

発表番号 39

液体培地希釈法による VNC 食品微生物の単離法に関する研究

助成研究者 藤井智幸 (新潟薬科大学応用生命科学部)

共同研究者 高木正道 (新潟薬科大学応用生命科学部)

従来行われてきた微生物の単離、検出方法は、増殖して固体培地上にコロニーを形成することをもってその微生物の存在を確認するというものである。この従来法は、「増殖能を有した検出すべき微生物＝コロニーを形成できる微生物」という考えに基づいたものであるといえる。しかしながら、このような実験手法で研究できる微生物は、自然環境に生育している微生物のたかだか数%であり、残りの大部分は認識されないまま残されているということが、近年認識されるようになってきた。コロニー形成能が無くても生きています菌、すなわち viable but nonculturable (VNC) 状態の微生物が存在するのであれば、VNC 状態の概念に即した微生物の単離、検出法が必要となってくる。そこで本研究では、従来法と比較して、

- (1) 液体培養での培養液の濁りから微生物の存在確認を行う
- (2) 濾過サンプルを限界希釈しマイクロプレートに分注した微小画分を利用して分離を行う。

という方法により微生物の分離・同定する手法を確立することを目的とした。

試料中の生菌数を液体培地希釈法と寒天培地平板を用いたコロニーカウンティング法(従来法)とを用いて算出し、両者を比較した。

表面海水においては、寒天培地平板法によって得られた生菌数は 10^2 CFU/mL のオーダーであったのに対し、液体培地希釈法では約 10 倍高い値となった。このことから、本研究で構築した方法で寒天培地平板にコロニーを形成する微生物よりも多くの微生物を液体培養可能であることが明らかとなった。また、液体培養される微生物群には、寒天培地平板上でコロニーを形成できないもの、すなわち VNC 状態の微生物が含まれていると考えられた。

塩を含む食品として、タイナ漬(原材料: たい菜、食塩)について生菌数の測定を試みたところ、液体培地希釈法でも寒天培地平板法でも共に 10^4 CFU/mL 程度という結果となった。

以上の結果から、本研究で構築した液体培地希釈法が、コロニー形成能の無い微生物の単離および生菌数測定に有効であることが示された。

液体培地希釈法による VNC 食品微生物の単離法に関する研究

助成研究者 藤井智幸 (新潟薬科大学応用生命科学部)

共同研究者 高木正道 (新潟薬科大学応用生命科学部)

1. 研究目的

食品はもともと生物であったものである。それが、肉になった瞬間、あるいは収穫された瞬間から品質の変化が始まる。食べ物の保蔵技術が限られていた時代、人類は身近な微生物の力を活用したり天然の化学物質を巧みに用いて腐敗のプロセスの進行を抑えることに成功した。塩の利用は、その代表とって良い。

近代微生物学では、自然界から個々の微生物をコロニーとして単離し、純粋培養することができて初めて、その微生物の研究が始まるという研究手法がとられてきた。つまり、微生物とは微生物学的手法で取り扱わなくてはならない生物のことであるということが出来る。しかしながら、このような実験手法で研究できる微生物は、自然環境に生育している微生物のたかだか数%であり、残りの大部分は認識されないまま残されているということが、近年認識されるようになってきた。例えば、自然環境中の細菌数を直接顕微鏡で数えた結果と寒天培地上で形成されるコロニー数とではオーダー単位の差が観察されることが知られている¹⁾。

このように、生きてはいても実験室内で固体培養されないという状態は、1985年生態学者の Colwell によって Viable but NonCulturable (VNC) 状態と名づけられた²⁾。現在では、コロニー形成しないために見落とされていた VNC 微生物が自然界に多数存在することが認識されるようになってきている。また、明らかなコロニー形成能が確認されている微生物種でも飢餓のようなストレス状態におくとコロニー形成能が一時的に低下するという現象も明らかにされている。

