

BPWにて一夜培養の供試菌株を滅菌生理食塩水にて $10^2 \sim 10^3$ / ml のオーダーとなるように希釈し、この希釈液 1ml を 90ml の上記の 3 種類の増菌培地に各 10g の滅菌（オートクレーブにて 121 °C、15 分）または未滅菌のカイワレ大根（可食部）とともに加え、36 °C、18 時間好気あるいは嫌気培養（アネロパク・ケンキ、三菱ガス化学）後、CT サプリメント（Mast Diagnostics）加マッコンキー寒天培地（CT-LMAC）または CT-SMAC 寒天培地に塗抹接種し、36 °C、20 ~ 22 時間培養した。培養後、発育した集落数を測定した。また、一部の菌株においては飢餓状態（洗浄 O157 菌体を脱イオン水中で 23 °C、3 週間保持）の菌体についても同様の実験を実施した。なお、未滅菌カイワレ大根の実験においては、出現した無色集落は可能な限り釣菌し、常法（生化学性状試験および抗血清凝集試験）により O157 の同定を行った。

2) 分離培地の検討

O157 分離菌株 94 株について CT-SMAC ならびに CT-SSMAC 寒天培地に画線接種し、集落性状を観察した。また、生食用野菜計 32 検体について、可食部 25g を 225ml の BPW に接種して 36 °C、18 時間培養後、その培養液を滅菌生理食塩水で 10 培段階希釈したものを上記の 2 種類の分離培地に塗抹接種し、36 °C、20 ~ 22 時間培養した。培養後、出現した集落数を測定した。

C. 研究結果

増菌培地の検討

1) 試験管レベルでの各種増菌法の比較

BPW および mEC+n を用いて 36 °C および 42 °C にて増菌培養を行った際の O157 菌株の発育状況を表 2 に示した。いずれの菌株においても BPW を用いて 36 °C で増菌させた場合に最も菌数が高かった。一方、mEC+n を用いて 42 °C で増菌させたものについては全く発育がみられなかった。また、KE-31 株は BPW を用いて 36 °C で増菌させたもの以外、全く発育しなかった。

2) 滅菌カイワレ大根を用いての各種増菌培養法の比較

BPW および mEC+n を用いて 36 °C および 42 °C にて増菌培養を行った際の O157 菌株の発育状況を表 3 に示した。いずれの菌株についても試験管レベルで増菌させた場合と比べて菌数は高くなった。特に、試験管レベルでは全く発育が認められなかった培養条件においても、滅菌カイワレ大根を加えることによって十分な発育が認められるものもあった。一方、菌株によってはいずれの増菌培地を用いても 42 °C では全く発育のみられないままのものもあった。O157 菌株およびカイワレ大根由来菌株を BPW および STG-BPW を用いて好気および嫌気条件下で混合培養を行った際の発育状況を表 4 に示した。O157 菌株はいずれの増菌培地、培養条件においても 10^8 オーダーまで発育したのに対し、カイワレ大根由来株の発育は STG-BPW を用いて増菌さ

せたものでは好気、嫌気いずれの培養条件においても完全に抑制された。

3) 未滅菌カイワレ大根を用いての各種増菌培養法の比較

BPW、STG-BPW および mEC+n を用いて増菌培養を行った際の O157 菌株の発育状況を表 5～11 に示した。O157 の検出率が最も高かった増菌培地は STG-BPW であった。STG-BPW は他の増菌培地と比較して全般的に O157 以外のソルビトール非分解菌の発育を抑制しており、また赤色集落を形成する菌に対しても抑制効果が認められた。一方、飢餓状態（洗浄菌体を滅菌脱イオン水中で 23℃、3 週間保持）の O157 について同様の実験を行った結果を表 12 および 13 に示した。供試した 2 株において mEC+n を用いて増菌させた場合には O157 は検出されなかった。

分離培地(CT-SSMAC 寒天培地)の検討

1) O157 野外分離株の CT-SSMAC 上での集落性状

供試された 94 株すべてが無色で β -ガラクトシダーゼ陽性（蛍光を発する）の集落性状を示し、例外は認められなかった（表 14）。

2) 各種生食用野菜の培養液の CT-SMAC および CT-SSMAC での培養時に各培地に発育した集落の比較

CT-SSMAC では CT-SMAC で無色の集落が出現した野菜の 50%において無色集落が不検出となるかあるいは数の減少がみられた。また、供試された 32 検体の生食用野菜においては O157 と同一の集落性状を示す集落（無色で β -ガラクトシダーゼ陽性）は検出されなかった（表 15）。

