

加圧損傷菌の検出に及ぼす培地の影響

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
著者	藤井, 建夫 里見, 正隆 中塚, 岳 山口, 敏季
巻/号	36巻1号
掲載ページ	p. 17-21
発行年月	1995年2月



加圧損傷菌の検出に及ぼす培地の影響

(平成6年5月23日受理)

藤井建夫*¹ 里見正隆*¹
中塚 岳*¹ 山口敏季*¹

Effect of Media on the Detection Rate of Pressure-Injured Bacteria

Tateo FUJII*¹, Masataka SATOMI*¹, Gaku NAKATSUKA*¹
and Toshiki YAMAGUCHI*¹

(*¹Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries:
4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108, Japan)

The usefulness of various media for the detection of pressure-injured bacteria was studied. Microorganisms, such as *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Listeria monocytogenes* were pressurized to obtain a survival rate of 10~50%, and then spread on several kinds of selective and non-selective media to enumerate viable counts. Detection rates on Trypticase soy agar (TSA), Nutrient agar (NA), Anaerobic bacterial count medium (ABCM) and Bonito-peptone-glucose (BPG) medium were generally superior to those on Brain heart infusion (BHI) and Plate count agar (PCA) medium. In the case of *Moraxella* sp. counts on BHI were only 1/500 of those on TSA. Addition of horse blood to BHI and PCA increased the detection rates. Detection rates on selective medium were relatively low and variable depending on the selective reagents included in the medium.

(Received May 23, 1994)

Key words: 高圧処理 pressurization; 加圧損傷菌 pressure-injured bacteria; 生残率 survival rate; 検出率 detection rate; 選択培地 selective medium

緒 言

食品の安全性、保存性、衛生的取り扱いの良否などの細菌学的品質を総合的に評価する手段として、生菌数並びに衛生指標菌数の測定が用いられている。測定された生菌数の多少は食品の加工、製造、貯蔵、流通過程での取り扱いを反映するので、それらの菌数レベルが食品衛生上重要視されることが多い。しかし、加熱、凍結及び乾燥などの処理を伴う食品加工においては食品中の微生物は何らかのストレスを受け、一部の微生物は栄養要求性や環境への適応性が変化した損傷菌として存在する¹⁾。そのため食品中の生菌数測定に際して培地、培養条件などが不適切であると、食品中の微生物が適正に検出

されない場合があり、それ相応の注意が必要である。また、近年の加工技術の多様化、コールドチェーンシステムの確立などにより食品中の微生物が損傷を受ける機会が増え、損傷菌の存在を無視できなくなってきた。そこで本報においては、近年注目されている高圧処理で生じる損傷菌の検出に及ぼす培地組成の影響について検討した。

実験方法

1. 供試菌株

Escherichia coli (ATCC11775), *Vibrio parahaemolyticus* (S-7: 研究室保存菌株), *Moraxella* sp. (MX-1: 研究室保存菌株), *Enterococcus faecalis* (IFO8033), *Listeria monocytogenes* (92-3048: 都衛研: 血清型4b) を用いた。

*¹ 東京水産大学食品生産学科: 〒108 東京都港区港南 4-5-7

Table 1. Survival Rate (%) of Pressure-Treated Bacteria on TSA

Bacteria	Survival rate (%)	Pressurization
<i>E. coli</i>	13.3	1,800 atm for 30 min
<i>V. parahaemolyticus</i>	22.5	1,200 atm for 10 min
<i>Moraxella</i>	37.3	1,800 atm for 30 min
<i>E. faecalis</i>	80.9	2,000 atm for 30 min
<i>L. monocytogenes</i>	40.2	2,000 atm for 30 min

2. 供試菌の培養条件

E. coli 及び *V. parahaemolyticus* は NB [普通ブイヨン: 栄研 (*V. parahaemolyticus* においては 50% 人工海水²⁾ で調製)] で 37°, 12 時間培養後更に同培地に接種し, 12 時間培養したものを, *E. faecalis* 及び *L. monocytogenes* は TSB (トリプチケースソイブロス: BBL) で 37°, 24 時間培養したもの, *Moraxella* は NB (50% 人工海水で調製) で 20°, 48 時間培養後更に同培地で 20°, 24 時間培養したものを実験に供した.

