Studies on the Growth Temperature of Psychrotrophic Bacteria: Growth at Various Incubation Temperatures of Psychrotrophic *Pseudomonas* Originated from Raw Milk and Raw Meat

Hironobu HIGOSHI, Sukekazu HAMADA and Makoto DOI

Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido
University, Kita 18 jo Nishi 9 chome, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060

(Received for publication July 29, 1974)

Abstract. The maximum, minimum and optimum growth temperatures of 50 psychrotrophic *Pseudomonas* strains (20 from raw milk, 10 from fresh pork and 20 from frozen veal) and 3 strains of mesophilic bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) were examined by stationary cultivation at 12 different temperatures at intervals of about 5°C between -8°C and 40°C, and by shaking temperature gradient cultivation at 30 different temperatures at intervals of about 1.5°C between 0°C and 45°C. The growth rates at various incubation temperatures were measured by optical density in trypticase soy broth (BBL) culture, using an electric photometer with 530 nm filter.

Of the 50 *Pseudomonas* strains examined, 42 grew at -8°C after 7- to 15-week incubation in a non-freezing broth (trypticase soy broth with 5% glycerin added), and 47 strains at -5°C after 3- to 4-week incubation. Of 3 strains unable to grow at -5°C for 10 weeks, one grew at -2°C for 3 weeks, and two at 1.5°C for 4 to 7 days. The maximum growth temperatures of the 50 strains examined ranged from 30 to 40.5°C, or mostly from 33 to 37°C. The optimum growth temperatures of the 50 strains ranged from 25.5 to 34.5°C, but those of 37 strains of them were 30°C or below.

It is preferable that all the 50 *Pseudomonas* strains are called "psychrotrophs" rather than "psychrophiles", according to the following results. Although two of the 50 strains were unable to grow at 0°C within 2 weeks, all the 50 strains grew at temperatures lower than 1.5°C within a week, and their optimum growth temperatures were between 25.5 and 34.5°C. On the other hand, the lowest growth temperatures of the 3 mesophilic strains tested were between 4.5 and 7.5°C by gradient cultivation. These strains showed no growth at 5°C for 14 days by stationary cultivation. Their highest growth temperatures were over 45°C. Their optimum growth temperatures were 37.5 and 40.5°C.

低温細菌群の発育温度に関する研究—生乳および生肉由来 *Pseudomonas* の種々の培養温度における発育態度について

日越博信・浜田輔一・土井 誠
(北海道大学獣医学部獣医公衆衛生学教室)

低温細菌群には、一般に「低温で比較的速やかに発育できる細菌」というばく然とした定義が与えられている [1,2,14,16,38,39]。しかし、低温とは何度か、また比較的速やかとは何時間（あるいは何日）かとい

う具体的な点については、低温細菌数の計測法が一定していないことと相まって、研究者によってまちまちである [4,12,32,34,38,40]。

また名称に関しては、低温細菌群といわれる菌株で

Table 1. Incubation temperatures and periods

Stationary cultivation*1		Gradient cultivation*2	
Temperature	Period	Temperature	Period
—8°C	20w*3		
—5°	10w		
—2°	5w		
0° & 5°	3w	0°~4.5°C	10~14d
10° & 15°	2w	6°~45°	4~5d
20°~40°	7~10d*4		

Remarks.

*1: 12 different temperatures with an interval of about 5°C between —8°C and 40°C.

*2: 30 different temperatures with an interval of about 1.5°C between 0°C and 45°C.

*3: Weeks.

*4: Days.

あっても、それらの多くは至適発育温度が中温域にあることから、Eddy [6] の提案以来、至適温度に関係なく、低温（5 あるいは 7°C 以下）で発育できる細菌を Psychrotrophs とし、20°C 以下に至適温度のある細菌に対しては、従来から用いられている Psychrophiles を残して、本細菌群を二群に分けようとする傾向にある [11,12,16,17,33,38]。この二群についての名称は、上記と同様の区分、あるいは限定した温度での発育能によって、Obligate または Facultative psychrophiles とも呼称されている [13, 26, 29]。しかしこれらの名称に関しても、本細菌群の定義と同様に、研究者の間で一致した見解はない。

低温細菌群の最低発育温度は、ほぼ —10°C とされている [5,15,29,38]。また食品類の冷凍保蔵の多くはこの温度以下で行われている。そのため、冷凍食品類の品質保持の上から、これらの菌群は実際に余り関係が無さそうである。しかし、本細菌群の低温側での発育限界温度を決定するために、氷点下における発育能を研究している人々はいる [5,9,10,19,20,27,30]。

