

# ストレス環境下における細菌の増殖と形態変化

横山 佳子, 松田 葵

## Bacterial Growth and Morphological Changes under Stressful Environmental Conditions

Keiko Yokoyama and Aoi Matsuda

In food processing environment, several treatments are given to the food to preserve its quality as well as shelf-life. If these treatments are not severe enough, the bacteria survive and are able to adapt to even harsher treatments. The purpose of this investigation was to examine the bacterial growth and morphological changes with respect to non spore-forming bacteria under adverse conditions, namely mild heat treatment, salinity or acid treatment with sanbaisu (mixture of vinegar, sugar and soy sauce). From the results of observation with scanning electron microscopy, *Escherichia coli* MC4100 showed that the cells tended to convert from a bacillary to a coccobacillary shape under each condition of heat treatment at 50°C for 24 h, treatment with 10% NaCl for 24 h or with sanbaisu for 10 min. The cells of *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 grown in the presence of NaCl were appeared to be somewhat larger than control cells. Furthermore, the gaps between NaCl-grown cells were filled in something like secretion. The cells treated with sanbaisu tended to be individual cells. *E. coli* MC4100 and *S. aureus* NCTC8325 treated with sanbaisu for 1 h were lost capability of the colony formation on Luria-Bertani (LB) agar plate. However, sanbaisu-treated cells cultured with recovery medium (LB broth) for 24 h were restored to colony formation again. These results raised the possibility that the both organisms became transiently viable but nonculturable (VBNC) state by acid stress (sanbaisu treatment).

(Received September 13, 2006)

### 1. 緒 言

微生物の増殖は、エネルギー源となる栄養源の有無、温度、pH、酸素、水分活性および圧力など様々な環境因子によって左右される。食品の微生物制御は、これらの環境因子をコントロールすることによって行われるが、食品の品質低下を考慮するか否かで処理方法が異なる。食品の品質低下を考慮しない場合は、過酷な条件の滅菌処理が可能であるが、考慮する場合は温和な条件で処理をしなければならない。後者の場合は生残菌の問題が生じる。生残菌の中には処理中には死に至らなかったが、細胞の構造や機能に障害を持つ損傷菌が含まれ、処理後の条件次第で生存性を回復する場合がある。

微生物の中には生存に不利な環境に適応する機構

を持ち、環境が良好になると増殖して食品の腐敗や食中毒の原因となる微生物が存在する。例えばグラム陽性細菌であるバチルス属やクロストリジウム属の細菌は、環境条件が変化して増殖が続けられなくなった時、耐久性の芽胞を形成して休眠状態に入ることが知られている<sup>1)</sup>。一方、芽胞を形成しない大腸菌や黄色ブドウ球菌などの細菌では、高温、低温、低 pH、高浸透圧、飢餓などの環境ストレスに対して様々な応答メカニズム（環境ストレス応答）を有している。例えば低温下に置かれた大腸菌では、菌体内に低温ショックタンパク質が産生され、細胞膜の流動性を低下させたり<sup>2)</sup>、DNA や RNA の二次構造を安定化する機構<sup>3)</sup>が知られている。また大腸菌では低 pH 環境下に置かれると、菌体内で酸ショックタンパク質が産生され、酸に対して抵抗を持つようになる。さらに酸ショックタンパク質が産生されると同時に浸透圧、熱、過酸化物質に対する耐性を担う

ショックタンパク質が作られ、菌体を保護する機構が報告されている<sup>4,5)</sup>。

これまでの食品細菌検査では特定の培地上で生育する細菌を問題としてきたが、従来の培養技術では十分な生育をしない、何らかのストレスを受けた損傷菌や生命力は保持しているが通常の培養では生育できない状態 (VBNC:viable but nonculturable state)<sup>6)</sup> になった細菌の存在が認められており、食品の品質や安全性の評価でこれを留意すべきか検討されているところである。

食品微生物の研究分野は、微生物利用・発酵食品などの分野と、微生物制御・食品保全などの分野の大きく 2 つに分けられる。後者は非生産的であるため、微生物制御についての研究は前者に比べて少ないのが現状である。しかし、微生物にとって食品中の化学成分や食品加工における様々な処理はストレス環境であり、食品中の微生物の挙動を把握し、食品の微生物学的安全性や品質保持を考えることは衛生管理が重要視されている昨今、大きな意義をもつといえる。

