

糖蜜の「アセトン」及「ブチル・アルコール」 醱酵に就て（第一報）

（一）新に検索発見したる *Bacillus butyligenus* の該醱酵。

〔附〕 Löffler 氏鞭毛染色法の一変法。

農學士 牟田 邦 基

（昭和七年八月三十日受理）

緒 言

從來糖蜜の Aceton 醱酵に関する研究は、之を穀類の該醱酵と同様何等嫌氣的培養を行ふ事も無く容易に目的を達せる事を報ぜるものと⁽¹⁾⁽²⁾、穀類の場合と異なり嫌氣的培養を實行して始めて目的を達する事を報ぜるものと⁽³⁾、又其他各種の特種なる醱酵方法⁽⁴⁾に依つて始めて目的を達せる事を報ぜるもの等ありて、是等研究家の意見は未だ甚だ相違がある様である。余は昭和4年より糖蜜を原料とする該醱酵の研究に従事したが、未だ從來穀類の醱酵に用ひられて居る Weizmann 氏の *Bacillus* を用ひて糖蜜を原料としては何等か特種なる方法が施行せらるゝにあらざれば、徒らなる酸醱酵に陥り目的とする醱酵困難なるか、或は又其收得量が微量に過ぎざる事を試験の結果知悉せるを以て自ら臺灣の土壤より新に検索発見して *Bacillus butyligenus* と命ぜる菌を用ひて比較的簡単に目的とする醱酵に成功し、且つ其中間工業試験にも之を數回實行して蒸溜に附し實際製品を得て、穀を原料とする Weizmann 氏の *Bacillus* に劣らざる成績をあぐる事が出来た。然し唯だ醱酵の當初に於て醱を減壓排氣状態に置く必要ある缺點を有したけれども、中間工業試験に於ては醱槽の製作其他有害細菌の進入等に就ては何等の支障懸念なく簡易に實行し得たので、今日迄に得た成績を報告せんとするものである。

本研究を遂行するに當つて海軍火藥研究部及滿鐵中央試験所の六所文三氏の厚意により分讓された Weizmann 氏の *Bacillus* 即ち *Bac. granulobacter pectinovorum* を參考とした。この海軍より分讓を受けた菌は、歐洲大戰の末期英國に滞在中なりし海軍火藥廠の岸本氏が Captain Desborough 及び Dr. Thysen 兩氏の厚意により英國海軍當局に交渉して分讓せられたもので Weizmann 氏の *Bacillus*、即ち *granulobacter* に相違なきもので、六所氏の研究成績¹⁾によるも、又私が其各種の性質に就て試験した性質が從來歐米に於て發表せられたる該菌の性質と全く相一致して居るものである。

實 驗

第一章 甘蔗糖蜜に適する菌の分離

（一）本島土着菌の検索。

從來 Aceton 菌の固形培養は頗る困難視或は不可能視せられ其純粹培養法としては孢子の耐熱性を利用して數十回の淘汰的培養に依つて目的を達せられつゝあり。故に余も亦目的とする

細菌を検索分離するには實驗の當初に於ては専ら C. Weizmann 氏の方法を用ひたが後固形培養基に於て容易に Kolonie を生産せしむる事を得たので、固形培養基上の Kolonie による分離法を併用した。即ち外國碎白米に市販米糠 10~20% を混ぜるもの、5~7% 水溶液の試験管入培養基を用意し Autoklav にて 2 氣壓に 2 時間蒸煮したものに採集した試料の少量を入れ 37°C Thermostat に 10~20 日間培養し、然る後沸騰せる Wasserbad に試験管の培養を漬け、試験管内の培養基の温度が Wasserbad の熱湯の温度 100°C と同一温度となる迄即ち 3~4 分間漬けた後取り出し、尙ほ試験管が沸騰湯に漬からざる上部は火焰を用ひて外部より殺菌を行ひ、然る後室内の常温に放置し、冷後之を種子として更に新しき同様培養基に接種熟成せしめ、以て更に同一方法を繰り返へし淘汰的培養を進行せしむ。斯くして適度に淘汰せし後固形培養を行ひ Kolonie を生産せしめ純粹培養を爲す。其際培養に用ひし試験管は長さ 25cm 内徑 3 cm にして綿栓を施し、更に之を Paraffin 紙にて包む。この試験管に於て培養液は 95~100°C の Wasserbad に浸漬すれば、3 分間に於て Wasserbad と同一温度となる。斯く比較的大型の試験管を用ふるは、醱酵の状況明瞭なるのみならず、培養の熟成後其上澄液を採つて Aceton の定性を爲し、之を種子として多數に分割して培養を進行し、又この試験管培養を減壓中に於て醱酵せしむる爲め減壓操作を行ふ場合、培養基の沸騰により可成綿栓を濡らさざらしめんが爲め、斯く大型なるを用ふる必要あり。

接種後培養するには、真空乾燥器中に入れて水銀柱の 20~50 mm の減壓程度にて 37°C Thermostat 中に保ち、其後培養中適度に更に排氣操作を繰り返へす。乾燥器の器底には 20% の Pyrogallol 及同 % の苛性加里を等量に混ぜるものを脱脂綿に浸して入る。

Solvent の生産の有無を検するには、Aceton の定性を爲す。Aceton の定性法としては Jodform 反應、Legal 氏の反應等あれど何れも頗る不適にして用ふる事を得ず、唯だ Rothera's Reaction⁽⁵⁾ を以て最も適當したるものとして専ら是により、又其呈色の強弱により各菌株の選擇淘汰を行ふ。其方法は熟成せる培養の上澄液を試験管に採り (Aceton の生産少量なる場合は醱を一旦蒸溜して、溜出液に就き定性を爲すべきなれど、特に必要を認めし場合の外蒸溜を行はずして唯だ上澄液を用ふ) 5% Na-nitroprussidlösung を滴加し、更に數滴の Konz. Ammoniak を加へ、更に又 Kahlbaum 製の festen NH_4 -Sulfat (不純なる時は呈色弱く、不明なる時あり) の少量を添加して festen NH_4 -Sulfat と液との間に生ずる紫色を 20 分以内に時々觀察す。但しこの反應に於て Na-Nitroprussid 及 NH_4 -Sulfat の量大なるに従ひ呈色度強しと雖も、Ammoniak の量大なる時は却つて呈色消失する傾向あり。而してこの反應により全く見込無きものは余は當初廢棄したれども、後は假令試験中 Aceton の生産力皆無なるものも保管して培養を進行せり。何となれば培養方法の如何若しくは培養基の種類を異にするに従つて Aceton の生産力を異にする場合あるを以てなり。而して淘汰的培養約 5~8 回にして Sand Kulture として保管し、漸次目的に最も適したるものより研究を進行す。

細菌の分離に使用したる穀類及土壤は第一表の如し。

第 一 表

細菌 番號	試料品名	試料採集場所	採集年月日	米醱に於ける Acetonの 生産
1	外國碎白米	總督府專賣局臺北造酒工場	昭和4年9月	++
2	馬鈴薯	臺北市内市販品	同年自9月至12月	-
3	粟	"	"	-
4	稗	"	"	-
5	臺灣産玄米	"	"	-
6	玉蜀黍(白色種)	"	"	-
7	"(黄色種)	"	"	-
8	蒸溜酒腐造醱	當研究所アミロ法試験中の醱	"	++
9	臺灣産米糠	臺北市内市販品	"	-
10	造酒工場粉米糠中附着物	總督府專賣局臺中支局酒工場	"	++
11	土 壤	臺南州曾文郡烏山頭甘蔗畑栽培中	同 年 12 月	+
12	"	臺南州嘉義市林業試験場バナナ畑	"	++
13	"	高雄州恒春郡四重溪パイカチライ蕃社	"	++
14	"	高雄州水底寮シヨウガ畑	"	++
15	"	高雄州後壁林製糖所 2042 番	"	+++
16	"	" 2047 番	"	+++
17	"	" 2048 番	"	++
18	"	臺南州嘉義市農事試験場パイナップル栽培畑	"	++
19	"	高雄州恒春郡枋寮附近水田	"	++
20	"	高雄州橋子頭臺灣製糖工場附近甘蔗畑	"	++
21	"	高雄州鶯鑾鼻燈臺タコノキ根元	"	++
22	"	高雄州屏東街臺灣製糖工場附近甘蔗畑	"	++
23	"	高雄州岡山郡燕巢庄淡水泥火山噴出土壤	"	++

本表に於て(一)は全く生産せず、(+)は極めて微量、(++)は明に生産すれども微量、(+++)は少々強きを示す。

以上の試料に於て土壤を採集するには園藝用の移植ゴテを用ひて土壤の表面より8寸乃至1尺の深さの部分を取つて綿栓殺菌して用意せる標本瓶に入れて貯藏す。用ふる移植ゴテは使用後毎回60 vol.%の酒精を用ひて洗滌し、脱脂綿若しくはガーゼに60 vol.%の酒精を浸漬せしめたるものを以て包み、更に乾燥せるガーゼにて包みし上を新聞紙にて包みて携帯す。馬鈴薯より目的とする細菌を分離するには馬鈴薯をBecherglas中に入れ加水して放置10日間十分腐熟したるものを加熱殺菌して用ふ。其他穀類は粉碎したるものを用ひしも粟、稗及米糠は粉碎せずして其儘用ひ、米は粉碎し若しくは粉碎せずして用ふ。土壤は加熱殺菌Pinzetteにて小塊を狭み其儘用ふ。

淘汰的培養約4回に至る迄各Probeを異にするに従ひ、細菌體の形態に各々相違ありしと雖も淘汰的培養漸次進行すると共に5~6回頃より略統一されたる形態、即ちClostridial-又はPlektoridial-formを形成する種類の形となる。然れども其間に各菌株に従ひ多少の相違あるものあるを認む。

以上の成績により大體に於て穀類中の Aceton 菌よりも土壤中の Aceton 菌に有力なるもの存在する傾向あり。

(二) 各菌株の糖蜜の醱酵能力比較。

糖蜜の醱酵に就ては本試験當初に於ては未だ十分なる經驗を有せざりし爲め多く失敗に歸せり。即ち假令多少の醱酵は營爲すと雖も、徒らなる酸醱酵にして又 Jodometrie 法により相當なる定量成績を得る場合あるも、實際に分溜により Aceton 及び Butanol を收得せんとする時は收得量は極めて微量に止まり、實際に Aceton を確實に生産せりとの確證を得るに至らざりき。