D. 考察

現在、食品からの O157 検出用の増菌培地として推奨されている mEC+n は、本研究での試験管レベルおよびカイワレ大根を用いた O157 添加実験の結果から、O157 の増菌用としては不適當であることが示唆された。また、生食用野菜の検体には多くの *Pseudomonas* 属等の好気性オキシダーゼ陽性グラム陰性桿菌が存在しており、これらが O157 の検出時に障害となりうることが指摘されている。そこで増菌培地に還元剤であるチオグリコール酸ナトリウムを添加したバッファードペプトン水を用いて試験管レベルおよびカイワレ大根を用いた O157 添加実験でその有用性を検討したところ、生食用野菜からの O157 の検出用として極めて有用であることが明らかとなった。一方、本研究で考案された CT-SSMAC 寒天培地と既存の CT-SMAC 寒天培地について、種々の生食用野菜からの O157 検出用としての有用性を比較検討したところ、CT-SSMAC 寒天培地において O157 と類似する性状を示す集落数がより減少もしくは検出率が著しく低下した。このことから CT-SSMAC 寒天培地は明らかに O157 検出用として有用でるとともに、それがカイワレ大根にとどまらず他の生食用野菜につい

でも用いられうることが確認された。

以上、本研究において改良、検討された増菌培地および分離培地を用いての検出は既存の方法に比べて有用であると思われる。また、IMS 法による O157 菌体細胞の捕捉操作等を一連の検査に組み入れることにより、さらにその検出率を向上させることも可能であると考ええる。

E. 研究発表

1) 学会発表

第 130 回日本獣医学会学術集会 (2000 年 10 月) : 佐多辰、藤沢倫彦、山井志朗、島田俊雄。生食用野菜 (カイワレ大根) からの腸管出血性大腸菌 O157 の分離のための平板培地の検討

第 83 回日本細菌学会関東支部総会 (2000 年 11 月) : 佐多辰、藤沢倫彦、山井志朗、島田俊雄。ソルビットマッコンキー寒天培地の改良に関する検討

2) 論文発表

Fujisawa, T., S. Sata, K. Aikawa, T. Takahashi, S. Yamai, and T. Shimada (2000)
Modification of Sorbitol MacConkey medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3117-3118.

表1 増菌培地の検討に用いられた菌株

菌 株	由来	血清型	病原因子
<i>Escherichia coli</i> NIID 2	患者便	O157:H7	VT-1,2
<i>Escherichia coli</i> NIID 457	食品	O157:H7	VT-1,2
<i>Escherichia coli</i> NIID 1496	蠅	O157:H7	VT-2
<i>Escherichia coli</i> NIID 1856	食品	O157:H7	VT-1,2
<i>Escherichia coli</i> KE-31	牛便	O157:H7	VT-1,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> X41	カイワレ大根		
Oxidase-positive 1c	カイワレ大根		
Oxidase-positive 2c	カイワレ大根		
Oxidase-positive 1i	カイワレ大根		
Oxidase-positive 3a	カイワレ大根		
Oxidase-positive 4aa	カイワレ大根		

表2 BPWおよびmEC+nにおけるO157菌株の発育状況

菌株	O157初期菌数 (CFU/ml)	36°C、18時間培養 (CFU/ml)		42°C、18時間培養 (CFU/ml)	
		BPW	mEC+n	BPW	mEC+n
NIID 2	2.6×10^1	1.5×10^8	1.2×10^8	8.2×10^7	>10
KE-31	1.3×10^1	7.7×10^7	>10	>10	>10

表3 滅菌カイワレ大根を用いての各種培養条件下におけるO157菌株の発育状況

菌株	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC			
		36°C、18時間培養 (CFU/ml)		42°C、18時間培養 (CFU/ml)	
		BPW	mEC+n	BPW	mEC+n
NIID 2	3.2×10^1	1.6×10^9	1.7×10^9	1.4×10^9	4.7×10^8
KE-31	1.4×10^1	7.2×10^8	4.8×10^8	>10	>10

