変敗缶詰食品から分離した偏性嫌気性 有芽胞細菌の簡易法による同定

松田 典彦*・駒 木 勝*・市川 良子*・後藤 幸恵*

Facultative Anaerobic Spore-forming Bacteria Isolated from Spoiled Canned Foods

Norihiko MATSUDA*, Masaru KOMAKI*, Ryohko ICHIKAWA*
and Sachie GOTOH*

* Research Laboratory, Japan Cannery Association,
460 Kariba-cho, Hodogaya-ku, Yokohama 240

Isolates from spoiled canned foods were identified. Since many isolates did not represent typical biological characteristics as shown in text books, the simplified method was employed to identify them. Among 122 strains examined, 99 strains (81%) could be identified as follows; *Clostridium sporogenes*, 65; *C. thermosaccharolyticum*, 14; *C. pasteurianum*, 11; *Desulfotomaculum nigrificans*, 4; *C. butyricum*, 3 and *C. perfringens*, 2. Ten of 23 strains remained were identified as *C. thermoaceticum*, but 13 strains could not be assigned. The simplified formulae table was proposed for differential identification of commonly encountered species of genera *Clostridium* and *Desulfotomaculum* in canned food spoilage. The table enable to identify the organism according to the limited biological characteristics, i. e., optimum growth temperature, aerobic growth, morphology of a spore and a sporangium, productions of lecithinase and lipase, fermentation and digestion of milk, and production of acid from starch, production of toxin or reduction of sulfate as occasion demands.

(Received Aug. 28, 1984)

缶詰食品の微生物による変敗は、多くの場合、加熱殺菌が不足したため缶内に生き残ったか、あるいは容器の密封が不完全であったために加熱殺菌後に缶内に侵入した微生物が発育した結果引き起こされる。加熱殺菌不足により変敗した缶詰食品からは有芽胞細菌が分離されることが多いが、これらの種を同定することは、変敗事故の再発防止と、加熱殺菌条件設定のための手掛りを得るのに役立つ。

著者らは、変敗缶詰由来有芽胞細菌の生物学的性状を調べ、BERGEY'S Manual (第8版)¹⁾に従い同定を試みたが、非定型的性状を示す菌株が多く同定が困難であった。そこで、限られた性状に基づく簡易鑑別法を試みたところ、良い成績を得たので報告する。本報では偏性嫌気性細菌について述べる。

実験方法

1. 供試菌株

前報²⁾で分離した偏性嫌気性有芽胞細菌及び1967年以前に当研究所で分離し、保存中の変敗缶詰由来の同上細菌、合計122株を用いた。

2. 培地の調製

(1) 肝肝ブイヨン培地

豚肝臓 300 g を一辺約 5 cm に角切りし、脱イオン水 1 l を加え、約 1 時間沸騰させた。冷却後、脱脂綿をガーゼで包んだフィルターでろ過し、粗大粒子を除去した。肝臓は水洗後、水を切り、一辺約 5 mm に角切りした。

バクト・ペプトン (Difco) 10 g, 酵母エキス (大五栄

* (社)日本缶詰協会・研究所 (〒240 横浜市保土ヶ谷区狩場町 460 番地)

養化学) 3g, ブドウ糖 5g, 可溶性デンプン 1g, リン酸水素ニカリウム 1g, L-システイン塩酸塩 0.5g, 寒天 1.5g を上記の肝臓浸出口液 1l に加熱溶解後, pH 7.8 に調整した。

中試験管 (ねじ蓋付, 外径 16mm, 長さ 150mm) に肝臓片 4~5個及び炭酸カルシウム約 0.1g (薬匙小1杯) を投入し, 前記の液を約 10ml ずつ分注した。121°C, 20分間高圧滅菌した。