然れども漸次試験回数を重ねるに従ひ、培養基の新古と Aceton の生産と重大なる關係あるを認むるに至り、更に進んで同じく新鮮なる培養基に於ても培養中に於ける嫌氣培養の排氣の程度に關係あるを認むるに至り、始めて糖蜜を原料として實際に Aceton 及 Butylalkohol を分溜する事に成功せり。

斯くの如くして 13 種の菌株に就き試験せる所は第二表の如し。此の表に於て

- (イ) 醱を調製するには下記分析表の糖蜜を Brix 10° に水道水を以て稀釋し、之れに醱 100 c.c. 中 1 g. の米糠を添加、アルカリを以て中和の後 Koch 氏殺菌釜に 3 日間、間歇殺菌を爲し、未だ醱の溫暖なる内に碎米培養の種子約 1~2 滴宛を接種す。
- (ロ) 培養する容器は 200~500 c.c. の三角瓶に醱を 100~300 c.c. 入れ綿栓は Paraffin 紙にて包み Pyrogallol を入れたる眞空乾燥器中に入れ、眞空度 30 mm に排氣減壓し其後醱酵經過中も時々排氣減壓を行ひ 37°C Thermostat 中にて培養す。
- (ハ) 原料糖蜜の分析；

第 二 表

Brix 度	總糖分 g%	還元糖 g%	蔗糖 g%	總酸 20g を中和する に要する N/10 NaOH	灰分	全窒素 g%
78.92	41.33	21.73	18.62	1.90 c.c.	9.564	0.538

【備考】 分析法は臺灣醸造研究会編醸造便覧による。

第三表に於ける Aceton の定量は普通一般に Aceton 醱酵の醱に於て用ひらるゝ Messinger 及 Goodwin⁽⁶⁾ 氏の方法に従ひしものにして其一例を示せば次の如し。

熟成醱 100~200 c.c. を採り、之を苛性曹達にて弱アルカリ性となし井水を加へて 200~300 c.c. となし蒸溜フラスコに容れ、普通の如く蒸溜に附し其 3 分の 2 の溜出液を採り、更に溜出液中の Ammoniak を除去する目的 (Bakteria は含窒物質を分解して Ammoniak を醱中に含有するに至るを以て溜出液中に遊離 Ammoniak を溜出して定量に過大なる結果を與ふ。殊に Pepton の如き含窒物を營養剤として用ふる如き場合は Ammoniak の發生旺盛にして被檢定液は屢々 Jod の添加により黒變する事あり) を以て稀硫酸を添加して弱酸性となし 3 分の 1 量の水を加へて再溜して其 3 分の 2 の溜液を Messkolben に採り正しく容量を定め、後其の 5~

第 三 表

細菌 番号	醱酵 時間	醱 100 c.c. 中の Aceton の g 数	Total glucose に對する Aceton の%	細菌 番号	醱酵 時間	醱 100 c.c. 中の Aceton の g 数	Total glucose に對する Aceton の%
No. 1	72時	0.0377	0.689	No. 17	72時	0.0662	1.200
"	"	0.0348	0.631	"	"	0.0599	1.086
No. 11	108時	0.1509	2.732	No. 18	"	0.0580	1.051
"	"	0.1354	2.452	"	"	0.0662	1.200
No. 12	"	0.0397	0.723	No. 19	"	0.1934	3.503
"	"	0.0271	0.491	"	"	0.1834	3.328
No. 13	"	0.0484	0.875	No. 20	"	0.1891	3.425
"	"	0.0382	0.691	"	"	0.2114	3.828
No. 14	72時	0.0102	0.194	No. 21	"	0.0329	0.595
"	"	0.0184	0.332	"	"	0.0319	0.578
No. 15	"	0.0169	0.307	No. 22	"	0.0329	0.596
"	"	0.0242	0.438	"	"	0.0439	0.797
No. 16	"	0.0160	0.289				
"	"	0.0135	0.245				

10 c.c. を有栓の 200~300 c.c. の三角瓶に入れ、2 N 苛性曹達 10 c.c. を三角瓶の器壁に添ふて流下せしめ、約 5 分間振盪せる後、N/10 沃度沃度加里液 10~25 c.c. を加へ栓を施し、振盪しつつ 10~20 分間放置、然る後更に 2 N 硫酸液を 10 c.c. より多少過量に加へて栓を施し振盪せる後 N/10 Na-Thiosulfat 液にて新鮮なる澱粉液を以て滴定して、消費されたる Na-Thiosulfat の量を前に加へたる沃度液より引き去り、残量の沃度液 1 c.c. = 0.000967 g の Aceton に相當するものとして計算す。但し此の際 blank kontrol として醱酵せしめざる醱を同様にして定量をなし、この滴定数を控除する事勿論なりとす。

以上の成績により第 20 號菌が最も目的とする所、即ち糖蜜の醱酵に適するを以て、先づ第 20 號より研究に着手せり。

第二章 第 20 號菌

本菌は臺南州岡山郡橋子頭壓臺灣製糖株式會社附近の甘蔗耕作中の土壤より昭和 4 年 12 月 6 日採集せるものより分離せるものなり。其碎白米及米糠の培養基に於ては培養基の分解比較的良好ならずして熱成せる醱に於ても久しく白濁を呈し、上澄液透明となる迄には久しき時日を要す。又熱成せる醱の黄色度も極めて淡く残渣の液上面に浮上する事も無く、永く保存する時は液の上面の試験管に微弱ながら Ring の形成あり、皮膜は形成せず、而して Aceton の生産も甚だ劣弱なり。

然れども糖蜜を原料とする時は比較的熱成醱の Aceton の香氣高きのみならず Jodometric 法による定量成績も頗る良好なるにより先づ本菌を撰定したり。

10 回の Selection により顯微鏡的に形態を調査し、又糖蜜醱を醱酵せしめて常に Konstant の Aceton の定量成績を得るにより純粹なりとして各種の研究を進行せり。而して研究の進行

中に於ても常に其培養中 Selection を行ひ、現在に於ては 100 數回の Selection を經しものを得るに至れり。

(一) 本菌の名稱。

Normale Zellen, Sporen, Sporangien, Reservestoff 等略ぼ *Bacillus amylobacter* A. M. et Bredemann⁽⁷⁾ 又は *Clostridium acetobutylicum* 若しくは *Bac. saccharobutylicus* Klecki⁽⁸⁾ 等の酪酸菌若しくは Aceton 菌に類似すれども Gramscheiförmig, Kolonie, 各種炭水化物の醗酵能力等に於て從來記載せられたるものと相違する處ありて、且つ從來 Aceton 菌として専ら廣く用ひられて居る *Bacillus granulobacter pectinovorum*, *Bacillus macerans* Schardinger⁽⁹⁾ 若しくは *Bacillus acetoethylicum* Northrop⁽¹⁰⁾ 等とは其工業的用法に於て特異性を有するものと思ふが故に、特に *Bacillus butyligenus* と命名して研究を進行せんとす。即ち從來提出せられたる Aceton 菌は穀類を直接分解醗酵して Aceton と Butylalkohol を生産するに反し、本菌は穀類に直接作用する場合は、好氣若くは嫌氣何れの培養たるを問はず、有機酸醗酵に陥り Aceton 及 Butylalkohol の生産量は極めて微量なるか若しくは皆無なるに反し、糖蜜を原料とする場合に於て嫌氣培養法により極めて優秀に Aceton 及 Butylalkohol の收得量を示す特性を有す。

(二) Morphologie.

Morphologie は各種の培養基に於て變化あるべき筈なれど、本報告に於ては米醗に於ける場合の記載を爲す。

(イ) 培養基の調製。

外國碎白米に 20% の米糠を混じり細粉となす。之を前記細菌の分離の項に記すと同様の試験管にて同様に蒸煮す。而して使用の際は一且貯藏して冷却せるものは更に沸騰する Wasserbad 中に入れ加熱し、或は又 Koch 氏殺菌釜中にて加熱せる後其未だ冷却せざる以前即ち 50~80°C に於て接種す。

(ロ) 培養の方法。

前記培養基に接種後其培養基の未だ溫暖なる内に真空乾燥器に入れ、20~30 m.m. 減壓度に達せしめ 37°C Thermostat にて培養す。

Normale (vegetative) Zellen:— 接種後 18~24 時間培養に於て兩端圓形にして堅實なる多く長桿狀、稀れに短桿狀を爲し、時に數個連結體を造り各個體の區別明かならざる場合あり。其長さは明瞭に 1 個體なりと認め得るものにて 12 μ に達する事稀れならず、短きは 3.2 μ 程度にして、普通 5 μ 程度のもの最も多數なり、幅は比較的一定して移動少く 0.8~1.2 なれども 0.8 μ 程度のもの最も多數なり。

Sporangien:— Clostridialform に於ては長さ 4.5~8 μ にして、幅は最大部に於て 1.8~3.2 μ なり。兩端は尖鋭度少く圓形を帯ぶるもの多數なれど、尖鋭の程度高く Spindelform を呈するものも少しとせず。Plektridialform に於ては長きものは 12.2 μ に達するものあれど、

7~8 μ のものを最も普通なりとす。幅は最大部に於て 1.6~3.2 μ なり。接種後 24 時間にて既に試験管培養に於ては Sporangien の形成ありて 24~40 時間にて其形成最も旺盛なり。

Sporen:— 胞子は甚だ幼稚なる新しき培養に於て即ち接種後 24~40 時間内外の培養に於て既に胞子を形成せる Clostridium 形の菌體少なからずして約 40 時間にして遊離胞子の形成旺盛なり。而して既に胞子を生ずるも頗る旺盛活潑なる運動を営む

十分に成熟せる胞子の大きさは 2.6×1.6 μ なり。

第 四 表							
1930, 12 gt. 2 nt. 接種培養; 1931, 3 gt. 6 nt. 検定.							平均
Länge (μ)	2.4	2.5	2.6	2.8	3.0	3.2	2.57 μ
Anzahl (個)	22	19	11	6	18	24	
Breite (μ)	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8		1.58 μ
Anzahl (個)	3	4	3	81	9		

培養 50~60 時間にして normal Zellen 及 Sporangien は減少して老廢體の状態となり、freie Sporen の數増大す。Spore は橢圓形にして表面平滑なり。胞子の大きさは成熟十分なるものに於て 3.2 μ × 1.6 μ の略ぼ一定したる大きさを有すれども、古き培養即ち接種後 20~100 日を経過せるものに於ては、長軸若くは短軸に於て 0.4 μ 程度縮少す。尙ほ新しき培養に於ても胞子を染色する際に於ける加熱の程度大ならざる時は生態の大きさと同一なれど、加熱大なる時は同様程度縮少を來す。而して本菌の胞子は Carbofuchsin による染色極めて良好にして且つ稀酸による脱色も比較的容易なり。

