

好気性孢子形成桿菌類の抗生性に関する研究 V[※]

糸引納豆生成能の無い菌株の抗菌性物質

松本宗人 (農産製造学研究室)

Muneto MATSUMOTO

On the Antibiotic Activity of Some Bacilli

(V) Antibiotics of several strains not classified as nattô bacteria.

緒 言

著者は、分離扁平培養基上で抗菌環らしきものを呈する好気性孢子形成桿菌の1株について抗菌性を確認検討し、該菌の培養液の呈する抗菌性は、極く一部が培養液の中性エーテル抽出物中の物質に由来し、一部は培養液の酸性エーテル抽出物の水蒸気蒸溜々々区分の物質に因り、主体は酸性エーテル抽出物の不揮発酸区分に在ることを知り、該区分より結晶物質を分離してこの物質が抗菌性の主体をなすものと考察し、該物質をジピコリン酸と同定したが、この物質が既に糸引納豆より分離されて各種微生物に対して抗菌性を有することが確認されていることを知ったので、供試菌について糸引納豆生成能を調べてこれを有することを認め、ついで納豆菌の数株について抗菌性を検討して、何れも、納豆洗脱液のアルカリ性エーテル抽出物と酸性エーテル抽出部の揮発酸区分とに抗菌性の一部を担う物質があること、酸性エーテル抽出部の不揮発酸区分に抗菌性の主体をなす物質の存在することを確認して、該区分よりジピコリン酸と見られる物質を分離した^{1,2,3,4)}。よって、此の物質が納豆菌によって特徴的に生産されるのではないかと想定して引き続き実験を試み、この推察を確かめるために、糸引納豆生成能をもたないが低度の抗生性を有する数種の菌株についてジピコリン酸産生の有無を検討した。結果は、何れの供試株の培養液にもジピコリン酸が存在していて興味ある知見であったので以下にその概要を報告する。

この実験は前報と同同時のもので、御指導頂いた恩師片桐教授、北原助教(当時)に対して深謝申し上げる。

実験ならびに考察

1. 供試菌株

先づ抗菌性菌株を分離し、ついでその糸引納豆生成能をしらべて生成能のあるものを除外して、残った菌株について培養液の抗菌性を検討して、好気的な孢子形成性の桿状菌で糸引納豆生成能の無い抗菌性菌株を選別して供試菌株とした。

分離：水田および畑地の土壌、雑草の枯草、刈取後の稲株等を拮抗体源とし、土壌は殺菌水に懸濁したものを、その他は予め肉汁培地に投じて37°Cに1夜培養して菌の繁殖により混濁せる集殖培地をそれぞれ分離試料とした。分離は常法の肉汁寒天培地の稀釈平板法によったが、拮抗体の発見選択を容易にするために、含菌平板法で試験生物を同時植菌した。すなわち、試験管内の融解培地に分離試料を接種稀釈して後に被検菌を接種して皿に注下した。被検菌(試験生物)には、黄色葡萄球菌寺島株(京大病院)をえらび、この菌の肉汁、37°C、1日培養後室温に数日置いた培養液を20倍に肉汁で稀釈したものの1滴を加えた。皿は37°Cに培養し1昼夜後に観察して、抗菌環を示す集落をリンゲル氏液に釣ってこれをしばらく振温分散してから肉汁寒天培地で再分離した。

糸引納豆生成試験：上記によって得た12菌株について糸引納豆生成能の有無を調べた。すなわち、煮熟大豆を三角瓶にいれて1気圧30分間殺菌したものに各菌株を1白金耳宛接種混合して、37°Cに1昼夜培養して状況を観察し、その後室温に置いて5日後に観察して、生成能を判別して菌株を選択した。此の判別は官能に依る主観的なもので必ずしも容易ではなかったが、供試株のうちで納豆生成能の無いものと判断した菌株の観察結果は第1表に示す如くである。AS1菌株は外観は納豆様に繁殖したが菌苔量は甚だ豊富でやゝ濃色粗雑である上に、混合するも菌苔が均質とならず帯褐色の菌苔が残った。AS4菌も生成菌に近いがAS1株と同様の傾向がある上

