塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフローラ 解析への応用

長島浩二*・八十川大輔*・中川良二*・池田隆幸*

Application of an Identification Method of Bacteria based on
their Nucleotide Sequences to Analysis of Microflora in Food

Koji NAGASHIMA*, Daisuke YASOKAWA*, Ryoji NAKAGAWA*
and Takayuki IKEDA*

* Hokkaido Food Processing Research Center, 589-4
Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu-shi, Hokkaido 069

An identification method based on the nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA (rRNA) gene was applied to the analysis of microflora in a food. We isolated bacteria from "Japanese pickles", "smoked salmon" and "seasoned pig bowels", and then analyzed about 300 bases of the 5'-terminal sequences of their rRNA genes. In the 35 sequences which were different each other being referred to a DNA data-base, each sequence showed a homology with that of the known species in an extent of 91 to 100%, in an average of 97.9%. In Japanese pickles of "Hasamizuke" which is moderately pickled, lactic acid bacteria were considered to occupy the majority of the microflora. On the other hand, in Japanese pickles of "Nozawanazuke", various species of bacteria were intermixed. In smoked salmon, bacteria belonging to *Staphylococcus* sp., *Acinetobacter* sp. and *Flabobacterium* sp. were detected. In seasoned bowels, 5 species including 2 species of bacteria inhabiting in animal's bowels were detected. When lactic acid bacteria were searched in various pickles, species which is closely related to *Leuconostoc cremoris* or *Lactobacillus sake* were always isolated.

(Received Jul. 30, 1997 ; Accepted Sep. 29, 1997)

食品工場における品質管理の最も重要なものとして衛生管理があるが、従来は最終製品の菌数検査が中心であった。しかし、最近では HACCP システム（危害分析重要管理点方式）に基づいた品質管理が広く採用されるようになってきた。このシステムは検査よりも予防に重点を置いており、製造工程のあらゆる危害を分析し、それを予防するための科学的な方策を立てるというものである。食品の最も重要な危害は微生物によって発生するので、これに対する十分な分析が必要である。この微生物危害分析において菌数だけでなくその種類を明らかにすることは、より科学的で適切な管理を可能にするが、微生物の同定は多大な労力と専門知識を要するため手軽に取り組むことができなかった。

近年の遺伝子操作技術の進展により、遺伝子情報に基づいた微生物の分類・同定が行われるようになってきた。これは DNA の塩基配列の違いに基づいた方法である。細菌の種レベルでの分類・同定には、主に 16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の塩基配列が用いられている¹⁾。本技術は従来法と比べて、(1) 機械化が進んでおり、簡便迅速であること (2) 得られるデータがデジタルであり、場所や人による違いが極めて少ないこと (3) 情報のデータベース化が進んでいるなどの特徴があり、分類の専門知識がなくてもかなりの精度で同定を可能にする。

本研究では、16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく細菌同定法を食品のマイクロフローラ解析に応用したので、その結果を報告する。

* 北海道立食品加工研究センター（〒069 江別市文京台緑町 589-4）

実 験 方 法

1. 細菌の分離

市販の“野沢菜漬漬”，“はさみ漬（鮭の切り身を大根の間に挟んだ漬物で2週間程熟成させている）”，“スモークサーモン” および“調味ホルモン” から，標準寒天（以下 St と略す）培地およびデゾキシコレート（以下 Deso と略す）培地，クロモカルト[®]（以下 Ch と略す，メルク社）培地を用いて塗抹法により菌を分離した。St 培地の場合，培養は5℃で2週間あるいは37℃で1日から2日間行った。Deso および Ch 培地の場合，37℃で24時間培養した。出現したコロニーを色および形態で区分し，それぞれから数コロニーずつ釣菌した。

乳酸菌は，市販の“野沢菜古漬”，“大根漬漬”，“白菜漬漬” から BCP 培地を用い，20℃で分離した。

2. 16S rRNA 遺伝子の増幅および塩基配列決定に用いたプライマー

細菌 16S rRNA 遺伝子の増幅および塩基配列の決定に用いたプライマーの大腸菌遺伝子上での位置および塩基配列をそれぞれ Fig. 1 と Table 1 に示した。プライマー A, C, D, E およびその相補配列（*）は EDWARDS^らによる。プライマー I, J, K およびその相補配列は NEFFS^らの 16S rRNA 配列のアライメントを基に設計された。

