

〔醸酵工学 第58巻 第2号 63-69. 1980〕

メタノール資化性細菌の寒天培地上でのコロニーの発現

浦上 貞治・竜田 洋子

三菱瓦斯化学(株)新潟研究所

Formation of colonies of methanol-utilizing bacteria on agar medium. URAKAMI, T. and Y. TATSUTA (Niigata Laboratories, Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc., 5, Enoki-cho, Niigata 950) Hakkokogaku 58: 63-69. 1980.

Formation of colonies of methanol-utilizing bacteria on agar medium was influenced by the composition of media, kinds of agar and sterilization time. Separate sterilization of components of the medium and agar had a good effect on the formation of colonies. Further, addition of Na-thioglycollate before sterilization also had a good effect on the formation.

Viable counts during preservation on agar medium or in liquid medium were made. Preservation on agar medium at 5°C was better than in liquid medium and viable counts decreased in by half after 80 days.

細菌がメタノールを資化することは、比較的古くから知られており、1892年Loew¹⁾は *Bacillus methylicus* が、また、1914年、Bassalik²⁾は *Bacillus extorquens* がメタノールを資化することを報告している。その後、数十年の間、報告はみられなかったが、1959年、Kaneda と Roxburgh³⁾により *Pseudomonas* sp. PRL-W4 が分離されて以来、Harrington と Kallio による *Pseudomonas methanica*,⁴⁾ *Pseudomonas* sp. AM-1,⁵⁾ *Vibrio extorquens*,⁶⁾ *Pseudomonas* sp. M-27,⁷⁾ *Methylomonas methylavora*,⁸⁾ および *Pseudomonas methylotropha*⁹⁾ など数多くの細菌が分離されている。そして、分離に用いられた培地は、いろいろなものがあるが、それらの培地についてコロニーの発現の点から検討されたものはみられない。

著者らは、1971年より数年間、日本各地の土壌、水よりメタノール資化性細菌の分離を試み、数多くの細菌を分離し保存してきた。¹⁰⁾ その間、寒天培地上でコロニーの発現が不均一であったり、保存中に死滅することがたびたび観察された。そこで、メタノール資化性細菌の寒天培地上のコロニーの発現を検討し、コロニーの発現のよい培地を作成した。またその培地を用いて、細菌の保存中における生菌数の変動を調べ、細菌の保存方法を検討したのでその結果について報告する。

実験方法

微生物 供試菌株として、土壌より分離したメタノール資化性細菌 BNK-84 株を用いた。BNK-84 株は極鞭毛を有するグラム陰性桿菌で、肉汁に生育できない“obligate”な菌株である。¹⁰⁾

寒天 (1)和光純薬製寒天、(2)栄研化学製寒天、(3)純正化学製寒天、(4)国産化学製寒天、(5)Difco Bacto Agar、(6)Difco Agar Purified、(7)Difco Agar Noble を用いた。

培地組成 Table 1 に示す6種類の培地を用いた。寒天培地は、各々の培地に寒天を1.5%添加して作成した。

培地の滅菌 液体培地の滅菌は、蒸気吹き込み型オートクレーブで、120°Cで15分間行った。なお、寒天培地の滅菌は、寒天を溶かさないうまま上記オートクレーブに入れて行い、滅菌後はできるだけ短時間で取り出し、寒天培地を作成した。滅菌時間は、オートクレーブ内が120°Cになってからの時間で示した。

培養 振とう培養、および静置培養を行った。培養温度は、使用菌株 BNK-84 株の最適温度である37°Cとし、種培養はすべてA培地で1日液体培養した細胞を用いた。

コロニー計測 培養液あるいは寒天培地上の細菌

Table 1. Composition of media.

Components	Medium A	Medium B	Medium C	Medium D	Medium E	Medium F
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	3.0 g				
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.0 g	—	—	—	—	—
KH ₂ PO ₄	4.0 g	1.4 g	—	1.0 g	—	2.0 g
K ₂ HPO ₄	—	—	—	3.0 g	3.0 g	7.0 g
NaH ₂ PO ₄	—	—	0.9 g	—	—	—
Na ₂ HPO ₄	—	2.1 g	2.1 g	—	—	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g					
FeC ₆ H ₅ O ₇ · XH ₂ O	30 mg					
CaCl ₂ · 2H ₂ O	30 mg					
MnCl ₂ · 4H ₂ O	5 mg					
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5 mg					
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.5 mg					
CH ₃ OH*	10 g					
Distilled water	1000 g					
(pH)**	(7.0)	(7.0)	(7.0)	(7.0)	(7.0)	(7.0)

* Methanol was added after sterilization by autoclave.

