乳製品中の *Bifidobacterium* の生菌数測定法

寺口 進 植原真理子 小笠 勝啓
光岡 知足*

森永乳業株式会社 中央研究所
東京都目黒区目黒4-4-22 〒153

*理化学研究所

埼玉県和光市広沢2-1 〒351

〔受付：7月14日，1978年〕

Bifidobacterium, *Lactobacillus* および *Streptococcus* を含有する乳製品から，*Bifidobacterium* のみを選択的に計数するための培地および培養方法を，*Bifidobacterium* (11菌株)，*Lactobacillus* (12菌株)，*Streptococcus* (2菌株) の各保存菌株を用いて検討した。

その結果，*Bifidobacterium* は，硫酸パロモマイシン 200 μ g/ml，硫酸ネオマイシン 100 μ g/ml，ナリジキシ酸 15 μ g/ml および塩化リチウム 3mg/ml を添加した血液無添加 BL agar (NPNL agar) 平板の炭酸ガス加スチールウール嫌気性，37C 48時間培養によつて選択的に計数できることが明らかとなつた。

また，嫌気培養装置のない場合，硫酸パロモマイシン 50 μ g/ml，硫酸ネオマイシン 30 μ g/ml，ナリジキシ酸 15 μ g/ml および塩化リチウム 3mg/ml を添加した血液無添加 BL agar (変法 NPNL agar) の試験管高層混釈寒天重層，37C，48時間培養によつても，*Bifidobacterium* の選択的計数が可能であつた。

Bifidobacterium は，1899年，Tissier⁸⁾ によつて初めて乳児の糞便より分離されて以来，乳児をはじめヒトの健康にかかわるもつとも重要な腸内菌の一つとして注目されている。近年，*Bifidobacterium* を腸内で優勢に増殖させることを目的に，*Bifidobacterium* の生菌あるいは *Bifidobacterium* 増殖促進因子を含む粉乳，醗酵乳，生菌製剤等の開発が国の内外で試みられ商品化されている。しかし，この種の製品に含まれる *Bifidobacterium* の生菌数測定法は，いまだ統一された方法がない。

光岡⁹⁾，根岸⁴⁾らは，腸内菌叢の *Bifidobacterium* を分離・計数する方法を報告しているが，食品等に含まれる *Bifidobacterium* の測定には，必ずしもじゆうぶんとはいえない。また，Schuler ら⁶⁾ は，乳製品中の *Bifidobacterium* の検出法として，螢光顕微鏡による方法および RCM 培地を使用する方法を報告しているが，一般的な方法とはいいがたい。最近，島田⁷⁾ は，醗酵乳中の *Bifidobacterium* の生菌数測定法について報告している。

著者らは，乳製品中で *Lactobacillus*，*Streptococcus* と併存する *Bifidobacterium* の生菌数を選択的に測定する

方法を検討したので，ここに報告する。

材料と方法

供試菌株：Table 1 に示した如く，*Bifidobacterium* 5 菌株11菌株，*Lactobacillus* 7 菌株12菌株および *Streptococcus* 1 菌株2菌株を供試した。

被検菌液調製用培地：*Bifidobacterium* および *Lactobacillus* は，Briggs liver broth²⁾，*Streptococcus* は，0.25%酵母エキス (Difco) 加10%スキムミルクを使用し，光岡⁹⁾の方法にしたがつて培養した。

生菌数測定用培地：非選択培地として血液を加えない BL agar (以下単に BL agar と略す) を用いた。その組成は，Table 2 に示す通りである。*Bifidobacterium* 選択培地は，BL agar に硫酸パロモマイシン，硫酸ネオマイシン，ナリジキシ酸，塩化リチウムおよびプロピオン酸ナトリウムの薬剤等を種々の濃度に添加した培地を使用した。また，*Lactobacillus* と *Streptococcus* の生菌数測定用培地としては，BCP 加プレートカウント寒天培地 (栄研) を使用した。