本研究では、日常生活で用いられる食品保存や調理操作における微生物制御方法の中で、食品の品質や食材の食感を損なわない温和な加熱・塩分・低 pH 条件を設定し、細菌にこれらのストレスを負荷することによって、各条件における細菌の生育状況の把握と走査型電子顕微鏡 (SEM) による細菌の形態変化を検討し、微生物制御に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

## II. 試料および方法

### 1. 供試菌株

平成 16 年 9 月に名古屋大学より入手した大腸菌 *Escherichia coli* MC4100 株および黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 株を用いた。これらの菌株は入手後ただちに、Luria-Bertani (LB) 液体培地で培養後、 $-60^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。本研究では、保存した供試菌株を LB 寒天培地に塗布し、 $35^{\circ}\text{C}$  の培養条件で一晩培養後、寒天培地上に生育したコロニーを採取し、LB 液体培地にて  $35^{\circ}\text{C}$  で一晩振とう培養したものを前培養菌として各実験に使用した。

### 2. 実験条件

#### 1) 熱処理

10ml の LB 液体培地を 3 本用意し、前培養液をそれぞれ  $100\mu\text{l}$  ( $10^6 \sim 10^7\text{cfu}$ ) ずつ添加した後、 $42^{\circ}\text{C}$  および  $50^{\circ}\text{C}$ 、コントロールとして  $37^{\circ}\text{C}$  にて振とう培養した。供試菌の各培養温度に関する増殖曲線は、

LB 寒天培地を用いた平板塗抹法により生菌数を計数し作成した。菌液を添加した時間を 0 時間とし、培養 8 時間までは 1 時間毎、以後は 24 時間後に菌液を採取し、生菌数を計数することにより増殖曲線を作成した。

#### 2) NaCl 処理

5% および 10% NaCl 濃度に調製した LB 液体培地とコントロールとして通常の LB 液体培地 (0.5% NaCl) に前培養液をそれぞれ  $100\mu\text{l}$  ( $10^6 \sim 10^7\text{cfu}$ ) ずつ添加した後、 $37^{\circ}\text{C}$  で振とう培養した。各 NaCl 濃度に関する供試菌の増殖曲線は、LB 寒天培地を用いた平板塗抹法により生菌数を計数し作成した。菌液を添加した時間を 0 時間とし、培養 8 時間までは 1 時間毎および 24 時間後に菌液を採取した。培養液からの NaCl の影響を除去するため、採取した培養液を  $12,000\text{rpm}$ 、3 分間遠心分離 (Model 1-13, 久保田商事 (株) 製) 後に生理食塩水にて菌を洗浄し、平板塗抹を行った。翌日生菌数を計数し、増殖曲線を作成した。

#### 3) 三杯酢による酸処理

三杯酢は穀物酢、砂糖および醤油の割合が 2 : 1 : 1 となるように調製した。三杯酢の pH を pH メーター (PB-11 型, Sartorius 社製) を用いて測定した。三杯酢を  $0.22\mu\text{m}$  メンブレンフィルター (ミリポア社製) を用いて濾過滅菌後、調製した三杯酢に前培養液  $100\mu\text{l}$  ( $10^6 \sim 10^7\text{cfu}$ ) を添加し、 $37^{\circ}\text{C}$  で振とう培養した。菌液を添加した時間を 0 時間として、30 分、1 時間および 24 時間後に菌液を採取した。菌液はそれぞれ  $500\mu\text{l}$  ずつ採取し、三杯酢の影響を除去するため生理食塩水を用いて菌を洗浄後、菌液  $100\mu\text{l}$  を LB 寒天培地に塗抹し、翌日コロニー形成の有無を確認した。さらに菌液  $100\mu\text{l}$  を LB 液体培地 (回復培地) に接種し、振とう培養を行い、菌の生育の有無を観察した。コントロールは三杯酢の代わりに LB 液体培地にて同様の操作を行った。

#### 4) 走査型電子顕微鏡 (SEM) による細菌形態の観察

熱処理、NaCl 処理および三杯酢処理後の菌体を、日本電子顕微鏡学会が推奨する方法<sup>7)</sup> により細菌の固定、脱水を行った。試料表面に導電性をもたせるため、イオンスパッタ (E-101 型, 日立製作所製) で金蒸着を行った後、走査型電子顕微鏡 (S-530 型, 日立製作所製) により加速電圧  $15\text{kV}$  にて細菌の形態を観察した。

