

## 資料

ラピッドメディア-DO による生鮮食品中の  
大腸菌群迅速検査

秋山 久美子, 小此木 成夫\*

(昭和女子大学短期大学部, \* 昭和女子大学大学院生活機構研究科)

原稿受付平成 15 年 8 月 22 日; 原稿受理平成 16 年 2 月 23 日

## Rapid Test for Coliforms in Fresh Foods Using Rapid Media-DO

Kumiko AKIYAMA and Shigeo OKONOJI\*

*Junior College of Showa Women's University, Setagaya-ku, Tokyo 154-0004**\* Graduate School of Practical Science, Showa Women's University, Setagaya-ku, Tokyo 154-0004*

The ability to detect coliform microorganisms was compared between the method using Rapid Media-DO (RM-DO) and two conventional methods (desoxycholate agar and BGLB broth) in 36 fresh food items (meat, fish, and vegetables). The numbers of microorganisms detected by the Rapid Media-DO method were then correlated with those by the two conventional methods. Although there was no difference between the numbers detected by the RM-DO desoxycholate agar methods, the numbers were significantly greater than those detected by the method using BGLB broth. These results indicate that the Rapid Media-DO method would be applicable to rapidly check meat, fish, and vegetable samples for coliform contamination.

(Received August 22, 2003; Accepted in revised form February 23, 2004)

**Keywords:** coliform 大腸菌群, food 食品, test 検査, Rapid Media-DO (RM-DO) ラピッドメディア-DO.

## 1. 緒言

近年, 牛の BSE 感染, 残留農薬基準違反, 黄色ブドウ球菌毒素による食中毒など, 食の安全を脅かす事故・事件が相次いで発生した。消費者は食品産業全体に対して不信感を募らせており, 食品を選択する際に安全性を重視する傾向を強めている。行政においても食品安全基本法が制定され, 今後ますます食品の安全性への社会的な関心が高まるとわれ, 食品製造者, 販売者に対して品質確保への一層の取り組みが要求されている。

販売に供される食品の微生物的品質を確保・向上するためには, 製造工程の衛生管理とともに, その検証のための微生物検査が不可欠である。しかしながら, 一般的な培養方法による微生物検査は長時間を要するため, 微生物的品質の早期把握および事故拡大防止等の観点から, 迅速かつ簡便な検査法が求められており, 様々な迅速検査法が開発・市販されている<sup>1)</sup>。

本報のラピッドメディア-DO (RM-DO) 培地<sup>2)</sup>および X-GAL 試液<sup>2)</sup> (森永乳業(株) 製造・販売) も大腸菌群の迅速検査用に市販され, 主に牛乳等の飲用乳の検査に使用されている。

大腸菌群は食品衛生管理上の重要な汚染指標菌であり, 乳製品や清涼飲料水等においては, 食品衛生法によりその基準が成分規格として定められている。

生鮮食品は非加熱であるため大腸菌群が検出されやすく, 食品衛生法における規格基準や衛生規範は定められていない。しかしながら, 自治体によっては指導基準を定め製造業者に対して衛生指導をはかっており, 菌数を迅速に把握することが重要となっている。このため, 今回生鮮食品である肉類, 鮮魚類, 野菜類を対象としてその大腸菌群迅速検査に RM-DO 培地および X-GAL 試液を組み合わせた検出法 (以下 RM-DO 法) を適用し, 実用性を検討したので報告する。

なお, 実用性の確認は, 大腸菌群の検査に一般的に

表 1. 実験用食材の内訳

肉類	
黒豚赤身 (カレー・酢豚用)	鹿児島黒豚もも・肩角切り
黒豚 (とんかつ・ソテー用)	鹿児島黒豚ももうす切り
黒豚薄切り A**	鹿児島黒豚ひき肉
黒豚薄切り B**	高座豚ブロック肉
黒豚赤身ひき肉	高座豚 (生姜焼用)
国産黒豚赤身ひき肉	国産豚ひき肉
鮮魚類	
めばちマグロ (生) 赤身サク	真あじ* A**
めばちマグロ (生) 赤身刺身	真あじ* B**
めばちマグロ (解凍) 切り落とし	地あじ*
本まぐろ (生) 赤身サク	あじ刺身
本まぐろ (生) 赤身刺身	あじたたき A**
まぐろ (ねぎとろ用)	あじたたき B**
野菜類	
チンゲンサイ*	キャベツ* A**
カットチンゲン菜 (加熱調理用)	キャベツ* B**
レタス*	キャベツ炒め
チョップレタス	カットキャベツ (加熱調理用)
カットレタス	カットキャベツ (サラダ用)
サンチュ (葉・袋入り)	千切りキャベツ (生食用)

