

かびと食品衛生について (続)

食品等からの菌分離とその同定法

高橋 治男 矢崎 廣久

Fungal Contamination in Foods – Part II – Fundamental Technic of Isolation and Classification

Haruo TAKAHASHI and Hirohisa YAZAKI

I はじめに

前報¹⁾では、かびおよびその産生する毒素(Mycotoxin かび毒)と食品とのかかわりについて、われわれの調査・研究を中心に紹介した。これらかびの防除については、いわゆる細菌などと異なり、極めて困難な点が多く、食品衛生上大きな問題となっている。しかしその進展を望むために、近い将来食品 GMP (Good Manufacturing Practice: 適性製造基準) や HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point System: 危害分析重要管理点方式) の導入も検討されている。

このようなことから、今後食品やその製造環境等でのかびの検査の増加が予測され、各検査機関の対応が望まれる。

そこで、今回は、かびの分離、同定等検査の実際と、いくつかの留意点について述べ参考としたい。

II 食品(糧)からの分離

1. 検体の殺菌

検査に先立ち、検体に付着する細菌等の除去を行う。穀類等粒体の場合は、有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ソーダで検体表面の殺菌を行う。これは、菌の胞子が単に検体表面に付着しているのではなく、内部にまで侵入している場合が問題だからである。粉状の場合は、このような手段はとれないので、次に述べるように培地に細菌の発育抑制剤を加えて分離する。

2. 培地の調製

1) 細菌の増殖抑制法: 分離培地上の発育集落をかびと予測して分離したところ、それが実際にはかびでなく細菌であった例が少なくない。そのため、細菌の発育を抑制する手段をとらねばならない。その方法として

通常次の2法がある。

(1) 培地を50%乳酸水溶液でpH4付近まで下げ方法: かびの至適増殖pHが微酸性側にあるのに対し、細菌のそれは、中性ないし微アルカリ側にあることを利用したものである。また、かびの耐酸性は強く、かつ発育しうる。特に *Aspergillus niger* などはpH1でも生存できるとさえいわれている。この場合、pHの調整は培地の加圧滅菌後に行わねばならない。滅菌前に調整すると寒天は凝固しない。

(2) 抗生物質の培地への添加: 一般的には Chloramphenicol の100mg/l 程度の添加が常用される。

2) 使用培地

(1) 分離用培地: 一般的にはポテト・ブドウ糖培地(PDA培地)、ツアベック・ドックス寒天培地(CDA培地)が用いられている。分離の対象が糸状菌だけでなく、酵母も含まれている場合にはPDA培地が推奨される。これは、酵母にはビタミンなどを栄養因子として要求するものが多く、CDAのような合成培地より、天然材料を使ったPDA培地が適しているからである。

次に問題となるのは、その培地の浸透圧である。かびは、その増殖における最適水分活性値(その菌の増殖に最も適する水分活性値)によって、*Aspergillus*, *Penicillium* 属などを主とする乾性(貯蔵)かびと、*Fusarium* あるいは *Botrytis* 属を主とする湿性(圃場)かびとに大別される。従って、乾燥食品や菓子類など浸透圧(糖あるいは塩濃度)の高い食品からの菌分離の場合には、PDAあるいはCDA培地に糖濃度20~25%になるように添加して使用する。乾性かびと湿性かびの中間なかびに対しては、通常のPDA培地と20%シュウクロース培地とを併用するのが望ましい。この場合、細菌の発育を抑制するため、抗生物質の添和やpHの低下させることはいうまでもない。

(2) 同定用培地: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* などが多くの場合、CDA培地が用いられる。ま

た、麦芽寒天培地と併用されることもある。*Fusarium* 属の場合には、ポテトシュウクロース培地が、酵母菌ではPDA培地が主として用いられる。いずれにしてもかびの同定の場合には、胞子形成状態などの形態的観察が主となることから、胞子を形成し易い培地を用いることが最も重要なことといえる。

