

教	材	研	究
---	---	---	---

## 微生物の発見と性質について (2)

角野 猛\*

Takeshi Sumino

## 6. 食品微生物の発育条件

一般に微生物が増殖するための条件としては空気(酸素)の有無, 温度, pH, 水分などが整う必要がある。

## (1) 酸素 (oxygen) の影響

微生物には酸素がないと発育のできない好気性微生物, 酸素があっても無くても発育できる通性嫌気性微生物, 酸素があると発育のできない嫌気性微生物の三つに大別される。尚, 酸素量が少ない状態で発育する微生物は微好気性微生物更に, 強い嫌気度を要求する微生物は偏性嫌気性菌と呼ばれる。

これらの微生物のエネルギー獲得は, 好気性微生物は好氣的呼吸または好氣的発酵, 嫌気性微生物は, 嫌氣的発酵あるいは嫌氣的呼吸による。また, 通性嫌気性菌の場合は, 酸素の無い時には嫌氣的発酵を, 酸素のある場合には好氣的呼吸を行う大腸菌, 酸素がある場合には好氣的呼吸を行う脱窒素菌, 酸素の有無に関わらず嫌氣的発酵を行う乳酸菌などがある。

表1に酸素の要求性による細菌の分類を示した。

## (2) 温度 (temperature) の影響

それぞれの微生物は発育に最適な温度(最適発育温度, 至適生育温度, optimum growth temperature)がある。

図1には, 発育曲線(growth curve)を示した。大きく分けると, 発育準備段階の誘導期(lag phase), 分裂によって指数的に増殖する対数増殖期(logarithmic phase), 一定の菌数まで達すると増殖する微生物と死滅する微生物が見られ一定菌量となる定常期(stationary phase)に入り, 微生物の増殖は停止する。その後, 菌数が減少する死滅期(death phase)に至る。対数増殖期においては, 最も活発な分裂を行っている。この分裂に要する時間を世代時間

表1. 酸素の要求性による細菌の分類

酸素の要求度による分類	代表的な菌類	検出される食品
好気性菌	カビ類, <i>Pseudomonas</i> 属細菌	パン表面, 干物表面
通性嫌気性菌	食中毒細菌, 腸内細菌科の細菌	生食肉, 魚
嫌気性菌	ウエルシュ菌	ハム・ソーセージ
偏性嫌気性菌	ポツリヌス菌, 酢酸菌	缶詰・瓶詰め
微好気性菌	カンピロバクター	ビニール袋密封食品

\* 郡山女子大学  
(Koriyama Women's College)

(generation time) といい, 対数増殖期の世代時間は最短となる。また, この期以外でも分裂はあるわけだが, 最短は「対一期」という。なお, 誘導期から対数期に移行する期間は増殖加速期, 対数期から定常期に移行する期間は増殖減退期, そして, 定常期から死滅期へ移行する期間は死滅加速期である。

図2はバシラス属細菌(*Bacillus licheniformis*)を, 液体培地(普通ブイヨン)を用い, 10℃~50℃で培養した場合の増殖曲線を示した。

縦軸に光学的濃度(660nm), 横軸に培養時間を取ってある。誘導期が最短で, 対数増殖期の傾斜角度が最も急で, 最大菌量が多いものを最適発育温度と考えることができる。

本菌の場合, 33℃近辺に見られ, 同温度より培養温度が低くなるにつれて, 誘導期が延長し, 対数増殖期の時間軸に対する傾斜角度が緩くなり, 定常期に達する時間が遅延した。

