EC テストにおけるガス非産生の大腸菌のギ酸形成性

(昭和 49 年 12 月 26 日受理)

金井美恵子^{*1} 内野晴美^{*1} 酒庭清子^{*1}
角野 猛^{*2} 宮沢文雄^{*1}Formation of Formic Acid by Gas Negative *E. coli* Strains in EC TestMieko KANAI, Harumi UCHINO, Kiyoko SAKENIWA,
Takeshi SUMINO and Fumio MIYAZAWA(*¹Zissen Women's University: Shibuya-ku, Tokyo; *²Kōriyama Women's
College: Kōriyama-shi, Fukushima)

Some strains of *E. coli* type I which produce no gas in EC medium at 44.5°C were detected from the human and animal feces. The average rate of detection frequency of these bacteria was about 10% among the total *E. coli* type I isolates.

The biochemical pattern of carbohydrate metabolism of these bacteria was investigated using nutrient broth containing formic acid, pyruvic acid, acetic acid or α -ketoglutaric acid, each of which is supposed to be intermediate compound in dissimilation pathway. Gas formation at 44.5°C was observed only in the broth containing formic acid.

In the lactose broth, formic acid was not produced by these bacteria at 44.5°C, whereas it was produced by the typical *E. coli* I strain.

From these results it is conceivable that the formic acid formation from pyruvic acid by the said atypical *E. coli* I strain may be inhibited at 44.5°C.

On the other hand *E. coli* type II and III bacteria almost failed to produce formic acid from pyruvic acid even at 37°C.

(Received December 26, 1974)

食品衛生の分野における便汚染指標菌としての大腸菌群の検査法には、BGLB 培地を用いる発酵法とデソキシコレート培地を用いる平板法が広く採用されており、一方、fecal type の *E. coli* I 型を他の大腸菌群と区別するために、Hajna, Perry ら¹⁾の44.5°C培養による EC テスト法が採用されている。

しかし、ヒトおよび動物の腸内細菌を検討する間に、*E. coli* I 型菌として分類される菌の中に、44.5°C培養による EC テストで発育はしてもガスを産生しない菌株の存在することを認めた。

そこで、このガスを産生しない *E. coli* I 型菌を中心に Coli-Aerogenes Subcommittee²⁾ という EC テストで発育のみられない *E. coli* II 型および *E. coli* III 型、さらに EC テストでガスを産生する *E. coli* I 型菌について、乳糖代謝に伴うギ酸形成能を比較検討した

ので報告する。

実験方法

1. EC テストでガス非産生の *E. coli* の分離

ヒトおよびブタ、メンヨウ、ヤギ、ラット、ウマの便を生理食塩水で稀釈、デソキシコレート培地に混釈接種し、37°C、24時間培養後、赤色集落のみを釣菌して EMB 培地で再分離を行った。分離菌は、乳糖ブイオンで酸およびガス産生能を確認するとともに、EC 培地を用いた 44.5°Cにおける発育およびガス産生能、IMViC 反応、チトクロームオキシダーゼ反応、カタラーゼ反応、硝酸塩還元性、運動性などの生物学的性状を検討した³⁾。

2. 乳糖および中間代謝物の分解

乳糖分解能については、供試培地として炭研製乳糖ブイオンおよび EC 培地を用い、ダーラム管を入れた試験管中で、供試菌の 37、40および44.5°C培養における酸ならびにガス産生能を検討した。

中間代謝物からのガス産生能については、普通ブイヨ

*¹ 実践女子大学：渋谷区東 1-1-11

*² 郡山女子短期大学：郡山市開成 3 丁目

Table 1. Incidence of Gas-negative Strains in EC Test Among *E. coli* Type I Isolates

Materials	Gas-negative strains/ Total <i>E. coli</i> type I isolates	%
Man	5 ^{a)} /161 ^{a)}	3.2
Swine	18/224	8.1
Others	24/108	22.2

^{a)} Figure shows number of strains

ンにピルビン酸 (和光純薬製), ギ酸, 酢酸 (以上キンダ化学製), α -ケトグルタル酸, オキサロ酢酸 (以上東京化成製) をそれぞれ 0.01 M の濃度に添加し, これに供試菌を接種し, 37 および 44.5°, 24時間培養後のガス産生能を検討した.

