

腸球菌の NaCl 存在下における温度感受性

川上 英之・橋本 秀夫

(広島大学水畜産学部食品工業化学科)

Influence of Temperatures on Enterococci in the Presence of Sodium Chloride

Hideyuki KAWAKAMI and Hideo HASHIMOTO

*Department of Food Chemistry and Technology, Faculty of Fisheries
and Animal Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama*

(Figs. 1-5, Table 1, Plates 1-2)

I 緒 論

食品の変質で最も影響の大きいのは微生物の増殖によるものである。これまでに微生物の増殖を防ぐ手段として加熱、冷却、乾燥、それに塩、糖、防腐剤の利用等が考えられて来た。さらに近年、放射線あるいはガス保蔵等も次第に実用化されるようになって来ている。これらの方法はすべて食品中に存在する微生物に対して殺菌的あるいは静菌的作用を有するものとして知られている。ところが、これまでの食品衛生検査法で用いられて来ている培地では発育出来ず、生菌として取扱われて来なかった細菌の中にも適当な培養条件を与えてやれば集落を形成して培地上に検出できるいわゆる非致死的損傷菌¹⁾が指摘されたことから食品の品質管理上これら損傷菌の挙動が注目されるようになった。さらに一方では、食品の各種殺菌処理によって変異²⁾をおこす細菌のあることも指摘されている。

そこで著者らは食品中に存在する微生物がこのような感作に対して、どのような影響を受けるかを推察することが食品管理上必要であると考え、今回は比較的高濃度の NaCl 存在下における腸球菌の温度感受性について若干の検討を加えたので報告する。

II 実験材料および方法

1) 材 料

実験に供した腸球菌はいずれも教室保存株で *S. faecalis*, *S. faecalis* var. *liquefaciens* それに *S. faecium* (A), (B) の4菌株を用いた。

培地はグルコースブイヨン(1%グルコース, 1%ペプトン, 0.5%酵母エキス, 0.5% NaCl, pH 7.0±0.2)を基本培地として用い、試験にはこの中 NaCl の濃度を6, 9%に変えたものを用いた。

2) 方 法

先ず4菌株をグルコースブイヨン(10 ml)に接種し、35°C, 12時間の振とう培養を2回くり返したものを供試菌液とした。

次にこの菌液を滅菌生理食塩水で希釈して 1.0×10^6 個ずつ試験用培地に接種した。これを 35°C 、 15°C 、 0°C 中で振とう培養すると共にアセトンドライアイス中で凍結後、 -20°C に保持して生菌数、集落の形態および NaN_3 に対する感受性について経時的に検討した。

生菌数は栄研化学製の標準寒天培地を用いて平板培養法³⁾に従って測定し、 NaN_3 に対する感受性は、腸球菌の発育の程度を測定することによって検討した。また発育の程度は600nmでの濁度の測定によった。

電子顕微鏡による観察は白金—バナジウムでシャドーイングを行なって処理したのち、日立のHU12—A型の電子顕微鏡を用いて、倍率10万倍で観察した。

Ⅲ 実験結果

1) 生菌数の変化

NaCl の濃度が0.5%のものを対照として、6%、9%の NaCl 存在下で培養した時の生菌数の変化を、培養温度を変えて測定した。

その結果、 35°C の場合、対照に比べて6%のものはLag phaseが3時間まで延長され、10時間後をとってみると、*S. faecium* (B)が最も発育が良く、他の3株は発育はおそくなる傾向を示した(Fig. 1)。9%のものは*S. faecium* (A)だけは次第に菌数が減少してゆく傾向を示した。その他の3株も発育はかなり抑制され、Lag phaseも24時間まで延長された。

