

Studies on Bifidobacterium I: An Improved Selective Medium for Bifidobacterium

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7826

Bifidobacterium に関する研究

I. *Bifidobacterium* の選択培地

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

田 中 隆 一 郎

(昭和60年10月15日受付)

Petuely の *Bifidobacterium* 選択培地にリボフラビン、核酸塩基、ピルビン酸塩及びナリジキシン酸を加えて選択培地の改良を行った。厳密な嫌気培養法を用いてヒト大便材料から、*Bifidobacterium* の分離をこの改良培地によって検討した結果、この培地は十分な選択力を有し、非選択培地と変らぬ高い *Bifidobacterium* 菌数を計測できることが確認された。

Key words *Bifidobacterium*, selective medium, nutritional requirements, nalidixic acid, fecal flora.

1956年、Petuely¹⁾は乳糖、酢酸アンモニウム、シスチン、ピオチン、パントテン酸および無機塩からなる単純な組成の *Bifidobacterium* の合成培地を考案し、さらにこの合成培地はヒト大便材料からの *Bifidobacterium* の選択培地としても利用しうることを報告した。また、その2年後には Gyllenberg ら²⁾は *Bifidobacterium* の栄養要求性を調べて3種類のタイプがあること、リボフラビンや核酸塩基は必須栄養源であることなどを明らかにした。本研究ではこの Petuely の選択培地の *Bifidobacterium* 分離能の向上に対し、リボフラビン、核酸塩基およびピルビン酸塩等の添加効果の有無につき検討した成績について述べる。この際、選択剤としてナリジキシン酸が *Bifidobacterium* に対する選択性が優れているという報告^{3,4)}に基づいて Petuely の選択培地の改良を試みた。この新しい *Bifidobacterium* 選択培地を用いてヒト大便中からの *Bifidobacterium* の選択能について検討した結果について報告する。

材料および方法

I. 使用菌株

Bifidobacterium の標準株8株と分離保存株154株を用いた。標準株は理化学研究所岡岡博士から分与され

たものであり、*B. bifidum* E319, *B. infantis* S12, *B. infantis* subsp. *lactentis* 659, *B. infantis* subsp. *liberorum* S76e, *B. breve* S1, *B. breve* subsp. *parvulorum* a S50, *B. adolescentis* a E194a, *B. longum* E194bである。また、保存株はすべて著者が健康乳児から分離したものであり、その内分けは *B. bifidum* 32株, *B. infantis* 4株, *B. infantis* subsp. *liberorum* 15株, *B. breve* 19株, *B. breve* subsp. *parvulorum* 55株, *B. adolescentis* 12株, *B. longum* 17株であった。さらに、*Bifidobacterium* 以外の標準株として下記の菌株を使用した。すなわち、*Eubacterium aerofaciens* VPI 1003, *E. contortum* VPI 8700, *E. cylindroides* VPI 8072, *E. eligens* VPI C15-48, *E. limosum* VPI 6684, *Bacteroides fragilis* ATCC 23745, 25825, *B. ovatus* VPI 10649, *B. distasonis* VPI 4243, *B. vulgatus* VPI 8482, *B. hypnemegeas* VPI 2366-1, *Fusobacterium necrophorum* ATCC 25286, *F. russi* VPI 0307, *F. varium* ATCC 8501, *Clostridium bifermentans* NCTC 504, *C. butyricum* IFO 3315, *C. innocuum* ATCC 14501, *C. perfringens* ATCC 14501, *C. sordellii* ATCC 9714, *C. sporogenes* ATCC 3584, *Lactobacillus catenaforme* VPI 1553-1, *L. crispatus* VPI 3199, *Streptococcus durans* IFO 3826, *S. equinus*

Abbreviations: MVL-G 培地, 変法 VL-G 培地; MPSN 培地, modified Petuely's synthetic medium supplemented with nalidixic acid.

