[農化 第 38 卷, 第 4 号, p. 213~215, 1964]

微生物の麴酸代謝に関する研究 (第 7 報)*

麴酸分解菌 K-1 の菌学的性状と分類

野々村誠一, 辰巳忠次 (大阪府立大学農学部)

昭和 38 年 11 月 20 日 受理

緒 言

著者らはさきに麴酸を分解する細菌を各地の土壌から検索して、麴酸を単一の炭素源として分解, 利用する細菌を得て K-1 菌と命名し, この細菌を用いて麴酸の分解を検討し, その経路を推定して報告した^(1,2).

本報告はこの K-1 菌の形態的, 培養的および生理的諸性質を検討した結果 *Arthrobacter ureafaciens* に属せしめることが妥当と思われる結果を述べる.

実験方法と結果

1. 供試細菌: 前報⁽¹⁾に記載した方法で分離, 純化した麴酸分解菌 K-1 菌は 0.2% 麴酸ブイオン寒天培地に斜面培養して保存したものを nutrient agar slant に移して実験に用いた.

2. 実験法: K-1 菌の形態的, 培養的および生理的諸性質は主として実験農芸化学上巻⁽³⁾, Manual of Microbiological Methods⁽⁴⁾ を参考にして行ない, ついでこれらの菌学的諸性質をもとにして Bergey's Manual⁽⁵⁾ に従って検索し, また別に駒形法を用いて種属を推定した. つぎに type culture を用いて比較実験を行なった. 実験はすべて二組並行して行ない, 使用薬品は一級品を用い, 和光肉エキス (和光純薬製), カタヤマペプトン (片山化学製), 雪印スキムミルク (雪印乳業製) を用いた.

3. 形態的性質: i) 形態; 桿菌 (nutrient agar slant, 30°, 24 時間), 古い培養は球菌 (72 時間), 菌端鈍円, 単独, 時に斜 T 字型の pleomorphism を示す. ii) 大きさ; $2\mu \times 1\mu$ (24 時間培養). iii) 孢子; なし. iv) 運動性; なし. v) グラム染色, 24 時間培養は陰性,

72 時間培養は土.

4. 培養的性質: i) 斜面培養 (30°, 3 日間); やや太い filiform, 生育良好, 菌苔乳白色ないし淡黄白色, やや隆起し, やや粘性があり, 下底部に少量の沈渣がある. 古い培養 (7 日間) では黄色を呈し, その色素は不溶性である. ii) 扁平培養 (寒天 0.7%); 直径 2 mm 内外, 微黄白色, 円型を呈し, convex で entire である. iii) soil-extract agar slant⁽⁶⁾ (風乾畠地土壌 1 kg に水 1 l を加えて 15 lb, 20 分間加熱浸出し, 濾過して 1 l に満たし, これに対して 0.02% KH_2PO_4 , 0.1% yeast ext. を添加する) filiform に生育するが発育は劣る. やや微黄色を呈し, 沈渣少量である. iv) 液体培養; 発育良好, 強く濁濁し, 沈渣少量で臭気はない. v) 穿刺培養 (寒天 0.7%); 表面一様に生育し, filiform ないし napiform に生育する. vi) ゼラチン穿刺培養; crateriform ないし napiform に発育し, ゼラチンを液化する. vii) B.C.P. ミルク培養 (スキムミルク 10%); 薄片状の菌膜をはり, 生育良好, 透明に近くアルカリ性になる.

5. 生理的性質: i) 硝酸塩の還元性 (30°, 3 日間); ペプトン培地では陰性, コハク酸, 硝酸塩培地⁽⁷⁾では陽性を示す. ii) 硫化水素の生成; 0.1% 酢酸鉛含有肉汁寒天穿刺培養で陰性. iii) Voges-Proskauer 試験; 陰性. iv) Methylred 試験; 陰性. v) 糖類の酸酵性; 糖 1%, ペプトン 1%, 食塩 0.5% の培地に 7 日間培養後 pH の変化を観察して測定した. グルコース, フラクトース, マルトース, シュクロース, アラビノース, ラクトース, キシロース, ガラクトース, グリセリンの 9 種の糖類でいずれもアルカリ性を呈して陰性である. vi) 澱粉の分解性; 陰性. vii) 色素の生成; 若い培養では淡微黄色であるが, 古い培養では黄色を呈し, glutamate soln.⁽⁸⁾ でも色素の生成はない. viii) pH の影響; pH 5 と 9 ではほとんど生育しないが, pH 6, 7, 8 では生育良好である. ix) 酸素の要求性; 表面にのみ生育す

* Studies on Kojic Acid Metabolism by Microorganisms. Part VII. Taxonomy of the Kojic-acid-decomposing Bacteria, Strain K-1.
By Seiichi NONOMURA and Chuji TATSUMI
(Faculty of Agriculture, University of Osaka Prefecture)

る. x) カタラーゼ生成; 陽性. xi) 糖代謝型式; Hugh and Leifson 法⁽⁹⁾に従ってグルコースを用いて行なった. 好気的条件下では高層培地の約 1/2 が黄変し, 全表面に生育し, 穿刺にそうて papillate に發育する. 嫌気的条件下では高層培地の約 1/5 が微弱に黄変し, パラフィン下約 1/8 の面積にも生育し, 微弱であるが穿刺にそうて生育する. 好気的生酸菌であるがまた微弱ながら酸酵的生酸性をも備えているものと推定できる. xii) クエン酸の利用法 (Na-Citrate·2 H₂O 14.9 g, NH₄H₂PO₄ 1 g, KCl 0.2 g, MgSO₄·7 H₂O 0.4 g, 水 1 l, pH 7.2 に補正) 微弱であるが生育し, 沈渣少量である. xiii) ニコチンの利用性 (クエン酸に替えてニコチン 5.5 g 使用); 生育しない. ivx) 尿酸より尿素の生成 (クエン酸に替えて尿酸 5 g 使用); 尿素の生成 ± である.