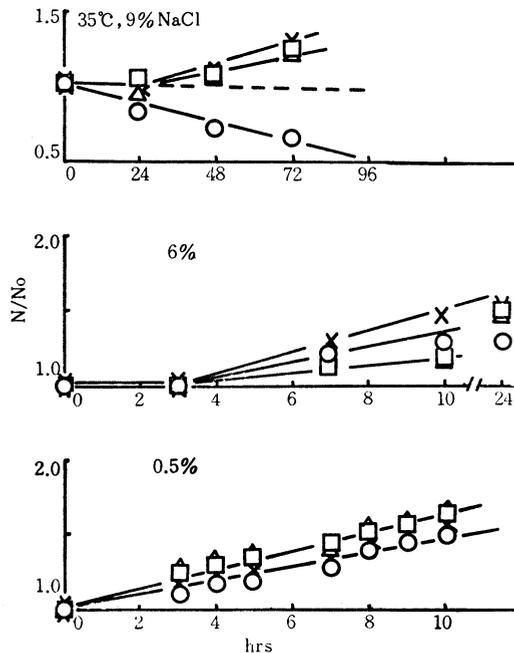


Fig. 1. Growth curves of enterococci at 35°C .

- △—, *S. faecalis*
- , *S. faecalis* var. *liquefaciens*
- , *S. faecium* (A)
- ×—, *S. faecium* (B)

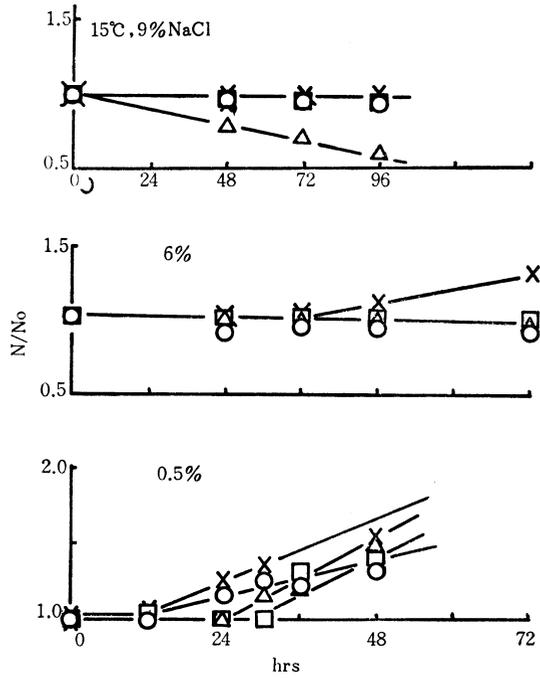


Fig. 2. Growth curves of enterococci at 15°C.

- △—, *S. faecalis*
- , *S. faecalis* var. *liquefaciens*
- , *S. faecium* (A)
- ×—, *S. faecium* (B)

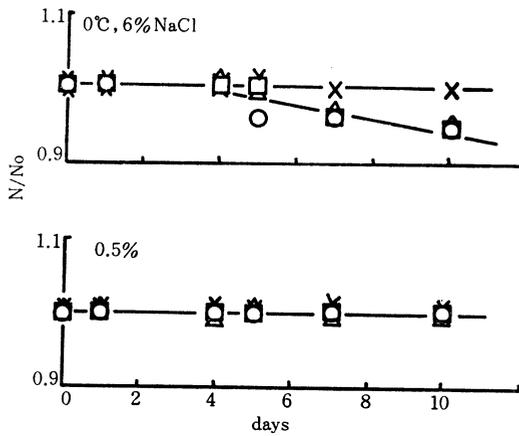


Fig. 3. Growth curves of enterococci at 0°C.

- △—, *S. faecalis*
- , *S. faecalis* var. *liquefaciens*
- , *S. faecium* (A)
- ×—, *S. faecium* (B)

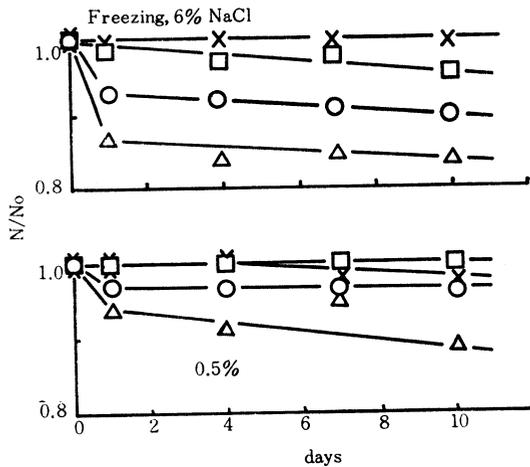


Fig. 4. Survivor curves of enterococci at -20°C .

