

## 冷蔵保存生乳より分離された *Flavobacterium* 属の性状

菊地政則\*・川村俊子\*・松井幸夫\*

### Characterization of *Flavobacterium* isolated from Bulk-cooled Raw Milk

Masanori KIKUCHI\*, Tosiko KAWAMURA\*  
and Yukio MATSUI\*  
(May, 1979)

#### 諸 論

*Flavobacterium* 属は、黄色色素生成菌として、Bergey (1923年) によって命名され現在に至っている。本属の菌の分類については、しばしば変遷があり、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (以下 Bergey's Manual とする) 第6版<sup>2)</sup> (1948年) では、Acromobacteriaceae に含まれ、グラム陰性菌をも含め27種が含まれていた。ところが、第7版<sup>1)</sup> (1957年) 以降ではグラム陰性菌のみとされた。

Bergey's Manual 第8版<sup>3)</sup> によると、グラム陰性桿菌で運動性をもつ種は周毛によるものとされている。しかし本属はいまだ明確な分類学的位置をもたず、不明確なグループとして一括されている。

Cowan<sup>4)</sup> によると *Flavobacterium* はグラム陰性桿菌で、普通非運動性であるが、運動性を有するものを含み、好氣的に発育、カタラーゼ、オキシダーゼがいずれも陽性、糖の分解は無いか、または徐々に分解するものとしている。一方 Pickett and Pederson<sup>19)</sup> は、インドール産生を本属の基本的特徴としてあげている。また Pickett ら<sup>17)・18)</sup> は臨床検査材料から分離された *Falvobacterium* の性状について検討し、3つのグループに大別した。そのうち糖から酸を生成するものをIとIIグループ、酸生成のないものをIIIグループとした。

Hayes<sup>9)</sup> も自然界に分布する *Flavobacterium* の分類学的考察を試み、分離菌株を5

\* 酪農学科，酪農微生物学研究室

Laboratory of Dairy Microbiology, Department of Dairy Science, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

phenon に分け、それぞれの特徴について詳細に述べている。

以上のごとく、現在 *Flavobacterium* 属については、その分類学上の位置についてもまた生乳、食品における生態についても不明な点が多く残されている。

今回は農場環境における *Flavobacterium* 属の生態を明らかにするため、まず生乳汚染菌の性状について検討した。

## 実験材料および方法

### 1. 供試菌

供試菌は筆者ら<sup>12)</sup>が、1974～1975年にバルククーラー保存生乳の80サンプルから普通寒天平板培地を用い、希釈法により、中温細菌は30°Cで3日間、低温細菌は7°Cで10日間培養後、形成集落からとくに黄色～橙色の非水溶性色素を産生するものを鈎菌、純粋分離をした167株を用いた。

### 2. 形態および培養所見

#### (1) グラム染色性と形態

普通寒天培地で25°C—48時間培養したものについて、Hunkerの変法<sup>16)</sup>によってグラム染色性ならびに形態を観察した。

#### (2) 運動性および鞭毛の観察

ペプトン水、または普通寒天斜面培地で25°Cで16～20時間培養した菌を懸滴法により運動性を確認し、運動性をもつものについてはLeifson法<sup>16)</sup>で染色し、鞭毛の付着様式を観察した。

#### (3) 色素生成

普通寒天培地および10%脱脂乳添加標準寒天培地上の集落の色調を、日本色彩(株)「実用 Today's Color 300」に準じて分類した。

### 3. 環境および生理的試験

#### (1) 発育温度

ペプトン水の前培養から菌をとり、同組成のペプトン水へ接種し、直ちに、0, 5, 10……30, 35, 37°Cの水槽中で14日間培養し、混濁を指標として発育の有無をみた。

