

アセトン・ブタノール醗酵に関する研究 (第2報)

I 細菌の分離並に検索 (續)

小 田 雅 夫

(1) 第1報に於いては蒐集せる試料より目的の菌の分離検索を行ひたる結果と31株の分離せる細菌中代表的なものとして選びたる2菌株中の1株183號菌即ち *Bacillus felsineus* var. *formosaensis* の性質に就いて報告した。

本報には選びたる2菌株中の他の1株にして新種と認められる195號菌の性質に關して報告する。

[III] 195 號菌の性質

試験方法は特に示さない限り前報の *Bacillus felsineus* var. *formosaensis* の場合と總て同様である。

形態的特徴

玉蜀黍醗を用ひ嫌氣的に培養した場合の形態は次の如くである。

榮養細胞：37°C に於いて24時間培養後の榮養細胞は端部に圓味ある桿狀で多くは單獨又は2個連結するものであるが稀に3~7個連結するものも認められる。細胞の大きさは0.7~1.0×2.2~10.8μであるが0.7~1.0×5.0~6.7μのものが多い。老成して肥大せる細胞には一端が少々尖つたものも認められる。

孢子囊細胞 (Sporangium)：48時間培養に於ける孢子囊細胞は紡錘狀のものが多いが稀に棍棒狀のものも認められる。孢子は細胞の中央に位置するものは少く多くは中央より少々偏りて存し中には細胞の一端に近く位置するものがある。孢子囊細胞の大きさは1.5~1.7×5.0~11.7μである。

孢子：形は橢圓形にして大きさは1.3~1.5×2.0~2.5μである。

運動性：幼若なる榮養細胞は活潑に運動し周生鞭毛を有することを認めた。

染色性：玉蜀黍醗に37°Cで46時間培養したものに就いて試験した。

(イ) Gram 染色は陽性である。

(ロ) 沃度液で幼若細胞は細胞の一端乃至三分の一を残し様に染色するが老成して肥大せる細胞 (37°C 71時間) は逆に細胞の一端乃至三分の一の所迄が紫色に染まり残りの部分は不染で留まるものが多い。

(ハ) メチレン青液及び石炭酸フクシン液で共に良く染色せられる。

培養的特徴

(イ) 固體培養

玉蜀黍汁寒天平板培養：ROSENTHAL 法に依り嫌氣的に 37°C に於いて培養し7日後に培養基の表面に白色露滴狀にして直徑 $0.6\sim 1.2\text{mm}$ なる聚落を形成する。聚落を低培率で鏡檢するに大體圓形で帶黃灰黑色を呈する。培養基層中の聚落は白色の不整形で直徑は大體 $1.0\sim 2.0\text{mm}$ である。是を低培率で鏡檢するに不整形で中央は灰黑色周縁は黃褐色である。聚落は表面のものも層中のものも共に質緊密にして壊はれ難い。

麴汁 (12°B) 寒天平板培養：排氣による嫌氣培養に於いて5日後に培養基の表面に白色露滴狀にして直徑 $0.8\sim 1.2\text{mm}$ なる聚落を形成する。是を低培率で鏡檢するに大體整齊なる圓形にして灰褐色を呈し内容は均質である。培養基層中の聚落は不整形にして低培率で鏡檢するに灰褐色を呈し内容は均質である。

玉蜀黍汁寒天劃線培養：排氣法により嫌氣的に 37°C で培養し5日後に劃線に沿ひ點々白色小粒狀の聚落を形成し培養基の底部は凝縮水中に於ける發育による瓦斯の發生の爲二三の龜裂を生ず。

麴汁 (12°B) 寒天劃線培養：排氣法並に ROSENTHAL 法により嫌氣的に 37°C で培養するに其兩法の場合共に劃線上に於ける發育は困難であるが時に劃線に沿ひ點々白色の聚落の形成せられる事が認められる。尙屢々試験管底部の凝縮水中に發育して白色の沈渣を生じ發生する瓦斯により培養基に龜裂を生じ時に數個の塊片に切斷せられることがある。

ペプトン (0.5%) 添加麴汁 (5°B) 寒天劃線培養：前記麴汁 (12°B) 寒天劃線培養の場合と同様劃線上に於ける發育は困難であるが底部の凝縮水中には屢々發育する。

牛乳寒天劃線培養：排氣法によりて嫌氣的に 37°C で培養せしに8日後に至るも發育は認められなかつた。

麴汁 (12°B) 寒天穿刺培養： 37°C に於いて5日後穿刺口に發育を認めないが全穿刺線に沿ひ白色粒性の棒狀に發育し培養基には發生する瓦斯によりて龜裂を生ず。