菌株保存用培地とするときには, 炭酸カルシウムの代りに, 土壌と炭酸カルシウムとの混合末約 0.1g を試験管に投入した。

(2) 土壌と炭酸カルシウムとの混合末³⁾

当研究所敷地内の土壌を乾燥し, メッシュ 3~4mm の篩を通した。この土と炭酸カルシウムを重量比約 9:1 の割合で混合した後, アルミ製盆上に厚さ約 5mm に拡げ, 乾熱で 160°C, 3時間, 3回間歇滅菌した。

(3) GAM 半流動及び寒天培地

日水製薬(株)製を用いた。ただし, 寒天培地には寒天 5g/l を加えた。

(4) PE-2 培地⁴⁾

バクト・ペプトン 5g, 酵母エキス 5g, L-システイン塩酸塩 0.5g, 寒天 1.5g を脱イオン水 1l に加熱溶解した。pH は調整しなかった。中試験管に乾燥エンドウ豆 (アラスカ種) 3~4粒及び炭酸カルシウム約 0.1g を投入し, 上記の液を約 10ml ずつ分注した。121°C, 20分間高圧滅菌した。

(5) ブドウ糖寒天培地

肉エキス (極東製薬) 2g, 酵母エキス 3g, ペプトン (Difco または大五栄養化学) 10g, ブドウ糖 5g, 塩化ナトリウム 5g, 寒天 20g を脱イオン水 1l に加熱溶解し, pH 7.0 に調整し, 121°C, 20分間高圧滅菌した。

滅菌ペトリ皿に適量分注し, 平板に固化し用いた。

(6) ゼラチン培地

プロテオース・ペプトン (Difco) 10g, 酵母エキス 10g, ブドウ糖 10g, 塩化ナトリウム 5g, ゼラチン末 100g, L-システイン塩酸塩 0.5g を脱イオン水 1l に加熱溶解し, pH 7.0 に調整した。これらを小試験管 (ねじ蓋付, 外径 13mm, 長さ 100mm) に 5ml ずつ分注し, 121°C, 15分間高圧滅菌した。

(7) 卵黄寒天培地

培地びんに GAM 寒天培地 450ml を分注し, 滅菌しておいた。使用時にこれを加熱溶解し, 55°C に保温した。

べつに 100ml 容ビーカーに生理食塩水 20ml とマグ

ネチック・スターリング・バー (テフロン被覆) 1本を入れ, アルミホイルで覆って, 121°C, 15分間高圧滅菌しておき, これに生鮮鶏卵1個の卵黄を無菌的に加え, マグネチック・スターラーで, 気泡ができないように注意しながら, 混和した。

これをマグネチック・スターリング・バーとともに GAM 寒天培地に加え, 同様に混和した後, 滅菌ペトリ皿に適量分注し, 平板に固化し用いた。

本培地は調製後ただちに用い, しばらくおくときには嫌氣的 (BBL, GasPak を使用) に保存した。

(8) 凝固卵白培地

鶏卵1個の卵白を 200ml 容ビーカーにとり, 沸騰水中で30分間加熱し, 凝固させた。これを一辺約 5mm に角切りし, その2~3片を小試験管に投入し, GAM 半流動培地を 5ml ずつ分注した。121°C, 15分間高圧滅菌した。

(9) 鉄加牛乳培地⁵⁾

無メッキ鉄くぎ (長さ約 3cm) を 0.1N-塩酸液に約 30分間浸漬した後, 水洗した。

小試験管に牛乳 5ml ずつを分注し, 鉄くぎ1本を投入した。121°C, 15分間高圧滅菌した。

(10) 炭水化物分解試験用培地

プロテオース・ペプトン 10g, 酵母エキス 10g, 塩化ナトリウム 5g, L-システイン塩酸塩 0.5g, 寒天 1.5g を脱イオン水 1l に加熱溶解し, pH 7.2 に調整した。この 90ml ずつを培地びんに分注し, マグネチック・スターリング・バー1本を投入した。121°C, 15分間高圧滅菌した。

ブドウ糖, マンノース及び乳糖では, それぞれ, 10% 水溶液 10ml を前記培地に無菌的に加え, マグネチック・スターラーでよく混和した後, 滅菌小試験管に無菌的に 5ml ずつ分注した。デンプンでは, 前記の培地組成に可溶性デンプン 10g を直接加えた。

