

発表番号 46 (0548)

塩ストレス環境下での VNC 食品微生物の単離とその挙動

藤井 智幸 (新潟薬科大学応用生命科学部)

高木 正道 (新潟薬科大学応用生命科学部)

食品および原材料の微生物検査での生菌数の測定には、好氣的な条件下で生育する中温細菌(20~40℃)を対象として寒天平板培養法が用いられている。近年、生理活性を保持しているが何らかのストレスにより寒天培地上にコロニーを形成できない **Viable but NonCulturable (VNC)** 微生物が食品や環境中に多数存在するということが明らかになってきた。さらに、寒天平板培地では増殖できないが同じ組成の液体培地中では増殖が可能な **ILC (In-liquid culturable)** 状態の微生物の存在が認識されるようになってきている。そこで、ILC 微生物を標的とした **1/5 strength ZoBell 2216E** 培地を使用した液体培地希釈法によるスクリーニング系を構築し、水産物、塩を用いた加工食品、野菜の合計 56 種類の食品について、寒天培地平板法による菌数の計測と比較することで VNC 微生物の検出を試みた。また、併せて表面海水から VNC 微生物を単離し、増殖特性および VNC 状態に対する塩濃度の影響を解析した。

水産物、加工食品試料の ZoBell 寒天培地での生菌数は、一般生菌数測定用培地を用いた場合の 10 倍以上の値をとるものが多かったが、野菜試料では ZoBell 寒天培地での生菌数は一般生菌数測定用培地を用いた場合とほぼ同等の値を示した。この結果は、海水など塩濃度の高い試料中に生息する微生物と野菜中に生息する微生物の種類が大きく異なることを示唆している。塩濃度の高い試料中には、ZoBell 培地のような NaCl 濃度が高く栄養源に乏しい培地では増殖するが、一般生菌数測定用培地のように栄養源が豊富で NaCl 濃度が低い培地では増殖できない微生物が主に存在していると考えられる。液体培地希釈法と寒天培地平板法における生

菌数の比較では、大部分の試料についてほぼ同等の生菌数を示し、ZoBell 培地を用いる限りにおいて、今回分析した試料中には VNC 微生物の存在の可能性は示されなかった。

一方、表面海水試料においては、液体培地希釈法で寒天培地平板法と比較して、約 10 倍高い生菌数が検出された。このことから液体培養でのみ増殖を示す VNC 微生物の存在が示唆された。液体培養の限界希釈法により、計 10 の単離菌株を得た。寒天平板培地を用いて培養を行った結果、培養開始 7 日後でコロニー形成が見られた菌株はひとつであった。16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を解析し、系統分類を行ったところ、単離された全ての菌株において、近縁種は *Delftia tsuruhatensis* であり、相同性は 98~99%であった。本細菌種は表面海水に生息し、ZoBell 液体培地で増殖可能な細菌の中で最もポピュレーションの高い種の一つであることが示唆された。表面海水から単離した *D. tsuruhatensis* 近縁株のうち、VNC の表現型を示した 2 株、そして寒天培地でも増殖した 1 株の合計 3 株について、異なる NaCl 濃度での液体培養条件と寒天培地上での増殖能の相関関係を解析した。5 日間の液体培養後の菌体濃度は、3 株とも、塩濃度の濃い条件の方が O.D.値(660 nm での吸光度)が高くなる傾向を示したが、いずれの塩濃度条件でも O.D.値は 0.2 前後であった。しかし、ある菌株では ZoBell 培地の 2 倍の濃度で培養すると他の 2 株に比べ、コロニーの形成が悪かった。このことから、塩濃度が高い条件で液体培養した菌体は寒天平板培地でコロニーを形成しにくい可能性が示唆された。

助成番号 0548

塩ストレス環境下での VNC 食品微生物の単離とその挙動

藤井 智幸 (新潟薬科大学応用生命科学部)
高木 正道 (新潟薬科大学応用生命科学部)

1. 研究目的

食品製造において、衛生管理は最も重要な業務のひとつである。衛生管理の目的は、食品の特徴を十分に理解した上で、安全な食品を製造・提供しながら、食中毒などの事故を未然に防止することである。特に原材料の食中毒原因菌の検査が容易にできれば、トラブルを未然に回避でき、またその後の工程の衛生管理に役立つ。通常、食品および原材料の微生物検査で汚染指標として生菌数の測定には、好気的な条件下で生育する中温細菌(20~40°C)を対象として寒天平板培養法が用いられている^{1, 2)}。また、食中毒菌の分離・検出に一般的に用いられている培地も全て寒天培地である。

ところが、近年、生理活性を保持しているが何らかのストレスにより寒天培地上にコロニーを形成できない Viable but NonCulturable (VNC) 微生物³⁾が食品や環境中に多数存在するということが知られるようになってきた。腸管出血性大腸菌 O157:H7、レジオネラ菌、コレラ菌はいずれも、ヒトの体内から分離した場合は固体培地上で増殖するが、環境中に放出されると VNC 状態に移行することが明らかにされている⁴⁾。