IFO 12533, *S. faecalis* IFO 3826, 3971, 12964, *Escherichia coli* IFO 12734 を用いた。

II. 使用培地

Bifidobacterium 選択培地の基礎培地としては、炭酸ソーダを添加した Petuely の合成培地¹⁾を、また非選択培地は変法 VL-G (MVL-G)^{6b)}培地を用いた。各々の培地組成を表 1, 2 に示した。上記培地で寒天を除いたものを液体培地として使用した。培地の作製は Hungate⁵⁾の方法を改良した東ら^{6a)}のガス噴射法によった。ガス噴射装置を用い、CO₂存在下で寒天培地の場合は中試験管(16×160 mm)に 4.5 ml ずつ、液体培地の場合は小試験管(12×100 mm)に 3 ml あるいは 4 ml ずつ分注しブチルゴム栓をして、MVL-G 培地は 121°C15 分間高圧滅菌、Petuely の合成培地は 100°C30 分間加熱することにより作製した。MVL-G 培地は室温で、Petuely の合成培地は 5°Cにて保存した。

III. 希釈液

培養菌体の洗滌や大便の希釈に用いた希釈液の組成は以下の如くである。塩類溶液 I, II 各々 7.5 ml, 0.1% レザズリン溶液 0.1 ml, 1% Na₂CO₃溶液 3.0 ml, 5% 塩酸システイン溶液 1.0 ml および蒸留水 81.0 ml である (pH 6.8)。希釈液は培地作製に用いたガス噴射法により、4.5 ml ずつを中試験管に分注しブチルゴム栓をして 121°C, 15 分高圧滅菌を行った。

IV. 試料の希釈, 接種, 培養法

培養菌体, 大便の希釈, 培地への接種は全て CO₂噴

射下で行い、CO₂存在下で培養した。寒天培地の場合、試料を接種後直ちに東ら^{6a)}の方法に従い中試験管を水中で回転させ、培地を中試験管壁にフィルム状に広げて固め培養した (ロールチューブ法)。

V. 培地の評価

Petuely の合成培地にリボフラビン, 核酸塩基(アデニン, グアニン, ウラシル, キサンチン), ビルビン酸ナトリウムおよび抗生物質 (ナリジキシン酸, ポリミキシン B, ネオマイシン) を添加した培地を被験培地とした。この際、培地 100 ml に添加した量はリボフラビン, 核酸塩基はいずれも 100 μg, ビルビン酸塩は 10 mg, 抗生物質は 10 mg あるいは 20 mg であった。MVL-G 液体培地(3 ml)を用い、被験株を 37°C, 24-48 時間培養後、希釈液で 2 回遠心洗浄(2000 xg, 10 分)を行い、3 ml の希釈液に懸濁したものを被験菌液とした。被験菌液の 10 倍段階希釈液 0.5 ml を各種被験培地および対照培地として用いた MVL-G 寒天培地に植菌し、ロールチューブ法にて 37°C で培養を行った。培養 3-5 日後に出現した集落数を数え、被験培地の集落数が MVL-G 培地の集落数の 50% 以上であった時、増殖性陽性と判定した。液体培地における増殖の測定は MVL-G 液体培地 (3 ml) で培養した菌液 0.5 ml を 4 ml の被験培地に植菌し、37°C で 5 日間培養を行い分光光度計 (日立モデル 100-60, 日立) を用いて OD_{660 nm} (OD) を測定した。

Table 1. Composition of basal Petuely's synthetic medium

Lactose	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
FeSO ₄	15 mg
MnSO ₄ ·7H ₂ O	8 mg
NaCl	15 mg
Biotin	100 μg
Panthenic acid	2 mg
Tween 80	1 g
3% L-cysteine·HCl solution	10 ml
8% Na ₂ CO ₃ solution	50 ml
Agar	20 g
Distilled water	1,000 ml
pH	6.8

Portions (4.5 ml) of the medium in tubes were heated at 100°C for 30 min and stored at 5°C until used.

Table 2. Composition of modified VL-G (MVL-G) medium

Salt solution I*	75 ml
Salt solution II**	75 ml
0.1% resazurin solution	1 ml
Trypticase peptone (BBL)	2 g
Meat extract (BBL)	2 g
Yeast extract (Difco)	2 g
Glucose	5 g
8% Na ₂ CO ₃ solution	50 ml
3% L-cysteine·HCL solution	10 ml
0.07% hemin solution	10 ml
Agar	20 g
Distilled water	790 ml
pH	6.8

* Salt solution I, 0.6% K₂HPO₄ solution.

** Salt solution II consists of 0.6% KH₂PO₄, 1.2% (NH₄)₂SO₄, 1.2% NaCl, 0.12% MgSO₄·7H₂O, and 0.12% CaCl₂·2H₂O.

Portions (4.5 ml) of the medium in tubes were autoclaved at 121°C for 15 min and stored at room temperature until used.

