

Bacillus subtilis の孢子の発芽過程に対する 消毒剤, 食品保存料及び抗生物質の影響について

銭 谷 武 平

Effect of Disinfectants, Food Preservatives and Antibiotics on the Process of Spore Germination of *Bacillus subtilis*

Buhei ZENITANI

It is uncertain at which stage of the germination process the chemical reagents exert its inhibitory effect. In this paper an attempt is made to decide the inhibitory effect of disinfectants, food preservatives and antibiotics on the germination process of *Bacillus subtilis* spores. The technique employed as criteria of germination was based on changes in optical density of spore suspension.

The experiments yielded the following results:

1. Spores of *B. subtilis* germinated rapidly in 0.1% glucose, yeast extract medium (medium F) as listed in Table 1. The curves of optical density-change in germination process were shown in Figure 1. A typical curve of optical density-change shown in Figure 2 may indicate the three steps a, b and c as described by Schmidt³⁾.
2. Inhibitory effect of some chemical reagents on the spore germination was investigated by using a curve of optical density-change.
 - a. Phenol and mercuric chloride inhibited germination in step a, but in the concentration of less than 0.01% of mercuric chloride, germination was inhibited in step b (Figure 3). Nitrofurazone had no effect on spore germination but inhibited it effectively in step b or in step c (Figure 4). Vitamin K₃ seems inhibitory in step a. Sorbic acid, dehydroacetic acid, boric acid and their sodium salts did not retard the rate of germination, but in acidic side at pH 5.5, it took a little lag time for sorbic acid to inhibit germination in step a. Chlorotetracycline and dihydrostreptomycin inhibited the outgrowth only, that is, step b or c. The results above mentioned are summarized in Table 3.
 - b. Enzyme inhibitors as listed in Table 4 have less effect upon spore germination. Oxine, cuperon and α, α' -dipyridil seem to have inhibitory action at an intermediate stage of spore germination.

緒 言

食品加工に於て殺菌・蒸煮等の加熱処理を受ける製品の変敗は二次的汚染を防止した場合には専ら有孢子細菌に起因する。缶詰類では殺菌不足の場合、また煉製品では加熱温度が比較的に低いため耐熱性の生残した孢子は活性化され発芽・増殖し遂には製品を変敗させる。従つて生残孢子を不活性化¹⁾するか、または適当な食品保存料を混合し発芽を全く阻止することが出来れば食品保蔵上、極めて有利である。しかし孢子の発芽過程* は4相²⁾或いは3段階³⁾の経過を辿るので孢子に対する種々の薬品がどの段階に影響

* 発芽及び発芽過程の用語は次の如く区別した。孢子の耐熱性の喪失に限定し、後述する Step a 段階の終了即ち易染色性になる段階を発芽とし、発芽及び発芽してから栄養細胞になり分裂増殖する前述の段階を広く発芽過程と解して使用した。

するかは十分に判っていない。孢子に対する薬品の作用を見る場合に作用過程を明確にしておくことは食品、器物、用水等の防腐・消毒に薬品を応用する際に適切な判断が得られる点に於て意義があると思う。

孢子の耐熱性に基く従来の方法では作用過程を明らかにし難い。そこで孢子から栄養細胞になる迄の発芽過程には形態的な変移の起ること、発芽初期には著しい重量の減少が見られること⁴⁾から適当な濃度の孢子懸濁液に対する光線の透過度を経時的に測定すれば発芽過程を追跡出来ることに着目した。初期透過度の減少は蜂須賀氏⁵⁾等が発芽率の算定に應用しているが透過度の変化曲線を検討した結果、発芽・out growth 増殖の3段階に区別することが出来た。

本報に於ては濁度変化曲線を應用する方法に従い消毒剤、食品保存料及び抗生物質等の孢子の発芽過程に対する影響を試験した結果について報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株及び孢子懸濁液の調製:— 教室所蔵の *Bacillus subtilis* を用い、普通肉汁液体培養、37°C、7日後に50°C、30分間加温処理してから孢子を遠心分離した。蒸留水で3回洗滌して同液中に懸濁し冷蔵庫に貯え実験に使用した。孢子濃度は 9.6×10^8 /ml (乾燥重量0.7mg/ml) であった。