VNC 微生物の部分集合として、寒天平板培地では増殖できないが同じ組成の液体培地中では増殖が可能な ILC(In-liquid culturable) 状態の微生物の存在が報告されている⁵⁾。食品衛生あるいは食品微生物学の立場に立つと、ILC 微生物は食品中で増殖しているにもかかわらず寒天培地上では検出できないことになり、大きな問題を引き起こす可能性が考えられる。そこで、ILC 微生物を標的とした液体培養によるスクリーニング系の構築が重要と考えた。

平成16年度にソルト・サイエンス研究財団助成研究として実施した「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」では、1/5 strength ZoBell 2216E 培地を使用した液体培地希釈法によるスクリーニング系を構築し、タイナ漬けおよびキムチに適用した⁶⁾。その結果、タイナ漬けでは液体培地希釈法でも寒天培地平板法でも1g 試料あたり 10^4 オーダーの菌数が計測された。また、キムチでは寒天培地平板法では1g 試料あたり 10^4 オーダーの菌数が計測されたが液体培地希釈法では菌

体の増殖が認められなかった。

一方、スクリーニング系構築のためのモデル試料として選択した新潟市浦浜海岸の表面海水からは、液体培地希釈法では1ml 試料あたり 5.2×10^3 の菌数が、寒天培地平板法では 4.4×10^2 の菌数が計測され、液体培地のみで増殖する VNC 微生物の存在が示唆された。液体培地希釈法で増殖が認められた培養液から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子領域を PCR 増幅し、増幅断片を大腸菌にクローン化し 5 クローンについて塩基配列に基づく系統解析を行ったところ、3 クローンが *Delfia* 属、1 クローンは *Variovorax* 属、1 クローンは *Alcaligenes* 属にそれぞれ分類された。

本年度は、液体培地希釈法によるスクリーニング系を合計 56 種類の食品に適用し、寒天培地平板法による菌数の計測と比較することで VNC 微生物の検出を試みた。また、浦浜海岸の表面海水から得られた VNC 微生物を単離し、増殖特性および VNC 状態に対する塩濃度および培養温度の影響を解析した。

2. 研究方法

2.1 食品・海水試料

2.1.1 食品試料

1) 水産物試料として、あさり、かき(4 試料)、サザエ(2 試料)、ハマグリ、しじみ、ホタテ、つぶ貝、冷凍サーモン、あじ、真あじ、鮭、かれい、冷凍えび、生えび、生ずわいがに(腸)、いか(腸)、たらこ、たら白子、筋子、めかぶ(6 試料)、海藻サラダ、塩太もずく、もずく、切りこんぶ(2 試料)、わかめの 25 種類(35 試料)を用いた。貝類の場合滅菌済みピンセットを用いて殻を開き、身を取り出し用いた。殻が開かない場合は、清潔な袋に貝を入れ叩いて殻を割った。魚類の場合、滅菌済みピンセットを用いて皮を剥ぎ取り、皮を用いた。生ずわいがにおよびいかは、腸を滅菌済みピンセットで取り出し用いた。冷凍サーモンおよび冷凍えびは、室温で解凍し用いた。

2) 加工食品試料として、キムチ、タイナ漬け、味噌、白菜漬、なす漬、いか白菜漬、梅干、たくあん、生ハム、味付豚ホルモン、たこわさび、スモークサーモン、塩数の子、あみ塩辛、塩漬イクラ、いくら醤油漬、えび塩辛、たこ塩

辛、いか塩辛、うにくらげ、いか刺し松前、小女子(しらす干し)、寒風干し鮭、ししゃも、塩鯖、しめ鯖の26種類(26試料)を用いた。

3)野菜試料としてきゅうり、なす、かぼちゃ、ごぼう、れんこん、かいわれ大根の6種類(6試料)を用いた。流水で10秒洗い、70%エタノールで殺菌した包丁を用いて表皮を薄く切り取り用いた。

2. 1. 2 海水試料

海水試料としては、滅菌した試料ビン(50 ml, Iwakiglass)で、水深30 cm程度の海底から採取した表面海水を用いた。新潟市浦浜(2004年12月21日、2005年12月21日および2006年1月11日採水)、新潟市角田浜(2005年3月13日、5月15日および12月21日)および新潟市関屋浜(2005年9月19日採水)の3箇所から合計7試料の表面海水を採水した。

2. 2 培地

2. 2. 1 1/5 strength ZoBell 2216E 培地

液体培地希釈法および寒天培地平板法による微生物の培養は1/5 strength ZoBell 2216E 培地(Table 1)を用いて行った。(以下 ZoBell 培地と呼ぶ。)なお、寒天培地として用いるときには、1.5%となるように寒天粉末(Wako)を加えた。

2. 2. 2 一般生菌数測定用培地

常法により計測される「一般生菌数」を解析するために、コンパクトドライ「ニッスイ」一般生菌数測定用培地(TC)を使用した。これは、標準寒天培地(1 L 当たり: Peptone, 5.0 g; Yeast Extract, 2.5 g; Glucose, 1.0 g; Agar, 15 g)の栄養素をベースとした培地である。酸化還元指示薬である2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC)が含まれ、乾燥したシート状になっている。試料液を1 ml 接種し、静置培養後赤色のコロニー数から一般生菌数を計測した。

