

耐熱性細菌에 관한 研究 (第 2 報)

嫌氣性細菌의 耐熱성에 關하여

李 啓 瑚 · 張 建 型

(서울대학교農科大學 · 建國大學校)

Studies on Thermal Resistance Bacteria (Part 2)

On the Thermal Resistance of Anaerobic Bacteria.

Lee, Ke Ho and Chang, Kun Hyung

(Agri. College of Seoul Univ.) · (Kon-Kuk. Univ.)

Abstract

The purpose of this paper is to study on the thermal death time curve and F-values, and morphological and physiological characteristics observed for the identification. The three strains of thermal resisting anaerobic bacteria isolated from unheated various cans and swelled cans and the different soils collected from the wide area in Korea.

The results obtained in the light of the manual of Bergey's for the identification of the anaerobic bacteria have been shown that the three strains of anaerobic bacteria are pertained to *Cl. sporogenes* B-41 *Cl. butyricum* B-72 & *Cl. botulinum* Type E B-163.

The optimum temperature, pH and thermal resistance, thermal death point of the anaerobic have been measured.

結 論

통조림에 汚染되어 變敗시키는 耐熱性細菌으로 好氣性胞子形成菌은 前報^(1,2)와 같이 *Bac. subtilis* *Bac. mesentericus* 등 嫌氣性胞子形成菌으로는 *Cl. botulinum*^(2,3) *Cl. welchii* 등을 들수 있는데 이들 胞子の 耐熱성과 pH에 對해서 또 胞子數와 殺菌溫度 및 殺菌時間 그리고 통조림 內容物中 여러化學的인 殺菌劑와 抵抗性⁽⁵⁾ 등에 對해서 여러 報告가 되어있다.

著者들은 우리나라에 存在하는 耐熱성이 강한 嫌氣性胞子形成菌을 分離하여 一連의 實驗을 하였다. 이 菌들의 致死溫度와 致死時間을 究明하여 통조림 最適殺菌條件을 確立케 하고자 이들 腐敗細菌의 汚

染來源이 되는 各地의 土壤 그리고 통조림제조공장 근처의 토양 및 통조림 內容物일 것이라 生覺하여 이에 關連되는 各 地區의 토양과 계, 새우, 송이 등의 未殺菌통조림 그리고 腐敗통조림관등을 蒐集하여 耐熱性嫌氣性胞子 形成菌을 分離하고 耐熱성을 screening 하여 가장 耐熱성이 강한 3 菌株을 選拔하여 이들에 對한 F-value 를 求하였으며 이들 菌의 培養의 形態學的, 生理學의 特性을 究明하여 同定하였기로서 報告한다.

材料 및 方法

土壤 및 통조림 : 全國 34 個地域의 作土 및 深土 (30cm 地下部位) 68 個 계, 새우, 콩치 오징어 서양 송이버섯 통조림(未殺菌된것) 5 個와 쇠고기 고

추장 제거 통조림 외 8種의 腐敗 膨脹관을 各各 蒐集하였다.

使用培地: 分離 및 培養用培地 thioglycollate agar, Difco nutrient agar(Difco), malt agar M/15, phosphate buffer solution (pH 6.8) and mineral oil bath

(1) 嫌氣性 耐熱性胞子形成菌의 分離

Sample 調製: 各 sample 1g or 1cc 적을 滅菌된 aluminium cap test tube(16×160 Pyrex)에 取하고 100C 의 boiling water bath 中에서 30分間 處理함으로써 耐熱性이 아닌 細菌은 殺菌시키고 耐熱性胞子形成菌만 殘存시킨後 滅菌된 M/15 phosphate buffer solution (pH 6.8)으로서 10進法에 依한 無菌의인 方法으로 稀釋하여 sample에 供하였다.

嫌氣性細菌 分離操作: Diluted sample solution 1ml 를 還元劑가 들어 있는 thioglycollate agar media 15~20ml 적 分注된 大形의 test tube(30×250밀은 고무栓)에 接種하며 重戶方法으로 34°C 의 incubator 中에서 培養시키게하고 그 上部에 liquid paraffine 을 無菌의으로 加하여 空氣外의 접촉을 차단시켜 Anaerobic condition 으로 하였다.

重戶된 test tube 의 agar media 中에 나타나는 colony 를 tube 밑의 고무栓을 빼고서 無菌의으로 獨立 colony 를 採菌하여 stab culture 로서 保存培養시켰으며 이로서 sporulation 을 充分히 시켜 spore 給源으로 하였다. 이때 dilution 如何에 따라서 獨立 colony 의 出現이 左右됨으로서 colony 를 잘 回收할 수 있을 程度로 dilution 에 留意함과 아울러 agar 濃度를 4~5%로 增量해주어야 獨立 colony 回收에 萬全을 期하게되는 點도 注意하여야 한다.