一方、食品類、特に冷蔵保蔵食品類から検出される低温細菌群では、多くの例で *Pseudomonas* が主位を占めているとされる [3,15,32,35,38]。著者らも、工場受入れ時の生乳および冷凍生肉由来低温細菌群については、同様な所見を得ている。

著者らは、これらの生乳および生肉由来低温性 *Pseudomonas* 計 50 株と、二三の中温細菌について、氷点下での発育能を含む、異なる培養温度での発育態度を明らかにする目的で、静置培養および振盪温度勾

配培養によって、それらの発育温度域および至適発育温度などを検討してきた。今回は、これらの成績を報告すると同時に、この成績に基づいて、本細菌群の定義あるいは名称に関しても、若干の考察を加えた。

材料および方法

供試菌株

今回供試した低温性 *Pseudomonas* は、5 または 20°C 培養で検出された菌株のうち、無作為的に選出された生乳由来 20 株、新鮮豚肉由来 10 株、冷凍猪肉由来 20 株、計 50 株である。対照には中温細菌の *Pseudomonas aeruginosa* (IAM 1007)、*Escherichia coli* (生乳由来) および *Staphylococcus aureus* (生乳由来) の各 1 株を使用した。

培養方法

培地は Trypticase soy broth (BBL) を使用した。氷点下の培養には、Larkin and Stokes [20] の報告を参考にして、凍結防止剤としてグリセリンを 2.5 または 5.0% の割に加えた同培地を用いた。これらの培地を、静置培養では中試験管 (18×180 mm) 内に、温度勾配培養では装置専用の L 型培養管 (17.5×170 mm) 内に、それぞれ 10 ml ずつ分注した。供試菌株は Trypticase soy broth で 20 または 35°C に 24 時間ずつ 3 代継代培養し、これを上記培地 10 ml にそれぞれ 0.1 ml ずつ接種した。なお、培地は全試験を通して同一ロットのものを使用した。

試験した培養温度と培養期間との組み合わせは、Table 1 に示した。すなわち静置培養では、—8°C

Fig. 1. Relationship between viable bacterial count and O.D. value of psychrotrophic *Pseudomonas* strain No. 1 originated from raw milk

(20 週培養), -5°C (10 週), -2°C (5 週), および 0°C (3 週) から 5°C 間隔で 40°C (1 週) までの 9 段階の温度, 合計 12 種の温度について試験した. 勾配培養では, 振盪温度勾配培養装置 (東洋科学, TN 3 型) を使って, 振盪回数を 30/分とし, 0°C (2 週培養) からほぼ 1.5°C の間隔で 45°C (5 日) まで, 30 段階の温度に分けて試験した.

発育の程度は, 光度計 (東京光電, 7A 型) を用いて測定した. すなわち同じ培地をブランクにし, フィルター 530 nm で測定した optical density (以下 OD と略記) によって求めた. OD 値は, 菌液接種直後と, 10°C 以上の培養では 3 時間ごとに 24 時間まで, それ以後および $0\sim 10^{\circ}\text{C}$ 培養では 24 時間ごとに, また氷点以下の培養では 1 週ごとに, それぞれ測定した.

なお, 生乳由来の 2 株については, 0 から 40°C まで, 5°C 間隔の 9 段階の温度の静置培養を行い, Trypticase soy agar を用いて, 20°C 4 日間培養による生菌数を計測し, 得られた発育曲線に基づいて, $g = t \log 2 / \log B_t - \log B_o$ [22] の式から平均世代時間

を算出した.

成 績

まず本試験に先立って OD 値と生菌数の関係を調べた. 生乳由来株 (No. 1) を用いて行った結果は, Fig. 1 に示す通りである.

Fig. 1 から明らかなように, 生菌数が少なくとも $10^7/\text{ml}$ でないと, OD 値は測定できなかった. これ以上に生菌数がふえると, それにつれて OD 値も増加した. しかし, 生菌数の増加と OD 値の増加とは必ずしも一定の関係を示さず, OD 値が 0.19 以下では, 生菌数の増加が比較的速やかであったのに対し, 0.2 以上では遅かった.

