凍結豚肉より分離した低温発育細菌の発育温度特性

(昭和 48 年 12 月 18 日受理)

小 久 保 弥 太 郎*

Influence of Incubation Temperature on the Growth of Psychrotrophic Bacteria Isolated from Frozen Pork

Yataro KOKUBO

(Department of Food Hygiene and Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 24-1, 3-chome, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo)

Growth temperature characteristics of 10 strains of psychrotrophic bacteria, which consisted of each 2 strains of *Pseudomonas* sp. (fluorescent type), *Pseudomonas* sp. (non-fluorescent type), *Flavobacterium* sp., *Coryneforms* sp. and *Micrococcus* sp., isolated from frozen pork were studied, since these 5 strains had been the most predominant contaminants of the frozen meat. Growth curves obtained on the 10 strains at varying temperatures covering 0 to 50°C with 5°C intervals were compared with those of 8 reference strains of stock cultures, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Flavobacterium suaveolens*, *Cytophaga* (Guppy B), *Escherichia coli*, *Microbacterium thermosphaerum*, *Micrococcus caseolyticus* and *Staphylococcus aureus*. A temperature gradient incubator model TN-3 of Toyo Kagaku Sangyo Co. was used in this experiment.

Regardless of the genera of the organisms minimum temperatures for the growth of all the isolates tested were below 0°C and the optimum ones were 25 or 30°C. The minimum generation time of the isolates varied from 29 to 65 min. Among these isolates, both *Pseudomonas* fluorescent types and non-fluorescent ones showed maximum growth temperatures of 35 and 40°C respectively, while those of the other organisms were 30°C. The growth rates of the psychrotrophic stock strains at 0°C were a little lower than those of the *Pseudomonas* sp. of the isolates.

(Received December 18, 1973)

著者はさきに、我が国における食肉需要のほぼなかばを占めるとみられる豚肉を対象に、凍結および未凍結生肉の細菌汚染の実態ならびにそれらを低温貯蔵した場合の汚染細菌の挙動などに関する一連の調査を実施し、汚染細菌の中でも特に低温発育細菌が肉質の劣化に主働的役割を演じ、品質管理上重要視すべき存在であることを報告した^{1)~3)}。

低温発育細菌の食品衛生学的意義を考えると、低温発育細菌の実態ならびに概念を明確にすることが、これらに対する品質管理面での対策を樹立する上からも必要なことと思われる。そのためにはまず基礎資料として、これらの細菌の生物学的特性を詳細に検討することが望

まれ、なかでも低温発育細菌の発育温度特性を知ることが最も基本的かつ重要とみななければならない。

これまで著者は低温発育細菌の発育温度特性について、それぞれいくつかの温度を設定し、各温度における発育を観察してきた^{1), 2)}。

そこで今回は1960年に Oppenheimer ら⁴⁾によって開発された温度こう配培養法 (temperature gradient incubation method) を採用し、凍結豚肉より分離した数種の低温発育細菌と既知の低温発育細菌、ならびに中温細菌とみなされている *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* などを対象に、0から50°に及ぶ幅広い温度域にわたって発育状態を観察し、これら菌株の発育温度特性を比較検討した結果、二、三の知見を得たので報告する。

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科：東京都新宿区百人町 3-24-1

実験方法

1. 供試菌株

凍結豚肉分離菌株として、数例の凍結豚カット肉から0および25°培養において高い頻度で分離され、Vanderzantらの分類法⁵⁾により属段階まで同定された菌株のうちから、けい光のある *Pseudomonas* sp. とけい光のない *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Coryneforms* sp., *Micrococcus* sp. の5種類について各種類2株ずつ計10菌株を供試した。

なお、上記各菌株と比較のために用いた保存菌株は *Pseudomonas fluorescens* IAM 12022, *Pseudomonas fragi* IAM 1650, *Flavobacterium suaveolens* OUT 3752, *Micrococcus caseolyticus* OUT 8088, 味の素中央研究所より分与された *Cytophaga* (Guppy B) および当研究所で冷蔵牛肉より分離された *Microbacterium thermosphactum* の6菌株ならびに豚生肉由来の *Escherichia coli* I 型株と *Staphylococcus aureus* 209 P の計8菌株である。