Table 1. Bacterial strains used

Strains	Obtained from
<i>Bifidobacterium bifidum</i> E319	G. Reuter
<i>B. bifidum</i> IPP 4216	A. Prévot
<i>B. longum</i> E 194b	G. Reuter
<i>B. longum</i> S 3	G. Reuter
<i>B. longum</i> BB-536	Our collection
<i>B. infantis</i> S12	G. Reuter
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> I-66-1	Our collection
<i>B. breve</i> ss. <i>breve</i> S 1	G. Reuter
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> S50	G. Reuter
<i>B. adolescentis</i> E194a	G. Reuter
<i>B. adolescentis</i> E298b	G. Reuter
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ATCC 11842	Lactobacillus Subcommittee
<i>L. bulgaricus</i> J 18a	G. Reuter
<i>L. jugurt</i> ATCC 521	Lactobacillus Subcommittee
<i>L. jugurt</i> GD-12	Our collection
<i>L. lactis</i> LLT-535	Our collection
<i>L. lactis</i> ATCC 8000	Lactobacillus Subcommittee
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Lactobacillus Subcommittee
<i>L. acidophilus</i> LAC-336	Our collection
<i>L. salivarius</i> ATCC 11742	Lactobacillus Subcommittee
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	Lactobacillus Subcommittee
<i>L. casei</i> II-12	Our collection
<i>L. casei</i> ATCC 393	Lactobacillus Subcommittee
<i>Streptococcus thermophilus</i> IAM 1047	University of Tokyo
<i>S. thermophilus</i> STH-419	Our collection

被検菌液の調製：単独菌液は、各供試菌の24時間培養液をそれぞれの培地に約5%ずつ接種し、37Cで16~18時間培養したものを単独菌液として実験に供した。2菌種混合菌液は、*Bifidobacterium* と *Lactobacillus* の各単独菌液を生菌数レベルが、ほぼ同じになるように希釈し、それぞれを1:1の割合で混合したものを供試した。また、3菌種混合菌液は、同様に調製した *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* および *Streptococcus* の各単独菌液を、それぞれ1:0.5:0.5の割合で混合したものを供試した。市販製品としては、ヨーグルト2種類、乳酸

Table 2. Composition of BL agar without blood (Mitsuoka et al.²⁾)

Lab-lemco powder (Oxoid)	3g
Proteose peptone No. 3 (Difco)	10g
Trypticase (BBL)	5g
Phytone (BBL)	3g
Yeast extract (Difco)	5g
Liver extract solution ^a	150ml
Glucose	10g
Soluble starch	0.5g
Solution A ^b	10ml
Solution B ^c	5ml
Tween 80	1g
L-Cysteine HCl-H ₂ O	0.5g
Agar (Difco)	15g
Distilled water	815ml

pH 7.2

^a. 10g of liver powder (Kyokuto Co., Ltd.) are extracted with 170 ml of distilled water for 1 hr at 50-60C and boiled for 10 min and filtrated.

^b. K₂HPO₄ 25g and KH₂PO₄ in 250ml of distilled water.

^c. MgSO₄ 7H₂O 10g, FeSO₄ 7H₂O 0.5g, NaCl 0.5g and MnSO₄ 0.337g in 250ml of distilled water.

菌飲料3種類および *Bifidobacterium* (*B. longum*) と *Lactobacillus* (*L. acidophilus*) を含む乳酸菌飲料1種類を供試した。

