

平成 15 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 15 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 16 年 2 月

東海大学  
小沼博隆教授

## 研究報告書

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

分担研究者 小沼 博隆（東海大学海洋学部）

協力研究者 土屋 禎（財団法人日本食品分析センター）

### 研究要旨

わが国の食品製造施設、特に調理施設は清掃や洗浄に大量の水を使用するウェットシステムが多い。しかし、ウェットシステムは施設内の湿度が高くなり病原菌をはじめとした多く微生物が汚染・増殖・拡散する危険性の高いことが指摘されている。近年では床や壁などを濡らさないドライシステム調理施設が衛生面に加え、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注目されその数も増加してきている。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十分に得られていないのが現状である。そこで、ドライシステムの衛生面での有効性を調べることを目的として、高湿度ならびに乾燥条件下における病原菌の挙動を調べた。その結果、腸管出血性大腸菌 0157およびサルモネラは、室温30℃・湿度90%の条件下では、栄養成分の全くない精製水中で菌数の減少は認められなかったが、湿度50%の条件下では死滅した。また、精製水に有機物であるペプトンを僅かに加えた場合は、湿度90%では増殖し、湿度50%では増殖はみられなかったが減少もみられなかった。また、黄色ブドウ球菌およびセレウス菌も同様の傾向を示した。

以上の結果から、ウェットシステム調理施設内のように湿度が高い場合は、病原菌は迅速に増殖することが明らかとなった。また、ドライシステム調理施設内のように乾燥している場合は、有機物が残存していない場合は、病原菌は比較的速やかに死滅するが、有機物が存在する場合には、乾燥状態であっても菌は減少せず長時間生残することが分かった。

### 1. 研究目的

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。しかし、ウェットシステムは施設内の湿度が高くなり病原菌をはじめとした多く微生物が汚染・増殖・拡散する危険性の高いことが指摘されている。近年では床や壁などを濡らさないドライシステム調理施設が衛生面に加え、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注目されその数も増加している。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、十分に得られていないのが現状である。そこで、ドライシステムの衛生面での有効性を調べることを目的として、高湿度ならびに乾燥条件下における病原菌の挙動を調べ、以下の結果を得たので報告する。

## 2. 研究方法

### 試験菌

*Escherichia coli* ATCC 43888 ; 大腸菌(0157: H7 , ペロ毒素非産生株) , *Salmonella enteritidis* IF0 3313 ; サルモネラ , *Staphylococcus aureus* IF0 12732 ; 黄色ブドウ球菌 , *Bacillus cereus* IF0 13494 ; セレウス菌 (芽胞)

### 菌液の調製

普通寒天培地で 35 ℃ , 16 ~ 20 時間培養後の菌体を以下の菌液調製溶液(滅菌精製水 0.1% ペプトン水 , 0.5% ペプトン水)に菌数が  $10^5 \sim 10^6 / \text{ml}$  となるように懸濁させ , 菌液とした . ただし , セレウスは 35 ℃ , 7 日間培養後の菌体を 70 ℃ , 20 分間加熱し , 栄養細胞を殺滅した後 , 遠心分離後 , 同様に懸濁させ , 試験液とした .

### 試料の調製

5 cm × 5 cm に切り取ったポリエチレンフィルムの上に菌液 0.5 ml を滴下し , 試料とした .

### 試験操作

試料を水飽和条件に保ったデシケータ - (相対湿度 90% 以上)内及び水を入れないデシケータ - (相対湿度は室内湿度 ; 約 50%) 内に入れ , 30 ℃ で保存し , 保存 17 時間 , 24 時間 , 48 時間(厨房の清掃終了後から翌日の朝 , 更に 1 及び 2 日後を想定)に試料の生菌数を測定した . また , 生菌数測定時に , 菌液が乾燥しているか否かを肉眼観察により確認した .

### 生菌数の測定

試料表面の生残菌を 0.05% ポリソルベート 80 加リン酸緩衝生理食塩水 10 ml で洗い出し , この洗い出し液の生菌数を標準寒天培地を用いた混釈平板培養法 (35 ℃ 2 日間培養)により測定し , 試料当たりに換算した .

## 3. 結果及び考察

ウェットシステム調理施設内の湿度が著しく高くなることから , 高湿度条件下において食品の残渣や跳ね水などに汚染した病原菌 (腸管出血性大腸菌 0157 , サルモネラ , 黄色ブドウ球菌 , セレウス菌) がいかなる挙動を示すかについての想定実験を行い表 1 に示した (表 1) .

### 1) 腸管出血性大腸菌 0157 (無毒株)

精製水に本菌を  $10^5 / \text{ml}$  に接種し , 室温 30 ℃ ・湿度 90% の条件下に置いた場合は , 48 時間まで菌数の変動はみられなかった . しかし , 湿度 50% の条件下に置いた場合は , 17 時間後には  $10 / \text{ml}$  以下に減少した .

0.1% ペプトン水に本菌を  $10^5 / \text{ml}$  に接種し , 室温 30 ℃ ・湿度 90% の条件下に置いた場合は , 17 時間後には  $10^7 / \text{ml}$  に増殖し , 48 時間後も  $10^7 / \text{ml}$  と変化はみられなかった .

しかし、湿度50%の条件下に置いた場合は、24時間後には $10^5$  / mlに減少し、48時間後には $10^4$  / mlに減少した。

0.5%ペプトン水に本菌を $10^5$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^7$  / mlに増殖し、48時間後には $10^8$  / mlまで増殖した。湿度50%の条件下に置いた場合は、24時間後には $10^6$  / mlとやや増殖し、48時間後も $10^6$  / mlを保っていた(図1~3)。

これらの結果から、大腸菌0157は、有機物の無い精製水中では48時間程度であれば増減しないで生残するが、湿度が低く液面が乾燥する場合には、徐々に死滅し、17時間後には10 / ml以下に減少することが明らかとなった。しかしながら、微量でもペプトンとともに存在する場合には、液面が乾燥しなければ増殖することがあり得るばかりか、湿度50%で液面が乾燥しても菌数の減少はみられないか、みられたとしてもごく僅かであることが分かった。

## 2) サルモネラ

精製水に本菌を $10^5$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、48時間まで菌数の変動はみられなかった。しかし、湿度50%の条件下に置いた場合は、24時間後には $10^2$  / ml以下に減少した。48時間後には10 / ml以下に減少した。

0.1%ペプトン水に本菌を $10^5$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^7$  / mlに増殖し、48時間後も $10^7$  / mlと変化はみられなかった。しかし、湿度50%の条件下に置いた場合は、24時間後には $10^3$  / mlに減少し、48時間後には10 / ml以下に減少した。

0.5%ペプトン水に本菌を $10^5$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^7$  / mlに増殖し、48時間後も $10^7$  / mlと変化はみられなかった。湿度50%の条件下に置いた場合は、24時間後まで $10^5$  / mlと変わらなかったが、48時間には $10^4$  / mlとやや減少した(図4~6)。

これらの結果から、サルモネラも大腸菌0157と同様に、有機物の無い精製水中では48時間程度であれば増減しないで生残するが、湿度が低く液面が乾燥する場合には、徐々に死滅することが明らかとなった。また、微量でもペプトンとともに存在する場合には、増殖することがあり得るばかりか、湿度50%で液面が乾燥しても菌数の減少はみられないか、みられたとしてもごく僅かであることが分かった。また、菌数の増減は有機物の濃度が0.1%より0.5%と濃くなると、増殖性も増すばかりか乾燥にもより強くなる傾向が認められた。したがって、大腸菌0157やサルモネラは増殖に適した有機物が微量でも存在する場合には、適当な温度と水分さえあれば急激に増殖するばかりか増殖した本菌は乾燥に対しても強くなることが伺われた。

