冷蔵海産魚の腐敗細菌(第2報)

解凍魚の腐敗した場合のミクロフローラ

(昭和 47 年 6 月 12 日受理)

奥積昌世* 堀江進* 木村正幸*
赤堀正光* 川前政幸*

Studies on Psychrophilic Spoilage Bacteria of Chilled Sea Fish (II) Bacterial Flora in the Spoilage after Chill Storage of Frozen Fish

Masayo OKUZUMI, Susumu HORIE, Masayuki KIMURA,
Masamitsu AKAHORI and Masayuki KAWAMAE

(Tokyo University of Fisheries: Konan 4, Minato-Ku, Tokyo)

In the previous paper, it was shown that the bacterial flora in the spoilage of chilled raw fish mainly consisted of members of the *Pseudomonas* III/IV-H, III/IV-NH and the *Vibrio* group.

The present study was undertaken to investigate bacterial flora of frozen fish and the spoiled fish after thawing and storing at chill temperature.

For enumeration and isolation of bacteria the smear plate method was employed using 50% sea water agar medium described in the previous paper. From the skin of the five frozen fish samples 74 strains were isolated, while 75 strains were obtained from the skin and muscle of the spoiled fish samples, respectively. The majority of isolates from the skin of frozen fish consisted of the *Moraxella*, the coccal groups and the other undetermined group, and the *Pseudomonas* and the *Vibrio*, which were dominant on the fresh raw fish as reported in the previous paper, formed only a small proportion of the isolates in the case of the frozen fish. After spoilage, on the other hand, the *Pseudomonas* III/IV-H, II and I, which were absent before storage, appeared markedly, and they accounted for most proportion of the isolates together with the *Moraxella*, while the above-mentioned coccal groups and the undetermined group disappeared. The *Pseudomonas* III/IV-NH and the *Vibrio*, which are most important spoilage bacteria of raw fish, were isolated in a small number from the spoiled fish in the present work.

(Received June 12, 1972)

わが国における冷凍魚の生産量は総漁獲高の約30%を占めているが、そのうちのかなりの部分は小売店で解凍され、鮮魚として販売されている。

著者ら¹⁾は前報において、一般鮮魚を低温で腐敗させた場合におけるミクロフローラを構成する菌群について検討し、好塩性の *Pseudomonas* III/IV-H、非好塩性の *Pseudomonas* III/IV-NH および *Vibrio* が腐敗魚のミクロフローラにおいて主要なものであることを観察したのであるが、今回は冷凍魚を低温で解凍し腐敗させた場合におけるミクロフローラについて検討したので報告す

る。

実験方法

冷凍魚の腐敗実験: 冷凍したニシンの2試料, サンマ, ハナレンコ, マコガレイ各1試料 (Table 1) を小売店で入手し、これらの試料を 0.5° の恒温器に入れ、そのまま腐敗臭が発生するまで貯蔵した。揮発性塩基窒素(TV B-N) およびトリメチルアミン窒素(TMA-N) の測定は前報¹⁾の方法によった。

生菌数測定用培地: 前報¹⁾で生菌数測定に用いた海水寒天平板培地を用いた。

生菌数測定および菌株の分離: 皮膚および筋肉の生菌

* 東京水産大学: 東京都港区港南 4-5-7

Table 1. Frozen Fish Samples Used for the Investigation of Psychrophilic Spoilage Bacteria.

No.	English name	Scientific name	Japanese name
1	Herring	<i>Clupea pallasii</i>	Nishin
2	Pacific saury	<i>Cololabis saira</i>	Sanma
3	Herring	<i>Clupea pallasii</i>	Nishin
4	Sea bream	<i>Dentex canariensis</i>	Hanarenko
5	Flat fish	<i>Limanda yokohamae</i>	Makogarei

Table 2. Bacterial Counts of the Frozen Fish and of the Spoiled Fish which had been Thawed and Stored at 0.5°C.

