本邦産土壤放射状菌の分類学的研究* II—1

升 本 修 三*

Shiuzo MASUMOTO: Taxonomic studies of soil *Actinomycetes* in Japan.

先に著者(1943)は本邦土壤から分離した放射状菌に就いて、その形態並に生理作用を調べ、放射状菌類分類上の準據となるべき諸性質に就いて若干の知見を得たが、その後引き続きその結果を参考にしつつ本邦産土壤放射状菌の分類を試みている。本報に於いては著者が分離した多数の放射状菌の中、外国産放射状菌の記載とほぼ完全に合致するもの4種を報告する。

種の同定に当つては、外国に於いて命名、記載された放射状菌の type culture と実地に比較対照する事ができなかつた爲、完備せる記載の具つた学名を採用する方針をとつた。

本研究の遂行に当り、懇篤な御指導を賜つた岸谷貞治郎教授 田中潔助教授、著者のため土壤試料を採取、又自ら分離せられた放射状菌を恵与された住吉匡氏、更に顕微鏡写真撮影に際して御尽力下さつた下斗米直昌教授及び橋本忠氏に衷心より感謝の意を表する。

培養条件及び実験方法

培養基: 種の同定に際して Krainsky (1914) 及び Waksman (1919) の原記載と比較する爲、まず最初はこれら両者が記載に際して用いた培養基と全く同じ処方のもを用いて試験したが、その後放射状菌の種々の特質を考慮してこれらの培養基の組成に若干の修正を加えたものを用いて記載し直した。下に著者が記載に用いた培養基の組成及び特質を記す。

1. 蔗糖寒天: 蔗糖(サツカロース、純品) 10g, NH_4Cl 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, NaCl 0.5g, CaCO_3 1g, 蒸溜水 1l, 寒天 15-20g, $\text{pH}=7.0$ 。以下の培養基は特に記入のない限りすべて pH を 7.0 に調整した。本培養基は Waksman のいわゆる Synthetic agar に著者が改良を加えたもので Waksman は之を主として放射状菌の顕微鏡的形態(殊に氣中菌糸の形態)の観察の爲に用いたが、著者は放射状菌の蔗糖利用力を試験することを主要な目的として本培養基を採用した。その爲に蔗糖は純品を用い、又窒素源としては放射状菌類にとつて硝酸塩より利用範囲の広いアンモニウム塩(第1報 114 ページ参照)を用いた。

2. グリセリン・アンモニウム寒天: グリセリン 10cc, クエン酸カルシウム 10g, NH_4Cl 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 蒸溜水 1l, 寒天 15-20g。本培養基は放射状菌の発育の結果その反応が酸性側に移り、形成された色素の酸性側に於ける色調が観察される特徴を有している。

3. グリセリン・硝酸寒天: グリセリン 10cc, NaNO_3 1g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 蒸溜水 1l, 寒天 15-20g。本培養基では前者と逆に形成された色素の塩基性側に於ける色調が観察される。

4. 葡萄糖寒天: 葡萄糖 10g, アスパラギン 0.5g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 蒸溜水 1l, 寒天 15-20g。本培養基は、Krainsky 及び Waksman の用いた培養基に少し改良を加えたものであつて、総べての放射状菌の発育に好適であり、菌株の保存に最も適している。

* 本研究費の一部は日本学術振興会補助金に負うている。本報告は昭和18年末広島文理科学科紀要(植物学)第5巻に投稿したものであるが、その後印刷不能となり第3報の後になつたものである。

5. 澱粉寒天：可溶性澱粉 10g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, NaCl 1g, CaCO_3 3g, 蒸溜水 1l, 寒天 15-20g. 本培養基は Waksman の処方通りであつて、アミラーゼの作用を試験するに用いる。そして又本培養基は気中菌糸の發育を促し、他のいずれの培養基に於いても殆ど気中菌糸を形成しない菌株も本培養基に於ては非常によく之を形成する。従つてかかる菌株に於いては菌株保存に必要な缺くべからざる培養基である。

