

残留抗菌性物質検査に使用する *Bacillus mycooides* 芽胞液の至適濃度及び保存条件の検討

食肉衛生検査所 ○田中 勲、篠原 良輔、白井 恵子※、和泉 晶子

※ 現小田原保健福祉事務所

はじめに

当所における残留抗菌性物質検査(簡易検査法)は、平成6年7月1日付け衛乳第107号「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法」に基づき標準作業書(SOP)を作成して実施している。令和元年度、*Bacillus subtilis* 及び *Bacillus mycooides*(Bm)の芽胞液作製後の保存条件を検討し、芽胞液作製後の生菌数を維持できるように、保存条件を冷蔵保存から冷凍保存(-80℃)に変更した [1]。しかし、芽胞液の保存条件に関わらず、Bm 含有検査用平板(Bm 平板)は作製後数日で平板中の菌が発育不良となることが多く、その対応に苦慮している。また、一度解凍した芽胞液の保存方法を定めておらず、再び検査に使用出来るか不明瞭であった。

そこで、今回、Bm 平板作製時に適切な濃度を得るために、芽胞液作製時の濃度及び解凍後の保存条件を検討したので報告する。

材料及び方法

1 材料

(1) 供試菌株

Bacillus mycooides ATCC11778 を供試した。

(2) 培地

AM8(Difco Laboratories)及び普通寒天培地(栄研化学(株))を使用した。

2 方法

(1) 芽胞液の作製

10⁹cfu/ml(高濃度)、10⁸cfu/ml(従来濃度)程度となるよう当所 SOP に準じて芽胞液を作製し、分注後冷凍(-80℃)で保存した。

(2) 芽胞液の保存条件

各濃度の芽胞液作製後、約1か月で解凍し、その後4か月間、冷蔵(2~10℃)するものと、再凍結と解凍を1か月毎に繰り返し行うものに分けて保存した。

(3) 生菌数測定

芽胞液作製から芽胞液解凍後4か月間、約1か月毎に芽胞液中の生菌数を測定し、表計算ソフト(Excel)でF検定を実施後、t検定で有意差を求めた。

(4) 感受性試験

芽胞液作製から芽胞液解凍後4か月間、約1か月毎に各濃度及び保存条件の芽胞液を用い、Bm 平板を当所 SOP に従い作製した。作製当日から4日間、感受性試験を毎日実施し、平板上の菌の発育状況及び阻止円直径を比較した。

なお、阻止円直径については表計算ソフト(Excel)でF検定を実施後、t検定で有意差を求めた。陽性コントロール(PC)はオキシテトラサイクリン(0.25 µg/ml)を使用し、陰性コントロール(NC)

はクエン酸アセトン緩衝液(pH6.0~6.4)を使用した。

成 績

1 芽胞液の生菌数比較

芽胞液作製時の芽胞液中の生菌数は高濃度が 1.2×10^9 cfu/ml、従来濃度が 1.1×10^8 cfu/ml であり、各芽胞液作製から芽胞液解凍後4か月後までの生菌数は表1-1及び表1-2のとおりであった。いずれの濃度及び保存条件においても生菌数は保存期間の経過とともに減少する傾向がみられたが、同一濃度の芽胞液間においては、保存条件による生菌数の統計的な有意差は認められなかった。

表1-1 冷蔵保存したBm芽胞液中の生菌数 ($\times 10^7$ cfu/ml)			表1-2 再凍結したBm芽胞液中の生菌数 ($\times 10^7$ cfu/ml)		
保存期間	高濃度	従来濃度	保存期間	高濃度	従来濃度
芽胞液作成時	120.0	11.0	芽胞液作成時	120.0	11.0
芽胞液解凍時	120.0	11.0	芽胞液解凍時	120.0	11.0
解凍1か月後 (冷蔵1か月)	150.0	9.0	解凍1か月後 (再凍結1回)	80.0	2.9
解凍2か月後 (冷蔵2か月)	80.0	3.7	解凍2か月後 (再凍結2回)	29.0	2.1
解凍3か月後 (冷蔵3か月)	79.0	9.0	解凍3か月後 (再凍結3回)	100.0	8.4
解凍4か月後 (冷蔵4か月)	48.0	1.3	解凍4か月後 (再凍結4回)	26.0	2.3

