

鮮魚の35°C培養公定法による生菌数と 20°C細菌培養法による生菌数の比較

福田 翼[†], 古下 学, 芝 恒男

Viable Counts of Bacteria Determined on Food Fishes by the Standard-Agar-Plate Method Incubated at 35°C and Nutrient-Agar-Plate Method Incubated at 20°C

Tsubasa Fukuda[†], Manabu Furushita, and Tsuneo Shiba

Abstract : Viable counts of bacteria were determined on food fishes with two different culture methods; 35°C incubation of standard-agar-plate and 20°C incubation of nutrient-agar-plate after inoculation of aseptically diluted food fish samples. Eighty five specimens of raw fishes, sashimi, and defrosted fishes were collected from retailers in Shimonoseki city. Most of the counts determined with the nutrient-agar-plate method were higher than those of the standard-agar-plate method (the official guideline method of hygienic quality). In a case of the largest difference, the nutrient-agar-plate count was two hundred folds higher than that of the standard-agar-plate count. Especially, the viable cell counts on defrosted fishes showed a significant difference between the nutrient-agar-plate counts and the standard-agar-plate counts.

Key words : Fish-spoilage, Sea food, Viable count, Psychrotrophic bacteria

緒 言

海産の鮮魚を汚染する細菌には、生息環境由来の好塩性の低温細菌や、沿岸域に流入する陸棲の非好塩性細菌、さらには製造・流通過程で汚染する手指や器具由来の細菌群がある。これら汚染細菌群の割合は海域の陸からの距離や、取扱時の衛生度、冷蔵期間、さらには海水由来の細菌でも海域の違いや季節の違いにより変化することが予想される。さらに凍結魚では耐凍性の高い細菌が優占になるかもしれない。また厳密な低温管理がなされれば低温細菌が多くなると推測される。したがって鮮魚の細菌汚染レベルを調べるには、これらの諸条件を考慮して細菌培養法を選択すべきかもしれない。

食品衛生法に定める一般生菌数は、食品の安全性、鮮度、品温管理、衛生的な取り扱いの良否の判断材料であ

り、食品の細菌汚染の程度を示す最も代表的な指標とされている。したがって、測定された一般生菌数は、実際に食品中に生存している細菌数を出来るだけ正確に反映していなければならない。しかしながら食品衛生法による検査方法（公定法）¹⁾は、NaClを含んでいない標準寒天培地を使用し、好氣的条件下で35±1.0°Cで48±3時間培養を行っている。したがって公定法で調べられる一般生菌数は『35°C条件下で発育可能な中温細菌数』と定義され、食品の製造・流通過程由来の細菌汚染を反映している¹⁾。すなわち、鮮魚などに存在する海水環境由来の好塩性の低温細菌などは計測され難い。実際、藤井²⁾は、東京の小売店で購入した水産食品では、35°C培養法よりも20°C培養法の方の細菌計数値が高く、標準寒天培地よりもNaClを含有している普通寒天培地の方が高い数値を示す事を報告している。このことは水産食品の腐敗が20°C以下でよく増殖する

2011年11月21日受付. Received November 21, 2011.

水産大学校食品科学科 (Department of Food Science and Technology National Fisheries University)

〒759-6595 山口県下関市永田本町2-7-1 (2-7-1 Nagata-Honmachi, Shimonoseki 759-6595, Japan)

[†]別刷り請求先 (corresponding author) : tsubasa@fish-u.ac.jp

とされる好塩性の低温細菌 (Psychrotrophic Bacteria)³⁾の働きが進む事を示唆しており, 公定法を用いるかぎり, 細菌数が魚肉の腐敗度を正確に示すのは難しいことを意味している。しかしながら, 多量かつ同一サンプルの中温細菌数および低温細菌数を比較した報告は少なく, 水産食品においても公定法が適用されているのが現状である。

