

Bacillus coagulans の孢子に関する研究— I

孢子数測定における培養条件

池上 義昭・橋本 京子・大田 智子

Heat Resistance of *Bacillus coagulans* Spores— I Effect of Recovery Conditions on Colony Counts of Heat-activated and Heat-damaged Spores

Yoshiaki Ikegami, Kyoko Hashimoto and Tomoko Ohota

Bacillus coagulans is of particular importance as a target organism for the heat sterilization processes of low-acid and acid canned foods.

In this paper, the spore counting media, incubation temperature, incubation time and dilution factor were collated as to the effect upon recovery of heat-activated and heat-damaged spores of *B. coagulans*.

The results indicate that the colony counts of heat-damaged spores were higher on SMA and DTA than on NGA and PPAA at 35 °C.

On the other hand, no difference was observed among the media in the recovery counts of heat-activated spores.

However, the colony counts on SMA, NGA and DTA at about pH 7.0 varied depending upon the kind of strains used.

As to the effect of incubation temperature, the maximum colony counts from heat-activated spores were obtained after 4 day-incubation at 55 °C. In contrast, the maximum colony counts from heat-damaged spores were obtained after 7 day-incubation at 35 °C, and recovery counts of unheat-treated spores were smaller than those of heat-activated spores.

On the effect of the dilution factor, the smaller was the colony counts on plate by the dilution factor, the greater was the total recovery counts of spores. However, when the colony counts on plate are extremely small, the accuracy was poor.

フラットソー変敗の原因菌である *Bacillus coagulans* は低酸性食品、中酸性食品罐詰の殺菌条件を決定するための対象細菌の一つである。一般に孢子の発芽及び増殖はその環境に影響され、特に加熱によって損傷を受けた孢子はその影響が大きいといわれている^{1, 2, 3, 4, 5}。

従って、この *B.coagulans* の孢子数をカウントする場合に、どのような条件で培養するのが最も良好であるかを培地の種類、培養温度、培養時間、及び希釈倍率について検討した。

実 験 方 法

1. 供試菌株

しめじ罐詰、及びデミグラスソース罐詰より分離し、常法に従って *B.coagulans* と同定した。それぞれの菌株を BC-1、及び BC-2 とした。

2. 孢子形成培地

- a. マンガン加標準寒天培地（以下M_n-SMAとする）

標準寒天培地（日水）に硫酸マンガン₂を10㎍加え121℃15分滅菌後、斜面に固化した。

- b. マンガン加普通寒天培地（M_n-NA）

普通寒天培地（日水）を使用し、M_n-SMAと同じ方法で作製した。

- c. マンガン加プロテオーゼ・ペプトン・アシドアガー培地（M_n-PPAA）

A；プロテオーゼペプトンNO. 3（Difco）5g，酵母エキス（Difco）5g，リン酸-カリウム4g，ブドウ糖5g，精製水500ml，pH5.0

B；粉末寒天20g，精製水500ml

AとBを別々に滅菌し、両液を混合、これにマンガンを加えて斜面に固化する。

- d. マンガン加プロテオーゼ・ペプトンアガー培地（M_n-PPA）

M_n-PPAA培地をpH7.0に調整した培地。

以上の4種類の培地を孢子形成用培地とした。

3. 孢子懸濁液の調整

孢子形成用培地に供試菌株を塗抹し、45℃で4日間培養し、培地上に形成した孢子塊を滅菌精製水に懸濁した。得られた孢子懸濁液を5℃で5000rpm，20分間遠心分離し、上澄を捨て、更に精製水に懸濁し、遠心分離した。この操作を3回繰返した後、滅菌M/15リン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁し、東洋上紙NO. 5Bで無菌ろ過後、85℃10分加熱して栄養細胞を死滅させ、5℃に冷蔵保管した。

4. 孢子数測定用培地

- a. 標準寒天培地（SMA）

- b. ブドウ糖寒天培地（NGA）

NAにブドウ糖を0.5%加えた。

- c. デキストローズ・トリプトンアガー培地（DTA）

DTA（Difco）30gを精製水1000mlに加えた。

- d. PPAA

- e. ブドウ糖トリプトン培地（GTB）

トリプトン（Difco）10g，ブドウ糖5gを精製水1000mlに加えた。すなわちDTA培地から寒天，BCPを除いた培地。

以上の5種類の培地を孢子数測定用培地とした。

5. 孢子数測定法

前記培地を使用し、平板希釈法及び最確数算出法（MPN）で行った。孢子は100℃10分加熱して活性化させた孢子，115℃20分加熱した加熱損傷孢子について測定した。

