

死菌体を栄養源とする細菌の生育に関する研究

著者	仁王 以智夫
号	58
発行年	1968
URL	http://hdl.handle.net/10097/12439

氏 名 (本籍) 仁 王 以 智 夫 (千葉県)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 博 第 5 8 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 4 4 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 農 学 研 究 科
(博 士 課 程) 農 芸 化 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 死 菌 体 を 栄 養 源 と す る 細 菌 の 生 育 に
関 す る 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査)
教 授 古 坂 澄 石 教 授 高 橋 甫
教 授 志 村 憲 助

論文内容要旨

I. 緒言

自然界には多数の細菌が棲息していて、環境の変化とともにその数は変動している。例えば土壌は一般には細菌にとって栄養分が欠乏状態にあると考えられており、そのために、易分解性の有機物が投与されると一群の細菌が急速に増加するのが観察される。これらの細菌群は、基質が消費し尽されるとともにその数を減じて行き、細菌菌体が土壌中に蓄積する。

土壌有機物の大部分は生物学的には比較的安定で、代謝を受けにくいと考えられているが、その他に比較的少部分ではあるが定常的に変動している物質群があり、そのような物質としての微生物菌体の役割りは重要であると考えられる。生成し、蓄積した細菌菌体の成分が生き残っている細菌にとって栄養源としてどのように利用されて行くかを解明することは、自然界の物質変動における短期間の反応を明らかにする上で重要な意味を持つていると考えられる。

従来、栄養源としての細菌菌体に関する研究はほとんどおこなわれていない。そこで本研究においてはこの問題をまず細菌生理の観点よりとりあげ、死菌体浮遊液中における細菌の生育とその制限因子の検討をおこなった。ついでその制限因子の解明を、生育にもなり死菌体成分の変化との関連で試みた。そして最後に細菌死菌体を栄養源とする細菌の生育を、菌数、重量 (biomass) 及び熱のそれぞれを基礎とする効率という面より検討した。

II. 熱処理菌体浮遊液中における細菌の生育

死菌体の調製には最も確実な方法として熱処理を選んだ。熱処理条件を検討した結果、100℃、10分の加熱が最も適当と思われたので、以下の実験はすべてこの条件に従った。またこの実験ではほとんどの場合、調製した熱処理菌体と同一株の細菌の生育を扱った。

熱処理菌体浮遊液中における細菌の生育がどのようなものであるかを検討するため、

*Escherichia coli*の熱処理菌体浮遊液を調製し、その中における*E. coli*の生育を生菌数を指標として追跡した。接種後約2時間のlagのちに細菌は指数関数的に増加した。生育速度はあたえる熱処理菌数を増すとより大きな値を示し、 $2.5 \times 10^{10}/ml$ で最大値1.73であつた。この値はカゼイン水解物を炭素、窒素源とする合成培地中の生育速度に近い値であつた。到達した最大菌数(収量)はあたえた熱処理菌数と広い範囲にわたつて比例関係にあり、その比(収率)は、10%であつた(表1)。この結果は、Monodが合成培地中で生育する細菌について得た基質濃度と細菌収量との関係に対比されるものである。

上記の結果より、*E. coli*においては1個の細菌細胞を生成するのに100個の熱処理菌体が必要と考えられる。他の種の細菌では収率がどのような値をとるかを知らるために、9種の細菌を用いておのおの熱処理菌体浮遊液中における生育を追跡した。*E. coli*の場合と同様にしてあたえた熱処理菌数と収量より収率を求めると表2のようになった。*Arthro bacter simplex*及び*Pseudomonas aeruginosa*について得られた値、7内至8%は最も高い方の値であり、1個の細胞を生成するのに13~14個の熱処理菌体が必要とすることを示している。一方、低い収率をあたえる細菌群では300内至2000個が必要であつた。*Achromo bacter liquefaciens*は熱処理菌体浮遊液中で全く生育しなかつた。