本菌は50℃でも発育し, 10℃では発育ができない菌種

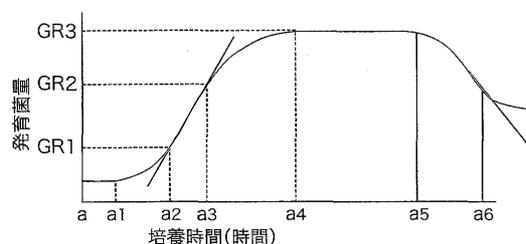
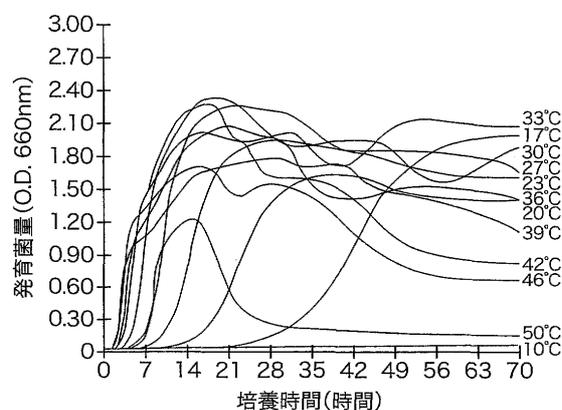


図1. 細菌の増殖曲線

a ↔ a1 誘導期, a1 ↔ a2 増殖加速期, a2 ↔ a3 対数期,  
a3 ↔ a4 増殖減退期, a4 ↔ a5 定常期,  
a5 ↔ a6 死滅加速期, a6 ↔ 死滅期

図2. *Bacillus licheniformis* の発育に及ぼす培養温度の影響

## 微生物の発見と性質について (2)

である。従って、食品を冷蔵庫 (10℃ 以下) で保管することは食品中の微生物を誘導期の状態に保つことといえる。

また、細菌は発育温度域によって、表1に示したように、低温性細菌 (Psychrophiles)、中温性細菌 (Mesophiles) および高温性細菌 (Thermophiles) に分けられる。なお、微生物の増殖下限温度は -10℃ 前後、増殖上限温度は 65℃ 前後であるが、70℃ でも増殖可能な微生物も存在する。

**(3) pH の影響**

微生物の増殖と pH の関係を表2に示した。

微生物を培養する場合、目的とする細菌の種類に合わせて pH を調整する必要がある。日常食品の多くは中性であり、また、食品関連微生物の多くは中性域で良好に発育する。一般に細菌は中性から弱酸性、カビ及び酵母は pH 5~6 の酸性で良好に発育する。

**(4) 水分の影響**

食品中に存在する水の一部は食品成分と結合した水として、残りは自由水として存在する。微生物は自由水を利用して増殖する。食品の砂糖漬け及び塩漬けは古来から伝承されている食品の保存方法のひとつであるが、これらは砂糖や塩が食品中の水と結合し自由水が少なくなり、微生物が増殖できないと考えられる。

食品の微生物の発育に影響を与える要因として水分活性 (Water Activity) がある。これは、食品中の自由水の含有率として表され、次式で計算される。

$$\text{水分活性} = \frac{\text{密封した容器における食品の飽和水蒸気圧 (P)}}{\text{密封した容器における純水の飽和水蒸気圧 (P_0)}}$$

表2. 微生物の増殖と温度

分類	至的発育温度	分類される環境	主な微生物
低温性菌	20~25℃	海水, 河川水, 土壌	<i>Pseudomonas</i> 属細菌 <i>Vibrio</i> 属細菌
中温性菌	25~40℃	人や動物の糞便	腸内細菌科の細菌 多くの食中毒細菌
高温性細菌	55~70℃	温泉	<i>B. stearothermophilus</i> <i>B. coagulans</i>

表3. 微生物の増殖と pH

細菌の種類	最適 pH
大腸菌, サルモネラ菌	中性~微アルカリ性
コレラ菌, 腸炎ビブリオ	アルカリ性 (pH 8.5~9.0)
真菌	酸性 (pH 5.5~6.0)
乳酸菌	酸性 (pH 5.5~6.0)

