定常熱伝導系の微生物学への応用 (第3報)

温度勾配培養法による低, 中および高温菌の同時分別分離

中江 利孝, 中西 武雄 (東北大学農学部)

昭和 41 年 3 月 24 日 受理

Application of Steady State Conduction System to Microbiology
Part III. The Simultaneous Isolation and Estimation of
Microflora according to Growth Temperatures
by Means of Temperature Gradient Incubation Method

By Toshitaka NAKAE and Takeo NAKANISHI

Faculty of Agriculture, Tohoku University

The apparatus for temperature gradient incubation was successfully applied to the simultaneous isolation of low, medium and high temperature organisms. The agar media inoculated with two or three combined cultures were placed in the incubation tubes, and incubated at the temperature gradient of $60^{\circ}\sim 6^{\circ}\text{C}$ for 12~18 hr. The tubes were cut at the positions corresponding to optimum temperatures for growth of each culture, from where the growing colonies of each of pure cultures could be isolated separately. Similarly, each strain of low, medium and high temperature organisms was simultaneously isolated from the diluted raw milk samples. There were distinct differences in the growing behaviors and temperature relations between the strains isolated. In the diluted samples of raw milk the numbers of psychrophiles, mesophiles and thermophiles were estimated by separate counting of their colonies according to the temperature range. The results from the counting are considered to be useful for obtaining more accurate information on bacteriological quality of the samples. (Received March 24, 1966)

緒 言

未知の検体から微生物を分離する場合, 従来の方法では, 寒天培地を一定の培養温度条件に設定し, その温度下に出現する集落から単一の微生物を純粋分離するのが常套手段であった。したがって, 発育温度範囲の異なった微生物を分離する際には, その培養温度条件を別個にいくつか設定し, たとえば, 低温菌または好冷細菌, 中温菌, 高温菌または好熱細菌をそれぞれ別々の培養温度条件で分離する必要があった。

前報^(1,2)において, 著者らは温度勾配培養装置を考案してその有用性を認め, これを微生物の発育温度範囲と至適温度の検定に応用することができた。したがって, 同様な原理から, この培養法は低, 中および高温菌を同時に分別分離し得るものと想定される。しかも温度勾配培養装置の上下両水槽の温度を適宜変えることによって, 一定の温度範囲に生育可能な微生物だけを選別すること

もできよう。さらにまた, 寒天培地内に検体の微生物が均一に分散している限り, 一定の培養温度範囲別の集落数の測定によって, その温度区分別の菌群の量的関係をも知ることができる。

以上のような観点から, 本報ではまず, 発育温度範囲の異なった既知の微生物を混合して温度勾配培養によるその分別分離の可能性に検討を加え, また, 未知検体からの低, 中および高温菌の同時分別分離とそれぞれの温度区分の菌数測定を行なって, 検体の菌叢の性状を知る手段としての有用性を考察したものである。

実 験 方 法

1. 供試菌株

温度勾配培養法による低, 中および高温菌の同時分離の可能性を知るために, それぞれ生育温度特性の異なる 3 種の連鎖球菌, すなわち *Streptococcus lactis* No. 527, *Str. cremoris* NC-5 および *Str. thermophilus* No. 510

を嫌気培養用とし、また、あらかじめ牛乳から分離した 2 種の好気性菌 *Bacillus subtilis* MR-4 および *Pseudomonas* sp. No. 115 を好気培養用として選定した。これらの菌株は試験の際に 2 種または 3 種混合して用いた。

2. 供試検体

未知の微生物群を低、中および高温菌に分別分離するための供試検体として、M ミルクプラントの混合生乳から得た生牛乳試料を用いた。生牛乳はそのまままたは 10 倍希釈段階の滅菌磷酸緩衝液希釈試料⁽⁸⁾として供試した。

3. 分離培地

供試混合菌株からの単一菌株の分離のためには、前報⁽²⁾の酵母エキス添加加糖ペプトン寒天 (YPGA) 培地を用い、必要に応じて少量のメチレン青を添加した。

供試検体からの分離培地には、牛乳の生菌数測定法⁽⁸⁾に準じた標準寒天培地を用いた。その組成はカザミノ酸 0.5%, 酵母エキス 0.25%, グルコース 0.1%, 寒天 3.0%, pH 7.0 で、必要に応じて少量のメチレン青を添加した。

