

野菜栽培土壌からの乳酸菌の分離について

Occurrence of Lactic Acid Bacteria in the Soil of the Cultivated Fields of Vegetables of Vegetables in Kumamoto Prefectural Research Center

田邊幾之助・身次幸二郎¹・郡司掛則昭・久保研一²・田中正美
熊本県農業研究センター生産環境研究所、八代農業改良普及センター¹、農業研究センター農産園芸研究所²

Ikunosuke Tanabe, Koujirou Mitsugi¹, Noriaki Gunjikake, Kenichi Kubo² and Masami Tanaka

要 約

畑地土壌中の微生物、とくに乳酸菌類の生態と作物生産とのかかわりを明らかにする目的で、その分離法を検討した。①試験圃場の畑地土壌より希釈平板法で乳酸菌を多数分離、同定したが、主要なものは2グループにまとめられた。*Streptococcus avium*と*Pediococcus* sp.であった。②畑地土壌では乳酸菌は優占種ではないので乳酸菌の分離には薬剤による選択分離が必要で、そのための選択培地の検討を行った。改変乳酸菌分離培地にはCycloheximide100mg/lおよびSodium azide50mg/lを加えることによって選択的に乳酸菌を分離し、有孢子細菌などの雑菌の汚染を消去しながら純粋分離を行うことができた。この結果を元にして③畑地土壌中の乳酸菌の生態を疫学的に研究調査をする目的で畑地土壌や作物根からの乳酸菌の直接平板分離について検討を行った。

キーワード：*Streptococcus avium*, *Pediococcus* sp., 改変乳酸菌分離培地 Modified culture medium for isolation of lactic acid bacteria, 畑地土壌 Soil of the cultivated fields of vegetables, 直接平板分離 direct plating for isolation

I 緒 言

近年、適当な農業用微生物資材を農地に投入することによって、作物の生育を促進し、収穫が格段に増大するとともに生産物の品質にも著しい改善が認められたというレポートを見かける。一方で、畑地土壌1gあたり 10^8 を越える常在微生物相の中におおむねかな微生物を導入してしかもそれが目立って有益な機能を発揮するという事は、あり得ないという見解も多い。これは醸造物のように閉鎖的な空間で起きている現象と畑地土壌のような開放的で媒体としても不均一な空間に形成されている微生物世界に対する認識に差があることによるものであろう。例えば、畑地土壌に植生、施肥、時に微生物の生活によっても環境変化が起きるかもしれない。そこに展開している微生物世界はその都度その変化に敏感に対応して揺動する。これは畑地土壌が微生物世界に対する選択培地の役割を果たしていることを示している。この点を明らかにすると、畑地土壌と農業用微生物資材の関係はおのずと筋道が見えてくる。

この研究は、畑地土壌中の微生物、とくに乳酸菌

の生態と作物生産との係わりを明らかにすることを目的として行っている。その一環として今回の報告は、①研究センターの畑地土壌中に乳酸菌が常在しているか、また②常在しているとするとどのような種類かについて一部明らかにできたので報告する。

II 材料および方法

1 畑地土壌および作物根試料

熊本県農業研究センターの施肥履歴の明らかな畑地土壌および作物根を採取し、可能なかぎりそのまま3時間以内に分離実験に使用した。①通常の希釈平板法での微生物の分離試料は収穫直前のキャベツの根圏土壌を採取し実験に供した。根圏土壌の含水量はそれぞれ平均35.1%（平成13年11月27日ハクサイなど）、29.1%（平成14年6月19日、キャベツ）および37.4%（平成14年12月2日キャベツなど）であった。一方、②畑地土壌中の乳酸菌の定性的分離には直接平板分離を行った。根圏土壌の他、キャベツの根を分離に使用したが、作物根はその根に土壌が付着したままのものを試料とし滅菌したカミソリ刃で

根の先端から5cmに切りそろえたものを1ペトリ皿あたり3本(約1g)使用して分離実験に供した。③疫学的微生物分離では作物根及び根圏土壌を実験に供した。作物は1) ”アカダイコン”、2) ハクサイ、3) チンゲンサイ、4) タアサイ、5) ”オータムポエム”(菜心)、6) コウサイタイ、7) ネギおよび 8) ピーマンの8点について行った。なお、希釈平板法などでの通常分離とか疫学的実験などでの対照としては作物を植え付けていない畝の土壌を採取したが、前作後はそのまま作つけないとはいえず、ホトケノザ(シソ科) およびナズナ(アブラナ科)などが点在していたのでなるべくそれらの根圏に含まれないと判断できる土壌を採取し、実験に供した。

2 分離培地

乳酸菌の分離には通常、麦芽肉汁寒天培地^{6,11)} や MRS (de Man, Rogosa and Sharpe, 1960) 培地⁹⁾などが使用されることが多い。ところが畑地土壌は乳酸菌の利用可能な糖類の少ない環境なのでそこに適応生息する乳酸菌を分離するには選択培地の使用が必要である¹⁵⁾。このためD(-)-fructoseおよび麦芽エキスを強化した改変乳酸菌分離培地(表1)を調製して使用した。

表1 改変乳酸菌分離培地・保存培地

	分離培地	保存培地
D-glucose	5g	2.5g
D(-)-fructose	5g	2.5g
yeast extract (Difco)	5g	2.5g
malt extract (Difco)	10g	10g
beef extract (Difco)	5g	2.5g
polypeptone(第五栄養)	5g	5g
sodium acetate, 3H ₂ O	5g	5g
塩類溶液(原液)*1	5ml	5ml
Tween80(Polyoxyethylene sorbitan monooleate)	0.5g	0.5g
ager. powder (Difco)	20g	15*2g
蒸留水	1l	1l

*1 塩類溶液(原液); MgSO₄ · 7H₂O, 4.0g; MnSO₄ · 4H₂O, 0.2g; FeSO₄ · 7H₂O, 0.2g; NaCl, 0.2g; 蒸留水, 100ml.

