

市販野菜サラダの細菌汚染状況および発色酵素基質法による 大腸菌群・大腸菌数検査法の評価

Bacterial Count and Evaluation of a Chromogenic Method for Determining the Number of Coliforms and *E. coli* in Commercial Vegetable Salad Samples

達 牧子*^s 内川輝美** 森末裕希** 寺本忠司**
Makiko Tsuji Terumi Utikawa Yuuki Morisue Tadashi Teramoto

The viable count, coliform count and *E. coli* count were determined in commercial vegetable salad samples to establish standard guidelines for hygiene monitoring. A chromogenic agar tricolor medium was compared with a conventional desoxycholate agar medium for identifying and quantifying the coliforms in commercial vegetable salad. The coliforms were measured on both agar media.

The viable count of 100 commercial vegetable salad samples had a wide range $10-10^6$ cfu/g, 82 (82.0%) and 97 (97.0%) of these samples being coliform positive when using the desoxycholate medium and agar tricolor medium, respectively. Ninety-seven of the coliform-positive samples were contaminated in the range of $10-10^6$ cfu/g. *E. coli* was positively detected in 6 (6.0%) of the 100 commercial vegetable salad samples in the range of $10-10^4$ cfu/g.

The chromogenic medium enabled rapid one-day measurement of coliforms and *E. coli* in perishable vegetable salad.

The bacteria of 35 coliform-positive colonies that grew on the agar tricolor medium were identified as 10 species, including *Klebsiella pneumoniae* (9 strains).

キーワード：野菜サラダ Vegetable Salad；生菌数 Viable Counts；大腸菌群 Coliforms；大腸菌 *E. coli*；発色酵素基質法 Chromogenic Method

市販野菜サラダは健康志向、調理の利便性、そのまま喫食できる簡便性、豊富な種類、簡単な購入（スーパーマーケット、コンビニエンスストア、ベーカリーショップ等）の利点があり、その消費は年々増加している。

生食用野菜はカット野菜の単品と複合調理食品の混合品（野菜およびトッピングのサラダ）があり、このうち容器包装された単品野菜と混合品は、JAS法改正¹⁾の生鮮食品表示基準および加工食品表示基準でそれぞれ原産地表示と主な原料の産地表示が必要になった。このように、非加熱食品である市販野菜サラダは法的に表示義務が課せられたが、衛生指標菌（生菌数、大腸菌群、大腸菌等）あるいは病原菌（黄色ブドウ球菌、サルモネラ、病原大腸菌 O157 等）による微生物学的規格基準の必要性が認識されているにもかかわらず、いまだに規格基準あるいは衛生基準のガイドラインは設定されていない。しかし、一部の自治体や民間企業で自主的な衛生基準値に生菌数 100 万個/g 未満、大腸菌群陰性あるいは大腸菌群数 3,000 個/g 以下、これらの組み合わせ等が設定されている。

野菜サラダの消費期限は 2 から 3 日と短く、現在の細菌検査体制では成績の結果が判明した時点ですでに消費されている。その生菌数検査および大腸菌群数検査は公的検査機関や多くの民間検査機関では公定法²⁾で行われ、生菌数検査に 2 日、大腸菌群数検査で約 4 日間要している。とくに大腸菌群数検査は推定試験のデソキシコレーイト寒天培地、確定試験の EMB 寒天培地、完全試験の乳糖ブイヨンからのガス産生およびグラム染色の順で行われているため、品質管理の上では、より短時間で結果の得られる検査法の迅速化が求められている。

発色酵素基質法は大腸菌群数および大腸菌数検査を同時に 1 日で判定できる迅速検査法である。わが国では公定法に採用されていないが、民間の食品細菌検査室ではすでに採用されつつある。また、欧米諸国では発色酵素基質法がすでに採用されている³⁾。

今回、市販野菜サラダの安全管理基準のガイドライン作成に生菌数、大腸菌群数および大腸菌数を対象とし、市販野菜サラダの汚染実態を調べた。さらに従来法のデソキシコレーイト寒天培地と発色酵素基質法のアガートリコロール培地による大腸菌群を定性的および定量的に比較した。

実験方法

1. 実験材料

平成 18 年 6 月から平成 19 年 6 月に関西地域のスーパー

* 神戸女子短期大学
(Kobe Women's Junior College)

** 株式会社ファルコライフサイエンス
(FALCO LIFE SCIENCE Ltd.)

^s 連絡先 神戸女子短期大学 食物栄養学科 〒650-0046
神戸市中央区港島中町 4-7-2
TEL 078(303)4700 FAX 078(303)4703