(11) クックド・ミート培地

中試験管に乾燥クックド・ミート培地 (Difco) 約 1g を投入し, 0.1% 寒天液 10ml を分注した。121°C, 15分間高圧滅菌した。

(12) 硫酸塩培地⁶⁾

リン酸二水素カリウム 0.5g, 塩化アンモニウム 1g, 硫酸ナトリウム 1g, 塩化カルシウム (2水塩) 0.1g, 硫酸マグネシウム (7水塩) 2g, 乳酸ナトリウム 3.5g, 酵母エキス 1g を脱イオン水 1l に加熱溶解し, pH 7.6 に調整した。121°C, 20分間高圧滅菌した後, この液をろ紙 (東洋濾紙, No. 101) でろ過して沈殿物を除

去した。冷却後、寒天 1 g/l を加え、加熱溶解した。この 500 ml ずつを培地びんに分注し、マグネチック・スターリング・パー 1 本を投入し、121°C、20 分間高圧滅菌した。

冷却後、 α 過滅菌した 1% 硫酸第一鉄アンモニウム液 50 ml/l を無菌的に加え、マグネチック・スターラーでよく混和した。これを滅菌中試験管に 10 ml ずつ無菌的に分注した。

本培地は調製後 2 日以内に用いた。

3. 菌株の保存

保存培養液 0.5 ml を滅菌パスツール・ピペットでとり、あらかじめ沸騰水中で 20 分間加熱脱気しておいた肝肝ブイオン培地（土壌と炭酸カルシウム添加）の底部に接種した。この培地を沸騰水中で 5 分間、またはこの条件で死滅する菌株では 80°C、20 分間加熱処理して芽胞を活性化した後、中温性細菌は 35°C、15 日間、高温性細菌は 55°C、10 日間培養した。これらは密栓後室温で保存し、1 年ごとに植え継いだ。

4. 生物学的性状試験

以下の試験ではとくに記さない限り、次の要領によった。すなわち、半流動培地は使用前に沸騰水中で 20 分間加熱脱気し、冷却しておいた。この底部に前培養液 0.1~0.5 ml を滅菌パスツール・ピペットで接種し、発育適温（35 または 55°C）で培養した。高温で培養するとき、及び低温でも長期間培養するときには、乾燥を防止するため密栓した。

(1) 前培養

供試菌株の培養液を適当な半流動培地（主として GAM 半流動培地、これに発育しないものは PE-2 培地または肝肝ブイオン培地）に接種した。栄養細胞を殺滅し、芽胞を活性化するため、これを 80°C、20 分間加熱した後、1 夜培養した。発育しないものは旺盛な発育が認められるまで（通常 2~3 日間）培養した。

(2) 好氣的発育

ブドウ糖寒天平板培地に前培養液 1 白金耳を画線し、5 日間培養した。

(3) 芽胞の形成

GAM 半流動培地、PE-2 培地または肝肝ブイオン培地に接種した。培養 3 日後より毎日培養液の一部をとり、位相差顕微鏡を用いて、芽胞及び芽胞嚢の形を観察した。

i) 楕円形芽胞：大部分の芽胞が明らかに円柱状または楕円形であるとき陽性、球状であるとき陰性とした。

ii) 芽胞嚢の膨大：大部分が顕著に膨大しているとき陽性、やや膨大しているとき及び膨大しているものと膨

大していないものが混在するとき弱陽性、すべてが明らかに膨大していないとき陰性とした。

iii) 端在芽胞：すべての芽胞が栄養細胞の最端部に形成されているとき陽性、最端部に形成されたものと準端部に形成されたものが混在するとき、及び大部分の芽胞が準端部に形成されているとき弱陽性、準端部に形成されたものと中央部に形成されたものが混在するとき、及びすべて中央部に形成されているとき陰性とした。