4. 培養および分離方法

供試菌株は前記寒天培地から寒天を除いた液体培地に 37°, 24 時間培養した。ただし、*Str. cremoris* と *Pseudomonas* sp. は 25° 培養とした。この前培養液を 2 種または 3 種混合したもの、および供試検体はそれぞれ 1 ml をとって溶解した分離用培地 9 ml に混釈し、均一に分散させる。この混釈培地の一定量を嫌気または好気培養管に前報⁽¹⁾に準じて封入固化させた。この場合、好気培養管は内径 9 mm または 11 mm のものを用い、平板状または内面一面に薄膜状に固化させた。60°~6° の温度範囲の温度勾配槽で所定時間培養後、特定の温度に相当する培養管上の位置を切断して、単一集落を液体培地に移植した。

生牛乳検体の生菌数測定の際には、温度勾配槽の深さ (27.5 cm) と同じ長さの部分が薄膜状培地になるように、培養管を特別に設計した。すなわち、内径 11 cm, 長さ 27.5 cm のガラス管の一端を封じ、他端に肩をつけて内径 5 mm, 長さ約 2 cm の細いガラス管を熔接した特殊培養管 (Fig. 3, A) を用いた。注射器を用いて 0.5 ml の検体試料と約 5 ml の溶解寒天培地を順次細いガラス管頸部から注入し、55° 保温下で培養管内で速やかに均一に混和後、内面に一様に薄膜固化させた。48 時間培養後集落の分散が適当で集落数測定可能な希釈段階の培養管を選び、特定の温度範囲別の菌数測定を行なった。そ

の温度区分は便宜上、10° 以下、10°~25°, 25°~40°, 40°~50° および 50° 以上とし、それぞれを好冷菌、低温菌、中温菌、高温菌および好熱菌の区分とした。

混合菌株および検体試料からの分離株は液体培地に移植した後、その分離位置に相当する温度付近で再培養し、さらに再度寒天培地による温度勾配培養を行ない、前報⁽²⁾に準じて発育温度特性を検定した。

生牛乳の同じ検体試料は、常法に準じた生菌数測定を並行して行ない、8°, 18°, 33°, 45° および 55° 下 48 時間培養時のそれぞれの生菌数を求めた。

結果および考察

1. 既知混合菌株の分別分離

Str. cremoris と *Str. thermophilus* の混合菌株を、メチレン青を含む YPGA 培地で 18 時間温度勾配培養し、25° および 50° に相当する培養管上の位置を切断して、その切断部付近から得た集落を再度同じ条件下で温度勾配培養に供した。Fig. 1 はその結果を示すもので、A は混合菌株、B は A の 50° 相当位置からの分離株、C

Fig. 1. Photograph Showing Two Single Cultures (B and C) Isolated from a Two-combined Culture of *S. thermophilus* and *S. cremoris* (A) under the Temperature Gradient Incubation at 60°~6°C for 18 hr.

Solid medium: Yeastrel peptone glucose agar containing methylene blue.

Fig. 2. Photograph Showing Two Single Cultures (B and C) Isolated from a Two-combined Culture of *B. subtilis* and *Pseudomonas* sp. (A).

Solid medium: Yeastrel peptone glucose agar.

はAの25°相当位置からの分離株の, それぞれ温度勾配培養時の発育状態である。BおよびCの発育帯とメチレン還元帯は前報⁽²⁾の *Str. thermophilus* と *Str. cremoris* 単独の場合と一致することから, これらはその両者混合菌株から明らかに分別分離できることがわかった。また, *B. subtilis* と *Pseudomonas* sp. の混合菌株を YPGA 培地において行なった結果は Fig. 2 のとおりであり, 図のAに示す混合菌株において, 2つの矢印の位置からの分離株はBおよびCに示す単独菌株の発育温度特性と完全に一致した。

