冷凍食品の微生物に関する研究

第2報 市販冷凍食品より分離した細菌の性状

(昭和40年12月28日受理)

駒形和男* 小川博望*

Microbiological Studies on Frozen Foods

II. General Properties of Bacteria Isolated from Frozen Foods

Kazuo KOMAGATA and Hiromochi OGAWA

(Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.:
2964, Suzuki-cho, Kawasaki)

Microorganisms found in the frozen foods were divided into three groups, psychrophile, psychro-tolerant mesophile and mesophile, on the basis of growth temperature. Almost all the bacteria isolated from the frozen foods were included in the psychro-tolerant mesophile, and exhibited a wide range of growth temperature between 0°C and 30°C. The kinds of bacteria were variable from sample to sample. The problem of microbiological inspection of frozen foods was discussed from the viewpoint of ecology.

(Received December 28, 1966)

緒言

前報¹⁾において著者らは市販冷凍食品には多数の微生物が存在し、その多くは0°で生育可能な細菌であることを報告した。低温に生育する微生物について種々の観点から研究がなされているが、その分類学的研究は少なく、冷凍食品についてもその知見はきわめて少ない。そこで著者らは前報で得られた冷凍食品の微生物のうちより代表的な細菌を選び、その分類学的研究を行なったので報告する。

実験

I 供試菌株

前報において各種冷凍食品より分離した約400株の微生物のうちより形態および培養の性質に基づいて代表的な菌株と思われる細菌40株を選んで実験に供した。

II 実験方法

A) 同定のための実験方法は主として Manual of Microbiological Methods²⁾によったが、一部は著者ら³⁾がすでに報告した方法によった。

B) 細胞の形態観察

グラム陽性菌の同定には細胞形態がきわめて重要な要素となるので、つぎのような方法によって細胞形態を詳細に観察した。

* 味の素株式会社中央研究所：川崎市鈴木町2964

1) 肉汁寒天および0.1%ペプトン添加グルタメート寒天での観察：標準培地として肉汁寒天を用い、また合成培地で *Coryne-form* 細菌の細胞形態が変化することが知られているので⁴⁾、著者らが常用しているグルタメート培地⁵⁾に生育因子として0.1%のペプトンを加えて比較した。それらに生育した細菌をグラム染色によって細胞形態を観察し、また Bisset ら⁶⁾の方法および位相差顕微鏡による細胞壁の観察も合わせて行なった。一部ではネガティブ・ステイニングを行なった細胞を電子顕微鏡により観察し、multicellular form の確認を行なった。

2) 塩化リチウム添加の液体培養での観察：塩化リチウムは細胞形態に変化を与えることが知られているので⁶⁾、0.5%塩化リチウムを添加した肉汁および0.1%ペプトン添加グルタメート・ブロスにそれぞれ接種し、25°、24時間培養してネガティブ・ステイニングにより細胞形態の変化を観察した。

3) 抗酸性染色：Ziehl-Neelsen 法とオーラミンOを用いる Richards and Miller のケイ光法⁷⁾によって抗酸性を観察した。

4) メタクロマチンの観察：肉汁寒天および0.1%ペプトン添加グルタメート寒天に培養し、メチレンブルーの単染色によりメタクロマチン（異染顆粒）の有無を調

べた。

C) 生育温度の測定

供試菌株は冷凍食品より分離したものであり、温度との関係が深いものと思われるので、つぎに述べるような方法で生育と温度との関係を詳細に調べた。0°, 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 37° および 42° の 9 段階の温度をとり、あらかじめその温度に保存してあった寒天斜面に画線培養し、毎日その生育を肉眼で観察して最高の生育に達するまでの日数を記録した。

D) 抗生物質に対する感受性テスト

抗生物質に対する感受性テストは日本栄養化学社製のディスクを用い、使用した抗生物質はテトラサイクリン、クロラムフェニコール、ジヒドロストレプトマイシン、エリスロマイシン、ペニシリンおよびスルフイソキサゾールである。

以上の実験は特記しない限り 25° で行なった。菌種の同定は主として Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7 版) によったが、Krassilnikov の著書⁴⁾ や Jensen の研究⁸⁾、その他著者らの研究⁹⁾ などを比較検討し、なるべく原報に従って同定した。

