

細菌及び糸状菌培養液における結晶生成

長崎大学医学部細菌学教室 (主任: 青木義勇教授)

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉 登教授)

長崎市中央保健所 (所長: 大利茂久博士)

釘 田 芳 文
くき た よし ぶん

Kristallbildung in Bakterien- und Schimmelpilzkulturflüssigkeiten. Yoshifumi KUGITA. Bakteriologisches Institut der Medizinischen Fakultät, Nagasaki Universität (Vorstand: Prof. Yoshio AOKI), Pathologische Abteilung, Forschungsinstitut der Endemischen Krankheiten, Nagasaki Universität (Vorstand: Prof. Noboru TOKURA), und Städtische Sanitätsbehörde zu Nagasaki (Direktor: Dr. Shigehisa OHRI).

本論文の要旨は、昭和35年7月20日(札幌)、日本細菌学会第33回総会において報告した。

緒 言

陳旧培地、特に培養後室温に数日間放置した平板や、保存菌株の寒天斜面内部にガラス片を突刺したような結晶性物質を認めることは決して稀ではなく、古く HEIM の教科書や BUCHANAN and FULMER の著書 (1928) にその記述があり、Bergey's Manual (1957) にも Calcium carbonate 生成菌 2 種 (*Pseudomonas calcis* 及び同 *calciprecipitans*) が記載され、また近年これの本質に関する独立した研究報告数編が公にされている。

この培地内における結晶生成について特に詳細な研究を行なったのは HEWITT であって、氏は *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* による Calcium carbonate 結晶生成について報告した。LEMBKE and LÜCK は培養した寒天培地に生じた結晶を分析し、それが Triple Phosphate $Mg(NH_4)PO_4 \cdot 6H_2O$ に他ならないことを述べ、*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* における小結晶の生成についても触れた。また GIRARD は *Pasteurella pestis* の培地中の結晶が P, Mg 及び塩基性窒素たる Trimethylamine を含んでいることを述べ、更に最も新しい文献として、UEHLEKE は *Proteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* などを中心

筋浸出液加寒天培地で培養した結果ある種の結晶の生成を認め、それが Triple phosphate であること、及び *Proteus* の一菌株 (L-18) によっては特に Trimethylammonium phosphate $Mg [NH(CH_3)_3]PO_4 \cdot 6H_2O$ と推定される物質が生成されることを報じ、長谷川は主題を好塩性細菌に限定し、化学的光学的検索の結果それが生成する結晶は Calcium carbonate ではなく磷酸マグネシウムアンモン $MgNHPO_4 \cdot 6H_2O$ であること、その生成に培地の組成が密接な関係があり、ペプトン水では不可能であり、肉汁、魚肉を主成分とするブイヨン、特にこれに $MgPO_4$ を添加したものに著明に生成されることを述べた。

著者はたまたま、魚肉に起因すると思われる食中毒例よりの分離一菌株について、魚肉浸出液をもってする人工汚染実験中、コノベンの底部に長さ 0.5~1.0mm、幅 0.1~0.5mm の小棒状多面型で、透過光線によると一見ガラスの微細破片のように輝く結晶様物質がかなり多量に析出しているのを認めた。よってこの結晶様物質の性状及び生成について二、三検討を加え、漸次他の菌株についても実験を重ね研究を進展せしめ、結晶生成の有無、生成条件或は組成等についてある程度知ることを得たのでここに報告する。

I 細菌培養による結晶の生成

菌株と培地

好塩菌。長崎市中央保健所で某集団食中毒の一事例

検索時分離した好塩性の *Pseudomonas* に所属すると思われる菌株のうちの MP 2 株。滝川等が食中毒より分離した病原性好塩菌 N 4 株、藤野等がシラス食中毒より分離し共に患与を受けた病原性好塩菌 EB 102 株の 3 株。

腸内細菌。著者が小児下痢症から分離した *E. coli* 0-125。糞便、水、牛乳に由来するそれぞれ 2 株の *E. coli*、計 7 株。*Sh. sonnei*、*S. enteritidis* 各 1 株、*Proteus* 5 株 (OX19, 糞便、牛乳由来各 2 株)、ほかに *Citrobacter* M 1 株 (未確定)、以上計 15 株。

Staphylococcus aureus. 食中毒から分離した 1 株 (YK 株) と教室保存の寺島株。

培地は常法によって製した (1) 肉エキスブイヨンと (2) 肉水ブイヨンを基本とし、これよりペプトンを除いたもの (3) (4) と、肉エキスや肉水を用いないペプトン水 (5) (6) を参考に用いた。肉エキスは極東鰹エキス、肉水は牛肉より自製。ペプトンは (1) (2) (5) 極東ペプトン、(6) はポリペプトン (武田)。食塩の含量はすべて好塩菌に対する場合 3%。その他の菌 0.5%、pH は一律に 7.2 に調整した。

1. 結晶生成と培地との関係

前記 6 種液体培地を 300ml 容コルベンに 200ml づつ分注、高圧滅菌 (15Lb, 15分)、上述の供試菌 20 株を移植後時々手振り振盪を試みつつ 37°C に 3 日間培養、室温 (10~15°C) または氷室 (4~5°C) に置いて結晶の生成を待った。以上の液体培地の他 (1) (2) に寒天を加えた固形培地中試験管斜面にも比較にまで菌を接種発育せしめ、それぞれ 1 ヶ月にわたり観察を行ったところ全株に結晶の生成をみた。これらの菌株より *Pseudomonas* MP 2 株、*E. coli* 0-125、*Citrobacter*

第 1 表 結晶生成と培地との関係

| 培地 | ブイヨン | | 同 (ペプトン欠) | | ペプトン水 | | 普通寒天 | |
|----------------------|------|----|-----------|-----|-------|------|------|----|
| | エキス | 肉水 | エキス | 肉水 | (極東) | (ポリ) | エキス | 肉水 |
| MP2 | + | + | + | + | - | - | + | + |
| <i>E. coli</i> | + | + | + | + | - | - | + | + |
| <i>Cit. M1</i> | + | + | + | + | - | - | + | + |
| <i>Staph. aureus</i> | + | + | (-) | (-) | - | - | + | + |
| <i>Pr. OX19</i> | + | + | (-) | (-) | - | - | + | + |
| 無菌 | - | - | - | - | - | - | - | - |

備考：+は結晶生成、-は同生成せず、() は菌発育不良。培地の食塩含量は MP2 に対してのみ 3%、その他は 0.5%

M1, *Staphylococcus aureus* YK, 及び *Proteus* OX19 を代表として選び、その成績を示したものは第 1 表である。

ブイヨンでは鰹エキス、肉水使用培地共にいずれの供試菌株も極めて良く発育する。培養後室温放置の場合いずれにおいても結晶の生成があるが、MP 2, *E. coli*, M1 の各株では 1~4 日目に結晶の生成を認めることが出来、4~5°C に放置した場合も結晶生成の時間に大差はないが MP 2 株においてそれが多少短縮される。*Staph. aureus*, *Proteus* OX19 では培養後氷室保存によって結晶が生成されず、室温保存 18 日以後に始めて結晶の生成を認めた。このブイヨンよりペプトンを除いても MP2, *E. coli*, *Cit. M1* の 5 株は発育良好で、また結晶の生成を認めるが、*Staph. aureus*, *Proteus* OX19 の 2 株は発育が悪く、室温氷室共に結晶の生成を認めることが出来なかった。これに反して両種のペプトン水では発育可能であって結晶の生成なく、結晶の生成に肉の抽出成分の存在が必要であることはこの点より判る。普通寒天でも結晶の観察は可能であった。菌接種 18 時間培養後室温に放置したところ 1 週間目頃より斜面内部に結晶の生成が認められた。これを透過光線で観察すると MP 2 株の場合結晶は斜面内部全般に散布された形で存在し、*E. coli*, *Cit. M1* ではこれが菌苔の底部に接するが如く平面的に散在しそれ以下の培地層には見られない。*Staph. aureus* と *Proteus* OX19 の場合は菌苔の底部より深部へ向って細長く挿入された形でこれが認められ、一見寒天の亀裂かまたは菌が寒天内部へ発育刺入したかの感を受ける。

2. 培養後の結晶生成の条件

上述のとおり完全なブイヨンによる場合供試菌全部に結晶生成を認めることが出来たので、以下は鰹エキスブイヨンを代表として選び先ず培養条件の検討を主体に二、三関連事項につき実験を行なった。即ち木培地を 200ml づつ三角コルベンに分注し高圧滅菌後各供試菌を移植所定の培養を行なった後、保存温度差による結晶生成の有無、滅菌後の結晶生成の有無、遠心分離及び除菌の影響、液性との関係について観察した。先ずその過程や結果を第 2 表に示し、以下各項目につき説明を加える。

