

講座

## 微生物のコロニー増殖と熱測定

古賀邦正

(受取日：2004年2月18日，受理日：2004年4月12日)

### Evaluation of the Growth Activity of Microbial Colonies on Solid Medium using Calorimetry

Kunimasa Koga

(Received February 18, 2004; Accepted April 12, 2004)

In many cases, microbes exist on solid phase. Microbes on solid phase multiply as colonial growth. It is known that the growth on solid phase is different from the growth in liquid state. Comparing with microbes in liquid state, microbes on solid phase are hard to take nutrients. And the environment of microbes varies from place to place in the colony and affects the metabolism of microbes.

Information of colonial growth of microbes on solid phase is required for prevention of putrefaction of solid food, utilization of soil microbes or investigation of a infection mechanism of pathogenic bacteria to an organism.

However, the information regarding colonial growth of microbes on solid phase is not enough compared with that of microbes in liquid state by the reason of the absence of suitable and quantitative methods of estimating the colonial growth curve.

In this article, microbial calorimetry is introduced to be the method suitable for non-destructive measurement of microbial colonial growth on solid phase. Changes in the metabolic heats of colonial growth with time (the growth thermogram) are obtained with good reproducibility. The actual heat evolution curves ( $f(t)$  curves) obtained from the thermograms of growing colonies give good agreement with the changes in viable cell numbers in colonies under the same conditions. Using microbial calorimetry, the colonial growth of microbes can be evaluated quantitatively. And still, the method is useful for evaluation of the complicated phenomenon by microbes such as putrefaction, and development of novel natural substances which suppress the colonial growth microbes.

#### 1. はじめに

微生物はわれわれの日常生活のいたるところに存在し、その種類や数もきわめて多い。たとえば、土壌1g中には1千万から1億個の微生物が存在し、物質循環に関与し、循環系を通じて地球上の多様な生物の生命を維持している。<sup>1,2)</sup>

また、微生物の多様な働きを利用して、多くの発酵生産物や醸造物をつくり、利用している。<sup>3)</sup>

これらの微生物の活性評価には、微生物の増殖がどの程度活発に進行しているかを把握する必要がある。微生物が増殖する際の菌数変化を時間に従って追跡すると、Fig.1のような増殖曲線が得られる。この増殖過程は、誘導期、対

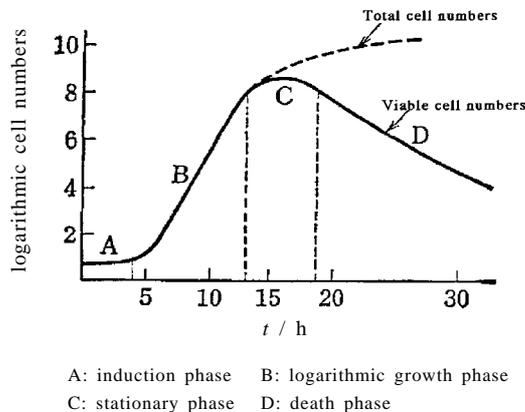


Fig.1 The typical growth curve of microbes.

Table 1 Measurements of microbial growth.

Method	Explanation
Direct enumeration of cells	Direct enumeration of microbes with a microscope
Turbidity estimation of cell numbers	Simple method of estimation of cell numbers with a spectrophotometer
Weighing mass of microbes	Weighing dry weights of microbes
Plate counts	The samples of the dilution of the original inoculum are used to inoculate Petri plates, on which colonies grow and can be counted

数増殖期，定常期および減衰期に分けられる。<sup>4)</sup> この増殖の基本パターンは微生物共通であるが，個々の微生物の違いやその微生物がおかれている環境の違いによって，誘導期の長さや対数増殖期における菌数の経時変化の傾きなどが異なっており，このような情報は発酵工程を管理したり，食品や環境の微生物汚染を防ぐ際にはきわめて重要である。

微生物の数を計測する方法には，次のようなものがある (Table.1)。<sup>5)</sup> 顕微鏡による直接計測：トーマの血球計測盤上で一定容積中の菌体数を数える。比色計などによる一定波長での透過率の測定：細胞が増えるに従い培養液が濁り，透過光量の減少が細胞数に依存することによる。菌体量の測定：湿菌体あるいは乾燥菌体の重量を測定する。

希釈した一定量の培養液を固体培地上に塗抹培養し，コロニー数を数える (希釈プレート法) これらのいずれの方法によっても菌体の懸濁液を希釈する操作や湿菌体や乾燥菌体を調製する操作のばらつきが大きく，正確な菌体数を計測するには相当の技術習熟が必要である。とくに，いずれの計測法でも，まず菌体の懸濁液を調製する必要があるが，微生物は液中に浮遊して増殖する場合と固形物に附着

