

アミラーゼ生産菌に於ける菌体とファージの成長曲線

渡辺, 健治
九州大学農学部

山藤, 一雄
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21497>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 17 (3), pp.253-267, 1959-12. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

アミラーゼ生産菌に於ける 菌体とファージの成長曲線

波辺 健治・山藤 一雄

Growth curve of the cell and phage
of amylase producing bacteria

Kenji Watanabe and Kazuo Yamafuji

緒 論

醱酵微生物のファージに関する研究は、人体病原菌のそれに比較すると非常に少ないが、乳製品の製造等に使われる *Streptococcus* を始め *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Clostridium*, 更に *Actinomyces* 等に就いては分離研究されてきている。

一方 *Bacillus subtilis* 系細菌を利用するアミラーゼの工業生産は戦後固体培養から液体培養法に委えられて以来、各工場では原因不明の溶菌現象が観察されるようになり、昭和30年 福田氏⁴⁾ が *B. subtilis* 系細菌に依るアミラーゼ生成機構を研究中に実験室的に菌体が増殖を止め溶菌し始める事を見出し、これがビルレントのバクテリオファージに依る事を確認した後此の方面の研究は一層さかんになった。しかし此等の溶菌には里村氏¹⁵⁾ のリゾチーム様酵素、相田氏³⁾ の溶菌性物質、野村氏¹³⁾ の anaerobic lysis 等の関与する場合もある事が判り溶菌現象の原因はより複雑なものになつてきている。其の後北原氏等¹²⁾ はアミラーゼ生産性 *B. subtilis* 系細菌のタンク培養溶菌液から血清学的其の他で異なる3種のビルレントファージを分離し其の感受性菌の溶菌過程に就いて報告したが、又その溶菌機作研究中ファージと酵素様物質の共同作用に依つて起る溶菌のある事も認め、更に工場に於けるファージ対策としての耐性株には accompanied lysis, 混合培養には nascent phenomena のある事に対して一般の注意を喚起した。福田氏⁵⁾ は其の後超遠心機と各種酵素を併用してファージを純化し電子検微鏡で其の実体を確認し血清学的性状、加熱、pH、紫外線等に依る不活化、宿主域等に就いて報告した。同氏に依れば菌体のファージに対する感受性とアミラーゼ生成には平行的な定量的関係があると言う。是等とは無関係に里村氏¹⁶⁾ は好気性有胞子細菌のリゾチーム様酵素を調べていたが、其の際 K-77 菌は溶原株でありアミラーゼ生産菌として分離された *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto-K49 に於てファージの形成を認め、此の菌を指示菌として累代増殖性のファージを分離した。氏等は酵素の研究に主眼を置きファージは其の作用様式の比較に用いたのであるが、ファージの放出が酵素分泌と無関係でプラーク形成に影響のない事、宿主域は酵素に較べて極めて狭小な事等を認めた。

著者等は細菌デオキシリボスクレアーゼとファージとの関係を研究する目的で、里村氏の菌体とファージを用い種々の条件下其等の増殖実験其の他を行つたのでその結果を報告する。

(1) 菌体の成長曲線

実験方法

1. 供試菌株

Bacillus subtilis var. *amyloliquefaciens* Fukumoto-K49. 大阪市立大学橋本研究室に於いて、有孢子性アミラーゼ生産菌として黒大豆より分離されたもので⁷⁾ 桿状、単独又は2個連結、運動性、最適 pH = 6~7. 最適温度 40°C.

2. 培養基の組成と培養法

福本氏等の使用している5%大豆粕アルカリ抽出液培地⁸⁾を主成分とし、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl を各々 0.02% 添加した中性の培養基で調製は多くの場合 100~300 ml を角付コルベんに入れ、30°C で振盪培養した。

3. 菌量の測定法

イ) 比濁法

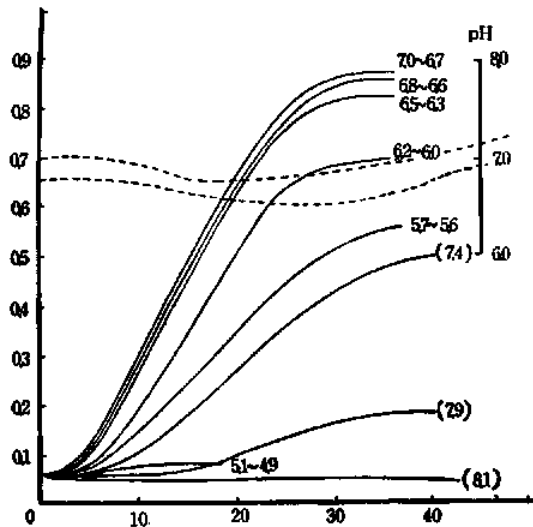
黄褐色の培地を含む菌体懸濁液を水で 10 倍量に稀釈し、日立光電光度計 (TK-120-S 型) でフィルター R, 1 cm の液層を使用し、水を標準として吸光度 ($-\log T$) を測定した。

ロ) 計算室法

Thoma の血球計算室 (1/4000 mm³ 区割) を用い常法に従い直接菌体数を測定した。

ハ) コロニー法

菌体懸濁液の 10 倍稀釈系列をつくり、各々の平面培養のコロニーの数から生菌体数を逆算した。



第1図. 菌体の生長曲線と pH (—菌体,pH).
縦軸は吸光度, 横軸は時間(時).

