

## 放線菌の新属 *Microbispora* について 特に *Waksmania* との比較検討

野々村 英夫, 小 原 巖

(昭和32年11月5日受理)

### A New Genus *Microbispora* of the *Actinomycetales* with Special References to the Genus *Waksmania*

By Hideo NONOMURA and Yuwao OHARA

放線菌は元来、細菌と糸状菌の中間的微生物と考えられるものであるが、同じ放線菌でも種類によって非常に細菌に近いものもあり、また殆んど糸状菌のようなものもある。従って CHON (1872) 及び HALZ (1877) が初めて放線菌の記載をして以来、殊に近年抗生物質の探究におびたしい数の放線菌が知られ、それらの分類については、なお異論も多いが Bergey's Manual 第6版ではこれらは *Actinomycetales* として細菌的なものから糸状菌的なものへ次のように3科に分類されている。

|                              |   |                                                   |
|------------------------------|---|---------------------------------------------------|
| Order <i>Actinomycetales</i> | { | Family <i>Mycobacteriaceae</i> Chester            |
| Buchanan                     |   | Family <i>Actinomycetaceae</i> Buchanan           |
|                              |   | Family <i>Streptomyetaceae</i> Waksman et Henrici |

ここに、それまで *Actinomycetaceae* に抱括されていたもので真菌糸を造り、それが細菌のように分裂せず、Conidia を造り糸状菌の性質の強いものを *Streptomyetaceae* として区別し、この科に *Streptomyces* Waksman et Henrici と *Micromonospora* Orskov の2属を設けている。この科の性質は *Streptomyces* 属によって良く代表されるが、他方の *Micromonospora* 属は気菌糸が発達せず、また胞子の形成様式が *Streptomyces* 属とは全く違って、かって *Micromonosporaceae* Krassilnikov 科として区別されたように他の属との関連性が充分密接でなかった。

ところが最近 COUCH<sup>5)</sup> は *Micromonospora* 属に似ているが Sporangium を造る2種類の放線菌について研究し、次の1科2属を追加し、この *Actinoplanes* 属は Chytrids に近似し細菌にも結びつくものであることを指摘した。

|                                     |   |                                      |
|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Family <i>Actinoplanaceae</i> Couch | { | Genus <i>Actinoplanes</i> Couch      |
|                                     |   | Genus <i>Streptosporangium</i> Couch |

またその後 ERIKSON<sup>3)</sup> は *Micromonospora* 属中で Thermophilic のものは孢子柄 (Sporophores) も短かく、気菌糸が生ずる点などで別の属に区別すべきであるとし WAKSMAN<sup>5)</sup> はこれを *Thermoactinomyces* Tsiklinsky として独立させた。この属は気菌糸の生ずる点で *Streptomyces* 属により近いものである。

次に著者ら<sup>12)</sup> は以上の属とは相違し *Micromonospora* 属及び *Thermoactinomyces*

属に似ているが、それらにはっきり対比すべき新しい系列の放線菌を発見し *Microbispora* (Type species: *M. rosea*) なる新属を設定することを提案し、本属は気菌糸を造り、その上に多くの2個連結した孢子を形成する点を特徴とした。しかるに偶然時を同じくして LECHEVALIER ら<sup>9)</sup> は WAKSMAN の許で、著者らと同様な放線菌を発見し新しく *Waksmania* (Type species: *W. rosea*) なる属名を提案し、*Streptomycetaceae* 科を次のように4属に分類している。

#### KEY TO THE GENERA OF THE STREPTOMYCETACEAE

1. Aerial (secondary) mycelium formed
  - a. Spores formed singly (not in chains)
 

Genus *Thermoactinomyces* Tsiklinsky
  - b. Spores formed in pairs      Genus *Waksmania* Lechevalier et Lechevalier
  - c. Spores formed in chains      Genus *Streptomyces* Waksman et Henrici
2. Aerial (secondary) mycelium not formed ;
 

Spores formed singly (not in chains)      Genus *Micromonospora* Orskov

更に相前後して HENSSEN<sup>8)</sup> は *Waksmania* 属に類した形態で Thermophilic な放線菌を報告しているようである。このように相次いで *Micromonospora* 属及び *Thermoactinomyces* 属系統に対する *Microbispora* 属系統のものが報告され、これらの系統のものが自然界に広く存在していることが確認されるに至ったことは、放線菌の系統的分類上重要なことであらう。

HENSSEN の報告はまだ見ることができないが、LECHEVALIER らの *Waksmania* 属と著者らの *Microbispora* 属は属設定の概念が同一であるので将来属名を統一する必要があると考えるので、この際 *Microbispora rosea* の表徴を一層明確にしておく必要を感じ、さきに紙数が制限されていた関係で報告できなかった試験結果を報告し、また *Waksmania rosea* と比較検討するため菌学的性質などの記載は LECHEVALIER らの報告になるべく近い形式並びに用語を使用し、既報<sup>12)</sup> と重複する部分もあるが総括して比較に便利なように取まとめ記載した。

なお放線菌の属として THIRUMALACHER<sup>13)</sup> は Conidia の形成なく Sclerotic granule を造る *Chainia* Thirumalacher なる新属の設定を提案しているが、これらの性質は他の属に排反的性質でないのではなお議論の余地があるように思われる。