### III. 結果と考察

#### 1. 熱処理

本研究では、細菌は死滅しないが菌体にストレスを与える温度として、熱ショックタンパク質の研究でよく用いられる 42°C および 50°C の温度条件を用い、37°C での培養をコントロールとした。2 種類の供試菌における増殖曲線を図 1-(a) および 1-(b) に示した。図 1-(a) より大腸菌 MC4100 株では、42°C ではコントロールとほぼ同様の増殖曲線が得られたが、50°C においては、培養 8 時間後までは菌数が  $10^3$  cfu/ml まで減少し、その後はほぼ一定の菌数を保った。図 1-(b) より黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株では、42°C ではコントロールとほぼ同じ増殖曲線が得られたが、50°C では培養 6 時間後までは菌数が  $10^3 \sim 10^4$  cfu/ml まで減少したが、24 時間後にはほぼ 0 時間と同様の菌数にまで増加した。

SEM による観察結果を写真 1-a および 1-b に示した。大腸菌および黄色ブドウ球菌ともに 50°C 加熱では、菌数が減少した培養 5 時間後の菌液を試料とした。また 42°C 加熱、コントロール (37°C) においても同様の条件で観察を行った。42°C 加熱では、大腸菌および黄色ブドウ球菌ともコントロール (写真 4-a, 4-b) とほぼ同じ形態であったため結果を省略した。写真 1-a より 50°C 加熱処理した大腸菌 MC4100 株ではコントロールと比較すると、やや丸みを帯びた形態となり、球形に近い菌体も観察でき

た。また細胞に窪みが生じている菌体が観察できた。写真 1-b より 50°C 加熱処理した黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株ではコントロールと比較すると、個々の菌体の大きさが不揃いであった。

本研究で設定した 42°C および 50°C の培養温度は、一般的に大腸菌や黄色ブドウ球菌では非致死的な温度であるが、増殖至適温度ではない。細菌が非致死的な熱ストレスを受けた場合、細菌細胞は温度の上昇を感知することによって、一群の熱ショックタンパク質を誘導合成し、高温で損傷した細胞機能を正常化することが知られている<sup>8,9)</sup>。また細菌が高い温度環境下に置かれると細胞膜の組成を変え、飽和脂肪酸や長鎖脂肪酸の比率を高めることが知られている<sup>10)</sup>。本研究において 50°C での培養では、一時的に生菌数が低下するが、死滅に至らなかった細胞が環境に適応し再び増殖を行っていることが考えられる。熱処理後の大腸菌や黄色ブドウ球菌の形態変化を観察した報告はほとんどないが、Harley ら<sup>11)</sup> は、グラム陰性細菌である *Legionella pneumophila* を熱処理すると、細胞の形がねじれ、細胞質の縮小により細胞壁が厚くなり、さらに細胞の小型化および形態の多型性が観察できたと報告している。本研究における大腸菌の細胞の小型化、球形化は細胞質の縮小や細胞膜の組成の変化によるものと考えられる。黄色ブドウ球菌においても形態の不均一化は細胞膜の組成変化が関与しているのではないかと考えられる。