6. ブイヨン寒天：ペプトン 10g, 肉エキス 5g, NaCl 5g, 蒸溜水 1l, 寒天 15-20g. 本培養基上に於ける放射状菌の發育は概ね一様であつて、種の特徴を示すことが少い。即ちこの培養基に於いて形成される色素は他の合成培養基に於けるように多様性を示さないし、又気中菌糸の發育は極めて不良で、たとえ生ずることがあつても種の特異性に乏しい。しかし分類上重要な褐色系水溶性色素形成の有無を試験するに必要な培養基である。

7. 馬鈴薯：馬鈴薯をコルク拔で棒状にくり抜き、一端を斜面にして試験管に入れる。本培養基上では上記褐色系水溶性色素の形成される場合はその色調が濃厚（殆ど黒色）顯著である。

8. ゼラチン：ゼラチン 150-200g, 蒸溜水 1l. 褐色系水溶性色素の形成並に溶出性蛋白質分解酵素の作用の強弱を試験する目的で使用する。

9. ラクムス牛乳：市販の牛乳にラクムスを加え中性とする。本培養基では發育状態のほかに、牛乳の凝固、透明化（ペプトン化）、牛乳の色の变化（褐色系色素形成の有無、並に酸又はアルカリの形成による反応の変化）等を試験する。

10. 葡萄糖ブイヨン：ブイヨンに葡萄糖 1% を加える。放射状菌の發育状態のほかに、葡萄糖より酸の形成の有無を試験するの用に用いる。

11. 蔗糖液：蔗糖寒天中寒天を除く培養液で蔗糖寒天と共に主として蔗糖利用力を検するの用に用いる。

12. チロシン寒天：グリセリン 10g, アスパラギン 0.5g, チロシン 0.5g, K_2HPO_4 1g, MgSO_4 0.5g, NaCl 0.5g, 蒸溜水 1l, 寒天 15-20g. 本培養基は放射状菌がチロシナーゼによつてチロシンから黒色乃至黒褐色の水溶性色素（所謂メラニン系色素）を形成するか否かを試験する爲に用いる。

培養温度：培養には総べて 30°C の定温器を用い、ゼラチンの場合にのみ 20°C で培養した。

培養期間：普通 10 日乃至 14 日間培養し、その間適時發育上の諸性質を記載した。

色素の記載：放射状菌によつて形成される色素は第1報 (111~112 頁) に述べたようになり変化に富むから、まず総称的な色名を掲げ、更にこまかい色名は和田三造編色名総鑑の色番号⁽¹⁾ に従う。47/86 はその色が 47 と 86 の中間色であり、60 dil. は 60 と同じ色調であるがこれより薄い事を表わす。

生理実験：諸種の生理作用を試験する爲に次のような方法を用いた。

1. 色素形成：ここに言う色素とは主として特殊な色素（恐らくメラニン系色素）を指している。先に著者 (1943, 107 頁) が定めた定義に従い、ゼラチンに於いて褐色系又は緑色これは前者と同一系統の色素であるが蛍光現象の爲、このように見えるのである）の水溶性色素を形成する菌株をクロモゲヌス類、然らざるものをアクロモゲヌス (*Achromogenus*)⁽²⁾ 類と呼ぶ。

上記のチロシン寒天を用いて培養試験を行うと、上の定義に於けるクロモゲヌス類の菌株は殆ど例外なくこの培養基を黒変させた。これに反してアクロモゲヌス類に属する菌株は一として培養基を黒変させたものはない。こうしてクロモゲヌス類とはチロシナーゼの作用を有する菌株類と考えて差支えない。これに関する詳細は別に報告する。

2. 炭素源の利用：基本液 (K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, NaCl 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, 蒸溜水 1l) に窒素源 NH_4NO_3 0.1%, 各種の炭素源 1% を加えた培養液と、更に寒天を加えた固体培養基を

