

酸化性細菌に関する研究 (第1報)

Pseudomonas の一般的性質に就て

近 藤 圭 二・武 田 六 郎

(財団法人 醗酵研究所)

最近に至るまで *Pseudomonas* は主として病原菌, 腐敗菌の面から取扱われており, RUZICKA,¹⁾ NIEDERKORN,²⁾ JORDAN,³⁾ TANNER,⁴⁾ STARK,⁵⁾ GESSARD,⁶⁾ CHARRIN,⁷⁾ EISENBERG,⁸⁾ BAERTHLEIN,⁹⁾ GEORGIA,¹⁰⁾ FULLER,¹¹⁾ TURFITT,¹²⁾ KHARASCH,¹³⁾ SELLEEN,¹⁴⁾ 等は本細菌の分類學的な面, 或は本細菌の一つの特徴である螢光性色素の生成等に就て研究を行つている。しかし乍ら本細菌の酸化性に関する研究は少く, 古く1911年に ALSBERG¹⁵⁾ は *Ps. savastanei* に於て, グルコースからグルコン酸が生産される事實を認めているがこの研究はあまり注目を引かなかつた。然るに1939年に至り, ソ聯の PERVOZVANSKY¹⁶⁾ 並びに IVASHKEVICH は *Ps. putidum*, *Ps. cyanogenum*, 及び *Ps. fluorescens* がグルコースからグルコン酸と2-ケトグルコン酸とを生産する事實を認め, 更に1940年に至つて米國の LOCKWOOD¹⁷⁾ によりこれが確認されて以來, STON,¹⁸⁾ STEIN,¹⁹⁾ WHELTON,²⁰⁾ BERNSTEIN²¹⁾ 等の研究もあり *Pseudomonas* の酸化性が新に注目される様になつた。其後 LOCKWOOD²²⁾ は α -ケトグルタル酸の生成, 及びペントース或はラクトース, マルトースの酸化に就て, 又 STANIER²³⁾ は芳香屬化合物の酸化, 酒精の酸化等に就て報告しており更に GRAY²⁴⁾ の2-ケトグルコン酸の生産に関する特許も公にされて *Pseudomonas* の廣範な酸化能が認識される様になつた。我國でも既に池田氏²⁵⁾ により假性酸化細菌なる名の下に諸種の検討が加えられている。

著者等は *Pseudomonas* に就て主として酸化性の面より之が研究を企圖し, 差し當り23株の菌を分離選擇しそれらの性質を既往の醋酸菌, グルコン酸菌のそれと比較し乍ら検討して見た。

實 驗 之 部

〔菌 の 分 離〕

BERGEY²⁶⁾ の分類では *Pseudomonas* を水溶性色素生産性を以てその特徴としているのに徴し著者等は本細菌の分離に當り, 土壤, 污水に就て平面培養を行い培地中で該色素を生産するものを選択し, 更にそれらのうち Warburg 檢壓計による酸素吸収試験に於てグルコースの Q_{O_2} が100以上を示すものを酸化性細菌として選擇した。

〔形 態 的 性 質〕

大さ: $0.6 \sim 0.9 \times 1.0 \sim 1.3 \mu$ (Bouillon 24時間, 30°C 培養) 短桿菌, 單一又は双狀, 變形態なし, グラム染色陰性, 運動性有り, 鞭毛は極毛。

〔培 養 的 性 質〕

液體培養: 醋酸菌, グルコン酸菌, と異り清酒麥酒培地に生育せず, 肉汁, Bouillon, 酵母水等には良く繁殖する。液を濁濁し, 表面に薄い菲膜を形成するもの9株, 厚い皮膜を形成するもの11株, 菌環を形成するもの3株であつた。

固體培養: 菌苔は平滑, 灰白色, 濕潤, 脂肪様光澤を有す。麴汁寒天, 麥芽寒天, 肉汁寒天, 酵母水寒天等いづれも良く繁殖する。螢光色素は酸性では發色せず, 従つて酸性窒素源或は生酸性炭素源を用いた場合は色素の生成は認め難い。尙供試菌株の中には繼代培養の過程で色素生産