培養温度は35℃，45℃及び55℃とし、培養時間は菌数が一定になるまで行った。孢子数は2枚の平板の平均の値をとった。

実験結果と考察

1. 孢子形成条件

孢子形成の条件として、孢子を多量に形成させる目的と、より耐熱性の孢子を形成させる目的がある。本報では前者の目的で、しかも簡単な操作で出来る方法を検討した。

SMA，NA，PPAA及びPPA培地の斜面上にBC-1及びBC-2を塗抹し、45℃で4日

培養し、生理的食塩水10mlを加えて懸濁液を作製し、無菌口過後の胞子を100℃10分加熱し、PPAAを使用して平板希釈法で胞子数を測定した。培養温度は55℃で行った。

その結果、表1に示したようにBC-1はMn-SMAにおいて最大の胞子数が認められ、pH 5.0のPPAAではほとんど形成は認められなかった。BC-2はMn-PPAAが最もよい結果を示したが、他の培地でもそれ程、大きな差はなかった。Mn-SMAは平均的に胞子形成が良く、培地作製も簡単であるので以後の実験ではMn-SMAを胞子形成用培地とした。

2. 胞子数測定における培養条件

加熱活性化胞子と加熱損傷胞子について、平板希釈法における培地の種類(SMA, DTA, PPAA及びNGA)と胞子数の関係を表2に示した。

加熱活性化胞子において、BC-1では培地の種類でそれほど差は認められなかったが、BC-2の場合はpH 7.0附近のSMA, NGA, DTAでは測定出来なかった。すなわち、これらの培地では表面近くで増殖し形成した大きなコロニーの周囲にコロニーが密集して形成し、均一にならなかった。これは、菌の増殖に伴ってpHが低下し、その周囲に生存している胞子が増殖し易くなったものと考えられる。従って、pH 5.0のPPAAが安定したコロニーを形成した結果になった。

Table 1 Sporulation of *B.coagulans* in various media at 45 °C .

Media	Stvain No.	BC-1	BC-2
Mn-SMA		1.0×10^8	1.4×10^8
Mn-NA		7.3×10^6	4.1×10^7
Mn-PPAA		$1.0 \times 10^2 >$	9.8×10^6
Mn-PPA		2.1×10^7	4.2×10^8

Table 2 Recovery count of heat-activated and heat-damaged spores of *B.coagulans* in various media.

Strain No.	Media	Heat-activated spores ※ ¹	Heat-damaged spores ※ ²
BC-1	SMA	2.6×10^6	2.3×10^3
	NGA	2.0×10^6	1.3×10^2
	DTA	2.4×10^6	1.1×10^3
	PPAA	1.9×10^6	7.0×10^1
BC-2	SMA	NT	2.1×10^5
	NGA	NT	1.1×10^5
	DTA	NT	2.7×10^5
	PPAA	1.3×10^8	2.1×10^4

※ 1 100 °C 10 min

※ 2 115 °C 20 min

これに反し、加熱損傷胞子はpH 5.0のPPAAでは増殖し難く、SMA, DTAが良い結果を示した。NGAがあまり良くないのは食塩の影響と考えられる。(NGAは0.5%の食塩を含んでいる)。

培養温度の影響は表3に示した。加熱活性化胞子ではBC-1はSMA, BC-2はPPAAを使用した。また加熱損傷胞子についてはSMAを使用した。活性化胞子では培養温度が55℃において最も良い結果を示したが、損傷胞子ではそれより低い温度の35℃が良い結果を示した。このように加熱損傷胞子は厳しい条件下では発芽、増殖が難しくなると考えられる。この事についてEdwardsらも同様の現象を認めている。

培養時間は通常48時間で行なわれる場合が多いが、*B.coagulans*については、この時間では充分でなく、図1に示したように、活性化胞子では55℃4日、損傷胞子では35℃1週間の培養が必要で

ある。

Table 3 Recovery count of heat-activated and heat-damaged spores of *B.coagulans* at various temperature.

