[農化 第 45 卷, 第 12 号, p. 529~533, 1971]

ルーメンから分離される微生物の研究 (第3報)

橙赤色球菌とその性質 (その3)

大井 章, 太田康子, 北原覚雄*

(相模女子大学学芸学部食物学科, *東京農業大学農学部農芸化学科)

昭和 46 年 4 月 26 日 受 理

Studies on Bovine Rumen Microbes

Part III. Reddish-orange Colored Cocci and Their Characteristics (3)

By Akira Ōi, Yasuko ŌTA and Kakuo KITAHARA*

Sagami Women's College; *Tokyo University of Agriculture

The anaerobic brick-colored cocci were known previously to be similar to *Streptococcus bovis* Orla-Jensen in fermenting starch and producing L (+) lactic acid, but their taxonomic position was remained unsolved. In this paper the cocci were compared with type cultures of *Sc. bovis* including ATCC 9809 and IFO 12058. They were coincided well in morphological characters, fermentable sugars, relatively low lactic acid recovery, utilization of inorganic nitrogen and other physiological properties except for: Present strains are strict anaerobic and generally more or less colored.

(Received April 26, 1971)

緒 言

牛のルーメンから分離した乳酸球菌^(1,2)は絶対嫌気性で、無機窒素を利用して生育した。この無機培養で橙赤色の色素を生成するものもあったが、呈色の度合は菌株によって異なり、全く色素を生成しないものもあった。ところで、分離菌群は色素生成能の違いをのぞいて、形態および生理的性質は完全に一致しているので、一つの種に包含されるものと考えている。強いでん粉の発酵能があって、回収率こそ低いものの右旋性乳酸のみを生成したので、*Streptococcus bovis* Orla-Jensen⁽³⁾に近縁のものとして想定しているが、まだ分類上の位置を決定するにはいたっていない。

本報では、その位置づけを明確にする目的で *Sc. bovis* の保存株と対比検討を行ない、分離菌は *Sc. bovis* の変種とするのが妥当との結論を得た。その結果をここに報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株 分離菌群の中から、無機窒素培養でもっとも着色の著しかった 148 と、着色しなかった N 51 を試験菌として用いた。対照の *Sc. bovis* ATCC 9809 および *Sc. bovis* IFO 12058 について主として対比し、*Sc. faecalis*, *Sc. liquefaciens*, *Sc. lactis*, *Sc. salivarius*, *Sc. thermophilus* (東京農業大学応用微生物研究室保存菌株) も対照とした。

2. 培養法 通性嫌気条件のミルク培地は 10% 脱脂粉乳の水溶液を、絶対嫌気条件のそれはミネラル・システイン塩酸・炭酸ソーダを含む溶液を、第1報にしたがって調製し、これに 10% の脱脂粉乳を溶解して用いた。形態の観察、一般生理試験、発酵性糖類、グルコースおよびでん粉の発酵試験については、ポリペプトン・イーストエキス培地を基本にして、詳細は第1報にしたがった。合成培地での培養は、第2報にしたがった。

第1表 *Streptococcus* の生理的性質の比較

	インドール生成	NO ₃ 還元	ミルク凝固	ゼラチン液化	適温 °C	耐熱性 60°C, 30'	食塩耐性		色	素
							2.5%	6.5%		
<i>Sc. faecalis</i> * ¹	—	—	+	—	wide	+	+	+	rarely	yellow
<i>Sc. faecalis</i> 1-3	—	—	—	—	30	+	+	+	—	—
<i>Sc. bovis</i> * ¹	—	—	+	—	40	+	+	—	—	—
<i>Sc. bovis</i> ATCC 9809	—	—	—	—	40	—	+	—	—	—
<i>Sc. bovis</i> IFO 12058	—	—	—	—	40	—	+	—	—	—
148* ²	—	—	+	—	40	+	+	—	reddish	orange* ³
N 51* ²	—	—	+	—	40	+	+	—	—	* ³

*¹ Bergey's Manual 記載, *² 絶対嫌気培養, *³ RL 培地での着色。

Sc. faecalis, *Sc. liquefaciens*, *Sc. lactis*, *Sc. salivarius*, *Sc. thermophilus*, *Sc. bovis* IFO 12058 は通性嫌気条件で, 148, N 51 は絶対嫌気条件で, *Sc. bovis* ATCC 9809 は両条件で培養を行なった。

