[農化 第 37 卷, 第 12 号, p.701~705, 1963]

米の *Aerobacter*, *Bacillus* 及び *Micrococcus* について

(穀類の微生物に関する研究 第 6 報)*

飯塚 廣, 駒形和男**, 内野忠治*** (東京大学応用微生物研究所)

昭和 38 年 3 月 1 日 受 理

緒 言

前報までに日本・タイ・ビルマ・中国大陸などの諸地域で採集した粳・玄米・白米の microflora を研究し^(1~3), 発芽能力を有する粳および正常な玄米の bacterial flora を構成する主要細菌は, いずれもさきに著者らが *Pseudomonas* 属の分類において報告した三大別^(4,5), すなわち Fluorescent group, Achromogenic group 及び Chromogenic group のうちの Chromogenic group 及び Fluorescent group に属する *Pseudomonas* であることについて報告した^(6~8). しかし米にはこれら *Pseudomonas* 以外の細菌も存在し, なかでも比較的多いのは *Aerobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* などである. 本報では正常な粳・玄米などより分離される *Aerobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus* の分類について述べる. また *Brevibacterium* については次報で報告の予定である.

実 験 方 法

供試菌株の分離については前報⁽¹⁾に述べたが, 今回はそのうち *Pseudomonas* 属約 300 株⁽⁷⁾, 以外の細菌約 300 株をまず著者らが考案した検索法⁽⁹⁾によって大別し, その各群の代表株から選出した *Aerobacter* 8 株, *Bacillus* 10 株, *Micrococcus* 1 株, 計 19 株を直接対象とした. これらの検索の過程及び同定の実験操作は前報までに述べたと同様であるから省略する.

実験結果及び記載

(1) *Aerobacter cloacae* (Jordan) Bergey et al.

Strain: Fg-1, Fg-2, 2Y-1, 2Y-2, Y-1, Y-7, Py-3.

Aerobacter は少数ではあるが, 小麦・大麦・トウモロコシ等の穀類より分離された報告がある^(10,11). 著者らが粳より分離した *Aerobacter cloacae* には 2 つのタイプがある. その第一は肉汁寒天上白色の発育を示すもの (Fg-1, Fg-2), 第二は肉汁寒天上の発育が黄色のもの (2Y-1, 2Y-2 等) である.

一般に米より分離される *Aerobacter* には, 前者より後者のタイプのものが多く, 著者らはこれらの細菌をとくに中国大陸米より多数分離した. 黄色コロニーを形成する *Aerobacter* は小麦などの他の穀類からも分離された報告⁽¹¹⁾があるので, このタイプの *Aerobacter* は比較的広く穀類に分布していると考えられる. なお粳より分離される *Aerobacter* の菌数はおおむね試料の総細菌数の 10% 前後である. これは粳の保存状態や収穫してから時間の異なり, *Aerobacter* が総菌数の 20% 以上にも及ぶ試料もあった. なおその出現頻度などは別に報告の予定である. 黄色コロニーを形成する *Aerobacter* は一見 *Erwinia* とみられるが, 稲に対する接種試験が陰性なので病原性を generic concept とする *Erwinia* に入れることはできない. *Aerobacter* の分類に関しては幾つかの研究が報告されているが, 著者らは *Aerobacter* の黄色色素の生成が分類の指標にならないという Thomas⁽¹²⁾ の報告と, 周毛を有しゼラチンを液化するものを *A. cloacae* とする Edward ら⁽¹³⁾ の見解に基づき, 著者らの分離菌株の黄色色素が非水溶性なので, これらの *Aerobacter* を *A. cloacae* と同定した.

* *Aerobacter*, *Bacillus* and *Micrococcus* isolated from Rice. (Studies on the Microorganisms of Cereal Grains. Part VI)

By Hiroshi IIZUKA, Kazuo KOMAGATA and Chuji UCHINO (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

** 現在: 川崎市鈴木町 味の素株式会社中央研究所

Present address: Central Research Laboratory, Ajinomoto Co., Inc., 2964 Suzuki-cho, Kwasaki.