性を殆んど喪失するものがある。グリセリン或はグルコースに各種窒素源を用いた場合の色素生産性は第1表の通りである。

Table I

	Glycerin								Glucose							
	NaNO ₃	KNO ₃	Ca(NO ₃) ₂	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	Urea	Glycocoli	Asparagin	NaNO ₃	KNO ₃	Ca(NO ₃) ₂	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	Urea	Glycocoli	Asparagin
1	++	++	++	+	+	++	++	++	+	-	+	++	-	++	-	+
8	+	+	+	-	-	++	+	++	-	-	+	-	-	++	-	-
11	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
12	++	+	+	-	-	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
44	++	++	++	-	-	++	+	++	-	-	-	-	-	++	-	-
81	++	++	++	+	-	++	++	++	±	-	+	+	-	++	-	+
101	++	++	+	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	++	-	+
103	++	++	++	-	-	++	++	++	+	++	++	-	-	++	-	+
106	++	++	++	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	++	-	-
109	-	-	-	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	++	++	+
111	++	++	++	-	-	++	++	++	+	++	+	-	-	++	-	-
116	++	++	++	-	-	++	++	++	±	-	+	-	-	++	-	-
120	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	+	+	-	++	++	+
121	++	++	+	-	-	++	++	++	++	+	++	-	-	-	-	-
122	+	+	++	-	-	++	++	++	+	+	++	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
127	+	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	++	-	-
133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
140	++	++	+	-	-	++	++	++	+	±	++	-	-	-	-	-
142	+	+	-	-	-	-	-	+	±	-	±	-	-	-	+	±
144	+	+	+	-	-	++	+	++	-	-	-	-	-	++	-	-
151	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+	-	-	-	++	-	+
152	++	++	++	++	-	++	++	++	-	-	+	-	-	++	++	+

〔生理學的性質〕

第2表の通りである。

ゼラチンの液化, リトマスミルクの凝固性, 硝酸鹽の還元力, インドールの生成等は今日迄 *Pseudomonas* の分類上の重要な基準とされ, 醋酸菌, グルコン酸菌に比して確かに特徴的な性質であるが, これらは菌株により区々であり, その酸化的性質とは關聯がない。ただ硝酸鹽の還元力と葡萄糖の酸化様式との間には或る關係がある様に思はれる。生育温度は高温性のものと低温性のものとに區別する事が出来るが, 低温性の菌株が多い。

次に醋酸菌, グルコン酸菌等はその生育の opt pH が微酸性であり, pH 4 でも生育出来るが *Pseudomonas* はその opt が中性乃至微アルカリ性であり pH 5 以下では生育出来ない。この事は極めて特徴的である。また前者は概して無機窒素源を同化し得ないが後者は亞硝酸鹽を除いて他を良く同化する。芳香屬化合物の同化試験はフェノールのみを 0.005 モルの濃度で行い他はいづれも 0.01 モルの濃度で行つた。SELLEEN 等はフェノールの同化性を分類の一規準としているが分離菌中にもフェノールを同化するものが一株だけあるのが認められた。安息香酸, フェニール

(352)

(近藤, 武田) 酸化性細菌に関する研究 (第1報)

