

食品からの腸炎ビブリオ検出方法の研究

分担研究者 熊谷 進 (国立感染症研究所)

研究協力者 工藤由起子 (国立感染症研究所)

丹野憲二 (日本食品分析センター)

既存の増菌培地による増菌条件について、とくに腸炎ビブリオの選択性に着目して検討を加えた結果、TCBS 寒天培地と組み合わせた方法としては、TSA で 3.6～3.7℃下6時間培養後、同温度下で食塩ポリミキシン18時間培養する方法が比較的優れていることが認められた。今後、夏季の自然汚染魚介類検体を用いて、この二段階増菌培養法と他の方法を比較評価するとともに、寒天平板培地についても改良を加えることが必要である。

1. 研究目的

近年、腸炎ビブリオによる食中毒が急増し、その予防方策が求められている。食中毒の原因調査等により、この急増は、主として O3K6 の急増を反映したものであることがすでに明らかにされている。原因食品として推定されたものは生魚介類と生食用加熱済み魚介類が多数を占めるが、これらについて原因細菌が検出された事例は極めて少なく、その一要因として食品からの病原腸炎ビブリオの検出が難しいことが考えられる。

従来我が国でよく用いられてきた腸炎ビブリオの検出方法としては、食塩加アルカリペプトンまたは食塩加ポリミキシンプイオン中で増菌してから、増菌培養物を TCBS 寒天培地に画線してから培養し、緑色コロニーについて生化学性状等を調べることによって同定する方法があげられる。本研究の目的は、この増菌方法について検討を加えることによって、より容易に検出できる方法を求めることにある。

2. 研究方法

実験1) 食塩加アルカリペプトンまたは食塩加ポリミキシンプイオンに腸炎ビブリオを接種した後に37度C下で培養し、培養中の菌数の変化を3%食塩加TSA および TCBS 寒天培地を用いて測定した(図1参照)。表1に示したO3K6TDH+株を含め10株を試験に供した。

実験2) 市販あさり剥き身25gに、食塩ポリミキシンプイオン(pH7.4)、同(pH9.2)、食塩加アルカリペプトン(pH8.3)、または同(pH8.8)各225mlを加えストマック処理または手でリンスした後に、36℃下で18時間培養した後に、培養物をTCBS寒天培地および3%食塩加標準寒天培地に塗抹し、それぞれ36℃で20時間および36℃で48時間培養した。TCBS寒天培地上の集落については白糖分解、白糖非分解、硫化水素産生各集落の数を計測した。

実験3) 実験1)の増菌培養において比較的増殖が遅かったTDH産生菌2株(VP1、VP5)、および実験1)の増菌培養において比較的増殖が速かったTDH非産生菌2株(V179、V201)を、ポリミキシンを除いた食塩ポリミキシンプイオン基礎培地で37℃一晩培養してから、2%食塩加PBSで希釈したものを接種菌液とした。まぐろ赤身25gに、上記4株をすべて接種してから、ポリミキシンを除いた食塩ポリミキシンプイオン基礎培地、食塩ポリミキシンプイオン、または食塩加アルカリペプトン各225ml加え、ストマック処理してから、食塩ポリミキシンプイオン基礎培地については37℃で4時間培養してからさらにポリミキシンを加え37℃で18時間培養した。食塩ポリミキシンプイオンおよび食塩加アルカリペプトンを加えたものは37℃で18時間培養した。なお、TDH産生菌2株(VP1、VP5)については各平均20.5CFU、30.5CFU、およびTDH非産生菌2株(V179、V201)については各平均5650CFU、250CFU接種した。増菌培養物は2%食塩加PBSで段階希釈し、

TCBS 寒天培地に塗抹し、37℃ 18時間培養してから腸炎ビブリオと思われる緑色コロニー数を計測した。さらに、各培養物由来のコロニーについて TDH 産生の有無をラテックス凝集反応で調べた。