3. 純粋培養

食品などのかびによる汚染個所から、あるいは分離培養を経て純粋培養への移行操作としては、そのかびの胞子懸濁液を調製し、混釈培養する方法が古くからとられている。この場合、糸状菌の胞子は、細菌や酵母と異なり、その表面が疎水性を示すため、単なる水を分散媒としたとき均一な懸濁液が得られない。そのためトリトンX-100などの界面活性剤を0.1%水溶液とし、高圧滅菌して用いているが、石けん水でも充分代用できる。

近年、比較的簡便な純粋分離法²⁾が用いられているので、その概略を述べる。滅菌スライドグラス上に、滅菌水を3~4か所に滴下する。あらかじめ胞子形成を確認した個所、あるいは目的とするかびの集落(培地上)より、白金鉤を用いて胞子をかきとり、第一の小滴に懸濁する。次いで白金鉤を火炎滅菌し、別の小滴で冷却後胞子を浮遊させた小滴に浸し、そのまま次の小滴に浸し攪拌する。これを繰り返すことによって胞子の適当な希釈液が得られる。これを寒天平板上に画線塗抹培養して単独集落を発育させ純粋分離する。

III 空気中・壁面からの分離

1. 空中落下のかび

通常Chloramphenicolを添加したブドウ糖ペプトン寒天やPDA寒天平板を、目的の場所で5~30分、シャーレの蓋をとって静置する方法が最もよく使われる。この方法は密閉され、空気の流れがないかまたは少ない場合での検査にはよいが、人の出入りが激しく、絶えず空気の流れるような場所ではエア・サンプラー法がよい。

2. 壁面等のかび

壁面あるいは器具類表面の分離は、従来専らふき取り法などによった。しかしこの方法は定性的で、単位面積当りの菌数測定などに適当でないことから、最近ではスタンプ・スプレッド法^{3,4)}がとり入れられ、食品工場の壁面の汚染測定に汎用されている。

これは、蓋の裏側に直径2.2mm(面積4cm²)のゴムスポンジのついた小型ポリ容器が滅菌包装され市販されている。この蓋をとってゴムスポンジの部分を壁面にスタンプし、検査室に持ち帰って、その接触面をPDAあるいは

20%シュウクロース添加のCDA平板培地に再びスタンプして培養する。

IV 培養温度

通常、20~25℃で行うが、冷凍食品や冷室の壁面などに着生する低温菌を対象とする場合には、5℃前後が適当である。また逆に、*Asp. fumigatus* などの高温菌には37℃付近で培養する。

培養は通常4~14日間行うが、酵母の巨大集落形成には、1か月間位の培養が必要である。

V 形態観察

かびの同定は、形態学的観察によるといいよい。純粋分離した平板上の集落は、肉眼的に集落の形態や産生する色素を、顕微鏡下で形成された胞子や菌糸を観察して同定する。また、純粋分離した菌を同定用培地を用いたスライドカルチャー法がある。この方法は、そのまま顕微鏡下で胞子の形成状態や菌糸の発育状況が詳細に観察できるので、最もよく使われている。この方法については一戸ら²⁾、飯塚ら³⁾その他多くの解説があるが、糸状菌と酵母では、操作法に若干の違いがあるので注意しなければならない。