3. 加圧処理

菌培養液を二分し, 一方を容量約 5 ml のポリ瓶につめポリ袋で脱気包装し, 油圧式高圧試験システム (最高圧力 2,000 atm) で加圧したものを加圧菌, 未処理のものを未加圧菌とした. 加圧条件はグラム陰性菌においては加圧後の生残率 (TSA を検出培地として) が 10% になるように, *E. coli* 及び *Moraxella* は 1,800 atm, 30 分間, *V. parahaemolyticus* は 1,200 atm, 10 分間, 耐圧性が高いグラム陽性菌は 2,000 atm, 30 分間とした (Table 1).

4. 検出条件

未加圧菌及び加圧菌を生理食塩水³⁾ (*V. parahaemolyticus* 及び *Moraxella* においては 50% 人工海水) で段階希釈し, 各種平板培地に塗抹, 培養後生じた集落数を計数し生菌数を求めた. なお, 損傷菌の定義としては選択培地においてはコロニー形成能をもたず, TSA などの非選択培地にのみコロニー形成能を持つもの¹⁾とした. 以下に使用した培地及び培養温度を菌株ごとに示す.

4.1. *E. coli*

非選択培地として TSA (トリプチケースソイアガー: BBL), TSYA [TSA に 0.5% の割合で酵母エキス (Difco) を添加したもの], ABCM (嫌気性菌培養用: 栄研), BHI (ブレインハートインフュージョン: 栄研), NA (普通寒天: 栄研), BPG⁴⁾ (魚肉エキス 5g, ペプトン 5g, グルコース 1g, 寒天 15g, 蒸留水 1 L, pH 7.0), PCA (標準寒天: 栄研), MA [Davis の最少培地³⁾: K₂HPO₄ 7g, KH₂PO₄ 2g, MgSO₄ · 7H₂O 0.1g, (NH₄)₂SO₄ 1g, クエン酸ナトリウム・二水和物 0.5g, 寒天 15

g, グルコース 2g (オートクレーブにて別滅菌), 蒸留水 1 L, pH 7.0], hb-TSA (TSA に 5% 馬血液を加えたもの) を, 選択培地として CVT (クリスタルバイオレット-テトラゾリウム寒天: 栄研), DCA (デソキシコレイト寒天: 栄研) を用いた. 平板塗抹後の培養は 30°*2, 48 時間で行った.

4.2. *V. parahaemolyticus*

非選択培地として TSA, TSYA, ABCM, BHI, NA, BPG, PCA, MA, hb-TSA を選択培地として CVT, TCBS (栄研) を用いた. 培地の調製には 50% 人工海水を用いた. 平板の培養は 37°*2, 48 時間で行った.

4.3. *Moraxella*

非選択培地として TSA, TSYA, ABCM, BHI, BHIY (BHI に 0.5% 酵母エキスを添加したもの), NA, BPG, PCA, MA, hb-TSA, hb-BHI (BHI に 5% 馬血液を加えたもの), hb-PCA (PCA に 5% 馬血液を加えたもの), ch-TSA (hb-TSA をチョコレートにしたもの), ch-BHI (hb-BHI をチョコレートにしたもの), ch-PCA (hb-PCA をチョコレートにしたもの) を, 選択培地として CVT を用いた. 培地の調製には 50% 人工海水を用いた. 平板の培養は 20°, 3 日間で行った.

4.4. *E. faecalis*

非選択培地として TSA, TSYA, ABCM, BHI, PCA, GYP (グルコース 10g, 酵母エキス 5g, ペプトン 5g, Tween 80 0.5g, NaCl 5g, 寒天 15g, 蒸留水 1 L, pH 7.0) を, 選択培地として PEA (フェニルエチルアルコール寒天: 日水製薬), AC⁵⁾ (ペプトン 20g, 酵母エキス 5g, グルコース 5g, クエン酸ナトリウム・二水和物 10g, K₂HPO₄ 4g, KH₂PO₄ 1.5g, NaCl 5g, NaN₃ 0.25g, 寒天 15g, 蒸留水 1 L, pH 7.0) を用いた. 平板の培養は 37°, 48 時間で行った.

4.5. *L. monocytogenes*

非選択培地として TSA, TSYA, ABCM, BHI, PCA, NA, BPG 及び hb-TSA を, 選択培地として PEA, OX (Oxford 培地: Oxoid), PALCAM (PALCAM 培地: Oxoid) を用いた. 平板の培養は 30°, 48 時間で行った.

