調査資料

殺菌方法の異なるビンおよび紙容器充てん
乳中の低温細菌の分布

(昭和 54 年 6 月 15 日受理)

山本和則* 佐藤秀雄* 赤津 好*

Distribution of Psychrotrophic Organisms in Bottled and Paper
Packed Market Milks Pasteurized by Various Methods

Kazunori YAMAMOTO, Hideo SATOU and Konomu AKATSU

(Ibaraki Prefectural Institute of Health: 4-1, Atago-cho, Mito, Ibaraki)

Key words: ビン装乳 bottled milk; 紙容器充てん乳 paper packed market milk; 低温細菌 psychrotrophic bacteria; 市乳中の細菌 bacteria in milk

近年、食品流通におけるコールドチェーンの進展に伴い、低温細菌による食品の汚染が、重要な問題となってきた。牛乳は、低温保存期間中に、低温細菌の汚染により、品質が低下しやすい食品の一つである。したがって、牛乳中の低温細菌の微生物学的、生化学的研究は、数多く報告されている^{1)~7)}。

しかし、ビンおよび紙容器充てん乳の充てん直後の低温細菌に関する比較調査は、ほとんど行われていない。そこで、今回、超高温処理 (UHT) 法、高温短時間処理 (HTST) 法、低温保持 (H) 法の 3 種の方法により殺菌されたビンおよび紙容器充てん乳の充てん直後の生菌数、低温細菌数ならびにそのフローラについて比較検討したので報告する。

試料および実験方法

1. 試 料

1978年8月中旬から9月上旬にかけ、茨城県内18乳処理場より充てん直後の市乳40検体を採取し試料とした。市乳の殺菌方法と容器のタイプを Table 1 に示した。すなわち、ビン充てん乳21検体、紙容器充てん乳19検体あった。なお、HTST法殺菌紙容器充てん乳は、茨城県内の乳処理場で造られていないため、試料が得られなかった。

2. 菌数測定と低温細菌の分離

1) 菌数測定

生菌数の測定は、標準寒天平板培養法により、35°C 2日間培養後、発現したコロニーを計数し、試料 1 ml 中の菌数として示した⁸⁾。低温細菌数の測定は、米国公衆衛生協会が定める乳、乳製品の標準検査方法⁹⁾に従い、生菌数測定と同様の方法により平板を作成し、7°C 10日間培養後、コロニーを計数し低温細菌数とした。

2) 低温細菌の分離

低温細菌の分離は、試料 1 ml を標準寒天平板に塗抹し、7°C 10日間培養を行った。発現したコロニーを標準寒天斜面に釣菌し、同じ条件で培養して生育の認められた菌株を低温細菌とした。

3. 低温細菌の同定

分離菌株の同定は、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第8版¹⁰⁾、医学細菌同定の手びき¹¹⁾、その他の報告^{12), 13)}に準拠して行った。主な検査項目は、グラム染色性、形態、芽胞形成の有無、運動性、O-F 試験 (Hugh-Leifson 法)、色素産生能、チトクロムオキシダーゼ産生能、カタラーゼ産生能などであった。

4. 各種条件における発育試験

661 株の分離菌株を標準寒天平板に 1 株ずつ塗抹し、温度および培養日数の異なる 7 種の条件下で培養を行った。すなわち、0°C, 7日間, 0°C, 14日間, 5°C, 7日間, 5°C, 10日間, 7°C, 10日間, 20°C, 4日間および 35°C, 2日間の各

* 茨城県衛生研究所: 茨城県水戸市愛宕町 4-1

Table 1. Types of Containers and Pasteurization Methods of Market Milk Samples Supplied by Total Dairy Plants in Ibaraki-prefecture

Containers	Pasteurization method			
	U.H.T. ^{a)} method	H.T.S.T. ^{b)} method	H. ^{c)} method	Total
Bottled milk	11	6	4	21
Paper packed milk	18	0	1	19
Total	29	6	5	40

^{a)} Ultra high temperature heating^{b)} High temperature short time^{c)} Holding

Figures in table indicate the number of samples.