** pH was adjusted with 1 N HCl or 1 N NaOH.

細胞を生理食塩水に懸濁し、希釈し、その希釈液 0.1 ml を寒天平板培地に塗抹し、3日間培養した。コロニー数は、コロニーカウンターで計測した。

メタノールの定量 培養液中のメタノール濃度は、TCD型ガスクロマトグラフィーで定量した。

実験結果および考察

培地上でのコロニーの発現

1) 培地組成 和光純薬製寒天あるいは Difco Bacto Agar を 1.5% 含有する (A)~(F) の 6 種類の寒天培

地を作成し、培地組成の影響を調べた。オートクレーブ時間は15分とした。

Table 2 に示すように、コロニーの発現は A, F 培地に極端に悪く、コロニーの発現の良好であった他の培地に比較して約 10⁻² (和光純薬製寒天)、および約 10⁻¹ (Difco Bacto Agar) の発現しかみられなかった。

2) 寒天 A 培地, B 培地に 7 種類の寒天を各々 1.5% 加え、寒天培地を作成し、寒天の影響を調べた。オートクレーブ時間は15分とした。

Table 3 に示すように、コロニーの発現は和光純薬製寒天、栄研化学製寒天で特に悪く、他の寒天を使用

Table 2. Effect of composition of media and kinds of agar on formation of colonies.

Agar	Colony (counts / ml)					
	Medium A	Medium B	Medium C	Medium D	Medium E	Medium F
Agar powder (Wako)	1.5 × 10 ⁷	1.8 × 10 ⁹	3.9 × 10 ⁹	1.7 × 10 ⁹	2.0 × 10 ⁹	1.0 × 10 ⁷
Bacto agar (Difco)	1.0 × 10 ⁹	8.8 × 10 ⁹	5.8 × 10 ⁹	9.9 × 10 ⁹	9.4 × 10 ⁹	4.4 × 10 ⁸

Table 3. Effect of kinds of agar on formation of colonies.

Kinds of agar	Colony (counts / ml)						
	Agar (Wako)	Agar (Eiken)	Agar (Junsei)	Agar (Kokusan)	Bacto agar (Difco)	Agar purified (Difco)	Agar noble (Difco)
Medium A	<10 ⁸	<10 ⁸	2.1 × 10 ⁸	1.3 × 10 ⁸	4.0 × 10 ⁸	3.8 × 10 ⁸	4.1 × 10 ⁸
Medium B	4.0 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸	2.6 × 10 ⁹	2.1 × 10 ⁹	2.3 × 10 ⁹	2.0 × 10 ⁹	2.2 × 10 ⁹

したもの比べてA培地で約 10^{-2} 以下、B培地で約 10^{-1} の発現しかみられなかった。Difco Bacto Agar, Difco Agar Purified, Difco Agar Noble, 純正化学製寒天, 国産化学製寒天でのコロニーの発現には差はみられなかった。

3)メタノール濃度の影響 Difco Bacto Agar を1.5%添加した培地Bを用い,メタノール濃度を0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 wt%としてメタノール濃度の影響を検討した。

Fig. 1 に示すように,メタノール濃度1%までコロニーの発現はほぼ等しく,以後,濃度の増加と共に減少し,2%では1%の場合の $\frac{1}{2}$ ぐらいであった。

4)滅菌時間 A培地, B培地について和光純薬製寒天, Difco Bacto Agar をそれぞれ1.5%加え,10分,20分,30分,40分,60分間滅菌し,寒天培地上でのコロニーの発現を調べた。

