ある細菌が尿中に繁殖してリグニンを赤くする現象に就て

(第5報) L.R. 菌と藍インデカン分解細菌との関係

原 田 篤 也

(大阪大学農学部研究所)

昭和 23 年 9 月 25 日受理

On a New Bacterium which makes Lignin Red in Urine

Part V. The Relation between the L.R. Bacterium
and the A. I. Bacterium.

by

Tokuya HARADA

(Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

緒 論

L.R. 菌が藍インデカンを分解することは前報¹⁾で述べたが、尿インデカン²⁾を分解する菌が藍インデカン³⁾を分解しても藍インデカン⁴⁾を分解する菌が尿インデカン⁵⁾を分解するかどうかは不明である。依つて先ず藍浸出液を用いて最も容易に得られるインデカン分解細菌を分離した。そして此の分離菌は尿インデカン⁶⁾を分解しないことを明にした。

かねて尿中で L.R. 菌が繁殖すると検微鏡下に生成色素に染色された菌様のものを観察したが、藍浸出液培養基中に L.R. 菌が繁殖しても又藍インデカン分解細菌が繁殖しても同様な形態のものを生ずることを見出した。そしてこの形は細菌に直接観察するものでないことを明にした。

実 験

I. 藍インデカン分解細菌の分離。

藍インデカン⁷⁾を分解する細菌として⁸⁾古く *Bacillus lactic aerogenes*, *Bacillus indigogenus* が知られている。藍インデカン⁹⁾を分解する藍植物¹⁰⁾中の酵素は indemulsin と呼ばれ、此の酵素と emulsin との比較研究がなされて居り、それによると emulsin は藍インデカン¹¹⁾を徐々に分解するが藍植物¹²⁾の酵素試料に比して遙に弱い。併しながら細菌の生ずる藍インデカン¹³⁾分解酵素の性質に就いては研究されていない。

菌の分離法。分離培養液として藍浸出液 (pH 6) を調整し、2% に豚尿を加えたものを同量培養基とした。液體培養基 20 cc に約 0.5 g の畑土¹⁴⁾を加えると、始め淡黄色の培養液は 1 日で著しく青藍色になる。粗培養を 2 回繰返し然る後扁平培養を行うと直径 2~3 mm 程度の生成色素に染色された青藍色の聚落¹⁵⁾が得られる。純粋分離菌は中性肉汁¹⁶⁾寒天に斜面培養をなし保存した。

II. 該菌 (便宜上藍に因み A.I. 菌と稱する) の性質。

A.I. 菌は $0.5\sim0.8\mu\times1.0\sim1.5\mu$ 程度の短桿菌で孤立或は 2 個連鎖¹⁷⁾のものが多く鈍圓の端部を有し、グラム染色は陽性で孢子を生産しない。KOSER の Citrate 培地によく生育し枸橼酸¹⁸⁾を旺盛に分解し、枸橼酸 1% 培養基より再加枸橼酸¹⁹⁾に對し約 50% の揮發酸²⁰⁾を生成する。メチルレッド試験²¹⁾土、ハーゲス-ブロスカフウェル試験²²⁾陽性、肉汁寒天培養基は白色、肥厚性、平滑、光澤があり、肉汁培養では全體がよく潤滑し表面に薄い被膜を生ずる。ゼラチンの液化なくインドールを生産しない。硝酸鹽をよく還元し亜硝酸にする。葡萄糖、乳糖、麦芽糖、グリセリン、 α -メチルグルコシッドより酸及びガスを發生するがズルシット²³⁾は分解しない。實驗方法は多田氏の *coli-aerogenes* 細菌の分類學的研究に準據する。

以上の性質より多田氏の分類²⁴⁾によれば *Aerobacter oxytoca* に類似するが暗ズルシット²⁵⁾を分解しない點で異なる。BERGY の分類²⁶⁾では *Aerobacter aerogenes* に屬するが多田氏の枸橼酸代謝の意義を分類上より重視し A.I. 菌は *Aerogenes oxytoca* の變種と見做す。なおハーゲス-ブロスカフウェル試験の陽性のもの