2. 孢子懸濁液の濁度変化による発芽過程の追跡:— 孢子懸濁液は0.1M 磷酸緩衝液 pH 7.3で10倍に稀釈し65°C、15分間加熱活性化⁶⁾した後直ちに冷却し発芽培地に入れた。孢子懸濁液3ml と発芽試験培地3ml を入れた比色用試験管は栓を施し30°C に置き30分または60分毎に Filt er No. 43 を用いて透過度(O.D.)を測定した。栄養細胞の段階に入ると0.01%メチレンブルー液0.2ml を混和、静置し脱色時間を測定する。一定時間後に反応を停止させ Thoma 血球計を用い位相差顕微鏡によつて栄養細胞及び孢子数を測定し、発芽率を求めた。

3. 濁度変化及び発芽率の表示法:— 測定結果は濁度変化率、 $\frac{T_{gt}}{T_{To}} \times 100$ で示した。Tt 及び To は t 時間及び実験開始時の (O.D.)。鏡検によつて求めた発芽率と比較対照するために濁度減少による蜂須賀氏等の式⁵⁾、 $G_t = \frac{A_0 - A_t}{0.7(A_0 - a)} \times 100$ を $\frac{(A_0 - A_t)100}{(1-k)(A_0 - a)}$ とし各実験毎に薬品無添加の最低濁度を100%発芽と見なし k を求めてから発芽率を算出した。Gt...t 時間の発芽率、At 及び Ao...t 時間及び実験開始時の O.D.、a...培地の O.D.

実 験 結 果

1. 孢子懸濁液の濁度変化から見た試験培地と発芽率の関係について

孢子が正常且つ急速に発芽増殖するのに必要な培地を比較試験した。其の結果は Table 1 に表示した

Table 1. The rate of germination of *Bacillus subtilis* spores in various media.

Media	Rate of germination (%)
A 0.75% Sodium chloride.	0*
B 0.1% Glucose.	4
C 0.1% Glucose and 0.1% yeast extracts.	78
D 0.1% Yeast extracts.	73
E 0.1% Polypeptone.	18
F 0.1% Glucose, 0.5% yeast extracts, 0.5% polypeptone and 0.1% NaCl.	98

* Three ml of spore suspension with 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7.3 and 3 ml of medium were incubated at 30°C for 4 hours.

如く酵母エキスで肉エキスに代用した 0.1%葡萄糖ブイヨンで発芽率が最高であつた。各培地に於ける孢子懸濁液の濁度変化曲線を図示すると Figure 1 のようである。発芽率が高い場合は濁度は最初の 1 時間で急速に減少するのに対し、生理食塩水及び 0.1%葡萄糖液中ではその濁度の減少を認めない。また含糖培地 C 及び F では再び濁度の増加を認めた。以上の試験結果によつて培地 F を使用した場合の孢子懸濁液の濁度曲線の変化に対する孢子の発芽過程の関係を確めることにした。

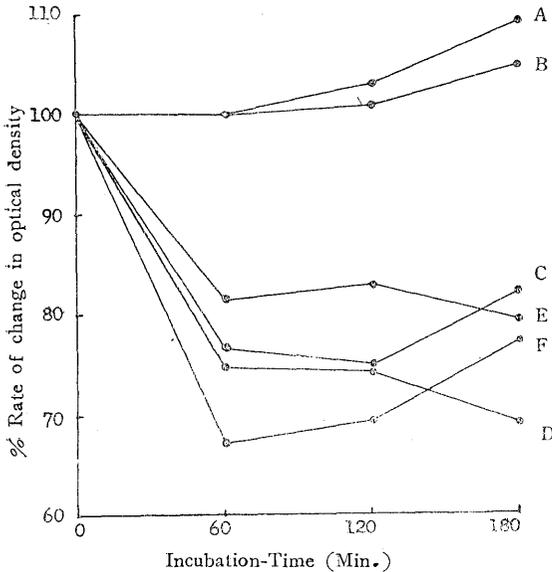


Figure 1. The curves of optical density-change of spore suspension cultured in various media. The rate of change in optical density is expressed by the equation, $Tt \times 100 / T_0$. T_0 and Tt indicate (O.D.) of spore suspension at 0 or t minutes.