※ 納豆菌に関する生化学的研究 V

第1表 選別菌株の糸引納豆生成試験結果

菌 株	AS 1	AS 4	AS 7	AS 8	AS 11	H 1 ※1
繁 殖	豊 富	豊 富	豊 富	貧 弱	貧 弱	豊 富
菌苔 色調	白一帯淡褐白色	白一帯淡褐白色	白一淡黄白色	淡黄褐色	淡褐一帯紅褐色	白一黄白色
皮膜	乾燥状粗大皺曲	乾燥状粗大皺曲	乾燥様薄膜	滑, 半光沢	滑半光沢	乾燥粉状
皺	多, 大	多, 大	ない	ない	ない	多, 小
粘質	普 通	普 通	やゝ少い	少 い	少 い	普 通
均質性	悪 い	不 良	良 い	良 い	良 い	良 い
糸 引	中程度	中程度	中程度	中程度	小	中程度
軟 化	普 通	普 通	低 い	悪 い	悪 い	普 通
PH※2	7.8	7.6	7.6	7.4	5.4	6.8
納豆臭	あ る	あ る	あ る	な い	な い	良
NH ₃ 臭	強 い	強 い	中程度	弱 い	な い	中程度
異 臭	な い	やゝ酸臭	な い	腐敗臭酸臭	酸 臭	な い
納豆味	—	—	—	—	—	普 通
菌型, 孢子	桿, 有	桿, 有	桿, 有	桿, 有	桿, 有	桿, 有
生成能	無 い	無 い	無 い	無 い	無 い	有 る

※1: 比較, 納豆菌, 北大保存株 ; ※2: 5 日目観察

に, やゝ酸臭があった. AS7 株は外観が納豆様を呈さず, 菌苔は薄く粘質少く豆粒の軟化も弱かった. AS8 菌も AS7 株同様の性状で納豆臭無く腐敗臭酸臭があった. AS11 菌は, AS8 菌株様の性状がさらに強く酸臭も強かった.

抗菌性再検定 : 選別菌は含菌平板法で葡萄状球菌寺島株を試験生物として分離したものであるが, 培養液についてそれぞれの抗菌性を質的, 量的に調べた. すなわち, 各菌株を肉汁培地 (肉エキス 1%, ペプトン 2%, 食塩 0.5%, 葡萄糖 0.5%, PH 7.0) (20ml を 150ml 容三角フラスコに入れ, 1 気圧 30 分殺菌, 表面積 : 液容量 = 1.5 強) に培養 (37°C, 静置) した液を酸性の場合は中和してザイツ無菌ろ液として, 稀釈法で肉汁培地を用いて寺島株に対する活性をしらべた. 結果は第2表に示す如くであった. AS11 菌を除いて他の菌株は何れも

第2表 選別菌株の培養ろ液の抗菌性

菌 株	PH	稀釈率, 被検菌の繁殖度			AU (1ml中)
		2 倍	5 倍	10 倍	
AS 1	7.6	±	2+	3+	2
AS 4	7.8	±	2+	3+	2
AS 7	7.6	±	2+	3+	2
AS 8	7.4	±	2+	3+	2
AS11	6.4	2+~3+	3+	3+	0
H 1	7.4	±	2+	3+	2
—	7.6	2+~3+	3+	3+	0

培養1日と3日の液を試験したが同結果であったので1日培養の液の結果のみ表示した. 稀釈法³⁾は一

般法で, 被検菌の対照の繁殖濁度を (3+)、無接種対照管の濁度を (-) として表示した. AU は抗菌力価³⁾で, 繁殖濁度が (±) の試験管の液の抗菌性物質の濃度を 1ml 中 1AU として計算した値. H1 株は比較用, 北大保存納豆菌.

糸引納豆菌程度の低度抗菌力を示した. AS11 株の培養液には抗菌力を認め得ないので, 念の為, 肉汁寒天培地に寺島株を同時植菌して 37°C 1 日培養して観察したところ, 集落周囲には明かに約 1mm 巾の抗菌環を認めた. 従って該菌は確かに拮抗体であるが, 培養液に抗菌性物質を認めることは出来ないのので, 該菌の培養液の PH も納豆生成試験における PH も低く酸臭が強い点等から, 拮抗性が培地の酸性化によるものかと推察して除外した.

以上の経過で選別した AS1, 4, 7, 8 の 4 菌株を供試した. AS1, 4 両株は共に京都市北部の水田刈取後の刈田土壌を, AS7 株は同地域の畑地土壌を, AS8 株は同地域の雑草枯草を分離源としている.

2. 抗菌性物質の抽出と分離同定

加糖ペプトン強化肉汁 (肉エキス 1%, ペプトン 2%, 食塩 0.5%, 葡萄糖 0.5%, 水道水, PH 7.0) を培地とし, 3 立容フェルンバッハ瓶に 1 立宛を注加して (表面積 : 液容量比 1.5 強) 1 気圧 30 分間殺菌したものに, 予め肉汁 20ml に培養した各選別菌株を注加して 37°C 2 日間培養したものを供試した. AS1, 4 両株は菌蓋を残して傾しゃした培養液を, AS7, 8 両株は菌膜がわずかで分離し難く液中に繁殖せる菌体を含んだ培養液そのままを, それぞれ試料とした. 培養液は各株につき 5 立宛

