

放線菌の分離培養について*

中 野 道 紀

Studies on the Isolation of Antibacterial Streptomyces

By

Michinori NAKANO

Since Fleming (1929) described the *Penicillium notatum* as an effective inhibitor of *Staphylococcus*, and Waksman (1944) extracted streptomycin from *Streptomyces griseus*.

Many antimicrobial strains of *Streptomyces* have been isolated by a number of investigators in this field of science.

The author has made an attempt to isolate it from soil with a view to searching for antibacterial strain. The results obtained are as follow :

1. Indicated Czapek's agar is of little or no use to the isolation of *Streptomyces*. Casein agar is suitable for the isolation of *Streptomyces*.
2. When casein agar is acidified, fungi are found, but when alkalized, bacteria appear, and the suitable pH value is pH 6.8 for the isolation of *Streptomyces*.
3. Aureomycin is no good for the purpose, because, when soil is steeped in aureomycin solution before isolation, or supernatant fluid is added in media at the culturing time, fungi appear in media.
4. When suitable concentration of aureomycin is added to the shake culture of *Streptomyces*, the growth of it is promoted, but too strong a concentration inhibits the growth. The suitable concentration is about 5×10^{-5} , though it varies with its strain.

放線菌の溶菌性を示すことは Gasperini (1890) により報告され、その後 Rosenthal (1925), Gartia 及 Dath (1926) により研究されているが 1929年 Fleming により *Penicillium notatum* の培養液の有効性を報告されてから¹⁾ 放線菌も有用菌株として着目される様になり Waksman 等により 1944年 *Streptomyces griseus* の代謝分泌物より Streptomycin が抽出されてから²⁾ 米国は勿論、わが国に於いても多くの研究者による報告は極めて多い。^{3) 4) 5) 6) 7)} 著者は抗菌性有効菌株の探索を目的とし、土壌よりその分離を試みた。この研究にあたり御指導を仰いだ 故小谷和夫教授に感謝する。

* 水産講習所研究業績 第231号, 1957年7月25日 受理

採 集 法

従来、放線菌は肥沃土壤に多いとされ、地表下 10~20cm の所が分離培地に表れる糸状菌や細菌数が少く、放線菌が分離し易い⁸⁾といわれ、地表下 80cm ではその65%が放線菌であると報告されている。著者は田畠・山林・墓地・洞穴内等の表地下 10~20cm の所を掘つて、その 10g を滅菌試験管に採取した。採集は北海道(阿寒・札幌・登別)宮城(松島)京都(天の橋立)鳥取(鳥取市)福岡(添田町)大分(別府市)宮崎(青島・高千穂)鹿児島(鹿児島市)佐賀(小城町)山口(下関市近傍)の各府県にわたつて行つた。

1 指示薬添加 Czapek's 寒天による分離

遠藤培地に赤変菌が表れるが、放線菌の探索に指示薬添加による着色培地を使用した方が、便利ではないかと思つて実験した。

実験方法及結果

採集した土壤を可及的迅速にその 1g を 9ml 滅菌水に入れ、3分振盪した後、そのまま 30分放置して、その上澄 1ml を更に 100倍に稀釈し、その 1ml をペトリ皿に入れ、第 1 表に示す各種指示薬 1~2 滴を加え Czapek's 寒天又は普通寒天を注加して 27°C 4~10日好気性及嫌気性培養し、次の結果を得た。

Table 1. Comparison of growth by the indicated Czapek's agar.

Cultured for 4 days at 27°C.

Indicator	Growth of colonies	Observation
Methylene blue	++ Blue or white colonies	Easy
Tashiro's reagent ⁹⁾	++	Easy
Neutral red	+	Uneasy
Methyl red	++	Easy
Bismark brown	++	Uneasy
Thymol blue	+	Easy
Brom phenol blue	++	Easy
Brom thymol blue	++	
Fuchusin	+	
Safranine red	+ Pink colonies	Easy

菌株による指示薬の選択性は認められないが放線菌による M. B. の還元帯が認められ判別に便であつた。N. R. は Aspergillus による還元帯は認められたが、Mucor には認められなかつた。この現象は Czapek's 寒天のみに表れ普通寒天には表れなかつた。田代試薬⁹⁾は嫌気性培養に限り細菌による還元が認められた。

N.R. 及 Bismark brown は遊離色素の為、判別に不便を極めたが、他のものについては検鏡に際し、幾分便利であつた。

2 培地の選択

実験方法及結果

培地には Waksman's media, Vander Brook media 等があるが、中沢及藤井の報告(1953)¹⁰⁾を参考に第 2 表に示す組成の培地に前記と同様稀釈した試料 1ml を培養して放線菌の分離を試み比較した。

この 6 種の分離培地に現れた Colony を比較すると、その数は土壤を加えて蒸溜した蒸溜

Table 2. Composition of media for isolation.