5. 評価法

未加圧及び加圧菌それぞれの TSA における生菌数を 100% とし, 各種培地での検出率を求めた. なお, 実験は 2 回以上くり返し, 再現性があることを確認し, その

*2 里見正隆, 山口敏季, 藤井建夫, 奥積昌世: 平成 5 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 294 (1993).

平均値を示した。

結果及び考察

1. *E. coli*

加圧処理した *E. coli* における各培地での検出率についての結果を Fig. 1 に示した。未加圧菌は各種いずれの非選択培地においても良好に増殖し、検出率は培地間で差はみられなかった。選択培地での検出において DCA は非選択培地と同等の検出率であったが、CVT での検出率は 60% と低かった。加圧菌の非選択培地における検出率は hb-TSA が 160% 以上、次いで TSYA, ABCM, NA, MA, 及び BPG が 50% 以上であった。BHI 及び PCA ではそれぞれ 29 及び 16% と非選択培地のうちでは検出率が悪かった。選択培地である DCA 及び CVT の検出率はそれぞれ 22 及び 3.8% であった。CVT は未加圧菌での検出率も低かった。今回検出率の高かった非選択培地の多くはペプトンとしてトリプテケースなどのカゼインのパンクレアチン分解物を使用しているが、凍結乾燥で生じた損傷菌の検出培地についてはペプトンの種類に影響を受け、カゼインのパンクレアチン分解物が優れているという森地¹⁾の報告と一致した。しかし、栄養条件が厳しいと思われる最少培地において良好な検出率が示されたのに対し、ペプトンを使用し、選択剤なども使用されていない BHI 及び PCA で低い検出率しか得られなかった点については、更に検討する必要があると思われる。また、選択培地である CVT 及び DCA での低い検出率については、一般的に損傷菌は細胞膜に障害を受け、選択透過性が失われているとされている¹⁾ため正常状態において無害であるクリスタルバイオレットやデソキシコール酸のような選択剤に感受性を示し、更に CVT は基礎培地が PCA であるため特に検出率が低かったと考えられた。

2. *V. parahaemolyticus*

加圧処理した *V. parahaemolyticus* の各種培地での検出率についての結果を Fig. 2 に示した。未加圧菌においては各種非選択培地で良好な増殖を示し、検出率に差はみられなかったが、選択培地である CVT 及び TCBS ではそれぞれ 11, 28% であった。加圧菌においても各非選択培地で検出率 50% 以上と良好な増殖を示したが、BHI では 12% と低かった。BHI の低い検出率は加熱損傷させた *V. parahaemolyticus*⁶⁾でも観察されている。選択培地である CVT 及び TCBS での検出率はそれぞれ 17, 20% であった。Beuchat *et al.*⁶⁾は加熱損傷させた *V. parahaemolyticus* の検出には選択剤の種類、添加量及び基礎培地に影響されるとしているが、本実験において各培地での検出率は加圧前後で大きな変化がみられず、選択機構が異なる選択培地においても差がみられなかったため、損傷菌の回復に及ぼす培地組成、選択剤の影響は少ないと思われる。しかし、本菌の生残率と損傷率 (TSA での生菌数と TCBS での生菌数の差) は 1,200

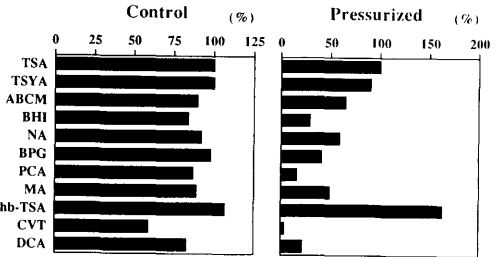


Fig. 1. Detection rate of pressure-injured *E. coli* on several media

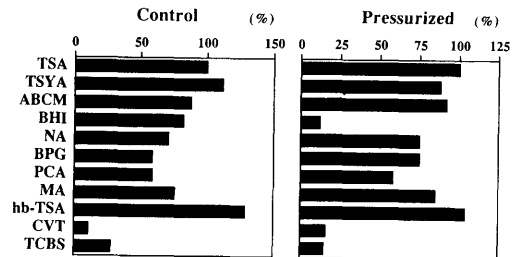


Fig. 2. Detection rate of pressure-injured *V. parahaemolyticus* on several media

