新ブタノール生産嫌気性窒素固定菌*

Clostridium aurantiacum, nov. spec.

須藤恒二, 倉島健次, 難波康之祐**, 松木 翠, 古坂澄石**

(東北大学農学部, ** 東北大学農学研究所)

昭和 34 年 6 月 27 日 受理

我々は 1956 年および 1957 年の夏低温硝子室内の水稲を植えたポット土壌中の *Clostridium pasteurianum* 型の嫌気性窒素固定菌の推移を稀釈法により半定量的に調査した。その際兩年共夫々 1 回宛, 即ち 1956 年には 27° の定温硝子室のポット土壌から 7 月下旬に, 1957 年には 23° の土壌から 9 月上旬に赤橙色の沈渣を示す菌株が得られ, その他の場合即ち 17° の硝子室又は自然温度の硝子室及び 23° 又は 27° の硝子室の他の時期に採取した土壌からは何れも外見上特別な様相を呈する菌株は得られなかった。上の両種の菌株はいずれも醗酵するがその開始は遅く, 赤橙色の head 及び沈渣を生じ古くなると褐色に変じた。結合態の窒素を含み窒素気流中の培地に 10 代に亘って移植が可能であるから明かに窒素固定菌であるが, 醗酵生産物として著量のブタノールを集積するので菌株の性質を検討し, 新種と推量し得る結果を得たので報告する。

方 法

培 地

a) Starkey の培地⁽¹⁾: glucose 20 g, K₂HPO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.2 g, CaCl₂·2H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 0.025 g, Na₂MoO₄ 0.0005 g, Na₂WO₄ 0.0005 g, MnSO₄ 0.0005 g, H₂O 1 l.

b) *Cl. pasteurianum* 用の培地⁽²⁾: glucose 20 g, K₂HPO₄ 0.8 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄ 痕跡, 水道水 1 l, pH 7.0.

c) Davies の培地⁽³⁾: glucose 20 g, ペプトン 0.25 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, MnSO₄ 0.01 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, NaCl 0.01 g, asparagine 1.0 g, H₂O 1 l, pH 7.0.

d) 玉蜀黍培地: 玉蜀黍砕粉 50 g, 水道水 1 l.

a), b), c) の培地は 15 封度 10 分加圧滅菌し, d) は 30 封度 30 分滅菌した。

特別な組成の培地については実験結果の項で述べる。

培養法: 大量の場合を除き試験管を用いた。試験管は硝子管付ゴム栓を付け, 硝子管は Hoffmann ピンコック付の肉厚ゴム管を付け減圧又は精製窒素ガス置換を可能にしている。この試験管に 5~10 ml の培地を入れ滅菌後 0.1~1 ml の前培養を接種し, 脱気又は精製窒素ガス置換を行い 30° 又は 37° で静置培養を行った。

結 果

1. 菌株の分離 普通及び定温硝子室内の稲を植えた堪水ポットの根圏に滅菌太口の注射管をさし込み, 土壌を吸い上げその 5 ml を 45 ml の滅菌水道水に懸濁し常法により均一な懸濁液が得られるようにする。これを順次 10 倍宛稀釈しその稀釈液 1 ml を Starkey 培地 5 ml に入れ窒素ガス気相で 30° で培養する。下に示す時期以外は全部着色せぬ培養が得られたが, 1956 年 7 月下旬及び 1957 年 9 月上旬に夫々 27° 及び 23° の定温硝子室のポット湛水土壌よりその 10³ 倍及び 10⁴ 倍の稀釈液からのみ赤橙色の沈渣を生じ, 上澄が黄橙色に色付き