孢子膜の残骸を附着した儘で運動するようになる。この段階を過ぎると活潑に運動する栄養細胞は成長し分裂するようになる。初期は発芽であり其の後の段階は outgrowth で便宜的に Step a, b 及び c と呼ぶことにした。

この曲線を枯草菌の孢子発芽に伴う正常な濁度変化曲線とし薬品添加による曲線の異同から阻害過程を推察する手段とした。薬品添加による曲線変化を説明すると先づ孢子が直接に薬品の影響を受けて発芽が阻止・抑制される場合は孢子懸濁液の濁度が減少しないかその速度が遅くなる(図中, Inhibitory line of step a). これは Step a 即ち孢子発芽の阻害である。しかし発芽に全く影響のない場合は濁度は正常曲線と同様に急速に減少する。若し outgrowth が阻害されると孢子懸濁液の濁度減少が限界に達してからは濁度が変化しないかまたは異同は小範囲に過ぎない(図中, Inhibitory line of step b or c の点線)。

処が Step c を阻害する場合は Step b が僅かに上昇した時期以降に濁度の減少が少ないので濁度が一定値に留まるか薬品の種類・濃度如何によつては逆に減少することもあり、ま

2. 孢子発芽と孢子懸濁液の濁度変化曲線の関係について

培地 F を使用し孢子発芽過程の進展に伴う孢子懸濁液の濁度変化を 30 分毎に測定し、濁度変化率で画いた曲線は Figure 2 の如くである。初期の急速な濁度減少期と停滞乃至僅かに上昇を示す時期と最後の濁度上昇期の 3 期に区別される。各期間を通じて細胞の形態的变化及び石炭酸フクシンによる染色性を観察した処、接種後 30~60 分間経過すると孢子は特有な屈折性が失われ易染色性になる(耐熱性の喪失を意味する)。次の過程に入ると孢子は楕円形から次第に膨脹し曲棒状になり屈曲部から栄養細胞が漸次成長して

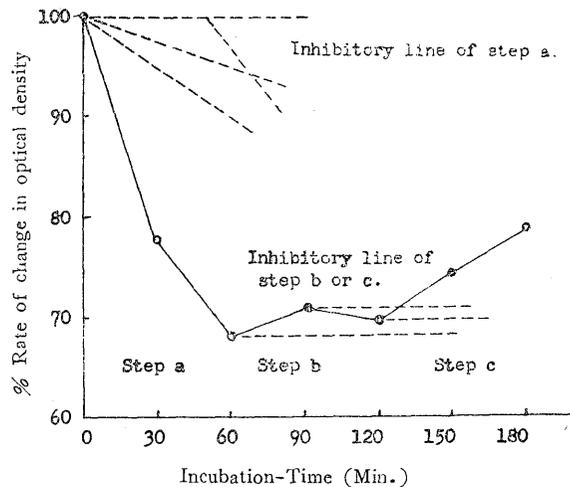


Figure 2. The standard curve of optical density-change of spore suspension at the process of spore germination of *Bacillus subtilis*.

れに正常曲線に近い状態のこともある。従つてこの Step においては阻害か否かは曲線の異同のみで判別出来ないから栄養細胞の呼吸能に依ることとし、そのためメチレンブルーの脱色時間を補助的手段として使用した。

3. 孢子懸濁液の濁度変化曲線から見た発芽過程に対する消毒剤・食品保存料等の影響について

i. 石炭酸並に昇汞の影響：— 殺菌消毒に使用する石炭酸並に昇汞の孢子発芽に対する影響を見た濁度変化曲線は Figure 3 に示した。昇汞は 0.05~0.1% では Step a の阻害、即ち孢子に直接に作用し 0.01