#### (2) マッコンキー寒天、SS寒天上での発育

ペプトン水で培養した菌をマッコンキー寒天(栄研)、SS寒天(栄研)の平板に画線し、25°Cで7日間培養し発育の有無をみた。

#### (3) 食塩要求性および食塩耐性

ペプトン水に最終濃度が、0, 0.5, 1.0……4.0, 4.5%になるように食塩を添加し、前培養

から接種，25°Cで7日間培養後混濁の有無で判定した。

#### (4) 抗生物質に対する感受性

ハートインフュジョン・ブイヨン培地(栄研)に供試菌を25°Cで24時間培養したもの0.2 mlを滅菌シャーレに添加し，直ちに50°Cに加温溶解した感受性ディスク用培地(栄研)20 mlにて混積平板を作り，培地が固化後，細菌感受性試験紙トリディスク(栄研)を平板上に置き，25°Cで40時間培養後の阻止円の有無で感受性をみた。なお，抗生物質の種類および薬剤濃度は以下のとおりである。

ペニシリンG(PC)，0.5，2，10 u，カナマイシン(KM)5，10，30 µg，ポリミキシンB(PB)50，100，300 u，ノボビオシン(NB)0.5，2，10 µg，テトラサイクリン(TC)，5，10，30 µg。

### 4. 生化学的試験

#### (1) カゼイン，ゼラチンの加水分解性

普通寒天培地にゼラチンの場合にはゼラチンを0.5%，カゼインの場合には脱脂乳を10%を各々添加した培地で平板を作成し，前培養した菌体を画線塗沫，25°Cで4日間培養後，酸塩化水銀溶液(HgCl<sub>2</sub> 12 g，HCl 16 ml，精製水 80 ml)で培地表面を洗浄し，透明環を形成したものをタンパク質分解陽性と判定した。

#### (2) デンプンの加水分解性

普通寒天培地に溶性デンプンを0.1%添加した培地で平板を作り，カゼインの分解をみた場合と同様，供試菌を接種，5日間培養後，ヨード・カリ液(KI 2 g，I 1 g，精製水 300 ml)で洗浄，透明環を形成したものを陽性とした。

#### (3) エスクリンの加水分解性

エスクリンブイヨン〔ペプトン(Difco)10 g，NaCl 5 g，エスクリン1 g，クエン酸鉄0.5 g，精製水 1,000 ml〕に供試菌を，25°Cで7日間培養し，培地が黒変したものを陽性とした。

#### (4) インドール産生

ブイヨン〔トリプトン(Difco)10 g，牛肉エキス(極東)3 g，NaCl 3 g，精製水 1,000 ml〕5 mlに培養後，キシロール2 mlを添加撹拌したのちKovács試薬を0.5 ml添加，発色の有無で判断した。

#### (5) 硝酸塩還元性

ペプトン水〔トリプトン(Difco)10 g，NaCl 3.0 g，KNO<sub>3</sub> 0.1 g，精製水 1,000 ml〕で菌を7日間培養し，Cowan<sup>4)</sup>の方法でみた。

#### (6) ウレアーゼ活性

0.0008%のクレゾール・レッドを含む2%尿素液の無菌濾過液を小試験管に1 mlずつ分

注し、普通寒天培地の菌体を濃厚に接種し、37°Cで2時間培養、紫赤色となったものを陽性とした。

#### (7) Voges-Proskauer 反応とメチル・レッド反応

Cowan<sup>4)</sup>の方法に準じ、ブドウ糖リン酸塩培地〔ペプトン (Difco) 5 g,  $K_2HPO_4$  5 g, グルコース 5 g, 精製水 1,000 ml〕に供試菌を 25°C で 7 日間培養し、培養液を 2 分、一方には 5%  $\alpha$ -ナフトール液と 40% KOH 溶液を加え、4 時間以内に赤色となったものを V.P. 反応陽性とした。またもう一方の培養液には 0.04% メチル・レッド溶液を加え赤色となったものを陽性とした。

#### (8) オキシダーゼ、カタラーゼ活性

斜面培地に培養した集落に直接、3% 過酸化水素水を添加し発泡するものをカタラーゼ陽性とした。また、二塩酸 N, N, N' N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミンの 1% 溶液をろ紙に浸こませ、それに菌を塗抹、30 秒以内に濃青色となったものをオキシターゼ陽性とした。