## 3) 黄色ブドウ球菌

精製水に本菌を $10^5$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、24時間後には $10^4$  / mlとやや減少し、48時間後には $10^3$  / mlに減少した。また、湿度50%の条件下に置いた場合は、17時間後までは $10^5$  / mlと変わらなかったが、24時間後には $10^2$  / mlに減少し、48時間後には $10^2$  / ml以下に減少した。

0.1%ペプトン水に本菌を $10^5$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^6$  / mlに増殖し、48時間後も $10^6$  / mlと変化はみられなかった。しかし、湿度50%の条件下に置いた場合は、48時間後には $10^4$  / mlとやや減少した。

0.5%ペプトン水に本菌を $10^5$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^6$  / mlに増殖し、48時間後も $10^6$  / mlと変化はみられなかった。湿度50%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^6$  / mlにやや増殖し、48時間後も $10^6$  / mlと変化はみられなかった(図7~9)。

これらの結果から、黄色ブドウ球菌はサルモネラや大腸菌0157とやや異なり、有機物の無い精製水中では減少する傾向がみられたが、ペプトンとともに存在する場合には、大腸菌0157やサルモネラと同様に液面が乾燥しても減少しにくい傾向がみられた。

#### 4) セレウス菌(芽胞)

精製水に本菌(芽胞)を $10^4$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、48時間まで菌数の変動はみられなかった。また、湿度50%の条件下に置いた場合であっても、48時間まで菌数の変動はみられなかった。

0.1%ペプトン水に本菌を $10^4$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^6$  / mlに増殖し、48時間後も $10^6$  / mlと変化はみられなかった。しかし、湿度50%の条件下に置いた場合は、24時間後には $10^2$  / mlに減少し、48時間まで $10^2$  / mlと菌数の変動はみられなかった。

0.5%ペプトン水に本菌を $10^4$  / mlに接種し、室温30℃・湿度90%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^6$  / mlに増殖し、48時間後も $10^6$  / mlと変化はみられなかった。しかし、湿度50%の条件下に置いた場合は、17時間後には $10^5$  / mlに増殖したが、24時間には $10^2$  / mlに減少し、48時間後も $10^2$  / mlと変化はみられなかった(図10~12)。

これらの結果から、セレウス菌は有機物の無い精製水中では、たとえ水分が蒸発し乾燥状態に暴露されても芽胞のまま発芽しないで存在するため増減しないで生残するが、適度な温度、水分および有機物とともに存在する場合には、急激に芽胞が発芽増殖し、湿度が低く液面が乾燥する場合には、乾燥によって生菌(栄養細胞)が徐々に死滅することが明らかとなった。

以上、ドライシステムの衛生面での有効性を調べることを目的として、高湿度ならびに乾燥条件下における病原菌の挙動を調べた結果、腸管出血性大腸菌0157およびサルモネラは、室温30℃・湿度90%の条件下では、栄養成分の全くない精製水中で菌数の減少は認められなかったが、湿度50%の条件下では死滅した。また、精製水に有機物であるペプトンを僅かに加えた場合は、湿度90%では増殖し、湿度50%では増殖はみられなかったが減少もみられなかった。また、黄色ブドウ球菌およびセレウス菌も同様の傾向を示した。

以上の結果から、ウェットシステム調理施設内のように湿度が高い場合は、病原菌は迅速に増殖することが明らかとなった。また、ドライシステム調理施設内のように乾燥している場合は、有機物が残存していない場合は、病原菌は比較的速やかに死滅するが、清掃、洗浄など衛生管理が不良で食品残渣など有機物が存在する場合には、

乾燥状態であっても菌は減少せず長時間生存することが分かった。

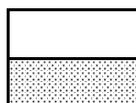
表-1 ポリエチレンフィルムに滴下した菌液の生菌数測定結果; 30 保存

試験菌	菌液調製溶液	湿度	試料当たりの生菌数			
			開始時	17時間後	24時間後	48時間後
大腸菌 (O157:H7)	精製水	90%	$1.3 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$	$8.2 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$
		50%	$1.3 \times 10^5$	10	10	10
	0.1%ペプトン水	90%	$1.6 \times 10^5$	$1.2 \times 10^7$	$9.4 \times 10^6$	$1.4 \times 10^7$
		50%	$1.6 \times 10^5$	$1.6 \times 10^7$	$8.8 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$
	0.5%ペプトン水	90%	$1.4 \times 10^5$	$4.6 \times 10^7$	$2.1 \times 10^7$	$4.2 \times 10^8$
		50%	$1.4 \times 10^5$	$2.4 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$
サルモネラ	精製水	90%	$2.0 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
		50%	$2.0 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	80	10
	0.1%ペプトン水	90%	$2.5 \times 10^5$	$3.4 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$
		50%	$2.5 \times 10^5$	70	$3.3 \times 10^3$	10
	0.5%ペプトン水	90%	$2.3 \times 10^5$	$6.5 \times 10^7$	$8.6 \times 10^7$	$7.3 \times 10^7$
		50%	$2.3 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$	$2.7 \times 10^5$	$2.5 \times 10^4$
黄色ブドウ球菌	精製水	90%	$2.2 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$	$5.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^3$
		50%	$2.2 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$7.0 \times 10^2$	80
	0.1%ペプトン水	90%	$3.8 \times 10^5$	$2.5 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$
		50%	$3.8 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$	$5.0 \times 10^4$
	0.5%ペプトン水	90%	$2.1 \times 10^5$	$3.2 \times 10^6$	$3.2 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$
		50%	$2.1 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$7.7 \times 10^4$	$1.5 \times 10^6$
セレウス (芽胞)	精製水	90%	$6.9 \times 10^4$	$5.0 \times 10^3$	$8.9 \times 10^3$	$4.0 \times 10^4$
		50%	$6.9 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$
	0.1%ペプトン水	90%	$6.7 \times 10^4$	$1.2 \times 10^6$	$7.9 \times 10^5$	$1.9 \times 10^6$
		50%	$6.7 \times 10^4$	$6.8 \times 10^2$	$6.7 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$
	0.5%ペプトン水	90%	$4.5 \times 10^4$	$6.5 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$	$8.3 \times 10^6$
		50%	$4.5 \times 10^4$	$3.5 \times 10^5$	$2.9 \times 10^2$	$3.1 \times 10^2$