2 感受性試験の比較

各条件における感受性試験の結果は表2-1及び表2-2のとおりであった。いずれの芽胞液濃度及び保存条件においても、平板作製後の日数の経過に伴って阻止円直径が大きくなる傾向がみられた。平板作製当日の阻止円直径について、高濃度の芽胞液を用いたBm平板では、保存条件に関わらず芽胞液解凍4か月後まで当所SOPの芽胞菌作製時の基準である阻止円直径 14 ± 1 mmを満たしており、さらに芽胞液作製時との阻止円の大きさの差が $-0.3 \sim +0.8$ mmと安定していた。一方、従来濃度ではいずれの保存条件においても芽胞液解凍1か月後以降に、 14 ± 1 mmを逸脱するものが多かった。

また、高濃度の芽胞液を用いた平板においては、今回の実験でNCに阻止円が形成されることはなく平板上の発育も良好であった。従来濃度の芽胞液を用いた平板においては、平板作製後日数を経過するに伴い平板全体の菌の発育が薄くなり、芽胞液解凍1か月後以降では、平板作製4日後のNC周囲に阻止円が形成されるものが多くみられた。

なお、今回の検討において芽胞液の保存条件と阻止円直径に統計的な有意差は認められず、平板上の菌の発育状況においても差異は確認出来なかった。

表2-1 冷蔵保管した芽胞液を用いて作成したBm平板による阻止円直径(mm)

平板作製時期	高濃度		従来濃度	
	平板作製当日	平板作製4日後	平板作製当日	平板作製4日後
芽胞液作成時	13.5	14.6	14.1	15.7
芽胞液解凍時	13.6	14.9	14.5	16.3
解凍1か月後 (冷蔵1か月)	13.3	14.4	16.0	17.1*
解凍2か月後 (冷蔵2か月)	13.9	14.6	15.5	16.6
解凍3か月後 (冷蔵3か月)	13.4	15.2	15.9	17.5*
解凍4か月後 (冷蔵4か月)	13.9	14.6	16.2	17.5*

※NCに阻止円形成

表2-2 再凍結した芽胞液を用いて作成したBm平板による阻止円直径(mm)

平板作製時期	高濃度		従来濃度	
	平板作製当日	平板作製4日後	平板作製当日	平板作製4日後
芽胞液作成時	13.5	14.6	14.1	15.7
芽胞液解凍時	13.6	14.9	14.5	16.3
解凍1か月後 (再凍結1回)	13.2	14.1	16.1	17.0*
解凍2か月後 (再凍結2回)	14.3	14.3	15.1	16.2
解凍3か月後 (再凍結3回)	13.4	15.0	15.1	17.2*
解凍4か月後 (再凍結4回)	14.0	15.2	15.9	17.6*

※NCに阻止円形成

考 察

芽胞液中の生菌数は、高濃度では解凍4か月後までいずれの保存条件においても 10^8 cfu/ml 以上であったが、従来濃度では解凍1か月後には 10^7 cfu/ml 程度になることが確認された。また Bm 平板作製時の芽胞液として、 10^9 cfu/ml 程度の濃度の芽胞液を用いることにより、いずれの保存条件においても発育が良好で安定した平板が作製できることが判明した。

一方で、平板作製時に芽胞液の濃度が 10^7 cfu/ml 程度になると阻止円直径が大きく、平板全体の菌の発育も薄くなり、平板作製4日後にはNC周囲に阻止円が形成されるものが認められたことから、安定した試験結果を得るためには 10^8 cfu/ml 以上の濃度の芽胞液を用いることが適当であると考えられた。

このことから、いずれの保存条件においても従来濃度の芽胞液を使用する場合は、解凍後速やかに使い切ることが望ましいと思われた。

まとめ

残留抗菌性物質検査に使用する Bm 芽胞液の至適濃度及び保存条件の検討を行った。その結果、芽胞液解凍後の保存期間が4か月程度であれば、再凍結と解凍を1ヶ月毎に繰り返した芽胞液と冷蔵保存した芽胞液との間で生菌数及び感受性試験の結果に差が生じない可能性があることがわかった。また同様の保存条件であれば、Bm 芽胞液を 10^9 cfu/ml 程度の濃度で作製し、その後 10^8 cfu/ml 以上を維持することにより発育が良好で安定した Bm 平板を作製できることがわかった。

[1] 荒木美緒他：残留抗菌性物質検査に使用する芽胞液の保存条件の検討, 全国食肉衛生検査所協議会微生物部会, 2020