昆布エキス中における昆布付着菌および 接種食中毒菌の消長*

大石 圭一・岡 重 美

(1971 年 4 月 26 日受理)

Studies of Bacterial Growth on Kombu and of the Growth of Food Poisoning Bacteria Inoculated in Kombu Extract

Keiichi OISHI and Shigemi OKA**

Kombu, a palatable seaweed belonging to *Laminariaceae*, has often been used as a seasoning material for soups or vegetables in authentic Japanese cookery. The soup is especially rich in nutrients for bacterial growth. Therefore studies on the food hygiene of kombu extract were undertaken.

The growth of bacteria adhering to the surface of kombu was observed in an extract of the plant.

The following food poisoning bacteria, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens* and *Cl. botulinum*, were inoculated in kombu extract or artificial kombu medium.

When the bacterial counts of cultures in natural kombu medium were compared with those in artificial medium, no remarkable differences in growth were observed in any of the bacterial species used.

Judging from the experimental results, attention should be paid to contamination with *S. enteritidis* and *St. aureus*. With respect to the other three food poisoning bacterial species, the extract was considered to be relatively safe in food hygiene under the experimental conditions.

わが国における食中毒の 60~70% は細菌性のものであり、その原因食は水産食品によるものがかなり多い。昆布原藻あるいはその加工食品は多量摂取されているが、昆布単独の細菌性食中毒は未だ報告されていないようである。

しかしどのような食品にあつても、食中毒起因菌が異常増殖を来す至適条件が備われれば、食中毒と結びつく危険は十分あると考えねばならない。これまで食品中における食中毒細菌の消長、あるいは増殖に関して検討を行なつた報告はかなり見られる¹⁻⁶⁾。

この研究では、昆布エキス中における昆布付着菌（供試昆布に付着していた細菌を意味する）、および接種食中毒菌の消長を調べた。昆布は生長の速やかなものであり、それに含まれている未知微量成分の存在も確認⁷⁾されているので、その中に昆布付着菌あるいは接種食中毒菌の生長因子あるいはその類似物質を含んでいるかも知れない。含んでいないとしても、昆布はエキス成分の多い食物であるから、上記細菌にとつては好ましい栄養源になると推測される。その結果、将来食品衛生上の問題が起るかも知れない。本報ではその可能性の有無を検討した。

* 昆布の品質 XIV (Quality of Kombu, Edible Seaweeds Belonging to Laminariaceae-XIV)

* この報告の一部は昭和 44 年 5 月日本食品衛生学会において講演発表した。

** 北海道大学水産学部食品化学研究室 (Laboratory of Seafood Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate)

Table 1. Composition of artificial kombu medium.

Substance	Weight
L-Glutamic acid	46.8 mg
L-Aspartic acid	23.4 mg
L-Alanine	3.9 mg
L-Proline	3.9 mg
Mannitol	300.0 mg
Ash of 2 grams of kombu	
Thiamine-HCl	6.0 mg
Nicotinic acid	6.0 mg
Distilled water	300.0 ml
Ajust to pH 5.4 or 7.2	

実験方法

昆布エキス培地 500 ml 容量の三角フラスコに蒸留水 300 ml および昆布切片 2 g を加え、マグネチックスターラーで、37°C、2 時間攪拌してエキスを抽出した。昆布は 1966 年 8 月函館大森浜産のもので、約 3 年間実験室内に保存しておいたものである。

抽出したエキスは東洋汙紙 No. 2 で濾し、pH 5.4 および 7.2 に修正し、121°C、10 分間滅菌した。pH 5.4 は昆布エキス抽出時の pH 値であり、多くの食品の pH 値もこの近くにある。

合成エキス培地 昆布エキス中の成分を調べ⁷⁾、昆布重量約 0.7% のエキス成分 とほぼ 同様な合成

昆布エキス培地を作成した。その組成を Table 1 に示した。

供試菌株 供試食中毒菌株およびその分譲者を次に記す。

Vibrio parahaemolyticus, 0-5 北大水産学部微生物学教室; *Staphylococcus aureus*, ホ-1 北大獣医学部; *Salmonella enteritidis*, 函館市衛生試験所; *Clostridium perfringens* A 型, Hobbs type 1 国立予防衛生研究所; *Clostridium botulinum* E 型, 木古内 北海道立衛生研究所

生菌数測定用培地 昆布付着菌と *St. aureus*, および *S. enteritidis* には普通寒天培地 (極東牛肉エキス 10 g, 極東ポリペプトン 10 g, NaCl 3 g, 寒天 15 g, 蒸留水 1,000 ml, pH 7.2) を用いた。

