
 報 文

土壌中に於ける放線菌の分布 (第4報) *Microbispora* 属の分離及び分類

野々村 英夫, 小 原 巖 (山梨大学工学部)

Microbispora 属は著者らが土壌から分離した放線菌で, 気菌糸上に2個宛の胞子を形成するという形態的特徴があり, *Streptomyces* 属と *Micromonospora* 属を分類学的に関係づける属として設定したものである¹⁾²⁾. 同様の放線菌は著者らと同時に LECHEVALIER ら³⁾によつても発見され *Waksmania* 属と命名し報告された. その後 BALDACCI や WAKSMAN は放線菌目内に於ける斯様な放線菌の分類上の位置について⁴⁾, また BISSET は主として形態的観点からその分類学的意義を詳細に論じている⁵⁾. しかしながらこの種類の放線菌は *M. rosea* と *W. rosea* の各1株宛報告されているのみでその後に新しく分離研究された報告はないようである.

ところが著者らは其後本属の分離に適当な方法を考案し試験した結果, 本属放線菌は各地の土壌から容易に検出分離されること, また場合によつては土壌試料中で優性な繁茂を示すことさえあることを知つた. 依つて本報ではこの属の分離法, 分布, 分離株の菌学的性質及びその分類について報告する.

I. 供 試 料

供試土壌の採集地, 種類, 試験菌の検出状態及び供試株の分離地は次報 Table 1 に示される. また水分, pH 及び灼熱損量など供試土壌の性質は前報²⁾に同じである. なお菌株 M-20 は既報¹⁾の *M. rosea* の Type culture である.

II. 供試菌株の検出, 分離法

ペトリ皿に SKINNER の Soil extract agar⁶⁾ (糸状菌や細菌の圧倒的に繁殖するときは薄める) を10~15ml 注入凝固させ, その表面に供試細土の少量 (約0.5g) を置き, その周辺は薄くまばらになるよう拡げる. 30°Cで3週間位培養すると, 培地上の土粒周辺または間隙に放線菌の気菌糸が発達してくる. 時には土粒全体が本属放線菌で白色にみえることもある. 之等の集落を顕微鏡の低倍率で検鏡した後, 釣菌して希釈平板法により純粹にされた.

この方法は土壌の希釈液を平板培養する時とは異なり, 一般の放線菌や細菌の発達は概して抑制され, *Microbispora* 及び *Streptosporangium* の両属放線菌が発達するという選択分離に適したものである.

III. 分類試験の培地及び方法

分離株はビタミンが生育に必須であり, 其他の培地組成にも特性を示すので標準培地を多少改変したり代置したものが多い.

(1) Oatmeal agar (OA)⁴⁾. pH は NaOH で6.8~7.0とした.

(2) OA-Y. OA に Bacto-Yeast Extract (YE) 1.0g/l を加えた. 30°Cに1ヶ月間斜面培養し主に気菌糸の生育と色調, 及び可溶性色素の生産を観察した. また別に平板培養で15~20日後, 形態的観察を行なつた.

(3) OA-P. OA に TAKEDA の Polypeptone 2.0g/l を加えた. 30°Cで10~15日間斜面培養し主に基生菌糸の観察を行なつた.

(4) Starch agar (SA)-Y. PRIDHAM の Inorganic Salt-SA に YE 0.5g/l 追加した. 30°C, 15日間平板培養し生育, 気菌糸, 炭酸カルシウムの溶解性を観察した.

(5) Glycerol-asparagine agar (GAA)-Y. GAA⁴⁾に YE 0.5g/l 追加した. 30°C, 15日間平板培養し, 主に基生菌糸の色を観察した.

(6) Potato agar (PA) 及び Nutrient agar (NA). BALDACCI ら⁷⁾の方法に従つた.

(7) Glycerin agar (GA). (14)の glucose を glycerin で代置した. 30°C, 1~2ヶ月間斜面培養し主に生育良否を観察した.

