

食肉中の残留抗生物質簡易検査法に使用する

*Bacillus subtilis* 及び *Bacillus cereus* における迅速な芽胞形成法の検討

島根県食肉衛生検査所 ○菅満宏 黒崎守人

#### はじめに

食肉中の残留抗生物質簡易検査法(以下「簡易法」という)では、*Bacillus subtilis*(以下「BS」という)及び *Bacillus cereus* (以下「BC」という)の試験菌液調整には普通寒天培地(以下「培地」という)培養にて芽胞形成率を 80%以上にする必要はあるが、特に BC では調整に苦慮していた。

そこで上記 2 菌種の迅速な芽胞形成を目指して、培地への硫酸マンガン(以下「 $MnSO_4$ 」という)の添加、並びに培養中の温度上昇(以下「ヒートショック」という)等の方法を組み合わせた培養試験を実施したところ、若干の知見を得たので報告する。

#### 材料及び方法

##### 1 培地の栄養成分低減

培地の規定量の (1)1/1、(2)2/3、(3)1/2、(4)1/3 の 4 群を設定した。

##### 2 培地の使用水

(ア) 蒸留水(以下「DW」という)、(イ)  $MnSO_4$  添加水(DW に  $1\mu g/mL$  の割合となるよう添加)、(ウ) 土浸出液(天然及び市販腐葉土について、溶解、ろ過後に高圧蒸気滅菌し pH を 7.0 に調整)、(エ) 土浸出液+ $MnSO_4$ ((ウ)に  $MnSO_4$  を  $1\mu g/mL$  の割合となるよう添加)の 4 群を設定した。

##### 3 培養温度

ヒートショック非設定群として (a)30°C(簡易法での培養温度)、(b)45°C の 2 群を設定した。

またヒートショック設定群として (c)芽胞形成率 10%未満にて 30°C から 45°C、(d)芽胞形成率 10%未満にて 45°C から 55°C、(e)芽胞形成率 20%以上にて 30°C から 45°C、(f)芽胞形成率 20%以上にて 45°C から 55°C の 4 群を設定した。

##### 4 試験方法

上記 1～3 を組み合わせた 96 群で BS 及び BC を培養し、各群を 1 週間毎に芽胞染色して鏡検観察した。また芽胞形成率が 80%以上となった群は、BS はカナマイシン、BC はオキシテトラサイクリンにて薬剤感受性を確認した。

#### 成績

各菌種における芽胞形成に要した期間を表 1 及び表 2 に示した。

##### 1 培地の栄養成分の低減

(3)及び(4)で早期化されたものの、コロニー形成数が大きく減少した。

##### 2 培地の使用水

(ウ)及び(エ)で最も早期化され、次いで(イ)、(ア)の順であった。なお(ウ)及び(エ)での天然腐葉土と市販腐葉土では結果に差異は無かった。

表1 BSにおける芽胞形成に要した期間(週)

培養温度 (ヒート ショック)	芽胞 形成率 (%)	使用水															
		(ア)DW				(イ)MnSO <sub>4</sub>				(ウ)土浸出液				(エ)土浸出液+MnSO <sub>4</sub>			
		栄養成分															
		(1)1/1	(2)2/3	(3)1/2	(4)1/3	(1)1/1	(2)2/3	(3)1/2	(4)1/3	(1)1/1	(2)2/3	(3)1/2	(4)1/3	(1)1/1	(2)2/3	(3)1/2	(4)1/3
(a) (b)	0	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	<10	2	2	1	1	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	10-20	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	N/A	N/A	1	1	N/A	N/A
	20-80	4-6	4-6	3-5	3-5	3-5	3-5	2-4	2-4	2-4	2-4	1-3	1-3	2-4	2-4	1-3	1-3
	≥80	7	7	6	6	6	6	5	5	5	5	4	4	5	5	4	4
(c) (d)	0	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	<10	2	2	1	1	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	10-20	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	N/A	N/A	1	1	N/A	N/A
	20-80	4-6	4-6	3-5	3-5	3-5	3-5	2-4	2-4	2-4	2-4	1-3	1-3	2-4	2-4	1-3	1-3
	≥80	7	7	6	6	6	6	5	5	5	5	4	4	5	5	4	4
(e) (f)	0	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	<10	2	2	1	1	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	10-20	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	N/A	N/A	1	1	N/A	N/A
	20-80	4	4	3	3	3	3	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
	≥80	5	5	4	4	4	4	3	3	3	3	2	2	3	3	2	2