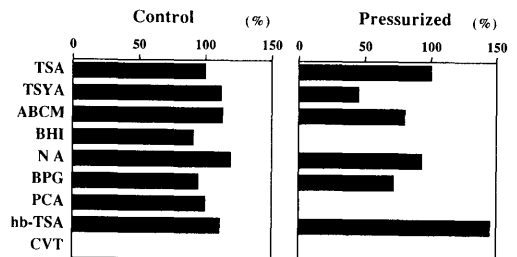


Fig. 3. Detection rate of pressure-injured *Moraxella* on several media

atm, 10 分間の加圧処理では十分に相関しているとは言いがたいこと、圧力によるタンパク質の凝集は 2,000 atm 前後⁷⁾から起こるため、1,200 atm 程度の加圧では物質透過性に関係するタンパク質に損傷が少ないと考えられることなどより、更に検討する必要があると思われる。

3. *Moraxella*

加圧処理した *Moraxella* の検出に及ぼす培地組成の影響について調べた結果を Fig. 3 に示した。未加圧菌においては各種非選択培地で良好に増殖し、検出率に差はみられなかった。選択培地である CVT では増殖できなかった。加圧菌においては BHI 及び PCA での検出が極端に悪く、それぞれ 0.02, 0.2% であった。CVT は未加圧菌と同様に増殖しなかった。その他の培地においては良好に増殖し、検出率は 70% 以上であった。一般に本菌群の分離には血液又はヘモグロビン^{8)~10)}を添加した

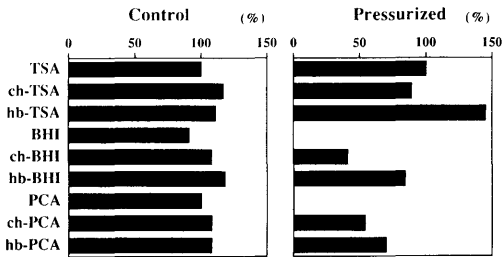


Fig. 4. Effect of blood on detection rate of pressure-injured *Moraxella* on several media

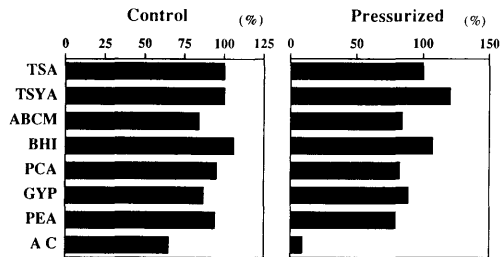


Fig. 5. Detection rate of pressure-injured *Enterococcus faecalis* on several media

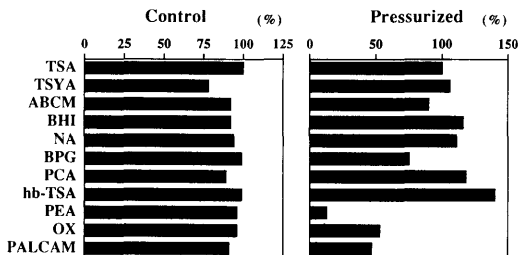


Fig. 6. Detection rate of pressure-injured *Listeria monocytogenes* on several media

培地が使われるため、TSA、BHI及びPCA培地及びそれらに馬血液を添加したもの、血液添加後加熱しチョコレート培地にしたものの計9種類の培地で実験を行い比較した。その結果をFig. 4に示した。未加圧菌においては基礎、血液及びチョコレートの各培地での検出率に差はみられなかった。加圧菌においては血液を加えることによりBHI及びPCAでの検出率が大幅に改善され、それぞれ84、70%であった。また、チョコレート培地においても血液寒天ほどではないが検出率は大幅に改善され、それぞれ41、54%であった。TSAにおいては血液添加で若干検出率が上昇したがチョコレート培地では変化がなかった。加熱及び未加熱の血液を加えることで損傷回復が起こるため、本菌における加圧損傷回復には主に血液中の加熱に対して安定な物質が必要であると考えられた。また、凍結損傷を受けた腸球菌の回復は、培地