VI. 大便材料での選択性

健康な成人(25-35才)の新鮮排せ便を試料とした。大便1g(湿重量)を10倍段階希釈を行い、 10^{-8} 及び 10^{-9} 希釈試料0.5mlを改良したPetuelyの合成培地(詳細は本文参照)およびMVL-G寒天培地に接種し、ロールチューブ法にて37°C、3-5日間培養した。いずれの培地においても出現集落数の70%以上を分離し、MVL-G斜面培地に継代後さらに純粋分離した。分離菌株の菌属レベルでの同定はグラム染色性、形態学的特徴、酸素感受性、生化学的性状、およびガスクロマトグラフィーによる低級脂肪酸の分析により行った⁷⁾。 *Bifidobacterium* については Mitsuoka⁸⁾⁹⁾の方法に従い各種糖発酵性に基いて必要に応じて菌種の同定を行った。

VII. 統計学的処理

各種培地により求めた大便中の *Bifidobacterium* の菌数について paired-t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

I. 栄養要求性と増殖効果

Petuelyの合成培地にリボフラビン、核酸塩基およびピルビン酸塩を加えて *Bifidobacterium* の増殖促進効果を検討した。Petuelyの合成培地においては8菌種、162株中114株(70.4%)が陽性と判定された。一方、リボフラビンを添加した場合には142株(87.7%)

が陽性となった。リボフラビンにさらに核酸塩基を添加しても明らかな効果は認められなかったが、さらにピルビン酸塩を加えることにより154株(95%)が陽性となった(表3)。以上の結果から、リボフラビン、核酸塩基、ピルビン酸塩を添加したPetuelyの合成培地(RNPPS培地)が *Bifidobacterium* の増殖に極めて有効であることが判った。

II. 抗生物質の影響

任意に選択した *bifidobacteria* 40株を用いてナリジキシン酸、ポリミキシンB及びネオマイシンを各々200 µg/mlの濃度でMVL-G寒天培地に添加して嫌気ロールチューブ法で培養し、その抑制効果を検討した。ナリジキシン酸、ポリミキシンB、ネオマイシンの添加により各々31株(77.5%)、23株(57.5%)および6株(15.0%)が増殖陽性を示した。以上の結果からナリジキシン酸が最も抑制効果が少ないことが判明し、以後選択培地にナリジキシン酸を用いることとした。さらに、任意に選んだ *Bifidobacterium* 6株とヒト腸管に優勢にいる菌種である *B. fragilis* 2株、*F. russi* 1株、*F. varium* 1株、*E. aerofaciens* 1株、*E. eligens* 1株、*C. perfringens* 2株および *S. faecalis* 2株の計9株を用いてRNPPS培地でのナリジキシン酸の添加効果を検討した。RNPPS液体培地にナリジキシン酸を各々、100 µg、200 µg/ml添加し37°C、5日間培養後の増殖をODで比較した。*Bifidobacterium* 6株の吸光度は100 µg/ml添加時は 1.07 ± 0.78 (平

Table 3. Effects of riboflavin, nucleic acid, and pyruvate on the growth of *Bifidobacterium*

Species	No. of strains tested	No. of strains showing positive growth* in basal Petuely's synthetic medium supplemented with			
		None	Riboflavin	Riboflavin+nucleic acids	Riboflavin**+nucleic acids+pyruvate
<i>B. bifidum</i>	33	28	32	32	32
<i>B. infantis</i>	5	4	4	4	5
<i>B. infantis</i> subsp. <i>liberorum</i>	16	16	16	16	16
<i>B. infantis</i> subsp. <i>lactentis</i>	1	1	1	1	1
<i>B. breve</i>	20	13	15	15	18
<i>B. breve</i> subsp. <i>parvulorum</i>	56	35	49	49	53
<i>B. adolescentis</i>	13	10	11	11	13
<i>B. longum</i>	18	5	14	14	16
Total	162	114(70.4)***	142(87.7)	142(87.7)	154(95.1)

* Evaluation for positive growth: The ratio of colony count in the test medium against that in non-selective MVL-G medium was more than 50%.

** Concentrations: riboflavin, 100 µg; nucleic acids (adenine, guanine, uracil, and xanthine), 100 µg of each; and pyruvate, 10 mg per 100 ml of medium.

