

## 食品製造工程における微生物検出技術の開発に関する研究

富永達矢\*<sup>1</sup> 本多春樹\*<sup>2</sup> 関根正裕\*<sup>1</sup>

### Development of Simple Detection System for the Source of Saprophytic Pollution in Food Processes.

TOMINAGA Tatsuya\*<sup>1</sup>, HONDA Haruki\*<sup>2</sup>, SEKINE Masahiro\*<sup>1</sup>

抄録

加工食品から大腸菌群が検出された際、迅速に汚染源を除き衛生状態を復元するための汚染源推定システムの開発を試みた。大腸菌群の実験室株22株を用いて糖の種類・食塩濃度が異なる培地上で生育を調べた結果、3種の培地を用いて4グループに分類可能なことが示された。この方法で実際の食品工場で採取された大腸菌群の構成を調べた結果、環境条件によって構成比が異なることが示され、食品から検出された大腸菌群の構成と一致した場所を汚染源と推定できた。

キーワード：食品衛生，大腸菌群，培地セット，汚染源探索

#### 1 はじめに

一般的な食品の製造工程では常に細菌に汚染される危険があり、特に食中毒菌の汚染事故が起きた場合、製造業者は致命的な打撃を受ける。そのため、企業では食の安全・安心を確保する目的で、自然界に多数存在する大腸菌群を汚染状態の指標として衛生管理を行い、食品中に大腸菌群が検出されると、清掃強化などの対処により衛生状態の保全に努める<sup>1)</sup>。しかし、大腸菌群は食品工場内の各所に常在するため、汚染源が除去され食品中の大腸菌群が検出されなくなるまでに多大な労力と時間を費やす。原料経路で様々な細菌が持ち込まれる食品製造過程においては完全な無菌化は困難であり、初期汚染段階の指標となる大腸菌群による汚染の段階で迅速に衛生状態を復元する手段が必要になる。

大腸菌群を構成する多種類の菌株の生育至適条

件は必ずしも同一ではなく<sup>2),3)</sup>、環境条件によって構成相も変化すると予測されることから本研究では、食品中で検出された大腸菌群の構成相から迅速に細菌汚染経路や原因を推定する技術の開発を目指した。

#### 2 実験方法

##### 2.1 菌株・培地

本研究で用いた微生物株は以下の22株である。*Citrobacter freundii* IAM 12471, *C. freundii* NBRC 13545, *C. freundii* NBRC 13546, *C. freundii* NBRC 13539, *C. freundii* NBRC 16624, *Escherichia coli* IAM 12119, *Enterobacter aerogenes* IAM 12348, *E. aerogenes* NBRC 12010, *Enterobacter cloacae* IAM 12349, *E. cloacae* NBRC 3320, *E. cloacae* NBRC 12935, *E. cloacae* NBRC 12937, *E. cloacae* NBRC 13536, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* IAM 1063, *K. pneumoniae* IAM 12351, *K. pneumoniae* NBRC 3318, *K. pneumoniae* NBRC 3319, *K. pneumoniae* NBRC 3321, *K. pneumoniae* NBRC 3512,

\*<sup>1</sup> 北部研究所 生物工学部

\*<sup>2</sup> 電子情報技術部

表1 糖資化性試験

	cont.	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO
<i>C. freundii</i> IAM 12471	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	±
<i>E. coli</i> IAM 12119	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>E. aerogenes</i> IAM 12348	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>E. cloacae</i> IAM 12349	-	±	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	±
<i>K. pneumoniae</i> IAM 1063	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>K. pneumoniae</i> IAM 1235	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF
<i>C. freundii</i> IAM 12471	+	+	-	+	+	-	-	-	-	±	+	+	±	+	+	-	-	-
<i>E. coli</i> IAM 12119	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
<i>E. aerogenes</i> IAM 12348	+	+	-	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>E. cloacae</i> IAM 12349	+	+	-	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i> IAM 1063	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i> IAM 1235	+	+	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG				
<i>C. freundii</i> IAM 12471	±	-	-	±	±	-	-	-	+	-	-	+	+	+				
<i>E. coli</i> IAM 12119	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-				
<i>E. aerogenes</i> IAM 12348	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	±	±	±				
<i>E. cloacae</i> IAM 12349	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-				
<i>K. pneumoniae</i> IAM 1063	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	±	±				
<i>K. pneumoniae</i> IAM 1235	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	±	±				

