カキの細菌フローラ

奥積昌世・中泉 洋・小池宏幸

(1979 年 5 月 12 日受理)

Bacterial Flora of Culture-Oysters (Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*)

Masayo OKUZUMI*, Hiroshi NAKAIZUMI*, and Hiroyuki KOIKE*

The present study was undertaken to analyse the bacterial flora of culture-oysters and of the silt accumulating on their shells. All the oysters were taken from two different areas of Hiroshima Bay during July and November, 1973, and the following January.

Enumeration and isolation of bacteria were conducted with a smear plate method using 50 percent seawater agar medium. Identification was based chiefly on the scheme of SHEWAN *et al.*

The generic composition of bacterial flora of the oysters differed from that of the marine water; that is, a very large portion of the isolates from the oysters consisted of genus *Vibrio* with no seasonal variation observed, while in the marine water pseudomonads were predominant. The ratio of psychrophilic vibrios to mesophilic ones, all isolated from the oyster samples, varied with the three seasons.

The bacterial flora of the silt was also composed mainly of vibrios, which were usually the same kind as those of the oysters.

The generic composition of the flora of commercial shucked oysters collected from some department stores in Tokyo in December, 1974, and the following January, was very similar to that of the culture-oysters.

カキは内湾で養殖されるので流入河川による汚染を受けやすく、また鮮度保持においては他の生鮮食品に比べてやや安易に流れ、とかく軽視され易い食品である。しかしそれでも生カキは美味でしかもバランスのとれたタンパク食品であるが故に、わが国のみならず欧米諸国においても内臓ぐるみで生食する習慣がある。

さて生カキを摂食した場合、われわれは内臓に存在する多数の生菌を飲み込むことになるが、それらの細菌の種類や性状などについては余り知られていない。カキに関する細菌学的研究は、人畜由来の腸内細菌による汚染およびその除去に関するものが多く、一方一般細菌に関するものは COLWELL および LISTON¹⁾, MURCHELANO^{2,3)}の研究があるだけで、その数は極めて少ない。また上記 COLWELL らや MURCHELANO らの研究は地まき式養殖のカキについて行なつたもののようで、日本の垂下式養殖のカキについて検討したものはほとんどないようである。

著者らは広島湾のカキおよびカキ殻に沈積した泥状物について夏、秋、冬の各季節における細菌フローラを検討し、また市販カキについても調べたので併せて報告する。

実験方法

試料 1973 年 7 月、同年 11 月、翌年 1 月の 3 回にわたり、広島湾倉橋島付近の清浄養殖域ならびに同湾似島付近の普通養殖域で採集したカキ、カキ殻に付着した泥状物、および養殖場の海水を試料とした。まず養殖筏付近の表層水を滅菌試料瓶で採水し、つぎに筏のカキを吊り上げて殻の付着泥状物（以後泥と略記）を滅菌広口瓶に採取し、ついで残りの泥を海水で十分に洗い落としてからカキを殻付きのままビニル袋に収め、上記の海水および泥試料と共にアイスボックスに収納して研究室へ運搬した。採水時の水温は Table 1 に示した通りである。また市販のむき身カキ（以後市販カキと略記する。なお養殖場のカキは単にカキと記す）は 1974 年 12 月と翌年 1 月に都内百貨店で購入したものである。市販カキの供試年月日、生食用または加工用の区別は Table 2 に示した通りである。

生菌数測定用培地 上記各試料の生菌数測定には堀江⁴⁾の海水寒天培地（但し寒天は 30 g）を用いて行なつた。またとくにカキと市販カキについては「生食用カキ」の成分規格に関する公定法に準じて標準寒天培地（但し

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo 108).

Fig. 1. Location of the sampling station.

