

スルファニルアミド—硝酸塩寒天重層法による

漬物原料野菜由来硝酸還元菌の計数

宮尾 茂雄

Enumeration of Nitrate-Reducing Bacteria in Vegetables
Used for Pickles by SAN (Sulfanilamide-Nitrate) Agar
Overlay Method

Shigeo MIYAO

Summary

For the enumeration or determination of nitrate-reducing bacteria in vegetables used for pickles easily, the use of SAN (Sulfanilamide-nitrate) agar overlay and replica methods was studied. As comparison of SAN agar overlay and conventional test tube method for the nitrate reduction test against 17 stock cultures was carried out, it was found that the results obtained by SAN agar overlay method were in good agreement with the results by test tube method as usual. Nitrate-reducing bacteria in cabbages, chinese cabbages, cucumbers and turnips used for pickles were enumerated and isolated by SAN agar overlay method. Number of nitrate-reducing bacteria reached $10^5 \sim 10^6/g$ and the ratio of cell counts of Gram-positive and nitrate-reducing bacteria in those of total Gram-positive bacteria in each vegetables were $1/100 \sim 1/10$, whereas the ratio of cell counts of Gram negative nitrate-reducing bacteria in those of total Gram-negative bacteria were about $1/2$. *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, coryneforms, *Pseudomonas*, *Enterobacter* and *Klebsiella* were isolated from cabbages and chinese cabbages as nitrate-reducing bacteria. Especially, *Bacillus* and *Micrococcus* in the Gram-positive nitrate-reducing bacteria, *Pseudomonas* and *Enterobacter* in the Gram-negative ones were dominant respectively.

野菜に付着している硝酸還元菌の作用によって、漬物の製造および保存中に、野菜に含まれている硝酸塩が還元され、亜硝酸が生産されることは良く知られている。

Hallら¹⁾はニンジンから分離した硝酸還元菌をニンジンジュースに接種し、亜硝酸が蓄積することを報告している。畑ら²⁾は大根に含まれる硝酸および亜硝酸濃度を調べるとともに、大根の成長、貯蔵、漬物加工における硝酸、亜硝酸量の変化について報告している。松井ら⁸⁾および柳原ら⁹⁾は漬物に蓄積する亜硝酸は漬物の中に存在する硝酸還元菌の作用に起因すると報告している。

前報¹⁰⁾で、漬物の製造過程での亜硝酸濃度の変化と

硝酸還元菌との関係について検討を加え、このなかで、*Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* が主要な硝酸還元菌であることを明らかにするとともに、硝酸還元菌の量的な変化が漬物におけるミクロフロラおよび乳酸の生成に影響をおよぼしていることを示唆した。

硝酸還元菌の計数に関してはMPN法¹¹⁾を用いるのが一般的であるが、MPN法は操作が煩雑であるとともに硝酸還元菌を分離するのが困難である欠点を有している。

そこで著者は漬物に関連の深い硝酸還元菌の簡易な計数と分離を可能とするための方法としてSAN (Sulfani-

lamide-nitrate) 寒天重層法を考案し、その有効性について検討を加えたので報告する。

材料および実験方法

1. 使用菌株

実験に使用した17菌株は当研究室で保存しているものを用いた。なお、それらのうちの7株は漬物原料野菜および発酵漬物より分離、同定したものである。供試菌株の前培養は、培地として次の組成のもの(トリプチケースペプトン5g, 酵母エキス2.5g, ブドウ糖1g/蒸留水1ℓ)を用い、30℃で1~2日間培養した。

2. 供試野菜

実験に使用した野菜は、キャベツ、白菜、大根、キュウリで当試験場農場で栽培されたものを使用した。

3. 硝酸還元試験

供試菌株をそれぞれ最小試験管を用い、硝酸塩培地(0.1%KNO₃, 0.5%トリプチケースペプトン, 0.25%酵母エキス, 0.1%ブドウ糖)で30℃, 3~5日間培養後、硝酸塩の還元を調べるために、それぞれの試験管に0.8%スルファニル酸/5N酢酸および0.1%N-1-ナフチルエチレンジアミンジハイドロクロライド溶液を数滴ずつ加え、亜硝酸の生成をみた。そして、深紅色を呈したものを亜硝酸生成陽性とした。なお、陰性のものについては亜鉛粉末を加え、未反応の硝酸塩を還元させることにより確認した。