+: 増殖, ±: 微増殖, -: 非増殖

*K. pneumoniae* NBRC 12059, *K. pneumoniae* NBRC 13277, *K. pneumoniae* NBRC 13541. 微生物株は XM-G 培地、BGLB 培地、パープルブロスベース (以下 PBB)1.5%に寒天を 2.5%加え、さらに D-ラクトース、D-アラビノース、D-アラビトール、D-キシロースなどの糖を 0.1~5.0%加えた培地にて、37℃、一晚培養した。

## 2.2 糖資化性試験・耐塩性試験

微生物株の糖資化性試験は、アピ 50CH プレート(日本ビオメリュー)を用いて行った。耐塩性試験は、BGLB 培地に 1-4%の NaCl を加えた培地に微生物株の前培養液を加え、37℃、24 時間培養し、24 時間後の濁度にて生育の有無を判断した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 培地条件による大腸菌群の生育特性

食品製造の環境中で頻りに検出される大腸菌群構成菌株である *C. freundii*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* の糖に対する資化性を表 1 に示した。グルコースやフルクトースなどに対しては全ての菌株で資化性を示し、また逆にエリスリトールやイヌリンに対しては全ての菌株で資化性を示さなかった。これに対し、D-アラビノース、D-アラビトール、D-キシロースに対する資化性は菌株間で異なった。

また、同じ菌株に対して、耐塩性の差異を調べた結果を表 2 に示した。2%の NaCl 存在下では、*C. freundii* 以外の全ての菌株が生育した。しかし、

表2 耐塩性試験

	NaCl			
	1%	2%	3%	4%
<i>C. freundii</i> IAM 12471	+	-	-	-
<i>E. coli</i> IAM 12119	+	+	-	-
<i>E. aerogenes</i> IAM 12348	+	+	+	-
<i>E. cloacae</i> IAM 12349	+	+	+	+
<i>K. pneumoniae</i> IAM 1063	+	±	±	-
<i>K. pneumoniae</i> IAM 12351	+	+	-	-

+: 増殖, ±: 微増殖, -: 非増殖

4%の NaCl 存在下では、*E. cloacae* 以外の全ての菌株が生育できなかった。3%の NaCl 存在下では、*E. cloacae* に加えて *E. aerogenes* も生育を示した。

以上の結果から、糖では D-アラビノース (DARA)、D-アラビトール(DARL)、D-キシロース (DXYL)の資化性の違いと耐塩性の違いを利用して大腸菌群の類別が可能ながことが示唆された。そこで、これらの糖と食塩の条件を変えた 4 種の PBB 平板培地を作成し、22 種の菌株を用いて増殖の有無を調べた。PBB に含まれるブロムクレゾールパープルによるコロニー周辺の変色から生育の有無を判断した。D-アラビノース培地が *C. freundii* の一部の菌株に対してのみ陽性であり、D-キシロース培地が *E. coli* と *E. cloacae* の一部に対してのみ陽性であった。一方、D-アラビトール培地では全ての *E. aerogenes* と *K. pneumoniae* の菌株に対して陽性であった。NaCl 培地では、*K. pneumoniae* の株間で陽性・陰性が分かれた。以上の結果から、D-アラビトールと食塩が大腸菌群の

表3 実験室株の選択培地上での生育

	DARADARL	NaCl	DXYL	
<i>C. freundii</i> IAM 12471	+	-	+	-
<i>C. freundii</i> NBRC 13545	+	-	+	-
<i>C. freundii</i> NBRC 13546	-	-	-	-
<i>C. freundii</i> NBRC 13539	+	-	-	-
<i>C. freundii</i> NBRC 16624	-	-	-	-
<i>E. coli</i> IAM 12119	-	-	+	+
<i>E. aerogenes</i> IAM 12348	-	+	-	-
<i>E. aerogenes</i> NBRC 12010	-	+	-	-
<i>E. cloacae</i> IAM 12349	-	-	+	+
<i>E. cloacae</i> NBRC 3320	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i> NBRC 12935	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i> NBRC 12937	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i> NBRC 13536	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> IAM 1063	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> IAM 12351	-	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i> NBRC 3318	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> NBRC 3319	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> NBRC 3321	-	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i> NBRC 3512	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> NBRC 12059	-	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i> NBRC 13277	-	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i> NBRC 13541	-	+	+	-

+ : 増殖, - : 非増殖

基礎培地の PBB に D-アラビノース、D-アラビトール、D-キシロースを加えた培地を DARA、DARL、DXYL とし、D-ラクトースに NaCl を 3% を加えた培地を NaCl とする。