2. 培養方法

1) 装置の設定

装置は東洋科学産業株式会社製の振とう温度こう配培養装置 TN-3 型を使用した。設定温度域は0から5°間隔で50°までの11段階とし、各断続培養管挿入部に培養管を挿入し、毎分42回の振とうを行い、96時間まで培養を継続した。なお、各段階での温度誤差は最大±0.5°であった。

2) 使用培地と培養操作

発育試験用培地は酵母エキスを0.1%に添加したハートインヒュージョンブイオン培地(栄研化学製)を使用した。供試菌株はすべて25°で2代培養した後、その12時間培養菌液を滅菌生理食塩水で1ml当たり $10^4 \sim 10^5$ 個の菌量になるように希釈し、その1mlを各培養管に移殖した。なお、各培養管はあらかじめ培地13mlを分注滅菌し、菌接種にさきだち各こう配温度に2時間以上保持したものをを用いた。

3. 菌数の測定

最初の24時間は原則として4時間ごとに、その後は12時間ごとに各こう配温度の培養管から培養液0.1mlずつを採取し、滅菌生理食塩水で10進希釈を行い、その0.1mlを0.1%酵母エキス加ハートインヒュージョン寒天培地(栄研化学製)平板に塗抹し、25°で48時間培養後発生した集落数から各こう配温度における菌数を算定した。

4. 発育温度特性の決定

最低発育温度は96時間以内に発育の認められた最も低い温度とし、0°で発育の認められたものは一応0°とみなした。同様に、最高発育温度は発育の認められた最も高い温度とした。至適発育温度は対数増殖期の世代時間が最も短かく、しかも最高生菌数に達した温度とした。なお、世代時間はTopley & Wilsonの方式⁶⁾によって算出した。

実験結果

1. 凍結豚肉分離菌株の発育温度特性

各種類1株ずつについて、それぞれの主要温度におけ

Fig. 1. The effect of incubation temperatures on the growth of the psychrotrophic isolates

Fig. 2. Generation times of the psychrotrophic isolates at various incubation temperatures

る発育曲線を Fig. 1 に示す。

いずれの供試菌株も、0～30°の間で発育が認められ、25または30°で最も良好な発育を示した。この両温度での発育状態にあまり差はなかったが、概してグラム陽性菌は25°の方が良かった。35°では *Pseudomonas* に属する4菌株が発育し、その内、けい光のない *Pseudomonas* は40°でも発育が認められたが、45°ではいずれの菌株も発育を示さなかった。なお、35°以上での発育状態は培養初期に比較的長い誘導期とその間の菌数値の減少が観察され、対数増殖期に入るとかなり急速に定常期に移行した。また、低温ほど誘導期が長くなる傾向がみられた。

定常期の菌数は一般にグラム陰性菌は培養液 1 ml 当たり 10^{10} 個のオーダーに達したが、グラム陽性菌ではそれより1オーダー程度低く、また、培養液の混濁度もグラム陰性菌の方が高かった。定常期には20～30°では供試菌株の多くがほぼ24時間以内に到達し、10°では全菌株とも72時間程度で定常期の菌数に達した。一方、至適発育温度より高い温度では定常期の菌数値が低くなる傾向がみられ、なかでもけい光のある *Pseudomonas* の35°培養およびけい光のない *Pseudomonas* の40°培養

では至適発育温度におけるより4オーダー程度低く、しかも一般に早く死滅期に移行した。

菌属別の各こう配温度での発育を比較するために、Fig. 1 の菌株について0～40°における発育温度曲線を Fig. 2 に示す。

Pseudomonas に属する菌株は一般に他の菌属に比較して低温での発育が良く、なかでもけい光のある *Pseudomonas* は0°での世代時間が2菌株とも6時間台であった。しかし、他の菌属では *Coryneforms* と *Micrococcus* 各1株を除きいずれも0°での世代時間は長かった。5°での世代時間は全株10時間以内となり、10°以上になると、培養温度による差は少なくなり、グラフのこう配も10°を境にして明らかな差が認められた。

以上のまとめとして、Table 1 に各菌株の最低、至適、最高発育温度および世代時間を示す。

Table 1 から明らかなように、同一菌属といえども各こう配温度における発育はかなり異なっていた。しかし、全般的にみて *Pseudomonas* に属する菌株は他の菌属のものに比べて幅広い発育温度域を示し、しかも、各こう配温度で良好な発育を示した。

