

K-培地に関する研究

ブドウ球菌および大腸菌の発育とその電子顕微鏡的観察

野村 治子・横田 芳武*・向仲 輝雄*

Studies of K-medium
Growth and Electron Microscopic Studies
of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

HARUKO NOMURA, YOSHITAKE YOKOTA* and TERUO MUKAINAKA*

K-medium is a new type of culture media developed by Katsuya in 1956.¹⁾

This inorganic medium is prepared from sodium silicates and phosphoric acid. The advantage of this medium is that it turns to a gelatinous form without heating.

In order to evaluate the applicability of K-medium for practical use, growth and ultra structure of *Staph. aureus* and *E. coli* grown on this medium were studied comparing with of those grown on Agar-medium.

The results obtained are as follows:

1) Number of colonies on K-medium of *Staph. aureus* and *E. coli* were significantly increased compared with those on Agar-medium.

2) Ultra structure of *Staph. aureus* and *E. coli* cultivated on both media were not differ much from one another.

The above results suggest that the K-medium may be useful for detecting contaminations of *Staph. aureus* and *E. coli* of foods.

緒 言

勝矢により開発されたK-培地 (Katsuya 1956¹⁾) は、固形培地の基剤である寒天のもつ加熱・溶解後一定温度まで冷却して使用するという欠点を解消し、加熱を要せず、常温で直ちにゼリー化し(ケイ酸ゲルの生成)、しかもほぼ中性・化学的に非活性で各種養分を添加しうる。そのうえゲルの生成速度のもっとも速いのは、いずれの温度においても中性領域 (Katsuya & Yamato 1956¹⁾) であり、一般細菌の発育至適 pH と一致するという利点や特徴をもっている。

このK-培地を用いて、さきに水中菌 (Katsuya & Yamato 1956¹⁾) や、*Bacillus Prodigiosus* (Yamato 1958²⁾) について、寒天培地との菌の発育状況が比較検討されており、著者 (Nomura 1973³⁾) もまた前報において、*Escherichia coli* について、飲食物用大腸菌検索培地である、デソキシコレート一培地と菌の発育状況をコロニー数で比較検討しているが、いずれも良

好な結果を得た。

本報においては、さらにK-培地の有用性を検討すべく、グラム (+) 球菌である、ブドウ球菌およびグラム (-) 桿菌である大腸菌について、寒天培地との発育状況をコロニー数で比較検討するとともに、とくに電子顕微鏡により、K-培地が細菌細胞におよぼす影響を形態学的に比較・観察したのでその結果について報告する。

1. K-培地

a. 組成

K-培地の組成は、ケイ酸を主成分とする Solution 1. およびリン酸を主成分とする Solution 2. より構成され、2液を混合することにより、ケイ酸ゲルを生成、これが寒天にかわる基剤である。それぞれに栄養素などが添加されている。(Katsuya & Yamato 1956¹⁾)

ここに本実験に用いた K-培地の組成を、対照の寒天培地 (栄研) の組成と比較する。(Table 1.), (Table 2.)

* 京都府立医科大学微生物学教室

Table 1. Composition of K-medium

Solution 1.	Na_2SiO_3	8.0 %
	Yeast Extract	0.25
	Pepton	0.5
	Gulucose	1.5
Solution 2.	H_3PO_4	4.0
	Arabian Gum	1.0

The pH of K-medium is adjusted to 7.1+0.2 adding Solution 2. in to 10 ml of Solution 1.

Table 2. Composition of Agar-medium

Agar	1.5 %
Yeast Extract	0.25
Pepton	0.5
Gulucose	1.5
pH 7.1+0.2	

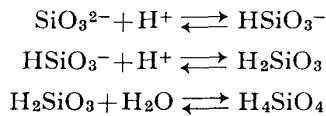
Manufacture: EIKEN CHEMICAL CO., LTD.

b. K-培地におけるケイ酸ゲル生成の機序

Solution 1. の主成分である Na_2SiO_3 は一般に水ガラスと呼ばれ、強酸・弱アルカリからなる塩であるために、稀薄な溶液は加水分解して、ケイ酸はそれより強い酸によって容易に遊離される。そこで、この Na_2SiO_3 よりケイ酸を遊離する役割を果す酸として、リン酸を使用したのが Solution 2. であると考えたとき、ケイ酸ゲル生成の機序は一応次のように説明できよう。

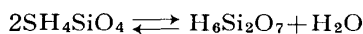
すなわち

Na_2SiO_3 は水溶液中では Na^+ イオンと SiO_3^{2-} イオンに解離し、ケイ酸イオンは水溶液中では次式で示されるごとく、平衡を保っているものと思われる。



これにリン酸を加えることにより、上式の平衡は右方向に進み、 H_4SiO_4 の遊離過剰がおこるため、これが次々と重合して、ケイ酸ゲルを形成するものと推察する。

重合に対して、化学式を与えることは疑わしいものの (Mayer 1972⁴⁾) の重合の第1段階は



で示される。

この $\text{H}_6\text{Si}_2\text{O}_7$ の結合は、 $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ のシロキサン結合により、(Fig. 1.)