胞子の發芽:— 胞子は米醱の培養の約 1 ヶ月経過して十分に成熟せるものを 100°C に 3 分間加熱して既に記述せると同様の米醱に同様にして接種 37°C に培養して Anilinwasser-gentianaviolettlösung を以て染色して發芽状態を觀察す。

接種後 17 乃至 20 時間にして大部分は發芽を爲し、14 時間以前に於て發芽するもの無く 15 時間乃至 16 時間に發芽するものは極めて小數に止まる。

發芽状態は胞子の長軸の一端より發芽する即ち極發芽なり。

老廢體:— 十分に醱酵終了後に於て之を觀察するに大部分は既に遊離胞子の状態を呈すれども vegetative Zellen 若しくは Plektridialform の形態を呈し、胞子形成の中途にて老廢の状態となれるもの少なからず。而して最も興味を感じる事項は Gramsche Färbung の項に於ても記載する如く老廢状態となれる vegetative Zellen 中に短桿菌樣體を發生し、而して該體を發生せる母細胞は漸次脱離して、該體は恰も獨立したる新なる細菌體の如き觀を呈する事なり。而して該體の特性とする所は母細胞は gramsche Färbung は negative なるに反し、之れは強き positive にして又胞子は 0.5% Methylen blau により染色極めて不良なるに反し、之れは極めて強く染色せらる。其の大きさは略ぼ一定し 0.8×1.6 μ 乃至 0.8×1.8 μ なり。新鮮なる培養に於ては該體を存せずして、醱酵の末期若しくは醱酵を終れる老培養に於て該體並に該體より母細胞の脱離しつつある状態を認むるなり。而してこれは 1 種の胞子類似の繁殖器管なるが

如き疑ひを有し Bredemann 氏等の記載する Microoidien⁽⁷⁾ 類似のものと思考せらる。

Geisseln:— 鞭毛染色を實行するには蛋白質, Pepton 等含有量少き炭水化物の固形培養の極めて新鮮なるものを採つて實行するを普通なりとす。然れども余は前述の米糲の液體培養に就き觀察を遂行せり。

染色は Löffler 氏法に従つて實行せるも殆んど全く不成功に終れり。而して實際用ふる硫酸第一鐵の古くして Oxyd 等に變化せるもの多きもの程、染色僅かに良好なる傾向ありしを以て硫酸第一鐵中に任意少量の硫酸第二鐵を添加して試験せるに良好なる成績を得たり。然れども尙未だ不十分なるを感じしを以て更に全く第一鐵を使用せず、硫酸第二鐵の 20% 水溶液（蒸溜水 1 L. 中硫酸第二鐵 20 g を溶解）を用ひしに毎回良好に鮮明なる Präparat を製するを得たり。其實行せる方法は

(1) Löffler 氏原法。

Janke-Zikes: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie に従つて行ふ。

硫酸第一鐵の冷飽和液を造るには綠礬の新鮮なるものを用ひて Oxyd を除去する爲め濾紙を以て濾過せる後他の試薬と相混じ、若しくは濾過せずして即ち Oxyd を除去せずして混ぜしも何れも Deckglas に色素の被膜を生じ、容易に Geissel を見る事能はずして極めて稀に小數に薄く染色せられたるに過ぎず。硫酸第一鐵の古く風化せるものを用ひし場合は、可なり鮮明に認め得る場合ありと雖も、硫酸第二鐵を用ひし場合の如く容易且つ鮮明ならずして極めて不完全なり。又媒染劑に苛性曹達、硫酸若しくは鹽酸の少量を添加して試験せるも何れも良結果を得ず。

故に媒染劑として硫酸第一鐵の新鮮なるものを用ふる時は Geissel の染色不可能にして、古く風化せるものを用ふる時は僅かに染色せられたりと雖も、下記の如く硫酸第二鐵を用ふるに如かざるなり。

(2) Löffler 氏の媒染劑の變法。

(1) に記述せるが如く媒染劑の硫酸第一鐵の風化如何により染色に難易ある事を認めしを以て硫酸第一鐵の代りに硫酸第二鐵を用ひしに Präparat の洗滌極めて良好にして、現はるる鞭毛の状態も極めて良好にして興味あるものあるを觀察せり。即ち倍率低き又解象率低き顯微鏡を以て觀察する時は、普通に視らるる Geissel の外に細菌體の周圍に一塊の不純物が煙の如く附着して視らるれども、之を倍率高く又解象率高き顯微鏡を以て觀察する時は細長なる鞭毛が波狀若しくは螺旋狀を呈し Peritrich に相互相接して密生し居る事を觀察す。（余は Zeiss 製の太型鏡筒顯微鏡にて對物鏡 120 n.A. 1.3 及 Leiz 製の太型鏡筒顯微鏡にて對物鏡 90 n.A. 1.32 の兩者を比較して用ひた。）

其染色を實行せる方法は

(1) Beize.

1 c.c. Alkoholische gesättigte Fuchsin Lösung.

5 c.c. 20 g Ferrisulfat を蒸溜水を以て溶解し 100 c.c. とす。

10 c.c. 20 g の Tannin を蒸溜水を以て溶解し 100 c.c. とす。

上の各液を使用に際して混合して濾過す。

(2) Anilinwassergentianviolett Lösung.

100 c.c. Anilinwasser.

4~5 g. Gentianviolett.

1 c.c. 1% Natronlauge.

此の色素液は使用に際し調製濾過す。

(3) 染色の方法.

前記米醱の 20~40 時間培養の數滴を水道水約 30 c.c. を入れたる小蒸發皿に滴加し、該液を Deckgläschen に可成薄く塗末し、瓦斯火焰上の乾燥せる空氣中に Cornetpinzette にて保持し、可成低温に可成迅速に乾燥せしむ。而して之を更に加熱して固定せしむる事なく、其儘媒染劑を滴加して靜かに加温し、液面より蒸氣の發生を見るに至りて加温を止め、1 分乃至 2 分間靜置す。然る後色素を傾斜して去り、水中に入れ十分に洗滌、94% 酒精を以て Präparat を洗滌、細菌の附着部分のみ着色を認むるに至りて止む。然る後濾紙にて乾燥し、Anilinwassergentianviolett を Präparat 上に滴加其全面を被はしめ Sparflamme 上にて徐熱し蒸氣發生するに至らば之を机上に靜置する事約 1~3 分間、然る後水洗して Balsam を以て Präparat を固定し檢鏡す。

遊離胞子に残存する Geißel:— 本菌は米醱に於て極めて迅速に、即ち 30 時間内外に於て既に Spore の形成を開始し、40 時間内外にて遊離胞子の形成旺盛なり。而して胞子を形成するも運動極めて活潑なり。故に接種後 40 時間内外の培養に於て前記せる方法により Geißelfärbung を行ふ時は、遊離胞子と認むべきもの、一端に數本、若しくは束状を爲して尙ほ Geißel を残存する事を認む。一見 Spore 其者に Geißel を有するが如き外觀を呈するものと雖も、下記するが如き事實により母細胞の一部が未だ十分脱離せずして尙ほ残存するものと思せらる。

(イ) 接種後 40 時間内外培養せる醱の上澄液（遊離胞子の發生旺盛なる時期の醱）を Deckgläschen に塗末し Sparflamme 上の乾燥空氣中に保持し乾燥せる後、1% 醋酸液を滴加して、其儘風乾揮發乾燥せる後前記鞭毛染色法により鞭毛染色を爲す時は、鞭毛は染色せられずして唯だ freie Sporen の前記鞭毛を附着せる部分に薄紫色に染色せられたる扇狀形の第十五圖に示すものと同一なる一種の尾を曳引するを視る。而して殆んど總ての freie Sporen に此の曳引物質を附着する事を認む。

(ロ) 前項と同一なる培養を採り、Sporenfärbung を爲し Methyleneblau を以て Doppelfärbung を行ふ時も同様に、紫色に染色せられたる扇狀形の物質を一端に曳引するを視ること第十五圖に示すが如し。

Granulose:— $N/10$ Jodjodkali 液を細菌の生體に加ふる時は極めて幼若なるものは唯だ稀黄色を呈するのみなれど Spore 生産の時期に到れるもの、若くは Spore を生産せるものは Granulose の生産顯著なり。

Kapsel Färbung:— Kapsel Färbung は Friedländer 氏法による。即ち

- (i) Präparat を 1~3 分間 1% 醋酸液に浸す。
- (ii) 液分を除去し速かに Präparat を風乾す。
- (iii) Anilinwassergentianaviolett 液を以て 4~5秒間處理す。
- (iv) 水にて洗滌し鏡檢す。

本法による時は normal Zellen 若しくは Sporangien に於ては Kapsel を見る事能はず。freie Sporen に於て Kapsel と思はるゝものを觀察すれども、これ所謂 Exine の厚きものなるべし。

Sporenkapsel:— Winogradsky 及 Bredemann 氏等は Sporenkapsel⁽¹¹⁾ なるものを稱したり。本菌に就て米醱に於て之を調査するに本菌の Spore は Carbol-fuchsin により極めて良く染色せらるゝにより、此の所謂 Sporenkapsel を調査するには極めて短時間 Präparat を Carbol-fuchsin 液に浸し、直ちに洗滌して見る時は Bac. granulobacter pectinovorum の如く顯著ならざるも之れに類するものを認むる事を得。然れどもこの Sporenkapsel は Winogradsky 若くは Bredemann 氏等の稱する如き母細胞の其儘殘存するものに非ずして、孢子其者の外皮なり。

Gramsche Färbung:— 本法を本菌に用ひし手續は下記の如し。

- (i) 若き培養より少量の細菌を採り Deckgläschen に Ausstrichpräparat を作り之を風乾固定す。
- (ii) Anilinwassergentianaviolett-lösung を Präparat に注ぎ加熱する事少くも 2 分間。
- (iii) 水を以て洗滌。
- (iv) $N/10$ Jodjodkalilösung を Präparat 上に注ぎ 30 秒~1 分間靜置。
- (v) Präparat より沃度液を流し去り、局方 absol. Alkohol にて洗滌肉眼にて色素を認めざるに至りて止む。

以上の方法に依て檢する時は本菌は negativ なり。然れども Spore 生産の時期に近づけるものに於ては partially positiv⁽¹³⁾ のものを小數に混す。Spore は negativ (殆んど總て negativ なれども小數に positiv なるものを混す) なりと雖も、老培養に就て調査するに第十七圖に示す如く、小數ながら短桿菌樣體の positiv なるものを混す。同一の試料に就て Methylenblau を以て染色する時は Gram positiv なりし其細菌樣短桿體は濃厚に染色せらるゝを見る。而して其大さは $0.8 \times 1.6 \mu \sim 0.8 \times 1.8 \mu$ なり。