*2 培地の滅菌は121C, 20分; pHの調整は培地調整時にはpH6.8とするが、炭酸カルシウム(沈降性, 160C, 1時間乾熱滅菌)を加える時はpH6.5としたものをオートクレーブで滅菌して用いる。

分離した細菌類の菌株の保存には糖類を半減した乳酸菌保存培地(表1)を用いた。

3 分離操作

①通常の希釈平板法に加え、試料と目的に応じて以下の分離方法を採用した。②中皿重層平板方式¹⁷⁾: 試料中に乳酸菌がいるかどうかという定性的な分離では多数の試料を迅速に処理する必要があるため、いきなり希釈平板法で分離を行うことには無理がある。そのため直接分離を行うのが普通である。中皿重層平板で乳酸菌を検出するにはペトリ皿の外蓋の中に土壌あるいは作物根を入れ、乾熱滅菌した炭酸カルシウムを加える。その上から乳酸菌分離寒天培地を20-40ml前後注入、よく混合して固める。その表面にペトリ皿の中皿を反転して中皿の背面を固めた寒天培地の表面を覆うように押し付けて置いて中皿重層平板とする。¹⁷⁾これは嫌気微生物の簡易培養法の一形式である。なお、使用した乳酸菌分離培地にはCycloheximide およびSodium azideをそれぞれ10mg/l加えた。③直接平板分離: 分離条件の検討とか疫学的分離などでは1g以内の試料を直接希釈なしに分離培地と混合して固めて後、培養する。この時は分離寒天培地にはCycloheximide およびSodium azideを種々な濃度に加えて分離を行う。

4 同定実験

常法に従って固定実験を行った。^{3, 7, 10, 11, 15)} 実験に用いた乳酸菌株は前報⁹⁾以降の研究で分離した乳酸菌株多数から選抜した代表株20株であるが、目的に応じて、あるいは特別な微生物の特徴について多数の菌株のデータが必要などときには使用する菌株を増やして実験を行った。糖類利用性基本培地は必要に応じて種々の生理的テストの基本培地に用いたが、組成は以下の通りである: 肉エキスbeef extract, 3g; 酵母エキスyeast extract, 2g; ポリペプトンpolypepton, 10g; NaCl, 3g; polyoxyethylene-sorbitan-monooleate, 1g; D-glucose, 30g; 蒸留水, 1l; pH 6.8。なお五炭糖類を糖質源とするときは濾過滅菌した五炭糖溶液(10g/100mlまたは20g/100ml)を無菌的に加えた。

乳酸の検出と光学活性: 乳酸の証明と生成乳酸の光学活性は糖類発酵性培地5mlに乳酸菌を接種して5-7日間30°Cで培養を行い培養濾液について食品分析酵素法試薬D-乳酸/L-乳酸およびD-グルコース(F-キット, R-Biopharm GmbH)を使用して生成乳酸を定量し、乳酸の光学活性を判定した。^{12, 13, 14)}

III 結果および考察

1) 分離乳酸菌の同定

前報⁹⁾では分離した畑地土壌中の乳酸菌を形態および生理的性質によってグループ分けし代表株について数量分類方式(Adansonの原理)^{4,5)}で同定した。現在の微生物分類の方向としてはDNA分析や化学分類による系統分析に基づいたアプローチが期待されている。しかし分類学以外の誰でもが利用できる簡単で便利な検索表はまだなく諸事が分類学の手の中にあるので微生物生態学などでは手をつかねている状態である。それまでは乳酸菌群は歴史的に生理的群として定義付けられていたし、乳酸球菌群は分裂方式に加えさらに生態群によって区分けされて来た。従って微生物生態学的研究で直面する分離微生物の取り扱いについては生理的群として旧来の検索表による区分けを通すのが次善の策と考えている。これらの結果を後で分類額分野の研究者の追試が可能な形にしておけば問題はない。今回はこの考え方

からBergeys' Manual VII版1)あるいはBergey's Manual VIII版2)の検索表により所を求めることとした。Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2 (P. A. Sneath N. S. Mair, M. E. Sharpe and J.G.Holt, Williams & Wilkins, Baltimore 1986) およびThe Prokaryotes, 2nd ed., Vol.2 (W. P. Hammes, N. Weiss, and W. Holzappel, Springer-Verlag, 1992)を参考にするという考え方もあるが、過去の物として決定的な手を加えられないVII版およびVIII版の検索表を利用するのが無難だと思われる。従来、微生物生態学での取り扱いでは生理的特徴のみで示すもの、属名で表記することも多かった。この点、可能な限り種名表記とした方が生態学的な情報を限られた字数により多く託すことができるのでこれを次善と判断したとすることである。