古くなると褐変する培養が得られた。

第 1 表 黄橙色嫌気性窒素固定菌の生産物

培 地	糖		アセ トン	ブタノ ール	エタノ ール	酪酸	醋酸	pH	1956 年の菌株は Starkey 培地で 1~2 月毎に移植を行うことにより 1957 年 8 月迄保存し得たが, その後発育し得なく
	前	後							
Davies	21.5	2.6	0.17	5.27	1.52	0.03	0.08	5.6	1956 年の菌株は Starkey 培地で 1~2 月毎に移植を行うことにより 1957 年 8 月迄保存し得たが, その後発育し得なく
Davies (含肝片)	20.0	1.7	0.1	5.24	1.41	0.41	0.09	4.6	
Starkey (含炭酸石灰)	20.0		0.1	6.45	2.25	0.61	0.13		

分析法 糖: Somogyi 法, Acetone: 微量拡散法, アルコール: Johnson 法, 酸: 蒸溜法

* A New Butanol Producing Anaerobic Nitrogen Fixer, *Clostridium aurantiacum*, nov. spec..

By Tsuneji SUTO, Kenji KURASHIMA, Yasunosuke NAMBA**, Midori MATSUKI and Chôseki FURUSAKA** (Faculty of Agriculture and ** Institute for Agricultural Research, Tohoku Univ., Sendai)

第1図 馬鈴薯斜面
24 時間, クリスタルバイオレット染色

第2図 含ペプトン Starkey 培地
48 時間, クリスタルバイオレット染色

なった。この間 10 代であるので窒素固定性のあることは明かである。1957 年 3 月に生産物の分析を行って第 1 表のような成績を得た。

これによるとこの菌の主要な醗酵生産物はブタノールであり、エタノールは此に次ぎ、アセトン、揮発酸は微量であり、検鏡によりクロストリジウムを認め得た。更に 1957 年得た菌株についても同様の検索を行い、同様の結果を得たので以後に述べる成績はすべて 1957 年得た菌株について得たものである。

この菌株は Starkey の培地では極めて誘導期が長く、普通 4~5 日、時としては 20 日以上に亘ることがある。併し生育を開始すると比較的短時間内に即ち 48~72 時間で生育を完了する。ペプトンのような窒素物を与えると誘導期は著しく短縮される。又ペプトン生育菌を無窒素培地に戻しても生育が見られるので、純化はペプトン 0.3% 含有 Starkey 培地を用い変形 Weinberg 管又は嫌気性平板を用いて培養し、集落を形成させて行い、その後の同定に供した。

2. 顕微鏡による所見 ペプトン含有 Starkey 培地に 30° で培養して得た菌を顕微鏡下に観察して得た結果は次の通りである。24 時間以内の幼若の菌は円端の桿菌であり、 $1\sim2\times5\sim6\mu$ の大きさをもっている。通常は単独であるが時として 2 又はそれ以上連鎖状をなしていることがある (第 1 図)。24 時間を過ぎる

頃より紡錘状に変じた細胞が出現する。この時期迄活潑に運動する。そして一端にクリスタル紫で特に強く染色される顆粒を生じ、後にこの部位に胞子が見られる (第 2 図)。胞子は $1.5\times2.0\mu$ の大きさの楕円体で端部又はそれに近い所に位置する。この胞子は 100°, 1 分間の耐熱性がある。

西沢・菅原法で染色すると周鞭毛が認められる。グラム染色は陽性である。沃度によっては紫褐色に染まりグラニューロズ陽性とは認め難い。

3. 各種培地上の生育

a) 無窒素培地：分子状窒素を窒素源とする時はさきに述べたように著しく長い誘導期の後に試験管底が赤橙色に広く薄く色付き、その後赤橙色の気泡を含んだ粘質塊が上部に浮く。それと共に管底約 1/5 に粘質の層を生じ中層はやや濁り振ると発泡する。生育終了後は中層は清澄になり発泡はないが外見上の大きい変化はない。栓を取ると著しいブタノール臭がする。これらの所見は以下の培地に共通する。

b) 含ペプトン Starkey 培地：この培地では誘導剤は著しく短縮され、24 時間後には激しく発泡し、気泡を含む赤橙色の粘質塊が泡上し下部にも蓄積する。液は赤橙色にうすく色付く。古くなると褐変する。

