Vibrio anguillarum にたいする界面活性剤の抗菌効果

Antibacterial Effect of Surfactants on *Vibrio anguillarum*

(昭和 45 年 8 月 11 日 受理)

飯 森 正 秀* 原 口 達 一*
(Masahide Iimori) (Tatsuichi Haraguchi)

The effect of pH and inorganic salt on the growth of *Vibrio anguillarum* was investigated in the presence of such surfactants as polyethoxylated fatty alcohol (SAEO), polyethoxylated alkyl phenol (NPEO), straight chain alkylbenzene sulfonate (LAS) and sucrose fatty acid ester (SE).

The results showed that SAEO, when acidic medium of pH 5 was employed, LAS and NPEO accelerated the antibacterial activity and also that, after the exposure of the bacterium to pH 5 medium, growth was apparently retarded on pH 7 medium.

緒 言

さきに著者らは鮮魚を pH 5.0 とした海水に非イオン界面活性剤のポリオキシエチレン脂肪族アルコールエーテル (SAEO) を加えて洗浄すると、海水のみによる洗浄にくらべて、魚の表面組織に悪影響を与えることなく、不快な魚臭を除去できるとともに表面に付着している微生物を有効に除去できることを見出した¹⁾。本報では、このような目的の洗浄剤として用いる界面活性剤に関する基礎的な研究の実験として、ひろく分布している代表的海水微生物の 1 種である *Vibrio anguillarum* を用いて、まず pH、無機塩のおよぼす影響を検討し、ついで各種の界面活性剤を培地に加えたときの抗菌効果を検討した結果、興味ある知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 試料

使用した界面活性剤は次のごとくである。

SAEO: $\text{RO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ R は抹香アルコールの残基。抹香アルコール 1 モルと酸化エチレン 9 モルを重合反応させた。触媒として用いた KOH は反応ののち氷酢酸で中和した。pH (1% 水溶液) 7.0, 分子量 655.0, くもり点 (1% 水溶液) 58.1°C。

NPEO: ポリオキシエチレンノニルフェノールエーテル $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ —ノニルフェノール 1 モルと酸化エチレン 9 モルを重合反応させた。触媒として用いた KOH は氷酢酸で中和した。pH (1% 水溶液) 7.0, 分子量 638.0, くもり点 (1% 水溶液) 55.0°C。

LAS: 直鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム

$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na}$ — C_{12} が主体のアルキル基の直鎖アルキルベンゼンを無水硫酸でスルホン化し、NaOH でナトリウム塩とした。未反応油を石油エーテルで溶解して除去し、98% エチルアルコールに溶解し不溶性のほう硝を除去した。pH (1% 水溶液) 7.0, 分子量 348.0。

SE: しゅ糖脂肪酸エステル。「ニットーエステル 1005」(大日本製糖) を用いた。

2. 供試菌

Vibrio anguillarum NCMB-6 を用いた。

3. pH, NaCl 濃度別培地中における増殖試験

培養基は下記 (B 培養基)²⁾ を用いた。

Polypeptone 1.0%, KCl 1.0%, NaCl 0.8%, “Lab-Lemco” (Oxoid) 0.3%, yeast extract 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15% (agar 1.5%)。

pH は M/5 Na_2HPO_4 —M/10 クエン酸緩衝液を培養基の溶液に 10v/v% 加えて調整した。NaCl は培養基の無機塩および緩衝剤に加算して所定の w/w 濃度となるように (以下これを NaCl 濃度と称す) 培地に加えた。供試菌を B 培養基の斜面培地で 30°C で 24 時間培養し、その菌体 1 白金耳を希釈水 (0.8% NaCl, 1.0% KCl) 約 10ml にけんだくさせ、その 1 白金耳を pH, NaCl 濃度の異なる B 培養基組成の液体培地 9 ml に接種し、30°C で培養した。

4. pH, NaCl 濃度別培地に接触ののちの増殖試験

pH, NaCl 濃度別の液体培地で 30°C で 1 時間培養したのち、培養液の 1 白金耳を pH 7.2, NaCl 濃度 2.0% の正常の B 培養基組成の液体培地 9 ml に接種し、30°C で培養した。