3. PCR による細菌 16S rRNA 遺伝子の増幅

細菌 DNA は InstaGene[™] Matrix（Bio-Rad）を用い，添付プロトコールに従って調製した。この DNA 標品を鋳型とし，プライマー“A”と“J*”を用いて 93℃で1分，55℃で2分，72℃で3分の反応を36サイクル行った。Taq DNA Polymerase には Promega 社の酵素（Cat. # M 1861）を用いた。

PCR 産物（約 1.4 kb）は 1.5% アガロース電気泳動で確認した。分子量マーカーには，ラムダファージ DNA の Hind III 消化物を用いた。

4. 塩基配列の決定

増幅した rRNA 遺伝子は MicroSpin[™] S-400 HR カラム（Pharmacia Biotech）によって精製した。塩基配列は，“C*”をプライマーとしてジデオキシターミネータ法（Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin-Elmer）により，ABI 製 DNA シーケンサーを用いて決定した。必要ならば，Table 1 に示したプライマーを用い，増幅 DNA の全塩基配列を決定した。得られた塩基配列を GeneWorks[®]（帝人システムテクノロジー社）を使ってアライメントし，同一ものを一

Fig. 1 Location of primers for amplifying or sequencing bacterial gene coding for 16S ribosomal RNA

The numbers represent the nucleotide positions of the primers in *E. coli* 16S rRNA gene (GenBank accession number V 00348).

Table 1 Primers for amplifying or sequencing of bacterial gene coding for 16S ribosomal RNA

Code	Sequence (5'→3')	Direction*	Position**
A	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	+	8- 28
C	CTACGGGAGGCAGAGTGGG	+	341- 361
C*	CCCACTGCTGCCTCCGTAG	-	361- 341
D	CAGCAGCCGCGTAATAC	+	518- 536
D*	GTATTACCGCGTCTGCTG	-	536- 518
E	AAACTCAAAGGAATTGACGG	+	908- 928
E*	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	-	928- 908
I	GAAGGTGGGATGACGTC	+	1178-1195
I*	GACGTCATCCCCACCTTC	-	1195-1178
J*	GTTACCTTGTACGACTT	-	1510-1492
K	TAGATACCTGGTAGTCC	+	789- 806
K*	GGACTACCAAGGTATCTA	-	806- 789

*: + ; Forward ; - ; Reverse

** : The nucleotide positions are represented as genetic loci on 16S ribosomal RNA of *E. coli*.

つのグループにまとめ，その内の一つの配列を National Center for Biotechnology Information (USA) (URL : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の DNA データベースと照合した。

実 験 結 果

食品から分離した菌について，種間の差が最も大きい領域である⁴⁾ 16S rRNA 遺伝子の 5'末端約 300 塩基の配列を決定した。その内の互いに異なる 35 配列についてデータベースと照合し，ホモロジーの高かった上位二つの菌種を表に示した。これらの配列は第一位の菌種の配列と 91 から 100% のホモロジーを示し，平均では

97.9%であった。

1. 野沢菜浅漬およびはさみ漬のマイクロフロー解析
野沢菜浅漬からは合計 38 株を分離し、N シリーズとした。このうちの 25 株について塩基配列を決定し、同一配列のものをまとめて I ~ XII の 12 グループに分けた (Table 2)。はさみ漬からは合計 24 株を分離し、H シリーズとした (Table 3)。このうち 22 株について塩基

配列を決定し、同様に I ~ VIII の 8 グループに分けた。

両食品とも Deso 培地と Ch 培地で赤色を呈したコロニーの数は、いずれの培地でも 10^3 個/g 程度であった。これらの赤色コロニーは調べた限りにおいて、予想されたように全てが大腸菌群の菌と最も高いホモロジーを示した (Table 2 の N 7, 8, 11, 12, 13, 17, Table 3 の H 1, 2, 3, 4)。しかし、はさみ漬の H 7, 8, 9 の菌株は Ch

Table 2 Analysis of microflora in Japanese pickles of "Nozawanazuke"