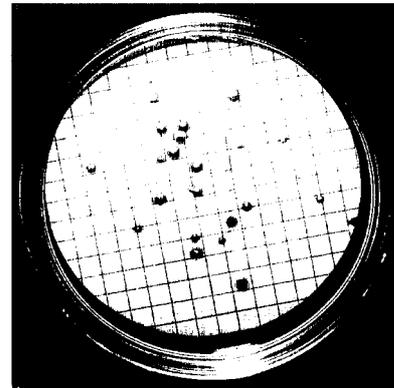


Fig.2 Bacterial (*Escherichia coli*) colonies on the surface of a membrane filter on the agar medium.<sup>8)</sup>

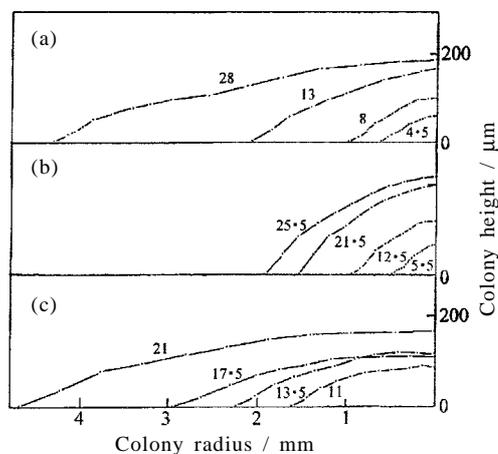
して増殖する場合があります，とくに固形物に附着している微生物の菌数を計測する場合，附着菌体を再現性よく懸濁せしめることは予想以上に難しい。

発酵工業においては，微生物は発酵槽の液体培地中で浮遊しながら増殖することが多いが，自然界では固形物に附着した状態で増殖する場合があります。固形食品の場合も，微生物は固形物に附着した状態で存在している。したがって，自然環境や固形食品での微生物数を評価するためには，固形物に附着した状態の微生物増殖の様子を正確に把握する手法が必要となる。しかし，従来，用いられてきた方法では間接的に微生物数を計測することしかできず，しかも，その定量性も充分とはいえない。

一方，微生物が増殖する際には一定の代謝熱を発生する。熱というパラメーターは，微生物が存在する環境が固体であろうと液体であろうと変わりなく伝導することから，代謝熱の経時変化を測定することによって，固形物に附着した微生物の増殖曲線が把握可能である。本講座では，熱測定の手法を用いて，寒天培地や食品などの固形物に附着した細菌のコロニー増殖に伴って発生する熱量の経時変化の測定法とその解釈を中心に紹介し，さらに，微生物の増殖曲線を熱測定の手法を用いて把握する意義について述べることにする。

## 2. 寒天培地上での細菌のコロニー増殖の熱測定

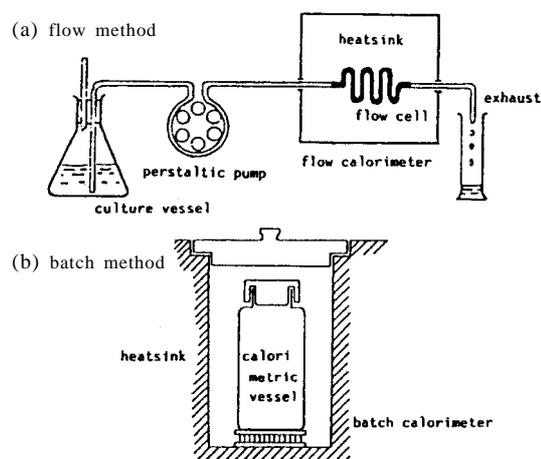
肉製品などにどの程度微生物が存在しているかを把握するためには，特定の表層部分や特定の肉製品の塊を対象にして菌を採取し，希釈プレート法にて生菌数を計測するのが一般的である。しかし，微生物は製品の特定部分に偏在している場合が多いので正しい情報が得にくい。実際，T. Mattilaらは食肉の表層に数種の汚染菌を接種し，20 での菌の増殖を詳細に顕微鏡で観察したところ，汚染菌は不連



**Fig.3** Standard colony profiles. Measurements of half-profiles at each colony age (in h) were done repeatedly 8 times to generate a standard profile: (a) *Escherichia coli*; (b) *Staphylococcus albus*; (c) *Bacillus cereus*.<sup>9)</sup>

続的にコロニー状に増殖しており、コロニー形成・維持するためには微生物の表層にある glycocalyx (糖衣) が大きな役割を果たしており、その増殖の様子は液体中での増殖に比べてはるかに複雑であることを指摘している。<sup>6,7)</sup>