湿度90%: 水飽和デシケータ - 内

湿度約50%: 恒温器内

目視による菌液の乾燥状態



乾燥していない

完全に乾燥している

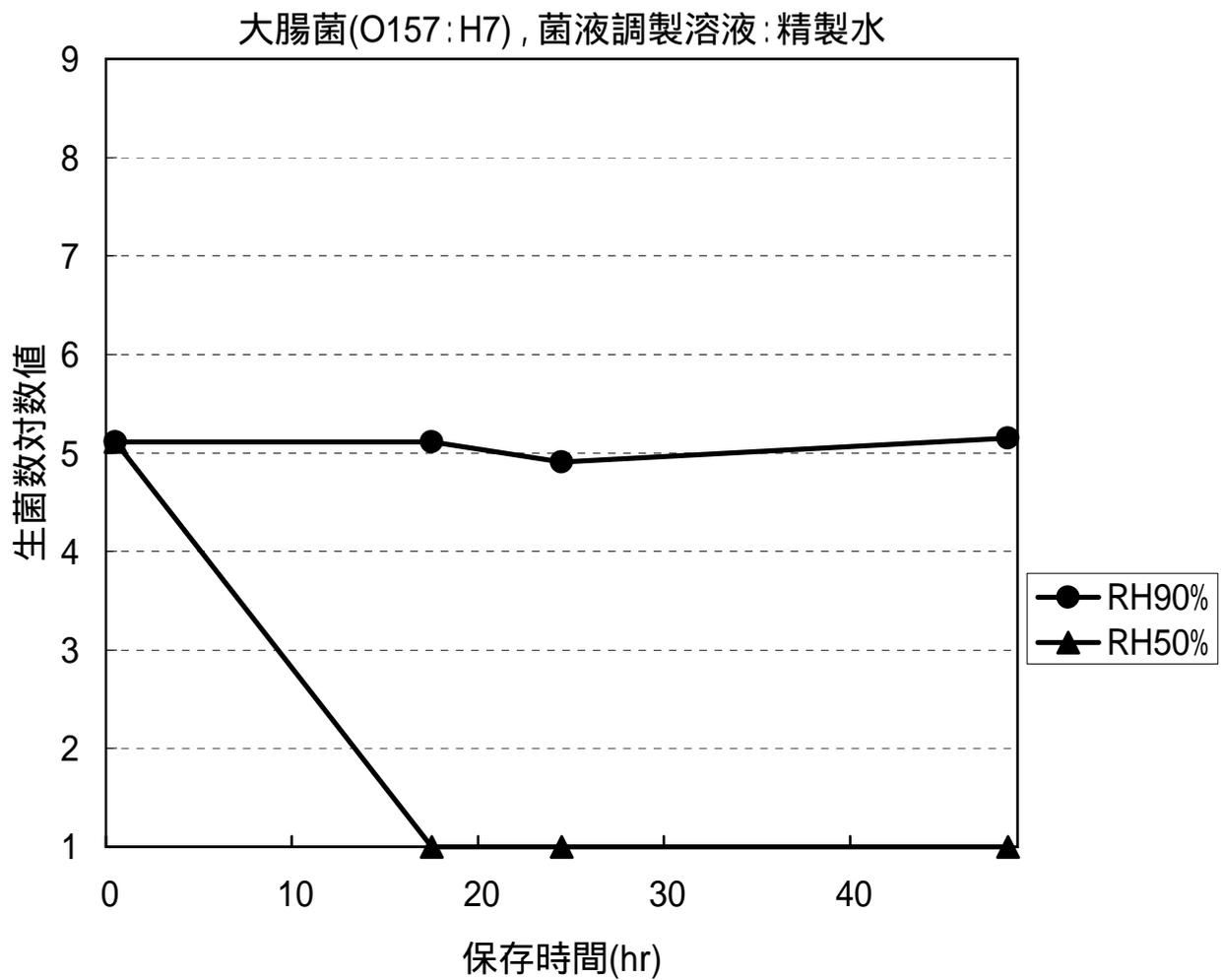


図-1 ポリエチレンフィルム上に滴下した大腸菌(O157:H7)菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:精製水)

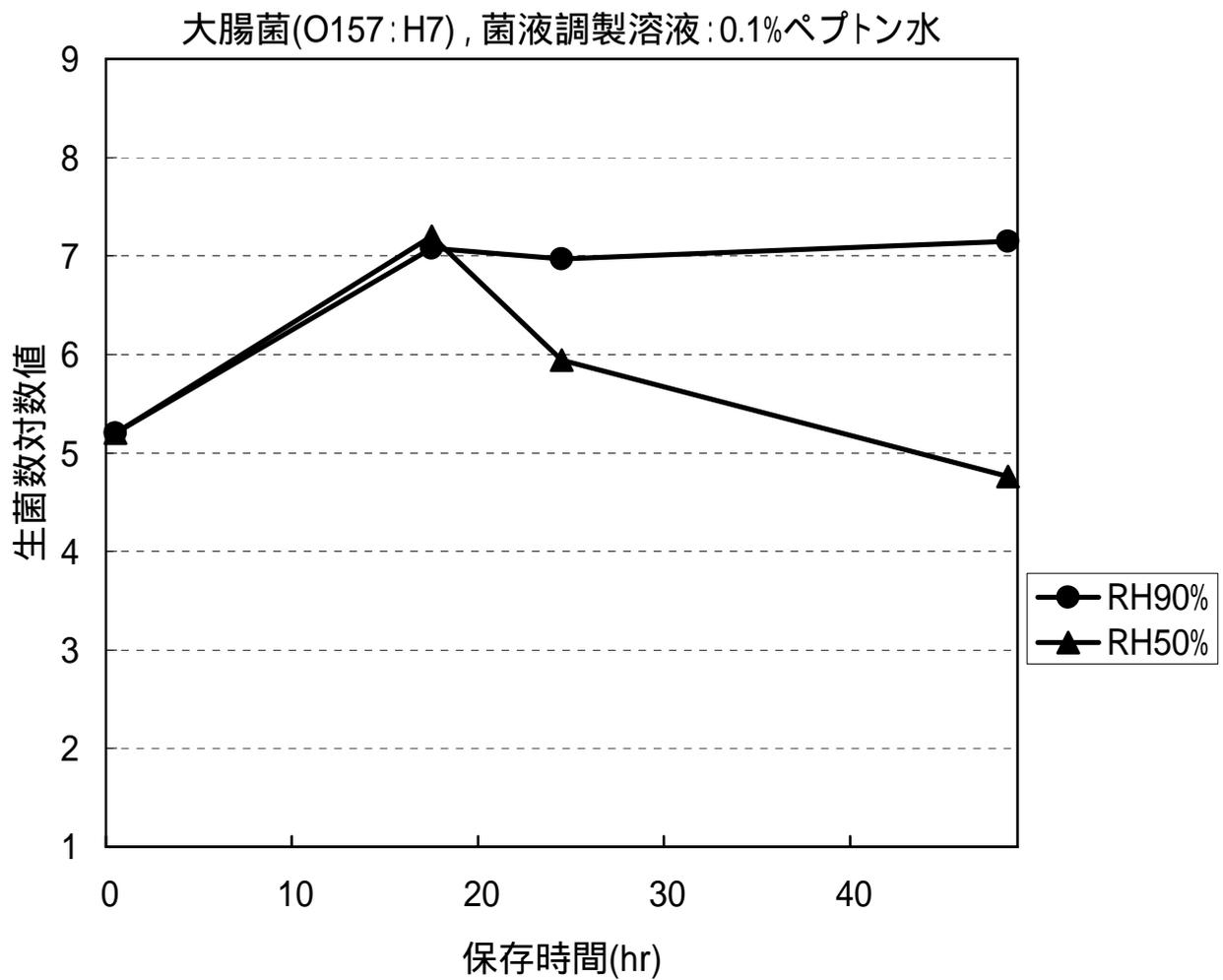


図-2 ポリエチレンフィルム上に滴下した大腸菌(O157:H7)菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:0.1%ペプトン水)

