

嫌氣性窒素固定菌に關する二三の實驗

(農學及園藝 第六卷第八號 昭和六年八月發表)

板 野 新 夫
荒 川 左 千 代

一、緒 言

單獨に遊離窒素を固定する細菌のうち其作用の最も顯著なるものは、好氣性に屬する *Azotobacter* 及び嫌氣性に屬する *Clostridium pastorianum* である。*Azotobacter* に關する研究業績⁽¹⁾は廣汎に涉つて報告されてゐるに拘はらず *C. pastorianum* に關する研究業績は是れに比較して僅少なるものゝ如く考へられてゐる。

Clostridium pastorianum は一八九三年 WINOGRADSKY⁽²⁾に依つて、土壤中より純粹に分離培養されたるものであつて、扁性嫌氣菌に屬し、糖類を含有する無窒素培養基に於て遊離窒素を固定し、酪酸發酵を起し空氣の流通ある時には他の好氣性菌と共に棲的に發育し、其固定作用を増進⁽³⁾⁽⁴⁾すると云はれてゐる。

既に本菌の顯著なる作用に關しては、WINOGRADSKY⁽⁵⁾ OMELANSKY und SOLOVNEKOFF⁽⁶⁾ TRUFFAUT et

BESSONOFF⁽⁷⁾等に依つて主張せられ世界各地に廣汎に分布する事が明かにされてゐる。

HASELHOF und BREDEMANN⁽⁸⁾は世界各地の一五二種の供試土壤中一三七種中には、*Bac. amylobacter*として檢出し、耕地、未耕地を問はず表土、下層土に棲存すると報告し、本菌の分布と土壤反應との關係に就て TRUFFAUT et BESSONOFF⁽⁷⁾は河底土 pH 5.88 のものに是れを檢出し、WAKSMAN⁽⁹⁾は pH 6.0 以下に於て、*Azotobacter* の棲息限界 pH 價以下の酸性土壤に於ても、尙多數に棲存してゐることを記載してゐる。又 DORNER⁽⁶⁾に依れば pH 5.7 以下にて良く發育することを認めたと云ふ。

本菌の土壤中に於ける數量に關して TRUFFAUT et BESSONOFF⁽⁷⁾は *Azotobacter* 含有量 100—1000 倍に當り、1 瓦に就て 1000000 を檢定したと云ひ、DÜGGELE⁽¹⁾は好氣性窒素菌が 1 瓦當 1000000 であるに對し、嫌氣性窒素菌は 100—1000000 であると報告し、MCCOY, HUBB and FRID⁽²⁾等は肥沃なる庭土に對し 1 瓦當 1000000 以上であると算定してゐるのである。

斯の如く土壤中に於ける嫌氣性窒素固定菌が、WINOGRADSKY に依つて最初に決定されて以來、諸種の細菌學的研究が行はれた結果、*Clostridium pastorianum* は嫌氣性酪酸生成菌に所屬する細菌であることが判り、純粹なる *Clostridium pastorianum* の決定は至難なるものと考へられて來た。即ち從來 *Clostridium pastorianum* として類別する主要條件には、(一)紡錘型なる形態を有し、(二)酪酸を生成して、(三)グラム染色に陽性を示し、(四)熱に對する抵抗力が強く、(五)膠質溶解性なく、(六)扁性嫌氣性なること等が列擧されてゐたが、併し、是等の諸條件は所謂嫌氣性酪酸菌の通性であつて、*Clostridium welchii*, *Cl. tetanus* 等の如き病原性嫌氣菌に對しても該當するものであつた。

最近 McCoy, HIGBY and FRED⁽²⁾は更に本菌類似菌の窒素固定力を測定し、本菌は、他の *Clostridium acetobutyricum* 及び *B. saccharobutyricus* 型よりも稍強力なる窒素固定力の存在することを認め類別資料とした。

更に McCoy, FRED, PETERSON and HASTINGS⁽³⁾は酪酸生成菌の基礎的研究を遂げ *Clostridium pastorianum* の分類上の位置を鮮明ならしむる事を得た。是れに依ると嫌気性酪酸菌は *Clostridium* 属の亞群 (sub-group) であつて、酸を生成するのみならず、アルコール類の如き中性物質をも生成する澱粉粒質 (granulose) 陽性菌にて、カタラーゼを有せず、非病原性なることを特徴とし、之を更に二種の形態に分類した。