(a) 保存温度差による観察

上記の移植培地を氷室、室温及び孵卵器内 (37°C) に保存し結晶の生成如何を観察した。氷室及び室温保存の場合は既述のとおりであるのに対して孵卵器内放

第2表 結晶生成の条件 (処理法, 保存法との関係)

| 処 理 法 | 保 存 法 | 結 晶 生 成 | | | | | | |
|-------------|--------------|---------|---------------|-------------|---------------|--------------|---|---|
| | | MP2 | <i>E.coli</i> | <i>Cit.</i> | <i>Staph.</i> | <i>Prot.</i> | | |
| | 氷 室 | + | + | + | - | - | | |
| | 室 温 | + | + | + | + | + | | |
| | 37°C | + | + | + | + | + | | |
| | 加熱 60°C, 30' | + | + | + | - | - | | |
| | " 100°C, 30' | + | + | + | - | - | | |
| 培 養 (3日) | 遠心分離 | 上 清 | 氷 室 | + | + | + | - | - |
| | | | Seitz 濾 過 | 氷 室 | + | + | + | - |
| | 沈 澱 | 氷 室 | + | + | + | - | - | |
| | | 氷 室 | + | + | + | - | - | |
| pH7.2 補正 | 氷室, 室温 | (+) | (+) | (+) | - | - | | |
| pH4.0 補正 | 氷室, 室温 | - | - | - | - | - | | |

備考: (+) は室温でのみ結晶生成, ほかに多量の菌体を移植したまま培養に付さず氷室に置いた対照, 及び培地のみの対照実験 (氷室, 室温, 37°C) を行ったが結晶の生成を認めなかった。

の場合は可成り遅れて結晶の生成がみられた。つまり MP2, *E. coli*, *Cit.* M1 では10~14日後に, *Staph. aureus* と *Proteus* OX19 では21~24日目頃に結晶の生成があり, 前3菌が氷室及び室温1~4日であったのに対する遅延が特に著明であった。またこの胞卵器内で生成された結晶の大きさはいずれの菌株の場合も氷室, 室温のそれより結晶形が遙かに大きく, 一方数的には少数であるという差異もみられた。

(b) 滅菌及び除菌との関係

所定の培養の後60°C, 100°Cでそれぞれ30分間滅菌し, 従って発育を停止せしめた後氷室及び室温に保存し結晶の生成を観察した。MP2, *E. coli*, *Cit.* M1の3株では非加熱時と殆んど日数の差なく結晶の生成がみられたが, *Staph. aureus* と *Proteus* OX19 の場合は滅菌後1ヶ月を経ても結晶の生成を認め得ず, 前項に次いでここでも2菌群の差異が留意された。

次に培養液を3,000 r.p.m., 30分間遠心し上清及び沈澱に分離し, 上清については更に菌体を完全に除去する意味で Seitz 濾過も行い, この上清, 沈澱, Seitz 濾液を氷室に保存したところ, MP2 以下3菌株のいずれにも結晶の生成を認めたのに対して, この場合も後群2菌株では結晶の生成がなかった。

(c) 培地 pH との関係

所定の培養後 MP2, *E. coli*, *Cit.* M1 培養液の pH を検したところ 8.2~8.4を示し, *Staph. aureus* と *Proteus* OX19 ではこれが弱酸性であったので, 試みに前者

3株のそれを補正して pH 7.2 及び4.0となし, 氷室及び室温に保存し観察したところ成績の変動が認められた。即ち pH 7.2 に補正したもののうち室温に保存したものにおいてのみ結晶の生成を認め, 氷室に保存したものでは1ヶ月間観察しても結晶の生成がなかった。pH 4.0 に補正したものでは終始結晶の生成がなく, 結晶の生成に培地 pH が一つの意義を有することは確言出来る。

なお以上すべての実験に対する対照の意味で, 同一培地に多量の洗滌菌を加え, これを培養することなく氷室に30日間格納した実験と, 菌を接種しない培地の主実験に相当する条件下の放置を行い十分に観察したが結局結晶の生成は認めなかった。更にその後に行った洗滌菌体の生食水浮遊液を保存した場合及び培地を pH 8.2~8.4としそのまま放置した場合も結晶は析出せず, 問題の結晶の生成に菌体の発育が必要であることは疑う余地がない。

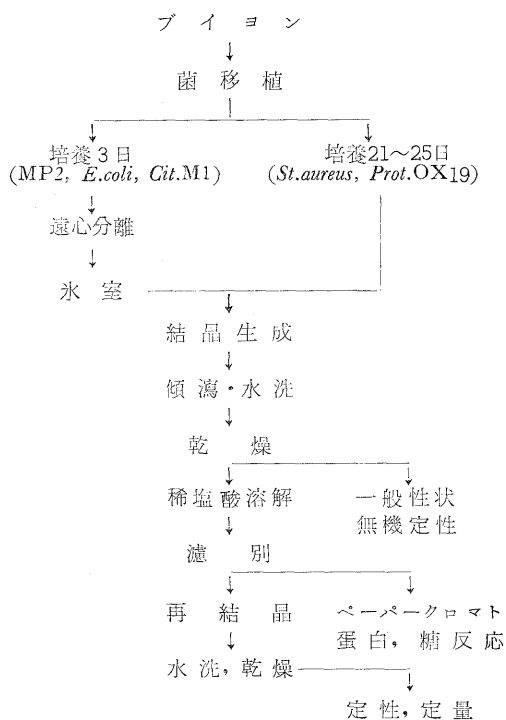
3. 結晶の分離, 精製及び組成

供試菌のうち MP2, *E. coli*, *Cit.* M1 の3株ではその既定培養液を3,000 r.p.m. 30分間遠心して菌体及び夾雑物を出来るだけ除去し, 上清を氷室に放置して結晶の生成を待った。*Staph. aureus* と *Proteus* OX19 ではそのまま長期に培養して結晶を生成せしめ, 共に上清を傾瀉により捨て, 水を加えて洗滌, 傾瀉を繰返し, かようにして取出された洗滌結晶を濾紙上に展げ余分の水を切り 45°C の乾燥器に入れ乾燥, 更に塩化カルシウムデシケターで恒量となるまで乾燥した。こ

の乾燥した結晶は各菌におけるものすべて同様に半透明白色の多面体棒状で、水及び Alcohol, Ether, Aceton 等の有機溶媒に溶解せず、また NaOH, KOH 等のアルカリ溶液にも溶解せず、これに反して HCl, H_2SO_4 , HNO_3 等の稀鉱酸及び酢酸等の稀有有機酸には極めて易溶性であった。結晶は加熱により揮発性塩基物を認めまた結晶水も認められる。熱灼時僅かに炭化するがこの炭化は恐らく夾雑物によるものであろう。更に加熱を続けると強烈な白色光を發する燃焼を確認することが出来る。

結晶を硝酸混液となし無機定性反応を行い Mg^{++} 及び PO_4^{---} を確認することが出来た。更に結晶を N/10 HCl に溶解飽和せしめ濾紙で濾別した後各種の蛋白及び糖反応を行なったがいずれの反応も陰性であり、また溶媒として水：酢酸：n-Butanol (2 : 4 : 1)、呈色は Diazo, Ninhydrin による一次元 Paper chromatography でこの供試液の展開を行なったがいずれも全く Spot を認めず、有機物の存在は大体において否定し得た。これら結晶の分離及び分析過程は第1図に示すとおりである。

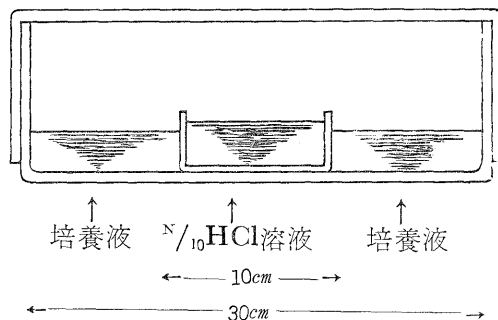
第1図 結晶の分離及び分析過程



以上の実験から無機物として Mg^{++} , PO_4^{---} を認め、揮発性塩基物、結晶水を定性的に確認すること

が出来たがなお結晶組成を認定するに至らなかったので、混入する夾雑物を除去し定量分析のために種々の方法により再結晶を試みたところ、次の方法により再結晶ができた。即ち第2図に示したように、先ず気密

第2図 再結晶に使用した装置



の状態にし得る大型シャーレ内にブイヨンを入れ菌を移植し $37^{\circ}C$ で約18時間増菌後、内部に N/10 HCl に飽和溶解した同菌による生成結晶液を入れた小型普通シャーレを装い、培養を継続したところ、この小型シャーレ内に再び結晶が生成された。この成績を得た理由として色々の考察がなされようが、培養液の塩基性物質が揮発し塩酸液中へ拡散され、等電点に達し再び結晶が析出するという考え方が最も当を得たものと思われる。