葡萄糖 (1%) 添加肉汁寒天穿刺培養： 37°C で48時間後穿刺口に發育を認めず穿刺線に沿ひ白色に微に發育する。5日後發育狀態に變化を認めない。

麴汁 (12°B) 膠穿刺培養： 22°C で5日後小漏斗狀に液化されるが菌の發育は不良にして液中に白色の菌體が少量浮游する程度である。

葡萄糖 (5%) 膠穿刺培養： 22°C で5日後培養基が小漏斗狀に液化されるが菌の發育は不良にして液中に白色の菌體が少量浮游するに過ぎない。

麴汁 (12°B) 寒天振盪培養： 37°C で48時間後培養基層中に多數の白色の聚落を生じ培養基は瓦斯の發生によりて生ずる龜裂によりて塊片に切斷せられる。

馬鈴薯平板劃線培養：ベトリ皿内馬鈴薯平板面に劃線し排氣法により嫌氣的に 37°C で培養し48時間後劃線の一部に白色に僅かに發育し且つ僅かながら發泡を認める。5日後には馬鈴薯平板の表面に白色の皮膜狀に發育しベトリ皿の蓋を開くとアセトン・ブタノール臭が強い。

(ロ) 液 體 培 養

液體培養は總て排氣法により嫌氣的に行つた。

玉蜀黍醗： 37°C で48時間後發泡盛んにして Head を有す。5日後液は強く白濁し液中猶多少の發泡が認められ Head の表面器壁に沿ひても多少の泡沫を有す。液にアセトン・ブタノール臭が強い。

麴汁 (12°B)： 37°C で48時間後液は白濁し液中に發泡盛んにして液面は泡沫で覆はれる。5日後液は強く白濁し液中に發泡は最早認められないが液面は泡沫で覆はれ器底に白色の粘質物を生ず。液にアセトン・ブタノール臭がある。

ペプトン (0.5%) 添加麴汁 (5°B)： 37°C で5日後液中に白色雲狀の浮游物を有し液面に白色の粘質物を浮べ其上が泡沫を以て覆はる。液にアセトン・ブタノール臭がある。

肉汁： 37°C で7日後にも發育を認めない。

葡萄糖 (1%) 添加肉汁： 37°C で72時間後液は白濁し液中の發泡が盛んである。5日後液の白濁が更に強くなる。

牛乳： 37°C で48時間後液中に微に發泡を認める。5日後凝固し液中に發泡を認め液面にも泡沫を有す。液にアセトン・ブタノール臭を有し乳清はリトマス試験紙で酸性を呈す。

リトマス牛乳： 37°C で48時間後凝固しリトマスは還元され凝固物は淡赤色を呈す。液中に發泡を認める。8日後凝固物は幾分ペプトン化せられ其量を減じる。

凝固卵白角柱片保有玉蜀黍醗： 玉蜀黍醗中の凝固卵白角柱片は 37°C で48時間後一部溶解せられて大きさを幾分減少する。8日後凝固卵白角柱片の溶解が進み大きさが更に小さくなる。

生 理 的 性 質

インドール： ウイツテ・ペプトン及び葡萄糖を各々1%宛含有する肉汁に 37°C で7日間培養した培養液に就いて 北里-Salkowski 反應並に Ehrlich 反應に依りて試験せるに兩反應共に陰性の結果が得られた。

硝酸還元性： 0.02% の硝酸加里を添加した麴汁 (12°B) に 37°C で72時間培養後還元は亞硝酸より先に迄進むことが認められた。即ち培養液を Diphenylamin 試薬で硝酸を、Gries 反應で亞硝酸を試験せるに何れも検出せられなかつた。

亞硝酸還元性： ペプトン (0.5%) 添加麴汁 (10°B) 並に葡萄糖 (1%) 添加肉汁に夫々更に 0.005% の亞硝酸曹達を添加した2種の培養液を用ひ 37°C で5日間培養し培養液に就いて Gries 反應で亞硝酸を試験せるに陰性であり還元せられしことを認めた。

硫化水素の生成：

(イ) ペプトン含有培養液より硫化水素の生成： 葡萄糖 (1%) 添加ウイツテ・ペプトン含有肉汁に 37°C で培養し5日後に醋酸鉛試験紙が僅かに黒變し僅微に硫化水素の生成することを認める。

(ロ) 亜硫酸の還元による硫化水素の生成：前記葡萄糖添加肉汁に 37°C で42時間培養せるものに Na_2SO_3 を 0.1% の割合に無菌的に添加して再び 37°C に保ちしに6時間半後已に醋酸鉛試験紙が顯著に黒變し硫化水素の生成を明かに認める。

