

細菌の合成培地に関する研究

第三編

合成培地にて継代培養した菌の代謝に関する検討

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)

仲 西 弘 孝

〔昭和33年10月1日受稿〕

緒 言

微生物の物質代謝の様相は、その發育環境に大きく支配されることは周知の事実であり¹⁾²⁾、同じ菌種でも病的材料より分離直後の菌は、継代を積ねたものとの間に酵素的性状の変化を認め、又金属イオン減少培地に發育せる菌は然らざる菌との間に著明な代謝経路の変動を認める³⁾⁴⁾。

著者は第一編⁵⁾及び第二編⁶⁾に於て述べた如く11株の菌に就て各種の窒素源を組合せることに依つて簡単な合成培地による菌發育に関する実験的研究を行つた。本編に於ては、第二編の実験結果中最もよく夫々の菌を發育せしめると考えられる培地を用いて、長期継代培養を行い發育度の継代変化を比較検討した。

更にかかる簡単な合成培地に發育した菌は普通寒天培地又は Bouillon 等に發育した菌との間に代謝様相の変動を認め得るであろうと考え、酵素活性の変化を Warburg 検圧計によつて、一般的な四基質について検討を加えた。

第1章 実験材料及び実験方法

第1節 実験材料

1) 使用菌株: 当教室保存の *Staphylococcus aureus* (寺島株) *Staphylococcus albus*, *Sal. enteritidis*, *Sal. typhi* 57S, *Sal. typhi* 57 R, *Sal. paratyphi* A, *Sal. paratyphi* B, *Sal. paratyphi* C, *Sal. typhi murium*, *Sh. sonnei*, *Sh. flexneri* 2a を常法に依り普通寒天培地に数代継代培養することにより純化を計り使用した。

2) 使用培地: 基礎になる合成培地は、第二編に記した如く下記の組成のものを調整し使用した。

第二磷酸ソーダ 2.5 gr

第一磷酸カリウム	0.35 gr
硫酸アンモニウム	0.5 gr
塩化アンモニウム	0.5 gr
硫酸鉄	0.001 gr
硫酸マグネシウム	0.001 gr
葡萄糖	1.0 gr
蒸溜水	1000. cc

pH は7.2に修正し、120°C で15~20分滅菌しこれに使用する窒素源は市販のものでなるべく純度の高いものを用い、何れも10 mg を基礎培地溶液5 cc に溶解し蒸気滅菌後3 cc 宛を適宜組合せて後全量100 cc になる如く調整して使用した。尚この際使用した合成培地は菌によつて各々異なるが第二編に於ける結果を参照して最も發育良好なるものを作り第1表に示した培地によつて継代培養を行つた。

第2節 実験方法

1) 継代方法: 初代培養は18時間培養の菌2 mg を10 cc の生理的食塩水に浮遊せしめ0.1~0.3 cc (菌の種類により量を加減) を注加培養した。しかる後37°C で24時間保ち、この中より2~3白金耳を同一組成の次の培地に継代し、10代まで培養を行つた。各培地に於ける菌の發育度を判定するに当つては、24時間後に光電比色計によつて測定した。Blank は同組成の合成培地に菌を培養することなく孵卵器中に放置したのものを用い、これを透過度100%として成績はすべて透過度T (%) で表示した。

例外として合成培地に發育しにくい *Staph. aureus* 及び *Staph. albus* は、初代接種も培地10 cc に対して菌量20 mg を混入し継代に際しては發育の如何にかかわらず培地中の菌を沈澱せしめその大部分を次代に継代し6代まで行つたものを実験に供した。

2) O₂ 消費量の測定: 上記の如くして得られた

最終培養菌を遠心沈澱して集菌し M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加) にて2回洗滌後、菌体を同上組成の緩衝液に浮遊させたものを静止菌浮遊液として用いた。菌量決定は光電比色計にて測定し標準曲線に対比して決定した。O₂ 消費量の測定は Warburg 検圧計を用い常法に従った。その際の基質は glucose, lactate, succinate, glutamate の代表的なもののみ

用いた。

第2章 実験成績

第1節 継代培養に依る菌の發育度に就いて

第二編に於て得た実験結果を基にして、第1表に示す如き各菌に夫々適する窒素源加合成液体培地を

第 1 表

菌 株	添 加 窒 素 源	継 代 数									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Staph. aureus	Val. Pro. Glu. Cys. Nic.	62	67	67	75	87	99	/	/	/	/
Stph. albus	Val. Pro. Glu. Cys. Nic.	69	69	73	81	96	100	/	/	/	/
Sal. enteritidis	Gly. Cys. Nic.	59	57	58.5	54	53	49	44	51	48	46
Sal. typhi 57 S	Try. Glu. Cys. Nic.	52	55	56	53	55	58	56	56	60	59
Sal. typhi 57 R	Try. Glu. Cys. Nic.	50	48	50	51	53	56	52	52	56	55
Sal. paratyphi A	Try. Cys. Nic.	54	55	54	57	56	54	58	56	58	59
Sal. paratyphi B	Glu. Phe. Cys. Nic.	69	77	70	73	68	65	53	63	70	67
Sal. paratyphi C	Gly. Glu. Nic.	73	58	66	69	53	57	67	55	66	65
Sal. typhi murium	Gly. Cys. Nic.	59	60	64	58	60	55	51	51	45	41
Sh. sonnei	Glu. Asp. Cys. Nic.	62	50	54	55	59	53	55	60	59	53
Sh. flex. 2a	Glu. Asp. Cys. Nic.	43	48	51	46	47	50	52	51	48	52