*** Numbers in parentheses are percentages of numbers of strains showing positive growth to number of strains tested.

均±SD), 200 µg/ml 添加時は 0.87 ± 0.84 であった。一方, 抗生物質非添加の対照培地である RNPPS および MVL-G 液体培地では各々 1.25 ± 0.92 , 1.84 ± 0.31 であった。抗生物質非添加の RNPPS 液体培地には *B. fragilis* ATCC 23745 株を除き *Bifidobacterium* 属以外の増殖は認められなかった。また, *B. fragilis* ATCC 23745 株はナリジキシン酸非添加の RNPPS 培地での OD は 2.44 であるが, ナリジキシン酸 100 µg/ml を添加した場合は 0.08 の OD 値を示した。これらの結果に基づき, リボフラビン, 核酸塩基, ビルビン酸塩, ナリジキシン酸および pH 指示薬としてプロムクレゾールパープル等を含む Petuely の改良培地 (modified Petuely's synthetic medium supplemented with nalidixic acid, MPSN 培地) を *Bifidobacterium* の選択培地として考案した (表 4)。

III. MPSN 培地の選択能

MPSN 寒天培地の *Bifidobacterium* に対する選択能を *Bifidobacterium* 28 株および *Bifidobacterium* 属以外の嫌気性菌および通性嫌気性菌を合わせて 28 株について検討した。*Bifidobacterium* は全株増殖陽性で

Table 4. Composition of modified Petuely's synthetic medim supplemented with nalidixic acid (MPSN medium) for *Bifidobacterium*

Lactose	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg
FeSO ₄	15 mg
MnSO ₄ ·7H ₂ O	8 mg
NaCl	15 mg
Biotin	100 µg
Panthenic acid	2 mg
Riboflavin	1 mg
Adenine	1 mg
Guanine	1 mg
Uracil	1 mg
Xanthine	1 mg
Tween 80	1 g
3% L-cysteine·HCl solution	10 ml
10% sodium pyruvate solution	1 ml
Nalidixic acid	100 mg
1.6% bromocresol purple solution	1 ml
8% Na ₂ CO ₃ solution	50 ml
Agar	20 g
Distilled water	1,000 ml
pH	6.8

Portions (4.5 ml) of the medium in tubes were heated at 100°C for 30 min and stored at 5°C until used.

5 日間培養後の集落の大きさは直径 1 mm 以上であった。他方, 28 株のその他の菌属のうち, *E. contortum* VPI 8700 と *C. innocuum* ATCC 14501 を除くすべての菌株には集落の形成は認められず, また上記の 2 株も直径 0.1 mm 以下の微小集落であった (表 5)。

IV. 大便中の *Bifidobacterium* の菌数測定

MPSN 寒天培地を用いてヒトの大便材料を培養後, 発育した集落を分離し *Bifidobacterium* に対する選択性について定性的および定量的に検討した。健康成人 5 名から 15 例の大便を採取し MPSN 寒天培地を用いて合計 175 株を分離し同定した (表 6)。175 株中 164

Table 5. Growth of *Bifidobacterium* and other strict or facultative anaerobes on MPSN medium

Genus and species	No. of strains tested	Growth* on MPSN medium
<i>B. bifidum</i>	3	3
<i>B. infantis</i>	4	4
<i>B. infantis</i> subsp. <i>liberorum</i>	4	4
<i>B. infantis</i> subsp. <i>lactentis</i>	1	1
<i>B. breve</i>	3	3
<i>B. breve</i> subsp. <i>parvulorum</i>	5	5
<i>B. adolescentis</i>	4	4
<i>B. longum</i>	4	4
Total	28	28
<i>Eubacterium</i>	5	1**
<i>Bacteroides</i>	6	0
<i>Fusobacterium</i>	3	0
<i>Clostridium</i>	6	1
<i>Lactobacillus</i>	2	0
<i>Streptococcus</i>	5	0
<i>E. coli</i>	1	0
Total	28	2

* Incubation period, 5 days.

** Colonies formed were less than 0.1 mm in diameter.

Table 6. Recovery ratio of *Bifidobacterium* from 15 human fecal samples on MPSN medium

Species	No. (%) of isolates
<i>B. adolescentis</i>	89 (51)
<i>B. longum</i>	40 (23)
<i>B. bifidum</i>	31 (18)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	4 (2)
<i>Eubacterium</i> spp.	5 (3)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	6 (3)

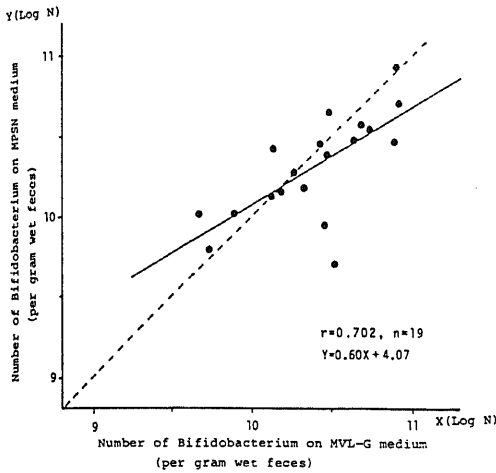


Fig. 1. Comparative recovery of *Bifidobacterium* by MPSN and non-selective MVL-G media from fecal specimens of 19 healthy adults N, number of bacterium.