- △—, *S. faecalis*
- , *S. faecalis* var. *liquefaciens*
- , *S. faecium* (A)
- ×—, *S. faecium* (B)

15°C の場合は、全体的に発育は悪くなり、NaClの濃度を6%にすると、*S. faecium* (B) 以外は72時間後においてもはじめの接種菌量とほとんど変化がみられなかった。さらに9%にすると、はじめの接種菌量より減少する傾向を示し、中でも *S. faecalis* はその傾向が著しく、96時間後には、はじめの約50%まで減少した (Fig. 2)。

さらに温度を下げて、 0°C にした場合、NaClの濃度を6%にすると *S. faecium* (B) は10日目までは、はじめの接種菌量と変わらないが、その他の3株は4日目頃から次第に生菌数が減少した (Fig. 3)。

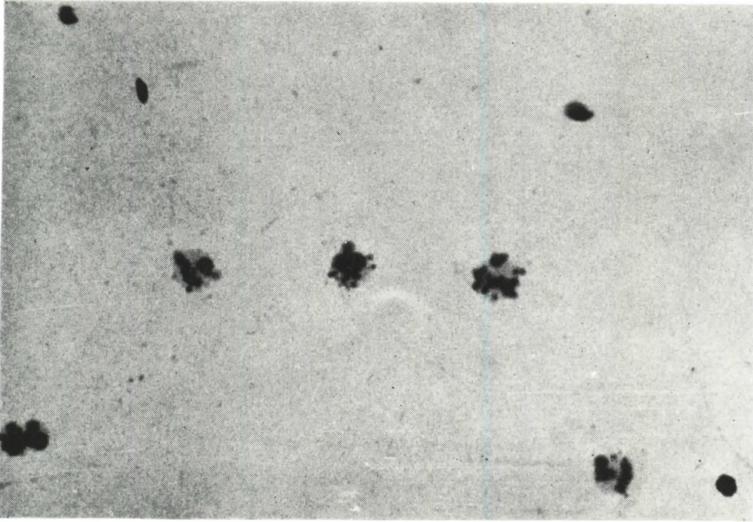
次にアセトンドライアイスで凍結したのち、 -20°C に保持すると2段階にわたって減少した。対照では *S. faecalis* > *S. faecium* (A) > *S. faecalis* var. *liquefaciens* = *S. faecium* (B) の順に減少した。6%ではこの傾向は一層明らかとなり、*S. faecalis* > *S. faecium* (A) > *S. faecalis* var. *liquefaciens* > *S. faecium* (B) の順に減少した (Fig. 4)。

2) 集落の形態

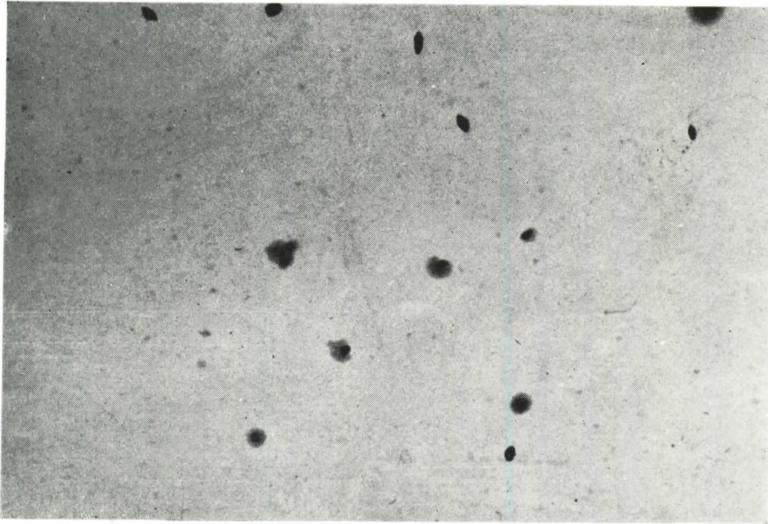
以上のように比較的高い濃度の NaCl が存在すると、発育が抑制される (Fig. 1~2) か、あるいは死滅してゆく傾向 (Fig. 3~4) を示す。