寒天は 30 g) も用いた。

人工海水 堀江⁴⁾が記載した人工海水を使用した。

生菌数の測定 カキの生菌数: むき身 200 g に希釈水 (50% 人工海水) 200 ml を加え、ホモジナイザーで 2 分間細砕し、そのホモジネートの 10 倍段階希釈液 0.1 ml を前記 2 種類の培地表面にコンラージ棒で塗抹し、海水寒天は 20°C、標準寒天は 35°C で培養して測定した。泥および海水の生菌数: 泥は 10 g、海水は 10 ml を秤取し、それぞれに 90 ml の希釈水を加えてサーモミキサーで 2 分間攪拌し、それらの 10 倍段階希釈液 0.1 ml をそれぞれ海水寒天に塗抹し、20°C で測定した。市販カキの生菌数: むき身 50 g に希釈水 200 ml を加え、以下上記カキの場合と同様に行なつた。

菌株の分離 海水寒天に発生した集落の中から無作為に 18—20 個を釣菌し、同培地で再分離を行なつた。カキから 116 株、泥 119 株、海水 118 株、市販カキ 60 株、計 413 株を分離し、実験に供した。

種々温度における発育試験 75% 海水ブイヨン (ポ

リペプトン 10 g、肉エキス 5 g、人工海水 750 ml、蒸留水 250 ml、pH 7.0) に、分離菌の 20°C、24 時間培養を接種し、5, 20, 25, 30, 35, 42°C の各温度で培養し、5°C では 7 日間、20 および 25°C では 3 日間、その他では 2 日間、発育の有無を観察した。

好塩性試験 0.5% および 3% 食塩水のそれぞれにポリペプトン 5% と肉エキス 3% を加えた 2 種類の培地 (pH はいずれも 7.0) を用い、7 月試料からの分離菌は 25°C で、11 月および 1 月試料ならびに市販カキからの分離菌は 20°C で培養し、発育の程度を 3 日間観察した。

形態学的、生化学的性状および同定法 性状試験は特記した場合を除いて、好塩性菌株については培地成分を 75% 人工海水に溶解した試験培地を用い、また非好塩性菌株については 0.5% 食塩水に溶解した培地を用い、pH 7.0—7.2 で行なつた。培養は上記好塩性試験の場合と同様の温度で行なつた。

運動性は SIM 培地 (栄研) で行ない、それが不明確な場合には懸滴標本検査を行なつた。チトクロームオキシダーゼ試験は KOVACS⁵⁾ の方法によつた。グルコースの分解試験は、非始塩性菌株については HUGH and LEIFSON⁶⁾ の培地を用い、好塩性菌株については LEIFSON⁷⁾ の MOF 培地を用い、それぞれ HUGH and LEIFSON⁶⁾ の方法で行なつた。カタラーゼ産生、硝酸塩還元各試験は Manual of Microbiological Methods⁸⁾ 記載の方法によつて試験した。硫化水素、インドールの各産生試験は SIM (栄研) を用いて行なつた。非水溶性色素産生、カゼイン水解の各試験は 2% 食塩加ミルク寒天平板で行なつた。ペニシリン感受性試験は CORLETT ら⁹⁾ が採用した培地を用いて行なつた。7 月試料から分離した vibrio についてはさらに下記の性状試験を行なつた。すなわち、VP 試験は池村¹⁰⁾ の方法により、でん粉水解、ゼラチン液化の各試験は Manual of Microbiological Methods⁸⁾ 記載の方法によつた。アルギン酸分解は木村¹¹⁾、発光性は HIDAKA¹²⁾ の方法

Table 1. Bacterial counts of culture-oysters and of silt accumulating on the shells

Date of sampling	Jul. 4, '73		Nov. 28, '73		Jan. 30, '74	
Station	Kurashiji-jima	Nino-shima	Kurashiji-jima	Nino-shima	Kurashiji-jima	Nino-shima
Temperature of marine water (°C)	21.0	23.9	15.9	15.4	9.5	9.7
Oyster (/g)	1.6×10 ⁶ (1.9×10 ⁴)	2.4×10 ⁶ (1.2×10 ⁴)	3.0×10 ⁵ (1.9×10 ⁵)	1.7×10 ⁵ (9.0×10 ²)	3.7×10 ⁵ (1.2×10 ³)	8.7×10 ⁵ (1.2×10 ³)
Silt (/g)	6.4×10 ⁷	1.2×10 ⁸	1.4×10 ⁸	2.5×10 ⁸	1.5×10 ⁸	5.1×10 ⁸
Marine water (/ml)	1.4×10 ⁴	4.0×10 ⁵	4.2×10 ²	1.1×10 ⁴	2.6×10 ³	4.8×10 ⁴

The bacterial counts were obtained by 20°C incubation, while those in parenthesis were by 35°C.