表4. 水分活性と微生物の発育の関係

微生物の種類	微生物が発育できる水分活性
多くの微生物	0.90 以上で発育
細菌	0.94~0.99
酵母	0.88 以上
かび	0.80 以上

水の水分活性値は 1 なので、食品の水分活性値は 1 より低くなる。

表4は水分活性と微生物の発育の関係を示した。

細菌は概ね水分活性 0.94 以上、酵母は 0.88 以上、カビは 0.80 以上で発育が見られる。

**7. 微生物の培養****(1) 固形培地と液体培地**

細菌の発育に必要な各種栄養分に寒天を添加して固めた培地を固形培地という。寒天量は粉末寒天を用いた場合は 1.5% の割合に添加する。寒天量を 0.5% の割合にすると流動性のある培地となり、半固形培地といい、この培地は細菌の運動性検査などに用いる。

固形培地はシャーレに流入し固めたものを平板培地、試験管に分注し、そのまま凝固した培地を高層培地、枕に並べて凝固させたものを斜面培地、高層と斜面の中間で凝固させたものを半高層又は半斜面培地という。(図3)

**(2) 好気培養と嫌気培養**

微生物の培養方法には好気的な培養と嫌気的な培養がある。食品中の細菌数を測定するための培養や、大腸菌群を培養するなどの場合は孵卵器 (恒温器, incubator) を用い、35℃, 24~48 時間培養する。これは好気的な培養である。また、缶詰のような空気と接触しない食品の場合は嫌気細菌数の測定が必要となる。この場合には嫌気培養する。その方法には、嫌気性菌培養装置を用いるなどの様々な方法があるが、簡易な嫌気培養方法として嫌気培養ジャーを用いる法がある。

**(3) 静置培養と振盪培養**

液体培地や平板培地をそのまま静置して培養する静置培養と、液体培地を振盪し空気を混ぜ込みながら培養する振盪培養がある。

好気性細菌や通性嫌気性菌の培養には静置か振盪培養、嫌気性細菌の培養は嫌気培養で静置培養する。

**(4) 滅菌, 消毒, 殺菌**

食品の微生物を抑制, 除去する語句として、滅菌 (sterilization), 消毒 (disinfection), 殺菌 (sterilization), 防黴, 抗菌などが使用される。

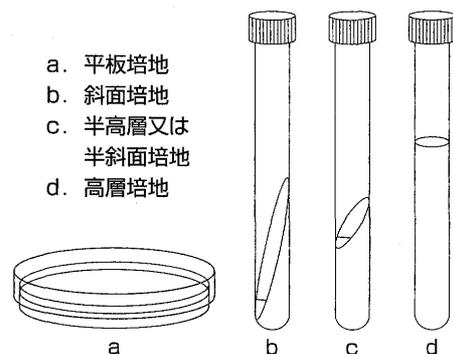


図3. 培地の形

滅菌 (sterilization) とは、食品などに存在しているすべての微生物を死滅させ、取り除くことである。日本薬局方には、滅菌と消毒を、「滅菌とは無菌性を達成するためのプロセス、すなわちすべての微生物を殺菌又は除去するプロセスであり、消毒とは生存する微生物の数を減らすために用いられる処置法で、必ずしも微生物をすべて殺菌、除去を意味するものではない」と記されている。従って、「手指を消毒する」というが、「手指を滅菌する」とは、言わない。

殺菌とは、微生物を殺すことである。一般には滅菌あるいは消毒のことを言うが、その概念は異なる。アルコール濃度の高い食品、缶詰め、LL牛乳などは無菌食品といえる。

抗菌 (antimicrobial effect) は、細菌の発育・増殖を阻止することであり、防カビ (anti-mould) は、黴 (真菌) の発育・増殖を阻止することである。食品添加物の保存料に分類されるソルビン酸カリウムなど、及び同防カビ剤に分類される TBZ などは抗菌的な働きである。

