

琉球大学学術リポジトリ

食肉類の低温細菌について(畜産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 日越, 博信, 浜田, 輔一, Higoshi, Hironobu, Hamada, Sukekazu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4216

食肉類の低温細菌について

日 越 博 信*・浜 田 輔 一**

Hironobu HIGOSHI and Sukekazu HAMADA: Studies on psychrotrophic bacteria isolated from raw meat

I 緒 言

低温細菌に関する研究報告は数多いが、それらの多くは乳および乳製品に関するものである。^{13, 16, 17,}
¹⁹⁾ 一般に食肉類は、比較的長期間の冷蔵または冷凍保存が行なわれるため、低温細菌の増殖による悪影響を受けやすい食品と考えられる。しかし、わが国においては、欧米諸国に比較して、食肉類の低温細菌に関する研究は意外に少ない。

そこで著者らは、食肉類の低温細菌による汚染状況の調査を行なうとともに、食肉類から分離される本細菌の性質を知る目的で、新鮮肉および冷凍肉を取り上げ、これらについて5°C, 20°Cおよび35°C培養による生菌数を測定し、次いで前二者温度で培養後に分離された菌株の諸性状を検索してきた。これらの成績のうち3種培養温度による生菌数の出現状況は、すでに報告した⁷⁾が、その内容は、と畜場で解体検査直後の極めて新鮮な生肉であっても、すでに低温細菌（多くは $10^1 \sim 10^3/g$ ）の汚染を受け、また-10°Cで1か月保存された冷凍肉では低温細菌数（多くは $10^7 \sim 10^8/g$ ）が著しく多く、保存中に増殖したものと考えられることなどであった。

本論文では、新鮮肉および冷凍肉から5°Cおよび20°C培養で分離された菌株について、まず同定を行ない、次いで培養温度を異にした場合の増殖試験を行なったので、それらの成績を記述する。

II 実験材料および方法

1 供試菌株

本実験で供試した菌株は、と畜場で解体検査直後の新鮮肉（焼肉、牛肉および豚肉、計151試料）、および-10°Cの冷凍庫で約1か月間保存されていた冷凍肉（焼肉、29試料）から、標準寒天培地“栄研”を用いて5°C10日または20°C4日培養後に分離された合計1,434株である。

2 分離菌株の同定

同定は、形態学的ならびに生化学的性状によってBergy's Manual,³⁾ 医学細菌同定の手引き¹⁴⁾などに準拠して行なった。同定を行なうにあたって用いた主な試験項目は、すでに報告した⁹⁾生乳由来菌株の場合と同様で、グラム染色、形態、芽胞の有無、運動性、ベン毛の位置、O-F試験（ヒュ・レイフソン培地“栄研”）、色素産生能（キングA、B培地“栄研”）、オキシダーゼ産生能（Kovacsの方法¹⁴⁾），

* 琉球大学農学部畜産学科

** 北里大学畜産学部

カタラーゼ産生能、ペニシリン感受性(2.5U, Shewanら¹⁵⁾)、アルギニン分解能(Thornley¹⁸⁾)などである。

3 4種培養温度における増殖試験

供試菌株のTrypticase soy broth(BBL) 20°C 24時間培養菌を、4枚の酵母エキス寒天培地(酵母エキス0.5%, ポリペプトン1.0%, 塩化ナトリウム0.5%, 寒天1.2%, pH 7.2)平板にそれぞれ白金耳(内径2mm)ずつ画線接種した。これらをそれぞれ0°C14日, 5°C10日, 20°C4日および35°C2日培養して、増殖の有無および増殖の程度(+, ++, +++)を毎日肉眼で観察した。

III 実験成績

1 分離菌株の同定

新鮮肉および冷凍肉から5°Cあるいは20°C培養で分離された菌株(以下前者を5°C分離株、後者を20°C分離株という)の同定成績は、表1に示した。

Table 1. Incidence of organisms isolated from fresh and frozen meat samples at 5°C and 20°C incubations

