

## 論理的手法による寒天培地の開発（例：サルモネラ菌用）

< マイクロバイオ株式会社 >

はじめに

寒天培地の開発は「科学」と言うよりは「芸術」と言われることがある。これは、開発において、論理的でシステマティックな手法が導入されていないことにその一因がある。

本稿では、より論理的な開発手法とこれにより開発された高感度なサルモネラ寒天培地の例を紹介する。

### 1. 液体培地による組成の決定

寒天培地を開発するうえで、細菌の増殖促進剤や選択抑制剤から構成される組成を決定するためには液体培地を利用する機会が多い。これは、基礎的な培地の性能を液体で把握する方が、無数の組み合わせを試行してみるという点では、より容易なためである。さらに、液体培地を使用して細菌の増殖過程を数値化し、このデータによりグラフ表示ができるようなシステムを採用すれば、培養液の性能が客観的に表現できるので、培地の調製がよりいっそう正確なものになる。

液体培地を使用すれば、ターゲット菌の増殖を阻害せず、かつ、選択性の高い最良の組成を決定することが容易となるが、寒天培地の開発においては、この時点で決定される基本的な組成が最終性能を大きく左右する。

例として、サルモネラ菌を検出する培地の開発を挙げてみる。この場合、培養温度も含め、まずは添加剤の量などのパラメータを多段階に振らせる特性試験を実施し、組成を決定して液体培地に十分な選択特性を持たせる。（図1）

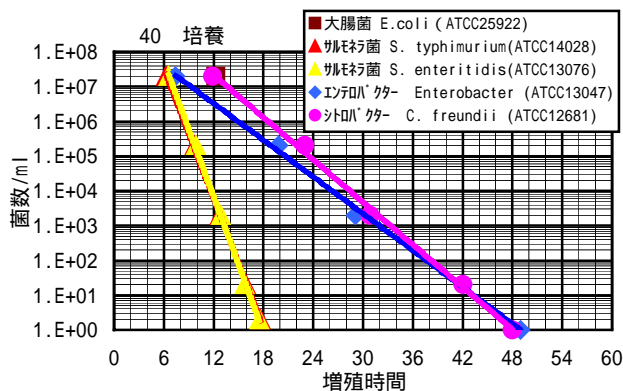


図1 サルモネラ菌用液体培地の菌増殖特性

### 2. 寒天培地による培養時間の決定

組成が決定された液体培地に寒天を加えると寒天培地ができる。この寒天培地を使用してターゲットであるサルモネラ菌を培養すると、液体培地においてサルモネラ菌 (*S. typhimurium*、*S. enteritidis*) 1CFU/mlの試料が反応する18時間の時点でコロニーが目視確認できる。この寒天培地の場合、硫化水素産生による黒色反応などを確実に確認するためにさらに6時間培養して、24時間後に確認すればよい。この寒天培地においては、24時間が検査プロトコール時間となる。

大腸菌はほぼ完全に抑制されているのでコロニーを形成しない。一般的に寒天培地に菌がコロニーを形成する時間は、液体培地のグラフに示されている 1,000CFU/ml の試料が検出できる時間とほぼ相関がとれていると言える。シトロバクターとエンテロバクターの場合には 30 時間以上経過するとコロニーが確認できる。

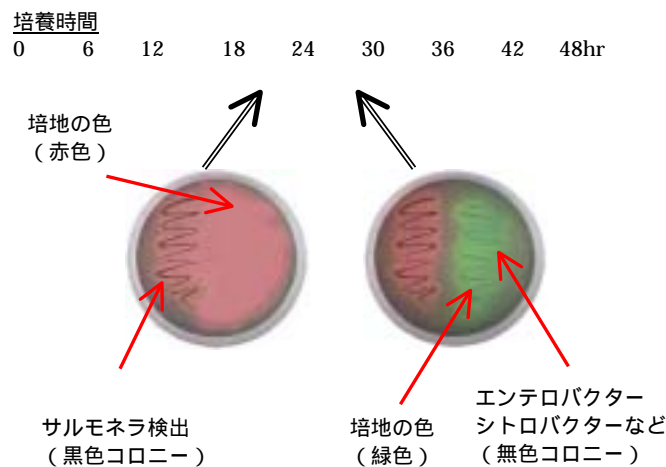


図2 培養時間による増殖度 (40 培養)

図2は、培地表面の左半分にサルモネラ菌を、右半分にエンテロバクターなどを塗った時の培養時間による増殖度合いを示したものである。検査プロトコール時間である 24 時間後に目視検査を実施すると、培地は赤色で、黒色のサルモネラ菌コロニーが培地面の左半分に形成されていることが確認できる。さらに培養し続け、30 時間後に目視検査を実施すると、培地面の右半分の色が緑色に変わり、その部分にエンテロバクターなどの無色のコロニーが形成されることが確認できる。

### 3. 選択要素の追加

ターゲット菌毎に用意された寒天培地には、選択性という意味で、いろいろな要素が盛り込まれている。基本的な培地自体の選択性は、ターゲット菌以外の増殖速度を制御することにある。これは、前述のように、時間軸に対しての観察する時点も目視確認に影響を与えることを意味している。これに加えて、例に挙げたサルモネラ菌を選択的に確認しようとする場合には、その菌の持つ性質を利用した次のような要素が採用できる。

