〔農化 第 45 巻, 第 8 号, p. 351~359, 1971〕

Lactobacillus arabinosus 17-5 と *Streptococcus faecalis* R の栄養共生に関する研究 (第1報)

栄養共生における菌の生育と活性物質の生成について

佐橋佳郎, 北原覚雄*

(三共株式会社生産技術研究所, *東京農業大学農芸化学科)

昭和 45 年 11 月 25 日 受 理

Studies on the Syntrophism of *Lactobacillus arabinosus* 17-5
and *Streptococcus faecalis* R

Part I. Formation of Growth Factors in a Syntrophic Culture Medium

By Yoshio SAHASHI and Kakuo KITAHARA*

Product Development Laboratories, Sankyo Co., Ltd., Tokyo; *Department
of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture

Although there are many reports on the symbiotic growth relating with microorganisms, little knowledge has been known about the so-called syntrophic growth between *Lactobacillus arabinosus* and *Streptococcus faecalis*.

In this reports, the present authors have made some attempts to interpret the mechanism of syntrophism among lactic acid bacteria which are usually used as strains for microbioassay, and studied on the growth factors in the syntrophic culture medium.

The syntrophism between *L. arabinosus* 17-5 (ATCC 8014) and *Sc. faecalis* R (ATCC 8043) was demonstrated in a synthetic medium lacking both phenylalanine and folic acid; these are required by *L. arabinosus* and *Sc. faecalis*, respectively. Establishment of this syntrophic growth was interpreted as follow: *L. arabinosus* produced a factor showing an activity as folic acid for *Sc. faecalis*, and *Sc. faecalis* formed a factor having an activity as phenylalanine for *L. arabinosus*. These factors were heat stable and secreted to the growth medium.

(Received November 25, 1970)

緒 言

一般に発酵といわれる現象は, 単一の微生物に起因するものばかりでなく多くの微生物が共存して生育し, 時間の経過とともに特徴ある菌の消長遷移とそれに伴う化学変化をみることが多い。

特に共存する微生物が相互に栄養的な交換を行なって生育する現象を栄養共生 (syntrophism) と称し, 乳酸菌の中にもこれを行なうものが知られている。すなわち, *Lactobacillus arabinosus* 17-5 (以下 *L. arabinosus*

と略す) と *Streptococcus faecalis* R (以下 *Sc. faecalis* と略す) の両菌株間にみられる栄養共生は Nurmikko ら⁽¹⁾により 1954 年に初めて報告され, その後 Koft ら⁽²⁾も同様の現象を報告している。さらに 1961 年 Krieg ら⁽³⁾はこの栄養共生現象の中にみられる生育因子などについて研究しているが, 明確な結論を得ていない。

この 2 菌種はいずれも天然に広く分布している乳酸菌種に属し, 多くの発酵食品⁽⁴⁾, サイレージ⁽⁵⁾その他の中にこれら 2 種が共存していることもよく知られている。ともに各種のビタミン, アミノ酸類その他の微生物定量

に利用されている菌株を含むことが特徴である。

そこで著者は、微生物の栄養要求性を基礎として、微生物定量法の原理と手法を利用しながら栄養共生現象の検討を行なったので報告する。

実験方法

1. 使用菌株 本報の実験に用いた乳酸菌は第1表のとおりである。正しい分類学的見地からみると、使用菌株の名称には妥当性を欠くものもあるが、慣例上本報告においては微生物定量法の呼称にしたがった。ただ、*Leuconostoc mesenteroides* P-60 は正しくは *Pediococcus* に属する菌株であるため⁽⁹⁾、*Leuconostoc* といわず *Leuc.* P-60 株とすることにした。

2. 培地 主として使用した培地の組成は第2表のとおりである。*L. arabinosus* の生育には組成 I の培地が最適であり、*Sc. faecalis* の生育には組成 II の培地が適しているが、両菌株を同時に培養する栄養共生用の培

地としては、二、三検討した結果、組成 III のように組成 I の酢酸ナトリウムを 1/2 量 (10 g/L) とし、これと同量 (10 g/L) のクエン酸ナトリウムを加えたものが、双方の生育に好結果を示すことを認めたので、この組成を採用した。

なお各種実験の目的に応じて、培地組成の一部を第3表のように改変して使用した。またビタミン類の影響を検討する実験などでは、それぞれ該当する成分を単独あるいは組み合わせて除去した欠乏培地を作った。