実験 4) アサリ剥き身を食塩ポリミキシンプイオンまたは食塩加アルカリペプトンで37℃ 18時間培養したものを TCBS に塗抹、培養後に平板上に形成された黄色と黒色のコロニーを、ポリミキシンを除いた食塩ポリミキシンプイオン基礎培地で一晚培養した菌液を用意した。それらを2%食塩 PBS で適宜希釈し、各約5 CFU、計約25 CFU、を10 ml の増菌培地に接種した。その増菌培地に、同様に増菌し希釈した腸炎ビブリオ菌株 (VP15、17、9、28) (表3) を各約5 CFU ずつ接種した。それら1:5の割り合いで腸炎ビブリオとその他アサリ由来菌を含む増菌培地を培養後、TCBS に塗抹培養し、コロニーを観察した。培地と培養条件は表2に示した。

3. 研究結果と考察

実験 1)

食塩ポリミキシンプイオンによる増菌においては、1~4時間目に菌が検出未満のレベルまで一旦減少し、その後8~10時間目までに増加し、3%食塩加 TSB 上で約 10^8 CFU/ml に達するのに対し、食塩加アルカリペプトンによる増菌においては、菌数はほとんど減少することなく6時間目まで増加し続け、約 10^8 CFU/ml に達することが認められた (図2、表4)。両増菌条件間の結果の相違は、ポリミキシンによる菌の損傷によるものと考えられる。TDH+株と TDH-株の間での相違は見られなかった。

実験 2)

既存の食塩ポリミキシンプイオンと食塩加アルカリペプトン両増菌培地の pH をアルカリ側に傾けることによって腸炎ビブリオの選択的増菌を促進できるかどうかを検討した。36℃で18時間増菌培養した後の腸炎ビブリオの特徴を

示す白糖非分解集落の数とその他集落数との比率については、食塩ポリミキシンプイヨン (pH 7.4)、同 (pH 9.2)、食塩加アルカリペプトン (pH 8.3)、および同 (pH 8.8) 各培地間で顕著な差異が認められなかった (表 5)。また、ストマック処理または手でのリンス処理の間にも大きな差異は認められなかった。集落数にも各処理間で顕著な差異が見られなかったことから、ここで用いた培養条件下では、既存の食塩ポリミキシンプイヨンと食塩加アルカリペプトン両増菌培地の pH を高くしても、選択性が上がらないことがわかった。

実験 3)

緑色コロニー数とその他コロニー数を表 8 に示した。表には、二段階の希釈において識別できた緑色コロニー数が多い希釈段階の成績のみを示してある。いずれの増菌培養条件によっても腸炎ビブリオと推定できる緑色コロニーが、他のコロニーと十分識別できた。両コロニーの比率に培養条件による顕著な差異は認められないものの、緑色集落数が全体の 10% 未満の場合が半数の検体に認められたことは、これら増菌培養条件と TCBS 寒天培地との組み合わせによる方法についてはさらに選択性の観点からの改良が加えられるべきものと考えられる。

検体 3、6、9 (表 8) について、各検体から緑色コロニー 37 株、合計 111 株について TDH 産生性をラテックス凝集反応で調べた結果、1 株のみに TDH 産生が認められた。TDH 産生菌と非産生菌を約 1 : 100 の数比で接種したことを考えあわせると、ここで用いた方法は、TDH 産生菌を目指した検出方法としても特段の利点はないことが示唆された。

実験 4)

TCBS 上コロニー数の計測値を表 6 に、緑色コロニー数の黄色コロニー数に対する比 (多すぎて数えられない場合および緑色コロニー数が 1 個の場合は「-」で示した) を表 7 に示した。4 菌株すべてについて緑色コロニーを明確に識別できた (比率を数値で示すことのできた) 条件は、2、8、10 であった。条件 3 は、TDH 非産生菌 1 株以外に対しては有効であった。したがって検討した

増菌条件の中では、TSA 6 時間培養後食塩ポリミキシン 1 8 時間培養、食塩加アルカリペプトン 6 時間培養、TSA 6 時間培養が選択性の観点から比較的優れており、TSA 6 時間培養後食塩加アルカリペプトン 1 8 時間培養も、TDH 産生菌荷対しては比較的良好であることがわかった。これらの増菌条件のうち、6 時間のみ的一段階培養においては、菌数が少ないために高い希釈段階においては検出できなかったが、TSA 6 時間培養後食塩ポリミキシン 1 8 時間培養においては 10^{-5} ~ 10^{-6} で検出できたことから、TCBS に画線することを想定した場合、この方法が現実的かつ選択性の点からも優れているものと考えられる。