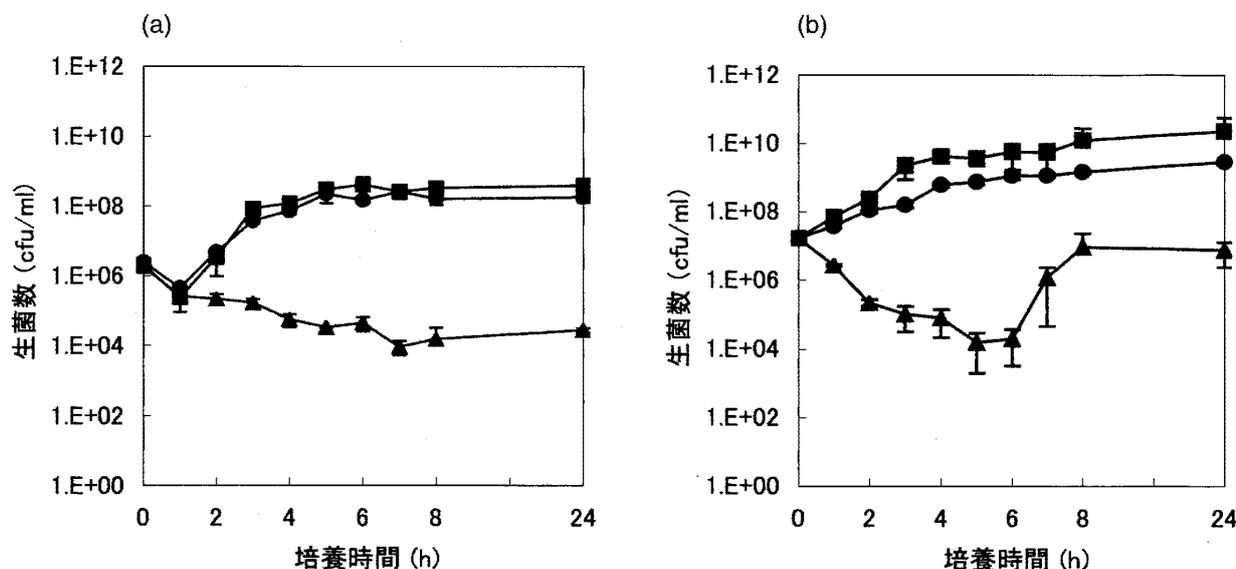


図 1 熱処理での増殖曲線  
 (a) 大腸菌 MC4100 株, (b) 黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株  
 ■ コントロール ● 42°C ▲ 50°C

## 2. NaCl処理

高濃度の塩を食品に添加すると、食品の水分活性が低下し微生物の増殖を制御して食品の腐敗・変敗を防止または遅延させる。食塩を用いた保存法である塩蔵法は、食品の常温保存法として伝統的に利用されてきた。しかし微生物の中には、高濃度の食塩中でも増殖できる好塩菌・耐塩菌が存在する。本研究で供試菌とした黄色ブドウ球菌も耐塩菌の一つである。大腸菌は食塩濃度が約 5～10% で増殖が停止するのに対し、黄色ブドウ球菌は 10% 以上の食塩の環境下でも生育する。本研究では、漬物や佃煮の塩分に相当する 5% NaCl および塩辛の塩分に相当する 10% NaCl 濃度での細菌の増殖と形態変化を検討した。

大腸菌 MC4100 株および黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株の増殖曲線を図 2-(a) および 2-(b) に示した。大腸菌 MC4100 株では 5% NaCl では、培養 5 時間後までは生菌数が減少傾向であったが、その後増加した。10% NaCl では、5 時間後までは 5% NaCl と同様に生菌数が減少したが、10% ではさらに減少を続け、生菌数が  $10^4$  cfu/ml まで減少し、その後は一定になるという傾向であった。黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株では、コントロールとほぼ同様の増殖傾向であった。

SEM での観察結果を写真 2-a および 2-b に示した。大腸菌では 5% NaCl において、最も生菌数が減少した培養 5 時間後の菌液を試料としたため、10% NaCl

においても同様の条件で観察を行った。また黄色ブドウ球菌では 10% NaCl 条件下でも増殖傾向にあったため、大腸菌と同様、培養 5 時間後の菌液を試料とした。5% および 10% NaCl 濃度下で培養した大腸菌 MC4100 株ではコントロールとほぼ同様の形態であったため結果を省略した。黄色ブドウ球菌 NCTC 8325 株では、コントロールと比較すると、5% NaCl では菌体が連鎖している間隙に分泌物様のものが観察できた (写真 2-(a) 矢印)。10% NaCl では菌体の形が球形ではなくなり、大きさもコントロールと比較すると大きくなる傾向であった。また単独化した菌体が観察できた。

耐塩菌である黄色ブドウ球菌は 10% NaCl でもコントロールとほぼ同様の増殖が見られたが、大腸菌では増殖が阻害された。塩分濃度が高いほど食品の水分活性は低下し、微生物の生育が妨げられて保存性の向上につながる。細菌細胞では、細胞から水が漏洩し、細胞収縮によって細胞質の溶質濃度が上昇する。本研究において、特に大腸菌では増殖阻害から脱水による形態変化が予想されたが、10% NaCl でも顕著な形態変化が観察できなかった。大腸菌では高浸透圧下におかれると、トレハロースを菌体内に蓄積する浸透圧保護機構が働くことが知られており<sup>12)</sup>、このような機構が作用した可能性が示唆される。Vijaranakul ら<sup>13)</sup> は、黄色ブドウ球菌が 2.5M NaCl によるストレス環境下に置かれると、細胞の大きさが大きくなり、透過型電子顕微鏡観察ではペプチドグ