培養に依存しない微生物の計数法として、顕微鏡下で直接計数する方法がある。即ち、微生物細胞内の DNA やタンパク質と親和性のある蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡で観察する方法である。近年、分子生物学的手法の発達により、培養操作を行うことなく微生物相を解析することが可能になった。代表的な手法として DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法がある。微生物の 16SrRNA 遺伝子の特定領域を PCR (Polymerase Chain Reaction) で増幅した後、変性剤入りのゲルで電気泳動し 16SrRNA の塩基配列の違いを解析する方法である。DGGE 法は、未知の微生物群集の多様性を比較簡単に解析できるため複合微生物系などを対象にして広く用いられている。

食品衛生において食品中の微生物群を調べることは必須のことであり、食品の品質にかかわる微生物群の中にも VNC 微生物が存在していても不思議は無いが、十分な検討が始まっていない。食品に関わる微生物を対象とした場合、増殖能を有していることが実用上重要であり、増殖しなければ微生物の影響は限定的だからである。従って、迅速な微生物検出法が研究・開発されているが、生菌数測定においては平板培養によるコロニーカウント法が常用されているのが、現状である。

現在、VNC の概念は以下のように大きく二つに分けられる。

- (1) ストレス環境下での微生物の生存を調べると、生菌数とコロニー形成可能菌数との差が生じることが観測される。ストレスを受けると VNC 状態に移行することは微生物の生き残り戦略のひとつと考えられている³⁾。
- (2) 自然界で、固体培地上で検出されるコロニー数と顕微鏡下で計数される総菌数との差が 1,000 倍以上も開くことがしばしば観察される。さらに後者の微生物の多くが生命反応を維持していることが認められている。

初め Colwell は上記(1)を挙げて VNC を定義したが、現在では(2)も VNC であるとされている。食品微生物を VNC の概念から捉えると、生命反応を有しているかどうか、増殖能を有しているかどうか、固体培地上でコロニーを形成できるかどうか、の3点がポイントと思われるが、このような知見の蓄積は全くなされていない。このような背景を踏まえ、本研究では、コロニー形成能の無い微生物の存在を前提としたスクリーニング法を構築し、コロニー形成能を持たない微生物を単離、培養する手法を確立することを目的とした。

2. 研究方法

これまでの微生物学では、寒天培地上でのコロニー形成能が「微生物が活着している」ことの証拠と考えられてきた。しかし、固体培地上でコロニーを形成しない、あるいは顕微鏡サイズの小さいコロニーしか形成しない菌はこれまでに知られており、PCR 法を使うことによりこのような微生物が実在する直接的な証拠が得られるようになった。

PCR 法は、培養操作を経ずに環境中の微生物の種類について情報を得られるという点で画期的な方法であり、確かにこれによって環境における微生物の多様性がこれまで考えられていたよりはるかに大きいことが実証された意義は大きい。食品微生物学の観点からみると、生きていても増殖しなければその影響は小さなものと考えられるため、増殖能がなくても検出される PCR 法は適当な実験手法とはいえない。

従来行われてきた微生物の単離、検出方法は、サンプルに濾過などの前処理を施した後、適当に希釈し固体培地上に塗布することによって微生物を分離し、増殖してコロニーを形成することをもってその微生物の存在を検出するというものである。この従来法は、「増殖能を有した検出すべき微生物 = コロニーを形成できる微生物」という考えに基づいたもの

であるといえる。しかし、コロニー形成能が無くても生きている菌が存在するのであれば、VNC 状態の概念に即した微生物の単離、検出法が必要となってくる。そこで本研究では、従来法と比較して、

- (1) 液体培養での培養液の濁りから微生物の存在確認を行う
- (2) 濾過サンプルを限界希釈しマイクロプレートに分注した微小画分を利用して分離を行う。

という特殊な方法により微生物のスクリーニングを行うこととした。

2.1 液体培地希釈法による菌数測定

2.1.1 培地

本研究では、塩を用いた食品に含まれる微生物群への適用を目指しているので、海洋細菌の取り扱いを参考にして、微生物の培養については以下の 1/5 strength ZoBell 2216E 培地を用いて 20°C で行った。

| | |
|---|------------------------------|
| NaCl (WAKO) | 23.4 g |
| KCl (WAKO) | 0.8 g |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O (WAKO) | 4.0 g |
| CaCl ₂ (WAKO) | 1.2 g |
| KBr (WAKO) | 100 mg |
| SrCl ₂ · 6H ₂ O (WAKO) | 26 mg |
| H ₃ BO ₃ (WAKO) | 20 mg |
| Peptone (Difco) | 1.0 g |
| Yeast Extract (Difco) | 0.2 g |
| Water | to 1L (1N NaOH で pH 7.5 に調整) |