#### (9) 脂肪分解性

前培養した菌をクロスリー寒天培地 (栄研) に画線、25°C で 4 日間培養後の集落周囲の青色化を観察した。

#### (10) 糖からの酸産生

普通寒天上の新鮮な菌体を OF 試験基礎培地 (栄研) にそれぞれの糖を添加した高層培地に穿刺、25°C で 4 日間培養後判定した。なお糖の最終濃度はエスクリンを、0.25%、グルコース、ラクトース、シュクロース、マルトース、マンニトール、キシロース、フラクトースを 0.5% とし、いずれも無菌ろ過液にして添加した。Board-Holding<sup>10)</sup> の培地 [ $NH_4H_2PO_4$  0.5 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g, 酵母エキス 0.5 g, B.T.B. 0.03 g, 寒天粉末 3 g, 精製水 1,000 ml] も同様に高層培地とし、穿刺培養した。クリグラー鉄寒天培地 (BBL) における酸産生も新鮮菌を処方にしたがい穿刺培養し、培地の変色によって酸を確認した。

#### (11) クエン酸塩の利用

Simmons のクエン酸塩培地<sup>16)</sup>の斜面に供試菌を画線、25°C で 7 日間培養し発育の有無でクエン酸塩の利用性をみた。

## 結果および考察

### 1. 形態および培養所見

スクリーニングテストで、*Flavobacterium* 属とみなされた 167 株はいずれも普通寒天培地、標準寒天培地上で発育が良好、しかも本属の特徴とされている非水溶性の黄色色素

の産生が認められた。また脱脂乳添加標準寒天培地上での発育も良好であり、色素産生も普通寒天培地でのそれより明瞭であった。Table 1 は分離菌の色調を大別したものである。*Flavobacterium* 属の産生する色素がカロチノイド系の色素であることは Weeks ら<sup>26)</sup> も報告しているが、その色調の範囲は広く、淡黄色から赤橙色までが認められている。今回、生乳より分離されたものは集落が yellow-orange, reddish-yellow のものが多く、また酸を産生するものは特にオレンジに近い色調のものが多く、総体として Geringer<sup>6)</sup> の報告と一致した。

Table 1. Variation of pigmentation in cultures isolated from raw milk samples

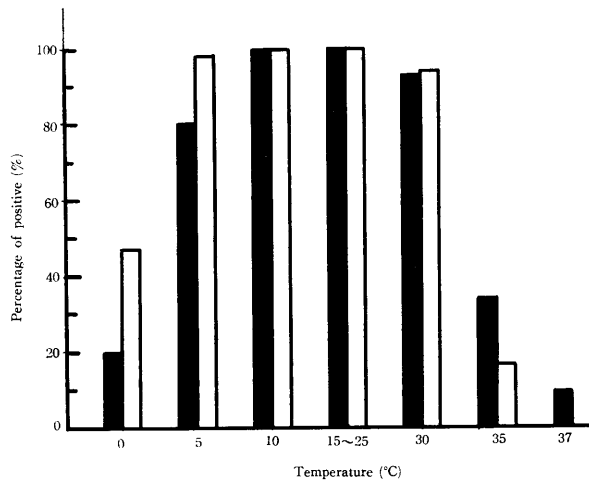
Pigment on standard agar	Weakly saccharolytic		Non-saccharolytic	
	No. of strains	%	No. of strains	%
Yellow-orange	64	45.1	1	4.0
Reddish-yellow	50	35.2	2	8.0
Pale-yellowish-brown	21	14.8	21	84.0
Yellow	2	1.4	1	4.0
Dark-yellow	2	1.4	0	0
Yellowish-brown	3	2.1	0	0
Total	142		25	

運動性をもつものは3株(1.8%)のみで、そのいずれもが数本の周毛性鞭毛をもっていた。Bergey's Manual<sup>3)</sup> には運動性をもつ種は第2グループに4種位置づけられているが、Pickett ら<sup>20)</sup> が臨床検査材料から分離した菌株では6%のものが、志賀<sup>22)</sup> は魚介類から分離したもので17%が運動性を有していると報告しているところから、運動性をもつ株は少ない傾向にある。したがって *Flavobacterium* 属で運動性をもつ株の生態は、今後、広範囲な分布調査の検討を必要とする。