表2 a 分離乳酸菌の特徴①形態と生理的性質

乳酸菌分離株(実験株)	グラム染色性	形態	Catalase test	Oxidase test	硝酸塩還元	生育温度			NaCl存在下育成			D-glucose発酵形式	乳酸の光学活性	同定
						40℃	45℃	液体	培養	培養	培養			
M-4, M-6, M-13, M-14, S-3, R-38	陽性	球菌 二連鎖	~	~	~	+	~	+	~	+	+	ホモ型	L(+)	Streptococcus avium
L-541, L-546, L-421, L-411, L-412, 5/345A-3	陽性	球菌 二連鎖	~	~	~	+	~	+	~	+	+	ホモ型	L(+)	Streptococcus avium
M-1, M-5, M-11, L-8, L-7-1, S-33	陽性	球菌 二連鎖 四連鎖	~	~	~	+	+	+	~	+	+	ホモ型	DL	Pediococcus sp.

表2 b 分離乳酸菌の特徴②糖類発酵性

乳酸菌分離株(実験株)	糖類発酵性(醗生成)																
	Glu	Gal	Ara	Xyl	Lac	Mtl	Gtl	Mal	Sac	Mel	Raf	Tre	Cel	Mez	Rib	Rha	Sal
M-4, M-6, M-13, M-14, S-3, R-38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
L-541, L-546, L-421, L-411, L-412, 5/345A-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
M-1, M-5, M-11, L-8, L-7-1, S-33	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+

※Glu, glucose; Gal, galactose; Ara, arabinose; Xyl, xylose; Lac, lactose; Mtl, Mannitol; Gtl, sorbitol; Mal, maltose; Sac, saccharose; Mel, melbiose; Raf, raffinose; Tre, trehalose; Cel, cellobiose; Mez, melezitose; Rib, ribose; Rha, rhamnose; Sal, salicin

乳酸菌の定義^{6,15)}は①唯一のエネルギー代謝は乳酸発酵であること。通常ブドウ糖の代謝で対糖収率が50%以上(ホモ発酵乳酸菌は対糖収率80%以上, EMP経路経由;ヘテロ発酵乳酸菌は対糖収率、40~50%, Phosphoketolase 経路経由)であること。②グラム染色は陽性、形態は球菌および桿菌。③酸素分圧に対し通性嫌気性。ヘムタンパクは含まず、カタラーゼテストは陰性;チトクローム系呼吸酵素はないのでオキシダーゼテストは陰性。従ってazideやcyanideで阻害を受けない。これらの項目を分離した酸生成菌がクリアすれば乳酸菌として同定作業に乗せることができる。純粋分離の過程でこれらの項目を確認して実験用の乳酸菌株とした。結果は表2にまとめてある。

乳酸の検出と光学活性:生成したD-乳酸およびL-乳酸の定量はそれぞれD-乳酸脱水素酵素およびL-乳酸脱水素酵素を使用する酵素法によって行った。また、消費糖量の測定もG-6-P(Glucose-6-phosphate)脱水素酵素による酵素法で測定した初糖と残糖の差から求めた^{13,14)} 実験に供した菌株はいずれも乳酸を産生した。このうちM-4, M-13, M-14, S-3およびR-38がホモ型発酵、L-乳酸のみを生成した。もう一つのホモ型発酵のグループは同様にL-乳酸を産生したL-541, L-546, L-421, L-411, L-122, A-1-3, 5/345A-3, A-3-1の菌株がこれに該当した。一方、第三のホモ型発酵株はDL-乳酸を生成した。M-1, M-5, M-6, L-8-1, L-7-1およびS-3がこれである。結果は表2に示したがこの特徴は前二者が*Streptococcus*属で後者は*Pediococcus*属であることを示している。

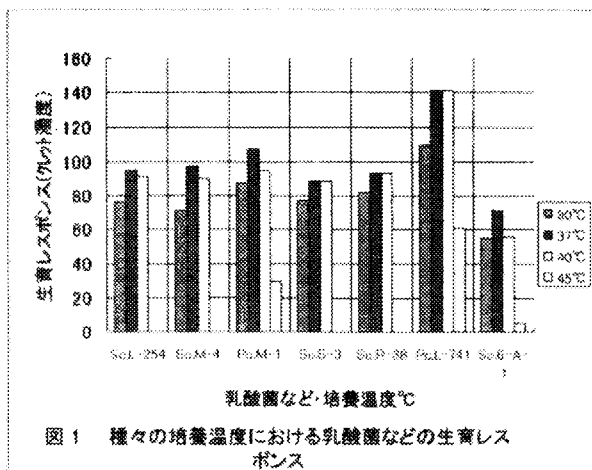


図1 種々の培養温度における乳酸菌などの生育レスポンス

生育温度:温度実験に使用した代表株を接種した寒天平板をビニールに包み、それぞれの培養温度のウォータバスに沈めて培養を行い、①生成乳酸による炭酸カルシウムの溶解環の直径を計り生育とした。一方、②改変乳酸菌分離培地の液体培地でそれぞれの温度で培養し、クレット濁度で生育判定を行った。結果は図1の通りであった。M-4およびL-541のグループは40°C生育はあるが、45°C培養では17日培養でも生育濁度はほとんど0であった。この45°C生育がないことは高温性の*Streptococcus faecalis*および*Sc. faecium*よりはこの温度での生育遅延を示す*Sc. avium*に近い性質をもつことになる。45°C生育とNaCl6.5%での生育を組み合わせるとPhysiological groupの*Enterococcus*の範囲に入れることができるが、M-4およびL-541のグループは40°C生育があるので、NaCl6.5%生育だけでこのグループの境界領域の細菌と判断した。一方でM-1に代表される菌株には45°C生育は37°C生育および40°C生育のほぼ30%程度であったが、45°C生育は陽性と判定し、土壌環境に適応した菌株でこれも温度的には境界領域の性質を示している*Pediococcus*属と判断した。

