

塩蔵魚介類の細菌学的研究 (I)

市販の塩辛からの好気性グラム陽性球菌の検索

Bacteriological Studies of the Salted Fish and Shellfish (I)

Inspection of aerobic gram-positive cocci
in Shiokaras on the market

友 松 滋 夫
加 藤 保 子

緒 言

食品を保存する場合の食塩による防腐効果については古くから研究されており、食塩水による脱水作用、すなわち浸透作用によって塩蔵する食品および細菌からの脱水が食塩の防腐作用と考えられてきている。

しかしいかの塩辛の熟成はその初期においてはいかの肝臓に含まれる酵素の作用によって自己消化という形で主として進められるが、後半は細菌の働きによるところが多いことを長尾・木村³⁾は報告している。その報告の中で塩辛中にみられる細菌は、熟成時期によっては1g中に 10^6 から 10^7 におよぶと述べている。このような著しい菌数が検出されてはいるが、塩辛は通例10%以上の食塩を含んでおり、無塩時の細菌叢とはかなり異っていて、耐塩性の細菌からなるものと考えられる。

そこで高濃度に食塩を含んでいる市販の塩辛に存在する細菌叢を明らかにするために、まず好気性のグラム陽性球菌についての検索を試みたので報告する。

実験材料および方法

市販の「塩辛」A, B, C, D, E, Fの6種を店頭で購入し、速かに実験に用いた。これら6種の材料から白金耳を用いて少量を採取し、普通寒天培地に接種し、 37°C にて48時間好気的に培養した。発育した集落を釣菌塗沫、グラム染色を実施し、グラム陽性球菌の確認されたものをさらに普通寒天培地に接種、保存し、次の各種の生物学的性状の検査に用いた。

普通寒天培地で 37°C 、24時間培養後、集落の大きさ、色調、硬さを観察した。さらに色素の産生については、スタヒロコッカス培地 No. 110 を用いて観察した。

第1表 好気性、グラム陽性の球菌の検索に用いた資料

資料記号	塩辛材料	製造年月日	添加物の標示
A	かつを	昭46. 10. 5	なし
B	いか	昭46. 11. 17	なし
C	いか	昭46. 7. 19	なし
D	いか	不明	合成殺菌料, 保存料, 着色料
E	いか	不明	合成甘味料, 酸化防止剤
F	いか	不明	合成着色料, 保存料, 酸化防止剤

ブドウ糖, 乳糖およびマンニット分解能の検査

ブドウ糖検査用ビオテストディスクを一枚ずつ小試験管にとり, 水 0.5 ml ずつを加えて濾紙中の成分を充分溶出させる。これに24時間培養の被検菌を接種し, 接種後 37°C にて6時間培養後, 試験液が黄変したものを陽性と判定し, 赤色にとどまり, 陰性と認めたものはさらに 37°C にて1夜おいて判定した。

乳糖およびマンニット分解能についても同様の検査を行なった。

硝酸塩還元能の検査

ビオテストディスク法を用いて行なった。菌の接種は, 糖分解能判定法と同様の方法で試験液に接種した。接種後 37°C に30~40分おいた後, 第1液 (サルファニリン酸 0.8 g / 5N 酢酸溶液 100cc) および第2液 (アルファナフチラミン 0.5 g / 5N 酢酸溶液 100cc) をそれぞれ1滴ずつ加えて赤色を呈するときを陽性と判定した。

コアグラージェテスト

ウサギプラズマ 1ml に滅菌生理食塩水 7ml を加えて溶かし, このプラズマ溶液 0.5ml ずつを小試験管に分注し, 24時間培養の被検菌を1白金耳ずつ接種し, よく混ぜる。37°C にて3時間培養後, プラズマ溶液が凝固したものを陽性と判定した。

実験結果および考察

市販になっている6種の塩辛から各種の細菌の発育が見られたが, その中でも好気性グラム陽性の球菌について検索した結果, これら塩辛のすべてから, 全部で13株の菌が分離された。これら13株の菌の形態, 生物学的性状を観察した結果を一括して第2表に示した。

一般的に, 普通寒天培地上では発育が悪く, 色素の産生の確認が困難なものが多かったが, スタヒロコッカル培地 No. 110 の上ではその確認が容易であった。硝酸塩の還元は, ブドウ状の球菌では9株中7株の多くの菌株にみられたが, 4連状, 双球状の球菌ではみられなかった。コアグラージェの存在は13株のすべての球菌に認められなかった。マンニットの発酵は双球状の球菌1株とブドウ状の球菌2株にみられた。乳糖の発酵はブドウ状の球菌9株中6株の多