寒天培地として用いるときには、1.5%になるように Bacto agar (Difco) を加えた。

2.1.2 方法

- 1) 海水サンプルからゴミなどの不純物を除くために前処理として Nuclepore Polycarbonate Membrane (pore size 1.0 μm) を用いて濾過を行う。漬物サンプルの場合には、まず漬け液を 1.5 mL マイクロチューブ 2 本にとり、遠心してパルプ分を除く(菌体が沈降しないように遠心において 3,000 rpm に達したら直ちに止める)。上清を生理食塩水で 10 倍に希釈した後、海水サンプルと同様に濾過を行う。
- 2) 濾過したサンプルを、生理食塩水を用いて 100 ~ 100,000 倍に希釈した後、200 mL の液体培地に 200 μL 加えて 96 穴平底マイクロプレートに 1 ウェル当たり 100 μL ずつ、10 枚に分注する。
- 3) 20°C で 3 日間 200 rpm で振とう培養する (図 1)。
- 4) 目視によって濁りが認められたウェルの数をカウントする。

- 5) 希釈試料を1枚につき100 µL 寒天プレートにまき、20°Cで3日間培養し、生成したコロニー数をカウントする。

3. 研究結果および考察

3.1 液体培地希釈法によるスクリーニング系の構築

液体培地希釈法により得られる濁りの認められる培養液は、必ずしも一つの菌細胞から増殖した単一微生物培養液であるとは限らない。しかしながら、十分に希釈されていれば一つのウェルに一つの菌細胞が分配されると考え、本研究での生菌数測定にあたっては濁りの認められたウェルの数がウェル総数の1%程度になるように希釈し計測することとした。

試料中の生菌数を液体培地希釈法と寒天培地平板を用いたコロニーカウンティング法(従来法)とを用いて算出し、両者を比較した。モデル系として、海水([1]佐渡市多田沖3,663 m、深さ-332 mの位置から採水した海洋深層水(原水)、[2]UV処理した海洋深層水(原水)、[3]逆浸透膜によって濃縮した海洋深層水をUV処理したものおよび[4]新潟市浦浜にて採水した表面海水)を選定した。結果を表1に示す。海洋深層水(原水)においては、通常の一般細菌試験では微生物は検出されていないが、海洋細菌の分離のために一般に用いられているZoBell培地を用いると、 10^4 CFU/mL程度の微生物が検出された。液体培地希釈法においては白濁したウェルが認められ、その数から生菌数を推定したところ、寒天培地平板法によって得られた生菌数と同程度の値となった。海洋深層水にUV処理を施すとある程度の殺菌効果が期待されるが、確かに原水に比べて生菌数は2オーダー減少した。

また、海洋深層水では原水においても濃縮水においても、液体培地希釈法によって得られた生菌数は寒天培地平板法によって得られた値と同程度であった。このことから、海洋深層水では、VNC状態の微生物がいない可能性が示唆された。

一方、表面海水においては、寒天培地平板法によって得られた生菌数は 10^2 CFU/mLのオーダーであったのに対し、液体培地希釈法では約10倍高い値となった。このことから、本研究で構築した方法で寒天培地平板にコロニーを形成する微生物よりも数多くの微生物を液体培養可能であることが明らかとなった。また、液体培養される微生物群には、寒天培地平板上でコロニーを形成できないもの、すなわちVNC状態の微生物が含まれていると考えられた。

海洋深層水(原水)を4°Cの条件で保存し、その間の生菌数変化を液体培地希釈法と寒天培地平板法の両者で比較した結果を図2に示す。生菌数は保存期間が長くなるにつれて数十分の1にまで減少し、20日を過ぎるとほぼ一定の値となった。微生物を低温ストレスにさらすとVNC状態に移行する可能性があるが、海洋深層水(原水)の場合、液体培地希釈法により求められた生菌数は、長期保存の後であっても寒天培地平板法による値とほぼ