このようにして再結晶させた精製結晶は原結晶のそれよりもやや大型であるが形状及び色調等は殆んど変りはない。これを水洗乾燥した後再確認のため Mg^{++} , PO_4^{---} , 揮発性塩基性窒素(以下 V. B. N. と略記)を定性し、また更に結晶組成を推定するために窒素については元素分析を行いまた結晶水を定量した。その結果は第3表に示すとおりで、いずれの結晶からも Mg^{++} , PO_4^{---} , V. B. N. を確認することが出来る。Trimethylamine(以下 T. M. A. と略記)は極めて微量ながら MP2, *E. coli*, Cit. M1 の3菌株による生成結晶で認められ、*Staph. aureus*, *Proteus* OX19 では検出されず、前章既述の両菌群の結晶生成状況に関する差異に何等かの関連があるかを思わしめた。この実験での T. M. A. の定性は結晶約 100mg の V. B. N. を約 5ml の N/10 H_2SO_4 に捕集し、 $\frac{1}{2}$ 量の 40%ホルムアルデヒドを加え更に飽和炭酸カリで液性を変え Wood test に準じて行なった。窒素の定量値は表示のように MP2 株の場合エキス、肉ブイヨン共に 5.58%、*E. coli* ではエキスブイヨン由来 5.51%、肉

第3表 結晶の組成

| 菌株 培地 | 定性 | | | | 定量 | | 推定組成 | | |
|----------------------|------------------|--------------------------------|-----|-----|-------|----------------------|------|--|---|
| | Mg ⁺⁺ | PO ₄ ⁻⁻⁻ | VBN | TMA | N (%) | H ₂ O (%) | | | |
| MP2 | エ,ブ | + | + | + | + | 5.58 | 47 | } MgNH ₄ PO ₄ · 6H ₂ O 含む MgNH(CH ₃) ₃ PO ₄ · 6H ₂ O | |
| | 肉,ブ | + | + | + | + | 5.59 | | | ~ 48 |
| <i>E. coli</i> | エ,ブ | + | + | + | + | 5.51 | 47 | | |
| | 肉,ブ | + | + | + | + | 5.48 | | | ~ 48 |
| <i>Cit. M1</i> | エ,ブ | + | + | + | + | 5.22 | 45 | | |
| | 肉,ブ | + | + | + | + | 5.55 | | | ~ 47 |
| <i>Staph. aureus</i> | エ,ブ | + | + | + | - | 5.71 | 48 | | |
| | 肉,ブ | + | + | + | - | 5.70 | | | } MgNH ₄ PO ₄ · 6H ₂ O |
| <i>Prot. OX19</i> | エ,ブ | + | + | + | - | 5.71 | ~ 49 | | |
| | 肉,ブ | + | + | + | - | 5.72 | | | |

備考： エ,ブは鱈エキスブイヨン，肉,ブは肉汁ブイヨン

ブイヨン由来5.48%, *Cit. M1*は5.22%と5.55%, *Staph. aureus*, *Proteus OX19*では共に5.70~5.72%であった。結晶水の定量成績も表示のとおりであるが、本定量は減圧(1~2 mmHg), 100°C加熱の条件下に行われ、V. B. N.は一部あるいは大部分が揮発するものと推定されるので、正確な定量値とは称し得ないと思う。なお窒素と結晶水の定量はただ一回だけの実験によるものである。

以上、培地内純化生成物直接及びその再結晶物について行った定性及び定量試験、更にV. B. N.が殆どNH₃と考えられることを考慮に入れ、先ずMP2, *E. coli*, *Cit. M1*の3株の場合、その培地内生成物の組成はMgNH₄PO₄ · 6H₂O (Triple phosphate) を主体とし、これに極めて微量のMgNH(CH₃)₃PO₄ · 6H₂O (Trimethylammonium phosphate) が混在しているものと推定した。一方*Staph. aureus*, *Proteus OX19*に由来する生成物ではT. M. A.が立証されず、これらはMgNH₄PO₄ · 6H₂O (Triple phosphate) 単独の構成であると考えられる。

4. 考察と要約

本研究では2, 3の菌属より任意に選出した5菌株について主要な実験が行なわれているが、特定の菌株のみに結晶性物質の生成がみられるのではなく、供用の全菌株合せて20株でも同様で、その菌属関係から推察すれば、この所見はかなり広範囲の菌種に適用されるものと思う。ただMP2, *E. coli*, *Cit. M1*を一群とし、*Staph. aureus*, *Proteus OX19*を他群とし、その間多少の成績の差異を認めたとことは留意すべきである。即ち前者

ではペプトンを添加しない培地でも結晶の生成を認めるのに対し後者はこれに発育が極めて不良であると共に結晶を生成せず、また前者において普通培地3日間の培養がその生成に充分な条件をなしているのに対し、後者ではその後更に孵卵器または室温に放置する処置を要する。しかしこの場合MP2以下3菌では培養液のpHが終始アルカリ性であるのに対して*Staph. aureus*と*Proteus OX19*では3日培養で弱酸性、その後の放置でこれが漸次アルカリ性に転ずる事実が立証され、またその後の化学的研究の成果として、前群の生成結晶にはTriple phosphateにTrimethylammonium phosphateが微量共存し、後者ではTriple phosphateのみが立証されるという所見がある。

培養後加熱によって菌を死滅させた後も結晶は生成されまた菌体を除去した後も結晶の生成をみる点から、結晶観察当時における菌の生死存否は必ずしも結晶に直結した関係を示さない。しかしそれ以前における菌の発育によって結晶を生成すべき物質が産出されていることは疑う余地がなく、具体的な結晶はその時の培地条件に大いに支配されているとみることが出来る。即ち培地中で菌が発育するに従い蛋白質が分解され塩基性物質つまりNH₃や揮発性アミン等が生成されるがこれらによって培地のpHは漸次アルカリ側に傾き、培地中に遊離するMg⁺⁺, PO₄⁻⁻⁻、並びに蛋白質に結合していたこれらはやがて細菌が蛋白質に作用することによって解離され、上記と結合しTriple phosphateのような難溶性塩を析出するものと推定される。この際液性を酸性に補正すると結晶の生成を認めないが、これは本物質が稀酸に易溶である点を考

えると了解される。

V. B. N. の大部分は NH_3 であろうがその他のものとして T. M. A. 及び Dimethylamine 等も考えられ、本研究では MP2 以下 3 菌でその産生を推定した。T. M. A. は肉の腐敗殊に魚肉の腐敗時にそのオキサイドを還元して出現するといわれ、この作用を表わす細菌として既に *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *E. coli*, *Sh. sonnei*, *Protzus* 等が挙げられている。著者の場合これが極めて微量である点は UEHLEKE の報告するものと可成り相違するが、T. M. A. の前駆物質である T. M. A. oxide の魚肉中の含量が魚種により様々であり、最も多量に含まれている板鰓類で 1~1.5%、一般に 0.2~0.4% と称され (高瀬)、仮にこれ等の魚肉に基いた肉エキスを供用したとしても培地内のそれは可成り稀釈されているため、細菌汚染後大量に T. M. A. のみを純粋に産生するとは思われない。

結晶型は一定せず特に寒天培地中のものは極めて大型に生長するものもあるが、これは培地の pH, V. B. N. 量, 温度, 時間, 粘稠度, 夾雑物 (細菌体を含めた意味の) などの諸因子に左右されるものと思われる。巻末に結晶の写真を添付したがこれらの結晶型は常時一定したものが得られるわけではなく、培地の種類, 汚染菌, 培養条件が同一であってもその度毎に大きさやその他の性状を異にする。写真 7, 8 は *Staph. aureus* の作った結晶で、分析の結果は Triple phosphate と推定されたが、同一培地に寒天を加えた固形培地内の結晶は更に大型で写真 9 で見るような羽毛状の大型結晶に生長している。

II 糸状菌培養による結晶の生成

糸状菌の類による培地内結晶の生成については既に緒論で述べた GLOCK 等の *Penicillium* に関する報告があり、また古く BUCHANAN and FULMER の著書に、*Mucor* の Spore 内に炭酸カルシウムが生成されると記載されていることもこれに関連ある文献と称し得る。著者もまた前章一般細菌による結晶生成の研究時、放置した汚染牛肉水に細菌発育の場合と同様な結晶を認め、汚染菌の検査によりそれが *Penicillium* 属であると同定し、以下に述べる糸状菌に関する研究を進展せしめ得た。

菌株と培地

使用菌株は下記 24 株である。

白霉菌及びカンジダ属。 *Tricophyton mentagrophytes*, *interdigitale*, *rubrum*, *ferrugineum*, *violaceum*, *concentricum*. *Candida albicans*, *tropicalis*, *pseudotropicalis*, *krusei*,

parakrusei, *stellatoidea*, *guilliermondi* (以上長大皮膚科患与)。

Penicillium toxicarium, *citrinum*, *granulatum*, *islandicum*. *Aspergillus oryzae*, *glaucus*. *Mucor geranicus wehmer*. *Fusarium lini balley*, *moniliform*, 同未分類株 (以上長崎衛研患与)。ほかに著者が牛肉水より分離同定した上述の結晶生成能力がある *Penicillium* 1 株 (未分類, *P.* 肉水と仮称)。