実験結果および考察

Sc. bovis ATCC 9809 および *Sc. bovis* IFO 12058 両菌株は, とともに 0.7~0.9 μ の球形で二連または短連鎖になり, 試験菌 148 (0.9~1.1 μ), N 51 (0.7~1.1 μ) と酷似しているが, その平均 0.8~1.0 μ よりやや小形であった。グラム陽性, PY 液体培養で均一な混濁を呈した。*Sc. bovis* IFO 12058 は通性嫌気条件下でのみ, 148, N 51 は絶対嫌気条件下でのみ, *Sc. bovis* ATCC 9809 は両条件下で生育する点, 嫌気度に差異が認められたが, 寒天穿刺培養では表面に生育せず, 穿刺孔に沿って糸状 (filiform) の生育をする点は, 対照試験各菌株とも共通していた。

試験菌と対照の *Sc. bovis* および *Sc. faecalis* の生理的性質を対比した結果を, 第1表に示した。各菌株ともインドールを生成せず, 硝酸塩を還元せず, ゼラチンを液化しない。*Sc. bovis* ATCC 9809, *Sc. bovis* IFO 12058 はミルクを凝固せず, 60°C, 30 分の熱処理に耐え得なかったが, 試験菌はミルクを凝固して, 60°C, 30 分の耐熱性をもっていた。この2性質に関しては, 試験菌の方が Bergey's Manual⁽⁴⁾ の記載に合致して, 対照株が一致しないという結果であった。適温は対照株および試験菌ともに 40°C で, 45°C でも生育し, Orla-Jensen, Sherman ら⁽⁵⁾ が *Sc. bovis* の性質として強調する高温性の点は共通していた。また, 6.5% の食塩を含む培地には, 対照株も試験菌もともに生育しなかった。Bergey's Manual には *Sc. faecalis* の中にまれに色素を生成するものがあるとしているが, 適温, 食塩耐性などで *Sc.*

bovis および試験菌と明瞭な差があり, 試験菌は *Sc. bovis* に近い性質のものであった。

発酵性糖類の結果を第2表に示した。試験菌は絶対嫌気条件で, 他は通性嫌気条件で培養した。*Sc. bovis* IFO 12058 はアラビノースを, *Sc. bovis* ATCC 9809 は蔗糖を発酵しなかったが, *Sc. bovis* の性質として指摘されているでん粉の発酵性については, 試験菌も対照株もその能力を有し, またイヌリンを発酵する共通点があって, Orla-Jensen, Sherman らの報告と照合すると, 対照株は牛糞から取得されたものではないかと想像され, とともに近縁のものであることを示している。

第1報において種々の糖質を基質にした発酵試験で, 試験菌の消費糖に対する乳酸の回収率の低い点を問題にし, 真の発酵性 *Streptococcus* には包含させ得ないことを指摘したが, その問題についてさらに検討する意味で, 口腔, 消化管, 乳汁など分離源の比較的関連性があると考えられる *Streptococcus* のグループと, 対照の *Sc. bovis* および試験菌について, グルコースを基質にして発酵試験を行なった結果を第3表に示した。いずれも乳酸のみを生成するものとみなされるが, *Sc. faecalis*, *Sc. liquefaciens*, *Sc. lactis*, *Sc. salivarius*, *Sc. thermophilus* は, 消費糖に対する乳酸の生成率 90% 以上でホモ乳酸発酵と認め得るが, 対照の *Sc. bovis* および試験菌は, 乳酸の生成率 70% 台でホモ乳酸発酵とはいえない結果であった。菌体の収量, および貯蔵糖質を定量して糖の収支を検討すれば, 乳酸の回収率は高くなるかも知れないが, 今後の研究にまたざるを得ない。ただ, この結果から *Streptococcus* 属の他の種と *Sc. bovis* および試験菌の間には明らかな差異があり, *Sc. bovis* と試験菌とは, 非常に近似した性質のあることが指摘できる。