#### 実 験 の 部

##### 1. 分 離

Soil extract agar を用い、常法により土壤中から分離された多数の放線菌のうち本菌は甲府市内北部の乾田から分離されたものである。

##### 2. 形態的性質の観察

シャーレに約 10 ml 宛寒天培地を採り、平板に固めた後、*M. rosea* の孢子または菌

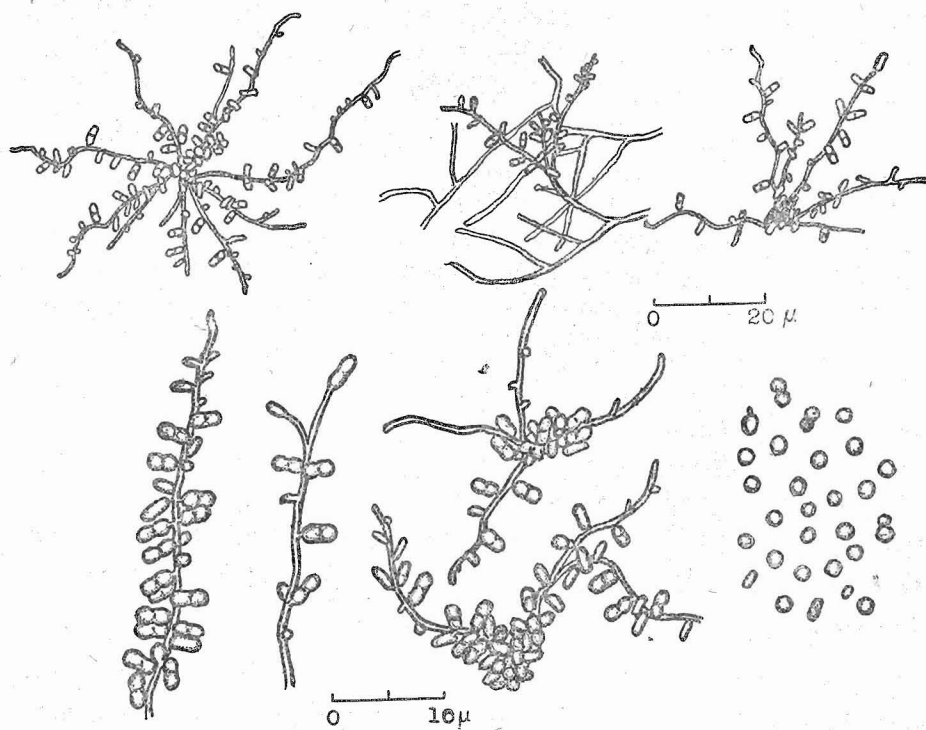


Fig. 1. Modes of Sporulation and Conidia

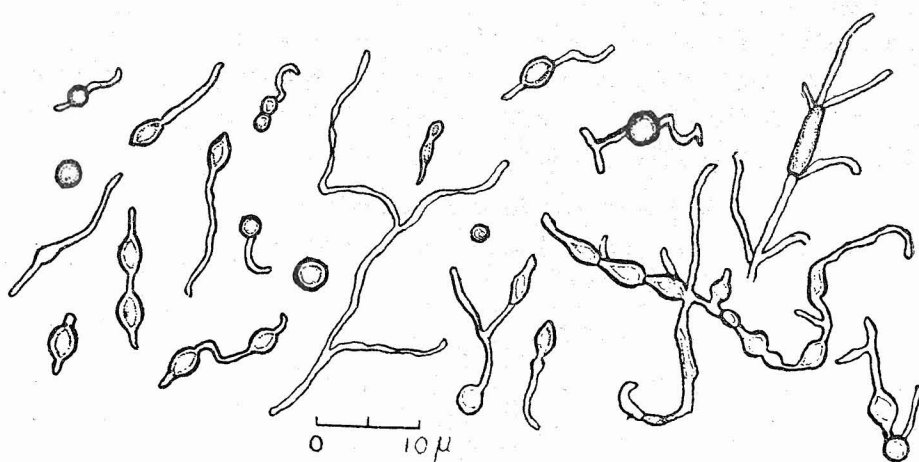


Fig. 2. Chlamydospores of *Microbispora rosea*  
Incubated for 10~15 days EMERSON's agar at 30°

体をうすく塗抹し, 30° に 14~20日間培養し, これを 600 倍または 1,500 倍で直接検鏡した。水につけたりスライドに採ると胞子は1個ずつに分離してしまう。胞子の着生状態その他は, Fig. 1; Plate I 及び別に Morphology として記載した通りである。

この菌の気菌糸及び胞子は非常に形成されにくく, 適当な培地の種類と濃度やビタミンの必要であることは, それぞれ別の項に記載した通りであるが LECHEVALIER<sup>9)</sup> らは *Wakmania* 属の分離に当って COUCH の方法<sup>4)</sup> により草の葉を用いており, 他の放線菌と違って特異な栄養条件を必要とする点 *Waksmania* と共通性が認められる。

なお著者らの菌は Fig. 2 のように栄養分の充分ある寒天培地では殆んど全部の菌体が厚膜胞子 (Chlamydospores) となり, このように極端に多くの厚膜胞子を形成する点も珍らしいものである。

### 3. 培養試験

BALDACCI ら<sup>3)</sup>, HESSELTINE ら<sup>10)</sup> の他, 従来放線菌の研究に使用されている後記のような培地及び一般に細菌の生理的性質を試験するのに使用されている Nitrate broth, Nitrate agar<sup>2)</sup> を調整した。これらの培地に斜面培養とした結果は別に Appearance on various media として記載した通りである。色調の比較は日本色彩研究所編の「色の標準」によった。

### 4. 染色試験

Manual of Methodes for Pure Culture<sup>2)</sup> の方法に準じ LOEFFLER'S alkaline Methyleneblue を用い, Acid-fast 試験は ZIEHL-NEELSEN 法によった。その結果は Staining の項に記載した通りである。

