

各種食品汚染微生物の把握とその防除技術（Ⅲ）

1. 目的

平成15年度から3年間行った「本県食品企業の微生物学的危害分析とその対策」により、各種加工食品の最終製品における微生物汚染の状況を把握することができた。しかし、最終製品から分離した微生物のみを対象としたため、汚染の原因箇所が不明である点や、主として同定試験に使用した簡易同定キットでは同定不能な微生物が存在する点が課題として残された。そこで、製造現場、原材料、半製品等のサンプリングによる汚染の原因箇所の特定、同定不能菌の遺伝子解析による同定、以上の2点を中心に試験を行い、データベースの更なる充実化をはかり、各食品製造現場に即した微生物防除技術を確立することを目的とした。

2. 方法

1) 供試試料（微生物）

最終製品、原材料、半製品の微生物は、県内食品企業提供のサンプルから標準寒天培地(日水製薬社)を用いた混釈培養法により分離した。製造器具等の汚染微生物は、ふきふきチェックⅡ(栄研機材社)を、空中浮遊菌はRCSエアースンプラー(Biotest社)を用いてサンプリングした。

2) 同定試験

(1)簡易同定キット

検出された微生物は、色や性状等により代表的なコロニーを標準寒天培地に移植し、画線培養等により純培養した後、定法どおりグラム染色及び顕微鏡観察を行った。ここで、形態等から細菌類と確認された菌株については、当該菌のグラム染色の種類、オキシダーゼまたはカタラーゼ試験結果をもとに、市販の微生物同定キット(APIシリーズ; bioMerieux社)を用いて同定を試みた。

(2)遺伝子解析

16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、菌体より抽出したDNAを鋳型として、PCRにより5'末端側約500 bpの領域を増幅し、サイクルシーケンス法で決定した。

DNAの抽出はPrepMan™ Ultra (Applied Biosystems社)を、PCRにはMicroSeq 500 16S rDNA PCR kit (Applied Biosystems社)を、PCR生成物の精製はQIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN社)を、サイクルシーケンスには、MicroSeq 500 16S rDNA Sequencing kit (Applied Biosystems社)をそれぞれ使用し、一連の操作はApplied Biosystems社の規定に従って行った。

得られた配列についてBLASTを用いてDNA塩基配列データベース (GenBank/DDBJ/EMBL) に対して相同性検索を行った。

3. 結果

平成20年度は県内食品製造企業の4現場で製造器具等のふき取りや、空中浮遊菌のサンプリングを行い、18箇所から51菌株を分離した。また、原材料や、半製品、最終製品65品目から177菌株を分離した。このうち182菌株について簡易同定キット等を用いて同定を行った。簡易同定キットで同定不能であった46菌株については、遺伝子解析により同定を行った。

分離菌の内訳を図1, 2に示した。最終製品・原材料・半製品からは大腸菌群が、製造環境(製造器具等のふき取り検査や、空中浮遊菌検査)からは *Micrococcus* 属及び *Bacillus* 属が多く検出される傾向が見られた。

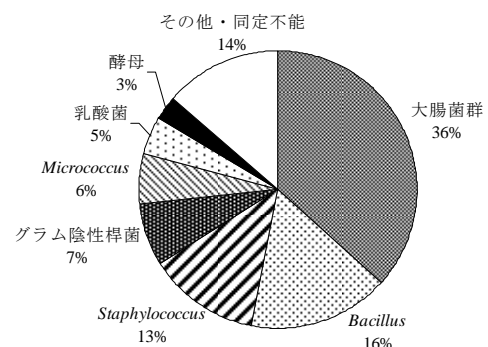


図1 最終製品・原材料・半製品からの分離微生物

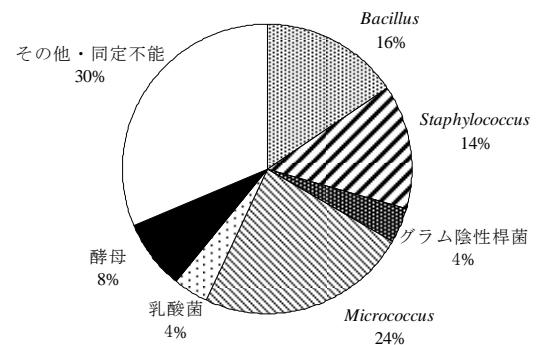


図2 製造環境からの分離微生物

同定結果や菌株のコロニーの画像等をデータベース化し、得られたデータから、当該企業の汚染原因箇所や、製造上の重要管理点を特定し、防除技術の指導に利用した。