同じ組成の寒天平板上の集落は卓子状で表面及び周縁は平滑であって粘質物は認められない。寒天中の集落は突起のある楕円体又は球であって色はいずれも黄橙色である。

c) Davies の培地：外観は上記の培地と変りがない。この培地で 5~6 代移植すると 24 時間前後で培地に絹糸様混濁は認められるが、その後の生育が認められなくなる。この時検鏡すると上記と同様の桿菌が認められる。併しこの桿菌はクリスタル紫で染まり難く、菌体中に点々と少々染まり易い顆粒が認められる。このような退化は 37° 培養で著しいが合成培地では早かれ遅かれつねにおこる。

d) 普通ブイヨン：全く生育が認められない。

e) 玉蜀黍培地：24 時間で極めて旺盛な醗酵を行い、72 時間前後で終える。培地は鮮明な黄橙色になる。この培地に数代移植すると漸次着色は薄くなり、遂には発色がなくなり醗酵能も減少する。この時ペプトン Starkey 培地に移植すると白色の粘液を生ずる菌株が得られる。このような培養から変形 Weinberg 管で分離を試みると白色の集落の菌のみが得られる。形態その他の諸性質は原株と極めてよく似ている。併しこの株を馬鈴薯斜で継代すると黄変することがあるので白色株は黄色株の一時的な変異株であるのか、ほぼ性質を同じくし色素

生産性のみ異なる両株の混合株がその時々により優劣を生ずるのかは尚検討を要する。併し現在まで他の培地に継代してこのように白色株への移行の認められたことはない。

f) 馬鈴薯斜面： 劃線培養を行っても一面に広がり、旺盛な繁殖を示し、鮮明な赤橙色に色付く。表面に粘質物を生ぜず、隆起しない。管底の凝縮水は赤橙色で粘稠となる。馬鈴薯は小塊にくずれることはない。

g) リトマス牛乳： 発泡はおこらないが3日目にカゼインが塊状に凝固し乳精部と分け、リトマスは還元を受け、カゼイン塊は黄橙色に着色する。ペプトン化は起らない。グルコース添加牛乳では旺盛に発泡するが、醗酵後の外観は上記と同じである。

h) 凝固卵白： Starkey 培地に熱凝固させた卵白片を入れ接種すると旺盛な生育を示す。菌は主として卵白上で生育し沈渣は殆ど生じない。卵白は赤褐色に強く着色し、著しく収縮するがくずれることはない。

i) ゲラチン培地： 20% ゲラチン添加 Starkey 培地の上部に接種し、室温に放置すると上部より極めて徐々に液化する。菌体及び培地は着色せず菌体量は少い。この菌体量の少いことは各培養を通じてこの菌株の著しい特徴の一つである。

30° にしてゲラチンをゾル化して培養すると3日後には完全に液化する。この時外見は上に述べた点と同様である。

4. 生理的性質

a) 炭素源に対する醗酵性及び資化性： Starkey 培地のグルコースをそれぞれ試験すべき炭素物に変え、0.3% ペプトンを加え培地を調製した。但し澱粉及びグリコーゲンはそれぞれ 1%、ペクチン、有機酸塩、アルコール、アセトンは 0.5% の濃度とした。5日間観察を行いその後分析に供した。結果は第2表に窒素物の資化試験とまとめてある。表から明らかなように五炭糖及び乳糖、纖維素、グリセロール、アルコール、有機酸類等を醗酵資化しない。多くの糖と共にマンニトールを醗酵することが注目される。生育すると必ず赤橙色の色素、粘質物を生ずる。