(1) 色番号の前には No. を附けず、菌株番号の方には No. を附け、両者の混同を避けた。

(2) 第1報で非クロモゲヌス類と名づけたが、これをに新にアクロモゲヌス (*Achromogenus*) 類と呼ぶ。

用いた。第1報の結果を参考にして、比較試験の主要な対象としてはマンニット、蔗糖及び乳糖を選んだ。先に著者が(1943, 120 ページ) 蔗糖及び乳糖の利用に関する変異の一例を報告しておいたように、これらの炭素源利用に関する菌株の性質は絶対的なものではなく、変異を起すことがある。本報告中にもその例が若干ある。即ち *Actinomyces roseochromogenus* に属する菌株の大部分は乳糖利用力を殆ど欠いているが、No. 40 及び 68 は共に乳糖寒天に於いて二次的に乳糖利用力をもつ菌落を生じる(第4表)。而して他方同じ種に属すると考えられる No. 165 は分離し始めから乳糖利用力を分つていることは上の変異と

第1表 *A. violaceus-ruber* に属する諸菌株の性状

菌 株	(1)螺旋形成 (蔗糖寒天)	(2)炭 素 源 の 利 用			
		マンニット	蔗 糖	乳 糖	イヌリン
No. 2 (2-a)	卅*	+	+	+	±
39 (2-b)	+	+	+	+	±
2-c	+	+	+	+	±
44 (2 d)	卅	+	+	+	±
2-e	卅	+	+	+	±

(1) 卅:螺旋が多い。卅:かなり多い。+:少い。±:殆んどない。-:全くない。(2) 卅:發育極めて良好。卅:良好。+:弱い。±:極めて弱い。* 螺旋を全く形成しないことがある。

関連して興味深い。即ち上の事実から、かかる変異は人爲的のみでなく、天然に於いても起るのではないかという事が想像される。又同じ *Act. roseochromogenus* の中には乳糖の外に、蔗糖、マンニットに就いてもこれをよく利用する菌株と、これを利用し得ない菌株とが存在するが、著者は未だ本種に於いてこの両種の炭素源に関する菌落解離の現象には遭遇していない。更に *Act. viridochromogenus* に属する菌株の大部分は蔗糖を利用し得ないが、これをよく利用する菌株がある(第2表)。しかしこの場合にも著者はまだ菌落解離の現象を観察していない。

第2表 *A. viridochromogenus* に属する諸菌株の性状

菌 株	基 生 の 色 (グリセリン・ア ンモニウム寒天)	螺旋形成 (蔗糖寒天)	炭 素 源 の 利 用			
			マンニット	蔗 糖	乳 糖	イヌリン
No. 20 (20-a)	帶 紫 灰 色	卅	卅	±	卅	±
61 (20-b)	帶 紫 褐 色	卅	卅	±	卅	±
55 (20-c)	黄 褐 色	+	卅	±	卅	±
116 (20 d)*	帶綠薄墨色	卅	卅	±	卅	±
36 (20-e)	暗 褐 色	卅	卅	±	卅	±
85	褐 色	-	卅	+	卅	+
99	黄 色	卅(c)**	卅	卅	卅	卅

* 20-e, f, g, h, i, j, k の7菌株は 20-d と同じ。** 螺旋の形はコルク拔状。+は1表と同じ。

3. 糖類よりの酸形成：この実験に用いる培養基はクロモゲヌス類とアクロモゲヌス類とで異なり、後者ではアイオンに各種の糖類1%を加えた培養液を用いて試験したが前者ではアイオンを用いると褐色色素溶出の爲、pH指示薬の色調が認め難くなる故、この場合には基本液+尿素(0.1%)+糖液(1%)を用いて試験した。どの場合にもpH指示薬にはB.T.Bを用いた。

4. 蔗糖よりの還元糖形成：培養蔗糖液にフェーリング氏液を加えて加熱して還元糖を検した。

5. 硝酸よりの亜硝酸形成：培養液には主として、基本液+ NaNO_3 (0.1%)+葡萄糖を用いた。培養4—5日の被検液を酸性にし、之に新鮮な沃化カリウム濃粉液を加えて亜硝酸の検出を行つた。

