

# 大腸菌群・大腸菌の検査

食品衛生法では「食品および添加物は、病原微生物により汚染され、またはその疑いがあり、人の健康を損なうおそれのあるものを販売し、または販売の用に供するために扱ってはならない」と規定している。実際には、これらの病原微生物が飲食物から検出されることはまれである。しかし、腸管系病原菌と起源を同じくする大腸菌群が、仮にある食品から検出された場合には、その食品は人畜の糞便に汚染された危険があるとみなされ、さらに、そのような食品は不潔で、取り扱いが不良であると考えられる。そこで腸管系病原菌の指標として、比較的検索の容易な大腸菌群が指定された。

ここにいう大腸菌群 (coliform group) とは、応用細菌学上で用いられる用語であって、分類学上の用語ではない。すなわち、グラム陰性、無芽胞の桿菌で、乳糖を分解して酸とガスを産生する好気性または通性嫌気性の細菌の一群をさし、大腸菌 (*Escherichia coli*)、エロゲネス菌 (*Enterobacter aerogenes*) など腸内細菌科に属する多くの菌種を含む。大腸菌群のうち、44.5℃で発育するものを糞便系大腸菌群という。

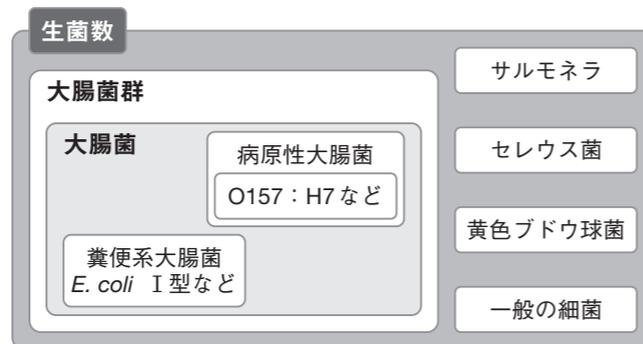
## 検査法の種類

大腸菌群の検査法には、発酵管法と寒天平板法がある。発酵管法では定性的な試験結果または理論値 (最確数) を求めることができ、寒天平板法では定量的に実測値を求めることができる。

発酵管法では、BGLB (ブリリアントグリーン加乳糖胆汁ブイヨン) 発酵管による方法と、乳糖ブイヨン (LB) 発酵管を用いる方法の2つがある。いずれも一定量の試料中における大腸菌群の有無を判定する定性試験と、同一希釈度のものを5本 (または3本) の発酵管に移植培養し、確率的にもっともありそうな数値 (最確数: MPN; most probable number) として求める定量試験とがある。

寒天平板法では、大腸菌群の選択培地として、デソキシコレート寒天培地またはバイオレット・レ

### 〈食品中の生菌数, 大腸菌群, 大腸菌等の関係〉



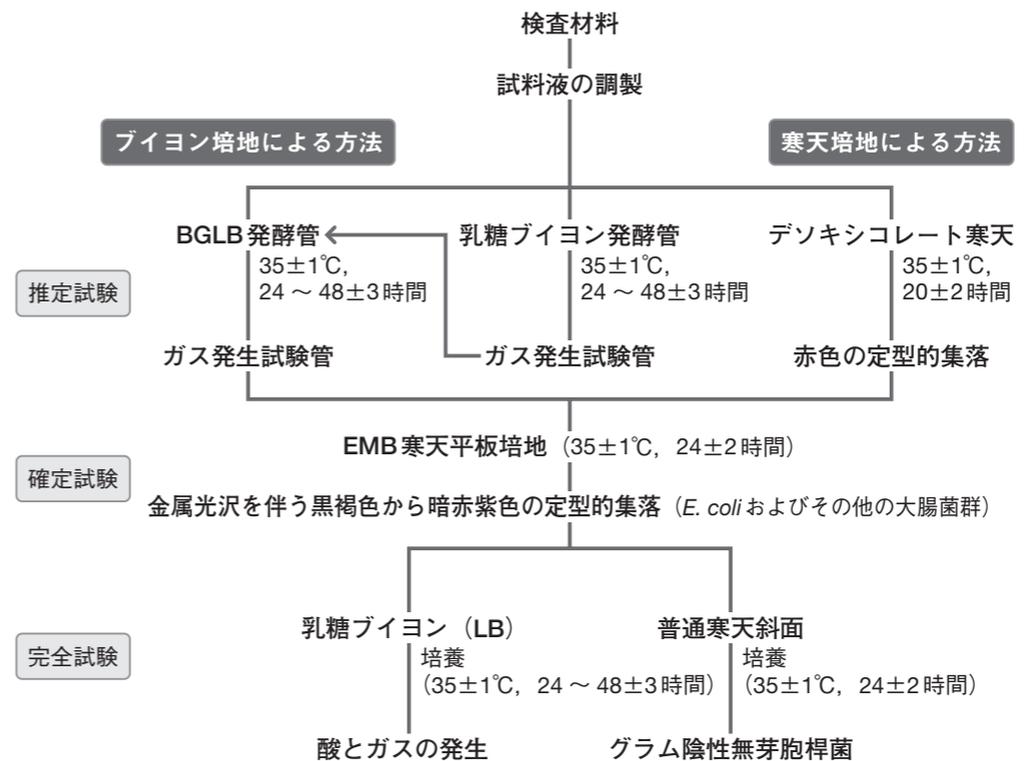
ッド胆汁塩寒天培地を用いることにより、定型的な集落を数えて実測値を求めることができる。検査対象試料に応じて指定された培地や検体量があるので、適正な方法を選択する。