3. ギ酸の分解活性

スミス発酵管を用い, pH 別および温度別にギ酸分解活性を検討した. すなわち, 普通ブイヨンに Sørensen のリン酸緩衝液を 1/15 M に添加し, ガラス電極 pH メータを用いて pH を調節した. これに, 0.05 M のギ酸を加え, 37°, 36時間培養を行い, ガス量を測定するとともに, 栄研製標準寒天培地により菌数を算定した.

4. ギ酸形成能

普通ブイヨン 100 ml 中に 1%乳糖を添加し, *E. coli*

I, II, III, および EC テストでガスを産生しない *E. coli* I 型菌のそれぞれについて乳糖からのギ酸形成能を検討した.

著者らの実験において, 乳糖代謝に伴い, 培地が酸性に傾くと同時にギ酸分解が始まると考えられたため, ギ酸を最もよく捕捉する目的で, 6時間培養時にギ酸の定量を行った.

ギ酸の定量法は, 培養液 50 ml について水蒸気蒸留を行い, 留液を 500 ml とし, 水酸化バリウム, 希硫酸を加えて培地中の非特異的な還元物質を沈殿させ, ガラスフィルター (G3) にてろ過を行った. 次に, 衛生試験法⁴⁾に準じ, ろ液に塩化第二水銀を加えて 100°の温浴上で加熱し, 生じた沈殿を重量既知のガラスフィルター (G4) にてろ過をした. 次に 105°, 30分乾燥後, 重量を測定し, 常法⁴⁾に従ってギ酸量を求めた. 対照実験におけるギ酸回収率は, 約87%であった. 供試々薬は, キンダ化学製特級試薬を使用した.

実験成績

1. EC テストでガス非産生の *E. coli* の分離

IMViC 反応その他生物学的性状から *E. coli* I 型に同定されたもののうち, EC テストでガス非産生の菌株の比率は, ヒトからの分離菌161株中, 5株 (約3.1%), ブタでは224株中, 18株 (約8.0%), その他の動物からは108株中, 24株 (約22.2%) 検出され, 全体の平均は

Table 2. Gas Formation Activities of the *E. coli* I Organisms at Various Temperature of Incubation

Strains	Temperature of incubation					
	37°C		40°C		44.5°C	
	LB	EC	LB	EC	LB	EC
80 ^{a)}	G. A	G. A	G. A	G. A	A	A
85 ^{a)}	G. A	G. A	G. A	G. A	A	A
339 ^{b)}	G. A	G. A	G. A	G. A	G. A	G. A

Incubation period, 24 hr: LB, lactose broth; EC, EC medium; G, gas formation; A, acid formation

^{a)} Gas negative *E. coli* I strain in EC test.

^{b)} Gas positive *E. coli* I strain in EC test.

Table 3. Gas Formation from Intermediate Compounds in the Dissimilation Process of Lactose

Strains	Formic acid		Pyruvic acid		Acetic acid		α -Ketoglutaric acid		Oxalacetic acid		Control	
	37°C	44.5°C	37°C	44.5°C	37°C	44.5°C	37°C	44.5°C	37°C	44.5°C	37°C	44.5°C
80 ^{a)}	+	+	+	—	—	—	—	—	+	trace	—	—
85 ^{a)}	+	+	+	—	—	—	—	—	+	trace	—	—
339 ^{b)}	+	+	+	+	—	—	—	—	+	trace	—	—

Basal medium, nutrient broth; incubation period, 24 hr

^{a), b)} See Table 2.

Fig. 1. Effect of pH on the growth and formic hydrogenlyase activities of *E. coli* I organisms

80, 339, See Table 2 Condition of incubation temperature, 37°C; Concentration of formic acid, 0.05 M in phosphate buffernutrient broth.

Fig. 2. Effects of incubation temperature on the growth and formic hydrogenlyase activities of *E. coli* I (No. 80) strain

Concentration of formic acid, 0.05 M in phosphate buffer-nutrient broth.

約10%であった (Table 1).

2. 乳糖および中間代謝物の分解

Table 2 に示す No. 80, 85 の 2 菌株は, EC テストを用いた 44.5° の培養においてガスを産生しない菌であるが, これらと, EC テストにおいてガスを産生する No. 339 について, 乳糖ブイオンによりガス産生能を比較検討した. 37, 40° ではいずれの菌株もガスおよび酸を産生したが, 44.5° では No. 80 および 85 においては酸のみが産生された. また, EC テストでのガス産生試験でも同様な結果が得られた (Table 2).