氷点以下の培養において, 著者らはグリセリン添加培地を使用した. -2 および -5°C 培養では 2.5% に, -8°C 培養では 5.0% にグリセリンを培地に加えたが, -8°C 培養においてのみ 2/50 本が凍結した. この凍結した培地では, 20 週培養後も菌の発育がみられなかった. また, グリセリン 2.5 または 5.0% 添加培地と無添加培地における発育の程度を,

Fig. 2. Growth at various incubation temperatures of psychrotrophic *Pseudomonas* strain No. 1 originated from raw milk, by stationary culture

10 株の *Pseudomonas* について、5 または 20°C 培養で比較したが、三種培地での発育程度には、ほとんど差がみられなかった。

各種培養温度における発育態度

供試した低温性 *Pseudomonas* 50 株のうち、生乳由来の No. 1 および No. 17 株について、静置培養と勾配培養における各種温度での発育曲線を求め、それぞれ Fig. 2, 3 および Fig. 4, 5 に示した。なお他の菌株の発育曲線には、菌株によって若干の違いがみられたが、一般的には、No. 1 または No. 17 株とほぼ同様のパターンを示したので、ここでの記載は省略する。

勾配培養については、Fig. 3 (No. 1 株) および Fig. 5 (No. 17 株) に示したように、培養 9 時間において、No. 1 株は 30°C で、No. 17 株は 28.5°C で、最も早く発育した。その後は培養時間の経過と

ともに、それぞれ 30 または 28.5°C の低温側および高温側で、順次発育速度を増していった。この発育速度の増強は、特に低温側の方で著明であった。すなわち No. 1 および No. 17 株では、いずれも培養 9 時間の OD 値を結んだ線が、30 または 28.5°C を頂点とするピラミッド型を呈した。その後の培養時間における OD 値を結んだ線は、培養時間が長くなるほど、台形に近い形を示した。また 18°C 付近から 36°C までの OD 値は、24 時間培養でほとんど最高に達していた。

静置培養において、生乳由来 No. 1 株は、40°, 0°C および氷点以下の培養温度では発育しなかった。Fig. 2 にみられるように、本菌株の 35°C 培養における OD 値の上昇は、培養後 18 時間までは、20 および 15°C 培養のそれより早く、その後 48 時間までは 10°C のそれよりも早かったが、その後の上昇は

Fig. 3. Effect of incubation temperature on growth of psychrotrophic *Pseudomonas* strain No. 1 originated from raw milk, by temperature gradient culture

るかに遅れて横ばいとなった。35°C の場合を除くと、低い培養温度ほど lag phase は長く、発育も緩慢であった。最も速やかな発育を示した培養温度は 30°C であり、25°C がこれに続いた。これらの培養温度では、lag phase がほとんどみられなかった。

この菌株の発育温度域は、Fig. 3 に示した勾配培養の結果からみて、1.5°C から 39°C 付近までの範囲にある。また Fig. 3 において、培養 9 時間で最高の OD 値が得られた温度は 30°C であった。これは Fig. 2 で示した静置培養で、発育曲線が最も早く立ち上がった温度 30°C と一致している。従って、この菌株の至適発育温度は、30°C 付近にあるものと考えられる。

No. 17 株は、Fig. 4 に示されたように、-8°C という低温でも、約 7 週の lag phase 後に発育した。この菌株では、培養のごく初期においては、25 および 30°C の両温度で発育曲線はほぼ平行し、他の培養温度より早く増殖した。15 および 24 時間以後にお

いては、30°C よりも、前者では 25°C、後者では 20°C 培養の方が発育が早かった。また、35°C 培養では、上記 No. 1 株とほぼ同様のパターンを示した。本菌株でも、25°C 以下の培養では、低温になるほど lag phase が長くなり、0°C で 5 日、-2°C で 1 週、-5°C で 2 週であった。

この菌株の発育温度域は、Fig. 4 および 5 における静置および勾配培養の成績より明らかなように、-8°C から 37.5°C までのかなり広い範囲にある。また勾配培養 9 時間目のピークは 28.5°C にあり、この温度は静置培養で発育曲線の最も早く立ち上がった 25°C に近い。このことから、この菌株の至適発育温度は、28°C 付近にあるものと考えられる。

No. 1 および No. 17 株について、勾配培養 9 時間目に最高 OD 値の得られた温度が、それらの菌株の至適発育温度であろうと記述した。これらの至適発育温度は、Table 2 に示されたように、平均世代時間

Fig. 4. Growth at various incubation temperatures of psychrotrophic *Pseudomonas* strain No. 17 originated from raw milk, by stationary culture

の最も短い発育温度ともほぼ一致している。

すなわち、No. 1 株の最短平均世代時間は、30 または 35°C で得られた。これは Fig. 3 における同菌株の勾配培養 9 時間のピーク 30°C とほぼ一致している。また No. 17 株でのそれは、25 または 30°C で最も短く、Fig. 5 における 9 時間培養のピーク 28.5°C と、ほぼ一致していた。

中温細菌の発育曲線は、供試した 3 株がいずれもほぼ同様のパターンを示した。その代表として、*Pseudomonas aeruginosa* の勾配培養による発育曲線のみを Fig. 6 に示した。