*** 現在: 横須賀市夏島町 東京ファインケミカル株式会社横須賀工場

Present address: Yokosuka Factory, Tokyo Fine Chemical Co., Inc., Natsujima-cho, Yokosuka.

写真1 *Aerobacter cloacae* var. *rugosum* nov. var. 7g-1 のグルタミン酸培地における集落. 25°, 7 日間培養 (×5)

写真2 *Aerobacter cloacae* var. *rugosum* nov. var. 7g-1 の鞭毛 (戸田氏鞭毛染色法による) (×1250)

左: 肉汁斜面寒天, 20°, 18 時間培養
右: 肉汁斜面寒天, 30°, 18 時間培養

(2) *Aerobacter cloacae* var. *rugosum* nov. var.

Strain: 7g-1

本菌株は稲藁より分離したグラム陰性の桿菌である。供試菌株は肉汁寒天上盛り上った黄色皺状の集落を形成し、グルタミン酸寒天ではその性質が顕著である。さらに培養が進むと水泡状となる(写真1)。しかし平滑のコロニーが segregant として認められることがある。細胞は小桿で運動するが、鞭毛はいわゆる degenerated flagella である。鞭毛の本数は *Proteus* などに比較して少なく、発育適温より低い 20~25° で培養した細胞には数本の周毛が観察される。しかし発育適温で培養したものは一般に運動する細胞が少なく、また鞭毛の本数の少ない細胞が見出されることがある(写真2)。生理的には活性が高く、各種の糖より酸を生成するが、ガスは生成しない。また V-P テストが陽性であり、硝酸呼吸により嫌氣的にも発育する。このような性質から供試菌株の分類学上の位置を求めると、*Flavobacterium*, *Cellulomonas*, *Escherichia*, 及び *Aerobacter* が考えられる。従来知られている *Flavobacterium* にはこのような生理的活性の強い菌種はなく、また糖の嫌氣的酸酵能と硝酸呼吸能の2つを有する *Flavobacterium* も知られていない⁽¹⁴⁾。 *Cellulomonas* はセルロースを分解することをもって generic concept としているので、このような性質のない供試菌株を *Cellulomonas* に含ませることはできない⁽¹⁵⁾。

供試菌株は硝酸呼吸能や酸酵能を有し、牛乳を酸凝固し、V-P 反応が陽性であるので現在では *Enterobacteriaceae* に含ませるのが妥当であろう。またこの Family では供試菌は生酸性があり、プロデギオシンの生成がないので *Escherichia* あるいは *Aerobacter* に類縁性があると考えられる⁽¹⁵⁾。 *Escherichia* と *Aerobacter* の区別は古くから、メチル・レッド反応 (MR テスト) と V-P テストの reverse correlation が用いられている⁽¹⁶⁾。このテストの培地には K_2HPO_4 を含むグルコース・ペプトン水が常用されている⁽¹⁷⁾。Smith は *Bacillus* 属の V-P テストには標準培地の K_2HPO_4 を同量の NaCl で置換した培地が適しており、またこの培地は *Aerobacter* の V-P テストの培地としても勝れていると報告している⁽¹⁸⁾。著者らはこの研究に注目し、MR テスト及び V-P テストには標準培地のほかに Smith の培地も用いた。なお MR テスト、V-P テストには *E. coli* K-12, *A. aerogenes* ATCC 8329 をコントロールとして用いた。その結果、供試菌株及び *A. aerogenes* ATCC 8329 はいずれの培地においても V-P テストは陽性であったが、特に Smith の培地は標準培地より色調がこく、発色もよく、このテストには勝れていた。なお *E. coli* K-12 はいずれの培地においても V-P テストは陰性であり、MR テストは陽性であった。また供試菌株及び *A. aerogenes* ATCC 8329 は標準培地において培養初期に MR テストは陽性であったが後陰性となった。しかし Smith の培地では両菌株とも4日間にわたる培養期間中 MR テストは陽性であった。以上のように MR テストは培地により異なるので著者らは供試菌株の MR テスト、V-P の結果の記載には使用した培地を明記した。供試菌株の MR テストは標準培地ではほとんど陰性と考えられ、また Smith の培地において *Aerobacter aerogenes* ATCC 8329 が供試菌株同様 MR テストが陽性であるので、著者らは供試菌株を *Aerobacter* に含めるのが妥当と考える。