同じであった。VNC 状態の微生物を確認することはできなかったが、本研究で検討している液体培地希釈法が、コロニー形成能の無い微生物を単離したり生菌数を求めたりすることのできる手法であることが示された。

3.2 液体培地希釈法による漬物中の生菌数測定

塩を含む食品の代表として、タイナ漬(原材料: たい菜、食塩)およびキムチ(原材料: 白菜、唐辛子、塩辛、にんにく、生姜、食塩、調味料(アミノ酸))について生菌数の測定を試みた。結果を表2に示す。タイナ漬では、液体培地希釈法でも寒天培地平板法でも共に 10^4 CFU/mL 程度の生菌数という結果となった。一方、キムチ中の生菌数に関しては、寒天培地平板法ではタイナ漬と同様に 10^4 CFU/mL 程度の値が得られたのに対し、液体培地希釈法では白濁したウェルが認められなかった。

キムチについて液体培地の方で微生物が検出されなかったことから、キムチ中の微生物は固相で増殖するタイプであることが示唆された。副材料として用いられている数々のスパイス由来の抗菌成分の存在が、液相での増殖を抑制している可能性が考えられた。今後、液体培地希釈法により生菌数をカウントする手法を様々な食品に適用していく上で、サンプルによっては測定できない可能性が示された。

タイナ漬に関していずれの生菌数測定法においてもほぼ同じ値が得られたことは、海洋深層水の場合と同様であった。以上の結果から、本研究で検討した2つの方法を併用すれば、対象サンプル中の微生物が固相で増殖するタイプなのか、液相で増殖するタイプなのか、判別できる可能性が示唆された。

3.3 液体培地希釈法により得られた分画の解析

表面海水サンプル中に、VNC 状態の微生物が存在している可能性が示唆されたので、その分画を解析した。

16S rDNA をコードする遺伝子の塩基配列による微生物菌種の推定を試みた。白濁したウェルのうち1つを選び、そこからさらに小規模の液体培養を行った培養液を分析に供した。

PCR 産物について予備クローニングを行ったところ、液体培養液中には3種の微生物由来の遺伝子が見出されたため、それぞれ U-1 株、U-2 株、U-3 株として、塩基配列を解析した。塩基配列から得られたそれぞれの株の系統樹を図3および図4に示す。相同性検索と系統樹の結果から、U-1 株が *Delftia* sp.、U-2 株が *Variovorax* sp.、U-3 株が *Alcaligenes* sp. と推定された。

さらに、同じ培養液を 100 μ L 取り寒天培地上に塗り広げ、20°C で3日間培養したところ、2種類のコロニーが形成された(図5)。一つは黄色のコロニーであり、グラム陰性桿菌であった。もう一つのコロニーは乳白色であり、グラム陰性球菌(球桿菌)であった。これらの結果から、黄色コロニーが *Variovorax* sp.、乳白色コロニーが *Alcaligenes* sp. と推測された。

以上のように一つのウェル中の液体培養液から複数の微生物が単離されたことから、単理法として確立するためには希釈が不十分であることがわかった。本研究では、白濁が認められたウェルがウェル総数の1%程度となるような希釈を行ったが、さらに希釈倍率が上げられるように工夫して、一つのウェルに一つの菌細胞が分配されるようにすることが必要である。

実験方法に改善の余地があることが明らかとなった一方で、寒天培地平板上のコロニーとして2種の微生物が、遺伝子解析から3種の微生物が確認されたことから、コロニー形成能の無い微生物が1種類存在していることが示され、液体培地のみでVNC微生物を単離・培養することが可能であることが明らかとなった。

4. 今後の課題

16S rDNA 遺伝子の解析によって、本研究で構築した液体培地希釈法が、単離・培養が困難であったコロニーを形成しない微生物の単離および生菌数測定に有効であることが示された。しかしながら、限界も明らかとなった。