同様な試験を *Str. cremoris*, *Str. lactis* および *Str. thermophilus* の3種混合菌株で行なった結果では, 12~14時間の温度勾配培養後において, それぞれ25°, 38°および50°の相当位置から純粋分離が可能であった。しかし, それ以後の培養時間では, *Str. cremoris* に適した25°の位置において *Str. lactis* が, また *Str. lactis* に適した38°の位置において *Str. thermophilus* が, それぞれ集落形成を増大し, 目的とする分離株にこれらの菌の汚染が認められる例があった。したがって, 混合菌株の各々に共通の発育温度域がある場合には, その分別

Fig. 3. Photograph Showing Low, Medium and High Temperature Organisms (B, C and D) Isolated from a Raw Milk Sample (A) under the Temperature Gradient Incubation at 60°~6°C for 48 hr.

Solid medium: Standard methods agar.

分離の時期と釣菌時の集落の選定に留意する必要が認められた。

一部の菌株分離試験において, 培養管は切断せずに, 培養後の培地を培養管から静かに取出し, 相当温度の位置から集落分離を試みた。その結果, この操作を無菌的に行ない, かつ培地内の別の集落または集落帯の汚染がない限り, 有効な手段であり, 培養管を再使用できる経済的な方法であることが認められた。

2. 生乳検体からの分別分離

集乳地域の異なる混合生乳 No. 1 および No. 2 試料について, 前述の既知混合菌株と同様に発育温度別の菌株分離を試みた。No. 1 試料について行なった1例は Fig. 3 に示すごとくであり, 図のAは100倍希釈の生乳試料, B, C およびDはAの20°, 38°および45°のそれぞれの相当位置からの分離菌株における温度勾配培養時の発育状態である。すなわち, この生乳検体から発育温度域の異なる菌株3種を同時に分別分離することができた。B, C およびD分離株の発育至適温度は, それぞれ26°, 39°および48°, 48時間培養時の発育温度範囲

TABLE I. VIABLE COUNTS ACCORDING TO TEMPERATURE RANGE BY THE TEMPERATURE GRADIENT INCUBATION METHOD AND PLATE COUNTS BY THE STANDARD METHOD

Temperature gradient incubation method				Standard method		
Temperature range (TR) °C	Length of TR cm	Viable counts* Sample		Temperature of incubation °C	Plate counts Sample	
		No. 1 /ml	No. 2 /ml		No. 1 /ml	No. 2 /ml
10	1.9	2.6×10^5	0	8	2.2×10^5	0
10~25	8.1	1.5×10^6	8.0×10^4	18	1.6×10^6	6.0×10^4
25~40	8.8	1.8×10^6	8.5×10^6	33	2.0×10^6	7.8×10^6
40~50	4.4	5.6×10^5	1.2×10^6	45	6.0×10^5	9.8×10^5
50	4.3	7.7×10^4	6.8×10^5	55	3.0×10^3	4.0×10^4

* Viable counts/ml=colony counts measured $\times \frac{27.5}{\text{length of TR}}$
 $\times 2 \times \text{reciprocal of dilution}$

は 8°~29°, 12°~43° および 25°~52° であった。また、グラム染色と検鏡による結果から、B, C および D 分離株はそれぞれグラム陰性桿菌、不規則な連鎖を示す球菌および連鎖球菌であった。

No. 2 試料について同様な試験を行なった結果では、至適温度 38° の連鎖球菌と至適温度 42° のグラム陽性桿菌が分離され、48 時間培養の条件下では好冷菌は分離されなかった。供試されたこれら 2 つの検体は試料採取地区と時期の異なるものであり、以上の結果は生乳の菌叢が時期的にも、また地域的にも異なることを示すと同時に、この温度勾配培養法によって、検体からの発育温度別菌群を迅速に分別分離できることが立証された。

3. 発育温度別生菌数の測定

上記の生乳検体 2 点について、発育温度別の生菌数測定を行なった結果は Table I に示されている。温度勾配培養法の場合、検体 1 ml あたりの生菌数は培養管上の温度区分相当の長さ、その区分内の集落数および検体希釈試料の希釈倍数から、Table I 下欄に示す式によって計算できる。この温度区分別生菌数と、その温度区分の中間値の温度で標準平板法によって得た生菌数とを比較した結果、両者は概ね類似した数値を示すことがわかった。ただし、50°~60° の温度区分の生菌数と 55° 下標準法による生菌数の数値は異なっており、この相違は 50°~55° の範囲において、55° 以下のある温度に生育するが、それ以上の温度では生育しない好熱性菌群があることを示している。