Each media was diluted by distilled water to 1000 ml finally and added 3.0 percent agar.

Czapek's agar		Casein agar		Starch agar		Glucose asparagine agar		Glucose agar	
K ₂ HPO ₄	1	K ₂ HPO ₄	0.5	K ₂ HPO ₄	0.5	K ₂ HPO ₄	0.5	Glucose	10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	Starch	10	Asparagine	0.5	Meat ext.	3
Sugar	30	Glucose	1	NH ₄ Cl	0.5	Glucose	10	Peptone	5
NaNO ₃	2	Fe ₂ (SO ₄) ₃	trace					NaCl	5
KCl	0.5	Casein	1						
Fe SO ₄	0.01								

Table 3. Appearance of streptomyces on the different media.

Media	Number of colonies		Number of streptomyces (%)
	Total	Streptomyces	
Czapek's agar	89	9	10
Czapek's (Soil distilled) *	108	13	12
Casein agar	75	28	38
Starch agar	60	12	20
Glucose Asparagine agar	35	5	13
Glucose agar	91	4	5

* Czapek's agar (soil distilled) : Composition was in table 2, diluted by the distilled water which distilled by the adding of soil.

水を用いた Czapek's 寒天が多いが、この Colony は細菌が多く、*Streptomyces* はその 12% で Casein 寒天はその 38% が *Streptomyces* で分離培地として最も優れていると思われる。これは中沢及藤井の報告 (1953)¹⁰⁾ と一致している。

3 分離培地の pH の影響

分離培地の最適 pH をしらべるため、2% CaCO₃ にて中和した pH 6.0 · 6.4 · 6.5 · 6.8 · 7.0 · 7.2 · 7.6 · 8.0 · 8.4 の Casein 寒天にて次の実験をした。

a) 土壌より分離する場合の影響

(1) 実験方法及結果

土壌 1g を滅菌水にとりよく振盪した後、30 分放置し、その上澄を 100 倍に稀釈して、その 1 ml を Casein 寒天に 27°C 4 日培養し、第 4 表の結果を得た。

(2) 実験方法及結果

土壌 1g を滅菌水にとり上記と同様方法で 27°C 4 日培養して、その上に *E. coli* 10⁴/ml を含むブドウ糖寒天を重層培養したが、良い結果は得られなかつた。尚 *E. coli* の噴霧培養も試みたが結果は思はしくなかつた。

b) *Streptomyces* を培養した場合の影響

(1) 実験方法及結果

著者が分離した *Streptomyces* C45 (仮番号) の孢子懸濁液を作り、その懸濁液 1 ml を次表に示す各培地に培養し、第 5 表の結果を得た。

Table 4. Comparison of appearance on the different pH casein agar.

Media (pH)	Mucor	Penicillium	Streptomyces		Bacteria	Total
			Appearance No.	Percent by total (%)		
Casein agar 6.0	41	1	21	33	0	63
6.4	23	0	12	34	0	35
6.6	31	0	16	34	0	47
6.8	16	0	18	53	0	34
7.0	18	0	11	38	0	29
7.2	16	0	18 Colonies smaller than pH 6.8	50	2	36
7.6	24 Growth scanty	0	13	33	2	39
8.0	8	0	14	58	2	24
8.4	11	0	16	55	1	28
Czapek's agar 7.0	52	3	1	2	6	62
Czapek's agar (soil distilled) 7.0	54	0	9	12	12	75
Glucose agar 7.0	22	0	0	—	5	27

Table 5. Comparison of appearance on the different pH casein agar in the case of pure culture on streptomyces.

Media (pH)	Number of colonies
Casein agar 6.0	1336
6.4	1600
6.6	1472
6.8	1480
7.0	1470
7.2	1430
7.6	1430
8.0	1420
8.4	1400
Czapek's agar 7.0	1120
Czapek's agar (soil distilled) 7.0	1948
Glucose agar 7.0	1544
Nutrient agar 7.0	1120

この結果から Casein 寒天の pH の変化による差はほとんど認め難い。尙 *Streptomyces* の純粹培養に於いて、この Colony 数から適否を判断するのは早計であるが、土壤を加えて蒸溜した蒸溜水にて調製した Czapek's 寒天に発育した Colony 数が他よりやや多く、発育が最も良好で純粹培養には最も適していると思われる。