第一群は酸(醋酸及び酪酸)を最終産物とする眞生酪酸嫌気菌であつて、是れに三亞型 (sub-types) がある。即ち(一) *Clostridium pastorianum* 型、(二) *B. saccharobutyricus* 型及び(三) *species pleuritida* 型である。第二群は酪酸、醋酸、ブチール、エチール・アルコール及びアセトン等を生成する細菌であつて、*Clostridium acetobutyricum weizmann* である。尙この他に眞性酪酸嫌気菌に近似する特徴を有した細菌にて、通性嫌気菌型が存在する。これは普通醋酸、エチール・アルコール時にアセトンを生じて酪酸を生成しない。所屬するものに *Aerobacillus polymyxa praznowski* を代表的なものとした。此研究結果 *Clostridium pastorianum* 型を他の類似菌より類別せんとするには、培養的諸條件として所謂酪酸菌の特徴以外に、(一)リトマス牛乳に對して發育が不充分で變化に乏しい事、(二) Corn mash 培養基に對して Mash を溶解せずして少量の瓦斯を發生し、酸の生成が極めて遅延する等を追加する必要が認められた。

従つて實驗上土壤中に棲息する *Clostridium pastorianum* のみの數量を算定することは不可能なることに屬し、單に嫌気性窒素固定菌として其概數を知るを以つて満足とせねばならぬ。

曩に山縣博士⁽⁴⁾等は本邦土壤に於ける本菌の分布狀態を調査せんとして形態、澱粉粒質反應の鏡檢及び培養中に於ける酪酸の存否等の簡易なる方法に従つて、二八四種の供試土壤を検査し興味ある結果を報告された。それに依ると、水田にて九五%、畑地にて八八、一%の分布率を有し、Azotobacterの分布率たる水田の三二、八%及び畑地の三三、七%より遙かに廣汎なる分布率を示すことを認められたのであるが、併し本菌はAzotobacterよりも窒素固定能力が著るしく低いので、之を利用することは困難であると附言された。

然共我々は(一)本菌は好氣性窒素固定菌より遙かに其含有量が多く、(二)殊に本邦水田の如く多濕なる土壤に於ては環境が屢々通性又は扁性の嫌氣的狀態に保留さるゝことが多いので、單獨に又は好氣性窒素固定菌と共に活動する狀態を明かにすることが必要であると共に、(三)本菌がAzotobacterの限界pH 5.8-6.0より尙酸度高き土壤に於ても、棲息分布することは好都合な點であると思ふのである。即ち著者等⁽⁵⁾の測定した結果に依ると、本邦耕土の水素イオン濃度は平均pH 6.8を示し、微酸性を呈してゐてAzotobacterに對しては、限界pH 價に近いpH 價を有してゐるので、本菌類の數量を知ることが意味のあることゝ云はねばならぬ。

茲に我々は上記の注意をひく諸點に對して二三の實驗成績を得たので其概要を參考のために報告せんとするものであるが、尙本研究は引續いて進行中に屬してゐる。

二、實 驗

一、嫌氣性窒素固定菌の土壤中に於ける數量及び其水素イオン濃度との關係

實驗方法

(一) 培養基 本菌の數量計算に供したる培養基は Winogradsky の無窒素培養基を改良したるものであり、凡そ次示の如き成分を有する様に調製した。

酵母菌加用	1.0 瓦	硫酸	酸	糖	糖
鹽基性磷酸加用	1.0 瓦	葡	葡	糖	20.0 瓦
硫酸	0.2 瓦	天	天	天	15.0 瓦
鹽化	0.1 瓦	蒸	水	水	1000.0 瓦

本培養基は約 pH 7.0 に調節し、試験管に高層培養用として注入し、之を高壓殺菌器中にて一五封度壓に一五分開殺菌した。

(二) 供試土壤 供試土壤は當研究所々藏の氣乾狀態のものにて鳥取縣土壤二點、神奈川縣土壤、岡山縣土壤、福井縣土壤、福島縣土壤、朝鮮土壤、臺灣土壤及び北海道土壤各一點の外に當大原農業研究所土壤二點を新鮮狀態にて使用した。又其水素イオン濃度はキンヒドラン法に依つて測定し⁽¹⁶⁾ pH 價として記載した。

(三) 數量算定法 供試土壤一〇瓦を一〇〇ccの殺菌水を有するフラスコ中に秤量し、約五分開手にて振盪したる後之を八〇度の水溶液中に浸漬して、二〇分開低温殺菌を行ひ無孢子菌を死滅せしめた。是れを原液となして其一ccを殺菌ビベットにて別器の殺菌水に漸次稀釋し、この所定稀釋液を豫め溶解し、約四〇度に冷却して置いた上記の培養基に一cc宛接種し、充分混合して直ちに冷水中に於て固化せしめた。其稀釋度は $1/10^1 - 1/10^{100000}$ である。