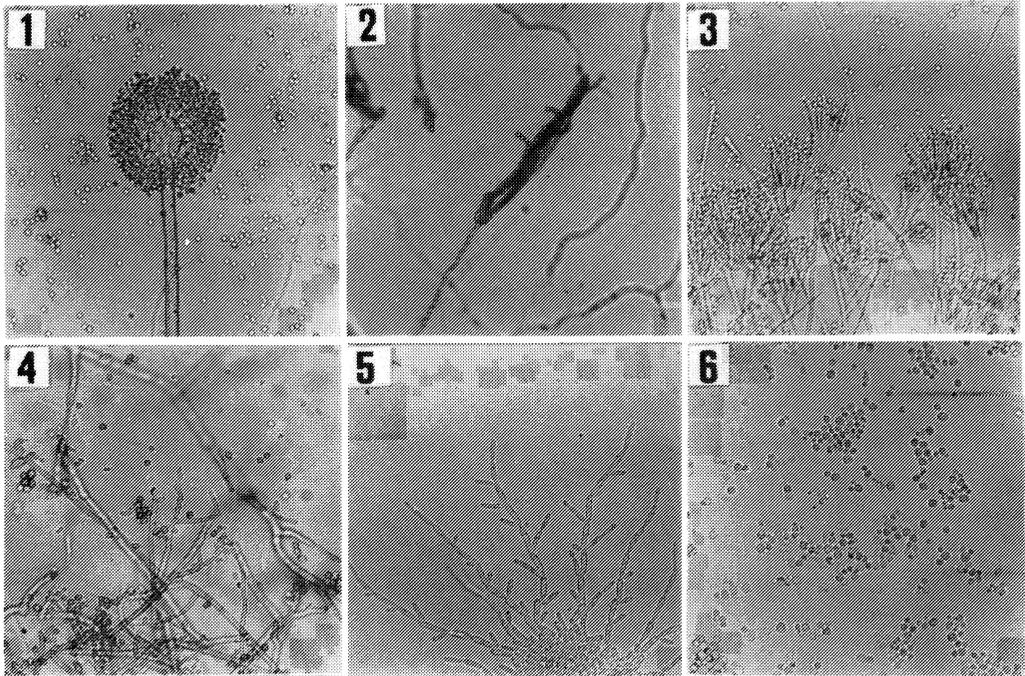
巨大集落については、その集落の特徴、増殖速度(集落の径を測定)、更に表・裏面の色調などを観察する。ついで胞子形成した部分を白金鉤でかきとり、それを鏡検する。一般的に培養の古い集落あるいは菌糸体(集落中心部)は、崩壊し易いため観察に適さないことが多い。

プレパラートに封入する場合は、先に述べた胞子懸濁液用トリトンX100の0.1%水溶液を用いる方がよい。保存が必要な場合は、ラクトフェノールを用いるか、あるいはラクトフェノール・コットンブルーで染色するとよい。

巨大集落培養の操作で、胞子が飛散しにくい酵母などの場合は、胞子を体着させた白金耳を、同定用平板培地の中心の真上から穿刺する。胞子が飛散し易い糸状菌などでは、平板培地を逆さに固定し、下から穿刺して胞子の飛散を防ぐ。

かび特に糸状菌の同定は、形態の微妙な差異、集落の特徴を論ずることが多いので、巨大集落培養とスライドカルチャーを併用ことが重要である。これに対し、酵母類の場合は、種属による栄養要求の違いがあることから生化学的検査も重要な手段となる。

最後に、いくつかの代表的なかびの写真を掲載する。



写真の説明

1. *Aspergillus* 属の分生子頭。分生子柄の先端が丸味をおび、頂のうとなるのが特徴。菓子より分離。
2. 同じく *Aspergillus* 属の分生子頭。*Penicillium* を思わせるようなほうき状を呈するものがある。菓子より分離。
3. *Penicillium* 属の分生子頭。この菌は、先端で更に枝分かれし、複雑な構造を有する。玄米より分離。
4. *Cladosporium* 属の分生子と栄養菌糸。栄養菌糸は老令化するにつれ、黒色をおびる。菓子より分離。
5. 酵母。糸状菌と見まちがえるような偽菌子を形成するものがある。市販のすしより分離。
6. 酵母。典型的な酵母型の細胞。玄米より分離。

引用文献

- 1) 高橋治男，他：かびと食品衛生について，千葉衛研究報，2，63-71，1978.
- 2) 一戸正勝，他： *Fusarium* 属の分類と同定法，防菌防黴，6，391-398，1978.
- 3) 高島浩介，他：食品工場を汚染するカビ，同上，7，453-460，(1979)，同，9，55-60，1981.
- 4) 春田三佐夫：食品衛生，環境衛生の分野における簡易細菌検査法，防菌防黴，8，154-166，(1980).
- 5) 飯塚 広，他：酵母の分類同定法，7-8，東大出版会（東京），1969，同，108-121.