低温性大腸菌群細菌 *Rahnella aquatilis* の 山岳地土壤における分布

(昭和 60 年 2 月 4 日受理)

堀江 進^{*1} 柳田 恭彦^{*1} 佐伯 和昭^{*1}
平石 明^{*2} 張 娟娟^{*1}

Occurrence of *Rahnella aquatilis*, Psychrotrophic Coliforms, in Mountain Soils

Susumu HORIE^{*1}, Yasuhiko YANAGIDA^{*1}, Kazuaki SAHEKI^{*1}, Akira HIRAISHI^{*2}
and Kenken CHO^{*1}

(^{*1}Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries:
Konan 4, Minato-ku, Tokyo, Japan;

^{*2}Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University:
Fukazawa 2, Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

In recent taxonomical studies concerning psychrotrophic coliform organisms several new species such as *Rahnella aquatilis*, *Serratia fonticola*, *Enterobacter amnigenus*, *E. intermedium*, etc. were proposed and approved. Based on the new taxonomy, various coliform isolates from mountain soils were identified in this study. During the period from October through December, 59 soil samples were collected from various places in and around Mt. Mito, located at the Tokyo-Yamanashi prefectural border. Enumeration and isolation of coliform organisms were done by using desoxycholate agar and incubating at 30°C. Fairly low coliform counts, less than 10³ per g, were obtained from most samples. Among 182 coliform isolates, 61% were identified as *Rahnella aquatilis*, 17.6% *Citrobacter freundii*, 5.5% *Escherichia coli*, 3.8% *Serratia fonticola*, 2.7% *Klebsiella pneumoniae*, 1.6% *Enterobacter cloacae*, 0.5% *Enterobacter aerogenes* and 7.1% were not determined. Almost all strains of *R. aquatilis* failed to grow at 37°C, the majority of them showed negative arginine dihydrolase reaction, and approximately half of them produced gas from glycerol. *Rahnella aquatilis* organisms appear to account for a large proportion of the coliform flora in unpolluted mountain soils.

(Received February 4, 1985)

Key words: 低温性 psychrotrophic; 大腸菌群 coliform; *Rahnella aquatilis*; 山岳地土壤 mountain soil

^{*1} 東京水産大学: 東京都港区港南 4

^{*2} 東京都立大学: 東京都世田谷区深沢 2

牛乳や鮮魚を 5° 以下で冷蔵した場合に、増殖温度域のとくに低い大腸菌群細菌の増殖のみられることは佐伯ら¹⁾が報告している。また堀江ら^{2), 3)}はこの種の低温性大腸菌群細菌が自然界の土壌に広く分布しており、また市販のむき身かきに含まれていることを明らかにし、これら魚介類に存在する低温性大腸菌群細菌は自然界の土壌、水などに由来するものと推定している。その後平石ら⁴⁾はヒトの糞便並びに山岳地の土壌、水などから大腸菌群細菌を分離し、分類学的検討の結果、山岳地に分布する大腸菌群細菌フローラの中で最も多数を占めるものは *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* の諸属とは異なる特定の細菌群であることを指摘している。

また一方、近年における細菌分類学の急速な進展によって、大腸菌群関連の分野においても新しい菌属、菌種の登場をみるようになった。すなわち、Gavini ら⁵⁾により *Serratia fonticola* が、また Izard ら^{6), 7)}により *Rahnella aquatilis*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter intermedium* などの新菌種が命名されるなど低温性大腸菌群に含まれる種々の細菌の分類が確立されてきた。本研究ではこの新しい分類によって自然界特に山岳地土壌に分布する大腸菌群細菌フローラを再検討することとした。

実験方法

1. 試料の採取

東京都西多摩郡の三頭山周辺の森林において、1983年10月27日に21地点、同年11月10日に18地点、同年12月12日に20地点で表層の土壌試料を採取した。

2. 大腸菌群数の測定と菌株の分離

堀江ら²⁾の記載に準じて実施した。試料の各希釈液についてデソキシコレート寒天培地2枚を用い、定型的赤色集落の中から10個またはそれ以下を釣菌し、大腸菌群の確認試験を行った。