Table II Physiological properties

No of stamm	Liquefaction of gelatin		Action of milc		Reduction of Nitrate	Formation of Indol	Growth at		opt pH of Growth	Utilization of N source						Utilization of aromatic compounds							Antagonistic character		Hydrolysis of starch	Catalase	
	Coagulation	Peptonization	0~5°	39°~40°			NaNO ₂	NaNO ₃		(NH ₄) ₂ SO ₄	Asparagin	Glycocoli	Urea	Phenol	Benzoate	Benzaldehyde	Benzylalcohol	Phenylacetate	p-amino benzoate	p-oxybenzoate	Salicylate	Staph.	B. coli				
1	+	+	+	+	-	+	-	6.2~7.5	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	+	”	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	+	6.0~7.0	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	-	-	-	-	-	+	6.5~7.6	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	+	-	+	+	-	-	+	”	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
81	+	+	+	+	-	+	-	”	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
101	-	-	-	-	-	-	+	6.2~7.5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
103	-	-	-	-	-	-	+	6.2~7.0	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
106	+	+	+	+	-	-	+	6.0~7.0	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
109	+	-	+	+	+	+	+	”	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
111	-	-	-	-	-	-	+	6.2~7.5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116	+	+	+	+	-	-	+	”	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
120	-	-	+	-	-	-	+	6.0~6.5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
121	-	-	-	-	-	-	+	6.5~7.5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
122	-	-	-	-	-	-	+	”	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+	-	”	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
127	-	-	-	-	-	-	+	6.0~7.5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
133	-	+	+	+	-	-	+	6.0~7.0	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
140	-	-	-	-	-	-	+	6.0~7.5	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
142	+	+	+	+	+	+	-	6.2~7.0	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
144	+	-	+	-	-	-	+	6.5~7.0	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
151	+	+	+	-	-	-	+	6.2~7.0	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
152	+	+	+	-	-	-	-	”	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

醋酸, 等は良く同化される。また安息香酸 derivate 中 p-アミノ-, p-オキシ-は同化されるが m-オキシ-は同化されない。なほ p-オキシ-の場合は fluorescence の生成が認められなかった。

抗菌力と酸化性との間には關聯が認められなかつたが、概して pyocyanin 生産株は抗菌力が強い様である。

〔各種炭水化物よりの生酸性〕

上述の様に *Pseudomonas* は酸に對する抵抗性が弱いので次の様な方法によつた。各種炭素源 1% Bouillon 0.1% KH₂PO₄ 0.03% MgSO₄·7H₂O 0.01% CaCO₃ 1% agar 3% の組成の培養基を薄くペトリシャーレ中に溶解凝固させ、各菌株を streak し、30°Cの下に24時間放置して生産された酸による炭酸石灰の溶解される態度を觀察した。

結果は第3表の通りである。

Table ■ Acid production of various carbon sources

	Arabinose	Xylose	Glucose	Galactose	Mannose	fructose	Sorbitose	Maltose	Lactose	dextrin	starch	sucrose	Sorbitol	Mannitol	Glycerin	ethyl alcohol	Butyl alcohol
1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
11	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
81	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
101	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
106	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
111	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
116	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
121	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
122	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
125	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
127	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
133	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
140	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
142	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
144	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
151	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表により明かな様に Arabinose, Xylose, Glucose Galactose, Mannose よりは生酸されるが, 他は ethyl alcohol よりは7株, Butyl alcohol よりは2株, Glycerin, Maltose, Mannitol よりは各々1株ずつ生酸され, Sorbitol 通りの生酸は全菌株を通じて認められなかった,

〔生化学的性質〕

葡萄糖の酸化

振盪培養: グルコース 10%, corn steep liquor 0.5%, urea 0.2%, KH_2PO_4 0.06%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025% の組成の培地を100cc宛振盪コルベンに容れ殺菌後別に殺菌した炭酸石灰を加え, 前培養として前記の培地10ccに27°Cで24時間培養した菌を接種し, 5日間26~27°Cで振盪培養を行つた. 2-ケトグルコン酸は Lockwood の法により培養液の旋光度と還元力とより算出した.

静置培養: グルコース 5%, 酵母水 0.5%の組成の溶液100ccを三角コルベンに容れ殺菌後炭酸石灰を添加した. 菌接種後26~27°Cの下に14日間培養し培養基中の ca 量を測りグルコン酸石灰として算出した.