表4 滅菌カイワレ大根を用いての各種培養条件下における供試菌株の発育状況

菌株	CT-LMAC上で の集落性状	初期菌数 (CFU/ml)	36°C、18時間好気培養後の 菌数 (CFU/ml)		36°C、18時間嫌気培養後の 菌数 (CFU/ml)	
			BPW	STG-BPW	BPW	STG-BPW
NIID 2+1i	赤色(NIID 2)	3.8×10^1	6.8×10^8	3.1×10^8	8.3×10^8	8.3×10^8
	無色(1i)	2.8×10^1	1.2×10^8	ND*	8.0×10^7	ND
NIID 2+3a	赤色(NIID 2)	3.8×10^1	8.6×10^8	4.1×10^8	4.4×10^8	2.8×10^8
	無色(3a)	8.7×10^0	1.5×10^8	ND	5.5×10^7	ND
NIID 2+1c	赤色(NIID 2)	3.8×10^1	7.2×10^8	3.0×10^8	NT**	NT
	無色(1c)	2.8×10^1	9.9×10^7	ND	NT	NT
NIID 2+2c	赤色(NIID 2)	3.8×10^1	8.0×10^8	2.4×10^8	NT	NT
	無色(2c)	2.5×10^1	5.0×10^5	ND	NT	NT
NIID 2+ X41	赤色(NIID 2)	3.8×10^1	7.6×10^8	2.9×10^8	NT	NT
	無色(X41)	5.4×10^0	1.1×10^7	ND	NT	NT
NIID 2+4aa	赤色(NIID 2)	3.8×10^1	6.5×10^8	5.3×10^8	NT	NT
	無色(4aa)	1.3×10^1	8.1×10^7	ND	NT	NT

*検出できず

**未実施

表5 未滅菌カイワレ大根を用いた各増菌培地における発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 2	赤色		1.1×10^8	1.0×10^7	1.1×10^9
	無色 <i>E. coli</i> O157	2.9×10^1	1.0×10^7	1.0×10^7	1.0×10^8
	無色 non- <i>E. coli</i> O157		1.0×10^8	2.0×10^7	6.0×10^7
対照	赤色		1.0×10^8	9.0×10^6	5.4×10^8
	無色		5.0×10^7	8.0×10^6	8.0×10^7

表6 未滅菌カイワレ大根を用いての各増菌培地における発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 2	赤色		3.0×10^7	1.1×10^6	9.0×10^6
	無色 <i>E. coli</i> O157	2.9×10^1	ND*	9.0×10^5	ND
	無色 non- <i>E. coli</i> O157		1.5×10^7	1.6×10^6	1.0×10^7
対照	赤色		1.8×10^7	3.2×10^6	3.0×10^7
	無色		2.0×10^7	5.0×10^5	2.0×10^8

*検出できず

表7 未滅菌カイワレ大根を用いての各増菌培地における発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 2	赤色		1.9×10^7	4.0×10^5	2.0×10^6
	無色 <i>E. coli</i> O157	2.1×10^1	ND*	1.0×10^6	1.3×10^6
	無色 non- <i>E. coli</i> O157		4.1×10^6	ND	2.0×10^6
対照	赤色		1.4×10^7	1.2×10^6	2.1×10^6
	無色		3.9×10^7	1.7×10^5	ND

*検出できず

表8 未滅菌カイワレ大根を用いての各増菌培地における発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 2	赤色		1.2×10^7	2.0×10^5	1.1×10^5
	無色 <i>E. coli</i> O157	2.1×10^1	3.0×10^7	1.1×10^6	ND*
	無色 non- <i>E. coli</i> O157		9.0×10^6	5.0×10^5	4.8×10^5
対照	赤色		1.1×10^7	3.0×10^5	2.3×10^5
	無色		4.0×10^6	5.4×10^5	3.7×10^5

*検出できず

表9 未滅菌カイワレ大根を用いての各増菌培地における発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 457	赤色		2.0×10^6	1.6×10^5	2.0×10^5
	無色 <i>E. coli</i> O157	2.9×10^1	1.6×10^8	3.1×10^7	1.2×10^8
	無色 non- <i>E. coli</i> O157		ND*	ND	1.0×10^6
対照	赤色		2.4×10^6	3.3×10^5	1.7×10^6
	無色		5.6×10^5	1.0×10^5	1.0×10^5