結果を Table 4 に示した。寒天として和光純薬製寒天を用いた場合, A培地では滅菌時間に関係なくほぼ一定であったが,そのコロニーの発現はB培地の約

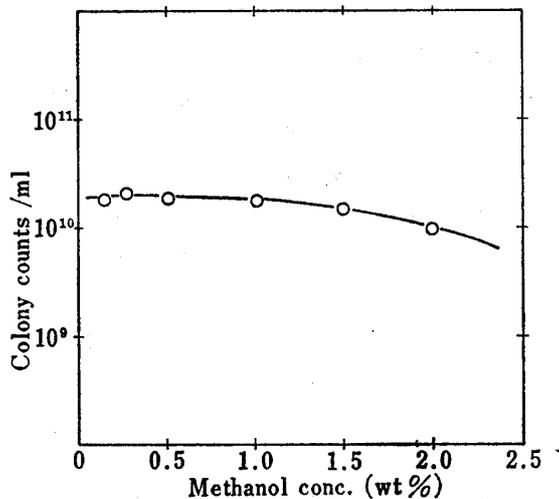


Fig. 1. Effect of methanol concentration on formation of colonies.

10^{-2} であった。B培地では滅菌時間30分以上でコロニーの発現が若干低下し,40分で約 $\frac{1}{2}$ に低下した。

寒天としてDifco Bacto Agarを用いた場合, A培地では滅菌時間20分を超えるとコロニーの発現は著しく低下し,60分では20分のコロニーの発現に比べて約 10^{-6} 以下となった。B培地では,滅菌時間60分まであまり大きな差はみられなかった。A培地, B培地のコロニーの発現の最大値を比較すると, B培地がA培地の約2倍の値を示した。

これらのことからコロニーの発現は,寒天,培地組成,滅菌時間により影響をうけることが明らかとなった。寒天としては和光純薬製寒天,国産化学製寒天が悪く,培地組成はA培地, F培地が特に悪かった。しかし, A培地, F培地のどの成分が悪い影響を与えているのか明らかではない。滅菌時間は30分以内が良好であった。メタノール濃度は2 wt%以上では,コロニーの発現に悪影響を及ぼすが,通常の培地組成であるメタノール1 wt%では影響を及ぼさないで,以後の実験にはメタノール濃度1 wt%を用いた。

5)寒天培地の作成方法 B培地に比較して, A培地でコロニーの発現が著しく悪く,また滅菌時間が長いとコロニーの発現が悪いことから,寒天培地の作成方法を検討した。培地として, A培地, B培地を用い,寒天はDifco Bacto Agar 1.5%を用いた。

次の(a)~(c)の方法を用いて寒天培地を作成した。

(a)フィルターろ過 寒天以外の培地成分を $\frac{1}{2}$ 量の水に溶解し, $0.22 \mu\text{m}$ のメンブランフィルター(ミリポアー製)で除菌した。一方,寒天は $\frac{1}{2}$ 量の水に溶解し,15分間オートクレーブで加熱滅菌した。これらの両成分を等量混合し,寒天培地を作成した。

(b)別滅菌 寒天と寒天以外の培地成分を別々に $\frac{1}{2}$ 量の水に溶解し,15分間オートクレーブで加熱滅菌し,これらの両成分を等量混合し,寒天培地を作成した。

(c)同時滅菌 全培地成分を溶解し,15分間オート

Table 4. Effect of sterilization time on formation of colonies.

Agar	Medium	Colony (counts / ml)				
		Time of sterilization (min)				
		10	20	30	40	60
1 Agar powder (Wako)	Medium A	1.8×10^8	1.5×10^8	1.8×10^8	1.3×10^8	1.3×10^8
	Medium B	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	7.5×10^9	5.0×10^9	4.5×10^9
2 Bacto agar (Difco)	Medium A	5.4×10^9	4.7×10^9	8.7×10^7	9.7×10^6	$< 10^4$
	Medium B	1.4×10^{10}	1.0×10^{10}	1.2×10^{10}	6.9×10^9	8.0×10^9

Table 5. Effect of procedures for preparation of agar plate media on formation of colonies.

Medium	Colony (counts / ml)		
	(a) Filtration	(b) Sterilization of each component separately	(c) Sterilization of components together
Medium A	1.6×10^{10}	1.8×10^{10}	1.0×10^{10}
Medium B	2.0×10^{10}	1.5×10^{10}	1.6×10^{10}