この場合生菌として取扱ったものの中にも何らかの損傷を受けたものも混じっていることが考えられる。特に 35°C という腸球菌の至適発育温度において、しかも *S. faecium* は腸球菌の中で最も耐熱性がある⁴⁾ とされているが、この *S. faecium* の中でも株によっては NaCl の濃度を9%にすると死滅してゆく傾向を示すもの (*S. faecium* A) があることから、本菌株を選んで6% NaCl 存在下における集落の形態を観察した。

その結果、Plate 1 に示すように、 35°C および 15°C で培養した場合、腸球菌の典型的な集落であるソロバン球状の集落と共に Rough 形の集落がみられた。しかし、 0°C あるいは凍結した場合には 35°C 、 15°C の場合程、顕著な変化はみられなかった。恐らくこれは集落形成能のあるものと無いものの差が一層顕著になり、集落形成能のあるものはほぼ正常な状態で生残し、それ以外のものは死滅したかあるいは使用した培地では集落を形成出来ない、いわゆる非致死的損傷菌¹⁾であった為にこのような結果が得られたものと考えられた。



(I)



(II)

Plate 1. Colonies of *S. faecium* (A) which cultured at 35°C (I) and 15°C (II) in the presence of 6% NaCl.

3) NaN_3 に対する感受性

次にこれらの Rough 形の集落が NaN_3 に対して感受性を有するか否かを検討するために、0~0.1%の濃度の NaN_3 に対する発育の状態を検討した (Fig. 5).

その結果、35°C では対照よりもやや発育は悪いが現在腸球菌検査用培地として市販されている S F 培地に含まれている 0.05% の濃度の NaN_3 にも十分耐えることが判った。しかし、0°C あるいは凍結したものは橋本⁵⁾ の提案した分離用推定培地に含まれている 0.02% にも影響を受け、 NaN_3 に対する感受性が非常に高くなっていることが判った。

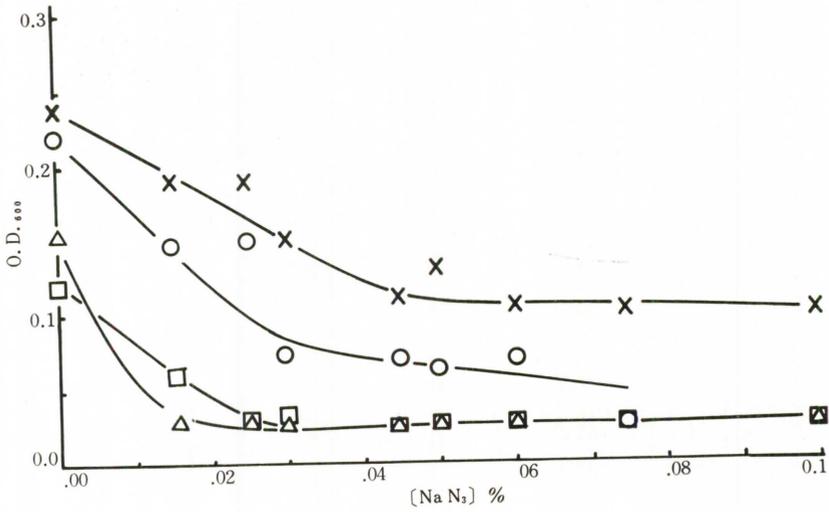


Fig. 5. Influence of NaN₃ on enterococci.