(2) 実験方法及結果

Streptomyces C 45 (仮番号) の抗菌性を利用して細菌の発育を阻止し、放線菌のみの発育を期待して、予め *Streptomyces* C 45 (仮番号) を Casein 寒天に 27°C 4 日培養しておき、土壤 1 g を滅菌水にとり、100 倍に稀釈して、滅菌濾紙にて濾過した後、その 3 白金耳を第 6 表に示す培地 (45°C に冷却) に入れ、これを予め *Streptomyces* C 45 (仮番号) を培養した平板の上に重層培養し、第 6 表の結果を得た。

これらの実験で Casein 寒天はその pH が酸性に傾くとカビが発育し、アルカリ性に傾くと細菌の発育が見られ、pH 6.6~7.2 ではその発育を見ず、pH 6.8 及 7.0 は培地に表れた *Streptomyces* の発育が最も良好で、分離培地として、Casein 寒天を使用する場合 pH 6.8 が最適と思われる。尙この実験で Casein 寒天が分離培地として優れていること及増菌を目的とした場合は土壤を蒸溜して作った蒸溜水にて調製した Czapek's 寒天の方が優れていることを確認した。

Table 6. Comparison of appearance on the different pH casein agar cultured by double culture method.

Media	pH	Colonies No. streptmyces	Colonies of others
Casein agar	6.0	++	Fungi ++
	6.4	++	Fungi ++
	6.6	++	
	6.8	+++	
	7.0	+++	
	7.2	+++ Colonies smaller than pH 6.8	
	7.6	+++	Bacteria +-
	8.0	++	Bacteria +-
	8.4	++	Bacteria +-
Czapek's agar	7.0	++	Bacteria +-
Czapek's agar (soil distilled)	7.0	++	Fungi +-
Glucose agar	7.0	+	Bacteria ++
Nutrient agar	7.0	+-	Bacteria ++

4 Aureomycin (AM) の使用

AM溶液を分離培地に加えるか、培養前に土壌をAM溶液に浸漬することにより、細菌の発育を阻止し、放線菌の分離に便ではないかと思つてAM溶液を使つて放線菌の分離を試み、この結果思はしくなかつたので *Streptmyces* の発育に及す、AMの影響について実験した。

a) 分離培養えの使用

実験方法及結果

土壌1gを Bouillon に入れ、振盪して30分后その上澄1mlを9ml Bouillon に入れ、これに 5×10^{-4} (g/ml) AM 1mlを加え、よく振盪して90分放置して、その1mlをブドウ糖寒天を用いて培養時 5×10^{-4} (g/ml) AM 1mlを加えて27°C 4日培養し、次の結果を得た。

Table 7. Comparison of appearance on the media by the steeping in aureomycin solution.

Soil of	Steeped in AM 5×10^{-5} (90min)		Did not steep AM	
	AM added media	AM absence	AM adedd media	AM absence
Cave	Fungi 2	Fungi 7 Bacteria 5	Fungi 5 Bacteria 2	Bacteria 2×10^3
Foot of mountain	Fungi 13	Fungi 14 Bacteria 57	Fungi 21 Bacteria 51	Fungi 3 Bacteria 5×10^2
Cultivated ground	Fungi 30	Fungi 36 Bacteria 15	Fungi 43 Bacteria 33	Fungi 6 Bacteria 5.4×10^2 Streptmyces 5
Graveyard	Fungi 44	Fungi 46 Bacteria 1	Fungi 46	Fungi 6 Bacteria 2.1×10^2 Streptmyces 8
Total	Fungi 89	Fungi 103 Bacteria 78	Fungi 115 Bacteria 86	Fungi 12 Bacteria 2.2×10^3 Streptmyces 13

第7表の如くAM溶液に浸漬するか、培地にAM溶液を加えたものは細菌の発育は抑制されて Colony 数は少いがその反対にカビの発生が多い、このカビは発育は良好ではなく、AMはカビの生長促進因子として働くのではなく、細菌の発育が抑制された結果、カビの発芽が促進されたものと思はれる。

Streptomyces はAM溶液に浸漬した場合も、これを培地に加えた場合も発育して来なかつた。これはAM溶液が濃厚であつた為によるものか、尙他の培地についても実験しなければ不明であるが、*Streptomyces* の分離培養にAMを使用することは、カビの発芽を促進し不便であつた。

この結果を最初の細菌数とAM処理後の残存細菌数との比をもつて、その抵抗力を表し、その分離場所の湿度との関係を参考までに示すと次表の如く、他に比較し湿度10%以上高かつた洞穴内即高湿度で日光及風を受けない場所で分離した細菌はAMに対する抵抗力が最も弱い結果を示した。

Table 8. Survive percent of bacteria by the different part of humidity.