NaCl加乳酸菌培地での生育:NaClをそれぞれの濃度を含む乳酸菌培地の液体培地(0.0, 1.0, 2.0, 3.5および7.0%)と軟寒天培地(0.3, 3.0, 6.5および12.0%)に穿刺培養して比較したが、図2に示すように液体培地ではNaCl濃度7.0%でM-1およびM-4両グループとも12日培養では生育はほぼ0、軟寒天培地ではNaCl濃度6.5%に穿刺培養した場合には12日の培養で生育はmoderate growthで6.5%生育は確実な陽性と判定できた。この濃度は分離乳酸菌にとって生育限界の濃度ではあるが、軟寒天穿刺培養での結果を採用して陽性と判定した。

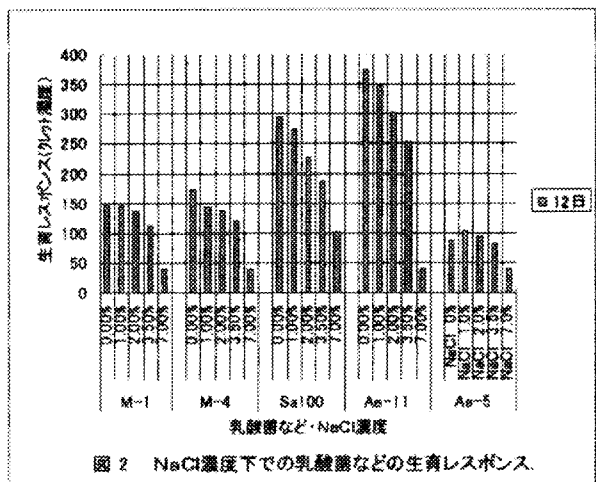


図2 NaCl濃度下での乳酸菌などの生育レスポンス

以上のように分離乳酸菌はいずれも乳酸菌の定義をクリアしているし、これらの分離株の大部分は3群の球菌にまとめられる。表2に示すようにM-4に代表されるもの、これとほとんど似た性質ながら糖類の発酵性でraffinose から生酸するL-541のグループおよびM-1に代表されるグループの3群である。ここで糖類の発酵性からグループを絞って見ると*Sc. faecalis* および*Sc. facium*は通常pentoseの発酵性はないとされるが、前2者はホモ乳酸発酵型でしかもpentoseの利用性がある点で生理的にはほぼ同一の乳酸菌と考えられる。上述のように生育温度とNaCl加乳酸菌培地での生育についてキーとなる45℃生育とNaCl16.5%生育の2点で境界領域にあって判定しにくいのが、*Sc. lactis*よりは*Sc. avium*と考えた方が生態型という見地からも妥当と判断している。一方、M-1グループの形態についてはtetradsないしは互いに直交する2つの分裂面をもつという点、生成乳酸の旋光性がDLなどから*Pediococcus*属乳酸菌と認めている。しかしこの場合も*Pediococcus urinae-equi*に近い種と見られるが、より高温性で45℃生育を示すため種の記述からは外れてしまう。ただ堆肥に適應した生態型ではないかと推定している。今回は*Pediococcus sp.*と止めて置いた方がよいと判断している。

2) 選択培地

乳酸菌の畑地土壤中の分布を希釈平板法などで明らかにするとともに、その生態を疫学的方法で検討するための簡便な選択培地を調製することを検討した。乳酸菌は畑地土壤中では優占種ではないので中皿重層寒天平板ではCycloheximideおよびSodium azideをとともに10mg/l添加することによって乳酸菌の炭酸カルシウム溶解環による検出は可能であったが、次のステップである純粋分離の操作が極めて困難であった。さらに簡単な直接平板分離では薬剤の濃度を上げないと全く問題にならなかった。このため選択培地に加える薬剤濃度について検討した。3) まず、菌類の生育阻害剤としてCycloheximideは①オートクレーブ滅菌が可能で、②カ価変動がないことから、効果は今一つではあるが、フィールドに近い実験室では実用性が高いと判断し今回の分離実験にはこれを使用することにした。この場合にも薬剤濃度と液体培養および平板培養あるいは斜面培養・穿刺培養など培地・培養方法との関係を検討して問題点に注意しながら検討を行った。また、呼吸系の阻害剤のSodium azideは呼吸的なエネルギー代謝を行う細菌、糸状菌などの生育阻害にはかなり効果的で、乳酸菌はほとんど生育阻害ないのでこの2薬剤