2. 3 液体培地希釈法による菌数測定

1)食品等固体試料は、クリーンベンチ内で無菌的に包装を開き、ストマッカーバック(Bag Page 網付, Interscience 社)に10 g 量り取ったものを入れ、生理食塩水を9倍量(90 ml)加えた。次にストマッカー(Bag Mixer 400, Interscience)を用い均質化した。ゴミや原生生物を取り除くため、フィルター(Nuclepore Polycarbonate Membrane pore size 1.0 μm 直径 47 mm, Whatman)濾過したものを原液試料とした。一方、海水等液体試料は、試料ビンに入っているものは均一にするために30回振ってから、10 ml マクロピペットを用いて採取し、固体試料と同様にろ過を行った。

2)原液試料を生理食塩水を用いて $10^2 \sim 10^5$ 倍まで10

倍ずつ段階希釈した後、200 ml の液体培地に200 μl 入れて96 穴平底マイクロプレート(96 Well Cell Culture Cluater Flat Bottom with Lid Tissue Culture Treated Non-Pyrogenic Polystyrene, Corning)に1 ウェルにつき100 μl ずつ10 枚に分注した。

3)20°C、振とう速度200 rpm で3日間振とう培養した。培養後の96 穴平底マイクロプレートについて、目視により濁りが認められたウェル数を計数することにより生菌数を求めた。

4)希釈試料を寒天平板プレート1枚につき100 μl 塗布した。同様にコンパクトドライ「ニッスイ」一般生菌数測定用培地(TC)に希釈段階ごとに1 ml 塗布した。20°Cで3日間培養しコロニー数を計測した。

2. 4 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の決定と系統解析

培養液中に生息する細菌の系統分類を行うために、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。培養液からのDNAの抽出、16S rRNA 遺伝子領域のPCR増幅および増幅断片の塩基配列の決定は島津ジェノミクリサーチ室に依頼した。

得られた塩基配列の大きな系統分類にはRibosomal Database Project II (RDP-II)のRDP classifier プログラムを用いた。近縁種の探索には、NCBIのBLAST-Nプログラムを用いた。得られた塩基配列と近縁種の16S rRNA 遺伝子配列のアライメントをCLUSTAL-X プログラム ver. 1.8 を用いて作製した後[31]、MEGA プログラム ver. 3.1 により分子系統樹を作製した。系統樹は木村の2-パラメーターモデルを用いた近隣結合法により作成した。サンプル回数500回のブーストラップ解析により系統樹のトポロジーの確からしさを検証した。

3. 実験結果および考察

3. 1 液体培地希釈法による食品試料中の生菌数測定

平成16年度の研究結果から、表面海水試料中に、液体培地では増殖できるが寒天培地では増殖できないVNC 微生物が存在することが示唆されたため、表層付近の海で採取された食品試料においても同様にVNC 微生物が存在する可能性があると考えた⁶⁾。そこで、25種類(35試料)の水産物試料について、液体培地希釈法を用いて生菌数の計測を行った。また、寒天培地平板法および一般生菌数測定用培地での生菌数も計測し、比較を行った。

その結果、計測したほぼ全ての試料について、一般生菌数測定用培地よりもZoBell 寒天培地での生菌数が大きかった(Table 2)。このことから、水産物試料中には、一

一般生菌数測定用培地では増殖できないが、ZoBell 寒天培地では増殖可能な微生物が多く存在していることが示された。

ZoBell 培地を用いた液体培地希釈法と寒天培地平板法による生菌数を比較したところ、ほとんどの水産物において、液体培地希釈法と寒天培地平板法による生菌数はほぼ同等の値を示した。液体培地希釈法での生菌数が寒天培地平板法よりも大きい値を示した試料はめかぶ①および切りこんぶ①のみであった。どちらの試料においても、液体培地希釈法で得られた生菌数が寒天培地平板法で得られた生菌数の約 10 倍高い値を示し、VNC 微生物の存在が強く示唆された。しかし、同じ種類の食材を再度購入し何度か追試したところ、同様の差は観られず、再現性が確認できなかった。製品の採取時期による環境温度、製造工場や輸送時の温度、殺菌作業等による加工状況の変化において VNC 微生物の存在が左右される可能性が考えられた。

次に、塩を用いた加工食品を試料について、液体培地希釈法を用いた生菌数の計測を行い、寒天培地平板法での生菌数との比較を行った。3 種類の培養方法で微生物が検出できなかった梅干、たくあん、生ハム、味付豚ホルモン、うにくらげ、いか刺し松前、小女子(しらす干し)、ししゃもおよびしめ鯖を除くと、全ての試料について一般生菌数測定用培地よりも ZoBell 寒天培地での生菌数の方が大きくなった (Table 3)。このことから、塩を用いた加工食品試料中には、一般生菌数測定用培地では増殖できないが、ZoBell 寒天培地では増殖可能な微生物が多く存在していることが示された。塩を用いた加工食品中には高塩濃度を好む微生物が多く存在しており、一般生菌測定用培地よりも塩濃度の高い ZoBell 培地に適応しやすいものが多かったものと考えられた。

液体培地希釈法と寒天培地平板法における生菌数の比較では、大部分の試料についてほぼ同等の生菌数を示した。キムチおよびいか白菜漬において、寒天平板法での生菌数はそれぞれ 7.8×10^3 、 9.6×10^4 cfu/g であり高い生菌数だったのに対し、液体培地希釈法での生菌数は、検出限界 (10^2 cells/g) 以下であった。これはキムチやいか白菜漬に含まれる何らかの成分が液体培地中で微生物の増殖を抑制しているためと考えられた。以上の結果から、ZoBell 培地を用いる限りにおいて、今回分析した加工食品中には VNC 微生物の存在の可能性は示されなかった。