生菌数測定方法：被検菌液は、希釈液A（組成：KH₂PO₄ 4.5g, Na₂HPO₄ 6.0g, L-Cysteine·HCl·H₂O 0.5g, Tween80 0.5g, 精製寒天1.0g, 精製水 1000ml)²⁾を用い、10倍段階希釈法により希釈した。培養は、主として炭酸ガス加 スチールウール 嫌気培養法²⁾（以下嫌気ジャー法と略す）によつたが、その他に、試験管を用いた高層混釈寒天重層法³⁾（以下試験管法と略す）、パウチ法¹⁾、シャーレを用いた混釈寒天重層法（以下シャーレ重層法と略す）も採用し、比較検討した。嫌気ジャー法では、表面をよく乾燥させた平板培地に希釈検液をピペットで0.05ml ずつ滴下し、直ちに嫌気ジャーにおさめ、酸性硫酸銅溶液で還元銅被膜をつけたスチールウール²⁾を入れてからジャーの蓋をし、脱気-炭酸ガス置換を2回繰り返した後、炭酸ガスを約700mmHg になるように充填した。

試験管法では、滅菌試験管（13mm×150mm）に希釈

検液を 1ml 入れ、次いで 100C で溶かした後、50C にした寒天培地 10ml をこれに加え、冷却固化させた後、さらに同じ培地を 15~20mm の厚さになるように重層した。

パウチ法は、非通気性で透明な柔らかいプラスチック製の滅菌小袋 (径約 100mm, (株) 酒見医科器械舗製) に希釈検液 1ml を入れ、次いで培地約 10ml を注入混合した後、なるべく空気を排除して封をクリップで閉じた。

シャーレ重層法では、底の深い滅菌シャーレ (径 90 mm × 高さ 19mm) に希釈検液を 1ml 入れ、直ちに 3~5ml の培地を加えて混釈し、固化させた後、さらに同じ培地を 15~16mm の厚さに重層した。なお、培地中の寒天濃度は、試験管法では 0.5%, その他は 1.5% とした。

また、*Lactobacillus* および *Streptococcus* の生菌数は、BCP 加プレートカウント寒天培地を用いた混釈平板培養法によつて測定した。

各被検菌液に含まれる *Bifidobacterium* の真の生菌数は、BL agar³⁾ 平板の嫌気ジャー法により、また、*Lactobacillus* および *Streptococcus* は、BL agar および BCP 加プレートカウント寒天培地の混釈好気平板培養によつて求めた。なお、これらの方法の培養条件は、すべて 37 C, 48~72 時間で行い、生菌数の値は、同一の希釈検液について 2 回ずつ測定し、その平均値で示した。

成 績

培養法の検討：まず、BL agar を使用し、嫌気ジャー法、パウチ法、試験管法およびシャーレ重層法を比較検討した結果、Table 3 に示した如く、シャーレ重層法で *B. adolescentis* の発育が抑制された以外は、全供試菌株とも良好な発育を示し、培養法による菌数の差は認められなかった。しかし、パウチ法では気泡が生じ、測定の際、やや時間と熟練を要し、実用上、なお問題が残ると思われた。

***Bifidobacterium* の選択培地の検討：**次に、BL agar を基礎培地として、*Lactobacillus* および *Streptococcus* の発育を抑制し、*Bifidobacterium* のコロニー形成をなるべく阻害しない薬剤とその濃度について検討を行った。選択培地を嫌気ジャー法によつて培養した場合、Table 4 に示すように、Mitsuoka ら³⁾ の BS agar に含まれる薬剤濃度 (硫酸パロモマイシン 50 μ g/ml, 硫酸ネオマイシン 200 μ g/ml, 塩化リチウム 3mg/ml, プロピオン酸ナトリウム 15mg/ml) を加えた BL agar 平板で

は、*L. salivarius* ATCC 11742 を除くすべての *Lactobacillus* および *S. thermophilus* の発育は完全に抑制されたが、*B. infantis* S 12 および *B. adolescentis* E298b の発育も抑制され、生菌数は著しく減少し、また、他の *Bifidobacterium* の菌数も幾分減少した。そこで添加薬剤の種類とその濃度について、さらに検討を加えたところ、硫酸パロモマイシン 200 μ g/ml, 硫酸ネオマイシン 100 μ g/ml, ナリジキシ酸 15 μ g/ml, 塩化リチウム 3mg/ml を BL agar に加えた培地 (NPNL agar) によつて、供試 *Lactobacillus* 並びに *Streptococcus* の発育はすべて阻止され、*Bifidobacterium* の発育はほとんど抑制されなかった。