(A)のごとき鎖状の構造や(B)のように環状の3量体の化合物を作るものと考えられ、これらが3次元的に乱雑に結合することにより、 SiO_4 における4面体

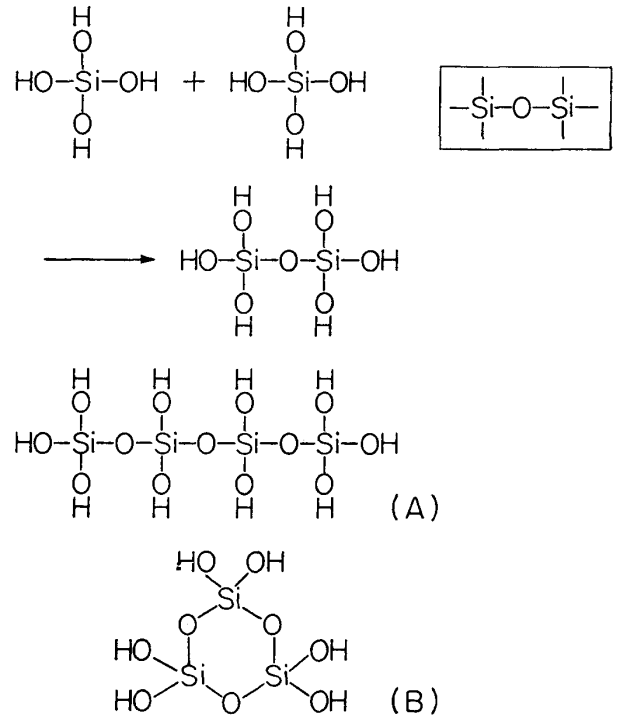


Fig. 1. Gel-formation of K-medium.

の頂点の酸素の原子が、隣接4面体に共有され、架橋を形成、ゲルを作るものと思われる。

このようにしてできたゲルは、寒天と異なり不可逆的である。

2. 実験方法

a. 使用菌株

Staphylococcus aureus 209-P および T-5 の2株と、

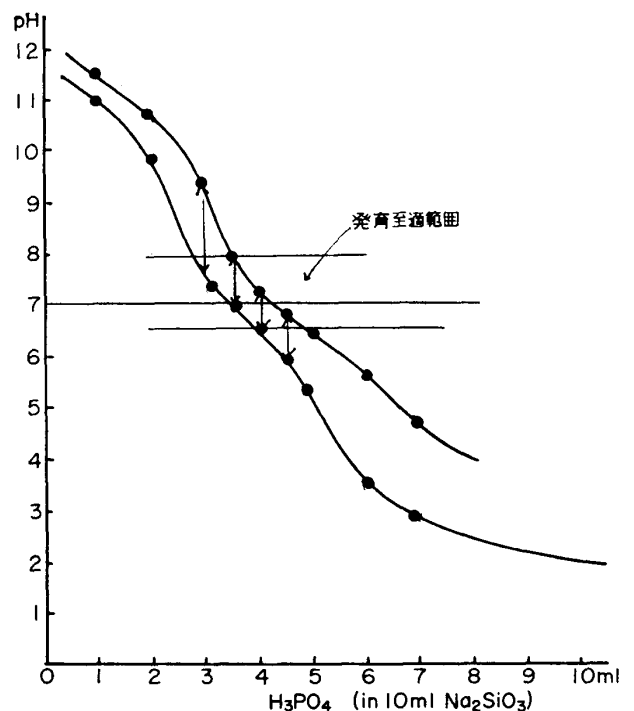


Fig. 2. Relationship between pH and concentration of H_3PO_4 .

Escherichia coli NIHJ の1株を使用した。

b. 菌の培養

1) K-培地における各菌株の発育至適 pH の検討と調製

Solution 1. 10 ml に対する Solution 2. の液量と pH の関係を検討した結果を Fig. 2. に示す。

Solution 1. 作製時の誤差の pH に与える影響は、2点の中 (◇) のうちにおさまる。

Fig. 2 にもとづき、pH の異なる K-培地をつくり、それぞれに各菌を培養し、発育至適 pH を検討したところ、いずれも pH 7 前後においてもっともよく発育した。

ゆえに、対照寒天培地と同様 (Table 2.), pH を 7.1 ± 0.2 になるように K-培地を調製した。

2) 培養方法

各菌株の斜面寒天培地18時間培養菌株の、1白金耳を生理的食塩水 10 ml に遊遊させ、これを原液として、さらに生理的食塩水で、10⁻⁵、10⁻⁶まで10倍希釈法により希釈し、その希釈菌液 1 ml を K-培地と寒天培地に注入、混釈後37°C 24時間培養、両培地に発育したコロニー数を比較した。

c. 電子顕微鏡試料の作成とその方法

両培地に発育した24時間混釈培養後のコロニーを生理的食塩水で、suspension 後集菌、さらに遠沈(3,000回転, 15') 沈渣を pellet 状にあつめ、寒天でサンドウィッチにした試料を、s-Collidine 緩衝 1% O₂O₄ (Bennt & Luft 1959⁹⁾) で24時間固定、次に酢酸ウラニールで染色、後エチルアルコール系で脱水した。包埋は、Epon 812 を主剤とする Luft (1961¹⁰⁾) の方法に準じて行った。

超薄切片は、Porter-Blum 型ミクロトーム (MT-1) により作成し、日立 UII-A 型電子顕微鏡を用いて、加速電圧 75 kV で観察・撮影した。

3. 結果

a. コロニー数の比較

1) ブドウ球菌

ブドウ球菌の K-培地、寒天培地に発育したコロニー数および、その差に対して T-検定を行った結果を Table 3. に、コロニーの発育状況を Photo 1-a., 1-b. (209-P), Photo 2-a., 2-b. (T-5) に示した。

T-検定の結果は、危険率 5% の有意差で、K-培地は寒天培地より良好な発育をした。

2) 大腸菌

大腸菌の K-培地、寒天培地に発育したコロニー数および、その差に対して T-検定を行った結果を Table 4. にコロニー数の発育状況を Photo 3-a., 3-b. に示した。

Table 3. Growth of *S. aureus*, 209-P and T-5 Cultivated on K-medium and Agar-medium.