の濃度組み合わせで効果的な乳酸菌の選択培地を構築することとした。

Cycloheximideを種々な濃度に加えた平板に微生物を接種、炭酸カルシウムの溶解環の直径を測定、一方、液体培地に接種した場合はクレット濁度を経時的に測定し薬剤の微生物生育に及ぼす影響を測定した。結果は図3aにまとめた。これに加えて、乳酸菌の選択分離培地での生育度合いは、分離の際に炭酸カルシウム(培地pH6.0~6.5)の溶解環の大きさで生育が乳酸発酵に依存しているかどうかは明らかになるので、これも指標として使用した。この結果は図3bに示した。これから乳酸菌、*Bacillus sp.* Ae-2 および*Enterobacter sp.* Ae-11には150mg/lでもほとんど生育阻害は認められなかったが、焼酎酵母*Saccharomyces cerevisiae* Sa100では20mg/lで完全に生育阻害した。しかしCycloheximideによる菌類の生育阻害は畑地土壤中に多い*Rhizopus spp.* (Rh-1-5, Rh-4-5, Ae-21およびAe-22)については300mg/lで生育が少し落ちるが、800mg/lでも濃度0mg/lの10~25%は生育があるので分離の際にはかなり妨げになる。この結果から菌類の生育を抑えるにはCycloheximideのみでなく、Sodium azideと組み合わせることが必要と見られる。通常分離にはCycloheximideを少なくとも100mg/lの割合で分離培地に加えたもので分離するものとした。

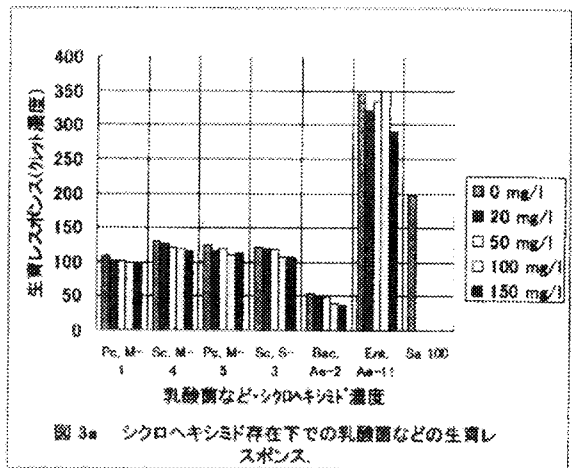


図3a シクロヘキシミド存在下での乳酸菌などの生育レスポンス

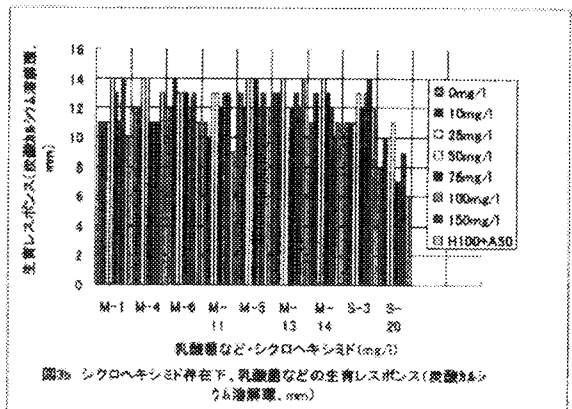


図3b シクロヘキシミド存在下、乳酸菌などの生育レスポンス(炭酸カルシウム溶解環, mm)

一方、呼吸系の阻害剤Sodium azideについては、従来、乳製品からの乳酸菌分離で75mg/l (Mayeux, Sandine and Elliker, "Leuconostoc Medium with Sodium Azide", 1962))、また水試料中のFaecal streptococciの分離には250mg/l (Hannay and Norton, "Glucose Azide Broth", 1947)) などの濃度が採用されており醸造物中の乳酸菌分離の10mg/lよりはるかに高濃度で実験が行われている。分離乳酸菌類を液体培地に接種してSodium azideに対するクレット濁度を経時的に測定した。結果は図4aに示した。また、改変乳酸菌分離平板に接種して炭酸カルシウムの溶解環の直径を測定して生育の指標としたものが図4bである。これから乳酸菌類には濃度100mg/lまではほとんど影響が認められなかったが、その他の雑菌類は30-100mg/lの間で生育に程度の差はあるがブレーキがかかるものと思われる。以上の結果から通常の乳酸菌の選択培地としては改変乳酸菌分離培地にCycloheximideおよびSodium azide はそれぞれ100mg/lおよび50mg/lとし、有孢子細菌もBacillus spp.やEnterobacter sp. が非常に大きな比重を占める分離試料では、Sodium azideを100mg/lとして対応する必要がある。