Group	Strains** (No. of N series)	Culture condition***	Color of colonies	Homologous species**** (homology %, identical/total nucleotides)
I	<u>1</u> , 2, 3, 6	St	white	<i>Enterobacter</i> sp. (99.4, 308/310),
	7, 8	Deso	red	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99.0, 307/310)
	13	Ch	red	
II	11, <u>12</u>	Ch	red	<i>Enterobacter</i> sp. (97.9, 378/386), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.9, 378/386)
III	<u>30</u> , 31	St (5°C)	white	<i>Enterobacter</i> sp. (99.4, 312/314), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (99.0, 311/314)
IV	17	Ch	pink	<i>Enterobacter</i> sp. (98.0, 391/399), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.5, 389/399)
V	<u>18</u> , 19	Ch	white	<i>Glossina austeni</i> (95.8, 229/239), <i>Escherichia hermannii</i> (94.6, 229/242),
VI	21, <u>22</u>	St	yellow	<i>Brevibacterium citreum</i> (98.7, 301/305), <i>Brevibacterium luteum</i> (98.7, 301/305)
VII	<u>27</u> , 28	St	yellow	<i>Corynebacterium triticia</i> (95.1, 289/304), <i>Corynebacterium rathyi</i> (94.7, 288/304)
VIII	<u>35</u> , 36	Ch	white	<i>Pseudomonas maltophilia</i> (97.7, 303/310), <i>Xanthomonas campestris</i> (95.8, 297/310)
IX	34	St (5°C)	white	<i>Pseudomonas pavonaceae</i> (94.2, 293/311), <i>Flavimonas oryzae</i> (93.6, 291/311)
X	29	St	white	<i>Lactococcus lactis</i> (100, 321/321), <i>Streptococcus cremoris</i> (99.4, 320/322)
XI	32	St (5°C)	white	<i>Leuconostoc cremoris</i> (97.8, 316/323),
	<u>37</u>	St	white	<i>Leuconostoc lactis</i> (95.7, 309/323)
XII	38	St	white	<i>Lactobacillus sake</i> (99.4, 339/341), <i>Lactobacillus plantarum</i> (86.3, 226/262*****)

* : This pickles is something that is lightly pickled and is not fermented.

** : When more than two strains are in a group, the sequence of the strain underlined was compared with a data-base.

*** : St : standard method agar ; Deso : desoxycholate agar ; Ch : chromocult^R agar

**** : Two species that showed the highest homology to strains of the each group are presented.

***** : A result on a part of decided sequence is presented, because there are gaps in its alignment.

Table 3 Analysis of microflora in Japanese pickles of "Hasamizuke"

Group	Strains (No. of H series)	Culture condition	Color of colonies	Homologous strains (homology %, identical/total nucleotides)
I	<u>1</u> , 2	Deso	red	<i>Erwinia amylovora</i> (96.6, 312/323),
		Ch	red	<i>Enterobacter</i> sp. (95.4, 308/323)
II	3	Ch	red	<i>Erwinia amylovora</i> (97.2, 309/318), <i>Enterobacter</i> sp. (96.2, 306/318)
III	7	Ch	white	<i>Enterobacter</i> sp. (95.5, 299/313), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (95.2, 298/313)
IV	<u>8</u> , 9	Ch	white	<i>Enterobacter</i> sp. (97.7, 303/310), <i>Klebsiella pneumoniae</i> (97.4, 302/310)
V	10	Ch	white	<i>Erwinia amylovora</i> (91.3, 242/265), <i>Enterobacter</i> sp. (90.9, 241/265)
VI	<u>11</u> , 12, 13	St	white	<i>Leuconostoc cremoris</i> (98.5, 319/324), <i>Leuconostoc lactis</i> (94.8, 307/324)
VII	14, 15, <u>16</u>	St	white	<i>Lactobacillus sake</i> (98.0, 336/343), <i>Lactobacillus plantarum</i> (84.5, 223/264**)
VIII	17~ <u>24</u>	St (5°C)	white	<i>Leuconostoc cremoris</i> (96.6, 317/328), <i>Leuconostoc lactis</i> (94.8, 311/328)

* : This pickles is something that salmon fillet is put between slices of radish, and is a little fermented.

