

平成16年度農林水産省
食品製造工程管理
情報高度化促進事業

平成16年度 病原微生物データ分析実験作業 成果報告書

「栄養分の有無ならびに湿潤・乾燥環境下
における病原菌の挙動に関する研究」

平成17年2月
学校法人 東海大学
小沼博隆教授

栄養分の有無ならびに湿潤・乾燥環境下における病原菌の挙動に関する研究

1. 目的

欧米では調理施設の衛生管理に対して、「キープドライ」(乾燥状態を保つこと)という概念がある。国内における大部分の調理施設は、従来から、床面が常に濡れた状態であるウェットシステムが採用されている。ウェットシステムは床等からの跳ね水による微生物汚染の問題や重装備の防水エプロン、長靴の着用のほか施設内が高温・高湿度になり床面の乾燥が悪く滑り易いなど作業環境が悪化しやすいため、ドライシステムの導入を図ることが望ましいと考えられている。

調理施設におけるドライシステムとは、調理環境を乾いた状態に、しかも室内の給排気と温度管理を適切に維持するシステムで、衛生面、作業者の健康面、作業の能率面等において有効なシステムであると考えられている。しかしながらドライシステムの導入による衛生面での効果、特に調理施設内の微生物検査に基づく有効性についての情報は無いのが現状である。そこで今回は、調理・製造・加工施設のドライ化の有効性を確認し、微生物制御に役立てる。

2. 試験方法

1) 試験菌

Salmonella Enteritidis NBRC 3313(サルモネラ)

Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210100(腸炎ビブリオ)

2) 菌液調製溶液の調製

以下の方法で各種菌液調製溶液を調製した。

① 白菜煮汁

3 cm×4 cm 角の大きさに切った白菜 200 g に精製水 400ml を加え、20 分間煮沸後、煮汁を採取し、高圧蒸気滅菌(121℃, 15 分間)したものを白菜煮汁(原液)とした。この原液を精製水を用いて 10, 100 及び 1,000 倍に希釈し、菌液調製溶液とした。

② マグロ煮汁

2 cm×7 cm×1 cm の大きさに切ったマグロ(赤身)200 g に精製水 400ml を加え、20 分間煮沸後、煮汁を採取し、高圧蒸気滅菌(121℃, 15 分間)したものをマグロ煮汁(原液)とした。この原液を精製水を用いて 10, 100 及び 1,000 倍に希釈し、菌液調製溶液とした。

なお、腸炎ビブリオの試験に用いるものは全て食塩を 3 % 添加した。

③ 液卵

鶏卵を溶き、液卵(原液)とした。この原液を精製水を用いて 10, 100, 1,000 及び 10,000 倍に希釈し、菌液調製溶液とした。

3) 菌液調製溶液の TOC の測定

菌液調製溶液の有機物量の指標として全有機炭素量(TOC)を、燃焼-赤外線分析法により測定した。なお、全炭素から無機体炭素を差し引いて有機体炭素を求めた。

4) 菌液の調製

普通寒天培地(栄研化学株式会社;腸炎ビブリオについては食塩を 3 %添加)で $35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 16~20 時間培養した試験菌の菌体を各種菌液調製溶液に懸濁させ、1 ml 当たりの菌数が $10^5\sim 10^6$ となるように調製し、菌液とした。

5) 試験操作

5 cm × 5 cm の大きさに切り取ったポリエチレンフィルムに菌液 0.4 ml(25 滴)を滴下し、試験片とした。これらを $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 90%以上(水飽和デシケーター内で保存)及び 40~50%(恒温器内で保存)で保存し、17, 24 及び 48 時間保存後に生菌数を測定した。また、目視により、試験片上の菌液の乾燥状態を確認した。

6) 生菌数の測定

SCDLP 培地 10mlを用いて、試験片から生残菌を洗い出した。この洗い出し液の生菌数を標準寒天培地(栄研化学株式会社)を用いた混積平板培養法($35\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 48 時間培養)により測定し、試験片 1 個当たりに換算した。なお、腸炎ビブリオの試験に用いる培地には食塩を 3 %添加した。

3. 結果

1) 白菜煮汁を用いて調製したサルモネラ菌液の試験結果(表-1 及び図-1~4)

白菜煮汁原液の TOC は 3,900 mg/L であった。

相対湿度 40~50%で保存した場合、24 時間後に菌液は完全に乾燥した。

相対湿度 40~50%で保存した場合、試験片当たり 10^5 の菌数が白菜煮汁原液では 17 時間後 10^7 に増加した後、48 時間後も増減はなかった。白菜煮汁 10 倍希釈液では 17 時間後に 10^7 に増加した後、24 時間後に 10^6 に、100 及び 1,000 倍希釈液では 17 時間後に 10^6 に増加した後 24 時間後に 10^3 に減少した。

相対湿度 90%以上で保存した場合、試験片当たり 10^5 の菌数が 24 時間後に白菜煮汁原液で 10^8 に、10 倍希釈液で 10^7 に、100 倍及び 1,000 倍希釈液で 10^6 に増加し、48 時間後まで増減はほとんど認められなかった。

2) マグロ煮汁を用いて調製したサルモネラ菌液の試験結果(表-2 及び図-5~8)