- △—, at -20°C, 6% NaCl
- , at 0°C, 6% NaCl
- , at 35°C, 6% NaCl
- ×—, at 35°C, 0.5% NaCl (control)

4) 電子顕微鏡による観察

以上述べて来た Rough 形の集落の菌体の形態について電子顕微鏡で観察した結果, Plate 2 に示すように, いずれも双球あるいは連鎖状の球菌で正常な腸球菌と形態上は変化がみられなかった.

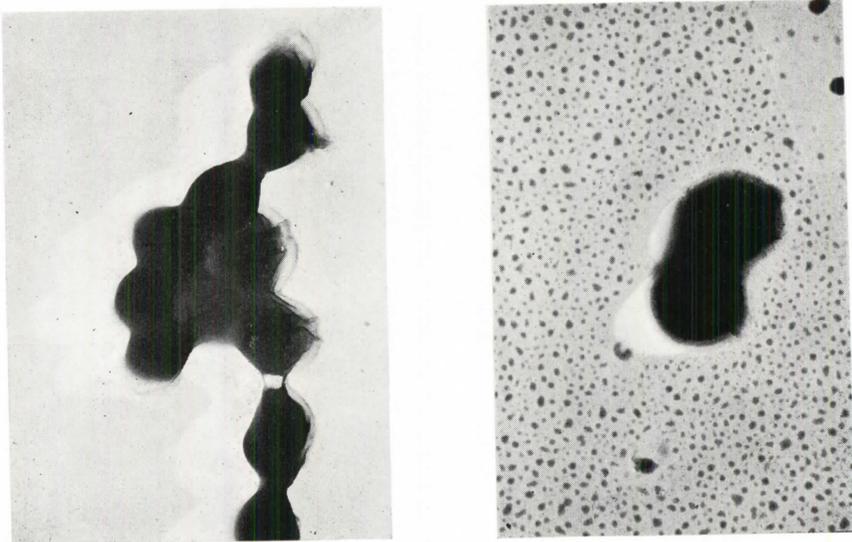


Plate 2. Electron microscopic forms of *S. faecium* (A) which cultured at 35°C in the presence of 6% NaCl, ×100,000.

IV 考 察

食品の加工、貯蔵のための種々の物理的、化学的処理はその中に存在する微生物に対して、多かれ少なかれ何らかの感作を与えていることが推察されるので、今回、比較的高い濃度の NaCl が腸球菌に与える影響について検討した。その結果、NaCl の濃度が 9% 以下では $35^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 0^{\circ}\text{C}$ の順に発育が良く、発育の温度依存性を良く示していた。また菌株間の差をみると、 35°C の場合 $S. faecium (B) > S. faecium (A) > S. faecalis = S. faecalis \text{ var. } liquefaciens$ の順に発育し、 15°C では $S. faecium (B)$ は次第に発育する傾向を示したが、それ以外のものは、はじめの接種菌量とほとんど差がみられなかった。さらに 0°C では $S. faecium (B)$ 以外は生菌数が減少し、死滅してゆく傾向を示した。腸球菌の中で $S. faecium$ は耐熱性が強く⁴⁾、またミソの中からも検出されたという報告⁶⁾ もあり種々の感作に対する抵抗性が最も強いとされていることから全体を通じて、 $S. faecium (B)$ が生残性を最も強く示したことはうなづける。しかし、同じ $S. faecium$ でありながら、A 株と B 株とではかなり低温における発育および生残性に差があった。一方、島崎⁷⁾ は水中における腸球菌の生残性について検討し、 20°C 、 5°C における井戸水および海中では 7 日目までは $S. faecalis$ およびその変種である $S. liquefaciens$ 、 $S. zymogenes$ は、はじめの接種菌量を保つが、 $S. faecium$ と $S. durans$ は約 1.0×10^1 倍位菌数が下ってくると報告しているの、このような不一致点についてはさらに検討を要する。

NaCl の濃度を 9% にすると、6% 以下の場合とは大部様子が異なり、 35°C では $S. faecium (A)$ だけは死滅してゆく傾向を示し、残りの 3 株は発育する傾向を示した。