(4) セラチンの加水分解

セラチン培地に接種し、5 日間培養した。これを無接種対照培地とともに 2~10°C に放置し、冷却した。

供試培地を倒立させ、対照培地が固化しているにもかかわらず、供試培地が液状のままであれば陽性、これらを室温下にもどしたとき、対照培地が液化するのに要する時間の半分の時間以内に供試培地が液化すれば弱陽性とした。これ以外のものは陰性とした。

(5) レンチナーゼ及びリパーゼの産生

卵黄寒天平板培地に前培養液 1 白金耳を画線し、4 日間嫌気培養（BBL, GasPak を使用）した。

i) レンチナーゼ：集落の周囲に白濁を生じたとき陽性、白濁が集落の直下に限られたとき及び白濁を生じなかったときは陰性とした。

ii) リパーゼ：集落の直下のみ白濁を生じ、かつ集落表面に真珠様光沢を生じたとき陽性、これ以外のとき陰性とした。

(6) 凝固卵白の液化

凝固卵白培地に接種し、30 日間培養した。卵白片が崩壊するか、透明となったとき陽性とした。

(7) 牛乳の激しい発酵及び消化

鉄加牛乳培地に接種し、15 日間培養した。

i) 激しい発酵：培養 5 日以内に牛乳が凝固し、旺盛なガス産生の結果、培地の液面に気泡が積み重なったとき陽性、ガス産生能が弱く、気泡の積み重なりが認められなかったときには弱陽性とした。

ii) 消化：ペプトン化がみられたとき陽性とした。凝固に伴う乳清分離は陰性とした。

(8) 炭水化物からの酸産生

それぞれの炭水化物分解試験用培地に接種し、5 日間培養した。

この培養液及びこれと同一条件で恒温放置した無接種対照培地に 0.4% ブロムチモール・ブルー液 1~2 滴を加え、両者の色調の差異により pH の変化を調べた。対照培地に比較して顕著な pH 低下が認められたとき陽性、わずかに低下したとき弱陽性とした。

(9) 毒素産生

クッド・ミート培地に接種し、35℃、5日間培養した。

この培養液の上澄 0.5 ml をマウス（4週令、体重約 20 g）の腹腔内に注射した。供試菌株 1 株につきマウス 2 匹を用い、注射後 24 時間以内に 2 匹ともへい死したとき陽性とした。2 匹中の 1 匹がへい死したときには再試験の結果により判定した⁷⁾。

(10) 55℃ における発育

肝肝ブイオン培地または PE-2 培地に接種し、55℃、5日間培養した。

培地に発育の徴候（混濁またはガス産生）が認められたとき陽性とした。

(11) 硫酸塩の還元

前培養液を滅菌生理食塩水で 10 倍希釈した液 0.5 ml を硫酸塩培地に接種し、55℃、5日間培養した。

培地全体が黒変したとき陽性、これ以外のとき陰性とした。

結果及び考察

著者らが供試菌株の同定を試みた当初、これらの生物学的性状のうち、炭水化物の分解性は BERGEY's Manual (第8版)¹⁾ 記載のいずれにも該当しないものが多く、大多数は同定できなかった。そこで、これらの菌株の同定を金沢大学医学部微生物学教室（主任：西田尚紀教授）へ依頼した。西田⁸⁾ は、その半数以上を *Clostridium sporogenes* あるいはその変異菌群と同定し、これらの変異性は、缶詰食品とともに厳しい加熱処理をされたことにより、選択あるいは変異の過程を経て得られたものであろうと推定した。

1967 年と 1968 年に変敗ソーセージ缶詰から分離したタンパク分解性嫌気性有芽胞細菌は、分離当初まったく炭水化物を分解せず、未同定のまま著者らの研究室で保管されてきたのであるが、継代培養を繰り返す途中で炭水化物の分解性を調べてみたところ、ブドウ糖、麦芽糖、ショ糖を次第に分解するようになった (Table 1)。これより、缶詰食品のように厳しい加熱処理を経て分離される株では、分離直後には、炭水化物の分解性が必ずしも定型的に現れないものと推察された。