マグロ煮汁原液の TOC は 9,100 mg/L であった。

相対湿度 40~50%で保存した場合, 24 時間後に菌液は完全に乾燥した。

相対湿度 40~50%で保存した場合, 試験片当たり 10^5 の菌数がマグロ煮汁原液では 17 時間後 10^9 に増加した後, 48 時間後も増減はなかった。マグロ煮汁 10 倍希釈液では 17 時間後に 10^8 に増加した後, 48 時間後に 10^7 に, 100 倍希釈液では 17 時間後に 10^7 に増加した後, 24 時間後に 10^6 に, 1,000 倍希釈液では 17 時間後に 10^6 に増加した後, 24 時間後に 10^3 に減少した。

相対湿度 90%以上で保存した場合, 試験片当たり 10^5 の菌数が 17 時間後にマグロ煮汁原液で 10^9 に, 10 倍希釈液で 10^8 に, 100 倍希釈液で 10^7 に, 1,000 倍希釈液で 10^6 に増加し, 48 時間後までほとんど増減は認められなかった。

3) 液卵を用いて調製したサルモネラ菌液の試験結果(表-3 及び図-9~12)

液卵 10 倍希釈液の TOC は 14,000 mg/L であった。

相対湿度 40~50%で保存した場合, 24 時間後に菌液は完全に乾燥した。

相対湿度 40~50%で保存した場合, 試験片当たり 10^5 の菌数が液卵 10 倍希釈液では 17 時間後 10^8 に増加した後, 24 時間後に 10^7 に減少した。液卵 100 倍希釈液では 17 時間後に 10^7 に増加した後, 24 時間後に 10^4 に, 1,000 倍希釈液では 17 時間後に 10^6 に増加した後, 24 時間後に 10^3 に, 10,000 倍希釈液では 17 時間後に 10^5 と増加は認められず, 24 時間後に 10^2 に減少した。

相対湿度 90%以上で保存した場合, 試験片当たり 10^5 の菌数が 17 時間後に液卵 10 倍希釈液で 10^8 に, 100 倍希釈液で 10^7 に, 1,000 倍希釈液で 10^6 に増加し, 48 時間後まで増減は認められなかった。10,000 倍希釈液では 48 時間後まで 10^5 と増減は認められなかった。

4) マグロ煮汁を用いて調製した腸炎ビブリオ菌液の試験結果(表-4 及び図-13~16)

マグロ煮汁原液の TOC は 9,100 mg/L であった。

相対湿度 40~50%で保存した場合, 24 時間後に菌液は完全に乾燥した。

相対湿度 40~50%で保存した場合, 試験片当たり 10^5 の菌数が 24~48 時間後で全ての条件で <10 に減少した。


相対湿度 90%以上で保存した場合, 試験片当たり 10^5 の菌数が 24 時間後にマグロ煮汁原液で 10^7 に, 10 倍希釈液で 10^6 に増加し 48 時間後までほとんど増減は認められなかった。100 倍希釈液では 48 時間後まで 10^5 とほとんど増減は認められなかった。1,000 倍希釈液では 24 時間後に 10^3 と減少した。

表-1 生菌数測定結果

試験菌	菌液調製溶液	相対湿度	測定	試験片1個当たりの生菌数	
				測定-1	測定-2
サルモネラ	***	***	接種直後*	1.4×10^5	***
	白菜煮汁 原液 TOC:3,900 mg/L	90 %以上	17時間後	7.8×10^7	7.0×10^7
			24時間後	1.4×10^8	9.7×10^7
			48時間後	1.9×10^8	2.0×10^8
		40~50 %	17時間後	1.2×10^8	5.1×10^7
			24時間後	6.0×10^7	7.1×10^7
			48時間後	3.9×10^7	1.2×10^7
	***	***	接種直後*	1.8×10^5	***
	白菜煮汁 10倍希釈液 TOC:390 mg/L	90 %以上	17時間後	1.3×10^7	2.0×10^7
			24時間後	2.0×10^7	2.6×10^7
			48時間後	4.7×10^7	5.1×10^7
		40~50 %	17時間後	1.2×10^7	2.2×10^7
			24時間後	2.0×10^6	2.6×10^6
			48時間後	4.6×10^6	4.1×10^6
	***	***	接種直後*	1.6×10^5	***
	白菜煮汁 100倍希釈液 TOC:39 mg/L	90 %以上	17時間後	5.7×10^6	3.0×10^6
			24時間後	4.4×10^6	4.2×10^6
			48時間後	9.5×10^6	8.1×10^6
		40~50 %	17時間後	4.8×10^6	1.2×10^7
			24時間後	2.1×10^3	1.0×10^4
			48時間後	<10	10
	***	***	接種直後*	1.5×10^5	***
	白菜煮汁 1,000倍希釈液 TOC:3.9 mg/L	90 %以上	17時間後	1.5×10^6	1.8×10^6
			24時間後	1.8×10^6	2.2×10^6
48時間後			3.7×10^6	2.7×10^6	
40~50 %		17時間後	2.0×10^6	1.6×10^6	
		24時間後	7.7×10^2	3.4×10^3	
		48時間後	3.8×10^2	3.0×10^2	