第2表 塩辛中の好気性グラム陽性の球菌の形態および生物学的諸性状の
検索結果と推定される菌属名

菌株番号	菌資料 株分離号	普通寒天培地上の集落			スタヒロ コッカス 培地 No.110 上の 色素の 産生	グ ラム 染色	菌 の 形 態	硝 酸 塩 の 還 元	コ ア グ ラ ー ゼ	糖の発酵			推定菌属名
		大きさ	色調	硬さ						マ ニ ツ ト	乳 糖	ブ ド ウ 糖	
No. 1	A	針先大	白	脂状	淡黄色	+	ブドウ状 球菌	+	-	-	-	A	<i>Staphylococcus</i> 属
No. 2	A	針先大	灰白	脂状	レモン	+	ブドウ状 球菌	+	-	-	A	A	<i>Staphylococcus</i> 属
No. 3	B	針先大	レモン	脂状	黄	+	4連状 球菌	-	-	-	-	A	<i>Gaffkya</i> 属
No. 4	B	針先大	白	粘稠	黄	+	双球状 球菌	-	-	A	-	A	<i>Micrococcus</i> 属
No. 5	B	針先大	灰白	脂状	橙	+	ブドウ状 球菌	-	-	A	-	A	<i>Staphylococcus</i> 属
No. 6	C	針先大	白	脂状	黄	+	ブドウ状 球菌	+	-	-	A	A	<i>Staphylococcus</i> 属
No. 7	C	針先大	白	脂状	淡橙	+	ブドウ状 球菌	+	-	-	A	A	<i>Staphylococcus</i> 属
No. 8	D	米粒大	黄	脂状	黄	+	4連状 球菌	-	-	-	-	A	<i>Gaffkya</i> 属
No. 9	D	針先大	白	脂状	橙	+	ブドウ状 球菌	+	-	-	A	A	<i>Staphylococcus</i> 属
No. 10	D	針先大	橙	脂状	橙	+	ブドウ状 球菌	-	-	-	-	A	<i>Staphylococcus</i> 属
No. 11	E	針先大	黄	脂状	黄	+	双球状 球菌	-	-	-	-	A	<i>Micrococcus</i> 属
No. 12	E	米粒大	白	粘稠	橙	+	ブドウ状 球菌	+	-	-	A	A	<i>Staphylococcus</i> 属
No. 13	F	米粒大	白	粘稠	白	+	ブドウ状 球菌	+	-	A	A	A	<i>Staphylococcus</i> 属

くに認められたが、4連状、双球状の球菌では認められなかった。ブドウ糖の発酵は分離した13株の球菌のすべてに認められた。

以上のように、13株の球菌が示したそれぞれの形態、生物学的諸性状などから *Bergey* の分類法に従って、その細菌の属名を判定した結果は第2表に記入した通りである。すなわち、菌株番号 No. 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13の9株は *Staphylococcus*属、菌株番号No. 3, 8の2株は *Gaffkya* 属、菌株番号No. 4, 11の2株は *Micrococcus* 属と考えられた。

長尾・木村⁴⁾はいかの塩辛の自家熟成中のものから好気性菌8株を分離しているが、その中で *Micrococcus perflavus*, *Microc. freudenreichii*, *Microc. flavus*, *Microc. subflavescens* の4株の *Micrococcus* 属を分離している。またその時に塩辛熟成より5日ないし8日目位までの初期には桿菌が、特に有芽胞桿状菌が多くみられ、8日目以降では球菌がよくみられ、特に *Micrococcus* 属が多いことを観察している。

私共が実験に用いた市販の塩辛は製造されてから早いもので3ヶ月、遅いものでは7ヶ月を経過しており、熟成もかなり進んでいるものと考えられる。かかる材料をもちいたためか、6種の塩辛のすべてから好気性のグラム陽性の球菌が分離されたが、13株中9株が *Staphylococcus* 属であり、*Micrococcus* 属は、先の報告のように多くはみられず、2株に過ぎな

った。また *Gaffkya* 属と思われる2株もみられた。

中村は⁵⁾海洋固有細菌として球菌類に *Micrococcus pikowskyi*, *Microc. halophilus*, *Microc. flavus*, *Microc. citreus*, *Microc. varians*, *Microc. aurantiacus*, *Microc. candidus*, *Sarcina lutea*, *Rhodococcus agilis*, *Staphylococcus citreus*, *Microc. conglomeratus*, *Microc. subcitreus* の菌種があり、多くの *Micrococcus* 属が存在することを記している。従って魚介類はその取扱いによってはこれらの菌の汚染を非常に受け易いものと思われる。

本実験では前述のように多くの *Staphylococcus* 属が検出され、*Micrococcus* 属は比較的少なかった。これら分離された多くの *Staphylococcus* 属がどこから由来したものか、すなわち塩辛の原料であるいかや鰹にもともと寄生していた細菌なのか、海洋中に生棲する細菌の汚染によるものか、または製造工程における自然あるいは、人の手指からの汚染によるものなのか、この実験では不明であるが、非常に興味ある問題である。

