HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サイレージ中の Bacillus coagulans について
Author(s)	佐々木, 博; 高尾, 彰一
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 10(3), 241-246
Issue Date	1977-05-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11895
Type	bulletin (article)
File Information	10(3)_p241-246.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

サイレージ中の *Bacillus coagulans* について

佐々木　博・高尾彰一
(北海道大学農学部農芸化学科応用菌学講座)
(昭和51年11月2日受理)

Bacillus coagulans in silage

Hiroshi SASAKI and Shoichi TAKAO
(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)
(Received November 2, 1976)

緒　言

1915年，HAMMER[6]が濃縮乳缶詰の変敗を起こす好熱性の有胞子酸生成菌を発見，*Bacillus coagulans* と命名して以来，この菌は濃縮乳のフラット・サワー原因菌[3,7,9,10]あるいは野菜果実缶詰の酸敗菌[1,8]として報告され，乳および乳製品からも広く検出されている。

この菌はまた，サイレージからも分離されているが[11~13]，熟成過程における役割については不明の点が多く，著者の1人が，熟成温度が45°Cになるとこの菌が多くなり，60°Cでは乳酸発酵の主役を演ずる[11]と報告している以外は，DOMETER (1930)[4]が発酵温度の高かったグラスサイレージ，ETCHELLS と JONES (1949)[5]が蒸煮馬鈴薯サイレージから，有胞子の乳酸生成菌を分離し，その役割を論じているに過ぎない。両報告にみられる有胞子乳酸生成菌は，記載されている諸性質から，*B. coagulans* と考えてほぼ間違いないものである。

著者らは，サイレージの微生物学的研究の一環として，熟成過程における *B. coagulans* の役割を明確にするために，集積培養法を用いてサイレージ中の菌数を最確数で求め，分離菌の性質を詳細に調べたところ，この菌の分布はかなり広範囲で，分類学的には同一種とみなすべきものでも，硝酸塩の還元性，糖類の発酵性などによって数多くのタイプに分けられることなどを知った。本報告は，それらの結果をまとめたものである。

実験方法

1. *B. coagulans* の計数分離法

B. coagulans が試料1g当り 1.0×10^6～1.0×10^7 も存在する高温発酵サイレージでは，肉汁寒天による希釈平板培養法（40～45°C培養）でも，比較的容易に分別計数および分離を行うことが出来たが，低温発酵サイレージでは，*B. coagulans* は菌数が少なく，他の細菌の集落形成が顕著なため，計数・分離はほとんど不可能であった。従って，次に示す集積培養法を利用して，計数・分離を行った。

サイレージ10gを滅菌した300 mℓ容の三角フラスコに秤量，滅菌水100 mℓを加えて十分振盪し，その液を10倍希釈液とした。その後この希釈液を滅菌水で順次10倍に希釈して10～10^6倍希釈液をつくり，各希釈液1 mℓを，集積培地9 mℓを分注滅菌した5本の試験管にそれぞれ接種，滅菌したVaspar（流動パラフインとワセリンの等量混合物）を約1 cm重層し，45°Cで3～4日培養した。酸生成の認められたものについては，さらに平板塗抹を行い，40°Cで3～4日培養後，*B. coagulans* 特有の小集落を形成し，グラム陽性で固有の胞子形成が観察されたものを分離した。また，菌数は *B. coagulans* の検出された試験管の本数から，最確数として求めた。

集積培養には，リトマスミルクまたはBTB添加グルコース・イーストエキス培地（酵母エキス5g，ペプトン5g，K_2HPO_4 2g，グルコース20g，BTB 1.6%アルコール溶液1 mℓを水1ℓに溶解中和したもの，以下GYEと記す。）を使用し，リトマスあるいはBTBの変色によって酸生成の有無を判定した。

2. 分類学的性質の試験

希釈平板培養法ならびに集積培養法によって分離した *B. coagulans* と推定された菌株は，すべてSMITHらの方法[13]に従って分類学的検索を行い，さらに詳細に菌

株間の性質の差異を調査した。

3. 供試サイレージ

北海道内で調製されたビートトップサイレージ48点，グラスサイレージ31点，デントコーンサイレージ23点を試料とした。

ビートトップサイレージは，いずれも晩秋から初冬の低温期に調製されており，埋蔵初期の発熱はまれであったが，グラスサイレージ31点中15点は，6～7月にかけてビニールバキュームサイロで調製されたもので，日中は初夏の日光を受け，埋蔵数時間後にすでに45°Cを越す高温に達し，その後も長期間高温に保持されていた。また，デントコーンサイレージは，いずれも，秋に塔型サイロで調製されたものであったが，この中には埋蔵初期にサイロ上層部でかなりの発熱が観察された5点を含んでいる。