4. 結論

生マグロやアサリ剥き身を検体として用い、またアサリ剥き身から分離した汚染細菌を用い、既存の増菌培地による増菌条件について、とくに腸炎ビブリオの選択性に着目して検討を加えた結果、TCBS 寒天培地と組み合わせた方法としては、TSA で $36 \sim 37^{\circ}\text{C}$ 下 6 時間培養後、同温度下で食塩ポリミキシン 1 8 時間培養する方法が比較的優れていることが認められた。今後、夏季の自然汚染魚介類検体を用いて、この二段階増菌培養法と他の方法を比較評価するとともに、寒天平板培地についても改良を加えることが必要である。

5. 研究発表

なし

図1 試験操作

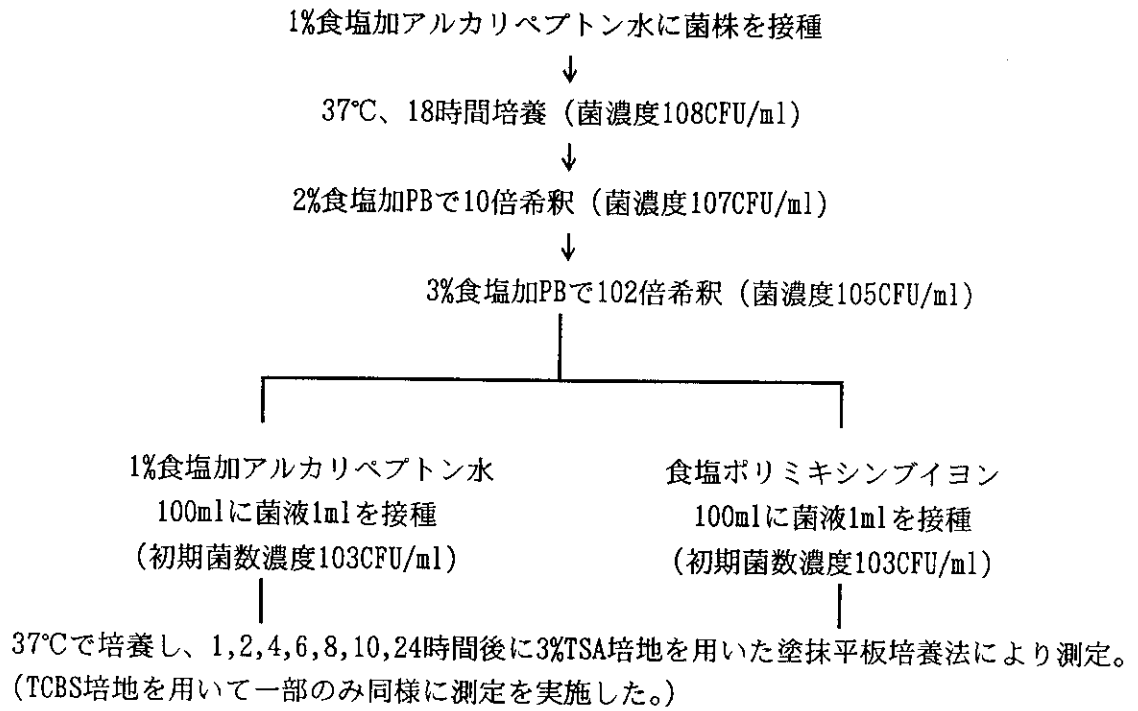


表1. 使用菌株

VP1 : O3K6 TDH+
 VP5 : O3K6 TDH+
 VP15 : O3K6 TDH+
 VP21 : O4K12 TDH+
 VP22 : O4K68 TDH+
 VP9 : O3K6 TDH-
 VP10 : O3K6 TDH-
 V179 : O4K64 TDH-
 V182 : K22 TDH-
 V201 : O10K24 TDH-

