冷凍食品に分布する腸球菌の種類

(昭和 51 年 9 月 24 日受理)

堀 江 進* 安 藤 広 志* 阿 部 正 明*

Distribution of Enterococcal Species in Commercial Frozen Foods

Susumu HORIE, Hiroshi ANDO and Masaaki ABE

(Tokyo University of Fisheries: 5-7, Konan 4-chome, Minato-ku, Tokyo)

Enumeration and isolation of enterococci in 72 samples of commercial frozen foods were carried out by using AE (Azide Esculin) agar plates. Among 561 strains which isolated from 61 samples, 447 strains from 58 samples were identified with enterococci by the completed test: gram positive cocci, negative catalase test, growth in 6.5% Sodium chloride glucose broth, and final pH in glucose broth between 4.0 and 4.4. These enterococcal isolates were divided into the species according to the "MSAG" tests, fermentation of mannitol, sorbitol and arabinose, and liquefaction of gelatine. Ninety five strains (21.3%) of *Streptococcus faecalis* were recovered from 32 samples, 102 (22.8%) of *S. faecalis* subsp. *liquefaciens* from 32 samples, 212 (47.4%) of *S. faecium* from 40 samples, 15 (3.4%) of *S. durans* from 7 samples, 23 (5.1%) of atypical forms were isolated from 14 samples. In order to investigate the result of identification tests mentioned above, 133 of the enterococcal isolates were examined by the 6 additional tests: fermentation of glycerol, melezitose and melibiose, nutritional requirement of folic acid, reduction of triphenyltetrazolium chloride, and resistance to 0.04% potassium tellurite. The results showed that most of the enterococcal species which had been primarily determined by the "MSAG" tests were approved after the additional 6 tests.

(Received September 24, 1976)

腸球菌は食品の凍結ならびに冷凍貯蔵中にほとんど死滅しない点で、冷凍食品の汚染指標として優れている。またその検査法もほぼ確立し、実用の域に達しているものと考えられる。冷凍食品における大腸菌群と腸球菌の菌数の比較については Larkin ら^{1)~4)}をはじめ多数の研究があり、堀江ら⁵⁾も近年これに関し報告している。しかし冷凍食品に含まれる腸球菌の種類についての検討は少ない。

Kereluk ら⁶⁾は市販の冷凍肉パイの腸球菌分離菌株を調べ、その大部分は *Streptococcus faecalis* および *S. faecalis* var. *liquefaciens* によって占められ、*S. faecium* は少数であったと報告している。Raj ら⁷⁾は冷凍水産食品から分離された腸球菌株を調べたところ、*S. faecalis* var. *liquefaciens* が多数を占め、*S. durans* がこれにつぎ、*S. faecium* は極めて少数であったと述べている。さて、これらの腸球菌の測定あるいは分離に

は Difco Manual⁸⁾に記載のある "Azide Dextrose Broth" (AD) と Litsky ら⁹⁾の "Ethyl Violet Azide" (EVA) 培地を組み合わせた AD-EVA 法、すなわち、液体培地が用いられている関係から、腸球菌フローラを形成する菌種の割合を明確に示すものとはいえない。今回著者は AE 寒天平板培地¹⁰⁾を用いて市販冷凍食品の腸球菌を測定し、その集落を釣菌し、腸球菌フローラを形成する菌種について観察を試みた。

実験方法

冷凍食品検体

東京都内および横浜市内の百貨店において 1973 年 12 月から 1974 年 11 月の間、72 検体を購入し実験に供した。

腸球菌の測定

検体の容器包装の表面を 70% アルコール綿でぬぐい、その 25 g を滅菌したホモジナイザーに採取し、滅菌リン酸緩衝食塩水¹¹⁾ 225 ml を加え 2 分間細砕したものを 10 倍希釈液とし、さらに常法により 100 倍希釈液

* 東京水産大学：東京都港区港南 4-5-7

Table 1. The Differential Characters of Enterococci Applied in the Present Study

	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. durans</i>
Acid from { Mannitol	+	+	+	—
Sorbitol	+	+	—	—
Arabinose	—	—	+	—
Liquefaction of gelatine	—	+	—	—
Acid from { Glycerol	+	+	—	—
Melezitose	+	+	—	—
Melibiose	—	—	+	+
Requirement of folic acid	—	—	+	+
Reduction of tetrazolium	+	+	—	—
Resistance to 0.04% tellurite	+	+	—	—