\*未加工の食材, \*\*A, Bは購入日が異なる。

用いられているデソキシコーレイト寒天培地および BGLB 培地による培養法と比較することにより行った。

## 2. 実験材料および方法

### (1) 実験材料

#### 1) 実験用食材

世田谷区内のスーパーマーケット4店より購入した生鮮食品 (表1) 3種類 (肉類, 鮮魚類, 野菜類, 各12検体), 36検体を実験用食材として使用した。なお, 食材名は販売店が貼付したラベルに記載されている内容に従った。

#### 2) 培地および試液

##### i) RM-DO 培地および X-GAL 試液

RM-DO 培地は, デソキシコーレイト寒天培地に準じた粉末成分を所定量より 5% 以上多い水量で溶解し, シャーレに分注・固化した後余剰水分を乾燥させた平板生培地である。乾燥後に重量を測定し, 所定水分量であることを確認する。

従来の平板生培地の試料溶液接種量が 0.1~0.2 ml までであるのに対し, RM-DO 培地は前述した水分調

整法の工夫により 1 ml の接種が可能である。

X-GAL 試液は, 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (X-GAL) をジメチルホルムアミドに溶解した溶液である。X-GAL は, 大腸菌群が有する酵素であるβ-ガラクトシダーゼの発色酵素基質で, 酵素反応により無色から青色に変色する<sup>3)</sup>。RM-DO 培地上にコロニーが形成された場合, X-GAL 試液をコロニーに直接滴下し反応させ, 青変の有無により大腸菌群の確認を行う。

##### ii) 従来法の培地

デソキシコーレイト寒天培地および BGLB 培地 (極東製薬工業 (株) 製), EMB 培地および LB 培地 (栄研化学 (株) 製) の調製は, 定法に従った。

### (2) 実験方法

#### 1) 試験溶液の調製

各食材の食用部分 10 g を滅菌フィルタバッグ (株エルメックス製) に採取し, 滅菌生理食塩水 90 ml を加え, ストマッカー (オルガノ (株) 製) を使用して均質化した後, フィルターを通過させた懸濁液を滅菌生理食塩水により段階的に希釈 ( $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ ) し試験溶

## ラピッドメディア-DOによる生鮮食品中の大腸菌群迅速検査

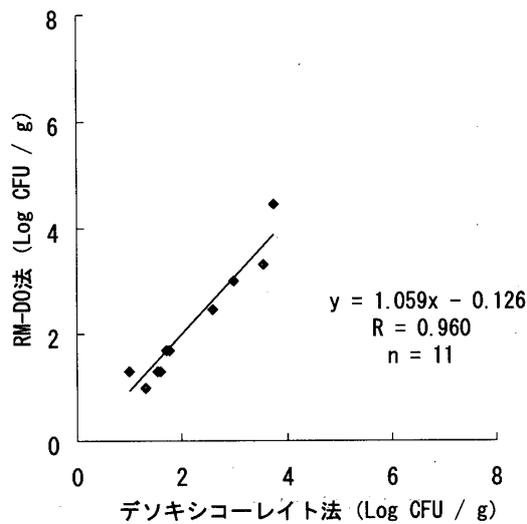


図1. 肉類におけるデソキシコーレイト法とRM-DO法の相関

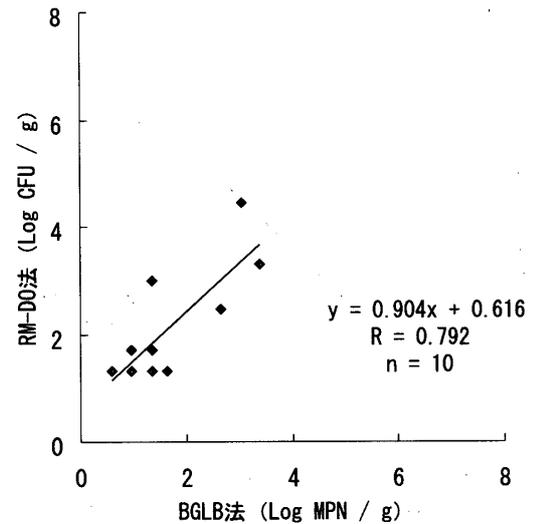


図2. 肉類におけるBGLB法とRM-DO法の相関

液とした。

## 2) RM-DO法による菌数計測

RM-DO培地に試験溶液1 mlを接種し、コンラージ棒を用いずにシャーレを前後左右に傾けて培地表面全体に広げ、水平な場所に約30分間静置し試験溶液を吸収させた後、35℃で12時間培養した。形成されたコロニーにX-GAL試液を滴下し、35℃で1時間反応させ、青色に変色したコロニーを大腸菌群として計測した。食材1 gあたりの菌数は、陽性コロニー数が1枚あたり30~300のシャーレを用い算出した。なお、陽性コロニー数が30未満のみの場合は、そのコロニー数を用いて算出した。