## 大腸菌群検査用培地の選択

培地名	検査対象物	食品例
BGLB 培地	細菌にとって栄養素の豊富な試料	一般の加工食品, 包装後加熱食肉製品, 魚肉ねり製品, 乳および乳製品の一部
乳糖ブイヨン	細菌にとって栄養素の少ない試料	氷雪, 清涼飲料水, ミネラルウォーター, 食品取り扱い器材の拭きとり試料など
デソキシコレート寒天	栄養分の豊富な試料	氷菓, アイスクリーム類, 冷凍食品, バターなど乳製品の一部, 乳酸菌飲料
EC 培地	大腸菌 ( <i>E. coli</i> ) の検出用	生食用かき, 食肉製品・冷凍食品の一部

大腸菌群の検査手順の概要を以下のフローシートに示す。

### 〈大腸菌群の検査手順〉





### 3.1 BGLB 発酵管による方法

一般の食品や、食肉製品、魚肉ねり製品、飲用乳など、細菌にとって栄養素の豊富な試料の大腸菌群の検査に広く行われる。この培地は乳糖ブイヨンよりも選択性が高く、処方されたプリリアントグリーン (BG) はグラム陽性菌に対して抑制効果があり、胆汁酸塩とともに選択性を示す。

#### 1 定性試験

一定量の検体中に 1 個以上の大腸菌群の存在の有無を知ることができる。大腸菌群検査は、定性試験、定量試験ともに推定試験、確定試験、完全試験の 3 段階からなる。

試料液は、10 倍段階希釈液を調製し、その各 1 mL をそれぞれ 2 本のダーラム管入り BGLB 発酵管<sup>\*1</sup> に接種する。0.1 mL, 0.01 mL 相当の接種では 100 倍, 1,000 倍に希釈したものの 1 mL を接種する。

##### 1) 推定試験

- 接種した BGLB 発酵管を 35°C, 24 ± 2 時間培養する。
- ダーラム管に気泡が生じたものをガス発生ありとし、推定試験陽性で確定試験に進む。
- ガス発生のない場合には、さらに 24 時間培養し、それでもガスの発生しない場合は推定試験陰性とし、大腸菌群陰性となる。この 24 時間培養は場合によって省略も可能。

##### 2) 確定試験

- 推定試験でガス発生があった発酵管から培養液の 1 白金耳量を、あらかじめ固化した EMB 平板培地<sup>\*2</sup> に画線塗抹し、35°C, 24 ± 2 時間培養する。
- EMB 平板培地上の集落に、金属光沢～暗紫赤色の定型的大腸菌群集落<sup>\*3</sup> (口絵参照) が存在した場合は 1 個以上を、非定型的集落のみの場合は、そのなかの大腸菌群にもっとも近い集落を 2 個以上釣菌し、確定試験陽性として、それぞれ乳糖ブイヨン発酵管と普通寒天斜面培地の両方に接種する。
- 35°C, 24 ± 2 時間培養する。

\*1 BGLB 発酵管 (brilliant green lactose bile bouillon): ペプトン 10 g, 乳糖 10 g, ウシ胆汁末 20 g, プリリアントグリーン 0.0133 g, 水 1,000 mL pH 7.2  
ダーラム管を入れた中試験管に約 10 mL ずつ分注して、121°C, 15 分間、高压蒸気滅菌を行う。

\*2 EMB (eosin methylene blue) 平板培地: ペプトン 10 g, 乳糖 10 g, リン酸一水素カリウム 2 g, エオジン Y0.4 g, メチレンブルー 65 mg, 寒天 18 g, 水 1,000 mL pH 6.6 ~ 7.0  
121°C, 15 分間、高压蒸気滅菌を行ったのち、50°C 程度まで放冷し、25 ~ 30 mL ずつ滅菌シャーレへ分注し、固める。なお、使用前には培地表面をあらかじめふ卵器内で乾燥させておく。

\*3 EMB 平板培地で大腸菌群が増殖すると、乳糖分解による酸の産生のため集落が酸性化し、培養中のエオジンにより黒色化する。大腸菌の場合は培地中のメチレンブルーの色と相まって黒褐色で金属光沢を有するようになる。大腸菌群のなかでも *Klebsiella* や *Enterobacter* などは乳糖を分解して培地が pH 6.0 付近になるとピルビン酸を縮合してアセトインを形成するため酸性化の進行が停止し、黒褐色から暗赤紫色の集落を形成する。

### 〈BGLB 発酵管による方法〉

#### 定性試験法—推定試験