供試菌株は運動性を有し、ゼラチンを液化するので Edward らの見解に従えば *A. aerogenes* に一致せず、むしろ *A. cloacae* に類縁である。しかしグルコースよりガスを生成せず、クエン酸を資化せず、特異的なコロニ

一を形成するので *A. cloacae* にも完全に一致しない。以上の理由によりこれを *A. cloacae* の一変種と認め、このコロニーの様相に基づき *A. cloacae* var. *rugosum* nov. var. としたい (rugosum: full of wrinkles)。
糲には比較的多くの *Aerobacter* が存在するが、本菌株の分離源の例から推定して、それらの細菌は土壌に由来し稲の茎や糲に達するものと考えられる。

新 変 種 の 記 載

Rods, 0.6 to 0.8 by 1.2 to 2.0 microns. Motile with peritrichous flagella. Large number of flagella are found on the cells cultured at 20~25° than the cells cultured at 30°. Gram-negative Spore not formed.

Nutrient agar colonies: Circular, smooth or rough, (pitted or ridged surface), entire to erose raised to convex, yellow, butyrous.

Glutamate agar colonies: Irregular, rough, lobate, raised, papillate or verrucose, dull with glistening center, dull yellow, membranous with raised center.

Nutrient agar slant: Growth moderate, filiform, smooth to pitted surface, yellow, butyrous, medium unchanged.

Glutamate agar slant: Growth moderate to abundant, filiform, deep depressed surface, dull yellow, medium unchanged.

Potato agar slant: Growth moderate, filiform, pale yellow, wet, pitted surface, medium unchanged.

Czapek agar slant: Growth scanty.

Nutrient broth: Fragile pellicle, slightly turbid.

Glutamate broth: Membranous pellicle, slightly turbid.

Nutrient gelatin stab: Saccate liquefaction (complete after two weeks).

Milk: Coagulated, gas not produced.

Litmas milk: Acid, coagulated, gas not produced.

B.C.P. milk: Acid, coagulated, gas not produced.

Nitrate reduced to nitrite in nitrate broth and succinate-nitrate broth.

Anaerobical growth with nitrate: Positive.

Indole not produced.

Hydrogen sulfide produced.

Starch not hydrolyzed.

Methyl red test: Positive (Smith's medium); Negative (Standard medium)

V-P test: Positive. (Standard medium and Smith's medium)

Cellulose not decomposed.

Acid but no gas from sorbitol, mannitol, xylose, arabinose, glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose, rhamnose, melibiose, cellobiose, trehalose and dextrin, but no action on glycerol, adnitol, dulcitol, sorbose, inulin, starch, salicin or aesculin in peptone media. According to Hugh and Leifson's method, acid is produced aerobically or anaerobically from sorbitol, mannitol, xylose, arabinose, glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose, rhamnose, melibiose, cellobiose, trehalose, dextrin and salicin. Aerobically acid from glycerol. No action on adnitol, dulcitol, inulin, starch and aesculin. Production of gas is not observed from any kind of carbohydrates employed.

Citrate not utilized in Koser's medium.

Optimum temperature: 25° to 37°.

Aerobic, facultatively anaerobic.

Source: Straw of Burmese rice.

(3) *Bacillus megaterium* De Bary

Strain: 6-1, 12-1, 37-1, EC-4

供試菌株は日本・タイ・ビルマ・中国大陸産の玄米・白米などより分離した。これらの菌株はチロシン含有培地を褐変し、肉汁寒天の斜面培養で yellow dots を作るので、古くは *Bacillus silvaticus* Neide⁽¹⁹⁾ といわれたものに属している。本種の米における生態的特長は正常な粳・玄米の bacterial flora を構成する主要細菌である Chromogenic group 及び Fluorescent group の *Pseudomonas* の菌数が減少した場合にこれらに交代して多く見出される。さらに本種は東南アジアの米に多く認められ、日本産の米では交代菌として本種よりもむしろ *B. subtilis* が認められる。

(4) *Bacillus cereus* Frankland and Frankland

Strain: DC-3, DB-4.