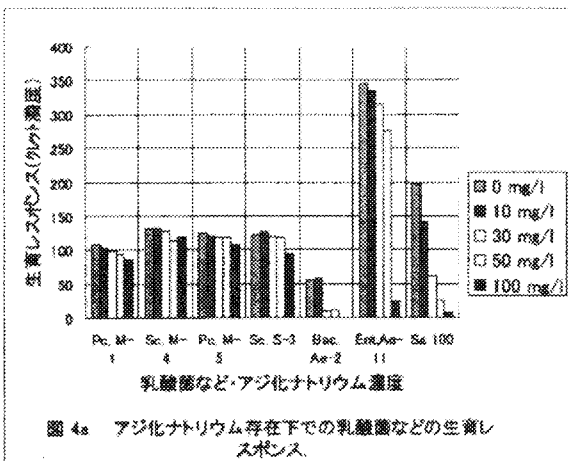


図4a アジ化ナトリウム存在下での乳酸菌などの生育レスポンス

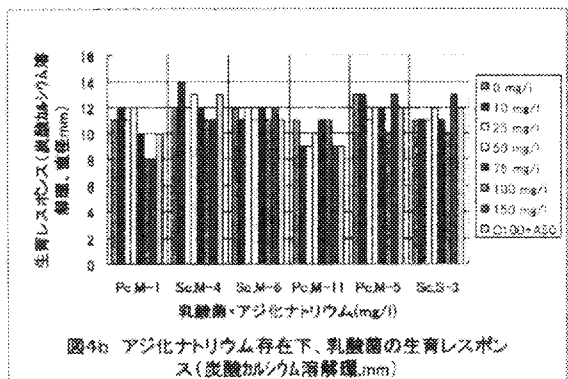


図4b アジ化ナトリウム存在下、乳酸菌の生育レスポンス(炭酸カルシウム溶解環直径,mm)

畑地土壌からの乳酸菌の分離試行：以上の結果を踏まえて実際の分離にどのような問題点があるか検討した。とくに上記の実験で出した結論は選択培地

に必要な薬剤濃度はCycloheximide : Sodiumazide=100 : 50 (mg/l) である。この結果からキャベツの根圏土壌について改変乳酸菌分離培地に加える薬剤濃度Cycloheximide/Sodium azide(mg/l)を0/0, 0/50, 0/100, 100/0, および100/100の組み合わせで希釈平板法および直接平板分離を行ったが、結果は表3である。コロニー数なるべく $30 \leq N \leq 100$ の範囲に入るような希釈平板について比較した。

表3 CycloheximideおよびSodium azideの濃度組み合わせによる分離

	Cycloheximide/Sodium azide					
	0/0	0/50	0/100	100/0	100/50	100/100
6希釈						
酸生成菌※	2	7	13	6	6	2
微小コロニー※	1	3	0	1	1	4
Bacillus sp※	70%(2)	0	11	9	1	2
Rhizopus sp	30%(1)	2	0	0	0	0
5希釈						
酸生成菌※	6	0	4	3	3	0
微小コロニー※	17	53	44	27	46	51
Bacillus sp※	95%(13)	0	(8)	60%	0	0
Rhizopus sp	5%(4)	0	0	40%	0	0
分離乳酸菌※※						
酸生成菌		Pc-4 Sc-2	Sc-1	Sc-1	Sc-1	
微小コロニー		Sc-3		Pc-1	Pc-1	Sc-3

※酸生成菌：乳酸菌を主とした炭酸カルシウム溶解環直径2mm以上。

微小コロニー：pin-head colony, 大部分はBacillus sp. およびグラム陰性細菌、乳酸菌も一部含まれる。主として、Sodium azideによって生育が制限されたもの。

Bacillus sp.: 寒天平板表面に被覆拡張型(spreading)コロニー形成。

※※純粋分離菌株：Pc, Pediococcus sp. M-1群；Sc, Streptococcus avium M-4群；Sc, Streptococcus avium L-541群

コロニーの炭酸カルシウム溶解環の直径が2mm以上のもの、それ以下で通常1mm以下のものとpin-head colony, Bacillus spp. (Bac.) およびRhizopusを主とする糸状菌類 (M) として計数した。表中、培地に加えるCycloheximide 100mg/lとSodium azide50mg/l濃度比を100/50のように示した。また、有孢子細菌のコロニーあるいは糸状菌の菌蓋がペトリ皿の寒天培地表面を全面覆う場合100%、それ以外の場合は同様に百分率として示した。通常の希釈平板法では結果に希釈率を掛けた数値、例えば5希釈の薬剤 100/50の結果では乳酸菌(酸生成菌)は平板上3コロニーなので 3×10^5 cells/g (土壌湿物重) となるが、こ

の場では乳酸菌は優先種ではないのでこれが正確な数値とは言えない。そのため乳酸菌数を希釈平板上の計数値で示した。ただ0/0と100/0の乳酸菌数は有胞子細菌が平板で優越し純粋分離が出来なかったもので、そのような分離平板上でたとえ炭酸カルシウムの溶解環のある寒天内コロニーがあっても乳酸菌である証明は出来ていない。また、Sodium azideを加えていない0/0と100/0では有胞子細菌やRhizopus sp.などの被覆拡張型のコロニーが酸生成菌数とpin-head colony数に大きく影響しているはずである。-6希釈でpin-head colony数が非常に少ないのはこの希釈での微生物数が減少し薬剤の相対濃度が高まり額面どおりに機能して生育が抑えられたことによつてpin-head colony数が減少したものであろう。一方、乳酸菌は薬剤のこの濃度では生育はほとんど影響を受けていないので本来のコロニー数を示していると見てよい。これから-6希釈からの 6.0×10^6 cells/g (土壤湿物重) がキャベツ根圏土壤中の乳酸菌数と見なしてもよいと判断している。この数値は有胞子細菌など雑菌類の1%以下の菌数である。

ここで畑地土壤中、植生の乳酸菌分布への影響について多少の検討を行った。まず作物としてキャベツを植え付けた畑地土壤と前作後、植え付けのない場合を対照として検討を行った。

表4 直接分離平板と希釈平板法低希釈平板の比較 (分離培地の薬剤濃度: Cycloheximide/Sodium azide = 100/100 μ m/ml)