Fig. 6 にみられるように、*P. aeruginosa* の発育温度域は、6°C から 45°C までの範囲にある。45°C 以上の温度では培養試験を行っていないが、この温度以上でも発育は可能と考えられる。また 6 時間培養で最高 OD 値を示した温度は、36~37.5°C であった。これは静置培養における発育曲線が、最も早く立ち上が

った温度 35 または 40°C とほぼ一致している。従って、この菌株の至適発育温度は 35~40°C の範囲にあるものと考えられる。

最低発育温度

静置または勾配培養における結果から、供試した *Pseudomonas* 50 株が発育できる最低温度を、由来別にして Table 3 に示した。

Table 3 にみられるように、50 株中 42 株は -8°C、7~15 週で、グリセリン 5% 加 Trypticase soy broth に発育した。また 5 株は、-8°C では発育しなかったが、-5°C、3~4 週で発育した。残り 3 株は、-5°C 以下では発育しなかったが、このうち新鮮豚肉由来の 1 株は -2°C で、他の生乳由来および新鮮豚肉由来各 1 株は 1.5°C で、それぞれ発育した。

中温細菌の最低発育温度は 4.5~7.5°C の範囲にあったから、多くの低温性 *Pseudomonas* の最低発育温度は、これら中温細菌のそれに比べると、10°C また

Fig. 5. Effect of incubation temperature on growth of psychrotrophic *Pseudomonas* strain No. 17 originated from raw milk, by temperature gradient culture

はそれ以上も低いことがうかがえる。

供試菌株の由来別に見ると、冷凍肉由来の 20 株すべてが -8°C で発育したことから、冷凍肉由来株は、生乳または新鮮肉由来株に比して、低温で発育できるものが多いように見うけられる。しかしこれは使用菌株による単なる差異かもしれない。あるいはまた冷凍肉は、生肉を -10°C で 1 カ月保蔵したものであるから、そういう冷凍温度の環境で優勢になった菌株が検出されたとも考えられ。

最高発育温度

供試菌株の発育のできる最高温度は、勾配培養の結果から求め、それを由来別にして Table 4 に示した。

この表でみられる通り、低温性 *Pseudomonas* の最高発育温度は、全体として $30\sim 40.5^{\circ}\text{C}$ の範囲にあった。しかしこの温度は、菌株によってかなりまちまちであるが、多くの菌株では $33\sim 37.5^{\circ}\text{C}$ の範囲にあった。他方、中温細菌 3 株については、 46°C 以上の温

度で培養試験を行っていないため、最高発育温度を決定することはできないが、 45°C では 3 株とも発育した。

低温性 *Pseudomonas* の最高発育温度を菌株の由来別にみると、冷凍肉由来では、過半数の菌株が 34.5°C 以下であったのに対し、生乳および新鮮肉由来では、ほとんどすべての菌株が 34.5°C 以上であって、冷凍肉由来株より高い傾向を示した。しかし冷凍肉由来株でも、 20°C で分離された 4 株は、 39°C 付近でも発育した。このように、分離の際の培養温度が高い菌株では、最高発育温度も高くなる傾向は、冷凍肉由来株で若干うかがえたが、生乳由来株ではみられなかった。

Table 3 および 4 からわかるように、今回供試した低温性 *Pseudomonas* の発育温度域は、菌株によって非常にまちまちであるが、多くの株は、 -8°C から中温域の 37°C 付近まで、かなり広い温度域で発育できた。

Table 2. The mean generation time (hours) of psychrotrophic *Pseudomonas* strains No. 1 and No. 17 originated from raw milk.

Strain	Incubation temperature (°C)								
	0	5	10	15	20	25	30	35	40
No. 1	—	19.2	5.9	4.7	1.9	1.8	1.7	1.7	—
No. 17	27.3	13.9	6.0	4.5	2.5	1.8	1.8	2.1	—

Remarks.

By stationary culture.

—: No growth.

Table 3. Minimum growth temperatures of psychrotrophic *Pseudomonas*

Incubation temperature	Period required for growth	Origin isolation temp.	No. of strains examined					Total
			Raw milk		Fresh pork	Frozen veal		
			5°C	20°C	5°C	5°C	20°C	
			10	10	10	10	10	
—8°C	7~15w*1		7	8	7	10	10	42
—5°	3~ 4w		2	2	1	.	.	5
—2°	2~ 3w		.	.	1	.	.	1
0°	5~ 7d*2		.	.	.	.	.	.
1.5°	4~ 7d		1	.	1	.	.	2

Remarks.

—8°, —5° and —2°C: By stationary culture.

0° and 1.5°C: By temperature gradient culture.

*1: Weeks. *2: Days.