2. 保存菌株の発育温度特性

供試菌株のうち、*Escherichia coli* と *Staphylococcus aureus* は他の菌株とかなり異なる発育を示したので、この2菌株を除く6菌株の発育温度特性について、凍結豚肉分離菌株の場合と同様、Fig. 3 および 4 に示す。

6菌株中、*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Microbacterium thermosphactum*, *Micrococcus caseolyticus* の4菌株は Table 1 に示すように、凍結豚肉分離菌株の発育にかなり類似していたが、5°以下での発育は全般的に劣っていた。そのうち *Pseudomonas* に属する2菌株は他の菌株に比べて発育温度域も広く、低温での発育も良好であった。なお、10°では *Microbacterium thermosphactum* は全供試菌株の中で最も発育が早く、世代時間は111分であり、ほぼ48時間で定常期に達した。しかし、*Flavobacterium suaveolens* は0°で発育せず、各こう配温度での発育も他の菌株よりかなり劣り、至適発育温度は35°であった。一方、*Cytophaga* は至適発育温度は30°であったが、発育温度域が10～30°と狭く、0、5°では菌数が減少し48時間目以後は測定されなかった。

Escherichia coli と *Staphylococcus aureus* の各こう配温度における発育は凍結豚肉分離菌株のいずれともかなり異なる傾向を示したので、凍結豚肉分離菌株のうちからけい光のある *Pseudomonas* sp. を1株選び、これら3菌株間の発育温度曲線の比較を Fig. 5 に示す。

Escherichia coli と *Staphylococcus aureus* の発育温度域は凍結豚肉分離菌株に比べて、上・下ともほぼ

Table 1. Cardinal Growth Temperatures and Generation Times of the Test Strains

Test strain		Minimum growth temperature (°C)	Generation time (min)	Optimum growth temperature (°C)	Generation time (min)	Maximum growth temperature (°C)	Generation time (min)
Frozen pork isolates	<i>Pseudomonas</i> sp. (fluorescent type) (1)	0	409	30	39	35	59
	<i>Pseudomonas</i> sp. (fluorescent type) (2)	0	394	30	46	35	72
	<i>Pseudomonas</i> sp. (non-fluorescent type) (1)	0	461	30	29	40	193
	<i>Pseudomonas</i> sp. (non-fluorescent type) (2)	0	570	30	42	40	99
	<i>Flavobacterium</i> sp. (1)	0	1,445	30	64	30	64
	<i>Flavobacterium</i> sp. (2)	0	5,418	30	51	30	51
	<i>Coryneforms</i> sp. (1)	0	493	25	40	30	151
	<i>Coryneforms</i> sp. (2)	0	1,970	25	65	30	74
	<i>Micrococcus</i> sp. (1)	0	516	25	65	30	103
	<i>Micrococcus</i> sp. (2)	0	1,668	25	55	30	181
Stock strains	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (IAM 12022)	0	942	30	43	40	102
	<i>Pseudomonas fragi</i> (IAM 1650)	0	1,141	25	51	40	88
	<i>Flavobacterium suaveolens</i> (OUT 3752)	5	2,408	35	59	40	151
	<i>Cytophaga</i> (Guppy B)	10	236	30	49	30	49
	<i>Microbacterium thermosphactum</i>	0	1,806	25	36	30	51
	<i>Micrococcus caseolyticus</i> (OUT 8088)	0	1,667	30	54	30	54
	<i>Escherichia coli</i> (Type I)	10	722	40	15	50	78
	<i>Staphylococcus aureus</i> (209 P)	20	344	35	36	45	41

10° 前後中温部に片寄り，至適発育温度も同様に高かった。また，培養温度の低下に伴う発育速度の低下も顕著であった。20° 以上では *Escherichia coli* は全供試菌株中最も発育が良く，40° における世代時間が最も短く約 15 分で，他の菌株の最短世代時間の 1/2 以下であった。しかし，*Staphylococcus aureus* の最短世代時間は他の菌株のそれと大差なかった。

考 察

低温で発育する細菌群に対しては，これまで好冷細菌あるいは低温細菌と呼ばれるなどきわめて漠然とした概念の下で取り扱われており，今日に至っても全面的に支持を受けるような定義づけがなされていず，いまだに両者ともかなり混乱した状況の下で取り扱われている。従来，至適発育温度，最高，および最低発育温度などの温域を明確にした上で，両者の概念を確立しようとする試みが数多くなされている。現段階では Eddy⁷⁾ や Kandler⁸⁾ の提案と，さらにそれらを集約した 1968 年の国際酪農連盟 (IDF) 主催の低温発育細菌に関するセミ