最後に、6 種類の野菜試料について、液体培地希釈法を用いた生菌数の計測を行い、寒天培地平板法での生菌数との比較を行った。かいわれ大根では、一般生菌

数測定用培地よりも ZoBell 寒天培地での生菌数の方が約 10 倍大きかった (Table 4)。しかし、それ以外の 5 種類の野菜試料では、一般生菌数測定用培地よりも ZoBell 寒天培地での生菌数はほぼ同等の値を示した。また、ZoBell 培地を用いた液体培地希釈法および寒天培地平板法での生菌数についても、かぼちゃ試料以外はほぼ同等の値を示した。以上の結果から、ZoBell 培地を用いる限りにおいて、今回分析した野菜試料中にも VNC 微生物の存在の可能性は示されなかった。

水産物、加工食品試料の ZoBell 寒天培地での生菌数は、一般生菌数測定用培地を用いた場合の 10 倍以上の値をとるものが多かったが、野菜試料では ZoBell 寒天培地での生菌数は一般生菌数測定用培地を用いた場合とほぼ同等の値を示した。この結果は、海水など塩濃度の高い試料中に生息する微生物と野菜中に生息する微生物の種類が大きく異なることを示唆している。塩濃度の高い試料中には、ZoBell 培地のような NaCl 濃度が高く栄養源に乏しい培地では増殖するが、一般生菌数測定用培地のように栄養源が豊富で NaCl 濃度が低い培地では増殖できない微生物が主に存在していると考えられた。一方、野菜のように塩分の低い試料中には ZoBell 培地でも一般生菌数測定用培地でも同様に増殖可能な微生物が主に存在しているものと考えられた。試料中の微生物の種類により、適切な培地を用いないと存在するが生菌数としてカウントできないということが示され、現在の生菌数測定法の孕む大きな問題点が本研究においても確認できた。

3.2 液体培地希釈法による表面海水中の生菌数測定

表面海水に存在する微生物以外の人為的要因を避けるために、生活排水や河川水の流れ込み等の影響が少ない場所を選び表面海水の採取を行った。2004 年 12 月 21 日に新潟市浦浜海水浴場にて採取した表面海水①で、液体培地希釈法より得られた生菌数は 5.2×10^3 cells/ml だったのに対し、寒天平板培地法より計数された値は 4.4×10^2 cfu/ml となり、約 1/10 の値となった。このことから、表面海水①において寒天培地平板では増殖しないが液体培地では増殖する VNC 微生物の存在が示唆された。1年後の 2005 年 12 月 21 日に同所で採取した表面海水⑤においても同様の実験を行った。その結果、液体培地希釈法により得られた生菌数は 1.3×10^4 cells/ml だったのに対し、寒天培地平板法では 1.7×10^3 cfu/ml であり約 1/10 の値となり、再現性が確認できた。

2005 年 5 月 15 日に新潟市角田浜海水浴場にて採取した表面海水③では、液体培地希釈法より得られた生菌数は 2.9×10^3 cells/ml、寒天平板培地法では 7.6×10^2

cfu/mlとなり、液体培地希釈法が約4倍高い値となった。2005年9月19日に新潟市関屋浜海水浴場にて採取した表面海水④では、液体培地希釈法より得られた生菌数は 1.1×10^6 cells/ml、寒天平板培地法では 1.6×10^6 cfu/mlとほぼ差がなかった。この表面海水④にて、生菌数が 10^6 cfu/mlと高かったのは、この関屋浜が信濃川の水が流れ込む港の近くであることや住宅街が多くあることから、生活排水等により富栄養化したために菌数が高くなったと考えられた。このことから、採取季節や場所によりVNC微生物の数に違いがあることが示唆された。

今回使用した一般生菌数測定用培地より得られた表面海水の生菌数は、ZoBell培地より得られた生菌数の約0.06~0.4%であり、淡水では約84%であった。このことから、海洋微生物学にて一般的に用いられているZoBell培地は、表面海水の生菌数測定に適している培地であることが示された。

3.3 液体培地希釈法により得られた分画からの微生物の単離と系統分類

表面海水試料⑦において、液体培地希釈法で寒天培地平板法に対し、約10倍高い生菌数が検出された。このことから同試料について液体培養でのみ増殖を示すVNC微生物の存在が示唆されたので、液体培地希釈法により得られた分画中の微生物を単離し、系統分類を行った。960ウェル中33ウェルの増殖画分が得られたので、この33ウェルから液体培養の限界希釈法によりNo. 5、8、10、14、17、21、22、28、32、33、計10の単離菌株を得た。寒天平板培地を用いて培養を行った結果、培養開始7日後でNo. 5番のみコロニー形成が認められた。さらに、6日後観察したところ、No. 5以外の全ての単離菌株においても微小コロニーの形成が認められた。これらの10菌株は液体培養では3日間で増殖が認められたことから、少なくともNo. 5以外の株は寒天培地上で極めて増殖しにくいVNC微生物である可能性が示唆された。