表3. 実験4) に使用した菌株

VP15 : O3K6 TDH+
 VP17 : O3K6 TDH+
 VP9 : O3K6 TDH-
 VP28 : O4K49 TDH-

表2 増菌条件

条件	1段階		2段階		3段階	
	増菌液	時間	増菌液	時間	増菌液	時間
1	食塩加アルカリペプトン	6時間	食塩ポリミキシン	18時間		
2	TSA	6時間	食塩ポリミキシン	18時間		
3	TSA	6時間	食塩加アルカリペプトン	18時間		
4	食塩ポリミキシン	6時間	食塩加アルカリペプトン	18時間		
5	TSA	6時間	食塩加アルカリペプトン	18時間	食塩ポリミキシン	6時間
6	TSA	6時間	食塩ポリミキシン	18時間	食塩加アルカリペプトン	6時間
7	TSA	6時間	食塩ポリミキシン	18時間	食塩ポリミキシン	6時間
8	食塩加アルカリペプトン	6時間				
9	食塩ポリミキシン	6時間				
10	TSA	6時間				
11	食塩加アルカリペプトン	18時間				
12	食塩ポリミキシン	18時間				

表4 増菌培地に添加した試験菌(TDH-)の生菌数測定結果(対数值)

試験菌	増菌培地	測定培地	生菌数(/ml)							
			開始時*	1時間後	2時間後	4時間後	6時間後	8時間後	10時間後	24時間後
VP9 (TDH-)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.18	3.28	3.45	5.99	7.08	7.63	8.11	7.38
	ペプトン水	TCBS	2.70	2.68	3.23	4.04	6.11	6.20	7.90	5.75
	食塩	3%NaCl加TSA	3.18	<1.00	<1.00	1.00	3.18	6.43	7.76	8.45
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	2.70	<1.00	<1.00	<1.00	1.00	4.08	8.63	4.96
VP10 (TDH-)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.04	3.36	4.90	6.81	8.04	7.91	7.67	7.73
	ペプトン水	TCBS	1.54	2.11	3.36	7.04	6.48	7.41	5.18	7.04
	食塩	3%NaCl加TSA	3.04	<1.00	<1.00	<1.00	3.26	5.69	8.32	8.11
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	1.54	<1.00	<1.00	<1.00	<1.00	4.11	5.60	7.28
V179 (TDH-)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.40	4.32	4.94	7.38	7.70	7.78	7.87	7.34
	ペプトン水	TCBS	**	**	**	**	**	**	**	6.51
	食塩	3%NaCl加TSA	3.40	<1.00	<1.00	3.59	6.04	8.53	8.28	8.81
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	**	**	**	**	**	**	**	8.41
V182 (TDH-)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.43	3.08	4.20	6.86	7.40	7.72	7.85	7.63
	ペプトン水	TCBS	**	**	**	**	**	5.51	6.95	5.67
	食塩	3%NaCl加TSA	3.43	<1.00	<1.00	3.51	5.41	7.85	8.40	8.57
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	**	**	**	**	**	5.91	6.20	7.80
VP201 (TDH-)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.48	3.23	4.48	7.30	7.72	7.78	7.93	7.98
	ペプトン水	TCBS	**	**	**	**	**	7.62	7.49	7.84
	食塩	3%NaCl加TSA	3.48	<1.00	<1.00	2.63	5.08	8.20	8.51	7.66
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	**	**	**	**	**	7.00	7.51	7.08

保存温度：37℃、<1.00：検出せず、**：測定せず

*：添加した菌液の生菌数を測定し、開始時の生菌数に換算した。

表4(2) 増菌培地に添加した試験菌(TDH+)の生菌数測定結果(対数値)