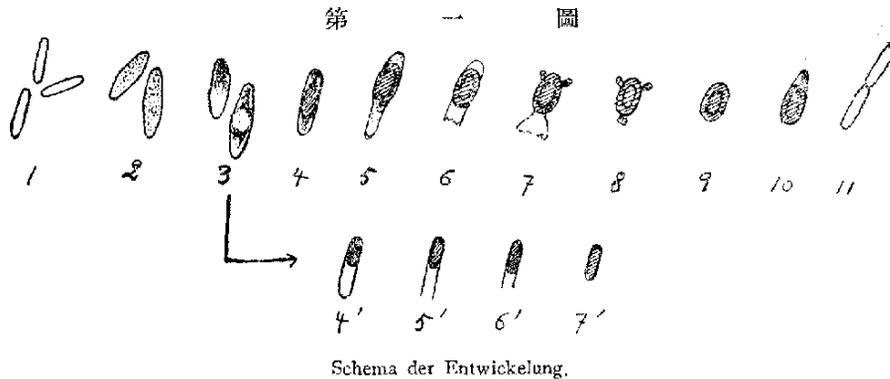
然れども之れは Bredemann 氏等の觀察せる Microoidien⁽¹¹⁾ 類似のもの、若しくは Haag 氏等の稱する Gonidial form⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ にして Gram negativ なる母菌の體内に生ぜるものが、母體が破壊脱離して frei の状態に變化せるものなるべし。

胞子の死滅温度：— 長さ 15 cm. 徑 1.5 cm. の試験管に 5% の米糲を 2 氣壓に 2 時間蒸煮せるものを 5 c.c. 宛分取し 100°C に 40 分宛 3 日間、間歇殺菌の後本菌を接種 10 日乃至 20 日培養、十分に胞子を生ぜしめたる後、これを其儘第五表に示す夫々の温度に加熱し、加熱所定時間を経れば直ちに冷水中に入れて冷却し、之を既述せる細菌の分離の場合に用ひたる大なる試験管入りの米糲中に流入接種して、37°C に培養して醗酵の有無を観察せり、但し 100°C 以上の温度の場合、胞子を培養せる試験管口を加熱熔融して密封したるものを所定の温度の Öl-bad に浸入せしめて同様にして試験す。

第 五 表

加熱温度	60°C	70°C	80°C	80°C	90°C	90°C	100°C
加熱時間	60分	60分	60分	120分	60分	120分	10分
醗酵の有無	+	+	+	+	+	+	+
加熱温度	100°C	100°C	100°C	100°C	100°C	110°C	
加熱時間	20分	30分	40分	60分	120分	10分	
醗酵の有無	+	+	+	-	-	-	

【備考】 (+) は未だ繁殖力を有し増殖醗酵するを示し、(-) は胞子全く死滅し増殖醗酵せざるを示す。



菌體の發育經過：— 本菌の米糲中に於ける發育經過に就て説明すれば第一圖の通りである。本圖の内 (1) は normale Zellen 時代で此の時代に於ては gram negativ であつて Jodjodkali 液に依つて唯だ黄色に染色せらるゝのみである。(2), (3) の時代は Spore 形成の時期に近づいて居るもので Jodjodkali 液に依つて紫藍色に染色せらるゝものが多い。(4) の時代は Spore が形成せられつゝある時代で Spore の部分は gram 染色により positiv となる。(5) は Spore が成熟したもので (6) 以下 (10) 迄は Spore が母細胞を脱離して發芽する迄の經過を示す。(4') から (7') 迄は老熟に達した糲中に於て normale Zellen が十分成育して完全なる Spore を形成するに至らずして Spore 類似の又 Oidien 若くは Gonidia 類似のものを形成して、それが母細胞を脱離して恰も 1 個の獨立した新たなる桿菌様體を呈するを示すもので、これは gram

positiv なるを以て gramsche Färbung により此の状態を良く視る事が出来る。

(二) 固形培養基上に於ける培養。

Bacillus granulobacter pectinovorum の固形培養基上に於て Kolonie を形成せしむる事は從來極めて困難視されて居た。然し最近に於ては Elliot R. Weyer and Leo. F. Rettger⁽¹²⁾ 氏は孢子の耐熱性を利用せる Weizmann 氏の方法と Plattenkultur による Kolonie 法とを併用して *Clostridium acetobutylicum* を分離して居る。然し其 Kolonie の記載を爲さざる爲め其特性を知るを得ざれども、余は前記の海軍より得た *Bac. granulobacter pectinovorum* と本菌とを平行して下記の通りにして固形培養を行ひ、何れも容易に kolonie を形成せしめ其特性を比較する事を得た。

斜面培養を爲すには細菌の検索分離に用ひた前記の試験管にて下記の如き培養基及方法を以て實行した。

(1) 培 養 基。

Dextrose-Agar (Bredemann 氏による)

Dextrose (anhydrous)	5.0 g.
照内 Pepton	6.0 g.
Liebig 肉エキス	4.0 g.
NaCl	1.0 g.
Agar	8.0 g.

以上を蒸溜水を加へ 500 c.c. とす。

(2) 培 養 方 法。

前述の試験管に 50 c.c. 宛入れ Koch 氏殺菌釜にて 40~45 分 3 日間滅菌を行ひ、未だ其冷却せざる以前 pyrogallol を入れたる真空乾燥器中に試験管を適當に横へて 20~30 mm 減壓程度に至る迄排氣を行ひ、試験管内の培養基を僅かに沸騰せしめつゝ固結せしむ。然る後十分冷却せしめ試験管を取り出し、米糲培養の種子を白金線にて培養基の表面を傷つけざる様注意して 1 線を引き、直ちに前の真空乾燥器に入れ再び 20~30 mm に排氣して 37°C にて培養す。然る時は生の seed を用ひたる場合は 1 週日を出でずして斜面上に線狀に若しくは散亂して多數の Kolonie を生ず。Dextrose-Agar の代りに前記の米糲に少量の Agar を添加同様に培養する時も同様の Kolonie を生ず。されど米糲は培養基が汚濁するにより Dextrose-Agar



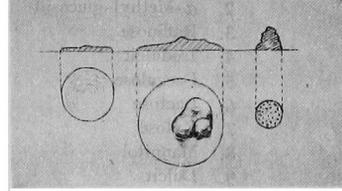
第二圖に如かざるなり。又第二圖に示す如き小 flask に同様 20 c.c. の固形培養基を入れ同様に真空乾燥器に入れ、Riesen-kolonie を生ぜしむる事を得。

以上の如くして實行する時は生の種子を用ひたる場合は多く 1 週日以内に Kolonie の生ずるを見れども、種子を一旦前述せる如くにして、100°C に加熱したる後培養する時は 1 箇月乃至 3 箇月にして Kolonie を發生す。

以上の如くにして Kolonie に就き觀察するに *Bac. granulobacter pectinovorum* は Dextrose-Agar に於て其未だ幼若なる Kolonie に於ても第九圖に示す如く、表面平滑にして潤ひある乳白色の眞球様光澤を有す。之に反して本菌の Kolonie

は其未だ幼小なるものに於て乳白色の第八圖に示す如き籠目状、若くは桑實状を呈するもの多し。然るに漸次 Kolonie の成長するに従つて桑實状若くは籠目状は消失して唯だ其の Kolonie 縁邊に近き部分のみに於て斯る籠目状の凹凸を呈するを認むるなり。第三圖は Dextrose-Agar 上に於ける本菌の Kolonie の平面並に縦断面圖を示すものにして桑實状を呈するは未だ幼若なる Kolonie にして他の二者は十分發育せるものである。

第三圖



前記の Dextrose-Agar の Agar の代りに Gelatine 25% として培養基を作り、第二圖に示す小 flask に Agar の場合と同様にして 15~20°C にて培養する時は Bac. granu-

lobacter pectinovorum の場合は顯著に Gelatine を溶解し全く Kolonie の生産なしと雖も、本菌は Gelatine を溶解する事極めて微弱にして Kolonie を發生するに至る。然れども Kolonie 漸次十分に發育するに至れば稍々 Gelatine を溶解し、殊に減壓の下に培養せらるゝを以て氣泡を發生し、爲めに Kolonie を破壊するに至る。然れども單に NaOH を以て中和したる Balling 11~12 度の麴「エキス」汁のみに 100 c.c. 中 22 g の割合に Gelatine を加へて製出せる培養基に於ては、本菌は 3 箇月間培養を爲すも Gelatine を液化する事なく十分に Riesen Kolonie を發育せしむる事を得。然れども前記の Dextrose-Gelatine 培養基に比して、單に麴「エキス」汁のみに Gelatine を加へたるものに於ては、前記の Dextrose-Gelatine の場合の如く發育良好ならずして屢々全く Kolonie を發生せざる事あるを以て多數に試験する必要あり。

(三) Physiologie.

(1) 各種糖類の醗酵試験。

200 c.c. の三角瓶に培養基 100 c.c. を入れ米醗培養の種子を前述の通りにして 100°C に加熱せるもの 2 白金耳乃至 0.3 c.c. 添加前記の如く減壓乾燥器中に入れ 37°C にて培養す。

培養基の調製：—

(a) 1 個の三角瓶に下記の調合液 50 c.c. を入れ 3 日間歇殺菌を爲す。

Ammoniumphosphat	1.0 g.	} 蒸溜水 1 l. に溶解
K-chlorid	0.2 g.	
Mg-sulfat	0.2 g.	
Pepton (Teruuchi)	2.0 g.	

(b) 1 個の三角瓶には各種糖類を 2 g (但し Trehalose 及 Melibiose は 1g 宛) を入れ、蒸溜水 50 c.c. を加へ、30 分 3 日間歇殺菌を行ふ。

(a) 及 (b) を同時に殺菌を終へたる後、(b) に種子を接種して (a) を (b) に移して合して得たるものを Pyrogallol 液を器底に有する真空乾燥器中に入れて 30 mm. に減壓の後 37°C にて培養す。

第 六 表

試験時：1931, 6 gt.