*検出できず

表10 未滅菌カイワレ大根を用いての各増菌培地における発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 1496	赤色		1.9×10^8	3.8×10^7	3.5×10^7
	無色	<i>E. coli</i> O157	3.4×10^1	1.7×10^7	ND
	無色	non- <i>E. coli</i> O157		3.0×10^6	1.0×10^6
対照	赤色		2.9×10^8	6.0×10^7	3.3×10^8
	無色		4.0×10^6	ND*	2.9×10^7

*検出できず

表11 未滅菌カイワレ大根を用いての各増菌培地における発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 1856	赤色		3.0×10^6	5.5×10^4	ND
	無色 <i>E. coli</i> O157	2.6×10^1	6.0×10^7	1.8×10^7	1.3×10^8
	無色 non- <i>E. coli</i> O157		ND*	ND	ND
対照	赤色		1.1×10^7	1.7×10^5	3.0×10^5
	無色		1.5×10^7	5.4×10^4	1.0×10^6

*検出できず

表12 未滅菌カイワレ大根を用いての各増菌培地における飢餓状態のO157菌株の発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 457	赤色		9.8×10^7	4.1×10^6	1.4×10^7
	無色 <i>E. coli</i> O157	1.1×10^1	1.0×10^7	3.0×10^5	ND*
	無色 non- <i>E. coli</i> O157		1.0×10^7	1.6×10^6	3.7×10^7
対照	赤色		1.1×10^8	3.3×10^6	1.6×10^7
	無色		1.2×10^7	1.1×10^6	3.9×10^7

*検出できず

表13 未滅菌カイワレ大根を用いての各増菌培地における飢餓状態のO157菌株の発育状況

菌株	集落	O157初期菌数 (CFU/ml)	CT-SMAC		
			36°C、18時間好気培養後の菌数 (CFU/ml)		
			BPW	STG-BPW	mEC+n
NIID 1496	赤色		2.4×10^8	1.1×10^8	6.0×10^8
	無色 <i>E. coli</i> O157	1.2×10^1	3.0×10^6	1.0×10^5	ND
	無色 non- <i>E. coli</i> O157		ND*	ND	1.0×10^7
対照	赤色		4.8×10^8	1.4×10^8	9.1×10^8
	無色		ND	ND	ND

*検出できず

表14 CT-SMACおよびCT-SSMAC寒天培地上のO157菌株の集落性状

菌株	血清型	病原因子	由来	CT-SMAC		CT-SSMAC
				色	色	蛍光
212	O157:H7	VT-1	ヒト	無色	無色	+
274	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
282	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
285	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
286	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
287	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
288	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
291	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
292	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
293	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
297	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
307	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
310	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
317	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
319	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
322	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
325	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
328	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
340	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
343	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
344	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
369	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
370	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
391	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
570	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
573	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
574	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
593	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
606	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
636	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
637	O157:H7	VT-1,2	ヒト	無色	無色	+
259	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
294	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
295	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
296	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
304	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
309	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
311	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
312	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
316	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
320	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
389	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
399	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
533	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
572	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
666	O157:H7	VT-2	ヒト	無色	無色	+
394	O157:NM	VT-2	ヒト	無色	無色	+
395	O157:NM	VT-2	ヒト	無色	無色	+

365	O157:H7	VT-1	食品	無色	無色	+
366	O157:H7	VT-1	食品	無色	無色	+
114	O157:H7	VT-1,2	食品	無色	無色	+
205	O157:H7	VT-1,2	食品	無色	無色	+
424	O157:H7	VT-1,2	食品	無色	無色	+
10	O157:H7	VT-2	食品	無色	無色	+
21	O157:H7	VT-1,2	環境	無色	無色	+
23	O157:H7	VT-1,2	環境	無色	無色	+
24	O157:H7	VT-1,2	環境	無色	無色	+
149	O157:H7	VT-1,2	環境	無色	無色	+
154	O157:H7	VT-1,2	環境	無色	無色	+
270	O157:H7	VT-1,2	環境	無色	無色	+
214	O157:H7	VT-2	環境	無色	無色	+
313	O157:H7	VT-2	環境	無色	無色	+
87	O157:NM	VT-2	環境	無色	無色	+
88	O157:NM	VT-2	環境	無色	無色	+
628	O157:NM	VT-2	環境	無色	無色	+
301	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
302	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
372	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
373	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
385	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
386	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
566	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
568	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
569	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
575	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
633	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
634	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
635	O157:H7	VT-1,2	牛	無色	無色	+
632	O157:NM	VT-1,2	牛	無色	無色	+
381	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
565	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
567	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
576	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
577	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
629	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
630	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
631	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
638	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
651	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
656	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
661	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
667	O157:H7	VT-2	牛	無色	無色	+
188	O157:NM	VT-2	牛	無色	無色	+
269	O157:H7	VT-1,2	犬	無色	無色	+