供試菌株はビルマ産の白米より分離した。*B. megaterium* について多数分離されるが、前者はツアベック寒天に生育し黄色を呈するが、本菌種は生育しないので区別される。本種の米における生態的特長は *Bacillus megaterium* と同様である。

(5) *Bacillus subtilis* Cohn emend. Prazmowski

Strain: BC-8, GB-4

本菌種は自然界に広く分布している細菌の一種であるが、著者らはこれを日本産粳・白米より分離した。角田らは⁽²⁰⁾、エクアドル茶米と称する変質米より本菌種を分離している。本種は前述の如く日本米における交代菌と考えられ、東南アジアにおける *Bacillus megaterium* と同様な生態的意義を有するものであろう。

(6) *Bacillus pumilus* Gottel

Strain: DP-23

本菌種は澱粉分解力を欠く点を除けば *B. subtilis* とほとんど変らない。*B. subtilis* と同様に各地域産の粳・白米より分離された。供試菌株はビルマ産の白米より分離した。

(7) *Bacillus sphericus* Neide

Strain: EB-2

本菌種は drum-stick like の sporangia を生じ、Smith⁽¹⁸⁾ の分類によれば *Bacillus* の第 3 群に属するものである。米よりは稀に分離され、本来土壌性のものであるから、米の調製中の汚染菌と考えられる。供試菌株はビルマ産の白米より分離した。

(8) *Micrococcus luteus* (Schroeter) Cohn

Strain: 19-2

Micrococcus は他の穀類から分離された報告はあるが⁽²¹⁾、著者らは米からも稀ではあるが分離した。本菌種はタイ産の白米より分離した。

考 察

前報⁽¹⁻⁸⁾までに正常な粳及び玄米の bacterial flora を構成する主要細菌は *Pseudomonas* であり、しかもそれらが特定の群、すなわち著者らが *Pseudomonas* の分類で報告した 3 大別のうちの Chromogenic group 及び Fluorescent group に属するものであることについて報告した。しかし米は栽培・収穫・流通・調製・貯蔵の諸過程を通じて種々の微生物群の変遷があり、細菌としてはこれらの他に本報で述べたような *Aerobacter*, *Bacillus* あるいは *Brevibacterium* などが比較的多く見られる。*Aerobacter* や *Brevibacterium* などは粳には認められるが白米には存在しないので立穂中か初貯蔵の間に侵入したものと考えられる。*Bacillus* は一般に正常な粳では主として粳殻の部分から分離され、貯蔵米やとくに搗精後日時を経過した白米からは高い率で分離されるので、その侵入経路は主として収穫以後にあると考えられる。すなわち米の細菌は生態的に 2 つの群に大別される。第 1 の群は *Pseudomonas* のように正常な粳に多数存在し、種子としての粳に $10^8 \sim 10^9$ /g 程度常に認められる常住菌。第 2 の群は *Bacillus* で代表される二次汚染による交代菌である。従って粳、玄米及び白米はその保存状態が不適当であると常住菌に代って二次汚染菌が増加して交代菌としての位置を占めるに至るものと考えられる。この段階がさらに進めば前記 *Bacillus* 属の他に二次汚染糸状菌としての *Aspergillus*, *Penicillium* も増殖し、いわゆる病変米の状態にたちいた。なお小麦は貯蔵条件が不良になると正常な小麦にはあまり認められない *Micrococcus* が増加すると報告されているのも⁽²¹⁾、米において著者らが得た知見と同じような微生物の変遷の現象かも知れない。