Table 2. Bacterial counts of commercial shucked oysters

Sample			Bacterial counts (/g)
No.	Date	For	
1	Jan. 20, '75	Eating raw	2.9×10^8 (1.0×10^4)
2	Dec. 2, '74	Eating raw	1.4×10^8 (2.2×10^5)
3	Jan. 20, '75	Eating raw	2.3×10^8 (3.6×10^5)
4	Dec. 2, '74	Cooking	2.9×10^8 (4.7×10^4)
5	Dec. 2, '74	Cooking	1.5×10^8 (1.1×10^4)
6	Jan. 20, '75	Cooking	2.8×10^8 (2.3×10^4)

The bacterial counts were obtained by 20°C incubation, while those in parenthesis were by 35°C.

Table 3. Generic distribution of the organisms isolated from the samples

Sample			No. of isolate	<i>Vibrio</i>	<i>Pseudomonas</i> III/IV-H	<i>Pseudomonas</i> I/II	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	Not determined
Date	Station*									
Oyster	Jul. 4	K	20	20	0	0	0	0	0	0
		N	19	17	2	0	0	0	0	0
	Nov. 28	K	20	13	7	0	0	0	0	0
		N	20	20	0	0	0	0	0	0
	Jan. 30	K	20	19	1	0	0	0	0	0
		N	17	17	0	0	0	0	0	0
Total			116	106	10	0	0	0	0	0
Silt	Jul. 4	K	19	15	2	0	0	0	0	2
		N	20	15	4	0	0	0	0	1
	Nov. 28	K	20	18	1	0	0	1	0	0
		N	20	18	2	0	0	0	0	0
	Jan. 30	K	20	19	1	0	0	0	0	0
		N	20	16	4	0	0	0	0	0
Total			119	101	14	0	0	1	0	3
Marine water	Jul. 4	K	19	11	4	0	0	3	0	1
		N	19	3	14	1	0	0	0	1
	Nov. 28	K	20	11	9	0	0	0	0	0
		N	20	6	11	1	0	0	0	2
	Jan. 30	K	20	7	6	6	0	0	1	0
		N	20	3	16	1	0	0	0	0
Total			118	41	60	9	0	3	1	4
Commercial shucked oyster	1		10	10	0	0	0	0	0	0
	2		10	8	0	0	1	0	1	0
	3		10	8	1	0	0	0	0	1
	4		10	9	1	0	0	0	0	0
	5		10	6	3	0	0	0	1	0
	6		10	9	0	0	1	0	0	0
Total			60	50	5	0	2	0	2	1

* Station K: Kurahashi-jima, Station N: Nino-shima.

Table 4. Grouping of the vibrios isolated from the samples according to the range of growth temperature

Date	Station*	Growth at	Group							Total
			A	B	C	D	E	F	G	
		5°C	—	—	—	+	+	+	+	
		20°C	+	+	+	+	+	+	+	
		25°C	+	+	+	—	+	+	+	
		30°C	+	+	—	—	—	+	+	
		35°C	+	—	—	—	—	—	+	
		42°C	—, ±	—	—	—	—	—	—	
Jul. 4	K	Oyster	9	0	0	0	0	2	9	20
		Silt	10	0	0	0	0	5	0	15
		Marine water	3	3	0	0	0	2	3	11
	N	Oyster	12	0	0	0	0	1	4	17
		Silt	15	0	0	0	0	0	0	15
		Marine water	3	0	0	0	0	0	0	3
		Total	52	3	0	0	0	10	16	81
Nov. 28	K	Oyster	4	0	1	1	0	5	2	13
		Silt	3	4	1	2	4	3	1	18
		Marine water	0	4	1	1	2	3	0	11
	N	Oyster	1	0	0	11	3	5	0	20
		Silt	2	5	2	0	2	7	0	18
		Marine water	1	0	0	0	2	2	1	6
		Total	11	13	5	15	13	25	4	86
Jan. 30	K	Oyster	0	0	0	0	16	3	0	19
		Silt	0	0	0	0	19	0	0	19
		Marine water	0	1	1	0	4	1	0	7
	N	Oyster	0	0	0	0	17	0	0	17
		Silt	0	0	0	0	16	0	0	16
		Marine water	0	0	0	0	3	0	0	3
		Total	0	1	1	0	75	4	0	81
Commercial shucked oyster		1	0	0	0	0	10	0	0	10
		2	0	3	1	0	3	1	0	8
		3	0	0	0	0	7	0	1	8
		4	0	0	0	0	8	1	0	9
		5	0	0	2	0	4	0	0	6
		6	0	0	0	0	9	0	0	9
		Total	0	3	3	0	41	2	1	50

* Station K: Kurahashi-jima, Station N: Nino-shima.