市販野菜サラダの細菌汚染状況および発色酵素基質法による大腸菌群・大腸菌数検査法の評価

表 1. アガートリコロール培地組成

ペプトン	10.0
塩化ナトリウム	5.0
リン酸二水素ナトリウム	2.2
リン酸一水素ナトリウム	2.7
ビルビン酸ナトリウム	1.0
L-トリプトファン	1.0
D-ソルビトール	1.0
ラウリル硫酸ナトリウム	0.2
硝酸カリウム	1.0
寒天	15.0
X-GLUC	0.1
Magenta-GAL	0.1
合計	39.3 g
	pH 7.0±0.2

(g/精製水 1 リットル当り)

マーケットやコンビニエンスストアで市販野菜サラダ 100 検体を購入し、実験材料に供した。

2. 使用培地

1) 細菌数検査培地

i) 生菌数検査培地

生菌数測定に標準寒天培地（栄研化学）を用いた。

ii) 大腸菌群数検査培地

大腸菌群数測定にデソキシコーレイト寒天培地（栄研化学）を用いた。

iii) 大腸菌群数および大腸菌数検査培地

大腸菌群および大腸菌数測定にアガートリコロール培地（エルメックス）を用いた。なお、アガートリコロール培地組成は表 1 の通りである。

2) 一般細菌検査培地

グラム染色に普通寒天培地（栄研化学）を用いた

3) 選択分離培地

大腸菌群の確定試験に EMB 寒天培地（栄研化学）を用いた。

4) 大腸菌群および大腸菌確認培地

大腸菌群の完全試験に乳糖ブイオン（栄研化学）、大腸菌の確認検査に LMX ブイオン（メルク）を用いた。

3. 市販野菜サラダの生菌数、大腸菌群数および大腸菌数検査法

1) 試料調整

実験材料 10 g を滅菌ストマッカー袋に秤量し、90 ml の滅菌希釈液（エルメックス）を加え、ストマッカーで 30 秒間処理し、その 1 ml を 9 ml の滅菌希釈液に接種し、各 10 倍段階希釈液を作製した。

2) 生菌数、大腸菌群数および大腸菌数検査法

野菜サラダの生菌数、大腸菌群数および大腸菌数検査を図 1 に示した。各 10 倍段階希釈液の 1 ml ずつを滅菌シャーレ 3 枚に接種した。その滅菌シャーレに標準寒天培地、デソキシコーレイト寒天培地、アガートリコロール培地の約 20 ml ずつを加え、混釈し、固化後、35℃ で培養した。