グリセリン, マンニット, ソルビットの酸化

基質各5%酵母水 0.5%の組成の培地50ccを用い26~28°Cの下に5日間振盪培養し, 培養液の還

(354)

(近藤, 武田) 酸化性細菌に関する研究 (第1報)

元力並にレゾルシン-Hcl による Seliwanoff のケトース反応を調べた。なほマンニツトの場合には鹽化鐵による麴酸の反應をも調べた。

エチルアルコール並にイソプロピルアルコールの酸化

基質2% (イソプロピルアルコールの場合は1%) 酵母水0.5%の組成の培地50ccを用い26~28°Cの下に3日間振盪培養し、醋酸は N/10 NaOH による滴定數より、Acetoin は20% KOH と Salcyl-aldehyd alcohol 溶液による呈色反應によつて調べた。結果は第4表の通りである。

Table IV Biochemical properties

	oxidation of glucose					oxidation of Alcohol acetic acid %	Inversion of sucrose	oxidation of glycerin	oxidation of mannite	oxidation of sorbite		oxidation of Isopropyl alcohol
	shaking culture				stationa- ryculture					reducing power	ketose reaction	
	αD	Reducing power cu mg	2-Keto gluco nate %	gluconate %	as gluconate %							
1	- 5.85	97.0	78	0	24	0	-	-	-	-	-	+
8	- 5.85	103.0	81	0	16	7.2	-	+	-	-	-	+
11	+ 0.66	3.5	0	90	15	0	-	-	-	+	-	+
12	- 5.00	86.0	69	0	13	0	-	-	-	+	-	±
44	- 3.34	65.0	48	0	13	0	+	-	-	-	-	-
81	- 5.89	58.0	70	0	16	7.6	-	-	-	-	-	+
101	- 4.73	71.7	63	0	14	0	-	-	-	-	-	±
103	- 3.53	53.9	47	0	12	0	+	-	-	+	-	-
106	- 3.70	58.5	50	0	9	0	+	-	-	-	-	±
109	+ 0.37	5.6	0	0	0	0	-	-	-	-	-	+
111	- 4.83	75.0	50	0	8	0	-	-	-	-	-	-
116	- 4.95	74.3	64	0	20	0	-	-	-	-	-	±
120	+ 0.56	0	0	85	26	4.0	-	-	-	-	-	+
121	- 4.47	95.0	66	0	15	4.5	-	-	-	-	-	+
122	- 3.86	61.0	51	0	9	5.7	+	-	-	-	-	+
125	+ 0.46	0.2	0	0	0	0	-	-	-	+	-	+
127	- 5.23	76.3	68	0	21	0	-	-	-	+	-	-
133	+ 0.38	0	0	87	31	4.5	-	+	-	-	-	+
140	- 4.50	75.0	61	0	17	4.5	-	-	-	-	-	+
142	+ 1.75	65.0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	+
144	- 4.35	80.5	61	0	17	0	-	-	-	-	-	±
151	- 7.10	121.0	97	0	23	0	-	-	-	-	-	+
152	- 4.41	68.0	61	0	7	0	-	-	-	-	-	+

即ち葡萄糖の酸化に就ては

- | | |
|----------------------------|------|
| 1 グルコン酸のみを生成するもの | 3 株 |
| 1 2-ケトグルコン酸を生成するもの | 17 株 |
| 1 グルコン酸, 2-ケトグルコン酸を生成しないもの | 3 株 |

であつた。既往の醋酸菌, グルコン酸菌と異なる點はその酸化力が靜置培養では極めて微弱であり且つ5-ケトグルコン酸が生産されない事であつてこれは菌の酸に對する抵抗性が弱いのに基いていると考えられる。なほグリセリンよりデオキシアセトンの生成, マンニツトより果糖, 麴酸の生成及びソルビットよりソルボースの生成等はいづれも認められなかつた。 *Pseudomonas* がア

ルコールより酢酸を生産する事は既に Stanier により指摘されたところであるが, 分離菌株中にも明かに酢酸を生産するものが7株ある事が認められた. この事は *Pseudomonas* と醋酸菌との距離を一層近づけるものと考えられる.

