

MRS 培地を用いた乳酸菌の単離 Isolating a Lactobacillus by MRS Culture Medium

川田 裕加 福山 陽菜 堀田 愛 本山 美羽
KAWATA Yuka, FUKUYAMA Hina, HORITA Ai, MOTOYAMA Miu

Fruits contain lactic acid bacteria. We experimented types of Lactic acid bacteria in some fruits. Lactic acid bacteria can be incubated in MRS medium. The type of lactic acid bacteria tested by a plate to measure the number of lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria types can be identified with API 50CH. We examined some fruits, resulting in we found out that those Lactic acid bacterias are Lactobacillus.

1. はじめに

乳酸菌とは特定の細菌の名前ではなく、生育に必要なエネルギーを得るために糖を分解して大量の乳酸を作り出す細菌の総称である。先行研究では校内に生息している植物から培養したコロニーに牛乳を混ぜ、凝固したことで発生したコロニーは乳酸菌とした。しかし、凝固した理由は他にも考えられるため、今回は乳酸菌が入っているか確実に突き止めるために乳酸菌量を測定することができる薬品と、検液の菌種を特定することができる薬品を使って実験した。また、先行研究で植物から取れたコロニーはおそらく乳酸菌であるという結果が出たため、本研究では部位ごとの区別がわかりやすい果物を使って実験をする。

2. 方法

MRS 培地とは

MRS 培地は代表的な乳酸桿菌(Lactobacillus 属) の選択培地である。選択性は低いが、現在多くの研究で使用されており、37℃培養にて乳酸菌を培養することができる。

MRS 培地作成方法・乳酸菌単離方法

- ① ビーカーに蒸留水と MRS 培地粉末と炭酸カルシウムと寒天粉末を入れて混ぜ、オートクレーブ(121℃2 気圧)で 15 分滅菌する。
- ② 滅菌した MRS 培地の半分を約 20 mL ずつ 4 枚のシャーレに入れる。
- ③ 試料をプラスチックシャーレに入れる。
- ④ 蒸留水と食塩を混ぜ、0.85%食塩水を調整する。
- ⑤ 試料を含むプラスチックシャーレに 0.85%食塩水を 10ml 入れ、懸濁する。
- ⑥ ⑤の懸濁液から 1.0mL とってシャーレに入れ、9.0mL の滅菌食塩水を加え 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000 と順次希釈列を作製する。このときシャーレを回してよく混ぜる。
- ⑦ ①の残り半分の MRS 寒天培地を約 20ml ずつすべてのプラスチックシャーレに注ぎ、よく混合して静置する。
- ⑧ 寒天が固まったら上下反転して蓋についた結露を乾かす。
- ⑨ すべてのシャーレを 37℃で 24 時間培養する。
- ⑩ コロニーが発生したシャーレのみクリーンベンチ内で単離し、あらかじめ作っておいた②の MRS 寒天培地に画線塗抹し、37℃で 24 時間再培養する。

表.1 試料 1 種類あたりの準備物 (シャーレ 8 枚分)

試薬等	質量 (g)
試料	0.50
蒸留水 (培地用)	160.00
MRS 培地粉末	8.80
炭酸カルシウム	1.60
寒天粉末	2.56

表.2 乳酸菌単離用試薬

試薬等	質量 (g)
蒸留水 (0.85%食塩水)	40.00
塩化ナトリウム	0.34

実験方法 (1) 乳酸菌数測定用プレートを使った実験

乳酸菌数測定用プレートとは

- 乳酸菌以外の夾雑菌を抑制し、乳酸菌だけを選択的に検出することが可能
- フィルム内で自動的に無酸素状態を作り出すため、その状態をつくるシステムが不要・気泡の有無によりホモ型とヘテロ型の区別が可能
- 48 時間で乳酸菌数を測定可能