そこで本研究では, 0.5%濃度のNaClを含む普通寒天培地を利用した20℃培養法と35℃培養の公定法を用いて, 山口県下関市内で販売されている水産食品の細菌汚染を調査した。

材料と方法

調査対象

平成23年1月から平成23年11月までの期間に下関市内で購入した鮮魚(ラウンド)からの切り身33検体, 市販の刺身28検体, および市販の解凍品24検体について細菌検査を行った (Table 1)。ラウンドをおろして切り身を取り出す場合には, 実際の流通現場や家庭環境を再現するため, 使用器具は家庭用洗剤 (食器洗いクリーン, 株式会社コープクリーン) および水道水を用いて洗浄した。解凍品は冷蔵

Table 1. Food fish samples

DATE	Fish species	Form	Condition	Production area	Store
2011-07-12	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	-	A
2011-07-12	Gnomefish	fillet prepared at lab.	raw	-	A
2011-07-21	Chicken grunt	fillet prepared at lab.	raw	Nagasaki	B
2011-07-22	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Fukuoka	B
2011-07-27	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Fukuoka	B
2011-07-27	Chicken grunt	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-07-29	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Fukuoka	B
2011-08-09	Thread-sail filefish	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	A
2011-08-10	Japanese seabass	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-08-19	Golden threadfin bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-08-19	Tilefish	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-08-24	Golden threadfin bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-08-24	Righteye flounder	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-09-02	Golden threadfin bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-09-13	Golden threadfin bream	fillet prepared at lab.	raw	Nagasaki	B
2011-09-13	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Fukuoka	B
2011-09-13	Gnomefish	fillet prepared at lab.	raw	Shimane	B
2011-09-13	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-09-22	Righteye flounder	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-09-22	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-09-26	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-09-30	Righteye flounder	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-09-30	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-10-03	False kelpfish	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-10-03	Righteye flounder	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-10-24	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-10-24	Righteye flounder	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-10-14	Golden threadfin bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-10-28	Sea bream	fillet prepared at lab.	raw	Fukuoka	B
2011-10-31	Golden threadfin bream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-10-31	White croaker	fillet prepared at lab.	raw	Nagasaki	B
2011-11-07	Golden threadfin bream	fillet prepared at lab.	raw	Shimane	B
2011-11-07	Yellowback seabream	fillet prepared at lab.	raw	Yamaguchi	B
2011-01-04	Sea bream	sashimi	raw	Kumamoto (farm)	C
2011-01-05	Sea bream	sashimi	raw	Kumamoto (farm)	C

“Fillet prepared at lab.” was prepared from round bought at retailers.

Table 1. Food fish samples (continued)