はメチルレッド試験が陰性であることは一般に認められているが、A.I. 菌はホーグス・ブロッカウエル試験が明に陽性であるのにメチルレッド試験が葡萄糖では不顕性であり乳糖では明に陽性を示している。多田氏の研究では *Aerobacter* の中で *Aerobacter oxytoca* のみがメチルレッド試験が乳糖では不顕性ながら出て居り葡萄糖では陰性を示している。

III. L.R. 菌, A.I. 菌, 尿素分解細菌, 腸内乳酸球菌と尿インデカンとの關係。

A.I. 菌が尿インデカン分解するか否かを数種の細菌を比較対照して試験した。尿素分解細菌は *Staphylococcus ureae* で東大坂口研究室より分離されたもの、腸内乳酸球菌は L. R. 菌の類似細菌として著者が新鮮人糞中より分離したもの（なお L. R. 菌と腸内乳酸球菌との類似性に就いては後に報告する）。

培養基は 1/4 に濃縮した尿にアンモニア水を加え調整したもの、デフェニルアミンの硫酸溶液は亜硝酸及び硝酸の検出に用いられ前者の呈色は後者の約 5 倍強くあらわれる。亜硝酸の検出は沃度加里溶液と硫酸とを加えて得られる沃度を澱粉で検出した。尿インデカンの呈色を行うのに亜硝酸を含んだ腐敗尿ではオーベルマイヤ試験（鹽化第二鉄を含んだ濃硫酸）は陰性を示すことを既に竹内氏が報じ、亜硝酸含有尿では酸化剤として沃度沃度加里、臭素加里を含む竹内氏試薬を用いるのがよく、こゝでは JOLLES 氏法を改良した竹内氏の方法²⁾を用いた。著者のインデカン反応はパラメチルアミノベンズアルデヒド濃硫酸溶液 5 滴を 5cc. の尿に加え数分間煮沸後アルカリ性にして得られる赤色色素の生産強度をしらべる方法である。

6 日間 37°C で培養したものにつき試験した。対照の菌無添加のものも同様に放置した。アルカリ性の強い培養液を (a)、弱いのを (b) とした。アルカリ度は 10 cc の培養液を中和するに要する N/10 硫酸の滴定 cc 数である。

Decomposition of urine-Indican in human urine.

		L. R.		A. I.		<i>Staphylococcus ureae</i>		Intestinal streptococcus		Control	
Culture-medium		a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
pH		9.4	8.4	>9.6	8.6	>9.6	>9.6	>9.6	8.4	>9.6	8.8
Alkalinity		5.0	3.5	5.8	4.7	20.0	15.2	5.3	3.7	6.8	5.5
Turbidity		+	+	-	+	+	+	±	+	-	-
Detection of nitrite		-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
Diphenylamine		-	-	±	±	±	±	±	±	-	-
Intensity of coloration of urine-indican	Author's method	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	OSBOMAYER's method	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	JOLLES, TAKEUCHI's method	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

すべての菌は尿中でよく繁殖するが常法によるリグニンの赤色呈色は L. R. 菌のみに限る。尿素分解菌のみが尿を強くアルカリ性にしてウレアーゼの強いことがわかる。デフェニルアミンの±は 200 倍に稀してもなほ識別され、亜硝酸の検出の±は 1000 倍でもみられ、従つて A. I. 菌は硝酸を亜硝酸に還元する能力の大きいことがわかる。竹内氏が腐敗尿に亜硝酸が生成されていることを報じているが、かゝる A. I. 菌の如き *coli-aerogenes* 属菌が繁殖して生成するものと考えられる。インデカン反応の著者の方法で±とあるのは 100 倍に稀してもなお色の識別できるものである。オーベルマイヤ試験、ジョレス竹内氏法に依る呈色の+はすべて対照の無菌の培養液の呈色と殆ど差がみられない。著者の方法とオーベルマイヤ試験では L. R. 菌, A. I. 菌が移植のものでは陰性を示し、竹内氏の改良法では A. I. 菌移植のものは陽性を示し、前の二方法では亜硝酸が尿インデカンの呈色をさまたげていると推定される。実際に新鮮尿に亜硝酸菌達を 0.026% 以上加えれば全く呈色しない。