試験菌	増菌培地	測定培地	生菌数(/ml)							
			開始時*	1時間後	2時間後	4時間後	6時間後	8時間後	10時間後	24時間後
VP1 (TDH+)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.45	3.79	4.62	5.96	7.45	7.95	8.04	7.67
	ペプトン水	TCBS	2.59	3.18	4.04	4.98	6.92	7.30	7.11	6.63
	食塩	3%NaCl加TSA	3.45	3.11	<1.00	<1.00	3.30	5.49	7.49	8.60
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	2.59	<1.00	<1.00	<1.00	1.95	4.08	5.04	6.98
VP5 (TDH+)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.32	3.63	4.36	6.67	6.43	6.30	5.97	7.64
	ペプトン水	TCBS	2.71	3.38	4.08	6.26	5.23	5.20	**	6.99
	食塩	3%NaCl加TSA	3.32	<1.00	<1.00	2.78	5.08	7.94	8.67	8.04
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	2.71	<1.00	<1.00	<1.00	3.48	6.48	8.40	7.61
VP15 (TDH+)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	2.91	3.57	4.38	7.40	7.71	7.69	7.68	7.85
	ペプトン水	TCBS	**	**	**	**	**	**	**	7.46
	食塩	3%NaCl加TSA	2.91	<1.00	1.70	4.50	6.52	8.52	8.45	8.04
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	**	**	**	**	**	**	**	8.76
VP21 (TDH+)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.04	2.56	3.90	7.11	7.76	7.76	7.88	7.76
	ペプトン水	TCBS	**	**	**	**	**	6.92	6.76	7.11
	食塩	3%NaCl加TSA	3.04	<1.00	<1.00	2.32	4.96	8.18	8.38	8.00
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	**	**	**	**	**	7.36	6.96	7.53
VP22 (TDH+)	1%NaCl加 アルカリ	3%NaCl加TSA	3.00	3.00	4.32	7.32	7.79	7.87	7.68	8.12
	ペプトン水	TCBS	**	**	**	**	**	7.38	6.74	8.60
	食塩	3%NaCl加TSA	3.00	<1.00	<1.00	3.00	6.30	8.15	8.52	8.38
	ポリミキシン ブイヨン	TCBS	**	**	**	**	**	7.23	7.30	8.34