	Number of 209-P			Number of T-5			
	K	A	D	K	A	D	
1	8	9	-1	1	600	434	166
2	5	6	-1	2	78	160	-82
3	60	72	-12	3	135	145	-10
4	155	118	37	4	32	32	0
5	166	212	-46	5	33	20	13
6	93	141	-48	6	263	250	13
7	327	285	42	7	320	281	39
8	71	55	16	8	500	365	135
9	216	232	-16	9	368	295	73
10	250	83	167	10	400	300	100
11	108	106	2	11	3	3	0
12	124	141	-17	12	27	28	-1
13	30	20	10	13	285	316	-31
14	39	19	20	14	179	131	48
15	66	82	-16	15	5	22	-17
16	44	15	29	16	1	4	-3
17	1	1	0	17	5	6	-1
18	55	137	-82	18	30	20	10
19	210	201	9	19	32	19	13
20	91	119	-28	20	4	3	1
21	45	27	18	21	1	1	0
22	130	120	10	22	54	55	-1
23	200	210	-10	23	208	190	18
24	346	199	147	24	37	37	0
25	266	386	-120	25	40	30	10
26	64	50	14	26	73	72	1
27	182	163	19	27	73	72	1
28	8	9	-1	28	70	72	-2
29	66	64	2	29	14	8	6
30	32	22	10	30	3	2	1
31	49	9	40	31	190	190	0
32	195	200	-5	32	40	40	0
33	50	41	9	33	60	58	2
34	178	111	67	34	34	72	-38
35	121	125	-4	35	320	280	40
36	149	200	-51	36	294	296	-2
Total	4200	3990	210	Total	4811	4309	502
	(P < 0.05)				(P < 0.05)		

T-検定の結果は、危険率 1% の有意差で、K-培地は寒天培地より良好な発育をした。

b. 電子顕微鏡像の比較

1) ブドウ球菌

K-培地、寒天培地に培養したブドウ球菌の超薄切

Table 4. Growth of *E. coli* Cultivated on K-medium and Agar-medium.

	Number of <i>E. coli</i>			Number of <i>E. coli</i>			
	K	A	D	K	A	D	
1	63	56	7	28	90	75	15
2	68	43	25	29	80	85	-5
3	70	60	10	30	60	10	50
4	45	31	14	31	600	300	300
5	54	31	23	32	205	163	42
6	192	118	74	33	1600	1600	0
7	185	111	74	34	220	240	-20
8	183	113	70	35	240	78	162
9	140	131	9	36	43	27	16
10	150	120	30	37	1000	800	200
11	70	140	-70	38	240	360	-120
12	600	420	180	39	267	113	154
13	180	110	70	40	145	222	-77
14	210	190	20	41	265	270	-5
15	215	144	71	42	194	53	141
16	218	178	40	43	270	271	-1
17	250	113	137	44	150	49	101
18	195	115	80	45	219	176	43
19	18	4	14	46	237	153	84
20	31	4	27	47	36	20	16
21	6	5	1	48	44	28	16
22	5	9	-4	49	3	3	0
23	3	7	-4	50	4	3	1
24	252	152	100	51	500	420	80
25	260	177	83	52	270	215	55
26	190	130	60	53	270	360	-90
27	185	110	75	Total	11290	8916	2374

(P < 0.01)

片像を, Photo 4-a₁, 4-a₂, 4-b₁, 4-b₂. (209-P), Photo 5-a., 5-b. (T-5) に示した.

K-培地に発育した 209-P 株の (4-a₁)細胞壁(W)は, 寒天培地のそれ (4-b₁, 4-b₂) に比し, やや肥大して観察されたが, T-5 株においては, 両培地に発育したコロニーの超薄切片像に差はみられなかった.

また, 細胞分裂の際の隔壁 (X, Y), (4-a₁) もまた, 同様のことがいえよう. 形質膜(M)はいずれも電子密度の異なる 3 層の単位膜や, 最内膜の色彩の単なる鋸状の形態もみられ, (Suganuma 1961⁷⁾, 1962⁸⁾, 1963⁹⁾, 1964¹⁰⁾, メソゾーム(Me)も両培地におけるコロニーの超薄切片像 (4-a₁, 4-a₂, 4-b₁, 4-b₂), (5-a., 5-b.) に差はみられなかった. すなわち, 形質膜(M)に連続した cytoplasmic type (Suganuma 1963⁹⁾) や, caveolar type (Suganuma 1961⁷⁾~1964¹⁰⁾) のもの, あるいは核 (N)

と密接している nuclear type (Suganuma 1963⁹⁾) のものや, 細胞質 (C) に独立して存在しているもの (discrete bodies) も観察された. 核(N)は, 比較的電子密度の低い透明な部分として観察され, いずれもデリケートな繊維がみられた. また, 細胞質中にみられる顆粒(r)は, リボゾームではなかろうかと推察された.

以上のごとく, ブドウ球菌において, 一部の菌種 (209-P 株) に細胞壁 (W) や, 隔壁 (X, Y) の肥大をみた他には, 両培地に発育したコロニーの超薄切片像には, ほとんど差はみられなかった.

2) 大腸菌

K-培地, 寒天培地に培養した大腸菌の超薄切片像を Photo 6-a₁, 6-a₂, 6-a₃, 6-a₄, 6-a₅. および, Photo 6-b₁, 6-b₂, 6-b₃. に示した.

細胞壁(W)は, グラム陰性菌特有の, グラム陽性菌よりも薄い層 (Kellenberger 1958¹¹⁾) として観察され, K-培地, 寒天培地間に発育したコロニーの超薄切片像に差はみられなかった. ただし, 強いて指摘すれば, K-培地 (6-a₃) において, 細胞壁の外層に突起様のものが観察され, これがいわゆる bleb (Koike 1967¹²⁾, Hara 1971¹³⁾) であるかどうかは不明である. 形質膜 (M) (Ogura 1962¹⁴⁾) もそれぞれ同様の形態をなしていたが, Schnaitmans (1966¹⁵⁾) が大腸菌の 1 株より観察した, 細胞質内膜構造の存在は, いずれも不明であった. また, 核(N)はいずれも, コイリングを繰返した繊維によって充たされ, おそらく DNA 繊維であろうと推察された. 細胞質内には, 多くの顆粒(r)が観察された.