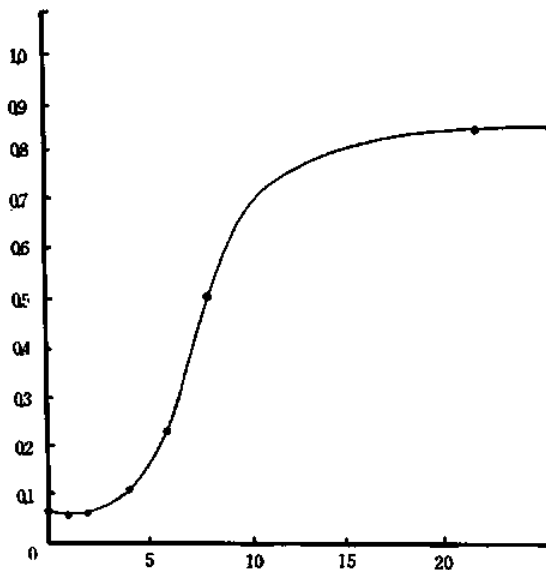
実験結果

供試菌の 20 時間培養 1 ml を各 pH の培地（塩酸、苛性ソーダ、硼砂で調整）100 ml に加え 30°C で振盪培養した場合の成長曲線を第 1 図に示す。

反応液の pH も時間と共に変化するが、大体 6.9 前後が最適である。又アルカリ性側の pH を苛性ソーダで調整した場合、24 時間くらいで pH は 1 前後下り菌体の増殖阻害効果が明瞭でなかつたので硼砂も使用した。図の（ ）内の数字はそれを示す。

後述のファージに関する諸実験に於ては、上述の 20 時間振盪培養せる菌体を新鮮培地に加えて 10 倍量に稀釈し培養を続けた菌体を使用したのも、其の際の菌体の成育状況を示す。

計算室法に依り菌体数を各々 2, 25 時間目に測定し 2.1×10^9 個/ml, 3.8×10^9 個/ml を得た。又コロニー法では 25 時間目の菌体数は 2.7×10^9 個/ml であつた。



第 2 図. ファージ実験供試用菌体の成長曲線。縦軸は吸光度、横軸は時間(時)。

(2) ファージの分離と確認

実験方法

1. 平面培養法に依るブランクの計数

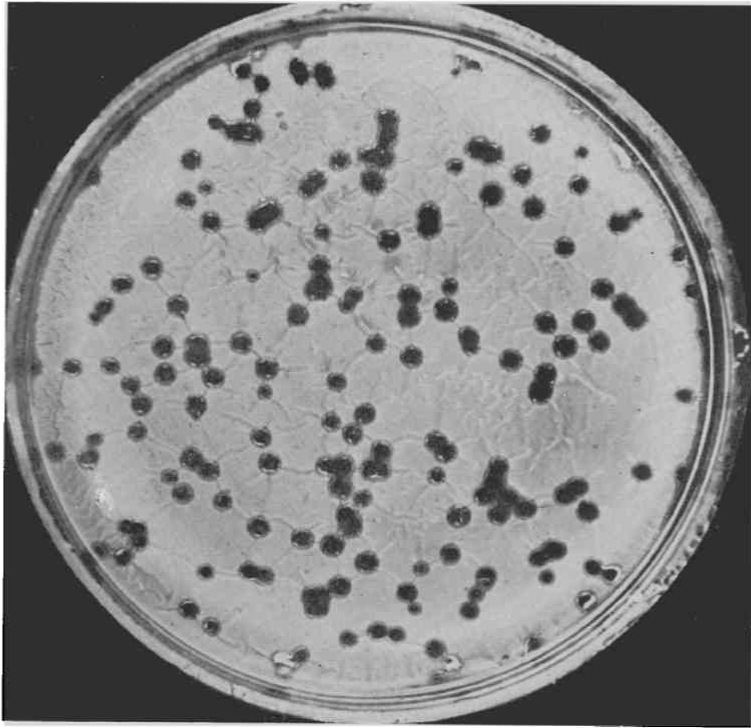
下層に 2% 寒天を含む培地 5~10 ml を流し固化後、1.5% 寒天含有培地 5~10 ml、20 時間振盪培養菌体懸濁液（約 10^9 個/ml）3 ml、ファージ被検液 1 ml の混合液を上層として加える寒天二重層法に依る。溶菌斑は 30°C の恒温器に 16 時間置いて観察した。

2. 供試菌体

培養基の組成、培養法は前項の菌体成長実験の場合と同じ。

実 験 結 果

供試菌体とファージ溶菌液の混合液を 5000r.p.m. で 30 分, 0°C で遠心分離し其の上澄液を殺菌生理食塩水で 10 倍系列に稀釈し, 平面培養法 (plating method) に依つて溶菌斑を形成させる. プラークを計数 (titer count) して原液のファージ濃度を知り, 又溶菌斑の均一である事を確めた. 第 3 図に溶菌斑 (実物大) を示す.