保存温度：37℃、<1.00：検出せず、**：測定せず

*：添加した菌液の生菌数を測定し、開始時の生菌数に換算した。

図 2-1 食塩ポリミキシンブイヨンに接種した試験菌の生菌数測定結果

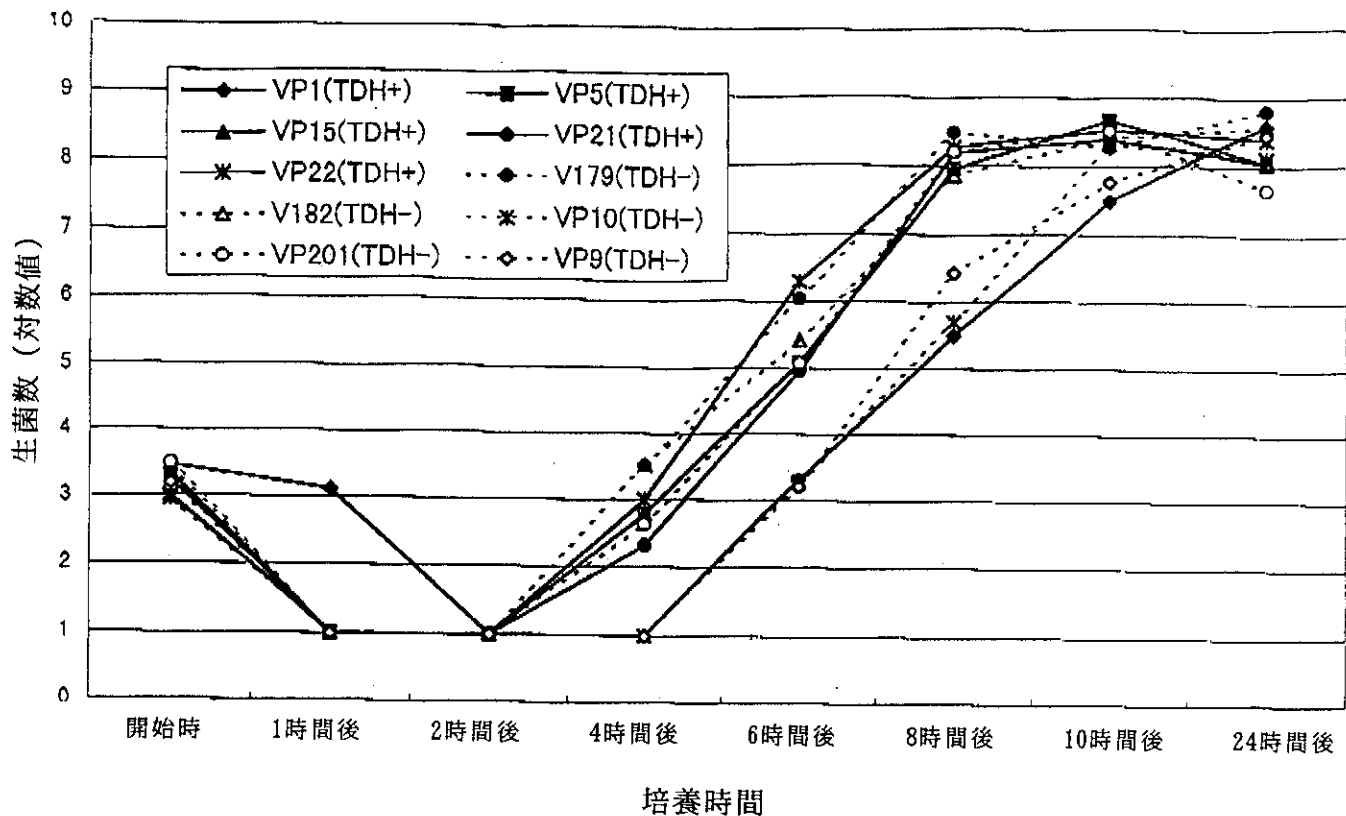


図 2-2 1%食塩加アルカリペプトン水に接種した試験菌の生菌数測定結果

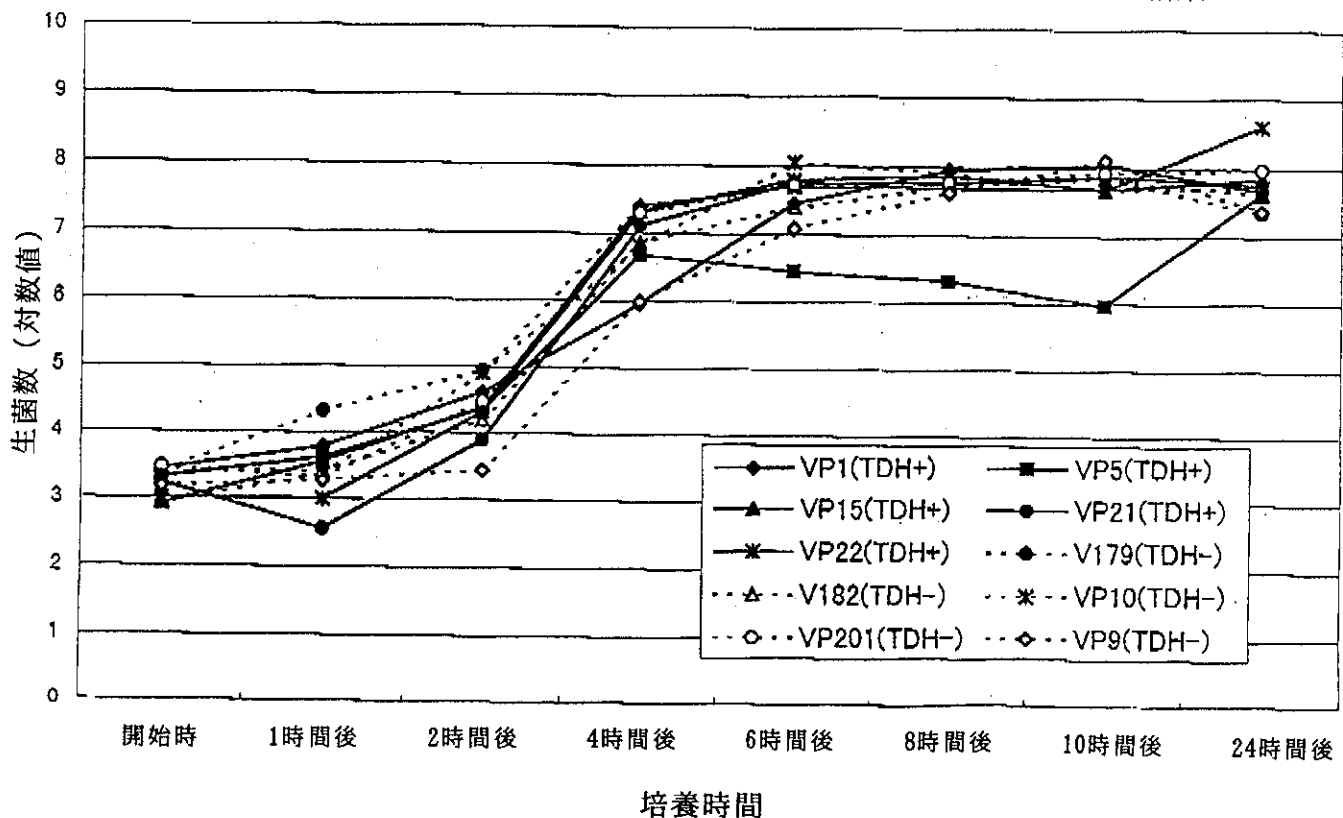


表5 アサリ剥き身(市販)からの腸炎ビブリオ検出法の検討(1999.9.7実施)

1999.9.10

使用培地(pH)	調製方法 ^{*1}	培養前				培養後(36°C, 18時間)									
		pH	培養液 1ml 当たりの生菌数			pH	培養液 1ml 当たりの生菌数								
			TCBS 平板塗抹 ^{*2}	3%NaCl 加 SA ^{*3}	細菌数		TCBS 平板塗抹 ^{*2}	3%NaCl 加 SA ^{*3}	細菌数						
		白糖非分解集落数	白糖分解集落数	白糖非分解集落数	白糖非分解集落数	白糖分解集落数	白糖非分解集落数	白糖分解集落数	白糖非分解集落数	白糖分解集落数	白糖非分解集落数	白糖分解集落数	白糖非分解集落数	白糖分解集落数	白糖非分解集落数
食塩ポリミキシン ブイオン(pH 7.4) [日水製薬]	a	7.4	<10	10	1.2 × 10 ⁴	6.2	2.3 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁷	1.1 × 10 ⁸					
