

Moorella thermoacetica 芽胞の発芽挙動

青山 好男

Germination Behavior of *Moorella thermoacetica* Spores

Yoshio Aoyama

The germination behavior of *Moorella thermoacetica* spores was examined. The thermophilic obligately anaerobic spore-forming bacteria cause spoilage of low-acid beverages sold with hot-vending machine. Highly purified spores are necessary to investigate the germination behavior. Bacteria were cultured 10-14 days at 55°C under anaerobic condition in mTGC medium for the sporulation. Highly purified spores were obtained by lysozyme and SDS treatment followed by heat treatment from the bacterial suspension. The germination of the highly purified spores was evaluated by three methods; drop of optical density, loss of spore's heat-resistance, and observation of spores with phase-contrast microscope. Time course of germination was the same in three ways; germination of spores begins in 20 minutes and most of the spore germinate after 60 minutes, and germination of spores was completed after 120 minutes. The effects of temperature and pH on spore germination were examined. Optimum temperature range of germination was 60 ~ 65°C from the standpoint of germination velocity. However, the drop in optical density on germination was the largest at 55°C, at higher temperatures 60°C, 65°C the degree of decrease were smaller. This result suggests the existence of less germinative spores at higher temperatures. The optimum pH range of germination was from 6.5 to 8.0.

Key words: spore, *Moorella thermoacetica*, germination, spoilage

食品の変敗を引き起こす微生物の中で、高温偏性嫌気性芽胞菌の *Moorella thermoacetica* は芽胞の耐熱性が極端に高いため¹⁾、この菌が増殖できる加温販売低酸性飲料（ミルクコーヒー、ドリンクスープ、しるこなど）では、この菌を制御するために苛酷な加熱殺菌処理が行われている。加熱のみでは殺滅効果が不十分であるために、抗菌性のある乳化剤を添加するなど、微生物制御面で負担が大きい。本研究は、この菌を制御する新しい技術を開発することをめざすものである。効率的な技術を開発することは、加熱殺菌条件を緩和し、製品品質の劣化を軽減することができる、生産性が向上し、生産コストの減少や省エネルギーをもたらす、乳化剤の添加量を低減できるなど、その意義は大きい。

芽胞菌は、芽胞形成や発芽という特殊なライフサイクルを有している。芽胞は休眠状態にあり、発芽しなければ増殖することもない。また発芽することで耐熱性が低下するなど制御しやすくなる。これまでに、発芽に関する多くの研究が行われており、基本的な発芽プロセスは解明されている²⁻⁵⁾。しかし、研究対象は *Bacillus* 属や食中毒菌など特定の菌種に限られている。発芽機構の大筋はすべての菌種で共通と考えられているものの、細かい点では菌種ごとに異なっている。特に、*Bacillus* 属と *Clostridium* 属の相違は大きいといわれている⁶⁻⁸⁾。*M. thermoacetica* の発芽に関しては、全く研究がなされていない。

本研究では、*M. thermoacetica* 芽胞の発芽に関する研究を行った。発芽挙動を調べるためには、高純度の精製芽胞液が大量に必要である。まず最初に、芽胞精製方法を検討し、形成コロニーから調製した菌懸濁液のリゾチーム処理、界面活性剤処理による芽胞精製方法を確立した。次に精製芽胞を用いて、培地である変法チオグリコレート培地中での発芽挙動を調べた。発芽評価として一般的に用いられている濁度低下や耐熱性消失の時間経過を調べ、位相差顕微鏡観察による発芽進行を比較した。また、温度や pH の発芽に対する影響を調べた。これらの結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌株

缶詰ミルクコーヒーの変敗品から分離された *Moorella thermoacetica*（旧名 *Clostridium thermaceticum*）24-1 株¹⁾を用いた。

2. 芽胞調製－芽胞形成と精製

1) 芽胞形成のための培養

M. thermoacetica 芽胞懸濁液（低温保存）を 100°C、5 分の加熱活性化後、滅菌希釈水で適宜希釈した液 1 ml を滅菌シャーレにとり寒天（最終濃度 1.5%）を加えた変法チオグリコレート (mTGC) 培地を注入、固化した。アネロパッ