至適発育温度

勾配培養の9時間目で最高OD値を示した温度を至適発育温度として、Table 5に示した。この表にみられるように、従来教科書など[28, 37]で低温細菌といわれているもの、すなわち20°C以下に至適発育温度をもつ菌株は1株もなく、全株とも至適発育温度は25.5°C以上であった。多くの菌株では、27~30°Cが至適発育温度であったが、33±1.5°Cのほぼ中温域に至適発育温度のある菌株が、13株も認められた。しかし供試した中温細菌の至適発育温度は、*P. aeruginosa*では36~37.5°C、*Escherichia coli*および*Staphylococcus aureus*では40.5°Cであった。これら中温細菌の至適発育温度が、低温性 *Pseudomonas* の最高発育温度範囲に近いことは興味深い。

次に至適発育温度を供試株の由来別にみると、生乳由来5°C分離株、新鮮肉由来5°C分離株および冷凍肉由来20°C分離株の多くが、27~30°Cの範囲にあった。しかし生乳由来20°C分離株では、これらの温度よりも若干高目の、また冷凍肉由来5°C分離株

では、若干低目の至適発育温度を示す株があった。

さらにこれらの株の至適発育温度は、Fig. 7に示されたように、それぞれの株の最高発育温度に近い傾向がうかがわれた。

考 察

今回供試した *Pseudomonas* 50株のうち、生乳および新鮮肉由来の各1株は、静置または勾配培養のいずれにおいても0°C、2週で発育しなかったもので、Ingraham and Stokes [15] および Stokes [29] の定義した低温細菌には含まれない。しかしこれら2株を含む全供試株は、勾配培養で1.5°C、7日以内に、また静置培養で5°C、5日以内に、それぞれ発育を示したので、Eddy [6]、Thomas [32]、Witter [38] および矢野 [39] の定義によると、低温細菌に属することになる。

低温性 *Pseudomonas* の氷点以下の温度における発育については、すでに先人によって—2~—6°C [5, 9, 10, 27, 31] の範囲で観察された。特に Sulzbacher

Fig. 6. Effect of incubation temperature on growth of mesophilic *Pseudomonas aeruginosa* (IAM 1007), by temperature gradient culture

[31] は、冷凍子羊肉および豚肉由来の 34 株すべてが、 $-4 \sim -6^{\circ}\text{C}$ で発育したことを報告している。 *Pseudomonas* ではないが、Straka and Stokes [30] は、南極の土壤等に由来する低温細菌 31 株中 19 株が -7°C で、また Larkin and Stokes [19, 20] は低温性 *Bacillus* が -4.5°C で、さらにあるものは -10°C でも発育したことを報告している。さらに Larkin and Stokes [20] は、細菌の発育を阻害しない培地の凍結防止剤がみつければ、 -10°C 以下での発育も可能なことを示唆した。

今回著者らが供試した低温性 *Pseudomonas* では、50 株中 48 株が -2 および -5°C で発育し、さらに 42 株が -8°C でも発育した。今回は -8°C 以下での発育試験を行わなかったが、 -8°C で発育した 42 株のうち幾株かは、これ以下の温度でも発育できるかもしれない。

低温細菌の最低発育温度を決定するには、長時間の培養と特殊な装置が必要であるが、それを決定することの実際面での価値は少ないと思われる。しかし今回供試した *Pseudomonas* 50 株中 47 株は、 -5 または -8°C でも発育したのに対し、中温細菌 3 株の最低発育温度は $4.5 \sim 7.5^{\circ}\text{C}$ であった。従って、低温細菌の特徴としては、氷点以下の温度における発育能があげられよう。また低温細菌は、中温細菌の最低発育温度以下、少なくとも 5°C 以下で発育できる細菌とするのがよいかもしれない。

二三の教科書 [28, 37] には、低温細菌群の至適発育温度は 20°C 以下と記載されていて、これが本細菌群の定義あるいは名称の混乱を来した原因の一つにされていたが [14, 26, 34, 38]、実際には、そのような菌株も分離されている [10, 21, 31]。しかしそのような菌株が、食品から分離されることはまれである [8, 12,

Table 4. Maximum growth temperatures of psychrotrophic *Pseudomonas*

Incubation temperature	Origin Isolation temp.	No. of strains examined					Total
		Raw milk		Fresh pork	Frozen veal		
		5°C	20°C	5°C	5°C	20°C	
		10	10	10	10	10	
30.0°C		.	.	.	1	.	1
31.5°		.	.	.	.	.	.
33.0°		.	.	1	4	3	8
34.5°		4	2	2	3	3	14
36.0°		1	3	3	1	.	8
37.5°		4	5	4	1	1	15
39.0°		1	.	.	.	2	3
40.5°		.	.	.	.	1	1

Remarks.