結 果

I 分離菌株の特徴

分離菌株 40 株のうち 20 株はグラム陰性で、培養時間、培養温度および培地等で染色性に変化はなかった。しかし *Alcaligenes metalcaligenes* に属する 5 株はまれにグラム陽性の細胞が混在し、種々検討したがこれは実験上の artefact ではなかったので若干 variable の傾向があると考えられる。運動性を有するものは極鞭毛を有する *Pseudomonas* 6 株と周鞭毛を有する *Aerobacter* 1 株のみで、他の *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* の 13 株はいずれも運動性を示さなかった。生理的には *Aerobacter cloacae* を除いて、不活性のものが多く、一般にラクトースより酸化的に酸を生成するものや、硫化水素を生成するものが多く、このことは今回分離した細菌群の特徴のひとつである。また冷凍食品より多数の *Pseudomonas* が分離されたが、ケイ光性の色素を生成する菌株は比較的少なかった。一方他の 20 株はいずれもグラム陽性の桿菌で運動性を有するものは有胞子の *Bacillus* 1 株と *Brevibacterium* 2 株で、他の *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Sarcina* および未同定菌の計 17 株はいずれも運動性を示さなかった。生理的には不活性で、低温における生育もグラム陰性菌ほど良好ではないが、なかには 0° で 5 日程度で生育するグラム陽性菌もあった。また後述する未同定菌のように分類学的にその位置の明確でない菌株も分離された。

II 生育と温度との関係

供試菌株の生育を 0° から 42° まで詳細に調べた結果、これら微生物は温度に対する態度からつぎのように大別

することができた。すなわちグループ 1 の菌株は低温でのみ生育するいわゆる psychrophile であるが、供試菌株には認められず、比較として用いた酵母に認められた。これについては別に報告する。グループ 2 に含まれるものは低温でも中温でもよく生育し、またグループ 3 に含まれるものは中温でのみよく生育する菌株である。

グループ 1 : 10~15° の間に生育の適温を有するもの (psychrophile)

Candida curiosa P-6

グループ 2 : 20~30° の間に生育の適温を有するが 0~10° の間でも生育するもの (psychrotolerant の mesophile)

2-1 : 生育の適温は 20~25° の間にあるが、30° では生育せず、0° では 4~7 日で生育するもの

Alcaligenes metalcaligenes P-148, P-177

Brevibacterium helvolum P-120

Arthrobacter citreus P-81

Arthrobacter tumescens P-71

2-2 : 生育の適温は 20~30° にあるが、37° では生育せず、0° では 4~7 日で生育するもの

Pseudomonas taetrolens P-233, P-274, P-296

Pseudomonas schuylkilliensis M-3

Flavobacterium ferrugineum P-187, P-15, P-48

Achromobacter delmarvae P-150, M-13

Achromobacter sp. P-73

Alcaligenes metalcaligenes P-171, P-173, P-184

Aerobacter cloacae M-9

Brevibacterium fuscum P-65, P-119

未同定菌 P-18, P-240, P-46, P-146

2-3 : 生育の適温は 25~30° にあるが、37° では生育せず、0° では 15~35 日で生育するもの

Pseudomonas sp. P-322

Flavobacterium sp. P-328

Flavobacterium sp. P-80

Brevibacterium helvolum P-337

Corynebacterium hydrocarboclastus M-10, M-28

Corynebacterium sp. M-37

Arthrobacter tumescens M-44

2-4 : 生育の適温は 20~30° にあるが、0° および 37° では生育せず、5° では 5~15 日で生育するもの

Pseudomonas maltophilia M-126

Brevibacterium ammoniagenes M-137

Brevibacterium sp. M-48

Arthrobacter sp. M-143

グループ 3 : 生育の適温が 25° 以上にあり、37° または 42° でも生育するが、0° では生育せず、5° では 14 日以上それ以上で生育するもの (mesophile)

Brevibacterium insectiphilium M-135

Bacillus pumilus M-155

Sarcina lutea subsp. *flava* M-110

おのおののグループより代表的な菌株を選び、生育と温度との関係を Fig. 1 に示した。

Fig. 1. Bacterial groups, psychrophile, psychrotolerant-mesophile and mesophile, on the growth temperature

* Time indicates the day when growth reached macroscopically a maximum at each of the temperature

III 抗生物質に対する感受性

本実験は実用上の問題として行なったのであるが、同じような性質を有する菌の間では抗生物質に対する感受性もまた同じパターンを示し、分類学上のひとつの指標として用いることができるものと思われる。一般にグラム陽性菌の方が抗生物質に対して感受性が強く、またどの微生物もテトラサイクリンに強い感受性を示し、スルフイソキサゾールに感受性のある菌株は少なかった。6種の抗生物質に対する感受性テストの結果を Table 1 に示した。