以上によつて A. I. 菌は尿インデカン分解するが尿インデカンを分解しないことが判明した。尚ほ尿インデカンの分解では A. I. 菌が略 pH 9 以下酸性に近い方でよく分解するのに対して、L. R. 菌は pH 8~9 以上のアルカリ性の方でよく分解する。

IV. 生成色素の形に就いて。

尿インデカン、藍インデカンが分解、酸化に依つて得られたインデゴ、インデルーピンがいかなる形で培養基中に含まれるか。両者は水に不溶性である爲長く放置すると器底に沈澱する。此の沈澱を顕微鏡で観察すると染色物質の不定形なものの中に小さいものは直径 1μ 、大きいものは直径 10μ 程度の形の整つた球形の2個近隣の形のもの（時には短桿状を示す）が藍色に染色されてみられる。L.R. 菌の尿培養液も藍浸出液の培養液も略同様にみられ、A.I. 菌の藍浸出液培養でも精形が崩れるが略同様な形がみられた。この形態が菌に直接関係するものか否かを確かめる爲に藍浸出液の固體培養基に L.R. 菌或は A.I. 菌を斜面培養して数天の中に形成された色素を顕微鏡でしらべた。表面に近い寒天層は藍色を示し、やや深い部分に赤色層がみられる。そこで菌の繁殖していない藍色部及び赤色部を菌の混じらないように注意して夫々取出し検鏡すると藍色部には上記の如き特異な形態の染色物質がみられ、赤色部には針状乃至桿状の染色物質がみられた。これに依つて特異な染色形態は菌に直接関係するものでないことが判明した。尿及藍浸出液の培養基に共に生ずる事は培養基組成の特殊な物質が関係するものではないことを示す。

結局球形の2個近隣のものはインデゴそのものであり、針形ものはインデルーピンそのものと考えらる。

結 論

- (1) 藍インデカンを分解する細菌を土壤中より分離し、該菌は *Aerobacter oxytocum* の1變種であることを認め、假に A.I. 菌と命名した。
- (2) 該菌は尿インデカンを分解しないが尿中でよく繁殖し亜硝酸を著しく生産する。
- (3) 腸内乳酸球菌は尿中でよく繁殖するが尿インデカンを分解しない。
- (4) 培養基中で L.R. 菌或は A.I. 菌に依つて生成されたインデゴは特異な形態を示す。

- (1) HARADA *Memoirs of the Inst. of Scient. Indust. Research, Osaka Univ.*, Vol. VI, 79 (1948)
- (2) 服部静夫 植物色素, 486 (昭 31)
- (3) 鈴木操太郎: 植物生理化学, 593 (昭 15)
- (4) E. F. ARMSTRONG and K. F. ARMSTRONG: *The glucoside*, 75 (1931)
- (5) 多田清次 農化, 18, 1047 (昭 17)
- (6) 多田清次: 農化, 18, 1131 (昭 17)
- (7) 竹内廣太郎: 東京衛生会雑誌, 31, 1199 (大 6)
- (8) 須藤憲三 野田的微量測定法, 90

Summary

As reported previously, the L.R. bacterium decomposes not only urine-indican, but also indican, namely glucoside of indoxyl. A bacterium, which hydrolyses plant indican into indoxyl and glucose, was isolated by the author from soil, and it was found that this bacterium did not decompose urine-indican in human urine.

It was decided from microscopic and biological studies that the bacterium is a new variety of *Aerobacter oxytocum*, and was named, for the time being, the A.I. bacterium.

培 養 基 中 の 染 色 形 態

I. L.R. 菌加アンモニア調整尿
6日間培養 750 倍

II. L.R. 菌アルカリ性藍浸出液
6日間培養 750 倍

III. A.I. 菌 藍 浸 出 液
6日間培養 750 倍

IV. A.I. 菌肉汁培養基
3日間培養 600 倍

I. II. III. は何れも染色法を施さない。