ナーの提案⁹⁾に基づいた psychrotroph (低温細菌) という用語が一般に支持され，特に発育適温が 20° 以下のものに限り psychrophile (好冷細菌) とすることが望ましいとの考え方が支配的であり^{10), 11)}，次第に両者の概念が明確化されつつあると思われる。このような観点に立って psychrotroph という用語で表される一連の細菌群について考えると，今回供試した凍結豚肉分離菌株のほとんどが上記の概念で規定されるカテゴリーに入るものであり，また，その発育温度特性は 0, 5° のような低温でも発育可能とはいえるものの，至適発育温度は 25~30° にあるものと考えられる。したがって現状では食肉に分布する低温発育細菌の大部分は著者のこれまでの調査結果^{1), 2)}からも，psychrotroph あるいは Kandler のいう⁸⁾ psychrotrophic mesophilics とみなしてよいと思われる。

なお，著者の調査範囲でも Witter¹²⁾ の総説に記載されているように，20° 以下に至適発育温度を有するとされる psychrophile の存在を認めるには至らなかった。

Fig. 3. The effect of incubation temperatures on the growth of six known strains

Fig. 4. Generation times of six known strains at various incubation temperatures

た。しかし、凍結豚肉分離菌株は従来から報告されている^{13)~19)} 低温発育細菌の低温での発育と比較しても、培養条件が異なるとはいえ、かなり良好な発育を示し、一般に 0, 5°でも発育が可能であるところから、0°前後の低い温度域で貯蔵された食肉中でも十分増殖可能なことが推察され、品質管理上十分な配慮が必要である。一方、比較のために用いた 8 保存菌株中、*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi*, *Microbacterium thermosphactum*, *Micrococcus caseolyticus* の 4 菌株は凍結豚肉分離菌株に近似した発育を示すところから、これらも凍結豚肉分離菌株同様 psychrotroph とみなしてよいであろう。

低温発育細菌と考えられるこれらの菌株は培養温度の低下に伴い、漸次発育に要する時間が延長し、5~10°を境にして顕著な発育速度の低下を示した。このような現象は種々の低温域で貯蔵された牛肉²⁰⁾ や牛乳^{13), 19)} 中の生菌数の消長でも観察されており、前報²⁾ の分離菌株の発育温度も 5 と 10°では発育率に明らかな差がみられた。以上のことから低温発育細菌には 5 と 10°の間を境にして環境温度に対する感受性が異なる臨界温度ともいふべきものが存在するものと考えられる。

供試菌株中、*Pseudomonas* に属する菌株は全般的にみて、他の菌属より低温での発育能力が高かったが、本菌属以外は同一菌属でも温度の低下に伴い発育を異にした。この事実は食肉を低温貯蔵した場合、本菌属が最終的には汚染菌叢の主体を占めることになる事実^{1), 3)} を裏書きする理由の一つになるものと思われる。

Fig. 5. Growth rates of *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* at various incubation temperatures

これらの低温発育細菌といわゆる中温細菌とみなされている *Escherichia coli* および *Staphylococcus aureus* の発育温度特性とを比較すると、低温発育細菌では至適発育温度が 10° 前後低く、発育温度域も中温域に及ぶとはいえ、概して低温部に片よる傾向がみられ、培養温度の低下に伴う影響も少なかった。これらの結果は Brown¹⁵⁾ や Ingraham¹⁶⁾ の報告とも一致するところから、両者の間には発育温度の点で明らかな差があると考えられる。したがって、従来から生菌数の測定条件として実施されてきた中温細菌を対象とした $35\sim37^{\circ}$ 培養の場合には低温発育細菌の発育がみられない場合があり、実際よりも測定値が低く判定される傾向にある。特に食肉の品質管理上の指標としての生菌数は汚染細菌のかんりの部分が低温発育細菌と考えられることから、その測定条件としては低温発育細菌でも発育可能な温度で、しかも成績判定の時間も比較的短くてすみ $25\sim30^{\circ}$ 培養が適当であろうと考えられる。