なお、冷凍食品より分離した細菌の同定については次報で述べる。

考 察

前報¹⁾において著者らは冷凍食品より分離される微生物はその形態やグラム染色性などの性質からいくつかのグループに大別され、またグラム陰性菌の多い試料とかグラム陽性球菌の多い試料があることを報告した。今回はそれぞれの試料を代表していると考えられる微生物の分類学的研究を行ない、グラム陰性菌の多い試料でもその内容を詳しく調べると、おのおの異なった属または種に属する細菌を主要なものとしていることが明らかになった。すなわち冷凍カキブレッドからはグラム陰性菌が多数分離されるが、主要細菌は *Ps. taetrolens* であり、冷凍生カキでは *Alcaligenes* が主要細菌であった。

またグラム陽性菌についても同様な現象が認められ、冷凍イカのさしみなどでは *Brev. helvolum* や *Arthrobacter* が主であるが、冷凍ニジマスでは *Sarcina lutea* などの黄色のコロニーを形成する球菌が多かった。

食品に及ぼす微生物の影響は微生物の種類によって異なるから、食品の微生物検査には試料中の生菌数のみならず、分類学的な意味における質的な構成にも注意を払わなければならないと考える。それにより構成微生物の生態から侵入経路を、またその生理的、生化学的性質から食品に及ぼす影響を予知することができるであろう。すなわち食品の微生物学的検査には特定の種類の微生物を調査するのみならず、いわゆる雑菌にも注目しなければならない。さらにそれら雑菌の生理学、生化学および形態学を背景とした広い意味の分類学的な特徴に基づき、それらの微生物がそこに存在する必然性を考え、微生物学的にきわめて複雑なマイクロフローを種または属の段階で考察しなければならないと考える。

低温に生育する微生物は一般に psychrophile といわれているが、mesophile, thermophile 等と比較してその定義があいまいである。教科書的な表現によれば、psychrophile とは20°C以下に生育の適温を有する微生物といわれている。しかしこの定義に合致する微生物は最近まで分離されず、また生育の適温に対する考え方の相違などの点から psychrophile の定義はもっぱら実用上の見地からなされてきた。しかし最近では20°C以下に生育の適温を有する微生物が見いだされ¹⁰⁾、また著者らも冷凍食品より20°C以下に生育の適温を有する *Candida* を分離している。Stokes¹¹⁾ は1963年に0°Cで1週間以内に肉眼的に十分観察できるほど生育するものを psychrophile と考え、そのなかで20°C以下に生育の適温を有するものを strict または obligate-psychrophile、20°C以上に生育の適温を有するものを facultative-psychrophile と呼称することを提案している。この見解に従えば、著者らが冷凍食品より分離した多くの微生物は facultative-psychrophile の範ちゅうに入る。しかし psychrophile という言葉は mesophile, thermophile に対応するものであるから、20°C以下に生育の適温を有する微生物、すなわち Stokes のいう obligate-psychrophile に対してのみ与えられるべき名称であると考え。以上の結果から今回われわれが冷凍食品より分離した広い生育温度域を有する細菌は psychrotolerant の mesophile と考えるべきものである。いずれにせよこれらは低温でも生育可能な細菌であるから、今後これらの食品衛生上の意義については広く検討されねばならない。

要 約

冷凍食品より分離される主要細菌の同定を行ない、それらが生育と温度との関係から3群に大別され、その多くが低温域から中温域までの広い温度域で生育することを明らかにした。また供試試料は分類学的にそれぞれ異