4. 考 察

水質・食品などの細菌学的検査は, 現場において直ちに培地に試料を接種し, コロニー数を算定することにより汚染の目やすとなることが一番望ましい. しかし一般に試料を現場より低温・無菌的に保存しつつ試験室に運んでいるのが実情で, ときに試料の変質, 菌数の変化, あるいは目標菌の消滅などをきたし, 適切な判断を得ることができない等の欠点がある. そこで, 迅速・簡易に随時に菌を接種し, コロニー数を算定できる現場用培地として, K-培地は考案されたのであった. 本実験において, 実際に毒素型グラム (+) 球菌であるブドウ球菌および, 感染型グラム (-) 桿菌である大腸菌を用い, これを既存の寒天培地を対照に比較培養したところ, コロニー数はむしろ, 寒天均地よりも多く, K-培地の方が良好な結果を示した.

そこで, さらに培養されたコロニーについて, 超薄切片をつくり, K-培地の細菌細胞の形態におよぼす

影響を寒天培地のそれとを比較しつつ、電子顕微鏡により超微細構造を観察したのであるが、ブドウ球菌209-P株の細胞壁の肥大および、大腸菌の Photo 6-a₃ にみられる細胞壁の突起様のものが観察された以外は、両培地に発育したコロニーの超薄切片像には、ほとんど差がみられなかった。

また、ブドウ球菌209-P株における細胞壁肥大の現象は、おそらくK-培地は単純な無機ケイ酸ゲルのみによる合成培地であるに比し、寒天培地はガラクトースを主成分とする有機ゲルであることに由来するものと推察され、したがって、209-P株の細胞壁成分に対し、K-培地の微量成分が何らかの影響をおよぼしたとするならば、今後さらに検討すべきであろう。

概して、コロニーの電顕像にも両培地の影響はみられず、K-培地は、ブドウ球菌および大腸菌に対しても有用な培地と思われる。

結 言

ブドウ球菌(209-P株, T-5株)および、大腸菌(NIHJ株)をK-培地に対して寒天培地を対照に培養、コロニーの発育および、それらの細菌細胞の超微細構造を比較観察した結果

1) コロニー数

- a. ブドウ球菌はT-検定の結果、危険率5%の有意差で寒天培地より良好な発育を示した。
- b. 大腸菌はT-検定の結果、危険率1%の有意差で寒天培地より良好な発育を示した。

2) 超微細構造

- a. ブドウ球菌209-P株の細胞壁、隔壁の肥大が観察された以外は、細菌細胞の基本構造(除、夾膜) Appleton (1964¹⁶⁾)には、K-培地、寒天培地に培養された細菌の超微細構造に大差は認められなかった。
- b. 大腸菌においても、K-培地、寒天培地に培養された細菌の超微細構造に差は認められなかった。

したがって、K-培地は、ブドウ球菌および大腸菌に対しても有用な培地であると結論する。

終わりに臨み、御校閲・直接の御指導を頂いた京都府立医科大学微生物学教室、菅沼 惇教授に深甚な謝意を表します。

また、本研究についてお励まし頂いた勝矢俊一先生に敬意を表するとともに、研究のための機会と御助言をお与え頂いた尾崎良嗣教授、水谷民雄助教授ならびに、京都府立医科大学微生物学教室員、同電子顕微鏡

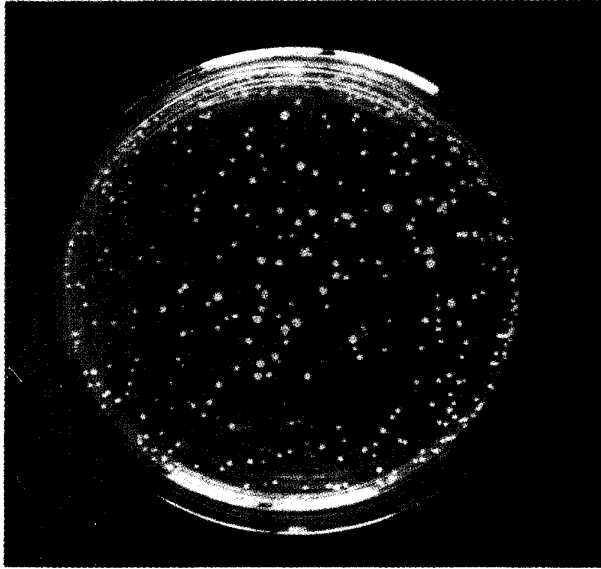
室森岡宏行講師に感謝します。

なお、本大学農学部電子顕微鏡室の使用についての御配慮もあわせて謝します。

(1975年7月31日受理)