Table I に示すごとく、No. 1 試料では中温菌と低温菌の菌数が最も多く、高温菌がこれにつぎ、わずかに好冷菌と好熱菌が認められた。この中温菌と低温菌は前述

の分離菌株の性状から主に不規則連鎖球菌とグラム陰性桿菌に相当することがわかる。

No. 2 試料では連鎖球菌に相当する中温菌が圧倒的に多く、グラム陽性の高温ないし好熱性桿菌がそれについていた。

以上の結果から、供試検体の生菌数を一定の培養温度でなく、一連の培養温度区分の下で測定できることが認められ、その発育温度別の菌群

の分離と生物学的性状の試験を並行して行なうことによって、検体菌叢の量的および質的性質を迅速に知ることが可能と考えられる。

検 討

Landman ら⁽⁴⁾はアルミ板を用いる水平型の温度勾配装置を利用し、その温度勾配方向にペトリ皿を並べることによって発育温度別の集落形成を与えているが、著者らによる微生物の分離または菌数測定的方式では、連続的な温度勾配下において特定の培養管を用いて培養する点で異なっている。

Broadhurst ら⁽⁶⁾は、3% 寒天濃度における牛乳の生菌数測定結果は、通常の濃度の寒天の場合とほとんど変わらず、しかも一部の好気性菌の拡散集落を防止できると報告している。したがって、本実験条件下の寒天濃度は検体からの集落分離、または集落数測定に支障を与えないものと考えられる。

共通の発育温度範囲にある 2 種以上の菌種の分別分離の際には、培養開始後の分離すべき時間を選定する必要があるが、分離だけの目的の場合には、集落を分離し易い濃度まで検体を希釈することによって混在菌種の汚染を防ぐことができる。また、この培養方式に適当な選択培地の使用を併用して特定の菌群のみを分離することも可能と考えられる。

結論的に、この温度勾配培養法は食品および生物学的試料から、微生物を発育温度別に同時に分離できるのみならず、検体の発育温度別生菌数をも測定可能である。したがって、従来一定の培養温度下に表現されていた生菌数を、より正確な微生物学的品質を反映した数値として発育温度別に表わすことができよう。

要 約

上下方向の定常熱伝導下の温度勾配培養装置を用いて、検体からの低、中および高温菌の同時分別分離の可能性に検討を加えた。分離操作において、混合菌株を含む寒天培地は細長い培養管内でその長さ方向の温度勾配下で培養された。菌濃度の高い *Str. cremoris* と *Str. thermophilus* または *B. subtilis* と *Pseudomonas* sp. を2種混合したものは 60°~6°, 18時間の温度勾配培養により、それぞれ適温付近に相当する培養管上の位置の密集集落帯から純粋株を分別分離できた。さらに、*Str. lactis* を加えた3種混合菌株の乳酸菌では、相互に共通の発育温度域を有するが、培養後分離すべき時期の選定によって分別分離が可能であった。実際に検体として生乳の希釈試料を用いた場合、培養温度 20°, 38° および

45° の相当位置から低、中および高温菌株をそれぞれ同時に分別分離できた。生乳検体はさらに、従来の生菌数測定法に準じた希釈濃度の下で発育温度範囲別の生菌数が測定された。この数値は従来の一定培養温度下の生菌数よりもいっそう正確な検体の微生物学的品質を反映させた値といえよう。

-
- (1) 中江利孝, 中西武雄: 本誌, **40**, 431 (1966).
 - (2) 中西武雄, 中江利孝: 本誌, **41**, 1 (1967).
 - (3) American Public Health Association: "Standard Methods for the Examination of Dairy Products", 11th Ed., 1960, p. 47.
 - (4) O. E. Landman, H. T. Bausum, T. S. Matney: *J. Bact.*, **83**, 463 (1962).
 - (5) J. Broadhurst, E. Krug. *J. Dairy Sci.*, **15**, 142 (1932).