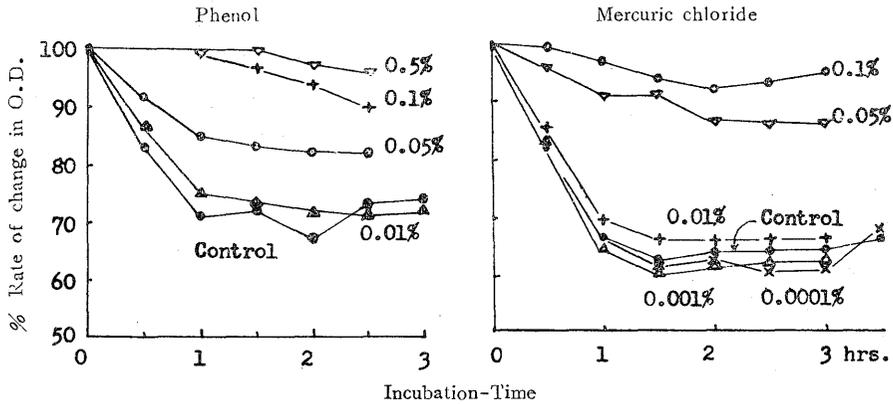


Figure 3. Effect of phenol and mercuric chloride on the germination process of *Bacillus subtilis* spores.

%以下では発芽に関係なく Step b 即ち outgrowth 以降を阻害するように濃度によつて阻害過程は相違する。しかし石炭酸は直接孢子に作用し発芽を阻害するが 0.01% では殆ど発芽阻止の効果が無い。両薬品の阻害過程及び発芽率は Table 2 に示した。

Table 2. Inhibitory effect of phenol and mercuric chloride on the process of spore germination of *B. subtilis*.

Reagent	Concent. %	Inhibition step	Rate of germination, %	Time of MB. reduction
Phenol	1	A	0 (60)*	—(210)†
	5×10^{-1}	A	0 0	—
	1×10^{-1}	A	6 3	—
	5×10^{-2}	A	27 21	—
	1×10^{-2}	None	94 87	12min.
Mercuric chloride	1×10^{-1}	A	0 21 (90)	—
	5×10^{-2}	A	0 24	—
	1×10^{-2}	B	4 91	—
	1×10^{-3}	B~C	17 100	—
	1×10^{-4}	None	98 100	10min.

* indicates the rate of germination by the equation of Hachisuka et al.

() shows the incubation-time.

† indicates the time passed before MB (Methylen blue) was added to the reaction mixture.

ii. 食品保存料及び抗生物質の影響：— 現在食品保存に採用されている数種の食品保存料及び抗生物質等の影響について試験した。

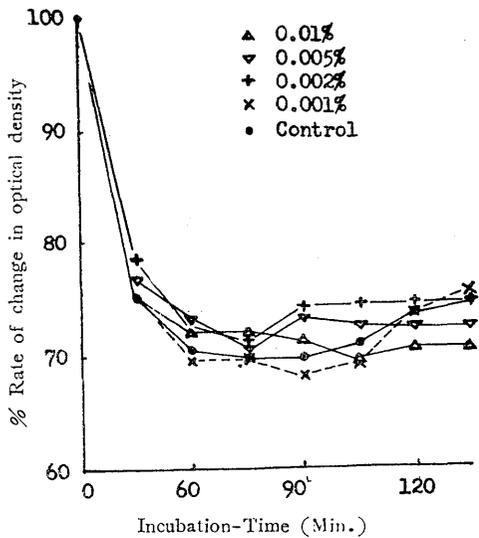


Figure 4. Effect of nitrofurazone on the germination process of *B. subtilis* spores.

c) ソルビン酸, デヒドロ酢酸及び硼酸.