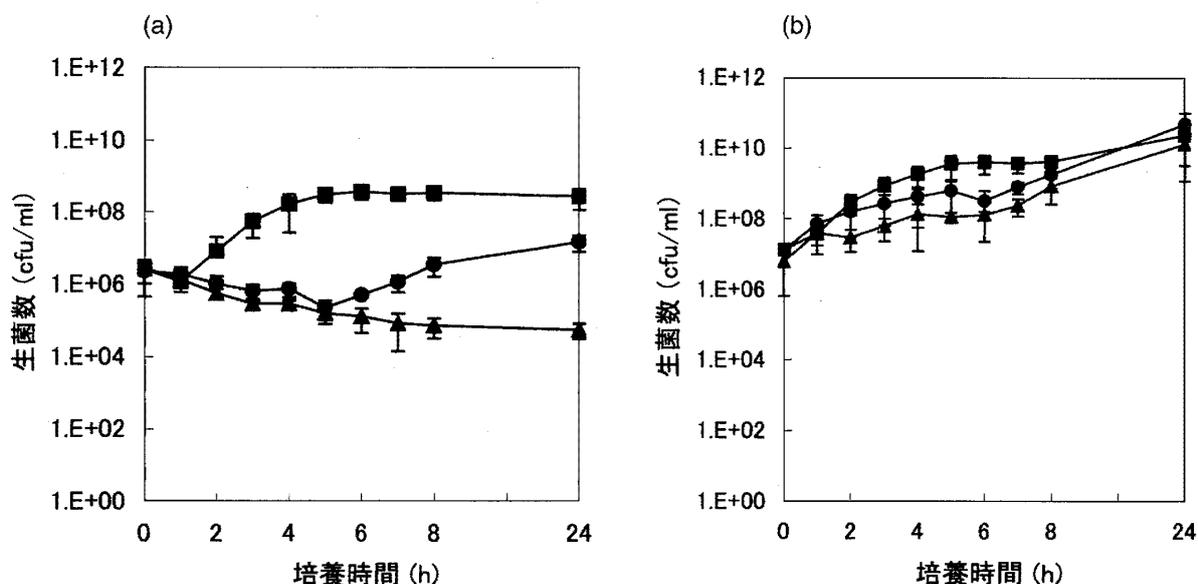


図 2 塩分存在下での増殖曲線  
 (a) 大腸菌 MC4100 株, (b) 黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株  
 ■— コントロール ●— 5% NaCl ▲— 10% NaCl

リカン層が薄くなったと報告している。本研究においても 10% NaCl では細胞がコントロールと比較して大きくなっていた。また Vijaranakul ら<sup>13)</sup> は走査型電子顕微鏡による観察も行っているが、本研究で得られたような分泌物様の物質で細胞間隙が満たされている顕微鏡像は観察されておらず、また細胞の単独化の顕微鏡像も報告されていない。分泌物様の物質の成分や細胞の単独化のメカニズムを解明し、環境適応との関係を検討することは今後の課題である。

### 3. 酸処理

乳酸、酢酸およびクエン酸などの有機酸は抗菌作用があることが知られており、発酵食品や加工食品のみならず調理の際にも保存性を高めるために利用されている。本研究では一般に調理で使用する三杯酢（穀物酢：砂糖：醤油＝2：1：1）を培地とした。三杯酢の pH を測定したところ pH 3.34 ± 0.07 であった。

LB 寒天培地上での生育については、それぞれの供試菌において三杯酢に添加直後と 30 分後ではコロニーが形成されたが、1 時間および 24 時間後ではコロニーの形成が認められなかった。24 時間後、菌液を三杯酢から回復培地（LB 液体培地）に移し、振とう培養した菌液を平板塗抹すると、翌日寒天培地上で再びコロニーを形成した。また 2 つの供試菌の回復培地での一晚培養後の菌数は  $10^7 \sim 10^8$  cfu/ml に達した。

SEM での観察は、寒天培地上でのコロニー形成能を有する培養 30 分後と、コロニー形成能を失った状態になっていると考えられる培養 24 時間後の菌液を試料とした。SEM での観察結果を写真 3-a および 3-b に示した。写真は三杯酢に接種して 30 分後の顕微鏡像であり、24 時間後の菌体は 30 分後とほぼ同様であったため結果を省略した。写真 3-a より、大腸菌 MC4100 株の菌体は、コントロール（写真 4-a）と比較すると細胞が小型化し、中には球形状の菌体が確認できた。黄色ブドウ球菌 NCTC 8325 株では、コントロール（写真 4-b）ではブドウの房状の配列が観察できたが、三杯酢に接種した場合は二連鎖状や単独で存在する菌体が観察できた（写真 3-b）。形態については大きな変化は認められなかった。