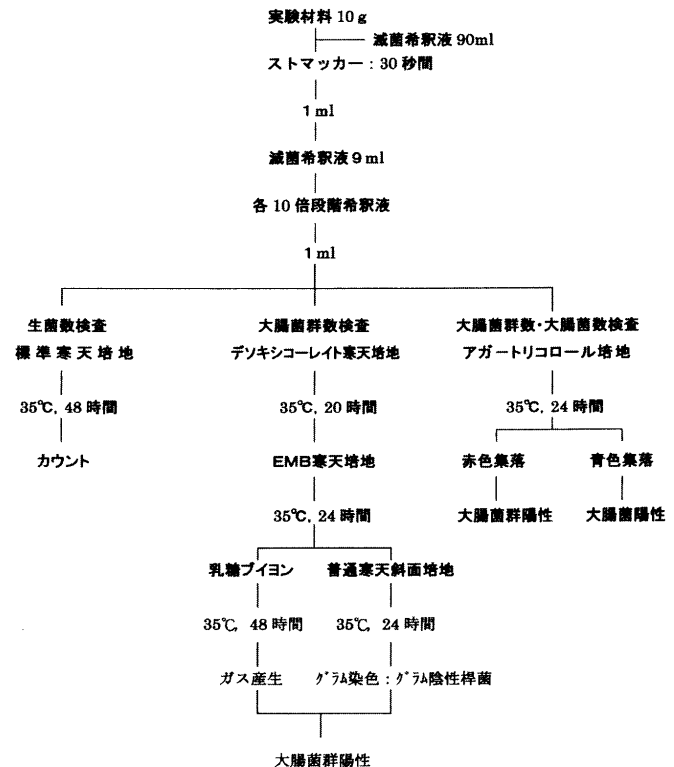


図 1. 市販野菜サラダの生菌数、大腸菌群数および大腸菌数検査法

i) 生菌数検査

標準寒天培地を 35℃ で 48 時間培養後、発育した集落をすべて計測した。

ii) 大腸菌群数検査

デソキシコーレイト寒天培地を 35℃ で 20 時間培養後、赤色集落を計測した。計測した 3～5 個の集落を EMB 寒天培地に画線塗抹し、35℃ で 24 時間培養後、発育した集落のうち、金属光沢等を示す定型的な集落を普通寒天斜面培地および乳糖ブイオンに接種し、35℃ でそれぞれ 24 および 48 時間培養した。普通寒天斜面培地に発育した菌はグラム染色後、鏡検してグラム陰性桿菌であることを確認した。また、乳糖ブイオンに接種した同一株でガス産生を認めたものを大腸菌群陽性とした。大腸菌群数は大腸菌群陽性集落数に希釈倍数を乗じて算出した。

iii) 大腸菌群数および大腸菌数検査

アガートリコロール培地を 35℃ で 24 時間培養後、発育した赤色集落を大腸菌群陽性、青色集落を大腸菌陽性とカウントした。大腸菌群数および大腸菌数はそれぞれカウントした集落数に希釈倍数を乗じて算出した。

4. 菌種同定

アガートリコロール培地のみで大腸菌群陽性とした 13 検体の赤色集落 38 個を釣菌し、LMX ブイオンに接種し、35℃ で 24 時間培養後、青色を呈したものを大腸菌群陽性と確認した。その菌株を普通寒天斜面培地に接種し、35℃ で 24 時間培養後、VITEK GNI+カード（日本ビオメリユ

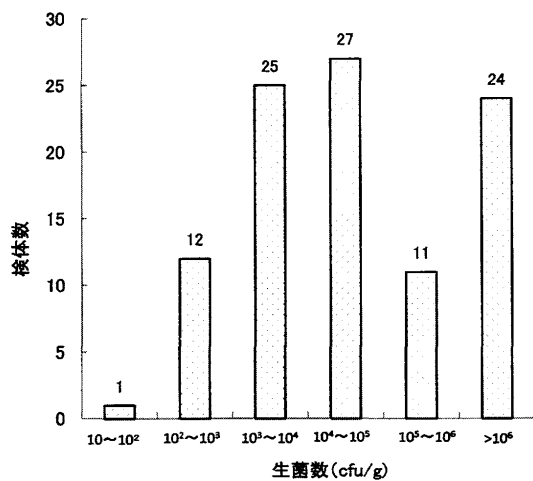


図2. 市販野菜サラダの生菌数

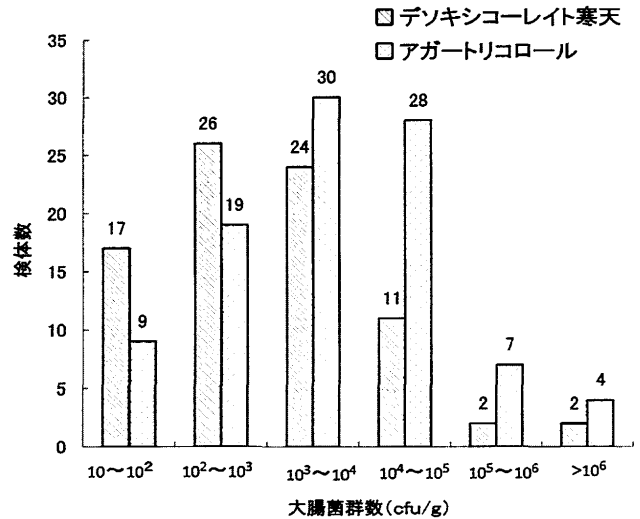


図3. 市販野菜サラダの大腸菌群数

一) で菌種同定を実施した。

実験結果

市販野菜サラダ 100 検体の生菌数、大腸菌群数および大腸菌数検査を行なった。

1. 市販野菜サラダの生菌数

市販野菜サラダ 100 検体の生菌数分布は図2のとおりである。野菜サラダ 100 検体の生菌数は $10 \sim 10^2$ 個/g が 1 検体、 $10^2 \sim 10^3$ 個/g が 12 検体、 $10^3 \sim 10^4$ 個/g が 25 検体、 $10^4 \sim 10^5$ 個/g が 27 検体、 $10^5 \sim 10^6$ 個/g が 11 検体、 10^6 個以上/g が 24 検体であった。野菜サラダの生菌数は $10 \sim 10^6$ 個以上と広範囲に分布したが、生菌数 10^6 個以上/g を示した検体は 24 検体 (24.0%) であった。