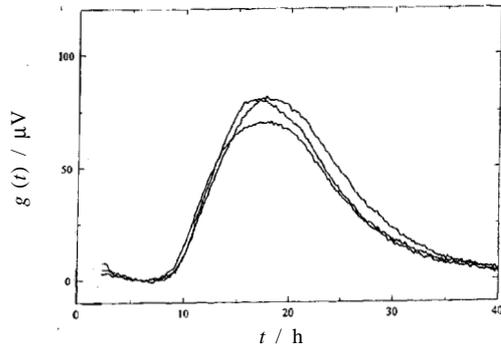
Fig.2は寒天培地表層でコロニー増殖する大腸菌 (*E. coli*) である。<sup>8)</sup> 細菌のコロニー増殖は、液体培養とは相当異なっている。固体培地上の細菌の増殖に伴うコロニー形成の様子をJ.W.T.Wimpennyが詳細に顕微鏡を通して観察している。<sup>9)</sup> 彼らが8回繰り返して観察、測定した結果がFig.3である。増殖初期には十分な酸素と培地からの栄養分を吸収し、対数増殖を行う。増殖は主に寒天表層に沿って水平方向に進むが、同時に垂直方向にも進行し、そのコロニー頂上へ向かう上昇角度は急勾配である。しかし、次第に酸素と栄養分の供給が不十分となり、増殖速度が低下してゆく。それとともに、増殖の方向は垂直方向から水平方向へシフトしてゆき、その上昇角度は緩やかになってゆき、コロニーの形状はこの増殖速度の変化を反映したものとなる。細菌の種類によってコロニーの形状は異なるが、上述した増殖の基本的な傾向は共通である。さらに、細菌のコロニー増殖のモデルとして、寒天培地を塗布したスライドグラス上に形成される細菌 (*Salmonella typhimurium*) のマイクロコロニーの径の経時変化を顕微鏡によって連続測定した画像を解析 (イメージアナリシス) することによって、細菌のコロニー増殖に及ぼす食塩とpHの影響を評価している (A.L.McKay and A.C.Peters).<sup>10)</sup> 固体培地での細菌のコロニー増殖の増殖速度定数 ( $\mu$  値) は液体培地での増殖より低く、それは栄養分の供給が不十分なことによるもの



**Fig.4** Calorimeter structures.<sup>11)</sup> (a) flow method, (b) batch method.

と考えられる。本方法はマイクロコロニーの径が0.1 mm以上、生菌数にしてコロニーあたりの菌数が $10^5 \sim 10^6$  cells以上で計測可能である。1 gの培地あたり $10^5 \sim 10^6$  cellsの菌数密度のレベルは増殖終了時期の菌数密度のレベルが $10^9 \sim 10^{10}$  cellsということを考えれば低く、増殖過程の初期にあたる。しかし、食品の腐敗を云々する場合、細菌数 $10^5 \sim 10^6$  cellsのコロニーが存在するというはすでに相当微生物汚染が進行していることになるので、それ以前のコロニー増殖の様子を把握することが大切であるが本方法では難しい。また、コロニーの径の変化は水平方向の菌の増殖を把握することができても垂直方向は把握できないわけで、このこともコロニー増殖の定量的把握という意味では問題である。

Fig.2に示したような細菌のコロニー増殖の過程を微生物用熱量計で測定した。熱量計の詳細については、すでに熱測定誌においても詳しい紹介がある<sup>11)</sup>ので多くを述べない。方式からみると、(i) 微生物の培養装置を外におき、ポンプで熱量計に培養液を導きながら測るフロー法 (Fig.4<sup>11)</sup>の(a))と(ii) 熱量計セルを培養容器そのもとして用いるバッチ法に分けられる (Fig.4<sup>11)</sup>の(b))が、固体培地での細菌のコロニー増殖を測定するにはバッチ法に限られる。われわれが用いているのは、伝導型原理で作動する20点式熱量計である。大きさが350 × 700 × 120 mmのアルミニウム製のヒートシンク中に一つの比較ユニットと19個の試料ユニットが設置された計20個の熱測定ユニットで構成されている。熱の検出は半導体熱電対素子 (サーモジュール) によっており、比較ユニットからの出力との差を示差的に取り出して、マルチプレキサー機能を有するインターフェースを通してマイクロコンピュータでフロッピーディス



**Fig.5** Growth thermograms observed for *E. coli* colonial growth on agar solidified medium at 30 . The measurements were done repeatedly three times under the same condition to confirm the reproducibility.

クに貯えるようになってい

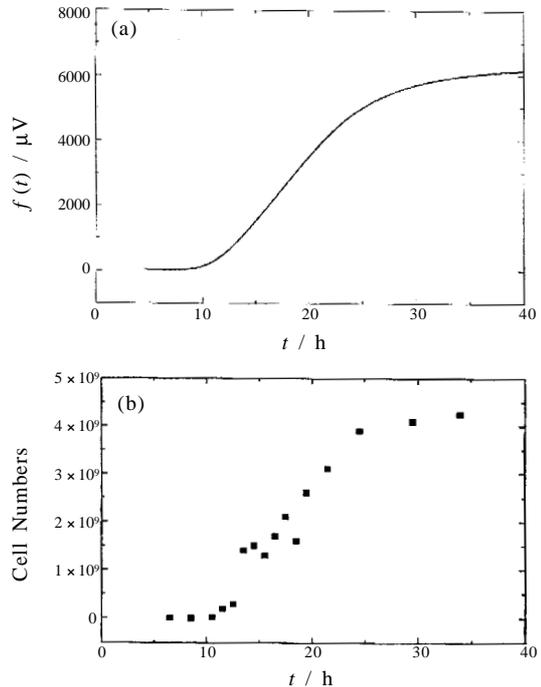
Fig.4の50 ml容バイアル瓶 (calorimetric vessel) 中に、無菌的に調製した2%寒天含有LB培地3mlを入れて、冷却固化、バイアル瓶表層の水滴を除去後、一定数の細菌を寒天表層に塗布する。塗布後、30 に保持した熱量計にバイアル瓶をセットし、菌の培養を開始する。培養開始後の微生物が示す発熱量の経時変化 ( $g(t)$ カーブ)をFig.5に示した。<sup>12)</sup>再現性確認のため、同じ条件で繰り返し測定した結果を示している。生物の示す代謝に伴う発熱量については多くの報告がなされている。<sup>13,14)</sup> その場合、基礎となるのは細胞や組織の示す熱生成が代謝活性に厳密に対応するというであり、熱量計の出力がそのまま生物活性を表すとみなしていることが多い。しかし、増殖活性を評価する場合、出力の大きさよりも、増殖に伴う熱量の経時変化を動力学的に解析する方がむしろ適していると考えられる。 $g(t)$ カーブから増殖曲線を得るため、以下のように解析する。<sup>11)</sup>