以上の結果から、寒天培地上でのコロニー形成能の消失以前から形態変化は起こっていることが明らかとなった。

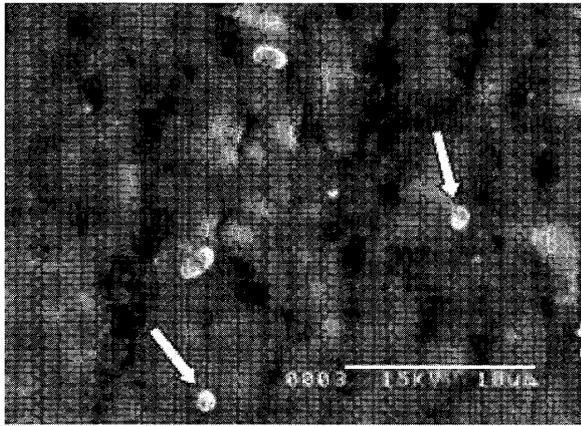
現在の食品衛生管理で行われている生菌数の測定法では、コロニー形成能の消失が起こった時点で、

その菌体は死菌体と判定している。しかし近年、生きているが通常の培養では培養できない、VBNC (viable but nonculturable) の状態になった細菌の存在が認められている<sup>14)</sup>。VBNC は一部の研究者の間で「非芽胞形成細菌のストレス環境下における遺伝的にプログラムされた生存戦略の一つである」と提唱されている<sup>15)</sup>。VBNC の状態では、通常菌数計測に用いる寒天培地上ではコロニーが形成されず、また細菌細胞が小型化、球形となることが特徴である。本研究では、2 種類の供試菌は三杯酢に 24 時間作用させた後、寒天培地上ではコロニーを形成しなかったが、回復培地で培養後はコロニー形成能が回復した。また SEM による観察結果より、特に大腸菌においては形態学的に球形の菌体が認められたことから、三杯酢中では細菌は死滅するのではなく、一時的に寒天培地上でのコロニー形成能を失った VBNC の状態になったと示唆される。酢漬けなど酢を使用した食品の保存法を利用することが多いが、保存条件が何らかの影響で変化し、細菌にとって良好な環境になれば細菌が再び増殖する可能性が考えられる。今後、食品の衛生管理は単に寒天培地上でのコロニー計数にとどまらず、「生きている」微生物すべてを検出・定量できるようなシステムを考えていく必要がある。

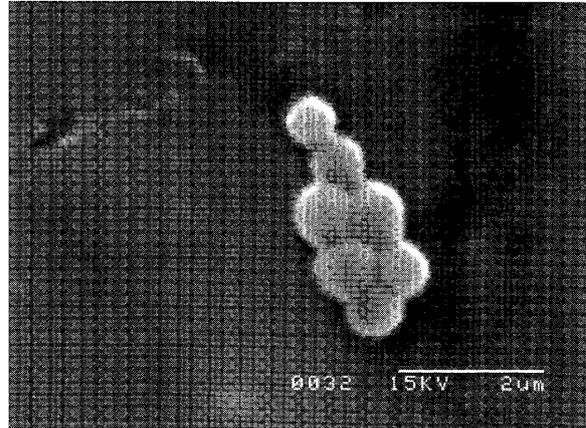
## IV. 要 約

食品の製造過程では、食品の品質低下防止および品質保持のために食品への様々な処理が行なわれる。これらの処理が不十分な場合、食品中の細菌は生残し、生残した菌体は、より厳しい処理条件に対しても適応できるようになる。本研究では加熱、塩分および三杯酢について、細菌の生存に不利であるが生残する程度のストレスを非芽胞形成細菌に負荷し、その生育状況や形態変化を検討した。走査型電子顕微鏡による観察結果から、大腸菌 MC4100 株では、50°C および三杯酢処理により細菌細胞が桿状から球状化する傾向が認められた。黄色ブドウ球菌 NCTC 8325 株では、10% NaCl 存在下ではコントロールと比較してやや細胞が大きくなり、また 5% NaCl 存在下では細胞間隙が分泌物のようなもので満たされている顕微鏡像が得られた。三杯酢で処理をすると、細胞が単独化する傾向が認められた。2 種類の供試菌は、三杯酢中では 1 時間後に LB 寒天培地上でのコロニー形成能を失うが、回復培地で培養すると再び寒天培地上でコロニーを形成した。三杯酢処理下では「生きているが通常の培地では培養できな