醗酵生産物としてブタノール、エタノールを認め得るがこの分析結果の一部は下記するが詳細は別報にゆずる。

第2表 各種炭素源及び窒素源に於ける生育

単 糖 類	生 育	多 糖 類	生 育	そ の 他	生 育	窒 素 物	生 育
キシロース	—	麦芽糖	++	マンニトール	++	硫 安	+
アラビノース	—	乳糖	—	グリセロール	—	硝酸ソーダ	+
グルコース	++	蔗糖	++	エタノール	—	亜硝酸ソーダ	—
果糖	++	ラフィノース	+	アセトン	—	カザミノ酸	++
マンノース	++	澱粉	++	醋 酸	—	カゼイン	++
ガラクトース	+	グリコーゲン	++	乳 酸	—	ペプトン	++
ラムノース	—	イヌリン	++	こはく酸	—	尿 素	++
		ペクチン	±			分子状窒素	+
		寒 天	—				
		纖 維 素	—				

* 炭素物試験の窒素源はペプトン、窒素物試験の時の炭素源はグルコース

b) 窒素源の資化性： Starkey 培地に窒素として 30 mg% となるようにそれぞれ各種の窒素物を加えて培地を調製した。成績は第2表に示してあるように亜硝酸を除いては資化される。無機の窒素物より有機の窒素物の方が資化され易いのは好気性の窒素固定菌である *Azotobacter* は無機の窒素物のあるものをよく資化し得るが、有機態窒素物の資化性について疑問が持たれていることを考えあわすと興味深い。

c) インドール生成： ペプトン水に前培養液を 7% 接種し、32°, 48 時間培養を行ったが殆ど生育は認められず、Ehrlich-Böhme 法⁽⁴⁾で試験を行ったが陰性であった。

d) 硝酸還元： 0.1% 硝酸カリ添加ペプトン水に c) と同様に接種し、37° で5日間培養したが、同様に殆ど生育は認められなかった。併し Griess 試薬⁽⁵⁾を用い亜硝酸の検出を行うと明瞭な発色が認められた。

e) 嫌気度試験： 0.3% ペプトン含有 *Cl. pasteurianum* 用培地を用い種々の割合の CO₂, O₂ の混合ガスで置換し試験を行った。ガスの影響を強化するため試験管を斜めに保ち液量を 5 ml とした。結果は第3表に示す通りであって、10% の酸素があっても生育し、20% 酸素、80% 炭酸ガスとおきかえても僅かに管底に生育する。併しガス置換を行わず直ちに密栓したもの及びゴム栓をせずそのまま開放したものでは生育が認められない。

第 3 表 各種酸素分圧下での生育

CO ₂ : O ₂	生育	CO ₂ : O ₂	生育
100 : 0	+	70 : 30	—
	+		—
	+		—
95 : 5	+	50 : 50	—
	+		—
	+		—
90 : 10	+	0 : 100	—
	+		—
	+		—
80 : 20	±	真 空	+
	—		+
	—		+

含ペプトン Starkey 培地, 30° 静置培養

ので嫌気性菌と認められる。又炭酸ガスは酸素の阻害をある程度回復し得ると考えられるが、この点はなお検討したい。

f) 醗酵生産物：第 1 表であげたようにブタノールを主産物とし、エタノールを副成しアセトン、揮発性有機酸を微量生成する。又イソプロパノールの微量も生成される。溶剤生産については別に報告するが、試験した範囲では一般のアセトン-ブタノール醗酵菌のように酸醗酵に転ずることは殆どなく、又生酸期も顕著でない特徴がある。

考 察

上記のように分離して得た赤橙色の嫌気性窒素固定菌はその形態並に生理的性質からみて明らかに *Clostridium* 属に属するが、

上述の性質をまとめると第 4 表のようになる。今 Bergey の Manual⁽⁶⁾ 及び Prévot の Manual⁽⁷⁾ から類縁の菌種を求めると *Cl. chromogenes* Prévot, *Cl. roseum* McCoy and McClung, *Cl. felsineum* (Carbone and Tombolato) Bergey et al., *Cl. flavum* McClung and McCoy, *Cl. aurantibutyricum* Hellinger があげられる。