***:実施せず <10:検出せず 保存温度:30 °C

* 接種菌液の生菌数を測定し、試験片1個当たりに換算した。

 接種した菌液は水滴が小さくなってはいるが、未乾燥。

 接種した菌液は乾燥していた。

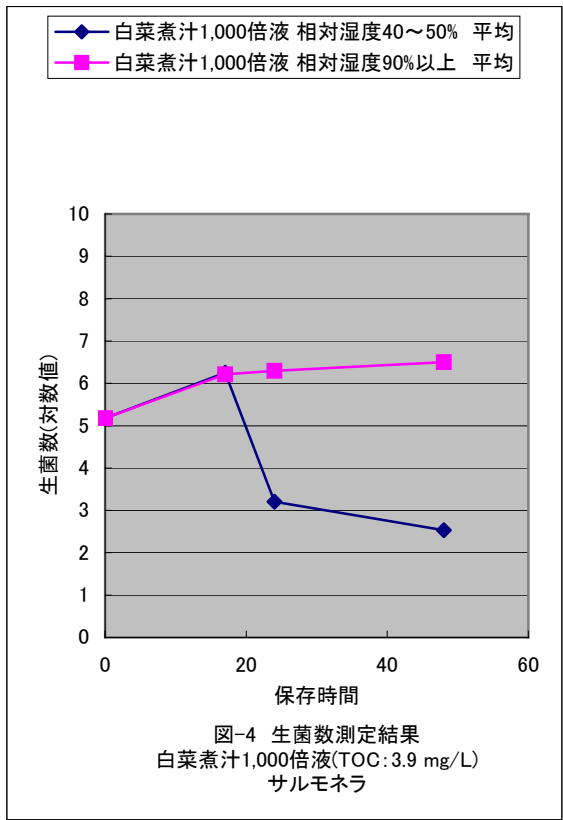
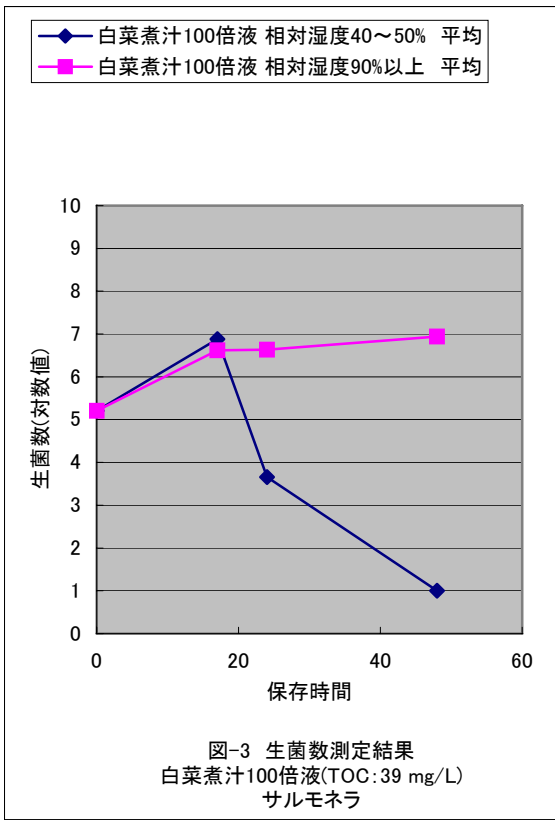
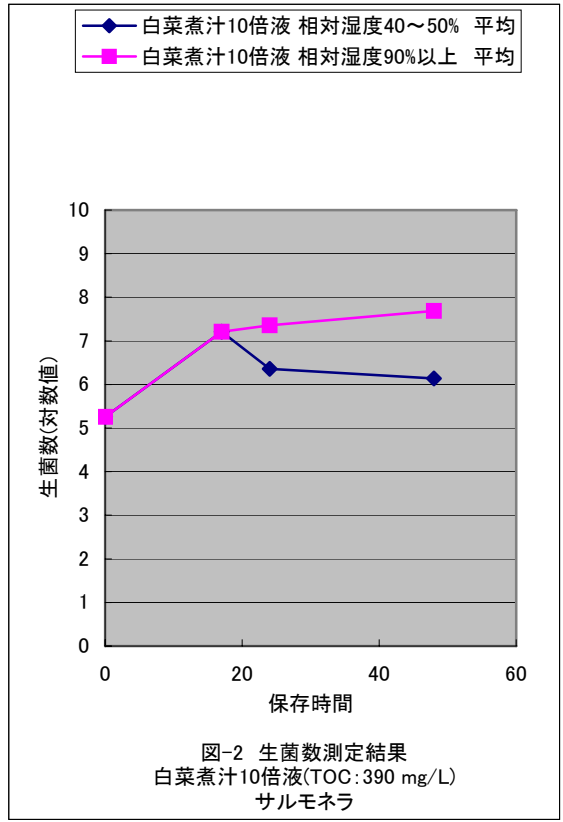
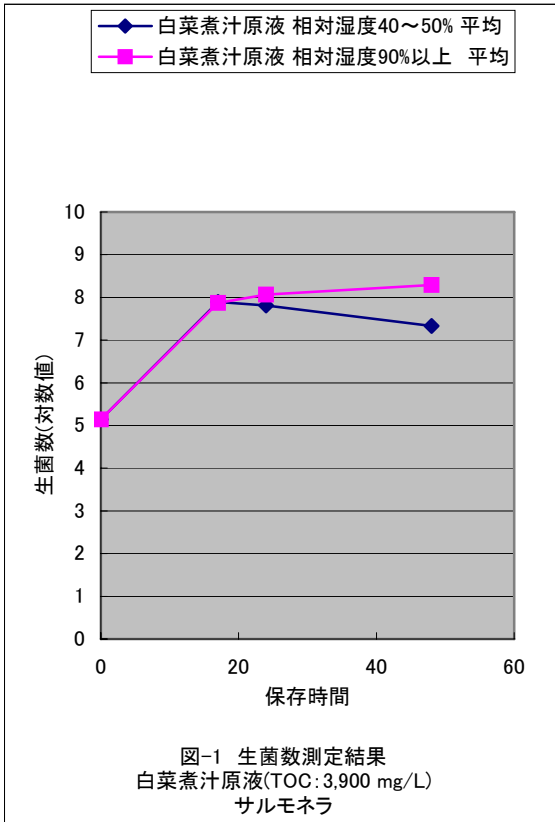




