低温性大腸菌群の山岳地における分布

(昭和 47 年 6 月 12 日受理)

堀 江 進* 荒 木 敏 明* 佐 伯 和 昭*

Some Observation on the Distribution of Psychrotrophic Coli-aerogenes Bacteria in the Mountain Area

Susumu HORIE, Toshiaki ARAKI and Kazuaki SAHEKI

(Tokyo University of Fisheries; Konan 4-chome, Minato-ku, Tokyo)

The multiplication of psychrotrophic coli-aerogenes bacteria in milk or fish stored at chill temperature is already known. In order to investigate the sanitary significance of the organisms, some observations on the distribution of the organisms in mountain and residential area were carried out. At 14 of 16 stations along the Kita-akikawa and the Mitake-sawa, branch of the River Tama, the psychrotrophic coli-aerogenes bacteria could be isolated from the soil, bottom mud or water samples. On the contrary, at only 3 of 13 stations in the residential areas the organisms were detected. Seventy two strains of the psychrotrophic coli-aerogenes bacteria collected in this investigation were classified into 11 groups according to IMViC types, motility and gelatine liquefying ability. Majority of the isolates showed --++ IMViC type with positive reaction both in motility and in gelatine liquefaction test (Group I). Thirty one of the 72 isolates showed marked growth in glucose broth at 5°C within 1 to 2 days. Almost all the strains grew well at 37°C, while not at 40°C.

From the result of this investigation, it was revealed that psychrotrophic coli-aerogenes bacteria are widely distributed in mountain area.

(Received June 12, 1972)

牛乳や鮮魚を冷蔵した場合に、いわゆる低温性大腸菌群の増殖することが知られている¹⁾²⁾。また一方、山口³⁾、玉置⁴⁾、寺本⁵⁾らはかなり前の研究において、冷血動物である淡水魚の腸管から大腸菌属の細菌を分離しており、これら魚類の大腸菌属菌株は温血動物由来の菌株と異なり、氷室の温度で発育し得ることが認められている。冷蔵した牛乳や鮮魚に出現する低温性大腸菌群は、これら先人の述べる魚類大腸菌属細菌と同一または近縁のものと推察されるのであるが、これらの細菌群の衛生細菌学的意義を明確にするためには自然界における分布を明らかにしておく必要がある。そこで著者らは、まず山岳地の土壌、川水における分布について検討し、山岳地における本菌群の分布を確認し得たので報告する。

実験方法

試料の採集

北秋川地区：1971年11月11日に、東京都の多摩川支流の北秋川上流および中流の6地点で、川底の泥土、川水

* 東京水産大学：東京都港区港南 4-5-7

およびその地点の土壌を採取した。土壌試料は表層から滅菌さじで採取した。川底の泥土は、滅菌した鉄パイプ（長さ 12 cm, 径 4 cm）に滅菌した布袋をつけ、太い糸をつけて水中に投げ、水底を引いて採取した。川水は、滅菌した 1000 ml 容試薬びんに採取した。各試料は採取後、研究室に運搬し、直ちに実験に供した。

御岳沢地区：同年12月9日、秋川支流の御岳沢の上流の10地点で土壌と川底泥土の試料を上記の方法で採集した。試料は研究室に運搬後、5°の恒温器に一夜放置した後、実験に供した。

住宅地域：東京都および神奈川県の住宅地域における土壌試料を同様の方法で採集した。

菌株の分離

土壌、泥土の試料はその 10 g をとり、リン酸緩衝生理食塩水 50 ml に入れ振とうし、5 倍希釈液をつくり、その 5 ml（試料 1 g に相当）を乳糖ブイヨン（ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, 食塩 5 g, 乳糖 5 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0）50 ml に接種し、Fig 1 の手順

Fig. 1 Scheme for the isolation of psychrotrophic coli-aerogenes bacteria

によって低温性大腸菌群の菌株を分離した。水試料は500 ml をミリポアフィルター (Type HA pore size 0.45 μ) でろ過し、そのフィルターを乳糖ブイオン 50 ml に接種した。接種した乳糖ブイオンを5°で10日間増菌培養した後、BGLB 発酵管に移植し、30°で24~48時間培養し、ガス産生をみたものをEMB 寒天培地に画線し、30°で24~48時間培養した。そこで出現した低温性大腸菌群とみられる集落を釣菌し、これを乳糖ブイオン発酵管に移植し、30°で24~72時間培養し、ガス産生

をみた場合に、これをブドウ糖ブイオン (ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, 食塩 5 g, ブドウ糖 10 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0) に移植し、5°で培養し、発育の有無を調べた。また一方、乳糖ブイオンから普通寒天斜面培地 (ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, 食塩 5 g, 寒天 13 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0) に移植し、30°, 24時間培養し、グラム染色試験とチトクロムオキシダーゼ試験を行なった。それらの結果、グラム陰性の桿菌で、チトクロムオキシダーゼ陰性であり、5°で7日以内に明瞭な発育を示したものを低温性大腸菌群菌株とみなした。