これらの主な方法には、物理的な方法と化学的な方法がある。

#### 1) 高圧蒸気滅菌

高圧蒸気滅菌器 (オートクレーブ, auto-clave) を用いて、1.2気圧、121℃で15分間行う方法である。培地の滅菌などに用いる。

#### 2) 乾熱滅菌

乾熱滅菌器を用いて、160℃~180℃で、40分~60分間加熱する。シャーレなどのガラス器具類の滅菌に用いる。

#### 3) 火炎滅菌

微生物を釣菌する場合に白金耳や白金線を用いるが、これらを、直接、ガスバーナーなどの炎で行う。

#### 4) 紫外線滅菌

実験台、調理台などの表面の殺菌に用いる。殺菌効果が強いのは260nm~280nmである。

#### 5) その他

コバルト60のγ線を用いた放射線殺菌、プラスチック製品など加熱することの出来ないものを対象にガス滅菌が行われる。

#### 6) 消毒法

手指の消毒法としては、以下の方法がある。

消毒用エタノール、ウエルパス、イソプロパノール、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、両性界面活性剤、逆性石鹼などが市販されている。

### 8. 食品の安全管理に係わる微生物

微生物は空気、土壌、水等のあらゆる環境に存在している。また人や動物の体表面、口腔内、腸管内等あらゆる所に見られるが、筋肉内は一般的には無菌である。また、すべての食品に存在し、無菌な食品はアルコール濃度の高い

食品、瓶詰、缶詰食品等のような高圧滅菌されたような食品に限定される。

微生物が食品に混入した場合、温度、水分、pH等の微生物の発育に必要な物理・化学的な環境条件が整えば、その食品成分を栄養素として利用し増殖する。食品中の微生物は食品成分を分解し、その代謝産物が食品に蓄積されることになり、異味・異臭を呈することになり可食性を失うことになり、広義の腐敗状態に達する。

一方、サルモネラ菌属、黄色ブドウ球菌、腸炎ビブリオ等の食中毒菌によって汚染された場合は、これらの細菌が発症菌量に至り、黄色ブドウ球菌がエンテロトキシンを産生すると、食中毒発症の危険性が高まる。

更に、食品工業における製造・加工での微生物による汚染は、食品の変質を進行させ経済的な損失を与えることになる。

#### (1) 食品に見られる微生物

食品成分であるタンパク質、脂肪及び炭水化物を分解する酵素を産生する微生物は食品を腐敗させる原因菌となる。それらの微生物は土壌、河川水、海水、人や動物の糞便に生存している。また、空気中に浮遊し、食品に付着する機会を待つ微生物がある。それらの主なものを以下に記す。

##### 1) バシラス (Bacillus) 属細菌

土壌などの自然界に広く分布するグラム陽性の有芽胞細菌である。タンパク質分解酵素、デンプン分解酵素を持ち、12%食塩濃度でも発育の認められる耐塩性の菌種がある。

図4に *Bacillus subtilis* の発育に及ぼす食塩濃度の影響を示した。

人に病原性のある菌種として食中毒原因菌のセレウス菌 (*Bacillus cereus*)、人獣共通感染症である炭そ菌 (*Bacillus anthracis*) がある。腐敗活性の強い菌として枯草菌 (*Bacillus subtilis*) が知られる。その他に、*Bacillus thermophilus*、*B. megaterium*、などがある。

##### 2) スタヒロコッカス (Staphylococcus) 属細菌

自然界、人の体表、鼻くうなどに見られるグラム陽性の

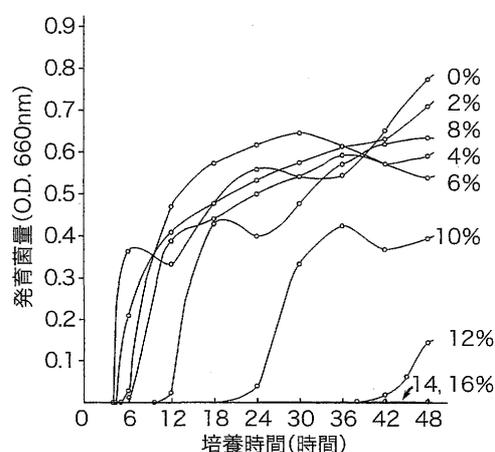


図4. *Bacillus subtilis* の発育に及ぼす食塩濃度の影響

## 微生物の発見と性質について (2)

無芽胞ブドウ状の球菌である。デンプン分解酵素活性が強く、食塩に対する抵抗性がある。黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は食中毒菌である。