VNC 状態の観点から考えると、

- (1) 生命活動は維持しているけれども液体培地でも寒天培地でも増殖できないもの、
- (2) 液体培地で増殖することができるが寒天培地では増殖できないもの

を区別して考える必要がある。食品衛生あるいは食品微生物学の立場に立つと、(2)のケースが問題を引き起こす可能性がある。食品中で増殖しているにもかかわらず寒天培地上で検出できないという状況が起こり得るからである。本研究で検討した液体培地希釈法はまさに(2)のケースに対応するための手法である。食品中に、液体培地で増殖することができるが寒天培地では増殖できない微生物がどの程度存在しているのか、全く未知である。本研究によって、今まで見過ごされてきた微生物の存在を確認する方法が準備できたものと考えている。

本研究を遂行する上で様々な助言をいただいた東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻正木春彦教授に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Stanley, J. T. & A. Konopka. (1985) Rev. Microbiol. 39 321-346
- 2) Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A., & Palmer, L. M. (1985) Bio/Technol. 3 817-820
- 3) Roszak, D. B. & R. R. Colwell (1987) Microbiol. Rev. 51 365-379



Figure 1 Apparatus for the medium-dilution method.

Table 1 Estimation of count of the culturable in seawater samples.

| Sample | Medium | Agar plate |
|---|-------------------|-------------------|
| | [1/mL] | [CFU/mL] |
| [1] Deep seawater (untreatment) | 2.1×10^4 | 9.6×10^3 |
| [2] Deep seawater (UV treatment) | 2.9×10^2 | 1.6×10^2 |
| [3] Deep seawater concentrated (UV treatment) | 9.3×10^3 | 9.6×10^3 |
| [4] Seawater | 5.2×10^3 | 4.4×10^2 |

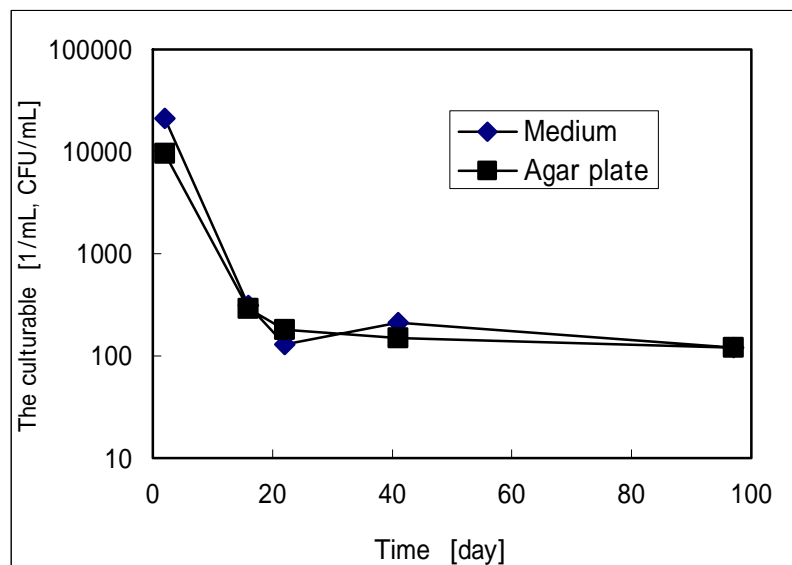


Figure 2 Time-course of the estimated count of the culturable in Sado deep seawater (untreatment).

Table 2 Estimation of count of the culturable in pickles samples.

| Sample | Medium | Agar plate |
|---------------|-------------------|-------------------|
| | 1/mL | CFU/ml |
| Taina pickles | 4.0×10^4 | 2.1×10^4 |
| Kimchi A | 0 | 9.3×10^3 |
| Kimchi B | 0 | 1.2×10^4 |