供試菌株は、そのほとんどが *Clostridium* 属細菌であろうと推定されたが、BERGEY's Manual¹⁾ によって本種を同定する場合には炭水化物の分解性が重要な鍵になるので、この性状が不安定であっては同定が困難である。そこで、従来、変敗缶詰食品からしばしば分離されると

Table 1 Production of acid from carbohydrates by putrefactive anaerobic spore-formers isolated from spoiled canned sausages

Strain No.	Year examined	Glucose	Maltose	Lactose	Sucrose	Mannose	Mannitol
5049	1967	— ^{a)}	—	—	—	—	—
	1974	+	—	—	w	Ne	—
	1982	+	+	—	+	—	—
5050	1967	—	—	—	—	—	—
	1974	w	w	—	+	Ne	—
	1982	+	w	—	+	—	—
5051	1968	—	—	—	—	—	—
	1974	—	—	—	—	Ne	—
	1982	+	w	—	+	—	—
5052	1968	—	—	—	—	—	—
	1974	+	—	—	+	Ne	—
	1982	+	—	—	+	—	—

a) +, positive; w, weakly positive; —, negative; Ne, not examined

言われている耐熱性偏性嫌気性有芽胞細菌の種についての同定することにした。選んだ種と、これらを鑑別するために用いた性状を Table 2 に示した。Table 2 を作成するに当っては BERGEY's Manual (第7版⁹⁾ および第8版¹⁾ のほか、National Canners Association のマニュアル¹⁰⁾、SPRAY⁵⁾ 及び McCLEUNG と TOABE¹¹⁾ の報告を参照し、これらに示された性状のうち、著者らの経験から、それぞれの種の特徴が明確に現われ、かつ識別が容易なものを選び採用した。

供試菌株の生物学的性状を 2～3 回繰り返して調べ、Table 2 に基づいて同定した結果を Table 3 に示した。生物学的性状の試験結果は、通常は陽性 (+) または陰性 (—) のいずれかで示されるが、ここでは陽性反応を ① 明瞭なもの (+) と ② 微弱なもの及びそのつど変化したもの (w/V) に分け、また陰性反応を ③ 供試菌株が培地に発育し、陰性となったもの (—) と ④ 発育しなかったため陰性と判定されたもの (NG) に分けて示した。これは、後日参照するのに便利であろうと考えたのと、たとえば *C. thermosaccharolyticum* のように、微弱な牛乳の発酵を示し、卵黄寒天培地（リパーゼ及びレシチナーゼの産生を調べるのに用いた）上で嫌氣的に発育し

Table 2 Proposed differential criteria for the selective species of genera *Clostridium* and *Desulfotomaculum*

Species	Optimum growth temp. (°C)	First step										Second step						
		Aerobic growth	Ellipsoidal spore	Swelling at sporulation	Terminal spore	Gelatin hydrolyzed	Lecithinase	Lipase	Liq. of c. albumen	Stormy fermentation	Digestion of milk	Acid from glucose	Acid from mannose	Acid from lactose	Acid from starch	Toxin produced	Growth at 55°C	Reduction of sulfate
<i>C. sporogenes</i>	35	— ^{a)}	+	+	V	+	—	+	+	—	+	+				—		
<i>C. botulinum</i>	35	—	+	+	V	+	—	+	+	—	+	+				+		
<i>C. bifermentans</i>	35	—	+	—	—	+	+	—	+ / w	—	+	+		—				
<i>C. perfringens</i>	35	—	+	—	—	+	+	—	—	+	—	+		+				
<i>C. butyricum</i>	35	—	+	V	V	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+		
<i>C. pasteurianum</i>	35	—	+	V	V	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—			
<i>C. thermosaccharolyticum</i> ^{b)}	55	—	—	+	+	—			—	w	—	+					+	—
<i>D. nigrificans</i>	55	—	V	V	—	—			—	—	—	—					+	+

a) V, variable. See Table 1 for the other symbols.

b) Gram stain is usually negative.