中のトリプトン濃度が高いほど優れていた¹¹⁾と報告されていることから考えると、ペプトン類の濃度も影響しているかもしれない。

4. *E. faecalis*

加圧処理した *E. faecalis* の検出と培地組成の関係について調べた結果を Fig. 5 に示した。非選択培地及びPEAにおける未加圧及び加圧菌の検出率に差はみられず、各培地とも80%以上であった。本菌の分離用選択培地であるAC培地における検出率は、未加圧及び加圧菌でそれぞれ65%、10%であった。本菌は圧力に強い抵抗性を持ち、2,000 atm、30分間の加圧では生残率が80%と高く、損傷の程度も軽いため、栄養要求性の複雑化やフェニルエチルアルコール(PEAに含まれる選択剤)への感受性の増大などが少なかったと考えられた。しかし、本菌の選択分離に使用されるNa₃(ACに含まれる)は本実験においてはフェニルエチルアルコールに比べ影響が大きかったため、分離に際して損傷菌の存在が考えられる場合注意が必要であると思われた。

5. *L. monocytogenes*

加圧処理した *L. monocytogenes* の検出と培地の関係について調べた結果を Fig. 6 に示した。未加圧菌においてはすべての非選択及び選択培地で良好に増殖し、各培地での検出率は90%以上であった。加圧菌においてはhb-TSAでの検出が最も良く140%であった。その他の非選択培地間で検出率に差はみられなかった。選択培地においてはPEA、PALCAM及びOXの検出率はそれぞれ13、47及び53%であった。選択剤に抗生物質を使用しているOX及びPALCAMの方がPEAに比べて高い検出率を示した。本菌も *E. faecalis* 同様グラム陽性菌であるため圧力に抵抗性を示し、2,000 atm、30分間の処理での生残率は50%と高く、損傷の程度も軽いが、*E. faecalis* と異なりPEAに高い感受性を示した。OX及びPALCAMにおいて高い検出率であった点については、選択剤に使用している抗生物質は特異的な抗菌スペクトルを持つため、損傷菌に対して影響が少ないと思われ、また、森田¹²⁾はクロラムフェニコールを加えタンパク合成を阻害した場合でも、回復が起こるとしていることなどから理解されよう。

以上の結果をまとめると、加圧損傷菌の検出において非選択培地ではTSA、TSYA、NA、ABCM、BPGが優れていた。一般に栄養が良いとされるBHI及び一般生菌数測定に使用されるPCAでの検出は菌によってはTSAの1/500以下であった。特に、PCAは広く用いられている培地であるだけに損傷菌の検出には適当でないといえる。血液の添加は効果がみられ、特に *Moraxella* では発育の不良なBHI及びPCAに添加することで検出率が500倍に増加した。選択培地では非選択培地に比べ検出率は低く、選択剤の種類で検出率に差がみられた。選択培地の使用による各種微生物の測定・検出に際して

は、選択剤の性質によっては実際の生菌数より少なく検出されうることに留意する必要があると思われた。本報では2,000 atm以下の圧力により生じた損傷菌について検討したが、タンパク質などの高分子が不可逆変性を起こすような高い圧力処理により生じた損傷菌については加熱損傷のように、より複雑な損傷を受けると考えられるため更に検討する必要があると思われる。

謝 辞

供試菌株の一部は東京都立衛生研究所 小久保彌太郎博士より分与頂いたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) 山里一英, 宇田川俊一, 児玉 徹, 森地敏樹編: “微生物の分離法” p. 365~376 (1989) R & D プランニング.
- 2) 堀江 進, 奥積昌世, 木村正幸, 赤堀正光, 川前政幸: 食衛誌. **13**, 410~417 (1972).
- 3) 東京大学医科学研究所学会編: “微生物学実習提要” p. 57 (1988) 丸善.
- 4) 藤井建夫: 日水誌. **43**, 517~521 (1977).
- 5) 春田三佐夫, 細貝裕太郎, 宇田川俊一編: “目でみる食品衛生検査法” p. 242 (1989) 中央法規出版.
- 6) Beuchat, L. R.: J. Appl. Bact. **40**, 53~60 (1976).
- 7) 林 力丸編: “食品への高圧利用” p. 1~30 (1989) さんえい出版.
- 8) Krieg, N. R., Holt, J. G. ed.: “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology” Vol. 1, p. 296~303 (1984), The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 9) 小沢 敦, 坂崎利一, 玉熊正悦, 波岡茂郎, 松本文夫編: “臨床細菌学—講義篇” p. 317~318 (1978) 講談社サイエンスティフィク.
- 10) 小沢 敦, 坂崎利一, 玉熊正悦, 波岡茂郎, 松本文夫編: “臨床細菌学—手技篇” p. 24~32 (1978) 講談社サイエンスティフィク.
- 11) 森地敏樹, 矢野信禮: 食衛誌. **13**, 29~35 (1979).