(8) Melanoides. Peptone agar⁴⁾を用いる方法に従つた.

(402) (野々村, 小原) 土壤中に於ける放線菌の分布 (第4報)

- (9) Starch hydrolysis. SA-Y に30°C, 20日間培養し LUGOL's solution で検査した.
- (10) Gelatin liquifaction. (a) Gelatin 120g YE 0.5g Dist. water 1000ml の培地で30°C, 1ヶ月間培養した. (b) BALDACCI らりの培地に YE 1.0g/l 加え, 20°C, 40~60日間培養した.
- (11) Milk peptonization. BALDACCI らりの方法に従った.
- (12) Nitrate reduction. Glucose nitrate broth⁶⁾を用い30°C, 7日後検出した.
- (13) Vitamin requirement. 基礎培地 (Glucose 10, Peptone 2, KCl 0.5, MgSO₄ 7H₂O 0.5, K₂HPO₄ 0.3, Dist. water 1000, Bacto. agar 20) に8種の B-Vitamins⁷⁾を加えたもの, B₁欠落, Biotin 欠落, B₁と Biotin のみ加えた4種の培地に孢子の食塩水懸濁液を接種, 30°C, 15~20日後比較した.
- (14) Sugar utilization. 培地 (Sugar 10, Casamino acid 2, KCl 0.5, MgSO₄ 7H₂O 0.5, K₂HPO₄ 0.3, Dist. water 1000, Bacto. agar 20, B-Vitamins) に孢子懸濁液を接種 30°C, 1ヶ月間斜面培養し対照と比較した. L-Rhamnose, L-Arabinose, Xylose を試験した.
- (15) Antibiotics. 放線菌を EMERSON's agar 平板に30°C, 15日間培養し, 集落側面の寒天を切取つて下記微生物の Bouillon agar の希釈平板上に置き阻止帯を観察した. *Asp. niger* ATCC 9642, *Pen. chrysogenum* IFO 4626, *Cand. krusei* Group II d-1 RIFY, *B. subtilis* IFO 3022, *E. coli* B1-1 (東大).

IV. 観察結果及び考察

(1) 気菌糸は Oatmeal agar-Y に培養した場合が最も良く形成され, 充分成熟した時はピンクを帯びた白色乃至はピンク色であつた. 基生菌糸は Oatmeal agar-P に培養する (30°C, 10~15日) と生育が良くその色調が強く現われて, 気生菌糸の生成は少ないので観察に適当と考えられた.

なお顕微鏡による形態観察の結果は供試株間で殆んど差異がみられなかつた.

(2) 紫色色素の結晶 (水不溶, エタノール, ベンゼン可溶) が大半の供試菌株によつて種々の寒天培地上若しくは寒天培地中に生成されるのが見られた. Fig. 4 はその拡大写真である. 多いものでは (Key, I-群) 基生菌糸はこの結晶によつて埋められ, 少ないものでも (Key, II-群) Oatmeal agar 上1ヶ月の斜面培養や, 平板培養検鏡の際などに確認され, 分類に利用できる特徴として考えられた. なお同様の色素結晶は *Streptosporangium* 属のある種でも生成されるのをみたが, 他の放線菌について観察した報告はみられないようである.

メラノイド色素の生成株はなかつたが, Oatmeal agar-Y を稍々暗色化するもの (Key, I-群) があり, また M-22はこの培地を褐色から帯暗緑色となし Oatmeal agar では Slate purple, 2~3ヶ月して堇色にした.

(3) 硝酸塩の還元性は結果が明瞭且つ安定で分類上重視できると考えられた. ゼラチン液化性は重要であるが方法(a)と(b)では結果が一致せず記載には(a)の結果を示した. また牛乳のペプトン化は確實安定化した性質とは考えられなかつた. なお澱粉を明らかに分解する株は4株に過ぎなかつた.