ないのが、その種の特徴とみられる菌種が含まれていたためである (Table 3)。

このような方法により、供試 122 株中の 99 株 (81%) を同定することができた。これらの圧倒的多数を *C. sporogenes* が占め、本種は 65 株であった。次いで *C. thermosaccharolyticum* 14 株、*C. pasteurianum* 11 株、*Desulfotomaculum nigrificans* 4 株、*C. butyricum* 3 株、*C. perfringens* 2 株の順であった。

残る 23 株中の 10 株は、いずれもミルク・コーヒー缶詰としての缶詰から分離された特徴ある高温性有芽胞細菌で、その芽胞の熱抵抗力が極端に強く、単一種であろうと推定されたので、さらに詳細に性状を調べ、BERGEY'S Manual (第 7 版)⁹⁾ 記載の *C. thermoaceticum* と同定した。*C. thermoaceticum* の性状の詳細については既報¹²⁾ に述べた。最後に 13 株が残ったが、これらはそれぞれに性状が異なり、さしたる特徴もなかったため未同定のままにした。

ASCHEHOUG と JANSEN¹³⁾ は、ノルウェー産の変敗魚類缶詰から分離したタンパク分解性嫌気性有芽胞細菌 46

株中の 38 株が *C. sporogenes* 類似菌であったと報告しているが、この結果は本報告とよく一致する。熊倉ら¹⁴⁾ は、わが国産の各種缶詰食品の変敗事故のうち、*Clostridium* 属細菌に起因するもの 22 例を分析し、*C. bifermentans* によるものが 2 例、*C. sporogenes* 2 例、*C. thermosaccharolyticum* 2 例、*C. pasteurianum* 2 例、*C. perfringens* 1 例、*C. toanum* 2 例、*C. tale* 1 例、同定不能 10 例であったと報告している。熊倉ら¹⁴⁾ の報告に同定不能の事故例が多いのは、缶詰由来の菌株に非定型の性状を示すものが多いことによると思われる。なお、彼らが同定した *C. toanum* と *C. tale* は、BERGEY'S Manual (第 8 版)¹¹⁾ において削除されている。

すでに西田¹⁵⁾ は、*C. perfringens* および *C. novyi* では、加熱によって生物学的性状の異なる非定型菌株が現われることを述べている。缶詰食品由来の *Clostridium* 属細菌は相当厳しい加熱処理を受けているはずであるから、非定型の菌株が現われることは当然予測される。したがって、缶詰食品由来の菌株を現在一般的に用いられているような方法により鑑別したのでは、種名を誤る

Table 3 Characteristics of strains of genera *Clostridium* and *Desulfotomaculum* isolated from spoiled canned foods