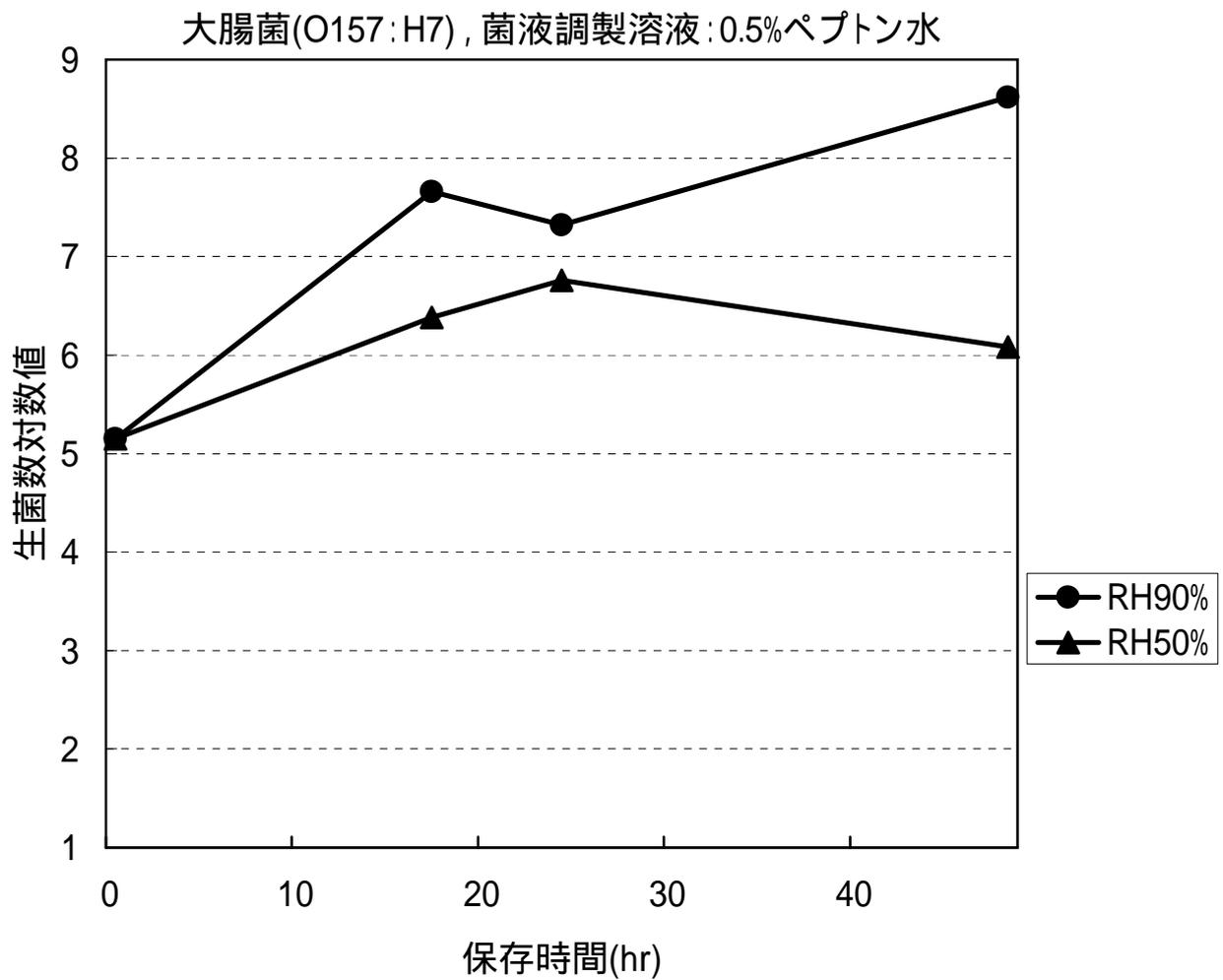


図-3 ポリエチレンフィルム上に滴下した大腸菌(O157:H7)菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:0.5%ペプトン水)

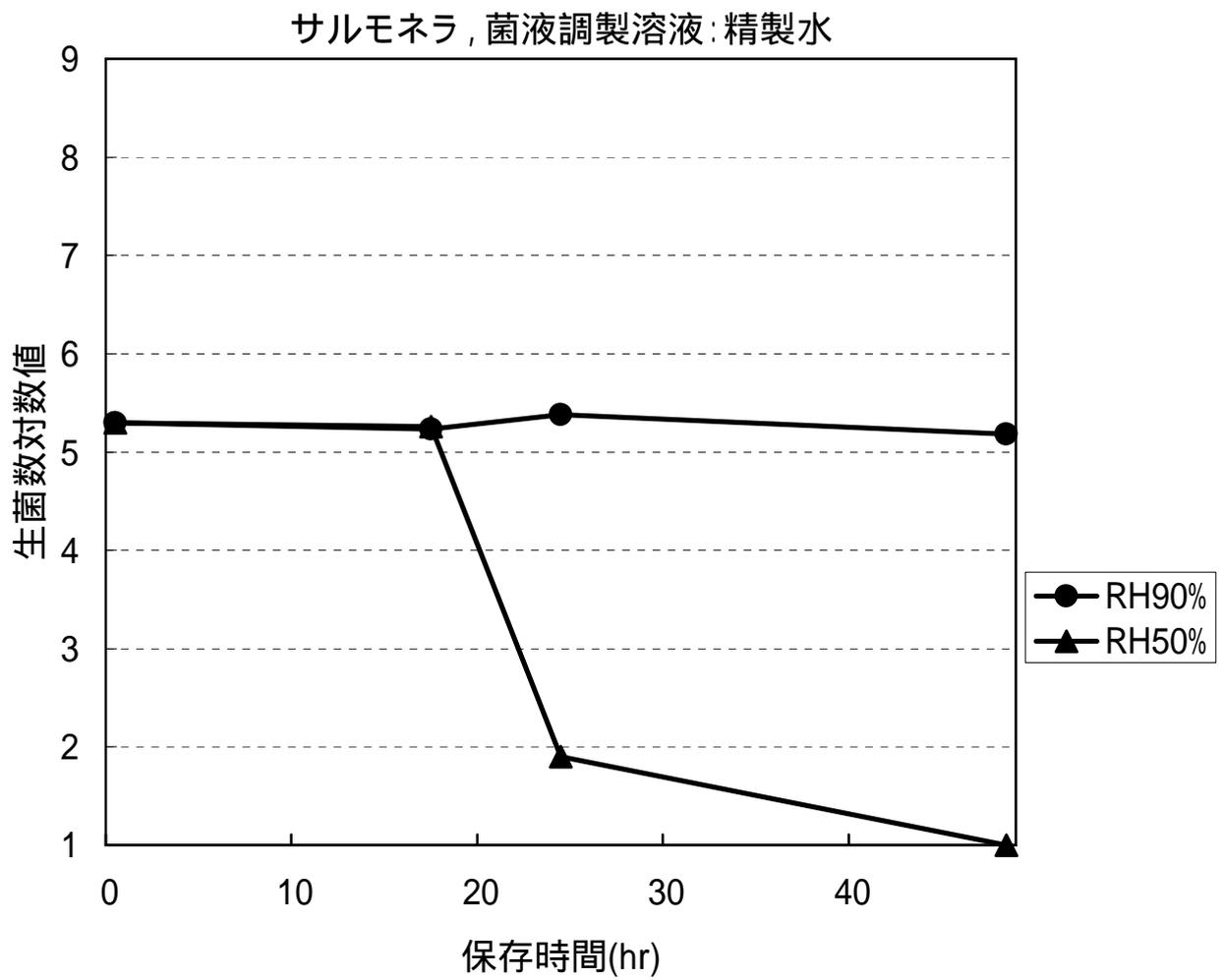


図-4 ポリエチレンフィルム上に滴下したサルモネラ菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液: 精製水)