** : A result on a part of decided sequence is presented, because there are gaps in its alignment.

培地で白色を呈したが、*Enterobacter* 属と高いホモロジーを示した。Ch 培地でのコロニーの赤色化は大腸菌群の菌が共通して持つ β -ガラクトシダーゼ活性によるものであるが、わずかではあるが、この酵素活性を持たない株もあることが知られている⁵⁾。両食品で分離された大腸菌群は腸内細菌群サブグループの第2群に属するものであり、病因菌の属する第1群や第4群とは明らかに区別された。

野沢菜漬から St 培地を用い、37°C、24 時間培養で大きなコロニーを形成した増殖の速い菌株（約 10^3 個/g）は全て *Enterobacter* 属と同定された（N 1, 2, 3, 6）。24 時間では非常に小さかったコロニーをさらに 4 日間培養したところ、白色と黄色のコロニーが共に 10^4 個/g 程度検出された。白色のものは乳酸菌（*Lactococcus* 属；N 29, *Leuconostoc* 属；N 37, *Lactobacillus* 属，N 38）と、黄色のものはコリネ型細菌（*Brevibacterium* 属；N 21, 22, *Corynebacterium* 属；N 27, 28）と高いホモロジーを示した。コリネ型細菌はバラ色、ピンク、オレンジ、黄、灰色などの非水溶性色素を産生する菌種が多いことが知られているが、N 21 と N 22 のコロニーも黄色

を呈していた。

多くの食品が低温で流通されていることから、低温で増殖できる細菌の存在を調べることは重要である。そこで、St 培地を用い 5°C で 2 週間の培養を行った。この条件でコロニーは約 4×10^4 個/g 検出された。これらを解析したところ、*Enterobacter* 属（N 30, 31）、*Pseudomonas* 属（N 34）および *Leuconostoc* 属（N 32）であるという結果を得た。前二者は漬物にとっては腐敗細菌となりうるものである。これらのことから、低温で良く増殖できる腐敗細菌が本漬物に相当数存在する可能性が示唆された。

はさみ漬の St 培地で検出されたコロニーは、いずれも乳酸菌であった（Table 3）。コロニーは 5°C 培養で最も多く検出され、他の培養条件の 10 から 100 倍であった。これら低温で検出された菌は *Leuconostoc cremoris* と 96% のホモロジーを示し、全塩基配列で比較した場合は 97% であった。以後の実験で、5°C 培養で分離された本菌株は 37°C では増殖が極めて遅く、20°C 付近に至適温度を持つことが示された。このため 37°C 培養では検出されなかったものである。

野沢菜漬とはさみ漬の St 培地上での上記の様なマイクロフローの違いは、今回使用した野沢菜漬が浅漬タイプの漬物であり、はさみ漬が熟成タイプであることを反映した結果と思われる。すなわち、はさみ漬の場合は熟成過程で乳酸菌がマイクロフローの大部分を占めるようになり、野沢菜漬は浅漬であるため各種の細菌が混在していると考えられた。

2. スモークサーモンのマイクロフロー解析

スモークサーモンからは St 培地、37℃、48時間の培養でコロニーを分離し、S シリーズとした。16株を分離し（塩基配列は13株について決定した）、I～Vのグループに分けた（Table 4）。この食品は非加熱であり、冷凍流通されているものである。分離株の塩基配列を決定した結果、*S. saprophyticus* と非常に高いホモロジーを示した菌（99.7%あるいは100%のホモロジー）が6株（Table 4の S1, 2, 3, 4, 9, 11）で最も多く、*Acinetobacter* 属と *Flavobacterium* 属がそれぞれ3株ずつ（S5, 7, 8およびS13, 14, 16）検出された。これらの菌は自然界に広く分布している。*S. saprophyticus* は食品によっては腐敗細菌となりうる菌であり、*Flavobacterium* 属は腐敗活性はあまり強くはないが、色素を産生する。実際に、S13, 14, 16のコロニーは黄色を呈していた。*S. epidermidis* はヒトの皮膚の常在菌として知られているが、この菌と100%ホモロジーを示した菌が1株（S6）分離された。

3. 調味ホルモンのマイクロフロー解析

本研究で使用した調味ホルモンは、醤油をベースにした調味液あるいは塩・胡椒をベースにした調味液に生ホ

ルモンを漬け込んだものである。生ホルモンは米国から冷凍で輸入されたものである。この食品からは合計12株分離し、B シリーズとした。この食品には、豚腸管由来の菌が存在すると予想されたが、実際に、分離された12株中5株（Table 5の B1, 4, 10, 11, 12）は *E. coli* と、2株（B6, 7）は *Y. enterocolitica* と極めて高いホモロジーを示した。0～5℃の低温でも発育可能な食中毒起因菌である *Y. enterocolitica* と思われる菌が検出されたことは、本食品の厳密な温度管理と何らかの静菌および殺菌処理の必要性を示している。塩タレ漬けホルモンからは、タレに含まれている胡椒から由来したと思われる *Bacillus* 属（B8, 9）が検出された。