## 2. 生理的性状

温度に対する感受性は、Fig. 1 に示したように、10~25°C においてはいずれの菌株も発育したが、35°C では22.2%、37°C になるとわずか3%のみが発育したに過ぎなかった。いっぽう、5°C では90%、0°C においても38.2%のものが発育可能であったことから、生乳および食品から分離されるものは低温域に発育至適温度をもつ菌種であることが明らかとなった。

食塩要求性および耐塩性については、Table 2 にみられるように、全菌株で食塩の要求性は認められず、しかも3%の濃度で68%のものが、また4.5%ですべての株が発育不能になったことから、われわれのみた *Flavobacterium* は海洋性のそれらとは異ったグループに属するものであることが分った。



**Fig. 1.** Growth response to the test isolates of *Flavobacterium* at various temperatures.

■ Mesophilic bacteria  
□ Psychrotrophic bacteria

**Table 2.** Growth response to the test isolates of *Flavobacterium* in different sodium chloride concentration

NaCl concentration in pepton water (%)	Group			
	Weakly saccharolytic (142 strains)		Non- saccharolytic (25 strains)	
	No. of positive	% of positive	No. of positive	% of positive
0	142	100.0	25	100.0
0.5	142	100.0	25	100.0
1.0	142	100.0	25	100.0
1.5	139	97.8	25	100.0
2.0	124	87.4	25	100.0
2.5	101	71.1	20	80.0
3.0	52	36.6	1	4.0
3.5	4	2.8	1	4.0
4.0	1	0.8	1	4.0
4.5	0	0	0	0

また、試験対象菌株の53.3%がマッコンキー寒天に発育したが、SS寒天には全く発育しなかった。

次にこれらの抗生物質に対する感受性をみて、その成績をTable 3に示したが、対照として代表的なグラム陰性桿菌、*Flavobacterium*の標準株などについても、それらの感受性の結果をも付け加えた。

**Table 3.** Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium* isolated from bulk-cooled raw milk and other representative gram-negative rods

Strains	Other designation	No. of strains	Antibiotics*				
			KM	PB	NB	TC	PC
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		6	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1	-	+	-	+	-
<i>Pseudomonas synxantha</i>		1	+	+	-	+	-
<i>Pseudomonas fragi</i>		1	+	+	-	+	-
<i>Aerobacter aerogenes</i>		3	-	+	-	+	-
<i>Proteus vulgaris</i>		1	+	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>		3	+	+	-	+	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>		2	+	+	-	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i>		1	+	+	+	+	-
<i>Serratia marcescens</i>		1	+	+	-	+	-
<i>Spirillum lunatum</i>		1	+	+	-	+	-
<i>Erwinia carotovora</i>		2	+	+	-	+	-
<hr/>							
<i>Flavobacterium aquatile</i> NCCB 8535			+	-	+	+	+
<i>Flavo. capsulatum</i> ATCC 14666			+	+	+	+	+
<i>Flavo. arborescens</i> ATCC 4358			+	-	+	+	+
<i>Flavo. flavescens</i> IFO 3085			+	+	-	+	+
<i>Flavo. esteraomaticum</i> ATCC 8091			-	-	+	+	+
<i>Flavo. heparium</i> ATCC 13125			-	-	+	+	+
<i>Flavo. menigosepticum</i> IFO 12535			-	-	+	+	-
<i>Flavo. okeankoites</i> IFO 12536			-	+	-	-	-
<i>Flavo. lutescens</i> IFO 12997			+	+	-	+	+
<hr/>							
Flavobacteria isolated			Percentage of positive (%)				
from bulk-cooled raw milk.			13.0	15.0	78.0	78.0	50.9

\* KM: Kanamycin 10  $\mu$ g, PB: Polymyxin B 100 u, NB: Novobiocin 2  $\mu$ g, TC: Tetracycline 10  $\mu$ g, PC: Penicillin G 10 u.