次に、NPNL agar を試験管法によつて培養したところ、嫌気ジャー法に比べて *Bifidobacterium* の発育が著しく抑制された。そこで、嫌気ジャー法を対照に、試験管法を用いた場合の選択培地の薬剤の濃度を検討した。その結果、BL agar に硫酸パロモマイシン 50 μ g/ml, 硫酸ネオマイシン 30 μ g/ml, ナリジキシ酸 15 μ g/ml および塩化リチウム 3mg/ml を添加した培地 (変法 NPNL agar) を使用することによつて、*Lactobacillus* および *Streptococcus* の発育はすべて抑制され、*Bifidobacterium* は対照と同程度に発育する事実を認めた。

混合菌液および市販製品への *Bifidobacterium* 選択培地の適用：*Bifidobacterium* 5 菌株、*Lactobacillus* 2 菌株および *Streptococcus* 1 菌株を用い、2 菌株あるいは 3 菌株の混合菌液、並びに市販ヨーグルトおよび乳酸菌飲料について、前記 2 種類の *Bifidobacterium* 選択培地と培養法 (嫌気ジャー法では NPNL agar 平板を用い、試験管法では変法 NPNL agar を用いた) を用い、*Bifidobacterium* の生菌数測定を行った。なお、混合菌液中の供試菌株の真の生菌数は、あらかじめ BL agar 平板の嫌気ジャー法培養によつて個々の菌株について測定した。*Bifidobacterium* と *Lactobacillus* を含む市販乳酸菌飲料中の両菌の真の生菌数は、BL agar 平板および Briggs agar 平板²⁾ の嫌気ジャー法培養によつて得られたコロニーの性状および菌形態の違いから分別し測定した。その結果は、Table 6 および Table 7 に示す通りで、混合菌液については、選択培地と BCP 加プレートカウント寒天培地によつて得られた *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、および *Streptococcus* の生菌数は混合前にあらかじめ測定した *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、および *Streptococcus* の生菌数とほぼ一致し、また市販製品についても選択培地による *Bifidobacterium* の生菌数は BL agar 平板、Briggs agar 平板で測定した生菌

Table 3. A comparison of incubation

Strains	Anaerobic steel wool jar method		Pouch
	Count per ml	Recovery (%)	Count per ml
<i>B. bifidum</i> E319	32×10^8	100	31×10^8
<i>B. bifidum</i> IPP 4216	20×10^8	100	14×10^8
<i>B. longum</i> E194b	33×10^8	100	30×10^8
<i>B. longum</i> S3	12×10^8	100	11×10^8
<i>B. longum</i> BB-536	27×10^8	100	22×10^8
<i>B. infantis</i> S12	47×10^8	100	61×10^8
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> I-66-1	67×10^8	100	55×10^8
<i>B. breve</i> ss. <i>breve</i> S1	19×10^8	100	14×10^8
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> S50	51×10^8	100	46×10^8
<i>B. adolescentis</i> E194a	29×10^8	100	26×10^8
<i>B. adolescentis</i> E298b	20×10^8	100	19×10^8

Table 4. Recovery of bifidobacteria, lactobacilli or streptococci on BL agar plate without in BCP agar by pour-plate method