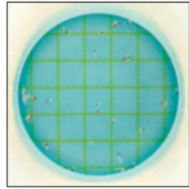
乳酸菌数測定用プレート判定方法

プレート内に発生する赤い斑点の数で乳酸菌数を測定することができる。また赤い斑点の周りに気泡があるかどうかで、ヘテロ型乳酸菌とホモ型乳酸菌の区別をつけることができる。

- ① 乳酸菌を同定するための試料であるりんご、レモンを種、皮、実に、みかんをアルベド、皮、実に分け、MRS 培地作成方法・乳酸菌単離方法の手順①~⑩で乳酸菌を培養させる。
- ② 蒸留水と MRS 培地粉末を混ぜ、オートクレーブ(121℃ 2 気圧)で 15 分滅菌した MRS 液体培地を蓋付き試験管に分注する。
- ③ ①のコロニーを白金線で掻き取り、MRS 液体培地に接種し、調製する。
- ④ ③の検液をピペットで乳酸菌数測定用プレートに接種し、気泡が入らないようにフィルムを下ろし、検液を均一に広げる。
- ⑤ フィルムを 37℃で 48 時間培養する。

表.3 試料 1 種類の MRS 液体培地 (プレート 9 枚分)

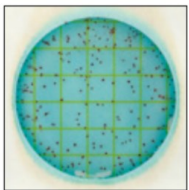
試薬等	質量 (g)
試料 (りんご・レモン・みかん)	適量
蒸留水	100.0
MRS 培地粉末	5.5



ヘテロ型乳酸菌

気泡圏→ヘテロ型乳酸菌

ヘテロ型乳酸菌とは、ヘテロ型発酵によって産生される乳酸菌である。ヘテロ型発酵ではグルコース 1 分子から 2 分子の乳酸を生み、乳酸のみを産生する。



ホモ型乳酸菌

気泡圏→ホモ型乳酸菌

ホモ型乳酸菌とは、ホモ型発酵によって産生される乳酸菌である。ホモ型発酵では、乳酸の他にエタノールや酢酸、炭酸ガスなどの乳酸以外のものも同時に産生する。

実験方法 (2) アピ 50CH・アピ 50CHL を使った実験

アピ 50CH・アピ 50CHL とは

アピ 50CH は、被検液の炭水化物代謝を試験するためのキットで、マイクロチューブに 50 の炭水化物及びその誘導体が含まれており、嫌気培養部分 (チューブ) では発酵試験が、好気培養部分 (カップ) では酸化試験及び同化試験が行われる。

アピ 50CHL 培地は乳酸菌 (Lactobacillus 属菌) および関連菌種を同定する目的で使用される。この培地は調製済みであり、アピ 50CH プレートで 49 種類の炭素源に対する発酵機能が確認できる。

アピ 50CH・アピ 50CHL の原理

アピ 50CHL 培地を用いて被検菌の菌液を調製し、プレートの各チューブに分注する。培養中、炭素源が発酵されることにより酸が生成されると、pH の低下に伴い指示薬の色が変化する。得られた結果から、菌種同定用ソフトウェアを用い、菌種を同定する。

※lactobacillus 属菌とは、乳酸菌の中でも最も一般的で自然界に多く生息するものである。



図.1 アピ 50CHL 培地

アピ 50CH・アピ 50CHL の実験方法

- ① 乳酸菌を同定するための試料であるみかんを皮、薄皮、実に、レモンを皮、種、実に分け、MRS 培地作成方法・乳酸菌単離方法の手順①~⑩で乳酸菌を培養させる。
※実験 (1) で、みかんから多くの乳酸菌が検出されたこと、また実験時の季節上みかんが入手できなかったこと

から、実験 (2) では柑橘系であるデコポンとレモンを試料として使用する。

※実験 (1) の課題として、みかんを薄く切っても皮にアルベドが付着してしまい、正確に部位による乳酸菌の有無を調べることができなかったため、実験 (2) ではアルベドを含んだ皮と薄皮、実に分けて実験した。