結果および考察

1. サイレージ中の *B. coagulans* の菌数

供試サイレージ102点の *B. coagulans* の菌数測定結果は，Table 1に示した。

表から明らかなように，ビートトップサイレージでは，集積培養を行っても *B. coagulans* を分離出来なかったものがかなり多く，分離されたものでも，サイレージ中の菌数は最高 4.6×10^3/g に止まった。これに反し，グラスサイレージではすべての試料から *B. coagulans* が検出され，最高値は 8.7×10^7/g を示した。

B. coagulans の多いサイレージでは，一般に *Streptococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* などに属する乳酸菌は少なく，*Pediococcus* が共存する傾向がみられたが，*B. coagulans* が 1.0×10^7/g を越えた8試料では，*Pediococcus* さえも検出されず，*B. coagulans* 主導型の酸発酵が行われたと考えざるをえなかった。これらのサイレージは，いずれも揮発性塩基態窒素 (VBN) の生成量が多く，pH は5.0以上で，品質はかなり劣ると考えられたにもかかわらず，酸生成量は総酸として2.0%を越え，揮発酸/総酸の比も10%前後と，酸組成は良好であった。

日光を遮蔽していないビニールバキュームサイロでつくられたグラスサイレージでは，*B. coagulans* と *Pediococcus* が共存するものが多く，酸生成菌として *B. coagulans* 以外のものが認められない試料もあった。これに反し，塔型サイロでつくられた品質良好なグラスサイレージでは，*B. coagulans* の菌数は少なく，*Lactobacillus plantarum* や *L. brevis* が多数検出され，正常な乳酸発酵過程を経過していることが明らかであった。

これらの結果は，*B. coagulans* の増殖が，サイレージの熟成温度と密接な関係にあることを示唆している。

熟成温度と *B. coagulans* の関係を明らかにするために，温度を一定にしてグラスサイレージ熟成過程における酸生成菌の遷移を追跡した1例を Fig. 1 に示した。

図から明らかなように，熟成温度15°および30°Cでは，*Lactobacillus* 主導型の酸発酵が行われており，*B. coagulans* の増殖はみられなかったが，熟成温度が45°Cになると *Pediococcus* とともに *B. coagulans* が増殖，さらに温度が上昇し，60°Cになると，酸発酵は *B. coagulans* 主導型に変ることが明らかとなった。

pH の低下は熟成温度が高くなる程悪化し，60°Cでは不揮発酸 (NVA) の生成が最高値を示したにもかかわらず，熟成が進むにつれて pH が上昇した。これは，熟成過程に VBN が多量に生成されるためと判断した。

デントコーンサイレージは，気温の低下する秋に埋蔵され，しかも供試試料はすべて塔型サイロで調製され，発熱がほとんどみられなかったためか，一般に *B. coagulans* の菌数が少なく，23試料中8試料では，集積培養を行ってもこの菌を分離出来なかった。しかし，加圧や密封が不十分で，埋蔵初期に発熱が起った部分から採取した5試料では，7.2×10^4～1.5×10^6/g の *B. coagulans* が検出された。従って，この場合にも，グラスサイレージと同様埋蔵初期の熟成温度の上昇が，*B. coagulans* の増殖を促したものと判断される。

B. coagulans の集積培養は，リトマスミルクあるいは GYE を用いて行ったが，10試料について，両者を併

Table 1. Viable counts of *B. coagulans* in silage

Material	Number of silages examined	Not detected	Detected* Minimum	Detected* Maximum
Beet-top silage	48	21	$1.0\times10>$	4.6×10^3
Grass silage	31	0	$1.0\times10>$	8.7×10^7
Dent-corn silage	23	8	$1.0\times10>$	1.5×10^6