(ハ) チオ硫酸の還元による硫化水素の生成：前記葡萄糖添加肉汁に 37°C で22時間培養せるものに $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ を 0.2% の割合に無菌的に添加して再び 37°C に保ちしに5時間半後已に醋酸鉛試験紙が顯著に黒變し硫化水素の生成を明かに認める。

各種炭水化物の醗酵性：試験の結果は次表の如くである。

但し供試の炭水化物類中 Arabinose, Xylose, Glucose, Galactose, Saccharose, Maltose, Lactose, Dextrin, Soluble Starch, Inulin, Mannitol, Dulcitol, Salicin は Merk 社製、Rhamnose, Fructose, Mannose, Raffinose, Sorbitol, Inositol は Kahlbaum 社製、Pectin は Fraenkel und Landau 社製、Trehalose は Digestive Ferments 社 (Difco) 製、 α -Methylglucoside, Glycerol, Glycogen, Adonitol, Quercitol は武田化学社製、Ca-lactate は大日本製薬社製の純品を用ひ Cellulose は東洋濾紙會社の定量分析用濾紙をバルブ状に解いて使用した。

試料	繁殖	瓦斯	酸度	PH	アセトン
Arabinose	++	++	13.84	4.2	+++
Xylose	+	+	10.50	4.4	+
Rhamnose	—	—	4.98	5.6	—
Glucose	++ ⁺	++ ⁺	10.45	4.6	++ ⁺
Fructose	+++	+++	11.56	4.4	++ ⁺
Mannose	++ ⁺	++ ⁺	8.43	4.6	++ ⁺
Galactose	++	++	11.69	4.5	++
Saccharose	++	++	10.63	4.4	+++
Maltose	++	++	10.26	4.3	+++
Lactose	++	+ ⁺	11.73	4.4	++
Trehalose	—	—	4.70	5.8	—
Raffinose	+	(+)	5.87	4.8	±
α -Methylglucoside	+++	++	9.49	4.5	+++
Dextrin	+++	+++	10.75	4.5	++ ⁺
Soluble Starch	+++	+++	9.53	4.4	+++
Glycogen	++	+++	—	4.4	++ ⁺
Inulin	—	—	3.76	5.8	—
Pectin	++	++	8.08	4.8	(+)
Cellulose	—	—	4.00	5.8	—
Glycerol	—	—	4.27	5.8	—
Mannitol	++	++	9.20	4.6	+
Dulcitol	—	—	4.07	5.8	—
Sorbitol	++	++	5.44	5.4	++
Salicin	+++	++	10.18	4.8	+++
Inositol	—	—	4.25	5.7	—

Quercitol	—	—	4.05	5.8	—
Adonitol	—	—	4.20	5.8	—
Ca-lactate	—	—	6.47	5.1	—
Control (Non-carbohydrate)	—	—	3.75	5.8	—

註：試験結果の表示方法は總て前報と同様である。

醗酵生成物：瓦斯及び酸の外にアセトン、正ブチールアルコール並にエチールアルコールを生成する。而してアセトン、正ブチールアルコール並にエチールアルコールの生成比率を玉蜀黍醗を用ひ 37°C に於いて96時間醗酵せしめた場合の醗酵液に就いて Christensen 法によりて試験せる結果の一例を示せば是等3成分の全量を100とする時アセトン=34.64, 正ブチールアルコール=64.28, エチールアルコール=1.08 である。