### 5. 培地の pH と生育試験

EMERSON'S agar と Nutrient agar を用い培地の pH は HCl 或は NaOH により調節し一旦 100° に加熱した後, Phenol red または Chlorphenol red (東洋濾紙製) で pH を比較し, 再び加熱殺菌した。これに菌体懸濁液を等量宛接種し, 30°, 14 日間培養して生育程度を比較した結果は Table 1 の通りであった。

Table 1. Growth of *Microbispora rosea* at various pH

The media were adjusted to the each pH value, with HCl or NaOH. Observations were made after 14 days at 30°

| Medium pH      | 5.0 | 5.2 | 5.4 | 5.6 | 5.8 | 6.2 | 6.4 | 6.6 | 7.0 | 7.2 | 7.4 | 7.6 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Nutrient agar  | -   | 5+  | 10+ | 10+ | 10+ | 10+ | 8+  | 6+  | 6+  | 4+  | 2+  | 2+  |
| Emerson's agar | -   | -   | 4+  | 8+  | 10+ | 10+ | 10+ | 8+  | 8+  | 8+  | 8+  | -   |

EMERSON'S agar では pH による影響が Nutrient agar より少なく, 液体培地では生育に従い pH が次第に低下し, ビタミンを添加した Asparagine-glucose solution で 10 日間培養した例では初めの pH 7.0 が 5.0~5.2 となった。

## 6. 栄養的特異性について

*M. rosea* は普通放線菌の栄養的性質を試験するのに使用されている PRIDHAM & GOTTLIEB<sup>11)</sup> の Basal medium にブドウ糖を加え、なおペプトン及びビタミン (B-Vitamins 以下同様) を加えたものにも生育できず、一般の放線菌と栄養要求に於て明らかに特異性が認められたので、次のような試験を行なった。

## a) 磷酸塩による生育阻害について

$K_2HPO_4$  と  $KH_2PO_4$  を 7:2 の割合に混合し Basal medium I に加え *Streptomyces antibioticus* (IFO-3216), 及び (*St. lavendulae* (IFO-3177)), の生育を比較試験した結果は既報<sup>12)</sup> 及び別項に記載してある通りである。いずれの菌も磷酸塩の過量により生育が阻害されるが, *St. antibioticus* では 1.0 g/l, *St. lavendulae* では 0.5~1.0 g/l が適量であったのに対し *M. rosea* では 0.1 g/l でも集落の色が淡くなり 0.5 g/l では色素生育が殆んどなく集落は扁平となり, 5 g/l では全然生育しなかった。即ちその適量は他の放線菌より極めて少なかった。

## b) 微量成分の影響について

Cu, Fe, Zn 及び Mn の硫酸塩を Basal medium I に加えこれらの微量成分が生育に及ぼす影響を試験した結果は  $Cu^{++}$  及び  $Fe^{++}$  については既報の通りであるが  $Mn^{++}$  は殆んど生育に影響なく  $Zn^{++}$  は 2~3ppm の濃度では毒性が認められないが 9.0 ppm では初期の生育が著しく抑制された。また  $Zn^{++}$  は発色が  $Fe^{++}$  より遅れているが着色度は対照のものより濃くなった。なお  $Fe^{++}$  が単独添加で *St. fradiae* などの生育を促進する効果のあることは HELM<sup>7)</sup> からも認めている。

## c) N-源の利用性について

Basal medium II に各種の N-源を添加し生育を比較した結果は既報<sup>12)</sup> の通りでビタミンを加えずによく生育するのは肉エキス (Beef extract) のみであった。これは肉エキスにビタミンが含まれているためと考えられる。別に液体培地 Basal medium III について試験した結果は Table 2 の通りであった。

Table 2. Utilization of Nitrogen Sources by *Microbispora rosea*

| N-source       | Basal medium III |           | Basal medium III + B-Vitamins |           |          |
|----------------|------------------|-----------|-------------------------------|-----------|----------|
|                | after(days)      | growth    | after(days)                   | growth    | acidity* |
| Peptone        | { 5<br>17        | 5+<br>10+ | 5<br>14                       | 5+<br>10+ | 0.70     |
| Na-glutamate   | { 5<br>17        | +<br>+⊥   | 5<br>14                       | ++<br>6+  | 0.30     |
| $(NH_4)_2SO_4$ | { 5<br>17        | ⊥<br>⊥    | 5<br>14                       | +<br>+⊥   | 0.40     |
| $KNO_3$        | { 5<br>17        | -<br>⊥    | 5<br>14                       | -<br>++   | 0.10     |
| Urea           | { 5<br>17        | -<br>⊥    | 5<br>14                       | -<br>+⊥   | 0.10     |
| Control        | { 5<br>17        | -<br>⊥    | 5<br>14                       | -<br>⊥    | 0.10     |

\* ml. of 0.1 N NaOH to neutralize 10 ml. of the medium; -, signifies, no utilization; 10+, signifies, maximum growth.

この場合ペプトンはビタミンの有無にかかわらず生育が良い点、寒天培地の場合と違った結果を示した。試験の結果を総合すると無機態-N は殆んど利用出来ず有機態-N でも通常培地では肉エキス以外は殆んど利用されない。しかしビタミンの存在する場合肉エキスの他ペプトン、アスパラギン、アミノ酸等が利用される。

なお放線菌はN-源としてのアミノ酸が同時に非常によい、C-源となる場合が多いが<sup>3)</sup> *M. rosea* は Asparagine-glucose solution に培養すると良く生育するが、この培地からブドウ糖を除去すると生育は Table 3 の様に全く制限されてくる。即ち本菌はアスパラギンを唯一のN-源とすることは出来るが、ブドウ糖及びビタミンが共存する時、始めて良く利用される。