このように多様な、かつ低い収率をあたえる制限因子を明らかにするため、まず栄養物質の量が収率を制限しているかどうかを検討した。数種の炭素、窒素化合物、あるいは無機塩類をそれぞれ単独に熱処理菌体浮遊液に添加して細菌を培養し、収量の増加の有無を検討した。実験に用いたほとんどの細菌の収量は NH_4Cl あるいはsodium glutamateを添加することによつて増加した。特に*Ach. liquefaciens*の場合、熱処理菌体浮遊液中では全く生育しなかつたのに NH_4Cl を添加することによつて収率は1.6%に迄増加した。*glucose*はほとんどすべての細菌において収量に影響をあたえなかつた。また、いくつかの細菌においては無機塩類のみの添加によつて著しい菌数増大が認められた中でも顕著なのは*Ar. simplex*の場合で、その収率は170%にも達した。この場合、生成細胞は栄養源としてあたえた細胞に比べ、かなり小さかつた。

これらの結果、熱処理菌体を人工培地中の各栄養物質と同様の考え方で扱うことが出来、一般に熱処理菌体浮遊液中における細菌の収率を制限しているのはその細菌に必要な栄養物質の量、特に窒素源と無機塩であることが明らかにされた。

Ⅲ. 熱処理菌体浮遊液中における *Arthrobacter simplex* の 生育と無機塩類の効果

熱処理菌体の成分を利用した細菌の生育には、熱処理菌体のどのような部分が生育に関与しているであろうか。次の点において特徴的であるという理由で *Arthrobacter simplex* をえらび、その生育、ことに収率に関係している要因を明らかにしようとした。i) 検討した細菌の中で収率の最も高い群の細菌である。ii) 無機塩類によつて収率が著しく増加する。

無機塩類の中で収率を増加させるのに有効な成分を検索した結果、用いたすべての塩は添加効果を示す群と生育を抑制する群とに大別された。促進効果を示すものはアルカリ族及びアルカリ土族に属する Na^+ , K^+ , Li^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Sr^{++} , Ba^{++} の塩化物及び NH_4Cl であつた。阻害するものは Mn^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} , Co^{++} , Al^{+++} , Fe^{+++} の塩化物であつた。促進効果を示す塩類で最適濃度を比較すると1価陽イオンの塩の最適濃度は2価イオンのその約5倍であり、塩類の添加効果はその種類よりもむしろイオン強度に関係していると考えられる。

この効果が熱処理菌体のどのような部分を利用することによつて生じるのかを検討するため、熱処理菌体浮遊液を遠心上澄区分と不溶性区分とに分画し、遠心前の浮遊液中及びその遠心上澄区分中における生育を比較した。その結果、塩類を添加しない培養では熱処理菌体の可溶化された区分のみが生育に関与するのに対し、塩類を添加すると不溶区分も生育に関与するようになることが確かめられた。これは電子顕微鏡による培養の観察結果と一致していた。熱処理菌体浮遊液に CaCl_2 や NaCl などの塩類を添加して培養すると、培養の遠心上澄に蛋白分解酵素活性があらわれた。この上澄は熱処理菌体浮遊液の濃度を減少させ、また TCA で沈殿しない Folin 呈色物質を熱処理菌体から遊離させる作用を示した。これらの結果から、塩類の添加効果は熱処理菌体の不溶区分に作用する蛋白分解酵素の生成あるいは安定化と関係していると考えられた。

Ar. simplex の収率が培地のイオン強度によつて変化するために、収率はあたえた熱処理菌濃度によつて変化することが期待される。そこで種々の濃度の熱処理菌体浮遊液を調製し、その中で細菌を生育させてその収量から収率を検討した。その結果を熱処理菌濃度に対してプロットしてみると図1のようになる。熱処理菌濃度が $5.0 \times 10^9 / \text{ml}$ 以下では収率は上澄液中の収率とほとんど

ど等しく、この濃度範囲で細菌の生育は熱抽出される成分のみの利用によつておこることを示している。これより高い濃度において収率は著しく高まり、 $5.0 \times 10^{10}/ml$ の熱処理菌濃度においては70%に到達した。この結果は *E. coli* の場合(表1)と比べて対照的であり、上記の塩類効果によるものと思われる。