Table 2. Viable and Psychrotrophic Counts in Bottled and Paper Packed Market Milks Pasteurized by Various Methods

Bacterial counts/ ml at the order of		Pasteurization method					
		U.H.T. ^{a)} method		H.T.S.T. ^{b)} method	H. ^{c)} method		Total
		Bottled milk	Paper packed milk	Bottled milk	Bottled milk	paper packed milk	Bottled milk Paper packed milk
Viable counts		No. of samples					
	0	7	17	3	1	1	11 18
	10 ⁰	4	1	0	0	0	4 1
	10 ¹	0	0	0	0	0	0 0
	10 ²	0	0	0	0	0	0 0
	10 ³	0	0	2	2	0	4 0
	10 ⁴	0	0	1	0	0	1 0
	10 ⁵	0	0	0	1	0	1 0
Psychrotrophic counts	0	7	17	0	0	0	7 17
	10 ⁰	4	1	0	1	1	5 2
	10 ¹	0	0	3	0	0	3 0
	10 ²	0	0	0	2	0	2 0
	10 ³	0	0	3	1	0	4 0

^{a)~c)} See Table 1

条件で培養を行い、その発育状態を検討した。

結 果

1. 生菌数および低温細菌数

Table 2 に、ビンおよび紙容器充てん乳の細菌による汚染状態を示した。

UHT 法殺菌乳は全検体とも、10⁰/ml 台以下の生菌数であった。また、94% の紙容器充てん乳は汚染されていないが、ビン充てん乳の 38% は汚染されていた。まったく同様な結果が低温細菌数についても認められた。

HTST 法あるいは H 法により殺菌された市乳の 50% 前後は、10³~10⁵/ml 台の生菌数であった。また、上記検体では、10⁰~10³/ml 台の低温細菌による汚染が認められた。紙容器充てん乳は低温細菌に汚染されにくいのに対し、ビン充てん乳は低温細菌によるかなりの汚染が認められた。

2. 低温細菌の分離と同定

低温細菌は全試料40検体中、16検体から検出され、総数 661 株を分離した。容器別では、ビン充てん乳から

Table 3. Types of Psychrotrophic Organisms in Bottled and Paper Packed Market Milks Pasteurized by Various Methods

Genus	Pasteurization method					Total
	U.H.T. ^{a)} method		H.T.S.T. ^{b)} method	H. ^{c)} method		
	Bottled milk	Paper packed milk	Bottled milk	Bottled milk	Paper packed milk	
	No. of organisms isolated. (%)					
<i>Pseudomonas</i>	19	2	144	144	0	309 (46.7)
<i>Acinetobacter</i>	0	1	27	34	0	62 (9.4)
<i>Aeromonas</i>	2	1	34	6	1	44 (6.7)
<i>Flavobacterium</i>	0	0	31	5	0	36 (5.4)
Coliform bacteria	0	0	21	5	0	26 (3.9)
<i>Alcaligenes</i>	1	0	8	11	0	20 (3.0)
<i>Bacillus</i>	6	0	30	10	1	47 (7.1)
<i>Micrococcus</i>	7	0	16	14	0	37 (5.6)
<i>Lactobacillus</i>	1	0	2	4	0	7 (1.1)
<i>Streptococcus</i>	1	0	0	0	0	1 (0.2)
Unclassified						
Gram (−) rods	0	0	41	15	0	56 (8.5)
Gram (+) rods	0	0	2	2	0	4 (0.6)
Yeast	0	0	11	1	0	12 (1.8)
Total	37	4	367	251	2	661(100.0)
Gram-negative	22	4	306	220	1	553(83.6)
Gram-positive	15	0	50	30	1	96(14.6)

a)~c) See Table 1

655 株, 紙容器充てん乳から 6 株であった。また, 殺菌方法別では UHT 法殺菌乳から 41 株, HTST 法殺菌乳から 367 株, H 法殺菌乳から 253 株であった。(Table 3)

661 株の分離菌中 553 株がグラム陰性菌であり, その中でも *Pseudomonas* が 309 株で, 分離した全低温細菌株の約半数を占めた。このような結果は, 他の研究者の報告ともよく一致している^{1)~7)}。その他に分離された低温細菌の属を多い順に示すと次のようであった。すなわち, *Acinetobacter* 62 株, *Aeromonas* 44 株, *Flavobacterium* 36 株, Coliform bacteria 26 株などであった。グラム陽性菌では, *Bacillus* 47 株, *Micrococcus* 37 株などが同定されたが, グラム陽性の低温細菌は全体の 14.6% と少なかった。低温細菌のフローラは, 各種殺菌方法によりほとんど影響を受けず, 全体のフローラと類似した傾向が認められた。しかし, UHT 法殺菌乳は他の殺菌方法で殺菌された市乳に比べてグラム陽性菌の割合が高かった。