4. 各種漬物からの乳酸菌の分離・同定

我々は漬物における乳酸菌に注目し、野沢菜古漬、白菜浅漬および大根浅漬から、BCP 培地を使用して乳酸菌を分離し、同定した。乳酸菌数は漬物によって様々であったが、それぞれから数個の黄色化コロニーを釣菌し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。Table 6に示されているように、これら漬物から分離された乳酸菌の塩基配列はいずれも *Leuconostoc cremoris* あるいは *Lactobacillus sake* と最も高いホモロジーを示した。野沢菜浅漬およびはさみ漬からも同種の乳酸菌が検出されており（Table 2および3）、漬物発酵におけるこれら乳酸菌の関与が示唆される。

考 察

本研究では、16S rRNA の5'末端約300塩基の配列を解析した。森ら⁴⁾は3'末端の約300塩基の配列が同定に

Table 4 Analysis of microflora in smoked salmon

Group	Strains (No. of S series)	Culture condition	Color of colonies	Homologous strains (homology %, identical/total nucleotides)
I	1, 2, 3, 4	St	white	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (100, 320/320), <i>Staphylococcus cohnii</i> (98.1, 314/320)
II	9, 11	St	orange	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (99.7, 316/317), <i>Staphylococcus cohnii</i> (98.4, 312/317)
III	6	St	white	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (100, 320/320), <i>Staphylococcus arlettae</i> (98.8, 316/320)
IV	5, 7, 8	St	white	<i>Acinetobacter</i> sp. (98.3, 295/300), <i>Acinetobacter lwoffii</i> (93.3, 125/134*)
V	13, 14, 16	St	yellow	<i>Flavobacterium indologenes</i> (92.8, 285/307), <i>Flavobacterium gleum</i> (92.2, 283/307)

*: A result on a part of decided sequence is presented, because there are gaps in its alignment.

Table 5 Analysis of microflora in seasoned pig bowels

Group	Strains* (No. of B series)	Culture condition	Color of colonies	Homologous species (homology %, identical/total nucleotides)
I	2, 3	St	white	<i>Moraxella osbensis</i> (99.2, 280/282), <i>Neisseria ovis</i> (88.7, 250/282)
II	5	St	white	<i>Staphylococcus caseolyticus</i> (99.1, 319/322), <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (92.5, 236/255)
III	6, 7	St	white	<i>Yersinia enterocolitica</i> (100, 311/311), <i>Yersinia intermedia</i> (97.8, 305/312)
IV	8, 9	St	white	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (99.4, 320/322), <i>Bacillus subtilis</i> (99.4, 320/322)
V	1, 4, 10 11, 12	St Ch	white purple	<i>Escherichia coli</i> (99.7, 311/312), <i>Shigella</i> sp. (99.0, 309/312)

* : Strains from No. 1 to 3 were isolated from row pig bowels. Strains from No. 4 to 7 and 11 or from No. 8 to 10 and 12 were isolated from pig bowels which are seasoned with soy-based or salt/pepper-based seasoning, respectively.

Table 6 Identification of lactic acid bacteria isolated from various kinds of Japanese pickles

Materials	Number of strain isolated	Homologous strains (homology %, identical/total nucleotides)
Nozawana*	9	<i>Lactobacillus sake</i> (99.3, 278/280), <i>Lactobacillus casei</i> (99.0, 208/210****)
Chinese cabbage**	5	<i>Leuconostoc cremoris</i> (99.0, 311/314), <i>Leuconostoc lactis</i> (95.0, 298/314)
Japanese radish**	4	<i>Leuconostoc cremoris</i> (98.7, 310/314), <i>Leuconostoc lactis</i> (94.6, 297/314)
	2	<i>Lactobacillus sake</i> (98.8, 333/337), <i>Lactobacillus casei</i> (98.5, 263/267****)
Cucumber**	1	<i>Leuconostoc cremoris</i> (97.8, 307/314), <i>Leuconostoc lactis</i> (95.5, 300/314)