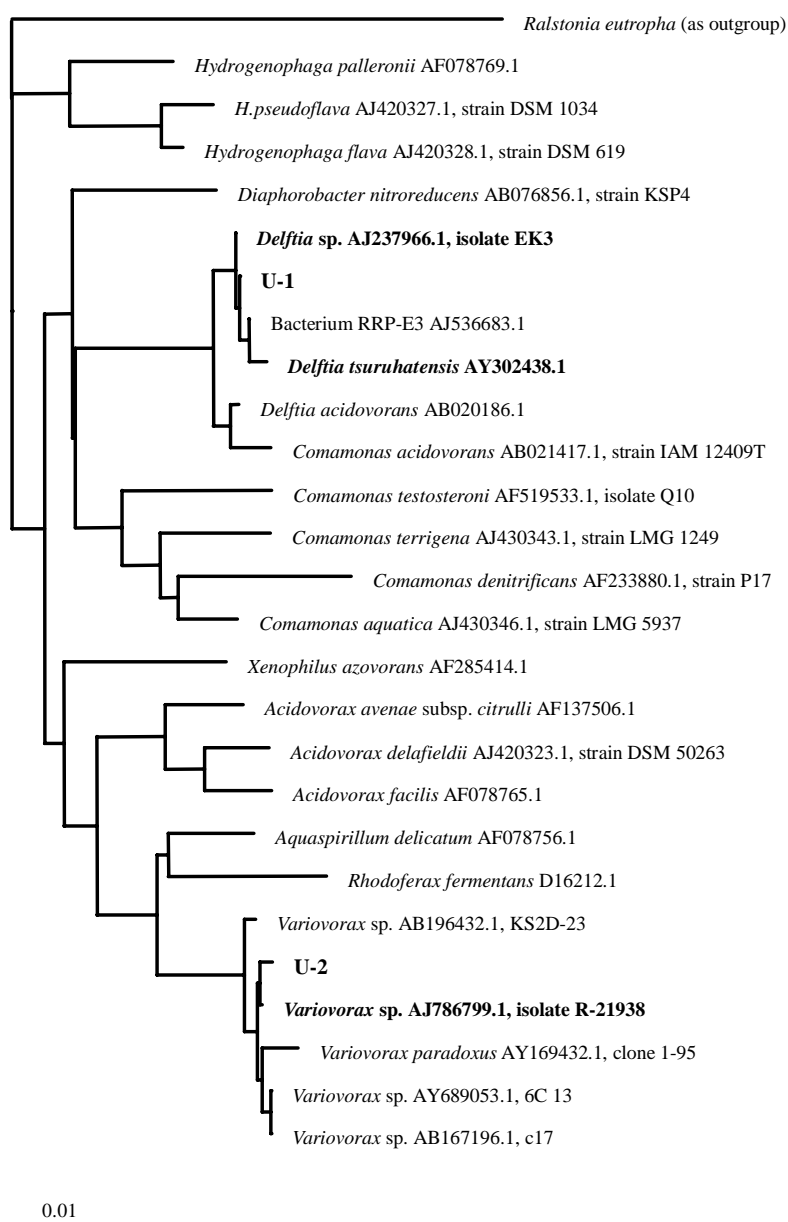


Figure 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain U-1 and U-2.