DATE	Fish species	Form	Condition	Production area	Store
2011-01-06	Olive flounder	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-01-07	Olive flounder	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-01-24	Olive flounder	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-01-24	Righteye flounder	sashimi	raw	-	C
2011-02-01	Olive flounder	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-02-01	Sea bream	sashimi	raw	Kumamoto (farm)	C
2011-05-19	Sea bream	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-05-19	Sea bream	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-05-25	Sea bream	sashimi	raw	-	C
2011-05-25	Japanese seabass	sashimi	raw	-	C
2011-06-14	Sea bream	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-06-21	Sea bream	sashimi	raw	Kumamoto (farm)	C
2011-06-21	Olive flounder	sashimi	raw	Oita (farm)	C
2011-06-28	Sea bream	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-06-28	Olive flounder	sashimi	raw	Nagasaki (farm)	C
2011-06-28	Sillago	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-07-22	Yellowtail amberjack	sashimi	raw	Kagoshima (farm)	B
2011-07-25	Sea bream	sashimi	raw	Kumamoto (farm)	C
2011-07-26	Olive flounder	sashimi	raw	Oita (farm)	C
2011-07-26	Sillago	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-08-01	Sillago	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-08-09	Gnomefish	sashimi	raw	Nagasaki	B
2011-08-11	Sillago	sashimi	raw	Yamaguchi	C
2011-10-17	Olive flounder	sashimi	raw	Nagasaki (farm)	C
2011-10-17	Sea bream	sashimi	raw	Kumamoto (farm)	C
2011-10-18	Olive flounder	sashimi	raw	Nagasaki (farm)	C
2011-01-04	Cod	fillet	defrosted	USA	C
2011-01-04	Cod	fillet	defrosted	USA	C
2011-05-19	Salmon	fillet	defrosted	Norway	C
2011-05-25	Salmon	fillet	defrosted	-	C
2011-06-01	Salmon	fillet	defrosted	Chile (farm)	C
2011-06-01	Goby	fillet	defrosted	Russia	C
2011-06-07	Salmon	fillet	defrosted	Chile (farm)	C
2011-06-07	Shrimp	fillet	defrosted	Vit Nam (farm)	C
2011-06-15	Salmon	fillet	defrosted	Chile (farm)	C
2011-06-15	Righteye flounder	fillet	defrosted	USA	C
2011-06-22	Tuna	fillet	defrosted	Taiwan	C
2011-06-22	Goby	fillet	defrosted	Russia	C
2011-06-22	Japanese scallop	fillet	defrosted	Hokkaido	C
2011-06-22	Righteye flounder	fillet	defrosted	USA	C
2011-06-29	Salmon	fillet	defrosted	Chile (farm)	C
2011-06-29	Righteye flounder	fillet	defrosted	USA	C
2011-07-06	Salmon	fillet	defrosted	Chile (farm)	C
2011-07-19	Salmon	fillet	defrosted	Chile (farm)	C
2011-08-19	Salmon	fillet	defrosted	Norway	B
2011-08-25	Righteye flounder	fillet	defrosted	Portugal	C
2011-08-25	Goby	fillet	defrosted	Iceland	C
2011-08-25	Cod	fillet	defrosted	USA	B
2011-10-31	Goby	fillet	defrosted	Russia	B
2011-10-31	Cod	fillet	defrosted	USA	B

または室温解凍の検体を使用した。

細菌検査

試料液の調製

魚肉10 gと滅菌生理食塩水90 mLをろ紙付きストマック袋に入れて120秒間ストマック処理を行った後に、500 rpm・1分間の遠心処理を行った。得られた上澄液を試料原液とした。

公定法による生菌数測定¹⁾

試料原液を滅菌生理食塩水で適宜希釈し、原液ならびに希釈液の0.1 mlを標準寒天培地（日水製薬株式会社）に塗布し、35℃・48時間培養を行った。各希釈段階につき3枚のプレートのコロニー数の平均値から、細菌数（CFU/g）を求めた。なお公定法では混釈法が用いられるが、塗抹法と混釈法の差はCFUにして10%以下であることを事前に確認している。

普通寒天培地による生菌数測定（以下の記述では普通寒天培養法と表記）

試料原液を滅菌生理食塩水で適宜希釈し、公定法と同様に普通寒天培地に塗布した。これを20℃で10日間培養し、コロニー数の計数を行った。普通寒天培地には、蒸留水1,000 mLに肉エキス（ベクトン・ディッキンソン株式会社）5.0 g、ペプトン（ベクトン・ディッキンソン株式会社）10.0 g、塩化ナトリウム（和光純薬工業株式会社）5.0 g、寒天（和光純薬工業株式会社）15.0 gを添加し、pH7.0に調製したものをを使用した。