No.	Sample	Storage days	Odour	TVB-N mg%	TMA-N mg%	Bacterial counts	
						Skin/cm ²	Muscle/g
1	Herring	0	Fresh	13.6	0	1.0×10 ⁴	
		18	Spoiled	25.2	3.8	1.5×10 ⁸	2.5×10 ⁶
2	Pacific saury	0	Fresh	10.6	0	7.3×10 ⁴	
		23	Spoiled	24.6	5.2	4.7×10 ⁷	1.3×10 ⁶
3	Herring	0	Fresh	12.7	0	3.4×10 ⁸	
		23	Spoiled	28.0	3.9	4.7×10 ⁶	1.4×10 ⁵
4	Sea bream	0	Fresh	12.6	0	5.4×10 ⁴	
		11	Spoiled	37.1	19.0	8.5×10 ⁸	1.9×10 ⁶
5	Flat fish	0	Fresh	7.7	0	5.4×10 ⁴	
		15	Spoiled	31.5	13.4	9.9×10 ⁸	2.6×10 ⁷

数の測定は前報¹⁾の方法に準じて行なったが培養温度は20°とした。菌株の分離は前報¹⁾の方法によった。

塩分要求試験：ブイヨン寒天平板培地（ポリペプトン5g，ミクニ肉エキス3g，蒸留水1,000ml，pH7.0），およびこれにNaCl30gを加えた平板培地を用い，50%人工海水ブイヨンの20時間培養菌を両平板培地に画線して25°で4日間培養し，両培地の発育を比較した。

分離菌株の同定：前報¹⁾に述べた方法によって属レベルにおける菌群の同定を行なった。

0.5°における発育試験：供試菌株として，前報¹⁾の鮮魚および今回の冷凍魚において，その新鮮時および腐敗時に分離した菌株のうち *Pseudomonas* I 9株，*Pseudomonas* II 16株，*Pseudomonas* III/IV-NH 30株，*Pseudomonas* III/IV-H 32株，*Vibrio* 15株，*Moraxella* 10株計112株を用いた。*Pseudomonas* I, II および III/IV-NH の各菌株については0.5% NaCl ブイヨン（ポリペプトン10g，肉エキス5g，NaCl5g，蒸留水1,000ml，pH7.0），また *Pseudomonas* III/IV-H，*Vibrio* および *Moraxella* については3% NaCl ブイヨン（上記ブイヨンのNaClを3%としたもの）を用い，50%人工海水ブイヨンの20時間培養菌を接種して0.5°で培養し，発育を比較した。

実験結果と考察

冷凍魚の0.5°で腐敗した場合の生菌数：冷凍魚5試料を0.5°の恒温器に貯蔵し腐敗させ，貯蔵前と腐敗時におけるTVB-N，TMA-Nおよび生菌数の測定を行なった結果をTable2に示した。

凍結魚における皮膚の生菌数は10⁸~10⁴/cm²程度であった。腐敗時における生菌数は皮膚で10⁸~10⁹/cm²，筋肉で10⁸~10⁷/gであった。

分離菌株の同定：凍結魚の皮膚から74株，腐敗魚の皮膚から75株，腐敗魚の筋肉から75株，計224菌株を分離，同定し，その結果をTable3に示した。

凍結魚の皮膚からの分離菌株の中では *Moraxella* と球菌類が多く，*Pseudomonas* は各群とも非常に少なく *Vibrio* も1試料からしか分離されなかった。

腐敗時の皮膚および筋肉の分離菌株をみると，凍結時と著しく異なっており，球菌類と非同定菌がみられなくなり，そして凍結時にはまったく分離されなかった *Pseudomonas* III/IV-H，*Pseudomonas* II および *Pseudomonas* I の菌株がかなり多く出現している。*Moraxella* は凍結時においてもっとも多く分離された菌群であるが，腐敗時においても皮膚で25.4%，筋肉で46.7%を占め，腐敗時のマイクロフローラの中でもっとも

Table 3. Bacterial Flora of the Frozen Fish and the Spoiled Fish.