Strains	BL agar plate without blood incubated in steel wool jar		BS agar plate incubated in steel
	Count per ml	Recovery (%)	Count per ml
<i>B. bifidum</i> E319	32×10^8	100	29×10^8
<i>B. bifidum</i> IPP 4216	20×10^8	100	10×10^8
<i>B. longum</i> E194b	33×10^8	100	10×10^8
<i>B. longum</i> S3	12×10^8	100	5.8×10^8
<i>B. longum</i> BB-536	28×10^8	100	18×10^8
<i>B. infantis</i> S12	48×10^8	100	$<10^7$
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> I-66-1	67×10^8	100	65×10^8
<i>B. breve</i> ss. <i>breve</i> S1	19×10^8	100	14×10^8
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> S50	51×10^8	100	45×10^8
<i>B. adolescentis</i> E194a	29×10^8	100	20×10^8
<i>B. adolescentis</i> E298b	20×10^8	100	1.0×10^8
<i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	5.1×10^8	100	$<10^7$
<i>L. bulgaricus</i> J 18a	5.4×10^8	100	$<10^7$
<i>L. jugurt</i> ATCC 521	3.5×10^8	100	$<10^7$
<i>L. jugurt</i> GD-12	25×10^8	100	$<10^7$
<i>L. lactis</i> LLT-535	2.8×10^8	100	$<10^7$
<i>L. lactis</i> ATCC 8000	7.7×10^8	100	$<10^7$
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	8.1×10^8	100	$<10^7$
<i>L. acidophilus</i> LAC-336	7.6×10^8	100	$<10^7$
<i>L. salivarius</i> ATCC 11742	19×10^8	100	3.0×10^8
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	12×10^8	100	$<10^7$
<i>L. casei</i> II-12	15×10^8	100	$<10^7$
<i>L. casei</i> ATCC 393	25×10^8	100	$<10^7$
<i>S. thermophilus</i> IAM 1047	8.2×10^8	100	$<10^7$
<i>S. thermophilus</i> STH-419	5.7×10^8	100	$<10^7$

conditions for bifidobacteria

Shake-tube method overlaid with agar		Pour-plate method overlaid with agar		
method				
Recovery (%)	Count per ml	Recovery (%)	Count per ml	Recovery (%)
97	31×10^8	97	36×10^8	113
70	17×10^8	85	16×10^8	80
91	36×10^8	109	35×10^8	106
92	13×10^8	108	10×10^8	83
81	27×10^8	100	26×10^8	96
130	38×10^8	81	65×10^8	138
82	64×10^8	96	61×10^8	91
74	14×10^8	74	14×10^8	74
90	48×10^8	94	57×10^8	112
90	33×10^8	114	3.0×10^8	10
95	19×10^8	95	$< 10^7$	< 0.5

blood, BS agar plate without blood and NPNL agar plate incubated in anaerobic jar, and

without blood wool jar	NPNL agar plate incu- bated in steel wool jar		BCP agar pour-plate incu- bated in anaerobic condition	
Recovery (%)	Count per ml	Recovery (%)	Count per ml	Recovery (%)
91	30×10^8	94	$< 10^7$	< 0.4
50	18×10^8	90	$< 10^7$	< 0.5
30	18×10^8	55	$< 10^7$	< 0.4
48	11×10^8	92	$< 10^7$	< 0.9
64	28×10^8	100	$< 10^7$	< 0.4
< 0.2	43×10^8	90	$< 10^7$	< 0.2
97	66×10^8	99	$< 10^7$	< 0.2
74	20×10^8	105	$< 10^7$	< 0.6
88	58×10^8	114	$< 10^7$	< 0.2
69	25×10^8	86	$< 10^7$	< 0.4
5	20×10^8	100	$< 10^7$	< 0.5
< 2	$< 10^7$	< 2	5.3×10^8	104
< 2	$< 10^7$	< 2	5.3×10^8	98
< 3	$< 10^7$	< 3	3.2×10^8	91
< 0.4	$< 10^7$	< 0.4	23×10^8	92
< 4	$< 10^7$	< 4	3.1×10^8	111
< 2	$< 10^7$	< 1	7.6×10^8	99
< 2	$< 10^7$	< 2	8.0×10^8	99
< 2	$< 10^7$	< 2	7.6×10^8	100
16	$< 10^7$	< 0.6	17×10^8	89
< 0.9	$< 10^7$	< 0.9	11×10^8	92
< 0.7	$< 10^7$	< 0.7	16×10^8	107
< 0.4	$< 10^7$	< 0.4	24×10^8	96
< 2	$< 10^7$	< 2	8.2×10^8	100
< 2	$< 10^7$	< 2	5.8×10^8	102