実験用液体培地は前章におけると同様の肉エキスブイオン、肉水ブイオン、それよりペプトンを除いたもので、培養法も培養温度を 30°C とした以外殆ど異なる。固形培地としては普通寒天のほか真菌類の分離または保存培地として常用される Sabouraud agar と Czapek-Dox agar を用いた。これら固形培地の起始 pH は 6.4、菌移植後は 30°C で一週間培養、その後室温に放置した。

1. 結晶生成と菌株及び培地との関係

前記液体培地に各供試菌を液面接種し培養するとすべて良好な発育を示し、殆どの菌株は 1 週間位で全液面を覆う表面集落を形成する。ただ *Candida* 属の菌株は混濁発育し、時がたつにつれて菌体の著明な沈澱を認められるので時々手振り振盪を行った。結晶の生成は細菌の場合と異って供用の全株に必ずしもこれを認めるとは限らず、24 株中の 8 株にとどまった。また普通寒天を除く両種の固形培地にはすべて結晶が生成されない。これらの関係を示したものは第 4 表である。即ち結晶を立証したものは白霉菌属の 6 菌種のう

第 4 表 結晶生成と培地との関係

| 菌株 | 培地 | | 同 (ペプトン 欠) | | 普通寒天 | サブロー | ツクスアドベツク |
|---------------------------|-----|----|------------|----|------|------|----------|
| | エキス | 肉水 | エキス | 肉水 | | | |
| <i>Tr. mentagrophytes</i> | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>C. albicans</i> | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>P.</i> 肉水 | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Asp. oryzae</i> | + | + | + | + | + | - | - |
| " <i>glaucus</i> | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>F. lini balley</i> | + | + | + | + | + | - | - |
| " <i>moniliform</i> | + | + | + | + | + | - | - |
| " (未分類) | + | + | + | + | + | - | - |
| その他の菌株 | - | - | - | - | - | - | - |

備考：+ は結晶生成、- は同生成せず。

ち、*Tr. mentagrophytes*. *Candida* 属の 7 菌種のうち *C. albicans*. *Penicillium* 属の 5 菌種のうち未分類の *P.* 肉

水株のみであり、*Aspergillus* 属では供試 2 菌種つまり *Asp. oryzae*, *Asp. glaucus*, *Fusarium* 属でも供試の 3 菌種共に結晶の生成を認めた。一方 *Mc. geranicus wehmer* ではこれを欠いていたが、菌属あるいは菌種による結晶出現の関係は使用菌株が極めて少いので言及出来ない。

2. 結晶の性状と組成

結晶の生成された培養液を傾瀉して粗結晶を残し、常水及び溜水でそれぞれ数回洗浄後、濾紙上で余分な水を切り45°C乾燥、更に恒量となるまで塩化カルシウムデシケター内で乾燥する。かようにして取出されたものは白色半透明の結晶で、前章既述の細菌類の

生成したものと極めてよく類似し、外観のみではいづれのものとも判断出来ない(写真参照)。この結晶は水、及びアルコール、エーテルなどの有機溶媒で溶解せず、また NaOH, KOH などのアルカリ溶媒にも溶けないが、HCl, H₂SO₄, HNO₃, HAC などの稀鉱酸及び稀有有機酸には極めて良く溶ける。細菌による結晶と同様加熱により結晶水を確認し、また V・B・N., を認めることが出来る。灼熱時僅かに炭化するがこれは夾雑物ではないかと思われる程度で、更に強熱すると強烈な白色光が認められる。

無機物, V. B. N., 水の定性及び定量の結果は第 5

第 5 表 結 晶 の 組 成

| 菌 株 | 定 性 | | | | 定 量 | 推 定 組 成 |
|---------------------------|------------------|--------------------------------|-----|-----|---------------------|---|
| | Mg ⁺⁺ | PO ₄ ⁻⁻⁻ | VBN | TMA | H ₂ O(%) | |
| <i>Tr. mentagrophytes</i> | + | + | + | - | 48 ~ 49 | MgNH ₄ PO ₄ · 6H ₂ O |
| <i>C. albicans</i> | + | + | + | - | | |
| P. 肉水 | + | + | + | - | | |
| <i>Asp. oryzae</i> | + | + | + | - | | |
| <i>F. lini balley</i> | + | + | + | - | | |

備考： 培地はいずれも肉水ブイヨン

表に示すとおりで、いずれの結晶においても Mg⁺⁺, PO₄⁻⁻⁻ が確認され、V. B. N. を認めるが T. M. A. は検出しなかった。また蛋白反応、糖反応はいずれも陰性であった。結晶水の定量は減圧下 100°C で加熱したものであるため、この場合も V. B. N. は同時に揮発したものと推定される。窒素の定量は行わなかった。これらの分析の結果から、いずれの結晶も MgNH₄PO₄ · 6H₂O (Triple phosphate) と推定し得た。それぞれの場合の結晶は大きさは勿論形状も大いに異なるがいずれも同一組成を有するものと認める。

3. 考 察 と 要 約

培地内結晶生成に関する従来の報告は一、二を除いて細菌類に限られ、糸状菌ではこれが比較的生成され難い感を持つ。これは事実であり、細菌では供試の 20 株全株に結晶の生成を認めたのに対して糸状菌では 3 分の 1 に過ぎなかったことがこれを明示している。また通常この種の菌属に用いられる Sabouraud, Czapek-Dox, Potato juice などの培地では結晶が生成されないことも従来留意を買わなかった一つの理

由になる。この結晶生成能が糸状菌の如何なる菌属いづれの菌種で特に発揮されるかあるいは欠如するかの問題は、今回の供試菌の範囲では論じ得られなかった。

生成結晶は分析の結果いずれも Triple phosphate と推定された。生成の機序も細菌類の場合と同様、蛋白質等の代謝産物として V. B. N. 特に NH₃ が産生され、培養基中の Mg⁺⁺, PO₄⁻⁻⁻ また更に蛋白質から解離されたそれらと結合し、難溶性塩である Triple phosphate を析出するものと思われる。しかし Sabouraud や Czapek-Dox の培地など炭水化物を主体とする培地の中では主として炭水化物代謝が行われ、したがって生成された有機酸等のため培地 pH は低下し、Urease 等の作用も抑制され揮発性アンモニアの生成もみられず、Mg⁺⁺, PO₄⁻⁻⁻ が存在しても難溶性塩を析出するに至らないと推定される。T. M. A. は検出されなかったため、糸状菌の結晶生成の型は細菌でいえば *Staph. aureus* と *Proteus* OX19 の型に該当する。これは糸状菌では T. M. A. oxide を還元する菌株が未だ発見されていないようであるので

当然のことと思う。

これらの結晶は細菌の場合と同様にたとえ培養条件を一定にしても毎常同一の形状大きさを示すとは限らない(附図写真10, 13)。結晶の生長には特に糸状菌の場合附加的の種々の要素が作用しこの結果になると考察される。

結晶の生成をみた8菌株の培養液 pH を追及すると、最初 pH7.0 に調整したものが培養初期には弱酸性に傾き、その後再びアルカリ側に移動、培養日数とともにこの傾向は著明になる。一方結晶の生成をみなかった菌株の培養液の pH は初期弱酸性に傾いたままでこの傾向を示さない。これは発育に際し恐らく炭水化物のみを利用することによるものと思われる。この反面アルカリ側移動はその菌株が蛋白質に働きかける性質を持ち、その結果としての代謝物 V. B. N. 殊に NH_3 が pH 変動の主働的役割を持つと推察される。

III 結晶生成のメカニズムについての

二、三の実験

細菌あるいは糸状菌が培地内で発育し、蛋白質の分解と共に NH_3 やアミンが生成され、培地 pH は漸次アルカリ性に傾く。一方培地内に遊離溶存していた Mg^{++} , PO_4^{---} と、元々蛋白質に結合して蛋白質分解の結果解離の状態になったこれらのイオンが上記と結合し、アルカリに難溶性の Triple phosphate などの塩類が生成されるというのがこれまでの諸実験の結果として著者が考えている結晶生成のメカニズムである。この考え方の根拠になったのは培地内生成結晶自体につき、またこれを一旦稀塩酸に溶かし再結晶したものにつき行った溶解性の検査や各種化学的定性反応並びに V. B. N. の窒素定量の結果などで、要するに最終産物の性状から生成過程を推論したに過ぎない。よって本章では細菌2株、糸状菌1株を選定し、3種の液体培地内における培養日数を追う pH 測定と揮発性成分中の窒素の定量を行い、この動態観察の面から上記推論に支持を与えんとした。また著者が設定したメカニズムで最も重要な段階をなしているのは V. B. N. と培地内イオンの結合であり、Uehleke が、シャーレの蓋に稀薄アンモニア溶液の1滴を置き非接種培地内に結晶を生成せしめ得たと記述していることが想起されるので、この意思を更に進展せしめ、菌発育培地の V. B. N. を非接種培地へ導く実験、及び微生物の代謝とは関係がない含窒素化合物を培地に拡散せしめ結晶の生成をみる実験を行った。