3. 培養方法ならびに測定方法 フェニルアラニン活性あるいは葉酸活性の測定などには内径 15 mm の試験管を用い、全量 2 ml の培養スケールで一般の微生物定量の常法^(10,11) にしたがって 72 時間培養後、主として 1/20 N 水酸化ナトリウム溶液による滴定値から定量あるいは活性の比較を行なった。またフェニルアラニン様活性物質あるいは葉酸様活性物質の生成、菌体の集積などは、実験目的に応じた容量の滅菌フラスコを用いて静置培養を行なった。培養温度はすべて 37°C である。

なお、いずれの実験においても、接種する菌体は滅菌生理食塩水で 3 回無菌的に洗浄したのち同液に懸濁したものを用いた。

4. 生菌数測定法 測定すべき菌液を滅菌生理食塩水で 10 倍段階希釈したのち、ペプトン、酵母エキス、酢酸ナトリウムおよびブドウ糖をおのおの 1% と寒天 2% を含む一般乳酸菌保存用寒天培地と混和し、37°C で

第1表 使用菌株一覧

Microbioassay における常用名	ATCC No.	分類学上正しいと 考えられる名称
<i>L. arabinosus</i> 17-5	8014	<i>L. plantarum</i> ⁽⁶⁾
<i>L. fermenti</i> 36	9338	<i>L. fermentum</i>
<i>L. casei</i> ε	7469	<i>L. helveticus</i> ⁽⁷⁾
<i>L. leichmannii</i>	7830	<i>L. delbrueckii</i> ⁽⁸⁾
<i>Leuc. mesenteroides</i> P-60	8042	<i>Pc. acidilactici</i> ⁽⁹⁾
<i>Sc. faecalis</i> R	8043	<i>Sc. faecalis</i>

第2表 基礎培地組成 (最終濃度 1 L 分)

成分	培地 I, II, III 共通	成分	培地 I, II, III 共通	成分	培地 I	培地 II	培地 III
DL-アラニン	200 mg	ビタミン B ₁ 塩酸塩	1.0 mg	ブドウ糖	20 g	20 g	20 g
DL-アスパラギン酸	400	リボフラビン	1.0	酢酸ナトリウム	20	—	10
L-アルギニン塩酸塩	200	ピリドキサル塩酸塩	1.0	クエン酸ナトリウム	—	20	10
L-シスチン	100	ピリドキシン塩酸塩	1.0				
L-グルタミン酸	500	パントテン酸カルシウム	1.0	K ₂ HPO ₄	500 mg	5 g	500 mg
グリシン	100	ニコチン酸	1.0	KH ₂ PO ₄	500	—	500
L-ヒスチジン塩酸塩	100	パラアミノ安息香酸	0.2				
DL-イソロイシン	200	葉酸	0.01	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	200 mg	800 mg	200 mg
L-ロイシン	100	ビオチン	0.01	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	10	40	10
L-リジン塩酸塩	200			MnSO ₄ ·4 H ₂ O	10	160	10
DL-メチオニン	200	アデニン	10 mg	NaCl	10	40	10
L-フェニルアラニン	100	グアニン	10				
L-プロリン	100	ウラシル	10	pH 6.8~7.0			
DL-セリン	100	キサンテン	10				
DL-スレオニン	200						
L-トリプトファン	50						
L-チロシン	100						
DL-バリン	200						

第3表 各種実験用培地組成の改変点

菌 株 名	目 的	培 地	備 考
<i>L. arabinosus</i>	フェニルアラニン活性測定	組成 I	アミノ酸混液使用
同 上	葉酸活性物質生成	同上	カゼイン酸分解物使用
<i>Sc. faecalis</i>	葉酸活性測定	組成 II	同 上
同 上	フェニルアラニン活性物質生成	同上	アミノ酸混液使用
<i>L. arabinosus</i> + <i>Sc. faecalis</i> (混合培養)	栄養共生培養 (syntrophic culture)	組成 III	アミノ酸混液使用 葉酸欠
<i>L. fermenti</i>	フェニルアラニン活性測定	組成 I	アミノ酸混液使用
<i>L. casei</i>	同 上	同上	同 上
同 上	葉酸活性測定	同上	カゼイン酸および酵素 分解物使用
<i>L. leichmannii</i>	同 上	USP XVIII	V, B ₁₂ 定量用改変
<i>Leuc. P-60</i>	フェニルアラニン活性測定	組成 I	アミノ酸混液使用