Organism	Fresh meat		Frozen meat	
	Incubation temperature 5°C	20°C	Incubation temperature 5°C	20°C
<i>Pseudomonas</i>	58 (10.8)*	•	83 (61.0)	96 (65.3)
<i>Flavobacterium</i>	55 (10.2)	109 (17.8)	•	•
<i>Alcaligenes</i> <i>Achromobacter</i>	218 (40.6)	37 (6.0)	12 (8.8)	8 (5.4)
<i>Acinetobacter</i>	46 (8.6)	6 (1.0)	•	•
<i>Coliform bacteria</i>	8 (1.5)	8 (1.3)	•	•
<i>Staphylococcus</i>	3 (0.6)	42 (6.8)	•	•
<i>Micrococcus</i>	3 (0.6)	76 (12.4)	•	•
<i>Streptococcus</i>	22 (4.1)	40 (6.5)	•	8 (5.4)
<i>Bacillus</i>	•	11 (1.8)	•	•
<i>Yeast</i>	23 (4.3)	24 (3.9)	•	•
Unclassified				
Gram(-) rods	42 (7.8)	28 (4.6)	•	6 (4.1)
Gram(+) rods **	55 (10.2)	225 (36.6)	41 (30.2)	29 (19.8)
Gram(+) cocci	4 (0.7)	8 (1.3)	•	•
Total	537 (100.0)	614 (100.0)	136 (100.0)	147 (100.0)

* Number in parenthesis indicates percentage

** Including coryneform bacteria

表から明らかなように、新鮮肉から分離された菌株は、冷凍肉から分離された菌株に比較して、分離の際の培養温度に関係なく、多種類の細菌から構成されていた。

これらを詳しくみると、新鮮肉の5°C分離株では、*Alcaligenes-Achromobacter* が圧倒的に多く、これのみで全体の40.6%を占めた。次いで*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*などであり、これらを含むグラム陰性桿菌が全体の79.5%に達した。これに対して同20°C分離株は、同定された菌株では*Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*などが多かったが、最も多かった非同定グラム陽性桿菌を含むグラム陽性桿菌および球菌で全体の69.3%を占めた。なお、新鮮肉の20°C分離株には*Pseudomonas*が1株もみられなかった。

一方、冷凍肉の5°C分離株と20°C分離株とは、細菌の種類およびそれぞれの検出率がほぼ同じであった。両温度分離株の大多数は、*Pseudomonas*であり、次に非同定グラム陽性桿菌が多かった。また、新鮮肉の5°C分離株において最も多かった*Alcaligenes-Achromobacter*は、少數ではあったが冷凍肉の5°C分離株および20°C分離株でもみられた。

なお、分離された*Pseudomonas*のうち、蛍光色素を産性した菌株の割合は、新鮮肉の5°C分離株では69%，冷凍肉の5°C分離株では12%，同20°C分離株では14%であり、冷凍肉由来株には蛍光色素産生株が少なかった。

2 4種培養温度における増殖試験

まず、新鮮肉の5°C分離株の4種培養温度における増殖程度を、表2に示した。

Table 2. Degree of growth at different incubation temperatures of organisms isolated at 5°C from fresh meat samples

Organism	No. of strains examined	Incubation temperature and degree *of growth															
		0°C				5°C				20°C				35°C			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
<i>Pseudomonas</i>	58	1	•	2	55	•	•	•	58	•	•	•	58	20	9	2	27
<i>Flavobacterium</i>	55	20	17	9	9	•	4	14	37	•	1	3	51	45	•	2	8
<i>Alcaligenes</i> (<i>Achromobacter</i>)	218	6	6	8	198	•	3	5	210	•	•	2	216	135	42	14	27
<i>Acinetobacter</i>	46	5	18	17	6	•	1	12	33	•	•	9	37	26	1	8	11
<i>Coliform bacteria</i>	8	•	4	1	3	•	•	2	6	•	•	•	8	•	4	•	4
<i>Staphylococcus</i>	3	1	1	1	•	•	1	1	1	•	•	•	3	•	1	•	2
<i>Micrococcus</i>	3	2	1	•	•	•	•	1	2	•	•	•	3	1	•	1	1
<i>Streptococcus</i>	22	1	21	•	•	22	•	•	22	•	•	11	11	•	•	•	•
<i>Yeast</i>	23	11	11	•	1	•	22	•	1	•	20	2	1	20	3	•	•
Unclassified																	
Gram (-) rods	42	10	6	3	23	•	5	•	37	•	2	2	38	37	2	1	2
Gram (+) rods **	55	31	6	11	7	6	8	12	29	•	9	12	34	50	2	•	3
Gram (+) cocci	4	1	3	•	•	1	3	•	•	4	•	•	3	1	•	•	•
Total	537	89	94	52	302	7	69	47	414	•	58	30	449	348	76	28	85
		(16.6) ***				(1.3)				(0.0)				(64.8)			

