# 九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

# 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

山藤,一雄

https://doi.org/10.15017/21497

出版情報:九州大學農學部學藝雜誌. 17 (3), pp. 253-267, 1959-12. 九州大學農學部

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

渡辺 健治・山藤 一雄

Growth curve of the cell and phage of amylase producing bacteria

Kenji Watanabe and Kazuo Yamafuji

#### 絡 新

酸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。

方 Bacillus subtilis 系細菌を利用するアミラーゼの工業生産は戦後間体培養から液体 培養法に変えられて以来、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<sup>9</sup> 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 が頭強を止め溶菌し始める事を見出し, これがピルレントのパ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つた。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<sup>3)</sup> の潜菌性物質,野村氏<sup>13)</sup> の anaerobic lysis 等の関与する場合 もある事が判り密園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<sup>10</sup> 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潜菌過程に就いて報告したが、 又その溶菌 機作研究申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換起した。 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徴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関係があると言う。 是等とは無関係に 里村氏崎 は好気性者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. amylollquefaciens 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。 **氏禁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ブ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ヌ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共等の増殖実験共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

#### **美** 験 方 法

#### 1. 供試菌株

Bacillus subtilis var. amyloliquefaciens Fukumoto-K49. 大阪市立大学福木研究室に於いて、有胞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<sup>7)</sup> 桿状、単独叉は2個連結、運動性、最適  $pH=6\sim7$ . 最適温度  $40^{\circ}C$ .

# 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 $^{9}$  を主成分とし、 $MgSO_{4}$ · $7H_{2}O$ ,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  $100\sim300\,\mathrm{m}l$  を角付コルベンに入れ、  $30^{\circ}\mathrm{C}$  で振盪培養した。

#### 3. 菌量の測定法

#### イ)比濁法

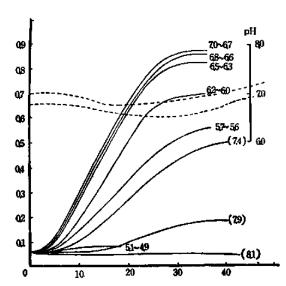
黄褐色の培地を含む菌体懸濁液を水で 10 倍 量に 稀釈し、 日立光電光度計(TK-120-S型)でフィルターR、 1 cm の液層を使用し、 水を標準として 吸光度(-log T)を測定した。

#### 中) 計算室法

Thoma の血球計算室 (1/4000 mm<sup>3</sup> 区劃) 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. 歯体の生長曲線と pH (――歯体, ……pH). 縦軸は吸光度, 横軸は時間(時).

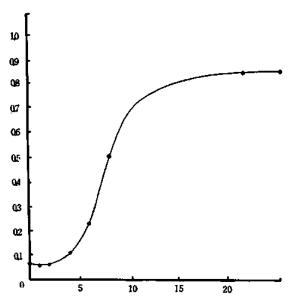
# 寒 験 結 果

供試菌の 20 時間 培養 1 ml を各 pH の培地(塩酸, 苛性ソーグ, 硼砂で調整) 100 ml に加え 30°C で振陽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で、 其の際の菌体の成育状況を 示す。

計算室法に依り歯体数を各々 2, 25 時間目に測定し  $2.1 \times 10^9$ 個/ml,  $3.8 \times 10^9$ 個/ml を得た. 又コロニー法では 25 時間目の菌体数は  $2.7 \times 10^9$ /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、機軸は時間(時).

#### (2) フェージの分離と確認

# 実 験 方 法

#### 1. 平面培養法に依るプラークの計数

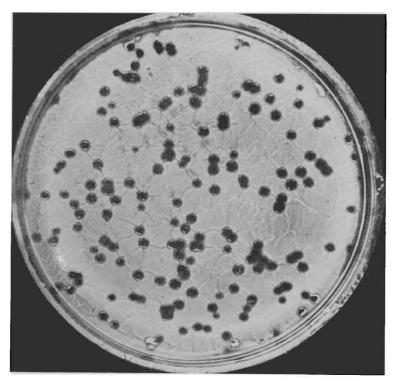
下層に 2 %寒天を含む培地 5 ~10 ml を流し間化後, 1.5% 寒天含有培地 5 ~10 ml, 20 時間振器培養菌体懸濁液 (約 10°個/ml) 3 ml, ファージ被検液 1 ml の混合液を上層として加える寒天二重層法に依る. 溶菌斑は 30°C の恒温器に 16 時間置いて観察した.

#### 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

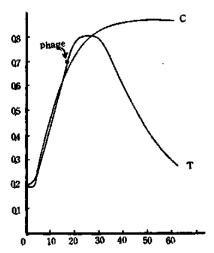
供試菌体とファージ溶菌液の混合液を 5000 r.p.m. で 30 分, 0°C で遠心分離し其の上澄液を殺菌生理食塩水で 10 倍系列に稀釈し、平面培養法 (plating method) に依つて溶菌斑を形成させる。プラークを計数 (titer count) して原液のファージ濃度を知り、又溶菌斑の均一である事を確めた。第3 図に溶菌斑 (実物大)を示す。



第3回. K-49ファージによる溶菌斑.