4. SAN寒天重層法による硝酸還元菌の計数および分離

供試原料野菜は細切後、10gを90mlの滅菌蒸留水の入ったホモジナイズ用カップに採取し、ホモジナイズし、検液を調製した。検液は滅菌蒸留水を用いて、10倍段階希釈を行い、その希釈液の0.1mlをプレートカウント寒天培地の表面にコンラージガラス棒で均一に塗布した。塗布後の培地は30℃で2~3日間培養後、コロニーの発生した培地上に固化直前まで冷やした15mlのSAN寒天を静かに重層した。寒天が固化してから30℃で約15分間静置後、0.1%NEDA(N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride)/2N塩酸を培地表面に注加し、亜硝酸の生成によりコロニーおよびコロニーの周辺部が赤変したものを計数し、硝酸還元菌数とした。硝酸還元菌の分離にあたってはSAN寒天重層法とレプリカ法を併用して行なった。すなわち、プレートカウント寒天培地上のコロニーをSAN寒天の重層の前にレプリカ法によって転写、培養し、SAN寒天重層法によって明らかとなった硝酸還元菌のコロニーの位置と対応させ、比較するこ

とによって釣菌を行なった。SAN寒天重層法についてはFig. 1に、SAN寒天の培地組成についてはTable 1に示した。

5. 漬物原料野菜の細菌の計数および硝酸還元菌の同定

漬物原料野菜のグラム陽性菌の計数は0.25%フェニルエチルアルコール加プレートカウント寒天培地を用い、30℃, 48時間, グラム陰性菌の計数はCVT寒天培地(日水製薬)を用い、30℃, 48時間培養後行なった。分離細菌の同定はBergey's Manual¹²⁾とCowanら¹³⁾の成書にもとづいて行なった。

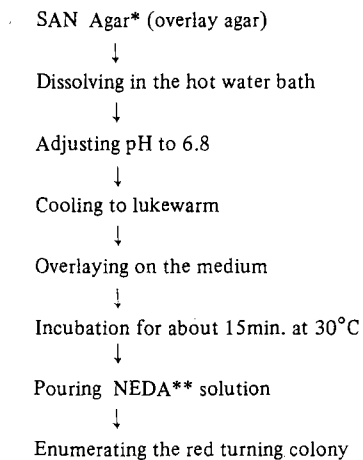


Fig. 1 SAN Agar overlay method for the enumeration of nitrate reducing bacteria

*: Sulfanilamide-Nitrate Agar

** : N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride

Table 1 Composition of SAN Agar and NEDA solution for the SAN Agar overlay method

SAN Agar		NEDA solution	
Glucose	0.5 g	NEDA*	0.1 g
KNO ₃	1.0 g	2N HCl	100 ml
Sulfanilamide	0.2 g		
Agar	2.0 g		
Water	100 ml		

*: N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride

実験結果および考察

1. 保存菌株に対するSAN寒天重層法と試験管法による硝酸還元試験の比較

漬物に関連の深い保存菌株17株を対象に、コロニー数が培地上に30~100形成するように培養液を希釈し、プ

レートカウント寒天培地に各0.1 mlを塗布した後、培養し、SAN寒天重層法による硝酸還元試験の有効性について検討を加えた。試験管法による硝酸還元試験は常法どおり、硝酸塩培地で培養後、亜硝酸の生成を調べた。その結果はTable 2に示した。*Micrococcus luteus* の一株が重層法で陰性、試験管法で陽性となり一致せず、また、*Pseudomonas* sp. は重層法で陰性、試験管法で弱い陽性となり一致しなかったが、その他の菌株においては全て一致したことからSAN寒天重層法による硝酸還元試験はかなり有効で、かつ簡易にできることがわかった。

