法は大腸菌群を1日で判定できる迅速検査法となっている。

このような利点をもつ合成酵素基質法の一つである大腸菌群・*E. coli* 数測定用 ES コリマーク寒天培地を用い

て食品の大腸菌群数測定における評価試験を行った。グラム陰性菌 45 株の ES コリマーク寒天培地における発育能試験ではすべて発育し、培養の経時的な集落の色調で 20 時間培養後に赤紫色集落 41 株とピンク色集落 4 株となり、22 時間培養では 45 株のすべてが赤紫色集落になった。ES コリマーク寒天培地は、大腸菌群の判定時間を少しでも早くするためにピンク色集落を含めて大腸菌群数としてカウントする 20 時間培養を採用した。その結果、ES コリマーク寒天培地に発育した大腸菌群

Fig. 2. Correlation of coliform counts between ES Colimark agar and Desoxycholate agar in 136 food samples.

Table 7. Result of identification of 150 magenta colonies isolated on ES Colimark agar

Species	Number of strains	Samples									
		A	B	C	D	E	F	G	H	J	K
<i>Citrobacter freundii</i>	6	0	0	0	0	1	0	0	1	4	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	27	6	10	6	1	0	0	0	2	2	0
<i>Enterobacter amnigenus</i>	11	0	0	0	0	0	0	0	3	8	0
<i>Enterobacter intermedium</i>	10	0	2	8	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	16	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	15	1	0	0	1	13	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	0	5	2	1	1	0	0	0	0	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	43	2	0	0	0	2	0	9	7	0	23
<i>Serratia liquefaciens</i>	4	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia plymuthica</i>	7	1	0	0	4	0	0	1	0	0	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia intermedia</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	150	15	17	16	8	17	16	10	13	14	24

Table 8. Behavior of various strains which exhibit 'coliform positive' sign on ES Colimark agar with lactose broth and ES coliblu medium

Species	Number of strains	Lactose broth		ES Coliblu medium	
		Acid	Gas	X-GAL* ¹	MUG* ²
<i>Citrobacter freundii</i>	6	6	5	6	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	27	27	20	27	0
<i>Enterobacter amnigenus</i>	11	11	5	11	0
<i>Enterobacter intermedium</i>	10	10	10	10	0
<i>Escherichia coli</i>	16	16	16	16	16
<i>Hafnia alvei</i>	15	15	14	15	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	9	9	9	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	43	43	28	43	2
<i>Serratia liquefaciens</i>	4	4	1	4	0
<i>Serratia plymuthica</i>	7	7	5	7	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1	0	1	0
<i>Yersinia intermedia</i>	1	1	0	1	0
Total	150	150 (100%)	113 (75.3%)	150 (100%)	18 (12.0%)

*¹: β -Galactosidase activity tested with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside.

*²: β -Glucuronidase activity tested with 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide.

は集落の色調で簡単に判定可能であった。

食品 413 検体からの ES コリマーク寒天培地とデスオキシコーレイト寒天培地による大腸菌群陽性数はそれぞれ 191 および 143 検体で、ES コリマーク寒天培地の方が 48 検体多く検出された。このように ES コリマーク寒天培地からの大腸菌群陽性数が公定法のデスオキシコーレイト寒天培地による大腸菌群陽性数より多いのは、大腸菌群の定義が前者では乳糖からの酸とガス産生、後者では β -galactosidase 産生菌と異なるためであり、合成酵素基質法は従来法より多くの菌種⁹⁾が含まれるためと考えられる。例えば、乳糖非分解 *E. coli* は従来法では乳糖からのガスを産生しないので大腸菌群陰性と判定されるが、合成酵素基質法では乳糖透過酵素を持たないため乳糖非分解である細菌でも β -galactosidase を産生すれば大腸菌群陽性と判定される。食品中にこのような乳糖非分解 *E. coli* が存在した場合でも合成酵素基質では大腸菌群陽性となる。したがって、消費者により安全な食品を提供するには、大腸菌群検出率の高い合成