表-2 生菌数測定結果

試験菌	菌液調製溶液	相対湿度	測定	試験片1個当たりの生菌数	
				測定-1	測定-2
サルモネラ	***	***	接種直後*	1.9×10^5	***
	マグロ煮汁 原液 TOC:9,100 mg/L	90 %以上	17時間後	1.4×10^9	1.7×10^9
			24時間後	1.9×10^9	2.4×10^9
			48時間後	1.8×10^9	2.0×10^9
		40~50 %	17時間後	1.8×10^9	1.6×10^9
			24時間後	1.6×10^9	1.8×10^9
			48時間後	8.8×10^8	7.0×10^8
	***	***	接種直後*	3.3×10^5	***
	マグロ煮汁 10倍希釈液 TOC:910 mg/L	90 %以上	17時間後	1.5×10^8	1.7×10^8
			24時間後	1.6×10^8	2.0×10^8
			48時間後	1.7×10^8	1.5×10^8
		40~50 %	17時間後	1.7×10^8	2.0×10^8
			24時間後	1.3×10^8	9.6×10^7
			48時間後	1.3×10^7	2.5×10^7
	***	***	接種直後*	1.1×10^5	***
	マグロ煮汁 100倍希釈液 TOC:91 mg/L	90 %以上	17時間後	1.4×10^7	1.8×10^7
			24時間後	2.1×10^7	3.0×10^7
			48時間後	2.5×10^7	2.7×10^7
		40~50 %	17時間後	1.5×10^7	2.1×10^7
			24時間後	7.6×10^5	1.4×10^6
			48時間後	3.3×10^4	1.6×10^4
	***	***	接種直後*	1.8×10^5	***
	マグロ煮汁 1,000倍希釈液 TOC:9.1 mg/L	90 %以上	17時間後	3.4×10^6	3.5×10^6
			24時間後	4.0×10^6	6.2×10^6
48時間後			8.7×10^6	8.1×10^6	
40~50 %		17時間後	4.1×10^6	5.1×10^6	
		24時間後	9.5×10^2	1.5×10^3	
		48時間後	<10	<10	