3) クロストリジウム (*Clostridium*) 属細菌

土壌などの自然界に広く分布するグラム陽性の有芽胞桿菌である。酸素の存在下では発育が不可能な嫌気性細菌である。タンパク質分解酵素活性が強く、食中毒菌としてボツリヌス菌 (*C. botulinum*)、ウエルシュ菌 (*C. perfringens*) が知られる。また、破傷風菌 (*C. tetanus*) も本菌属である。本菌は、上述のごとく嫌気性細菌であり、缶詰め、瓶詰め、真空パックされた食品などに混入した場合発育が認められる。かつては、イズシを原因とする食中毒の代表的な原因細菌であった。

4) シュウドモナス (*Pseudomonas*) 属細菌

河川水などにみられる水生細菌である。最適発育温度は 25~30℃ である。グラム陰性の無芽胞桿菌で、タンパク質、デンプン分解能が強い。鮮魚類の腐敗の原因細菌である。

5) ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属細菌

土壌などの自然界に広く分布するグラム陽性の無芽胞球菌である。タンパク質分解及びデンプン分解酵素活性が強い。食肉加工品及び鮮魚類の腐敗原因菌となる。

6) ビブリオ (*Vibrio*) 属細菌

海水中にみられる水生細菌である。最適発育温度は 30℃ 前後である。グラム陰性の無芽胞桿菌で、食中毒細菌として腸炎ビブリオ (*Vivrio Parahaemolyticus*) が知られる。3~7% の食塩濃度で良好に発育する好塩性細菌である。かつては、日本の食中毒原因細菌の代表的なものであった。

## 9. HACCP (Hazard analysis and critical control point)

食品の絶対条件は安全性が確保されていることである。従来その方法としては、完成された食品のサンプリングによって、細菌学的及び理化学的試験を行い安全性が確認された商品を出荷するものであった。すなわち、従来の衛生管理は最終食品に食品危害を発生させるようなものが含まれていないかなどの最終製品の検査を中心とするものであった。

HACCP は食品の安全性を確保するシステムであるが、危害分析重要管理点方式と言われるものである。このシステムは 1960 年代にアメリカの航空宇宙局 (NASA) が宇宙食の高度の安全性を確保するために開発した食品品質管理手法である。本システムは食品の原材料の生産から、加工、流通、出荷、販売等に至るまでのすべての生産工程に対して、予め考えられる生物的、科学的、物理的危険を分析し、危害防止のための重要な管理ポイント定め、管理基準を設定し、適正な頻度で監視し、計画的、科学的に食品の安全性を確保するものである。

## (1) HACCP の 7 原則

この手法は、1993 年 FAO/WHO の合同食品規格委員

会 (コーデックス委員会) で採択された。その時に採択された 7 原則は次のようである。

## ① 危害分析の実施 (hazard analysis)

食品の生産から消費までの各段階で発生が考えられる危害を明らかにし、さらに、その可能性について分析し、対策を確立しておくことである。

## ② 重要管理点

食品危害の発生の可能性を抑えるための重要管理点を決定する。

## ③ 管理基準の設定

上述の重要管理点が管理されているかを確認する必要がある。そのための管理基準を定めておく必要がある。

## ④ モニタリング方法の設定

## ⑤ 改善措置方法の設定

## ⑥ システムの維持

## ⑦ 記録の保持

食品のこのような管理が必要となった理由として、日本国内は基より世界各国で食品危害が続出していること、消費者の食の安心・安全に対する関心が高まっていること、従来の手法 (抜き取りや最終製品検査) に限界があることなどである。