IV. 熱処理菌体を栄養源とする細菌の生育の基質、及び生育した細菌細胞の成分

これ迄に述べて来た細菌の生育が、熱処理菌体のどのような成分を基質としておこっているのかを検討した。その検討のためには熱処理菌体とその成分を利用して生育した細菌細胞を分離する必要がある。*E. coli* については、熱処理菌体浮遊液の遠心上澄区分のみが生育に関与することが確かめられたので、この区分を生育の基質として用いた。*Ar. simplex* の場合、熱処理菌体浮遊液の遠心上澄区分のみが生育に関与する場合と不溶区分も関与する場合とを区別して検討した。前者については *E. coli* と同様、上澄区分を用い、後者については熱処理菌体を音波処理し低速の遠心で未破壊の細胞を除去した上澄に塩類を添加したものを基質とした。

熱処理菌体浮遊液の遠心上澄区分中で培養した場合、基質となる成分は両細菌とも同様で、主として遊離アミノ酸と冷酸可溶のRNAであつた。一方、*Ar. simplex* が $CaCl_2$ の存在下に、音波処理した菌体成分を利用して生育する際には、測定したすべての成分、すなわちDNAの92%、RNAの87%、蛋白の93%、炭水化物の15%、アミノ酸の73%が培地中から減少した。この傾向は塩類無添加、あるいは NH_4Cl 添加の培養においても観察されたが、減少は $CaCl_2$ の場合ほど顕著ではなかつた。

細菌細胞の成分は培地組成や生育速度によつて変化することが知られている。そこで菌体成分を利用して生育した細菌の成分を知るために *Ar. simplex* を、音波処理して破壊した細胞の上澄液中で $CaCl_2$ の存在下に培養し、生成した細菌のDNA、RNA、蛋白含量の分析を種々の生育段階においておこなつた。そして分析値を肉エキス培地中で生育した細菌の値と比較した。その結果、熱処理菌体成分を利用して生育した細菌は生育期間を通じて単位重量当りのDNA含量が著しく高い一方、RNA含量は低いこと、蛋白含量は両者で変化しないことが示された(表3)。

V. 生 育 効 率

熱処理菌体成分を利用して細菌が生育する時の基質となる物質を知り、同時に供給された熱処理菌体成分と生成した細菌細胞との重量バランスを求めることにより、重量あるいは熱を基礎とする効率が求められる。細菌は *E. coli* と *Ar. simplex* を用いた。N.において述べたのと同様に、*E. coli* については熱抽出区分を生育培地として用い、*Ar. simplex* については熱抽出区分及び音波処理菌体の上澄液を生育培地とした。重量バランスを求めた実験においては数段階の濃度の培地を調製して、細菌の収率が一定となることを確かめて重量効率を求めた。また、文献値より菌体及び熱抽出区分と音波処理菌体上澄液中に含まれる熱量を求め、これより熱効率を算出した。これらの結果は表4に示されている。

E. coli においては菌数による効率と重量による効率とはよく一致していた。また、重量による効率を灰分を除いた値で計算するとこれは熱量を基礎とする効率とよく一致した。熱抽出区分中で生育した *Ar. simplex* においては、重量による効率は菌数による効率の約50%にすぎなかつた。これに対し、重量による効率と熱量による効率は *E. coli* と同様、灰分を除いた値で計算するとよく一致していた。この傾向は音波処理菌体を利用する生育の場合でも同様であつたが、生菌数による効率が100%程度であるのに対し、熱量による効率は34~36%で、両者の差は顕著であつた。これは生育(質量増加)と細胞分裂が独立した現象であることと関係すると考えられる。

合成培地中で生育する細菌について報告されている効率(あたえた基質量に対する生成菌体量の比)は、Luriaによれば、最も良い条件において *Brucella* で17~33%、*Serratia* で40%であり、*Ar. simplex* で得られた値はほぼこれに匹敵する値であつた。