ク (12 枚のシャーレを嫌気袋に入れ、酸素除去-二酸化炭素発生袋を入れシール) で嫌気状態にした後、55℃恒温庫で 10 ~ 15 日培養しコロニーを形成させた。形成されたコロニーが大きいほうが、菌懸濁液調製作業には効率が良いために、コロニーがシャーレあたり 10 個程度になるように希釈倍率を調節した (コロニー数が少ないほど、1 つのコロニーは大きい傾向がある)。

2) 芽胞の精製

実験に用いた芽胞は、以下に述べる方法で調製した。精製過程での芽胞の状態 (走査電子顕微鏡観察) および収率 (精製芽胞数) を調べた。

①コロニー採取と加熱処理…培養 10 ~ 15 日経過後、平板に生じたコロニーを白金耳で掻き取り滅菌希釈水 (栄研) に懸濁した。調製された芽胞-栄養細胞懸濁液を 100℃、5 分加熱し、栄養細胞を死滅させた。8℃で 5,000 rpm、10 分間遠心集菌し、その後滅菌水で 3 回遠心洗浄した。

②リゾチーム処理…遠心集菌された芽胞-栄養細胞ペレットを少量の滅菌希釈水に懸濁した後、卵白リゾチーム 1% 溶液 (M/15 リン酸緩衝液 pH7.0) に分散し 37℃、16 時間振盪処理した。振盪は振盪恒温水槽で振幅 100 mm、振盪速度 150 rpm。その後、遠心処理 (5,000rpm、10 分、8℃) を行い、ペレットを沈降させた。そのペレットを滅菌希釈水に懸濁し、遠心処理 (5,000 rpm、10 分、8℃) で 3 回繰り返し洗浄した。最後に少量の滅菌希釈水に懸濁した。

③ドデシル硫酸ナトリウム処理…1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を加えて、37℃で振盪しながら 2 時間処理した。振盪条件はリゾチーム処理の場合と同様である。処理後、遠心処理 5,000 rpm、10 分によりペレットを沈殿させた。この SDS 処理後の遠心洗浄は 20℃で行った (濃厚 SDS 溶液は 10℃以下では凝集発生するため)。

④最終洗浄…20℃の滅菌希釈水で 2 回遠心洗浄 (5,000 rpm、10 分) し、最終的に少量の滅菌希釈水に懸濁し濃厚な状態で使用まで低温保存した。

生芽胞数の測定は、加熱処理 (100℃、5 分) した芽胞を、寒天を加えた mTGC 培地で 55℃で 7 日間混釈嫌気培養し、生じたコロニー数を計測した。

3) 走査電子顕微鏡による芽胞の観察

精製各段階での芽胞の状態を走査電子顕微鏡で調べた。芽胞懸濁液を日本電子(株)ナノパーコレーターに少量とり、注射器で水を吸引した後、(株)真空デバイスのマグネトロンスパック装置 MSP-1S で白金-パラジウムを蒸着した後、(株)日立ハイテクノロジー TM-1000 形ミニスコープで常法に従い観察した。

3. 発芽評価

発芽評価の方法としては、芽胞懸濁液の濁度低下、芽胞

の耐熱性消失、芽胞からの遊離ジピコリン酸量測定などの方法が用いられるが、濁度低下法が最もよく用いられている²⁾。発芽の時間経過を芽胞懸濁液の濁度低下、芽胞の耐熱性消失、位相差顕微鏡観察の 3 つの方法で調べた。これら 3 つの方法での発芽経過を比較するために同一発芽条件で確認した。

1) 濁度低下

日立紫外可視分光光度計 U-2000 (温度調節装置付き) を用い、650 nm の吸光度を経時的に追跡し、その濁度低下により発芽評価した。少量の精製芽胞で発芽評価できるように、微量分光セルを用いた。あらかじめ発芽液 540 μ l を微量分光セルにとり温度調節装置で 55℃にセットし、芽胞懸濁液 60 μ l を加えた (初発の 650 nm の吸光度を 0.5 前後になるように懸濁液の芽胞濃度を調整)。波長 650nm での濁度を 1 分間隔で連続的に 120 分まで測定し、濁度低下曲線を得た。芽胞懸濁液は発芽試験直前に加熱活性化 (100℃、5 分) した。