要 約

酸化性細菌として *Pseudomonas* の一般的性質を既往の醋酸菌, 並にグルコン酸菌のそれと比較検討した. 主要な相違点を列挙すれば次の様である. (1) 水溶性色素を生産する. (2) 清酒, 麥酒等には生育しないがブイヨン, 肉汁, 酵母水, 等には良く繁殖する. 又醋酸菌等に比しより *autotrophic* であり, 従つて人工増地にもよく生育する. (3) 生育の OPpH は中性又は微アルカリ性側にあり酸性には生育しない. (4) 芳香属化合物を同化する. (5) 葡萄糖を酸化してグルコン酸2-ケトグルコン酸等を生産するが, 5-ケトグルコン酸は生産しない. (6) グリセリン, ソルビット等を酸化して夫々デオキシアセトン, ソルボース等を生産する能力はない. (7) ブチールアルコールより殆んど生酸しないガラクトース, マルトースより生酸するものがある. (8) 静置培養ではその酸化力が極めて微弱である. (9) 酸化能は適應性が強い.

Pseudomonas の以上の様な性質から知られる事は本細菌が朝井博士の所謂 *Eugluconobacter* と類似している事實である. 著者²³⁾等もかつて花類よりその様な性質をもつ二, 三の菌を分離し, グルコノバクターとの共通性乃至特異性を論じたところであるが, *Eugluconobacter* と *Pseudomonas* 等の關聯性は新に検討されなければならないと考えられる.

終りに臨み御指導御校閲を賜つた醗酵研究所長佐藤博士並に阿部博士に深く感謝する. 尙熱心に實驗に御助力下さつた永井敏夫氏, 沖津房惠嬢に厚く感謝する.

(本報告は昭和25年2月11日日本農藝化學會關西支部例會で講演した).

文 献

- 1) RUZICKA : Arch. Hyg. **34**, 149 (1899).
- 2) NIEDERKORN : Z. f. Bakt. **1** Ab. **27**, 749 (1900).
- 3) JORDAN : J. Hyg. **3**, 1 (1903).
- 4) TANNER : J. Bact. **3**, 63 (1918).
- 5) STARK : J. Bact. **45**, 491 (1943).
- 6) GESSARD : Ann. Inst. Pasteur. **4**, 83 (1890), **5**, 65 (1891), **6**, 801 (1892).
- 7) CHARRIN : Compt. R. **114**, 1565 (1892).
- 8) EISENBERG : Z. f. Bakt. **1** Ab. **73**, 466 (1914).
- 9) BAERTHLEIN : Z. f. Bakt. **1** Ab. **81**, 428 (1918).
- 10) GEORGIA : J. Bact. **22**, 349 (1931).
- 11) FULLER : J. exp. Med. **4**, 609 (1899).
- 12) TURFITT : Bioch. J. **30**, 1323 (1936), **31**, 212 (1937).
- 13) KHARASCH : J. Bact. **32**, 533 (1936).
- 14) SELLEEN : J. Bact. **46**, 491 (1943).
- 15) ALSBERG : J. Biol. Chem. **9**, 1 (1911).
- 16) PRVOZVANSKII : Microbiology **8**, 149 (1939), **8**, 915 (1939).
- 17) LOCKWOOD : Ind. Eng. Chem. **31**, 1318 (1940), **32**, 1626 (1940).
- 18) STON : J. Bact. **43**, 18 (1942).
- 19) STEIN : J. Bact. **44**, 387 (1942).
- 20) WHELTON : J. Bact. **49**, 177 (1945).
- 21) BERNSTEIN : Arch. Bioch. **3**, 445 (1944).
- 22) LOCKWOOD : J. Bact. **42**, 51 (1941), **52**, 581 (1946), J. Biol. Chem. **164**, 81 (1946), **171**, 213 (1947).
- 23) STANIER : J. Bact. **51**, 191 (1947), **54**, 339 (1947), **55**, 477 (1948).
- 24) GRAY : Chem. Abst. 5683 (1947). U. S. P. 2421611-2421612.
- 25) 池田 : 日農化, **24**, 51, 56, 101, 103 (1951).
- 26) BERGY : Determinative Bacteriology (6 edition) (1948).
- 27) 朝井 : 日農化, **11**, 636 (1935).
- 28) 植村, 近藤 : 日農化, **13**, 201 (1942).