Part	Humidity (%) (Temp.)	Survive percent	
		AM 5×10^{-5} Steeped 90min	AM 5×10^{-5} Added media
Cave	69 (19°C)	0.16	0.07
Food of mountain	54 (21°C)	3.8	3.4
Cultivated ground	59 (22°C)	2.8	6.1

b) *Streptomyces* の発育に及ぶAMの影響

実験方法及結果

著者が分離した *Streptomyces* 101, 102株 (ともに仮番号) の孢子懸濁液 (Bouillon pH

7.0) を作り、この 1 ml をAM濃度 0.2×10^{-5} , 5×10^{-5} , 8×10^{-5} , 10^{-4} , 2×10^{-4} (g/ml) の Bouillon に接種して 24°C 4日振盪培養してその結果を観察し次の結果を得た。

Streptomyces 101株 (仮番号) は Bouillon 中に、マリモ様球状に発育した。その大きさはAM濃度 5×10^{-5} 及 2×10^{-5} ではAMを加えない Bouillon 中に発育したものより、遙かに大きくAMによる

Table 9. *Streptomyces* growth change on the different aureomycin concentration of media by shake culture.

Shake cultured on 27°C 4 days.

Str.	AM concns. (g/ml)	Change of media	Diameter of growth (mm)
101	2×10^{-4}	Faint white brown	1
	1×10^{-4}	Faint white brown	1
	8×10^{-5}	Faint white brown	3
	5×10^{-5}	Faint white brown	10
	2×10^{-5}	Faint brown	12
	absence	Faint white brown	3
102	2×10^{-4}	Faint yellow brown	1
	1×10^{-4}	Faint yellow brown	12
	8×10^{-5}	Faint yellow brown	12
	5×10^{-5}	Faint brown	25
	2×10^{-5}	Faint brown	8
	absence	Faint brown	18

発育促進が見られる。*Streptomyces* 102株(仮番号)は綿様塊となり発育した。その大きさはAM濃度 5×10^{-5} のみ、AMを加えない Bouillon に発育したものより大きく、その発育促進が見られるが、他の濃度のものはいずれもその発育の抑制が見られる。

これらから *Streptomyces* の振盪培養に際し、培地に適当濃度のAMを加えるとその発育促進作用があり、不適當濃度の場合はその発育を抑制される。その適当濃度は菌株による異なるが 5×10^{-5} (g/ml) 位と判断される。

摘 要

各地の地表下10~20cm の土壌から抗菌性有効放線菌株の探索を目的とし分離培養した結果

1) Czapek's 寒天に指示薬を加えて着色し、探索の便を計つたが大した効果はなかつた。

2) 分離培地としては *Streptomyces* の発育率の高い Casein 寒天が適している。

3) Casein 寒天の pH が酸性に傾くとカビの発育を伴い分離には極めて不適當で、逆にアルカリ性に傾くと細菌の発育が多くなり、最適 pH は6.8である。

4) *Streptomyces* を予め27°C 4日培養し、その上に重層培養して、分離を試みた場合、結果は良好であつたが、先に土壌より分離培養したものに *E. coli* の重層培養を試みたものは、良い結果を得なかつた。

5) Aureomycin を分離培養時、培地に加えるか、分離前処理として Aureomycin 溶液に浸漬した場合、カビの発芽が促進され、Aureomycin を分離培養に使用することは不適當である。

6) *Streptomyces* を振盪培養する場合、培地に適当濃度の Aureomycin を加えると発育促進作用があり、不適當濃度の場合には抑制される。

この適当濃度は菌株により異なるが 5×10^{-5} 位である。

文 献

- 1) FLEMING, A. 1929. *Brit. J. Exp. Path.*, **10**, 226.
- 2) SCHATSS, A., E. BUGIE and S. A. WAKSMAN. 1944. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **55**, 66.
- 3) 梅沢浜夫・田崎忠勝・福山節子: 1952. *J. Antib.*, **5** (9).
- 4) 池田庸之助・平井豊次・西巻貞一: 1950. *J. Antib.*, **3** (11), 726.
- 5) 緒方 浩一: 1950. *J. Antib.*, **3** (7), 440.
- 6) 相磯和嘉・宮本高明・柳沢文徳・新井正・林誠: 1950. *J. Antib.*, **3** (2), 87.
- 7) 細谷 省吾: 1952. *J. Antib.*, **5** (8), 452.
- 8) ROUTINE, J. B., A. C. FINLAY. 1952. *Bact. Rev.*, **16** (2), 51.
- 9) 石坂 音治: 1951. 微量瓦斯拡散分析提要. 柴田化学器械工業.
- 10) 中沢鴻一・藤井繁弘: 1951. 農化, **27** (5), 253.
- 11) BREED, R. S. 1948. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 6th ed. The Williams and Wilkins Co.
- 12) WAKSMAN, S. A. and H. A. LECHEVALIER. 1953. *Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics*. The Williams and Wilkins Co.