Table 1. Sensitivity to Antibiotics

Antibiotics		Tetracycline	Chloramphenicol	Dihydrostreptomycin	Erythromycin	Penicillin	Sulfisoxazol
Strains							
<i>Ps. taetrolens</i>	P-233	*##	++	++	—	—	—
<i>Ps. taetrolens</i>	P-274	##	++	++	+	—	—
<i>Ps. taetrolens</i>	P-296	##	+	+	+	—	—
<i>Ps. schuyllkilliensis</i>	M-3	++	—	—	—	—	—
<i>Ps. maltophila</i>	M-126	—	+	—	—	—	—
<i>Pseudomonas</i> sp.	P-322	+	##	##	+	—	—
<i>Flavo. ferrugineum</i>	P-15	##	++	+	++	—	—
<i>Flavo. ferrugineum</i>	P-48	##	++	+	+	—	—
<i>Flavo. ferrugineum</i>	P-187	##	++	—	+	—	—
<i>Flavobacterium</i> sp.	P-328	±	—	—	—	—	—
<i>Flavobacterium</i> sp.	P-80	##	+	—	++	##	+
<i>Ach. delmarvae</i>	P-150	—	##	##	++	##	##
<i>Ach. delmarvae</i>	M-13	##	##	##	##	—	—
<i>Achromobacter</i> sp.	P-73	++	++	+	+	—	—
<i>Al. metalcaligenes</i>	P-148	##	##	##	++	+	—
<i>Al. metalcaligenes</i>	P-171	+	##	##	++	—	—
<i>Al. metalcaligenes</i>	P-173	##	##	##	++	++	—
<i>Al. metalcaligenes</i>	P-177	##	##	##	++	++	—
<i>Al. metalcaligenes</i>	P-184	##	##	##	++	##	—
<i>Aerobacter cloacae</i>	M-9	##	—	++	—	—	—
<i>Brev. helvolum</i>	P-120	##	##	##	##	##	—
<i>Brev. helvolum</i>	P-337	##	++	##	##	##	—
<i>Brev. fuscum</i>	P-65	##	##	##	##	##	—
<i>Brev. fuscum</i>	P-119	##	##	##	##	##	—
<i>Brev. ammoniagenes</i>	M-137	##	##	##	++	##	++
<i>Brev. insectiphilium</i>	M-135	##	##	++	##	++	##
<i>Cory. hydrocarboclastus</i>	M-10	##	##	—	##	+	—
<i>Arth. citreus</i>	P-81	##	##	##	##	##	—
<i>Arth. tumescens</i>	P-71	##	##	##	##	++	—
<i>Bacillus pumilus</i>	M-155	##	##	##	##	##	++
<i>Sarcina lutea</i> subsp. <i>flava</i>	M-110	##	##	##	##	##	—
Unidentified organisms	P-18	##	+	—	##	##	—
Unidentified organisms	P-46	##	±	+	+	—	—
Unidentified organisms	P-146	++	—	—	##	##	—
Unidentified organisms	P-240	##	##	—	##	##	—

Antibiotics	minimum concentration	medium concentration	maximum concentration
Tetracycline	5 µg	10 µg	30 µg
Chloramphenicol	5 µg	10 µg	30 µg
Dihydrostreptomycin	2 µg	10 µg	50 µg
Erythromycin	0.5 µg	2 µg	10 µg
Penicillin	0.5U	2U	10U
Sulfisoxazol	50 µg	150 µg	300 µg

*## : Strongly sensitive. Inhibition zone is shown at minimum, medium and maximum concentrations.

++ : Moderately sensitive. Inhibition zone is shown at medium and maximum concentrations.

+ : Weakly sensitive. Inhibition zone is shown at alone maximum concentration.

— : Insensitive. Inhibition zone is not shown.

なった属または種に属する細菌を主要なものとしているので、食品の微生物検査には試料中の生菌数のみならず分類学的な意味における微生物の質的な構成にも注意すべきであると考えた。

本研究にあたり種々指導いただいた味の素㈱中央研究所の勝屋登博士に感謝いたします。

本研究の一部は日本農芸化学大会(1964年7月, 札幌)で発表。

文 献

- 1) 駒形和男, 小川博望, 勝屋 登: 食衛誌. **5**, 441 (1964).
- 2) M. J. Pelczar Jr.: "Manual of Microbiological Methods" McGraw-Hill Book Company, INC. (1957).
- 3) 飯塚 広, 駒形和男: 農化. **36**, 663, 668 (1962).
- 4) N. A. Krassilnikov: "Diagnostik der Bakterien und Actinomyceten" Gustav Fisher (1959).
- 5) K. A. Bisset, C. M. F. Hale: Expt. Cell Res. **5**, 449 (1953); V. S. D. Skerman: "A guide of the identification of the genera of bacteria" (1959), Williams & Wilkins より引用.
- 6) T. H. Lord: "Determinative bacteriological laboratory manual" (1960) Burgess.
- 7) O. W. Richards, D. K. Miller: Am. J. Clin. Pathol. **11**, 1 (1941); M. J. Pelczar Jr.: "Manual of Microbiological Methods" (1957) より引用.
- 8) H. L. Jensen: Proc. Linnean Soc. N. S. Wales **59**, 19 (1934).
- 9) 駒形和男, 飯塚 広: 農化. **38**, 496 (1964).
- 10) N. L. Lawrence, D. C. Wilson, C. S. Pederson: Appl. Microbiol. **7**, 7 (1959).
- 11) J. L. Stokes: "Recent progress in microbiology" VIII, Univ. Toront, p.187 (1962).
- 12) K. Komagata, T. Nakase: J. Gen. Appl. Microbiol. **11**, 255 (1965).