炭水化物名	Aceton の生産	總 酸	Wachstum
1. Mannose	++	6.0	++
2. α -Methyl-glucosid	+	12.6	++
3. Raffinose	++	6.8	++
4. Isodulcit	+	2.6	+
5. Jaevulose	++	8.1	++
6. Lactose	++	7.4	++
7. Xylose	++	7.4	++
8. Mannitol	++	4.0	++
9. Dulcit	++	4.0	++
10. Arabinose	++	11.5	++
11. Saccharose	++	9.1	++
12. Inulin	++	8.9	++
13. Salicin	++	7.4	++
14. Glucose	++	6.4	++
15. Maltose	++	9.5	++
16. Sorbitol	++	8.9	++
17. Pectin	-	5.8	-
18. Dextrin	+	16.4	++
19. Glycogen	++	7.8	++
20. Trehalose	++	9.0	++
21. Melibiose	-	8.2	++
22. Galactose	++	8.9	++
23. Koji-ex.	++	6.0	++
24. Bouillon	+	2.5	++
25. Ca-Lactate	-	2.5	-
26. Glycerin	-	1.1	-
27. Kontroll (non Kohlenhydrat)	-	2.0	-

【備考】 本表に於て (-) は増殖醱酵若くは Aceton を生産せざる事を示し、
(+) は弱, (++) は強を示す。

以上の試験に於て Initial acidity は測定せざりしも Lackmus 試験紙にて Pectin を除く外は總て殆んど中性であつた。總酸を計るには熟成醱を濾過して濾液 20 c.c. を $N/10$ NaOH で滴定して其 c.c. 数を示す (Lackmus 紙にて)。

試験に用ひし各炭水化物に就ては豫め Aceton の定性を爲せるも何れも反應を認めず、又 Pepton に就ては糖類の検出を爲せるも全く之を認めなかつた。

以上の試験に於て注意を喚起せられたのは、次の事項であつた。

- (a) α -Methyl-glucosid 及 Dextrin に於て酸の生産が顯著。
- (b) Isodulcit を弱力ながら醱酵し Aceton の生産が比較的強勢なる事。
- (c) Trehalose 及 Melibiose の醱酵旺盛なる事、然れども Melibiose は Aceton の生産痕跡に止まる事。
- (d) Pectin を醱酵せざる事。

故に更に次の如く試験を反復せり(第七表)。但し培養基、培養方法等前記同様。

即ち第七表により Isodulcit は本菌により弱勢ながら醱酵分解せられ、又 Trehalose 及

第七表

1931, 7 gt. 2 D. A.M. 10~P.M. 2. 接種	細菌の 種類	醱酵中に於ける炭酸瓦斯の發生狀況						總酸	Aceton
		3 nt. A.M. 8	3 nt. P.M. 2	4 nt. A.M. 8	4 nt. P.M. 2	5 nt. 正午	6 nt. A.M. 8		
α -Methyl-glucosid	第20號菌	-	+	++	+++	+++	+	11.2	++
Isodulcit	"	-	+	++	-	-	-	3.1	++
Trehalose	"	-	+++	++	+	+	-	8.5	++
Melibiose	"	-	++	+++	++	++	-	8.2	-
Isodulcit	gra. pect. Weizmann	-	-	-	-	-	-	2.0	-
Trehalose	"	-	-	-	-	-	-	2.0	-
Melibiose	"	-	-	-	-	-	-	2.5	-
Dextrine	"	+	+++	+++	++	++	+	6.4	++

【備考】 本表に於て(-)は醱酵せざる事及 Aceton の生産なき事を示し(+)は弱,
(++)は強, (+++)は強烈を示す。

Melibiose は旺盛に醱酵せらるゝ事確實なるべし。尙ほ Isodulcit に就ては Merck 製及 Kahlbaum 製何れに就ても其後數回試験せるも依然何れも Trehalose 其他のものゝ如く旺盛ならずとするも、生育良好にして疑ふ餘地無き程度に瓦斯の發生あるを確めたり。而して Bac. granu. pect. の Isodulcit, Trehalose 及 Melibiose の醱酵能力なき事は從來の研究家¹²⁾と一致せりと雖も Trehalose 及 Melibiose に於ては接種後約1週日には醱酵なく2週間乃至3週間定温匣中に其儘培養放置する時始めて幾分繁殖醱酵を爲せるものある事を認めたりしも十分確定するに至らずして止む。

Pectin は本試験に用ひしものは酸を含有する事多かりし爲め、本菌により醱酵せしむる事不可能であつたが「アルカリ」を以て中和せしむる事により醱酵せしむる事を得た。

今 Pectin 及 blank control として Pectin 若くは其他の炭水化物を入れずして醱酵せしめたる成績表を示せば第八表の通りである。

第八表

1931, 7 gt. 8 nt. A. M. 10 接種	アルカリによる中和の有無	細菌の 種類	醱酵中に於ける瓦斯發生の狀況							總酸	Aceton
			9 nt. A.M.8	9 nt. P.M.5	10 nt. A.M.8	10 nt. P.M.2	11 nt. A.M.8	12 nt. A.M.8	13 nt. A.M.8		
Pepton+Pectin	中和	第20號菌	++	++	-	-	-	-	-	7.2	+
Pepton+non Pectin	"	"	-	-	-	-	-	-	-	4.0	-
Pepton+Pectin	不中和	"	-	-	-	-	-	-	-	8.0	-
Pepton+non Pectin	"	"	-	-	-	-	-	-	-	6.9	-
Pepton+Pectin	中和	gra. Pect. Weizmann	++	++	-	-	-	-	-	6.1	+
Pepton+non Pectin	"	"	-	-	-	-	-	-	-	3.8	-
Pepton+Pectin	不中和	"	-	-	++	+	-	-	-	9.2	+
Pepton+non Pectin	"	"	-	-	-	-	-	-	-	6.1	-

第八表の試験に用ひたる培養基の調製法は、下記の如くにして培養法其他は前試験と同様に

して施行せるものである。

培養基 100 c.c. 中

Ammoniumphosphat	0.10 g.
K-Chlorid	0.02 g.
Mg-Sulfat	0.02 g.
Pepton	2.00 g.
Pectin	0.0~2.0 g.

尚ほ同表に於て豫め中和して而して全く醱酵せざるものに於ても、最後の酸の分析に於て酸を生ぜるは種子として接種せる醱中の酸に起因せるものである。

(2) 牛乳の醱酵。

200 c.c. flask に新鮮なる牛乳 100 c.c. を入れ Koch 氏殺菌釜にて 1 時間宛殺菌すること 3 日にして第 4 日目には 30~50°C に Koch 氏殺菌釜中に放置すること 4~5 時間、第 5 日目には温暖なる室温に放置し、第 6 日目に 1 時間 100°C に殺菌し、本菌の種子を接種前述の通りにして、培養するに旺盛なる醱酵を營爲すると同時に、牛乳は著しく凝固物質を生ずると共に Aceton 及 Butanol も顯著に生産せり。

第三章 本菌即ち第 20 號菌による糖蜜の醱酵

余は *Bac. granulobacter pectinovorum* 及六所氏が静岡縣富士郡より得られた同種の菌に就て甘蔗糖蜜を原料として之れに少量の米糠を混じ、目的とする醱酵に就て研究したが、未だ優秀な成績を得るに到らなかつた。然し前述の如く本島の土壤中から新に検索分離したものに就ては、甘蔗糖蜜の本醱酵に對して相當優秀なる成績をあぐるを得た。故に茲に其醱酵方法其他に就き記載せんとす。

(1) Aceton の定量法。

Goodwin 氏の Messinger's method による Aceton の定量は純 Aceton 水溶液に於て精密に研究せられたもので、醱酵醪を單なる蒸溜によつて得たるが如き液に就き、直ちに該定量法を應用する事は危険性あり。殊に性質未だ不明なる細菌の醪に於ては、實際の收得量と相比較せざる可らず。然れども實際 Aceton を分離收得する事も頗る複雑なる仕事に屬するを以て、余は差當り下記の通り Rothera 氏の呈色反應を利用して比色法により之が定量を爲し、兩者を相比較する事により、Jodmetry 法による定量成績の屢々頗る大なる誤りに陥れる事を發見して、以て校正する便利を得し事が多かつた。例へば Pepton 其他窒素含有の營養物を添加した場合、當然熟成醪に Ammoniak を生ずる。故に熟成醪を普通に行はるゝが如く、中和若しくは「アルカリ」性となして蒸溜する場合は、溜出液中 Ammoniak が含有せらるゝに至る。故に其量が大なる場合は Jod 液添加の際、沈澱が黒變するを以て直ちに其誤りを知る事が出来るが、其量の小なる場合に於ては之を觀過する場合が多く、爲めに頗る過大なる成績を示す場合が多い。故に余は常に dil. H₂SO₄ にて溜出液を酸性として更に再溜して定量を爲した。

Rothera 氏の呈色反應による Aceton の比色定量法として用ひし方法は下記の通りである。

(a) 標準液の調製：— 純 Aceton を容量にて量定し、蒸溜水にて稀釋し 0.05~0.3 vol.%迄 0.05% 刻みに標準液を製す。これを Messinger 氏の Goodwin 氏變法により 100 c.c. 中の純 Aceton の g 數を決定して置く（Merck 製の純「アセトン」を Jodmetry 法により定量せるに 99.48 g.% であつた）。而して之れを使用に際し適度に稀釋して用ふ。

(b) 試 藥：—

(イ) 25 g. の Na-Nitroprussid を 250 c.c. の蒸溜水に溶解。

(ロ) 純 Ammoniumsulfat 250 g. を 1 L. の蒸溜水に溶解。

(ハ) 比重 0.88 の純 Ammonia 水。

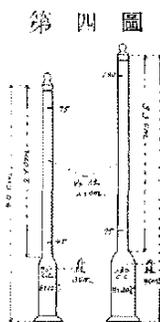
(c) 定量方法：— 定量せんとする蒸溜液及び標準液を同時に 10 c.c. 宛比色用ガラス圓管に入れ、之れに試藥 (ロ) を 10 c.c. 宛添加、之れに更に試藥 (イ) を 2 c.c. 宛添加、更に試藥 (ハ) を 1 c.c. 宛加へ標準液と被檢定液とを同時に振盪す。然る時は過マンガン酸加里様色を漸次呈出し、約 20 分間にして最高潮に達し、漸次褪色を爲す。故に其呈色の度合並に變色する状態を標準液と相比较する事により、被檢定液中の Aceton の量を略算する事を得。而して被檢定液中の Aceton の含有量過小にして比色困難なる場合は (ロ) 液 10 c.c. を添加する代りに粉末狀の硫酸を 1~2 g. 宛加へて行けば、呈色度濃厚となり、比色に適度なるものを得る場合あり。

此の方法に基く時は精密なる數字は得る事能はざれども Jodmetry 法による成績と比較對照して其誤りなきを確むるに便利である。

(2) Butylalkohol (Solvents) の定量法。

Butylalkohol を單獨に分離定量する事は頗る困難視されて居る。故に一般に Aceton 及 Ethylalkohol と共に合して oil 若くは Solvents と稱して定量せられ、これより Aceton の量を引き去つて Butylalkohol と酒精の量として居る。而して Aceton の量を 2 倍して Butylalkohol の量とし後を酒精と見積るのであるが、これは甚だ疑問である。