Number of strains grown within 5 days by temperature gradient culture.

Table 5. Optimum growth temperatures* of psychrotrophic *Pseudomonas*

Incubation temperature	Origin Isolation temp.	No. of strains examined					Total
		Raw milk		Fresh pork	Frozen veal		
		5°C	20°C	5°C	5°C	20°C	
		10	10	10	10	10	
25.5°C		.	.	.	2	1	3
27.0°		3	1	2	4	3	13
28.5°		2	1	3	1	2	9
30.0°		4	2	2	2	2	12
31.5°		.	4	.	.	.	4
33.0°		1	2	2	.	1	6
34.5°		.	.	1	1	1	3

Remarks.

*: Temperature at which maximum O. D. value was obtained by temperature gradient culture for 9 hours.

14, 16].

著者らの供試した生乳および生肉由来株 50 でも、至適発育温度は 25.5–34.5°C の範囲にあった。なお Stokes [29], Thomas ら [33] および Thomas and Druce [34] によると、大多数の低温細菌群の至適発育温度は 30°C 以下である。今回の供試株のうち、30°C 以下に至適発育温度があったのは 37 株であり、上記および他の研究者の報告 [7, 18, 23–25, 30] とほぼ一致する。

著者らの供試した多くの低温性 *Pseudomonas* の最高発育温度は、33–37.5°C の範囲にあった。また中温細菌 3 株では、この温度は 45°C またはそれ以上であったから、この最高発育温度によって、低温細菌と

中温細菌の両者を区別できるかもしれない。しかし Upadhyay and Stokes [36] および中江 [23] は 45°C で、また Frank [7] および小久保 [18] は 40°C で、それぞれ発育する低温細菌を観察している。このように、低温細菌群の最高発育温度は、菌株によってまちまちであり、その範囲も非常に広い。そのため、Stokes [29] および Witter [38] も指摘したように、本細菌群の最高発育温度は限定できないであろうし、これによって本細菌群を特徴付けるのも困難と思われる。

Hucker [13] は、0°C で発育するが、32°C で発育できない細菌を Obligate psychrophiles, 両温度で発育できる細菌を Facultative psychrophiles と呼称し

Fig. 7. The range of temperature and optimum temperature for growth of 50 strains of psychrotrophic *Pseudomonas* and 3 different mesophilic bacteria

て、低温細菌を2群に分けたが、実際には Obligate psychrophiles は分離できなかったと報告している(著者らは今回これに属する1株を、冷凍牛肉由来 5°C 分離株で証明できた。Fig. 7 参照)。

一方 Eddy [6] は、従来の名称 Psychrophiles とは別に、至適発育温度に関係なく、5°C 以下で発育する細菌に対して、Psychrotrophs の名称を提案した。Ingram [16] および Kandler [17] も、この名称を示持している。1968 年国際酪農連盟の低温細菌に関するセミナーでも、Psychrotrophs の名称が使用された [8, 11, 40]。なお Stokes [29] および Rose [26] は、Hucker [13] と同様の名称を用いたが、彼らの基準では、至適発育温度が 20°C あるいは 25°C 以下のものを Obligate、これ以上のものを Facultative としている。

著者らの供試した 50 株は、それらの至適発育温度が 25.5~34.5°C にあった。そのうち 48 株は氷点以下の温度でも発育でき、残り 2 株は 1.5°C で発育した。また供試株それぞれの発育温度域の両端(上限が 30~40.5°C で、50 株中 45 株では 33~37.5°C、下限が 1.5~-8°C で、48 株では -2~-8°C)および

至適発育温度は、対照に用いた中温細菌 3 株のそれらより、それぞれほぼ 10°C 低かった (Fig. 7)。

従って著者らは、今回の供試株に対して、Eddy [6] の提案した名称 Psychrotrophs をあてたい。また和名については、矢野 [1]、小川 [25] の提案した“低温細菌”が妥当と思われる。なお Psychrophiles, “好冷細菌”の定義については、さらに検討する必要があるが、20~25°C 以下に至適発育温度のある細菌とするのが良いかもしれない。

著者らは、これまで低温細菌群を 5°C, 10 日培養で分離してきた。この条件は矢野 [40] によって提唱されたものであり、Eddy [6] の Psychrotrophs の定義にも合致し、さらに今回の実験結果からも、妥当な検出分離条件と考えられる。低温細菌群の分離には 7°C, 7 または 10 日培養法が広く用いられている [2, 25, 38, 40]。7°C 前後では、今回供試した中温細菌 3 株のすべてが、7~10 日の勾配培養で弱いながらも発育した。しかしこれら 3 株の中温細菌は、静置培養において 5°C, 14 日でも発育しなかった。このことから、低温細菌の検出分離に当っては 5°C, 10 日培養を行えば、中温細菌を排除できるかもしれない。