* Degree of growth: -, no growth; +, poor growth; ++, moderate growth, +++, good growth

** Including coryneform bacteria

*** Number in parenthesis indicates percentage

20°C 4日培養では、5°C 分離株のすべてが増殖し、しかもそれらの大多数が良好に増殖した。また、0°C 14日培養では多くの菌株が増殖したが、35°C 2日培養では逆に多くの菌株が増殖できなかった。なお、5°C 10日培養で増殖できない、すなわち再現性のない菌株が少數みられた。

菌属別にみると、*Pseudomonas* および *Alcaligenes-Achromobacter* ではほとんどの菌株が0°C、5°C および 20°C 培養で+++ 程度に増殖した。これらに比べて, *Flavobacterium* および *Acinetobacter* では0°C 培養で+++ 程度に増殖した菌株が少なかった。大腸菌群の全菌株は、試験した4種培養温度でともに増殖したが、それらの増殖程度は20°C および 5°C 培養で良好であった。

次に、新鮮肉の20°C 分離株についての成績を表3に示した。

Table 3. Degree of growth at different incubation temperatures of organisms isolated at 20°C from fresh meat samples

Organism	No. of strain examined	Incubation temperatures and degree* of growth															
		0°C				5°C				20°C				35°C			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
<i>Flavobacterium</i>	109	33	22	24	30	13	13	11	72	1	2	2	104	66	15	6	22
<i>Alcaligenes-Achromobacter</i>	37	13	7	4	13	6	4	2	25	•	•	•	37	20	9	3	5
<i>Acinetobacter</i>	6	1	•	4	1	1	•	•	3	•	1	•	5	2	3	1	•
<i>Coliform bacteria</i>	8	4	2	•	2	3	1	2	2	•	•	•	8	•	•	1	7
<i>Staphylococcus</i>	42	31	10	1	•	15	20	7	•	•	•	•	42	•	4	5	33
<i>Micrococcus</i>	76	66	8	1	1	45	21	7	3	2	3	7	64	13	14	11	38
<i>Streptococcus</i>	40	37	2	1	•	30	8	2	•	•	33	7	•	2	31	7	•
<i>Bacillus</i>	11	8	2	1	•	6	4	•	1	•	1	3	7	5	1	•	5
<i>Yeast</i>	24	10	13	1	•	5	9	8	2	•	9	2	13	17	7	•	•
Unclassified																	
Gram (-) rods	28	20	4	1	3	7	5	9	7	•	•	4	24	17	2	3	6
Gram (+) rods**	225	140	60	18	6	54	49	76	46	•	21	18	186	108	53	23	41
Gram (+) cocci	8	7	1	•	•	2	6	•	•	7	•	1	•	7	1	•	•
Total	614	370	132	56	56	187	140	124	163	3	77	43	491	250	146	61	157
						(60.3)***				(0.5)				(40.7)			

* , **, *** See the footnote in Table 2.