3. 供試標準菌株

大腸菌群に属する標準菌株 *Enterobacter cloacae* JCM 1232 (ATCC 13047), *Enterobacter aerogenes* JCM 1235 (ATCC 13048), *Enterobacter amnigenus* JCM 1237 (ATCC 33072), *Enterobacter intermedium* JCM 1238 (ATCC 33110) *Serratia fonticola* JCM 1242 (ATCC 29884), *Serratia plymuthica* JCM 1244 (ATCC 183), *Serratia liquefaciens* JCM 1245 (ATCC 27592), *Escherichia coli* JCM 1649 (ATCC 11775), *Citrobacter freundii* JCM 1657 (ATCC 8090), *Citrobacter diversus* JCM 1659 (ATCC 27156), *Levinea amalonatica* JCM 1661 (ATCC 25405), *Klebsiella pneumoniae* JCM 1662 (ATCC 13883), *Rahnella aquatilis* JCM 1683 (ATCC 33071) を用いた。これらの菌株は理化学研究所微生物系統保存施設から分譲されたものである。

4. 生物学的性状試験法

大腸菌群に同定された菌株について、10月及び11月に分離したものは1試料につき5株またはそれ以下、12月に分離したものは10株またはそれ以下を供試菌株とし、まず 41° における増殖試験を行い、陰性と陽性とに群別した。性状試験における培養温度は 41° 陰性の菌株では 30°, 41° 陽性の菌株は 35° とした。各培養試験には特記した場合を除いてブイヨン (ポリペプトン 10g, 肉エキス 5g, 食塩 5g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0) に 18~24時間培養した菌を接種した。

IMViC 試験, 硫化水素産生, チトクロムオキシダーゼ試験は佐伯ら¹⁾の方法によった。運動性及びゼラチン液化は Ball ら⁹⁾の方法によった。ツィーンエステラーゼは平石ら⁴⁾の記載した方法により10日間観察した。DNA 分解は DNA 培地 (栄研) を用いて、24時間培養後観察した。尿素分解はクリステンゼン尿素培地 (栄研) を用い、4日間培養し観察した。リシン及びオルニチンデカルボキシラーゼ, アルギニンジヒドロラーゼは Moeller Decarboxylase Base (Difco) を用い、普通寒天斜面培養菌を接種し、4日間培養し観察した。炭水化物からの酸産生には Barsiekow の培地 (ポリペプトン 10g, 食塩 5g, ブロムチモールブルー 0.024g, 炭水化物 10g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.0) を用い、2日間培養した。グリセリンからのガス産生には上記培地に寒天 10g を加えたものを用い、3日間培養後観察した。エスクリン分解には 0.1% エスクリン加ブイヨン (pH 7.4) を用い、4日間培養後 7% 塩化第二鉄溶液を加えて観察した。マロン酸利用にはマロン酸塩培地 (栄研) を用い、4日間培養した。酒石酸の利用にはジョルダン培地 (栄研) を用い2日間培養した。粘液酸の利用には坂崎¹⁰⁾の記載した Ellis らの培地を用い2日間培養した。

結果と考察

大腸菌群数の測定と菌株の同定

各土壌試料の推定大腸菌群数を測定し、菌株を分離し、その中大腸菌群に属することが確認された菌株について、これを 41° 増殖試験により陽性と陰性に群別し、それぞれについて菌種の同定を行った成績を Table 1 に示した。

また Table 1 に示した各菌種の採集日別分離菌株数を集計して Table 2 に示した。

Table 2 に示したように、10月と11月の調査では分離菌株の約 50% が *R. aquatilis* で最も多数を占め、これについて *C. freundii* が若干分離され、その他の菌種は少数であった。12月の調査では *R. aquatilis* が 85.2% を占めた。3回の調査を集計すると大腸菌群分離菌株の 61% は *R. aquatilis* であり、これについて *C. freundii* 17.6% で、*Enterobacter*, *Klebsiella* などの菌種はきわめて少数であった。

分離した *R. aquatilis* 111 株の性状を標準菌株

Table 1. Enumeration of Coliforms in Soils Collected from the Mountain Area and Identification of the Isolates