このような事実から米の微生物学的研究または検査においては、細菌数のみを主要な標識として考えることも、またいわゆる病変米菌数のみを考えることも試料の微生物的汚染や保管状態を正しく把握することにはならない。すなわち試料の正常な場合の常住微生物と二次汚染による交代微生物との生化学的特長をも含めた分類学上の差を考慮して、米という極めて不均一な生態系を構成している microflora の動向を判定した上でなければならない。

要 約

(1) 日本・タイ・ビルマ・中國大陸などで著者らが採集した粳・玄米・白米・その他の試料より次の細菌を分離・同定した。

<i>Aerobacter cloacae</i> (Jordan) Bergey et al.	7 株
<i>Aerobacter cloacae</i> var. <i>rugosum</i> nov. var.	1 株
<i>Bacillus megaterium</i> De Bary	4 株
<i>Bacillus cereus</i> Frankland and Frankland	2 株
<i>Bacillus subtilis</i> Cohn emend. Prazmowski	2 株
<i>Bacillus pumilus</i> Gotteil	1 株
<i>Bacillus sphaericus</i> Neide	1 株
<i>Micrococcus luteus</i> (Schroeter) Cohn	1 株

(2) これらは前報までに述べた正常な粳や玄米の主要細菌である著者らの Chromogenic group 及び Fluorescent group の *Pseudomonas* とは異なり、二次的に汚染した細菌であろうと推定した。これらのことから米穀検定における微生物検査への考慮について述べた。

本研究は 1959 年 6 月、日本農芸化学会第 193 回関東支部例会（東京）において報告した。なお本研究を行なうにあたり、稲に対する接種試験を実施していただいた農林省農業技術研究所富永時任技官並びに実験上種々御協力をいただいた当研究室の諸氏に感謝する。

- (1) 飯塚 廣：本誌, 31, 454 (1957), 32, 496 (1958).
- (2) H. Iizuka: *J. Gen. Appl. Microbiology*, 3, 146 (1957); 4, 108 (1958).
- (3) 飯塚 廣：東京大学応用微生物研究所シンポジウム, 第 2 集「微生物の生態」, p. 250 (1961).
- (4) 飯塚 廣, 駒形和男：本誌, 36, 663 (1962).
- (5) 飯塚 廣, 駒形和男：本誌, 36, 668 (1962).
- (6) 飯塚 廣, 駒形和男：本誌, 37, 71 (1963).
- (7) 飯塚 廣, 駒形和男：本誌, 37, 77 (1963).
- (8) 飯塚 廣, 駒形和男：本誌, 37, 137 (1963).
- (9) 駒形和男：本誌, 35, 981 (1961).
- (10) W. M. Esten: Connecticut Agri. Expt. Sta. (Storrs) Bull. 591 (1909) (文献 (21) より引用).
- (11) L. A. Rogers, W. M. Clark, A. C. Evans: *J. infect. Dis.*, 17, 137 (1915).
- (12) S. B. Thomas, K. Elson: *J. appl. Bact.*, 20, 50 (1957).
- (13) P. R. Edward, M. A. Fife: *J. Bact.*, 70,

382 (1955).

- (14) 飯塚 廣, 駒形和男, 高橋雅弘：日本農芸化学会大会, 1962 年 4 月 (仙台).
- (15) R. S. Breed et al.: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed", Williams & Wilkins (1957).
- (16) M. Levine: *J. Bact.*, 1, 153 (1916).
- (17) M. J. Pelczar: "Manual of Microbiological Methods", McGraw-Hill (1957).
- (18) N. R. Smith, R. E. Gordon, F. E. Clark: "Aerobic Sporeforming Bacteria, Agricultural Monograph", No. 16, U. S. D. A. (1952).
- (19) E. Neide: *Z. Bakt.*, II, 12, 1 (1904).
- (20) 角田 広, 諸岡信一, 中野尚子：食糧研究所研究報告, 10号, 69 (1955).
- (21) J. A. Anderson, A. W. Alcock: "Storage of Cereal Grains and Their Products", p. 129~131 (1954). "American Association of Cereal Chemists" より引用.