文 献

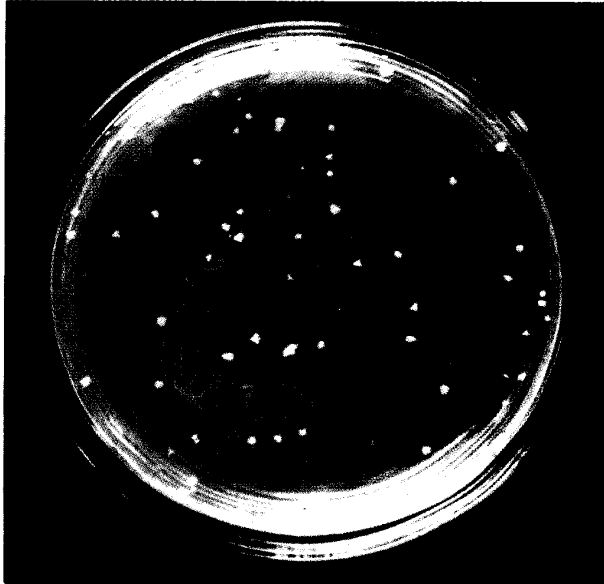
- 1) 勝矢俊一・大和平易(1956): K-培地に関する報告(1). 一西京大学学術報告, **2**, C-65~73.
- 2) 大和平易(1958): 霊菌のK-培地における培養について. 一西京大学学術報告, **2**, C-225~227.
- 3) NOMURA, H. (1973): Study of K-medium. 一京都府立大学学術報告, **24**, Ser. B-11~15.
- 4) MAYER, H. (奥田進訳)(1972): Das Wasserglas, 第8版. 59. コロナ社, 東京都.
- 5) BENNETT, H. S. & LUFT, J. H. (1959): s-Collidine as a Basis for Buffering Fixatives. 一J. Biophys. Biochem. Cytol. **6**, 113.
- 6) LUFT, J. H. (1961): Improvements in epoxy resin embedding methods. 一J. Biophys. Biochem. Cytol. **9**, 409~414.
- 7) SUGANUMA, A. (1961): The Plasma Membrane of *Staphylococcus aureus*. 一J. Biophys. Biochem. Cytol. **10**, 292~298.
- 8) SUGANUMA, A. (1962): Some Observations on the Fine Structure of *Staphylococcus aureus*. 一J. Inf. Disease. **111**, 8~16.
- 9) SUGANUMA, A. (1963): Some features of membranous Structures in *Staphylococcus aureus*. 一J. Inf. Disease. **113**, 179~185.
- 10) SUGANUMA, A. (1964): The Plasma Membrane of *Staphylococcus aureus* Treated with HCl Solutions. 一J. Cell Biol. **21**, 290~293.
- 11) KELLENBERGER, E. & RYTER, A. (1958): Cell Wall and Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. 一J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 323~326.
- 12) 小池聖淳・飯田恭子・松尾達也(1967): 第40回日本細菌学会総会.
- 13) 原 一仁(1971): ポリミキシンEの作用機序に関する研究. 一京都府立医大学雑誌, **80**, 6, 311~322.
- 14) OGURA, M. (1963): High Resolution Electron Microscopy on the Surface Structure of *Escherichia coli*. 一J. Ultrastruct. Res. **8**, 251~263.
- 15) SCHNAITMAN, C. & GREENWALT, J. W. (1966): Intracytoplasmic Membranes in *Escherichia coli*. 一J. Bacteriol. **92**, 780~783.
- 16) APPLETON-CENTURY-CROFTS, Ed (1964): Zinsser Microbiology, 13th ed. 49. New York.



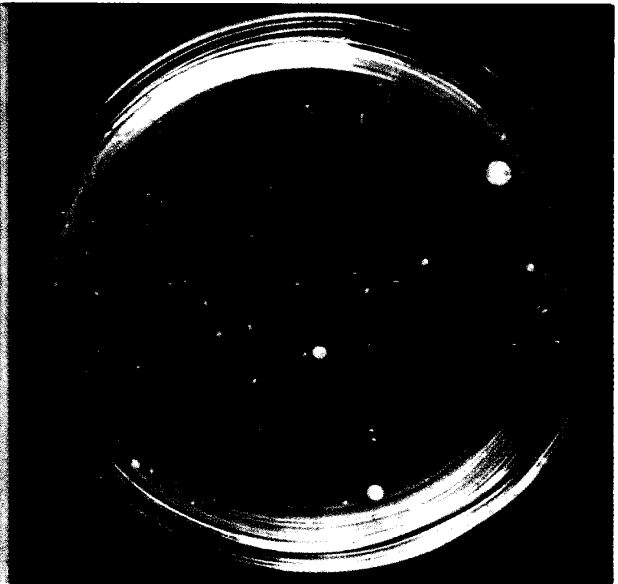
1-a.



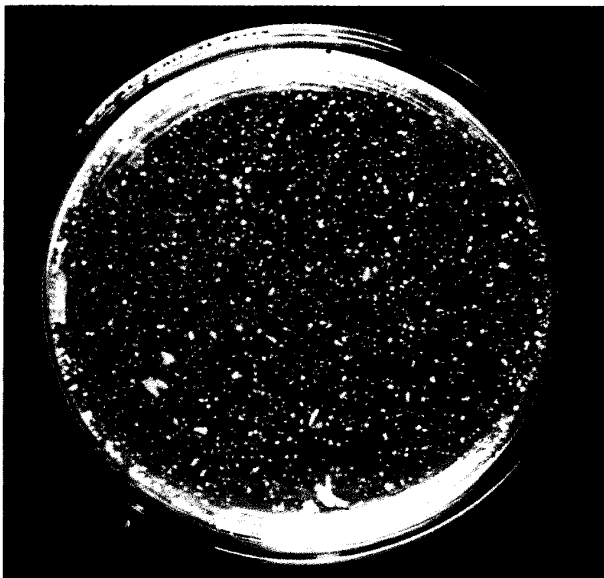
1-b.



