

ノート

黄色ブドウ球菌検査方法の改良

吉川修司・浅野行蔵・田村吉史

An Advanced Method of *Staphylococcus aureus* Detection

Shuji YOSHIKAWA, Kozo ASANO and Yoshifumi TAMURA

平成8年に起きたO-157による集団食中毒を期に、小売業が求める食品に対する微生物基準が今まで以上に厳しくなっている。また、消費者が食品衛生に寄せる関心もこれまでになく高まっている。このような状況下では、小売業が設定した微生物基準を満たさなければ取引が非常に難しい。さらに、納品段階での微生物検査が非常に厳しく行われている。このような中、検査室を持つ食品企業では、自社製品の検査を行って品質保証を図っている。微生物検査の判定を正しく行うには、検査しようとする微生物の標準菌株での反応を見ておく必要があるが、食品製造業では実際の菌株を使用して検査するのは食品衛生上現実的ではない。したがって、食品業界から判定が容易にできる検査法が望まれる。

黄色ブドウ球菌は人や動物の化膿蒼に由来する食中毒菌であり、食品の微生物検査で高頻度で実施される。現在、一般的に用いられている黄色ブドウ球菌の分離・検出培地には、卵黄加マンニット食塩寒天がある。この検出原理は、卵黄反応による油膜、マンニットからの酸生成によるコロニー周囲の黄変、黄色色素の産生に基づいている^{1),2)}。しかし、黄色ブドウ球菌の示す黄色色素の生成および卵黄反応は、必ずしも明瞭ではなく、標準菌株を持っていて生育状態を見慣れていても判定しにくい場合がある。食品企業では標準菌株を持っていないケースがほとんどであり、検査室のスタッフでは判定が困難なことが多い。

黄色ブドウ球菌を判定する方法に、抗体による凝集反応を利用した方法がある。しかし、抗体を用いる試験はコストが高いため、食品企業の負担が多く問題がある。

大腸菌やサルモネラ菌では、菌種の判定が容易な合成基質を利用してコロニーを着色する培地が実用化されている^{3),4)}。本研究では、培地に亜テルル酸カリウムを加えてコロニーを着色し、卵黄反応の有無を判断しやすくする検査法を検討したので報告する。

実験方法

培地の調製方法は、マンニット食塩寒天培地（肉エキス1g, ポリペプトン10g, 食塩75g, マンニット10g, 寒天15g, フェノールレッド25mg, 精製水1,000ml, pH7.4）を121°Cで15分間滅菌後、卵黄溶液（50%乳剤, メルク社）50mlとともに3%亜テルル酸カリウム溶液（オクソイド社）を無菌的に別途添加した。

亜テルル酸カリウムの濃度を決定する試験では、亜テルル酸カリウムの濃度は0~100mg/lまで変化させた。

Staphylococcus aureus IFO 14462^Fを液体培地（ポリペプトン0.5%, 肉エキス0.3%, 食塩0.5%, pH7.0）に接種し、24時間培養後、滅菌生理食塩水で濁度（OD₆₆₀）が0.1となるように希釈した。次に希釈液を、生理食塩水で1万倍、および10万倍希釈した菌液を卵黄加マンニット食塩寒天培地および亜テルル酸塩卵黄加マンニット食塩寒天培地に100 μ l塗抹し、37°Cで24時間培養した。培地の評価は、培地に出現したコロニー数および大きさ、卵黄反応の明瞭さ（反応の出現程度とコントラストの明瞭さ）、マンニットからの酸生成、およびコロニーの黒さについて項目別に評価した。評価は3点法（最高2点、最低0点）とし、数値が高い方を良好とした。

亜テルル酸塩卵黄加マンニット食塩寒天培地上で、黄

*現 北海道立オホーツク圏地域食品加工技術センター（〒090-0008 北見市大正353番地19）

Table 1 Composition of mannit salt terullite egg-yolk medium

| | |
|--|-------|
| Meat extract | 1g |
| Polypepton | 10g |
| NaCl | 75g |
| Mannit | 10g |
| Agar | 15g |
| Phenol | 25mg |
| Distilled water | 950ml |
| Adjust pH 7.4 | |
| After autoclaving at 121°C for 15minutes, aseptically add a following 2components. | |
| Egg-yolk emulsion (50%emulsion) | 50ml |
| Potassium tellurite | 25mg |

色ブドウ球菌と他の菌の判別が可能か選択性試験を行った。用いた培地の組成を Table 1 に示した。供使菌株は、*S. aureus* IFO 13276^p および IFO 14462, *S. epidermidis* JCM 2414^T, *S. saprophyticus* JCM 2427^T, *Micrococcus luteus* IFO 3333, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^T, およびグラム陰性菌として *Escherichia coli* JCM 1649^T を用いた。被検菌を液体培地ポリペプトン 0.5%, 肉エキス 0.3%, 食塩 0.5%, pH 7.0) で 24 時間培養後、菌液を各 10 μ l ずつ培地上に接種した。評価は酸の生成能力、卵黄反応の有無、コロニーの色を観察して行った。

実験結果

亜テルル酸カリウムは無色であるが、ブドウ球菌は亜テルル酸カリウムを金属テルルに還元する能力がある。この結果、ブドウ球菌のコロニーは全体が黒く発色する。コロニーの周囲に卵黄反応による油膜を生じるが、コロニーが黒くなると油膜がより明瞭に観察できる。一方、亜テルル酸カリウムには抗菌性があるので、はじめに亜テルル酸の至適添加量を求めた。卵黄加マンニット食塩寒天培地と亜テルル酸塩卵黄加マンニット食塩寒天培地