***:実施せず <10:検出せず 保存温度:30 °C

* 接種菌液の生菌数を測定し、試験片1個当たりに換算した。

 接種した菌液は水滴が小さくなってはいるが、未乾燥。

 接種した菌液は乾燥していた。

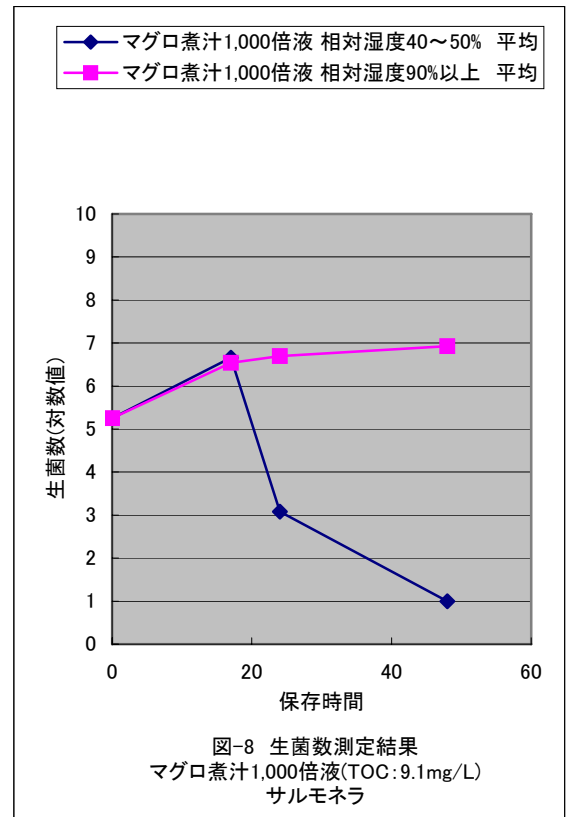
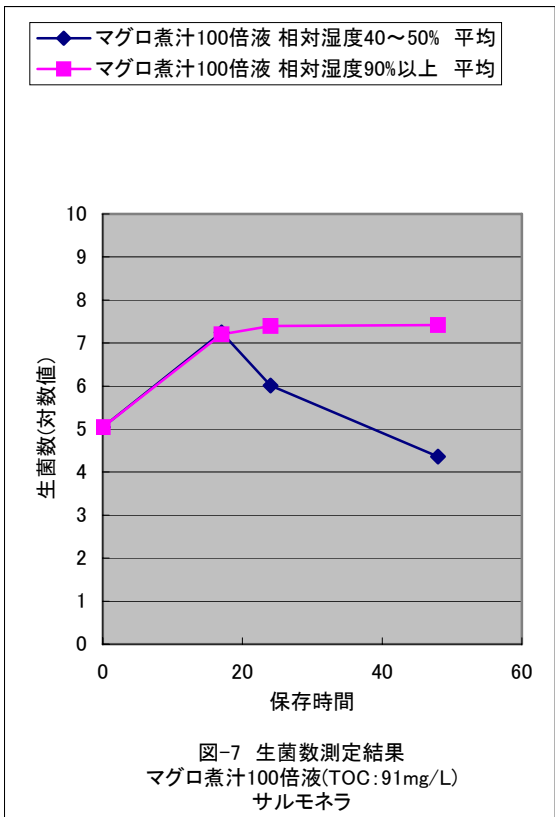
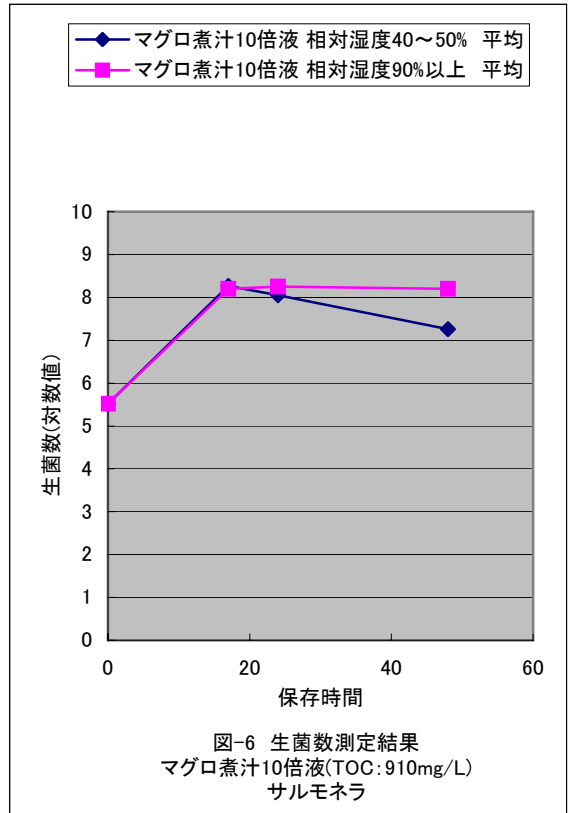
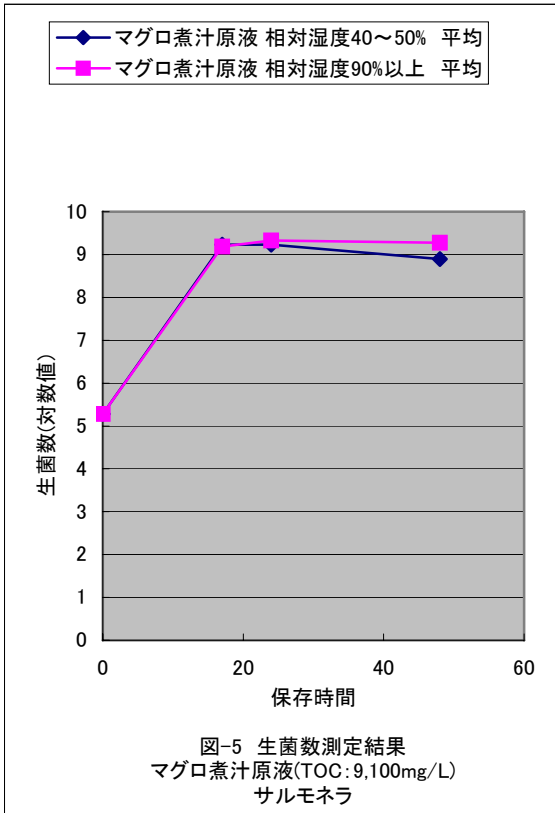




表-3 生菌数測定結果

試験菌	菌液調製溶液	相対湿度	測定	試験片1個当たりの生菌数	
				測定-1	測定-2
サルモネラ	***	***	接種直後*	9.4×10^4	***
	液卵 10倍希釈液 TOC:14,000 mg/L	90 %以上	17時間後	8.7×10^7	1.4×10^8
			24時間後	1.9×10^8	1.3×10^8
			48時間後	3.3×10^8	4.2×10^8
		40~50 %	17時間後	1.2×10^8	1.2×10^8
			24時間後	1.0×10^7	1.3×10^7
			48時間後	2.9×10^6	2.8×10^6
	***	***	接種直後*	8.2×10^4	***
	液卵 100倍希釈液 TOC:1,400 mg/L	90 %以上	17時間後	2.1×10^7	1.5×10^7
			24時間後	1.9×10^7	1.9×10^7
			48時間後	3.2×10^7	4.5×10^7
		40~50 %	17時間後	1.4×10^7	1.9×10^7
			24時間後	3.0×10^4	7.5×10^4
			48時間後	2.2×10^4	1.0×10^4
	***	***	接種直後*	1.5×10^5	***
	液卵 1,000倍希釈液 TOC:140 mg/L	90 %以上	17時間後	2.5×10^6	2.7×10^6
			24時間後	2.9×10^6	2.1×10^6
			48時間後	4.7×10^6	4.4×10^6
		40~50 %	17時間後	5.1×10^6	4.6×10^6
			24時間後	3.4×10^3	5.5×10^3
			48時間後	1.1×10^3	1.4×10^3
	***	***	接種直後*	1.4×10^5	***
	液卵 10,000倍 希釈液 TOC:14 mg/L	90 %以上	17時間後	2.4×10^5	2.4×10^5
			24時間後	1.8×10^5	2.2×10^5
48時間後			4.3×10^5	4.4×10^5	
40~50 %		17時間後	3.7×10^5	3.2×10^5	
		24時間後	9.2×10^2	70	
		48時間後	30	20	