然る後之を二八度の定溫器内に納め二三日間置きに取出して、培養試験管を觀察した。其際瓦斯を發生して寒天に

龜裂を生ぜしめたる聚落を、一個の細胞と假定(第一圖参照)して常法に従つて算定し、土壤一瓦當に換算した。今一四日間保温したる結果を示せば第一表の通りである。

第 1 表 嫌氣性窒素固定菌の數量

實驗番號	土 壤 摘 要	pH 價	土壤1瓦當 細菌數	實驗番號	土 壤 摘 要	pH 價	土壤1瓦當 細菌數
1	鹿 取 土(田)	5.95	90,000	7	福島砂 壤 土(田)	5.13	4,000
2	鹿 取 土(田)	7.51	13,000	8	朝 鮮 土(田)	6.28	13,000
3	神奈川畑實壤土(田)	6.40	5,000	9	臺灣砂岩質壤土(田)	6.31	7,000
4	岡山砂 壤 土(田)	5.33	1,500	10	北海道 壤 土(田)	6.00	17,000
5	島根 壤 土(田)	6.07	200	11	倉敷砂 壤 土(田)	7.20	120,000
6	福井 壤 土(田)	7.51	17,000	12	倉敷砂 壤 土(田)	6.25	480,000

備考 倉敷砂壤(田)に水分13%、同(田)に水分5%を示し他は水分12%であつた。

第一表に明な如く一二種の供試土壤に就ては、例外なく嫌氣性窒素固定菌の存在を認めたが、併し其含有量は種々變化があつて、氣乾土壤に於ては一瓦當二〇〇—九〇、〇〇〇を算し、新鮮土壤に於ては畑地にて二二〇、〇〇〇、水田にて四八〇、〇〇〇を有して畑地は水田の恰も1/2に該當するが如き數字を得た。この水田土壤は水稻跡(刈取後)の乾田であり畑地土壤は白菜栽培中であつた。

この兩土壤に對しては同時に好氣性窒素固定菌を扁平法に依つて測定したが畑地土壤にて五二、〇〇〇、水田土壤にて五一、〇〇〇を示し殆ど大差を示さなかつた。是れに依つてみるのに嫌氣性窒素固定菌は畑地土壤にて好氣性窒素

固定菌の約二倍水田土壤に於ては約六倍の多數にて存在することを知つた。

更に其窒素固定力を検定するためにマンニツト無窒素培養液 (Ashby) を用ひて算定したのに一五日間に於て其指數は畑地土壤にて一三、水田土壤にて一〇であつた。

又本表に依つて土壤 pH 價と細菌數量との關係をみるのに Azotobacter が pH 5.8 6.0 を限界とするが如き判然たる關係を認むる事を得なかつたが殊に注目すべきことは pH 5.3 の如き酸性土壤に於ても尙相當の細菌が存在する點であつた。McCoy⁽¹²⁾等の検定する所に依ると、直接鏡檢法に依つて一〇億を算定した Clostridium pasteurianum も、是れを稀釋法に従つて算定する時は其 10^{10} に當る一、〇〇〇、〇〇をしか計算し得なかつたと云ふのであるが、是れより推定する時は土壤の所含量は、但し巨大なるものでらうと考ふる事が出来る。

次に是等嫌氣性窒素固定菌は普通培養基に發育する細菌數量に比較して、如何なる割合に存在するかを對照するため、別に測定した結果と綜合してみれば第二表に示す通りである。

第 2 表 土壤中に於ける細菌數の對照

細菌數	畑地土壤	水田土壤	細菌數	畑地土壤	水田土壤
普通細菌總數	29,500,000	25,800,000	好氣性纖維素分解菌	12,000	14,200
膠質溶解菌	6,500,000	5,100,000	硝酸鹽元菌	12,700,000	14,200,000
嫌氣性嫌氣菌	—	1,300,000	好氣性窒素固定菌	52,000	51,000
色素生成菌	3,400,000	1,400,000	嫌氣性窒素固定菌	130,000	480,000

第二表に於て殊に興味ある點は、畑地土壤と水田土壤との所含細菌數に於て大差なきに拘はらず嫌氣性窒素固定菌の數量は判然と相異なること、及び硝酸還元菌の極めて多數に存在する點である。