要 約

著者らは、生乳由来 20 株、新鮮豚肉由来 10 株、冷凍犢肉由来 20 株、計 50 株の低温性 *Pseudomonas* および 3 株の異種の中温細菌について、 -8°C から 40°C にわたる 12 段階の温度での静置培養法と、 0°C から 45°C までの間をほぼ 1.5°C の間隔で 30 段階に分けた温度での振盪温度勾配培養法とを用いて、発育温度域および至適発育温度を、主として optical density (OD) 値によって検討し、次のような成績を得た。

1. *Pseudomonas* 50 株中 42 株が -8°C 、7~15 週で、また 47 株が -5°C 、3~4 週で発育した。なお冷凍犢肉由来の全供試株は、 -8°C で発育した。 -5°C 、10 週で発育しなかった 3 株のうち、1 株は -2°C で、他の 2 株は 1.5°C で発育した。中温細菌 3 株の最低発育温度は $4.5\sim 7.5^{\circ}\text{C}$ の範囲にあった。

2. 供試した *Pseudomonas* の最高発育温度は、 $30\sim 40.5^{\circ}\text{C}$ の範囲にあった。生乳および新鮮豚肉由来株の大多数は 34.5°C 以上に、冷凍犢肉由来の過半数の株は 34.5°C 以下にあった。一方、中温細菌 3 株は 45°C でよく発育した。

3. 温度勾配培養の 9 時間で最高 OD 値の得られた温度を至適発育温度としたとき、*Pseudomonas* 50 株のそれらは、 $25.5\sim 34.5^{\circ}\text{C}$ の範囲にあった。このうち 37 株は、 30°C 以下に至適発育温度をもっていた。これに対して中温細菌の至適発育温度は、 $36\sim 40.5^{\circ}\text{C}$ の範囲にあった。

4. 本実験で使用した *Pseudomonas* のうち、 0°C で発育できない菌株が 2 株認められた。これらを含む 50 株すべては、 5°C 以下、10 日以内に発育し、至適発育温度はすべて 25°C 以上にあった。従って、これらの菌株の名称には、Eddy [6] の提案した Psychrotrophs を採用し、和名は“低温細菌”としたい。なお対照の中温細菌 3 株は 5°C 、15 日の静置培養で発育しなかった。

本論文の要旨は第 76 回日本獣医学会 (1973 年 10 月) で報告した。

文 献

- [1] 栗飯原景昭・矢野信礼 (1970). 低温細菌. 食品衛生の微生物, 朝倉書店, 東京, 138-203.
- [2] American Public Health Association (1967). In Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 12th ed., Amer. Pub. Hlth Ass., New York, 70.
- [3] Ayres, J. C. (1963). Low temperature organisms as indexes of quality of fresh meat. In Microbiological Quality of Food, Slanetz, L. W., Chichester, C. D., Gaugin, A. R., and Ordal, Z. J., editors, Academic Press Inc., New York, 132-148.
- [4] Baumann, D. P., and Reinbold, G. W. (1963). Enumeration of psychrophilic microorganisms. A review. *J. Milk Food Technol.*, **26**, 81-86.
- [5] Berry, J. A., and Magoon, C. A. (1934). Growth of microorganisms at and below 0°C . *Phytopathology*, **24**, 780-796.
- [6] Eddy, B. P. (1960). The use and meaning of the term psychrophilic. *J. appl. Bact.*, **23**, 189-190.
- [7] Frank, H. A. (1962). Influence of low incubation temperature on classification of *Pseudomonas geniculata*. *J. Bacteriol.*, **84**, 68-71.
- [8] Franklin, J. G. (1968). Getting to grips with psychrotrophic bacteria. *Dairy Indus.*, **33**, 399-402.
- [9] Haines, R. B. (1934). The minimum temperatures of growth of some bacteria. *J. Hyg. (Lond.)*, **34**, 277-282.
- [10] Harde, W., and Veldkamp, H. (1968). Physiology of an obligately psychrophilic marine *Pseudomonas* species. *J. appl. Bact.*, **31**, 12-23.
- [11] 春田三佐夫 (1970). 乳および乳製品の衛生細菌, 特に低温菌について. メディヤ・サークル, **15**, 437-446.
- [12] 春田三佐夫 (1974). 低温細菌の検査法. モダンメディア, **20**, 273-288.
- [13] Hucker, G. J. (1954). Low temperature organisms in frozen vegetables. *Food Technol.*, **8**, 79-82.
- [14] Ingraham, J. L. (1958). Growth of psychrophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, **76**, 75-80.
- [15] Ingraham, J. L., and Stokes, J. L. (1959). Psychrophilic bacteria. *Bact. Rev.*, **23**, 97-108.
- [16] Ingram, M. (1966). Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, **16**, 111-118.
- [17] Kandler, O. (1966). Zur Definition der "psychrophilen" Bakterien. *Milchwissenschaft*, **21**, 257-261.
- [18] 小久保弥太郎 (1974). 凍結豚肉より分離した低温発育菌の発育温度特性. 食衛誌, **15**, 188-194.
- [19] Larkin, J. M., and Stokes, J. L. (1966). Isolation of psychrophilic species of *Bacillus*. *J. Bacteriol.*, **91**, 1667-1671.
- [20] Larkin, J. M., and Stokes, J. L. (1968). Growth