類別に利用可能と考えられた。さらに、これらの因子による分類の作用機序は異なり、両者を組み合わせた条件も分類に利用できると考えられる。

### 3.2 食品工場内の大腸菌群構成及び汚染源の特定

実際に食品工場内の数カ所から大腸菌群を XM-G 培地を用いて採取し、D-アラビトール培地、食塩培地及び D-アラビトール/食塩培地の 3 種類を用いて培養を行った。各培地に生育した大腸菌群は表 4 の分類により I ~ IV グループまでの 4 種に分けられる。すなわち、DARL+NaCl 培地に生育するもの(I)、DARL 培地に生育するものから I グループに属するものを除いたもの(II)、NaCl 培地に生育するものから I グループに属するものを除いたもの(III)、及び XM-G 培地に生育するものから I・II・III グループに属するものを除いたもの(IV)となる(表 5)。工場・作業場床においては II グループのものが 100% を占めるのに対し、冷蔵

表4 大腸菌群のグループ化

	DARL 資化	耐塩性
I グループ	+	+
II グループ	+	-
III グループ	-	+
IV グループ	-	-

+ : 増殖, - : 非増殖

表5 各グループの選択培地上での生育

	培地上で生育するグループ
DARL 培地	I + II
NaCl 培地	I + III
DARL+NaCl 培地	I
XM-G 培地	I + II + III + IV

表6 工場内から分離された大腸菌群の構成

	グループ			
	I	II	III	IV
工場・作業場床	0	100	0	0
冷蔵庫床	0	0	0	100
排水溝上流	0	0	19	81
排水溝下流	0	0	16	84
製造機械表面	12	5	21	62

単位は%

庫床においては IV グループのものが 100% を占めていた。さらに製造機械表面においては I - IV グループ全てのものが検出されたが、そのうちの 60% は III グループに所属するものであった。

以上の結果から、工場内の異なる環境下において大腸菌群の構成相が異なっていることが分かり、今回設定した 3 種の培地の組み合わせで構成相の相違を示すことができた。また、排水溝の上流と下流のように類似した環境条件であれば、構成相も類似することも確認できた。

実際に食品中で検出された大腸菌群の大腸菌群の構成を表 7 に示した。加工食品 A の構成相は成形加工機(乾) から分離された菌相とほぼ一致し、また、加工食品 B の構成相は洗場床から分離された菌相とほぼ一致し、それぞれの汚染源を推定することができた。該当箇所を十分に清掃することで加工食品 A、B とも大腸菌群の検出がされなくなったことから、本手法の有効性が確認された。

近年、菌株 DNA の塩基配列を用いた汚染源追

表7 食品から分離された大腸菌群の汚染源推定

	グループ			
	I	II	III	IV
倉庫床(冷蔵)	22	3	16	59
倉庫床(常温)	0	100	0	0
成形加工機(乾)	32	18	5	45
成形加工機(湿)	5	14	14	68
作業場床(湿)	0	0	19	81
野菜洗浄場床	0	0	0	100
排水溝	0	0	16	84
原料	19	3	13	65
空中浮遊菌	19	12	23	46
加工食品A	41	21	5	32
加工食品B	0	0	0	100

単位は%

跡技術が研究されているが<sup>4,5)</sup>、それらが高価な装置・専門的な技術を要するのに対して、本技術は培地の組み合わせと培養により容易に汚染源推定を行うことができた点に特色がある。

#### 4 まとめ

##### (1) 選択培地セットの組成検討

大腸菌群の菌株間における糖の資化性・耐塩性の相違を利用して、大腸菌群菌株を4グループに群別する培地を設定することができた。

##### (2) 食品工場内の異なる環境下における大腸菌群構成相の相違

異なる環境下において分離された大腸菌群を4グループに群別したところ、分離源によって異なる菌相を示した。

##### (3) 汚染源探索調査

食品から分離された大腸菌群の構成相とその食品を製造した工場内各所から分離された大腸菌群の構成相とを比較し、照合することにより、大腸菌群の汚染原因箇所の推定に成功した。

#### 謝辞

菌株を分譲いただいた IAM カルチャーコレクションに深謝致します。

#### 参考文献

- 1) An, Y. and Breindenbach, G. P. Environ.: Monitoring *E. coli* and total coliforms in natural spring water as related to recreational mountain

areas., Environ. Monit. Assess., **102**(2005)131

- 2) Gordon, D. M.: Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination., Microbiology, **147**(2001)1079.
- 3) Anderson, K. L, Whitlock, J.E., and Harwood, V. J.: Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments., Appl. Environ. Microbiol., **71**(2005)3041.
- 4) Geornaras, I, Hastings, J. W., and von Holy, A.: Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains from poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents., Appl. Environ. Microbiol., **67**(2001)1940.
- 5) Gordon, D. M., and Lee, J.: The genetic structure of enteric bacteria from Australian mammals., Microbiology, **145**(1999)2673.