微生物細胞の培養中に観察される $g(t)$ カーブは実際には試料のヒートシンクに対する温度差であり、その熱伝導に関してはNewtonの熱伝導則が成り立つとみなされるので、熱量計ユニットの熱伝導定数 (Newtonの冷却定数)を $K$ とすると、熱伝導損失を補正した時の熱量計出力 $f(t)$ は次のように与えられる。

$$f(t) = g(t) + K \int g(t)dt \quad (1)$$

この $f(t)$ は系を仮想的な断熱状態に置いた時に観察されるであろう試料とヒートシンクとの間の温度差である。したがって、試料の熱容量に大きな変化がない限り、この $f(t)$ は試料系が生成する熱量の経時変化に対応することになる。

Fig.5の細菌のコロニー増殖に伴う $g(t)$ カーブから(1)式に従って仮想的な断熱状態における熱変化曲線に変換した $f(t)$



**Fig.6** (a)  $f(t)$  curves obtained from the growth thermograms, (b) the changes in viable cell numbers in colonies with incubation period of *E. coli* growth on agar medium at 30 .

カーブをFig.6(a)に示した。寒天培地の固体表面の細菌を経時的に3 mlの生理的食塩水で回収して生菌数を測定して得られた増殖曲線がFig.6(b)である。<sup>12)</sup> 両者はよく一致しており、 $f(t)$ カーブはコロニー増殖をしている細菌の増殖曲線をよく示している。ここで勘違いしないために指摘しておくが、 $f(t)$ カーブが示しているのはコロニー数ではなく、コロニーを形成している微生物の総菌数の経時変化である。固形物表面に微生物が形成するコロニーを目視で観察した場合、ある一定の大きさに達した時にコロニーが観察可能になるので、寒天表層の細菌がすべて同じ条件で増殖している場合には、ある瞬間に一齐に観察されることとなる。しかし、実際にはコロニー間の相互作用や栄養分摂取の競合関係のため、コロニー形成に差が生じ、ある時間範囲にわたってコロニーが観察される。Fig.7に、熱測定を行った場合と同じ条件で培養した際の大腸菌の寒天表層でのコロニー形成の経時変化の様子を $f(t)$ カーブと比較して示した。<sup>12)</sup> 熱量計出力が立ち上がり始める培養開始後10時間経過時点でも、まだ、コロニーは観測されない。増殖曲線の中頃である培養開始後15時間で、やっと小さなコロニーがいくつか観察され、培養開始後25時間までにコロニーの大きさと

微生物のコロニー増殖と熱測定

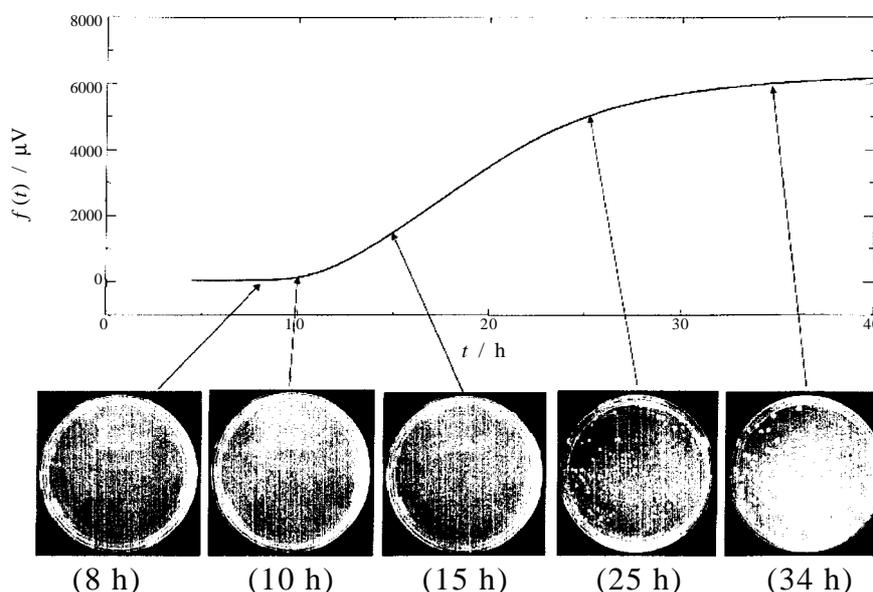


Fig.7 The process of colony formation and the  $f(t)$  curve of *E. coli* colonial growth on agar medium at 30 .