生物学的性状の検査法

培養試験の接種菌としては、ブドウ糖ブイオンに30°で24時間培養したものを用いた。性状試験における培養は特記しない限り30°で行なった。

5°における発育試験: ブドウ糖ブイオンに接種し、シャープ電機製の循環式電子恒温槽を用い5°で培養した。

37°, 40°, 42°の発育試験: ブドウ糖ブイオンに接種し、恒温水槽を用い24時間培養した。

IMViC 試験: 佐伯ら²⁾の記載した方法によった。

運動性試験: SIM 培地 (栄研) を用いた。

ゼラチン液化試験: ゼラチン培地 (ポリペプトン10g, 肉エキス 5g, 食塩 5g, ゼラチン 200g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0) を用い、20°で30日間培養観察した。

硝酸塩還元試験: IN ペプトン培地 (栄研) を用い、迅速法によった。

チトクロムオキシダーゼ試験: Kovacs⁶⁾の方法によった。

実験結果と考察

分離菌株の群別

北秋川・御岳沢などの山岳地における土壌、川底の泥

Table 1. Grouping of the Psychrotrophic Coli-aerogenes Bacteria Isolated from Soil, Mud and Water

Group	IMViC type	Motility	Gelatine liquefaction	No. of isolates			
				Soil	Mud	Water	Total
I	- - + +	+	+	23	18	3	44
II	- - + +	-	-	5	0	0	5
III	- - + +	-	+	0	1	0	1
IV	- - + +	+	-	0	0	2	2
V	- + - +	+	-	2	5	4	11
VI	- + - +	-	-	1	2	0	3
VII	- + + +	+	-	2	0	0	2
VIII	- - + -	+	-	1	0	0	1
IX	+ + - -	-	-	0	1	0	1
X	+ + - +	+	-	0	0	1	1
XI	- + + -	-	-	0	0	1	1
Total				34	27	11	72

土、水および住宅地などの土壌から Fig. 1 の術式によって低温性大腸菌群の72菌株を分離した。これらの菌株はいずれも硝酸塩を還元することをみとめた。さらに、IMViC 試験、運動性およびゼラチン液化性によって、

これらの菌株を Table 1 に示すように I ~ XI 群に群別した。この中で、I 群すなわち IMViC 型が - - + + で、運動性+、ゼラチン液化+のものがとくに多く過半数を占めていた。

Table 2. Isolation of Various Groups of Psychrotrophic Coli-aerogenes Bacteria in the Mountain Area

Date	Station		No. of isolates of each group		
	Location	No.	Soil	Mud	Water
Nov. 11 1971	The upper stream of the Kita-akikawa, a branch of the River Tama	1	I-1, II-3, V-1	I-5	I-1
		2	II-2	I-2	I-1
		3	Negative	I-1	Negative
	The mid-stream of the Kita-akikawa	4	Negative	VI-2, IX-1	I-1, XI-1
		5	I-4	V-1	IV-2, V-2
		6	I-2	V-1	V-2, X-1
Dec. 9 1971	The source of the Mitake-sawa, a branch of the River Tama	7	I-1	V-2	
		8	I-3	I-1	
		9	I-1	Negative	
		10	I-3	Negative	
		11	I-6	I-2, III-1	
	The upper stream of the Mitake-sawa	12	Negative	Negative*	
		13	Negative	I-2	
		14	I-2	I-2, V-1**	
		15	Negative	Negative	
		16	Negative	I-3	

* The bottom mud of the Ayahiro Falls.

** The bottom mud of the Nanayo Falls.

Table 3. Isolation of Various Groups of Psychrotrophic Coli-aerogenes Bacteria from Soil Samples in Residential Area

Station		No. of isolates of each group
No.	Location	
1	Riverside bank, Setagaya-ku, Tokyo	Negative
2	Riverside bank, Setagaya-ku, Tokyo	Negative
3	Pine wood, Setagaya-ku, Tokyo	Negative
4	Roadside, Setagaya-ku, Tokyo	VII-2
5	Garden, Setagaya-ku, Tokyo	V-1, VI-1
6	Garden, Minato-ku, Tokyo	Negative
7	Garden, Meguro-ku, Tokyo	Negative
8	Garden, Kawasaki	Negative
9	Grassplot, Zushi	VIII-1
10	Grassplot, Zushi	Negative
11	Garden, Zushi	Negative
12	Wood, Fujisawa	Negative
13	Roadside, Kamakura	Negative