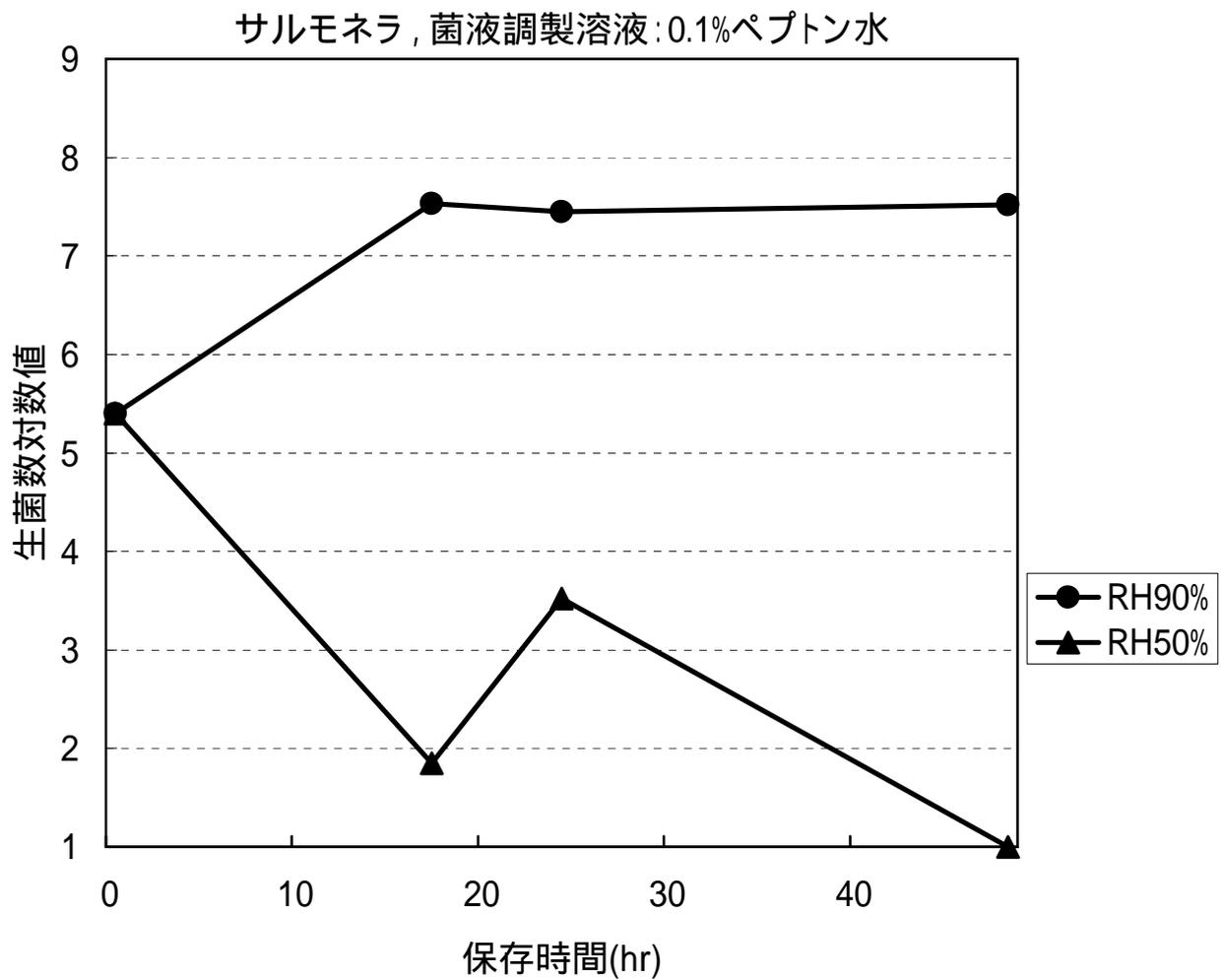


図-5 ポリエチレンフィルム上に滴下したサルモネラ菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:0.1%ペプトン水)

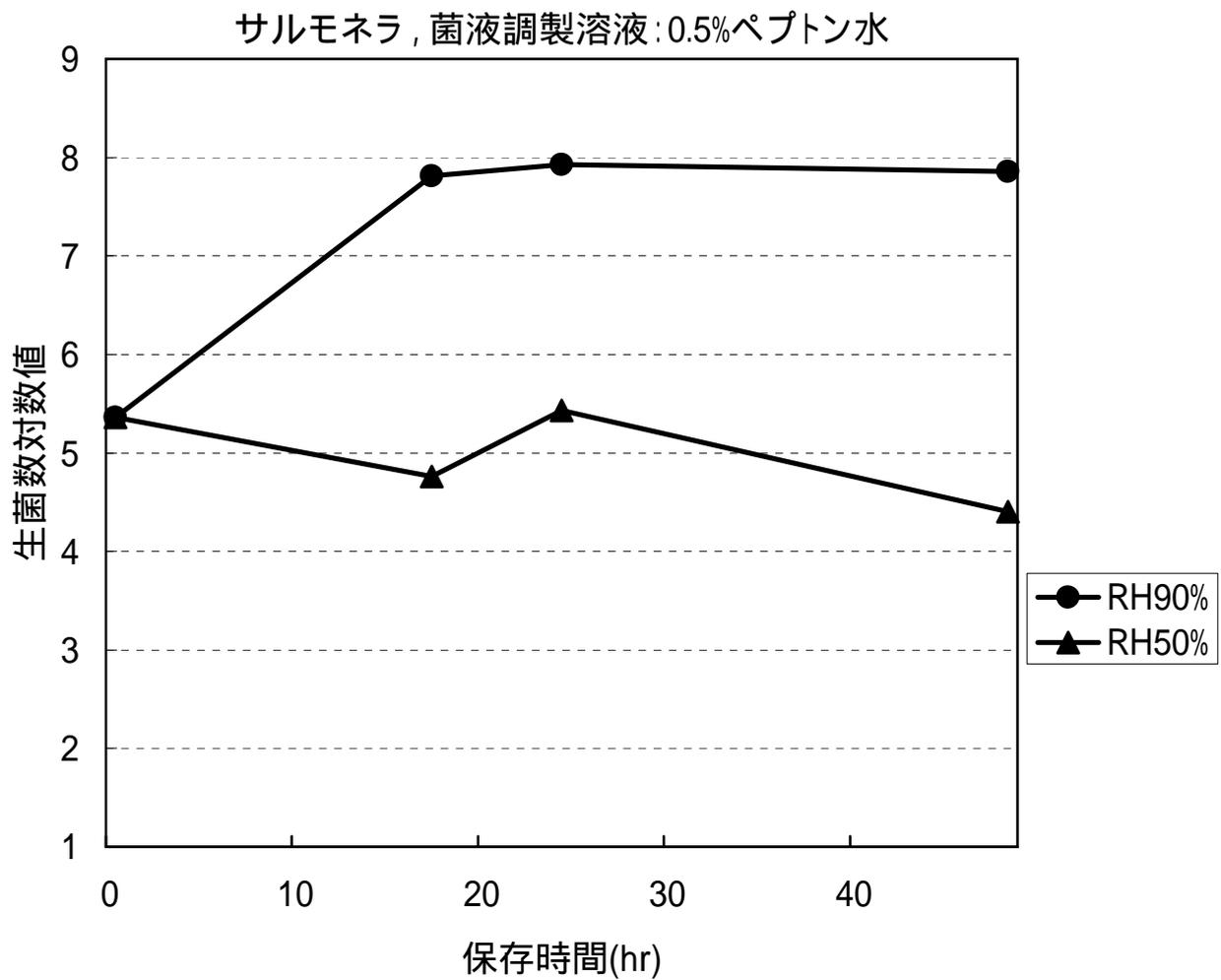


図-6 ポリエチレンフィルム上に滴下したサルモネラ菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:0.5%ペプトン水)