Table 3. Effect of the Glucose on the Growth of *Microbispora rosea* in Asparagine-glucose Solution (AGS) at 30°

| Medium                             | after (days) | Growth          |                       |
|------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------------|
|                                    |              | <i>M. rosea</i> | <i>St. lavendulae</i> |
| A G S                              | 3            | -               | ++                    |
|                                    | 4            | ++              | +++                   |
|                                    | 10           | 10+             | 20+                   |
| Omission<br>of Glucose<br>from AGS | 3            | -               | +                     |
|                                    | 4            | 0.1+            | ++                    |
|                                    | 10           | 0.2+            | 5+                    |

d) 要求ビタミンの種類について

ブドウ糖を C-源とする Basal medium II にペプトンまたはアスパラギン或はグルタミン酸を加えた場合のビタミン要求を実験した結果の1部は既報の通りである。(培地は 120°, 15 分間殺菌した後、ビタミンを加え、再び 115° で 15 分間殺菌する) いずれの場合も Thiamine を欠いた培地では殆んど生育が見られないが Thiamine のみ単独に添加した場合には供試全ビタミン(Thimine-HCl; Biotin; Ca-Pantothenate; Rivoiflavine; Pyridoxine-HCl; Paraaminobenzoic acid; Niacin; Inositol) を添加した対照のものの 70~80 % の生育を示し、色素の生産は遅れるばかりでなく著しく弱くなる。

以上のような *M. rosea* の栄養的特異性を知ったので次のような純合成培地を調整しこれに生育させることが出来た。なおこの培地のブドウ糖を 2% とすれば 3~4 週間で胞子を形成させることもできるが、胞子形成用培地としては Oat meal agar の他、例えば次のような培地が良い。

A Synthetic Medium for the Culture of *Microbispora rosea*

|                                            |        |                                            |           |
|--------------------------------------------|--------|--------------------------------------------|-----------|
| Glucose .....                              | 10.0g. | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O ..... | 10mg.     |
| Asparagine .....                           | 2.0    | Washed agar .....                          | 20 g.     |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O ..... | 0.5    | Dist. Water .....                          | 1,000 ml. |
| KCl .....                                  | 0.5    | Thiamine .....                             | 1 mg.     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....      | 0.05   | Biotin .....                               | 0.5mg.    |

A Medium for the Sporulation of *Microbispora rosea* recommended

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| 5-times diluted Emerson's medium*   | 1,000 ml. |
| Thiamine-HCl                        | 1 mg.     |
| Biotin                              | 0.5 mg.   |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O | 10 mg.    |

\* With tap water, pH 6.5, agar 20g

## 分 類

新属 *Microbispora* は菌糸が細菌のように分裂しないので、*Streptomycetaceae* 科の既設 3 属及び *Wakmania* との類似点及び相違点を挙げ比較すると次のようになる。

1. *Microbispora* と *Streptomyces* Waksman et Henrici (Syn. *Euactinomyces* Langeron, *Actinomyces* Buchanan) との比較

両者共に気菌糸を造り、それに孢子が形成され、寒天培地に堅い皮革質の集落を造り、孢子層は湿っていない点等類似しているが *Streptomyces* の孢子は分岐した気菌糸の先端部分があるまきびれて鎖状に形成されるので、孢子の大きさと孢子柄とが殆んど差がないのに対し *Microbispora* では孢子の直径が孢子柄の中より明らかに大きく、成長し成熟した孢子が 2 個連結している点で明らかに相違する。

2. *Microbispora* と *Micromonospora* Orskov との比較

両者共に孢子が孢子柄の先端に同じような機構で形成されるが成熟した孢子が、比較的長い孢子柄に 1 個宛単独にあるか、極く短かい孢子柄（殆んど欠除しているように見える）に 2 個宛連結しているかの点及び後者は孢子を真気菌糸上に生ずる点で明らかに両者は区別される。また *Micromonospora* は澱粉を分解し、ゼラチンを消化する性質が強いが *Microbispora rosea* にはその性質がない点でも相違している。しかし多くの培地に気菌糸を造らず集落が orange-pink になる点等で類似している。

3. *Microbispora* と *Thermoactinomyces* Tsiklinsky との比較

両者共に気菌糸を造り、真気菌糸上の孢子が短かい孢子柄の先端に形成される点で類似しているが *Thermoactinomyces* の孢子は 1 個ずつしか生成されず Thermophilic である。また澱粉を分解しゼラチンを液化するのに対し *M. rosea* は Mesophilic で澱粉及びゼラチンを分解する力がない。

4. *Microbispora* と *Waksmania* Lechevalier et Lechevalier との比較

LECHEVALIER ら<sup>9)</sup>の記載により *M. rosea* と *W. rosea* の主な相違点を挙げると Table 4 のようになる。

即ち孢子の色、硝酸塩の還元性及び牛乳の分解力は両者で明らかに相異し、細胞の形、大きさは *M. rosea* の方が全体として小さく、ゼラチンの液化はわずかに相違している。厚膜孢子は *W. rosea* については記載がないので恐らく *M. rosea* に見られる程、特徴的でないと考えられる。

以上の相違点は両者を違った Species として区別するに充分であると考えるが、両者共に孢子の性質及びその形成様式の他に生育温度、酸素の要求性など良く一致しているので

Table 4. Comparison of Characteristics between *Microbispora rosea* and *Waksmania rosea*

|                          | <i>M. rosea</i> | <i>W. rosea</i> |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| Spore color              | white           | light pink      |
| Action on Nitrates       | reduced         | not reduced     |
| Milk peptonization       | negative        | completely      |
| Gelatine liquefaction    | negative        | slightly        |
| Size of :Aerial mycelium | 0.5~0.7 $\mu$   | 0.8~1.5 $\mu$   |
| Vegetative mycelium      | 0.6~0.9 $\mu$   | 0.3~1.2 $\mu$   |
| Conidia                  | 1.4~1.6 $\mu$   | 1.7~1.8 $\mu$   |