Cl. chromogenes はゲラチン液化後赤色色素を分散し、馬鈴薯斜面で灰黄色色素を生産し、果糖、ガラクトース、蔗糖、乳糖、麦芽糖、マンニトールから酸及びガスを生成するが本菌はゲラチン培地で色素を生産せず、馬鈴薯培地では明瞭な赤橙色となり、乳糖を醗酵資化しない点で *Cl. chromogenes* と異なる。

Cl. roseum は赤橙色の色素を作りリトマス牛乳を強く凝固し、馬鈴薯を急速に消化し赤又は黄色とし褐色の沈渣を生ずる。キシロース、アラビノース、ぶどう糖、マンノース、果糖、ガラクトース、乳糖、麦芽糖、蔗糖、デキストリン、グリコーゲン、イヌリン、ペクチン、澱粉を資化するがマンニトールは資化しない。然るに本菌はリトマス牛乳の凝固は極めてゆるやかであり、馬鈴薯の消化は行わない。又五炭糖、乳糖を資化しないのに反しマンニトールを資化する点で *Cl. roseum* とは異なる。

Cl. felsineum は本菌に最も近く橙色色素を生産し通気によって変色せず、ぶどう糖、マンノース、ガラクトース、麦芽糖、蔗糖、デキストリン、グリコーゲン、イヌリン、ペクチン、澱粉を醗酵資化し、又よく溶剤を作る点で似ているが、馬鈴薯を消化し、アラビノース、キシロースのような五炭糖、乳糖を資化し、マンニトールを資化しない点で異なっており、生成溶剤にアセトンがかなり含まれることも異なっている点の一つである。

Cl. flavum はリトマス牛乳を凝固し、ぶどう糖、ガラクトース、麦芽糖、果糖、乳糖、ペクチン、澱粉を資化し、イヌリン、マンニトールを醗酵しないが我々の菌は牛乳に対する反応性弱く、且つ乳糖を資化せず、イ

TABLE 4. PHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE TESTED ORGANISM

1. Litmus milk : Spongy clot was formed slowly without fermentation. When added with glucose, strong coagulation and fermentation occurred. Spongy clot was not digested.
2. Potato slant : Luxuriant growth. Potato was colored clear orange, turned brown when aged. Slime was not produced. Digestion did not take place.
3. Coagulated egg-white : Digestion did not take place but shrinking was observed.
4. Gelatine : Complete liquefaction was observed in 3 days. Sediment and supernatant were colorless.
5. Indol : Not produced.
6. Nitrate : Reduced to nitrite.
7. Vegetative cell : Rod, 1~2×5~6 μ . Usually single sometimes in pair, actively motile with peritrichous flagella, when old, became spindle formed clostridium.
8. Spore : 1.5×2 μ . Ellipsoidal, terminal or subterminal. Resistant 100°C 1 minute's heating.
9. Staining : Gram positive. Granulose negative.
10. Acid and Gas from glucose, fructose, mannose, maltose, sucrose, starch, glycogen, inulin, mannitol. Xylose, arabinose, rhamnose, lactose, cellulose, glycerol, ethanol, acetone, acetate, lactate, succinate were not fermented.
11. Products of Glucose Fermentation : Main product is butanol. Ethanol is lesser amount. Acetone, isopropanol, acetic and butyric acids slight.

ヌリン、マンニトールを醗酵する点が異なっている。

Cl. aurantibutyricum も亦我々の菌によく似た菌の一つであるが、糖の資化性及び生産物で異なっている。即ちキシロース、ガラクトース、ぶどう糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、ペクチン、澱粉を資化するがイヌリン、マンニトールを資化しないのに我々の菌はキシロース、乳糖を資化せず、イヌリン、マンニトールをよく資化する。又 *Cl. aurantibutyricum* の生産物は醋酸及び酪酸を主とし、溶剤を僅かに副生するのに反し我々の菌はブタノール、エタノールの溶剤を主とし揮発性酸は僅かに副生するにすぎない。

以上のように今まで記載のある諸種の菌種とそれぞれ幾つかの点、特に分類の重要な基準となる糖類の資化醗酵性或は醗酵生産物の種類で著しく異なっているので新種とするのを適当と認め、次のように命名したい。

Clostridium aurantiacum nov. spec.