ビタミン要求性はN-源にペプトンを用いると生育良く且つビオチンの有無による基生菌糸の色の変化が明らかであつた (N-源にカザミノ酸を用いた場合のビオチン要求とは一致しない).

(4) 糖類の資化性は無機塩をN-源とする合成培地で供試株全体に適當なものがなかつたのでカザミノ酸を用い, 無糖培地より生育の良い場合を資化するとみなしたが, この培地では結果が不明の株もあつた.

抗菌性は若干の株が *E. coli* 又は *B. subtilis* に対して抗菌力を示し, またM-2の振盪培養濾液 (ペプトン欠 EMERSON 液体培地) は *C. krusei* を肉汁寒天上で可成強く抑制するが加糖培地ではその効果が認められなかつた.

V. 分類及び記載

試験の結果に基き, 供試22株を次の様に5種2変種に分類し, それぞれ標徴を記載した. この中1種を除き他は新種として命名し提案するものである. なお抗菌性及び糖類の資化性は別に Table 1 に表示した.

Key to the species of the genus *Microbispora*

I. Violet crystals abundant on oatmeal agar; no or very poor growth on glycerin agar.

A. Nitrites produced from nitrates.

1. *M. amethystogenes*

B. Nitrites not produced from nitrates.

1a. *M. amethystogenes* var. *nonreducans*

Ⅰ. Violet crystals little to trace, poor growth, on oatmeal agar; fair growth on glycerin agar.

2. *M. parva*

Ⅱ. No violet crystals on any medium; moderate growth on glycerin agar.

A. Soluble pigment dark yellowish gray to pale purple in oatmeal agar-Y*, pale violet in oatmeal agar.

3. *M. chromogenes*

B. Soluble pigment not produced or pale yellow in oatmeal agar-Y or oatmeal agar.

1. Starch hydrolysed.

4. *M. diastatica*

2. Starch not hydrolysed.

a. Nitrites produced from nitrates.

5. *M. rosea*

aa. Nitrites not produced from nitrates.

5a. *M. rosea* var. *nonnitritogenes*

* Y signifies that Bacto yeast extract was added to the medium.

1. *Microbispora amethystogenes* spec. nov.

Amethystogenes, referring to the "violet crystal producing" character.

Oatmeal agar (OA)-Y: Aerial mycelium pale pink to pink, scanty (M-9, 8) to abundant. Soluble pigment pale yellowish brown. Violet crystals abundant on the medium (or on the OA) after one month at 30°C. Oatmeal agar (OA)-P: Substratum growth flat, light brown to brownish gray, with scant aerial mycelia after 15 days. Starch agar (SA)-Y plate: Aerial mycelium pale pink to pink. Growth raised and the reverse brown to brown purple. Calcium carbonate dissolved. Glycerol asparagine agar (GAA)-Y plate: Growth very poor. Potato agar (PA): Growth wrinkled, dark brown, without aerial mycelium. Glycerin agar (GA): Growth very poor. Nutrient agar (NA): Growth usually very poor.

Spores oval or round, 1.3~1.6 μ . Aerial mycelia 0.5~0.7 μ wide.

Physiological properties: Melanoides not produced; starch not hydrolysed; milk peptonized slowly; nitrites produced from nitrates; thiamine required essentially and biotin secondarily, or slightly (M-18); gelatin liquified.

Six strains were studied; M-8, M-10, M-12, M-13, M-9, M-18.

2. *Microbispora amethystogenes* var. *nonreducans* var. nov.

Nonreducans, referring to the nitrate "not reducing" property.

The cultural and morphological characteristics of the variety are covered with the description of the species.

Nitrites not produced from nitrates.

Thiamine required essentially and biotin secondarily or scarcely (M-16,17).

Five strains were studied; M-11, M-14, M-15, M-16, M-17.

3. *Microbispora parva* spec. nov.

Parva, referring to the "feeble" growing on oatmeal agar.