V. parahaemolyticus には, BTB Teepol 寒天培地 (日水) を, *Cl. perfringens* にはカナマイシン不含 CW 寒天培地 (日水) を, *Cl. botulinum* には, トリプトソイ寒天培地 (栄研) にブドウ糖を 1% 加えたものを用いた。

昆布付着生菌数の測定 500 ml 容量の三角フラスコに滅菌生理食塩水あるいは滅菌蒸留水を 300 ml 入れ、これに約 2×2 cm² に細切した昆布 5 枚 (約 2 g) を加えた。この時点を目 0 時間目とし、以後 15°C では 9 日間、37°C では 48 時間培養を続けた。この間経時的に前述の生菌数測定用培地により、常法に従って昆布培養液の上澄液中の生菌数の測定を行なった。

接種食中毒菌数の測定 37°C、18~24 時間の培養菌を滅菌生理食塩水に懸濁 (10⁴~10⁶/ml) させた。その 1 ml ずつを昆布および合成昆布エキス培地に接種、37°C、48 時間培養を行なった。ただし *Cl. botulinum* は、30°C で 40~48 時間培養したものを同様に接種し、これを 30°C、48 時間培養した。

菌数は混積平板法により測定した。2 種の嫌気性菌については、上述の生菌数測定培地で混積したものを、ROSENTHAL の嫌気培養法⁸⁾により経時的に菌数を測定した。

結果および考察

昆布付着菌の消長 蒸留水および生理食塩水で昆布を浸出した液中で、37°C における昆布付着菌の経時的消長を 7 回調べ、その結果を Fig. 1 に示した。なお実線あるいは点線は各実験時の菌数値のほぼ中央を通るように結んだものである。蒸留水および生理食塩水の両浸出液においても、培養後 6 時間目までまったく増殖しないが、12 時間目から増殖を始め、48 時間目には最高 10⁵/ml となった。15°C においても同じ実験を行なった。その結果、培養後 2 日目まではほとんど増殖しない。しかし 3~4 日目から増殖を開始し、9 日目までにその最大値は 10⁷/ml に達した。

接種食中毒菌の消長 エキス中における接種食中毒菌の増殖状況は次のようである。

(1) *V. parahaemolyticus* pH 5.4 のエキスを菌を接種した場合の菌数変化を Fig. 2 に示す。

Fig. 1. Vicissitude of bacteria at 37°C in two kinds of extracts from kombu pieces.

Fig. 2. Vicissitude of *V. parahaemolyticus* in natural or artificial kombu medium (pH 5.4).

Fig. 3. Vicissitude of *St. aureus* in natural or artificial kombu medium (pH 5.4).

Fig. 4. Vicissitude of *S. enteritidis* in natural or artificial kombu medium (pH 5.4).

接種菌量は $12 \sim 18 \times 10^8/\text{ml}$ であったが、天然および合成昆布エキスとも3時間目から生菌数の減少が始まり、48時間目にはまったく検出されなかった。この原因が培地条件によるものではないかと考え、培地のエキス濃度、NaCl濃度およびpH値を検討したところ、この菌には3%のNaClが存在すれば発育し、エキス濃度、pH値の相違は特に重要でないことが判った。

しかし天明ら¹⁾が *V. parahaemolyticus* 30株を用い、12種の野菜エキスを接種した結果、キャベツ、

Fig. 5. Vicissitude of *Cl. perfringens* in natural or artificial kombu medium (pH 5.4).

Fig. 6. Vicissitude of *Cl. botulinum* in natural or artificial kombu medium (pH 5.4).

レタス、キュウリのエキス中では食塩無添加群でも、供試菌株のそれぞれ 53, 96 および 30% が増殖したことを報告している。この結果によれば、食品によつては必ずしも NaCl がなくてもこの菌は発育することが知られる。しかしこの実験条件下では、昆布エキス中にこの菌の発育に足る NaCl 量がないことが知られた。

(2) *St. aureus* pH 5.4 のエキス中における消長を Fig. 3 に示した。昆布エキス中では菌量 $36 \times 10^3/\text{ml}$ を接種後 6 時間目より次第に増殖し始め、48 時間目まで増殖の傾向が認められた。一方合成エキスにおいては、前者におけるより緩慢な増殖の傾向を確認した。

両エキスの pH 値を 7.2 に調整して同様の実験を行なつた。その結果、この細菌は微酸性でも中性でもその発育に変わりはない。この場合も合成培地の方が天然のものより発育の程度が低かつた。がしかし、両者の差は顕著でない。この菌は Fig. 3 に示されたような発育をするので、時には食中毒に結びつく危険性も考えられる。