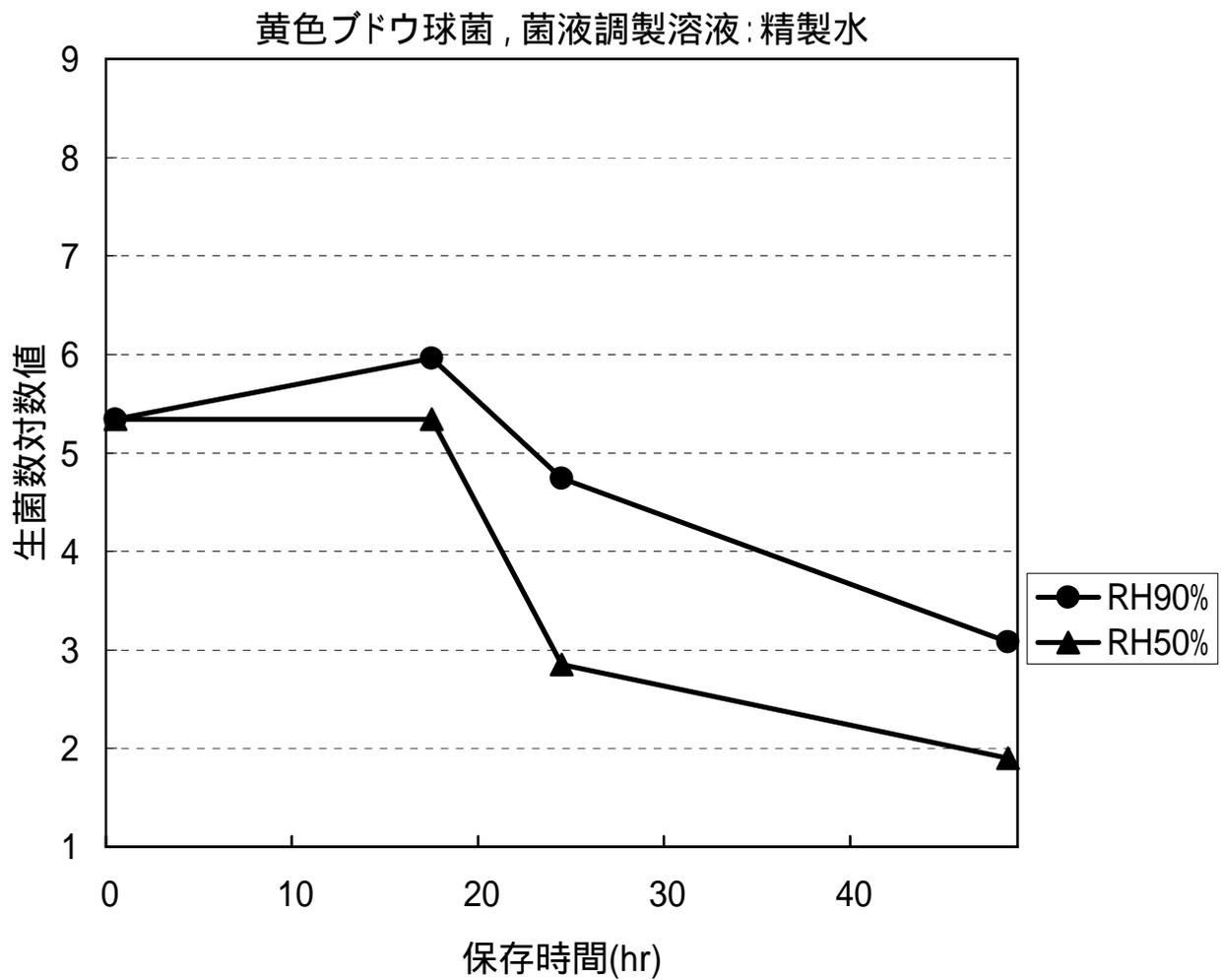


図-7 ポリエチレンフィルム上に滴下した黄色ブドウ球菌菌液の生菌数経時変化(30 保存，菌液調製溶液：精製水)

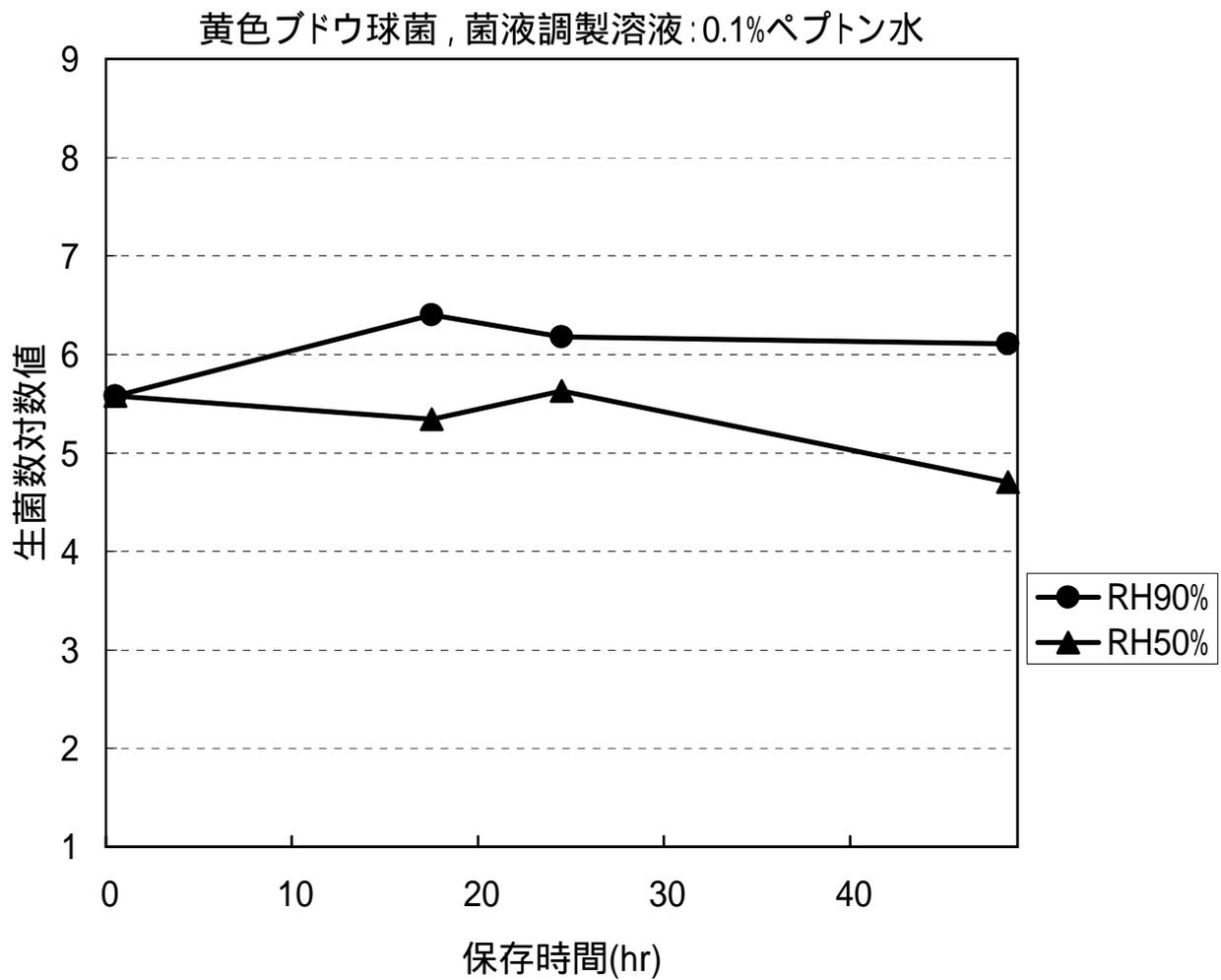


図-8 ポリエチレンフィルム上に滴下した黄色ブドウ球菌菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:0.1%ペプトン水)