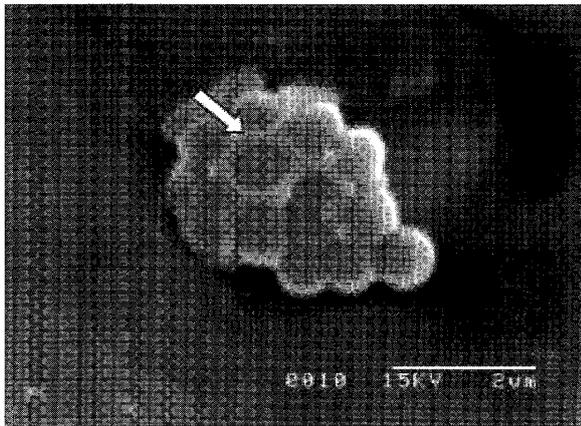
い」状態, すなわち VBNC の状態で存在していることが示唆された。



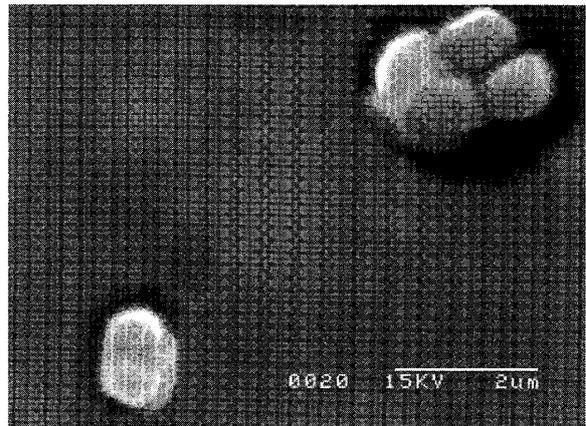
1-a 大腸菌 MC4100 株 : 50°C 処理, 5 時間培養。スケールは 10 $\mu$ m。



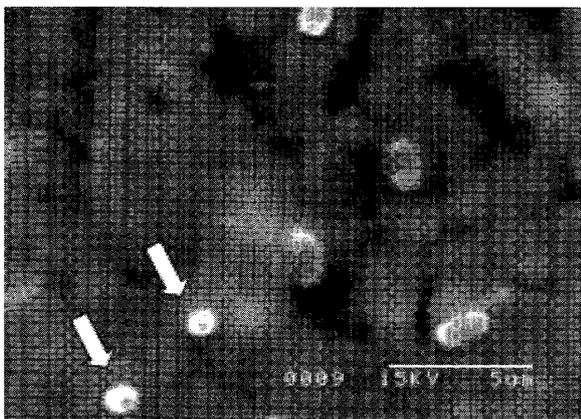
1-b 黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株 : 50°C 処理, 5 時間培養。スケールは 2 $\mu$ m。



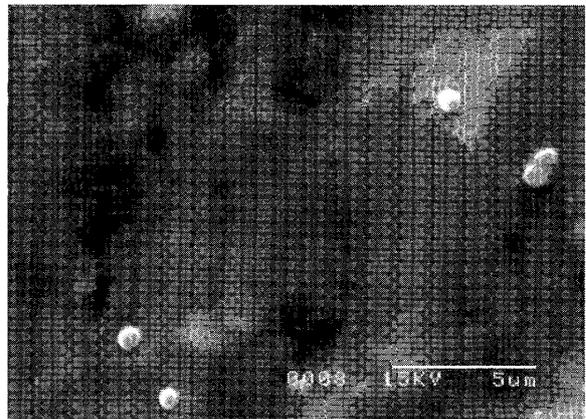
2-a 黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株 : 5% NaCl 処理, 5 時間培養。スケールは 2 $\mu$ m。