5°C 培養では、ほぼ30%の菌株が増殖できなかったが、それらの多くは *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* などであった。また、0°C 培養では60%の菌株が、35°C 培養では40%の菌株が、それぞれ増殖できなかった。これらの成績は、上記5°C 分離株の成績に比較して、0°C 培養で増殖できない菌株が著しく多かったのに対して、35°C 培養で増殖できない菌株が逆に少なかった。なお、20°C 分離株にも20°C 培養で増殖できない菌株がごく少數みられた。

冷凍肉由来株の増殖試験の成績については、前述のように5°C 分離株と20°C 分離株との菌属の出現状況がほぼ同じであったから、これらを一括して表4に示した。

Table 4. Degree of growth at different incubation temperatures of organisms isolated at 5°C and 20°C from frozen meat samples

Organism	No. of strain examined	Incubation temperature and degree* of growth															
		0°C				5°C				20°C				35°C			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
<i>Pseudomonas</i>	179	•	•	1	178	•	•	•	179	•	•	•	179	121	52	1	5
<i>Alcaligenes</i>	20	1	6	5	8	•	3	6	11	•	•	•	20	4	25	9	
<i>Achromobacter</i>)																	
<i>Streptococcus</i>	8	1	7	•	•	•	6	2	•	•	5	3	•	3	5	•	•
Unclassified																	
Gram (-) rods	6	1	1	•	4	•	2	•	4	•	•	1	5	3	•	3	
Gram (+) rods**	70	1	25	43	1	•	23	43	4	•	7	52	11	69	•	1	
Total	283	4	39	49	191	•	34	51	198	•	12	56	215	200	59	7	17
		(1.4)	***			(0.0)				(0.0)				(70.7)			

* , ** , *** See the footnote in Table 2

5°Cおよび20°C分離株のすべては5°Cおよび20°C培養で増殖し、さらにほとんどの菌株が0°C培養でも増殖した。しかも大多数の菌株はこれら3種培養温度で良好に増殖した。特に、*Pseudomonas*ではほとんどすべてがそのような菌株であった。一方、35°C培養では29.3%の菌株が増殖したにすぎず、しかもこの温度で増殖した菌株の多くは、+程度の弱いものであった。

以上の成績から、冷凍肉の20°C分離株は、すべてが5°C 10日培養で増殖し、0°C培養においても5°C分離株とほとんど同程度に増殖できることを示している。

IV 考 察

新鮮肉の5°C分離株および20°C分離株では、ともに多種類の細菌がみられたが、それらの内容は異なっていた。すなわち、5°C分離株では*Alcaligenes-Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*などのグラム陰性桿菌が79%を占めたのに対し、20°C分離株ではグラム陽性の桿菌または球菌が約70%を占めた。これらの成績は、小久保¹⁰⁾が冷蔵前豚肉から分離した低温細菌において*Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*などのグラム陰性桿菌で70%以上を占め、またWolinら²⁰⁾の冷蔵前牛肉から25°C培養で分離した菌株の多くが、グラム陽性桿菌であったとする報告とほぼ一致した。

一方、冷凍肉では、5°Cおよび20°C分離株ともに*Pseudomonas*が圧倒的に優勢であると同時に、この他の種類およびそれらの検出率も両者分離株ではほぼ同じであり、新鮮肉の場合とは明らかに異なった。

種々食品類から検出される低温細菌では、*Pseudomonas*が主位であるとする報告は多く、さらに食肉および乳を冷蔵保存したとき、本菌属が優勢になることもすでに報告されている。^{1, 5, 11, 17)}これらの報告における成績と今回の著者らの成績とは、検出率では必ずしも一致しないが、今回の冷凍肉由来株で*Pseudomonas*が圧倒的に優勢であった点ではほぼ同じであった。この冷凍肉由来株で優勢であった*Pseudomonas*は、おそらく新鮮肉を汚染していたものが-10°Cでの冷凍保存中に増殖したものと考えられるが、なかでも蛍光色素を産生しない本菌属の増殖が著明であった。すなわち、新鮮肉由来の

Pseudomonas では蛍光色素産生株が 69 %を占めたのに対し、冷凍肉由来のそれでは蛍光色素非産生株が逆に 84 ~ 88 %を占めていた。これらと同様の成績は、新鮮鶏肉または冷蔵鶏肉由来の *Pseudomonas* において、Barnes and Impey²⁾ および Lahellec ら¹²⁾ によって報告されている。