クレーブで加熱滅菌し、寒天培地を作成した。その結果を Table 5 に示した。

A培地では、(a)フィルターろ過、(b)別滅菌、がコロニーの発現がよく、(c)同時滅菌、の約 10^2 倍のコロニーの発現がみられた。B培地では、(a)(b)(c)のいずれの作成方法でも、コロニーの発現はほぼ同じ値であった。A培地の(a)(b)での値は、B培地での値とほぼ等しかった。また、A培地およびB培地での(a)フィルターろ過、(b)別滅菌、およびB培地での(c)同時滅菌、で作成した寒天培地は褐色に着色しなかったが、A培地での(c)同時滅菌、で作成した寒天培地は褐色に着色した。

A培地を用いても培地成分と寒天とを混合して、同時滅菌を行わなければ、コロニーの発現のよい寒天培地を作成することができた。このことから、寒天と培地成分を混合して加熱滅菌することにより、コロニーの発現を抑制する物質が生成するものと考えられる。この場合寒天培地は褐色に着色してくる。

6)チオグリコール酸ナトリウムの添加効果 チオグリコール酸ナトリウムは、酸化還元電位を低位に保つので主として嫌気性細菌の培養に用いられている。培地成分と寒天を加熱することによって生じる物質の生成が、チオグリコール酸ナトリウムを加えることにより、抑制されるのではないかと考え、チオグリコール酸ナトリウムの添加効果を調べた。

(i)A培地への添加効果 寒天として Difco Bacto Agar を用い、以下に示すような寒天培地(a), (b), (c), (d), (e)を作成し、コロニーの発現を比較した。

(a)A培地にチオグリコール酸ナトリウムを0.1, 0.5 g/l 添加し、寒天と混合した後、120°Cで60分間オートクレーブで加熱滅菌し、寒天培地を作成した。

(b)A培地に寒天を混合し、120°Cで60分間オートクレーブで加熱滅菌した後、約50°Cに冷却し、無菌ろ過したチオグリコール酸ナトリウム溶液を無菌的に添加し、寒天培地を作成した。

(c)A培地に寒天を混合した後、120°Cで15分間オートクレーブで加熱滅菌し、寒天培地を作成した。

(d)A培地の培地成分と寒天とを別々に $\frac{1}{2}$ 量の水に溶解し、120°Cで15分間オートクレーブで加熱滅菌した。これらの両培地を等量混合し、寒天培地を作成した。

(e)対照として、B培地に寒天を混合して、120°Cで15分間オートクレーブで加熱滅菌し、作成した寒天培地を用いた。

A培地をオートクレーブで加熱滅菌した後にチオグリコール酸ナトリウムを添加した(b)寒天培地、およびチオグリコール酸ナトリウムを添加しなかったA培地の(c)寒天培地は、褐色に着色した。チオグリコール酸ナトリウムを、加熱滅菌前に添加した(a)寒天培地のうち、チオグリコール酸ナトリウム0.5 g/l 添加では、寒天培地は褐色に着色しなかったが、0.1 g/l 添加では褐色に着色した。また、寒天と寒天以外の培地成分を別々に加熱滅菌した(d)寒天培地、および対照として用いた(e)のB培地の寒天培地は褐色に着色しなかった。

寒天培地の着色とコロニーの発現との間に、ある種の関係がみられ、褐色に着色した寒天培地——(a)のチオグリコール酸ナトリウム0.1 g/l 添加した寒天培地および(b), (c)の寒天培地——は、コロニーの発現が著しく悪かったが、培地が褐色化しなかった寒天培地——(a)のチオグリコール酸ナトリウムを0.5 g/l 添加し、オートクレーブで加熱滅菌した寒天培地および(d), (e)寒天培地——では、コロニーの発現が良好であった。

(d)のA培地の培地成分と寒天とを別々に加熱滅菌した寒天培地と、(e)の対照のB培地の寒天培地では、コロニーの発現はほぼ一致した。しかし、(a)のチオグリコール酸ナトリウムを0.5 g/l 添加した後に、オートクレーブで加熱滅菌した寒天培地では、コロニーの発現がさらによく、(d), (e)の寒天培地の約2倍の値であった (Table 6)。

(ii)B培地への添加効果 寒天として Difco Bacto Agar を用い、B培地にチオグリコール酸ナトリウムを無添加、および0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 g/l 添加した後15分間加熱滅菌し、寒天培地を作成した。

Table 6. Effect of Na-thioglycollate on formation of colonies on medium A.