余は糖蜜を原料とせる場合に於ては醱 2~4 L. を用ひて普通の酒精の定量の場合の蒸溜の如く蒸溜を行ひ、其間酸と Ammoniak とを驅除して、再溜を繰返へし濃縮して最後に約 100c.c. の溜出液を得る心算にして、第四圖に示す定量用ガラス圓壺 (0.1 c.c. 目盛) に溜液を受け 130 c.c. 迄溜出せしむ。該ガラス圓壺には豫め下部の大徑部に脱水炭酸加里 (局方) を其小徑部の下部迄充滿させて置く。然る時は炭酸加里の量は 80~90 g. で溜液を炭酸加里を以て、飽和となす様に出來て居る。而して炭酸加里中に溜液を溜出せしむる際は該圓壺を水中に保つて、其際發生する熱を冷却せしむる様にする。130 c.c. 迄の溜液を得れば、之れを取つて流水中に冷却しつゝ振盪して十分炭酸加里を溶解せしめ、上部に分離する油層を讀取するのである。この c.c. 數に其比重 0.82 (此の比重は後記するが如く實驗上の數字) を乘じ重量を出す。而してこの油層中



には後記するが如く、8~9%の水分を含有して居る。然しながら多くの場合油層を分離したる炭酸加里溶液部を取つて、更に再溜して同じく第四圖に示す 75 c.c. 容量を有する小定量用ガラス圓壺（炭酸加里を大秤部に 35~40 g. 容る）にて更に同様にして、定量すれば前に分離した油量の 8~9% の油量が分離するが故に、大體に於て油層中に含有せらるゝ水分と炭酸加里液中に残留する油分と相殺するものと、思考して差支へない實驗成績を得た。

(3) 醱の醱酵中に於ける減壓排氣の要不要。

穀類の醱酵に於ては其孢子の發芽の際は嫌氣培養を必要とすれども、發芽後に於ては菌體其自體より、炭酸瓦斯及水素瓦斯を發生する爲めに自然的に自ら嫌氣培養状態となるを以て、Aceton-Butyl の醱酵操作工程中に於ては一旦發芽し既に醱酵しつゝあるものを種子として用ふる場合に於ては、嫌氣培養を行ふ必要な事と稱されつゝあり。

本菌の糖蜜醱酵に就き此の排氣の要不要に就き試験を爲す事次の如し。

(a) 減壓排氣操作を全く行はずし場合：— 假令減壓排氣の下に培養せる種子を用ふるも主醱酵醱に於て減壓排氣操作を全く行はずして、普通の好氣培養と同様な培養法を用ふるも徒らなる有機酸醱酵に陥り Aceton 及 Butylalcohol の生産殆んど皆無なり。斯る醱を Carlsberg 罐にて約 1 石を製し、蒸溜に附し solvent を製出せんと試みしも、僅かに種子として用ひたる醱中の solvent に相當するものと思はるゝ極めて少量を得るに過ぎず。

(b) 假令排氣操作を行ふと雖も排氣不徹底なりし場合：—

(イ) 使用原料糖蜜—前記載のものと同一物。

(ロ) 培養基及醱酵容器—500 c.c. 三角瓶に Brix 10 度の醱 250 c.c. を入れ、市販米糠 1.5 g. を入れ「アルカリ」を以て Lackmus 試験紙にて中和後 Koch 氏殺菌釜にて 40 分宛 3 日間歇殺菌を爲す。此の醱に於て總糖分は醱 100 c.c. 中 5.52 g. なり

(ハ) 培養に用ひし種子—新鮮にして旺盛に醱酵しつゝある本菌の米醱培養。

(ニ) 培養法—培養基を約 30°C の室溫に放置數日間にして之に接種 Pyrogallol を有する真空乾燥器中に入れ、減壓度 30 mm. となし、37°C Thermostat にて培養。

(ホ) 醱酵成績—

第 九 表

昭和 5 年 9 月 23 日午前 11 時接種、同月 29 日午後分析

細菌番號	醱 100 c.c. 中に於ける Aceton の g 數	Total Glucose に對する Aceton の %	醱 20 c.c. を中和するに要せし N/10 NaOH の c.c. 數	醱 100 c.c. 中の發糖分
No. 20	0.03935	0.713	12.1	2.62

即ち徒らに酸醱酵を起し成績極めて不良なり。

(c) 培養基の仕込濃度を低下せしめたる場合の影響：— 前項試験に於ては培養基の仕込濃度を Brix 10 度にて實行したが Brix 6 度に低下せしめ、同様に試験す。但し此際醱の總糖

分は 100 c.c. 中 3.38 g. なり。而して得たる成績は第十表に示す。

第十表

昭和5年9月23日午前11時接種，同27日分析

細菌番號	醱 100 c.c. 中に於ける Aceton の g 數	Total glucose に対する Aceton の %	醱 20 c.c. を中和するに要せし N/10 NaOH の c.c. 數
No. 20	0.02850	0.843	14.15
"	0.03004	0.888	14.15

即ち Brix を 6 度に低下せしめて仕込むも効果なし。

(d) 減壓排氣を十分ならしめし場合：— 仕込濃度を Brix 10 度とし，其他は前同様にして唯だ培養法を下記の通りに行ふ。

培養基を殺菌直後未だ其冷却せざる以前 6°C にて接種前述の真空乾燥器中に入れて減壓排氣して十分に培養基を沸騰せしめ，減壓度を 30 mm. に達せしめたる後 37°C Thermostat に入れ其後醱酵経過中に於ても時々減壓排氣を行ふ。斯くして得たる醱の分析成績第十一表の通り

第十一表

フラスコ番號 1 及 2 は昭和5年9月9日午前11時接種，同12日午後分析

フラスコ番號 3 及 4 は昭和5年10月20日午後4時接種，同6日午後分析

細菌番號	フラスコ番號	醱 100 c.c. 中の Aceton の g. 數	Total glucose に対する Aceton の %	醱 20 c.c. を中和に要する N/10 NaOH の c.c.	醱 100 c.c. 中の發糖分の g. 數
No. 20	1	0.18905	3.425	—	—
"	2	0.21139	3.829	—	—
"	3	0.18953	3.511	3.8	0.889
"	4	0.20549	3.809	3.4	0.875

即ち以上の如く十分減壓排氣操作を行ふに非ざれば，本菌に於ては十分目的を達成する事態はざるなり。

(e) 本菌による穀類の醱酵：— 醱酵方法は十分に排氣減壓を行ひ，原料は試験番號(1)に於ては碎白米粉に 2% の米糠を添加せるもの 6 g を 100 c.c. の水に入れ，試験番號(2)及(3)は(1)に更に 3 g. の Pepton を添加す。

第十二表

試験番號	細菌番號	接種年月日	分析年月日	全醱中の Aceton の g. 數	醱 20 c.c. を中和に要する N/10 NaOH c.c. 數	Rothera 氏の呈色反應
1	No. 20	1931, 8 gt. 26nt.	1931, 8 gt. 31nt.	0.0169	16.0	+
2	"	" " 29nt.	" 9 gt. 2 nt.	0.0291	19.3	spur
3	"	" " "	" " "	0.0149	19.5	"

即ち本菌は澱粉質を原料としては Pepton の如き營養物の添加の有無に不拘，直接に目的とする醱酵を營爲せしむる事不可能にして徒らに酸醱酵を惹起す。

(f) 糖蜜を原料として本菌と Weizmann 氏の Aceton 菌との油狀物質生産の比較：—

- (イ) 醱酵方法——十分に排氣減壓。
 (ロ) 仕込濃度——Brix 10°。
 (ハ) 醱の殺菌——100°C にて 3 日間歇殺菌。
 (ニ) 醱量及營養物の添加——No. 20 號菌は醱量 3 L. とし、之に 30 g. の米糠を添加、
 Weizmann 氏菌は醱量 4 L. とし之に 40 g. の米糠を添加。

第十 三 表

細菌種別	29 ml.	30 ml.	1 ml.	2 ml.	3 ml.	4 ml.	5 ml.	熟成醱20 c.c. 中の Aceton の N/10 NaOH による g 數	熟成醱100 c.c. 中の Aceton の g 數	醱1 L. 中の oil 收得量
No. 20	+++++	++++	++	±	-	-	-	5.2 c.c.	0.1830	12.33 c.c.
Weiz.	+++++	++++	++	±	-	-	-	14.8 c.c.	0.0745	3.5 c.c.

即ち本菌は Weizmann's Bacillus に比し、極めて Oil の收得量良好なり。

(g) 糖蜜を原料として得たる油狀物質の性質：— 以上研究せる所により、工業試験に於ても、十分成功を爲す確信を有するに至れる以て、著者等が「アミロ」法⁽¹⁶⁾の研究に使用せし中間工業試験の醱酵装置を用ひ、實際仕込を實行して單式の舊式焼酎蒸溜機を用ひ、再溜に再溜を繰返へし油狀物質を分取して分析を行つた。「アミロ」法の研究に用ひた醱酵装置は、何等減壓の下に操作する目的が無かつたので、真空ポンプを用ひて醱酵槽内を減壓に保つ場合不潔なる外氣進入は可なり著しきものがあつた。然るにも不拘醱は極めて良好に目的とする醱酵を營爲せしむる事が出来た。

糖蜜使用重量	90 kg.	添加米糠	9 kg.
仕込水	700 L.	仕込濃度	Brix 10°

以上の醱を醱酵せしめ得た熟成醱の容量は 939.8 L. であつた。其醱の分析成績は

Aceton in 100 c.c. "Moromi"	0.4719 g.
Total acid "Moromi" 20 c.c. を中和に要せし N/10 NaOH の c.c. 數にて	
2.7~3.2 c.c. 但し Litmus 試験紙を指示薬として	
Total glucose in 100 c.c. "Moromi"	0.567 g.