2) 耐熱性消失

濁度低下法と同様に、あらかじめ 55℃に保温した変法チオグリコレート培地 9 ml に加熱活性化処理した芽胞液を 1 ml 注入し、その後経時的にサンプリングした。その液を直ちに加熱処理 (100℃、5 分) し、適宜希釈後、混釈培養法でコロニー数を測定し、耐熱性を有する生残芽胞数を求めた。120 分間で耐熱性を失った芽胞数の全耐熱性芽胞数に対する割合を発芽率として求めた。

3) 位相差顕微鏡観察

オリンパス光学顕微鏡 BX51 を用いて発芽試験中の芽胞を位相差観察した。バクテリアカウンター (トーマ血球盤の 1 種) のガラス表面に溶融状態の mTGC 軟寒天培地 (寒天濃度 0.45%) を流し、濃厚な精製芽胞液を少量加え、よく混合し、専用のカバーガラス (通常のを断片化したもの) を密着させた。バクテリアカウンターは観察視野内で識別できる溝が刻まれており、その溝を目安に発芽試験中観察サンプルの同一部分を常に観察した。断片化したカバーガラスを用いた理由は、観察サンプルの厚みをできるだけ薄くするためである (できるだけ多数の芽胞に同時に焦点が合うようにするため)。このサンプルを、55℃の恒温器内に保管して経時的に取り出し、観察した。なお保管中の 55℃での乾燥を防止するために、サンプルは滅菌シャーレにとり、滅菌水で湿らせた濾紙切片をシャーレ内に置き、シャーレの蓋と容器の間はガムテープで接着した。

4. 発芽に対する温度、pH の影響

発芽に対する温度の影響は、分光光度計 U-2000 の温度調節装置で所定温度に設定して、分光セル内の mTGC 培地温度が所定温度に到達した後に、精製芽胞液を加えて濁度の経時変化を調べた。温度条件は 40 ~ 70℃の 7 水準であった。pH の影響は 6MHCl および 6MNaOH で pH を調

整した mTGC 培地を用いて、55℃で行った。pH 条件は 4.5 ～ 10.0 の 7 水準であった (mTGC 培地は pH7.0)。

実験結果と考察

1. 芽胞の形成と精製

平板に形成されたコロニーから調製された菌懸濁液 (栄養細胞と芽胞の混合懸濁液) が精製の材料であるが、この懸濁液中の芽胞の割合を光学顕微鏡観察で調べたところ約 5% であった。本菌は元々芽胞形成率の低い菌種である。芽胞形成率向上のため、培地や培養方法について検討したが、最終的には通常行われている培養方法で芽胞形成した。

芽胞精製では、芽胞の損失をできるだけ少なくしながら栄養細胞を除去することが必要である。精製方法について検討した結果、以下の精製方法を確立した。精製過程での走査電子顕微鏡画像および収率を示す (図 1)。芽胞は直径約 1 μm の球形である。栄養細胞は桿菌状で、大きさは $0.6 \sim 0.8 \times 2 \sim 6 \mu\text{m}$ であり、形状から芽胞と栄養細胞の区別は容易である。

精製の最初の段階は、加熱処理である。これは栄養細胞を死滅させると同時に、リゾチームを作用させやすくするための過程である。画像からは栄養細胞がやや細く、分節化している。この段階の収率は 89% と高く、ばらつきも小さい。リゾチームは細菌の細胞壁成分のペプチドグリカ

ンを分解する酵素であり、栄養細胞を溶解することができる。リゾチーム処理の画像 (図 1 の c)) では、栄養細胞が分解し、ペースト状に一体化したものが認められる。リゾチーム処理での収率は 63% であった。次に SDS 処理であるが、SDS は細胞膜に作用して溶解する界面活性剤であり、リゾチームで細胞壁を分解された栄養細胞に作用して栄養細胞を溶解する。画像 (図 1 の d)) では分かりにくいですが、芽胞の他に多量の微細溶解残渣が全面的に存在している。SDS 処理後の収率は 51% であり、バラツキも小さい。最終の水による遠心洗浄過程は、滅菌希釈水による懸濁液—遠心洗浄 (5000 rpm, 10 分) を 3 回繰り返す工程であり、ここで溶解残渣が除去される。最終的には、純度 95% 以上の精製芽胞液が得られた。最終段階での収率は 12% と大きく低下した。収率 12% は $n=2$ の平均で、7% と 17% とバラツキはかなり大きい。最終洗浄段階で収率は大きく低下した。この原因の一つは、最終洗浄段階で SDS 濃度が低くなると芽胞が凝集しやすくなることが挙げられる。一部の芽胞が粒子状凝集物となって遠心管に付着する現象がみられた。この現象は、この芽胞表面の疎水性が高いことに起因しているのかもしれない。他菌種の芽胞であるが、Tween80 を用いて濃度を徐々に低下した液で遠心洗浄することで凝集を防止している研究報告がある⁹⁾。