OA-Y: Aerial mycelium white to pale pink. Soluble pigment faint pale yellow. Violet crystals may be trace. OA: Growth poor. Violet crystals present after one month at 30°C. OA-P: Substratum mycelium pale yellowish brown or pale light brown, poor, with scant aerial mycelia after 15 days. SA-Y plate: Aerial mycelium feeble, white to pinkish white. Substratum growth poor and the reverse white. Calcium carbonate not dissolved. GAA-Y plate: Growth moderate to fair, raised, brown. PA: Growth wrinkled, dark brown. GA: Growth good. Nutrient agar: Growth fair.

Spores oval or round, 1.3~1.6 μ . Aerial mycelia 0.5~0.7 μ wide.

Physiological properties : Melanoides not produced ; starch not hydrolysed ; gelatin attacked slightly ; milk not or very slowly peptonized ; nitrites not produced from nitrates ; thiamine required essentially and biotin secondarily.

Three strains were studied ; M-2, M-3, M-4.

4. *Microbispora chromogenes* spec. nov.

Chromogenes, referring to the soluble "pigment-producing" property,

OA-Y : Aerial mycelium distinct pink, abundant. Soluble pigment dark purplish gray (slate purple in OA). No violet crystals—after one month at 30°C. OA-P : Substratum mycelium orange after 15 days. SA-Y plate : Growth raised. The reverse dark orange. Calcium carbonate dissolved—after 15 days. GAA-Y plate : Growth raised, substratum brown. PA : Growth pale orange with pale pink aerial mycelia and pale yellow soluble pigment. GA : Growth fair. Later dark green soluble pigment. NA : Growth fair.

Spores oval or round, 1.3~1.6 μ . Aerial mycelia 0.5~0.7 μ wide.

Physiological properties : Melanoides not produced ; starch not hydrolysed ; gelatin liquified ; milk not peptonized ; nitrites produced from nitrates ; thiamine required essentially and biotin secondarily.

One strain was studied ; M-22

5. *Microbispora diastatica* spec. nov.

Diastatica, referring to the "starch hydrolyzing" property.

OA-Y : Aerial mycelium distinct pink, abundant. Soluble pigment pale yellow. No violet crystals.—after 15~30 days at 30°C. OA-P : Substratum mycelia pale yellowish brown covered entirely with pale pink aerial mycelia after 15 days. SA-Y plate : Growth raised with pink aerial mycelia. The reverse yellow orange. Calcium carbonate dissolved—after 15 days. GAA-P plate : Growth raised. Substratum mycelium pale yellow. GA : Growth good. NA : Growth very good without aerial mycelium.

Spores oval or round, 1.3~1.6 μ . Aerial mycelia 0.5~0.7 μ wide.

Physiological properties : Melanoides not produced ; starch hydrolysed ; gelatin liquified (M-5 slightly) ; milk peptonized slightly ; nitrites not produced from nitrates ; thiamine required essentially and biotin scarcely. Rhamnose utilized for the growth.

Three strains were studied ; M-5, M-6, M-21.

6. *Microbispora rosea* Nono. et oh. J. Ferm. Tech. (Japan), 35 (8), 306-311 (1957)

OA-Y : Aerial mycelium pale pink. Soluble pigment faint pale yellow. No violet crystals—after one month at 30°C. OA-P : Substratum growth orange after 15 days. SA-Y plate : Aerial mycelium white to pale pink. Substratum growth thin, then the reverse white. Calcium carbonate not dissolved—after 15 days. GAA-Y plate : Growth very poor, often moderate. PA : Growth wrinkled, brown. GA : Growth fair to good. NA : Growth fair.

Spores oval or round, 1.3~1.6 μ . Aerial mycelia 0.5~0.7 μ wide.

Physiological properties : Melanoides not produced ; starch not hydrolysed ; gelatin attacked slightly ; milk not peptonized ; nitrites produced from nitrates ; thiamine required essentially and biotin secondarily.