同一の属に抱括さるべきものと考えられる。そのうえ色素生産性, 澱粉分解力, 抗菌性などに於ても良く一致する。なお合成培地に生育の悪いこと, 胞子が限られた培地にしか形成されないことは両者とも, 普通の放線菌と違った栄養素要求菌であることを示すが, 栄養的性質について LECHEVALIER らは殆んど試験していないので著者らの結果と比較出来ない。

以上の結果から *Microbispora* 属の分類学上の位置を示すと次の Key 及び図のようになる。

#### KEY TO THE GENERA OF THE STREPTOMYCETACEAE

##### A. Aerial mycelium formed

###### 1. Conidia formed in chains

Genus *Streptomyces* Waksman et Henrici

###### 2. Conidia formed in pairs

Genus *Microbispora* Nonomura et Ohara

= *Waksmania* Lechevalier et Lechevalier

###### 3. Conidia formed singly ;

Thermophilic

Genus *Thermoactinomyces* Tsiklinsky

##### B. Aerial mycelium not formed

###### 1. Conidia formed singly ;

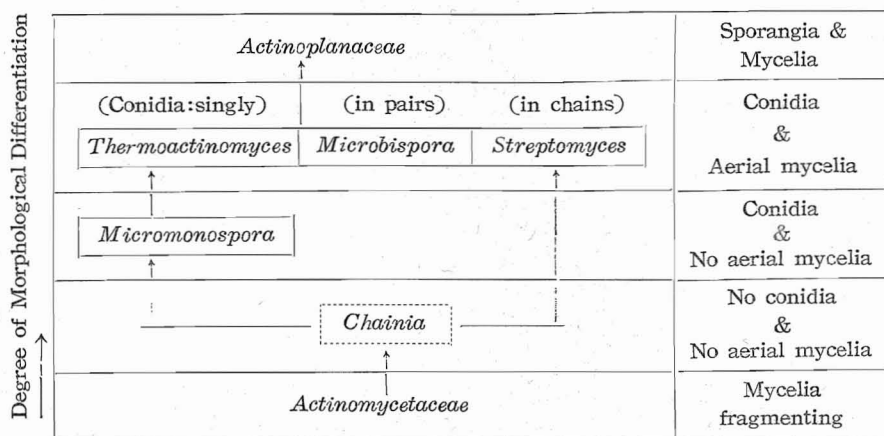
Mesophilic

Genus *Micromonospora* Orskov

###### 2. Conidial forms unknown ;

Sclerotic granules produced

Genus *Chainia* Thirumalachar

Systematics of the Genera of the *Streptomycetaceae* Waksman et Henrici

## 要 旨

1) 土壌中から新しい系統に属する放線菌を発見し、その性質を研究した結果、さきに *Streptomycetaceae* Waksman et Henrici 科に新たに *Microbispora* 属を設定することを提案したが、偶然時を同じくしてアメリカ及びドイツに於ても類似した放線菌が発見されるに至ったので、前報では紙数の関係で報告できなかった実験結果を主として報告し *Microbispora rosea* の記載を補うと共に、LECHEVALIER らの報文により *Waksmania rosea* と比較した。

2) *M. rosea* と *W. rosea* は同一の属名に統一されるべきものと考えるが、両者は胞子の色、硝酸還元性、ミルク消化などに於て明らかに相違するので、違った Species として区別しなければならない。

3) HENSSEN の発表している菌については、その報文をまだ見ていないので詳細は不明であるが *Microbispora* 属の Thermophilic な属型と考えられ、これらの発見によって *Micromonospora-Thermoactinomyces* 系に対する *Microbispora* 系も自然界に広く存在していることが確認されたわけである。

終に本研究は文部省科学研究費による総合研究「腐植の形成、性状並びに類別に関する研究」(主任; 東京大学農学部教授, 弘法健三) の分担課題である「土壌中に於ける放線菌の分布」に関する研究の一部であり、研究費の御援助に対し謝意を表す。

なお *Streptomyces antibioticus* 及び *St. lavendulae* を分譲された財団法人醗酵研究所 (IFO) 長谷川武治氏に感謝する。

DESCRIPTION OF *MICROBISPORA* NONOMURA ET OHARA

The genus *Microbispora* is characterized by the conidia produced in longitudinal pairs on the aerial hyphae. The conidiophores may be so short that conidia appears to be produced directly on the mycelium. The aerial mycelium forms a bud at the side and later the bud, or occasionally the tip of side branch, swells and is separated by a crosswall in the middle giving to rise two spherical or oval conidia. The germination of conidia and the structure of vegetative mycelium are similar to those of *Streptomyces*. This genus is aerobic and mesophilic.

Type species, *Microbispora rosea* Nonomura et Ohara

*Morphology*

*Vegetative mycelium.* On inoculation into fresh medium the conidia germinate, producing one to three germ tubes and forming the radiate or arborescent branching. Hypae,  $0.6\sim0.85\mu$  in diameter, unseptate and not segmenting into bacillary or coccoid elements.

*Aerial mycelium.*  $0.5\sim0.7\mu$  in diameter ( $40\sim200\mu$  in length). Often in cluster and some branching. The colonies are covered with white thin layer of aerial mycelium bearing abundant white conidia. The "fairy rings" occur on some media. Coremia-like hyphae are not formed.

*Conidiophores.* Length usually does not exceed  $0.5\mu$ , but exceptionally  $2\sim3\mu$  long conidiophores are formed as monopodial branchlets.