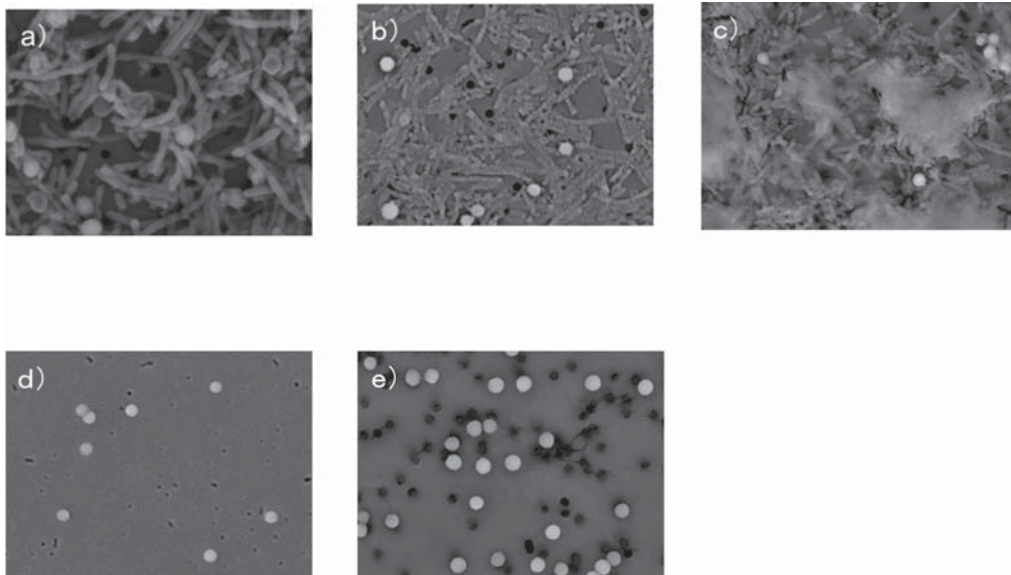


図 1 芽胞の精製過程 (各過程での走査電子顕微鏡画像, 収率)

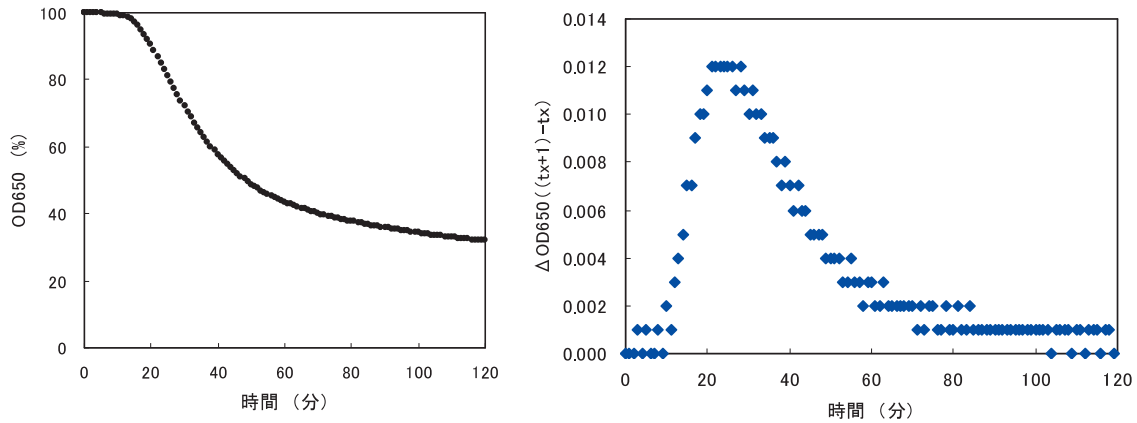
- a) 芽胞 - 栄養細胞懸濁液 (収率 100%) b) 加熱処理後 (収率 89%) c) リゾチーム処理後 (収率 63%)
d) SDS 処理後 (収率 51%) e) 精製芽胞液 (収率 12%)