48~72時間培養後、生育したコロニーを計数して生菌数を算出した。

実験結果および考察

1. 乳酸菌の栄養要求性と栄養共生との関係

乳酸菌類のアミノ酸、ビタミン要求性からみて栄養共生の出現する可能性のある組合せは、A菌が特異的に要求するX物質をB菌が全く要求せず、逆にB菌が特異的に要求するY物質をA菌が全く要求しないというものでなければならない。このような組合せでXおよびY物質の両者を欠く培地にA, B両菌を同時に接種したとき両菌が併行して生育してくれば栄養共生が成立したものと考えられる。

そこで微生物定量に常時使用される乳酸菌について、それら各菌株の栄養要求性を考慮して、栄養共生の起こる可能性ある6組をつくり、その生育の検討を行なった。結果は第4表のごとくで明瞭な栄養共生のみとめられる組合せは *L. arabinosus*-*Sc. faecalis* であった。

2. *L. arabinosus* と *Sc. faecalis* の栄養共生

この両菌株はその特長ある栄養要求性から、それぞれ多くのビタミン、アミノ酸類の微生物定量に利用されている^(10,11)。この栄養要求性のなかで一方が必須に要求する物質で他方が要求しないというものは、*L. arabinosus* のフェニルアラニンおよびシスチン要求

性と、*Sc. faecalis* のビタミンB₆群および葉酸要求性である。それで、これら諸物質を含まない合成培地を用いて両菌株の単独ならびに混合接種を行ない、その生育状況を検討して第5表の結果を得た。表にみられるとおり、明らかに栄養共生のみられるのはフェニルアラニン、葉酸を含まぬ培地における混合培養のときのみであることが知られる。

第5表のうちフェニルアラニン、葉酸の両者を除いた培地における *L. arabinosus* と *Sc. faecalis* の単独および混合培養時の生育曲線は第1図のとおりで、単独では両菌とも生育しないが両者の洗浄菌懸濁液を混合して

第4表 数種乳酸菌の間における栄養共生の出現

混合接種した 乳 酸 菌 名	培地から同時に 除いた2成分	菌の 生育
<i>L. arabinosus</i> - <i>Sc. faecalis</i>	フェニルアラニン-ビタミンB ₆	—
" - "	" - 葉酸	+
<i>L. fermenti</i> - "	" - ビタミンB ₆	—
" - "	" - 葉酸	—
<i>Leuc. P-60</i> - "	" - ビタミンB ₆	—
" - "	" - 葉酸	—

第5表 *L. arabinosus* および *Sc. faecalis* の生育に及ぼす
二、三のアミノ酸、ビタミンの影響

培 地	接 種 菌 株 名		
	<i>L. arabinosus</i>	<i>Sc. faecalis</i>	混合
単培	フェニルアラニン欠	—	+
一	シスチン欠	—	+
除	ビタミンB ₆ 群欠	+	+
去地	葉 酸 欠	+	+
複培	フェニルアラニン・V, B ₆ 群欠	—	—
合	フェニルアラニン・葉酸欠	—	+
除	シスチン・V, B ₆ 群欠	—	—
去地	シスチン・葉酸欠	—	—

(+: 生育, -: 生育せず)

第1図 フェニルアラニンおよび葉酸欠培地における *L. arabinosus* 17-5 および *Sc. faecalis* R の生育曲線

●—● *L. arabinosus* 17-5 + *Sc. faecalis* R
 ×—× *L. arabinosus* 17-5
 △—△ *Sc. faecalis* R

接種すると若干の誘導期の後、明瞭な生育が認められた。

このとき 48 時間培養後の生菌数を酵母エキス・ペプトン・ブドウ糖寒天培地を用いて測定し、同時に平板上の集落から 30 株を分離して、それぞれの栄養要求性と菌型を観察した結果は第6表のとおりである。

培養 48 時間の生菌数は約 10^9 /ml で、混合培養して栄養共生が成立した場合も完全条件下の単独培養の場合もほとんど差がみられない。また栄養共生が行なわれている培養液中において生育、存在している菌について分離確認した結果は、表にみられるようにフェニルアラニンを要求する桿菌、すなわち *L. arabinosus* と葉酸を要求する球菌すなわち *Sc. faecalis* の2種類のみが検出さ

れ、要求性あるいは形態の異なる菌は全く認められなかった。したがって *L. arabinosus* と *Sc. faecalis* の両菌株がフェニルアラニン、葉酸をともに欠く培地で生育し得るのは、変異株のような遺伝的問題が介在するのではなく、なんらかの栄養交換、すなわち栄養共生現象に起因することが強く示唆される。