*Conidia.*  $1.4\sim1.6\mu$  in diameter. Spherical to subglobose. They are born directly on the aerial hyphae or terminally on very short conidiophores, and also on tips of the main sporogenous hyphae and branches. Matured conidia are formed in longitudinal pairs ( $1.4\sim1.7\times3.0\sim3.2\mu$ ). They are very fragile and easily detached from conidiophores and each other when dipping into water. None is formed on vegetative hyphae. Conidium surface is smooth and hydrophobic.

*Chlamydospores.* Abundant chlamydospores are formed (Fig. 2) on vegetative hyphae. On the agar medium rich in available carbon and nitrogen sources almost all hyphae become into chlamydospores. Predominantly fusiform, about  $2\times3\mu$ , but some of them spherical (up to  $4\mu$  in diameter).

*Appearance on various media*

All cultures were incubated at  $30^\circ$  and observed after 2 weeks and after 40 days, except mentioned.

*Asparagine-dextrose agar.* Almost no growth.

*Bennett's agar.* Pale pink growth, becoming cork, glistening, raised, almost smooth. Aerial mycelium is not formed.

*Carrot agar.* Growth good often meagre. Coral becoming chocolate, chestnut brown in the middle, dull red at the margin. Glistening with granular surface, occasionally very slight white aerial mycelium at the top of slant.

*Ca-malate agar.* No growth.

*Casein agar.* Very poor growth, cream to translucent, flat, glistening.

*Czapek's agar.* Almost no growth, pale cream.

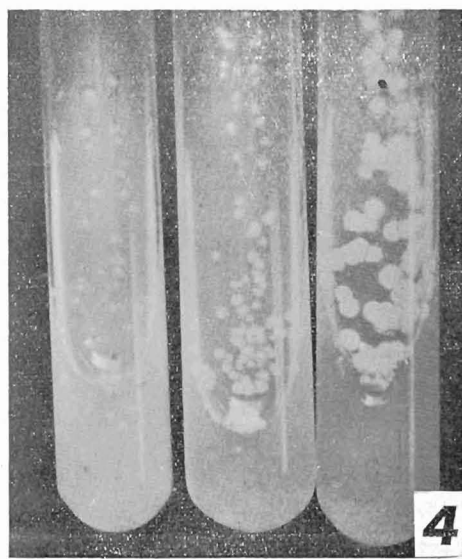
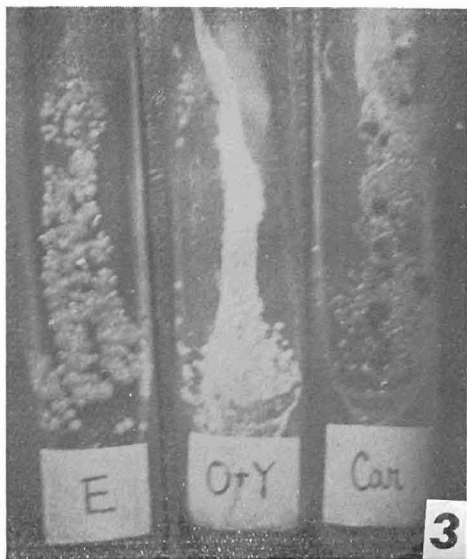
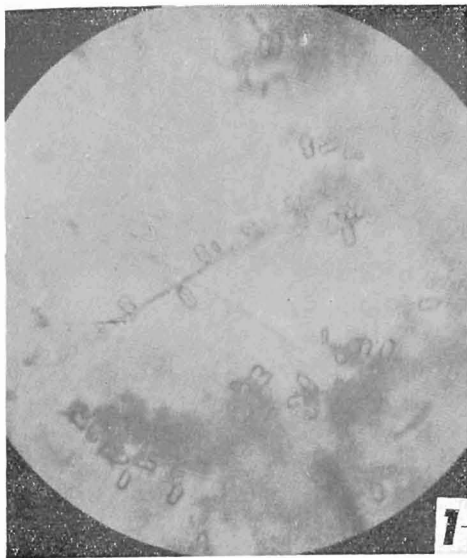


Plate I. A new Actinomycete, *Microbispora* gen. nov.

### EXPLANATION OF PLATE

- Fig. 1. Aerial hyphae and sporulation on palte agar x 1,500.
- Fig. 2. Aerial growth on plate agar, after 14 days at 30°. x 600.
- Fig. 3. Slant cultures on Emerson's agar (E), Carrot agar (Car.), and Oatmeal agar (O).
- Fig. 4. Slant cultures showing very poor growth without N-compounds, poor growth with peptone medium(white), and moderate growth with peptone plus vitamins (orange).

*CB agar.* Growth moderate, camell to coral pink becomes light brown, glistening, granular, raised.

*Emerson's agar.* Sundust to camell growth, glistening, raised, folded. Aerial mycelium and conidia are not formed.

*Glucose-asparagine agar.* Very thin translucent growth.

*Meat peptone solution.* Bottom growth. Fluffy when inoculated with conidia, granular when inoculated with vegetative cells. No surface growth.

*Nutrient agar.* Growth moderate, dull orang to sundust, glistening, raised, folded. Aerial mycelium is not formed.

*Oat meal agar.* Growth moderate, pale yellowish brown, almost flat, covered with white powdery aerial mycelium.

*Potato agar.* Dull orange to dull red, glistening, growth covered with white veil of aerial mycelium at the top of slant.

*Potato plug.* Growth poor. Light brown, occationally very slight trace of white aerial mycelium.

*Yeast-extract agar.* Poor growth.

*Gelatin.* Poor growth. No liquefaction after 30 days at 21°, even on a medium containing B-vitamins or yeast-extract.

*Milk.* Growth meagre, no coagulation, no peptonization after incubation for 30 days. No change of pH value of the milk.