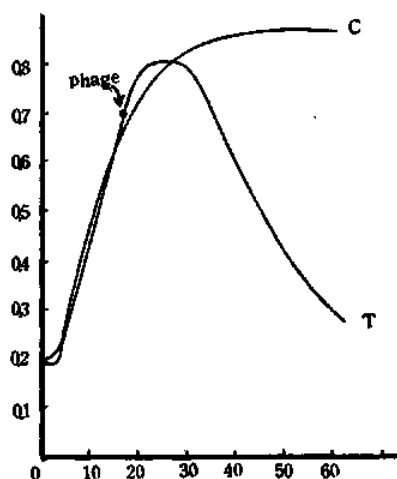
第 3 図. K-49 ファージによる溶菌斑.

プラークの形状が均一な溶菌斑を殺菌生理食塩水に溶かし, これをあらかじめ一晚培養した菌体と 30°C で 2 日間振盪培養後, 遠心分離して菌体を除き上澄液を 55~60°C の重湯煎で 30 分加熱, 5000r.p.m, 15 分, 0°C での遠心分離を繰り返し上澄液をファージ検液として使用する. 此の連続稀釈のファージを上述と同じ寒天二重層法で平面培養する. 此の実験をくり返して溶菌斑の形状の均一である事, プラーク数は濾液の稀釈度に逆比例する事を確認した. 溶菌斑の形状は直径 1~2 mm の透明な円形で周囲に暈輪 (halo) を有する.

次に培養菌体にファージを添加し, 其の溶菌現象に依る培養液の濁度の低下を追求した.

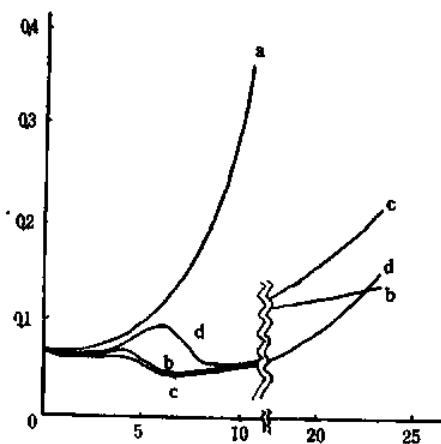
方法は前述の如く菌体の培地との混合液を水で 10 倍に稀釈し吸光度を測定するのである.

第4図はその一例である。尚3日目に遠心分離して菌体を除き、上澄を titer count して 5×10^8 個/ml の濃度のファージ溶液が得られた。



第4図. ファージ添加に依る培養液の濁度低下.
反応液 30°C, pH 6.8~7.1. C (control):
ファージ無添加, T (test): ファージ添加.
縦軸は吸光度, 横軸は時間(時).

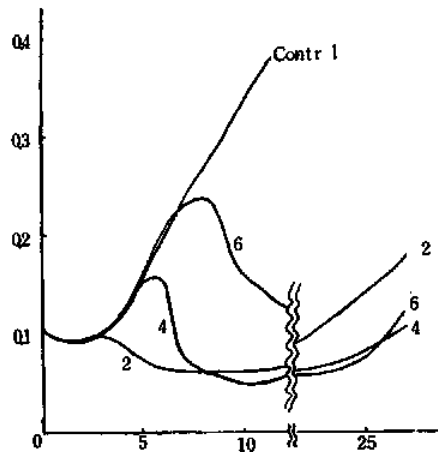
次に20時間培養の菌体 1ml を 90ml の培地に加え、更にそれに次の各濃度のファージを加えた場合の培養液の濁度の変化を調べた。



第5図. 一定量の菌体に種々の濃度のファージを加えた場合の培養液の濁度変化. a: ファージなし. 初発菌体量 1.1×10^8 /ml, b: 1.0×10^8 /ml ファージ 1ml 添加, c: 1.0×10^9 /ml ファージ 9ml 添加, d: 1.0×10^5 /ml ファージ 9ml 添加.
縦軸は吸光度, 横軸は時間(時).

