

ペトリフィルム ACP を用いた海洋細菌の定量による 海ぶどう養生海水の管理基準*

久高潤・堀井亨・久保弘文**・紫波俊介**・平良勝也・
仁平稔・岡野祥・喜屋武向子・玉那覇康二

Establish Standard of Seawater Quality Standard by Marine-bacteria Count in Sterilized Seawater in Washing Process of *Caulerpa lentillifera* Using Petrifilm Aerobic Plate Count*

Jun KUDAKA, Toru HORII, Hirofumi KUBO**, Toshiyuki SHIWA**, Katsuya TAIRA, Minoru NIDAIRA,
Sho OKANO, Hisako KYAN and Koji TAMANAHA

要旨：海ぶどうの清浄化工程に使用する海水の管理基準を定めるため、沖縄県内の養殖場において養生海水の海洋細菌数と腸炎ビブリオの調査を実施した。70 検体を調査した結果、紫外線殺菌を行っていた 15 検体のうち腸炎ビブリオが検出されたのは 1 検体 (6.7%) のみで、残り 14 検体 (93.3%) からは検出されなかった。一方、紫外線殺菌未実施の海水 55 検体からは 24 検体 (35.7%) で腸炎ビブリオが検出された。また、紫外線殺菌を実施していた 15 検体中 12 検体 (80%) は海洋細菌数が 100 cfu/ml 未満に分布しており、また、腸炎ビブリオは検出されなかった。つまり、紫外線殺菌を行った海水で、海洋細菌数が 100 cfu/ml 未満の場合、腸炎ビブリオも検出される可能性は極めて低いと考えられる。この結果から、海ぶどうの清浄化に使用する殺菌海水の管理基準は、海洋細菌数が 100 cfu/ml 未満であることが望ましい。

Key words: 滅菌海水, Sterilized seawater, 海洋細菌, Marine bacteria, 海ぶどう, *Caulerpa lentillifera*, 腸炎ビブリオ, *Vibrio parahaemolyticus*, 管理基準, Quality standard, ペトリフィルム, Petrifilm

I はじめに

沖縄県の主要な水産業として急速に発展した海ぶどう養殖の持続的発展と、食中毒菌による健康被害を未然に防止する事を目的に平成 18 年度より海ぶどうの衛生管理技術開発に取り組んできた。これまでの調査から、海ぶどう製品の約 19% から腸炎ビブリオが検出されることを報告し、また、海ぶどうを清浄化するには、つま取り養生後、良い海ぶどう (粒付きが良く浸出液の少ないもの) を選別し、紫外線殺菌海水にて強曝気・オーバーフローで 3 日間物理的に洗浄する (物理的洗浄法) が最も有用であることを報告した (本誌)。

物理的洗浄を行う場合、海水の流量やエアポンプの強さも重要であるが、最も注意すべき点は、海水の殺菌が確実に行われているかを管理することである。海水殺菌装置の管理は、装置の動作確認や紫外線ランプの管理に加え定期的な細菌検査を行い、殺菌効果を確認する必要がある。海水中に生息する細菌のほとんどが海洋性細菌であるため発育に塩分やミネラル類を要求する。それらを含まない普通寒天培地や標準寒天培地には発育出来ない。そのため、海洋細菌数を定量するためには Marine

agar 等の培地が必要である。

そこで我々はこれまでに乾式のフィルム培地を用いた簡便な海洋細菌数の定量法を試み、現場で紫外線海水殺菌装置の評価や検査を簡便に実施する方法を開発した。その結果、Marine agar を用いる従来法と変わらない成績が得られた (図 1)。今回は、養殖場で海ぶどうの清浄化に使用する殺菌海水の管理基準値を策定するために、養生に使用している海水のペトリフィルムを用いた海洋細菌の調査を実施した。

II 方法

沖縄島 20 箇所の海ぶどう養殖場において 2009 年 1 月、2009 年 3 月及び 2010 年 7 月に 70 検体の海水を採取した。海水は養生海水の取水口から、滅菌した 2 L のポリ容器に採取し冷蔵しながら輸送し、1 L 中の腸炎ビブリオの定性試験と 1 ml 中の海洋細菌数を検査した。

1. 腸炎ビブリオの検査

海水 1 L を滅菌された 0.45 μm のメンブレンフィルター (ADVANTEC) を用いて無菌的にろ過し、そのフィルターを 100 ml のアルカリペプトン水 (日水) にて 35°C、