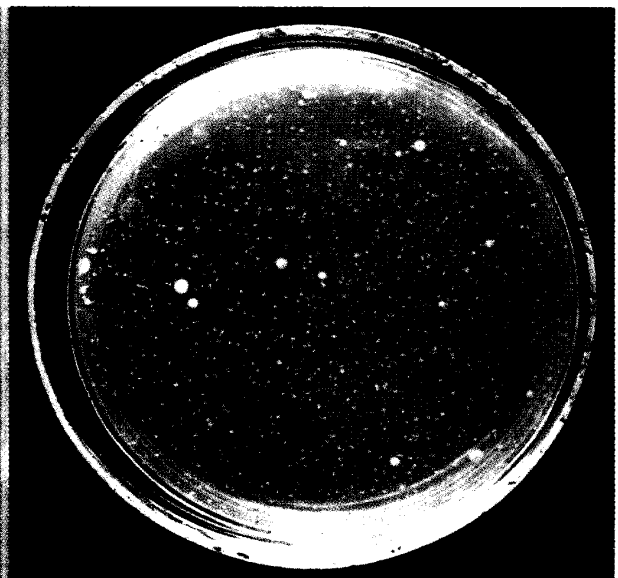
2-a.



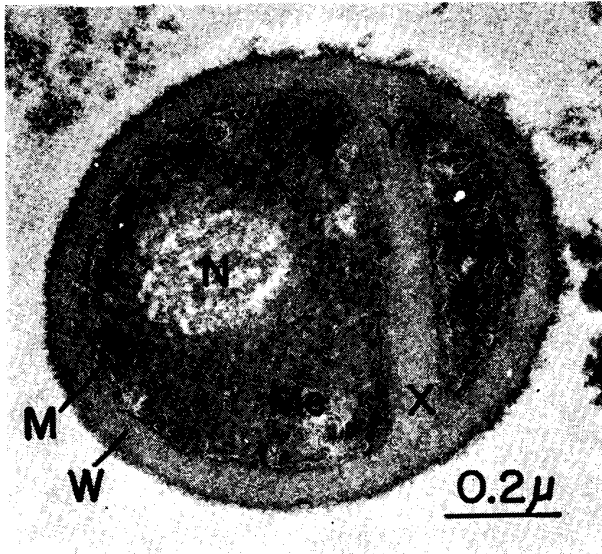
2-b.



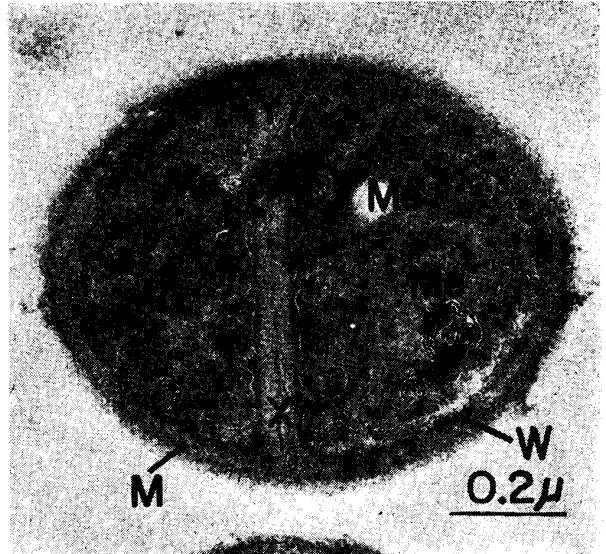
3-a.



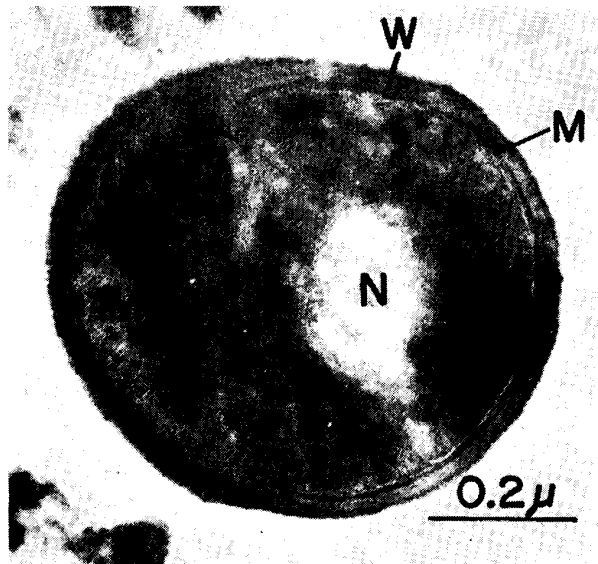
3-b.



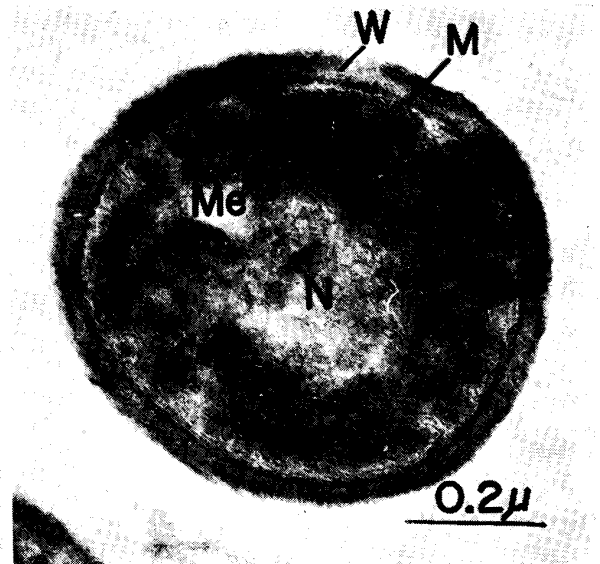
4-a₁.