第5図に示された如く、濃度の高い区分程早く溶菌現象が認められた。しかし再び濁度の増加がファージ無添加区に較べるとはるかに少ないが認められたので3日目に更にファージを添加したが濁度の再低下は認められなかつた。分離確認はしなかつたけれども、多分抵抗菌が生じたものと推察される。

次に20時間培養の菌体5mlを95mlの新しい培地に加え振盪培養を常法に従つて続け、種々の成育時期にファージ($1.0 \times 10^8/\text{ml}$)2mlを添加し溶菌過程を観察して第6図を得た。



第6図. 各時間毎にファージを添加した場合の培養液の濃度変化。Controlはファージ無添加、数字はファージを添加せる時間。縦軸は吸光度、横軸は時間(時)。

第6図より明らかな如く菌体の生育時期により溶菌現象は異なつた様相を示す。2時間後の菌体をもつともファージの攻撃を受け易いように思われる。

(3) 遊離ファージの温度、pHに依る不活化

[A] ファージの活性と温度との関係

実験方法

前述の方法で菌体より分離したファージ溶液を10mlずつ試験管に分注し、夫々の系列を各温度の重磁煎に浸漬し各時間毎に1ml採取し単一感染に依るブラーク計数法に依り活性ファージの生存率を調べた。

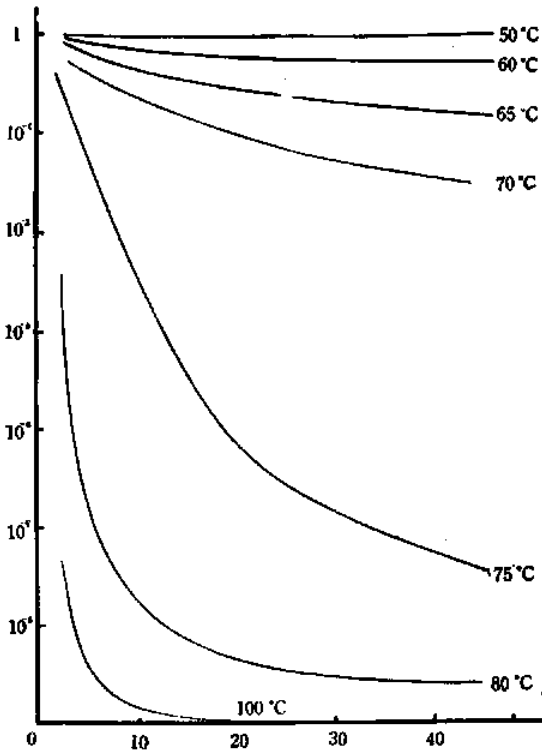
実験結果

ファージ原液を培地で $10^7/\text{ml}$ くらいに稀釈(pH=6.9)して行つた場合の結果を、最初を1とした生存曲線で示すと第7図の如くなる。

[B] ファージの活性とpHとの関係

実験方法

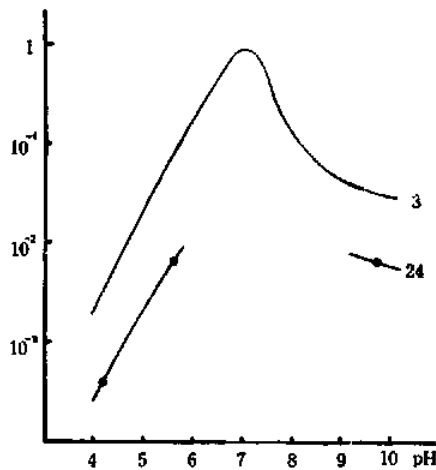
$1.0 \times 10^8/\text{ml}$ 濃度のファージ溶液0.5mlを各pH培地(塩酸、苛性ソーダで調整)に加え37°Cの恒温器に入れ、一定時間後にその0.5mlについてファージ活性を常法のブラーク計数法に依り調べた。



第7図. 遊離フェージの温度による不活化. 図中の数字は反応温度 °C. 縦軸は生存率, 横軸は時間(分).

実験結果

反応開始後 3, 24 時間に於ける生存率と培地の pH との関係を第8図に示す.



第8図. フェージの pH に依る不活化 (— 3時間, —●— 24時間). 縦軸は生存率, 横軸は pH.

(4) ファージの一段増殖実験

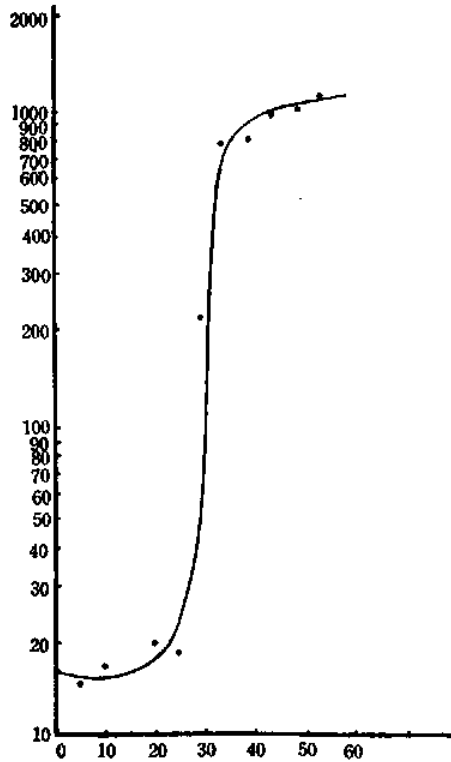
培養液の溶菌現象に依る濁度変化である程度ファージ作用の様相がうかがえたが、本ファージの成育特性を明らかにするために更に一段増殖実験を行った。