株(94%)が *Bifidobacterium* と同定され、89株(51%)は *B. adolescentis*, 40株(23%)は *B. longum*, 31株(18%)は *B. bifidum* と同定されたが4株(2%)は同定不能であった。残り11株(6%)は *Eubacterium* と *Peptostreptococcus* と同定された。また、被験19例の大便1g(湿重)中の *Bifidobacterium* の菌数は、MVL-G寒天培地では 10.39 ± 0.19 (対数平均値の95%信頼限界値)、MPSN寒天培地では 10.30 ± 0.16 であった。また、両培地間の差を統計的に処理した有意の差は認められなかった。図1にはMVL-G寒天培地およびMPSN寒天培地で計測した *Bifidobacterium* の菌数を示した。なお、MVL-G寒天培地より分離した678株中206株(30.4%)が *Bifidobacterium* と同定された。

考 察

Bifidobacterium の選択培地については現在利用可能なものが数種類報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。これらの培地の殆どには第1義的な選択剤としてネオマイシン、カナマイシン、ナリジキシン酸などの抗生物質が用いられている。Finegoldら¹⁰⁾は通常非選択培地にこのような抗生物質を選択剤として加える方法では、*Bifidobacterium* に対する選択性は十分満足し得るものはえがたく、且つある場合には *Bifidobacterium* の増殖すら失敗することもあると述べている。著者はこのような成績から基礎培地に Petuely の合成培地を用い、また栄養要求性試験の結果から既に報告²⁾⁷⁾されているいくつかの栄養物を添加することにより改良を試み

た。選択剤としての抗生物質については、ナリジキシン酸が最も *Bifidobacterium* の増殖阻害が少なく³⁾、且つその他の菌属も有効に阻止しうることが知られている⁴⁾。著者の成績でも MPSN 培地では *Bifidobacterium* 以外の菌をほぼ完全に抑制することが判った。また、成人の大便材料を用いて MPSN 培地から *Bifidobacterium* を回収した結果、*Bifidobacterium* の菌数レベルと菌種のパターンは Mitsuoka ら⁹⁾の報告と基本的に一致していた。大便材料を試料とした際には MPSN 培地でも *Peptostreptococcus* や *Eubacterium* が検出されることがあるが、その程度は問題にならない程に低いことも証明された。

近年、ヒト大便中に最優勢にいる菌種は比較的単純な栄養要求性を示すという事実が次第に明らかにされてきた¹²⁾¹³⁾。著者の研究結果からも *Bifidobacterium* は嫌気条件さえ十分であれば唯一の N 源としてアンモニアだけで増殖できることを示している。また、Matteuzzi ら¹⁴⁾は多数の *Bifidobacterium* が N 源として例えばアミノ酸等の有機 N 化合物よりもアンモニアの方を好んで利用することを示している。この情報はヒト生態系におけるアンモニア代謝の中で、消化管内の *Bifidobacterium* の役割を考える上で興味深い。また、Petuely の合成培地に新たに栄養源を加えてもなお増殖し得ない菌株が存在したが、現在これらの株の栄養要求性につき種々のアミノ酸、ペプチド、ビタミン類、糖類等の添加効果につき検討している。

本研究の結果から、新しい *Bifidobacterium* の選択培地 MPSN 培地は大便中の *Bifidobacterium* の選択的な分離と計測に十分有効であり今後の *Bifidobacterium* の研究を容易ならしめるものとする。

結 論

Bifidobacterium の選択培地の作成を企図し、Petuely の合成培地の改良を行い以下の結論を得た。

1) Petuely の合成培地にリボフラビン、核酸塩基およびピルビン酸塩を添加することにより、*Bifidobacterium* の増殖性が 114/162 株 (70.4%) から 154/162 (95.1%) と向上し有用な基礎培地となった。