を培養し、1回1立を大型連続抽出器を用いて処理した。抽出は、培養液を苛性ソーダで充分アルカリ性としてエーテル抽出を約16時間行って、アルカリ性エーテル抽出物を得、残液に硫酸を加えてこれを酸性としてエーテル抽出を約16時間行って酸性エーテル抽出物を得、各抽出物は温水で溶出して水溶部を中和して抗菌力を寺島株について検定し、酸性抽出物は水蒸気蒸溜して揮発酸部と不揮発酸部とに分け、各部を中和して抗菌力を検定した。不揮発酸部を各株毎にまとめて、それぞれ平圧加熱濃縮し冷却して細柱状の結晶を得た。既に酸性エーテル抽出中に受器のエーテル溶液の界面にやゝ黄色を帯びた菊花様の結晶小塊が幾つか認められ、このものは以後の処理で温水に溶解したが、一部をとって融点を測定したところ、各株に於て、230°C付近で分解発泡しピリジン臭を発したのでジピコリン酸を予想した。上記の粗結晶は約230°C付近で融けて分解発泡しピリジン臭を発生し、またやゝ太い細管中に加熱して分解発泡して出る蒸気を石灰水上澄液に導いて白濁を認め、何れもジピコリン酸と判断した。これらの粗結晶を肉汁に約0.1、0.2%に溶解して寺島株に対する抗菌力をしらべた結果は、何れも0.1%で静菌時に、0.2%で殺菌的に抗菌性を示した。上の経過による培養液の抽出分別区分の抗菌力や取得結晶について第3表に示した。何れの菌株も納豆菌⁴⁾と同等または以上の抗菌力を示し、また、アルカリ抽出部に極く一部の抗菌力があり、揮発酸部に一部の抗菌力があり、抗菌力の主体は不揮発酸部にある。この様相は納豆菌における場合と全く同傾向である。なお株によって

第4表 供試菌の性状

菌株記号	AS 1	AS 4	AS 7	AS 8
菌型	桿状	桿状	桿状	桿状
孢子部位	中央的	中央的	中央的	中央的
孢子形成膨大	する	する	認め難い	認め難い
菌体大きさ, μ	0.8~1.0×3.6~4.0	0.8×2.4~3.6	1.0~1.4×2.4~4.4	1.2~1.4×2.0~5.6
孢子大きさ, μ	1.0~1.2×1.2~1.6	1.0×1.2~1.4	1.0×1.2~1.4	1.0~1.2×1.4~1.6
孢子形状	やゝだ円	卵形	卵やゝだ円	卵形
鞭毛, 運動性	周毛, 有	周毛, 有	周毛, 有	周毛, 有
グラム染色	陽性	陽性	陽性	陽性
肉汁寒天平板	大不正円形, 粗皺粗面, 扁平, 帯褐黄白, 縁線状	大不正円形, 中皺やゝ粗面, 扁平, 灰白, 全縁状	円形, 拡布, 半光沢, 丘状, 白から灰色を加える	円形, 半光沢, 丘状, 全縁
同上斜面	拡布状, 扁平, 無光沢, 粗皺, 帯褐黄白, 膜質	拡布状, 扁平, 無光沢, 細皺粉状, 灰白, 膜質	やゝ拡がる, 半光沢, 粘質均質	粘性, 平滑
肉汁	液面粗皺膜状, 壁上昇, 液澄	液面細皺膜状, 壁上昇, 液澄, 汗臭	薄膜, 液やゝ澄となる	極く薄い膜を認める濁る, 器底に菌体。
肉汁膠穿刺	地層状	地層状	ろ斗状	ふくろ状
牛乳	溶解	溶解	凝固, 溶解	凝固せず, 溶解
馬鈴薯	多量繁殖, 粗皺, 澱粉分解。	多量繁殖, やゝ粗皺やゝ濃灰色, 澱粉分解	粘質, 半光沢, 黄色を帯びる, 多量繁殖, 水解	灰白色凹凸あり, 澱粉水解, 多量繁殖

第3表 培養液の抗菌性物質の抽出結果

AU	AS 1	AS 4	AS 7	AS 8
培養ろ液	約10,000	約10,000	約10,000	約10,000
アルカリ性抽出物	200	200	200	200
酸性抽出物	8,000	8,500	16,000	15,000
揮発酸部	2,500	2,000	2,500	3,000
不揮発酸部	6,500	6,500	15,000	14,000
結晶取得量, g	0.1	0.1	0.12	0.14
結晶融点, °C	232 ~233	234 ~235	232 ~233	228 ~230