実験方法

方法は Adams 氏¹⁾の原報、¹⁾ 其他^{3,6,11,17)} を参照し簡略化して次の如く行つた。即ち前記培養基にて 30°C で 20 時間 振盪培養した菌体を同組成の新しい培地で更に 10 倍に稀釈し 2 時間培養を続けると菌体は約 $10^8/ml$ の濃度の懸濁液となる。これに菌体量より少々少ないファージの一定量を加えて 37°C で 10 分間、中性で吸着を行わせる。これで大体 90% 以上吸着されるが、而る後予め用意しておいた増殖管の培地で急激に 100 から 10000 倍に稀釈して吸着進行を阻止し以後 37°C、中性で反応させ経時的に其の一定量を取り寒天二重層法に依る平面培養で活性ファージの定量を行つた。ブランクの計算は平面培養後 30°C で 16~20 時間してから行つた。

実験結果

今実験の 1 例を挙げると第 9 図の如くなる。



第 9 図. K-49 ファージの一段増殖曲線. pH 6.9, 37°C の大豆粕培地で反応. 縦軸は 1 ml 中のブランク数, 横軸は吸着後の時間(分).

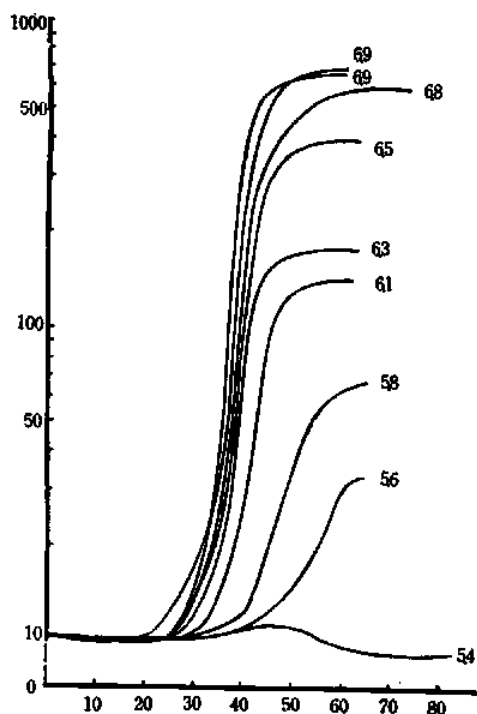
温度 37°C の中性培地では普通ファージが感受性菌に感染してから新生ファージが現われずに感染菌が1個の感染中心となつている最小潜伏期 (minimum latent period) は約 40 分, 感染菌1個あたりの新生ファージ平均放出額 (mean burst size) は 70~95 程の一段増殖曲線を描いて成長する。

(5) ファージの成長に及ぼす pH の影響

菌体と同様ファージの成長を問題とする場合にも pH と温度の及ぼす影響が先ず検討されるべきであり, 乳酸菌のファージ増殖に及ぼす pH の影響に就いては Overcast,⁴⁴⁾ 金子氏等¹⁰⁾ が又 Clostridium に就いては Gold 氏等⁹⁾ が菌体数の変化より検べている。著者等は反対に種々の pH 値に於けるファージの成長を溶菌斑を計数するブランク計数法 (Plaque count method) で直接に観察した。

実験方法

菌株, ファージ, 培地, 操作法は前述の一段増殖実験の場合と全く同様にし増殖管中の反応液の pH は塩酸, 苛性ソーダで調整して行つた。菌体とファージは 37°C で 10 分間吸着させてから下記 pH 値の増殖管で稀釈し 37°C で反応を開始させ時間に依るブランク数の変動を検べた。



第 10 図. 酸性側に於けるファージの成長. 吸着時 pH は 6.7~6.8, 図中の数字は反応液の終末時 pH, 横軸は 10 分吸着後の時間 (分), 縦軸のブランク数は初発を 10 とした時の比ブランク数。