2. 市販野菜サラダの大腸菌群検出状況

市販野菜サラダ 100 検体のデソキシコーレイト寒天培地およびアガートリコロール培地による大腸菌群陽性数はそれぞれ 82 検体 (82.0%) および 97 検体 (97.0%) であり、いずれの検査培地でも大腸菌群陽性率は高率であった。また、アガートリコロール培地による大腸菌群陽性率はデソキシコーレイト寒天培地より 15% 高かった。

デソキシコーレイト寒天培地およびアガートリコロール培地における野菜サラダの

大腸菌群数は図3のとおりである。野菜サラダの大腸菌群数は $10 \sim 10^2$ 個/g が 26 検体 (デソキシコーレイト寒天培地 17 検体、アガートリコロール 9 検体)、 $10^2 \sim 10^3$ 個/g が 45 検体 (デソキシコーレイト寒天培地 26 検体、アガートリコロール 19 検体)、 $10^3 \sim 10^4$ 個/g が 54 検体 (デソキシコーレイト寒天培地 24 検体、アガートリコロール 30 検体)、 $10^4 \sim 10^5$ 個/g が 39 検体 (デソキシコーレイト寒天培地 11 検体、アガートリコロール 28 検体)、 $10^5 \sim 10^6$ 個/g が 9 検体 (デソキシコーレイト寒天培地 2 検体、アガートリコロール 7 検体)、 10^6 個以上/g が 6 検体 (デソキシ

コーレイト寒天培地 2 検体、アガートリコロール 4 検体) であった。

アガートリコロール培地による大腸菌群数は 10^3 個/g 以上の各 10 倍段階ですべてデソキシコーレイト寒天培地より多かった。

3. 市販野菜サラダの大腸菌検出状況

市販野菜サラダ 100 検体のアガートリコロール培地による大腸菌陽性数は 6 検体 (6.0%) で、大腸菌数は $10 \sim 10^2$ 個/g が 3 検体、 $10^2 \sim 10^3$ 個/g が 2 検体、 $10^3 \sim 10^4$ 個/g が 1 検体あった。

4. 発色酵素基質法による大腸菌群陽性菌の菌種

参考までに VITEK GNI+カード (日本ビオメリュー) による大腸菌群の同定を試みたところ、アガートリコロール培地でのみ大腸菌群陽性であった 13 検体から分離された 38 菌株の菌種は以下のとおり 10 種類で、菌種不明は 3 菌株であった。その菌種と菌株数は *Cedecus lapagei* 1 菌株, *Enterobacter aerogenes* 1 菌株, *Enterobacter amnigenus* 3 菌株, *Enterobacter cancerogenus* 1 菌株, *Enterobacter cloacae* 3 菌株, *Enterobacter intermedium* 6 菌株, *Ewingella americana* 1 菌株, *Klebsiella pneumoniae* 9 菌株, *Kluyvers species* 5 菌株および *Pantoea agglomerans* 5 菌株であった。

考 察

わが国では生のまま喫食される市販野菜サラダの微生物学的規格基準あるいはガイドラインの必要性は認識されているが、法的な基準値は設定されていない。しかも、消費期限の短い生食野菜の生菌数および大腸菌群数検査は公的検査機関あるいは多くの民間検査機関では公定法に準拠し、検査成績は約 2~4 日間要しているため検査日数の短縮に迅速検査の採用が求められている。しかし、現状では一部の民間の食品検査室で大腸菌群数および大腸菌数検査

市販野菜サラダの細菌汚染状況および発色酵素基質法による大腸菌群・大腸菌数検査法の評価

に迅速検査として発色酵素基質法が採用されているにすぎない。

今回の調査で得られた成績からガイドライン作成にはいくつかの問題点が明らかになった。例えば、市販野菜サラダの生菌数基準値の目標を一般食品の衛生指導基準の10万個以下にすれば、野菜サラダの24%は不合格になる。また、大腸菌群では使用する培地、すなわち、従来法のデソキシコーレイト寒天培地と発色酵素基質法のアガートリコロール培地による大腸菌群陽性率はそれぞれ82%と97%と異なった。その理由の1つは従来法と発色酵素基質法の大腸菌群定義の相違、すなわち、従来法の定義は国際的に乳糖を発酵してガスを産生するグラム陰性桿菌と決められ、その定義に基づいて各国独自の検査法が採用された。わが国における大腸菌群検査の公定法は推定試験、確定試験、完全試験の順序で行なわれ、成績の判定に約4日間要している。しかも、乳糖のガス産生には乳糖分解酵素と細胞膜透過酵素が関与し、細胞膜透過酵素が欠けると乳糖は発酵されない。一方、発色酵素基質法はこれら2つの酵素に関係なく、大腸菌群が持つ特異酵素 β -galactosidaseによって寒天培地に添加された合成酵素基質を加水分解して大腸菌群は24時間培養後に発育集落の色調で判定される。もう1つの理由は、発色酵素基質法で大腸菌群とされる菌種は従来法の菌種⁴⁾より多いことである。したがって、大腸菌群陽性率はデソキシコーレイト寒天培地とアガートリコロール培地によって異なることが指摘されている。