*Nitrate broth and Nitrate agar.* Nitrate reduced to nitrite. After 3 days, nitrite were found distinctly in the media with sulphanic acid and  $\alpha$ -naphthylamine.

*Inversion of sucrose.* No activity after 10 days in modified Emerson's liquid medium containing sucrose instead of glucose. Tests for activities were made with a filtrate of the medium and Fehling solution.

*Starch utilization.* Starch agar: pale cream to translucent, glistening. No diastatic activity, even on starch agar plus peptone or B-vitamins. Tests for starch hydrolysis were made with a lugol solution.

### Staining properties

The organism is not acid-fast. Matured conidia were difficult to stain with Leffler's methylene blue. The chlamydospores take this stains more strongly than hyphae.

### Pigmentation

*M. rosea* usually forms pale pink (with 0.2~0.3 % beef extract) to orange (with peptone plus vitamins) mycelium which becomes paler during prolonged incubation. The pigment production are greatly affected by the nutritional conditions, in particular biotin in the medium. Fe-ion promotes the darkening of colonies and media. Diffusible pigment is very slight. After hot HCl-treatment, the pigments of cells were almost unextracted with acetone and petroleum ether or benzene, but extracted with warm alcohol.

### Growth temperature

The organism is a mesophile. Growth was rather better at 30° than

at 20°. Thermal death point in meat peptone solution, vegetative cells 55°, conidia 65° for 10 min.

### *Optimum pH for growth*

Though this organism can grow at pH 5.2~7.9, the best growth take place at a reaction slightly acidic (about pH 6.0).

### *Antibiotic properties*

No activities were found by cross-streak tests on Emerson's agar or nutrient agar. The following organisms were used: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Klaeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens*, *Aspergillus niger*, and *Mucor mucedo*.

### *Nutritional characteristics*

#### *Effect of phosphate concentration on growth*

It was found that the potassium phosphates in the medium inhibit the growth of the organism at a usual concentration (0.5~5.0 g/l.), and the optimum level is lower than 0.01% in the basal medium I but these inhibitory action of phosphates were greatly eliminated with increasing concentration of beef extract.

#### *Effect of the minor elements on growth*

Cu<sup>++</sup>-ion (CuSO<sub>4</sub>) is injurious even at 2~3 ppm levels. Fe<sup>++</sup>-ion (FeSO<sub>4</sub>), on the other hand, promotes the vegetative and aerial growth at 5~10 ppm levels. No appreciable effects of Zn<sup>++</sup>-ion and Mn<sup>++</sup>-ion were observed on the basal medium I.

#### *Nitrogen utilization*

Ammonium compounds, and urea are not utilized as a sole source of nitrogen; utilizing asparagine, glutamic acid or peptone, with B-vitamins.

#### *Requirement of B-vitamins*

Thiamine and biotin are essential. Occasionally ca-pantothenate, pyridoxine, and PABA seems to be favourable for the growth of this organism. Biotin also controls pigmentation.

### *Source*

*M. rosea* was isolated from a garden soil located in Kofu, Yamanashi Pref., Japan. Type specimens are deposited in the Institute for Fermentation, Osaka, Nagao Institute, Tokyo, and also in the American Type Culture Collection, Washington, U. S. A. and bear the number ATCC 12950.

## MEDIA USED FOR PRESENT STUDY

*Asparagine-dextrose agar*. Glucose, 10.0 g.; l-asparagine, 0.5 g.;  $K_2HPO_4$ , 0.5 g.; beef extract, 2 g.; agar, 17 g.; tap water, 1 l.

*Bennet's agar*. Beef extract, 1 g.; yeast extract, 1 g.; polypepton (Takeda), 2 g.; glucose, 10 g.; agar, 20 g.; dist. water, 1 l.; adjust pH to 7.3 with NaOH.

*Carrot agar*. Carrot, 350 g.; agar, 18 g.; dist. water, 1 l.; adjust pH to 7.4.

*Calcium malate agar*. Ca-malate, 10 g.;  $NH_4Cl$ , 0.5 g.;  $K_2HPO_4$ , 0.5 g.; agar, 18 g.; dist. water, 1 l. pH 7.0.

*Casein agar*. Glucose, 1.0 g.;  $K_2HPO_4$ , 0.5 g.;  $MgSO_4 \cdot 7aq.$ , 0.2 g.;  $Fe_2(SO_4)_3$ , trace; agar, 20 g.; casein, 1.0 g.; dist. water, 1 l.

*Czapeck's modified agar*.  $K_2HPO_4$ , 1.0 g.;  $MgSO_4 \cdot 7aq.$ , 0.5 g.; KCl, 5 g.;  $FeSO_4 \cdot 7aq.$ , 0.01 g.;  $NaNO_3$ , 2.0 g.; agar, 18 g.; dist. water, 1 l. (pH 7.4)

*C B agar*. Glucose, 10 g.; beef extract, 5 g.; peptone, 5 g.;  $K_2HPO_4$ , 1 g.;  $MgSO_4 \cdot 7aq.$ , 0.5 g.; KCl, 0.5 g.; agar, 25 g.; dist. Water, 1 l.

*Emerson's agar*. Beef extract, 5.0 g.; yeast extract, 1.0 g.; peptone, 4.0 g.; NaCl, 2.5 g.; glucose, 10.0 g.; agar, 20 g.; dist. water, 1 l.

*Glucose-asparagine agar*. Glucose, 10 g.; asparagine, 0.5 g.;  $K_2HPO_4$ , 0.5 g.; agar, 15 g.; dist. water, 1 l. (pH 6.8)

*Meat peptone solution*. Glucose, 10 g.; peptone, 10 g.; beef extract, 5 g.; NaCl, 5 g.; dist. water, 1 l. (pH 7~7.2)

*Nutrient agar*. Peptone, 10 g.; beef extract, 5 g.; glycerine, 15 g.; agar, 18 g.; dist. water, 1 l. (pH 7~7.2)

*Oat meal agar*. Rolled oat, 65 g.; dist. water, 1 l.; cook to thin gruel, filter through cheesecloth, and bring up to 1 l. while still hot. Add 2% agar. Do not adjust pH.