数が増加している。総菌数とは異なり、観察されるコロニーの数は短時間に急に増加するが、この場合、15時間から20時間の時期に急激に増加するものと推察される。コロニー数の急激な増加の後、培養開始25時間後と34時間後ではコロニーの大きさは増加しているが、観察されるコロニー数に違いはなかった。このように、熱量計を用いれば正確な菌数変化が把握しにくい固体培地での細菌のコロニー増殖でも、正確に把握可能である。正確な増殖変化がわかれば、その細菌の増殖の速さの正確な評価が可能となる。微生物の増殖曲線からその増殖の速さを評価する方法を述べることにする。

至適条件で増殖している微生物は一定の速度で娘細胞を産み続ける。1個の微生物が娘細胞を分裂し2個となるのに要する時間を世代時間 ( $\tau$ ) という。多くの微生物の世代時間は約20分から数時間までの範囲にあり、微生物ごとに決まった固有の値である。2個になった微生物は、ほぼ同じ世代時間をかけて4個となり、ついで8個となる。従って、初めに  $N_0$  だった微生物数が  $n$  世代後には  $N = N_0 2^n$  となる。すなわち、 $N/N_0 = 2^n$  となり、対数の形に換えると次式が得られる。

$$\ln N - \ln N_0 = n \ln 2 \quad (2)$$

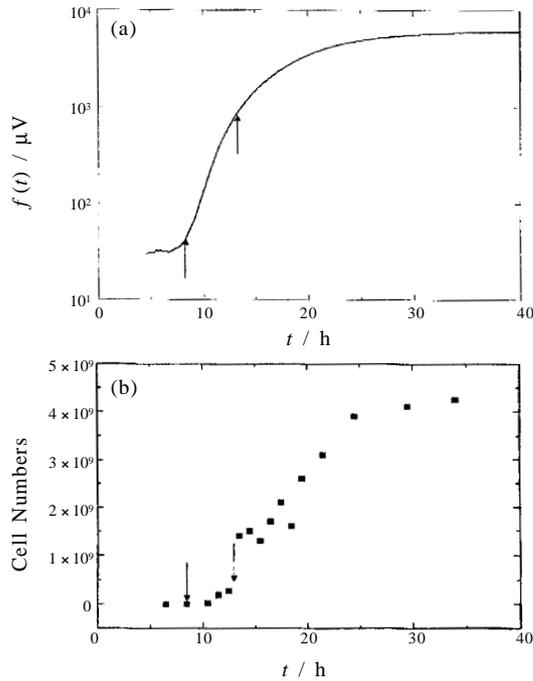
増殖時間  $t$  の間に  $n$  世代経て  $N_0$  だった微生物数が  $N$  となったのだから、 $n \tau = t$  であり、 $n = t/\tau$  である。従って、

$$\ln N - \ln N_0 = t \ln 2 / \tau \quad (3)$$

となる。

$\ln 2 / \tau$  は定数なので、(3)式は、微生物数の対数値と増殖時間との間は直線関係となることを示している。この状態の微生物は、栄養成分も充分ある至適条件で増殖が進行しており、対数増殖期 (logarithmic growth phase) にある。この直線の傾きはその微生物の増殖速度の指数であり、増殖速度定数 ( $\mu$ ) とよばれる。従って、増殖速度定数 ( $\mu$ ) と世代時間 ( $\tau$ ) との間には、 $\mu = \ln 2 / \tau = 2.303 \log 2 / \tau$  という関係がある。

*E. coli* のコロニー増殖に伴う  $f(t)$  カーブを片対数表示した結果を Fig.8(a) に、生菌数の経時変化 Fig.8(b) に比較して示した。<sup>12)</sup> 図から対数増殖期は培養開始後 8.5 時間から 13.5 時間の短い範囲であることが知られる。この時期は増殖曲線全体から言うと 10% にしか相当せず、発熱量もわずかであり、少数の小コロニーが観察されるに過ぎない。しかし、寒天表層の微生物数は  $5 \times 10^8$  cells のレベルに達しており、食品の微生物汚染という面から言えば充分深刻な状態にあると言える。 $f(t)$  カーブから得られた増殖速度定数 ( $\mu$ ) は  $0.64 \text{ h}^{-1}$  であった。従来、顕微鏡観察あるいはイメージアナリシスによるコロニー形成速度から評価して  $0.1 \text{ h}^{-1} \sim 0.15 \text{ h}^{-1}$  であると報告されている。<sup>10)</sup> 熱測定の手法を用いることによって、増殖初期の対数増殖期の増殖速度定数は従来報告されていたよりもかなり大きな値であることが明らかになった。通常の液体培養でも、微生物集団が長時間早い速度の対数増殖を維持することはまれである。対数増殖期の結末には、利用可能な栄養素の消耗や有毒代謝産物