	b	7.5	<10	10	2.1 × 10 ³	6.6	9.1 × 10 ⁷	2.8 × 10 ⁷	2.0 × 10 ⁶	5.6 × 10 ⁸					
変法食塩ポリミキシン ブイオン(pH 9.2) [日水製薬]	a	8.9	80	90	2.9 × 10 ⁴	6.4	2.6 × 10 ⁷	2.8 × 10 ⁶	9.0 × 10 ⁵	1.9 × 10 ⁸					
	b	9.0	40	30	1.4 × 10 ⁴	7.4	1.5 × 10 ⁸	3.5 × 10 ⁷	1.3 × 10 ⁷	6.8 × 10 ⁸					
アルカリ性ペプトン (pH 8.3)[自製]	a	8.7	1.1 × 10 ²	1.6 × 10 ²	1.5 × 10 ⁴	6.6	2.0 × 10 ⁷	1.5 × 10 ⁷	7.3 × 10 ⁶	1.9 × 10 ⁸					
	b	8.9	40	30	2.2 × 10 ⁴	6.9	1.0 × 10 ⁷	3.9 × 10 ⁶	1.4 × 10 ⁶	1.6 × 10 ⁸					
変法アルカリ性ペプトン (pH 8.8)[自製]	a	9.0	80	90	3.0 × 10 ⁴	6.5	3.0 × 10 ⁷	5.6 × 10 ⁶	7.6 × 10 ⁶	2.1 × 10 ⁸					
	b	9.0	20	40	2.1 × 10 ⁴	7.0	2.1 × 10 ⁷	6.0 × 10 ⁶	8.0 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁸					

*1 a ; ホモジナイズ(ストマッカー), b ; リンス(手振り)

*2 TCBS 寒天平板塗抹培養法(培養条件: 36°C, 20 時間)

*3 3%食塩加標準寒天平板培養法(培養条件: 36°C, 48 時間)