6. 駒形法⁽⁶⁾による K-1 菌の検索: 好気性細菌の genus または species を容易に検索する方法が駒形によって示されているので, 同法に従って K-1 菌の検索を行った. i) nutrient agar slant; 生育中程度, 糸状に發育す. 淡微黄色, 下底部に沈渣少量 (30°, 18 時間培養). ii) glucose amm. soln.; 生育微弱, 沈渣あり, 酸生成 ± (10 日間後 pH 6.6, 対照 7.0). iii) p-hydroxybenzoate soln.; 生育微弱, 沈渣少い, 色素の生成はない. iv) glucose-nitrate soln.; 生育微弱, 沈渣少量. v) glutamate soln.; 生育微弱, 沈渣少量, 色素の生成はない. vi) B.C.P. milk (10% スキムミルク); 菌膜をはり, 生育良好, 透明に近く凝固しない. 沈渣あり, アルカリ性になる (pH 7.5, 対照 7.1).

考察と結論

7. 分類の基準: 駒形法に従って K-1 菌を検索すると, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium faciens* および *Agrobacterium tumefaciens* の 3 種に推定できるが Bergey's Manual⁽¹⁰⁾によると *Agrobacterium* は flagella をもって運動する代表的な小短桿菌であり, *Agrobacterium tumefaciens* は 1~4 個の flagella をもっていること, リトマスミルクをゆるやかに凝固し, facultative anaerobe で五倍子形成の植物病源性が特徴であるから K-1 菌は *Agrobacterium* 属ではないと推定できる.

Corynebacterium 属と *Arthrobacter* 属の特徴的差異は Conn⁽¹²⁾によると, 両属の形態的特徴は branching と pleomorphism であって同一の性質を示すが, しいてその差異を求めると *Corynebacterium* 属はグラム陽性

であり, *Arthrobacter* 属はグラム陰性 (特に若い培養) であることで区別される. このように *Corynebacterium* 属と *Arthrobacter* 属の相異は厳格には区別できないようであるが, K-1 菌は若い培養でグラム陰性であることから *Arthrobacter* 属に属せしめることが妥当と考えられる.

さらに *Arthrobacter* 属を species に分類する Key⁽¹¹⁾によると窒素源として硝酸塩およびアンモニウム塩を利用し得ること, 有機栄養としてクエン酸を利用し得ること, 加えるに chromogenic であり, 澱粉を分解できないこと, 硝酸塩から亜硝酸を生成しないこと等の諸性質から K-1 菌は *Arthrobacter ureafaciens* (Krebs and Eggleston) Clark に類似すると考えられる. よって標準菌として *Arthrobacter ureafaciens* IAM-1658 (ATCC-7562) を用いて比較実験を行なったが, K-1 菌の諸性質はほとんど標準菌と一致した (ただし尿素生成は K-1 菌 ±, 標準菌 + を示し, 麩酸に対する QO₂ は前者 30.8, 後者 20.2).

8. 分類: 以上の結果が示すように標準菌 *Arthrobacter ureafaciens* IAM-1658 と K-1 菌は全く同じ性質を示し, また標準菌を 0.2% 麩酸ブイオン寒天培地に培養して得た resting cells は麩酸を分解することからも, K-1 菌は *Arthrobacter ureafaciens* に属せしめることが妥当と考えられる.

9. 結論: 麩酸分解菌 K-1 菌の形態的, 培養的および生理的諸性質を検討し, ついで標準菌 *Arthrobacter ureafaciens* IAM-1658 を対照菌として Bergey's Manual の検索法に従って同定を行ない, K-1 菌は *Arthrobacter ureafaciens* (Krebs and Eggleston) Clark に属せしめることが妥当と考えられる.

本研究に際し, type culture として *Arthrobacter ureafaciens* IAM-1658 の御分与をお願いしました東大応微研塚廣博士にお礼申し上げます. なお本実験の結果は昭和 38 年 4 月, 日農化大会で発表した.

- (1) 野々村誠一, 辰巳忠次: 本誌, 35, 951 (1961).
- (2) S. Nonomura: Bull. Univ. Osaka pref., Ser B, 13, 59 (1962).
- (3) 東大農化編: 実験農芸化学, 上巻, 朝倉書店 p. 186 (1961).
- (4) Soc. of Amer. Bacteriologists: "Manual of Microbiological Methods", McGraw Hill, p. 140 (1957).

- (5) R. S. Breed et al. : "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7th Ed., Williams and Wilkins Comp., p.578(1958).
 - (6) V. Sundman : *Can. J. Microbiol.*, 4, 221 (1958).
 - (7) 飯塚 廣, 駒形和男 : 本誌, 36, 663 (1962).
 - (8) 駒形和男 : 本誌, 35, 981 (1961).
 - (9) R. Hugh, E. Leifson : *J. Bacteriol.*, 66, 24 (1953).
 - (10) R. S. Breed et al. : "Bergey's Manual", p. 288 (1958).
 - (11) R. S. Breed et al. : *ibid.*, p.606 (1958).
 - (12) H. J. Conn, I. Dimmik : *J. Bacteriol.*, 54, 291 (1947).
-