

## 膨脹鯷トマト漬罐詰の細菌に就いて

吉村 貞彦 日高 富男 久野 康彦

On the Bacteria in swelled canned Tomato-Sardines.

Sadahiko YOSHIMURA, Tomio HIDAHA and Yasuhiko HISANO

微生物特に細菌に依る罐詰食品の腐敗は広汎なる種類の製品に就き可成り多くの種類がその原因として指摘されて居り、これに関する報告は洋の内外を問はず殆んど枚挙に遑なしと云ひ得る。他方斯くの如き腐敗防除に関しても現在その手段方法は確立した段階に到達したと云ひ得られるが、今尙罐詰食品の腐敗は跡を絶つことなく起きつゝあることはよく見聞する処である。我が国に於て一時杜絶状態にあつた罐詰工業は戦後再び隆盛となり來り、海外に輸出せられるものも亦少なくない様であるが、輸出向きとして製造されたものにも完全なるもののみでないといはれて居る。

その一例として昭和廿五年春北九州の某工場に於て輸出向きとして製造されたトマトサーヂン罐詰中に多量の膨脹罐が発生し、その原因につき調査を依頼され、細菌の分離実験を行つた処数種の細菌の存在を証明し得た。文献が示す如く罐詰腐敗の原因となる細菌はその種類極めて多く一定して居らず、この度吾人が見出したものの記載を行ふことも全く徒爾ではないと考え、それら細菌の性質の極く大要を報告せんとするものである。

本報告の発表を行うに当り多大の御配慮並びに援助を賜りたる本学部長山本清内氏に深甚の謝意を表すると共に実験に援助されし教室員池田常子氏にも謝意を表するものである。

## 実験材料

本実験に供した材料は普通トマトサーヂンと稱せらるゝ鯷肉と Tomato paste とを原料としたものの膨脹罐で楕円 1 号及 3 号罐に詰められたもので (1 号罐には鯷肉 425 g Tomato paste 85g を、3 号罐には鯷肉 215g, Tomato paste 50g を填充)、殺菌は 10 ポンドに於て 90 分間行つたものである。罐は何れも著しく膨脹して居たが、内一個は更に卷締不完全に依り卷締部に亀裂を認め、内容物は少しく漏洩せしを認めた。罐内の状態を検査するため、罐の外部を予め十分に洗滌乾燥し、後酒精で殺菌し、酒精を以て拭ひ火焰中を通して殺菌した罐切を用いて無菌的に開罐し、殺菌した匙を以つて罐の内容物を数箇所から採集した。

罐は何れも開封と同時に音を發し無臭の瓦斯を強く噴出した。内容物は何れも何等忌むべき臭氣なく肉眼的には変化の状態は認め得なかつた。精細に観察したが所謂「Springer」

とは認め得られなく、又罐の内面に錆は認め得なかつた。

### 細菌の分離

培養基としては普通肉汁寒天、葡萄糖寒天及次に述べるが如き組成を有するものの三種を使用した。即ち実験に供した材料と同一で健全なるもの内容物 100g に対し水道水 900 cc, を加へ 30 分間 100°C にて加熱後濾過、水を加えて 1 立となし、これに peptone 10 g, NaCl 5g, 葡萄糖 10g, 及び寒天 (2%) を加へ、pH 6.8~7.0 としたものである。

分離法としては好氣的には普通平面培養法を、嫌氣的には Burri 氏法並びに Crumwiede 及 Pratt 氏法に依つたが後者に依る分離は目的を達し得なかつた。

斯くして 6 株の細菌を得、その性質の検索を行つた処、4 株に帰着した。即ち非芽胞性桿狀菌 1 株、球菌 2 株、芽胞性桿狀菌 1 株である。

### 分離細菌の記載

#### 1) 通性嫌氣性瓦斯形成菌 (*Escherichia Freundii* 又は近縁菌)

##### 顯微鏡的觀察

形態：両端円形をなせる短桿菌にしてその大き約 24 時間後 30°C に於て  $1.5 \times 2 \sim 2.5 \mu$ , 細胞の配列は多くは孤立するも 2 個連結するものあり、長き鎖状とならず。運動性を有し鞭毛は周生なり。胞子を形成せず。

染色性：普通染色液に能く染り、グラム染色法にては脱色す。

##### 培養上の性質

寒天平面培養 (30°C)：表面に發育するものは初め円形より後稍不整形となる半透明の聚落にして、稍褐色を帯びたる灰白色にして白色に近き光沢を有す。弱拡大下に於ては微かに細粒状を呈するも無構造にして淡黄褐色を呈す。深層に發育せしものは白色楕円状を呈す。