Table 4. Growth of the Psychrotrophic Coli-aerogenes Isolates at 5, 37 and 40°C

Group	No. of strains	Growth at 5°C within			Growth at 37°C		Growth at 40°C	
		1~2 days	3~4 days	5~7 days	+	-	+	-
I	44	26	14	4	44	0	0	44
II	5	0	3	2	5	0	0	5
III	1	1	0	0	1	0	0	1
IV	2	0	0	2	2	0	0	2
V	11	2	8	1	9	2	1	10
VI	3	0	2	1	3	0	0	3
VII	2	2	0	0	2	0	0	2
VIII	1	0	1	0	1	0	1	0
IX	1	0	1	0	1	0	0	1
X	1	0	0	1	1	0	0	1
XI	1	0	1	0	1	0	0	1
Total	72	31	30	11	70	2	2	70

Figures represent number of strains

各菌群の分離状態

山岳地における各菌群の分離状態を Table 2 に示した。調査点 1~3 (水温 7.0°) は北秋川の上流で、ヒトの生活による汚染はない地点とみなされる。ここでは、土壌から I, II, V 群が、川底の泥土と水からは I 群のみが検出された。調査点 4~6 (水温 8.0~8.7°) は北秋川の中流であるが、土壌から I 群のみ、泥土、水からは I, IV, V, VI, IX, X, XI 群が分離された。御岳沢の水源方面の調査点 7~11 (水温 8.3°) はヒトによる汚染はない地点とみられるが、5 か所とも土壌からは I 群のみが検出され、川底の泥土では I 群のほか、V, III 群もみられた。調査点 12 のあやひろの滝の滝つぼ (水温 5.0°) では分離できなかった。また、13, 15, 16 の調査点の土壌からは検出されなかった。しかし、水中泥土の試料では、調査点 13 (水温 4.2°) で I 群、調査点 14 (七代の滝の滝つぼ、水温 3.0°) で I および V 群、調査点 16 (水温 6.0°) で I 群が検出された。住宅地の土壌からの各菌群の分離状態を Table 3 に示した。住宅地などの 13 調査点の土壌試料では概して検出率が低く、4, 5, 9 の 3 か所のみで検出されたが、山岳地に多くみられた I 群は分離されなかった。

各菌群の低温、高温における発育

各菌群の菌株を 5°, 37°, 40°, 42° で発育試験を行なったところ、Table 4 の結果が得られた。試験菌 72 株の中で、31 株は 5° 培養で 1~2 日の中に明瞭な発育を示した。とくに I 群についてみると大半の菌株が 1~2 日以内によく発育した。また今回の分離菌株のほとんどすべてが 37° で発育した。しかし、40° では反対にほとんどすべての菌株は発育しなかった。また 42° で発育した菌株はみられなかった。佐伯ら²⁾ が鮮魚から分離した菌

株の多くは 37° で発育しなかったのであるが、この点で今回の自然界からの分離菌株は異なっている。

Fig. 1 に示したように、乳糖ブイヨンを用い、5° で 10 日間、低温性大腸菌群の選択増菌を行ない、これを直接 BGLB 発酵管に移植する術式を用いることによって、山岳地の土壌、川の泥土、水などから比較的容易に低温性大腸菌群菌株を分離し得ることがわかった。そして、むしろ市街地、住宅地などの土壌試料で検出率が低いという結果が得られた。本研究によると、低温性大腸菌群は山岳地に広く分布しており、土壌、川底の泥土などは生息場所と考えられる。したがって、これらの細菌はたえず水で運ばれ、河川の下流、都市の下水などにもきわめて広く分布しているものと考察される。

要 約

低温性大腸菌群の自然界における生息場所を明らかにする目的で、東京都の多摩川上流、北秋川および御岳沢の山岳地において、土壌、川底の泥土、水から菌株の分離を試みた。また住宅地域の土壌についても調べた。試料を乳糖ブイヨンに接種し、5° で 10 日間、選択増菌培養し、これを BGLB 発酵管に移植し、30° で培養し、ガスを産生したものから EMB 培地で菌株を分離した。72 菌株を分離し得たが、IMViC 型、運動性、ゼラチン液化性により I~XI 群に群別された。その中の 44 株は I 群すなわち IMViC 型 - - + + で、運動性 +、ゼラチン液化 + のものであった。山岳地における 16 調査点の中の大部分において、土壌、川底泥土、水などから I 群を中心に各種菌群の低温性大腸菌群菌株が分離された。住宅地の土壌試料では検出率が低かった。分離菌 72 株の中で、31 株は 5° で 1~2 日以内に明瞭な発育を示した。また今回の分離菌株のほとんどは 37° で発育し、40° で

発育しなかった。

低温性大腸菌群は山岳地の土壌，川底の泥土，水などに広く分布していることが明らかにされた。

文 献

- 1) Panes, J. J., Thomas, S. B: J. appl. Bact. 31, 420 (1968).
- 2) 佐伯和昭，堀江 進，慶野一夫：食衛誌. 12, 95 (1971).
- 3) 山口静夫：国民衛生 3, 609 (1926).
- 4) 玉置周介：福岡医科大学雑誌 21, 257 (1928).
- 5) 寺本嘉範：千葉医学会雑誌 9, 313 (1931).
- 6) Kovacs, N.: Nature No. 4535, P. 703 (1956).