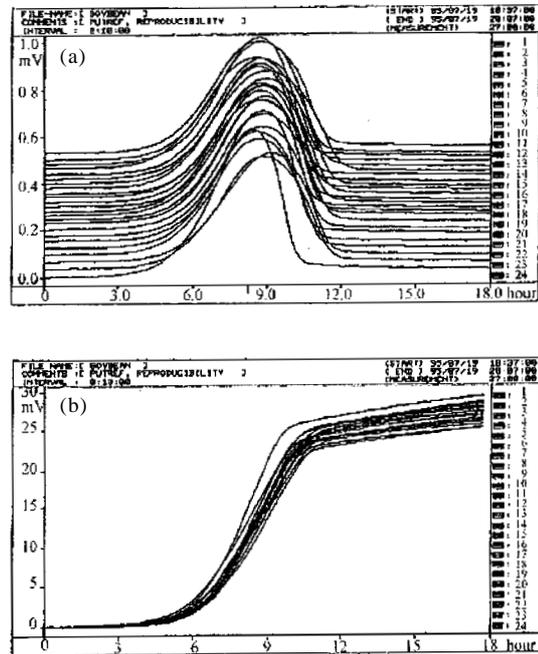


**Fig.8** (a) logarithmic  $f(t)$  curve of *E. coli* colonial growth on agar medium at 30 °C, and (b) the changes in viable cell numbers in colonies with incubation period of *E. coli* growth on agar medium at 30 °C.

の蓄積により増殖速度が低下し、ついには増殖停止する。コロニー増殖の場合には、これに加えてコロニーの構造上の特性が加わる。コロニー上部に位置する微生物はコロニー下部の寒天培地表面に位置する微生物に比べて栄養摂取しにくいし、コロニー内部に位置する微生物はコロニー周辺に位置する微生物に比べて酸素が摂取しにくい。有毒代謝産物の蓄積も均等ではない。これらの要因が増殖速度に影響を及ぼし、対数増殖期が短いものと推察される。コロニー増殖でも、増殖初期の微生物は固体培地の表層に沿って栄養分を十分に摂取しつつ垂直および水平方向に増殖するものと予想され、これがこの時期の微生物増殖速度が速い理由と考えられる。

### 3. 食品の腐りやすさの評価

高橋らは実際の食品として煮豆を対象にして、不均一な食品を対象とする腐敗過程の計測が熱測定によって精度よく測定できることを紹介している。<sup>15)</sup> Fig.9(a)は同一条件の煮豆を24個の試料容器に入れて、腐敗菌群を接種した際に観測した  $g(t)$  カーブである。煮豆のような不均一で個体差の大きい食品が対象であっても、再現性よく腐敗のサーモ

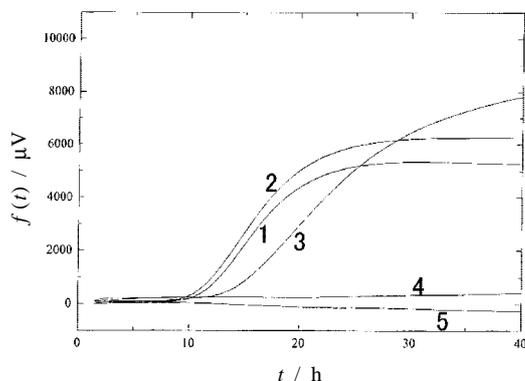


**Fig.9** (a) growth thermograms observed for putrefaction culture of boiled soybeans, and (b)  $f(t)$  curves of microbes relating with putrefaction culture. The measurements were done repeatedly 24th times under the same condition to confirm the reproducibility.

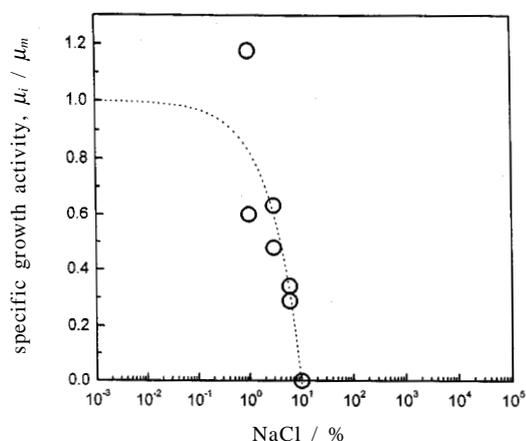
グラムが測定できることがわかる。Fig.9(b)は、腐敗の  $g(t)$  カーブから(1)式に従って得られた  $f(t)$  カーブである。この  $f(t)$  カーブは腐敗に伴う熱生成の経時変化を示すものであり、“熱的”にみた腐敗プロセスを表している。従って、腐敗プロセスを示す  $f(t)$  カーブから増殖速度定数 ( $\mu$ ) と同様にして、“腐敗速度定数”を求め、食品の腐りやすさの指標とすることができる。なお、腐敗速度定数の標準偏差はパーセントに換算すると  $\pm 2.8\%$  となり、十分な精度で腐敗過程を把握できる。<sup>15)</sup> 食品の違いによって腐敗曲線は異なっており、複雑な腐敗という現象が熱測定によって定量的に評価可能であることが理解される。