15°C では $S. faecalis$ が最も速く死滅してゆく傾向を示した。

一方、アセトソードドライアイスで凍結した後、 -20°C に保持すると、速度の異なる 2 種類の一次反応に従って、2 段階にわたって死滅してゆくことが判った。中でも $S. faecium (A)$ および $S. faecalis$ はそれが明らかにかがわれた。そこで、第 1 段階の速度を k_1 、第 2 段階の速度を k_2 とし、 k_1 、 k_2 を(1)式により求めた (Table 1)。

$$k_1, k_2 = \frac{dN/N_0}{dt} \text{ (hr.}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

(この時の N/N_0 は接種直後の生菌数 (N_0) に対するその後の生菌数 (N) の変化量を、また t は培養時間を表わす。)

Table 1. Kinetics of extinction of frozen injured enterococci.

	k_1 (hr. ⁻¹)		k_2 (hr. ⁻¹)	
	0.5%	6%	0.5%	6%
<i>S. faecalis</i>	2.5×10^{-3}	5.4×10^{-3} (4.1×10^{-4})	2.3×10^{-4}	1.4×10^{-4}
<i>S. faecalis</i> var. <i>liquefacience</i>	—	6.2×10^{-4} (4.1×10^{-4})	—	—
<i>S. faecium</i> A	1.5×10^{-3}	3.1×10^{-3} (4.1×10^{-4})	—	1.6×10^{-4}
<i>S. faecium</i> B	—	—	—	—

() ; stored at 0°C

この表から判るように、凍結した場合 NaCl が 0.5% の時についてみると、 $S. faecalis$ の $k_1 = 2.5 \times 10^{-3}$ 、 $k_2 = 2.3 \times 10^{-4}$ で k_1 は k_2 の約 10 倍、 $S. faecium (A)$ は $k_1 = 1.3 \times 10^{-3}$ 、 $k_2 = 0$ 、6% についてみると、 $S. faecalis$ は $k_1 = 5.4 \times 10^{-3}$ 、 $k_2 = 1.4 \times 10^{-4}$ で k_1 は k_2 の約 38 倍、 $S. faecium (A)$ は $k_1 = 3.1 \times 10^{-3}$ 、 $k_2 = 1.6 \times 10^{-4}$ で k_1 は k_2 の約 19 倍といずれも凍結による死滅は k_1 に大きく依存しているこ

とが判った。また、NaCl の濃度が0.5%の時の k_1 に対する6%の時の k_1 の比を取ってみると、約2.4となる。さらに6%のNaCl存在下において、0°Cに保持した時の k_1 に対する凍結した時の k_1 の比を取ると、*S. faecalis* は14、*S. faecalis* var. *liquefaciens* は15、それに *S. faecium* (A) は7.5である。これらの結果から、温度が一定の場合、NaCl の濃度を0.5%から6%にした時の死滅してゆく速度の比(2.4)よりもNaClの濃度を一定にして、温度を0°Cから凍結温度(約-60°C)にした時の速度の比(7.5~15)の方が約3~7倍大きくなることが判る。すなわち、0°C以下に保持した場合、死滅に影響する要因はNaClの濃度変化よりも温度変化の方が大であることが判った。

凍結、乾燥あるいは浸透圧ショック⁸⁾はいずれもこれらの処理の過程において細菌に致命的なショックを与えることが知られている⁹⁾¹⁰⁾。その主な原因は①細胞内外での氷晶の形成による細胞破壊¹¹⁾、②細胞膜の透過性の増大¹²⁾、③各種の代謝障害^{13)~15)}、④脱水による塩類の濃縮¹⁶⁾による障害が挙げられる。凍結-融解にしても凍結乾燥-復水にしても、これらの考えられる原因は単独で作用するのではなく、すべて連鎖反動的に生じて細菌を死に至らせる。