Frozen or Spoiled	Group (Genus)		No. of strains	<i>Pseudomonas</i> I	<i>Pseudomonas</i> II	<i>Pseudomonas</i> III/IV -NH	<i>Pseudomonas</i> III/IV-H	<i>Vibrio</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	Not determined
	No.	Sample											
Frozen (Skin)	1	Herring	15	0	0	0	0	0	3	0	5	0	7
	2	Pacific saury	15	0	0	0	0	3	6	0	6	0	0
	3	Herring	15	0	0	0	0	0	5	0	0	3	7
	4	Sea bream	15	0	0	1	0	0	5	4	0	5	0
	5	Flat fish	14	0	0	1	0	0	4	1	0	0	8
	Total		74	0	0	2	0	3	23	5	11	8	22
	Percentage		100	0	0	2.5	0	4.0	31.1	6.8	14.8	10.8	30.0
Spoiled (Skin)	1	Herring	15	5	9	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	Pacific saury	15	0	0	0	0	1	8	4	0	0	2
	3	Herring	15	7	0	0	0	0	8	0	0	0	0
	4	Sea bream	15	0	0	2	11	1	1	0	0	0	0
	5	Flat fish	15	0	3	1	9	0	2	0	0	0	0
	Total		75	12	12	4	20	2	19	4	0	0	2
	Percentage		100	16.0	16.0	5.3	26.7	2.7	25.4	5.2	0	0	2.7
Spoiled (Muscle)	1	Herrig	15	1	13	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	Pacific saury	15	0	0	0	0	0	14	1	0	0	0
	3	Herring	15	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0
	4	Sea bream	15	0	0	0	13	2	0	0	0	0	0
	5	Flat fish	15	1	3	0	5	0	6	0	0	0	0
	Total		75	2	16	1	18	2	35	1	0	0	0
	Percentage		100	2.7	21.3	1.3	24.0	2.7	46.7	1.3	0	0	0
Total			224	14	28	7	38	7	77	10	11	8	24

Table 4. Growth Rate of the Strains of the Six Groups at 0.5°C

Group	No. of strains (112)	Incubation days				
		3	4	5	6	8
<i>Pseudomonas</i> I	9	1	3	7	7	9
<i>Pseudomonas</i> II	16	0	2	4	14	16
<i>Pseudomonas</i> III/IV-NH	30	0	15	22	23	30
<i>Pseudomonas</i> III/IV-H	32	13	29	32		
<i>Vibrio</i>	15	4	8	12	15	
<i>Moraxella</i>	10	0	0	0	2	10

Figure represents number of strains showed visible growth.

優勢を示した。また *Pseudomonas* III/IV-NH および *Vibrio* は凍結時、腐敗時とも非常に少数であった。凍結魚の場合には *Pseudomonas* および *Vibrio* の少ない点が前報に述べた鮮魚のマイクロフローラと大いに異なる点であり、また腐敗時においても *Moraxella* が優勢で *Pseudomonas* III/IV-NH および *Vibrio* が非常に劣勢の点で鮮魚の腐敗時のマイクロフローラと著しく異なっていた。

0.5° における各菌群の発育: 前記 112 菌株について 0.5° における発育を検討した結果を Table 4 に示した。

培養3日で発育の認められたものは *Pseudomonas* I の1株, *Pseudomonas* III/IV-H の13株, *Vibrio* の4株であった。4日後では *Pseudomonas* III/IV-H で大部分, *Vibrio* および *Pseudomonas* III/IV-NH で約半数, *Pseudomonas* I および II で少数が発育を示したが, *Moraxella* では認められなかった。この実験によると 0.5° における発育は *Pseudomonas* III/IV-H がもっとも速く, *Pseudomonas* III/IV-NH と *Vibrio* がこれに次ぎ, *Moraxella* がもっとも遅いようである。