2. 発芽挙動

1) 濁度低下による発芽曲線

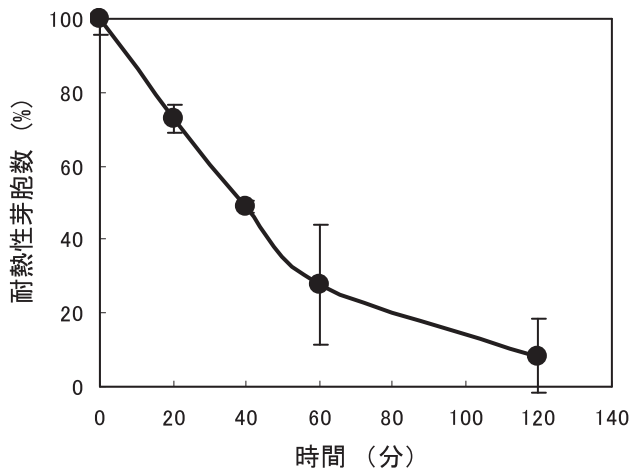
芽胞発芽における濁度 (650nm での吸光度: OD_{650}) の経時変化を図 2 a) に示す。また発芽速度 (1 分間あたりの濁度変化) の経過時間に対するプロットを図 2 b) に示す。20 分あたりから発芽がはじまり、20 分から 30 分で最

大の発芽速度となり、30 分から発芽速度は徐々に低下し、60 分でほぼ濁度低下は終了している。この結果から発芽はほぼ 60 分で終了している。この発芽条件では、発芽評価として 120 分までの濁度変化追跡で発芽は評価できると考えられる。

図2 発芽における OD₆₅₀ の低下a) OD₆₅₀ の経時変化 b) 発芽速度の経時変化

2) 耐熱性の消失

発芽における耐熱性芽胞数の経時変化を図3に示す。発芽開始時(0分)の耐熱性芽胞数を100とすると、120分で8.4%まで低下した。耐熱性消失芽胞数の全芽胞数に対する割合は91.6%であり、発芽率は91.6%である。この耐熱性消失試験で用いた芽胞懸濁液は濁度低下測定に用いたものと同一ロットである。発芽率と濁度低下の数値とを

図3 発芽過程における耐熱性芽胞数の変化
(n=3、平均±標準偏差)

比較した。発芽開始時点での650nmでのODは0.486で、120分後では0.176に低下しているの、濁度は63.8%の低下である。濁度低下度合いと耐熱性消失度は異なるが、その理由は芽胞のすべてが発芽しても濁度はゼロにならないためである(発芽して暗色化しても濁度は多少ある)。一般に、発芽率は耐熱性消失割合で表されている。

3) 発芽過程の位相差顕微鏡観察

濁度低下や耐熱性消失による発芽評価は間接的な方法である。芽胞が発芽する様子を直接観察する必要があると考え、発芽試験中の芽胞を位相差顕微鏡観察した。濁度低下や耐熱性消失を調べたサンプルと同一の芽胞懸濁液ロットを用いて位相差顕微鏡観察した画像を図4に示す。休眠芽胞は高い屈折率をもつため、位相差顕微鏡では白く光って見える。図4 a)の0分では、白く光った多数の芽胞がみられ、大部分が休眠芽胞である。20分経過では、明るさが少し低下した芽胞が少数みられる。60分では、かなり多くの芽胞が暗色化している。120分では全芽胞の8割程度が暗色化している。20分で発芽が始まり、60分で大部分の芽胞が発芽、120分で発芽はほぼ完了している。位相差顕微鏡観察による発芽の時間経過は、濁度低下や耐熱性消失の時間経過とほぼ合致している。