本実験条件に於てはどれも供試濃度では殆ど効果を認めなかつた。僅かに0.1%ソルビン酸がStep cの延長を見せたにすぎない。しかしこれらの酸類は一般に酸性で一層有効に作用する。ソルビン酸はpH5.5以下で阻害が著しいから⁷⁾ pH 7.3を酸性条件に変更し試験したが発芽開始時間が延長したけれども其後の濁度減少は余り影響をうけないようであつた。他の酸類はpH 5.5に於ても殆ど効果はなかつた。

d) クロルテトラサイクリン (オーレオマイシン). フラスキンと同様に発芽に対して全く阻止効果がない (Figure 6). 栄養細胞の状態近く

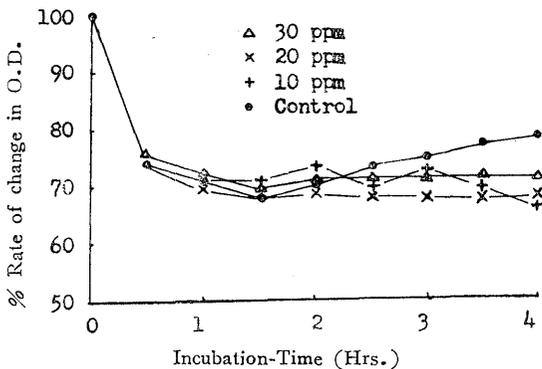


Figure 6. Inhibitory effect of Chlortetracycline on the process of spore germination of *B. subtilis*.

a) ニトロフラゾーン(フラスキン). ニトロフラゾーンは Figure 4 に示した如く発芽には殆ど影響がなく Step b または C の段階に至つて阻害するにすぎない。0.001%では正常濁度変化曲線に近いがメチレンブルーを還元せず (対照は6分)。栄養細胞またはそれに近い状態に至つて始めて阻害をうけるようである。

b) 2-メチル・ナフトキノン (ビタミン K₃). V. K₃は難水溶性のため最初は5%酒精を含む条件で試験した。その結果によると5%酒精のみでStep aの阻害が現れ発芽率72% (270分後に添加した。メチレンブルーは18分で脱色)で0.1~1.0 mg/10ml では殆ど栄養細胞を認めなかつた。予め加熱溶解し酒精の影響を除いた場合は Figure 5の如く含酒精の場合と同様に Step aの阻害傾向を認めた。供試食品保存料中 Step aの阻害傾向を認めたのは本品のみであつた。

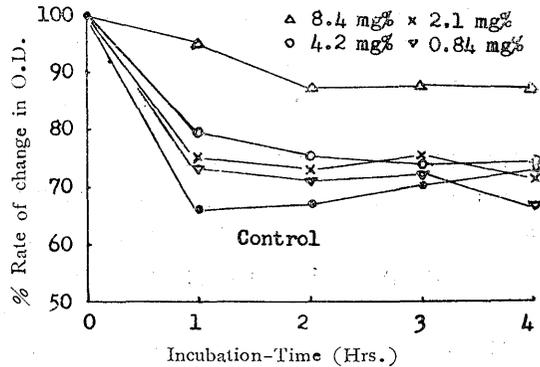


Figure 5. Effect of Vitamin K₃ on the process of spore germination of *B. cillus subtilis*.

になつて阻害され 20~30ppm では2時間以後に殆ど濁度変化がないが, 10ppm 以下では返つて減少する傾向が認められた。ストレプトマイシンを用い同様の試験をしたが発芽の抑制は示さなかつた。以上の食品保存料等の効果及び阻害過程は Table 3 に一括表示した。

4. 孢子懸濁液の濁度変化曲線から見た発芽に対する阻害剤の影響について
消毒剤・食品保存料に続いて阻害剤の影響について試験した。培地は0.2%酵母エキス, 1.0%ポリペプトン, 0.2%葡

Table 3. Inhibitory effect of some food preservatives and antibiotics on the germination of spores of *Bacillus subtilis*.