Agar plate medium	Colony (counts / ml)
(a) Medium A (sterilization for 60 min) addition of Na-thioglycollate before sterilization	
Na-thioglycollate 0.1 g/l	<10 ⁴
Na-thioglycollate 0.5 g/l	6.7×10 ⁹
(b) Medium A (sterilization for 60 min) addition of Na-thioglycollate after sterilization	
Na-thioglycollate 0.1 g/l	<10 ⁴
Na-thioglycollate 0.5 g/l	<10 ⁴
(c) Medium A (sterilization for 15 min) no addition of Na-thioglycollate	4.0×10 ⁸
(d) Medium A (sterilization for 15 min) no addition of Na-thioglycollate separate sterilization of components of medium and agar	2.0×10 ⁹
(e) Medium B (sterilization for 15 min) no addition of Na-thioglycollate	2.7×10 ⁹

チオグリコール酸ナトリウム添加寒天培地は、0.1 g/l 添加でも無添加の約2倍のコロニーの発現がみられた (Table 7).

7)チオグリコール酸ナトリウム添加B培地の滅菌時間の影響 最もコロニーの発現のよい培地であるチオグリコール酸ナトリウムを0.5 g/l 添加したB培地を15~120分加熱滅菌し、滅菌時間の影響を検討した。寒天として Difco Bacto Agar を用いた。

チオグリコール酸ナトリウム添加培地では、滅菌時間15~120分でコロニーの発現はほぼ等しく、滅菌時間による影響はみられなかった (Table 8)。

これまで、コロニーの発現がよいと思われていた Difco Bacto Agar を用いたB培地でも、チオグリコール酸ナトリウムを0.5 g/l 添加することにより、さ

らに約2倍のコロニーを発現させることができた。また、培地組成および滅菌時間などの点でコロニーの発現が著しく悪い場合——たとえば、A培地で培地成分と寒天を混合して加熱滅菌する場合——でもチオグリコール酸ナトリウムを0.5 g/l 添加して加熱滅菌することにより、B培地へチオグリコール酸ナトリウムを0.5 g/l 添加して作成した寒天培地とほぼ同じコロニーの発現をさせることができた。

寒天および培地成分を混合し、加熱滅菌することにより生じるコロニーの発現を抑制する物質は、チオグリコール酸ナトリウムを添加することにより抑制され、寒天培地は褐色とならなくなるものと考えられる。

以上のことから、メタノール酸化性細菌の寒天培地としては、培地組成および寒天の種類にかかわらず、

Table 7. Effect of Na-thioglycollate on formation of colonies on medium B.

Colony (counts / ml)	Sodium thioglycollate (g/l)					
	0.00	0.10	0.25	0.50	0.75	1.00
	2.7×10 ⁹	5.0×10 ⁹	5.1×10 ⁹	5.5×10 ⁹	5.6×10 ⁹	5.2×10 ⁹

Table 8. Effect of sterilization time on formation of colonies with addition of Na-thioglycollate on medium B.

Medium	Colony (counts / ml)			
	Time of sterilization (min)			
	15	30	60	120
Addition of 0.5 g/l Na-thioglycollate	1.1×10 ¹⁰	1.3×10 ¹⁰	1.0×10 ¹⁰	1.1×10 ¹⁰
No addition of Na-thioglycollate	4.3×10 ⁹	—	—	—

チオグリコール酸ナトリウムを 0.5 g/l 添加した培地
が好ましいことが明らかとなった。

保存中の生菌数の測定 寒天培地, 液体培地い
ずれの場合も, 長時間放置すると細菌は死滅する
ので, これら培地における保存中の死滅速度を測
定した。

1) 寒天培地での死滅速度 培地 B にチオグリ
コール酸ナトリウム 0.5 g/l および Difco Bacto
Agar 1.5 % を加え, 加熱滅菌して平板寒天培地
を作成した。

一つの平板寒天培地へ, メタノール養化性細菌
BNK-84 株を約 10^8 個接種し, 37°C で 48 時間
培養したものをそれぞれ 5°C, 37°C に保存した。
その 1 コロニーを各日ごとに切り取って, 生理食
塩水に懸濁し, 610 nm の吸光度および生菌数を
測定し, 生菌数/OD_{610 nm} 値を比較した (Fig. 2)。
なお, この結果は五つのコロニーでのデータの
平均値である。