単離された10菌株の16S rRNA遺伝子の部分塩基配列を解析し、系統分類を行った(Fig. 1)。その結果、全ての菌株において、近縁種は*Delftia tsuruhatensis*であり、相同性は98~99%であった。平成16年度の結果においても、浦浜の表面海水から*D. tsuruhatensis*を最近縁とする最近が検出されている⁹⁾ので、本細菌種は浦浜の表面海水に生息し、ZoBell液体培地で増殖可能な細菌の中で最もポピュレーションの高い種の一つであることが示唆された。*D. tsuruhatensis*はテレフタル酸(ポリエチレンテレフタレート(PET)の原料)分解微生物として活性汚泥から低栄養培地を用いて単離、報告された細菌である⁷⁾。細胞形態はわずかに曲がった桿菌であり、グラム陰性で

運動性を示す。生育可能温度は10~40℃、生育可能pHは5.0~9.0である。本研究での培養条件は、人工海水ベースの培地を用いており低栄養培地と言え、pH 7.5、培養温度は20℃に設定していることから報告されている*D. tsuruhatensis*の生育可能環境と一致している。この他の報告例にサルガッソー海(西インド諸島北東方の大西洋の海域)中、水田土壌や河川の堆積物中および淡水表面中に*Delftia*属細菌が存在することが報告されている。しかし、海水中の*Delftia*属細菌の報告例は少なく、またVNC状態になるという報告はまだない。

以上の結果から、浦浜の表面海水中には*D. tsuruhatensis*に近縁な細菌が多数生息することが明らかとなった。*D. tsuruhatensis*に近縁な細菌のうち、10個の単離株のうち、9株はZoBell寒天平板培地上でほとんど増殖せずVNC状態であったのに対し、1株は寒天平板培地でも増殖できることが示された。

3.4 単離微生物の増殖に及ぼす塩濃度および培養温度の影響

浦浜の表面海水から単離した*D. tsuruhatensis*近縁株のうち、VNCの表現型をしめしたNo. 8およびNo. 21、そして寒天培地でも良好に増殖を示したNo. 5の合計3株について、異なるNaCl濃度での液体培養条件と寒天培地上での増殖能の相関関係を解析した。ZoBell培地上で20℃、3日間の前培養液を用い、NaCl濃度23.4 g/l (ZoBell培地の濃度)、35.1 g/l (ZoBell培地の1.5倍の濃度)、そして46.8 g/l (ZoBell培地の2倍の濃度)の3条件で20℃の液体培養(本培養)を行い、培養5日後の培養液を1白金耳とりZoBell寒天平板培地に塗布して20℃で3日間静置培養し、増殖能を観察した(Table 5)。5日間の液体培養後の菌体濃度を660 nmの吸光度で解析したところ、3株とも、塩濃度の濃い条件の方がO. D.値が高くなる傾向を示したが、いずれの塩濃度条件でもO. D.値は0.2程度であった。しかし、No. 21株をZoBell培地の2倍の濃度で培養したものは他の2株に比べ、コロニーの形成が悪かった。このことから、少なくともNo. 21株については、塩濃度が高い条件で液体培養した菌体は寒天平板培地でコロニーを形成しにくい可能性が示唆された。

次に、No. 5、8、21の3株について、異なる温度での液体培養条件と寒天培地上での増殖能の相関関係を解析した。ZoBell培地上で20℃、3日間の前培養液を用い、ZoBell培地で、20℃、10℃、4℃の3条件で液体培養(本培養)を行い、培養5日後の培養液を1白金耳とりZoBell寒天平板培地に塗布して20℃で3日間静置培養し、増殖能を観察した。5日間の液体培養後の菌体濃度

を660 nmの吸光度で解析したところ、いずれの株においても温度の低い条件になるほどO. D.値が低くなる傾向を示した。4°Cで液体培養した培養液は3株ともO. D.値が0.05以下の低い値をとり、ほとんど増殖していないことが示唆された。これらの培養液を寒天平板培地に塗布し3日間静置培養した結果、No. 5についてはコロニーを形成したが、No. 8についてはコロニーの形成が悪かった。さらにNo. 21についてはコロニーを形成しなかった。No. 8およびNo. 21については、低温での培養により寒天平板培地でコロニーを形成しにくくなっている可能性が示唆された。しかし、これらの2株は液体培養でも増殖がほとんどみられなかったことから、寒天平板での培養開始時点で菌体がほとんどいなかった可能性も考えられる。今後、培養条件と寒天平板培地上での増殖能の相関関係をさらに詳細に検討していく予定である。

4. 今後の課題

本研究では液体培地希釈法によるスクリーニング系を合計56種類の食品に適用し、寒天培地平板法による菌数の計測と比較することでVNC微生物の検出を試みた。その結果、現時点ではVNC微生物の存在が強く示唆される食品は認められなかった。しかし、使用する培地によりカウントされる生菌数に10倍以上の違いがある食品試料があることが分かった。今後、使用する培地の検討も含めて、液体培地希釈法によるスクリーニング系の最適化を行い、食品試料中のVNC微生物の探索を進めていく予定である。

また、表面海水から液体培地希釈法により①液体培地でも寒天平板培地でも増殖する株および②液体培地では増殖するが、寒天平板培地では増殖しにくい微生物株を単離することに成功した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統分類の結果、いずれの単離株も