Reagent	Concent. %	Step inhibited.	% of spores germinated.	Time of MB. reduction.
Nitrofurazone	1×10^{-2}	B	0 97 (60)	— (210)
	5×10^{-3}	B-C	0 95	—
	2×10^{-3}	B-C	0 98	—
	1×10^{-3}	C	6 98	—
Vitamin K ₃	8.4×10^{-3}	A	0 35 (90)	— (270)
	4.2×10^{-3}	A-B	0 66	—
	1.7×10^{-3}	A-B	11 78	—
	8.4×10^{-4}	none	97 77	9
Sorbic acid	1×10^{-1}	A?	97 — (90)	18 (210)
	5×10^{-2}	none	98 —	18
	1×10^{-2}	none	— —	10
Sodium dehydroacetate	1×10^{-1}	none	98 — (90)	18 (210)
	5×10^{-2}	none	— —	14
	1×10^{-2}	none	— —	10
Borax	1	B	3 100 (90)	— (240)
	5×10^{-1}	C?	5 100	—
	1×10^{-1}	none	98 —	9
	5×10^{-2}	none	97 —	6
Chlortetracycline	30ppm.	B-C	0 96 (90)	— (240)
	20ppm.	B-C	0 97	—
	10ppm.	C	0 94	—
	5ppm.	C	0 100	—
	1ppm.	C	0 100	—

葡萄糖及び 0.5%食塩とし 2.5%寒天平板を用い孢子を採取した。発芽基本培地は予め最小要求量を検討し 0.1% Casate (カゼイン, トリプシン消化物), 0.05%葡萄糖を使用した以外は既述の試験方法に拠つた。なお酵母エキスの補足の効果は認められなかつた。

1. 試験培地の pH 及び酒精の発芽に対する影響:— 阻害剤使用に先立ち酒精・pH の影響を試験した結果, 阻害剤を溶解使用する如き低濃度の酒精では著しい影響はないが 5~10%酒精は Step a を阻害する。また 0.1M 磷酸緩衝液を使用した場合, pH 5.5~7.5 の範囲では発芽率 (蜂須賀氏の方法に拠る) は殆ど影響をうけなかつた。

ii. 孢子懸濁液の濁度減少から見た孢子発芽に対する阻害剤の影響:— Table 4 に表示したように殆ど阻害効果がなく, 蔞酸及びチオウレアが Step a の中間期に僅かに影響するようであつた。蔞酸塩を使用したのは発芽間に遊離するカルシウムとの関係を推察しようとしたものである。蜂須賀氏等はアスパラギン, カラメルび磷酸緩衝液を使用し同様試験しているが概ね同じ傾向の結果を示している。しかし金属とキーレートす

Table 4. Effect of some inhibitors on the germination of spores of *Bacillus subtilis*.

Inhibitor	Concent.	Rate of germination (2 hours incubation at 30° C)
Iodoacetate	M/50	— (96)
	M/100	100 —
Malonate	M/100	92 (88)
Arsenite	M/100	— (84)
Flouride	M/100	— (95)
2,4 Dinitrophenol	M/1000	92 (90)
Oxalic acid	M/100	81 —
Hydroxylamine	M/100	92 —
8 Hydroxyquinoline	M/1000	0
	M/10000	100
α, α Dipyrilidil	M/100	11
	M/1000	88
Cuperon	M/100	25
	M/1000	98
Thiourea	M/100	92
	M/1000	100
Cyanide	M/100	91 (90)

() shows the results of Hachisuka et al's experiment.

る阻害剤の内には有効性を示すものがあり、オキシンは $10^{-3}M$ 、 α - α' デピリヂルとクフエロンは $10^{-2}M$ でそれぞれ多少の発芽阻害が認められた。オキシンの α - α' デピリヂルは直接胞子の発芽を抑制するようで接種後の30分間は濁度変化せずその後減少するが蔭酸と同程度で、発芽途中の段階に至つて金属が固定され其の段階で発芽の停止している様に見える。オキシンは一旦僅かに減少し濁度が再び高まつた。

考 察

胞子は発芽過程に於ては細胞の膨化・伸長・胞子膜の破裂して栄養細胞の脱出・増殖細胞へと成長する。加熱活性化して同一速度で発芽が進行するとすれば形態変化は濁度変化となつて発芽過程を追跡出来ると予想し略々その目的を達し得たが、その初期濁度減少は既に蜂須賀氏等⁵⁾が発芽率の算定に應用していた。本法によれば発芽後の outgrowth、増殖への区別を判定出来るから薬品の効果を発芽過程全体について観察出来る利点があるが“Sporicidal”か“Sporostatic”かは曲線の変化のみでは判定出来ない欠点がある。