***:実施せず 保存温度:30 °C

* 接種菌液の生菌数を測定し、試験片1個当たりに換算した。

 接種した菌液は水滴が小さくなってはいるが、未乾燥。

 接種した菌液は乾燥していた。

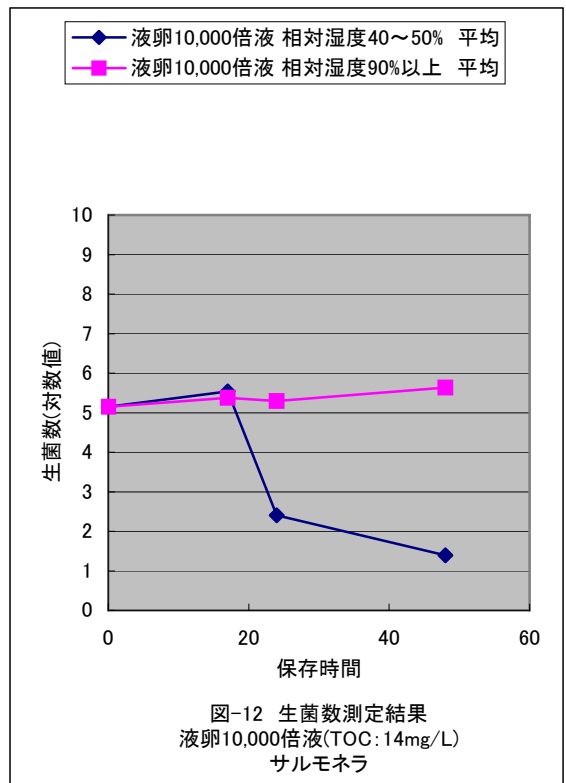
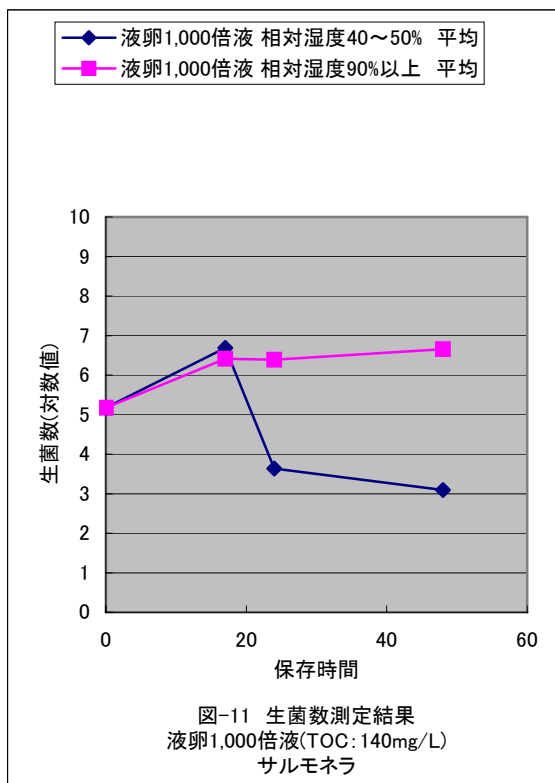
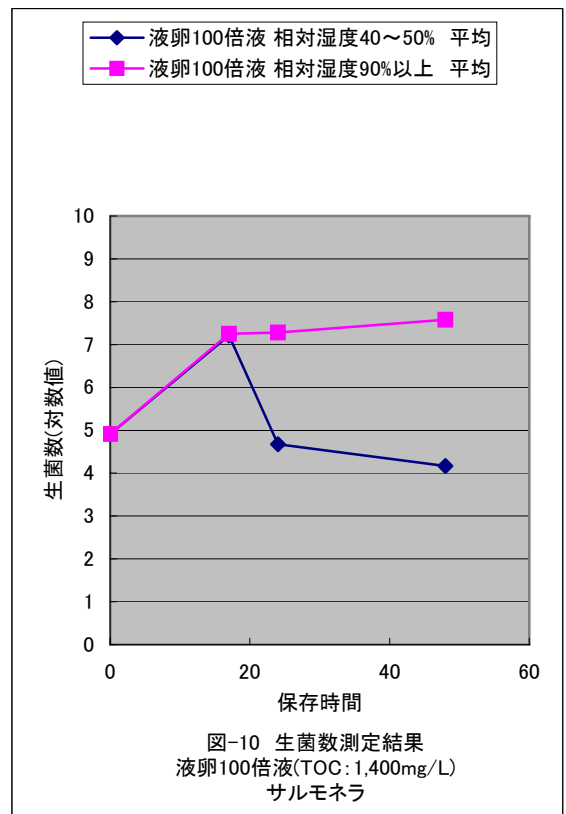
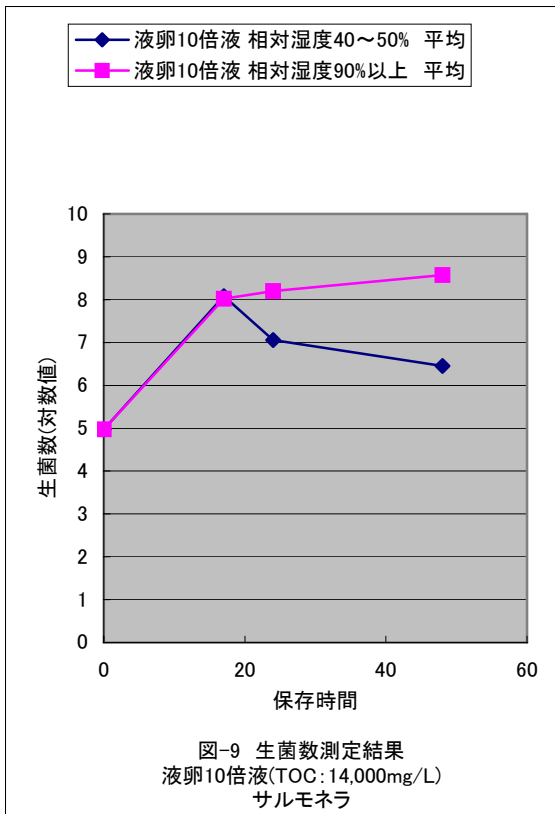