生でん粉の発酵試験の結果を第4表に示した。*Sc.*

第 2 表 *Streptococcus* の発酵性糖類

	<i>Sc. faecalis</i> *1	<i>Sc. faecalis</i> *2 1-3	<i>Sc. bovis</i> *1	<i>Sc. bovis</i> *3 ATCC 9809	<i>Sc. bovis</i> *3 IFO 12058	148**
アラビノース	±	—*5 0	±	+	—	+
キシロース		— 0	±	+	—	—
ラムノース		— 0.65		+	—	
グルコース	+	+	+	+	+	—
ガラクトース		+	+	+	+	
マンノース		+	+	+	+	+
果糖		+	+	+	+	
麦芽糖	+	+	+	+	+	+
蔗糖	±	+	+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	+	+
メリビオース		+		+	+	
ラフィノース	±	+	+	+	+	+
イヌリン	±	— 0	±	+	+	+
可溶性でん粉		— 0	+	+	+	
馬鈴薯でん粉		— 0	+	+	+	+
グリセリン	+	— 0	—	—	—	
マニトール	+	+	±	—	—	
サリシン	+	+	+	+	+	+

*1 Bergey's Manual 記載, *2 PY 培地 5ml, 30°C, 3 日培養, *3 PY 培地 5ml, 40°C, 3 日培養, *4 RL 培地 4ml, 40°C, 3 日培養 (CO₂ 置換), *5 生育と 1/10N NaOH 滴定数。

第 3 表 *Streptococcus* のグルコースの発酵

菌 株	培養条件	消費グルコース mg	アルコール mg	酢酸 mg	乳酸 mg	乳酸生成率 %
<i>Sc. faecalis</i> 1-3	通性嫌気性	2929	40	105	2655	90.65
<i>Sc. liquefaciens</i> IFO 3528	"	1546	101	294	1434	92.70
<i>Sc. lactis</i> 1-1	"	1735	64	175	1601	92.25
<i>Sc. salivarius</i> IFO 3350	"	1634	91	262	1504	92.08
<i>Sc. thermophilus</i> 1-2	"	1576	35	111	1481	93.96
<i>Sc. bovis</i> IFO 12058	"	3529	26	146	2444	69.05
<i>Sc. bovis</i> ATCC 9809	{ 絶対嫌気性	3531	44	153	2576	72.96
148	"	3510	42	154	2486	70.84
N 51	"	3241	34	116	2476	76.38
	"	1954	15	37	1417	72.52

PY 培地 200ml, *Sc. faecalis*, *Sc. liquefaciens*, *Sc. lactis*, *Sc. salivarius* 30°C, *Sc. thermophilus*, *Sc. bovis*, 148, N 51, 40°C, 各 5 日間培養。

第4表 *Streptococcus bovis* の生でん粉の発酵

		消費 でん粉 mg	乳酸 mg	乳酸 生成率 %
<i>Sc. bovis</i>	可溶性でん粉	409	243	59.4
ATCC 9809	馬鈴薯でん粉	647	270	43.3
148	"	1705	1024	60.0
N 51	"	1758	1148	65.3

PY 培地 200ml 培養, *Sc. bovis* 24時間通性嫌気条件, 148, N 51, 7日間絶対嫌気条件.

bovis ATCC 9809 の発酵試験では, 全く無処理のでん粉を用いたが, そのためでん粉に付着している汚染有胞子細菌の生育は避けられないので, 24時間で試験をうち切った. 培養時間が短いために消費糖量が少なく, 乳酸の生成率 43% と低かったが, 適宜処置をして長時間培養すれば消費糖量も増し, 従って乳酸の生成率も向上するものと期待される. 生でん粉の発酵についても, 対照の *Sc. bovis* と試験菌は, 近似した能力をもっているものとみなされる. これはルーメン微生物の見地からも, 特記を要するであろう.