石炭酸や昇汞の如き薬品は高濃度では胞子に対して直接作用し、発芽阻止するに較べフラスキン、オーレオマイシン等の如き食品保存料の大部分は発芽に全く影響なく outgrowth 以降の段階になつて始めて阻害作用を発揮する。このことは Table 3 に見られる如く栄養細胞を主にした直接鏡検では発芽率 0%であるに比較し濁度減少を基にした蜂須賀の式では発芽率 100%と相違することからも容易に判る。

嫌気性有胞子細菌の胞子に対する Streptomycin の影響を見た報告⁸⁾によると発芽に全く阻害効果がないが増殖細胞の分裂を阻止する様で本試験の結果と同様である。この理由として耐熱性胞子に対する抗生物質の不透過性が挙げられているが、Step a に有効でない薬品も恐らく同様の理由によるかもしれない。なおビタミン K_3 のみが供試食品保存料中で Step a の阻害傾向を示したが Powell¹⁰⁾が発芽過程に SH 群の関与することを示唆した。V. K_3 は SH 酵素を阻害することから発芽中に出現する SH 恐らく昇汞と結合する様な胞子中の SH が V. K_3 により影響を受け Step a の阻害を示すものと思われる。

また阻害剤の効果を併せて試験したが Powell¹⁰⁾、蜂須賀等⁵⁾、Harrell & Halvorson¹¹⁾の結果と併せて解糖や TCA サイクルの阻害剤の効果のない事は薬品の不透過性か或いは発芽過程にこの様な代謝系が関与していないものと思われる。然しオキシンの α - α' デピリヂル及びクフエロンがかなり有効性を示し、オキシンの BAL の阻害効果は Powell によつても認められているが、恐らくこれらにキレートされる金属が発芽過程に関与していると推察される。

総 括

枯草菌胞子の発芽過程に対する薬品の影響を胞子懸濁液の濁度変化曲線を用いて検討し次の結果を得た。

1. 含糖肉汁 (0.1%葡萄糖、酵母エキス使用) に懸濁した胞子は発芽の進行と共に濁度変化をなし発芽過程は 3 段階に区別出来た。
2. 石炭酸・昇汞等は発芽其のものを阻害するが大多数の食品保存料等は発芽に殆ど影響がなく其れ以降の段階になつて始めて阻止作用を示す。
3. 酵素阻害剤のうちオキシンの α - α' デピリヂル等以外は殆ど発芽に影響を与えなかつた。

本研究は内地留学中に実施したので終始懇篤な指導を与えられた九大農学部富安行雄教授に対し深謝の意を表す。

文 献

1. SCHMIDT, C. F., and W. K. NANK. *Food Research*, **22**, 562 (1957)
2. KNAYSI, G. *Elements of Bacterial Cytology*. 2nd Ed., p. 248
Constock Publishing Co., Inc., Ithaca, N. Y. (1951)
3. SCHMIDT, C. F. *Ann. Rev. Microbiol.*, **9**, 387 (1955)
4. POWELL, J. F., and R. E. Strange. *Biochem. J.*, **54**, 205 (1954)
5. HACHISUKA, Y. et al. *J. Bact.*, **69**, 399, 407 (1955)
6. CHURCH, B. D., H. HALVORSON and H. O. HALVORSON. *J. Bact.*, **68**, 393 (1954)
7. EMARD, L. O., and R. H. VAUGHN. *J. Bact.*, **63**, 487 (1952)
8. WYNNE, E. S., R. E. COLLIER and P. A. MEHL : *J. Bact.*, **64**, 883 (1952)
9. POWELL, J. F. : *J. Gen. Microbiol.*, **4**, 330 (1950). 3. に依る.
10. POWELL, J. F. : *J. Gen. Microbiol.*, **4**, 330 (1950), **5**, 993 (1951). 3. に依る.
11. HARRELL, W. K., and H. HALVORSON : *J. Bact.*, **69**, 276 (1955)