を得た。10 倍希釈液 1 ml を AE 寒天培地に混合し、また 10 倍および 100 倍希釈液の 0.1 ml を AE 平板培地の表面に塗抹し、いずれも 45° で 24 時間培養した。その結果、黒色の“Halo”を有する定型的な集落を数えて推定腸球菌数を求めた。なお各段階 2 枚ずつの平板培地を用い平均値を出した。

腸球菌菌株の分離

1 検体当たり、腸球菌の定型的集落と認められるもの 10 個（またはそれ以下）を釣菌し、堀江ら¹⁰⁾の方法により完全試験を行った。

“MSAG” (Mannitol, Sorbitol, Arabinose, Gelatine)

試験による菌種の同定

完全試験陽性の全菌株について、マンニット、ソルビット、アラビノース分解ならびにゼラチン液化の 4 項目試験を行い Table 1 により同定した。

生物学的性状の試験法

菌種の同定に必要な下記の性状試験を行った。培養試験において、特記しない限り培養温度は 37° とし、ブドウ糖ブイヨン（ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, ブドウ糖 10 g, 塩化ナトリウム 5 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0）に 24 時間培養したものを接種菌とした。

6.5% 食塩加ブドウ糖ブイヨンにおける増殖： 6.5% 食塩加ブドウ糖ブイヨン（ポリペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, ブドウ糖 10 g, 塩化ナトリウム 65 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0）を用いた。

終末 pH の測定：前記ブドウ糖ブイヨンに 4 日間培養後 BCG（ブロムクレゾールグリーン）試験紙で pH が 4.0～4.4 であるか否かを試験した。

炭水化物分解試験：炭水化物分解試験用培地（ポリペプトン 10 g, 酵母エキス 3 g, 塩化ナトリウム 5 g, BTB（ブロムチモールブルー）0.024 g, 炭水化物 10 g, 蒸留水 1000 ml, pH 7.4）に接種し、48 時間培養後、培地の黄変により酸の生成を観察した。

ゼラチン液化試験：Deibel ら¹²⁾の培地を改変した培

地（バクトトリプトン 10 g, 酵母エキス 5 g, リン酸二カリウム 5 g, 塩化ナトリウム 5 g, ブドウ糖 0.5 g, ゼラチン 150 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0）を用い、37° 7 日間培養後、冷却し、凝固の有無を観察した。

TTC（トリフェニルテトラゾリウムクロライド）還元試験：Barnes¹³⁾の TG 培地を一部改変した培地（バクトペプトン 10 g, 極東牛肉エキス 10 g, 塩化ナトリウム 5 g, ブドウ糖 10 g, TTC 0.075 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 6.0～6.1）を用いた。培地を調製するには、ペプトン 1 g, 牛肉エキス 1 g, 塩化ナトリウム 0.5 g を 95 ml の蒸留水に溶解し、121°, 15 分間滅菌した。これに 115°, 10 分間滅菌した 20% ブドウ糖溶液 5 ml, 100°, 30 分間滅菌した TTC 1% 溶液 0.75 ml をそれぞれ無菌的に加え、中試験管に 5 ml ずつ無菌的に分注した。滅菌ピペットで菌液の 1 滴を本培地に接種し、24 時間培養後ブタノール 5 ml を加え、振とう後静置した。ブタノール層が赤色を呈した場合を陽性とした。

0.04% 亜テルル酸カリウム抵抗性試験：橋本¹⁴⁾の記載した培地を用い、4 日間培養し、増殖の有無を観察した。

葉酸要求試験：日水製薬（株）製の葉酸定量用培地を用いた。これに葉酸 10 μg/1000 ml 加えたものを基礎培地とした。これらの培地は小試験管に 2.5 ml ずつ分注し、121°, 5 分間滅菌して用いた。まず基礎培地に接種し、24 時間培養し、増殖したものを径 0.3 mm の白金線を用い、同基礎培地ならびに葉酸定量用培地に接種し、24～48 時間培養し、増殖の有無を比較した。

β 溶血性試験：“Blood Agar Base” (Difco) を用い、これにウマの脱線維素血液を 5% 量加えて調製した血液寒天を用いた。

実験結果と考察

推定腸球菌数の測定と完全試験

実験結果は Table 2 に示すとおりである。冷凍食品 72 検体において推定腸球菌数は 1 g 当たり、<10 が 12

Table 2. Enumeration of Enterococci in the Frozen Foods and Identification of the Isolates by "MSAG" Reactions*1