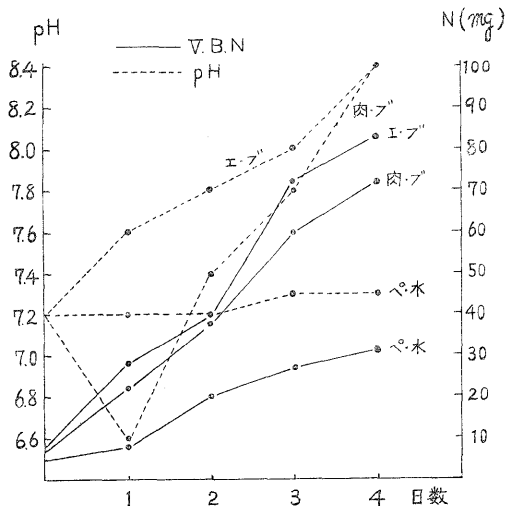
1. 培養培地の pH と V. B. N. の推移

供試菌株は結晶生成が速かで Trimethylamine の産生を伴う *Pseudomonas* MP 2株、比較的遅れて Triple phosphate 単味の結晶を生成する *Staph. aureus* 及び同じく Triple phosphate のみを産生する糸状菌 *Tr. mentagrophytes* の3株である。培地は肉水ブイヨン、鯉エキスブイヨン及びペプトン水で、両種の細菌は 37°C 、*Tricophyton* は 30°C にそれぞれ必要日数培養後室温に放置、適当日数における培養液 pH の測定(比色法による)と既述の方法による V. B. N. の定量を行った。しかして今回特に後者には CONWAY の微量拡散法を応用し、培養液そのまま 1ml を除蛋白することなくこれに供し mg-N/100ml の値を求めた。

MP 2株培養液の pH 及び V. B. N. は結晶生成日数を考慮に入れ培養開始後24時間ごとに測定し4日目まで観察した。ペプトン水の pH は終始著変を認めず3日目以後僅かに変動したに過ぎないが、肉水ブイヨン及びエキスブイヨンでは著変を認めた。即ち前者では pH 一応弱酸性に傾き2日目以後再びアルカリ性となるに対して、後者では初期よりアルカリ性を示し、2日目の値前者は7.8、後者は8.0、4日目には共に8.4であった。

V. B. N. の推移も上記に似てペプトン水では著しい

第3図 MP2株培養時の pH 及び V. B. N. の推移



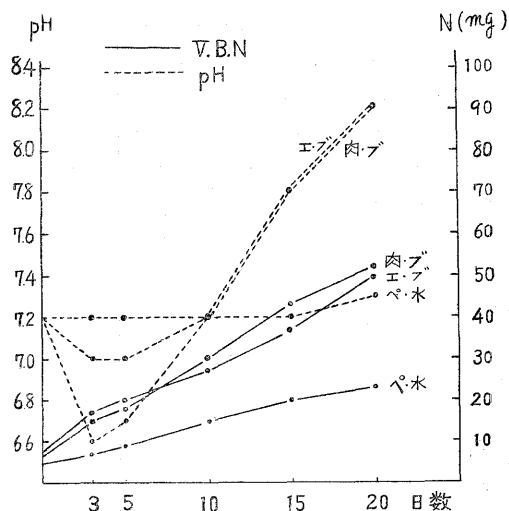
備考：ペ・水はペプトン水、肉・ブは肉水ブイヨン、エ・ブは鯉エキスブイヨン、3日目まで 37°C 、以後室温

増加はなく、肉水ブイオン及びエキスブイオンにおいてのみ著変を認めた。即ち最初の値N量として8mg, 7mgであるのに対して、3日目前者60mg, 後者72mg 4日目前者72mg, 後者38mgであった。これらの結果を示したものは第3図である。

Staph. aureus 培養液での推移は、結晶生成日数を考慮して、培養開始直後は2, 3日目その後は5日ごとに測定、結局20日目まで観察した。ペプトン水のpHは15日目まで変わらず20日目に僅かな変動を認めたに過ぎなかったが、肉水ブイオン及びエキスブイオンのそれはいずれも初期弱酸性に傾きその後徐々にアルカリに復帰、20日目にはpH 8.2に達した。

V. B. N. の推移も pH と傾向を一にし、ペプトン水では僅かの増加にすぎないのに対して、肉水ブイオン、エキスブイオンでの V. B. N. は急速明瞭であり、20日目の値は前者 52mg, 後者 50mg であった(第4図)。

第4図 *Staph. aureus* 培養時の pH 及び V. B. N. の推移

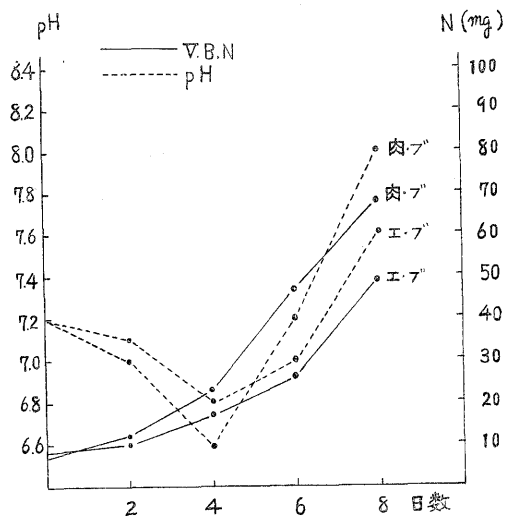


備考：ペ・水はペプトン水、肉・ブは肉水ブイオン、エ・ブは鰹エキスブイオン、3日目まで37°C 以後室温

Tr. mentagrophytes 培養液についての実験は培養開始後2日目ごとに測定の方針で8日目まで行った。ただペプトン水には発育不良であったのでこれは省略し、肉水ブイオンとエキスブイオンについてのみ実験した。両培地のpHは培養初期弱酸性を呈するが4日目以降アルカリ性となり8日目には前者8.0, 後者7.6

であった。一方V. B. N. も4日目頃から可成り急激に増加して8日目の値前者68mg, 後者49mgであった(第5図)。

第5図 *Tr. mentagrophytes* 培養時の pH 及び V. B. N. の推移

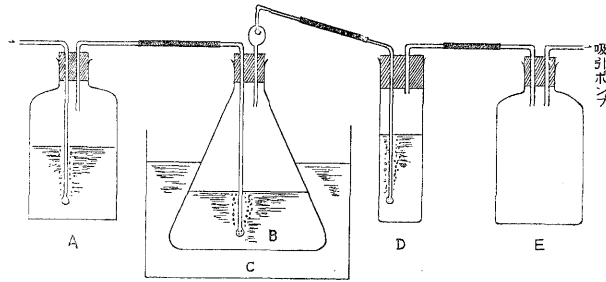


備考：肉・ブは肉水ブイオン、エ・ブは鰹エキスブイオン、終始30°C

2. 培養培地から非接種培地中への通気による結晶生成

MP 2株を実験菌として選び、その肉水ブイオン3日培養液をA. O. A. C.改良法に準ずる通気装置(第6図)に接続し、同培養液(B)より発生気体を非接種培地(D)に導く実験を行った。その前段階である洗気瓶(A)内には稀硫酸(1:9)を入れ、Bを加温する恒温槽(C)は45±1°Cに保たれている。非接種培地は培養培地の約1/5量、pHは弱酸性(pH6.4)として高圧滅菌後装着した。培養培地には通気開始直前分解剤として10%炭酸ソーダ液を、また消泡剤としてアミールアルコールを2, 3滴加え、吸引ポンプを徐々に作働せしめ、約4時間気体交換の後非接種培地を取りはずし、雑菌の発育抑制のため4~5°Cの水室に保存、結晶の生成如何を観察した。しかしてこの場合格納後2日目に結晶の生成を認めることが出来、この結晶は外観、性状共に菌培養時の結晶に全く一致することを確認した。なお本実験時の室温は10°C前後であった。

第 6 図 汚染培地から非汚染培地への通気装置



- A : 洗気瓶 (H_2SO_4 1 : 9) B : 汚染培地 (500ml)
 C : 恒温槽 ($45^\circ \pm 1^\circ \text{C}$) D : 非汚染培地 (100ml)
 E : 安全瓶