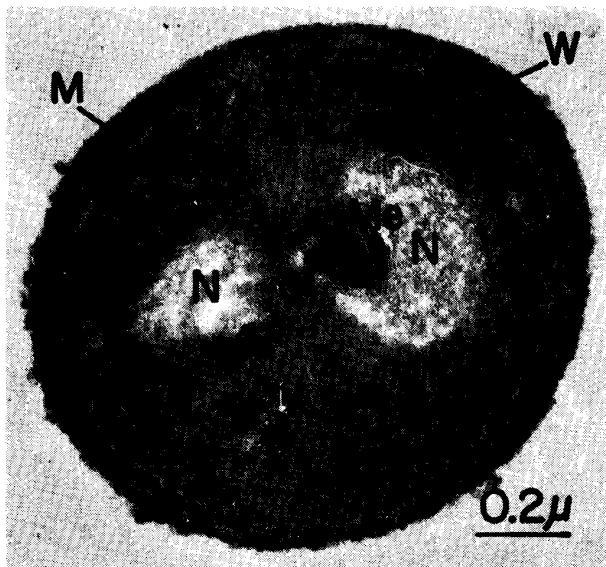
4-a₂.



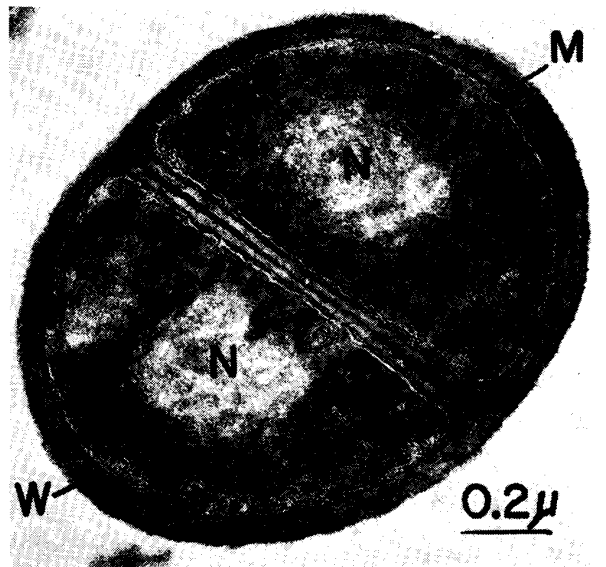
4-b₁.



4-b₂.



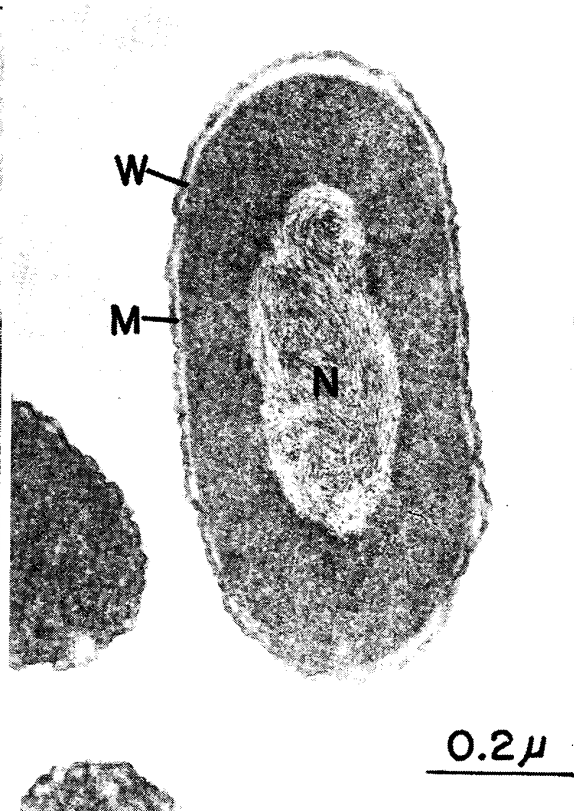
5-a.



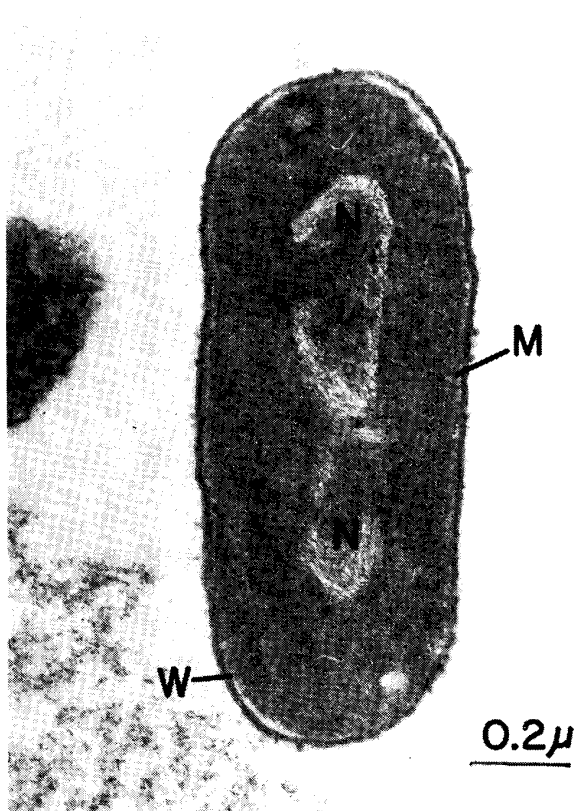
5-b.