Date of sampling (1983)	No.	Station		Pre-sumptive coli-form count per g	Completed test		Identification test		
		Location	Above the sea (m)		No. of strains tested	No. of strains positive	No. of strains tested	Growth at Positive strains	41°C Negative strains
Oct. 27	1	Lake Okutama (Kawano)	700	<5					
	2	Lake Okutama (Kawano)	700	25	5	1	1	C*1.1*2	
	3	Mt. Iyo	800	170	10	3	3	K-1, Ec-1, C-1	
	4	Mt. Iyo	800	5	1	1	1	C-1	
	5	Mt. Iyo	850	50	10	5	5	C-1	R-2, N-2
	6	Mt. Iyo	900	10	2	2	2	C-2	
	7	Mt. Mitō	1,000	55	10	4	4	E-3, C-1	
	8	Mt. Mitō	1,100	320	10	10	5		R-5
	9	Mt. Mitō	1,150	15	3	3	3	E-1	N-2
	10	Mt. Mitō	1,200	45	9	5	5	E-3, C-1	R-1
	11	Mt. Tsukiyomi	1,000	260	10	10	5		R-5
	12	Mt. Tsukiyomi	1,050	20	4	2	2		R-2
	13	Mt. Tsukiyomi	1,100	60	10	8	5		R-5
	14	Mt. Tsukiyomi	1,100	20	4	4	4	N-1	R-3
	15	The summit of Mt. Tsukiyomi	1,147	25	5	5	5		R-5
	16	The Kazahari Pass	900	330	10	6	5	K-3	R-2
	17	The Kazahari Pass	850	70	10	9	5		R-5
	18	The Kazahari Pass	800	<5					
	19	The Kazahari Pass	800	40	8	2	2	Ec-1, N-1	
	20	Kazuma, the upper stream of the Minami-akikawa	700	30	6	4	4	C-4	
	21	Kazuma, the upper stream of the Minami-akikawa	700	5	1	1	1	E-1	
Nov. 10	22	Mt. Mitō	800	15	3	2	2		R-2
	23	Mt. Mitō	850	25	5	5	5	C-5	
	24	Mt. Mitō	850	240	10	10	5		R-5
	25	Mt. Mitō	900	<5					
	26	Mt. Mitō	950	5	1	0			
	27	Mt. Mitō	1,000	1,400	10	10	5	E-2, C-3	
	28	The Kazahari Pass	1,100	110	10	10	5		R-5
	29	The Kazahari Pass	1,100	5	1	1	1		R-1
	30	The Kazahari Pass	1,100	50	10	10	5		S-2, R-2, N-1
	31	Mt. Tsukiyomi	1,100	280	10	7	5		R-3, K-1, Ea-1
	32	Mt. Tsukiyomi	1,100	35	7	4	4		S-3, R-1
	33	The summit of Mt. Tsukiyomi	1,147	<5					
	34	The summit of Mt. Tsukiyomi	1,147	15	3	3	3	C-2	R-1
	35	Mt. Tsukiyomi	1,000	2,000	10	10	5		R-1, N-4
	36	Mt. Tsukiyomi	1,000	480	10	10	5		R-4, S-1
	37	Mt. Iyo	800	10	2	1	1		R-1
	38	Mt. Iyo	850	570	10	10	5	C-4, Ec-1	

Table 1. (Continued)

Date of sampling (1983)	No.	Station Location	Above the sea (m)	Pre-sumptive coli-form count per g	Completed test		Identification test		
					No. of strains tested	No. of strains positive	No. of strains tested	Growth Positive strains	at 41°C Negative strains
	39	Mt. Iyo	900	400	10	10	5	C-1	R-4
Dec. 12	40	The summit of Mt. Mitō	1,527	20	4	2	2		R-2
	41	Mt. Mitō	1,500	10	2	2	2		R-2
	42	Mt. Mitō	1,450	<5					
	43	Mt. Mitō	1,400	25	5	5	5	C-4	R-1
	44	Mt. Mitō	1,300	30	6	5	5	S-1, R-1	R-3
	45	Mt. Mitō	1,200	10	2	1	1		R-1
	46	The Kazuma Pass	1,120	5	1	1	1	C-1	
	47	The Kazuma Pass	1,120	15	3	2	2		R-2
	48	The Kazuma Pass	1,120	<5					
	49	The Kazuma Pass	1,120	25	5	5	5		R-5
	50	The Kazahari Pass	1,200	<5					
	51	The Kazahari Pass	1,200	<5					
	52	The Kazahari Pass	1,150	40	8	6	6		R-6
	53	The Kazahari Pass	1,150	1,000	10	10	10		R-10
	54	Mt. Mitō	1,100	15	3	2	2		R-2
	55	Mt. Mitō	1,000	15	3	3	3		R-3
	56	Mt. Mitō	900	60	10	9	9		R-7, N-2
	57	Mt. Mitō	900	<5					
	58	Mt. Mitō	800	<5					
	59	Kazuma	800	5	1	1	1		R-1