3. 非接種培地に V.B.N. 拡散による結晶生成

上記のように菌接種培地内発生ガス体の通気により単なる培地内に結晶を生成せしめ得たので、更にここでは微生物代謝の結果物ではない単なる試薬アンモニア、T.M.A., Dimethylamine(D.M.A.)を非接種培地に拡散せしめ、結晶の生成をみる実験を行った。拡散はコルペン内に小試験管を吊すという簡単な方法により、先ずこのコルペン内に弱酸性とした非接種培地約 100ml を入れ、次いで小試験管内に稀アンモニア水を入れて密閉したところ、間もなく培地内に極めて小さな結晶の生成を認めた。この場合濃厚アンモニア水では肉眼可視の結晶の生成はなく白色沈澱を認めるに過ぎないが、上記のようにアンモニアの極めて稀薄なもの (約 N/20) を用いると結晶が出来、更にこれを徐々に拡散せしめる意味と雑菌の増殖抑制のために水室に格納すれば 2, 3 日後にかなり大型の結晶にまで発育せしめ得る。この結晶は既述の培養液内自然発生のものとはかなり形状を異にし、大部分のものは羽毛状で、単なるアンモニア性アルカリ溶液から得られる Triple phosphate のそれと全く異ならない (写真 9) 次にアンモニア水の代わりに T.M.A. 水溶液、更に D.M.A. 水溶液を拡散せしめたが同様に結晶の生成を認めた。稀薄溶液とし水室内で長時間作用せしめる方が大型の結晶の観察に適することも同様であった。両実験の結晶形は極めて類似し、上記 Triple phosphate に相当する羽毛状を主体とする形態ではなく、棒状多面体で既述の実験における MP 2 株及び *Penicillium* 肉水株が自然に生成した結晶に近い型であった (写真 1, J2)。

4. 考察と要約

代表 3 菌株を使用、肉水ブイオン、エキスブイオン及びペプトン水培養に当たっての pH 及び V.B.N. の推移について実験を行った。ペプトン水培養時結晶が生成されないことは既に述べたが、これと関連あることとして、ペプトン水では pH 及び V.B.N. が終始緩慢な変化しか示さず、例えペプトン水中に結晶生成に必要な Mg^{++} , PO_4^{---} が存在しても V.B.N. の産生が充分でなく従って pH の変動も僅少に止まる結果となり、結晶の生成に至らないという推論が本実験により成立した。肉水ブイオンとエキスブイオンでは両実験値の変動は著明で、pH 初期弱酸性に傾くものもあるが、やがてアルカリ側へ傾き、末期には 8.0 前後となる。V. B. N. も日を経るとともに増加し結局 50mg を越え、最初の値の 10mg を下まわるものに比すれば著しい増量である。しかもこれらの成績は実際における結晶の生成に深い関連を持ち、結晶生成の速かな MP 2 株培養の場合に最も早期にかつ著明な変動値がみられ、結晶生成の条件が一応満たされたと思われる 3 日目には pH 7.8~8.0, V. B. N. 70~80mg と最高値に達している。一方結晶生成が最も遅い *Staph. aureus* では両測定値の変動も最も緩徐で、結晶生成に約 3 週間を要することに歩調を合せ 20 日目に pH 8.2, V. B. N. 50~52mg を示す。しかして結晶の生成日数あたかも前 2 菌の中間に位する *Tr. mentagrophytes* では 8 日目の pH 及び V. B. N. 値それぞれ 7.6~8.0 と 49~68mg でこれまた予期どおりの結果を示す。要するに pH のアルカリ転位と V. B. N. の増量は結晶の形成と直接関係があり、もし結晶生成に必

要にして充分な両者の値を一般的に示すならば pH 7.6 以上, V. B. N. 50mg-N(100ml中)という結果となる。

次に培養培地の V. B. N. を非接種培地に導いた結果, 微生物を培養しなくても既述の結晶と全く同様な結晶が生成されることを確認, 更にまた微生物代謝とは無関係な NH_3 , T. M. A., D. M. A. を非接種培地に拡散せしめて同様な結晶の生成に成功した。これは pH のアルカリ転移と V. B. N. の増量が如何なる物質により, あるいは如何なる物質を主体として行われるかを認知せしめる実験成績であり, 同時に培地中にそれらの前駆物質が存在すれば, 或種微生物によるその還元の結果 T. M. A., D. M. A. を含む結晶の析出も可能であることが実験的に証明された。

Ⅲ. 結 論

食中毒分離一菌株で魚肉浸出液を用いる人工汚染実験中, コルベンの底部に微細結晶の析出を認め, これをきっかけとして細菌及び糸状菌培養液における結晶生成について系統的な研究を行った。

実験用菌として選んだのは細菌として好塩菌, 各種腸内細菌, ブドウ球菌など 7 種 20 株, 糸状菌として *Trichophyton*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* など 6 属 24 株で, 使用培地は鯉エキスブイオン, 肉水ブイオン, それよりペプトンを除いたもの, ペプトン水, 普通寒天, Sabouraud, Czapek-Dox の培地などであった。培養の結果, 細菌では 20 株すべて, 糸状菌では 24 株中 8 株に結晶の生成を認めた。よってこれらのうちから代表菌株を選出して, 結晶生成と培地との関係, 培養後の結晶生成の条件, 結晶の化学的本質, 結晶生成のメカニズムなどについて種々の実験を行い, 次の結論を得た。

1) 結晶生成には培地に肉エキスをを用いるか, あるいは肉水を基礎とすることを必要とし, 単なるペプトン水や炭水化物を主体とする培地では生成を認めない。なお寒天の有無は無関係である。

2) 所定日数培養後の菌の生死有無は結晶の生成に特に関係なく, 培地 pH 及び揮発性塩基物量に重大な意義があり, 結晶生成をみる培養液はいずれもアルカリ性を示し, かつ揮発性塩基物の増量がある。

3) 結晶は一見ガラスの微細破片を思わせしめ, 菌種によって僅かに特徴があるがこれに特に結晶型としての一定の型式は与え得ない。すべて水, 有機溶媒, アルカリ溶媒に難溶あるいは不溶で, 一方稀酸には容易

に溶解する。

4) 結晶は分析の結果, Mg^{++} , PO_4^{---} 及び揮発性塩基性窒素を定性的に検出し, 次いで行った窒素並びに結晶水の定量測定と溶解性その他の性状の検査からこれは主として Triple phosphate $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ よりなるものと推定した。しかして特に一部細菌群では以上のほかに T. M. A. が微量に検出されるので, これらの菌株(今回供試の範囲では好塩性 *Pseudomonas* MP2, *E. coli* O-125, *Citrobacter* M1 の 3 株) では, これらによる生成結晶中に, 上記に加え Trimethylammonium phosphate $\text{MgNH}(\text{CH}_3)_3\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ が一部混在するものと考えられる。

5) 結晶を構成する Mg^{++} , PO_4^{---} は, もともと培地中に遊離していたものと, 蛋白質に結合していたものとの起原し, 後者の場合菌が蛋白質に作用した結果これが解離され結晶生成に関与したものと考察する。

6) 結晶を構成する揮発性塩基性窒素は菌が蛋白質などに作用した結果発生したアンモニアやアミンを主要部分とする。これが培地中に溶存し, 漸次増加するに従い pH もアルカリ側に傾くが, この条件のもとに揮発性塩基性窒素と前記 Mg^{++} , PO_4^{---} とが結合し難溶性塩を析出するものと推定した。

7) 非接種培地内に菌培養の結果形成された揮発性塩基性窒素を持続的に導き, また微生物代謝とは無関係な他種の揮発性塩基性窒素を拡散せしめ, 培養時と同様な結晶の生成観察に成功した。

8) 培地内結晶の生成は, 菌種による難易や一部菌株での上記の Trimethylammonium phosphate 複合などの関係を認めるとしても主体をなすものの本質には差異がなく, また培地や培養条件による影響が大きい点も顧慮して, これに菌種診断上の意味を附すことは出来ない。

稿を終るに臨み終始御懇切な御指導, 御鞭撻ならびに御校閲を賜りました青木義勇教授に衷心より感謝致します。同様御校閲をいただきました登倉登教授に深謝致しますと共に種々有益なる御助言を戴いた風研病理部林薫講師, 細菌学教室内藤達郎講師に深謝致します。なお御助力下さいました薬学部大田助手, 中央保健所試験室の諸氏に感謝の意を表します。