寒天斜面培養 (30°C)：發育良好にして菌苔は拡がらず刺棘状 (echinulate), 僅かに段丘状に隆起、表面は平滑、周縁は波状、色は反射光線にては灰白色、通過光線には帶褐淡黄色、半透明、殆んど均質なり。

寒天穿刺培養 (30°C)：穿刺溝内の發育は一樣にしてその形は filiform—echinulate なり。

膠質穿刺培養 (20°C)：發育緩漫にして徐々様に發育しその形 echinulate 基質は 1 ヶ月を経るも液化せられず。

肉汁培養 (30°C)：發育良好にして一樣に烈しく溷濁、液表面に濕光沢ある半透明、帶灰白色を呈する皮膜を有す。沈澱物は粘稠にして帶褐淡黄色を呈す。

葡萄糖寒天培養 (30°C) : 振盪培養に於ては24時間後既に瓦斯を発生して寒天は破碎亀裂を生じ白色略球形を呈せる聚落の形成を認む。穿刺培養を行いし場合瓦斯の産生は前者程多量ならず。

牛乳培養 (30°C) : 2~3日後凝固せられ稍白濁せる乳清を分離す。瓦斯を形成す、反応は酸性となる。

馬鈴薯培養 (30°C) : 發育良好にして、2~3日後割線部に刺棘状の灰白色濕光沢ある僅かに隆起せる菌苔を形成す。

遠藤氏寒天培養 (30°C) : 24-36時間後基質は濃紅色となる。

#### 化学的性質

- a) 色素の形成 : 色素を形成せず
- b) 瓦斯及酸の形成 : 葡萄糖、蔗糖及乳糖より瓦斯及酸を形成する。
- c) 硫化水素及びインドールの形成 : 硫化水素を形成するもインドールを産生せず。
- d) アンモニヤの形成 : ペプトン水中に於て (30°C) アンモニヤの形成を認むる。
- e) 硝酸塩を還元 : 硝酸塩を還元せず。
- f) Voges-Proskauer 反応 : -
- g) Methyl-red 試験 : +
- h) 枸橼酸塩を炭素源として利用す。

有離酸素に対する関係 : 通性嫌氣性。

#### 2) 芽胞性桿状菌

##### 顯微鏡的觀察

形態 : 多く孤立するも2個或は數個連結して短き鎖状となりて現はるゝ桿状体にて両端円し、その大きは培養時間に依りて異なるも約24時間培養せしものは  $1.3 \times 2.7 \sim 3.0 \mu$ 。

胞子は寒天培養上にて(30°C) 3~4日後に形成せられその形は楕円形  $1 \times 1.3 \mu$  なり、その形成部位は菌体の端に近きもの多く、菌体は其の部分膨大して Clostridium 型となる。

運動性を有し、鞭毛は周生なり。

染色性 : 普通使用せらるゝアエリン色素にて容易に染り、グラム染色法にて陽性なり。

##### 培養上の性質

肉汁寒天平面培養 (30°C) : 發育中庸、円形にして僅かに隆起し表面平滑濕光沢あり、周縁全縁なる聚落を生ず、聚落は初め殆んど無色にて透明なるも芽胞の形成と共に灰白色を呈し、不透明となる。

寒天斜面培養 (30°C) : 發育緩かにして薄膜状に幾分拡り周縁稍粗なる波状を呈し細か

き粒状をなす表面を有し濕光沢あり不透明にして灰白色なる菌苔を生ず。

寒天穿刺培養(30°C)：穿刺溝内に於ける發育は一様にして刺棘状を呈す，發育緩慢なり。

膠質穿刺培養(20°C)：發育極めて不良にして1ヶ月を経るも基質の液化を見ず。

肉汁培養(30°C)：初め一様に溷濁するも皮膜の形成するに及び漸時透明となる。皮膜は稍厚く均質不透明灰白色なり。灰白色にして粘稠なる沈澱物を生ず。

葡萄糖寒天培養(30°C)：振盪培養に於ては一様に灰白色を呈する球状の小聚落を生じ，穿刺培養に於ては穿刺溝内に一様に刺棘状及至点綴状の菌苔を生ず。何れの場合にも瓦斯の發生なし。