## (2) わが国の対応

これらに対して、わが国は食品衛生法で従来的一般衛生管理プログラム (Sanitation Standard Operation Procedure) と本システムを組み合わせた「総合衛生管理製造過程」(食品衛生法第 7 条の 3、製造又は加工の方法及びその衛生管理の方法につき食品衛生上の危害の発生を防止するための措置が総合的に講じられた製造または加工の過程を言う) を定めた。

なお、総合衛生管理製造過程の対象となる食品は、乳・乳製品、食肉製品、魚肉練り製品と容器包装詰詰加圧加熱殺菌食品である。そして、この過程を導入して食品の製造・加工する業者に対して承認制度を発足させた。さらに、この承認を受けた製品には厚生労働大臣承認の HACCP マークを表示することができる。

なお、更に、その利点は次のようなことが考えられる。

- ① 作業や手続きが標準化されて、作業効率がよくなる。
- ② 食品の安全性の向上への企業努力を引き出す。
- ③ 何か問題点が生じたときに速やかに原因究明が可能である。
- ④ 製品が完成した時にロット全体の安全性を確認できる。

## 10. 食品の汚染指標微生物

食品の衛生状態を判定する細菌学的方法として一般生菌数の検査及び大腸菌群の検査が行われる。

一般生菌数は食品中の生菌数を指し、菌数が多いほど衛生的に不良な食品といえる。加工食品の多くは、加熱処理

表5. 市販弁当の生菌数

食品名	生菌数(g)	食品名	生菌数(g)
飯	$10^2 \sim 10^3$	シウマイ	$10^0 \sim 10^2$
卵	$10^2 \sim 10^3$	キャベツ	$10^3 \sim 10^4$
コロッケ	$10^0 \sim 10^2$	キンピラゴボウ	$10^0 \sim 10^2$
フライ	$10^0 \sim 10^2$	スパゲティー	$10^0 \sim 10^2$
天ぷら(野菜)	$10^0 \sim 10^2$	佃煮	$10^0 \sim 10^2$
煮物	$10^2 \sim 10^3$	漬物	$10^2 \sim 10^3$

され、細菌数は少ないものである。しかし、時間の経過とともに細菌生菌数は増加するので、細菌数の多寡が衛生状態の目安となる。なお、鮮度が良好な加工食品でも細菌数が多い場合がある。これは、製造時の食品の取扱、調理器具の衛生的な取扱の欠如が考えられる。一般に生菌数が  $10^7/g$  以上となると初期腐敗といわれる。なお、牛乳の原料乳検査では、総菌数の検査が実施される。これは、生乳中の細菌を染色し顕微鏡で菌数を測定して、1 ml 中の数として表す。表5に市販弁当のおかずなどの生菌数を示した。

大腸菌群(Coliform organisms)は乳糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性の好気性又は通性嫌気性桿菌と定義されている。本菌群は細菌学上の特定の細菌種を指すのではなく、大便から検出される大腸菌や土壌等から検出される Klebsiella 属細菌もこの定義を満たすことになるので、大腸菌群の範疇に入る細菌はヒトや動物の糞便及び自然界に広く分布している。しかし、大腸菌群が食品から検出された場合はその食品が直接又は間接的に糞便の汚染を受けたと判断され、その食品は衛生的には不良と判断される。

大腸菌群の汚染源が何であるかは把握しにくい、本来は食品成分に含まれていない大腸菌群が検出されることは、その製造過程において衛生的に不良な状態があったものと判断される。特に、高度な品質管理の行き届いた食品の製造過程において検出されることは、その衛生的意義はより重要となる。