表2 BCIにおける芽胞形成に要した期間(週)

培養温度 (ヒート ショック)	芽胞 形成率 (%)	使用水															
		(ア)DW				(イ)MnSO <sub>4</sub>				(ウ)土浸出液				(エ)土浸出液+MnSO <sub>4</sub>			
		栄養成分															
		(1)1/1	(2)2/3	(3)1/2	(4)1/3	(1)1/1	(2)2/3	(3)1/2	(4)1/3	(1)1/1	(2)2/3	(3)1/2	(4)1/3	(1)1/1	(2)2/3	(3)1/2	(4)1/3
(a) (b)	0	≤6	≤6	≤5	≤5	≤5	≤5	≤4	≤4	≤4	≤4	≤3	≤3	≤4	≤4	≤3	≤3
	<10	7	7	6	6	6	6	5	5	5	5	4	4	5	5	4	4
	10-20	8	8	7	7	7	7	6	6	6	6	5	5	6	6	5	5
	20-80	9-11	9-11	8-10	8-10	8-10	8-10	7-9	7-9	7-9	7-9	6-8	6-8	7-9	7-9	6-8	6-8
	≥80	12	12	11	11	11	11	10	10	10	10	9	9	10	10	9	9
(c) (d)	0	≤6	≤6	≤5	≤5	≤5	≤5	≤4	≤4	≤4	≤4	≤3	≤3	≤4	≤4	≤3	≤3
	<10	7	7	6	6	6	6	5	5	5	5	4	4	5	5	4	4
	10-20	8	8	7	7	7	7	6	6	6	6	5	5	6	6	5	5
	20-80	9-11	9-11	8-10	8-10	8-10	8-10	7-9	7-9	7-9	7-9	6-8	6-8	7-9	7-9	6-8	6-8
	≥80	12	12	11	11	11	11	10	10	10	10	9	9	10	10	9	9
(e) (f)	0	≤6	≤6	≤5	≤5	≤5	≤5	≤4	≤4	≤4	≤4	≤3	≤3	≤4	≤4	≤3	≤3
	<10	7	7	6	6	6	6	5	5	5	5	4	4	5	5	4	4
	10-20	8	8	7	7	7	7	6	6	6	6	5	5	6	6	5	5
	20-80	9	9	8	8	8	8	7	7	7	7	6	6	7	7	6	6
	≥80	10	10	9	9	9	9	8	8	8	8	7	7	8	8	7	7

### 3 培養温度

ヒートショック非設定群である(a)及び(b)では結果に差異は無かった。

またヒートショック設定群において(c)及び(d)では効果が無かったが、(e)及び(f)ではヒートショック後1週間で芽胞形成率が80%以上となり早期化に大きく影響した。

### 4 鏡検観察結果及び薬剤感受性

鏡検観察での形態的变化については、培養条件にかかわらず芽胞形成率20%以上の群では第II期以上(図1参照)の段階と推察される状態が多数観察されたが、10%未満の群ではほとんどが第0~I期であり第II期以上と推察される状態はごく少数に留まった。なお薬剤感受性については全群で感受性を確認した。