表15 各種生食用野菜の増菌培養液の培養時に出現した集落

生食用野菜	CT-SMAC (CFU/ml)		CT-SSMAC (CFU/ml)	
	赤色集落	無色集落	赤色集落	無色集落
キャベツ	4.0×10^6	2.4×10^6	5.4×10^6	1.2×10^6
キャベツ	7.6×10^6	2.0×10^6	8.1×10^6	ND
キャベツ	1.7×10^7	ND*	1.8×10^7	ND
キャベツ	5.9×10^6	3.4×10^6	6.4×10^6	6.0×10^5
サラダ菜	1.0×10^6	2.2×10^7	2.0×10^6	3.2×10^7
サラダ菜	1.0×10^6	2.2×10^7	2.0×10^6	2.3×10^7
サラダ菜	ND	1.4×10^7	1.2×10^7	ND
サンチュ	4.0×10^4	2.2×10^7	2.0×10^6	3.2×10^7
レタス	1.0×10^5	6.9×10^5	2.0×10^5	7.0×10^5
レタス	<10	<10	<10	<10
レタス	3.0×10^4	5.2×10^5	1.4×10^5	1.4×10^5
レタス	2.0×10^4	6.9×10^5	2.2×10^5	4.8×10^5
トマト	ND	8.0×10^5	ND	8.7×10^5
トマト	<10	<10	<10	<10
キュウリ	4.3×10^5	1.0×10^5	3.8×10^5	8.0×10^4
キュウリ	3.9×10^5	2.5×10^5	4.2×10^5	2.8×10^4
キュウリ	9.0×10^3	1.2×10^4	1.4×10^4	ND
サニーレタス	8.0×10^4	5.6×10^5	1.0×10^5	7.0×10^5
サニーレタス	8.0×10^4	5.6×10^5	3.8×10^5	2.1×10^5
サニーレタス	1.0×10^5	1.8×10^7	1.4×10^7	1.0×10^5
クレソン	8.0×10^4	1.8×10^5	1.6×10^5	4.0×10^4
クレソン	1.8×10^5	8.0×10^4	1.6×10^5	7.0×10^4
クレソン	8.0×10^4	2.8×10^5	4.0×10^5	ND
パセリ	8.7×10^6	5.0×10^5	9.8×10^6	ND
パセリ	8.7×10^6	1.5×10^5	1.0×10^7	ND
パセリ	8.0×10^5	3.7×10^6	4.2×10^6	ND
セロリ	5.4×10^7	ND	4.9×10^7	ND
セロリ	4.0×10^7	3.0×10^7	4.9×10^7	ND
セロリ	5.4×10^7	ND	4.9×10^7	ND
おいしい菜	ND	8.0×10^6	ND	1.2×10^7
大根	<10	<10	<10	<10
大根	1.2×10^4	1.7×10^4	2.0×10^4	ND

*検出できず

堆肥有機肥料製造工程における衛生微生物学的研究

研究協力者

上田 成子

女子栄養大学助教授

研究要旨：有機肥料は堆肥、動物腸内容物を含有するものと含有しないもの
とに大きく分類される。本報告では堆肥有機肥料製造工程における衛生微生物
学的検討を行った。この結果、冬期の発酵製造過程10日目に0146:H21（病
原性大腸菌）、夏期の原材料コーン・大豆ダストから028ac:HUT（組織侵入
性大腸菌）、屠場汚泥から0125:H19（病原大腸菌）と08:HUT（毒素原性大腸
菌）、発酵発酵製造過程1ヶ月目から018:HUT（病原性大腸菌）の5菌株が
検出された。以上の結果、衛生的な堆肥の製造・生産に際しては十分な発酵
と十分な発酵熱が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