表-4 生菌数測定結果

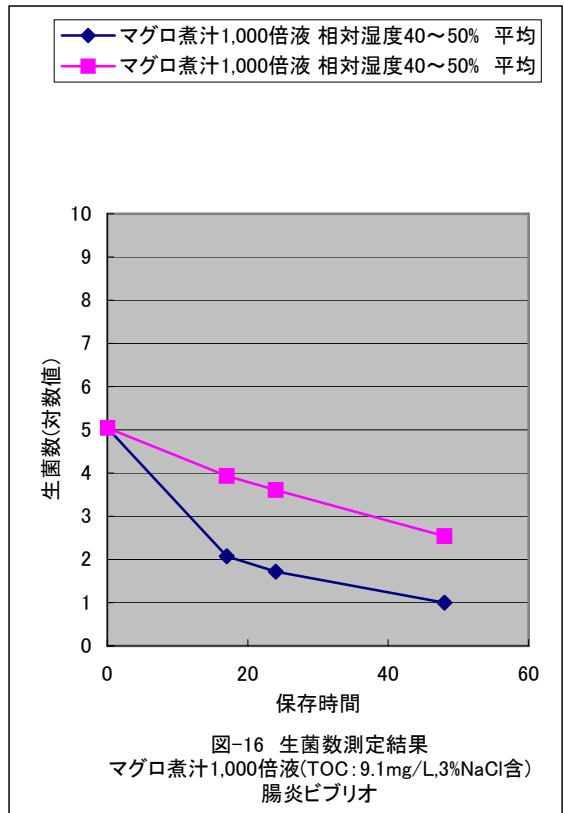
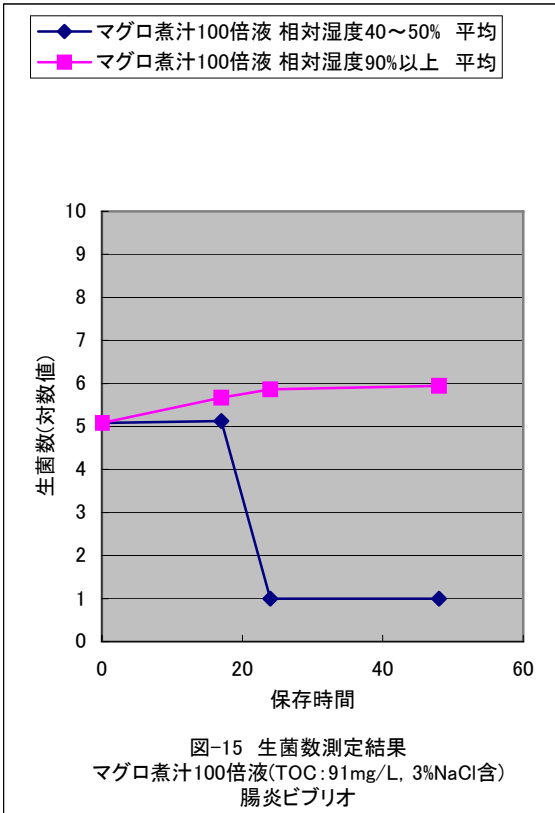
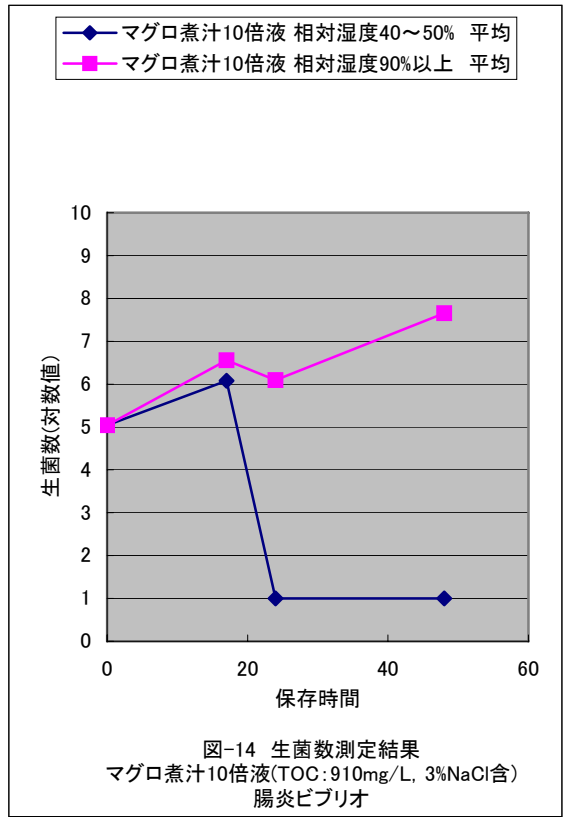
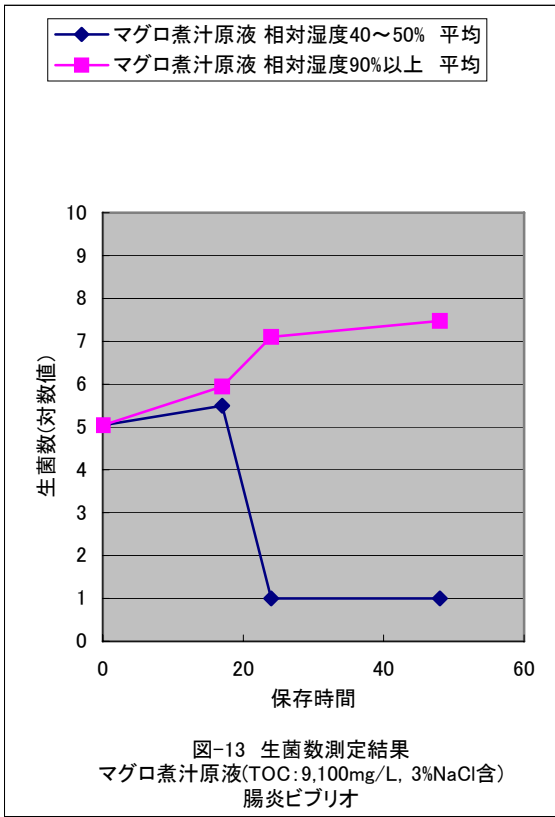
試験菌	菌液調製溶液	相対湿度	測定	試験片1個当たりの生菌数	
				測定-1	測定-2
腸炎ビブリオ	***	***	接種直後* ¹	1.1 × 10 ⁵	***
	マグロ煮汁 原液 (食塩3%添加) TOC:9,100 mg/L	90 %以上	17時間後	1.0 × 10 ⁶	7.8 × 10 ⁵
			24時間後	1.7 × 10 ⁷	9.6 × 10 ⁶
			48時間後	5.0 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁷
		40~50 %	17時間後	2.3 × 10 ⁵	4.3 × 10 ⁵
			24時間後	<10	<10
			48時間後	<10	<10
	***	***	接種直後* ¹	1.1 × 10 ⁵	***
	マグロ煮汁 10倍希釈液 (食塩3%添加) TOC:910 mg/L	90 %以上	17時間後	3.8 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁶
			24時間後	1.4 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁶
			48時間後	4.9 × 10 ⁷	4.1 × 10 ⁷
		40~50 %	17時間後	1.2 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁶
			24時間後	<10	<10
			48時間後	<10	<10
	***	***	接種直後* ¹	1.2 × 10 ⁵	***
	マグロ煮汁 100倍希釈液 (食塩3%添加) TOC:91 mg/L	90 %以上	17時間後	4.4 × 10 ⁵	5.0 × 10 ⁵
			24時間後	5.5 × 10 ⁵	9.8 × 10 ⁵
			48時間後	8.8 × 10 ⁵	8.7 × 10 ⁵
		40~50 %	17時間後	1.5 × 10 ⁵	1.2 × 10 ⁵
			24時間後	<10	<10
			48時間後	<10	<10
	***	***	接種直後* ¹	1.1 × 10 ⁵	***
	マグロ煮汁 1,000倍希釈液 (食塩3%添加) TOC:9.1 mg/L	90 %以上	17時間後	8.8 × 10 ³	8.3 × 10 ³
			24時間後	7.2 × 10 ³	2.3 × 10 ³
48時間後			1.2 × 10 ³	1.0 × 10 ²	
40~50 %		17時間後	7.0 × 10 ²	20	
		24時間後	90	30	
		48時間後	<10	<10	