2. 野菜分離菌株に対するSAN寒天重層法と試験管法による硝酸還元試験の比較

キャベツおよびカブを対象とし、それらから無作為に250の菌株を分離し、それぞれの菌株に対してSAN寒天重層法と試験管法による硝酸還元試験を実施し、比較検討した結果をTable 3に示した。硝酸還元試験において両方法が一致した比率は共に陽性の場合で19.6%、共に陰性の場合で76.8%となり、両方を合わせると96.4%で高い一致率を示し、一方、不一致率は3.6%と低い値にとどまった。したがって、この結果からSAN寒天重層法は硝酸還元試験として簡易で有効な方法であることが知られた。

Table 2 Comparison of SAN Agar overlay method and test tube method for the nitrate reducing test against named strains

Strains	Overlay	Test tube*
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	—	+
<i>Micrococcus varians</i> GP-1	+	+
Coryneform bacteria GP-4	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 209JC1	+	+
<i>Arthrobacter</i> sp. GP-7	—	—
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 9135	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	—	—
<i>Pseudomonas fluorescens</i> C-24	+	+
<i>Pseudomonas</i> sp. T096	—	+w
<i>Pseudomonas</i> sp. T045	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> E-1	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI 602	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 3301	+	+
<i>Erwinia carotovora</i> IFO 3380	+	+
<i>Flavobacterium lutescens</i> IFO 3084	+	+

+ : Nitrate reducing positive — : Nitrate reducing negative

w : Nitrate reducing weakly positive

* : Put a few drops of 2% sulfanilamide/85% phosphoric acid and 0.5% NEDA solution in each broth culture to be tested.

A distinct pink or red in the broth indicates the presence of nitrite

Table 3 Comparison of SAN Agar overlay method and test tube method* for the nitrate reducing test against the bacteria isolated from the cabbages and turnips

Nitrate reducing test		Number of bacteria					Total
Overlay	Test tube	Cabbage	Cabbage	Cabbage	Turnip	Turnip	
+	+	10	19	5	3	12	49 (19.6%)
-	-	40	31	39	46	36	192 (76.2%)
+	-	0	0	0	0	0	0 (0.0%)
-	+	0	0	6	1	2	9 (3.6%)
Total		50	50	50	50	50	250 (100.0%)

+ : Nitrate reducing positive - : Nitrate reducing negative * : See Table 2

Table 4 Number of nitrate reducing bacteria in cabbage, chinese cabbage, cucumber and turnip

	Cabbage	Chinese cabbage	Cucumber	Turnip
Total cell counts*1 (NO ₃ reducing bacteria)	4.9×10 ⁶ (2.2×10 ⁶)	8.9×10 ⁶ (1.2×10 ⁶)	7.6×10 ⁶ (6.7×10 ⁵)	8.0×10 ⁵ (1.7×10 ⁵)
Gram positives counts*2 (NO ₃ reducing bacteria)	2.5×10 ⁴ (3.0×10 ³)	4.0×10 ⁵ (8.0×10 ³)	4.0×10 ⁶ (2.1×10 ⁵)	3.2×10 ⁵ (4.3×10 ³)
Gram negatives counts*3 (NO ₃ reducing bacteria)	7.6×10 ⁵ (3.9×10 ⁵)	6.2×10 ⁶ (4.8×10 ⁶)	1.3×10 ⁶ (4.0×10 ⁵)	1.2×10 ⁵ (5.9×10 ⁴)

*1: Plate-counted on the PCA agar

*2: Plate-counted on the PCA agar containing 0.25% β-phenylethylalcohol

*3: Plate-counted on the CVT agar

Table 5 Microflora of nitrate reducing bacteria in cabbage and chinese cabbage

Vegetables	Genera	Number of nitrate reducing bacteria
Chinese cabbage	<i>Micrococcus</i>	45
	<i>Bacillus</i>	3
	<i>Pseudomonas</i>	38
	<i>Alcaligenes</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	10
	<i>Klebsiella</i>	2
Cabbage	<i>Micrococcus</i>	6
	<i>Staphylococcus</i>	1
	<i>Bacillus</i>	10
	<i>Pseudomonas</i>	12
	<i>Alcaligenes</i>	2
	<i>Enterobacter</i>	24
	<i>Klebsiella</i>	2
<i>Erwinia</i>	1	