で試験した。炭水化物の分解は上記グルコース分解の試験法のうち好気的条件下について試験した。

Pseudomonas, *Vibrio*, *Flavobacterium-Cytophaga* については SHEWAN ら¹³⁾ および堀江ら⁴⁾, *Moraxella* および *Acinetobacter* については BAUMANN ら^{14,15)} の記載に従って同定した。

結果および考察

生菌数 カキ, 泥および海水の生菌数を Table 1 に, 市販カキの生菌数を Table 2 に示した。

海水寒天で測定したカキの生菌数は, 7 月の試料では 200 万前後であったが, 11 月では 20 万前後に減少し,

1 月では 11 月より若干増加した。一方市販カキではいずれも 100 万~300 万であった。

泥の生菌数は, 7 月が $10^7 \sim 10^8$, 11 月と 1 月がいずれも 10^8 であった。

細菌フローラ カキ, 泥, 海水および市販カキから分離した計 413 株について genus level まで同定し, その結果を Table 3 に示した。

カキでは分離菌 116 株のうち, *Vibrio* の占める割合は 91.4%, *Pseudomonas* III/IV-H は 8.6% で, いずれの季節においても *Vivrio* が圧倒的に多く, 海水フローラと明らかに異なることがわかった。

泥では *Vibrio* 84.9%, *Pseudomonas* III/IV-H 11.8

Table 5. Further grouping of the vibrios isolated from the July's samples, basing upon the differences in physiological characteristics

Biochemical test		Group										
		A					B	F		G		
		I	II	III	IV	V		I	II	I	II	III
Indol		+	*	+	+	+	-	*	+	-	+	+
Hydrogen sulfide		d	***	d	-	-	-	-	-	-	-	-
hydrolysis of casein		+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Liquefaction of gelatin		+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Acid from	arabinose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	xylose	+	-	+	+	+	+	+	+	d	+	+
	lactose	-	+	+	+	-	-	-	+	d	+	-
	sucrose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	raffinose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	sorbitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Decomposition of chitin		+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Hydrolysis of alginate		d	d	+	-	-	-	+	+	+	+	-
hydrolysis of starch		+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Catalase		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
No. of the vibrios		36	13	11	6	1	3	5	5	11	2	7
Kurahashi-jima	Oyster	7	2	0	0	0	0	2	0	9	0	0
	Silt	8	0	1	0	1	0	1	4	0	0	0
	Marine water	1	0	2	0	0	3	1	1	2	0	1
Nino-shima	Oyster	5	4	3	0	0	0	1	0	0	0	4
	Silt	9	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	Marine water	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0

* +: more than 90% strains have this character.

** -: less than 10% of strains positive for this character

*** d: 11~89% positive

Biochemical characteristics with which all the vibrios shared: ammonia from peptone +, nitrate reduction +, luminescence -, acid from galactose +

%, その他 3.3% で、カキの場合と同様に *Vibrio* が多数を占めた。

市販カキでは *Vibrio* 83.4%, *Pseudomonas* III/IV-H 8.3%, その他 8.3% であった。

上記各試料から分離した vibrio について、発育温度域の差異により群別を試みたところ、Table 4 に示すごとく 7 群に分けることができた。すなわち A~C は 5°C で発育不能の菌群 D~G は発育可能の菌群である。

7 月のカキでは、A, F, G 各群が検出され、低温菌の占める割合は 50% 以下であったが、11 月になると A 群は顕著に減少し、菌群組成は多様化した。しかし 1 月になると組成は著しく単純化し、E 群が大多数を占めるようになった。このように養殖中のカキに存在する主要菌は genus *Vibrio* に属するが、それら vibrio の種類は季節の推移と共に交代するようであった。

市販カキはすでに述べたように 12 月と 1 月に購入し

たものであるが、それらの vibrio の大部分は E 群に属した。

泥の vibrio では、7 月から A, F の 2 群、11 月から全群、1 月から E 群のみが検出され、若干の例外はあるが大体においてカキの菌群組成に似ていることがわかった。