- ② トレイの端に名前と部位と希釈倍率を記入して、トレイに約 10mL の蒸留水を入れる。
- ③ プレートをパッケージから取り出し、1 枚ずつ切り離して 5 枚のプレート (O-49) を培養容器に入れる。
- ④ 5mL サスペンションメディアのアンブルを開け、滅菌綿棒で培地中のコロニーを全て掻き取り、アンブルに調製する。
- ⑤ ④の菌液にマクファーランドスタンダードを 3 滴滴下し、調製する。
- ⑥ アピ 50 CHL 培地の入ったアンブルを開け、⑤の菌液をアピ 50CHL 培地に接種して、均一化する。
※接種した菌液は直ちに使用する
- ⑦ ピペットでチューブ部分 (カップ部分を除く) にアピ 50CHL 培地に調製した菌液を接種する。
※このとき培養容器をわずかに前方に傾け、チューブ部分との境のカップの端にピペットのチップをつけるように注入する。
※嫌気状態にするために菌液がチューブの上端よりも上にならないようにする。
- ⑧ 全ての試験にミネラルオイルを重層し、プレート用カバーをする。
- ⑨ 37°Cで 48 時間、好気条件下で培養する。

表.4 試料 1 種類あたりの準備物

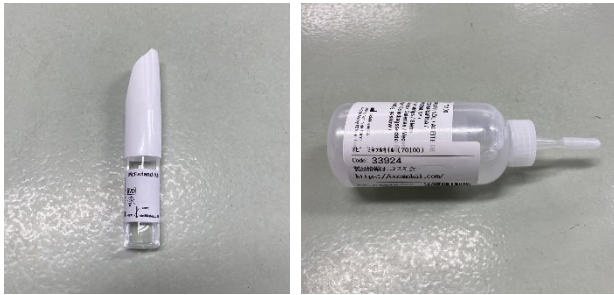
試薬等	量
試料 (みかん)	適量
マクファーランド標準液	適量
ミネラルオイル	適量
蒸留水 (培地用)	60 mL
アピ 50CH プレート	6 組 (5 枚 1 組)
培養容器 (トレイと蓋)	6 組
アピ 50CHL 培地	6 本
サスペンションメディア	5ml (6 本)



アピ 50CHL 培地



サスペンションメディア



マクファーランド標準液

ミネラルオイル

3. 結果

実験結果 (1) 乳酸菌数測定用プレートを使った実験

乳酸菌数測定用プレートを使った実験後のコロニーの有無を表.4 に示す. また, コロニーが発生したもののみ, 赤い斑点の周りの気泡の有無で, ヘテロ型乳酸菌とホモ型乳酸菌の区別をつけた結果を図.2 に示す.

表.1 試料 1 種類あたりの準備物 (シャーレ 8 枚分)

希釈液	みかん			りんご			レモン		
	皮	実	アルブド	皮	実	種	皮	実	種
1	○	×	○	○	×	×	○	×	×
1/10	×	×	○	×	×	×	×	×	×
1/100	×	○	○	×	×	×	×	×	×
1/1000	×	○	○	×	×	×	×	×	×

※アルブドとはみかんに付いている白い筋のこと.

※乳酸菌が発生した (赤い斑点が出た) ものを○で表す.

乳酸菌数測定用プレート

みかん・皮 1/1	レモン・皮 1/1	りんご・皮 1/1	みかん・実 1/100	みかん・実 1/1000
○	×	×	○	○
ヘテロ型			ヘテロ型	ヘテロ型
みかん・アル 1/1	みかん・アル 1/10	みかん・アル 1/100	みかん・アル 1/1000	
○	○	×	○	
ヘテロ型	ヘテロ型		ヘテロ型	

図.2 ヘテロ型乳酸菌とホモ型乳酸菌の区別をつけた結果

実験方法 (2) アピ 50CH・アピ 50CHL を使った実験

乳酸菌を同定するための試料であるデコポンを皮, 薄皮, 実に, レモンを皮, 種, 実に分け, MRS 培地作成方法・乳酸菌単離方法の手順で乳酸菌を培養させ, アピ 50CH・アピ 50CHL の試験に使用した培地のみ, 以下に示す.