玉蜀黍培地から得られる *Cl. aurantiacum* と類似した白色株がその変異株であるとすれば色素生産性で *Clostridium* 属を二大分別する Bergey の分類法に大きな疑問を投げるものであるが、相互転換が可能なるものであるか、共生からの分離によるものかは更に検討したい。

嫌気性窒素固定菌が水田土壤中に年間かなりの濃度で存在することは兩年のポット試験での成績を通じて認められたが、同時にこの場合一定の時期にここに述べた溶剤生成性の菌へと交替する場合のあることも知られた。溶剤生成性の *Clostridium* の多くのものに窒素固定性のあることは Rosenblum⁽⁶⁾ の示した所であるが、かかる型の菌が水田土壤中での窒素循環に於ても一定の役割を演ずる可能性があると考えられるが、勿論今後更に精査を要する問題である。

綜 括

(1) 定温硝子室内の稲を植えたポット土壤中の *Cl. pasteurianum* 型の嫌気性窒素固定菌の推移を検討している際、二年に亘って略同一の時期に赤橙色の色素を生産する嫌気性窒素固定菌を分離した。

(2) 該菌はブタノールを主とし、エタノールを従とし、アセトン、イソプロパノール、揮発性酸を僅かに生産する溶剤生産菌であるのでその性状を検討した。

(3) 多くの液体培地では赤橙色の色素及び粘質物を生産する。無窒素より結合態窒素を含む培地でよく生育し、有機態の方が利用性が高い。菌は $1\sim 2\times 5\sim 6\mu$ の桿菌で活潑に運動し、周鞭毛を有し、グラム陽性である。古くなると紡錘形になり端末又は近くに $1.5\times 2.0\mu$ の楕円体の胞子を生ずる *Clostridium* である。

(4) ぶどう糖、果糖、マンノース、麦芽糖、蔗糖、ペクチン、グリコーゲン、イヌリン、澱粉、マンニトールを資化し溶剤と酸とガスを生成するが、キシロース、アラビノース、ラムノース、乳糖、纖維素、グリセロール、エタノール、アセトン、醋酸塩、乳酸塩、琥珀酸塩は資化されない。リトマス牛乳の凝固は極めておそく醗酵は殆どおこらない。ゲラチンは液化するが、凝固卵白は消化しない。馬鈴薯斜面上によく生育するが粘質は生産せず、馬鈴薯を消化しない。

(5) 類似の菌種の性質の記載と対比して新種とするのを適当と認め、*Cl. aurantiacum* と命名した。

終始御指導を頂いた植村教授に感謝すると共に、試料土壤採取の便宜を与えられた本学鈴木道夫氏に感謝する。又本研究費の一部は文部省科学研究費によったものである。

(1) R. L. Starkey, P. K. De : *Soil Sci.*, 47, 329 (1939).

(2) M. Stephenson : *Bacterial Metabolism*, Longmans, London, p. 316 (1948).

(3) R. Davies, M. Stephenson : *Biochem. J.*, 35, 1325 (1941).

(4, 5) 伝染病研究所学友会, 細菌学実習提要, 144, 138, 丸善, 東京 (1958).

(6) R. S. Breed et al. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 7th Ed., Williams & Wilkins, Baltimore (1957).

(7) A. R. Prévot : *Manual de Classification et de Détermination des Bactéries Anaérobies*, Mason, Paris (1957).

(8) E. D. Rosenblum : *Thesis Univ. Wisconsin* (1950).