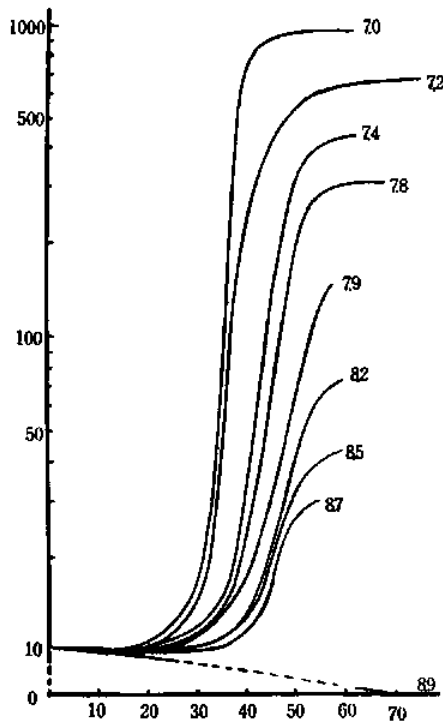
実験結果

1. 酸性側に於ける一段増殖実験

これに依るとフェージの成長は中性付近で最大で pH 値の下るに従つて放出量は減少するが pH 5.6 迄は大體増加し宿主の成長と平行している。又潜伏期は pH が變つても最適条件と殆ど同じで感染後約 40 分である。

2. アルカリ性側に於ける一段増殖実験

アルカリ性側では pH 8.7 でもフェージの放出は阻止されないが、放出量が pH 上昇に伴つて減少するのは宿主の生理的條件の悪化に関係しているものと思われる。潜伏期は酸性側と同様に pH に依り殆ど影響を受けない。



第 11 図. アルカリ性側に於けるフェージの成長, 吸着時 pH は 6.9~7.0, 図の説明は第 10 図と同じ。

次に最大放出量を得る為には潜伏期の全ての時期が中性でなければならないのか或いは潜伏期の初期だけに特に関係しているのか等を知る予備試験として 37°C, 中性で反応後 28 分目に反応液の pH を各々 8.6 と 5.4 にした。其の時のプラーク数の時間に対する関係を示すと次表の如くなり、潜伏期の後期でも pH 値が悪化するとフェージの正常な成長はおさえられる事が判つた。従つて pH は潜伏期の全ての時期に影響しているものと想像される。

第 1 表. 反応途中で pH を悪化させた時の一段増殖実験.

吸着後の時間(分)		0	15	25	35	40	45	55
ブランク数	pH 5.4	107	105	105	114	—	130	300
	pH 8.6	110	100	—	110	200	—	—

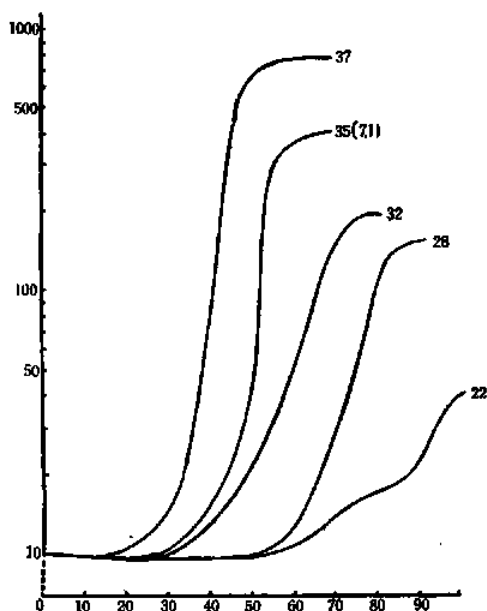
(6) ファージの成長に及ぼす温度の影響

pH の場合推察された如く温度の場合も宿主の最適温度がファージの最適条件であろうと考え、培地の温度を 20°C ~ 50°C に変化させて一段増殖実験を行った。増殖管中の反応時間と活性ファージ数(比ブランク数で示す)の関係を示すと第 12 図-(イ), -(ロ)の如くなる。吸着時の条件は 37°C , 10 分で pH 7.0. 反応液の pH は全て 7.0 であるが, 7.1 であつたものは () で示した。又図中の数字は温度 ($^{\circ}\text{C}$) を示す。

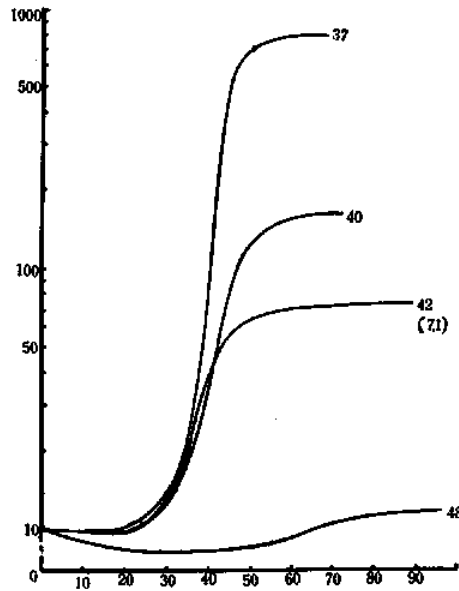
第 12 図に示された如くファージの成長は温度に対して非常に敏感で 20°C 以下, 50°C 以上では成育は阻止された。又高温の場合潜伏期には著しい変化が認められないが, 低温部では放出量の低下の他に明らかに潜伏期が延長される。

(7) ファージの成長と宿主菌体の生育時との関係

菌体の斜面培養から一白金耳接種し 30°C で 20 時間振盪培養したものを宿主として一段増殖実験を行った所, 第 13 図に示す如く其の潜伏期が非常に長く又其の許容 pH 域も狭められていた。



第 12 図-(イ). 22°C ~ 37°C での一段増殖曲線.
図の説明は第 10 図に同じ。



第12図-(ロ). 37°C~48°C での一段増殖曲線.
図の説明は第10図に同じ.