Table 5. Recovery of bifidobacteria, lactobacilli or streptococci on BL agar plate without blood incubated in anaerobic jar, and in modified NPNL agar shake tube method overlaid with agar

Strains	BL agar plate without blood incubated in anaerobic jar		Modified NPNL agar shake tube overlaid with agar	
	Count per ml	Recovery (%)	Count per ml	Recovery (%)
<i>B. bifidum</i> E319	32×10^8	100	30×10^8	94
<i>B. bifidum</i> IPP 4216	20×10^8	100	26×10^8	130
<i>B. longum</i> E194b	33×10^8	100	30×10^8	91
<i>B. longum</i> S3	12×10^8	100	11×10^8	92
<i>B. longum</i> BB-536	28×10^8	100	31×10^8	111
<i>B. infantis</i> S12	48×10^8	100	43×10^8	90
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> I-66-1	67×10^8	100	58×10^8	87
<i>B. breve</i> ss. <i>breve</i> S1	19×60^8	100	20×10^8	105
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> S50	51×10^8	100	50×10^8	98
<i>B. adolescentis</i> E194a	29×10^8	100	20×10^8	69
<i>B. adolescentis</i> E298b	20×10^8	100	17×10^8	85
<i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	5.1×10^8	100	$<10^7$	<2
<i>L. bulgaricus</i> J 18a	5.4×10^8	100	$<10^7$	<2
<i>L. jugurt</i> ATCC 521	3.5×10^8	100	$<10^7$	<3
<i>L. jugurt</i> GD-12	25×10^8	100	$<10^7$	<0.4
<i>L. lactis</i> LLT-535	2.8×10^8	100	$<10^7$	<4
<i>L. lactis</i> ATCC 8000	7.7×10^8	100	$<10^7$	<2
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	8.1×10^8	100	$<10^7$	<2
<i>L. acidophilus</i> LAC-336	7.6×10^8	100	$<10^7$	<2
<i>L. salivarius</i> ATCC 11742	19×10^8	100	$<10^7$	<0.6
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	12×10^8	100	$<10^7$	<0.9
<i>L. casei</i> II-12	15×10^8	100	$<10^7$	<0.7
<i>L. casei</i> ATCC 393	25×10^8	100	$<10^7$	<0.4
<i>S. thermophilus</i> IAM 1047	8.2×10^8	100	$<10^7$	<2
<i>S. thermophilus</i> STH-419	5.7×10^8	100	$<10^7$	<2

数とよく一致し、*Bifidobacterium* と他の菌との判別は可能であった。

考 察

ヨーグルト、乳酸菌飲料などの乳製品に *Bifidobacterium* を利用した製品中の生菌数を計測する場合、*Lactobacillus* と *Streptococcus* は乳等省令に定められたBCP加プレートカウント寒天培地による混積平板培養法で測定することができるが、*Bifidobacterium* についての測定法は、まだ確立されていない。

Bifidobacterium の生菌数を求める方法としては、非選択培地³⁾の好気性、嫌気性両培養によつて、*Lactobacillus*, *Streptococcus* および *Bifidobacterium* の各生菌数を測定する方法と、選択培地を用いて *Bifidobacterium* のみを測定する方法が考えられる。前者の方法は、コロニーと菌の形態の違いと好気性発育の有無によつて判別

するため経験を要し、しかも、*Bifidobacterium* と他の乳酸菌の生菌数に大きな差がある場合の計数は困難である。一方、*Bifidobacterium* 選択培地としては、MitsuoakaらのBS培地³⁾、根岸の培地⁴⁾、島田らの改変Rogosa培地⁷⁾等が報告されているが、これらは、*Bifidobacterium* の一部の菌種の発育を抑制し、あるいは、*Lactobacillus* の一部の菌種の発育を阻止することができず、いずれもそのままでは一般の食品検査に適した方法とはいえない。