Delftia tsuruhatensis に最近縁であった。これらの単離株については、さらに詳細にVNC状態を決定する要因の解析を進めていく予定である。

文献

- 1) 厚生労働省監修(2004)「食品衛生検査指針:微生物編」日本食品衛生協会, 東京.
- 2) 三瀬勝利, 井上富士男(1999)「食品中の微生物検査法解説書」講談社, 52-123.
- 3) Colwell, R. R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A., Palmer, L. M. (1985) Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology*, 3, 817-820.
- 4) 小暮一啓(1997)「病原性細菌の viable but nonculturable (VBNC) state について」*Microbes and Environ.*, 12, 135-145.
- 5) 正木春彦(2003)「海洋性難培養細菌のコロニー形成能とその単離培養法」日本農芸化学会関東支部 2003年度第1回例会シンポジウム「海洋微生物研究の新展開」講演要旨集 (<http://jsbba.bt.a.u-tokyo.ac.jp/03reikai1/masaki.pdf>).
- 6) 藤井智幸, 高木正道(2006)「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」平成16年度研究助成報告書集(II 医学・食品科学編) pp. 177-186, 財団法人ソルト・サイエンス研究財団, 東京.
- 7) Shigematsu, T., Yumihara, K., Ueda, Y., Numaguchi, M., Morimura, S. and Kida, K. (2003) *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1479-1483.

Table 1 Composition of 1/5 strength ZoBell 2216E medium

NaCl (Wako)	23.4 g
KCl (Wako)	0.8 g
MgSO ₄ ·7H 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 (Bacto Peptone, Difco)	1.0 g
Yeast Extract (Bacto Yeast Extract, Difco)	0.2 g
Water	to 1 L (pH was adjusted to 7.5 by 1N NaOH)

Table 2 Comparison of cell counts in marine products using the three cultivation assays

Sample	Liquid cultivation (cells/g)	Agar-plate cultivation (cfu/g)	Cultivation using Nissui TC medium (cfu/g)
Short-necked clam (Asari)	8.0×10 ⁶	1.3×10 ⁷	5.1×10 ⁵
Oyster ①	7.7×10 ⁵	7.2×10 ⁵	1.7×10 ⁴
Oyster ②	9.1×10 ⁴	2.9×10 ⁴	8.3×10 ³
Oyster ③	2.1×10 ⁵	1.7×10 ⁵	1.7×10 ⁴
Oyster ④	1.5×10 ⁵	1.7×10 ⁵	1.1×10 ⁴
Top shell (Sazae) ①	<10 ²	2.0×10 ³	1.0×10 ²
Top shell (Sazae) ②	1.3×10 ³	2.8×10 ³	2.9×10 ²
Shigure clam (Hamaguri)	2.0×10 ⁷	3.4×10 ⁷	2.8×10 ⁶
Freshwater clam (Shijimi)	9.0×10 ⁵	1.1×10 ⁶	1.2×10 ⁵
Common scallop (Hotate-gai)	5.3×10 ⁵	4.3×10 ⁵	4.0×10 ³
Tsubu-gai	2.1×10 ⁶	2.8×10 ⁶	8.5×10 ⁴
Frozen salmon	1.0×10 ²	2.0×10 ²	NT
Aji fish	7.1×10 ³	5.2×10 ³	1.5×10 ³
Ma-aji fish	4.2×10 ⁵	4.2×10 ⁵	2.9×10 ⁴
Salmon	1.8×10 ⁶	2.4×10 ⁶	9.6×10 ⁴
Karei fish	3.2×10 ⁵	3.3×10 ⁵	7.5×10 ³
Frozen shrimp	1.6×10 ⁴	1.5×10 ⁴	8.5×10 ²
Raw shrimp	1.3×10 ⁵	1.6×10 ⁵	1.2×10 ⁴
Raw zuwai crab	2.5×10 ⁵	3.2×10 ⁵	2.6×10 ³
Gut of cuttlefish	1.4×10 ⁴	2.0×10 ⁴	8.0×10 ²
Tarako	1.3×10 ⁶	3.8×10 ⁶	3.0×10 ⁶
Tara shirako	3.5×10 ⁴	5.8×10 ⁴	2.1×10 ⁴
Sujiko	1.7×10 ⁴	2.3×10 ⁴	6.5×10 ²
Mekabu ①	1.1×10 ³	1.3×10 ²	2.8×10 ²
Mekabu ②	2.1×10 ⁵	3.9×10 ⁵	1.6×10 ⁴
Mekabu ③	1.4×10 ⁴	1.3×10 ⁴	8.1×10 ²
Mekabu ④	3.0×10 ⁴	2.9×10 ⁵	1.0×10 ⁵
Mekabu ⑤	6.3×10 ³	5.4×10 ³	9.2×10 ²
Mekabu ⑥	<10 ²	1.0×10 ²	<10 ¹
Seaweed salad	3.1×10 ³	5.9×10 ³	7.5×10 ²
Shio-huto mozuku	<10 ²	<10 ²	<10 ¹
Mozuku	<10 ²	5.0×10 ²	<10 ¹
Kiri-kombu ①	4.1×10 ³	2.5×10 ²	2.0×10 ¹
Kiri-kombu ②	<10 ²	2.0×10 ²	1.0×10 ¹
Wakame seaweed	3.3×10 ³	2.3×10 ³	1.5×10 ³