7 月試料の vibrio だけについてさらに生化学的性状を検討したところ、Table 5 に示すごとく、A 群を 5 型、B 群を 1 型、F 群を 2 型、G 群を 3 型に細分することができた。

カキでは A-I, A-II, A-III, F-I, G-I, G-III の 6 型から成り、カゼイン、ゼラチン、キチン、アルギン酸などを加水分解するものが多かった。泥では大部分が A-I, A-II, A-III の 3 型に属し、カキに存在する菌型とはほぼ同じであった。

COLWELL ら¹¹⁾によると pacific oyster の主要菌群は

Pseudomonas-Vivrio (52.0%), *Flavobacterium* (17.1%), *Micrococcus* (10.5%), また MURCHELANO ら²⁾ の eastern oyster では *Pseudomonas* (31.2%), *Flavobacterium-Cytophaga* (26.0), *Vibrio* (25.0%), *Achromobacter-Alcaligenes* (17.7%) など、筆者らのみた細菌フローラに比べて *vibrio* の占める割合はかなり低いようである。この差異の原因についてはいろいろ考えられ、今後の検討課題になるのだが、一つに垂下式養殖と地まき式養殖の差異をあげることができるかもしれない。

鈴木¹⁰⁾および小沼ら¹⁷⁾の調査によると、築地市場に入荷したむき身カキの中には、*Lactobacillus* や *Streptococcus* などの陸棲菌が多数検出されたものがあつたが、河端¹⁸⁾の指摘にもあるように、陸棲菌の汚染や増殖は採取後の蓄養、むき身、洗浄、輸送などの過程においてとくに起るようである。

謝 辞

本研究の遂行に当たり御助言をいただいた東京水産大学堀江進教授ならびに小笠原義光教授に対し、また貴重な資料の提供など種々の御援助をいただいた広島市水産課の森田友文氏に対し厚く御礼を申し上げる。

文 献

- 1) R.R. COLWELL and J. LISTON: *Appl. Microbiol.*, **8**, 104-109 (1960).
- 2) R.A. MURCHELANO and C. BROWN: *J. Invertebrate Pathol.*, **11**, 519-520 (1968).
- 3) R.A. MURCHELANO and J.L. BISHOP: *J. Invertebrate Pathol.*, **14**, 321-327 (1969).
- 4) 堀江 進・奥積昌世・木村正幸・赤堀正光・川前政幸: 食衛誌, **13**, 410-417 (1972).
- 5) N. KOVACS: *Nature*, **178**, 703 (1956).
- 6) R. HUGH and E. LEIFSON: *J. Bacteriol.*, **66**, 24-26 (1953).
- 7) E. LEIFSON: *J. Bacteriol.*, **85**, 1183-1184 (1963).
- 8) SOCIETY of AMERICAN BACTERIOLOGIST: *Manual of Microbiological Methods*, McGraw Hill Book Co., Inc., New York, 1957, pp. 140-168.
- 9) D.A. CORLETT, J.S. LEE, and R.O. SINNHUBER: *Appl. Microbiol.*, **13**, 818-822 (1965).
- 10) 池村謙吾: モダンメディア, **12**, 129-135 (1966).
- 11) 木村喬久: 北海道大学水産学部研究彙報, **12**, 41-47 (1961).
- 12) T. HIDAKA: *Memo. Facult. Fisheries, Kagoshima Univ.*, **14**, 127-180 (1965).
- 13) J.M. SHEWAN, G. HOBBS, and W. HODGKISS: *J. appl. Bact.*, **23**, 379-390 (1960).
- 14) P. BAUMANN, M. DOUDOROFF, and R.Y. STANIER: *J. Bacteriol.*, **95**, 58-73 (1968).
- 15) P. BAUMANN, M. DOUDOROFF, and R.Y. STANIER: *J. Bacteriol.*, **95**, 1520-1541 (1968).
- 16) 鈴木 昭: モダンメディア, **23**, 244-266 (1977).
- 17) 小沼博隆・鈴木 昭・河西 勉・高山澄江・水島久美子・高久 久・山田 満: 食衛誌, **16**, 422-423 (1975).
- 18) 河端 俊治: モダンメディア, **15**, 129-142 (1969).