Species	Number of strains	Reaction	Aerobic growth	Ellipsoidal spore	Swelling at sporulation	Terminal spore	Gelatin hydrolyzed	Lecithinase	Lipase	Liq. of c. albumen	Stormy fermentation	Digestion of milk	Acid from glucose	Acid from mannose	Acid from lactose	Acid from starch	Toxin produced	Growth at 55°C	Reduction of sulfate
<i>C. sporogenes</i>	65	$\left\{ \begin{array}{l} +^a) \\ w/V \\ - \\ NG \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0^b) \\ 0 \\ 0 \\ 65 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 65 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 64 \\ 1 \\ 4 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 65 \\ 57 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 65 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 64 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 65 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 65 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 65 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 49 \\ 9 \\ 7 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne^a) \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 65 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$
<i>C. perfringens</i>	2	$\left\{ \begin{array}{l} + \\ w/V \\ - \\ NG \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 2 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 2 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 0 \\ 2 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 2 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 2 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$
<i>C. butyricum</i>	3	$\left\{ \begin{array}{l} + \\ w/V \\ - \\ NG \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 3 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 1 \\ 2 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 2 \\ 3 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 3 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 3 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 3 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 3 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 3 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 3 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$
<i>C. pasteurianum</i>	11	$\left\{ \begin{array}{l} + \\ w/V \\ - \\ NG \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 11 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 11 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 4 \\ 2 \\ 5 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 3 \\ 8 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 11 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 2 \\ 9 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 2 \\ 9 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 11 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 11 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 11 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 11 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 11 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 11 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 11 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$
<i>C. thermo-saccharolyticum</i>	14	$\left\{ \begin{array}{l} + \\ w/V \\ - \\ NG \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 14 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 14 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 14 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 14 \\ 0 \\ 14 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 14 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 14 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 14 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 14 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 14 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 14 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 14 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 14 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 14 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 14 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 14 \\ 0 \end{array} \right.$
<i>C. thermoaceticum</i>	10	$\left\{ \begin{array}{l} + \\ w/V \\ - \\ NG \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 10 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 10 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 10 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 10 \\ 0 \\ 0 \\ 10 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 10 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 10 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 10 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 5 \\ 5 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 10 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 10 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 7 \\ 1 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 5 \\ 4 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 5 \\ 5 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 5 \\ 5 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 10 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 10 \\ 0 \end{array} \right.$
<i>D. nigrificans</i>	4	$\left\{ \begin{array}{l} + \\ w/V \\ - \\ NG \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 4 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 4 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 4 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 4 \\ 1 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 3 \\ 4 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 4 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 4 \\ 4 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 4 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 4 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 0 \\ 4 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 3 \\ 1 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \\ 1 \\ 1 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 1 \\ 3 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 0 \\ 1 \\ 3 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \\ Ne \\ \\ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 4 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 4 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{array} \right.$

a) NG, no growth. See Tables 1 and 2 for the other symbols.

b) Number of strains

Table 4 Simplified formulae for differential identification of commonly encountered species of genera *Clostridium* and *Desulfotomaculum* in canned food spoilage

Species	Optimum growth temp. (°C)	First step								Second step		
		Aerobic growth	Ellipsoidal spore	Swelling at sporulation	Terminal spore	Lecithinase	Lipase	Stormy fermentation	Digestion of milk	Acid from starch	Toxin produced	Reduction of sulfate
<i>C. sporogenes</i>	35	- ^{a)}	+	+	V	-	+	-	+		-	
<i>C. botulinum</i>	35	-	+	+	V	-	+	-	+		+	
<i>C. bifermentans</i>	35	-	+	-	-	+	-	-	+			
<i>C. perfringens</i>	35	-	+	-	-	+	-	+	-			
<i>C. butyricum</i> ^{b)}	35	-	+	V	V	-	-	+	-	+		
<i>C. pasteurianum</i> ^{b)}	35	-	+	V	V	-/NG		-	-	-		
<i>C. thermosaccharolyticum</i> ^{c)}	55	-	-	+	+	NG	NG	w	-	+		-
<i>C. thermoaceticum</i> ^{d)}	55	-	-	+	+	NG	NG	-	-			-
<i>D. nigrificans</i>	55	-	V	V	-	NG	NG	-	-			+

a) See Tables 1, 2 and 3.

b) Abundant growth in juice made of tomato or orange (pH 4.5)

c) Usually Gram negative

d) Fresh spores survive after autoclaving for 20 minutes at 120°C.

か、あるいは未同定として残すかのいずれかにならざるをえない。

商業的に製造された缶詰食品に変敗事故が発生したときには迅速な対応が要求される。このようなとき、変敗原因菌の種名を BERGEY'S Manual (第8版)¹⁾ 記載の有芽胞細菌 115 種 (*Bacillus* 属 48 種, *Clostridium* 属 61 種, *Sporolactobacillus* 属 1 種, *Desulfotomaculum* 属 3 種, *Sporosarcina* 属 2 種) の中から探し出すのは容易なことではない。厳しい加熱処理を受けたことによって性状が不安定になっている菌株であれば一層困難である。変敗事故の再発防止のためには、過去に報告された変敗原因菌との類似性を把握するだけでも有益である。そこで、Table 3 の結果に基づき、変敗缶詰由来偏性嫌気性有芽胞細菌の簡易鑑別表 (Table 4) を作成した。著者らの分離菌株中に *C. bifermentans* は含まれていなかったが、過去の報告^{14) 16) 17)} に多いので、Table 4 にはこれを含めた。