* Viable counts/g of silage

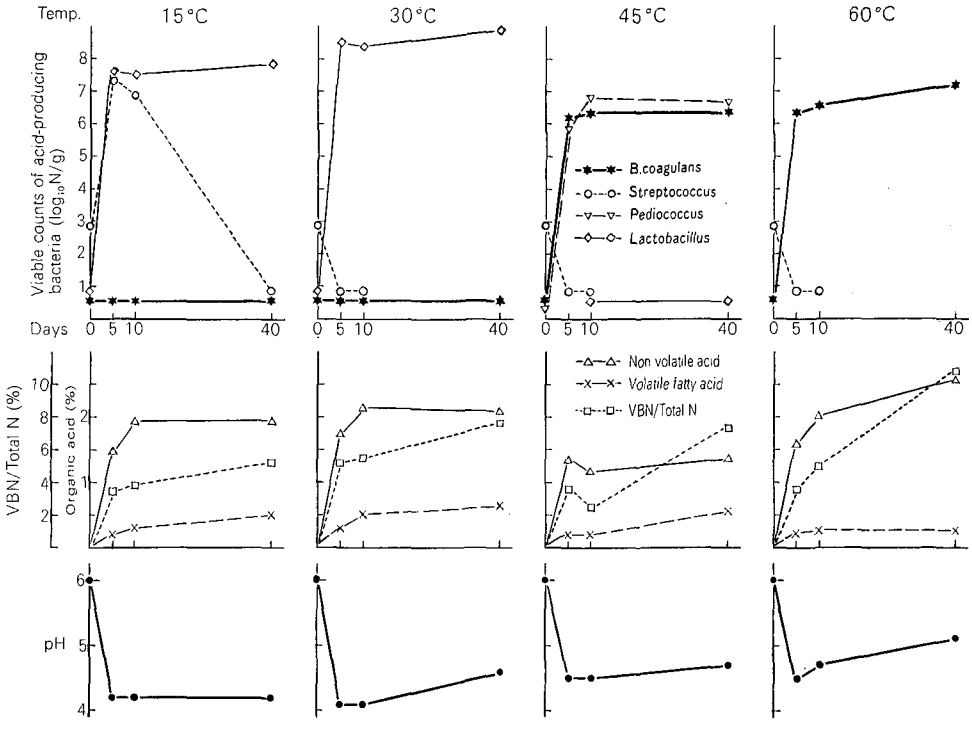

Fig. 1. Effect of temperature on the occurrence of *B. coagalans* and its acid production in fermentation process of grass silage

用して菌数値を比較したところ，Table 2 に示した通り，GYE の方がやや菌数値が高い傾向がみられた。しかし，その差は極めて僅少で，菌数を比較する上ではほとんど問題はないものと思われる。なお，Table 2 には参考として肉汁寒天平板培養で求めた菌数も示したが，菌数の多いものではこの方法でも集積培養法にほぼ等しい値がえられた。しかし，菌数の少ない試料では，他の好気性細菌の集落形成が速やかで，*B. coagulans* の菌数を求めることが出来なかった。

Table 2. Comparison of viable counts of *B. coagulans* by different counting methods

Sample	Most probable number on litmus milk	Most probable number on glucose yeast extract	Plate count on nutrient agar
A	1.2×10	1.3×10	ND*
B	2.8×10^2	3.0×10^2	ND
C	6.7×10^6	7.4×10^6	7.0×10^6
D	5.3×10^4	5.8×10^4	ND
E	8.3×10^3	9.6×10^3	ND
F	4.6×10^5	4.7×10^5	ND
G	2.8×10^2	2.8×10^2	ND
H	1.9×10^7	2.1×10^7	2.1×10^7
I	2.6×10^4	2.9×10^4	ND
J	7.4×10^3	8.1×10^3	ND

* Not detected.

2. 分離菌の性質

供試サイレージ 102 点中 73 点から分離し，*B. coagulans* HAMMER と同定した 114 株の分類学上の性質を一括して示すと，次の通りである。

i) 形態学的性質

a) 栄養細胞： 肉汁寒天上に発育した菌体は，幅 0.6～1.0 μ，長さ 2.5～6.0 μ，連鎖状を呈することなく，均一に染色される。培養初期には周毛を有し，運動性を示す。

b) グラム染色性： 陽性であるが，胞子形成時には，若干の細胞が陰性を示す。約 10% の菌株では，長期間の培養によって陰性の細胞がやや増加する。

c) 胞子嚢： 大部分の菌株は，胞子形成部分がやや膨らむが，ほとんど膨らまない菌株（分離菌中 2 株）もある。

d) 胞子： 栄養細胞の先端あるいはやや端に寄って形成され，幅 0.9～1.0 μ，長さ 1.2～1.5 μ。胞子形成率は，他の *Bacillus* 属菌に比べ非常に低く，加糖培地では胞子形成率がさらに低下する。