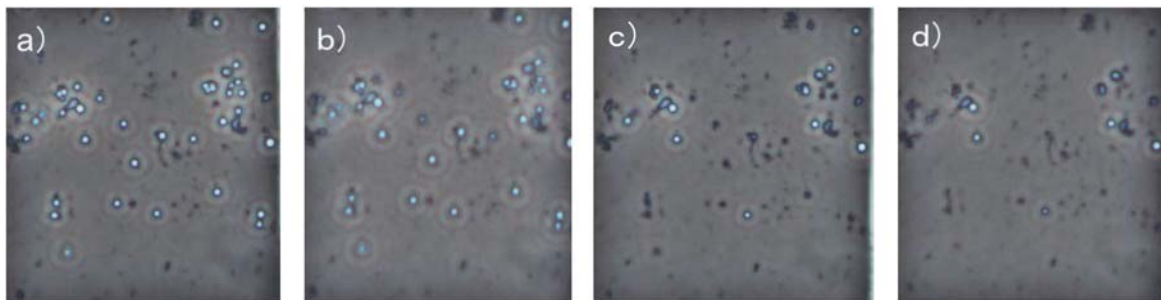


図4 発芽進行の位相差顕微鏡観察画像 (mTGC 培地、55℃)

a) 0分 b) 20分 c) 60分 d) 120分

白く光っているのが休眠芽胞、発芽すると最初は明るさが低下し、最終的に暗色化する

3. 発芽に対する温度, pH の影響

発芽に対する温度の影響を図5に示す。55～65℃では、発芽は120分ではほぼ完了し濁度変化がない状態に達したが、120分後の濁度低下は温度により異なっていた。55℃が最も大きな低下であり、60℃、65℃となるにつれて低下度は小さくなった。発芽速度は60～65℃で最大であった。最終的な濁度低下度は発芽率に関連しており、高温では発芽速度は大きいものの、発芽率は低い。高温になるにつれて、芽胞全体の中で発芽可能な芽胞の割合が減少している可能性がある。また、より低温では120分では発芽完了しておらず、濁度低下により多くの時間を要すると考えられる。

温度を横軸に発芽速度を縦軸にとったものを図6に示す。最大発芽速度の70%以上の温度範囲は50～70℃であった。40℃では発芽速度は10%以下であり、ほとんど発芽は認められなかった。本菌の栄養増殖への温度の影響は既に報告されている¹⁰⁾。発芽に最適な温度条件と栄養増殖に適した温度条件はほぼ同様であるが、70℃では増殖速度がきわめて小さいのに対して、発芽速度は最適条件60～65℃での58%であり、発芽可能な範囲は高温側に広い。これは芽胞の耐熱性が高いにもかかわらず、栄養細胞の耐熱性は低いことに関連していると考えられる。