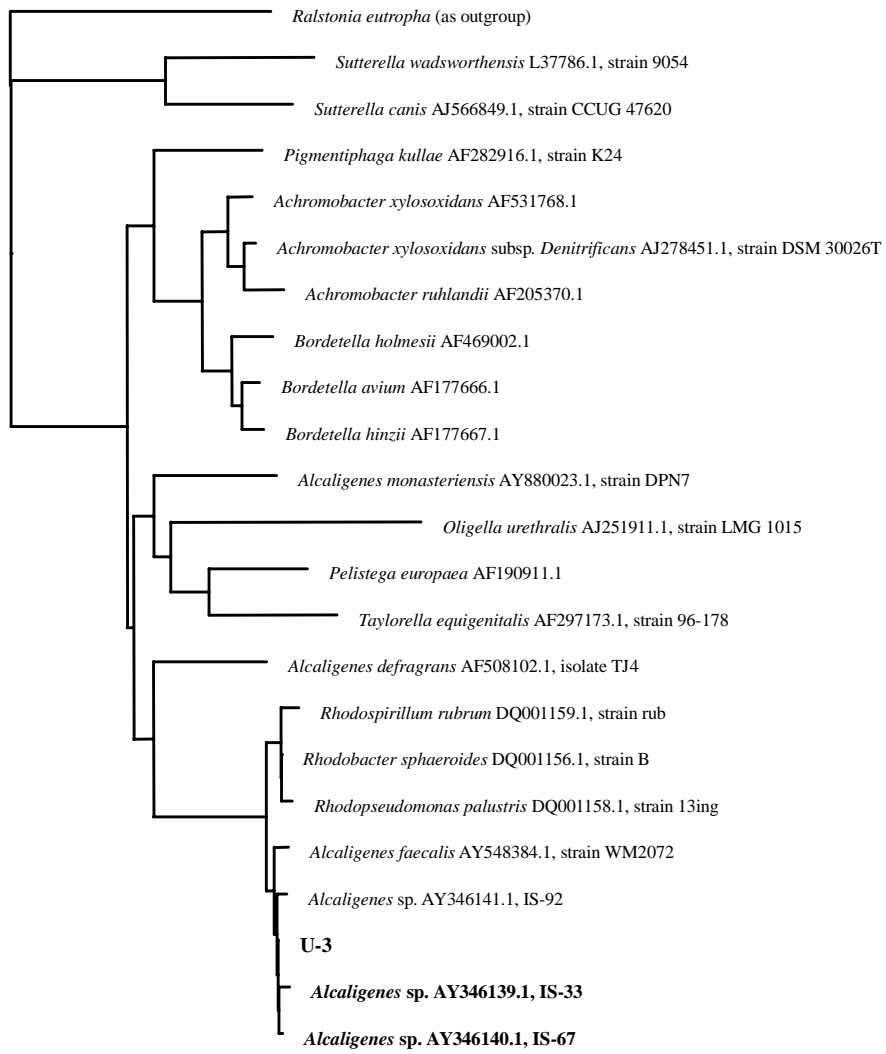


Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain U-3.

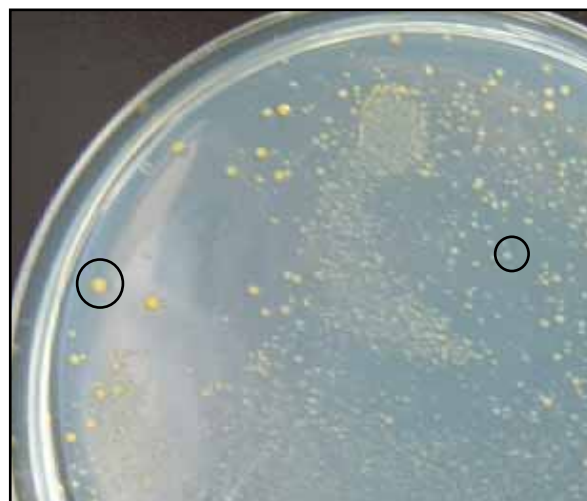


Figure 5 Image of colonies of bacteria in seawater.

Isolation of VNC bacteria by the medium-dilution method

Tomoyuki Fujii, and Masamichi Takagi

Faculty of Applied Life Sciences,

Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

The concept of 'viable but nonculturable (VNC)' has been developed for the two decades and recognized among many bacteria including environmental microb and human pathogens. Therefore, culture-independent techniques, such as fluorescence *n situ* hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), are required for the detection of bacteria in the environment and foods. In this study, for detection of VNC bacteria, we tried to establish the medium-dilution method, as follows;

- 1) The confirmation of the existence of the bacteria is carried out from the turbidity of the medium in the culture,
- 2) The isolation of the bacteria is carried out using the micro-fraction that the diluted sample is divided with a micro-plate.

The viable count in the sample was estimated both by the medium-dilution method and by colony-counting method. In a seawater sample, the viable count estimated by the medium-dilution method was 10 times as large as that of colony-counting method. Therefore, the seawater sample seemed to contain VNC bacteria. In Taina pickles sample, the viable counts estimated by both methods were almost equal.

From these results, the medium-dilution method was found to be useful for the isolation of VNC bacteria from the environment and foods.