VI. 要 約

熱処理菌体を栄養源とする細菌の生育を検討した。その結果、細菌の生育は熱処理菌体浮遊液に含まれる栄養物質の量によつて定められることが認められた。

収率は細菌によつて様々な値をとる。*Escherichia coli* では熱処理菌の濃度の広い範囲にわたつて一定であつた。一方、熱処理菌のある濃度以上で生育基質の質的变化がおこるために収率の変化する細菌もあつた。*Arthro bacter simplex* はその例である。

熱処理菌体を栄養源とする細菌の生育は菌数、重量及び熱量を基礎とする効率であらわされる。検討した細菌においては、重量を基礎とする効率と熱量を基礎とする効率はよく一致したが、菌数を基礎とする効率がそれらと一致するかどうかは細菌種によつて異つていた。

表 1. 熱処理菌体浮遊液中で生育する *Escherichia coli* の
収率に及ぼす熱処理菌濃度の効果

熱処理菌 濃度 (A)	最大生菌数 (B)	収 率 B/A · 100
$2.8 \times 10^7 / ml$	$< 10^4 / ml$	—
2.8×10^8	2.0×10^5	0.07
2.8×10^9	3.2×10^7	1.1
5.0×10^9	5.0×10^7	1.0
2.5×10^{10}	2.8×10^8	1.1
5.0×10^{10}	7.0×10^8	1.4

表 2. 種々の細菌における収率

細 菌	収 率	
	実験 1	実験 2
<i>Achromobacter liquefaciens</i>	—	—
<i>Arthrobacter simplex</i>	7.0	7.8
<i>Aerobacter aerogenes</i>	1.6	2.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7.0	7.3
<i>Erwinia aroideae</i>	0.047	0.037
<i>Sarcina lutea</i>	0.19	0.15
<i>Proteus vulgaris</i>	1.5	2.3
<i>Serratia marcescens</i>	0.047	0.30
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25	0.30
<i>Escherichia coli</i>	0.85	1.0

図1. 熱処理菌濃度による Ar. simplex の収率の変化

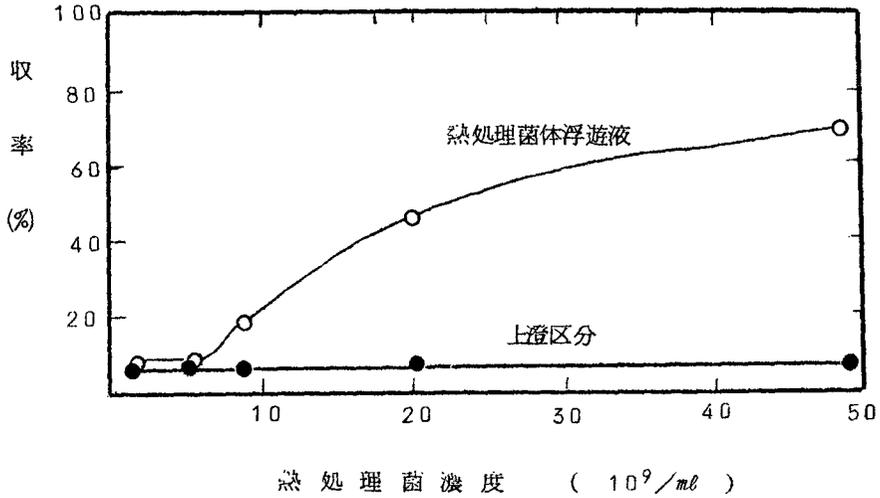


表3. 熱処理菌体の音波処理上澄液中で生育した Ar. simplex の細胞成分

培地	生育段階	生菌数 (10 ⁹ /mg)	成分		
			DNA (%)	RNA (%)	蛋白 (%)
Sonicate of heat-killed cells	Logarithmic	4.07	92.0	10.9	50.8
	Stationary	5.15	12.2	10.5	52.0
Broth	Logarithmic	4.49	65.8	13.9	50.3
	Stationary	4.76	64.8	14.0	50.2