3. SAN寒天重層法による漬物原料野菜の硝酸還元菌の計数

SAN寒天重層法が硝酸還元試験を簡易に行なうのに有効であることが明らかとなったので、漬物原料野菜であるキャベツ、白菜、キュウリ、カブを対象に硝酸還元菌の計数に応用した結果をTable 4に示した。生菌数はいずれの野菜においても約 $10^5 \sim 10^6$ cfu/g、グラム陽性菌数は約 $10^4 \sim 10^6$ cfu/g、グラム陰性菌数は約 $10^5 \sim 10^6$ cfu/gであり、硝酸還元菌数は約 $10^5 \sim 10^6$ cfu/gに達していた。グラム陽性の硝酸還元菌が全グラム陽性菌数に占める割合は1/100~1/10と低い値であったが、一方、グラム陰性の硝酸還元菌が全グラム陰性菌数に占める割合は約1/2に達していた。このことから、野菜に付着しているグラム陰性菌の多くが硝酸還元能を有していることがわかった。

4. 漬物原料野菜の硝酸還元菌の細菌叢

キャベツおよび白菜からSAN寒天重層法とレプリカ法を組合せることによって分離したそれぞれ61, 56の菌株を同定しTable 5に示す結果を得た。キャベツの場合、グラム陽性菌では *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* およびCoryne型細菌が主要菌で、特に、*Bacillus* と *Micrococcus* が硝酸還元菌の優勢菌であった。グラム陰性菌においてはEnterobacteriaceaeに属する細菌が硝酸還元菌として一般的で、特に *Enterobacter* が優勢であった。その他には *Pseudomonas*, *Alcaligenes* などが分離された。白菜の場合はグラム陽性菌ではキャベツの場合と同様、*Bacillus* と *Micrococcus* が主要な硝酸還元菌であった。グラム陰性菌においてはEnterobacteriaceae, *Pseudomonas* および *Alcaligenes* が分離され、特に *Enterobacter* や *Klebsiella* が優勢であった。

摘 要

発酵漬物の製造および流通過程で生じる亜硝酸は漬物の品質に影響をおよぼし、その多くは原料野菜に付着している硝酸還元菌によることが知られている。そこで、漬物用野菜に付着している硝酸還元菌を簡易に計数および同定する方法としてSAN (Sulfanilamide-nitrate) 寒天重層法とレプリカ法を用いる方法に検討を加えた。

SAN寒天重層法と従来の試験管法を17株の保存菌株および野菜からの分離細菌を対象に比較検討したところ、高い一致率を示した。また、原料野菜を対象に硝酸還元菌の計数をSAN寒天重層法を用いて行なった結果、原料野

菜に付着している硝酸還元菌数は $10^5 \sim 10^6$ cfu/gに達しており、それらの占める割合はグラム陽性菌で1/100~1/10、グラム陰性菌で1/2であった。さらに、分離した硝酸還元菌を同定したところ、グラム陽性菌では *Bacillus*, *Micrococcus* が、グラム陰性菌では *Enterobacter*, *Pseudomonas* が優勢であった。

文 献

- 1) Hall, C.B. and Hicks, J.R. : *J. Food Sci.*, 42, 549 (1977)
- 2) 畑 明美, 緒方邦安 : 日本栄養食糧学会誌, 22, 58 (1969)
- 3) 同 上 : 日本栄養食糧学会誌, 24, 345 (1971)
- 4) 同 上 : 日本栄養食糧学会誌, 24, 485 (1971)
- 5) 畑 明美, 緒方邦安 : 日本食品工業学会誌, 23, 132 (1976)
- 6) 同 上 : 日本食品工業学会誌, 23, 257 (1976)
- 7) 同 上 : 日本食品工業学会誌, 25, 280 (1976)
- 8) 松井 : 日本農芸化学会誌, 25, 280 (1976)
- 9) 柳原, 駒田, 米原, 山田 : 日本食品衛生学雑誌, 4, 343 (1963)
- 10) 宮尾茂雄, 青木睦夫 : 東京都農試研報, 12, 121 (1986)
- 11) Alexander, M. : *Methods of Soil Analysis, Part 2*, ed. by Black, C. A. et al, p.1484, American Society of Agronomy Inc., Wisconsin (1965)
- 12) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. ed. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 13) Cowan, S. T. : *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria* 2nd ed. Cambridge Univ. Press (1974)