(3) *S. enteritidis* この菌を pH 5.4 の昆布および合成エキスに $32 \sim 175 \times 10^5/\text{ml}$ 接種して Fig. 4 のような結果をえた。この菌は、これらの培地中で比較的早く発育し、6~12 時間目でかなり発育が見られるが、48 時間目頃から増殖率が低下した。両エキスの pH 値を 7.2 に調整して行なつた実験結果は調整しないものと同じであつた。

この菌は *St. aureus* と同様通性嫌気性食中毒菌の代表的なものであり、昆布エキスには天然あるいは合成培地ともによく発育する。昆布エキスの食品衛生上着目せねばならない菌である。

(4) *Cl. perfringens* Fig. 5 は pH 5.4 のエキス中に菌数 $155 \sim 233 \times 10^2/\text{ml}$ を接種した場合の *Cl. perfringens* の消長である。天然あるいは合成エキスとも各 3 回消長を調べたが、どの場合も 6 時間まで菌は検出されるが 12 時間目には検出できなかった。pH 7.2 の場合も前者とまったく同様である。

(5) *Cl. botulinum* 菌数 $10^3 \sim 10^6/\text{ml}$ を pH 5.4 の培地に接種後の発育状況を Fig. 6 に示した。接種菌数の多少にかかわらず、接種後 6 時間目から生菌数の減少が始まり、12~24 時間では減少傾向は著

しくなるが、48 時間目でもまだ検出できた。pH 値を 7.2 に修正した結果は修正前と同様であった。天然エキスおよび合成エキス、pH による違いはあまりみられない。

本菌あるいは *Cl. perfringens* のような偏性嫌気性菌の発育には、嫌気度ならびに発育因子としての還元物質の存在など嫌気的条件が特に必要とされる。今回の実験は偏性嫌気性菌もそれ以外の菌もまったく同一条件で行なつた。これが後 2 種の菌の発育しえなかつた原因であるか否かを確認するために、次の実験を行なつた。

液状チオグリコール酸塩培地の組成⁸⁾に準拠し、天然および合成昆布エキス培地に、0.05% のチオグリコール酸ナトリウム、0.5% のブドウ糖、0.08% の粉末寒天を加え、滅菌後の pH が 6.8 前後になるように 10% NaOH で修正した後、酸化還元電位指示薬として 0.1% レサズリン水溶液を培地 1 l 当り 1 ml 添加し、18×180 mm の中試験管に 15 ml ずつ分注、121°C、10 分間高圧滅菌した。これに上記 2 種偏性嫌気性菌をそれぞれ接種し、その発育を検討した。

この結果においても先の結果と同様両菌種の発育は認められなかつた。それゆえ天然および合成昆布エキス中には、これら 2 種偏性嫌気性菌に対する生長因子が欠けているものと推察された。

以上の結果は各菌種につき 1 株のみから得られたものである。したがってそれぞれの菌に普遍的な結果とはいいがたい。上記結論はあくまでも 1 株を普遍的なものとなして述べた。

要 約

1. 昆布付着菌は 15°C、31°C にかかわらず、生理食塩水と蒸留水のそれぞれに少量の昆布を入れれば、充分発育し得る。同一培養時間における増殖率を比較すると 37°C の方が高い。

2. 供試食中毒菌のうち *St. aureus*, *S. enteritidis* は、37°C において pH 5.4 および 7.2 の天然ならびに合成昆布エキス中で良く発育する。天然培地における *St. aureus* の発育は合成培地にまさる。*V. parahaemolyticus* はこれら培地に 3% の NaCl を添加しなければ増殖しない。*Cl. perfringens* および *Cl. botulinum* はこれらの培地には本実験条件下ではまったく発育しない。さらにこの培地に還元性物質を加えても発育しない。

文 献

- 1) 天明黎子・柳沢文徳・山口三重・田中香磨・広瀬周二：公衆衛生，**25**，340～346 (1961)。
- 2) 加藤 博：日細誌，**20**，541～544 (1965)。
- 3) 藤原喜久夫：食衛誌，**9**，81～90 (1968)。
- 4) 平川俊昭：食品衛生研究，**19**，82～86 (1969)。
- 5) 鈴木弘一：同誌，**19**，67～72 (1969)。
- 6) 中津川修二・浅川 豊：静岡衛研年報，**15**，51～69 (1969)。
- 7) 大石圭一・奥村彩子：函館大谷女子短大紀要，第 2 号，1～52 (1966)。
- 8) 伝染病研究所学友会編：細菌学実習提要，478 pp.，丸善，東京 (1958)。