野菜サラダのデソキシコーレイト寒天培地による大腸菌群数は $10\sim 10^6$ 個/g以上と広範囲であり、小沼ら⁵⁾の報告にある $10\sim 10^6$ 個/gとはほぼ同じであった。

このように、野菜サラダの衛生的基準のガイドラインに生菌数や大腸菌群の定性的あるいは定量的な基準値で規制することは困難であると考えられる。一方、外国では、非加熱食品の微生物学的規格基準に大腸菌が採用されていることから市販野菜サラダのガイドラインとして大腸菌陰性とすることが望ましい。

市販野菜サラダの生菌数、大腸菌群数および大腸菌数の汚染実態を調査し、従来法のデソキシコーレイト寒天培地と発色酵素基質法のアガートリコロール培地による大腸菌の定性および定量的に比較した。さらに大腸菌数を調べた。

1. 市販野菜サラダ100検体の生菌数は $10\sim 10^6$ 個/g以上と広範囲であった。また、デソキシコーレイト寒天培地およびアガートリコロール培地による大腸菌群陽性数はそれぞれ82検体(82.0%)および97検体(97.0%)と高率であり、両者の大腸菌群数は $10\sim 10^6$ 個/g以上と広範囲であった。
2. 市販野菜サラダの大腸菌群陽性数はトリコロール6検体(6.0%)と低く、その菌数は $10\sim 10^4$ 個/gであった。
3. 発色酵素基質寒天培地は消費期限の短い市販野菜サラダの大腸菌群数および大腸菌数検査を1日で判定できる迅速検査法であった。
4. 発色酵素基質法のアガートリコロール培地のみで大腸菌群陽性からの分離菌の菌種は、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter intermedium*等であった。

文 献

- 1) 農林水産省(2006), 生鮮食品品質表示基準, 平成18年10月27日, 農林水産省告示第1463号
- 2) 食品衛生研究会(2006), 食品衛生小六法 18年版, 新日本法規出版, 名古屋
- 3) Michaels Curiale and Paul Fahey (1989), Dry Rehydratable Films for Enumeration of Coliforms and Aerobic Bacteria in Dairy Products: Collaborative Study, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 312-318
- 4) 仲西寿男, 寺本忠司(1996), 大腸菌群および糞便系大腸菌の迅速検査, 食品衛生検査指針 微生物編, 日本食品衛生協会, 東京, pp.28-34
- 5) 小沼博隆(1995), 市販カット野菜の微生物汚染状況, 食品衛生研究, **45**, 25-37

(平成20年3月5日受付, 平成20年8月4日受理)

和文抄録

市販野菜サラダの生菌数、大腸菌群数および大腸菌数の汚染実態を調査し、衛生基準のガイドライン作成を試みた。また、従来法のデソキシコーレイト寒天培地と発色酵素基質法を用いたアガートリコロール培地で大腸菌群を定性および定量的に比較した。さらに大腸菌数を調べた。

1. 市販野菜サラダ100検体の生菌数は $10\sim 10^6$ 個/g以上と広範囲であった。また、デソキシコーレイト寒天培地とアガートリコロール培地による大腸菌群陽性数はそれぞれ82検体および97検体と高率であり、両者の大腸菌群数は $10\sim 10^6$ 個/g以上と広範囲であった。
2. 市販野菜サラダの大腸菌群陽性数は6検体と低く、その菌数は $10\sim 10^4$ 個/gであった。
3. 発色酵素基質寒天培地は消費期限の短い市販野菜サラダの大腸菌群数および大腸菌数検査を1日で判定できる迅速検査法であった。
4. 発色酵素基質寒天培地から分離された大腸菌群陽性検体の菌種は、*Klebsiella pneumoniae*、*Enterobacter intermedium*等であった。