微生物の発育温度特性を知るために、中江²¹⁾は定常熱伝導系を応用した温度こう配培養法を開発し、各種畜産食品由来の低温発育細菌について検討し、この方法が優れていることを報告した。この方法は寒天培地中の集落の発現状況を観察し、それによって当該菌の温度特性を知る目的からすれば良い方法である。しかし、食品保蔵の立場からみれば、汚染細菌の誘導期の長さ、対数増殖期における発育速度ならびに菌体量などが重要な意味を有すると考えられるので、これらに関する正確な情報を種々の温度で同時に知るためには、そのつど菌数測定という多少の煩雑さはあるにしても、著者が今回採用した振とう培養を加味する温度こう配培養法の方がより優れていると考える。すでに当研究所の丸山²²⁾は *Yersinia enterocolitica* などの腸管系病原細菌について検討し成果を得ている。この方法は発育温度特性のみでなく、他

の生理学的活性に及ぼす温度の影響なども知ることができ、将来、低温発育細菌などを含めた食品汚染細菌の挙動を知る上からも有力な手段になるものと考えられる。

要 約

食肉を汚染する低温発育細菌の発育温度特性を知る目的で、凍結豚肉から分離したけい光のある *Pseudomonas*、けい光のない *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Coryneforms*, *Micrococcus* の各2株と保存菌株の低温発育細菌6株、中温細菌2株について、振とう温度こう配培養装置を用いて 0 から 5° 間隔で 50° までの各温度における発育状態を比較した結果、次の成績を得た。

- 1) 分離菌株はいずれも 0° で96時間以内に発育を示した。
- 2) 分離菌株の中で最高発育温度に差がみられ、けい光のない *Pseudomonas* は 40° 、けい光のある *Pseudomonas* は 35° 、その他の菌属は 30° であった。
- 3) 分離菌株の至適発育温度は 25 または 30° で、その温度での世代時間は $29\sim65$ 分であった。
- 4) 0° において分離菌株中の *Pseudomonas* の発育は速やかで、これに比べて保存菌株の発育はかなり遅かった。

稿を終るに臨み本研究に対し終始御指導を賜った当研究所生活科学部長春田三佐夫博士ならびに本実験に当たり有益なる御助言をいただいた微生物部丸山務研究員に深甚なる謝意を表し、併せて梅木富士郎主任研究員に感謝する。

本報告の概要は日本食品衛生学会第26回学術講演会で報告した。

文 献

- 1) 小久保弥太郎、梅木富士郎、春田三佐夫：食衛誌。12, 164 (1971)。
- 2) 小久保弥太郎：東獣畜誌。19・20 合併号, 184

- (1973).
- 3) 小久保弥太郎: 食衛誌, **14**, 448 (1973).
- 4) Oppenheimer, C. H., Drost-Hansen, W.: J. Bact., **80**, 21 (1960).
- 5) Vanderzant, C., Nickelson, R.: J. Milk and Food Tech., **32**, 357 (1969).
- 6) Topley, W. W. C., Wilson, G. S.: "Principles of Bacteriology and Immunity" Vol. 1, p. 97 (1957) Arnold & Co., London.
- 7) Eddy, B. P.: J. appl. Bact., **23**, 189 (1960).
- 8) Kandler, O.: Milchwissenschaft, **21**, 257 (1966).
- 9) Intern. Dairy Federat.: IDF VI-DOC-48 (1969).
- 10) 中江利孝: 乳技協資料, **20**, 2 (1970).
- 11) 矢野信礼: "食品衛生の微生物" p. 142 (1970) 朝倉書店.
- 12) Witter, L. D.: J. Dairy Sci., **44**, 983 (1961).
- 13) Greene, V. W., Jezeski, J. J.: Appl. Microbiol., **2**, 110 (1954).
- 14) Vanderzant, W. C., Moore, A. V.: J. Dairy Sci., **38**, 743 (1955).
- 15) Brown, A. D.: J. gen. Microbiol., **17**, 640 (1957).
- 16) Ingraham, J. L.: J. Bact., **76**, 75 (1958).
- 17) Sinclair, N. A., Stokes, J. L.: *ibid.*, **85**, 164 (1963).
- 18) Olsen, R. H., Jezeski, J. J.: *ibid.*, **86**, 429 (1963).
- 19) 小川益男: 東京農工大学学術報告, **11**, 71 (1968).
- 20) Ayres, J. C.: Food Res., **25**, 1 (1960).
- 21) 中江利孝: 農化, **42**, 639 (1968).
- 22) 丸山 務: 日細誌, **28**, 343 (1973).