他方、4種培養温度での増殖試験において、同じ菌属でも由来または分離の際の培養温度によって、それぞれの増殖態度が異なっていた。これらのこととは、由来または分離された温度によって菌種が異なるか、あるいは同じ菌種であっても菌株それぞれの特異性によるのかもしれないが、今回はそこまで追究しなかった。しかし、新鮮肉および冷凍肉からの 5°C 分離株では、すべてが 20°C 4 日以内に増殖し、しかもそれらのほとんどが良好な増殖を示した。これは多くの低温細菌が、20°C付近に至適増殖温度のあることを示していると思われる。

20°C 分離株の増殖試験において、5°C 培養では冷凍肉由来の全菌株が、また新鮮肉由来の約 70 % の菌株が、それぞれ増殖した。これらの菌株は、国際酪農連盟による低温細菌の定義⁶⁾、7°C 以下で増殖する細菌、または Eddy⁴⁾、Thomas¹⁶⁾、矢野²¹⁾ および日越ら⁸⁾ の 5°C で増殖する細菌、という基準に照らし合わせると、低温細菌 (Psychrotrophic bacteria) に包含される。これらのこととも考慮すると、20°C 4 日培養法は、低温細菌の迅速な検出方法に応用できるかもしれない。特に、今回の冷凍肉のような比較的長期間冷凍または冷蔵された食品類では、本培養法を用いてもよいと思われる。しかし、新鮮肉の 20°C 分離株は、同 5°C 分離株に比較して 0°C 培養で増殖できる菌株が少ない反面、35°C 培養で増殖できる菌株が多くなり、またグラム陰性桿菌の検出率も低かったから、新鮮な食品類について 20°C 4 日培養法を応用する場合は、これらの点に留意する必要があろう。

V 要 約

食肉類の低温細菌による汚染状況の調査を行なうとともに、それら食肉類から分離される本細菌の性質を知る目的で、新鮮肉および冷凍肉から 5°C 10 日または 20°C 4 日培養で分離された 1,434 株について、同定を試み、次いで培養温度を異にした場合の増殖試験を行ない、次のような成績を得た。

新鮮肉の 5°C 分離 537 株では *Alcaligenes-Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* などのグラム陰性桿菌が 79 % を占めた。同 20°C 分離 614 株では、グラム陽性の桿菌および球菌が約 70 % を占めたが、*Flavobacterium* も 18 % あった。冷凍肉の 5°C および 20°C 分離株、計 283 株では、分離した温度に関係なく *Pseudomonas* が 60 % 以上を占めた。

4種培養温度での増殖試験において、新鮮肉の 5°C 分離株では 17 % が 0°C 培養で増殖できなかったが、これらは *Micrococcus*, *Flavobacterium*, Yeast などに多かった。また同 5°C 分離株の 65 % は 35°C 培養で増殖できなかった。一方、新鮮肉の 20°C 分離株では、70 % が 5°C 培養で、また 40 % が 0°C 培養で増殖した。他方、冷凍肉の 5°C および 20°C 分離株では、ほとんどすべての菌株が 0°C 培養で増殖でき、しかも大多数の菌株が良好な増殖を示した。しかし、35°C 培養では大多数の菌株が、逆に増殖できなかった。

20°C 4 日培養で分離された菌株は、冷凍肉由来のすべてと新鮮肉由来の 70 % が低温細菌に包含されることから、本培養法は特に比較的長期間冷凍または冷蔵保存された食品類において、低温細菌の迅速な検出法として応用できると思われる。

参・考 文 献

- Ayres, J. C. 1960 Temperature relationship and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef, Food Res., 25 : 1 ~ 18