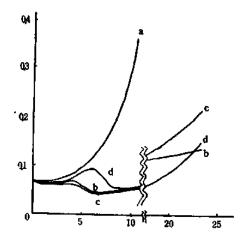
プラークの形状が均一な溶菌斑を殺菌生理食塩水に溶かし、これをあらかじめ一晩培養した菌体と 30°C で 2 日間振盪培養後、遠心分離して菌体を除き上澄液を 55~60°C の重湯煎で 30 分 加熱,5000 r.p.m,15 分,0°C での遠心分離を繰り返し上澄液をファージ検液として使用する。此の連続稀釈のファージを上述と同じ寒天二重層法で平面培養する。此の実験をくり返して溶菌斑の形状の均一である事、プラーク数は濾液の稀釈度に逆比例する事を確認した。溶菌斑の形状は直径 1~2 mm の透明な円形で周囲に暈輪 (halo) を有する。

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  $5 \times 10^9$  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, 機軸は時間(時)。

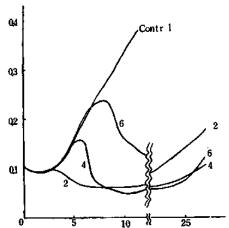
次に 20 時間 培養の菌体 1ml を 90ml の培地に加え、更にそれに次の各機度のファージを加えた場合の培養液の濁度の変化を調べた。



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。初発協体量 1.1×10<sup>8</sup>/ml, b: 1.0×10<sup>9</sup>/ml ファージ 1 ml 添加, c: 1.0×10<sup>9</sup>/ml ファージ 9 ml 添加, d: 1.0×10<sup>5</sup>/ml ファージ 9 ml 添加.
縦軸は吸光度, 結軸は時間(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  $(1.0\times10^9/ml)$  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時間後の菌体が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

#### 笑 験 方 法

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

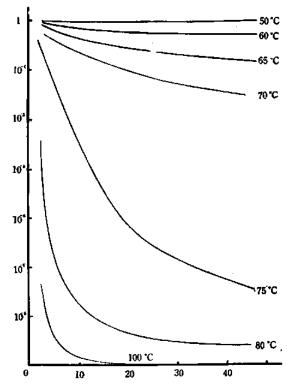
#### 実 験 結 果

ファージ原液を培地で  $10^7/ml$  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

#### 笑 験 方 法

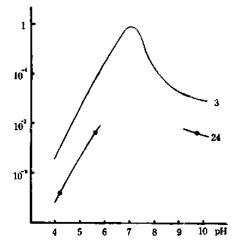
 $1.0 \times 10^6/\text{m}l$  濃度のファージ溶液  $0.5\,\text{m}l$  を各 pH 培地(塩酸、苛性ソーグで調整)に加え  $37^{\circ}\text{C}$  の恒温器に入れ、一定時間後にその  $0.5\,\text{m}l$  についてファージ活性を常法のプラーク計数法に依り検べた。



第7 四. 遊離ファ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 驗 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. ファージの 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

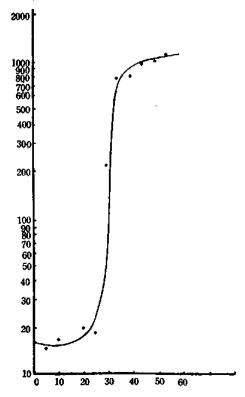
培養液の溶菌現象に依る濁度変化である程度 ファージ 作用の 様相がうかがえたが、本ファージの成育特性を明らかにするために更に一段増殖実験を行つた。

#### 寒 験 方 法

方法は Adams 氏の原報。" 其の他<sup>8.6,11,10</sup> 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<sup>8</sup>/ml の濃皮の懸濁液となる。これに菌体量より稍 々少ないフェ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 反応させ経時的に共の一定量をとり寒 天二重層法に依る平面培養で活性フェージの定量を行つた。プラークの計算は 平面培養後 30°C で 16~20 時間してから行つた。

#### 寒 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℃ の 大豆粕培地で反応・縦軸は 1 ml 中の プラーク数、横軸は吸着後の時間(分)。

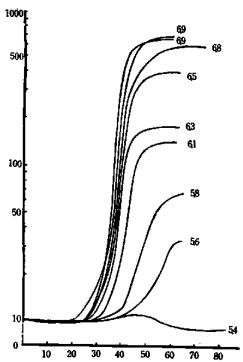
温度 37°C の中性培地では普通ファージが必受性菌に感染してから新生ファージが 現われずに感染菌が 1 個の感染中心となつている最小潜伏期 (minimum latent period) は 約 40 分, 感染菌 1 個あたりの新生ファージ平均放出額 (mean burst size) は 70~95 程の一段増殖曲線を描いて成長する.