結果および考察

35℃培養法の公定法および20℃培養法の普通寒天培養法における生菌数測定結果をFig. 1に示す。実験室でラウンドから調製された切り身、市販の刺身、および解凍品の細菌数は、いずれの場合であってもそれぞれ $10^2 \sim 10^4$ CFU/g、 $10^2 \sim 10^4$ CFU/g、 $10^1 \sim 10^5$ CFU/gで、刺身および実験室で調製された切り身において細菌数が少なく、市販の冷凍品で高い結果となった。また切り身と刺身および解凍品のいずれの場合においても35℃培養の公定法よりも20℃培養の普通寒天培養法の方が高い傾向を示し、その傾向は85検体中74検体（87%）において観察された。さらに、11検体（14%）においては10倍以上の差が見られ、最大で約200倍の差が確認された。一方、公定法の方が高い数値を示したサンプルにおいては、最大差のものでも5倍程度で

あった。特筆すべきは解凍品であり、ラウンドから調製された切り身や刺身に比べ、解凍品では普通寒天培養法で測定した好塩性の低温細菌の割合がより大きくなる傾向がみられた。図に示した解凍品のいずれの試料も、食品衛生法の「 10^6 CFU/g以下とする生食用冷凍鮮魚介類の成分規格」⁴⁾に適合するが、生食用解凍サーモンを4℃条件下で4日間保存した場合には、公定法よりも20℃普通寒天培養法が約100倍以上の高い値を示すことも確認している（データ未発表）。したがって公定法による生菌数測定は、冷蔵された水産食品や解凍された水産食品の細菌汚染レベルを過小評価している場合のある事が明らかとなった。

魚介類において20℃培養法で計数される低温細菌数が多くなることは、緒言で述べた藤井以外にも他の論文で報告されている。すなわち里見ら⁵⁾は標準寒天培地を用いて生菌数を検討した結果、中温細菌数よりも低温細菌数の方が高い数値を示す事をズワイガニの事例で示している。Kayamaら⁶⁾は様々な条件で保存したエビの生菌数について報告しており、いずれの場合においても低温細菌数の方が高い数値であることを報告している。また、郷原ら⁷⁾は、市販冷凍イカおよびエビについて検討しており、同様の結果を報告している。ただこれらの研究は、塩分を含まない標準寒天培地を用いており、海水由来の好塩性低温細菌を計測出来ているのか不明である。

塩分を含んだ培地を用いた例としては里見ら⁵⁾の研究があり、約2%のNaClを含んだマリンアガーで、37℃培養条件よりも20℃培養条件で計数細菌数が増えることをズワイガニと冷凍甘エビの事例で報告している。また、標準寒天培地よりもマリンアガー培地の方が高い数値を示す事も明らかにしており、低温条件に加えて塩分濃度にも配慮した培養条件が必須であることを示している。

一方、市販の鮮魚について標準寒天培地を用いて細菌数を調べた場合に、20℃培養の低温細菌よりも35℃培養の中温細菌の方が高くなる事例も報告されている。すなわち新井ら⁸⁾によれば、水産物卸売市場の鮮魚においては、低温細菌数よりも中温細菌数の方が多い事例が数多くみられ、中温細菌数が低温細菌数よりも約10倍以上高い数値を示す事例もある。同様に、石田⁹⁾は、市販のサーモンの中温細菌数および低温細菌数を検討し、サーモンにおいては中温細菌数の方が高くなったことを明らかにしている。これらの傾向がNaClを含まない標準寒天培地を用いたためだと解釈することも可能だが、それよりも中温細菌数が低温細菌数よりも多くなる場合には、大腸菌汚染レベルが上昇