6. 蓚酸形成：(基本液+ NH_4NO_3 (0.1%)+炭素源+寒天)に培養し、凡そ2週間後に基生の一部及びその周囲の寒天を採つて蓚酸カルシウムの結晶の有無を観察した。

7. 蛋白質分解作用：蛋白質分解の強度は一方ゼラチンの液化速度、液化範囲、液化部の透明度等と、他方牛乳のペプトン化(透明化)速度、範囲、透明度等から判定した。

8. 澱粉分解作用：澱粉寒天をシャーレ中に平板とし、これに接種後4—5日目にヨウ素・ヨウ化カリウム液を加えて、澱粉が加水分解された結果沃度反応の現われない部分の幅(聚落の縁辺と沃度反応の現われている境界線との幅)を測定した。澱粉分解の記載中の数値はこの幅をmmで表わしたものである。

9. 脂肪分解作用：融解したアイオン寒天に少量のバターを加え強く振盪して作つた脂肪の乳濁液をシャーレ中に入れて平板に凝固させ、これに接種し聚落の周囲が透明になつたものを陽性、そうでないものを陰性として表わした。

10. セルロース分解作用：Omeliansky氏液に濾紙片をつけて、これに接種し、濾紙の消化を見た。

種 の 記 載

本報告で発表する4種の放射状菌はどれも既に各国に於いて記載された種であるが、著者の用いた培養基は原記載に用いられている培養基とは少しく組成を異にし、かつ又著者の実験によつて若干補正された記載箇所もあるので、やや重複の嫌いはあるが、改めて全体に亘る記載を下に記すことにした。

1. *Actinomyces violaceus-ruber* Waksman & Curtis (1919, p. 160); Sny. *Act. violaceus* Waksman & Curtis (1916, p. 110); *Act. coelicolor* (Müller) Lieske (1921, p. 28); *Act. waksmanii* Bergey et al. (1930, p. 489); 又 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ed. V (1939, p. 867) によれば *Act. tricolor* Wollenweber も同種であるという。

分離菌株：No. 2 (2-a)山地, No. 39 (2-b)堆肥, No. 2-c 畑地, No. 44 (2-d)厩肥, No. 2-e 植木鉢の土, No. 2-f, No. 2-g, 畑地。分布：やや普通の土壤放射状菌である。形態(蔗糖寒天)：螺旋：多し。旋回緩し(open type)(第1及び第2図)稀に之を生じないことがある(第1表)。

分生子：短卵形, $1.0 \times 1.2\mu$ 。

培養所見：(主として No. 2-a に就いて)。

1. 蔗糖寒天：基生(基生菌叢)：発育は弱い裏面淡青色115又は116(5日), 後深青色117(15日)。気菌(気中菌叢)：白色僅かに青色を帯びる。後(15日)灰色を帯びるに至る。培養基の着色：他の培養基に於いては溶解性色素の形成が顯著であるが、本培養基に於いては発育不良の爲色素形成が弱く殆ど滲出せず、僅かに淡青色の色素が滲出することがある。

2. グリセリン・アンモニウム寒天：基生：初め(5日)赤橙色(49又は62), 後次第に紫色となり(15日), 遂に濃青色(115, 116, 117)となる。気菌：薄く, 粉狀。初め黄白色, 次第に灰汁色(33)となる。培養基の着色：色素は非常に拡散しやすい。初めピンク(60又は69), 次第に赤紫色, 次いで青紫色, 最後に培養基全体が濃青色(115, 116, 117)となる。