乳糖代謝の中間代謝物を添加した際の成績を Table 3 に示した. 対照培地である普通ブイオンではガス産生は見られないが, ギ酸を添加したものでは, 37°, 44.5° の両培養温度において, いずれの供試菌株においても十分なガス産生が認められた. ピルビン酸を添加した場合, 37° ではいずれの菌株でもガス産生を認めた. 44.5° では No. 80, 85 はガスを産生しなかったが, EC テストでガ

Table 4. Formic Acid Formation from Lactose by *E. coli* Strains

Strains	Formic acid (mg/100 ml)	
	37°C	44.5°C
80 ^{a)}	10.34	0
80	10.92	5.46
339 ^{b)}	13.68	8.68
347	0.59	—
401	9.47	13.68
404	0.44	—

Incubated for 6 hr in 1% lactose-nutrient broth

^{a), b)}: See Table 2.

80, restored strain of No. 80; 347, *E. coli* III isolated from feces; 401, *E. coli* I isolated from raw milk; 404, *E. coli* II isolated raw milk.

ス産生菌である339はガスを産生した. 酢酸および α -ケトグルタル酸を添加した場合では, 両温度条件で3菌株ともガスを産生しなかった. オキサロ酢酸を添加した場合には, 37° では3菌株ともガスの産生を示したが, 44.5° ではいずれもこん跡程度のガス量であった (Table 3).

3. ギ酸の分解活性

ギ酸放水素酵素の最適 pH を検討するためブイオン中にギ酸を添加し, リン酸緩衝液で pH を調節して, 接種菌の発育状態とガス産生との関係をみた. 菌の発育状態は, pH 7.0 において最も良好であったがガスの産生は全くみられなかった. pH 5.6 では供試したすべての菌においてガス量は最大値を示した (Fig. 1).

培養温度については, 37から 44.5° でほぼ同量のガス

産生が見られたが, 菌は 37° に培養された際に旺盛な発育が認められることから, 最適温度は 44.5° 付近にあるものと考えられた (Fig. 2).

4. ギ酸形成能

EC テストで発育をするが, ガスを産生しない菌, すなわち供試菌中の No. 80 では Table 4 に示すとおり, 乳糖ブイヨン中, 37°, 6 時間培養において, 100 ml 当たり 10.34 mg のギ酸の生成がみられた. 44.5° では, ギ酸の生成は全く認められなかった. これに対して, EC テストでガスを産生する No. 339 および 401 (牛乳からの分離菌株) では, 37° および 44.5° の温度条件ではほぼ同量のギ酸形成が行われた. また, No. 80 の菌株は, 継代培養を重ねるに従って, 44.5° でガス産生能を回復した. これを 80' として同様に検討してみると, 37° 培養では 10.92 mg, 44.5° 培養で 5.46 mg とわずかながらギ酸形成が認められるようになった. 44.5° で発育不能な *E. coli* II 型および *E. coli* III 型菌では, 37° 培養時のギ酸形成はそれぞれ 0.44, 0.59 mg で, *E. coli* I 型菌よりはるかに少ない値を示した.

考 察

現在, 生食用カキの大腸菌検査培地^{5), 6)}として採用されている EC 培地を用い, 動物糞便由来の *E. coli* の性状を検討する間に, 典型的 *E. coli* I 型の生物学的性状を有しながら, EC テストではガス非産生の菌株が, 分離菌の約 10% 存在する事実を認めた.

E. coli の EC 培地, 乳糖ブイヨン, BGLB 培地などにおけるガス産生の代謝経路は, 乳酸形成と同時にアセチルリン酸と二酸化炭素を伴った経路⁷⁾や変則的な TCA 回路⁸⁾も存在するといわれるが, 主な経路としては, ビルビン酸がギ酸および酢酸に加水分解され, さらにギ酸は, ギ酸放水素酵素 (*formic hydrogenlyase*) によって二酸化炭素と水素が産生される. これがダーラム管などに捕捉されるものと考えられる. 著者らは, これら中間代謝物からのガス産生性を検討したが, 典型的 *E. coli* I 型菌は 37, 44.5° の両培養温度条件下で, ビルビン酸, ギ酸のいずれからもガス産生を認めた. しかし, EC テストでガス産生能を欠く菌では, 44.5° ではビルビン酸からガスは産生されず, ギ酸からはガスが産生され, ギ酸放水素酵素は完全に活性を維持していると判断された. Blackwood ら⁹⁾は pH 6.2 での乳糖からの生成ギ酸量は, pH 7.8 に比較しはるかに少ないと報告している. 著者らの実験では, *E. coli* I 型菌のギ酸放水素酵素の最適 pH は, 産生ガス量および菌の増殖度から判断し, pH 5.6~5.8 の範囲であり, 最適温度は 44.5° 付近にあると推察され, Blackwood らの報告を裏づけるものであった.