本報告では、乳製品中の *Bifidobacterium* のみが発育する選択培地の開発を目的に、*Lactobacillus*, *Streptococcus* および *Bifidobacterium* の保存菌株を使用し、Mitsuoaka らのBS培地の選択剤に改良を加え、より乳製品中の *Bifidobacterium* の計数に適した選択培地を調製し、あわせて、特殊な嫌気培養装置を使用しない場合の *Bifidobacterium* の簡便な培養方法について検討し

Table 6. Recovery of bifidobacteria, lactobacilli and streptococci on or in various agar media from mixed cultures

Strain added (No. of organisms added per ml)			Percent recovery		
<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Bifidobacteria on NPNL agar plate incubated in anaerobic jar	Bifidobacteria in modified NPNL agar shake tube overlaid with agar	Lactobacilli and streptococci in BCP agar pour-plate incubated aerobically
<i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842 (26×10^7)	—	<i>B. bifidum</i> IPP 4216 (14×10^7)	100	86	100
	—	<i>B. longum</i> E194b (14×10^7)	86	93	96
	—	<i>B. infantis</i> S12 (26×10^7)	88	100	88
	—	<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> S50 (28×10^7)	75	89	92
	—	<i>B. adolescentis</i> E298b (30×10^7)	120	103	104
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (41×10^7)	—	<i>B. bifidum</i> IPP 4216 (14×10^7)	71	93	110
	—	<i>B. longum</i> E194b (14×10^7)	79	93	102
	—	<i>B. infantis</i> S12 (26×10^7)	112	96	88
	—	<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> S50 (28×10^7)	96	96	93
	—	<i>B. adolescentis</i> E298b (30×10^7)	67	100	98
<i>S. thermophilus</i> STH-419 (15×10^7)	<i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842 (13×10^7)	<i>B. bifidum</i> IPP 4216 (14×10^7)	86	100	93
		<i>B. longum</i> E194b (14×10^7)	93	86	86
		<i>B. infantis</i> S12 (26×10^7)	100	81	93
		<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> S50 (28×10^7)	96	79	86
		<i>B. adolescentis</i> E298b (30×10^7)	93	97	73
<i>S. thermophilus</i> STH-419 (15×10^7)	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (21×10^7)	<i>B. bifidum</i> IPP 4216 (14×10^7)	100	107	106
		<i>B. longum</i> E194b (14×10^7)	100	86	100
		<i>B. infantis</i> S12 (26×10^7)	100	96	94
		<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i> S50 (28×10^7)	89	93	97
		<i>B. adolescentis</i> E298b (30×10^7)	83	93	97

Percent recovery was calculated from the number of organisms added.

Table 7. Recovery of bifidobacteria in commercial products

Commercial products	No. of organisms per ml of products determined by each medium				
	Lactobacilli and streptococci in BCP agar pour-plate incubated aerobically	Bifidobacteria, lactobacilli or streptococci		Bifidobacteria on NPNL agar plate incubated in anaerobic jar	Bifidobacteria in modified NPNL agar shake tube overlaid with agar
		on BL agar plate without blood incubated in anaerobic jar	on Briggs agar plate incubated in anaerobic jar		
Yogurt (A)	82×10^7	—	—	$<10^6$	$<10^6$
Yogurt (B)	47×10^7	—	—	$<10^6$	$<10^6$
Lactic acid beverage (C)	22×10^7	—	—	$<10^6$	$<10^4$
Lactic acid beverage (D)	66×10^5	—	—	$<10^4$	$<10^4$
Lactic acid beverage (E)	36×10^5	—	—	$<10^4$	$<10^4$
Lactic acid beverage indicated as containing <i>B. longum</i> (F)	24×10^6	19×10^6 (bifidobacteria) 7×10^6 (lactobacilli)	18×10^6 (bifidobacteria) 24×10^6 (lactobacilli)	18×10^6	18×10^6