* : Well pickled, ** : Lightly pickled

**** : A result on a part of decided sequence is presented, because there are gaps in its alignment.

適していることを報告したが、この領域は極めて近縁の菌種では全く同じ配列の場合があることが最近解ってきたため、その場合には5'末端約300塩基の配列を使うことを勧めている。プライマー“C”はこの領域の塩基配列を決めるためのものであり、これを用いたジデオキシターミネータ法によるシーケンス反応はほとんどの場合で安定したエレクトロフェログラムを与えた。

分離株のこの約300塩基の配列をデータベースと比較した結果、既知の菌種と91~100%の範囲でホモロジーを示した。この数値は登録配列数の増加に伴って上昇し100%に近づくはずである。しかし、塩基配列によって種レベルで細菌が同定できるようになるには、さらなる研究の進展が必要である。従って、現状においては本方法はあくまでも簡易的な同定法である。しかし、生化学

的特定の段階として菌種の範囲を絞り込んだり、得られた菌名を使って各種の情報検索を行い、その情報を微生物管理に役立てるということでは有用と考えられる。

乳酸菌の同定に関しては、森ら⁴⁾が独自のデータベースを構築して良好な結果を得ている。このように、特定の菌属のデータベースを構築して運用していくことが現状では有効であると思われる。

腸内細菌群はDNAの塩基組成と二、三の生化学的、生理学的性質によって4つのサブグループに分けられるが、病原菌や食中毒菌はサブグループの第1群と第4群に属している⁶⁾。従って、これらの菌とそれ以外の腸内細菌群を16S rRNA遺伝子の塩基配列によって確実に区別できるかどうかは重要である。そこで、今回我々が腸内細菌群と特定した菌株とデータベースに登録されている代表的な腸内細菌群の菌株の塩基配列をアライメントすることにより、ホモロジーの内容をより詳しく検討してみた。Fig. 2にそのアライメントの一部を示した。このアライメントから、(1)調べた限りにおいて、腸内細菌群の第2群は大腸菌の塩基番号77と89に相当する塩基を共に欠損しており、他のサブグループと区別される(2)本研究で腸内細菌群の第2群と特定された菌株も当該塩基を欠損していることが明らかになった。これらのことから、現状のデータベースにおいても、腸内細菌群の第2群とその他のサブグループをかなりの確実性をもって区別することができると考えられた。

マイクロフローの解析では、菌種のポピュレーションが重要である。今回のマイクロフロー解析では、検出されたコロニーの特徴に基づいてグループに分け、菌数を計測した後、それぞれのグループから数個のコロニーを釣菌した。その際、食品のマイクロフローを出来る限り正しく反映するように努める必要があるが、出現したコロニーの特徴とどのコロニーを釣菌したかを画像として保存すれば、結果のより正確な解釈が可能になると思われる。

本研究で用いた細菌分離条件は、一般的に食品微生物検査で採用されている標準的な条件と低温培養(5℃)の組合せであった。しかし、標準寒天培地で37℃、48時間という培養条件ではコロニーが非常に小さく、以後の実験が困難である場合があった。また、乳酸菌のあるものは37℃で生育できず、低温培養で検出された(Table 3のHグループ)。このことは、自明のことではあるが、マイクロフローの解析では分離培地および培養条件に留意する必要があることを示している。