添加窒素源は下記の通り略号にて示した。

PL-valine : Val. L-proline : Pro. L-glutamic acid : Glu. L-cystine : Cys. glycine : Gly.

PL-tryptophan : Try. PL-phenylalanine : Phe. L-aspartic acid : Asp. nicotinic acid : Nic.

作成し、これを継代培養した。Staphylococcus を除くすべての菌に於ては、すべて10代まで可能であった。Sal. enteritidis 及び Sal. typhi murium に於ては継代を重ねるに従つて徐々に發育増強を來した。Sal. paratyphi B に於ても僅かながら増強の傾向に見られたが、その他の菌に於ては發育の増強は全く見られず、むしろ3~4代に於て減弱する結果が認められた。Staphylococcus aureus 及び albus に於ては發育不良の爲6代にて中止した。

2) 合成培地發育菌の O₂ 消費量に就て

上述の継代培養によつて得られた菌が Bouillon 培地に發育した菌と酵素活性に於て差が存在するかどうかを追求する為に行つた実験結果は第2表に示す如くである。即ち各菌株とも2~3の例外はあるが合成培地に於て継代培養した菌は環境不良の爲か対照に比して O₂ 消費量の減少を來し、酵素活性度の低下が窺はれる。以下各菌について詳述する。

Staph. aureus 及び albus に於てはすべての基質について合成培地継代菌は酸化能の低下を來し、

特に Staph. albus では半減した。

Sal. enteritidis では lactate, glutamate を基質とした場合に著明に O₂ 消費量が減少しているが他の基質では変化がなかつた。

Sal. typhi 57S, Sal. typhi 57 R, Sal. paratyphi A, Sal. paratyphi B, Sal. paratyphi C には何れの基質に於ても合成培地継代菌は Bouillon 培地發育菌に比して O₂ 消費量が低下を來しているが、ただ Sal. typhi 57 S に於ける glucose を基質とする場合、Sal. typhi 57 R に於て Lactate を基質とする場合に、同程度か、むしろ増加している結果が得られた。

Sal. typhi murium では特異的な結果が得られた。即ち合成培地継代菌が lactate, succinate, glutamate では減少しているに反して、glucose の酸化能は著明に増加を來している。

Sh. sonnei に於ても glucose, glutamate の酸化能が対照に比して亢進している。Sh. flexneri 2a に於ては glucose, lactate, succinate に対しては

第2表 各種基質に於ける細菌の酸素消費量
O₂ 消費量 μl

菌株	合成培地 継代菌				ブイヨン 培地継代菌			
	Glucose	Lactate	Succinate	Glutamate	Glucose	Lactate	Succinate	Glutamate
Staph. aureus	24	47	69	20	28	56	74	22
Staph. albus	11	12	24	18	21	27	65	22
Sal. enteritidis	120	118	40	32	119	209	45	59
Sal. typhi 57S	146	124	97	73	137	142	89	83
Sal. typhi 57R	87	92	72	73	92	84	61	68
Sal. paratyphi A	66	72	64	54	71	97	78	55
Sal. paratyphi B	89	34	19	21	142	70	26	27
Sal. Paratyphi C	124	86	24	21	180	120	30	35
Sal. typhi murium	119	76	42	49	70	118	50	64
Sh. sonnei	139	97	31	61	84	248	126	55
Sh. flex. 2a	47	66	44	64	75	162	101	28

菌量 湿菌量にて Staphylococcus 及び Shigella は 10mg/cup.
Sal. enteritidis. Sal. typhi 57S. 57R.
Sal. Paratyphi A は 6mg/cup.
Sal. paratyphi B. C. Sal. typhi murium は 3mg/cup.)
を 2cc 宛使用
基質：終濃度 10⁻² Mol の基質 0.3cc に生理食塩水を加え全量を 3c. c. とし P. H. 7.2 37.5°C 1hr.