- リジン脱炭酸
- 硫化水素産生

#### (A) リジン脱炭酸 ----- 培地の色変化

ターゲットとしているサルモネラ菌は、リジンを培地に添加しておくことで脱炭酸し、アルカリ性のアミンを産生する。他の増殖可能な菌であるエンテロバクターやシトロバクターなどは、乳糖および白糖の両者あるいはいずれかを分解し、酸を産生する。これによる pH 変化を利用すると、菌の増殖に影響しない pH 指示薬を組み合わせることにより、サルモネラ菌の場合には「赤色」に、他の菌の場合には「緑色」というように、培地面の色を変化させることが可能となる。(図3)

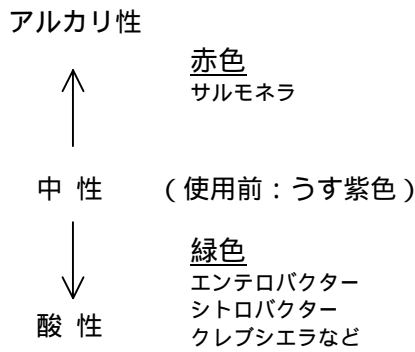


図3 リジン脱炭酸による培地の色特性

(B) 硫化水素産生 ----- コロニーの黒色化

サルモネラ菌は、チオ硫酸ナトリウムなどの含硫アミノ酸を利用して硫化水素を産生する。この産生された硫化水素は、クエン酸鉄アンモニウムと反応すると黒色の硫化鉄となる。培地にこの2つの化学物質を添加しておく、サルモネラ菌は黒色のコロニーを形成する。シトロバクターなども硫化水素を産生するが、pHが酸性となるので硫化鉄への反応は進行しない。(表1)

サルモネラ	黒色コロニー
エンテロバクター シトロバクター クレブシエラなど、	無色コロニー

表1 コロニーの黒色反応

4. 総合特性

培地の総合特性は、培地の組成に依存する基本性能と選択要素から成る。また、寒天培地の性能は、目視確認した時に、いかに容易で確実に判断できるかによる。判断を容易にさせる要点は、選択要素や反応も含めて、アナログ的なものよりもデジタル的なものを採用することにある。

サルモネラ菌用寒天培地の場合、判定条件はカルノーマップで示せば次のようになる。(表2)

		40 24 時間培養時		
		コロニーあり	コロニーなし	
リジン脱炭酸	培地赤色			コロニー無色
		サルモネラ		コロニー黒色
リジン脱炭酸	培地緑色			コロニー無色
				硫化水素産生

表2 サルモネラ判定条件

判定条件から分るように、サルモネラ菌は、40℃で24時間培養後において、目視検査した時に確認される黒色のコロニーで、その周囲の培地面が赤色であるものということになる。

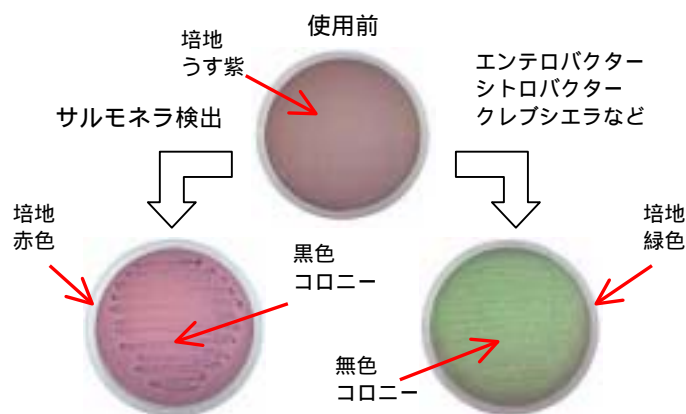


図4 サルモネラ検出時の状態

このように、ターゲット菌と他の菌の増殖率についての制御を行なって選択性を高め、培養開始後から目視確認までの時間（検査プロトコール）を決定し、複数の顕著な選択要素を追加して論理的に開発すれば、極めて目視確認し易く、かつ、確実にターゲット菌を捉える寒天培地が開発できる。例として挙げたサルモネラ寒天培地は、他の菌により高度に汚染された試料の中からでも確実に食中毒の主原因となるサルモネラ菌を検出し、その状態が一目で分かるようになっている。

おわりに

「古きをたずねて新しきを知る。」

細菌学者のコッホが発明したと言われている寒天培地が、長い歴史を越えて、生菌を検出する方法として存続していることには、それなりの理由がある。各種のハイテク検出方法が存在しているにも係らず、食品衛生法で公定法として寒天培地を用いる方法が採用されていることは、食品で問題を引き起こす生菌を検出する方法としては寒天培地を使用することが最も信頼性が高い、確実なものであることを意味している。

この寒天培地の開発に論理的な手法を適用した場合、だれにでも容易にターゲット菌の検出ができる高感度なものを作り出すことができる。その性能は、各種のハイテク検出方法にも勝るとも劣らないものであることは、新たな発見でもある。

小川廣幸：論理的手法による寒天培地の開発（例：サルモネラ菌用），食品工業, Vol.44, No.10, 39～41（2001）

参考文献

小川,他：“呈色反応方式による細菌検査の数値化”，食品工業, Vol.43, No.14, pp.58-61（2000.7）

<http://www.microbio.co.jp>  
<mailto:info@microbio.co.jp>