5°C 保存では, 約 2 か月間ほぼ同じ生菌数を
維持し, 半減期 (生菌数が $\frac{1}{2}$ になる日数) は約 80
日であった。37°C 保存では, 初期に生菌数は急
激に減少し, その後の減少は緩やかであり, 20
日保存で約 10^{-3} に減少した。

2) 液体培地での死滅速度 液体培地 (培地 B)
へ, メタノール養化性細菌 BNK-84 株を接種し,
37°C で 48 時間培養したものを 5°C, 37°C で
静置保存し, 各日ごとにその培養液の OD_{610 nm}
と生菌数を前述の寒天培地を用いて測定した。

5°C 保存では OD_{610 nm} の変化はあまりみ
られなかったが, 37°C 保存では OD_{610 nm} の
急激な減少がみられた (Table 9)。

生菌数と日時を対数目盛りにプロットすると直線関

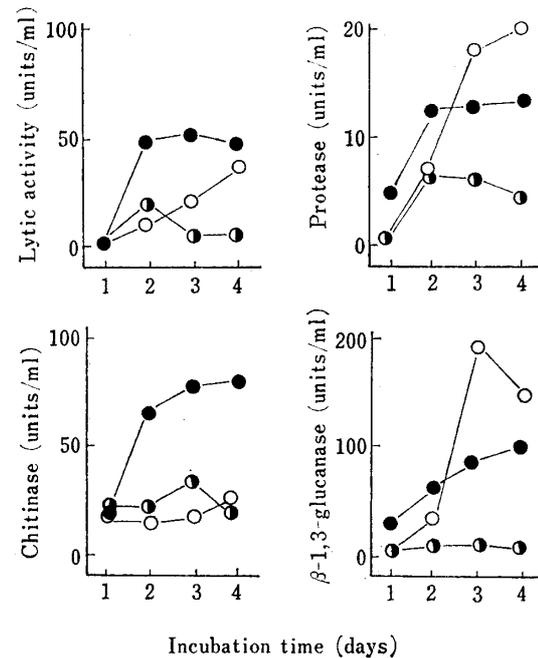


Fig. 2. Change of viable counts during preservation on agar plate medium.

—○— Viable counts on preservation at 5°C,
—●— Viable counts on preservation at 37°C.

係が得られ, 死滅速度の半減期は 5°C で約 12.5 日,
37°C で約 0.5 日であった。また, 生菌数と OD_{610 nm}
の比の値と日時を対数目盛りにプロットすると直線関
係が得られ, 5°C での半減期は生菌数から算出した値
とほぼ等しく, 37°C での半減期は生菌数から算出した値
より若干短い値 (約 0.6 日) となったが, その差は
ごく少なかった (Fig. 3)。

これらの結果から, 菌の保存には寒天培地で 5°C
保存が好ましく, 約 2 か月間は十分保存が可能である
ことがわかった。

Table 9. Change of OD_{610 nm} and viable counts during preservation in liquid medium.

Preserved time (days)	Preserved at 5°C			Preserved at 37°C		
	OD _{610 nm}	Viable counts/ml	Viable counts/OD _{610 nm}	OD _{610 nm}	Viable counts/ml	Viable counts/OD _{610 nm}
0	2.70	7.1×10^9	2.6×10^9	2.70	7.1×10^9	2.6×10^9
1	—	—	—	2.60	2.6×10^8	1.0×10^8
2	2.70	5.5×10^9	2.0×10^9	2.50	3.7×10^7	1.5×10^7
3	—	—	—	2.16	3.0×10^6	1.4×10^6
5	2.70	4.6×10^9	1.7×10^9	1.80	1.3×10^5	7.2×10^4
7	—	—	—	1.40	1.7×10^4	1.2×10^4
9	2.70	4.3×10^9	1.6×10^9	0.67	—	—
15	2.70	2.6×10^9	9.6×10^8	—	—	—
25	2.68	1.7×10^9	6.3×10^8	—	—	—
32	2.68	5.6×10^8	2.1×10^8	—	—	—