*1 Abbreviations, C: *Citrobacter freundii*; K: *Klebsiella pneumoniae*; Ec: *Enterobacter cloacae*; R: *Rahnella aquatilis*; E: *Escherichia coli*; S: *Serratia fonticola*; Ea: *Enterobacter aerogenes*; N: Not determined

*2 Figure shows No. of strains

Table 2. Numbers of Strains of Each Species Isolated from Mountain Soil Samples

Growth at 41°C	Species	Date of sampling			Total No.	Total (%)
		Oct. 27	Nov. 10	Dec. 12		
Negative	<i>Rahnella aquatilis</i>	35	30	45	110	60.4
	<i>Serratia fonticola</i>		6		6	3.3
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		1		1	0.5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		1		1	0.5
	Undetermined	4	5	2	11	6.0
	Total	39	43	47	129	70.9
Positive	<i>Citrobacter freundii</i>	12	15	5	32	17.6
	<i>Escherichia coli</i>	8	2		10	5.5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4			4	2.2
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1		3	1.6
	<i>Rahnella aquatilis</i>			1	1	0.5
	<i>Serratia fonticola</i>			1	1	0.5
	Undetermined	2			2	1.1
	Total	28	18	7	53	29.1
Total		67	61	54	182	
<i>Rahnella aquatilis</i> %		52.2	49.2	85.2	61.0	

Table 3. Biochemical Reactions of *Rahnella aquatilis* Strains Isolated (111 Strains)

Characteristic	<i>Rahnella aquatilis</i> isolates		Type strain ATCC 33071	Description according to Izard et al.
	Reaction* ¹	%+		
Indole	—	0	—	—
Methyl red	—	2.7	—	—
Voges-Proskauer	+	99.1	+	+
Citrate (simmons)	+	100	+	+
Motility	+	100	+	+
Gelatine liquefaction (30°C)	+ or —	89.2	+	+
Tween-esterase	+	100	+	+
Growth at 4°C	+	100	+	+
Growth at 37°C	—	2.7	—	+
Growth at 41°C	—	0.9	—	—
Lysine decarboxylase	—	0	—	—
Arginine dihydrolase	— or +	18.0	+W* ²	+ or —
Ornithine decarboxylase	—	3.6	+W	—
Urease	—	0.9	—	—
H ₂ S production	—	0	—	—
Deoxyribonuclease	—	0	—	—
Malonate	+	100	+	+
Mucate	+	99.1	+	+
Tartrate (Jordan's)	—	0	—	—
Acid from:				
Dulcitol	+	98.2	+	+
Inositol	—	0	—	—
α -Methyl D-glucoside	—	1.8	—	—
Melezitose	—	2.7	—	—
Sucrose	+ or —	80.2	+	+
Adonitol	—	0	—	—
Raffinose	+	91.9	+	+
Gas from glycerol	— or +	46.8	—	—
Esculin hydrolysis	+	100	+	+

*¹ Symbols, +: positive reaction for at least 90% of the isolates; —: negative reaction for at least 90% of the isolates

*² Symbol, +W: weakly positive reaction

(ATCC 33071) と比較した成績を Table 3 に示した。また Izard ら⁶⁾の報告した特性を比較のため記載した。

分離菌 111 株と標準菌株を比較するとアルギニンジヒドロラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼで差異がみられ、また分離菌株の 46.8% がグリセリンからガスを産生した点が注目される。Izard ら⁶⁾の記載によると 37° 陽性となっているが、標準菌株並びに分離菌株のほとんどが 37° で増殖しなかった。*R. aquatilis* は 4° で増殖し、41° では増殖せず、37° における増殖は菌株により異なるようである。平石ら⁴⁾は山岳地土壤、渓流水、汚染河川水などから *R. aquatilis* と考えられる 140 菌株を分離しているが、これらの菌株は 37° における増殖、アルギニンジヒドロラーゼ、メレチトース及び α -メチルグルコシド発酵などにより 3 群に分類されると報告している。本研究の分離菌株のほとんどが 37° 陰性菌