* 本研究は地域イノベーションクラスタープログラム都市エリア型 (一般) 沖縄湾岸エリア マリンバイオ産業創出事業費によって実施した。

** 沖縄県水産業改良普及センター

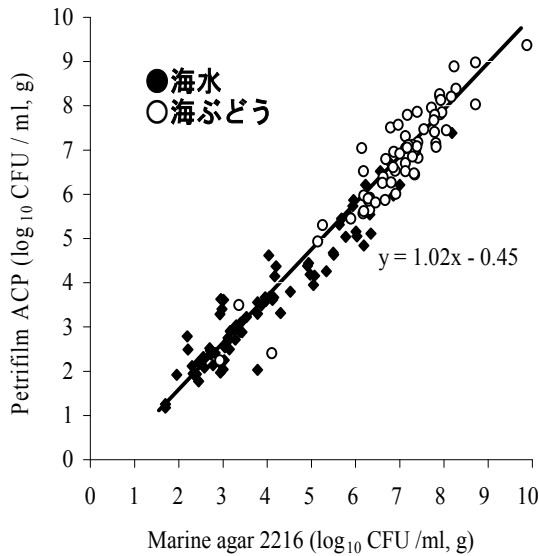


図1：Petrifilm ACP と Marine agar を用いた海洋細菌数の比較¹⁾。

24時間培養した。その後、CHROMagar Vibrio (関東化学) を用いて 35℃、24 時間培養し、腸炎ビブリオを検出し、1%塩化ナトリウムを加えた TSI 寒天培地 (栄研) および LIM 培地 (日水) にて同定した。

2. 海洋細菌数の定量

検体 1 ml を原液、および滅菌海水で 10¹~10³ まで段階希釈したもの 1 ml をペトリフィルム AC プレート (3M ヘルスケア) に接種し、スプレッターで拡散させた後 27℃ で 5 日間培養した。培養後出現した赤色コロニーをすべて計測し、1 ml あたりの海洋細菌数を求めた。

Ⅲ 結果

紫外線殺菌を実施した海水 15 検体、および未実施の海水 55 検体、合計 70 検体の海水を採取した。紫外線殺菌を行っていた海水 15 検体中腸炎ビブリオが検出された 1 検体 (6.7%) のみで、残り 14 検体 (93.3%) からは検出されなかった。一方、紫外線殺菌未実施の海水 55 検体からは 24 検体 (35.7%) に腸炎ビブリオが検出された (表 1)。また、紫外線殺菌を行っていない施設の海水の多く (89.1%) は、海洋細菌数が 100 cfu/ml 以上に分布しており、100 cfu/ml 未満であっても 33% から腸炎ビブリオ検出された (図 2)。一方、紫外線殺菌を実施していた 15 検体中 12 検体 (80%) は海洋細菌数が 100

表 1. 紫外線殺菌実施・未実施の海水から検出された腸炎ビブリオ。() 内は%を示す。

腸炎ビブリオ 検査結果	海水の紫外線殺菌		合計
	実施	未実施	
検出	1 (6.7)	24 (43.6)	25 (35.7)
不検出	14 (93.3)	31 (56.4)	45 (64.4)
合計	15 (100)	55 (100)	70 (100)

cfu/ml 未満に分布しており、また、腸炎ビブリオは検出されなかった。紫外線殺菌を行っているにもかかわらず腸炎ビブリオが検出された検体は 1 検体のみであったが、この検体からは海洋細菌数が 1000 cfu/ml 以上検出されていた。つまり、紫外線殺菌装置の能力不足、紫外線ランプの寿命、海水のろ過不足など、装置の管理不十分が考えられた。

これらの結果から、紫外線殺菌を行った海水で、海洋細菌数が 100 cfu/ml 未満の場合、腸炎ビブリオも検出される可能性は極めて低いと考えられる。このことから、海ぶどうの清浄化に使用する殺菌海水の管理基準は、海洋細菌数が 100 cfu/ml 未満であることが望ましい。また、海洋細菌数を検査する場合は、採水の際、紫外線殺菌ランプを付けた場合と付けない場合の検査を同時に行い、付けた場合有意に菌数が低下することもあわせて確認する必要がある。

我々はこれまでに海ぶどうの清浄化方法について、室内実験と現場試験をくり返し、簡便で大量に海ぶどうを清浄化するためには物理的洗浄方法が有用であることを報告した (本誌参照)。その際、管理すべき点は以下のとおりである。