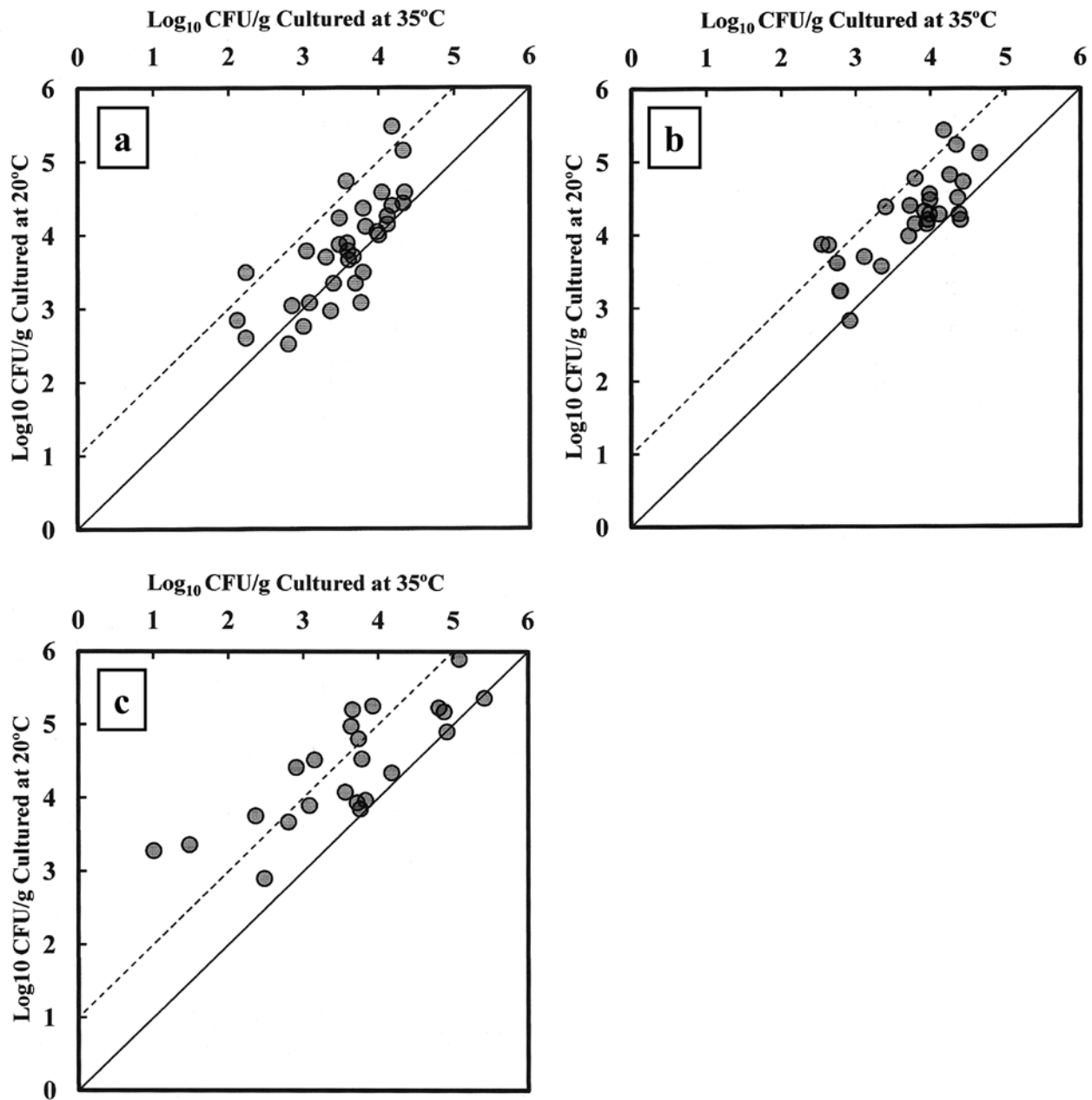


Fig. 1. Comparison of viable counts of bacteria determined with standard-agar-plate method (35°C Incubation) and Nutrient-Agar-Plate Method (20°C Incubation).
 a: Fillets prepared in our laboratory from Round, b: Sashimi bought at retailers, c: Defrosted fish

し、一般細菌数も 10^5 CFU/gを超えている場合が多いこと⁸⁾に注目すべきであろう。石田の場合には、中温細菌数が約 10^8 CFU/gにまで達している。

一般に細菌検査法での生菌数は、検査の直近におきた細菌汚染レベルと、保存中に増殖した細菌レベルを示している。取扱いが衛生的であれば直近の汚染の影響は比較的小さい。公定法で調べられる中温細菌は食品冷蔵中にはほとんど増えないので、中温細菌数が多い場合には検査直前の