3. グリセリン・硝酸寒天：概ね前者と異なるところがない。只色素の滲出は最初より青色で, 次第に濃厚となる。気菌は白色, 青色を帯びる。

4. 葡萄糖寒天：前者と大差がない。
5. 澱粉寒天：基生：ピンクより赤色に移り、次第に赤紫色（89又は93）となる。気菌：初め白色、後灰褐色（33に近い）。滲色：ピンク、後少しく青みを帯びる（79に近い）。
6. ブイヨン寒天：基生：初めクリーム色、後次第に朱色（63又は59）となり、更に青色となる菌株（No. 2-a）がある。これに反して No. 2-b, No. 2 d は赤色の儘で青色とならない。気菌：ごく僅かに生ずるか、或は全く生じない白色。培養基の着色：青色。
7. 馬鈴薯：基生：赤色後青色。気菌：白色後灰白色、青みを帯びる。培養基の着色：濃青色。
8. ゼラチン：基生：裏面青色。気菌：僅かに生じ、白色。培養基の着色：なし。液化：中等の強度。
9. ラクムス牛乳：発育：表面に浮び菌膜を形成する。青色、次第に濃青色となる。牛乳の色：ラクムスは褐色し、土色となるが、次第に青色を帯びた暗色に変る。牛乳の凝固：認められない。透明化：中等の強度。
10. 葡萄糖ブイヨン：発育：一部は浮き、一部は沈んで発育する。前者は液面に於いて薄き皮膜を形成し、裏面赤色を呈する。培養基の着色：なし（15日）。
11. 蔗糖液：発育：微弱。雪片状、液中に散在する。培養基の着色：なし。
- 生理作用：**1. 色素形成：総べての菌株はブイヨン寒天並にゼラチンに於いて褐色系水溶性色素を形成せず、又チロシン寒天に於いては青色色素を形成するが、黒色色素を形成しない。即ち本種はチロシナーゼ陰性である。
2. 炭素源の利用：蔗糖、乳糖、マソニットを利用し、イヌリンは殆ど利用し得ない。（第1表参照）
3. 糖類よりの酸形成（No. 2-a に就いて）：

糖 類	葡萄糖	果 糖	ガラクトース	乳 糖	蔗 糖	麦芽糖
酸形成	+	±	—	—	—	—

4. 蔗糖よりの還元糖形成（No. 2-a）：概ね常に陰性。
5. 硝酸よりの亜硝酸形成（No. 2 a）：非常に著しい。
6. 脛酸形成（No. 2-a）：蔗糖、葡萄糖、醋酸フマル酸、コハク酸、クエン酸、グリセリン、グリコール、グリコール酸、蟻酸のどれからも脛酸を形成しない。
7. 蛋白質分解（No. 2-a）：ゼラチン、牛乳共に中等の強度。
8. 澱粉分解（No. 2-a）、弱い。2 mm
9. 脂肪分解（No. 2-a）：陰性。
10. セルロース分解（No. 2-a）：陰性（30日）

特徴：本種はチロシナーゼ陰性にして、種々の人工並に自然培養基に於いて、その時の培養基の反応に応じて赤色、紫色乃至青色（多くの場合赤色及び紫色は培養が古くなるに従つて青色に移る）の水溶性色素を形成し、培養基全体を着色せしめるところの極めて特徴ある種である。

II. *Actinomyces viridochromogenus* Waksman (1919, p. 163); Syn. *Act. viridochromogenes* Krainsky (1914, p. 684); 又 Baldacci (1939) によれば *Act. (Streptothrix) viridis* で Lombardo-Pellegrino (1903) も之と同種なりという。

分離菌株：No. 20 (2-a), No. 61 (2-b), No. 55 (2-c), No. 116 (2-d), No. 137 (2-e) No. 140 (2-f), No. 20-g, No. 20-h, No. 20-i, No. 20-j, No. 20-k, No. 36 (2-l), No. 85, No. 99 等。どれも畑地産。

分布：各地の畑地に最も普通の種である。形態（蔗糖寒天）：螺旋：多数。旋回は緩い。（第3, 第4図）。但し No. 99 は旋回緊密でコルク栓拔状（Cork screw type）となる（第5図）。又 No. 85 は螺旋