2) 選択剤としてナリジキシン酸 (100 μg/ml) をさらに添加した MPSN 培地を考案し、*in vitro* での選択能を検討した結果、*Bifidobacterium* は全株 28/28 株 (100%) が非選択培地と変らぬ増殖を示した。他方、その他の菌属 (*Eubacterium* 5 株, *Bacteroides* 6 株, *Fusobacterium* 3 株, *Clostridium* 6 株, *Lactobacillus* 2 株, *Streptococcus* 5 株, *Escherichia coli* 1 株) はほぼ完全に抑制された。

3) MPSN 培地を用いて健康成人の大便材料から

Bifidobacterium の分離を行い、定性的および定量的な検討を加え、本培地の出現集落の94% (164/175株) が *Bifidobacterium* であること、分離菌数も $10.30 \pm 0.16/g$ (対数平均値の95%信頼限界/便湿重量 g) と非選択培地 ($10.39 \pm 0.19/g$) と変らぬ高菌数を示すこと等が確認された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました西田尚紀教授に深く感謝いたします。また、貴重な御教示を賜った中村信一助教授に厚く御礼申し上げます。また、貴重な御助言を賜ったヤクルト中央研究所務台方彦所長に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) **Petuely, F.**: Ein einfacher vollsynthetischer Selektiv nährboden für den *Lactobacillus bifidus*. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A., **166**, 95-99 (1956).
- 2) **Gyllenberg, H. & Carlberg, G.**: The dominance of a specific nutritional type of *Lactobacillus bifidus* in breast-fed infants. Acta Pathol. Microbiol. Scand., **42**, 380-384 (1958).
- 3) **Miller, L. G. & Finegold, S. M.**: Antibacterial sensitivity of *Bifidobacterium* (*Lactobacillus bifidus*). J. Bacteriol., **93**, 125-130 (1969).
- 4) **Sherris, J. G.**: Future needs, p439-442. In E. H. Lennette, E. H. Spaulding, & J. P. Truant (ed.), Manual of clinical microbiology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1974.
- 5) **Hungate, R. E.**: A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes, p117-132, In J. R. Norris & D. W. Ribbons (ed.), Methods in microbiology, vol. 3B. Academic Press, Inc., New York, 1969.
- 6) **東 量三**: 嫌気性菌と嫌気性菌症 (小酒井・鈴木編), 第1版, 6a; 36-40頁, 6b; 335-338頁, 医学書院, 東京, 1968.
- 7) **Holdeman, L. V. & Moore, W. E. C. (ed.)**: Anaerobe laboratory manual, 2nd ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1975.
- 8) **Mitsuoka, T.**: Vergleichende Untersuchungen über die *Bifidobakterien* aus dem Verauungstrakt von Menschen und Tieren. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A., **210**, 52-64 (1969).
- 9) **Mitsuoka, T. & Kaneuchi, C.**: Ecology of the bifidobacteria. Am. J. Clin. Nutr., **30**, 1799-1810 (1977).
- 10) **Finegold, S. M., Sugihara, P. T. & Sutter, V. L.**: Use of selective media for isolation of anaerobes from humans, p99-108. In D. A. Shapton & R. G. Board (ed.), Isolation of anaerobes. Academic Press, Inc., New York, 1971.
- 11) **Mitsuoka, T., Segal, T. & Yamamoto, S.**: Eine verbesserte Methodik der qualitativen und quantitativen Analyse der Darmflora von Menschen und Tieren. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A., **195**, 455-469 (1965).
- 12) **Eller, C., Crabill, M. R. & Bryant, M. P.**: Anaerobic roll tube media for nonselective enumeration and isolation of bacteria in human feces. Appl. Microbiol., **22**, 522-529 (1971).
- 13) **Varel, V. H. & Bryant, M. P.**: Nutritional features of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. Appl. Microbiol., **28**, 251-257 (1974).
- 14) **Matteuzzi, D., Crociani, F. & Emoldi, O.**: Amino acids produced by bifidobacteria and some clostridia. Ann. Microbiol. (Paris), **129B**, 175-181 (1978).

Studies on *Bifidobacterium* I: An Improved Selective Medium for *Bifidobacterium*

Ryuichiro Tanaka, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – Juzen Med. Soc., 94, 935–941 (1985)

Key words: *Bifidobacterium*, selective medium, nutritional requirements, nalidixic acid, human fecal sample

Abstract

Petuely's selective medium for *Bifidobacterium* was improved by addition of riboflavin, nucleic acid bases, pyruvate, and nalidixic acid. The modified medium, when examined under strictly anaerobic conditions for efficient isolation of *Bifidobacterium* from human fecal samples, exhibited selective and high viable counts that were close to those found on the usual non-selective medium.