なお, 希釈倍率が低いほど乳酸菌の純度が高くなるため, コロニーが発生した培地のうち, みかんの部位ごとにそれぞれ希釈倍率が一番低いものを使って試験している.

MRS 寒天培地



レモン (実)
1/1000 希釈

レモン (種)
1/1000 希釈

レモン (薄皮)
1/100 希釈



デコポン (実)
1/100 希釈

デコポン (皮)
1/1000 希釈

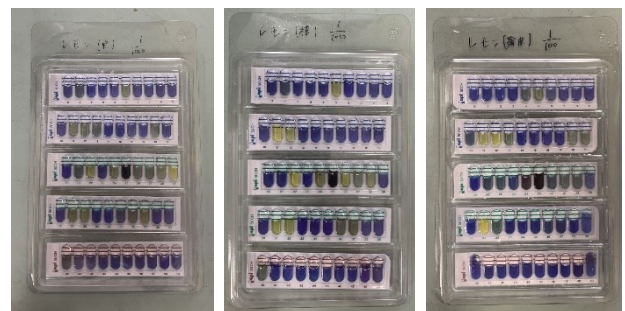
デコポン (薄皮)
1/100 希釈

アピ 50CH 判定方法

水素イオン指数からアピ 50CH 培地の元の色 (青色) より酸性に近い色に変化しているチューブは+, アルカリ性に近い色に変化しているチューブは-と入力する.



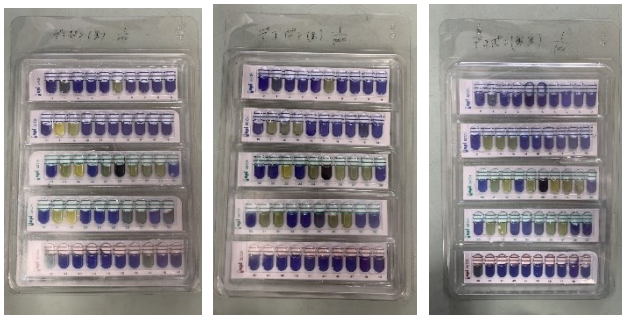
青 緑 緑 緑 青 青 青 青 青 青
アピ 50CH プレート



レモン (実)
1/1000 希釈

レモン (種)
1/1000 希釈

レモン (薄皮)
1/100 希釈



デコポン (実) 1/100 希釈 デコポン (皮) 1/1000 希釈 デコポン (薄皮) 1/100 希釈

アピ 50CH 判定結果

レモン (実) 1/1000 希釈

菌種名 : *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*

DOUBTFUL PROFILE									
ストリップ	API 50 CHL V5.2								
プロファイル	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
注釈									
菌種名	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	99.1	0.39	0	0%	RIB 24%	MNE 81%	SAL 10%	MAL 75%	TRE 20%
次候補	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus acidophilus 3</i>	0.3	0.18	0	0%	RIB 0%	MAL 75%			

レモン (種) 1/1000 希釈

菌種名 : *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*

DOUBTFUL PROFILE									
ストリップ	API 50 CHL V5.2								
プロファイル	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
注釈									
菌種名	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	99.1	0.39	0	0%	RIB 24%	MNE 81%	SAL 10%	MAL 75%	TRE 20%
次候補	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus acidophilus 3</i>	0.3	0.18	0	0%	RIB 0%	MAL 75%			