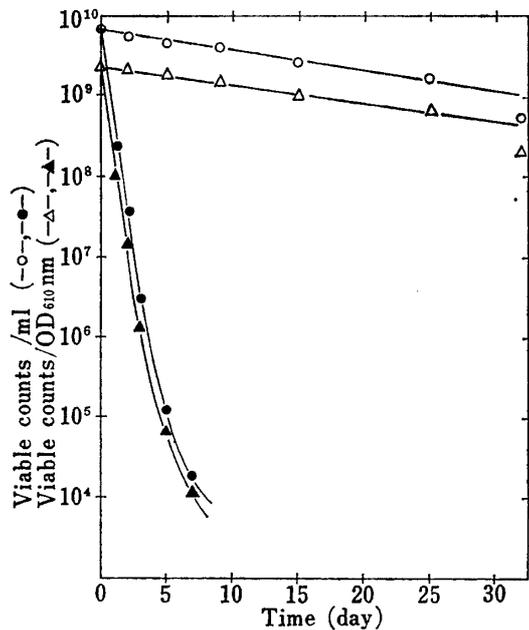


Fig. 3. Change of viable counts during preservation in liquid medium.

- Viable counts on preservation at 5°C,
- △— Ratio of viable counts/OD_{610 nm} on preservation at 5°C,
- Viable counts on preservation at 37°C,
- ▲— Ratio of viable counts/OD_{610 nm} on preservation at 37°C.

要 約

メタノール酸化性細菌 BNK-84 株を用いて、寒天培地上でのコロニーの発現および保存中における細菌の死滅速度を検討し、以下の結果を得た。

(a)寒天培地上でのコロニーの発現は、A培地、F培地で特に悪く、B、C、D、E培地では良好な結果が得られた。寒天は和光純薬製、栄研化学製が特に悪く、純正化学製、国産化学製、Difco 製が良好であった。また、滅菌時間もコロニーの発現に影響を及ぼし、30分以内が良好であった。寒天培地上でのコロニーの発現は、培地組成、寒天、オートクレーブでの滅菌時間を選ぶことにより、比較的良好な値を得ることができた。

(b)寒天培地上のコロニーの発現が悪い条件でも培地成分と寒天を別々に滅菌後混合することにより、コロニーの発現が良好となった。このことから、培地成分と寒天を混合した後加熱滅菌すると、コロニーの発現を抑制する物質が生成するものと考えられる。この場合、寒天培地は褐色に着色する。

(c)寒天培地にチオグリコール酸ナトリウム 0.5 g/l 添加した後滅菌すると、培地組成、寒天および滅菌時間に関係なくコロニーの発現抑制物質の生成は抑制され、コロニーの発現は最も良好となった。この場合、チオグリコール酸ナトリウム無添加で、コロニーの発現の最も良好であった寒天培地に比較して約2倍のコロニーの発現がみられた。また、寒天培地の褐色化も抑制された。

(d)コロニーの発現にとって良好な寒天培地を用いて、菌株の保存中における生菌数の変化を測定した。細菌の保存中における死滅速度は、37°Cの方が5°Cよりも速く、また、液体培地の方が寒天培地よりも速かった。寒天培地 5°C 保存では、細菌の死滅速度は半減期約80日、約2か月間の保存が十分可能であった。

終わりに、本研究の遂行にあたり、ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました東京大学応用微生物研究所駒形和男教授に心から感謝いたします。また、終始直接のご指導を賜りました岐阜大学工学部倉石迪夫教授（前、三菱瓦斯化学新潟研究所長）に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Loew, O. : *Centr. Bakt. Parasitenk. I Abt.*, **12**, 462 (1892).
- 2) Bassalik, K. : *Jahrb. Wiss. Botanik*, **53**, 255 (1914).
- 3) Kaneda, T., Roxburgh, J. M. : *Can. J. Microbiol.*, **5**, 87 (1959).
- 4) Harrington, A. A., Kallio, R. E. : *Can. J. Microbiol.*, **6**, 1 (1960).
- 5) Peel, D., Quayle, J. R. : *Biochem. J.*, **81**, 465 (1961).
- 6) Stocks, P. K., McCleskey, C. S. : *J. Bacteriol.*, **88**, 1065 (1964).
- 7) Anthony, C., Zatman, L. J. : *Biochem. J.*, **92**, 609 (1964).
- 8) Kouno, K., Oki, T., Nomura, H., Ozaki, A. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 11 (1973).
- 9) Byrom, D., Cusby, J. C. : *Proc. Int. Symp. Microbiol. Growth on C₁-Compd.*, p. 23 (1975).
- 10) Urakami, T., Komagata, K. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **25**, 343 (1979).

(昭54. 10. 22 受付)