Frozen foods	No. of samples	Presumptive enterococcal counts g ^{*2}						Completed test		MSAG reactions								
								No. of strains tested	No. of strains positive	Typical					Atypical			
										<i>S. faecalis</i>	<i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. durans</i>	-	+	+		
		Below 10	10 to 10 ²	10 ² to 10 ³	10 ³ to 10 ⁴	10 ⁴ to 10 ⁵	Over 10 ⁵											
Shrimp	10		3*3	4	3			91	60	18	19	19	2				2	
Peeled shrimp	7		1	3	3			70	47	17	16	9	3				2	
Breaded shrimp	16	2	5	5	2	1	1	132	104	27	31	42	1	3				
Croquette	14	2	3	6	1	2		117	107	13	12	72	1	7				2
Breaded fish	8		2	4	1	1		73	65	12	11	32	8	1	1			
Breaded oyster	4	2	2					14	7			5			1	1		
Miscellaneous	13	6	2	2	3			64	57	8	13	33		2				1
Total	72	12	18	24	13	4	1	561	447	95	102	212	15	13	6	4		
									100*4	21.3	22.8	47.4	3.4	2.9	1.3	0.9		

*1 Fermentation of mannitol, sorbitol, and arabinose, and liquefaction of gelatine

*2 Determined by AE agar plate counts

*3 Figures represent numbers of samples

*4 %

検体, 10~10² が18検体, 10²~10³ が24検体, 10³~10⁴ が13検体, 10⁴~10⁵ が4検体, >10⁵ が1検体であった。72検体の中の61検体から561菌株を分離したが, その中で完全試験の結果腸球菌に同定されたものは58検体からの447株(79.7%)であった。すなわち AE 培地上の定型的集落の約80%は腸球菌に同定された。

“MSAG”試験による菌種の同定

腸球菌に同定された447株についてマンニット, ソルビット, アラビノース, ゼラチンの4項目試験の結果により第一次的に菌種の同定を行った成績をTable 2に示した。*S. faecium* が212株(47.4%)で最も多く, 40検体から分離されており, *S. faecalis* subsp. *liquefaciens* が102株(22.8%), *S. faecalis* が95株(21.3%)でこれにつぎ, いずれも32検体から分離され, これらの菌種で91.5%を占めた。そして *S. durans* は7検体から得られた15株(3.4%)にすぎなかった。また非定型菌株は14検体から分離された23株(5.1%)であった。また冷凍食品の種類別にみると, エビおよびむき身エビでは *S. faecium* の比率が比較的低く, これと反対にフライ類, 特にコロッケ類では *S. faecium* が圧倒的に多数を占めている点が目立っている。

“MSAG”試験による同定成績に対する検討

前述のように“MSAG”試験により全菌株についての菌種の鑑別を試みたわけであるが, さらに正確な菌種の同定を行うにはTable 1に示した他の6項目の試験が

必要であると考えられる。そこでTable 2に示した同定成績を吟味する目的で, “MSAG”試験で定型的性状を示した菌株の中から無作為に120株を選び, また非定型的性状の菌株の中から無作為に13株を選び, 合計133株について上記6項目の試験を行い, 結局10項目の試験結果によって再検討した。Table 1には鑑別特性として10項目を挙げたが, その各菌種の典型的特性の中で8項目以上を有するものをその菌種に同定することとした。なお, この他β溶血試験も行ったが全菌株が陰性であった。実験結果をTable 3に示した。“MSAG”において+-+-+を示し, *S. faecalis* に同定された24株についてみると, その中の19株は典型的性状を示し, また他の4株も8項目以上の特性を有するので *S. faecalis* に同定され, 1株のみが非定型株とされた。なお, “MSAG”で+-+--+を示し非定型とされていた1株が10項目の結果では *S. faecalis* に同定された。次に“MSAG”で++++の27株についてみると, 24株は典型的性状を示し, 他の3株を含めてすべて *S. faecalis* subsp. *liquefaciens* に同定された。“MSAG”で+-+-+, すなわち *S. faecium* に同定された61株について10項目試験の結果をみると, 53株は *S. faecium* に同定され, その中41株が典型的性状を示した。そして8株が非定型株とされた。これらの菌株はTTC還元ならびに亜硝酸塩抵抗性がいずれも陽性である点が注目される。この他“MSAG”試験では非定型に入れた

Table 3. Results of 10 Biochemical Tests Made for the Identification of 133 Enterococcal Isolates

