酸素電極を用いた一般生菌数検査の簡易迅速化

天野義久*・新井潤一郎*・山中俊介**・一色賢司***

Rapid and Convenient Estimation of Bacterial Cell Count in Food Using Oxygen Electrode Sensor

Yoshihisa AMANO*, Jun-ichiro ARAI*, Shunsuke YAMANAKA**
and Kenji ISSHIKI***

* *Daikin Environmental Laboratory, Limited, 3 Miyukigaoka Tsukuba-shi,
Ibaraki 305-0841*

** *Rose Corporation, Limited, 2045-1 Kamiinayoshi Chiyodamachi Niiharigun,
Ibaraki 315-0056*

*** *National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
2-1-2 Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8642*

Bacterial respiration measurement method with oxygen electrode sensor has been applied to estimate the bacterial cell count in foods. The relationship between respiration of bacteria and its bacterial cell count was examined with the newly developed O₂ uptake detector and the conventional agar-plate. Using 168 food samples, the new method was evaluated. Samples were processed with a stomacher for one minute in saline, and injected into the ninety-six well sensor plate with oxygen electrodes embedded. After nutrient broth was added to each well, dissolved oxygen concentration of each sample was monitored continuously for 24 hours at a temperature of 35°C. Detection time for oxygen electrode method was defined as the elapsed time when the dissolved oxygen is consumed by bacterial respiration to 60% of negative control oxygen concentration. It depended on the number of conventional plate count. As for samples containing 10⁵ [cfu/g] bacteria, detection time was approximately 6 hours, and it decreased linearly with the log number of standard plate count, with a slope of -2.6 [hour/cfu/g]. Correlation coefficient for the estimated cell count with reference curve and conventional plate count was 0.83. This new method detected bacteria more rapidly, in proportion to bacterial concentration in foods. (Received Jul. 12, 2000 ; Accepted Oct. 24, 2000)

1996年の腸管出血性大腸菌O157:H7による食中毒集団発生を一つの契機に、日本国内のみならず国際的にも食品衛生技術の向上が強く求められている¹⁾²⁾。従来、日常検査として行われる食品細菌検査は、寒天培養法が用いられている。寒天培養法は確実な検査法ではあるが、培養によるコロニー形成を待つ方法は原理上検出時間が長く、また多くの作業の労力と時間を必要とする。実際の食品製造流通現場等において、細菌検査の結果

をフィードバック出来ていない現状は、この寒天培養法が持つ問題点が一因となっている。毎日の検査を食中毒防止に役立てるためには、必要十分な検査を短時間で行うことが不可欠であり、それが検査現場等からの強い要請となっている。

我々は、酸素電極を用いて微生物の呼吸量を測定する技術³⁾⁴⁾により、食品の細菌数を推定することを試みた。これは、液体培地中の溶存酸素量が増殖した細菌の呼吸

* 株式会社ダイキン環境研究所 (〒305-0841 茨城県つくば市御幸が丘3)

** 株式会社ローズコーポレーション (〒315-0056 茨城県新治郡千代田町上稲吉 2045-1)

*** 農林水産省食品総合研究所 (〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

により消費されるまでの時間が、測定開始時の菌濃度に依存する原理を用いている。好気性菌及び通性嫌気性菌の検出が可能であり、検出時間は主として菌の増殖速度によって決定される。このようにして食品中の細菌数を迅速・簡便に測定することにより、検査結果を食品衛生の向上に活用し得る食品細菌検査法の可能性を検討した。

実 験 方 法

1. 試 料

茨城県内の食品製造工場（ローズコーポレーション）より、検査対象となった食材（製造直後、あるいは保存試験のために室温あるいは冷蔵で20時間から72時間保存したもの）の提供を受け、計60種類、のべ168食材を試料として使用した。試料は表1に示した。

2. 従来法試験

比較対照として、従来法による一般生菌数計測を併せて行った⁵⁾。培地は標準寒天培地（日水製薬製）を使用した。食材10gに対し滅菌生理食塩水を90ml加えてストマック処理を行い、4段階に希釈、各濃度において1mlをシャーレに分注した後、45℃から50℃に保温した寒天培地を混濁し、35℃で48時間培養後に出現したコロニー数をカウントした。

3. 酸素電極を用いた測定

原理の確認実験として、グラム陽性菌（*Bacillus subtilis* IFO13722）、グラム陰性菌（*Escherichia coli* ATCC 25922）、カビ（*Aspergillus niger* IFO6341）、酵母

（*Saccharomyces cerevisiae* IFO 10217）の4種について希釈系列を作成し、酸素電極を用いて液体培地中の溶存酸素濃度の変化を16時間観察し、菌濃度の関係を調べた。*Bacillus subtilis* については、栄養細胞に加え、7日間寒天で培養後、65℃、30分の熱処理を2回行うことで、芽胞菌についても測定した。