もともと、グラム陰性菌が感受性をしめすポリミキシン B (100 u) に対し 15% の株のみが感受性をもち、逆にグラム陽性菌が感受性をもつペニシリン G (10 u) に対し 50.9% が感受性を示した。これら両薬剤に対しては、*Flavobacterium* の標準株等も同様な傾向をみせた。

以上のことから、われわれのみた *Flavobacterium* はグラム陰性菌であるにもかかわらず、その抗菌スペクトルは特異な傾向をしめすことが分った。

*Flavobacterium* 属がポリミキシン B に対し非感受性を示す傾向があることは Gilardi<sup>7)</sup>

も報告し、他のグラム陰性桿菌から本菌を分別するに有効な手段であるとしているが、今回の結果からも、そのことが確かめられた。

### 3. 生化学的性状

#### (1) 糖からの酸産生

*Flavobacterium* はブドウ糖などから微弱ながら酸を産生することが知られている。今回の実験で扱った菌株の糖分解試験の結果を Table 4 にまとめたが、ブドウ糖と乳糖については、組成の異なる培地を用いた場合の結果についても示した。ブドウ糖、乳糖においては、ペプトンの含む Hugh- の培地に比べ、無機塩培地である Board の培地での酸産生の頻度が高く、Kligler 培地での酸産生確認は適当でないことが明らかとなった。これはペプトンを含む培地では、ペプトンの分解産物のため培地がアルカリ化し、産生された微弱な酸の量ではそれを確認することが困難なためと考えられる。したがって、*Flavobacterium* のような非発酵性菌の同定に際しては培地組成に十分配慮する必要があるだろう。なお、糖から酸を生成しないものは、Pickett<sup>17)</sup> の分類による III グループに一致するものと考えられる。

**Table 4.** Carbohydrate reactions of *Flavobacterium* isolated from raw milk samples

Carbohydrate	No. of isolates examined	Percentage of positive		
		Hugh-Leifson	Board-Holding <sup>10)</sup>	Kligler's agar
Glucose	167	73.1	83.8	0.6
Lactose	167	15.6	26.3	0.6
Sucrose	167	25.7	—*	—
Maltose	167	71.9	—	—
Mannitol	167	3.0	—	—
Xylose	167	6.6	—	—
Fructose	167	36.5	—	—

\* —: Test not performed.

#### (2) その他の生化学的性状

分離菌株のその他の生化学的性状を Table 5 に示した。供試菌株はいずれも、カゼイン、ゼラチンなどに対する分解性が強く、特にゼラチンに対して 99.4% が陽性であった。また、エスクリンに対する分解性も高く 91% が陽性であり、この点は *Flavobacterium* の基本的性状の 1 つとみてよい。いっぽう、脂肪の分解性は供試菌株の約半数が陽性を示した。

本属菌の場合インドール産生をみるには従来の方法、すなわち Kovács または Ehrlich



**Table 5.** Physiological characteristics of *Flavobacterium* isolated from bulk-collected raw milk

Features	Weakly saccharolytic (142 strains)		Non-saccharolytic (25 strains)	
	No. of positive	%+	No. of positive	%+
Oxidase	142	100.0	25	100.0
Catalase	142	100.0	25	100.0
Hydrolysis of :				
Esculin	131	92.3	21	84.0
Starch	142	100.0	25	100.0
Casein	135	95.1	25	100.0
Gelatin	141	99.3	25	100.0
Butter fat	92	64.8	4	16.0
Indol	115	81.0	24	96.0
Citrate	6	4.2	1	4.0
NO <sub>3</sub> to NO <sub>2</sub>	48	33.8	4	16.0
Voges-Proskauer	0	0	0	0
Methyl red	2	1.4	0	0
Require added NaCl	0	0	0	0
Urease	50	35.2	0	0
Growth on :				
MacConkey agar	73	51.4	16	64.0
Kligeier agar	142	100.0	25	100.0
SS agar	0	0	0	0
Motility	3	2.1	0	0

試薬を直接培養液に添加する方法ではむずかしいとして、Smith<sup>24)</sup> は培養液にキシロールを添加し、インドールを抽出して Kovács 試薬を添加することを推奨している。われわれもその方法にしたがったが、微弱ながら 83% が陽性であった。なお、Pickett<sup>19)</sup> は *Flavobacterium* の基本的性状の 1 つに、このインドール産生を指標としている。