表 4. 細菌の生育効率

細菌	培養の基質	効 率 (%)			
		細菌数	重量	熱量	
Escherichia coli	熱抽出区分	1.0	1.12	1.12	
	熱抽出区分に対して*	—	5.32 (5.66)	6.64 (5.96)	
	消費された区分に対して	—	7.15 (6.94)	6.66 (6.00)	
Arthro bacter simplex	熱抽出区分	7.8	3.71	3.71	
	熱抽出区分に対して*	—	18.9 (28.3)	37.5 (33.7)	
	消費された区分に対して	—	80.0 (79.2)	79.0 (71.2)	
Arthro bacter simplex	音波処理菌体	音波処理菌体に対して	—	23.1	25.9 (23.5)
		添加物	なし	—	—
			CaCl ₂	97.5	36.2
		NH ₄ Cl	70.0	33.8	37.8 (34.2)
		消費された区分に対して	—	—	—
		添加物	なし	—	59.8
CaCl ₂	—		73.0	45.9 (44.0)	
NH ₄ Cl	—		72.5	51.1 (48.2)	

* II, IIIの結果より求めたもの

* * 菌体重量の熱抽出される割合を求めて換算したもの

カッコ内は ash-free basis。

審査結果の要旨

本論文は土壌中における細菌の死菌体が細菌の栄養源としてどのように働きうるかを明らかにする第一段階として死菌体浮遊液中における細菌の生育とその制限因子について検討を行ったものである。100°C 10分の熱処理菌体にそれと同種の生菌を接種してその生育の収率（得た最大生菌細胞数×100/熱処理細胞数）を10種の菌について検討した結果 *Arthrobacter simplex* 及び *Pseudomonas aeruginosa* は最も高い収率を与え7~8%、*Escheichia coli* は1%、*Ervinia aroideae* 等低い収率を与えるものでは0.04~0.3%、又 *Achromobacter liquefaciens* は熱処理浮遊液中では全く生育しなかった。このような低い収率をあたえる制限因子を明らかにするため、まず栄養物質の量が収率を制限しているかどうかを検討した。その結果熱処理菌体浮遊液中における細菌の収率を制限しているのは、その細菌に必要な栄養物質の量、特に窒素源と無機塩であることを明らかにした。

その際、*A. simplex* の場合無機塩のみの添加によって、著しい菌数の増大が起ることが見出された。塩類の効果についてさらに詳細に検討を加え、生育促進効果を示すものはアルカリ族及びアルカリ土属に属する陽イオンで二価イオンが最も有効であった。

そして、塩類を添加しない培養では熱処理菌体の可溶化された区分のみが生育に関与するのに対し、塩類を添加すると不溶区分も生育に関与することが認められた。このことは電子顕微鏡による培養の観察結果によってさらに確かめられた。そして塩類添加効果は熱処理菌体の不溶区分に作用する蛋白分解酵素の生成あるいは安定化が主要な原因であろうと推定した。

ついで利用された熱処理菌体成分及び生育した細菌細胞の菌体成分を *E. coli* 及び *A. simplex* について検討した。熱処理菌体の遠心上澄区分中で培養した場合基質となる成分は両細菌とも同様で、利用される成分は遊離アミノ酸と冷酸可溶RNAであった。一方 *A. simplex* が CaCl_2 存在下に音波処理した熱処理菌体成分を利用して生育する際には測定したすべての成分、すなわちDNAの92%、RNAの85%、蛋白の93%、炭水化物の15%、アミノ酸の73%が培地中から消失した。そして生成した菌体は肉エキス中で培養した菌体に比べて、RNAは低い、蛋白含量は差がないことが示された。

これらの分析値をもとにして生育の重量及び熱量効率についても検討を加えた。*E. coli* においては菌数効率と重量或いは熱量効率は良く一致した。それに対して *A. simplex* の場合は菌数による効率が100%程度であるのに対し重量及び熱量による効率は34~36%であった。これは新たに生育した細胞が熱処理細胞の約1/3の大きさであることと良く一致している。

以上熱処理菌体を栄養源とする細菌の生育を検討して、細菌の生育は熱処理菌体浮遊液に含まれる栄養物質の量によって定められ、特に窒素物及び塩類が制限要因となっており、又 *Arthrobacter simplex* の塩類効果について興味ある現象を見出し、その解析を行った点において農学博士の学位を与えるにふさわしいものと判定した。