AU : 第2表註参照, 結晶融点 : 不訂正

は揮発酸部の抗菌力のやゝ強いものがある (AS 8株) が恐らく有機酸生成量が多いのであろう。また, AS 7, 8両株の場合には培養ろ液の抗菌力価に比べて抽出物の抗菌力価はかなり高いが, これは, 既に前報²⁾で認めた如く抗生物質 (不揮発部に由来のもの, おそらくジピコリン酸) が菌体内にも存在していて溶出されたものと考えられる。以上の経過により, 納豆菌に属さない有孢子好気桿菌の抗生物質の内容が判明して, 酸性抽出物の不揮発酸部にその主力が存在し, またその主要物質はジピコリン酸と見られるので, ジピコリン酸産生は, いわゆる納豆菌に特徴的な性質ではないという甚だ興味ある事実を明かにすることが出来た。

4. 供試菌株の性状

選別供試菌株の菌学的性状を常法に従って調べた結果は第4表の如くであった。この結果を Bergey's Manual⁵⁾に照すと, AS 1, AS 4株は共に *B.subtilis* Cohn.

インドール形成	陰 性	陰 性	陰 性	陰 性
硫化水素形成	弱陽性	弱陽性	弱陽性	弱陽性
硝酸塩還元	する	する	する	しない
生 酸	グリセリン, 葡萄糖, 蔗糖, マンニット, アラビノース, キシロース	グリセリン, 葡萄糖, 蔗糖, マンニット, アラビノース, キシロース	グリセリン, 乳糖, 葡萄糖, 蔗糖, マンニット	グリセリン, 乳糖, 葡萄糖, 蔗糖, マンニット, アラビノース, キシロース
瓦 斯	陰 性	陰 性	陰 性	陰 性
アンモニア	陽 性	陽 性	陽 性	弱陽性
アセトイン	陽 性	陽 性	陰 性	陰 性
酸 素	通性好気	通性好気	通性好気	通性好気
適 温	40°C	40°C	35—40°C	35°C

の1株とみられ、AS 7 株は *B. ruminatus* Gottheil. または *B. danicus* Löhnis and Westermann に、就中後者にほぼ一致し、AS 8 株は *B. megatherium* De Bary の1変株と（文献記載の菌体の大きさに比しAS 8 株の菌体はやゝ小さいが）見られる。

以上、土壌又は枯草より分離した好気性孢子形成桿菌の、納豆菌類似の抗菌環を示す菌株でしかも糸引納豆生成能を持たない数種菌株について、抗菌性物質の様相を検討したところ、供試菌株は納豆菌類似の抗菌性を持ち且つ主要抗菌性物質としてジピコリン酸を生産することを知った。ジピコリン酸は近年、Powell ら⁶⁾、Foster ら⁷⁾、ほか⁸⁾が数種の孢子形成桿菌類に認め、孢子中に存在するとし、その生理的意義や生成機作について続報しており、また青かびの培地にも発見され⁹⁾、微生物界で極めて興味ある物質となった。

摘 要

土壌または枯草より分離した好気性孢子形成桿菌のうち、納豆菌類似の抗菌環を示す菌株で、糸引納豆生成能の無い菌株を数種選び、それらの抗菌性物質を検討した。

供試菌株の培養液（菌株により菌体を含む）の抗生物質の極く一部は、アルカリ性エーテル抽出物として得られ、一部は酸性エーテル抽出物の揮発酸区分に在り、主

力は不揮発酸部にあつて、この不揮発酸部の主体はジピコリン酸と判断した。供試菌株の抗菌性物質の様相は納豆菌のそれに全く類似しており、ジピコリン酸産生が納豆菌に特徴的なものではないことを知った。

供試した4種の菌につき、2株を *B. subtilis* Cohn. の1株と、1株を *B. danicus* Löhnis and Westermann の1株と、1株を *B. megatherium* De Bary の1株と同定した。

文 献

1. 松本宗人：本誌，143.
2. 同上：同上，150.
3. 同上：同上，158.
4. 同上：同上，162.
5. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 379, '30.
6. POWELL, J. F. and STRANGE, R. E. : Biochem. J. 65, 700, '57. ほか.
7. MARTIN, H. and FOSTER, J. W. : J. Bact. 76, 167, '58. ほか.
8. 天羽幹夫：農化関東支部講演，('58)
9. OOYAMA, J., NAKAMURA, N. & TANABE, O. : Bull. agr. chem. Soc. Japan 24, 743, '60.

Summary

Antibiotics were investigated of several strains of Bacilli, isolated from soils of farm fields or dry weeds by waysides, having no potency to produce "nattō" on soybeans.

The strains exhibited the antibiotic activity like nattō bacteria and produced dipicolinic acid in the culture fluids as a main substance of antibiotics.

The results revealed that the production of dipicolinic acid was not the specific character of nattō bacteria.

The two of four strains investigated were both identified as *B. subtilis*, the one was as *B. danicus* and the remainder was as *B. megatherium*.