5. 界面活性剤を加えた培地における増殖試験

各種の界面活性剤を 0.02w/w% となるように B 培養

* ライオン油脂株式会社研究部

第 1 表 pH, NaCl 濃度別増殖試験

(3 培地併行)

pH	3.0			4.0			5.0			6.0			7.2 (B 培養基)		
培養(時間)	12	24	48	12	24	48	12	24	48	12	24	48	12	24	48
NaCl濃度(%)															
2.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
3.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
6.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+
8.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

— 生育を認めず + わずかに生育を認める 十明らかに生育を認める
 卍 豊富な生育を認める

基組成の液体培地に加え、前記の方法に準じて供試菌を接種し、培養した。

6. 界面活性剤添加培地に接種ののちの増殖試験

供試菌を各種の界面活性剤を前記の濃度に加えた液体培地 9 ml で 30°C で 1 時間培養したのち、その培養液 0.3 ml を正常の B 培養基組成の液体培地 9 ml に接種し、30°C で培養した。

7. 生菌数測定

試料培養液 1 ml をとり、10 倍希釈段階の平板混釈培養法により、B 培養基で 30°C で 120~144 時間培養してコロニーを計数し試料中の生菌数を測定した。

実験結果

1. pH, NaCl 濃度別培地における増殖試験

pH, NaCl 濃度の異なるそれぞれの培地で 48 時間培養し、培地の濁度より増殖度を判定した。結果を第 1 表に示す。

この結果より、供試菌は培地の条件が pH 5.0 以下、あるいは培養基の無機塩・緩衝剤を含む NaCl 濃度が 8.0 % 以上では増殖しないことがわかった。また、供試菌の

生育最適 pH (6, 7) でも NaCl 濃度 6 % では生育の阻害が認められた。

2. pH, NaCl 濃度別培地に接触ののちの増殖試験

pH, NaCl 濃度の異なるそれぞれの培地で 1 時間培養したのち、B 培養基組成の液体培地で 24 時間培養した結果を第 2 表に示す。

この結果より、供試菌を pH, NaCl 濃度別培地で pH

第 2 表 pH, NaCl 濃度別培地に接触ののちの増殖試験 (3 培地併行)

pH	3.0		4.0		5.0		6.0		7.2 (B 培養基)	
培養(時間)	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24
NaCl濃度(%)										
2.0	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
3.0	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
6.0	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
8.0	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
10.0	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
20.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

符号内容は第 1 表に同じ

第 3 表 界面活性剤を加えた培地における増殖試験

(生菌数/培地 1 ml)

培養時間		初 発	15 分	30 分	1 時間	5 時間	8 時間	13 時間	30 時間
pH	界面活性剤								
7.2 (B 培養基)	—	3.0×10^8	1.4×10^8	1.8×10^8	1.8×10^8	5.9×10^7	5.5×10^8	5.6×10^8	1.4×10^9
5.0	—	3.0×10^8	2.7×10^8	1.2×10^8	6.0×10^8	2.3×10^8	30>	30>	30>
5.0	SAEO	3.0×10^8	6.2×10^8	3.7×10^8	1.3×10^8	30>	30>	30>	30>
5.0	NPEO	3.0×10^8	5.7×10^8	3.7×10^8	8.0×10^8	30>	30>	30>	30>
5.0	L A S	3.0×10^8	9.1×10^8	5.8×10^8	3.7×10^8	30>	30>	30>	30>
5.0	S E	3.0×10^8	2.0×10^8	6.8×10^8	5.8×10^8	30>	30>	30>	30>

第 4 表 界面活性剤添加培地 (pH 5.0) に接触ののちの増殖試験

(生菌数/培地 1 ml)

界面 活性剤	培 地		増 殖 培 地							
	培養	接 触 培 地		初 発	4 時間	10	15	18	24	30
		初 発	1 時間							
—		2.5×10 ⁵	6.8×10 ³	2.3×10 ²	1.2×10 ⁴	8.1×10 ⁴	5.0×10 ⁵	5.2×10 ⁵	5.2×10 ⁵	5.2×10 ⁵
SAEO		2.5×10 ⁵	1.6×10 ³	5.0×10	6.2×10	1.2×10 ⁴	1.5×10 ⁵	1.1×10 ⁵	1.8×10 ³	1.2×10 ²
NPEO		2.5×10 ⁵	1.6×10 ³	5.0×10	6.2×10	1.9×10 ⁴	2.2×10 ⁵	1.2×10 ⁵	2.5×10 ³	2.8×10 ²
L A S		2.5×10 ⁵	1.2×10 ³	4.0×10	5.6×10	1.6×10 ⁴	1.5×10 ⁵	1.7×10 ⁵	1.7×10 ⁵	1.1×10 ³
S E		2.5×10 ⁵	5.5×10 ³	1.8×10 ²	6.2×10 ³	6.8×10 ⁴	3.3×10 ⁵	5.2×10 ⁵	5.2×10 ⁵	4.3×10 ⁵