3. 低温細菌の検出頻度

低温細菌はビン充てん乳 14 検体, 紙容器充てん乳 2 検体, 計 16 検体から分離された。16 検体中の低温細菌の検

出頻度を Table 4 に示した。

ビン充てん乳でみると, *Pseudomonas* の検出頻度は, 86% の高い値を示した。また, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* は, それぞれ 64% の比較的高い検出頻度で現われる低温細菌であることが認められた。

4. 各種条件における発育能

分離した 661 株の低温細菌について, 7 種の培養条件における発育能を検討した。分離菌株は, 7°, 10 日間および 20°, 4 日間でいずれも全株の発育が認められた。しかし, 0°, 14 日間培養では, 78.5%, 5°, 7 日間培養では 85.3%, 35°, 2 日間培養では 95% の発育を示した。(Table 5)

0°, 7 日間の培養条件では, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* と同定された菌株は, 半数以上の発育を示したが, 全体としては 346 株 (52.3%) が発育を示さなかった。*Alcaligenes*, *Aeromonas*, Coliform bacteria などの菌株の大部分は上記条件では発育を示さないが, 培養時間を 14 日間に延ばすと発育を示す菌株が多かった。

考 察

18乳処理場から採取した紙容器充てん乳は、ビン充てん乳と比べ良い衛生状態にあると認められる。すなわち、大部分の紙容器充てん乳は低温細菌に汚染されてい

Table 4. Frequency of Occurrence of Psychrotrophic Organisms in Bottled and Paper Packed Market Milks

Genus	Container types		
	Frequency of occurrence		
	Bottled milk	Paper packed milk	Total
<i>Pseudomonas</i>	12	1	13
<i>Acinetobacter</i>	9	1	10
<i>Aeromonas</i>	9	2	11
<i>Flavobacterium</i>	7	0	7
Coliform bacteria	6	0	6
<i>Alcaligenes</i>	7	0	7
<i>Bacillus</i>	9	1	10
<i>Micrococcus</i>	6	0	6
<i>Lactobacillus</i>	4	0	4
<i>Streptococcus</i>	1	0	1
Yeast	4	0	4
Contaminated samples	14	2	16

ないが、ビン充てん乳の67%は汚染が認められた。上記結果は、紙容器が牛乳を汚染から保護するために適切な容器であることを示している。

浜田は紙容器に牛乳が充てんされる際に、外気が容器から完全に排除されるので、良い衛生状態にあると報告している¹⁴⁾。殺菌方法を比較すれば、UHT法がHTST法あるいはH法に比べ著しく優れている。40検体中、生菌による汚染はビン充てん乳10検体、紙容器充てん乳1検体より認められたにすぎないが、低温細菌による汚染はビン充てん乳14検体、紙容器充てん乳2検体より認められた。この結果は市乳の細菌汚染状況をは握するためには、生菌数を測定するよりも低温細菌数を測定する方が良いことを示している。市乳から低温細菌として分離された菌株の約半数は*Pseudomonas*と同定された。この結果は報告されている他の研究者らの結果とよく一致する^{1)~7)}。HTST法およびH法殺菌ビン充てん乳から、26株のColiform bacteriaが、分離された。これは乳処理場での殺菌から打センまでの過程が、不衛生であったと考えられる。また、これらの乳処理場では空気からの汚染を防ぐためのバイオクリーンルームなどが設置されていないこともその理由の1つにあげられよう。低温細菌の約半数は、*Pseudomonas*に属するが、*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*に属する菌株も、比較的高い検出頻度で分離された。特に、ビン充てん乳では、グラム陰性菌およびグラム陽性菌に属する分類学的に種々雑多の細菌による汚染が認められた。これはビン

Table 5. Growth Responses of Psychrotrophic Organisms Isolated from Market Milks at Different Incubation Temperatures