11. *Clostridium Pastorianum* の純粹分離

三〇〇ㄩの三角瓶に下記の如き成分を有する WINGRADEKY 無窒素培養液を一五〇ㄩ注入し綿栓を施したる後高壓殺菌器を以つて一五封度壓にて一五分間殺菌した。

培 養 基

鹽基性磷酸加里	1.0 瓦	硫酸	糖	0.01 瓦
硫酸苦士	0.3 瓦	葡 萄 糖		20.0 瓦
鹽化曹達	0.01 瓦	蒸 溜 水		1000.0 瓦
硫 酸 鐵	0.01 瓦	炭 酸 石 灰		30.0 瓦

備考 炭酸石灰別に殺菌し後混合する。

かく調製した培養液に數量算定の際發育せしめたる高層培養より、試験管の下底を破損して寒天の一片を接種し是れを二八度に保溫して置く。然る後數日間醗酵させて強力なる酪酸の臭氣を發するに至るを待ちて、是れを八〇度の水浴中に浸漬して約二〇分間低溫殺菌し、その一部分を更に同培養液に接種し數回是れを繰返した。之を粗培養菌株とする(第三圖参照)。かゝる粗培養菌株には尙好氣性グラム陽性菌等を附隨するのであるが是れは本菌より Crystal violet 2% 對して鋭敏に制限され易いのでこの性質を利用して除去することが出来る。即ち同培養液に 1:50,000乃至 1:100,000

の濃度に Crystal violet を加へた液に二―三回移植し培養を繰返すのである。かくして可及的に好氣性孢子菌を除去し得たならばこの菌株を嫌氣的扁平培養法を施して、聚落を形成させる。

嫌氣的扁平培養を行ふには〇、五％葡萄糖加ペプトン肉汁寒天を培養基として用ゆる。

培 養 基

ペプトン	5.0 瓦	葡 萄 糖	5.0 瓦
肉エキス	3.0 瓦	蒸 溜 水	1000.0 瓦
寒 天	15.0 瓦		

培養基は常法に従つて試験管に注入し高壓殺菌器にて一五封度壓に一五分開殺菌する。この培養基に上記の如くにして得た本菌の孢子懸浮液を稀釋的に接種し常法の扁平培養となしたる後著者等の改良した⁷⁾ Morse-Kopeloff 嫌氣培養法を適用するのである。

本法は同直徑のペトリー皿を二個選び交互に合致させて一組となし、之を常法に従つて乾熱殺菌したるものであつて一方のペトリー皿に先づ扁平的に接種したる後充分固化せしめ、是れを反轉し、他のペトリー皿には消毒脱脂綿を少量置きその上に〇、五―一、〇瓦のピログロールをのせ一〇％苛性加里液を一〇―一五蟬注加して可及的迅速にペトリー皿を合致させ、その合致點を電氣用のテープにて數回巻つけ通氣を充分に遮斷するのである。

是れを二八度の定溫器内に納めて置く時は數日にして培養基上に小型の聚落を生成するに至る(第二圖参照)。

Clostridium pastorianum 聚落の表面聚落を成すものは大體圓形にて幾分丘狀 (raised) を呈し、濕性であつて色は

クリーム黃色を呈する。組織は粒狀 (granular) にて周圍は全縁 (entire) である。深部聚落にあつては瓦斯を保留するものがある。

この特徴ある聚落より純粹なる菌株を得ることが出来る (第四圖參照)。尙念のために好氣的に扁平培養を行つて雜菌の有無を檢定する要がある。

本菌は是れを鏡檢するのに極く幼若なる菌株は沃度にて黃色に染色された桿狀を呈するが、孢子形成菌は細胞が膨張して所謂紡錘型 (Clostridia) を呈し、澱粉粒質 (starch) は沃度に依つて青紫色に染色される。併し成熟するに至るとこの反應は漸次消失して來る。多分この澱粉粒質は貯藏物質であつて孢子形成に消費さるゝものであらうと云ふ。勿論紡錘型は常型であつて、之には多少の變型を伴ふのが普通である。大さは $12 \times 40\mu$ が普通であつてグラム染色に對して陽性、老細胞は陰性を呈する。鞭毛は周縁毛 (Peritrichia) にてよく運動する。孢子は卵型又は近圓型であつて成熟すると細胞の中央部から末端の方に移行する。

かくしてこの菌株を更にリトマス牛乳及び Corn mash 培養基にて試験し、他の類似菌と類別し遂に純粹なる菌株を得た。

三、總括

本文は嫌氣性窒素固定菌に關する二三の實驗を記載したるものであつて、今その成績を要約すれば次の通りである。

1、pH 5.33-7.51 を有する本邦土壤一二種に就きて嫌氣性窒素固定菌の數量を測定した。其結果氣乾土壤に於ては一瓦

當二〇〇—九〇、〇〇〇を算し、新鮮土壤に於ては畑地にて一二〇、〇〇〇、水田にて四八〇、〇〇〇であつて、これは好氣性窒素固定菌の約二倍及び約六倍に該當する數量であつた。