株であるので、これらの多くは平石らの報告した Bio-group 3 に該当するものと推察される。41° に増殖せず、4° で増殖するものを低温性大腸菌群とよぶこととすると、これに入る菌種としては *R. aquatilis* のほかに *E. amnigenus*, *E. intermedium*, *S. fonticola*, *S. plymuthica* などがあるが、*Rahnella* と *Enterobacter* はツインエステラーゼで明確に鑑別される。また *Rahnella* はデオキシリボスクレアーゼを産生せず、ズルシット陽性、イノシット陰性の点で *S. fonticola* を除く *Serratia* 属菌種と鑑別可能である。また IMViC 型のほかリシンデカルボキシラーゼ陰性、イノシット陰性などの点で *S. fonticola* とも鑑別は容易である。山岳地土壤に分布しているいわゆる低温性大腸菌群の中で最も多数を占めている IMViC 型—++ で運動性を有する細菌はそのほとんどが *R. aquatilis* であることが明らか

にされた。これらの *R. aquatilis* 菌株はその増殖可能温度などから考えても温血動物の腸管とは無関係と考えられる。一方、*Enterobacter* や *Klebsiella* に属する細菌の分布はきわめて少なかった。また IMViC 型—十—で運動性の細菌についてみると、41° 陰性株は *Serratia* 属、41° 陽性株は *Citrobacter* 属であることが示唆された。

現在、特定の食品の大腸菌群検査にはデソキシコレート寒天平板培地が採用されている。平石ら⁴⁾の成績からみて *R. aquatilis* はデソキシコレート寒天平板において 30° では集落を形成し得るが 35° の場合にはその大部分が抑制される。すなわち *R. aquatilis* のような自然界由来の低温性大腸菌群細菌が多数を占めている食品の検査においてはデソキシコレート寒天の培養温度がきわめて重要な意義を有するものと考えられる。

要 約

近年、いわゆる低温性大腸菌群といわれる細菌についての分類が確立されたので、この新分類によって山岳地土壤の大腸菌群フローラを再検討した。東京都西部の標高 1,000 m 前後の山岳地で 10 月から 12 月にわたる 3 回の調査により合計 59 の土壌試料を採集し、デソキシコレート寒天培地に 30° で培養して大腸菌群を測定し、かつ菌種を同定した。土壌 1 g の推定大腸菌群数は 10~10³ 程度であった。合計 182 株の大腸菌群を分離したが、その中の 61% が *R. aquatilis* であった。これについて *C. freundii* が 17.6%, *E. coli* が 5.5% みられ、*S. fonticola*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* 及び *E. aerogenes* などがきわめて少数分離された。*R. aquatilis* の分離菌株のほとんどが 37° で増殖せず、大部分がアルギ

ニン陰性であり、約半数がグリセリンからガスを発生する点が注目された。山岳地土壤の大腸菌群フローラ的大部分は温血動物の腸管に無関係とみられる *R. aquatilis* であることが示唆された。

文 献

- 1) 佐伯和昭, 堀江 進, 慶野一夫: 食衛誌. **12**, 95~99 (1971).
- 2) 堀江 進, 臼井 進, 神白智子, 佐伯和昭: 同上. **16**, 324~329 (1975).
- 3) 堀江 進, 山田朝陽, 佐伯和昭: 日水誌. **42**, 131~135 (1976).
- 4) Hiraishi, A., Horie, S.: J. Gen. Appl. Microbiol. **28**, 139~154 (1982).
- 5) Gavini, F., Ferragut, C., Izard, D., Trinel, P. A., Leclerc, H., Lefebvre, B., Mossel, D. A. A.: Int. J. Syst. Bacteriol. **29**, 92~101 (1979).
- 6) Izard, D., Gavini, F., Trinel, P. A., Leclerc, H.: Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) **130 A**, 163~177 (1979).
- 7) Izard, D., Gavini, F., Trinel, P. A., Leclerc, H.: Int. J. Syst. Bacteriol. **31**, 35~42 (1981).
- 8) Izard, D.: Gavini, F., Leclerc, H.: Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. C **1**, 51~60 (1980).
- 9) Ball, R. J., Sellers, W.: Appl. Microbiol. **14**, 670~673 (1966).
- 10) 坂崎利一: “新細菌培地学講座 (上)” p. 376~378 (1978) 近代出版。