(2) Heat resistance screening⁽¹⁾

耐熱性의 screening 은 保存培養의 stab culture 에

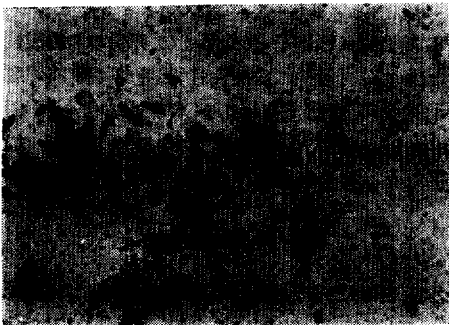


Fig. 1 *Cl. sporogenes* B-41

서 2週間 充分히 sporulation 시킨 test tube 中에서 白金線으로 glass tube 中의 滅菌된 phosphate buffer solution 에 接種하여 spore suspension 으로하고 一部는 spore concentration 을 檢토허게하고 一部는 heat resistance 를 screening 하였으며 方法은 前報⁽¹⁾에 準하였다.

(3) 嫌氣性細菌의 培養

a) Petri dish 上의 嫌氣培養: 嫌氣培養은 biological method⁽⁶⁾에 準하였다. 꼭맞는 petri dish 뚜껑만을 두개서로 코겐 다음 scotch tape 로 封해서 外氣의 酸素流通을 차단시키게 하고 Petri dish 中의 酸素는 好氣性菌의 生長에 利用케하고 嫌氣性細菌을 發育시키는데 이때 好氣性菌을 3~5 hrs 먼저 接種함이 成績이 좋았다. Petri dish 뚜껑한 쪽에 nutrient agar 로서 pour plate 로하고 plate 半은 anaerobic bacteria 를 接種케 하고 나머지 半은 aerobic bacteria 이고 fast growth type 인 *Serratia marcescens* 나 *Staphylococcus aureus* 를 接種하고 封해서 incubation(34°C) 을 32hrs. 以上하여 觀察하였다.

b) Anaerobic bacteria 의 諸特性檢討: 嫌氣性 耐熱性細菌의 培養上: 特性과 形態學의 生理學의 特性을 routine test 로서 Manual of microbiological methods⁽⁶⁾에 依하여 綜合的인 檢討를하였고 그 結果와를 Bergey's manual⁽⁷⁾을 基礎로하고 對照하여 綜合比較함으로써 同定을 하였다.

結 果

前熱處理함으로써 又先 嫌氣性 耐熱性 胞子形成菌 總342株를 分離하여 이것을 供試菌으로 heat resistance screening 을 하여 最終的으로 耐熱性이 강한 3 菌株을 選拔하였다. 120±1°C 中에서 2,4 分 견디는 가장 耐熱性이 강한菌株 B-163 과 2 分 견디는 B-41, B-72 菌株을 各各 選拔하고 이들에 對한 F-value

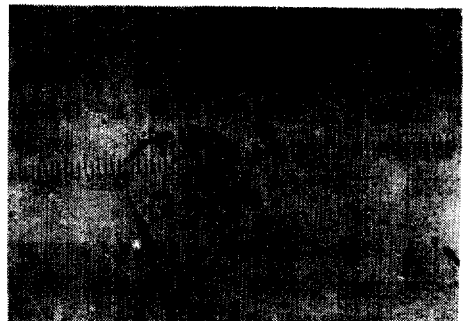


Fig. 2 *Cl. butyricum* B-72

물 Table 1 과 같이 求하였다. 그리고 Table 2, 3, 4, 5 와 같은 培養上의 諸特性과 形態學的, 生理學的의 여러 性質을 檢討하였다.

Table 1. Heat resistance of isolates

Strain No.	Spore conc.	Heat treated	
		Temperature (°C)	Time(min)
41	7×10^8	120 ± 1	2.0
72	5×10^8	120 ± 1	2.0
163	6×10^8	120 ± 1	2.4

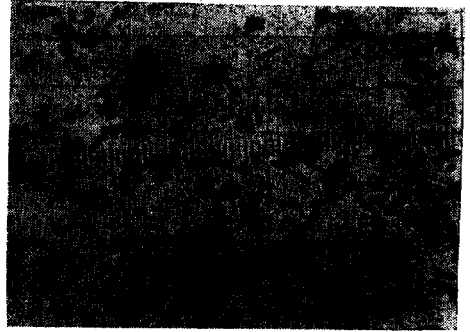


Fig.3 *Cl. botulinum* Type E 163

Table 2. Culturing characteristics of isolates

Strain No	Glucose agar surface colonies (anaerobic)	Glucose agar deep colonies (anaerobic)	Plain agar slant	Glucose broth	Litmus milk	Opt. temp.
41	small irregular transparent opaque yellowish white	Wooly balls nodular centers creamy white	no growth	turbid grs produced	softly coagulated reduced slow peptonization	37°C growth well
72	irregular slightly raised moist creamy white	Biconvex entire yellowish white	no growth	abundant turbidity	coagulation reduced	34°C growth well
163	small irregular creamy white	wooly balls creamy white	no growth	little growth	no coagulation slightly changed	30°C growth well