クエン酸塩利用、Voges-Proskauer 反応、メチルレッド反応、ウレアーゼ活性、硝酸還元性はいずれも一部の菌株のみが陽性を示したがこの点も本属菌の特徴とみてよいと思われる。

生乳からの *Flavobacterium* 属の分離は多数の研究者によって報告されている<sup>5), 9), 11), 12), 14), 15), 23), 25)</sup>。しかしその分離菌株の分類学的性状については、Geringer ら<sup>6)</sup>、Kielwein ら<sup>13)</sup> を除き十分な検討がなされていないのが現状である。いっぽう *Flavobacterium* の生乳の品質、特にタンパク質に対する影響についての検討は、柳谷ら<sup>27)</sup>、笹野ら<sup>21)</sup> によってなされ、生乳品質に本菌が関与していることが明らかにされている。また今回の研究からも明

らかのように、本菌は低温域での増殖が容易であることから、牛乳および低温保存乳製品の品質に与える影響はきわめて大きいものと考えられる。

## 要 約

バルククーラーでの貯蔵生乳から 167 株の中温性および低温性 *Flavobacterium* を分離し、形態学的、生理学的、生化学的性状の検討を行った。

分離菌はすべて普通寒天培地上でよく発育し、5°C では 167 株中の 90%、0°C でも 38.2% が発育し、低温における発育性が明らかであった。またすべての菌株はカタラーゼ、オキシダーゼ活性をもち、それらの菌株は 25°C 培養において、標準寒天培地上に pale-yellow から orange の色素をもつ S 型集落を形成した。

分離菌のうち 3 株 (1.7%) は懸滴法で運動性が確認され、いずれも周毛性鞭毛をもっていた。

分離菌株の約 53% にあたる菌株は MacConkey 寒天上で発育が可能なのに対し、SS 寒天上では全く発育不能であり、さらに 4.5% 食塩濃度培地でも発育ができなかった。また、わずかな菌株を除き、インドールの産生、デンプンの加水分解、タンパク質の分解性が陽性で、これらの点が本菌の基本的性状であるとみられる。

分離菌の約半数がペニシリン G に感受性を示したが、ポリミキシン B に対しては感受性がなく、特異なパターンをしめした。

上述の性状は *Flavobacterium* を容易に他のグラム陰性桿菌から分別し得て、それらの同定法として用いられてよいと考えられる。

## 文 献

- 1) Breed, R. S., E. G. D. Murray and N. R. Smith, 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (Seventh Edition) pp. 296-332 The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- 2) Breed, R. S., E. G. D. Murray and A. P. Hitchens, 1948. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (Sixth Edition) pp. 412-442 The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- 3) Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (Eight Edition) pp. 357-364 The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- 4) Cowan, S. T., 1974. (坂崎利一訳) 医学細菌同定の手びき (第 2 版) 近代出版, 東京.
- 5) Dempster, J. F., 1968. Distribution of psychrotrophic micro-organisms in different dairy environments. *J. Appl. Bact.* **31**: 290-301.
- 6) Geringer, M. und G. Kieiwein, 1976. Untersuchungen zur Einteilung der in Milch vorkommenden Flavobakterien. *Archiv. für Lebensmittelhygiene*. **27**: 11-17.
- 7) Gilardi, G. L. 1971. Antimicrobial susceptibility as a diagnostic aid in the identification