Three strains studied ; M-1, M-7, M-20. The last strain is the one described in the preceding paper.¹⁾²⁾

7. *Microbispora rosea* var. *nonnitritogenes* var. nov.

Nonnitritogenes, referring to the "nitrite not producing" property.

The cultural and morphological characteristics are covered with the description of the species.

Nitrites not produced from nitrates.

One strain was studied ; M-19.

Table 1. Antibiotic spectrum and sugar utilization.

<i>Microbispora</i>	Spec. No. 1						1a					2			3	4			5			5a
	M-8	9	10	12	13	18	11	14	15	16	17	2	3	4	22	1	7	20	5	6	21	19
<i>B. subtilis</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	+	+	+	+	+	±	-	+	±	+	-	+	-	-	-	-	±	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	±	±	-	-	±	-	+	+	+	-

要 旨

1. *Streptomycetaceae* 科 *Microbispora* 属の放線菌を独自の方法により各地の土壤から検出し、これらが広く普通に分布していることを明らかにした。

2. 分離した22株につき分類学的特性を研究し、5種及び2変種に分類し、その標徴を記載した。その中1種を除き他は新種及び新変種としてそれぞれを命名して提案するものである。

3. 供試菌株はいづれも形態上の差異は比較的少なく、生育にビタミンB₁が必須でありビオチンも必須又は副次的に要求すること、また大半の供試菌株は水不溶、ベンゼン可溶の紫色色素の結晶を種々の寒天培地に多量に生成することを知った。なお若干の供試菌種は抗菌性を示した。

文 献

- 1) 野々村, 小原: 本誌, **35**, 8 (1957).
- 2) 野々村, 小原: 山梨大醸酵研, No. 4, 11 (1957); No. 6, 77 (1959).
- 3) LECHEVALIER, M.P. and LECHEVALIER, H.: J. Gen. Microbiol., **17**, 104 (1957).
- 4) BALDACCI, E. and WAKSMAN, S.A. et al.: Protocol of the "Round Table Conference on Streptomyces" and the suggested plan in the common experiment proposed by the "Subcommittee on Streptomyces" on the occasion of the 7th Int. Congr. of Microbiol. Stockholm, 1958 (Mimeo).
- 5) BISSET, K.A.: HOCKENHULL's "Progress in the Industrial Microbiology", Vol. I. Heywood, London, 31-43 (1959).
- 6) Soc. Am. Bacteriologists: "Manual of Microbiological Methods", Biotech Pub., New York V, 12-14 (1954).
- 7) BALDACCI, E. et al.: Symposium, Actinomycetales, Morphology, Biology, and Systematics. 6th Int. Congr. Microbiol., Rome, 20-39 (1953).
- 8) SKINNER, C. et al.: "Molds, Yeasts, and Actinomycetes", 2 Ed., Wiley (New York) 59 (1951).

(昭和35, 4, 2受理)

土壤中に於ける放線菌の分布 (第5報)

Streptosporangium 属の分離及び分類

野々村 英夫, 小原 巖 (山梨大学工学部)

COUCH²⁾は孢子ノウを形成する放線菌として *Actinoplanaceae* 科 (1955) を設け、孢子に運動性のある *Actinoplanes* 属と運動性のない *Streptosporangium* 属に分類したが、後者の属ではまだ Type species 1種の記載以外報告を見ないようである。

著者らは前報¹⁾で *Microbispora* 属の分離法について述べたがその方法は本属 *Streptosporangium* 属にも選択的であることを知った。そこでその方法によりわが国各地の土壤について本属が普通に分布していることを確め、若干の分離株を選んで分類学的研究を行なつたので報告する。

I. 供 試 料

供試土壤の種類、本属 (及び *Microbispora* 属) が容易に検出された土壤 (+) 及び供試菌株を Table 1 に示した。なお供試菌株 S-14 は COUCH から分離された *S. roseum* の Type culture である。