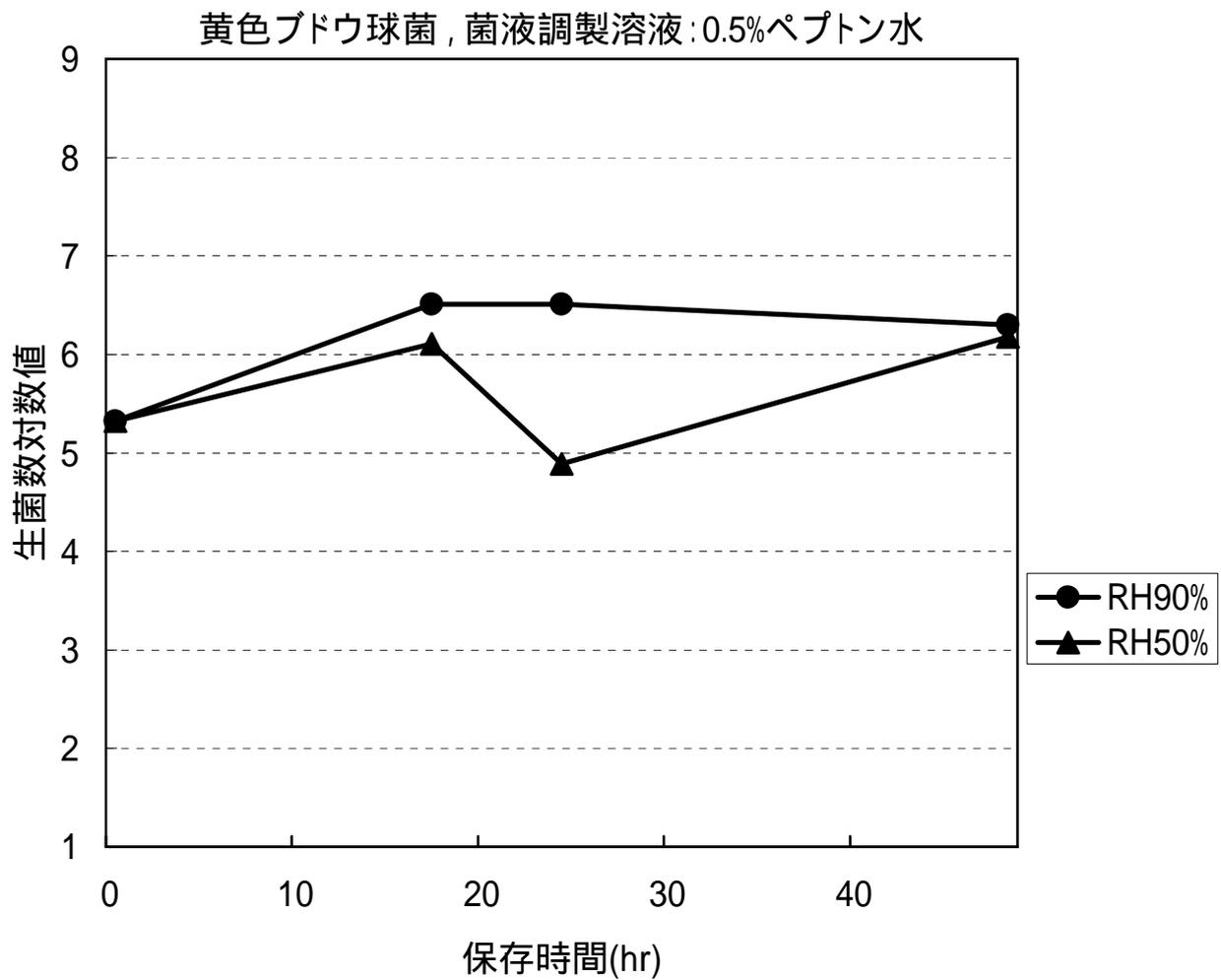


図-9 ポリエチレンフィルム上に滴下した黄色ブドウ球菌菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:0.5%ペプトン水)

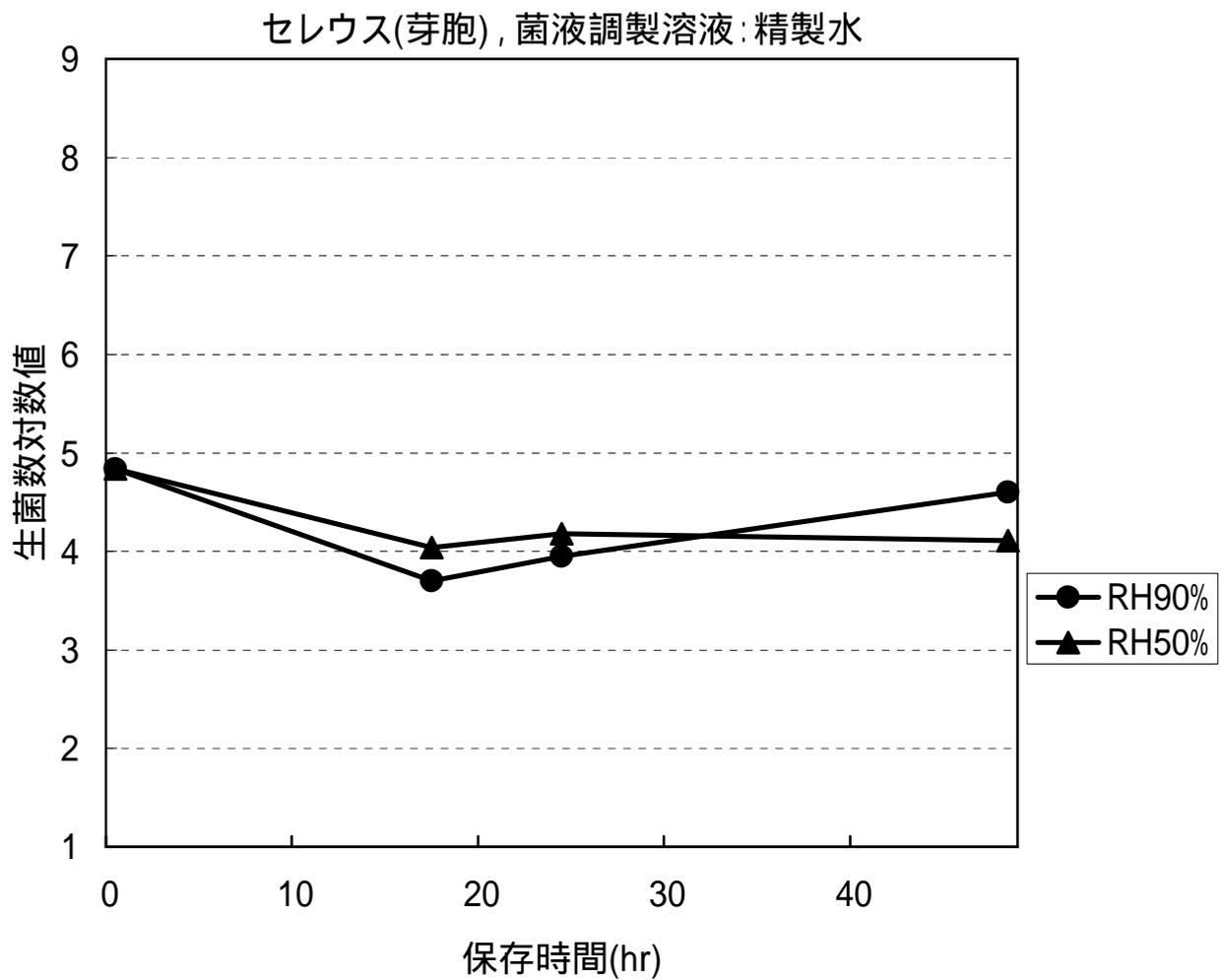


図-10 ポリエチレンフィルム上に滴下したセレウス(芽胞)菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液: 精製水)