馬鈴薯培養(30°C)：微に發育を認め，灰白色半透明の拡布状菌苔を生ず。

牛乳培養(30°C)：一ヶ月を経るも肉眼的変化を認めず。反応は殆んど変化せず。

化学的性質

a) 色素の形成：色素を形成せず。

b) 瓦斯及酸の形成：葡萄糖より酸を形成するも蔗糖又は乳糖より酸を生ぜず。前記何れの糖よりも瓦斯の形成行はず。

c) 硫化水素及インドールの形成：硫化水素を形成せず，又インドールをも産出せず。

d) 硝酸塩の還元：硝酸塩を亜硝酸に還元す。

e) アンモニアの形成：ペプトン水中にアンモニアを形成せず。

有離酸素に対する關係：本菌は初め好氣的には極めて發育不良なりしも累代培養を行うに次いで通性嫌氣性となれり。

### 3). 球菌A

顯微鏡的觀察

形態：單一或は2個時に不規則に集合して現はるゝ球状菌にして稀に卵形をなすものあり，その大さ1.0~1.3 $\mu$ なり，運動性を欠く。

染色性：普通染色液に能く染りグラム染色法に脱色す。

培養上の性質

寒天平面培養(30°C)：發育遅し，止針頭状にして，僅かに隆起し，無色に近き灰白色殆んど透明，硝子状光沢あり，平面平滑，周縁は全縁，内部は無溝造なり，弱拡大下(100倍)にありては淡黄褐色を呈し，細粒状をなす。

寒天斜面培養(30°C)：發育遅く，貧弱なる点綴状，隆起せず表面平滑濕光沢あり淡灰白色の菌苔を生ず。

寒天穿刺培養(30°C)：發育不良・穿刺溝に沿つて一様に点綴状無色に近き發育を生ず。

膠質穿刺培養 (20°C) : 發育不良, 1ヶ月を経るも基質を液化せず。

肉汁培養 (30°C) : 接種後約48時間を経て漸く微かに溷濁を認め初め一様なるも次第に透明となる。粘稠性にして灰白色を呈する沈澱物を少量生ず。

葡萄糖寒天培養 (30°C) : 發育不良, 劃線部に微かに灰白色にて点綴状, 殆んど隆起せず濕光沢を有する灰白色の菌苔を生ず。

牛乳培養 (30°C) : 1ヶ月を経るも肉眼的に変化を認めず, 基質は僅かに酸性となる。

#### 化学的性質

- a) 色素の形成 : 色素を形成せず。
- b) 瓦斯及酸の形成 : 葡萄糖, 蔗糖及乳糖より僅かに酸を形成するも瓦斯を形成せず。
- c) 硫化水素及インドールの形成 : 硫化水素を形成せず, 又インドールをも造らず。
- d) 硝酸塩の還元 : 硝酸塩還元性なし。
- e) アンモニアの形成 : ペプトン水中にてアンモニアを形成せず。]

有離酸素に対する関係 : 通性好氣性

#### 4) 球菌 B

##### 顯微鏡的觀察

形態 : 球形をなし多く単一に現われ稀に2個連結することあり, 一般に不規則なる配列をなす。その大きき1.1 $\mu$ , 運動性を欠く。

染色性 : 普通使用せらるゝアニリン色素に能く染り, グラム染色陽性なり。

##### 培養上の性質

寒天平面培養 (30°C) : 發育は最初緩慢なり, 初め殆んど無色に近きも次第に淡黄色となり硫黄色となる。聚落は点状より円状となり, 隆起して中高, 表面は平滑均質, 周縁は全縁にして, 半透明光沢を有す。弱拈大下にありては稍粗なる粒状をなし暗黄褐色を呈す。

寒天斜面培養 (30°C) : 發育遅く3-4日に到り初めて菌苔を形成し始む。菌苔は刺棘状をなして拈らず, 表面平滑, 内部は殆んど無構造, 周縁は粗大な波状を呈し, 硝子状光沢を有し帯褐黄色殆んど無透明なり。