さらに, 乳酸菌としてはもっとも特異的な性質である無機窒素源の利用について対比した結果が, 第5表である. 第2報にしたがって窒素源に硫酸アンモニウムを用い, システイン塩酸 0.05%, 炭酸ソーダおよびビタミン類を添加した合成培地で培養をこころみた. *Sc. bovis* ATCC 9809 はこの培地に良く生育して, 乳酸の生成率は試験菌に比較して 10% ほど低かったが, 無機窒素を利用する能力のあることが分かった. Orla-Jensen はこの問題については, なにもふれていないので, 原種にこの能力があったか否かは分からない. Hansen⁽⁶⁾ によると, *Sc. bovis* ATCC 9809 の原株は Sherman 研究室のものなので, あるいは *Sc. bovis* には, もともとこの能力があったともみられる. ただ, 菌体色素の生成については, 試験菌 148 と対照の *Sc. bovis* ATCC 9809 との間には明瞭な差がみられ, 試験菌は橙赤色に着色したが, 対照株は全く着色をみなかった. 試験菌群の中にも RL 培養で着色の極端なものと, 全く色素の生成しない

ものが存在することは, 第1報に述べたとおりである. この色素生成能については, さらに検討をすすめたい.

以上, *Streptococcus bovis* の保存株と試験菌とを対比検討した結果を総合して考えると, 試験菌が無機窒素源を利用して生育して橙赤色に着色するものがあるほか, 分類学的な性質は, 一部を除いて *Sc. bovis* の保存株に近似したことから, 試験菌は *Sc. bovis* の変種とするのが妥当である. *Sc. bovis* は, 他の *Streptococcus* 属細菌に比較して乳酸の生成率が低く, 真の発酵性 *Streptococcus* に包含できるか否か問題はあがあるが, トレーサー実験などによって一段と追究したいと考えている.

要 約

ルーメンから分離した乳酸球菌と *Streptococcus bovis* の保存株を対比検討して, 下記の結果を得た.

(1) 試験菌と対照の *Sc. bovis* は, 形態も生理的性質も近似していたが, 対照の *Sc. bovis* は通性ないし絶対嫌気性であり, 試験菌は絶対嫌気性である点が異なっていた.

(2) 試験菌と対照の *Sc. bovis* は, ともにでん粉の発酵能があった. とくに, ともに生でん粉をも発酵できる点は, ルーメン細菌として重視すべきであろう.

(3) グルコースを基質にした発酵試験の結果は, *Sc. faecalis*, *Sc. liquefaciens*, *Sc. lactis*, *Sc. salivarius*, *Sc. thermophilus* はホモ乳酸発酵をしたが, 試験菌と対照の *Sc. bovis* は乳酸の生成率 70% 台で, ホモ乳酸発酵とはいえないものであった.

(4) 試験菌と対照の *Sc. bovis* は, 無機窒素を利用して生育し, 乳酸を生成した. この培養で, 試験菌には橙赤色の色素を生成する菌株があって, 対照の *Sc. bovis* とは異なった.

以上総合して, 試験菌と対照の *Sc. bovis* は同一の種に属するものと考えられ, 試験菌は *Sc. bovis* の変種とするのが妥当である.

本報告は, 昭和44年11月の日本農芸化学会関東支部大会で講演した.

保存株を分譲くださり, また文献をご恵送くださった American Type Culture Collection の Dr. P. A. Hansen に感謝します. また, 保存株を分譲くださった財団法人発酵研究所に感謝します.

実験に協力された東京農業大学山口邦夫, 岡本哲夫両

第5表 *Streptococcus bovis* の無機窒素培養

菌 株	着色	消費グル コース mg	乳酸 mg	乳 酸 生成率 %
<i>Sc. bovis</i> ATCC 9809	—	4036	2088	51.8
148	橙赤色	4036	2466	61.2

200ml, CO₂ 置換, 40℃, 3日間培養.

君に感謝します.

-
(1) 大井 章, 森 茂, 北原覚雄: 農化, 43 , 507 (1969).	(4) C. F. Niven, Jr.: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 7th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1957, p. 520.
(2) 大井 章, 森 茂, 北原覚雄: 農化, 44 , 252 (1970).	(5) J. M. Sherman and P. Stark: <i>J. Bacteriol.</i> , 22 , 275 (1931).
(3) S. Orla-Jensen: "The Lactic Acid Bacteria," 1919, p. 137.	(6) P. A. Hansen: 私信 (1968 年 11 月).
-