今回の試験では、まず高温域(35°C)においてはNaClの高い濃度による浸透圧の増加、それに伴って脱水、塩類濃縮による細胞内の自由水の減少による代謝障害が引き起こされることが考えられる。また低温域(0°C以下)ではNaClによる塩類濃縮もさることながら、NaClの濃度変化による浸透圧の変化よりもむしろ温度変化によって、氷晶の形成に伴う細胞の破壊、塩類濃縮、代謝障害等が原因となり、死に至る過程の方が速度論的解析からより大きな要因であると考えられた。

また6%NaCl存在下で0°Cあるいは凍結した*S. faecium* (A)はNaN₃に対して強い感受性を示した。この結果からも、温度変化あるいは浸透圧変化によって最終的には代謝障害に至ることが判る。

以上述べて来たことをより普遍的なものとするためには、NaClの濃度、温度、菌種あるいは菌株数等についてもっときめの細い検討がなされなければならない。また今後は凍結を考える場合融解による影響も考慮されなければならない。

これらの点については今後の検討を待たなければならない。

V 要 約

食品の加工、貯蔵のための物理的、化学的処理に伴って、食品中に存在する微生物がどのような影響を受けるかを推察する目的で、今回は腸球菌を用いて比較的高い濃度のNaClの存在下における温度感受性を検討した。その結果、①低温域(0°C以下)では死滅を律速する要因はNaCl濃度変化よりもむしろ温度変化に大きく依存することが判った。

②低温域における腸球菌の死滅は速度の異なる2種類の一次反応から成り、 k_1 に依存することが判った。

③低温処理した*S. faecium* (A)はNaN₃に対して強い感受性を示した。

本研究を行なうに当たり、御協力いただいた岡田正和教授、田村達堂助教授に深謝する。

なお、本研究の一部は第24回日本食品衛生学会(昭和47年、秋田)において発表した。

参 考 文 献

- 1) 森地敏樹：食衛誌，13，173—188 (1972)。
- 2) 田島弥太郎：科学，43，745—749 (1973)。
- 4) 厚生省環境衛生局監修：食品衛生検査指針，1，p. 103，日本食品衛生協会，東京(1973)。
- 4) 橋本秀夫，川上英之：食衛誌，6，507—510 (1965)。
- 5) 橋本秀夫：メディアサークル，41，1—9 (1963)。
- 6) 伊藤 寛，海老根英雄：食料研究所報告，18，14—22 (1964)。

- 7) 島崎保家：モダンメディア, **16**, 41—48 (1970).
- 8) HAROLD, C. NEU and LEON, A. HEPPEL: J. Biol. Chem., 3685-3692 (1965).
- 9) 森地敏樹：凍結・乾燥と細胞障害, p. 45, 東大出版会, 東京 (1970).
- 10) SPECK, M.L. and COWMAN, R.A.: Freezing and Drying of Microbiology, p. 39, Univ. Tokyo Press, Tokyo (1969).
- 11) 根井外喜男：凍結・乾燥と細胞障害, p. 1, 東大出版会, 東京 (1970).
- 12) SMEATON, J.R., ELLIOTT, W.H.: Biochem. Biophys. Res. Comm., **26**, 75-80 (1967).
- 13) MORICHI, T., IRIE, R., YANO, N., KEMBO, H.: J. Gen. Appl. Microbiol., **9**, 149-155 (1963).
- 14) 森地敏樹, 矢野信礼：食衛誌, **13**, 29—35 (1972).
- 15) 佐藤幹夫：凍結・乾燥と細胞障害, p. 65, 東大出版会, 東京 (1970).
- 16) STRAKA, R.P., STOKES, J.L.: J. Bacteriol., **78**, 181-188 (1959).

SUMMARY

The influence of sodium chloride on the growth of enterococci (*S. faecium* A and B, *S. faecalis* and *S. faecalis* var. *liquefacience*) has been examined.

The rate of extinction depended on the temperature more than on the sodium chloride concentration and a kinetic mechanism which qualitatively accounted for the observed behavior was discussed under the lower temperature zone (below 0°C).

The reaction consisted from two kinds of velocities (k_1 and k_2) and depended on k_1 greatly.

Cold- and frozen-injured *S. faecium* (A) in the presence of 6% sodium chloride was influenced by sodium azide.