寒天穿刺培養 (30°C) : 初め發育不良なるも次第に旺盛となり穿刺溝内には淡黄色点綴状をなす菌苔を一様に生ず。

膠質穿刺培養 (20°C) : 初め念球状の沈下を來し約1週間後液化す, 液化部は半透明なり。

肉汁培養 (30°C) : 僅かに溷濁し淡黄色幾分粘稠なる沈澱物を稍多量に生ず。

葡萄糖寒天培養 (30°C) : 發育貧弱なり, 瓦斯を形成せず。

馬鈴薯培養 (30°C) : 發育貧弱なるも, 刺棘狀黄色不透明の濕光ある扁平なる菌苔を生ず。

牛乳培養 (30°C) : 1 ヶ月を経るも外觀上の変化を認めず, 反応変化せず。

#### 化学的性質

a) 色素の形成 : 黄色の色素を生ず。

b) 瓦斯及酸の形成 : 葡萄糖より酸を形成するも蔗糖及乳糖より酸を生ぜず。これら三種の糖類の何れよりも瓦斯を生ぜず。

c) 硝酸塩の還元 : 硝酸塩の還元力を欠く。

d) アンモニアの形成 : ペプトン水中にてアンモニアを形成せず。

有離酸素に対する関係 : 通性好氣性。

これら4株の細菌の類縁関係は都合に依り決定し得なかつたのは遺憾である。前述の記載上の性質より吾人が分離し得た細菌中の非芽胞性の桿菌が供試罐詰中の膨脹を引き起すものと想像した。依つて該菌を肉汁寒天斜面上に30°Cに於て24時間培養を行いたるものを生理的食塩中に懸濁し, 正常なるトマトサージンの罐詰せしものに無菌的に接種し, 後直ちに密封したものを30°Cに保ちたる処5日後には罐は著しく膨脹し細菌の分離に供した試料と同一の様相を示した。かく接種実験を試みた罐より再び同一菌を多教証明することを得て, 本実験に於て検査された罐詰の膨脹は非芽胞性にて糖類を瓦斯形成の下に分解する能力を有する細菌により引き起さるゝことを証明し得た。

他方他の三種の細菌についても同様にして膨脹の原因となり得るか否かを1ヶ月間に亘り検査したが何れも膨脹を認め得なかつた。4株の細菌を組合することによる接種試験は行わなかつた。

次に分離細菌の熱に対する抵抗性の決定を試みた, 実験に使用した供試菌中非芽胞性桿状菌は24時間, 他は48時間夫々肉汁に30°Cに於て培養したもので, 予め所定の温度に予熱した pH6.8 の肉汁9cc. 宛を分注した試験管に可及的少量宛を手早く接種して加熱を続け, 所要時間後速かに冷却, 後30°Cに保ち發育の有無を検した。実施温度は芽胞性

| 加熱温度(°C) | 非芽胞性桿状菌  | 球菌 (1) | 球菌 (2)   | 芽胞性桿状菌 |
|----------|----------|--------|----------|--------|
| 50       | 30~60分以内 | 60分以上  | 30~60分以内 | —      |
| 55       | 5~10分 // | 60分以上  | 5分以内     | —      |
| 60       | —        | 10分以内  | 3分以内     | —      |
| 65       | 1分以内     | 10分以内  | 3分以内     | —      |
| 70       | 30秒以内    | 5分以内   | 30秒以内    | —      |
| 100      | —        | —      | —        | 10分以内  |

菌は 100°Cのみを他は 50°, 55°, 60°, 65°及70°C で斯くして行つた実験で知り得た各温度に於ける死滅に要する時間は大体前表に示す如くである。

以上の結果から考える時、實際上罐詰中に於ける場合と可成り条件を異にするとはいえ実験した細菌は何れも左程熱に対して抵抗性が大なりとは謂ひ得ない様に思はれる。尤も球菌中には実験室的には耐熱性乏しきにかゝりわらず可成高温度且つ長時間殺菌を施した罐内に尚ほ生存する理由は明確に説明されて居ない。然し乍ら非芽胞性桿状菌は普通密封完全で充分に殺菌された罐詰中には生存しないとされて居り、吾人が分離したのも上記の結果より寧ろ罐の密封不完全に依り、殺菌後罐内に侵入したものと考えるのが妥当と思はれる。

概 括

輸出向きとして製造されたトマトサーヂン罐詰の膨脹したものから非芽胞性並に芽胞性桿状菌の各々1株宛及球菌2株を分離し得たが、膨脹は此等の中の非芽胞性桿状菌により引き起さるゝことを確め、且つ該菌は耐熱性に乏しきことから斯る変敗は密封不完全により起りしものと考へられた。

Résumé

From the swelled canned tomato-sardines four kinds of bacteria were isolated. Among these bacteria, the non-sporulating one was ascertained to be the causative organism of the swell; furthermore, the defect seemed to be brought about by the incomplete seaming of cans.

| 菌名  | 培養基 | 温度    | 時間  | 結果 |
|-----|-----|-------|-----|----|
| 球菌  | 牛肉汁 | 100°C | 10分 | 死滅 |
| 球菌  | 牛肉汁 | 70°C  | 10分 | 死滅 |
| 球菌  | 牛肉汁 | 65°C  | 10分 | 死滅 |
| 球菌  | 牛肉汁 | 60°C  | 10分 | 死滅 |
| 球菌  | 牛肉汁 | 55°C  | 10分 | 死滅 |
| 球菌  | 牛肉汁 | 50°C  | 10分 | 死滅 |
| 桿状菌 | 牛肉汁 | 100°C | 10分 | 死滅 |
| 桿状菌 | 牛肉汁 | 70°C  | 10分 | 死滅 |
| 桿状菌 | 牛肉汁 | 65°C  | 10分 | 死滅 |
| 桿状菌 | 牛肉汁 | 60°C  | 10分 | 死滅 |
| 桿状菌 | 牛肉汁 | 55°C  | 10分 | 死滅 |
| 桿状菌 | 牛肉汁 | 50°C  | 10分 | 死滅 |