- of non-fermenting gram-negative bacteria. *Appl. Microbiol.* **22**: 821-823.
- 8) Hayer, P. R. 1977. A taxonomic study of flavobacteria and related gram-negative yellow pigment rods. *J. of Appl. Bact.* **43**: 345-367.
  - 9) 日越博信・浜田輔一, 1976. 工場持込時生乳における低温細菌群. *食衛誌* **17**: 34-40.
  - 10) Holding, A. J., and J. G. Collee, 1971. in "Methods in Microbiology. Vol 6 A" (Norris, J. R. and D. W. Ribbons) Academic Press, London.
  - 11) 菊地政則・松井幸夫, 1974. バルククーラー貯蔵生乳の細菌数推移および菌叢に関する研究. *日畜会報* **45**: 592-596.
  - 12) 菊地政則・松井幸夫, 1976. バルククーラー貯蔵生乳の細菌学的品質に関する研究. *酪農科学食品の研究* **25**: 125-131.
  - 13) Kielwein, G. und M. Geringer, 1977. Die milchhygienische Bedeutung von Flavobakterien. *Archiv. fur Lebensmittelhygiene.* **26**: 221-225.
  - 14) Kiuru, K., E. Ekland, H. Gyllenberg and M. Antila, 1971. Die proteolytische Aktivitat der psychrotrophen Mikro-organismen in der Hofbehaltermilch. *Milchwissenschaft,* **26**: 138-141.
  - 15) LaGrange, W. S. and F. E. Nelson, 1961. Bacteriological evaluation of manufacturing grade bulk-tank milk. *J. Dairy Sci.,* **44**: 1440-1445.
  - 16) Lennette, E. H., E. H. Spaulding and J. P. Truant, 1974. *Manual of Clinical Microbiology,* (Second Edition) pp. 898. American Society for Microbiology, Washington.
  - 17) Pickett, M. J. and C. R. Manclark, 1970. Nonfermentative bacilli associated with man; I. Nomenclature. *Amer. J. Clin. Path.,* **54**: 155-162.
  - 18) Pickett, M. J. and M. M. Pederson, 1970. Salient features of nonsaccharolytic and weakly saccharolytic nonfermentative rods. *Can. J. Microbiol.,* **16**: 401-409.
  - 19) Pickett, M. J. and M. M. Pederson, 1970. Non-fermentative bacilli associated with man; II. Detection and identification. *Amer. J. Clin. Path.,* **54**: 164-177.
  - 20) Pickett, M. J. and M. M. Pederson, 1970. Characterization of saccharolytic non-fermentative bacteria associated with man. *Can. J. Microbiol.,* **16**: 351-362.
  - 21) 笹野 貢・岡田迪徳・長岡隆夫・大浦義徳, 1977. 低温保存乳より分離した低温細菌の乳蛋白質分解作用. *日畜会報* **48**: 403-409.
  - 22) 志賀信雄, 1957. 腐敗細菌としての *Flavobacterium* の研究. *千葉医学会雑誌* **33**: 28-41.
  - 23) 清水苗一, 1977. 生乳の長距離輸送と品質保持. *酪農科学・食品の研究* **26**: 221-227.
  - 24) Smith, R. F., R. R. Rogers and C. L. Bettage, 1972. Inhibition of the indol test reaction by sodium nitrite. *Appl. Microbiol.,* **23**: 423-424.
  - 25) Twomey, A. and W. E. Grawley, 1968. The microflora of raw milk in relation to quality testing. *N. Z. J. Dairy Tech.,* **3**: 120-122.
  - 26) Weeks, O. B., A. G. Andrewes, B. O. Brown and B. C. L. Weedon, 1969. Occurrence of C<sub>40</sub> and C<sub>45</sub> carotenoids in the C<sub>50</sub> carotenoid system of *Flavobacterium dehydrogenes.* *Nature,* **224**: 879-882.
  - 27) 柳谷孝幸・三上正幸・三浦弘之, 1973. 低温性細菌による牛乳タンパク質の変化. *日農化会誌* **47**: 259-266.

### Summary

One hundred and sixty-seven flavobacteria isolated at 7°C for 10 days or at 30°C for 3 day incubation from bulk-cooled raw milk were studied regarding their morphological, physiological and biochemical characteristics. All the isolates were

grown in nutrient agar wells. The ninety percent of 167 isolates was found to grow at 5°C, and the 38.2% was found to grow at 0°C. All of these showed catalase- and oxidase-positive.

The majority of the isolates presented pale-yellow to orange pigmentation and formed smooth colonies on standard agar at 25°C.

The three isolates (1.7%) showed motility in the hanging drop preparation and were monotrichous. Nearly 53% of these grew on MacConkey agar but failed completely to grow on SS agar.

With a few exceptions, these *Flavobacterium* gave positive results to indol production, hydrolysis of starch, and digestion of protein. Approximately half of them were highly sensitive to penicillin G, although they failed to respond to polymyxin B.

These results may serve to distinguish *Flavobacterium* from other bacteria.