## 3) デソキシコーレイト寒天培地による菌数計測 (以下デソキシコーレイト法)

定法<sup>4)</sup>に従い試験溶液1 mlをデソキシコーレイト寒天培地で混釈した後、重層し35℃で20時間培養した。コロニーが形成された場合はEMB培地およびLB培地による確認試験を行った。その際、形成されたコロニー数が20までの場合は全数を確認試験に供し、20をこえる場合はシャーレを分画して分画内のコロニーを確認試験に供した。分画する場合は、1分画あたりのコロニー数が約20コロニーまでとなるように分画した。シャーレあたりの陽性コロニー数は、分画内の陽性割合から換算して算出した。食材1 gあたりの菌数は、陽性コロニー数が1枚あたり30~300のシャーレを用いて算出した。なお、陽性コロニー数が30未満のみの場合は、そのコロニー数を用いて算出した。

## 4) BGLB培地による菌数計測 (以下BGLB法)

最確数(MPN)3本法により菌数計測を行った<sup>5)</sup>。段階的に希釈した試験溶液1 mlをBGLB培地に接種し、35℃で48時間培養した。ガスが生成された場合は、EMB培地およびLB培地による確認試験を行った。各希釈段階の陽性数から食材1 gあたりの菌数(最確数)を算出した。

## 3. 結果および考察

各食材におけるRM-DO法とデソキシコーレイト法、RM-DO法とBGLB法の菌数の相関を図1~6に示した。両方あるいはどちらか一方の培地において菌が検出されなかった食材についてはデータに含めなかった。

RM-DO法とデソキシコーレイト法の相関係数は、肉類、鮮魚類、野菜類について各々0.960, 0.806, 0.867であり、RM-DO法とBGLB法については各々0.792, 0.865, 0.942であった。相関の有無の検定<sup>6)</sup>では、RM-DO法とデソキシコーレイト法およびBGLB法の菌数に相関が認められた( $p < 0.05$ )。

また、全食材についてのRM-DO法とデソキシコーレイト法、RM-DO法とBGLB法の菌数の相関を図7, 8に示した。相関係数は、RM-DO法とデソキシコーレイト法では0.890, RM-DO法とBGLB法では0.871であり、相関が認められた( $p < 0.05$ )。この際、ウィルコクソンの符号順位検定法<sup>7)</sup>により、RM-DO法とデソキシコーレイト法およびRM-DO法とBGLB法についてそれぞれ菌数の差の検定を行ったところ、RM-DO法とデソキシコーレイト法では菌数に差は認められず( $p < 0.05$ )、RM-DO法とBGLB法では菌数