醗酵と温度の関係：最適温度 37°C 附近、最高温度 45~46°C 附近、最低温度 22°C 以下である。是が試験成績の詳細は別に後報する。

繁殖と空気との関係：嫌氣性である。

類 縁 關 係

本菌を類縁の已知の菌種と比較するに *Bacillus saccharobutyricus* v. KLECKI⁽²⁾, *Bacillus amylobacter* A. M. et BREDEMANN⁽³⁾, *Bacillus macerans* SCHARDINGER⁽⁴⁾ 等とは培養的特徴、主要生成物又は各種炭水化物に対する醗酵性等に於いて相異なる。最も近似するは *Clostridium acetobutylicum* McCoy et al.⁽⁵⁾ であるが同菌は Rhamnose, Inulin, Trehalose を醗酵して Sorbitol, Pectin を醗酵せず又蛋白質の分解によりて硫化水素を生成なさざるに對し本菌は Rhamnose, Inulin, Trehalose を醗酵せずして Sorbitol, Pectin を醗酵し且つ Pepton より硫化水素を生成する點等が異なる。翻つて本邦に於ける已知の此種の菌種と比較するに *Bacillus butyloaceticus* OKADA⁽⁶⁾ はゼラチン培養基を液化せず Inulin, Rhamnose を醗酵するが本菌はゼラチン培養基を液化し Inulin, Rhamnose を醗酵せざる點が相異し且つ孢子の形成部位が兩者相異なることが認められる。更に *Bacillus butyligenus* MUTA⁽⁷⁾ は肉汁に發育し炭水化物中 Rhamnose, Trehalose, Inulin, Dulcitol を醗酵して Pectin を醗酵せず且つ同菌は穀類醗に於けるアセトン・ブタノール生成力微弱なるに對し本菌は肉汁には發育せず Rhamnose, Trehalose, Inulin, Dulcitol を醗酵せずして Pectin を醗酵し尙穀類醗に於けるアセトン・ブタノール生成力が旺盛なる事等相異なる點が多い。又 *Bacillus butanolaceticus* YUKAWA-HORIE⁽⁸⁾ は孢子囊細胞が鼓撥狀であり尙 Inulin を醗酵して Sorbitol を醗酵せず且つ 45°C に於いては已に醗酵を営まざるに對し本菌は孢子囊細胞が主として紡錘狀であり又 Inulin を醗酵せずして Sorbitol を醗酵し且つ 45~46°C に於いても尙醗酵する點等が異なる。仍つて本菌を新種と認め *Bacillus aceto-butanolicus* n. sp. と命名する。

本研究には文部省科學研究費の援助に負ふ處大であり研究費の一部は本坊藏吉氏が補助を與へられた共に

深甚の感謝を捧げる。尙研究に對して御支援下さつた岩井喜一郎氏並に研究試料の蒐集に御盡力を戴き或は便宜を與へられた明治製糖株式會社佐久芳男氏、鹽水港製糖株式會社橋本虎男氏、日本穀産株式會社石山正夫氏、大陸科學院藤野公平氏、天王寺商業學校岡本睦夫氏、南洋廳熱帶産業研究所蘆澤安平氏、南洋興發株式會社藤田達一氏、同斜森茂氏、同岡本頼太郎氏、同小原潤一氏、中島文彦氏(順序不同)の各位に深厚なる感謝を意を表する。

尙實驗を終始熱心に援助せられたる佐藤慶治君に深く感謝する。

文 献

- 1) 小田 : 本誌、19, 475 (昭和16)
- 2) V. KLECKI, V. : Centralbl. Bakt. II. 2, 169 (1896)
- 3) BREDEMANN, G. : Centralbl. Bakt. II. 23, 385 (1909)
- 4) SCHARDINGER, F. : Centralbl. Bakt. II. 14, 772 (1905)
- 5) MCCOY, FRED, PETERSON and HASTINGS : Jour. Inf. Dis., 39, 483 (1926); *ibid.*, 46, 118 (1930), through Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 5. ed., p. 765 (1939)
- 6) 岡田穗積 : 北海道工試報、38, (昭和7)
- 7) 牟田邦基 : 日、農、化、誌、9, 19 (昭和8)
- 8) 湯川又夫、堀江重美 : 日、農、化、誌、15, 609 (昭和14)

圖 版 説 明

I、玉蜀黍汁寒天上聚落 : 37°C に於いて5日間培養せるもので略實物大である。

II、麴汁寒天上聚落 : 37°C に於いて4日間培養せるもので略實物大である。

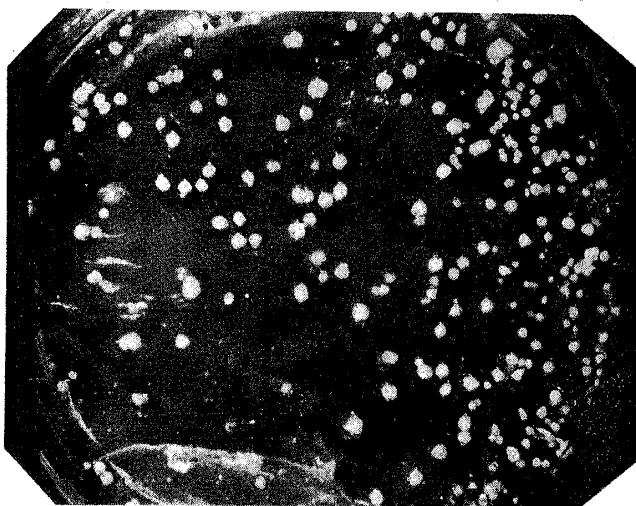
III、玉蜀黍醗に培養(37°C)せる細胞で略1000倍大である。

- a) 41時間培養の榮養細胞
- b) 72時間培養の孢子囊細胞
- c) 41時間培養中の沃度により染色せる細胞
- c') 72時間培養中の沃度により染色せる細胞

I



II



III