食材の測定では、ストマック処理した検体100μlと2倍濃度の普通ブイヨン（栄研化学製）100μlを、今回開発した酸素電極を装着した測定セル（図1）に分注し、溶存酸素測定装置を用いて、35℃で培養しながら液体培地中の酸素濃度を24時間連続測定し、従来法による一般生菌数試験結果との関係を調べた。酸素電極出力のコントロールとして、培地の出力電流値を測定した。

実 験 結 果

Bacillus subtilis, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, および *Saccharomyces cerevisiae* はすべて、呼吸による培地中の溶存酸素濃度の減少が観察された。酸素電極で溶存酸素濃度をモニターすることで菌の検出が可能であり、検出時間は初期菌濃度に依存していた。結果を図2に示した。*Aspergillus niger* は、細菌に比べ増殖時間がかかった。また、*Saccharomyces cerevisiae* については10⁶ (cfu/ml) のものしか検出されなかった。

食材を使った実験では、酸素電極自体が微量の酸素を消費する影響を排除するために、無菌の培地で24時間、1分毎に測定した電極出力（電流値）をコントロール出力とし、実際の毎分の出力値をコントロール出力と比較

表 1 使用した食材

厚揚げ煮	牛肉（和牛モモ）	ちくわ（磯辺揚げ）	ホットドッグ（ウインナー）
イカ	牛肉玉子丼	中華サラダ	ホットドッグ（ナポリタン）
インゲン	キュウリ	中華麺	ポテトサラダ
うずら水煮	香草ドリア（ご飯）	鶏（唐揚げ）	マカロニグラタン
うの花	香草ドリア（ソース）	ナポリタン	マカロニサラダ
エビ（ボイル）	香草ドリア（チキン）	人参	ミックスベジタブル
カリフラワー	コーン	ネギ	焼きうどん
きくらげ	ごぼうサラダ	パストラミ	焼きそば（ソース）
キャベツ	こんにゃく煮	ハッシュドビーフ（ソース）	焼きそば（麺）
牛肉（輸入サーロイン）	さつま揚げ煮	ハッシュドビーフ（具材）	焼きそば（野菜）
牛肉（和牛内もも）	里芋煮	ハム	ゆで卵
牛肉（和牛カルビ）	サンドイッチ（コロッケ）	ハンバーグ	レタス
牛肉（和牛外モモ）	ジャガイモ煮	ひじき煮	レッドオニオン
牛肉（和牛バラ肉）	スパゲッティ麺	ブロッコリー	レッドキャベツ
牛肉（和牛ブリスケ）	玉葱（ボイル）	ほうれん草ボイル	わかめ

図1 96 チャンネル式酸素電極セル

3 電極式の酸素電極が、プラスチック製のセルの中に一体成型されている。アノードで酸素が還元され、溶存酸素濃度に比例した電流が流れる。上面は密閉されていないが、気液界面からの酸素の溶解速度は、細菌呼吸による酸素の消費速度に比べ小さいため無視できる。

図2 各種菌の濃度と酸素消費

▲, *Bacillus subtilis* (栄養細胞); ●, *Aspergillus niger*; △, *Bacillus subtilis* (芽胞); ■, *Escherichia coli*; ⊠, *Saccharomyces cerevisiae*

することにより検出の判断を行った。検出時間は、測定開始から細菌による酸素の消費が明らかに確認できるコントロール比 60% (図3) 以下の電流値を示すまでの時間とし、以後の結果はこの検出時間により求めた。

実験を行った全 168 食材中、電極法で検出されたもの、ならびに寒天法で検出されたものの内訳と組み合わせは、表 2 のとおりとなった。寒天法の陰性とは、300 (cfu/g) 未満、電極法陰性とは、24 時間で検出しなかったものである。酸素電極法による検出時間と、寒天法で得た一般生菌数 (対数値) との関係は、図 4 のような直線的な関係となり、相関を示した。近似式は

図3 各種検体の出力例

96 チャンネル式溶存酸素測定装置により検出した電流値を、ネガティブコントロール値との比で表している。

表 2 従来法との結果比較

		酸素電極法	
		陰性	陽性
寒天法	陰性	17	6*
	陽性	16**	129

* 電極法検出時間は平均で 14.6 (h) であり、換算値 60 (cfu/g) に相当し、より低濃度まで検出した。

** 寒天法による菌数は、 $1.4 \times 10^2 \sim 2.6 \times 10^4$ であった。

[検出時間 (h)] = $-2.58 \log [\text{生菌数 (cfu/g)}] + 19.2(1)$ となり、検出時間の目安としては、食材中の菌数 10^5 [cfu/g] に対し 6 時間程度と、従来法の 48 時間に比べ