細菌汚染が高レベルであったことを示している。すなわち大腸菌の検出においても示されているように、卸売市場では検査直前の細菌汚染の影響が大きいのであろう。一方20°Cで計数される細菌は4°Cでも増殖できる細菌が多い³⁾ので、20°C培養法は冷蔵期間中に増えた低温細菌を反映するが、卸売場の鮮魚の冷蔵保存期間は短い。したがって、非衛生的な取扱いが目立つ場所では公定法が有効であり、衛生的にとりあつかわれた水産食品においては、20°C培養

法が有効になると考えられる。またこの傾向は冷蔵された場合に顕著になるのであろう。実際、里見らの例でも、初期菌数が少ない水産物を3日間冷蔵した場合には、20℃培養法の計数値が35℃培養の計数値よりもはるかに大きくなっている。一方、筆者らが行った衛生的処理、すなわち殺菌処理した調理器具を使用してラウンドから切り身を取り出した場合でも35℃培養法で一定の細菌数が計数されるが、これらが処理中の汚染によるのか、あるいは35℃での増殖しうる低温細菌を示すのかは、菌を分離して調べてみなければわからない。また解凍直後の水産物において低温細菌の割合が顕著に大きくなる傾向がみられるが、これが低温細菌と中温細菌の耐凍性の差によるのかは、今後の課題である。筆者らが調べた切り身と刺身の一般細菌数は、普通寒天培養法、公定法、いずれの場合でも 10^5 CFU/g未満であったので、衛生的な処理が行われたものと判断され、そのような場合には35℃の公定法よりも、低温細菌用の20℃普通寒天培養法が優れていることを示していると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご尽力をいただきました中村基子氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 小久保彌太郎：汚染指標菌, 1. 細菌数. 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針 微生物編 2004. 社団法人日本食品衛生協会, 東京, 116-128 (2004)
- 2) 藤井建夫：水産食品の生菌数測定法-I 培地組成, 培養温度および平板法について, 東海水研報, 118, 71-79 (1989)
- 3) Morita Y R: Psychrophilic Bacteria. *Bacteriol Rev*, 39, 144-167 (1975)
- 4) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 微生物編 2004. 社団法人 日本食品衛生協会, 東京, 588-589 (2004)
- 5) 里見正隆, 及川 寛, 矢野 豊：微生物学的品質評価. 中添純一, 山中英明 (編), 水産物の品質・鮮度とその高度保持技術. 恒星社厚生閣, 東京, 67-81 (2004)
- 6) Kayama M, Marseno W D, Saito M, Kobayashi S, Tanno K, Watai M, Akutsu S, Suzuki H, Yamamoto T, Tominaga S: Studies on Keeping Quality and Freshness of the Marine Products. *J Fac Appl Biol Sci, Hiroshima Univ*, 27, 67-68 (1988)
- 7) 郷原秀一, 淡中純一, 春木良司, 野村泰史, 寺田厚, 内田和夫：市販冷凍食品に分布する微生物について. 日本獣医畜産大学研究報告, 35, 210-213 (1986)
- 8) 新井輝義, 池内容子, 岸本泰子, 石崎直人, 柴田幹良, 観 公子, 下井俊子, 牛山博文, 立田真弓, 白石典太, 甲斐明美, 矢野一好：卸売市場で流通する鮮魚, 魚介類加工品及び浸け水のヒスタミン生成菌汚染状況. 東京都健康安全研究センター研究年報, 58, 245-250 (2007)
- 9) 石田哲夫：魚肉に分布する低温細菌の種類とその性質. 山形県立米沢女子短期大学紀要, 40, 63-70 (2005)