ii) 培養上の性質

a) 肉汁寒天上の集落： 直径 1.0～1.8 mm の小さな円形集落で，不透明，白色～乳白色。

b) 肉汁寒天斜面培養： 菌株によって若干異なるが，一般に発育は貧弱である。半透明～不透明，白色～乳白色。

c) 食塩添加肉汁： 食塩濃度 5% では発育しない。

d) グルコース添加肉汁寒天： 無糖の肉汁寒天よりも発育は良好である。

e) 馬鈴薯切片： 灰白色の貧弱な発育を示す。

f) 大豆エキス寒天： 一般に肉汁寒天よりも発育良好。(分離菌中 3 株は肉汁寒天と同様の発育を示す。)

g) 酸性プロテオースペプトン寒天： 肉汁寒天よりも発育良好。

h) グルコース硝酸塩寒天： 発育しない。

i) チロシン添加肉汁寒天： 肉汁寒天と同様の発育。

j) リトマスミルク： ラクトースを発酵する菌株は，酸を生成し牛乳凝固後にリトマスを還元するが，ラクトースを発酵しない菌株の大部分は全く変化を示さず，若干変化をみせるものでも，リトマスを僅かに還元するに止まり，牛乳を凝固しない。

k) 肉汁： 均一に混濁し，長期間培養では沈澱を生ずる。

iii) 生理学的性質

a) 澱粉加水分解力： 陽性。

b) ゼラチン加水分解力： 陰性。

c) カゼイン加水分解力： 陰性。

d) アセチルメチルカルビノール生成： 大部分の菌株は陽性。(分離菌中 2 株のみ陰性)

e) インドール生成： 陰性。

f) グルコース培地における pH 低下力： 分離菌中 2 株を除き，45°C, 7 日以内の培養で，pH が 4.6～4.8 まで低下する。

g) 発酵試験： グルコースから酸を生成するが，ガスは生成しない。

アラビノース，キシロース，シュクロース，マンニットの発酵性は，菌株により異なる。

h) 硝酸塩の還元性： 分離菌中 19 株が陰性，95 株が陽性。

i) 嫌気条件での硝酸塩からのガス生成： 陰性。

Table 3. Physiological differences among 114 strains of *B. coagulans* isolated from silage

Representative strain	1033a	993c	993b	994b	1001c	1001a	1035a	1035b	1000a	1002a	994a
Number of isolates	2	2	15	2	6	10	1	2	22	18	34
Nitrate reduction	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
Production of acetylmethyl-carbinol	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH of glucose broth	4.6	4.7	4.8	5.7	4.6	4.7	4.8	4.8	4.7	4.6	4.6
Acid from:											
glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
sucrose	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+
lactose	−	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+
arabinose	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
xylose	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+
mannitol	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+
Origin*	G	G	B,G,D	G	G,D	B,G,D	G	G	B,G,D	B,G,D	B,G,D
Biotype	a	b	c	d**	e**	f**	g	h	i**	j**	k**

* G: Grass silage B: Beet-top silage D: Dent-corn silage

** These types were formerly differentiated from *B. coagulans* by the name of *B. dextrolacticus*.

j) 嫌気条件でのグルコース培地の発育： 陽性。

k) クエン酸資化性： 陰性。

l) カタラーゼ生成： 陽性。

m) 発育温度： 発育範囲 28～55°C。33～45°C で発育良好。約半数の菌株は 60°C でも発育するが，65°C では全く発育しない。

3. 菌株による生理学的性質の差異

さきに，分離同定した *B. coagulans* 114 株の中には，硝酸塩の還元性，アセチルメチルカルビノールの生成能，糖類の発酵性などが異なる菌株が存在することを述べた。Table 3 は，それらの生理学的性質の相異を要約したものである。表中の Biotype には，著者らが便宜的にアルファベットの a～k の記号を付した。

硝酸塩還元力を有しない a～c の 3 型は，HAMMER[6] が最初に *B. coagulans* と命名した菌株に，d～f および i～k の 6 型は ANDERSON と WERKMAN[2] が *B. dextrolacticus* と命名した菌株に最も近縁のものと考えられる。しかし，両者は，いずれも SMITH ら[13] の分類によれば *B. coagulans* の中に含められているので，著者らもそれに従った。

SMITH らの報告によれば，*B. coagulans* は，通常，硝酸塩還元力は陰性と記され，還元力を持つ菌株は極少数との印象を受けるが，著者らの分離菌では，むしろ還元力を持つものの方が多かった。従って，硝酸塩還元力の有無は，その菌の分離源によってかなり異なるものと推測される。