3. 接種時点をずらせた場合における栄養共生の経過

フェニルアラニンおよび葉酸を除去した培地に *L. arabinosus* と *Sc. faecalis* を同時に接種したときには第1図のように約 24 時間の誘導期ののちに両菌が共存しながら急激に生育してくる。そこで、いずれか一方の菌の接種を遅らせたときにも栄養共生現象が起こるか否かを検討を行なった。

すなわちフェニルアラニンおよび葉酸の双方を除いた培地にまず *Sc. faecalis* のみを接種して、そのまま 37°C で保存し、24, 48, 72 および 120 時間後に *L. arabinosus* を追加接種して菌の生育状況を生酸度から検討した(第2図)。同時に実施した両菌をスタートから同時に接種した対照と比較するとき、72 時間後までに接種したものは、いずれも同じように約 24 時間の誘導期ののち、ほとんど同じ速度で生育を開始し、その生酸度も対照よりやや高い。しかし 120 時間後に接種した場合には、はじめに接種した *Sc. faecalis* がすでに弱ってきているためか生育にややにぶりがみられるが、栄養共生が起こっていることは観取できる。

このときスタートより 216 時間目、すなわち *L. arabinosus* を接種して 96 時間後の生菌数を測定した結果、*Sc. faecalis* が約 4×10^6 /ml、*L. arabinosus* が約 4×10^8 /ml で両菌が共存していることは明らかであった。

また同様にフェニルアラニン、葉酸両者を除いた培地に上の場合と順序を逆にして、まず *L. arabinosus* を接種して 37°C で、24, 48, 72 および 120 時間保存した後

第6表 栄養共生で生育した乳酸菌の性状および分離菌の栄養要求性

接種菌株名	<i>L. arabinosus</i>	<i>Sc. faecalis</i>	<i>L. arabinosus</i> + <i>Sc. faecalis</i>
一次培養培地組成 { フェニルアラニン 葉酸	添加 なし	なし 添加	なし なし
48 時間培養後の生菌数 (/ml)	2.8×10^9	1.8×10^9	1.5×10^9
分離した菌株数	5 株	5 株	30 株
分離菌の形態 { 球菌 桿菌	0 5	5 0	21 9
分離菌の { フェニルアラニン欠培地生育株 栄養要求性 { 葉酸欠培地生育株 フェニルアラニン・葉酸両欠培地生育株	0 5 0	5 0 0	9 21 0

に, *Sc. faecalis* を接種したときの経過は第 3 図に示される。両菌をスタートに同時接種したときの誘導期が約 24 時間であるのに比べ, 24 時間後の *Sc. faecalis* 接種では誘導期が約 48 時間, 48 時間後の接種では 48 時間強, 72 時間後では 96 時間とそれぞれ誘導期の時間が長くなり, 120 時間後の接種ではその後 120 時間 (スター

トより 240 時間) の観察で菌の生育は全く認められなかった。このように誘導期が延びるのは, 最初に接種した *L. arabinosus* が培地中で単独に存在する間に弱ってしまうという性質を持っているためではないかと推定されるが, いずれにしても 72 時間後に *Sc. faecalis* を接種したものまでは, 明瞭な栄養共生現象がみられたわけで

第 2 図 フェニルアラニン, 葉酸兩欠培地における *L. arabinosus* 17-5 と *Sc. faecalis* R の混合培養 (その 1)

一次接種菌: *Sc. faecalis* R 二次接種菌: *L. arabinosus* 17-5
 ●—● 対照 *Sc. faecalis* R と *L. arabinosus* 17-5 スタートより同時接種
 ○—○ *Sc. faecalis* R 接種後 24 時間目に *L. arabinosus* 接種
 □—□ " 48 時間目に "
 △—△ " 72 時間目に "
 ×—× " 120 時間目に "

第 3 図 フェニルアラニン, 葉酸兩欠培地における *L. arabinosus* 17-5 と *Sc. faecalis* R の混合培養 (その 2)

一次接種菌: *L. arabinosus* 17-5 二次接種菌: *Sc. faecalis* R
 ●—● 対照 *Sc. faecalis* R と *L. arabinosus* 17-5 スタートより同時接種
 ○—○ *L. arabinosus* 接種後 24 時間目に *Sc. faecalis* R 接種
 □—□ " 48 時間目に "
 △—△ " 72 時間目に "
 ×—× " 120 時間目に "