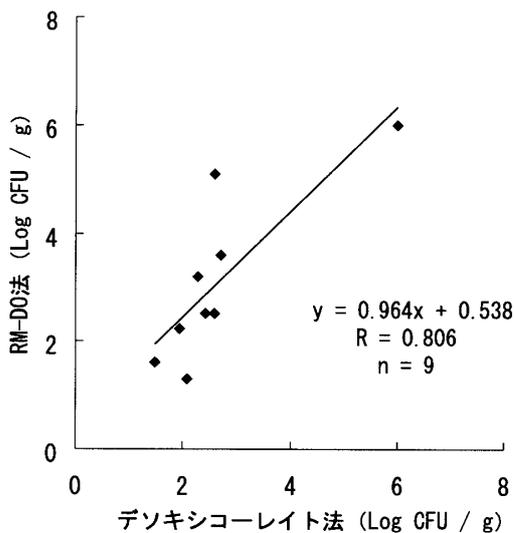


図3. 鮮魚類におけるデソキシコーレイト法と RM-DO 法の相関

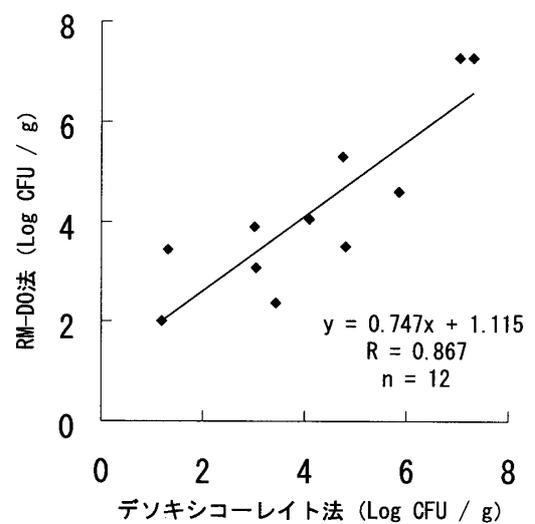


図5. 野菜類におけるデソキシコーレイト法と RM-DO 法の相関

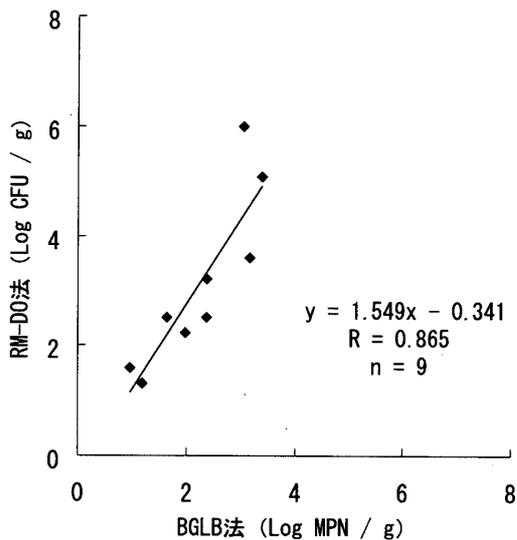


図4. 鮮魚類における BGLB 法と RM-DO 法の相関

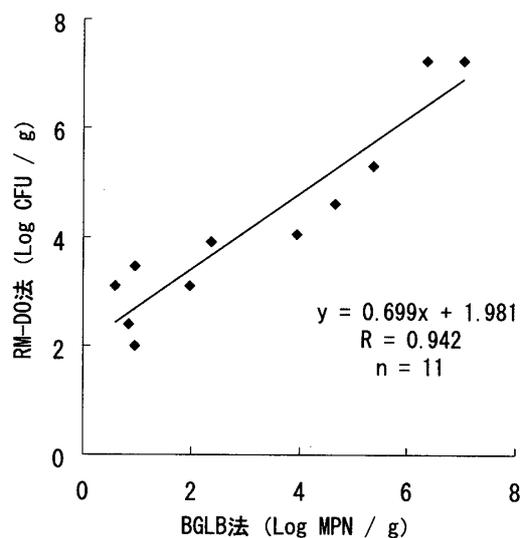


図6. 野菜類における BGLB 法と RM-DO 法の相関

に差が認められ RM-DO 法が有意に多かった (片側検定,  $p < 0.025$ ).

RM-DO 法とデソキシコーレイト法の比較においては, 各食材および全食材において菌数に相関が認められ, 菌数の差も認められなかったことから, RM-DO 法はデソキシコーレイト法とほぼ同等の検出能力を有していると考ええる.

RM-DO 法と BGLB 法の比較においては, 菌数の相関はデソキシコーレイト法との比較と同様であったが, 全食材についての菌数に差があり, RM-DO 法の方が有意に多かった. この原因は, MPN による菌数計測法はばらつきを伴うものであり, それに影響した可能

性があると考ええる. RM-DO 法は, 少なくとも BGLB 法と同等以上の検出能力を有していると考ええる.

以上のように, RM-DO 培地における培養時間は 12 時間であり, デソキシコーレイト寒天培地 (20 時間) と比較し約半分, BGLB 培地 (48 時間) と比較し 4 分の 1 の時間であるにもかかわらず, ほぼ同等の検出能力を示した. これは, RM-DO 培地は培地表面に菌が生育するため好気性~通性嫌気性の大腸菌群が生育しやすく, コロニー径が大きくなり視認性が増すことが原因であると推察する. さらに, RM-DO 培地は混積時のヒートショックがなく, 菌の生育を阻害しないことも原因と考える.