さらに、これら分離した13株の球菌の耐食塩濃度を測定した結果を第3表に示したが、

第3表 塩辛中の好気性、グラム陽性の球菌、13株の耐食塩濃度の測定結果

菌 属 名	菌株番号	普通寒天培地に添加した食塩濃度					
		5%	10%	15%	20%	25%	30%
<i>Staphylococcus</i> 属	No. 1	+	+	+	+	-	-
	No. 2	+	+	+	+	+	-
	No. 5	+	+	+	+	-	-
	No. 6	+	+	+	+	+	-
	No. 7	+	+	+	+	-	-
	No. 9	+	+	+	+	-	-
	No. 10	+	+	+	+	-	-
	No. 12	+	+	+	+	-	-
	No. 13	+	+	+	-	-	-
<i>Gaffkya</i> 属	No. 3	+	-	-	-	-	-
	No. 8	+	+	+	-	-	-
<i>Micrococcus</i> 属	No. 4	+	+	+	+	-	-
	No. 11	+	-	-	-	-	-

+ : 菌が発育したもの、- : 菌が発育しなかったもの。

Staphylococcus 属は15%まで耐えるものが1株、20%まで耐えるものが6株、25%まで耐えるものが2株であった。*Micrococcus* 属は5%まで耐えるもの1株、20%まで耐えるもの1株であった。*Gaffkya* 属は5%まで耐えるもの1株、15%まで耐えるもの1株であった。

Micrococcus 属, *Gaffkya* 属については, その数値を比較に用いるには菌株数があまりに少ないが, 限られた分離13株の中では *Staphylococcus* 属は食塩耐性が比較的高い傾向を示した。

通例, 市販の塩辛の食塩濃度は5~15%程度であるので, 分離された *Staphylococcus* 属はこれら食品中で充分生育ができるものと考えられた。清水は塩蔵魚介の腐敗について述べているが, その中で, 5~7%の食塩濃度では鮮魚の2倍程度の貯蔵可能期間をもつにすぎない。また20%の食塩濃度でも20°Cで20日内外で腐敗が認められるようになる。常温において腐敗をとめるには魚肉に対して約25%の食塩濃度の必要なことを指摘している。私共もこの実験から同じように25%以上の可成り高い食塩濃度が必要なことを知った。

先述のように, 中村は海洋中に多くの *Micrococcus* 属が存在すると述べているが, これらの *Micrococcus* 属について寺田らは^{7),8),9),10)}, 水産食品の腐敗過程におけるマイクロフローラの中に *Micrococcus* 属のあることを認め, むしろ腐敗の原因菌の1つと考えている。このような菌が検出される塩辛を製造後, 長期間置いたり, 室温などの比較的暖かいところに放置したりしているのをよく見かけるが, その保存について今少し考慮を要するものと思われた。さらに, この実験では比較的簡便な方法によって菌の検索を試みたが, それでも多くのブドウ球菌が検出された。しかし幸いにも, これらブドウ球菌中には病原性ブドウ球菌の疑いのあるものは認められなかった。

われわれは日常塩辛の珍味を, 衛生学的にはそれほど考えずに賞味してきているが, 以上のような観察結果から, これら食品の製造過程, 食塩添加量, 製品の取扱法には細心の注意を要することを改めて知った。

結 論

1. 市販になっている6種の塩辛から, 特に好気性, グラム陽性の球菌について検索を試みた。その結果これらの塩辛すべてから, 球菌が13株検出された。これら13株の球菌は, *Staphylococcus* 属が9株, *Gaffkya* 属が2株, *Micrococcus* 属が2株であった。
2. またこれら13株の球菌の耐食塩濃度を測定した結果, *Staphylococcus* 属は15~25%, *Micrococcus* 属は5~20%, *Gaffkya* 属は5~15%の耐食塩濃度を示した。

文 献

- 1) Lindet : C. R. Acad. Sci., 155, 790 (1912)
- 2) Rockwell and Ebertz : J. Inf. Dis., 35, 573 (1924)
- 3) 長尾 清, 木村喬久 : 北海道大学水産学部研究彙報 1, 145 (1951)
- 4) 長尾 清, 木村喬久 : 水産学雑誌 54, 21 (1949)
- 5) 中村 浩 : 微生物学ハンドブック, p 616, 技報社, 昭和39年

- 6) 清水 潮：食品衛生学事典, p 89, 医歯薬出版, 昭和47年
- 7) 寺田安一：腐敗中毒, p 20, 建帛社, 昭和46年
- 8) 宮木高明：モダン・メディア, 7, 343 (1961)
- 9) 高瀬 明：水産食品衛生, p 204, 新紀元社, 昭和31年
- 10) Maltshewsky, N. & Partmann, W. : Arch. Mikrobiol., 16, 252 (1951)