Table 3. Morphological characteristics of isolates

Strain No	Vegetative cells						Spore	
	Gram stain	Form & arrangement	Flagella	Motility	Chain	Size of majority (μ)	Endospore	Form & arrangement
41	+	rods plectridial	+	wotile	—	0.6~0.7 \times 3~6	+	ovoid terminal
72	+	rods clostridial	+	"	—	0.5~0.7 \times 4~6	+	" "
163	+	" "	+	"	—	0.5~0.7 \times 5~7	+	" "

Table 4. Physiological characteristics of isolates

Strain No.	Catalase	Gas in fermentation tube	Putrid odor	Gelatin & glucose gelatin	Nitrate	Indol	Skatol	Relation to free oxygen
41	—	+	+	liquefaction & blackening	rapidly reduced	+	+	strictly anaerobe
72	not known	+	+	no liquefaction	not reduced	—	±	"
163	—	+	+	liquefaction & blackening	±	+	±	"

Table 5. Acid and gas formation from carbohydrates

Strain No	Mono saccharides							Disaccharides			
	Xylose	Arabinose	Rhamnose	glucose	fructose	Galactose	mannose	Sucrose	Maltose	Lactose	Trehalose
41	±	±	—	+	+	+	±	—	+	—	—
72	+	±	—	+	+	+	±	+	±	+	—
163	±	±	—	+	+	—	±	+	+	—	—

Strain No.	Poly saccharides					Poly alcohol					Glycoside	
	Raffinose	Dextrin	Starch	Cellulose	Inulin	Glycerol	Adonitol	Dulcitol	mannitol	Sorbitol	Inositol	Salcin
41	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
72	—	—	+	—	—	—	—	—	+	±	—	+
163	—	±	±	—	—	±	+	—	—	+	+	±

以上 여러 Table 의 結果를 綜合해서 Bergey's manual 에 對照했을 때 strictly anaerobic, catalase negative 임으로 *Clostridium Genus* 에 屬하였으며 rods, 그리고 sporulation 하면 swollen 으로 되고 Clostridial 이나 plectridial 로 되고 motile 그리고 cellulose 는 全然 醱酵치 못하는 點의 Endospore 形成 및 ovoid form, glucose 醱酵 또한 glucose gelatin 의 liquefaction 또는 not liquefaction 하는 點이 3 菌株 共通의 一致點을 알 수 있다. 이들 3 菌株 species 의 同定을 보면 isolated strain B-41 은 *Clostridium sporens* 에 isolated strain B-72 는 *Clostridium butyricum* 에 Isolated strain B-163 은 *Clostridium botulinum* Type E 와 carbohydrates 利用을 보아도 各各 吸似한 點이 多分함으로 以上과 같이 推定的으로 近緣菌이라 同定을 하게 되었고 이들 모두 土壤이 分離源이었음을 아울러 밝혀준다.

Clostridium botulinum Type E B-163 은 Sommer, Sugiyama 가 보고한 F-value 와 거의 비슷비슷한 값이었고 *Clostridium welchii* (Perfringens) 가 selection 되지 않았음은 sample collection 이 未備하지 않았나 生覺된다.

摘 要

통조림 腐敗原因이 되는 耐熱性 嫌氣性 孢子 形成 菌을 우리나라 各地方의 土壤과 未殺菌 通조림 腐敗 通조림판에서 分離, 分離 菌株에 對한 耐熱性을 screening 하여 耐熱性이 강한 3 菌株을 選拔하고 F-value 를 求하고 培養上의 諸特性 形態學의 生理學的

特性을 綜合檢討하여 *Clostridium sporogenes* B-41, *Clostridium butyricum* B-72, *Clostridium botulinum* Type E B-163 近緣菌임을 同定하였다.

Reference

- 1) KE HO, LEE, YOUNG RACK, CHOI & KU N HYUNG, CHANG, 1964 Studies on thermal processing of canned foods. Report of Army Res. & Testing Lab. 3, 21
- 2) SOMMER, E.W, 1930 Heat resistance of spores of *Cl. botulinum*. J. Infectious Diseases 46, 85
- 3) SUGIYAMA, H, 1951 Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Cl. botulinum*. J.Bact. 62, 85
- 4) HEEDLEE, M.R, 1931 Thermal death point of spore of *Cl. welchii*. J. Infectious Diseases 48, 468
- 5) ANDERSON, E.E & ESSELEN, W.B., 1949 Effect of acids, salts, sugars & other food ingredients on thermal resistance of Bac. thermoacidulans. Food Res. 14, 499
- 6) PELCZAR, M.J & Mc Clung, L.S. 1950 Manual of microbiological methods (Mc GrowHill)
- 7) Breed, R.S Murray, E.G & Smith, N.R., 1957 Bergey's manual of determinative bacteriology 7 th edition (William & Wilkins)
- 8) LEE, KE HO & CHANG, KUN HYUNG 1965 Studies on thermal resistance bacteria (Part.1) On the thermal resistance of aerobic bacteria. Kor. Jour. Microbiol. 3, 1.11