### 4. 熱測定による微生物のコロニー増殖抑制の評価

腐敗を抑えるために種々の方法があり、それらが微生物のコロニー増殖をどの程度抑制するかを熱測定によって定量的に評価することができる。熱測定の結果から、速度論的に微生物の増殖活性に及ぼす抗菌剤などの薬剤の影響を評価する手法についてはA.-O. Antoceらが先に提案した。<sup>16)</sup> 方法としては増殖速度定数の低下から評価する方法と増殖時間のたちあがりの遅れから評価する方法とがあるが、そ



**Fig.10**  $f(t)$  curves of *E. coli* on agar medium containing various amounts of NaCl at 30 . The numbers identify curves corresponding to growth with (1) 0 %, (2) 1 %, (3) 3 %, (4) 6 %, (5) 10 % NaCl contents.



**Fig.11** Plot of the specific growth activity,  $\mu_i / \mu_m$ , against the concentration,  $i$ , of NaCl for colonial growth of *E. coli* on agar medium.

れぞれの方法で最小阻止濃度 (MIC) 値を求めた結果、両者で大きな違いは認められなかった。<sup>16)</sup>

コロニー増殖の場合には、増殖のごく初期の立ち上がり付近での増殖活性が大きな意味を持つ。初期の対数増殖期以降の増殖の遅れは、前述したようにコロニーの形状やそこに位置する微生物への基質や酸素の供給速度などの要因も影響するため、ここでは対数増殖期から得られる増殖速度定数の低下から評価する方法について述べる。

抗菌剤の濃度が  $i$  の時の増殖速度定数を  $\mu_i$ 、抗菌剤の濃度が 0 で栄養成分が充分にある時の増殖速度定数を  $\mu_m$  とすると、 $\mu_i$  および  $\mu_m$  はそれぞれ実験的に求めることができる。抗菌剤濃度 0 の時の増殖速度定数に対する抗菌剤濃度  $i$  の時の増殖速度定数の比、 $\mu_i / \mu_m$ 、を比増殖活性と呼ぶこととする。比増殖活性は抗菌剤濃度が増加するに従い、1 ( $\mu_i = \mu_m$ ) から 0 ( $\mu_i = 0$ ) まで変化することから、抗菌剤による抗菌活性を  $(1 - \mu_i / \mu_m)$  で表し、これが抗菌剤濃度  $i$  の  $m$  乗に比例すると仮定すれば、

$$(1 - \mu_i / \mu_m) = k \cdot i^m \quad (4)$$

となる。

ここで、 $k$  と  $m$  : 定数。

(4)式で増殖活性が完全に 0 になった時の抗菌活性は 1 であり、その時の抗菌剤の濃度を  $i_c$  とすると

$$i_c = (1/k)^{1/m} \quad (5)$$

となる。

(4)式に対する回帰分析により、二つの未知数  $k$  と  $m$  を決定することができ、その結果、 $i_c$  を(5)式によって求めることができ、 $i_c$  の値が MIC 値に相当する。

食塩は食品中の水分活性を低下させることによって微生物の動きを抑制することが知られており、古来から塩蔵などの手法が用いられてきた。そこで種々の濃度の食塩を含有した寒天培地上で *E. coli* のコロニー増殖を行わせ際の  $f(t)$ カーブから増殖速度定数を求め、食塩による増殖速度定数の低下から MIC 値を求めてみた。Fig.10 が種々の食塩濃度の寒天培地での *E. coli* のコロニー増殖を示す  $f(t)$ カーブである。食塩濃度が高くなるにつれて増殖が抑制されている。 $f(t)$ カーブから培地の食塩濃度  $i$  の時の増殖速度定数  $\mu_i$  を求めて、 $\mu_i / \mu_m$  と食塩濃度  $i$  との関係を図.11 に示した。これが食塩の *E. coli* のコロニー増殖に対する作用曲線である。この作用曲線から食塩の MIC 値を求めた結果、 $9.7 \pm 1.5$  % であることが知られる。従来法に従って、種々の食塩濃度含有の寒天培地に *E. coli* を植菌し、48 時間後の菌の生育をコロニーの有無で判断した結果から求めた MIC 値は約 8 % であり、熱測定で求めた結果は従来法とよく一致している。<sup>12)</sup> 従来法で正確な MIC 値を得ようとすれば、評価する抗菌剤の添加量を限りなく細かく調整しなければいけない。一方、熱測定の手法を用いると、低濃度の抗菌剤を含有することによる菌の増殖の低下もすべて MIC 値を得るための情報となることから、一定数の培養実験を行うことによって詳細な MIC 値を求めることができる。

食塩の過度の使用は健康面で問題があるし、消費者ニーズからも殺菌剤・抗菌剤の使用は控える流れにある。このような背景を考えると、微生物の活性を抑制する作用を持つ食品素材を多く持つことが今後ますます必要であり、食品中の微生物の増殖を定量的に把握でき、しかも、抗菌活性・静菌活性を有する素材の微生物のコロニー増殖に対す