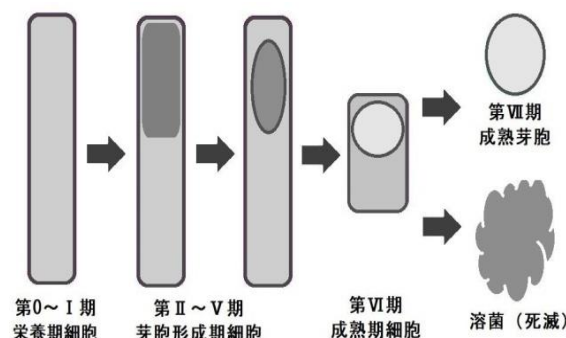


図1 芽胞形成に伴う形態的变化 [1]

## 考察及びまとめ

本研究では培地の調整と環境ストレス付与による迅速な芽胞形成を試み、 $\text{MnSO}_4$ 、土浸出液使用及びヒートショックで効果を得た。特に筆者らが見出した土浸出液使用とヒートショックの併用法は、特別な機材及び方法等を用いず実施可能で簡便かつ効果的な方法となった。しかし本研究法では固形培地使用による芽胞の回収ロスが生じるデメリットが課題として残った。

芽胞形成細菌は栄養源枯渇を感知すると芽胞形成遺伝子を活性化させ、さらに同一属菌への情報伝達機構であるクオラムセンシング(Quorum Sensing)も発動させて芽胞形成を開始する[2][3]。

知見では BS 及び BC は培養当初から栄養源が枯渇状態となると、栄養期細胞での増殖率及び芽胞形成率の低下を招く[1][2]。本研究においても培地の栄養成分低減群では芽胞形成の早期化には寄与したが、形成コロニー数の低下を招いたことから実用性に乏しい結果となった。

培地に金属陽イオン、特に  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 及び  $\text{Ca}^{2+}$ を添加すると *Bacillus* 属菌の芽胞形成率及び発芽率が上昇すること[1][2]、並びに腐葉土は構成成分として  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 及び  $\text{Zn}^{2+}$ を含有していることから[4]、本研究での土浸出液使用は腐葉土が含有する金属陽イオンにより芽胞形成促進効果が発現したと考えられる。

また BS 及び BC への環境ストレスのうちヒートショックは最大のストレス因子であり、早期に芽胞を成熟化するべく反応するという知見から[2][5]、本研究でのヒートショックの効果は形成途中の芽胞の成熟化を促進させたことを裏付ける結果となった。ただし芽胞形成率 10%未満の群ではほとんどが第 I 期以前の状態であり芽胞形成の早期化も確認出来なかったことから、ヒートショックは芽胞形成開始の時期を早期化する因子では無く、あくまでも栄養源が枯渇し芽胞形成が開始された第 II 期以降における芽胞成熟化の促進因子となっていることが示唆された。

知見では BS 及び BC での芽胞形成液体培地の報告があることから[1]、今後はその報告内容と本研究で得た知見を基礎とした液体培地の使用により、迅速な芽胞形成と効率的な芽胞回収を兼ね備えた試験法を確立していくことで、簡易法による食肉の安全性向上に寄与していきたい。

## 引用文献

- [1]渡部一仁：細菌芽胞(孢子)－その特徴と調整法,抵抗性試験法,第 14 改正日本薬局方での関連記載項目及び芽胞形成菌管理の意義－,PDA Journal of GMP and Validation in Japan,3, 67-73 (2001)
- [2]F. Carlin：Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus* : evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms, FEMS Microbiology Reviews,42, 614-626 (2018)
- [3]池田幸：Quorum Sensing と菌体増殖,生物工程学,90,582-585 (2012)
- [4]末安竜士ほか：樹葉の枯死・腐植に伴う化学成分組成の動態評価に関する考察,第 37 回土木学会関東支部研究発表会,VII-25 (2010)
- [5]H.Yoshikawa：Diverse but functionally related mechanisms of environmental stress responses in *Bacillus subtilis*,Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria,21,16-26 (2010)