又第6図でみられた如く フェージ添加による溶菌曲線が宿主の生育時期に依り異なるのでフェージの成長は菌体の成育時期によつて影響されるにちがいないと思ひ次の如く種々の生育時期の菌体を用いる一段増殖実験を行つた. 方法は常法に従ひ 20 時間 振盪培養した菌体を更に 10 倍に新しい培地で稀釈し 30°C で培養を続け各時間毎の菌体を一段増殖実験の宿主として使用した.

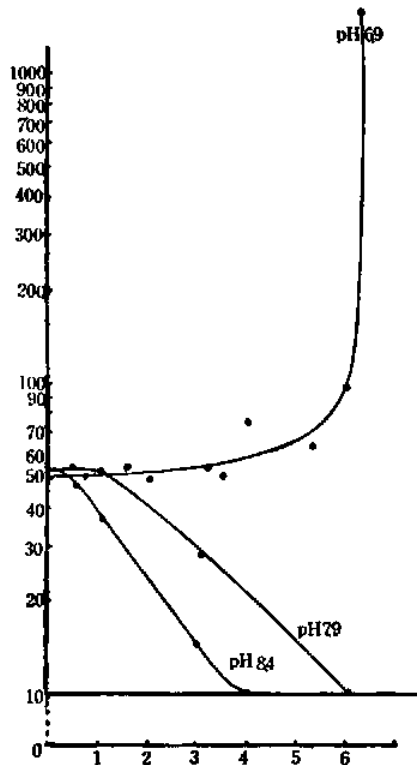
始めに予想した程ではないが潜伏期は延長され、2 時間培養の菌体の潜伏期が最も短かつた. 前の実験(第13図参照)での潜伏期の異常な延長は菌体の生育期と他の未知因子も関係しているものと推察される.

要 約

(1) *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto-K 49 を 5% 大豆粕アルカリ抽出培地で培養し pH 6.7~7.0 で大成長を示し、 10^9 /ml 迄増殖する事、pH 約 5 以下及び 8 以上では殆ど生育しない事を認めた.

(2) フェージは周囲に暈輪を有する直径 1~2 mm の透明な溶菌斑を形成する. 遊離フェージは培地中では 65°C 以上で除々に失活する. pH に依つても不活性化が起り中性附近で安定である.

(3) フェージの成長は一段増殖曲線の典型的な型に従ひ約 40 分の潜伏期の後に急激に増加して放出量は 70~95 で最高となる.



第13図。一白金耳より出発し20時間培養の菌体での一段増殖曲線。吸着並びに反応条件は上述の一段増殖実験と同じ。アルカリ性側のpHは0.2 M-tetraborate (pH 9.4)で調整。縦軸1 ml中のプラーク数、横軸は時間(時)。

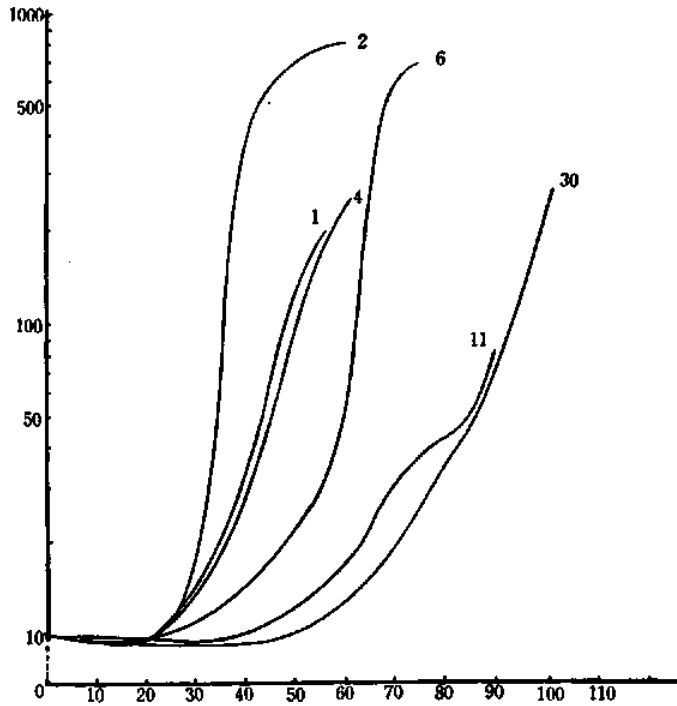
(4) ファージの増殖はpH 7.0前後が最適でpH 5.4以下又は8.9以上では成長しないが、酸度の変化は潜伏期に殆ど関係しない。