る抗菌活性を簡便かつ定量的に評価できる熱測定の手法は非常に有用であると言える。また、さらに病原性のメカニズムとの関わりも深い微生物の固相への接着と増殖、バイオフィーム内での微生物の相互作用など微生物に関する興味深い挙動の把握に熱測定の手法が有力であろうと考えられる。本原稿執筆にあたり、貴重なアドバイスを頂戴した けいはんな文化学術協会・微生物計測システム研究所長 高橋克忠先生に感謝致します。

### 文 献

- 1) 大森俊夫, 環境微生物学, 昭晃堂, 7 (2000).
- 2) G. T. Tortora, B. R. Funke, and C. L. Case, MICROBIOLOGY, The Benjamin/Cummings Publishing Company, California, 664 (1995).
- 3) 百瀬春生, 微生物工学, 丸善, 116 (1997).
- 4) M. T. Mdigan, J. M. Marinko, and J. Parker, ブロック微生物学 (室伏きみ子, 関 啓子監訳), オーム社, 137 (2003).
- 5) 西山隆造, 応用微生物の基礎知識, オーム社, 41 (1981).
- 6) T. Mattila and A. J. Frost, *J. Applied Bacteriology* **65**, 455 (1988).
- 7) T. Mattila and A. J. Frost, *Food Microbiology* **5**, 219 (1988).
- 8) M. T. Mdigan, J. M. Marinko, and J. Parker, ブロック微生物学 (室伏きみ子, 関 啓子監訳), オーム社, 984 (2003).
- 9) J. W. T. Wimpenny, *J. General Microbiology* **114**, 483 (1979).
- 10) A. L. McKay and A. C. Peters, *J. Applied Bacteriology* **79**, 353 (1995).
- 11) 高橋克忠, 熱測定, **18**[1], 9 (1991).
- 12) K. Koga, Y. Nishizawa, Y. Matsumoto, T. Hara, and K. Takahashi, *Biocontrol Science* **9**[1&2] (2004), in press.
- 13) J. P. Belaich, Growth metabolism in bacteria, in: A.E. Beezer (Ed.), *Biological Microcalorimetry*, Academic press, New York, 1 (1980).
- 14) I. Lamprecht, Growth metabolism in yeast, in: A.E. Beezer (Ed.), *Biological Microcalorimetry*, Academic press, New York, 43 (1980).
- 15) 河本由香, 有本直子, 深田はるみ, 新田康則, 高橋克忠, 川崎東彦, 防菌防黴誌 **24**, 321 (1996).
- 16) A.-O. Antoce, N. Pomohaci, V. Antoce, H. Fukuda, K. Takahashi, N. Amano, and T. Amachi, *Biocontrol Science* **1**[1], 3 (1996).

### 要 旨

微生物は多くの場合、固形物に付着して存在し、コロニー状に増殖する。液体培地での増殖と固体培地でのコロニー増殖では、微生物の増殖特性が相当違うことが知られている。液体培地に比べて固体培地では微生物が増殖に必要な栄養物の取得が難しいこと、微生物がコロニー状に集積しているためコロニー内部と外の環境が相当異なっており、その環境の違いが微生物の増殖と代謝に影響を及ぼすことなどがその違いの要因であろうと考えられている。

食品の腐敗の予防、土壌微生物の挙動の把握、さらには生体への微生物の付着や感染メカニズムの把握などを知るには、固体培地での微生物の増殖挙動に関する情報が必要である。しかし、液体培地に比べて固体培地での増殖に関する情報はきわめて少ない。また、微生物の増殖を把握する方法として主に四つの方法があるが、そのいずれも固体培地で増殖する微生物の増殖を定量的に把握するには適していない。

本講座では、微生物熱量計を用いて固体培地での細菌の増殖に伴って発生する代謝熱の経時変化 ( $g(t)$ カーブ) を測定し、その  $g(t)$ カーブから得られる  $f(t)$ カーブがコロニー増殖する細菌の増殖曲線と対応していること、また、 $f(t)$ カーブを用いると細菌数が急激に増殖する対数増殖期の把握が可能であること、その時期はコロニーがまだ観察されないきわめて増殖初期の時期であること、などについて紹介し、そのことはどういう意義があるかを述べる。また、微生物用熱量計を用いて得た結果を速度論的に解析することによって、固形食品の腐敗などの複雑な現象が定量的に評価可能であること、微生物のコロニー増殖を抑制する静菌剤の効果も定量的に評価可能であることなどを述べ、微生物熱量計の有用性を紹介する。

古賀邦正 Kunimasa Koga  
東海大学開発工学部, School of High  
Technology for Human Welfare, Tokai  
Univ., TEL. 0559-68-1211, FAX. 0559-  
68-1156, e-mail: koga@wing.ncc.u-  
tokai.ac.jp  
研究テーマ: 複合微生物の挙動把握と食  
品・環境分野への応用  
趣味: ラグビー観戦, サイクリング