では、培地に出現したコロニーの数は、亜テルル酸カリウム濃度によらず差がなかったので(データ示さず)、4 項目について、結果を示した (Table 2)。

亜テルル酸カリウム濃度と黄色ブドウ球菌の出現状況は、亜テルル酸カリウム濃度を 10 mg/l 以上とした場合にコロニーを黒く着色できた。しかし、亜テルル酸カリウムを 40 mg/l 以上含有させるとマンニットからの酸の生成、および 50 mg/l 以上含有させると卵黄反応が抑制された。よって、亜テルル酸カリウムの含有量としては 10~35 mg/l が適し、特にコロニーの発色が良好な 25~35 mg/l が最適であった。よって、コロニー周囲に見られる卵黄反応を明瞭にする目標は達成できた (Fig.1)。

亜テルル酸塩卵黄加マンニット食塩寒天培地における黄色ブドウ球菌の選択性について、結果を Table 3 および Table 4 に示した。亜テルル酸塩卵黄加マンニット食塩寒天培地では、卵黄反応が卵黄加マンニット食塩寒天培地に比べて見やすくなった。具体的には、*S. aureus* IFO 14462 はこの株のもともとの特徴の 1 つとして黄色色素の産生能力が弱いので、卵黄加マンニット食塩寒天培地ではコロニーが白色になり、卵黄反応の白濁環とのコントラストが不明瞭だった。一方、亜テルル酸塩卵黄加マンニット食塩寒天培地では、コロニー全体が黒くなり、卵黄反応の確認が容易であった。また、*Micrococcus* および *Enterococcus* の発育は卵黄加マンニット食塩寒天培地の場合と同様に僅かであった。また、亜テルル酸塩卵黄加マンニット食塩寒天培地では、卵黄加マンニット食塩寒天培地の場合と同様に大腸菌は全く生育しなかった。

要約

食品産業にとって微生物管理は極めて重要である。しかし、黄色ブドウ球菌の検査において、従来の微生物検査では判定が困難であり、改善が求められていた。本研

Table 2 Lecithoviterin reaction, colony color, colony size, and acid production of *S.aureus* IFO 13276^p on the media

| | Potassium tellurite concentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| | 0 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 80 | 100 |
| Lecithoviterin reaction | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | △ | △ | × | × | × |
| Blackness of colony | × | △ | △ | △ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Acid production | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | △ | △ | △ | × | × | × | × |
| Colony size | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | △ | △ | × | × | × |

Lecithoviterin reaction ○: very clear, △: clear, ×: unclear
 Blackness of colony ○: Dark black, △: Light black, ×: not black
 Acid production ○: very clear, △: clear, ×: unclear
 Growth of colony ○: Good, △: Slightly inhibited, ×: Strongly inhibited



Fig.1 *S. aureus* IFO 13276^P on mannit salt terullite egglyolk medium and mannit salt egglyolk medium
Mannit salt terullite egglyolk medium contained 25mg/l potassium terullite.

Table 3 Colony color of *S.aureus* and other bacteria on media

| Microorganism | Strain | Mannit salt egglyolk agar medium | Mannit salt egglyolk tellurite agar medium |
|------------------------------|------------------------|----------------------------------|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | IFO 13276 ^P | yellow | black |
| <i>S. aureus</i> | IFO 14462 | white | black |
| <i>S. saprophyticus</i> | JCM 2427 ^T | white | black |
| <i>S. epidermidis</i> | JCM 2414 ^T | red | light black |
| <i>Micrococcus luteus</i> | IFO 3333 | white | white (less growth) |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | JCM 5803 ^T | white | white (less growth) |
| <i>Escherichia coli</i> | JCM 1649 ^T | non growth | non growth |

T: type strain, P: same as FDA209P

Table 4 Acid production and lecithoviterin reaction on media

| Microorganism | Strain | Mannit salt egglyolk agar medium | | Mannit salt egglyolk tellurite agar medium | |
|------------------------------|------------------------|----------------------------------|-------------------------|--|-------------------------|
| | | Acid production | Lecithoviterin reaction | Acid production | Lecithoviterin reaction |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | IFO 13276 ^P | + | + | + | + |
| <i>S. aureus</i> | IFO 14462 | + | + | + | + |
| <i>S. saprophyticus</i> | JCM 2427 ^T | - | - | - | - |
| <i>S. epidermidis</i> | JCM 2414 ^T | - | - | - | - |
| <i>Micrococcus luteus</i> | IFO 3333 | + | - | + | - |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | JCM 5803 ^T | + | - | + | - |
| <i>Escherichia coli</i> | JCM 1649 ^T | non growth | non growth | non growth | non growth |

T: type strain, P: same as FDA209P

究では判定が困難だった黄色ブドウ球菌の判定を容易にするため、卵黄加マンニット食塩寒天に亜テルル酸カリウムを添加して黄色ブドウ球菌のコロニー全体を黒く着色する方法を検討した。その結果、亜テルル酸カリウムを添加すると、卵黄反応が見やすくなり黄色ブドウ球菌

の識別が明瞭となった。亜テルル酸の添加量は25~35 mg/l が最適であった。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 微生

-
- 物編 (社)日本食品衛生協会, 東京) p.160 (1990). II (社)日本食品衛生協会, 東京) p.15 (1996).
2) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 追補 3) 同上 p.32 (1996).