NT: Not Tested

Table 3 Comparison of cell counts in salt-processed foods using the three cultivation assays

Sample	Liquid cultivation (cells/g)	Agar-plate cultivation (cfu/g)	Cultivation using Nissui TC medium (cfu/g)
Kimuchi	$<10^2$	7.8×10^3	NT
Taina pickles	3.1×10^4	2.7×10^4	NT
Miso	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Hakusai pickles	4.6×10^4	1.5×10^5	1.9×10^4
Nasu pickles	$<10^2$	$<10^2$	1.0×10^1
Ika-Hakusai pickles	$<10^2$	9.6×10^4	5.7×10^4
Pickled plum	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Yellow pickled radish	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Raw ham	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Cooked pig hormone	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Tako-wasabi	$<10^2$	2.0×10^2	4.0×10^1
Smoked salmon	$<10^2$	1.0×10^2	4.0×10^1
Salted kazunoko	8.3×10^2	3.5×10^2	1.0×10^1
Ami shiokara	$<10^2$	1.0×10^2	2.0×10^1
Salted ikura	4.3×10^4	4.4×10^4	2.0×10^4
Soy sauced ikura	$<10^2$	1.0×10^2	$<10^1$
Shiokara of shrimp	$<10^2$	1.0×10^2	2.0×10^1
Shiokara of octopus	$<10^2$	5.3×10^2	3.0×10^2
Shiokara of cuttlefish	1.0×10^2	3.0×10^2	3.0×10^1
Uni-kurage	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Raw cuttlefish (Matsumae)	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Shirasu-hoshi (Shokojo)	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Kampu-hoshi salmon	1.0×10^2	2.5×10^2	3.0×10^1
Shishamo	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$
Salted mackerel (shio-saba)	$<10^2$	1.0×10^2	2.0×10^1
Vinegared mackerel (shime-saba)	$<10^2$	$<10^2$	$<10^1$

NT: Not Tested

Table 4 Comparison of cell counts in vegetables using the three cultivation assays

Sample	Liquid cultivation (cells/g)	Agar-plate cultivation (cfu/g)	Cultivation using Nissui TC medium (cfu/g)
Cucumber	1.6×10^4	2.2×10^4	5.6×10^4
Eggplant	1.7×10^5	3.0×10^5	1.2×10^5
Pumpkin	4.2×10^3	2.3×10^4	5.5×10^2
Burdock (gobou)	4.2×10^5	2.9×10^5	3.3×10^5
Lotus root	5.4×10^4	5.3×10^4	4.6×10^4
Radish sprouts (kaiware-daikon)	2.7×10^7	5.3×10^7	3.5×10^6

Table 5 Comparison of cell counts in sea water samples using the three cultivation assays

Sample (sampling site, date)	Liquid cultivation (cells/ml)	Agar-plate cultivation (cfu/ml)	Cultivation using Nissui TC medium (cfu/ml)
Surface seawater ① (Urahama, 21 Dec.04)	5.2×10^3	4.4×10^2	NT
Surface seawater ② (Kakutahama, 13 Mar. 05)	1.2×10^4	3.2×10^3	3.1×10^2
Surface seawater ③ (Kakutahama, 15 May 05)	2.9×10^3	7.6×10^2	6.0×10^0
Surface seawater ④ (Sekiyahama, 19 Sep. 05)	1.1×10^6	1.6×10^6	6.8×10^3
Surface seawater ⑤ (Urahama, 21 Dec. 05)	1.3×10^4	1.7×10^3	1.7×10^1
Surface seawater ⑥ (Urahama, 21 Dec 05)	5.0×10^4	3.4×10^3	2.0×10^1
Surface seawater ⑦ (Urahama, 11 Jan. 06)	3.2×10^4	2.7×10^3	2.0×10^1