2. Barnes, E. M. and Impey, C. S. 1968 Psychrophilic spoilage bacteria of poultry, *J. appl. Bact.*, **31**: 97~107
3. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974 Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., Baltimore, Williams & Wilkins
4. Eddy, B. P. 1960 The use and meaning of the term psychrophilic, *J. appl. Bact.*, **23**: 189~190
5. Gardner, G. A. 1965 The aerobicflora of stored meat with particular reference to the use of selective media, *J. appl. Bact.*, **28**: 252~264
6. 春田三佐夫 1970 乳および乳製品の衛生細菌、特に低温細菌について、メディヤサークル, **15**: 437~446
7. 日越博信, 矢挽輝武, 浜田輔一 1973 新鮮肉および冷凍肉の低温細菌群について, 北獣会誌, **17**: 191~197
8. _____, 浜田輔一, 土井 誠 1975 低温細菌群の発育温度に関する研究, 日獣誌, **37**: 165~177
9. _____, _____ 1976 榨乳直後分房乳における低温細菌群, 食衛誌, **17**: 27~33
10. 小久保弥太郎 1973 解凍豚肉を低温貯藏した場合における細菌叢および肉質の変化, 食衛誌, **14**: 448~451
11. _____, 梅木富士郎, 春田三佐夫 1971 豚生肉を汚染する低温細菌に関する研究, 食衛誌, **12**: 164~169
12. Lahellec, C., Meurier, C., Bennejean, G. and Catsaras, M. 1975 A study of 5920 strains of psychrotrophic bacteria isolated from chickens, *J. appl. Bact.*, **38**: 89~97
13. 三河勝彦 1977 牛乳低温細菌の特性, 酪農科学・食品の研究, **26**: 153~163
14. 坂崎利一, 島崎保家訳 1967 Cowan and Steel 医学細菌同定の手びき, 東京, 納谷書店
15. Shewan, J. M., Hodgkiss, W. and Liston, J. 1954 A method for the rapid differentiation of certain non-pathogenic, asporogenous bacilli, *Nature, Lond.*, **173**: 208
16. Thomas, S. B. 1974 The microflora of bulk collected milk, *Dairy Inds.*, **39**: 237~240
17. _____ and Thomas, B. F. 1973 Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk, *Dairy Inds.*, **38**: 11~15
18. Thornley, M. J. 1960 The differentiation of *pseudomonas* from other gram-negative bacteria of the basis of arginine metabolism, *J. appl. Bact.*, **23**: 37~52
19. Witter, L. D. 1961 Psychrophilic bacteria, *J. Dairy Sci.*, **44**: 983~1015
20. Wolin, E. F., Evans, J. B. and Niven, Jr, C. F. 1957 The microbiology of fresh and irradiated beef, *Food Res.*, **22**: 682~686
21. 矢野信礼 1964 牛乳・乳製品の好冷細菌, 食衛誌, **5**: 103~111

Summary

A total of 1,434 strains isolated by incubation at 5°C for 10 days or at 20°C for 4 days from fresh meat (veal, beef and pork; 151 samples in all) immediately upon dressing at slaughterhouse and frozen meat (veal which had been preserved at -10°C for approximately 4 weeks; 29 samples) were identified and tested their growth abilities at 0°C for 14 days, 5°C for 10 days, 20°C for 4 days and 35°C for 2 days incubation respectively.

The results obtained are summarized as follows:

Gram-negative bacilli such as *Alcaligenes-Achromobacter*, *Pseudomonas* and *Flavobacterium* accounted for 79% of the 537 strains isolated at 5°C incubation from fresh meat. Approximately 70% of the 614 strains isolated at 20°C incubation from the same type of source were gram-positive bacilli and cocci while *Flavobacterium* accounted for about 18%. By contrast, *Pseudomonas* constituted over 60% of all organisms (136 strains isolated at 5°C, 147 strains isolated at 20°C) from frozen meat, irrespective of incubation temperature.

In the growth test at different incubation temperatures, of the 537 strains isolated at 5°C incubation from fresh meat, 17% failed to grow at 0°C and these were frequently of the genera *Micrococcus* and *Flavobacterium* or yeast. Sixty-five percent of the same population was unable to grow at 35°C. Of the 614 strains isolated at 20°C incubation from fresh meat, 70% was able to grow at 5°C, 40% at 0°C. Of the 283 strains isolated at 5°C and 20°C incubation from frozen meat, practically all strains proved to be capable of growth at 0°C, mostly satisfactorily, but the majority failed to grow at 35°C. It would follow from these finding that incubation at 20°C for 4 days is applicable as a rapid method for detection of psychrotrophic bacteria in samples of foodstuff preserved frozen or refrigerated over a relatively extended period such as the frozen meat used in this study.