## 11. 食品の細菌検査

一般生菌数及び大腸菌群の検査は、滅菌済みの培地、希釈液、シャーレ及びピペットなどが市販されているので、簡潔に検査を実施できる。

### (1) 一般生菌数の測定(図5)

試料	ジュースなどの液体食品	約 50 ml
器具	滅菌シャーレ	6 枚
	滅菌ピペット (1 ml)	4 本
培地	標準寒天培地	約 100 ml
希釈液	9 ml の滅菌希釈液 (9 ml)	3 本
培養機器	孵卵器(恒温器)	1 台
手順	① 試料原液を 10, 100, 1000 倍に希釈	
	② 上記原液と各希釈液を 1 ml の滅菌ピペットで、1 ml ずつ 2 枚のシャーレに	

分注

- ③ 45~50°C に保持した滅菌標準寒天培地をシャーレ全体に行き渡る程度混入(約 20 ml)、蓋を押さえて静かに混釈後、静置し凝固させる。
- ⑤ シャーレの蓋を下にして、35°C に調整した孵卵器(恒温器)で 48 時間培養する。
- ⑥ 48 時間培養後、発育の見られた細菌集落(colony, コロニー)の数を測定する。

### 実験操作フローシート

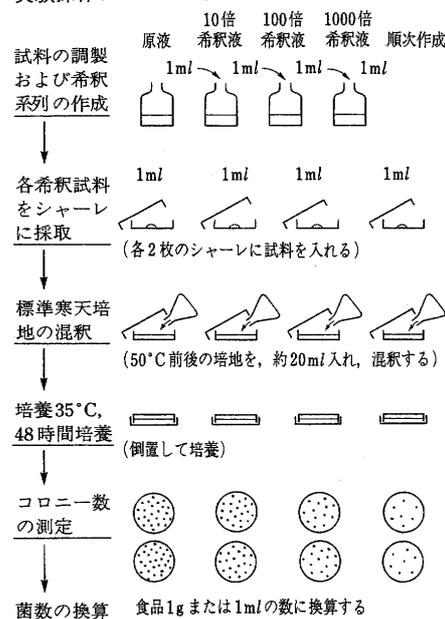


図5. 実験操作フローチャート

### (2) 大腸菌群数の測定

器具、手順は一般生菌数同様、培地をデソキシコーレイト寒天培地とする。

### おわりに

近年、細菌及びウイルスを原因とする微生物性の食中毒が多発している。学校などの給食施設で発生した場合、患者数が多くなり、その影響は大きい。1996年、腸管出血性大腸菌O157を原因とした食中毒が発生して以来、集団給食施設での衛生管理は徹底されているが、二度とこのような事件が発生しないことを祈る。

食材となる野菜、魚及び肉類などの食材は無菌なものではなく、何らかの微生物が付着している。これらの微生物はその発育条件が整えば発育・増殖し、食品の可食性を失うことになる。また、それらの微生物が食中毒菌であるならば食品危害が発生する可能性がある。

これらを防止するためには、食品の特性、個々の微生物の性質などを把握し、食品の衛生管理を徹底する必要がある。

微生物の発見と性質について (2)

参考文献

- \* 今西二郎, 岸下雅通, 小追芳正, 多田功, 西山弥生, 沼崎義夫, 八田亨二, 森内浩幸 (2006), 「看護微生物学」, 医歯薬出版株式会社
- \* 小野章史, 川澄俊之, 鈴木和雄, 角野猛, 成田弘子, 西山邦隆, 橋口亮, 廣田才之, 松仁茂樹, 吉田啓子 (2006), 「食品衛生学実験」, 共立出版
- \* 菅野道廣, 上野川修一, 山田和彦, 本間健, 有菌幸司, 角野猛, 植木幸英, 井上浩一 (2006), 「食べ物と健康」, 南江堂
- \* 宮沢文雄 (1989), 「一般食品衛生学」, 三共出版
- \* 清水潮 (2001), 「食品微生物の科学」, 幸書房
- \* 藤井建夫ほか (2001), 「食品の保全と微生物」, 幸書房
- \* 山西弘一, 平松啓一編集 (2003), 「標準微生物学」, 医学書院