NT: Not Tested

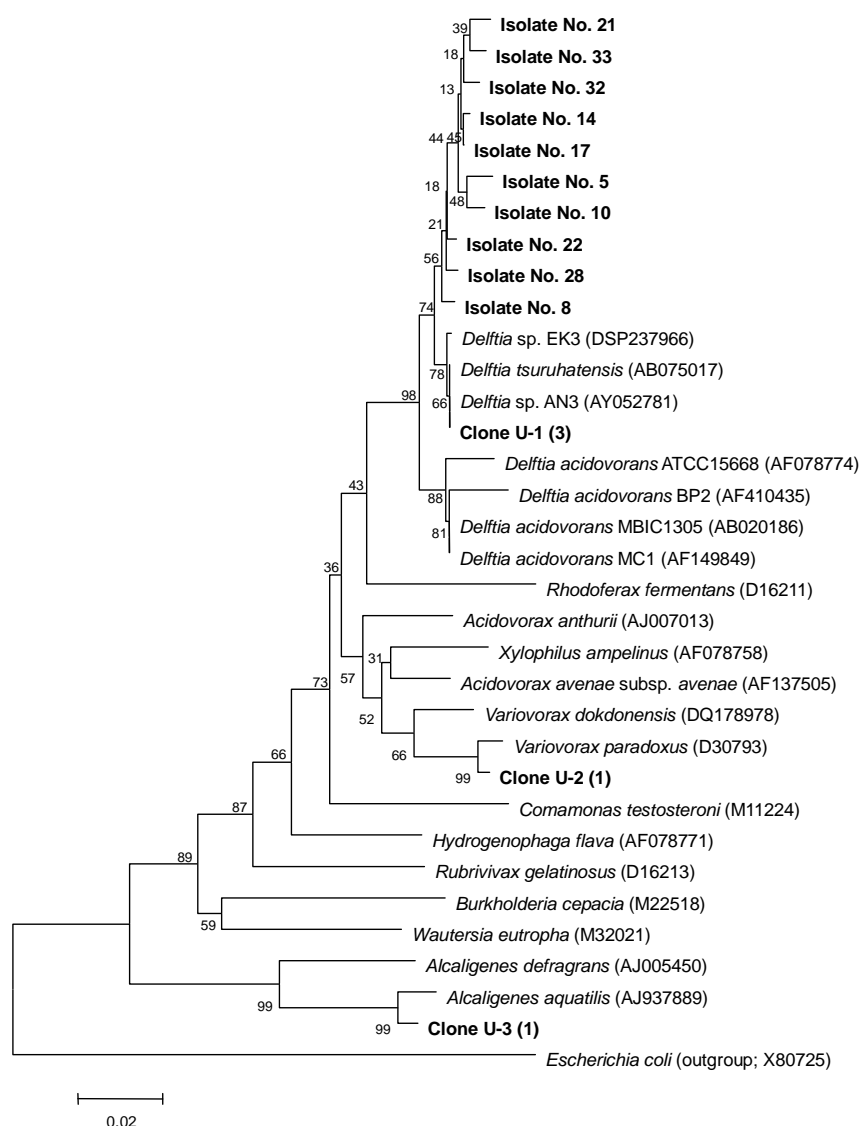


Fig. 1 Phylogenetic relationship of the ten isolates obtained by the liquid medium dilution method (Isolate No. 5~33) within the class *Betaproteobacteria*.

The tree was constructed by neighbor-joining method with partial 16S rRNA gene sequences. The Bootstrap values were shown at brance nodes. The bar represents 2 substitution in 100 nucleotides. Clones U-1, U-2 and U-3, obtained by our previous work⁶⁾, were shown with the number of clones in parentheses.

0548

Isolation and characterization of VNC bacteria from food samples under high salt conditions

Tomoyuki Fujii, and Masamichi Takagi

Faculty of Applied Life Sciences,
Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

Summary

Significant populations of viable but nonculturable (VNC) bacteria have reportedly existed in a number of natural environments, as well as foods. On the aspect of sanitary control in food industry, urgent attention should be paid on the fraction of VNC bacteria, which can grow under certain environmental conditions. We have previously constructed the medium-dilution method for enumeration and isolation of the in-liquid culturable (ILC) fraction of VNC bacteria using micro-plates. In the present study, we applied this method on a number of food samples as well as seawater samples to enumerate the population of ILC bacteria. By comparison with the estimated number by conventional colony-counting methods, we attempted to estimate the population of the ILC fraction of VNC bacteria in the food and seawater samples.

Thirty-five marine products, 26 salt-processed foods, 6 vegetables and 7 seawater samples were chosen for the samples. In most marine products, salt-processed foods and seawater samples, the cell numbers estimated by agar-plate cultivation using 1/5 strength ZoBell 2216E medium were approximately ten fold larger than those estimated by cultivation using Nissui TC medium. In contrast, approximately same cell numbers were estimated in vegetable samples by these two cultivation assay. These results suggest that ZoBell medium, designated for marine bacteria, was suitable for cultivation of bacteria predominant in marine products, salt-processed foods and seawater samples. The estimated cell numbers in liquid cultivation by medium-dilution method were almost same value with the cell numbers estimated by agar-plate cultivation in most food samples. In surface sea water samples, however, the cell numbers estimated by the medium-dilution method were approximately ten fold larger than those estimated by agar-plate cultivation. This result indicated that significant number of the ILC fraction of VNC bacteria in the sea water samples could be detected and cultivated using the medium-dilution method with ZoBell medium.

Total 10 bacterial isolates were obtained from a surface sea water sample by the medium-dilution method. One isolate, No. 5, showed growth ability in liquid medium, as well as agar plate. However, the other 9 isolates showed poor growth ability on agar plate, although they showed growth ability in liquid medium. These results suggested that these 9 isolates were ILC fraction of VNC bacteria. Phylogenetic analysis based on partial nucleotide sequence of 16S rRNA genes revealed that these 10 isolates were affiliated with the genus *Delftia* and were closely related to *Delftia tsuruhatensis* with 98 to 99% sequence identities. This finding suggested that even strains phylogenetically identical could show different phenotypes in the culturability on agar plate. Isolates No. 5, 8 and 21 were cultivated on agar plate after liquid cultivation with a high concentration of NaCl or at a low temperature. Isolate No. 5 could grow on agar plate after cultivation under these stress conditions. However, isolate No. 21 showed significantly limited growth on agar plate after liquid cultivation under a high concentration of NaCl and at a low temperature conditions. These results suggested that liquid cultivation with a high NaCl and/or a low temperature could promote the bacterial VNC state, at least for isolate No. 21.