酵素基質法の採用が望ましいと考えられる。

ES コリマーク寒天培地で大腸菌群陽性、デスオキシコーレイト寒天培地で陰性と判定された 10 検体から分離された赤紫色集落 150 株は、12 菌種に同定され、*P. agglomerans* 43 株、*E. cloacae* 27 株、*E. coli* 16 株などであり、すべて大腸菌群陽性であった。また、従来法で 150 株のうち 37 株は乳糖非分解菌で大腸菌群陰性となり、その菌種に *P. agglomerans* 15 株、*E. cloacae* 7 株が含まれていた⁷⁾。また、青～青紫色集落 88 株のうち *E. coli* は 87 株 (98.9%) であったので ES コリマーク寒天培地では青～青紫色集落を *E. coli* と判定してもほとんど問題がないと考えられた。

食品の大腸菌群数測定に用いられる ES コリマーク寒天培地は、従来法の大腸菌群検査の混濁法と同じ操作と作業で行われるので特別な技術習得を必要としない。しかも、食品の大腸菌群数および *E. coli* 数を 20 時間培養で同時に集落の色調で明確に判定できる迅速性に優れた寒天培地と言える。その迅速性は培地に含まれる 2 種類

の合成酵素基質 Magenta-GAL と X-GLUC に作用する酵素が菌種に固有であるためその特異性が高いことから確認試験を必要としないことによる。

以上の結果から、ES コリマーク寒天培地は食品の腸管病原菌の汚染あるいは安全性の指標とする大腸菌群・*E. coli* 検出培地として十分利用できることが明らかになった。

要 約

ES コリマー寒天培地における各菌種の発育と集落の発色能を調べた。また、食品 413 検体からの大腸菌群数測定を ES コリマーク寒天培地とデスオキシコーレイト寒天培地で比較した。さらに、ES コリマー寒天培地に発育した赤紫色および青～青紫色集落の菌種を決定した結果、次のことが明らかとなった。

1. 大腸菌群を含むグラム陰性菌 45 株はすべて ES コリマーク寒天培地に発育し、明瞭な発色を示した。
2. 市販食品 413 検体からの大腸菌群検出は 198 検体 (47.9%) であり、ES コリマーク寒天培地による大腸菌群陽性数はデスオキシコーレイト寒天培地より 48 検体 (11.6%) 多かった。
3. ES コリマーク寒天培地のみに発育した赤紫色集落 150 株の菌種は *P. agglomerans* 43 株, *E. cloacae* 27 株など 12 菌種であった。
4. ES コリマーク寒天培地に発育した青～青紫色集落 88 菌株は, *E. coli* 87 株 (98.9%) および同定不能 1 菌株であった。

以上のことから、ES コリマーク寒天培地は、従来法よりもより幅広く大腸菌群を検出でき、食品の安全性向上に貢献できる培地であると考えられた。

文 献

- 1) Feng, P. C., Feng, S. and Hartman, P. A.: Fluorogenic assay for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **43**, 1320-1329 (1982).
- 2) 小久保彌太郎: 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, p. 79-91, 日本食品衛生協会, 東京 (1990).
- 3) 厚生省生活衛生局: 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令, 昭和 26 年 12 月 27 日, 厚生省令第 52 号 (1951).
- 4) 厚生省生活衛生局: 食品, 添加物等の規格基準, 昭和 34 年 12 月 28 日, 厚生省告示 370 号 (1962).
- 5) 仲西寿男, 寺本忠司: 大腸菌群および糞便系大腸菌の迅速検査法. 食品衛生検査指針 追補 II 微生物編, p. 28-34, 日本食品衛生協会, 東京 (1996).
- 6) 坂崎利一: 医学細菌同定の手びき (第 3 版), p. 151-152, 近代出版, 東京 (1993).
- 7) 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).
- 8) 寺本忠司: 大腸菌群および大腸菌. 食品と微生物, **9**, 211-216 (1993).
- 9) Watkins, W. D., Rippey, S. R., Clavet, C. R., Kelley-Reitz, D. J. and W. Burkhardt III: Novel compound for identifying *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1874-1875 (1988).