- i) 目視や手触りの検査をロットごとに行い、品質のよい海ぶどうだけを選別し、水分が滲出してくるような品質の悪い海ぶどうは、菌を再増殖させる可能性があるため商品化しないこと、
- ii) 洗浄する前に、二酸化炭素を飽和させた海水に海ぶどうを漬け、付着している小エビなどの甲殻類を窒息死させ落とすこと。
- iii) 3 日間紫外線殺菌海水をかけ流しながら強通気で海ぶどうを回転させ、表面から剥がれ落ちてくる汚れをオーバーフローで流し、壁面に溜まる汚れは毎日きれいにふき取ること。

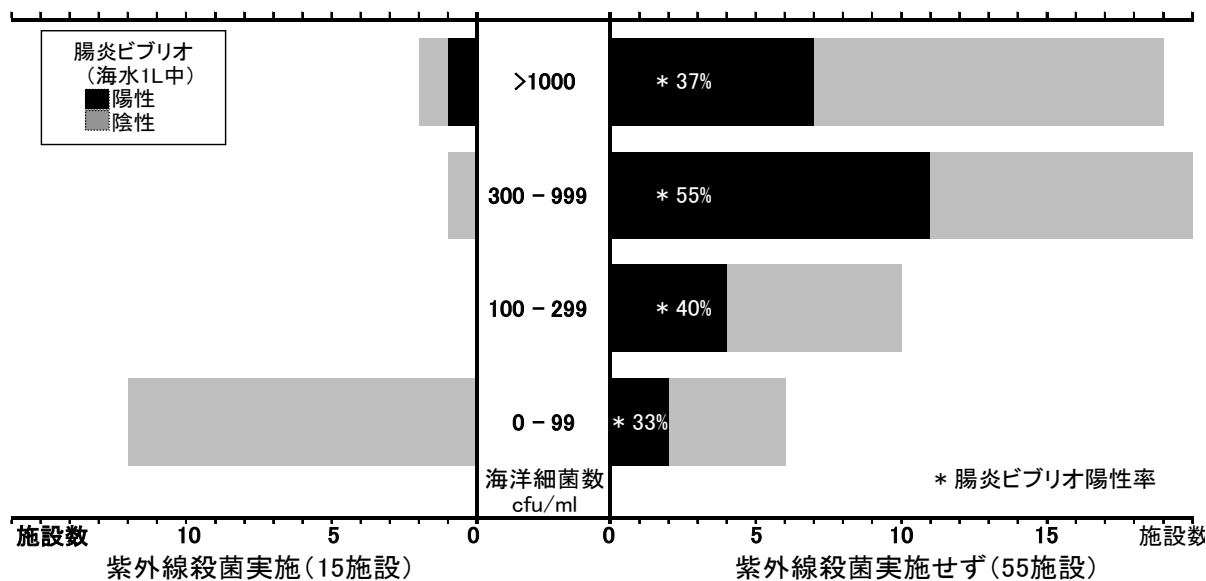


図2. 養生海水の海洋細菌数と腸炎ビブリオの調査結果 (紫外線殺菌海水の効果検証)。

iv) 紫外線殺菌装置は毎日点検し、ランプと点灯を確認する。また、定期的にペトリフィルムを用いて海洋細菌数が100 cfu/ml未満であることを確認すること。

この方法は、日数を要するため出荷が3～4日遅れるが、確実に行うことで除菌でき、海ぶどうに活力を与える。紫外線殺菌装置導入のための設備投資は必要であるが、方法は簡単で養殖工程に無理なく導入できるため、この方法をマニュアル化し、県内の海ぶどう養殖施設に広く普及することで品質向上と健康被害の防止につながる。ペトリフィルムACプレートを用いた海洋細菌数検査法は、海ぶどう養殖の衛生管理のみならず、港などで魚の洗浄に用いる殺菌海水の管理にも応用可能である。

<謝辞>

本調査にご協力頂きました県内各地の海ぶどう養殖生産者の方々に深謝します。

IV 参考文献

1) Kudaka, J., Horii, T., Tamanaha, K., Itokazu, K., Nakamura, M., Taira, K., Nidaira, M., Okano, S, and Kitahara, A. (2010) Evaluation of the petrifilm aerobic count plate for enumeration of aerobic marine bacteria from seawater and *Caulerpa lentillifera*. J. Food Prot., 73: 1529-1532.