要 約

変敗缶詰から分離した偏性嫌気性有芽胞細菌 122 株を簡易法により同定したところ 99 株 (81%) を同定することができた。これらは *C. sporogenes* 65 株, *C. thermosaccharolyticum* 14 株, *C. pasteurianum* 11 株, *D. nigrificans* 4 株, *C. butyricum* 3 株, *C. perfringens* 2 株であった。簡易法により同定できなかった 23 株のうち 10 株は *C. thermoaceticum* であった。

得られた結果に基づき、変敗缶詰由来偏性嫌気性有芽胞細菌の簡易鑑別表を作成した。本表によれば、発育最適温度、好氣的発育、芽胞及び芽胞嚢の形、レシチナーゼ及びリパーゼの産生、牛乳の発酵及び消化のほか、必要に応じて、デンプン分解、毒素産生または硫酸塩還元 of のいずれかを調べることで変敗原因菌を鑑別できる。

本研究において有益な御助言をいただいた金沢大学医学部西田尚紀教授と、原稿を御校閲いただいた東京農業大学小崎道雄教授に深謝する。

文 献

- 1) GIBSON, T., GORDON, R.E., KITAHARA, K., SMITH, L.D.S., HOBBS, G. and CAMPBELL, L.L.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., BUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E. edited (The Williams and Wilkins Co., Baltimore), p. 529 (1974).
- 2) 松田典彦・駒木 勝・市川良子・後藤幸恵: 日食工誌, **32**, 444 (1985).
- 3) GORDON, R.E., HAYNES, W.C. and HOR-NAY PANG, C.: *The Genus Bacillus*, Agriculture Handbook No. 427 (U.S.D.A., Washington, D.C.), p. 101 (1973).
- 4) HERSOM, A.C. and HULLAND, E.D.: *Canned Foods, an introduction to their microbiology*, 5th ed. (J.A. Churchill Ltd., London), p. 323 (1963).
- 5) SPRAY, R.A.: *J. Bacteriol.*, **32**, 135 (1936).
- 6) American Type Culture Collection: *The American Type Culture Collection, Catalogue of Strains*, 10th ed. (American Type Culture Collection, Maryland), p. 238 (1972).
- 7) 阪口玄二: 微生物検査必携, 厚生省監修 (日本公衆衛生協会, 東京), p. 209 (1966).
- 8) 西田尚紀: 食衛誌, **17**, 1 (1976).
- 9) BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. and SMITH, N.R.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. (The Williams and Wilkins Co., Baltimore), p. 613 (1957).
- 10) National Canners Association, *Research Laboratories: Laboratory Manual for Food Canners and Processors*, 3rd ed., Vol. I (The AVI Publ. Co., Inc., Westport, Connecticut), p. 117 (1968).
- 11) McCLUNG, L.S. and TOABE, R.: *J. Bacteriol.*, **53**, 139 (1947).
- 12) 松田典彦・増田寛行・駒木 勝・松本直起: 食衛誌, **23**, 480 (1982).
- 13) ASCHEHOUG, V. and JANSEN, E.: *Food Research*, **15**, 62 (1950).
- 14) 熊倉 悟・田中 昭二・茂木 幸夫: 缶詰時報, **37** (12), 62 (1958).
- 15) 西田尚紀: 日細誌, **31**, 663 (1976).
- 16) 田中昭二: 缶詰時報, **41**(2), 39 (1962).
- 17) WALKER, H.W.: *Food Microbiology, Public Health and Spoilage Aspects*, DIFIGUEIREDO, M.P. and SPLITLSTOESSER, D.F. edited (The AVI Publ. Co., Inc., Westport, Connecticut), p. 373 (1976).

(昭和59年8月28日受理)