合成培地継代菌は極度に活性度を失うのに反して glutamate に対する活性度は2倍以上の亢進を来たした。

総括及び考按

著者は教室保存の11株の細菌に就て窒素源に主眼をおいた液体合成培地を調整し、これ等に長期継代培養を行い発育量の増減を観察し、それ等に発育した菌の主要基質に対する酵素活性の変動を追求し、上記の成績を得た。

細菌の合成培地の研究に当つては3代継代を目標にして判定を行うのを常識とし、3代目発育可能ならば、以後は殆ど発育可能と考えられる。然しその後の発育の量的関係を観察する場合、液体合成培地に対する適応的な発育度の増加或は逆になんらかの要因による発育の低下等が考えられる。著者の行った10代継代観察では、Sal. enteritidis 及び Sal.

typhi munitum は 5, 6 代頃より発育度を増して居り、適応的な発育増強と考えられる。その他の菌に於ては、長期継代を行つてもかかる現象は認められず、栄養要求性に差異が存する為と考えられるが、その詳細は明かにし得なかつた。何れにしても実験成績に示した如く Staphylococcus を除いた他の菌では夫々の菌で化学的組成のはつきりした簡単な液体合成培地に継代可能で、しかもかなりの発育量がある為、発育菌を用いて細菌生理の研究を行い得ることが分つた。

緒言に述べた如く継代方法によつて酵素的性状の異なることは当教室に於ても牛田²⁾、戸部³⁾、田中⁴⁾等が報じているが、著者の実験に於て得られた菌に就ても一般酵素活性に変動が見出された。

Staphylococcus では発育が非常に悪く、従つて著者の行つた全基質に於て、活性度の低下が見られた。

Salmonella 属では継代培養には充分耐え得るが、殆どどの基質に対する酵素活性度は低下しており、酵素形成に要する栄養素もしくは発育素が充分でないと思われる。しかし Sal. typhi murium では glucose に対する活性度が著明に増加しているが、基礎培地中に glucose を含む為に適応的に活性度が増加していると考えられる。Shigella sonnei では glucose, glutamate に対して、Sh. flex 2a では glutamate に対して著明な活性度の増加が見られるからやはり合成培地中に glucose 又は glutamic acid が存在する為の適応的な酵素活性に依存すると思惟される。

結 論

著者は教室保存の11種の細菌に就て、アミノ窒素源に主眼をおいた液体合成培地に10代培養を行い発育量の変動を観察し、それ等の菌の酵素活性度の変化を追究した。

1. Staphylococcus 以外の菌は 2, 3 のアミノ酸を含む簡単な液体合成培地に10代継代培養が充分可能であり、しかも収量は可成多い為生理研究に使用し得る。Sal. enteritidis 及び Sal. typhi murium では継代を重ねるにつれて適応的に発育増加を認めた。

2. 液体合成培地継代発育菌に就て glucose, lactic acid, succinic acid, glutamic acid 4 基質に於ける酵素活性度を Wardurg 検圧計を用いて O₂ 消費の面より比較するに、一般に対照に比して活性度の低下を来たした。但し Sal. typhi 57S,

Sh. flex. 2a に於ける glucose に対する活性度及び、Sh. sonnei に於ける glucose, glutamic acid, に対する活性度は適応的に増強した結果が得られた。

稿を終るに当り終始御懇篤なる御教示を戴き、御校閱を賜つた恩師村上栄教授に心から深謝致します。

文 献

- 1) Stephenson, M. et. al. : Biochem. J., 31, 1311, 1937.
- 2) Waring, W.S. et. al. : Arch. Biochem., 4, 75, 1944.
- 3) 戸部 : 岡山医学会雑誌, 第70巻, 3565, 1958.
- 4) 田中他 : 第31回日本細菌学会発表
- 5) 仲西 : 岡山医学会雑誌, 第71巻, 73~79, 1959.
- 6) 仲西 : 岡山医学会雑誌, 第71巻, 81~88, 1959.
- 7) Umbreit, W.W. et. al. : Manometric Techniques and Tissue metabolism. 1949.
- 8) 牛田 : 岡山医学会雑誌, 69, 611, 1957.

Studies on the Synthetic Media or Culture of some Bacteria

Part III Study of the metabolism of the bacteria cultured by serial transfer on the synthetic fluid media

By

Hirota NAKANISHI

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. Sakae Murakami)

Using eleven species of bacteria described in the preceeding paper, the author observed the fluctuation of the growth of bacteria cultured by serial transfer through ten generations on the synthetic fluid media prepared carefully its amino nitrogen contents, and investigated the fluctuation of the enzyme activity of bacteria.

1) The all species of bacteria except Staphylococcus could be cultured succesfully through ten generations on the synthetic fluid media contained simply few species of amino acids. Moreover, the cellular amount yielded was fairly abundant, so it was suitable preparation for study of its metabolism. It was observed on *Sal. enteritidis* and *Sal. typhi murium* that the growth of bacteria increased with the progress of transfers.

2) In the light of O₂-uptake by Warburg's manometer, the author compared the enzyme activity to four substrates, i. e. glucose, lactic acid, succinic acid and glutamic acid, of the bacteria cultured in the synthetic fluid media by serial trasfers with that of the bacteria cultured normally. Generally, that activity of the former was reduced than that of the latter. But the activities of *Sal. typhi* 57 S and *Shigella flexineri* 2 a to glucose and that of *Shigella sonnei* to glucose and glutamic acid were risen.