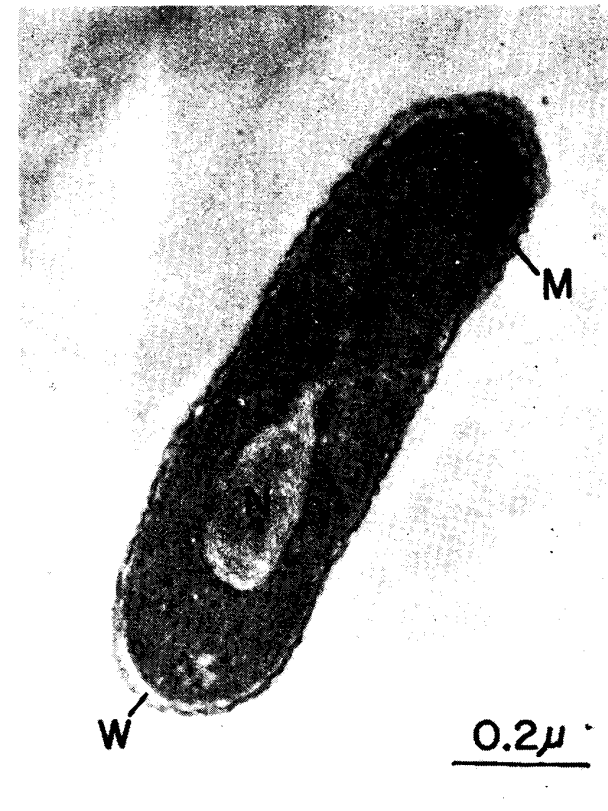
6-a1.



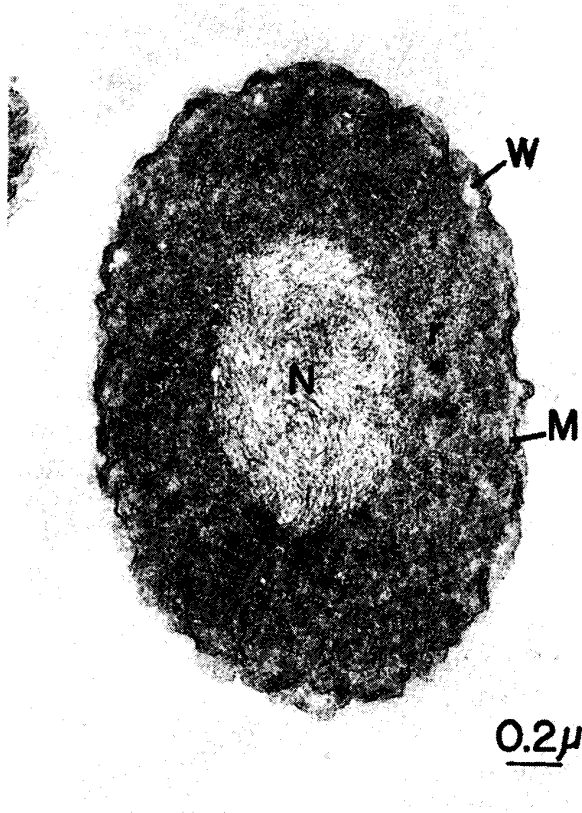
6-a2.



6-a3.



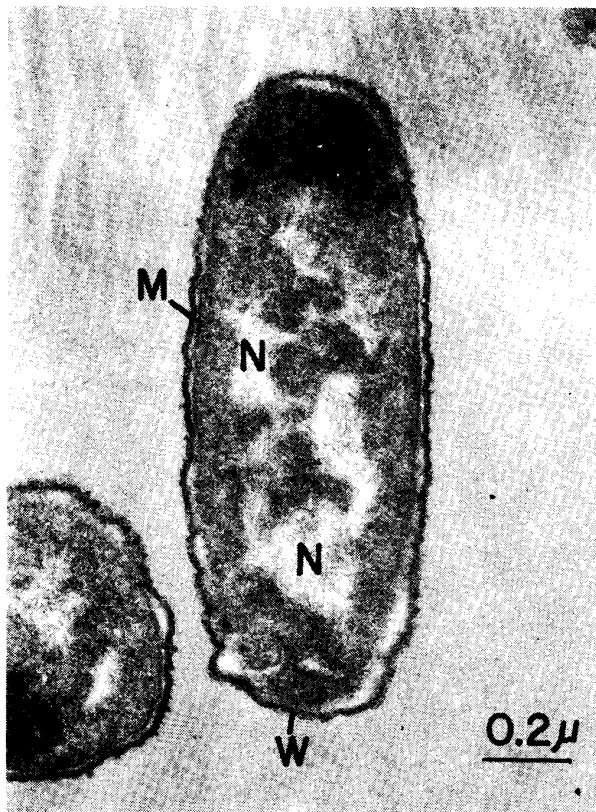
6-a4.



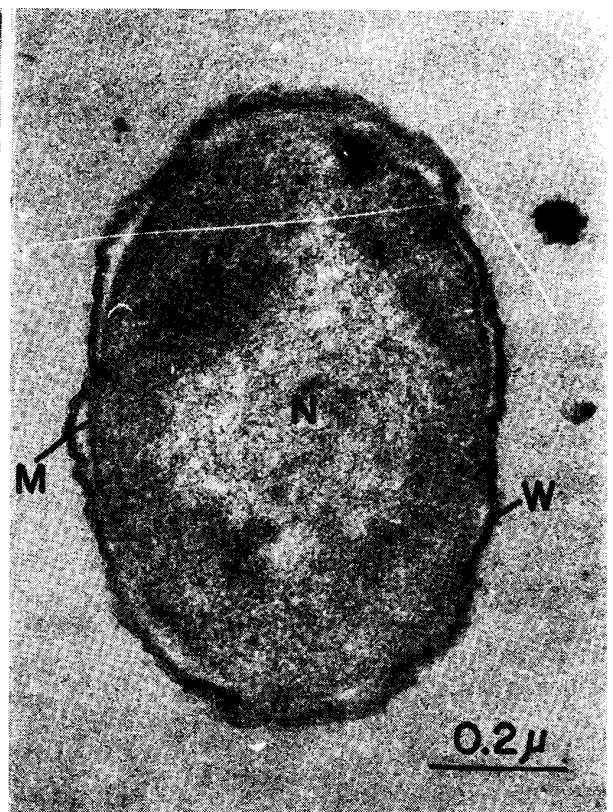
6-a5.



6-b1.



6-b2.



6-b3.