- of psychrophilic microorganisms at subzero temperature. *Canad. J. Microbiol.*, **14**, 97-101.
- [21] Lawton, W. C., and Nelson, F. E. (1954). The effect of storage temperatures on the growth of psychrophilic organism in sterile and laboratory pasteurized skim milk. *J. Dairy Sci.*, **37**, 1164-1172.
- [22] 牧野利一 (1964). 細菌の生理および生化学. III, 生長, 獣医微生物学, 平戸勝七編, 養賢堂, 東京, 27-29.
- [23] 中江利孝 (1968). 定常熱伝導系の微生物学への応用. VI. 温度勾配培養法による低温性細菌の発育温度特性の検定とその意義. 農化, **42**, 639-644.
- [24] 中江利孝 (1969). 定常熱伝導系の微生物学への応用. VII. 温度勾配培養法による各種牛乳細菌の発育温度特性の検定とその意義. 農化, **43**, 857-861.
- [25] 小川益男 (1968). 牛乳の低温菌に関する衛生学的研究. 東京農工大農学部学術報告, No. 11, 1-88.
- [26] Rose, A. H. (1962). Temperature relationships among microorganisms. *Wallerstein Lab. Comm.*, **25**, 5-17.
- [27] Shaw, B. G., and Shewan, J. M. (1968). Psychrophilic spoilage bacteria of fish. *J. appl. Bact.*, **31**, 89-96.
- [28] Smith, D. T., Conant, N. F., Beard, J. W., Willett, H. P., Overman, J. R., Brown, Jr., I. W., Sharp, D. G., and Posten, M. A. (1957). Physiology of microorganisms. IV. Growth of bacteria. In *Zinsser Bacteriology*, 11th ed., Appleton-Century-Crofts, Inc., New York, 33-37.
- [29] Stokes, J. L. (1963). General biology and nomenclature of psychrophilic microorganisms. In *Recent Progress in Microbiology*, VIIIth International Congress for Microbiology, Montreal, Univ. Toronto Press, Canada, 187-192.
- [30] Straka, R. P., and Stokes, J. L. (1960). Psychrophilic bacteria from Antarctica. *J. Bacteriol.*, **80**, 622-625.
- [31] Sulzbacher, W. L. (1950). Survival of microorganisms in frozen meat. *Food Technol.*, **4**, 386-390.
- [32] Thomas, S. B. (1958). Psychrophilic microorganisms in milk and dairy products. I and II. *Dairy Sci. Abst.*, **20**, 355-370 and 447-468.
- [33] Thomas, S. B., Druce, R. G., and Davies, A. (1966). The significance of psychrotrophic bacteria in raw milk. *Dairy Indus.*, **31**, 27-32.
- [34] Thomas, S. B., and Druce, R. G. (1969). Psychrotrophic bacteria in refrigerated pasteurized milk. I, II and III. *Dairy Indus.*, **34**, 351-355, 430-433 and 501-505.
- [35] Thomas, S. B. (1970). Psychrotrophic microorganisms in market cream. A review. *Dairy Indus.*, **35**, 79-84.
- [36] Upadhyay, J., and Stokes, J. L. (1962). Anaerobic growth of psychrophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, **83**, 270-275.
- [37] Wilson, G. S., and Miles, A. A. (1964). Temperature. In *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, 5th ed., Edward Arnold Ltd., London, 88-89.
- [38] Witter, L. D. (1961). Psychrophilic bacteria. A review. *J. Dairy Sci.*, **44**, 983-1015.
- [39] 矢野信礼 (1964). 牛乳・乳製品の好冷細菌. 食衛誌, **5**, 103-111.
- [40] 矢野信礼 (1968). 低温細菌の計測法. モダンメディア, **14**, 532-539.