Genus	No. of strains examined	Incubation condition						
		0°C		5°C		7°C	20°C	35°C
		7 days	14 days	7 days	10 days	10 days	4 days	2 days
<i>Pseudomonas</i>	309	185 (59.9)	260 (84.1)	269 (87.1)	289 (93.5)	309 (100)	309 (100)	293 (94.8)
<i>Acinetobacter</i>	62	18 (29.0)	40 (64.5)	42 (67.7)	51 (82.3)	62 (100)	62 (100)	60 (96.8)
<i>Aeromonas</i>	44	12 (27.3)	36 (81.8)	38 (86.4)	42 (95.5)	44 (100)	44 (100)	42 (95.5)
<i>Flavobacterium</i>	36	19 (52.8)	30 (83.3)	32 (88.9)	33 (91.7)	36 (100)	36 (100)	35 (97.2)
Coliform bacteria	26	7 (26.9)	17 (65.4)	21 (80.8)	25 (96.2)	26 (100)	26 (100)	26 (100)
<i>Alcaligenes</i>	20	2 (10.0)	12 (60.0)	17 (85.0)	19 (95.0)	20 (100)	20 (100)	19 (95.0)
<i>Bacillus</i>	47	24 (51.1)	36 (76.6)	43 (91.5)	44 (93.6)	47 (100)	47 (100)	45 (95.7)
<i>Micrococcus</i>	37	16 (43.2)	31 (83.8)	32 (86.5)	37 (100)	37 (100)	37 (100)	36 (97.3)
<i>Lactobacillus</i>	7	0	3 (42.9)	5 (71.4)	6 (85.7)	7 (100)	7 (100)	6 (85.7)
<i>Streptococcus</i>	1	0	0	0	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)
Unclassified								
Gram (−) rods	56	20 (35.7)	42 (75.0)	50 (89.3)	52 (92.9)	56 (100)	56 (100)	51 (91.1)
Gram (+) rods	4	0	0	3 (75.0)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)
Yeast	12	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	11 (91.7)
Total	661	315 (47.7)	519 (78.5)	564 (85.3)	614 (92.9)	661 (100)	661 (100)	629 (95.2)

充てん乳中の低温細菌のフローラが紙容器充てん乳中のそれと比較して、著しく複雑なことを示している。

要 約

茨城県内18乳処理場から採取した充てん直後のビンおよび紙容器充てん乳中の低温細菌の分布およびフローラについて比較検討し、次の結果を得た。

1. 紙容器充てん乳の方がビン充てん乳に比べて低温細菌による汚染が少なかった。
2. UHT 法で菌数が最も少なく H 法がこれにつぎ、HTST法における菌数は最大であった。
3. 低温細菌は紙容器充てん乳からはわずか6株しか分離できなかったが、ビン充てん乳の方は UHT 法 37 株、HTST 法 367 株、H 法 251 株が分離され、そのフローラを見ると3法とも *Pseudomonas* が最も多かった。

また、H 法と比べると HTST 法では、*Aeromonas*, *Flavobacterium*, Coliform bacteria などが多かった。

4. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus* と同定された低温細菌は、それぞれ 60% 以上の検出頻度で分離された。

文 献

- 1) 小川益男：東京農工大学農学部学術報告，第 11 号 (1968)。
- 2) Schultze, W. D., Olson, J. C., Jr.: J. Dairy

Sci., **43**, 346~350, 351~357 (1960).

- 3) Witter, L. D.: *ibid.*, **44**, 983~1015 (1961).
- 4) Morita, R. Y.: Bacto. Rev., **39**, 144~167(1975).
- 5) 浜本典男, 広田哲二, 金内稔郎: 食衛誌. **7**, 14~19 (1966).
- 6) 三河勝彦: 酪農科学・食品の研究, **25**, A-153~A-163 (1977).
- 7) 矢野信礼: 食衛誌., **5**, 103~111 (1964).
- 8) 厚生省令第 52 号: 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令 (1951).
- 9) Am. Pub. Hlth. Ass.: "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" 13th ed., (1972) Academic Press, New York.
- 10) Buchanan, R. E., Gibbons, N. E.: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 8th, ed., (1974) Williams & Wilkins, Baltimore.
- 11) Cowan & Steel (坂崎利一訳): "医学細菌同定の手びき" 第2版 (1974) 近代出版.
- 12) 春田三佐夫: モダンメディア, **20**, 273~288 (1974).
- 13) 矢野信礼: *ibid.*, **14**, 532~539 (1968).
- 14) 浜田次郎: ジャパンフードサイエンス, **10**, 40~45 (1971).