***:実施せず <10:検出せず 保存温度:30 °C

* 接種菌液の生菌数を測定し、試料1個当たりに換算した。

 接種した菌液は水滴が小さくなってはいるが、未乾燥。

 接種した菌液は乾燥していた。



4. 考察

結果から、以下の通り考察された。

- 1) 今回の試験条件において、温度 30 °C、相対湿度 40～50 %では 17 時間後では水滴は小さくなるが、完全には乾燥せず、24 時間以降は完全に乾燥すると考えられた。
- 2) サルモネラに関しては、全ての菌液調製溶液(TOC:3.9 mg/L 以上)において菌液が乾燥するまでは増殖が認められ、TOC が高いほど増殖速度も速くなった。また、乾燥条件では全ての菌液調製溶液において生菌数の減少が認められ、死滅速度は TOC が低いほど速くなっており、3Log 以上死滅させるためには TOC で 100mg/L 程度以下である必要があると考えられた。
- 3) 腸炎ビブリオに関しては全ての菌液調製溶液(TOC:9,100 mg/L 以下)で乾燥により死滅した。腸炎ビブリオの菌液には増殖に必要な 3 %の食塩を添加しているため、菌液の乾燥に伴い食塩濃度が高くなっていくためであると考えられた。また、マグロ煮汁 1,000 倍希釈液(食塩 3%添加, TOC:9.1 mg/L)においては菌液の乾燥の有無に関わらず、生菌数が減少した。今回の条件においてマグロ煮汁 100 倍希釈液(TOC:91mg/L)よりも低い栄養分の存在下では増殖が困難であると考えられた。

以 上