有機栽培野菜は安全・健全な食品として世界各国で生産量が増加傾向にある。また、農産物の生産に際してGAP (Good Agricultural Practices) に基づいた衛生管理のなされた栽培方式が各国で推奨される傾向にある。有機栽培には有機肥料が使用されるが、有機肥料の腸管病原菌についての調査研究はほとんどなされていない。これまで演者らは有機栽培野菜、市販合成有機肥料、有機肥料原材料の腸管病原菌などの細菌学的検討をおこない、市販合成有機肥料から *Salmonella* Enteritidis を検出し生食用野菜への二次汚染の可能性を示唆した。有機肥料は堆肥、動物腸内容物を含有するものと含有しないもの
とに大きく分類される。ここでは堆肥について報告する。

B. 研究方法

①堆肥と検体の収集：堆肥はオガクズ、もみ殻、落花生殻、生牛糞、乾燥牛糞、豚糞汚物、玉蜀黍・大豆ダスト、ダメージ物、屠場汚泥、白土などの11種の原材料を用いて製造された。検体の収集は冬期の1999年の12月と初夏期の2000年5月に仕込まれた試料を収集した。原材料、仕込み後0、10および20日目さらに1、2、3、4、5 および6 月目に検体を収集した。これら発酵中の堆肥の温度についても測定した。②試験方法：検体は、食品衛生検査指針に準拠し一般細菌、大腸菌群、糞便性大腸菌群、腸球菌および *Bacillus cereus* の菌数を測定した。また、*Salmonella*、Enterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7、*Listeria monocytogenes* は免疫磁気ビーズとPCR法の併用法により検査した。分離された大腸菌については病原性との関連性を検討するために血清型別を行った。また、分離腸球菌についてはバンコマイシン耐性についても検討した。さらに乳酸菌、酵母およびカビについても検査した。また、pH、水分含量（赤外水分計法）および水分活性（Rotronic ag AwVc）を測定した。

C. 結果および考察

冬期の発酵堆肥0日目の大腸菌群、糞便性大腸菌群および腸球菌はそれぞれ6.7 log of CFU/g、>110 MPN/g、4600 MPN/gであり、それに対し初夏期はそれぞれ5.7 ± 1.0 log of CFU/g、110 ± 0 MPN/g、19,6067 ± 61283 MPN/gであり、腸球菌は冬期に比較し初夏期に100倍高かった。冬期の発酵最終時（6ヶ月目）の大腸菌群、糞便性大腸菌群および腸球菌はそれぞれ3.7 log of CFU/g、15 MPN/g、460 MPN/gであり、初夏期はそれぞれ4.0 ± 0.6 log of CFU/g、2.7 ± 1.2 MPN/g、132 ± 72 MPN/gであった。これらの菌群は発酵の経過と共に菌数は減少した。病原大腸菌は冬期の発酵10日目の検体から0146:H-UT（病原性大腸菌）が検出されたが、20日目以降は検出されなかった。なお冬期の原材料からも病原大腸菌は検出されなかった。一方、初夏期は原材料の屠場汚泥から0125:H19（病原性大腸菌）と08:H-UT（毒素原性大腸菌）が、また、玉蜀黍・大豆ダストから028ac:H-UT（組織侵入性大腸菌）が検出された。さらに発酵1ヶ月目の検体から018:H-UT（病原性大腸菌）が検出されたが、2ヶ月目以降は病原大腸菌は検出されなかった。なお、*Salmonella*、Enterohemorrhagic *E. coli* 0157:H7、*L. monocytogenes* は検出されなかった。以上の結果、衛生的な堆肥の製造・生産に際しては十分な発酵と十分な発酵熱が必要であることが示唆された。

D. 結論

以上の結果、有機栽培野菜を微生物学的に安全・健全に生産するためには有機肥料の腸管病原菌フリーが望まれる。そのためには腸管病原菌を有機肥料の製造発酵過程で除去する方が最重要となる。さらに、製造中での発酵肥料の田畑への野積や非閉鎖系施設での製造は野生動物・家畜および衛生害虫により腸管病原菌が他へ伝播することから有機肥料の製造にあたっては閉鎖系の施設で行うことが重要と考えられる。