図4 酸素電極法の結果と寒天法の相関

て1/8の検出時間となった。菌数に応じて検出時間は変わり、菌数が10倍変わると、検出時間は2.6時間変化した。寒天法で陰性、電極法で陽性となった5件については、平均値14.6時間（換算値60 (cfu/g) 相当）であった。一方、寒天法陽性、電極法陰性のものが16件認められた。

考 察

近似式(1)から検出時間を菌数に換算したものと、寒天法の菌数を図5に示した。相関係数は0.83となり、ほぼ実用的なレベルにあるものと考えられる。

寒天法陽性・電極法陰性となった16件、また低濃度側でばらつきが大きかったことについては、酸素電極法と寒天培養法の次のような原理的な差異が原因として考えられる。

1. 細菌の呼吸量・増殖速度の違い

細菌の呼吸量あるいは増殖速度は、寒天培地でのコロニー形成能と無関係であるのに対し、酸素電極法では、直接影響を受ける。枯草菌、大腸菌、カビ、酵母について測定を行ったが、呼吸量については、特に大きな差異は認められなかった（図2）。増殖速度については酵母が最も遅く、 10^6 (cfu/ml) しか検出できなかったことは、 10^5 (cfu/ml) が10倍増殖するまでに16時間以上かかることを示し、同一の条件での測定は出来ないと考えられた。

2. 食品中の物質による影響

ストマック処理した液を寒天法では1/20以下に希釈するのにに対し、酸素電極法では、1/2希釈となる。従って酸素電極法では、培養時に食材によるpH変化あるいは各種の増殖阻害物質の影響を受けやすいと考えられた。

図5 検量線による菌数（電極法）と寒天法の菌数

3. 増殖の競合

多菌種が混在した状態では、寒天培地に比べ液体培地では、代謝産物などにより影響を受けるため、数の少ない菌については増殖阻害が考えられる。低濃度側で菌数が少なめの傾向を示す例の一因と推察された。

4. 低濃度での誤差

以上の原因に加えて、 10^4 以下で検出時間のばらつきが大きくなった原因としては、希釈のばらつきがある。低濃度の検体ではセル中の菌数が10~100 (cfu) 程度のもも多く、寒天法に比べ1/10量を用いるため、希釈誤差の影響が大きくなる。さらに、菌の状態により、総合的に呼吸量が大きくばらついてくものと推察された。

全体的な結果としては、従来法の48時間に比べ大幅な時間短縮が可能でありながら、菌数の多いものについて異常な低値もなく、菌数の少ないものについても異常な高値は認められなかった。 10^5 (cfu/g) 付近を判断基準とすれば、実用に際して問題がないと考えられ、特に食品工場などの自主的な衛生管理手法として活用されることが期待される。また、上記の様々な差異についても、食品の微生物学的安全性確保の観点からは、酸素電極法がより実際の危険度を反映し、迅速性も考え合わせると、より実状を反映した検査法であると考えられた。

なお、検体量に起因する低濃度側での問題については、検体量を10倍の2mlにした新型の食品細菌検査専用装置(DOX-60F)と専用セルを開発し、対処を図っている。

要 約

酸素電極法による細菌検出法を食品検査に応用した.

(1) 従来 48 時間を要した一般細菌数検査を迅速に行うことが可能であった. 10^5 [cfu/g] の場合, 6 時間で菌数を推定できた.

(2) 10^5 [cfu/g] 以上の偽陰性が観察されず, 実用性が確認された.

(3) 菌数の多いものほど早く結果が出るという特性は, 食品微生物検査に適していた.

(4) 以上の特徴から, 本法は食品衛生の向上を目的とする食品細菌検査法として有用であると考ええる.

本研究は, 日本食品科学工学会第 47 回大会 (2000 年, 東京) において発表した.

文 献

- 1) World Health Organization : Food Safety Report by the Director General, EB 105/10, Dec. 2 (1999).
- 2) 宮本敬久 : 食科工, **47**, 173 (2000).
- 3) AMANO, Y., OKUMURA, C., YOSHIDA, M., KATAYAMA, H., UNTEN, S., ARAI, J., TAGAWA, T., HOSHINA, S., HASHIMOTO, H. and ISHIKAWA, H. : *Human Cell*, **12**, 3 (1999).
- 4) 町田勝彦 : 日本臨床微生物学雑誌 **9**, 178 (1999).
- 5) 厚生省生活衛生局 : 食品衛生検査指針微生物編, 社団法人日本食品衛生協会 67 (1990).

(平成 12 年 7 月 12 日受付, 平成 12 年 10 月 24 日受理)