### (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, 40 金子氏 等10 が叉 Clostrdium 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プラーク計数法 (Plaque count method) で直接に観察した。

#### 寒 験 方 法

一菌株、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 吸浴させてから下記 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プラーク 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, 機動は 10 分 吸着後の時間 (分), 縦軸のプラーク数は初発を 10 とした時の比プラーク数.

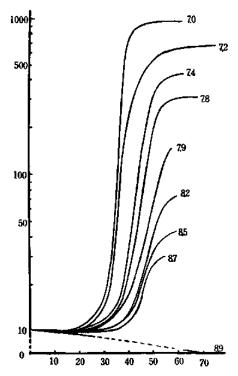
#### 実 験 結 果

# 1. 酸性側に於ける一段増殖実験

これに依るとファージの成長は中性附近で最大で pH 値の下るに従つて放出量は減少するが pH 5.6 迄は大体増加し宿主の成長と平行している。 又潜伏期は pH が変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 でもファージの放出は阻止されないが、放出量が pH 上昇に伴って減少するのは宿主の生理的条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ァージの成長. 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 値が悪化するとファ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。

吸着後の問	0	15	25	35	40	45	55	
プラーク数	pH 5.4	107	105	105	114		130	300
	pH 8.6	110	100		110	200		

第 1 表. 反応途中で pH を悪化させた時の一段増殖実験.

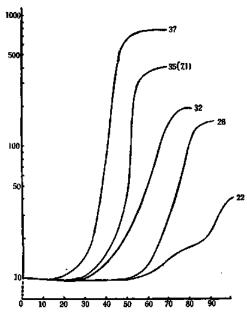
# (6) ファージの成長に及ぼす温度の影響

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  $20^{\circ}$ C~ $50^{\circ}$ C に変化させて一段増殖実験を行つた。増殖管中の反応時間と活性ファージ数(比プラーク数で示す)の関係を示すと第 12 図一(イ)、一(ロ) の如くなる。吸着時の条件は  $37^{\circ}$ 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 ( $C^{\circ}$ ) を示す。

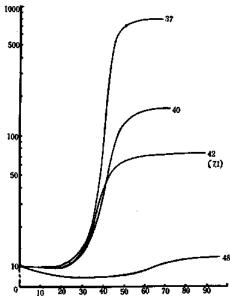
第12 図 に示された如く ファージの成長は温度に対して非常に敏感で 20°C 以下,50°C 以上では成育は阻止された。又高温度の場合潜伏期には著しい変化が認められないが、低温度部では放出量の低下の他に明らかに潜伏期が延長される。

# (7) ファージの成長と宿主菌体の生育時との関係

歯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つた所、第 13 図 に示す如く共の潜伏期が非常に長く叉其の許容 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.



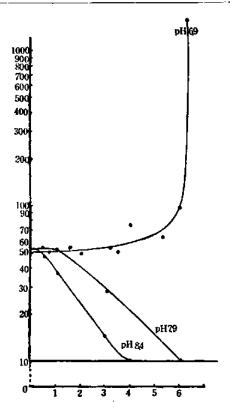
第12 図-(ロ). 37°C~48°C での一段増殖曲線。 図の説明は第10 図に同じ、

叉第6図でみられた如くファ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ァ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い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。 方法は常法に従い 20 時間 振る卓養した菌体を更に 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った、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

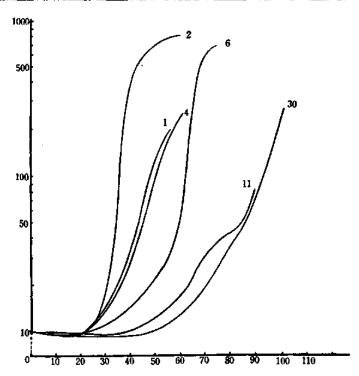
- (1) Bacillus subtilis var. amyloliquefaciens Fukumoto·K 49 を 5 % 大豆約アルカリ 抽出培地で培養し pH 6.7~7.0 で大成長を示し、10º/ml 迄増殖する事、pH 約5以下及び8以上では殆ど生育しない事を認めた.
- (2) ファージは周囲に最輪を有する直径1~2mm の透明な溶菌斑を形成する. 遊離ファージは培地中では 65°C 以上で除々に失活する. pH に依つても不活性化が起り中性附近で安定である.
- (3) ファージの成長は一段増殖曲線の典型的な型に従い 約40分の潜伏期の後に急激に増加して放出量は70~95で最高となる。



第13 図。 一白金耳より出発し 20 時間 培養の歯体での一段増殖出線。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-tetraborte (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稍々長くなる。
- (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. 種々の生育時期の関体での一段増殖曲線。 吸着条件は 37°C, 10 分で pH 6.9. 反応被は 37°C, pH 6.95~7.05. 数字は宿主開体の培養時間で 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関体。図の説明は第 10 図 に同じ。

# 文 献

- 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) 福木寿一郎, 1945. 殷化, 19:487.
- 8) 福本寿一郎•山木武彦•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・北原覧雄, 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) 里村市男・岡田茂孝・福木寿一郎, 1957. 農化, 31:801.
- 17) 脇木 朽、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.