第4図 *L. arabinosus* 17-5 と *Sc. faecalis* R の栄養共生における培地組成の影響

ある。

これらの実験で *L. arabinosus* と *Sc. faecalis* は最初から同時に接種されたときも、また別々に時間をずらして接種したときも、前に接種した菌が存在している限り常に栄養共生を行なうことが立証されたわけである。特にいずれの場合においても生育誘導期の短縮がみられなかったことから、両菌が培地中に共存する状況になったときから、両菌が相互に影響し合って互いに生育してることが同時に推定される。

4. 栄養共生における培地組成の影響——特にビタミン類の影響

L. arabinosus と *Sc. faecalis* におけるフェニルアラニン、葉酸の間に栄養共生が起こる場合、他の培地成分のはたす役割の一部を知る目的で、ビタミン類の最少培地、およびそれに他のビタミンを添加して検討を行なった。

L. arabinosus の生育に必須な最少限度のビタミンはニコチン酸、パントテン酸およびビオチンで、これにパラアミノ安息香酸が促進因子として加わる。一方 *Sc. faecalis* はビタミン B₆ 群、パントテン酸および葉酸が必須因子でニコチン酸とビオチンが促進因子である。

そこで *L. arabinosus* の必須ビタミン 3 種、すなわちニコチン酸 (N. A.), パントテン酸 (PaA) およびビオチン (Biot.) のみをビタミン源として含む最少培地 (minimum medium) [また、アミノ酸成分のうちフェニルアラニンのみを除去] として、これに他のビタミンを添加しながら栄養共生の起こる状況を観察した。

個々の実験条件としては最少培地にパラアミノ安息香酸 (PABA), ビタミン B₆ [ピリドキシン (PIN), ピリドキサール (PAL)] あるいはビタミン B₁ (V. B₁), リボフラビン (V. B₂) を添加したもの (第 4 図中記号 A), これらにフェニルアラニン (Phe) (記号 B), あるいは葉酸 (FA) (記号 C) を添加した 3 種の培地を用い、それぞれ *L. arabinosus* と *Sc. faecalis* 両菌を同時に混合接種してその生育を観察した。その結果は第 4 図 ①～⑦のとおりである。

第 4 図 ①にみられるようにニコチン酸、パントテン酸、ビオチンのみからなる最少培地では、これにフェニルアラニンまたは葉酸を加えても生育は全く起こらない。*L. arabinosus* の accessory factor であるパラアミノ安息香酸を添加した第 4 図 ②の場合、フェニルアラニンを添加して同菌に対しての必須成分がそろったとき

には当然のことながら生育が起こる。一方 *Sc. faecalis* の必須因子、ビタミン B₆ を添加したときはピリドキシン、ピリドキサール両者を加えた第 4 図 ⑤、ピリドキサールのみの第 4 図 ④、ピリドキシンのみの第 4 図 ③、いずれもそのままでは生育が認められないが、それぞれ葉酸を加えて *Sc. faecalis* に対する必須成分がそろった場合には生育が起こる。しかし最少培地にパラアミノ安息香酸、ビタミン B₆ 群を加えた培地 (第 4 図 ⑥) では完全に栄養共生が成立する。これにビタミン B₁, リボフラビンを加えても栄養共生がみられた (第 4 図 ⑦)。

以上の結果から両菌が essential に、あるいは stimulative に要求するビタミンのパラアミノ安息香酸、ビタミン B₆ 群のいずれか一方が欠けた場合には、栄養共生の起こらないことが明らかとなった。

5. 培地中に生成される活性因子の熱安定性

2 種の菌が栄養共生を行なうには、互いに他の菌の生育に必要な物質を菌体外に生成することが必要である。そこで葉酸欠培地に *L. arabinosus* を、またフェニルアラニン欠培地に *Sc. faecalis* をそれぞれ培養したのち菌体を濾過し、その濾液を中和して定量用培地に添加し、前者では葉酸活性を、後者ではフェニルアラニン活性を測定した。

まず加熱滅菌に対する両活性物質の安定性を検討するため微生物定量法の常法にしたがい、115°C 5 分間オー

第 5 図 *Sc. faecalis* R の生成するフェニルアラニン活性物質の加熱滅菌に対する安定性

●—● L-フェニルアラニン標準品添加
▲—▲ 培養濾液添加 常法滅菌法
x—x 培養濾液添加 菌管様作

第6図 *L. arabinosus* 17-5 の生成する葉酸活性物質の加熱滅菌に対する安定性

●—● 葉酸標準品添加
▲—▲ 培養濾液添加 常法滅菌法
△—△ 培養濾液添加 無菌操作法

トクレーブ滅菌したものと、ザイツ瀾過した培養濾液を無菌操作によって処理して活性を測定した2方法を比較した結果は第5, 6図のごとくで、いずれの物質も加熱によっては失活しないことがわかった。そこで以後の各実験は特殊な場合のほか活性測定に際しては、すべて常