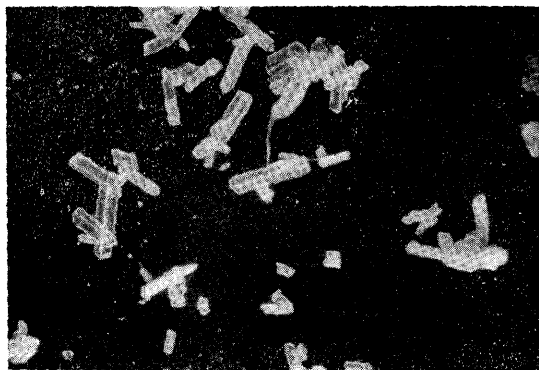
参 考 文 献

- 1) **Breed, P.S., Murray, E.D. & Smith, N.R.:** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th Ed., Baltimore, 119, 1957.
- 2) **Buchanan, R.E. & Fulmer, E. I.:** Phy. Biochem. Bact. Vol. 1, Baltimore, 138, 1928.
- 3) **Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T. & Ueha, T.:** On The Bacteriological Examination of Shirasu-Food Poisoning. Med. J. Osaka Univ., 4 (14) : 299—304, 1953.
- 4) **Girard, G.:** Production de Cristaux par une Souche de *Pasteurella pestis* Cultivée sur Certain Milieux Gélosés. C.R. Acad. Sci. Paris, 235 (22) : 1441—1443, 1952.
- 5) **Glock, G. E., Murray, M.M. & Pinc, P.:** The Origin and Significance of Salivary Phosphatase. Biochem. J., 32 : 2096—2104, 1938.
- 6) **長谷川俊吉:** 結晶形成好塩性細菌に関する研究。日本衛生学雑誌, 14 (7) : 894—905, 1959.
- 7) **林薫, 釘田芳文, 内藤達郎:** 最近5年間に長崎市内に発生した細菌性食中毒事例とその成因考察。長崎大学風土病紀要, 2 (3) : 181—197, 1960.
- 8) **Heim, L.:** Lehrbuch der Bacteriologie. 6. und 7. Aufl. Ferdinand Enke, Stuttgart, 153, 1922.
- 9) **Hewitt, H. B.:** Bacterial "Calculi,," J. Path. Bact., 59 : 657—664, 1947.
- 10) **石坂音治:** Conway 法による微量拡散分析。化学の領域, 4 (11) : 591—598, 1950.
- 11) **厚生省:** 食品衛生特殊技術講習会テキスト, 1956.
- 12) **厚生省:** 衛生検査指針, III (2), 1953.
- 13) **Lembke, A. und Lück, H.:** Strukturuntersuchungen an Mikroorganismen. Zbl. Bakt. 1 Org., 155 : 171—188, 1950.
- 14) **佐々木林治郎:** 食肉加工十三講, 東京, 1956.
- 15) **佐々木林治郎, 藤巻正生:** 肉及び肉製品の貯蔵加工に関する化学的研究(3)肉の Trimethylamine に関する化学的研究(1)。日本農芸化学会雑誌, 27 (7) : 420—423, 1953.
- 16) **高瀬明:** 水産食品衛生, 東京, 1956.
- 17) **滝川巖, 藤沢俊雄:** 海水性細菌によると思われる食中毒症発生例について, 食品衛生研究, 3 : 15—19, 1956.
- 18) **Theiss, O.:** Mikromyzeten und L-Kulturen. Zbl. Bakt. 1 Org., 152 : 209—214, 1947.
- 19) **Uehleke, H.:** Kristallbildungen in Bakteriennährböden. Z. Immun. forschg., 114 (4) : 371—377, 1957.
- 20) **Wood, A.J. & Baird, E. A.:** The Reduction of Trimethylamine Oxide by Bacteria. 1. Enterobacteriaceae. J. Fish. Res. Board Can., 6 : 194, 1943.

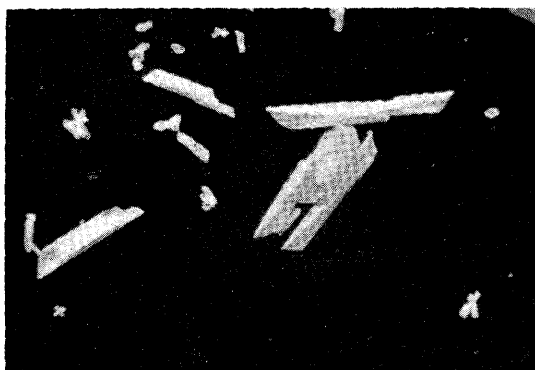
Zusammenfassung

Beim Verschmutzungsversuch des Fischextraktes mit einem aus Lebensmittelvergiftungsfällen isolierten Bakterium liess sich eine Bildung von glassplitterartigen Kristallen an der Kuppe des Kulturkolbens beobachten. Diese Erfahrung gab dem Verf. Anlass die vorliegende systematische Untersuchung durchzuführen, unter Verwendung von Boniteextraktbouillon, Fleischextraktbouillon, Nähragar, Sabouraud-, Czapek-Dox-Nährflüssigkeiten usw. als Kulturmedien, 20 Bakterienstämmen (halophile Bakterien, Darmbakterien von verschiedenen Arten, Staphylokokken u. a.), und 24 Schimmelpilzkulturen (*Tricophyton*, *Candida*, *Penicillium*, *Aspergillus* und *Fusarium*) als Impfstoffe. Die Teststämme wurden zuerst in den Nährflüssigkeiten für 24 Stunden oder in den festen Nährböden durch 3 Tage kultiviert, dann einen Monat lang bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank sich selbst überlassen, um die