表6 増菌条件の相違によるTCBS上のコロニー数

条件	希釈倍率	VP15		VP17		VP9		VP28	
		緑	黄	緑	黄	緑	黄	緑	黄
1	-7	0	3	0	58	-	∞	0	9
	-6	0	31	0	∞	0	42	0	26
	-5	0	166	∞	∞	0	221	0	195
	-4	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
2	-7			0	1	-	∞	0	8
	-6			10	61	6	30	7	47
	-5	53	352	∞	∞	86	217	∞	∞
	-4	∞	>∞	∞	∞	∞	-	∞	-
3	-6	1	0	4	11	3	2	0	0
	-5	9	10	36	96	26	28	0	1
	-4	58	158	∞	∞	∞	∞	∞	∞
	-3	∞	>∞	∞	>-	∞	∞	∞	∞
4	-6	-	-	-	-	-	-	-	-
	-5	0	168	-	-	-	-	-	-
	-4	∞	∞	0	349	-	∞	0	150
	-3	∞	∞	∞	∞	-	∞	∞	∞
5	-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	-5			0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3	10	2	0	36	6	90	16	111
6	-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3	∞	-	∞	∞	∞	∞	∞	>∞
7	-6	0	0	0	0	∞	∞	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3	-	∞	∞	>∞	0	0	∞	∞

条件	希釈倍率	VP15		VP17		VP9			VP28	
		緑	黄	緑	黄	緑	黄	黒	緑	黄
8	-3	0	44	18	49	∞			0	102
	-2	9	139	1	100	42	167		20	100
	-1	50	300	∞<	∞	∞	∞		50	200
	0	100	500	∞	∞				∞	∞
9	-3	0	180	0	257	26	317		0	185
	-2	∞	∞	∞	∞	∞	∞			∞
	-1	∞	∞	∞	∞	∞	∞		0	∞
	0	∞	∞	∞	∞	0	∞		0	∞
10	-3	1	4	0	0	1	12		0	7
	-2	0	30	0	20	1	5		4	28
	-1	4	82	26	100	0	53	4	14	65
	0	1		100	100	37	54	50	124	∞
11	-6	-	-	-	-	-	-		-	-
	-5	∞	∞	-	-	30	1		0	15
	-4	∞	∞	-	-	47	180		0	∞
	-3	∞	∞	-	-	∞<	∞		0	1
12	-7	0	12	0	6	0	18		0	∞
	-6	0	84	19	197	0	133		0	48
	-5	0	∞	0	∞	0	∞		0	∞
	-4	0	∞	0	∞	0	∞		0	∞

表7 増菌方法によるTCBS上のコロニー数（比率＝緑／黄）

条件	希釈倍率	VP15		VP17		VP9		VP28	
		緑	黄	緑	黄	緑	黄	緑	黄
1	-7	0	0	0	0	-	-	0	0
	-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	-5	0	0	-	-	0	0	0	0
	-4	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-7	-	-	0	0	-	-	0	0
	-6	-	-	16	16	20	15	-	-
	-5	34	34	-	-	40	-	-	-
	-4	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-6	-	-	36	36	150	0	0	0
	-5	90	90	38	38	93	0	14	14
	-4	37	37	-	-	-	-	22	22
	-3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-6	-	-	-	-	-	-	-	-
	-5	0	0	-	-	-	-	0	0
	-4	-	-	0	0	-	-	-	-
	-3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3	500	500	0	0	6.7	14	-	-
6	-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-6	0	0	0	0	-	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
	-3	-	-	-	-	-	-	-	-

8	-3	0	0	37	0	0	0
	-2	6.5	6.5	-	20	20	20
	-1	17	17	-	25	25	25
	0	20	20	-	-	-	-
9	-3	0	0	0	0	0	0
	-2	-	-	-	-	-	-
	-1	-	-	-	-	-	-
	0	-	-	-	-	-	-
10	-3	-	-	-	0	0	0
	-2	0	0	0	14	14	14
	-1	4.9	4.9	26	22	22	22
	0	-	-	100	-	-	-
11	-6	-	-	-	-	-	-
	-5	-	-	-	0	0	0
	-4	-	-	-	-	-	-
	-3	-	-	-	-	-	-
12	-7	0	0	0	-	-	0
	-6	0	0	9.7	0	0	0
	-5	0	0	0	-	-	0
	-4	0	0	0	-	-	0

表8 実験3の成績

増菌条件	検体 番号	増菌培養物の希釈 10^{-5}			増菌培養物の希釈 10^{-4}		
		緑色集落数	その他集落 数	%	緑色集落数	その他集落 数	%
基礎培地→ ポリミキシ ン	1	4	67	6			
	2	15	61	25			
	3	3	79	4			
ポリミキシ ン	4	16	200	8			
	5	28	156	18			
	6				26	296	9
アルカリペ プトン	7				30	242	12
	8				11	142	8
	9	6	46	13			