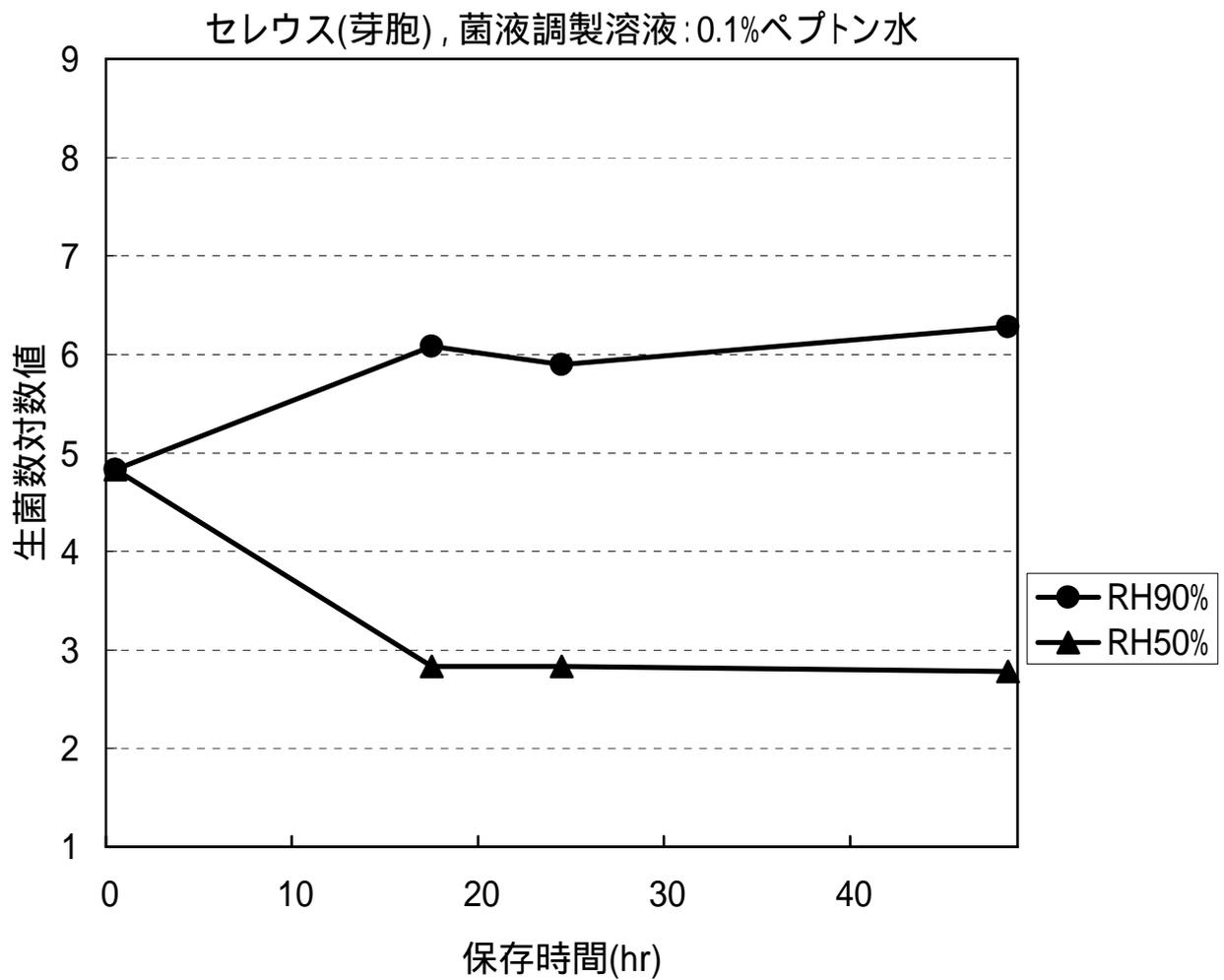


図-11 ポリエチレンフィルム上に滴下したセレウス(芽胞)菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:0.1%ペプトン水)

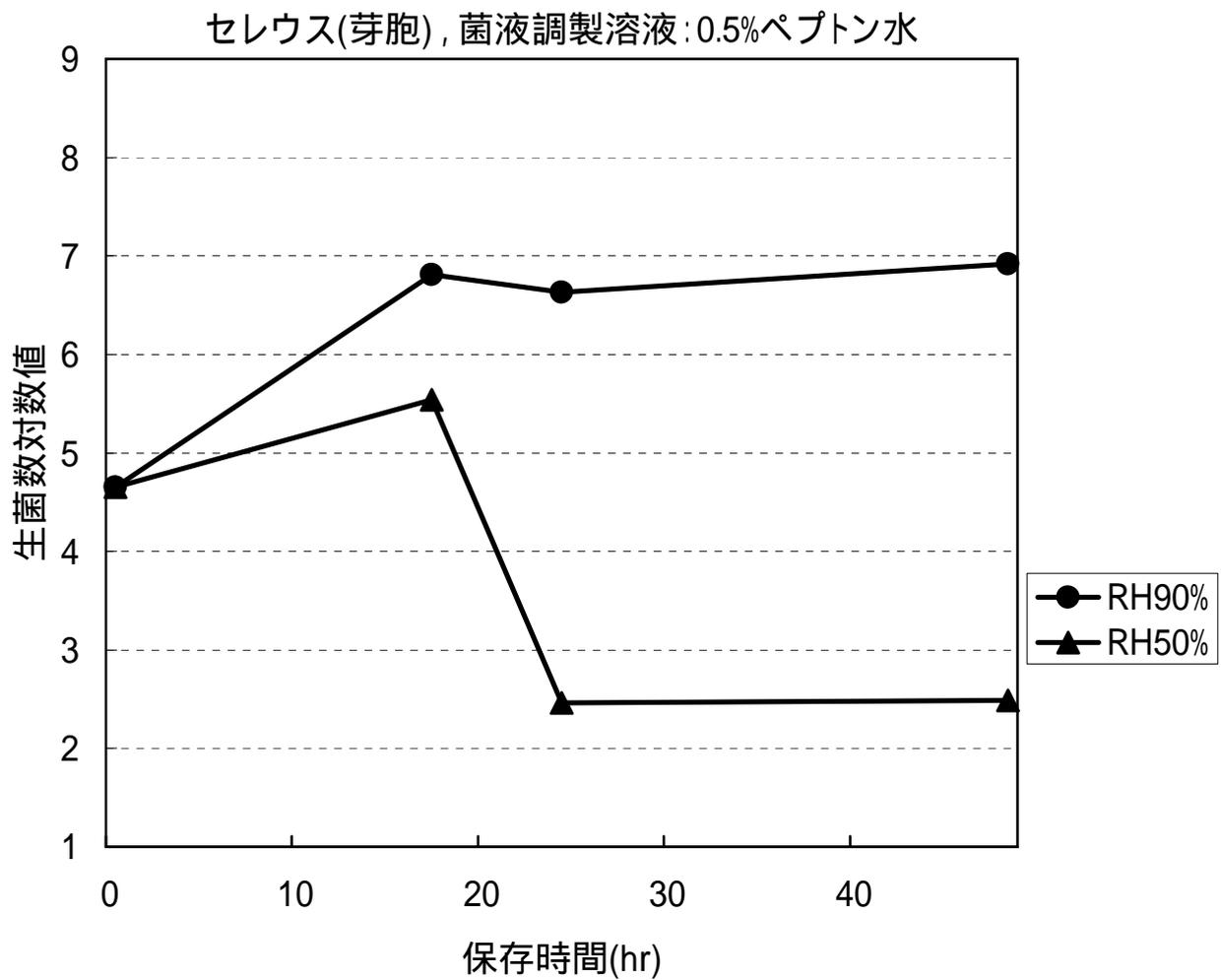


図-12 ポリエチレンフィルム上に滴下したセレウス(芽胞)菌液の生菌数経時変化(30 保存, 菌液調製溶液:0.5%ペプトン水)