以上の熟成醱を蒸溜に附し油狀物質 44.452 kg. を得た。この製品は比重で 0.9505 at 15°C で 20°C 附近迄は透明なれど 16°C 附近より白濁を呈した。而して Litmus 試験紙並に Phenolphthalein に対して中性であつた。この製品 5 kg. を取つて炭酸加里 2,500 g. を加へ分離する油分を分取し、炭酸加里溶液部は更に再溜に附し、同一方法により油分 19 c.c. を更に分取し、前の油分と合した。其の比重は 0.8375 at 15°C であつた。これを更に再溜に附し Öl-bad 約 180°C にて殆んど乾燥するに至る迄溜出せしめ、得たる溜分は 1664 g. であつた。これを次の通り分析した。

第十 表

比 重 (15°C)	0.8330
” (25.7°C 室温)	0.8220
水分 (試料 20 c.c. に石油エーテル) 100 c.c. を加へ分離せるもの)	9.12 g%
遊離酸 (試料 20 c.c. Ind, Phenol.)	0
アセトン	{ 21.7575 g 100 c.c. 26.47 g%

この 1664 g. より 1 kg. を取り分別蒸溜に附し次の如き溜分を得た。

第十 五 表

60°C 以下主として 58°C にて溜出 258.0g.	102~110	1.0 g.
60~70 10.5 "	110~120	521.0 "
70~80 19.0 "	残 渣	7.0 "
80~90 45.5 "	計	946.0 "
90~100 8.0 "	缺 減	54.0 "
100~102 76.0 "		

以上の各溜分の内 60°C 以下にて溜出する分を Aceton と見、80~90°C にて溜出する分を酒精と見、100~102°C にて溜出する分を水分と見、110~120°C にて溜出する分を Butylalkohol と見て各溜分を合計せる 946 g. に對する % を見る時は

水 分	8.03%	Aceton	27.38%
Butylalkohol	55.01%	酒 精	4.71%

となる。故に本試験に於ては Aceton 1 に對し Butylalkohol 2 と少量の酒精とより油分は構成さるゝ事を見る。然れども余はこの多量仕込試験を行ふ以前に於て Carlsberg 罐にて排氣減壓の下に醱を醱酵せしめ、蒸溜に蒸溜を重ね漸次水分を除去し、油狀物質を得て次の如き溜分を得た。

第十 六 表

60°C 以下	103.0 g.	93~100	56.3 g.
60~75	11.0 "	100~120	289.5 "
75~78	0.8 "	120~121	45.5 "
78~83	143.6 "	残 渣	5.6 "
83~90	66.4 "	計	828.3 "
90~93	27.0 "		

以上の内 60°C 以下にて溜出する溜分は主として 57°C にて溜出し、水に可溶性にて Rothera 氏の呈色反應を強く呈し、可燃性で香氣も Aceton と一致して居た。

78~83°C にて溜出せる分は主として 78°C にて溜出し、酒精臭を有し、水に可溶にして可燃性、Rothera 氏の反應は微弱であつた。而して其 125 c.c. を取つて赤磷 25 g, Jod 250 g. を加へ、Ethyl Jodid を造り、Wasserbad にて加熱蒸溜、溜出液を dil. NaOH にて洗滌、更に水

洗して再溜した。其際約 20 c.c. を操作中損失したが、72~74°C にて溜出し溜液は 183g. を得た。Ethyl Jodid の沸點は 72.3°C であるから、殆んどこれと一致して居る。

110~120°C にて溜出する第十六表の溜分に就ても同様にして Butyl Jodid を製出した。即ち sample 125 c.c. より

沸 點	溜 分
97~128°C	7 g.
128~133°C	171 g.

此の時の氣壓計は 759 mm. であつた。故に *n*-Butyl-Jodid の沸點は 130.4~131.4°C (745.4 mm.) であるから、殆んどこれと一致して居る。

故に 60°C 以下の溜分を Aceton と見、78~83°C の溜分を酒精と見、100~120°C の溜分を Butylalkohol と見て、各溜分を合計したる 828.3 g. に對する % を見る時は

Aceton	103.0 g.	12.43%
Ethylalkohol	143.6 g.	17.34%
Butylalkohol	289.5 g.	34.95%

以上の如く Aceton に對して Ethylalkohol と Butylalkohol の量が著しく増大して居る。故に其の原因に就て考究するに、實驗上の誤差に基くものか、或は又 Carlsberg 罐を用ひた場合は罐を構成する銅板が薄くして十分に排氣を實行する事不可能なりし爲め、十分なる醗酵が行はれざりしに基くか、其 2 者の 1 に出でずして、恐らくは後者の原因に基くものなるべしと思考する所なれども未だ確實ならず。

(h) 醗酵瓦斯の分析：— 醗酵瓦斯は原料糖蜜 90 kg. にて、最も旺盛なる場合は 1 時間當 1,000 L. を超過する場合あり、而して醗酵の初期に於ては水素瓦斯の量は、炭酸瓦斯の量よりも遙かに大なりと雖も、醗酵漸次進行するに伴つて水素瓦斯は減少し炭酸瓦斯の量を増大するに至る。之を平均するに大略水素瓦斯 4 に對して炭酸瓦斯 6 の割合ではないかと思はれた。幸ひ當研究所に於て天然瓦斯の研究に従事して居られた庄野技師に依頼して、數回醗酵瓦斯を分析した成績は第十七表の通りである。分析は Bone and Wheeler 氏の裝置で行はれたもので、水素瓦斯の定量は爆發法によつたものである。第十七表に掲ぐるものは名種仕込が異なつたものに就ての分析表であつて、一仕込に就ての醗酵の初期と末期とを順次に掲げたものではないので、是等の詳細に就ては次報に於て報告したいと思ふ。

第 十 七 表

CO ₂	51.48	46.92	28.91	62.27
H ₂	48.13	53.08	57.18	37.73
其 他	0.39	0	—	—
O ₂	—	—	3.20	—
N ₂	—	—	10.71	—

【備考】 以上は何れも vol.% にして、N₂ を多量に含有して居るは榮養として含養物を多量に用ひた爲めであつて、O₂ を含有して居るは醗酵の初期である爲めに、未だ空氣が残存し居た爲めである。

總 括

十分なる中間工業試験を實行するに先つて、今日迄に得たる成績を總括するに次の如し。

(1) 糖蜜を原料とする場合に於ては Weizmann's Bacillus は不適なる爲め、適當なる細菌の檢索を行ひ、之を土壤中より發見して *Bacillus butyigenus* と命名した。

(2) 従來 Weizmann's Bacillus は固形培養基上 Kolonie を形成せしむる事殆んど不可能視せられて居つたが、之を容易に形成せしむる事を得た。而して *Bacillus butyigenus* に就ても Kolonie を形成せしめて之等の性質を明にした。

(3) *Bacillus butyigenus* の鞭毛染色には Löffler 氏の方法は全く不適であつた。故に Löffler 氏法の硫酸第一鐵を用ふる代りに硫酸第二鐵を用ひしに、頗る容易且つ鮮明に鞭毛染色が可能であつた。

(4) *Bacillus butyigenus* を用ひて糖蜜を原料として目的とする醱酵を營爲せしむるには醱酵の初期に於て減壓排氣を必要とした。該方法は一見頗る困難なるが如く推察せらるゝ所なれども實際に於ては、之を工業的に行ふに何等懸念する必要がなかつた。之に適したる 10 hl. の醱酵槽を設計製作試験を行つたが、何等の支障なく完全に進行届付を終つた。排氣減壓装置も支障なく設備が出来て試験運轉も完全であつた。醱酵中の減壓排氣操作により、醱中の Aceton 損失大なるが如き懸念があつたが、排氣減壓は醱酵の初期に於てのみ必要で、既に Aceton の生産開始せらるゝ状態となれば、醱酵瓦斯の發生激烈で排氣減壓の必要なく、醱酵槽内の壓は却つて外氣壓より大となる爲め斯る懸念は不必要であつた。

(5) 90 kg. の糖蜜を原料として 20 Litre (17 kg.) の油狀物質を收得した。其の油狀質には 8% の水分を含有して居つたが、之を分別蒸溜して Aceton, Butylalkohol 及 Ethylalkohol の含量を定めた。然し途中の醱酵状態の變化により Aceton の含量を減少, Ethylalkohol 及 Butylalkohol の含有比の増大を來す場合がある様に思はるゝものがあつた。

(6) 醱酵瓦斯の分析を行つたが、殆んど炭酸瓦斯と水素瓦斯のみであつたが、其含有比は醱酵の初期に於ては前者より後者が大で、醱酵の進行するに従つて前者が増大し 後者より大となつた。而して異狀醱酵の場合は醱酵の進行に従つて炭酸瓦斯の増大を伴はず、水素瓦斯の量が大であつた。

本稿を終るに際し、本研究御指導を賜りし醱酵工業科長中澤博士並に工業部長加福博士及貴重なる細菌を分讓せられたる六所文三氏に深く感謝の意を表す。又瓦斯分析に深き經驗を有せらるゝ庄野技師が援助を與へられし事を深く感謝す。

(昭和七年八月 臺灣總督府中央研究所醱酵工業科研究室にて)

参 考 文 獻

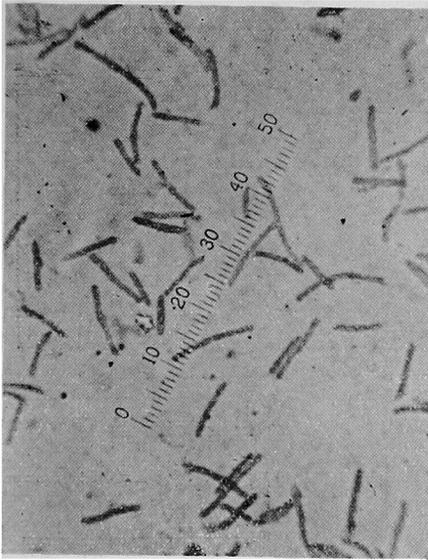
- (1) 六所文三：日本農藝化學會誌，大正 14 年 6 月，第 1 卷，675。
"：海軍火藥廠研究部報告，乙第 30 號。
- (2) 岡田穗積：北海道工業試験場報告，昭和 5 年 7 月，第 27 號。

- (3) G. Mezzadrolu u. G. Magno: Woch. Brau., 1929, 66, 170.
- (4) 六所文三, 河井四郎: 滿鐵中央試験所報告, 第15輯, 217.
- (5) A. C. H. Rothera: Chem. Zentralblatt, Band I, 1909, 402; Jour. of Physiol., 1908, 37, 491~494.
- (6) Goodwin: Journ. of American Chem. Soc., 1920, 42, 40.
- (7) C. Bredemann: Centralbl. für Bakt., II, 1909, 23, 385.
- (8) Valerian v. Klecki: Centralbl. für Bakt., II, 1896, 2, 169, 249, 286.
- (9) Franz Sharding: Zentralbl. für Bakt., II, 1905, 2, 772.
- (10) J. H. Northrop: Jour. Biol. Chem., 1912, 39, 1; Journ. Ind. and Eng. Chem., 1919, II, 723.
- (11) Winogradsky: Centralbl. für Bakt., II, 1902, 9, 43, 107.
- (12) E. R. Weyer and Leo F. Rettger: Jour. of Bakt., 1927, 14, 399.
- (13) John W. Churchman: Jour. of Bakt., 1929, 18, 413.
- (14) A. Cunningham: Centralbl. für Bakt., II., 1930, 83, 22.
- (15) 牟田, 野本, 田中: アミロ法に関する研究, 1931, 85, 879.