一般鮮魚の新鮮時におけるマイクロフローラは前報¹⁾で報告したように *Pseudomonas* III/IV-H, III/IV-NH, *Vibrio* および *Moraxella* によって占められていた。これに対し今回の冷凍魚においては *Moraxella* と球菌類によって大半が占められており, *Pseudomonas* と *Vibrio* は非常に少なかった。この点で鮮魚と冷凍魚との間に著しい差異がみられた。Shewan²⁾ は、一般に鮮魚を凍結すると細菌の60~90%は死滅し、さらに冷凍貯蔵することによって生菌数はさらに減少すると述べている。しかも死滅し易い細菌はとくにグラム陰性の無芽胞菌に多いといわれている。冷凍魚において *Pseudomonas* III/IV-H, III/IV-NH および *Vibrio* が非常に少ないのは鮮魚の凍結処理によって大部分が死滅したためであると推察されるが、この点に関しては今後さらに吟味を要する。

一般鮮魚を 0.5° に貯蔵し腐敗させた場合、概して *Pseudomonas* III/IV-H, *Vibrio* および *Pseudomonas* III/IV-NH が優勢となったことを前報¹⁾で報告したのであるが、今回のように冷凍魚を腐敗させたものでは、*Pseudomonas* II が多数であったもの、*Moraxella*、あるいは *Pseudomonas* III/IV-H が多数を占めたものなど、試料によって非常にまちまちで、この点一般鮮魚の場

合と比較して著しく異なっていた。鮮魚の腐敗の場合、すでに新鮮時において *Pseudomonas* III/IV-H, III/IV-NH および *Vibrio* が多数を占めており、しかもこれらの菌群は 0° 付近でもっとも速やかに増殖するので、冷蔵中に優勢になることは理解できる。これに対し冷凍魚の場合には、凍結時において *Moraxella* や球菌類が多数を占めており、これに対し *Pseudomonas* III/IV-H や III/IV-NH および *Vibrio* などは非常に少数しか生き残っていないので、0° 付近で貯蔵した場合に形成されるマイクロフローラの内容は鮮魚の場合のように単純ではないであろう。しかしいずれにしても鮮魚の場合に比較すると、冷凍魚を低温で解凍、腐敗させた場合には、凍結魚で多数生き残っている *Moraxella* が腐敗時のマイクロフローラの中で重要な位置にあることがうかがわれる。

要 約

冷凍魚5試料を 0.5° で貯蔵し、解凍、腐敗させ、凍結時の皮膚および腐敗時の皮膚および筋肉の生菌数を測定し、菌株を分離した。貯蔵前の凍結魚の皮膚から74株、腐敗時の皮膚から75株、筋肉から75株、合計 224 株を分離し、前報に記載した群別法にしたがって同定した。

凍結魚の皮膚では *Moraxella* と球菌類が多く、*Pseudomonas* と *Vibrio* は非常に少なかった。腐敗時の各試料における各菌群の分離菌株数をみると、*Moraxella*、*Pseudomonas* III/IV-H, *Pseudomonas* II, あるいは *Pseudomonas* I の多いものなどがあり、試料によりまちまちであった。そして鮮魚の腐敗の場合に比較すると *Pseudomonas* III/IV-NH および *Vibrio* がきわめて少数であり、*Moraxella* が比較的多数を占めている点が注目された。

各菌群の 0.5° における発育を検討したところ、*Pseudomonas* III/IV-H がもっとも速く、ついで *Vibrio* *Pseudomonas* III/IV-NH が速く、*Moraxella* はこれらに比べて遅かった。

なお本研究の一部は文部省科学研究費(試験研究)によった。

文 献

- 1) 堀江 進, 奥積昌世, 木村正幸, 赤堀正光, 川前政幸: 食衛誌, 13, 410 (1972).
- 2) Shewan, J. M.: Fish as Food vol. I, 487, (1961), Academic Press, New York and London