二、土壤の水素イオン濃度と數量との關係は檢定することが出来なかつた。

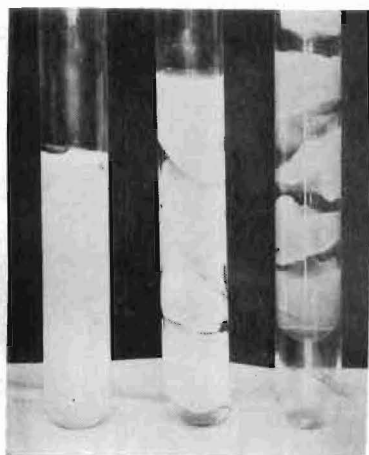
三、水田土壤と畑地土壤との細菌數量の比較對照に於て殊に嫌氣性窒素固定菌は、この割合を示し、他と違つて判然とした。

四、*Clostridium pastorianum* の純粹分離法を詳細に記述した。

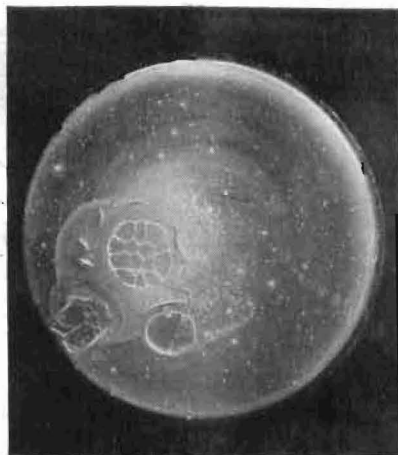
参 考 文 獻

1. WAKSMAN, S. A., Principles of Soil Microbiology 1927.
2. WINOGRADSKY, S., Compt. Rend. Acad. Sci., 116:1385 1388, 1893. 118; 353, 1894.
3. ORELANSKY, V. L., Arch. d. Sci. Biol., 18: p. 327 338, 1915.
4. TRUFFAUT, G. et BEZSSONOFF, N., Science du Sol. T. 6; p. 24 52, 1927.
5. WINOGRADSKY, S., Arch. d. Sci. Biol., T. 3: 297 352, 1894 1894 1895.
6. ORELANSKY, V. L. und SOLOUNSKOFF, M., Arch. d. Sci. Biol., T. 18; p. 459 482, 1915.
7. TRUFFAUT, G. et BEZSSONOFF, N., Compt. Rend. Acad. Sci., T. 181: P. 165 167, 1925.
8. HASSELHOF, E. und BREDEMANN, G., Landw. Jahrb., 35: s. 381 414, 1906.
9. DORNER, W., Landw. Jahrb., Schweiz. 1: 28, 1924.

10. TRUFFANT, G. et BKZSSONOFF, N., (Compt. Rend. Acad. Sci., T. 112, P. 319 1322, 1921.
11. DÜGGEL, M., Zeit. f. For t. Schweiz, 1923.
12. MCCOY, E., Higby, W. H. and Fred, E. B., Central J. Bakt., Abt. II, Ed. 76:314 320, 1928.
13. MCCOY, E., Fred, E. B., Peterson, W. H. and Hastings, P. G., Jour. Infect. Dis., Vol. 46:118, 1930.
14. 山縣宇之吉 齋藤圭一 村井彬次郎 細菌に依る遊離窒素利用研究報告 第二號 大正十四年
15. 坂野新夫 荒川左千代 土肥科學雜誌 第四卷 四五頁 昭和五年
16. 坂野新夫 荒川左千代 松浦章 日本農業化學雜誌 第五卷 九百八十四頁 昭和四年
17. 坂野新夫 荒川左千代 日本農業化學雜誌 第六卷 九百九十六頁 昭和五年



第1圖 嫌気性窒素固定菌の高層培養
左:無接種(標準)中:第二回稀釋接種
右:第一回稀釋接種(28度7日間培養)



第2圖 *Clostridium pasteurianum* の粗聚落
(Morse-Kcpeloff 嫌気培養改良法に依る)
(28度3日間培養) $\frac{2}{3}$ 倍



第3圖 *Clostridium pasteurianum* の粗培養 (28度7日間培養、800倍) 墨汁染着標本

(Phot. ARAKAWA)



第4圖 *Clostridium pasteurianum*
(23度3日間培養、1500倍) 墨汁染着標本