(5) 本ファージは又37°Cで最も良く繁殖し37°C以上48°C迄は潜伏期は同じで放出量は極度に下り、37°C以下22°C迄の場合は放出量の低下の他に潜伏期も少々長くなる。

(6) 菌体の生育時期によつてもファージの潜伏期は変化し、概して対数的増殖期が最小で定常期に入るとファージ放出迄の時間が長くなる。

(7) 此のファージの生育は菌体の成長と平行関係にあり菌の生理的条件即ち温度、pH、培養時期等に依り非常に影響を受け易い事が明らかにされた。

本研究につき貴重な菌株並びにファージ溶菌液を分与された上、種々助言を与えられた大阪市立大学福本寿一郎、里村幸男、山本武彦の諸博士に厚く御礼申し上げる。尚又終始実験に協力された寺本正也君に深く感謝する。



第 14 図. 種々の生育時期の菌体での一段増殖曲線.

吸着条件は 37°C, 10 分で pH 6.9. 反応液は 37°C, pH 6.95~7.05. 数字は宿主菌体の培養時間で
 ②は対数的増殖期の初め, ④は対数的増殖期と
 定常期との中間期の菌体. 図の説明は第 10 図
 に同じ.

文 献

- 1) Adams, M. H., 1950. Methods of study of bacterial viruses, *Methods in medical research*, 25: 1.
- 2) 相田徳二郎, 1957. 農化, 31: 259.
- 3) 伝研学友会編, 1958. 細菌学実習提要(丸善), 438.
- 4) 福田重夫, 1955. 農化, 29: 743.
- 5) 福田重夫, 1957. 農化シンポジウム.
- 6) 福見秀雄, 1956. 生物学実験法講座(中山), 18.
- 7) 福本寿一郎, 1945. 農化, 19: 487.
- 8) 福本寿一郎・山本武彦・市川和宏, 1957. 農化, 31: 332.
- 9) Gold, W. and Watson, D. W., 1950. *Journal of Bacteriology*, 59: 17.
- 10) 金子太吉・岩野貞雄・北原覚雄, 1957. 農化, 31: 654.
- 11) 金子太吉, 1958. 実験化学講座(丸善), 25: 81.
- 12) 北原覚雄・金子太吉, 1958. 農化, 32: 405, 411; 1957. 農化シンポジウム.

- 13) 野村真康, 1955. 農化, 29: 674.
- 14) Overcast, W. W. et al., 1951. Journal of Bacteriology, 61: 87.
- 15) 里村幸男・岡田茂孝・福本寿一郎, 1957. 農化, 31: 289.
- 16) 里村幸男・岡田茂孝・福本寿一郎, 1957. 農化, 31: 801.
- 17) 脇本 哲, 1955. 九大農学芸雑誌, 15: 151.

Summary

1) The growth of bacterial cells (*Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* Fukumoto-K 49) was investigated under various pH values in 5% soybean extract medium by estimating turbidity of culture solution. The optimum pH is 6.7-7.0 and this bacterium can not multiply at pH above 8 or pH below 5.

2) The plaque formed by K49-phage is clear and circular. Its diameter is 1-2 mm and it has a halo. The influence of temperature on the bacteriophage was examined by plating technique. It was found that the phage is stable for 40 minutes under 60°C, and that above this temperature the activity of phage decreases gradually with the increase of the temperature. The effect of pH-value on the phage was also studied by the same technique. In general, the phage is comparatively stable at the neutral solution and the activity of phage decreases at higher or lower pH.

3) The growth of K49-phage was followed by One Step Growth Curves. Under the optimum condition (pH 7.0, at 37°C) in soybean extract medium this phage multiplies with the average burst size of about 70-95 and the latent period is about 40 minutes.

4) The burst size varies with the pH values ranging from 5.4-8.9, without changing of the latent period. When the host-phage complex was incubated at pH 7 and 37°C for the initial 38 minutes after infection and then placed at pH 5.4 or 8.6, the phage could not multiply as in the standard medium.

5) This phage gives the greatest titer at 37°C. Although between 37°C and 48°C, the average burst size is greatly affected but the latent period is not prolonged, the temperature between 37°C and 22°C affects both the latent period and the burst size.

6) The latent period is also influenced by the age of host. The cells of logarithmic growth phase generally have a minimum latent period and those of stationary phase have a longer period.

7) It was revealed that the growth of the phage seems to keep pace with that of its host cell and is influenced by the biological and physical conditions.