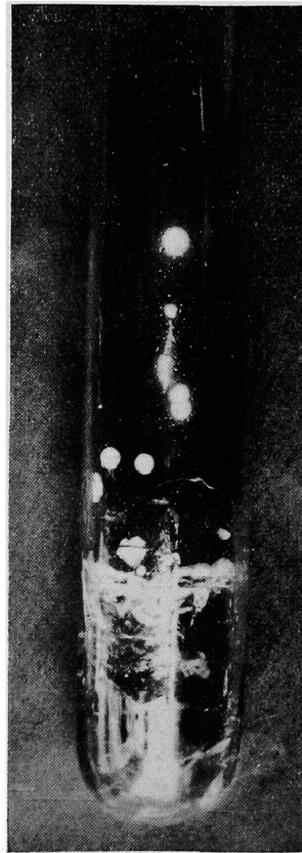
附 圖 説 明

- 第五圖:— Dextrose-agar 上に増殖したる Kolonie の第 20 號菌の normal Zellen を Gentianaviolett にて染色したるものにして Micrometer の 1 度目は 0.8μ にして 1,400 倍。
- 第六圖:— 米膠中に於ける第 20 號菌の freie Sporen を Carbolfuchsin にて染色せるものにして Micrometer の 1 度目は 0.8μ にして 2,000 倍。
- 第七圖:— 第 20 號菌の D-Agar 上に於ける斜面培養にして、水溶液を器底に有する真空乾燥器中にて培養せる、爲め、試験管内に水分を凝縮し、爲めに多く培養基の上部に散亂したる Kolonie を生じ、下部は醱酵を惹起し龜裂を生ず; 倍率 $\times 3$ 。
- 第八圖:— 第 20 號菌の D-Agar 上に於ける表面培養 Kolonie の未だ幼若なるものにて籠目状を呈するを示す; 倍率 $\times 15$ 。
- 第九圖:— Bact. granulobacter peclinovorum (Weizmann) の D-Agar 上に於ける表面培養 Kolonie の幼若なるものにして表面平滑にして眞珠球光澤を呈するを示す; 倍率 $\times 15$ 。
- 第十圖:— 第 20 號菌の D-Agar 上に於ける表面培養 Kolonie にして十分老熟せるものを示す; 倍率 $\times 3$ 。
- 第十一圖:— 第 20 號菌の D-Agar 上に於ける Riesen Kolonie; 倍率 $\times 3$ 。
- 第十二圖:— 第 20 號菌の麩エキス・セラチン上に於ける Riesen Kolonie にして十分老熟せるものを示す。即ち 1931, 10 gt, 12 ml. に接種して約 15°C にて培養し, 12 gt, 1 ml. に撮影せるものなり。倍率は眞物同大にして膠の液化殆んど無し。
- 第十三圖:— 第 20 號菌の D-Gelatine 上に於ける Riesen Kolonie にして、未だ幼若にして十分發育せざるものにして、尙ほ發育を持續せしむる時は僅少なから膠を液化し、爲めに Kolonie は破壊せらるゝに至る。
- 第十四圖:— 第 20 號菌を米膠に於て接種後 37°C にて 30~40 時間培養せるものにして、Spore の染色を爲し、更に Methyleneblau にて染色せるものにして、1 より 8 迄順次 normale Zellen より胞子を形成し、母細胞を脱離して行く順序を示すものにして、1 の時代には Gramsche Färbung は陰性にして 2, 3 及 4 に於て濃厚に、或は紫色に染色せられて居る部が Gram 陽性に即ち partially positive に染色せられ 5, 6, 7 及 8 となりて再び全く Gram 陰性となるものと思せらる。老培養に於ては 4 に示す紫色に染色せられたるものが第十七圖に示す如く、漸次母細胞が破壊せられ、恰も 1 個の獨立せる新なる細菌體なるが如く見らるゝものと思せらる。
- 第十五圖:— 第 20 號菌の米膠培養にして、接種後 37°C にて 50 時間乃至 60 時間経過せるものにして、之を胞子染色を爲し、更に Methyleneblau にて染色する時見らるゝ状態にして、胞子の一部に一種の洩引物質を附着せる状態を示す。
- 第十六圖:— 第 20 號菌の米膠培養の老熟せるものを Gramsche Färbung により觀察せるものにして、6 に示す Gram 強陽性なる 1 種の胞子類似若くは細菌類似様體が母細胞より脱離する様を 1 乃至 6 の順序に認めらる。
- 第十七圖:— 第 20 號菌の同じく米膠老培養を Gramsche Färbung を爲したるものにして、1 は第十六圖の 6 に相當するものにし、2 は遊離胞子にして、一見する時は Gram 強陽性の全く別種なる細菌體を混入するが如く見ゆるを示す。

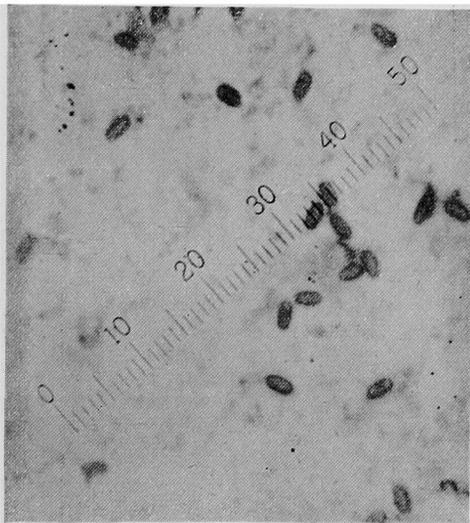
第 五 圖



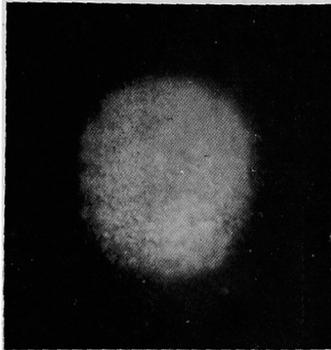
第 七 圖



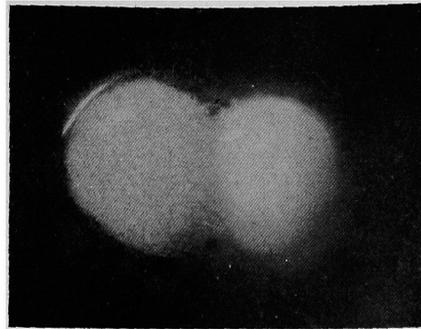
第 六 圖



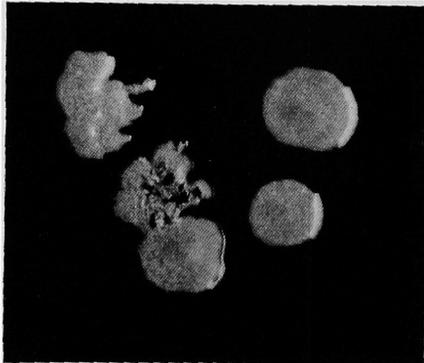
第 八 圖



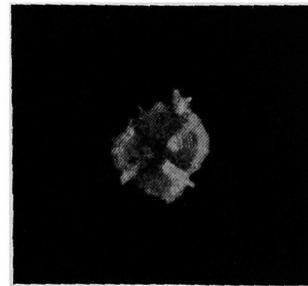
第 九 圖



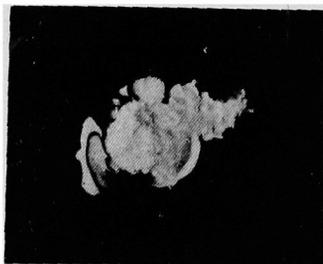
第 十 圖



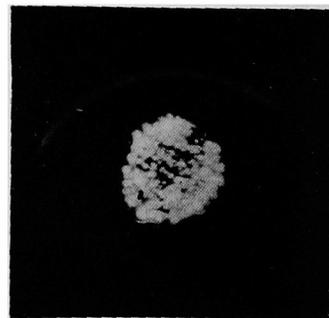
第 十 一 圖



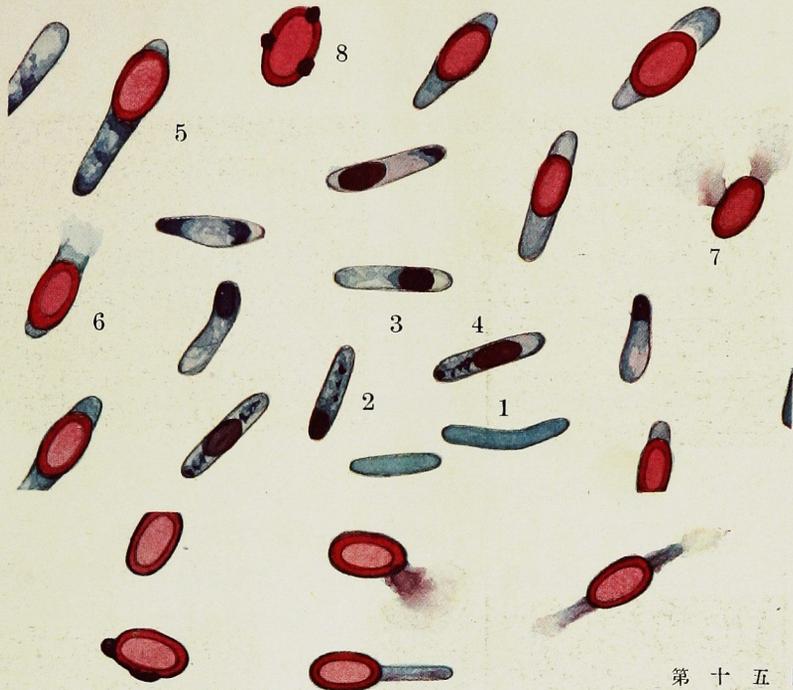
第 十 二 圖



第 十 三 圖



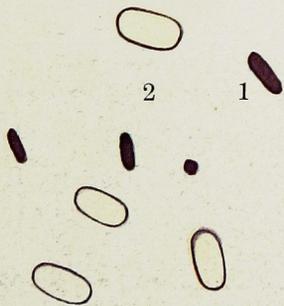
第十四圖



第十五圖



第十七圖



第十六圖