	66	99
	<i>E. amylovora</i> (H10)	ACGGTAGCACA-GAGAGCTTCCT-CTTGGGTGAC
	<i>K. pneumoniae</i>	ACGGTAGCACA-GAGAGCTTCCT-CTCGGGTGAC
	<i>Enterobacter</i> sp. (N1)	GCGGTAGCACA-GAGAGCTTCCT-CTCGGGTGAC
II	<i>E. amylovora</i> (H17)	ACGGTAGCACA-GAGAGCTTCCT-CTTGGGTGAC
	<i>Enterobacter</i> sp.	GCGGTAGCACA-GAGAGCTTCCT-CTCGGGTGAC
	<i>E. amylovora</i> (H1)	GCGGTAGCACA-GGGAGCTTCCT-CTCGGGTGAC
	<i>E. amylovora</i>	ACGGTAGCACA-GAGAGCTTCCT-CTTGGGTGAC
	<i>S. marcescens</i>	GCGGTAGCACANGGAGCTTCCTCCCTGGGTGAC
	<i>C. freundii</i>	ACGGTAGCACAGAGGAGCTTCCTCTGGGTGAC
	<i>E. coli</i> (B12)	ACGGTAACAGGAAGNAGCTTCCTTTGCTGAC
I	<i>E. coli</i>	ACGGTAACAGGAAGAAGCTTCCT-CTTTGCTGAC
	<i>S. dysenteriae</i>	ACGGTAACAGGAAGCAGCTTCCTGTTGCTGAC
	<i>S. enteritidis</i>	ACGGTAACAGGAAGCAGCTTCCT-CTTCGCTGAC
IV	<i>Y. enterocolitica</i> (B6)	GCGGCAGCGGGAAGTAGTTACTACTTTGCCGAC
	<i>Y. enterocolitica</i>	GCGGCAGCGGGAAGTAGTTACTACTTTGCCGAC
III	<i>P. vulgaris</i>	GCGGTAACAGGAGAAAGCTTGCTTTCTGCTGAC

Fig. 2 Alignment of the sequences of 16S ribosomal RNA genes from bacteria of enteric group

The sequences of 16S rRNA genes from *Citrobacter freundii* (GenBank accession number M 59291), *E. coli* (V 00348), *Enterobacter* sp. (U 39566), *Erwinia amylovora* (X 83265), *Klebsiella pneumoniae* (Y 11487), *Proteus vulgaris* (J 01874), *Salmonella enteritidis* (U 90318), *Serratia marcescens* (U 65971), *Shigella dysenteriae* (X 80680), *Yersinia enterocolitica* (U 63135) and our isolates (N 1, N 17, H 1, H 10, B 6 and B 12) were aligned. Strain number of the isolate is shown in parentheses. Numbering corresponds to 16S rRNA genes from *E. coli*. Arabic figures represent the subgroup of enteric group.

要 約

16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいた細菌同定法を食品のマイクロフロー解析に応用した。漬物、スモークサーモン、調味ホルモンから菌を分離し、93菌株について16S rRNA 遺伝子の5'末端約300塩基を決定した。その内の互いに異なる35配列をDNAデータベースと照合した結果、既知菌種の配列と91~100%の範囲でホモロジーを示し、平均では97.9%であった。

熟成タイプのはさみ漬では乳酸菌がマイクロフローの大部分を占めていたのに対し、浅漬タイプの野沢菜漬は各種の細菌が混在しており、特に低温で生育可能な腐敗細菌が相当数存在した。両漬物でのマイクロフローの違

いは、今回使用した野沢菜漬が浅漬タイプの漬物であり、はさみ漬が熟成タイプであることを反映したものと思われる。

スモークサーモンでは *Staphylococcus* 属, *Acinetobacter* 属および *Flabobacterium* 属の菌が検出された。調味ホルモンでは動物腸管生息菌 2 菌種を含む 5 菌種が検出された。

各種漬物の乳酸菌を検索したところ, *Leuconostoc cremoris* あるいは *Lactobacillus sake* に近縁の菌種が常に分離された。

本研究の遂行に当たり、ご教示を頂いた酪農学園大学高橋樹史博士ならびに農林水産省食品総合研究所森 勝美博士に感謝いたします。また、本稿の作成に当たり校閲頂いた北海道立食品加工研究センター浅野行蔵博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 小柳津広志：生化学, **61**, 693 (1989).
- 2) EDWARD, U., ROGALL, T., BLOCKER, H., EMDE, M. and BOTTGER, E.C.: *Nucleic Acids Res.*, **17**, 7843 (1989)
- 3) NEEFS, J-M., VAN DE PEER, Y., HENDRIKS, L. and DE WACHER, R.: *Nucleic Acids Res.*, **18**, Supplement, 2237 (1990).
- 4) 森 勝美：醸協, **9**, 188 (1997).
- 5) MANAFI, M.: International Conference on Coliforms and E. coli, regarding abstracts # 151, UK (1995).
- 6) STANIER, R.Y., INGRAHAM, J.L., WHEELIS, M.L. and PAINTER, P.R.: 微生物学 (下), 原著第 5 版 (培風館, 東京), p. 122 (1993).

(平成 9 年 7 月 30 日受付, 平成 9 年 9 月 29 日受理)