	根に近い 根圏土壤	根に少し遠 い根圏土壤	対照: 前作後 植栽のない土壤
4希釈			
酸生成菌	11	5	6
微小コロニー※	56	92	81
Bacillus sp※			
Rhizopus sp	2	1	7
3希釈			
酸生成菌※	38	18	23
微小コロニー※	488	364	404
Bacillus sp※			
Rhizopus sp			
水分量 (%)	37.4	37.9	37.5
植生	キャベツ	キャベツ	ナスナ、ホトケノザ

※酸生成菌、微小コロニー、Bacillus sp.は、表3の注釈と同様。

表4はキャベツ根圏土壤を根に近いものと比較的根から距離のあるもの、および対照としては前作後植え付けのないいずれも畑地土壤で施肥履歴はほぼ類似している試料である。対照はキャベツの植え付けはないものとしたが、そこにはナスナ(アブラナ科)

およびホトケノザ(シソ科)の自生がかなりあったので、なるべくそれらの根圏の影響のなさそうな部分から試料を採取した。希釈平板法で薬剤は100/100 (mg/l)とした。表として示した希釈は-3希釈と-4希釈で乳酸菌相の情報はある程度得られたものと思われる。結果からは対照と比較して試料の乳酸菌の分布について植生に依存的だという結果ではない。ただ乳酸菌の純粋分離が一部で不首尾であったので結論を出しにくい菌数はほぼ似た傾向をもっているし、分離できたものはいずれもSc. aviumであったので植生への依存性は低い可能性がある。

3) 直接分離平板

畑地土壤あるいは作物根などを試料として乳酸菌の分布を定性的にしかも簡単に調査する簡易平板について検討した。乳酸菌は糖類の供給にエネルギー代謝が依存しているので①植生とか②施肥堆肥などにかなり依存しているものと想定される。そのため多数の試料を実験に供するには直接平板分離などの簡易平板法が重要になってくる。また、③土壤中などでは植物の分泌するfine chemicalsによるアレロパシー(allelopathy)のような現象も重要な微生物相の制御因子となる可能性も考慮すれば、さらに多数の試料の検討が必要になってくる。ここで上記で行った希釈平板法の-2と-1の低希釈分と同時に行ったキャベツ根の直接平板分離のデータを示したのが表5である。

表5 直接分離平板と希釈平板法低希釈平板の比較 (Cycloheximide及びSodium azideの組合せによる分離)

	Cycloheximide/Sodium azide					
	0/0	0/50	0/100	100/0	100/50	100/100
低希釈2希釈						
酸生成菌※	0	65	57	0	10	23
微小コロニー※	0	109	124	0	146	68
Bacillus sp※	50%	0	50%	100%	0	0
Rhizopus sp	50%	0	80%	7	0	0
低希釈1希釈						
酸生成菌※	0	25	23	0	1	6
微小コロニー※	0	176	114	0	76	258
Bacillus sp※	0	0	0	100%	100%	2
Rhizopus sp	100%	100%	100%	(13)4	4	3
直接分離平板①						
酸生成菌※	0	7	15	0	0	6
微小コロニー※	0	95	88	0	39	80
Bacillus sp※	100%	50%	(16)100%	100%	90%	23
Rhizopus sp	100%	50%	100%	0	0	0
直接分離平板②						
酸生成菌	0	9	0	0	0	4
微小コロニー※	0	59	55	0	16	23
Bacillus sp※	90%	50%	60%	100%	100%	100%
Rhizopus sp	10%	50%	40%	0	12	0
分離乳酸菌 酸生成菌		Pc-4	Sc-2	Sc-1	Sc-1	Sc-1
微小コロニー		Sc-2				
		Sc-3		Pc-1	Pc-1	Sc-3

この結果から乳酸菌の分布について直接平板分離の結果が低希釈平板分離の結果と似た傾向を示していると判断している。有孢子細菌数とRhizopus sp.の分布状況から、薬剤によってこれらの雑菌の生育の遅延があればかなり乳酸菌にとって有利な状況を作り出すことが期待できるので、希釈平板法を直接平板分離に置き換えても土壤中の乳酸菌事情をある程度把握できることを示している。また、試料の状態によっては直接平板分離では薬剤は100/100 (mg/l)の方が有孢子細菌などの影響を最小限にとどめることができるし、純粋分離成功の可能性も高まると思われる。現在の段階では乳酸菌の分布および分離に関して法則性は明確ではないが、根圏土壤には多くの乳酸菌が有孢子細菌の1%以下のレベルで分布しているのは確かなようである。しかも分離される乳酸菌は*Streptococcus avium* および*Pediococcus sp.*で、分離方法は異なっても通常の希釈平板法によるものと同様な結果であった。

予備的疫学実験：直接平板分離の妥当性を考慮して疫学的な実験によって乳酸菌の分布と植生との関係を検討するため以下の予備実験を行った。乳酸菌にとって重要な糖類・生育因子等の供給系は堆肥などと同時に作物など植生の影響はかなり大きいと考

えられる。このため種々の作物根を採取して薬剤100/50 (mg/l)を含む改変乳酸菌分離培地で直接平板分離の方式で分離を行い、分離される乳酸菌を検討することによって、乳酸菌相の畑地土壤中での意味を解明することが出来るものと考えている。

乳酸菌群について現在までのところ、植生と乳酸菌との間に特別な関係は認められてはいないが、作物および季節など種々の条件を勘案して疫学実験を行えば、何らかの法則性を見いだすことができるかも知れない。そのための予備的実験として作物根からの直接平板分離を行った結果が表6である。