*Potato agar*. Peeled potato, 200 g.; agar, 18 g.; dist. water, 1 l. (pH 7.4)

*Starch agar*. Starch, 10 g.; in 800 ml. of water and 500 ml. of water containing:  $K_2HPO_4$ , 1 g.;  $MgSO_4 \cdot 7aq.$ , 1 g.; NaCl, 1 g.;  $(NH_4)_2SO_4$ , 2 g.;  $CaCO_3$ , 3 g.; agar, 10 g.

*Yeast-extract agar*. Yeast extract, 4 ml.; malt extract, 10 g.; glucose, 4 g.; agar, 24 g.; dist. water, 1 l. Do not adjust pH.

*Milk*. 1) Upon culture on well developed potato agar pour sterilized skimmed-milk. 2) Skimmed milk

*Basal medium I*. Glucose, 10.0 g.; beef extract, 1.0 g.; peptone, 1.0 g.; NaCl, 0.5 g.; yeast extract, 2.0 ml.; agar, 20 g.; dist. water, 1 l.

*Basal medium II*. Glucose, 10.0 g.; KCl 0.5 g.;  $MgSO_4 \cdot 7aq.$ , 0.5 g.;  $K_2HPO_4$ , 0.1 g.; agar, 20 g.; dist. water, 1 l.

*Basal medium III*. Glucose, 10.0 g.; KCl, 0.5 g.;  $MgSO_4 \cdot 7aq.$ , 0.5 g.; NaCl, 0.1 g.;  $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ , 0.1 g.;  $FeSO_4 \cdot 7aq.$ , 5 mg.; deionized dist. water, 1 l.

*Potato plug*. Peeled potato in test tube.

*Gelatine*. Peptone, 5 g.; glucose, 20 g.; gelatine, 200 g.; dist. water, 1 l. (pH 7)

## LITERATURES CITED

- 1) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 6th Ed., Baltimore, W. Wilkins (1948)
- 2) *Manual of Methodes for Pure Culture Study of Bacteria*. Leaflet II (1950); IV (1954), Geneva, N. Y. Biotech Publ.
- 3) BALDACCI, E. and P. REDAELLI: Symposium, *Actinomycetales*, Morphology, Biology and Systematics. (VIth International Congress of Microbiology) Roma, Fondazione Emanuele Paterno (1953)
  - a) BALDACCI, E., G. F. COMASCHI, T. SCOTTI, and C. SPALLA: General Criteria for the Systematics of Genera and Species of *Actinomyces* (*Streptomyces*) and *Micromonospora*. *Ibid.*, p. 20.
  - b) ERIKSON, D.: Variation of Mycelial Pattern in Sporogenous and Asporogenous "Actinomycetes". *Ibid.*, p. 102.
  - c) NICKERSON, W. J. and R. R. MOHAN: Studies on the Nutrition and Metabolism of *Streptomyces*. *Ibid.*, p. 137.
- 4) COUCH, J. N.: Technic for Collection, Isolation, and Culture of Chytrids. *J. Elisha Mitchell Sci. soc.*, 55, 208 (1939)
- 5) COUCH, J. N.: *Actinoplanes*, A New Genus of the Actinomycetales. *Ibid.*, 66, 87 (1950)
- 6) COUCH, J. N.: *Actinosporangiaceae* should be *Actinoplanaceae*. *Ibid.*, 71, No. 2 (1955)
- 7) HEIM, A. H. and H. LECHEVALIER: Effect of Iron, Zinc, Manganese, and Calcium on the Growth of Various Strains of *Streptomyces*. *Mycologia*, 48, 628 (1956)
- 8) HENSSEN, A.: Beiträge zur Morphologie und Systematik der Thermophilen Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, 26, 373 (1957)
- 9) LECHEVALIER, M. P. and H. LECHEVALIER: A New Genus of the Actinomycetales: *Waksmania* gen. nov. *J. gen. Microb.*, 17, 104 (1957)
- 10) MINER, R. W. and K. B. RAPER: Speciation and Variation in Asexual Fungi. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 60, Art. 1 (1954)
  - a) HESSELTINE, C. W., R. G. BENEDICT, and T. G. PRIDHAM: Useful Criteria for Species Differentiation in the Genus *Streptomyces*. *Ibid.*, p. 136
- 11) PRIDHAM, T. G. and D. GOTTLIEB: The Utilization of Carbon Compounds by some Actinomycetales as an Aid for Species Determination. *J. Bact.*, 56, 107 (1948)
- 12) 野々村英夫, 小原巖: 土壤中に於ける放線菌の分布 (第2報)  
新放線菌 *Microbispora*, 醸工, 35, 307 (1957)
- 13) THIRUMALACHAR, M. J.: *Chainia*, A New Genus of the Actinomycetales. *Nature*, 176, 934 (1955)
- 14) WAKSMAN, S. A. and A. T. HENRICI: The Nomenclature and Classification of Actinomycetales. *J. Bact.*, 46, 377 (1943)
- 15) WAKSMAN, S. A.: *The Actinomycetes*. Waltham, Chronica Botanica (1950)
- 16) WAKSMAN, S. A. and H. A. LECHEVALIER: *Actinomycetes and their Antibiotics*. Baltimore, W. Wilkins (1953)
- 17) 日本色彩研究所編: 色の標準, 日本色彩社, 東京 (1954)