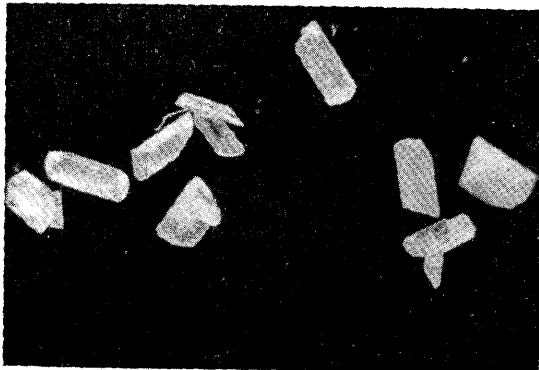
1



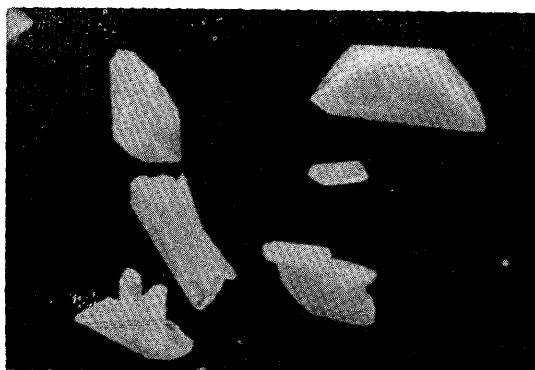
2



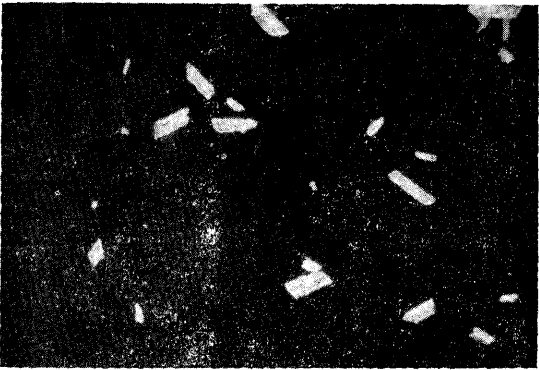
3



4



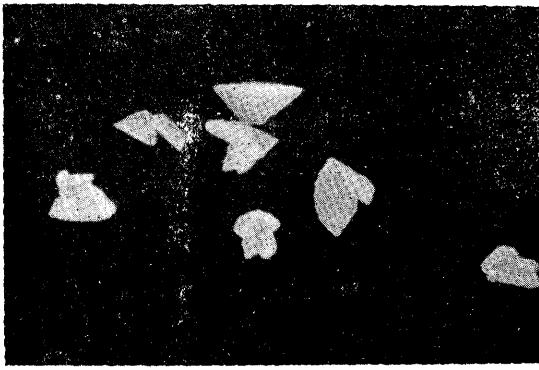
5



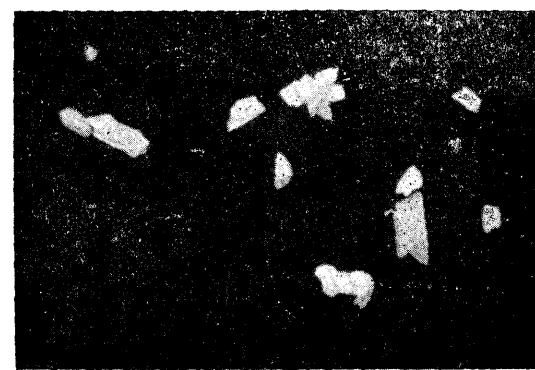
6



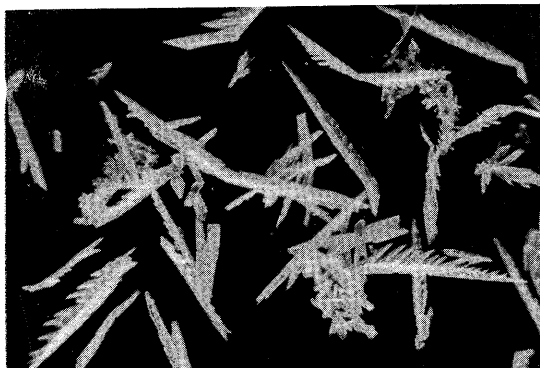
7



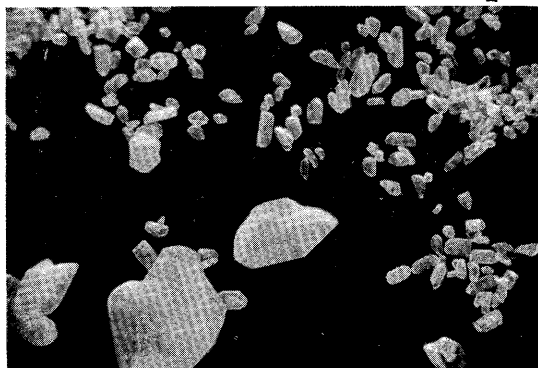
8



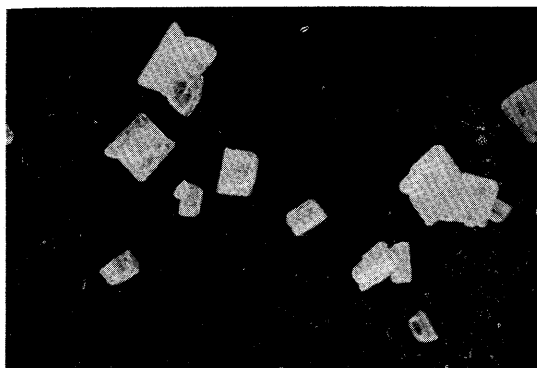
9



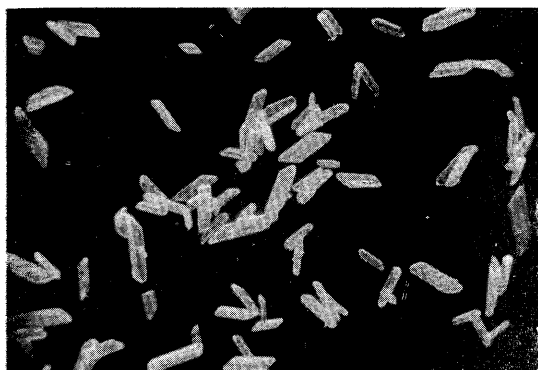
10



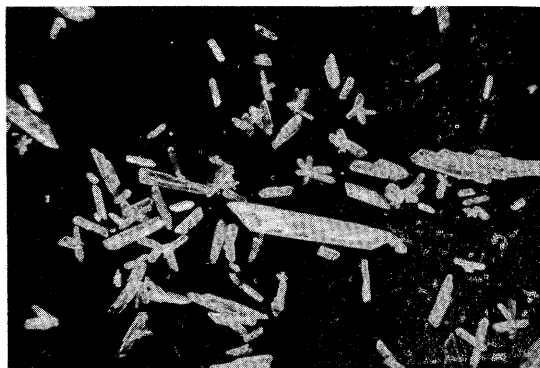
11



12



3



附 図 写 真 説 明 (培地内に生成された結晶)

| No. | 撮影倍率 | 菌株 | 培地 | No. | 撮影倍率 | 菌株 | 培地 |
|-----|------|----------------------|----------|-----|------|---------------------------|--------|
| 1 | ×20 | MP2 | 肉エキスブイヨン | 8 | ×20 | <i>Staph. aureus</i> | 肉水ブイヨン |
| 2 | ×20 | MP2 | 肉水ブイヨン | 9 | ×20 | (NH ₃ 拡散) | 肉水ブイヨン |
| 3 | ×20 | <i>E. coli</i> 0-125 | 肉エキスブイヨン | 10 | ×20 | <i>Tr. mentagrophytes</i> | 肉水ブイヨン |
| 4 | ×20 | <i>E. coli</i> 0-125 | 肉水ブイヨン | 11 | ×20 | <i>Candida albicans</i> | 肉水ブイヨン |
| 5 | ×20 | <i>Cit. M1</i> | 肉エキスブイヨン | 12 | ×20 | <i>P. 肉水</i> | 肉水ブイヨン |
| 6 | ×20 | <i>Cit. M1</i> | 肉水ブイヨン | 13 | ×20 | <i>F. lini balley</i> | 肉水ブイヨン |
| 7 | ×20 | <i>Staph. aureus</i> | 肉エキスブイヨン | | | | |

etwaige Kristallbildung zu beobachten. Die Kristallbildung stellte sich bei all diesen Bakterienkulturen verhältnismässig frühzeitig (nach einigen Tagen) ein, aber im Falle von Schimmelpilzen wurde sie nur bei einem Drittel der verwendeten Stämme beobachtet und zwar verspätet (nach etwa 10 Tagen). Die Hauptergebnisse äusserte sich folgendermassen zusammengefasst zu werden.

(1) Die Benutzung vom Bonite- oder Fleischextrakt im Nährboden oder Fleischwasser als Grundmedium ist für die Kristallbildung unerlässlich; im einfachen Peptonwasser und in den hauptsächlich auf Kohlehydraten beruhenden Nährböden hat man keine Kristalle zu Gesicht bekommen. Der Agar-Zusatz in den Nährmedien übt keinen Einfluss auf die Kristallbildung aus.

(2) Die Kristallbildung kommt zur Erscheinung auch ohne lebende Zellen in den Kulturmedien, sofern die entkeimten Testflüssigkeiten nach der Kultivierung bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank aufbewahrt werden. Dagegen haben die Wasserstoffionenkonzentration der Nährböden und die Menge ätherischer basischer Substanz in den Medien dafür eine grosse Bedeutung; in allen Kulturflüssigkeiten erfolgt die pH-Verschiebung nach der alkalischen Seite und gleichzeitig findet sich eine Anhäufung von der ätherischen basischen Substanz statt.

(3) Die gebildeten Kristalle erwecken den Eindruck, als ob kleinste Glassplitter an der Kuppe des Kulturkolbens zerstreut sind. Keine Besonderheiten in Formen nach den Mikrobenarten. Leicht löslich im Wasser, in organischen Lösungsmitteln und in angesäuerten Flüssigkeiten, aber schwer oder fast unlöslich in alkalisierten.

(4) Die qualitative Analyse der Kristalle ergab Mg^{++} , PO_4^{---} und den ätherischen basischen Stickstoff. Der Stickstoff hiervon und das Kristallwasser wurden weiter mengenmässig bestimmt. Zieht man diese analytischen Ergebnisse zusammen in Betracht und die beschriebene Löslichkeit und andere physikalische Eigenschaften der Kristalle in Rechnung, so wird angenommen, dass sie hauptsächlich aus Tripelphosphat $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ sich zusammensetzen. Hervorzuheben ist dabei, dass in einer Reihe von den Versuchen, nämlich mit *Pseudomonas* MP2, *E. coli* 0-125 und *Citrobacter* M1, geringe Menge von Trimethylamin daneben nachweisbar war. Es steht fest, dass in den Kristallen in diesen Fällen Trimethylammoniumphosphat $MgNH(CH_3)_3PO_4 \cdot 6H_2O$ als eine Zusatzkomponente enthalten ist.

(5) Mg^{++} und PO_4^{---} in den Kristallen beruhen teils auf den frei in den Nährböden vorliegenden Substanzen, teils auf den an Eiweiss gebundenen. Hier wird es angenommen, dass die Dissoziation sich in Mg^{++} und PO_4^{---} im Gefolge der Bakterienwirkung gegenüber den Eiweissstoffen in den Medien stattfindet.

(6) Es ist begreiflich, dass man den ätherischen basischen Stickstoff hauptsächlich auf Ammoniak und Amine zurechnen kann, die auch in Gefolgschaft der Eiweisspaltung gebildet werden. Mit Steigen der Konzentration dieser Substanz in den Medien ist die Reaktion nach der alkalischen Richtung verschoben, und es ist so erklärlich, dass unter diesen Medium-Bedingungen der ätherische basische Stickstoff und die erwähnten Salzen miteinander sich verbinden und in Form unlöslicher Kristalle abgeschieden werden.

(7) Es gelang dem Verf., durch Einführung vom ätherischen basischen Stickstoff bakteriellen Ursprungs in nichtgeimpfte Medien die Kristalle dieser Art dort darzustellen. Ferner war ihm geglückt, durch Verwendung einiger fertiger Präparate vom ätherischen basischen Stickstoff ein gleiches Ergebnis zu gewinnen

(8) Der Verf. ist zum Schluss gekommen, dass wir dieser Kristallbildung eine Bedeutung für Diagnose und Klassifikation der Bakterien nicht beilegen können.

(Verfasser)

Zur Veröffentlichung am 15. November 1960 empfangen.