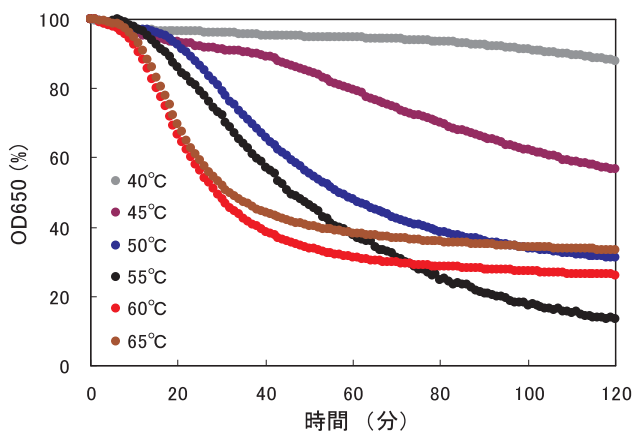


図5 発芽への温度の影響

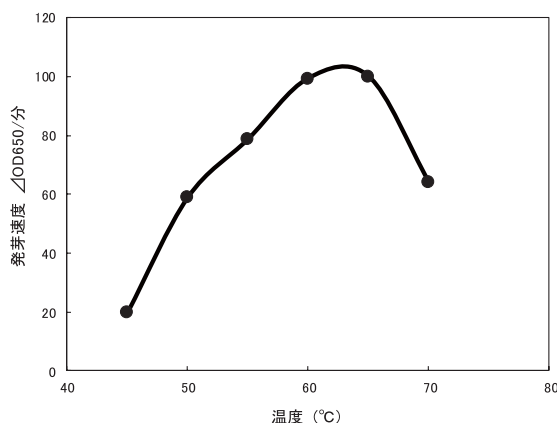


図6 発芽速度への温度の影響

発芽速度に対する pH の影響を調べた結果を図7に示す。発芽の最適 pH 範囲は6.5～8.0で、最大発芽速度の70%範囲は5.5～8.5であった。温度の場合と異なり、最適 pH 領域における120分後の濁度低下に pH での違いはなかった。発芽速度への pH の影響を栄養増殖速度への pH の影響¹⁾と比較したところ、発芽に適した pH 範囲は栄養増殖に比べてかなり広がった。

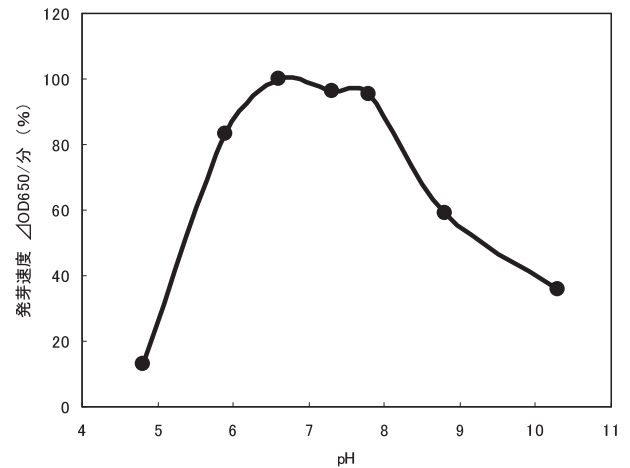


図7 発芽速度への pH の影響

まとめ

1. *M. thermoacetica* 芽胞の精製方法を確立、純度95%以上の芽胞懸濁液が得られた。
2. 芽胞の耐熱性消失から求めた発芽率は92%であり、濁度低下は64%であった。
3. 位相差顕微鏡で発芽の時間経過を調べたところ、20分で発芽開始、60分で大部分の芽胞が発芽、120分ではほぼ発芽は完了した。濁度低下、耐熱性消失、位相差顕微鏡観察での発芽の時間経過はほぼ合致した。
4. 発芽の最適温度は55～65℃の範囲にあるが、発芽速度では60～65℃が最大であり、発芽率（120分後の濁度低下程度）は55℃が最も大きく、60、65℃と温度が高くなるほど発芽率は小さくなる傾向があった。40℃ではほとんど発芽しないが、70℃では発芽速度は50℃と同程度（最大発芽速度の60%）であった。
5. 発芽の最適 pH は6.5～8.5であった。温度と異なり、pH の違いで発芽程度が異なることはなかった。

参考文献

- 1) 中山昭彦：ホットベンダーで問題となる腐敗性高温細菌；伊藤武，森地敏樹編「食品のストレス環境と微生物－その挙動・制御と検出」，p.120，サイエンスフォーラム，2004。
- 2) 近藤雅臣，渡部一仁：スポア実験マニュアル，p19-41，p73-87，技報堂出版，1995。
- 3) 蜂須賀養悦：芽胞学，p.203-318，東海大学出版会，

1988.

- 4) 安田陽子, 柄久保邦夫: 防菌防黴, 25, 333-348, 1997.
- 5) 土戸哲明: 細菌胞子の生理と制御の基本的考え方, 日本防菌防黴学会年次大会講演要旨, p.98, 2009.
- 6) 昌山敦: 細菌芽胞の発芽機構—分子レベルでの多様性—, 生活衛生, 54(4), 361-366, 2010.
- 7) P.Setlow: Spore germination. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 550-556, 2003.
- 8) A.Moir: How do spores germinate? *J. Appl. Microbiol.*, 101, 526-530, 2006.
- 9) C.C.J.van Melis, M.N.N.Groot, M.H.Tempelaars, R.Moezelaar, T.Abee: Characterization of germination and outgrowth of sorbic acid-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 spores: phenotype and transcriptome analysis. *Food Microbiol.*, 28, 275-283, 2011.
- 10) A.Nakayama et al.: Classification and identification of the bacteria causing obligate-anaerobic flat sour spoilage. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 25,297-309, 1984.