Classification of the strains on the basis of MSAG reactions		Acid from			Liquefaction of gelatine	Acid from			Requirement of folic acid	Reduction of tetrazolium	Resistance to 0.04% tellurite	No. of strains	Identification of the strains after the 10 biochemical tests
		Mannitol	Sorbitol	Arabinose		Glycerol	Melezitose	Melibiose					
<i>S. faecalis</i> (24)	1	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	19	<i>S. faecalis</i>
	2	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	1	
	3	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	1	
	4	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	1	
	5	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	1	
	6	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	1	Atypical
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i> (27)	1	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	24	<i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i>
	2	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	2	
	3	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	1	
<i>S. faecium</i> (61)	1	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	41	<i>S. faecium</i>
	2	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	5	
	3	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	3	
	4	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	2	
	5	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	1	
	6	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	1	Atypical
	7	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	6	
	8	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	1	
	9	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	1	
<i>S. durans</i> (8)	1	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	7	<i>S. durans</i>
	2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1	
Irregular types (13)	1	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	4	<i>S. faecium</i>
	2	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1	
	3	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	1	
	4	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	1	Atypical
	5	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	2	
	6	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	1	<i>S. faecalis</i>
	7	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	2	<i>S. faecium</i>
	8	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1	
Total												133	

れたマンニト陰性の5株, アラビノース陰性の3株, ソルビット陽性の1株などが10項目試験の結果では *S. faecium* に同定された。“MSAG”で *S. durans* に同定された8株は10項目試験の結果でもすべて *S. durans* に同定された。

以上の成績によると“MSAG”試験で *S. faecalis*, *S. faecalis* subsp. *liquefaciens* および *S. durans* に同定された菌株のほとんどすべては10項目試験の結果においても変動がなかった。すなわち, これらの菌種に

ついては“MSAG”による同定試験の正確性が高いようである。これに対し, “MSAG”で *S. faecium* に同定された菌株においては10項目の結果, 非定型株とされたものが若干あり, また逆に“MSAG”で非定型株とされたものが, 10項目の結果では *S. faecium* に同定された例もかなりあった。

本研究の成績によると市販冷凍食品の腸球菌フローラにおいては, そのほとんどが *S. faecium* ならびに *S. faecalis* (*S. faecalis* subsp. *liquefaciens* を含む) に

よって占められており, *S. durans* は少なく, また同定困難な菌株の少ないことを知った。

要 約

市販冷凍食品の 72 検体について, AE (アザイド・エスクリン) 寒天平板培地を用いて, 推定腸球菌数を測定し, またその中の 58 検体から腸球菌 447 株を分離し得た。これらを “MSAG” 試験 (マンニット, ソルビット, アラビノースの発酵, ゼラチン液化) により同定したところ, *S. faecium* が 47.4% を占め, *S. faecalis* subsp. *liquefaciens* が 22.8%, *S. faecalis* が 21.3% で, *S. durans* は 3.4% であった。この同定成績を他の 6 項目の生化学的性状試験により吟味したところ, “MSAG” 試験による *S. faecalis* および *S. faecalis* subsp. *liquefaciens* などの同定はかなり正確であるが, *S. faecium* の場合には若干正確性の劣ることが示唆された。

文 献

- 1) Larkin, E.P., Litsky, W., Fuller, J.E.: Appl. Microbiol., **3**, 98 (1955).
- 2) Larkin, E.P., Litsky, W., Fuller, J.E.: *ibid.*, **3**, 102 (1955).
- 3) Larkin, E.P., Litsky, W., Fuller, J.E.: *ibid.*, **3**, 104 (1955).
- 4) Larkin, E.P., Litsky, W., Fuller, J.E.: Am. J. Pub. Health, **46**, 464 (1956).
- 5) 堀江 進, 山形 誠, 井上広志, 和泉 力: 食衛誌. **15**, 110 (1974).
- 6) Kereluk, K.: Appl. Microbiol., **7**, 324 (1959).
- 7) Raj, H., Wiebe, W.J., Liston, J.: *ibid.*, **9**, 295 (1961).
- 8) Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents, 9th ed. (1953).
- 9) Litsky, W., Mallmann, W.L., Fifield., C.W.: Am. J. Pub. Health, **43**, 873 (1953).
- 10) 堀江 進, 佐藤史郎, 森田 亨, 井上広志, 和泉力, 山形 誠: 食衛誌. **15**, 105 (1974).
- 11) 厚生省監修: 食品衛生検査指針—I p. 93 (1973) 日本食品衛生協会.
- 12) Deibel, R. H., Lake, D. E., Niven, C. F.: J. Bacteriol., **86**, 1275 (1963).
- 13) Barnes, E. M.: J. Gen. Microbiol., **14**, 57 (1956).
- 14) 橋本秀夫: メディヤサークル, No. 54, 9 (1964).