4.0 以下あるいは NaCl 濃度 20% 以上で 1 時間接触させたのち正常の B 培養基の培地に移植しても増殖しないことがわかった。

3. 界面活性剤を加えた培地における増殖試験

pH 5.0 の液体培地に SAEO, NPEO, LAS, SE を加えたそれぞれの培地で 30 時間培養し、経時的に生菌数を測定した。結果を第 3 表に示す。

結果より、対照の pH 7.2 の正常の培地での豊富な増殖にたいし pH 5.0 の培地では次第に死滅し、生菌は 8 時間までにほとんど認められなくなった。pH 5.0 の培地に界面活性剤を加えた場合では、界面活性剤の種類により差はあるが、生菌数の減少はさらに大きく、5 時間までで生菌は認められなくなった。生菌数減少を促進させる場合は、LAS がもっとも大きく NPEO, SAEO がこれに次ぎ SE がもっとも小さかった。

4. 界面活性剤添加培地に接触ののちの増殖試験

pH 5.0 の液体培地に界面活性剤を加えて供試菌を接種し培養したのち、菌体を pH 7.2 の正常の液体培地に移植して 30 時間培養し、経時的に生菌数を測定した。結果を第 4 表に示す。

結果より、pH 7.2 の培地に移植したのちの供試菌の生育は、初発菌数は異なるが、SAEO, NPEO, LAS を加えた培地に接触した試験区では、それらを加えない試験区とくらべて、生育度合も遅く生育の定常期の菌数もやや少なく、また死滅期への到達はとくに SAEO, NPEO 添加区において早いことが認められた。SE 添加区ではその効果はほとんどみられなかった。

考 察

Vibrio anguillarum は pH 5.0 の培地では NaCl 濃度 2.0% でも生育しないが、その系に 1 時間接触させたのち菌体を生育に適した培地に移植すると、またはじめの pH 5.0 の培地の NaCl 濃度を 6.0% まで高めたときでも、豊富に増殖することを認めた。すなわち pH 5.0

のこれらの系では供試菌はまだ死滅していないで生育が抑制されているのにすぎない。

本報では、前報¹⁾の鮮魚の洗浄試験の結果に基づき、培地の pH を 5.0 に限定しこれに界面活性剤を加えたときの供試菌の生育を阻止する効果を上記の実験条件に準じてさらに検討した。界面活性剤は pH 5.0 培地の抗菌効果を助長することが示され、このことは前報で示された洗浄による除菌効果の一端をうらづけるものであろう。また、供試菌を pH 5.0 の系に接触させたのち菌体を生育に適した培地に移植したとき供試菌の生育は、界面活性剤を加えない試験区の場合とくらべて、SAEO, NPEO および LAS 添加区では生育誘導期がやや延長され対数増殖期の生育はほぼ同様であったが、定常期における生菌数レベルはやや低く、とくに注目すべきは、SAEO, NPEO 添加区では死滅期が比較的早期に起こった。このような抗菌効果は、前報¹⁾の保存試験の結果からもみられる如く、界面活性剤を用いた比較的短時間の洗浄でも、鮮魚あるいはその環境で、洗浄後も残存する微生物の生育を抑制し除菌効果を増進できることを示すものと考えられる。

要 約

Vibrio anguillarum にたいする低 pH、無機塩の影響を検討し、ついで pH 5.0 の培地に界面活性剤 SAEO, NPEO, LAS, SE を加えた時の抗菌効果を検討した。その結果、SAEO, NPEO, LAS は供試菌にたいして pH 5.0 の培地の抗菌作用を助長し、またその後最適 pH の培地に菌体を移植した時も増殖を阻害することを認めた。

終りに臨み本報告の発表を許可されたライオン油脂株式会社小林寅次郎社長、ならびに本研究のご指導を賜った専務取締役富山新一博士に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 原口、飯森：日本水産学会誌，36，497 (1970)
- 2) Simidu, U. et al.: J. General Microbiology, 52, 361 (1968)

(経費著者負担)