形成がない。分生子：球形 ($0.75-1.0\mu$)，乃至短卵形 ($0.75-0.9 \times 0.95-1.5\mu$)。

培養所見 (主として No. 20-a に就いて)：1. 蔗糖寒天：基生：發育微弱にして寒天表面上菌苔の發育がなく，粉狀の氣菌を薄く生ずる。(粉狀發育)。但し No. 20-d は發育良好で，寒天表面上に厚い菌苔(裏面黃色)を生ずる。氣菌：薄く，粉狀，綠青色 (140)。培養基の着色：なし。

2. グリセリン・アンモニウム寒天：基生：裏面は綠色を帯びる。一部薄墨色となる。No. 20-b では暗紫褐色 47/86 (3 日)；又 No. 20-d では黃色 6/15 (3 日)。(第 2 表参照)。氣菌：速かに生じ，基生全面を厚く被う。表面多孔質，その孔より無色液粒を分泌する。氣菌の色は特徴ある綠青色 (140)，青微の胞子の色にやや似る。培養基の着色：薄墨色が僅かに拡散する。No. 20-b, 20 d ではそれぞれ基生の色と同色で僅かに滲出する。

3. グリセリン・硝酸寒天：上と異るところがない。

4. 葡萄糖寒天：概ね前者と異るところがない。ただ基生裏面の色が一層黒くなる。

5. 澱粉寒天：基生：裏面暗綠色 (145)。氣菌：多量，色は前に同じ (140)。培養基の着色：なし。

6. ブイヨシ寒天：基生：黃質，後オリーブ色 氣菌：ごく薄く生ずる。基生に密着して白金耳以つて採り難い。白色，綠色を帯びることがある。培養基の着色：褐色乃至濃褐色。

7. 馬鈴薯：氣菌：厚く多量，綠青色を帯びる灰色。培養基の着色：暗黒色，後殆ど黒色。

8. ゼラチン：發育：氣菌を僅かに生ずる。白色後灰白色。培養基の着色：濃褐色乃至殆ど黒色。液化：弱い。液化した部分は粘稠である。

9. ラクムス牛乳・發育：暗褐色後チョコレート色の厚い菌膜を生ずる。牛乳の色：初め青色を帯びた暗褐色となり，後次第に黒褐色となる。牛乳の凝固：認められない。透明化：強度中等，牛乳半透明となる。

10. 葡萄糖ブイヨン：發育：液面に厚い菌膜を生ずる。暗綠色。培養基の着色：褐色後暗褐色。

11. 蔗糖液：發育：極めて微弱で，液中に雪片狀に發育する。全く発しないことがある。

生理作用：1. 色素形成：総ての菌株はブイヨン寒天並にゼラチンに於いて濃褐色色素を分泌する。但しチロシン寒天上のチロシナーゼ反応は微弱である。

2. 炭素源の利用 (第 2 表参照)：どの菌株もマンニット及び乳糖を良く利用する。大部分の菌株は蔗糖及びイヌリンを殆ど利用しない。但し No. 85 及び No. 99 は蔗糖及びイヌリンを利用する。

3. 糖類よりの酸形成 (No. 20-a)：葡萄糖・尿素液に於いて陰性。

4. 蔗糖よりの還元糖形成 (No. 20-a)：陰性。

5. 硝酸よりの亜硝酸形成 (No. 20-a)：結果不定。

6. 蓚酸形成 (No. 20-a)：蔗糖，葡萄糖，醋酸，フマル酸，コハク酸，グリセリン，グリコール，グリコール酸，蟻酸から蓚酸を形成しない。

7. 蛋白質分解 (No. 20-a)：ゼラチン，牛乳に於いては共に弱い。

8. 澱粉分解：No. 20, 36 は弱い (1-2mm)：No. 85, 99 はやや強い (4-6mm)。

9. 脂肪分解 (No. 20-a)：陽性，強度中等。

10. 纖維素分解：陰性。

特徴：本種はいわゆるクロモゲヌス型に属するが，チロシナーゼ反応は顯著でなく種々の培養基上，特有な綠青色 (ややアオカビの胞子の色に似る) の氣中菌糸を生ずる極めて特徴のある種である。