Table 2 に示した集積培養による菌数測定結果において，リトマスミルク使用時には，GYE よりもやや少ない値がえられる傾向がみられたが，これは，乳糖発酵能を持たない菌株が，リトマスミルクで集積培養されなかったためと考えられる。

グラスサイレージおよびデントコーンサイレージから分離した菌株では，分離源と糖類の発酵性との間に相関関係を見出すことは出来なかったが，ビートトップサイレージからの分離株は，いずれもシュクロース発酵能を有していた。このことは，サイレージ原料の糖分組成とそこに生育する微生物の発酵能との相関性を示すものとして，生態学的に興味深いものがある。

要　　約

サイレージの微生物学的研究の一環として，サイレージ中にしばしば検出される *B. coagulans* の役割を明確にするために，この菌の出現状況，分類学的性質および生理学的性質を試験し，次の結果をえた。

1. *B. coagulans* は，45～60°C の高い熟成温度を経過したサイレージに，多数見出された。

2. 高温発酵サイレージでは，*Lactobacillaceae* に属する乳酸菌が少なく，酸発酵は *B. coagulans* 主導型となった。

3. 分離同定した *B. coagulans* の中には，かつて *B. dextrolacticus* と呼ばれた硝酸塩還元力を有する菌株が多かった。

4. ビートトップサイレージから分離した *B. coagulans* は，すべてシュクロース発酵能を有していた。このことは，生態学的に興味深いものがある。

謝　　辞

本報告を終わるに当り，研究遂行中御懇篤な御指導，御鞭撻を賜わった北海道大学名誉教授佐々木酉二先生ならびに種々便宜を与えられた北海道農業試験場草地開発第 1 部長三股正年氏（現酪農学園大学教授）に，深甚の謝意を表する。

また，サイレージの調製，採集，分析等に御協力頂いた北海道農業試験場草地部第 5 研究室長鳶野　保氏，山下良弘技官，外草地第 5 研究室の各位に深く感謝する。

文　　献

1) ALLEN, M. B.: Bact. Rev., **17**, 125-173 (1953).
2) ANDERSON, A. A. and C. H. WERKMAN: Iowa State Coll. J. Sci., **14**, 187-194 (1940).
3) CORDES, W. A.: J. Dairy Sci., **11**, 46-51 (1928).
4) DOMETER, K.: Cent. f. Bakt., II Abt., **82**, 71-99 (1930).
5) ETCHELLS, J. L. and I. D. JONES: J. Agr. Res., **78**, 19-31 (1949).
6) HAMMER, B. W.: Iowa Agr. Expt. Sta. Res. Bul., No. 19 (1915).
7) HUSSONG, R. V. and B. W. HAMMER: J. Bacteriol., **15**, 179-188 (1928).
8) JANSEN, E. and V. ASCHEHOUG: Food Res., **16**, 457-461 (1951).
9) SARLES, W. B. and B. W. HAMMER: J. Bacteriol., **23**, 301-314 (1932).
10) NICHOLS, A. A.: J. Dairy Res., **10**, 231-249 (1939).
11) 佐々木博： 北大農学部邦文紀要, **8**, 188-251 (1972).
12) 佐々木酉二： 北原覚雄編，乳酸菌の研究，116-137，東大出版会，東京 (1966).
13) SMITH, N. R., R. E. GORDON and F. E. CLARK: Agricultural Monograph, No. 16, U. S. Dept. Agr. (1952).

Summary

There have been a few reports on the occurrence of *Bacillus coagulans* in silage, but the role of the bacterium in silage fermentation has scarcely been investigated. As a part of microbiological studies on silage fermentation, 114 strains of *B. coagulans*, lactic acid producing spore-former, were isolated from silage ensiled with beet-top, grass or dent-corn, then the ecological and taxonomical studies on the bacterium were carried out.

The results obtained are as follows:

1. *B. coagulans* was predominant and only a small number of lactic acid bacteria belonging to *Lactobacillaceae* were found in the silage fermented at temperatures as high as 45 to 60°C. Therefore, *B. coagulans* appeared to play very important roles in silage fermentation at high temperature.

2. Many nitrate-reducing strains were recognized among the bacteria classified to *B. coagulans*. These strains were formerly differentiated from *B. coagulans* by the name of *B. dextrolacticus*.

3. All strains of *B. coagulans* isolated from beet-top silage had an ability to ferment sucrose. Such a phenomenon is ecologically interesting concerning the relation between the origin of microorganisms and their fermentability.