た。

まず、選択培地としては、血液を加えない BL agar を基礎培地とし、これに硫酸パロモマイシン $200 \mu\text{g/ml}$ 、硫酸ネオマイシン $100 \mu\text{g/ml}$ 、ナリジキン酸 $15 \mu\text{g/ml}$ 、塩化リチウム 3mg/ml を添加した培地 (NPNL agar) を使用することによつて満足すべき結果が得られた。

次に、BL agar および NPNL agar を使用し嫌気培養法の簡便法について検討を行つたところ、*Bifidobacterium* の発育は、培養方法によつて著しく影響を受けることが明らかとなつた。これは、培養方法によつて嫌気度および菌のおかれた状態が異なり、薬剤の種類によつては、菌自体の感受性に变化が生じるためと考えられた。BL agar の培養方法の比較では、嫌気ジャー法がもつとも菌数が多く確実性があり、試験管法、パウチ法がこれに次ぎ、シャーレ重層法は菌種によつては菌数が著しく低下した。さらに、NPNL agar を用いての培養方法の比較では、嫌気ジャー法以外はいずれも菌数が著しく低下した。

なお、試験管法を用いた場合、NPNL agar の硫酸パロモマイシンの濃度を $50 \mu\text{g/ml}$ に、また、硫酸ネオマイ

シンの濃度を $30 \mu\text{g/ml}$ に低下させた変法 NPNL agar を使用する必要があつた。以上の如く、供試菌株および市販製品について、乳酸菌の発育を抑制し、*Bifidobacterium* のみを発育させる選択培地および培養方法を見出すことができた。

文 献

- 1) Bladel, B. O., and Greenberg, R. A. (1965): Appl. Microbiol., **13**, 281-285.
- 2) 光岡知足 (1974): 臨床検査, **18**, 1163-1172.
- 3) Mitsuoka, T., Segal, T., und Yamamoto, S. (1965): Zbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., **195**, 455-469.
- 4) 根岸 章 (1958): 日細菌誌, **13**, 519-527.
- 5) Pheil, C. G., and Ordal, Z. J. (1967): Appl. Microbiol., **15**, 893-898.
- 6) Schuler, R., Ruppert, A., und Müller, F. (1968): Milchwissenschaft, **23**, 614-618.
- 7) 島田清弘, 馬田三夫, 務台方彦, 鈴木 昭, 小沼博隆 (1977): 食品衛生学雑誌, **18**, 537-546.
- 8) Tissier, M. H. (1899): Compt. Rendu. Soc. Biol., **51**, 943-945.

Enumeration of Bifidobacteria in Dairy Products

Susumu TERAGUCHI, Mariko, UEHARA, Katsuhiko OGASA,
and *Tomotari MITSUOKA

Central Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.,
4-4-22, Meguro, Meguro-ku, Tokyo 153, and

*Institute of Physical and Chemical Research, Wako, Saitama 351

An improved selective medium, neomycin-paromomycin-nalidixic acid-lithium chloride (NP NL) agar, was developed for the enumeration of bifidobacteria in dairy products containing bifidobacteria, lactobacilli and streptococci. NP NL agar was BL agar without blood containing neomycin sulfate (100 $\mu\text{g/ml}$), paromomycin sulfate (200 $\mu\text{g/ml}$), nalidixic acid (15 $\mu\text{g/ml}$), and lithium chloride (3 mg/ml). It was employed as a plating medium. Incubation was carried out at 37C for 2 days in an anaerobic steel-wool jar filled with an atmosphere of 100% CO_2 .

In the case of dispensation with anaerobic jars, modified NP NL agar in combination with the shake culture tube method with an additional agar medium overlaid was also proved to be useful for the same purpose. Modified NP NL agar was BL agar without blood containing neomycin sulfate (30 $\mu\text{g/ml}$), paromomycin sulfate (50 $\mu\text{g/ml}$), nalidixic acid (15 $\mu\text{g/ml}$), and lithium chloride (3 mg/ml).