ビルビン酸からギ酸・酢酸を生成する酵素の活性度については, 37° および 44.5°, 6 時間培養後のギ酸量を定量し検討した. その結果, 典型的 *E. coli* I 型菌は, 両

培養温度条件において生成ギ酸量に極端な差は認められなかった. EC テストでガスを産生しない *E. coli* I 型菌では, 37° 培養においてギ酸形成がみられるが, 44.5° でギ酸は形成されなかった. また, *E. coli* II 型および *E. coli* III 型では, 37° においても典型的 *E. coli* I 型に比較しギ酸量はきわめて少量であった. 一般にこのビルビン酸分解酵素は, 無機リン酸存在のもので, アセチルリン酸およびギ酸に分解し, アセチルリン酸はリン酸が ATP として取り入れられる一方, 残基は酢酸になることが明らかにされ, この間のアセチルリン酸形成には CoA および TPP が関与する可能性も指摘されている¹⁰⁾. 44.5° における前述のガス産生能を欠く *E. coli* I 型菌が, これらの過程のいずれにおいて不活性化されてかは推測の域を出ないが, ビルビン酸分解酵素によるギ酸形成が 44.5° で阻害されているものと考えられる.

一方, 春田¹¹⁾, 高倉¹²⁾の報告においては, デソキシコレート培地から得られたガス非産生性の *E. coli* I 型菌を検出し, しばしば培地に継代することによってガス産生能を回復するという. 著者らも同様な知見を得ており, ガス産生能の回復と同時にギ酸形成もみられるようになることを明らかにした.

また, 44.5° で全く発育の認められなかった *E. coli* II 型や *E. coli* III 型菌においてはギ酸生成は非常に少なく, *E. coli* I 型菌とは本質的に異なるものと考えられた.

要 約

- 1) 動物糞便中から, EC テストでガスを産生しない *E. coli* I 型菌が, 総分離菌の約 10% に存在するのを認めた.
- 2) EC テストでガス非産生の *E. coli* I 型菌はビルビン酸からギ酸, 酢酸を形成する酵素が不活性化されたと考えられる.
- 3) これらの菌株は継代培養を重ねることにより, ガス産生が認められることから, 本来典型的 *E. coli* I 型に帰属するものと考えられた.
- 4) 44.5° において発育の認められない *E. coli* II 型および *E. coli* III 型のギ酸形成は, 37° 培養において *E. coli* I 型に比較しはるかに少なかった.

実験に際し, 種々御指導頂きました国立衛生試験所山羽 力博士に感謝いたします.

本論文の要旨は, 第 28 回日本食品衛生学会において発表した.

文 献

- 1) Hajna, A. A., Perry, C. A.: Am. J. Public Health, 33, 550 (1943).
- 2) 坂崎利一: モダンメディア, 5, 169 (1959).
- 3) 厚生省監修: “食品衛生検査指針”, 日本食品衛生協会 (1973).
- 4) 日本薬学会編: 衛生試験法注解, 194 (1973).

-
- 5) 渡辺昭宜, 友野加智子, 伊藤蓮太郎: 食衛誌, **9**, 481 (1968).
 - 6) 鈴木 昭: メディヤサークル, **47**, 359 (1963).
 - 7) Krebs, H. A.: Biochem. J., **31**, 2095 (1937).
 - 8) Ajl, S. J.: Bacteriol. Revs., **15**, 211 (1951).
 - 9) Blackwood, A. C., Neish, A. C., Ledingham, G. A.: J. Bact., **72**, 497 (1956).
 - 10) Rainbow, C., Rose, A. H.: Biochemistry of Industrial Micro-organisms, Academic press, London and New York (1963).
 - 11) 春田三佐夫, 三雲隆三郎, 嶋田幸治: 都衛研年報, **VI**, 122 (1956).
 - 12) 高倉剛二ら: 第 8 回日本公衆衛生学会総会 (1953).