この範囲内で酸生成菌の分布は有孢子細菌の分離とは密接な関係が物からの分離が目立っている。これらの培養した平板について剣山を利用し RaffinoseおよびMelezitose、さらにArabinoseを組み合わせてレプリカ法を行えば種分布比率は明らかにすることができると思われる。このような疫学的データを重ねることによって乳酸菌の分布と意味についても何らかの法則性を引き出すことができると判断している。

謝辞 本研究を行うにあたり、土壤および作物試料の提供、あるいは培地調製など実験補助に土壤肥料研究室および環境保全研究室研究員各位および研究補助員の方々のご協力を得ることができた。ここに関係各位に深く感謝の意を表す。

表6 野菜類の根からの直接分離

	微生物の検出			出された試料番号			分離 乳酸菌※
	酸生成菌			有孢子細菌	その他の細菌	Rhizopus等	
	+++	++	+				
"アカダイコン"		2,5		1,2,3,4,5	4,5	1,2,5	Sc-6
ハクサイ		1,2,3,5	4	3		4	Sc-1 Pc-1
チンゲンサイ		1,2,5		1,2,3,4,5	3,4	1,5	Sc-2
タアサイ		1,2,3, 4,5		5			Sc-8 Pc-5
"オータムボエム" 菜心	4	1,2,3,4			3	1,2,5	Sc-5 Pc-4
コウサイタイ 紅葉苣		4,5	1	1,2,3,5	1,2,3,5		Sc-8
ネギ Allium Fistulosum			4	1,2,3,4,5	1,3,4		Sc-1
ピーマン Capsicum annuum cv.			4	1,2,3,4,5	1,3		Sc-3

※分離乳酸菌:Sc, *Streptococcus avium*;Pc, *Pediococcus sp.* ScおよびPc-の後の数値は純粋分離でできた乳酸菌の菌株数。

IV引用文献

- 1) BREED, Robert S. and others : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Seventh Edition, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957.
- 2) BUCHANAN R.E. and N.E. GIBBONS : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eighth Edition, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- 3) HARTEMINK, R., V.R. DOMENECH and F.M. ROMBOUTS : J. Microbiol. Methods, 29, 77-84, 1997.
- 4) 金子太吉 : データ解析, p. 311-346, "微生物の化学分類実験法", 駒形和男編, 学会出版センター東京, 1982.
- 5) KERRIDGE, D. : Bacterial Classification, p. 483-503, Joel Mandelstam and K. McQuillen, "Biochemistry of Bacterial Growth", Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1968.
- 6) 北原覚雄 : 『乳酸菌の研究』, 東京大学出版会, 1966.
- 7) 駒形和男 : 好気性細菌, p. 99-162, "微生物の分類と同定" <下>, 長谷川武治編著, 学会出版センター, 東京, 1985.
- 8) HARRIGAN, W.F. and Margaret E. McCance : Laboratory Methods in Microbiology, 1966, Academic Press, London and New York, 1966.
- 9) 身次章二郎・田邊幾之助・郡司掛則昭 : 九州農業研究, 第64号, p. 61, 2002.
- 10) 須藤恒二 : 嫌気性細菌, p. 163-180, "微生物の分類と同定" <下>, 長谷川武治編著, 学会出版センター, 東京, 1985.
- 11) 玉岡 寿・田邊幾之助・小林武一・大林 晃・松村悦男 : 日醸協, 66, 810-815, 1971.
- 12) 田邊幾之助・音地龍夫・二石真智子・迫間敬子・志々目義紀 : 鹿大農学術報告 第32号, p. 69-77, 1982.
- 13) 田邊幾之助・坂田太吉・迫間敬子 : 鹿大農学術報告 第31号, p. 47-52, 1981.
- 14) 田邊幾之助・二石真智子・迫間敬子・有川順子 : 鹿大農学術報告 第33号, p. 47-52, 1983.
- 15) 内村 泰・岡田早苗 : 乳酸菌実験マニュアル一分離から同定まで一, 小崎道雄監修, 朝倉書店, 1992.
- 16) 内村 泰・岡田早苗・駒形和男 : 生物工学, 77 (11), 467-469, 1999.
- 17) 山里一英・飯塚 廣 : 日農化 33, 379-382, 1959.

Summary

Occurrence of Lactic Acid Bacteria in the Soil of the Cultivated Fields of Vegetables in Kumamoto Prefectural Research Center

Ikunosuke Tanabe, Koujirou Mitsugi¹, Noriaki Gungikake, Kenichi Kubo² and Masami Tanaka

The ecology of lactic acid bacteria in the cultivated fields of vegetables is investigated. The modified culture medium for the isolation of lactic acid bacteria from soil samples is selective due to the presence of cycloheximide and sodium azide at concentrations of 100mg/l and 50mg/l, respectively, inhibiting competing soil microflora, including *Bacillus* spp. *Enterobacter* sp. and *Rhizopus* sp. and permitting the growth of soil lactic acid bacteria.

Many strains of lactic acid bacteria were isolated from the cultivated fields of vegetables. These isolates consisted mainly of *Streptococcus avium* and *Pediococcus* sp.

The lactic acid bacteria would not be prevailing species in the cultivated fields of vegetables in Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center