レモン (薄皮) 1/100

菌種名 : *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*

DOUBTFUL PROFILE									
ストリップ	API 50 CHL V5.2								
プロファイル	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
注釈									
菌種名	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	99.9	0.55	0	0%	RIB 24%	ESC 24%	MAL 75%		
次候補	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus acidophilus 3</i>	0.1	0.18	0	0%	RIB 0%	NAG 75%	MAL 75%		

デコポン (実) 1/100 希釈

菌種名 : *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*

DOUBTFUL PROFILE									
ストリップ	API 50 CHL V5.2								
プロファイル	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
注釈									
菌種名	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii</i>	95.2	0.48	0	0%	RIB 24%	MNE 81%	MAL 75%	TRE 20%	
次候補	% ID	T	非典型反応						
<i>Weissella viridescens</i>	4.3	0.24	0	0%	RIB 20%	MNE 100%	MAL 100%		

デコポン (皮) 1/1000 希釈

菌種名 : *Lactobacillus acidophilus*

DOUBTFUL PROFILE									
ストリップ	API 50 CHL V5.2								
プロファイル	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
注釈									
菌種名	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus acidophilus 3</i>	99.7	0.25	0	0%	FRU 100%	GLYG 7%			
次候補	% ID	T	非典型反応						
<i>Leuconostoc lactis</i>	0.1	0.0	0	0%	FRU 82%	MNE 83%	SAL 10%	CEL 10%	LAC 99%

デコポン (薄皮) 1/100

菌種名 : *Lactobacillus crispatus*

DOUBTFUL PROFILE									
ストリップ	API 50 CHL V5.2								
プロファイル	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----								
注釈									
菌種名	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactobacillus crispatus</i>	99.7	0.54	GAL 76%	MDG 0%	AMY 76%	LAC 76%			
次候補	% ID	T	非典型反応						
<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	0.1	0.2	RIB 85%	GAL 100%	MDG 20%	LAC 99%	SAC 20%	GLYG 4%	GEN 91%

4. 考察

実験結果 1 から発生した乳酸菌はすべてヘテロ型であったことがわかった。また、みかんには多くの乳酸菌が含まれていることが分かった。

実験結果 2 から発生したコロニーはすべて乳酸菌であることが分かった。レモンは実、種、薄皮のいずれの部位で同種である *Lactobacillus delbrueckii subsp. Delbrueckii* が確認された、デコポンの実も同種が確認されたが、皮では、*Lactobacillus acidophilus* が、薄皮では、*Lactobacillus crispatus* と部位によって異なる菌種が確認された。なお、*L. delbrueckii* は豆乳発酵に、*L. acidophilus* はヨーグルト等乳製品に、*L. crispatus* は皮膚有害菌の制御に活用されている菌種である。

5. 結論

レモンは実、種、薄皮のいずれの部位で同種である *Lactobacillus delbrueckii subsp. Delbrueckii* が確認された、デコポンの実からは *Lactobacillus delbrueckii subsp. Delbrueckii*、皮は、*Lactobacillus acidophilus* が、薄皮は、*Lactobacillus crispatus* と部位によって異なる菌種が確認された。

6. 参考文献

- ・食品からの乳酸菌の分離・簡易同定に関する操作 http://www.fmric.or.jp/ffd/ffmanual/100755_suzukic.pdf
- ・3M™ ペトリフィルム™ 培地 乳酸菌数測定用 LAB プレート 解説書 https://multimedia.3m.com/mws/media/13042030/mic-082.pdf&fn=MIC-082-B_R3.pdf
- ・アピ 50CH 添付文書 <http://www.products.sysmex-biomerieux.net/product/pdf/50300G>
- ・アピ 50CHL 培地 添付文書 <http://www.products.sysmex-biomerieux.net/product/pdf/50410H>
- ・マクファーランドスタンダード <http://www.products.sysmex-biomerieux.net/product/pdf/70900.pdf>

7. 謝辞

本研究を行うにあたって、後藤先生にご教授いただきました。ありがとうございました。