第8図 活性物質の生成経過 (その2)
L. arabinosus 17-5 の生成する葉酸様活性物質

●—● 葉酸標準品添加
○—○ 120時間培養濾液添加
□—□ 72時間 "
△—△ 48時間 "
×—× 24時間 "

法とおり簡単な加熱滅菌法を採用することにした。

6. 活性物質の時間的生成経過

フェニルアラニン欠培地にはフェニルアラニン要求性をもたない *Sc. faecalis* はよく生育し、また葉酸欠培地には葉酸を要求しない *L. arabinosus* がよく生育する。そして生育とともに、それぞれフェニルアラニン様活性物質および葉酸様活性物質を培地中に生成してくるが、その時間的経過を第7, 8図に示した。

いずれの活性物質も比較的短時間のうちに生成され、*Sc. faecalis* のつくるフェニルアラニン様活性物質は約48時間で、また *L. arabinosus* のつくる葉酸様活性物質は24~48時間でそれぞれ最高に近い生成量を示してくる。したがって両活性物質の活性測定、抽出精製のためには、ほぼ生成量の安定した値を示す72時間培養を採用するのが妥当であると判定した。

要 約

微生物界にしばしばみられる共生現象のうち、乳酸菌における栄養共生 (syntrophism) について検討を行った。

(1) 栄養要求性からみて栄養共生の推定される多数の組合せのうち6組を実験して *L. arabinosus* (ATCC No. 8014) と *Sc. faecalis* R (ATCC No. 8043) 両菌株

第7図 活性物質の生成経過 (その1)
Sc. faecalis R の生成するフェニルアラニン活性物質

●—● L-フェニルアラニン標準品添加
○—○ 120時間培養濾液添加
□—□ 72時間 "
△—△ 48時間 "
×—× 24時間 "

がフェニルアラニンと葉酸要求性の間に本現象を示すことを認めた。

(2) この現象は変異株のような遺伝的な原因によるものでなく、互いに相手菌の生育に利用されるフェニルアラニン、葉酸またはこれらに相当する活性物質をそれぞれ培地中に生成していることに起因する。

(3) いずれか一方の菌接種を遅らせたときにも、最初に接種した菌が存在しているかぎり共生による生育は起こってくる。

(4) フェニルアラニンおよび葉酸以外の培地成分、特にビタミン組成の関係について検討を行なった結果、両菌の生育に必要なビタミン類、すなわちニコチン酸、パントテン酸、ピオチン、パラアミノ安息香酸、ビリドキシン、ビリドキサルがないと栄養共生は起こらない。ビタミン B₁、リボフラビンはこの現象に見かけ上関係がないと考えられる。

(5) これらの活性物質は熱に対して安定で、115°C 5 分間の加圧滅菌でも失活が認められない。

(6) 各活性物質は比較的短時間のうちに生成され、いずれも約 48 時間の培養で最高生育を示すに十分な量となる。

- (1) V. Nurmikko: "Ann. Acad. Sci. Fennicae," Ser. A, Vol. II, No. 54, 1954, p. 7.
- (2) B. W. Koft and J. H. Morrison: *J. Bacteriol.*, **72**, 705 (1956).
- (3) N. R. Krieg and M. J. Pelczar: *J. Gen. Microbiol.*, **25**, 77 (1961).
- (4) 岩井正憲, 今原広次, 万 雄治, 中浜敏雄: 醸工, **43**, 791 (1965).
- (5) 佐々木西二: 乳酸菌の研究 (北原覚雄編), 東京大学出版会, 1966, p. 116.
- (6) R. S. Breed, E. G. O. Murray and N. R. Smith: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 7th Ed., Baltimore, 1957, p. 549.
- (7) R. S. Breed, E. G. O. Murray and N. R. Smith: *ibid.*, 7th Ed., Baltimore, 1957, p. 545.
- (8) K. Kitahara, T. Kaneko and O. Goto: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3**, 111 (1957).
- (9) A. Nakagawa and K. Kitahara: *ibid.*, **5**, 95 (1959).
- (10) 田村学造, 角田俊直, 桐村二郎, 宮沢 滋: 農化, **26**, 460, 474 (1952).
- (11) 宮沢 滋: 高峰研年報, **4**, 115 (1952).