## ラピッドメディア-DOによる生鮮食品中の大腸菌群迅速検査

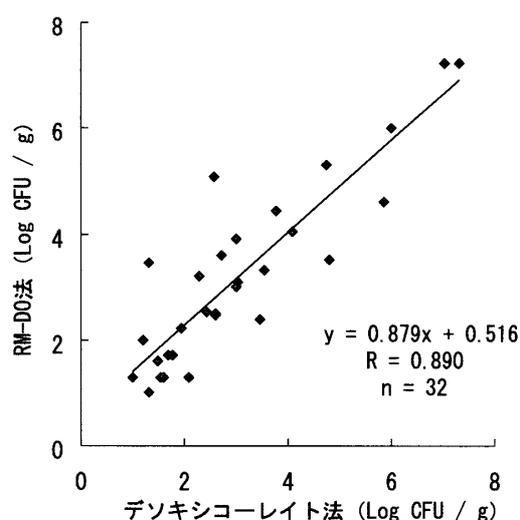


図7. 食材全体におけるデソキシコーレイト法とRM-DO法の相関

また、RM-DO培地上に形成されたコロニーにX-GAL試液を直接滴下する大腸菌群確認試験法は簡便で、しかも従来のEMB培地およびLB培地を用いた確認試験(72時間)に比べ短時間(1時間)で確認可能であり、有効な方法であると考えられる。

肉類、鮮魚類、および野菜類の大腸菌群迅速検査においてRM-DO法は従来法とほぼ同等の性能を有すると考えられることから、ほかの生鮮食品類や未加熱摂取食品類への適用の可能性もある。

#### 4. 要 約

大腸菌群迅速検査用に市販されているRM-DO培地およびX-GAL試液を組み合わせた検出法(RM-DO法)を生鮮食品に適用し、実用性を検討した。実用性の確認は、従来法であるデソキシコーレイト寒天培地およびBGLB培地による培養法と比較することにより行った。食材は生鮮食品3種類(肉類、鮮魚類、野菜類)、36品目を使用した。

実験の結果、各食材における比較ではRM-DO法と従来法で測定した菌数には相関が認められた。食材全体での比較では、RM-DO法は従来法と高い相関を示

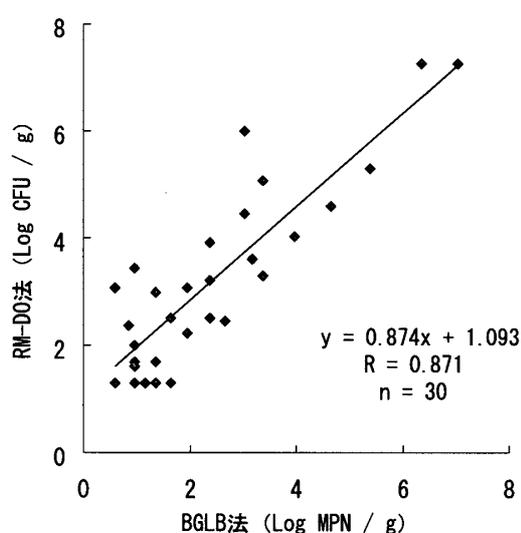


図8. 食材全体におけるBGLB法とRM-DO法の相関

し、またRM-DO法で得られた菌数はデソキシコーレイト法と差はなく、BGLB法に比べ有意に多かった。

RM-DO法は、従来法と同等以上の検出能力を有することが確認できたことから、肉類、鮮魚類、野菜類の大腸菌群の迅速検査にも適用可能な方法であると考えられた。

#### 引用文献

- 1) 中川 弘, 伊藤 武: 食品・環境の微生物検査の実際と簡易・迅速検査法の導入の現状と今後, 食品と開発, **37** (1), 2-5 (2002)
- 2) 長尾英二, 中川 稔, 清瀧兼司, 狩野健一郎, 佐々木一枝, 鍵 裕明, 増田哲也, 森地敏樹: 日本食品微生物学会雑誌, **20** (2), 75-81 (2003)
- 3) 厚生省生活衛生局(監修): 『食品衛生検査指針 追補II』, 日本食品衛生協会, 東京, 28-34 (1996)
- 4) 厚生省生活衛生局(監修): 『食品衛生検査指針 微生物編』, 日本食品衛生協会, 東京, 86-88 (1990)
- 5) 厚生省生活衛生局(監修): 『食品衛生検査指針 微生物編』, 日本食品衛生協会, 東京, 83-88 (1990)
- 6) 石居 進: 『生物統計学入門』, 培風館, 東京, 199-202 (1975)
- 7) 石居 進: 『生物統計学入門』, 培風館, 東京, 127-129 (1975)