Strain No.	Temp °C	Heat-activated spores	Heat-damaged spores
BC-1	35	2.0×10^6 ※ ¹	2.3×10^3 ※ ¹
	45	2.0×10^6	1.2×10^3
	55	2.6×10^6	3.5×10^2
BC-2	35	2.6×10^7 ※ ²	2.1×10^5 ※ ¹
	45	1.0×10^8	1.6×10^5
	55	1.3×10^8	2.0×10^3

※¹ SMA ※² PPAA

表2に示したように、SMA、DTA、及びNGAなどの培地では細菌の増殖によってコロニーの周囲のpHが低下する。従って、加熱損傷孢子数を測定する場合、一平板中に形成したコロニーが多いと、後から発芽、増殖する孢子がコロニーを形成し難くなることが考えられる。そこで一平板のコロニー数（希釈倍率の変化）と孢子数の関係を調べた。

表4はBC-2の加熱損傷孢子について、希釈倍率を変え、平板上に形成するコロニー数と孢子数の関係を示した。この結果よりコロニー数が少ない程、孢子数は多い。しかし余り少ないとコロニー数のバラツキが多いので正確性に乏しくなる。50個位のコロニー数が最も良いと考えられる。常に50個位のコロニーを形成させるように希釈倍率を考えて操作することは實際上無理であるので、50から10個のコロニーを形成させるように希釈すべきである。

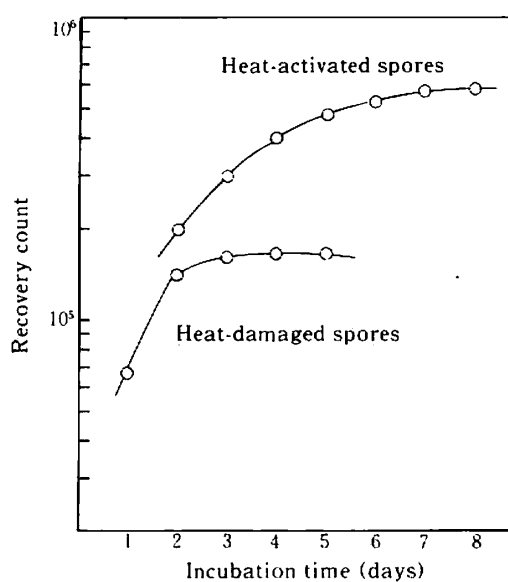


Fig.1 Effect of incubation time on recovery count of *B.coagulans* spores (BC-2).

Table 4 Recovery count of heat-damaged spores of *B.coagulans* (BC-2) on various dilution.

Dilution	Mean count of 5 plates	Recovery count of spores
$\times (1.0 \times 10^3)$	418	4.2×10^5
$\times (2.0 \times 10^3)$	241	4.8×10^5
$\times (4.0 \times 10^3)$	124	5.0×10^5
$\times (6.0 \times 10^3)$	85	5.1×10^5
$\times (8.0 \times 10^3)$	68	5.4×10^5
$\times (1.0 \times 10^4)$	57	5.7×10^5

平板希釈法は増殖に伴うpHの低下があるので、この影響のない最確数算出法(MPN法)と平板希釈法を比較した。

表5はBC-2の活性化及び損傷孢子についてMPN法と平板希釈法で測定した孢子数の比較を

示した。使用した培地はMPN法ではGTB培地，平板希釈法では，活性化孢子はPPAA，損傷孢子はSMAである。この結果より，MPN法より平板希釈法の方が良い事が認められた。

*B.coagulans*は通性嫌気性菌であるが発芽，増殖に酸素を多く必要とし，液体培地と固形培地の酸化還元電位の差と考えられる。また，液体培地は発芽，増殖に時間を要し，約1カ月以上の培養が必要であった。

Table 5 Comparison of dilution method (PPAA and SMA) and MPN method (GTB) on recovery count of *B.coagulans* spores (BC-2).

Methods	Temp °C	Heat-activated spores	Heat-damaged spores
Dilution method	35	1.7×10^7	2.1×10^5
	45	7.0×10^7	1.6×10^5
	55	9.0×10^7	2.0×10^5
MPN method	35	1.1×10^6	1.4×10^5
	45	1.7×10^6	1.3×10^5
	55	3.5×10^7	7.9×10^5

要 約

孢子数及び加熱損傷孢子の生存孢子数の測定に関して，後培養の培地の種類，培養温度，培養時間，希釈倍率及びMPN法，平板希釈法などの測定方法を検討した。

孢子数測定ではPPAAで55°C 4日培養が最適条件であることが認められた。

加熱損傷孢子の生残孢子数測定ではSMA培地で35°C 7日培養が最適であった。

測定方法は平板希釈法で一平板中に50個から100個のコロニーを形成させるように希釈して測定することが望ましい。

文 献

- 1) Nelson, F.F.,: *J.Bact.*, 45, 395 (1943).
- 2) Nelson, F.E.,: *J.Bact.*, 48, 473 (1944).
- 3) Frank, H.A., and Campbell, Jr., L.L.: *Appl. Microbiol.*, 3, 300 (1955).
- 4) 天羽幹夫 農化誌, 26, 306 (1952).
- 5) 天羽幹夫 農化誌, 27, 456 (1953).