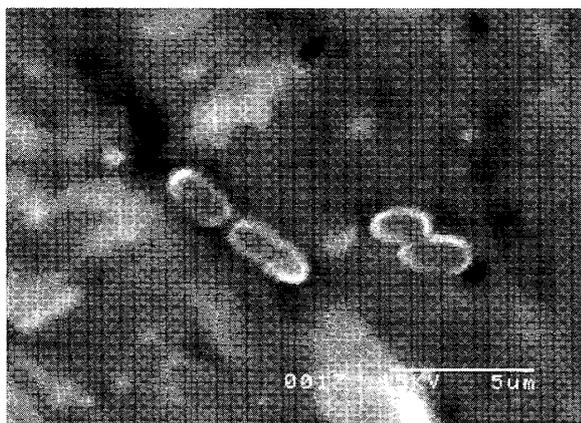
2-b 黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株 : 10% NaCl 処理, 5 時間培養。スケールは 2 $\mu$ m。



3-a 大腸菌 MC4100 株 : 三杯酢処理 30 分後\*。スケールは 5 $\mu$ m。

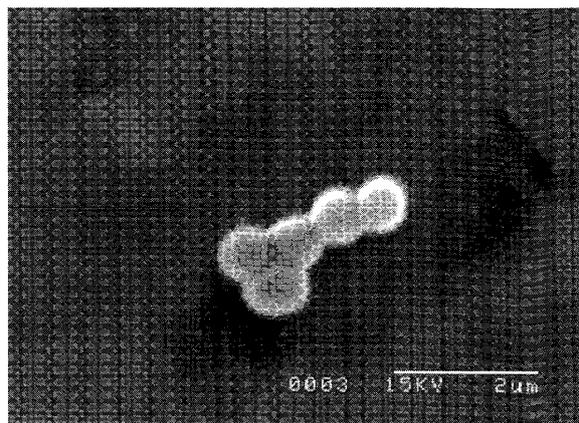


3-b 黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株 : 三杯酢処理 30 分後\*。スケールは 5 $\mu$ m。



4-a 大腸菌 MC4100 株：コントロール (37°C) 5 時間培養。スケールは 5 μm。

\*三杯酢処理実験におけるコントロールの電子顕微鏡写真は、4-a および 4-b と同様の形態であったため省略した。



4-b 黄色ブドウ球菌 NCTC8325 株：コントロール (37°C), 5 時間培養。スケールは 2 μm。

## 謝 辞

本研究は、平成 16 年度京都女子大学研究経費助成により行われたものである。

(平成 18. 9. 13. 受付)

## 引用文献

- 1) I. Barák, E. Ricca and S.M. Cutting: *Mol. Microbiol.*, 55, 330-338 (2005)
- 2) M. Inouye and S. Phadtare: *Sci. STKE*, 237, 26 (2004)
- 3) C. O. Gualenzi, A. M. Giuliodori and C. L. Pon: *J. Mol. Biol.*, 331, 527-539 (2003)
- 4) C. N. Arnold, J. McElhanon, A. Lee, R. Leonhart and D. A. Siegele: *J. Bacteriol.*, 185, 2475-2484 (2001)
- 5) N. Masuda and G. M. Church: *Mol. Microbiol.*, 48, 699-712 (2003)
- 6) Rita R. Colwell & D. Jay Grimes 編/遠藤圭子訳・清水 潮監訳：「培養できない微生物たち」 pp. 1-4, 学会出版センター, 東京 (2004)
- 7) 日本電子顕微鏡学会関東支部編：「走査電子顕微鏡」 pp. 261-263, 共立出版 (2000)
- 8) 由良 隆, 森 浩禎, 金森正明, 湯沢晴美：蛋白質・核酸・酵素, 37, 2925-2934 (1992)
- 9) Gross, A., *Cellular and molecular biology*, 2<sup>nd</sup> Ed., pp. 1382-1399, Ame.r. Soc. Microbiol. (1996)
- 10) 清水 潮著：「食品微生物 I - 基礎編 食品微生物の科学」 p. 138, 幸書房 (2001)
- 11) V. S. Harley, B. S. Drasar and G. Tovey: *Microbios.*, 91, 73-78 (1997)
- 12) P. I. Larsen, L. K. Sydnnes, B. Landfald and A. R. Strom: *Arch. Microbiol.*, 147, 1-7 (1987)
- 13) U. Vijaranakul, M. J. Nadakavukaren, B. L. M. Jonge, B. J. Wilkinson and R. K. Jayaswal: *J. Bacteriol.*, 177, 116-5121 (1995)
- 14) Rita R. Colwell & D. Jay Grimes 編/遠藤圭子訳・清水 潮監訳：「培養できない微生物たち」学会出版センター (2004)
- 15) D. McDougald: *FEMS Microbiol. Ecol.*, 25, 1-23 (1998)