

発育電位時間曲線による細菌代謝の研究

第 1 編

チフス菌による電位降下物質の研究

岡山大学医学部微生物学教室 (主任: 村上 栄教授)

植 田 真 臣

〔昭和 33 年 10 月 10 日受稿〕

目 次

- | | |
|--|--|
| <p>I. 緒 言</p> <p>II. 実験材料及び実験装置</p> <p>III. 実験方法及び実験成績</p> <p>1) 細菌浮游液から細菌を分離したときの酸化還元電位</p> | <p>2) 酸化還元電位と増殖菌量との関係</p> <p>3) 酸化還元電位変動物質の半透膜透過と拡散に就て</p> <p>IV. 総括及び考按</p> <p>V. 結 論</p> |
|--|--|

I. 緒 言

細菌が呼吸乃至増殖中に於ける培地の酸化還元電位に関する研究は Potter (1911)¹⁾ を始め可成り多くの人々の報告がある。Gillepsie (1920)²⁾ は細菌の増殖によつて電位は降下することを報告し、Cannan 等 (1926)³⁾ は洗滌イースト菌を用い、Aubel 等 (1928)⁴⁾ は腎、肝、筋肉組織を用いて何れも電位を測定している。後者はコハク酸とメチレン青を加えて電位降下の変化を報告したがその機序については明らかにしていない。Hewitt (1930, 1931)^{5)-8) 12)-17)} は溶血連鎖球菌、ジフテリア菌、肺炎球菌等を用いブイオンにグルコース等の基質を加えた培地で電位時間曲線を求めて報告し、Knight (1930)⁹⁾¹⁰⁾ は pH を変じて、Lepper 等 (1930)¹¹⁾ は電極に金とイリジウム、Green (1933)¹⁸⁾ はアスコルビン酸を用いて何れも酸化還元電位の報告を行っている。

Yudkin (1935)¹⁹⁾ は大腸菌を用いて電極を半透膜で包んで電位測定を行いこれを通過し得る電動能物質のみが電位を変動させるもので、この方法では細菌の真の酸化還元電位を知ることは出来ないと報告している。その後福見 (1941)²⁰⁾²¹⁾、鎌倉等 (1943)²²⁾²³⁾、山田 (1943)²⁴⁾ 等の報告があるが何れも細菌浮游液中に浸された電極を介して測定される電位は液中の電子の産生度を示すという基礎理論から遠く離れたものではない。著者は細菌の複雑な酵

素作用による代謝の機構を産生電子の割合のみから窺わんとするものではないがチフス菌を用いてその浮游液中に於ける電位の変化を種々の角度から追求し細菌の酸化還元電位に関する生理学的考察を行った。

II. 実験材料及び実験装置

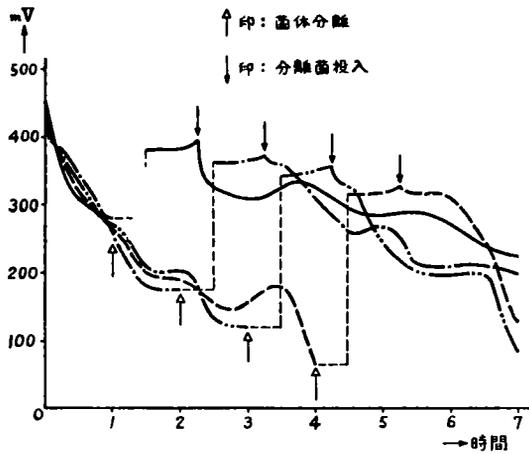
本実験に使用した菌株は当教室保存の *Sal. typhi* 57 S で使用培地は種々塩類加溶液 (pH 7.2)、ブイオン、 $1/60$ M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) である。基質として一部に乳酸とグルコースを用いた。供試菌処理法、使用培地の組成、電位測定装置及び菌浮游液の容器である三口コルベン等は当教室の秋田 (1957)²⁵⁾ の報告中のそれと同様である。菌量の測定には A. K. A. 5 号 D 型光電管比色計を用いた。菌浮游液の容器は上記三口コルベンのほか内径 10 mm、長さ 120 mm の硝子管の一端を J 字形に曲げその断端に半透膜を覆つたものを作成した。この特殊試験管を縦 110 mm、横 50 mm、深さ 45 mm の試験槽内に入れ半透膜を隔てて特殊試験管の内外に白金電極を挿入した。この試験槽は一部実験では菌浮游液の容器にも使用した。

III. 実験方法及び実験成績

- 1) 細菌浮游液から細菌を分離したときの酸化還元電位
- 三口コルベンを用い *Sal. typhi* 57 S 100 mg を

30 cc の種々塩類加溶液に浮遊しこれに基質として乳酸 $10^{-3}M$ を加えて $37.5^{\circ}C$ に保ち電位降下を測定し、一定時間後に浮游液を取り出して 10000 r. p. m. 20 分間遠心沈澱して菌体を分離し上清液を三口コルベンに入れ、この電位変化を45分間測定した後分離菌を再び浮遊せしめて電位を測定すると図 1 の如くなる。即ち測定開始 1 時間後に 170 mV 降下した時ここで菌体を分離し、その操作のため 30 分経過したが上清液のみの電位は 100 mV 上昇しており更にそのまま 45 分間では 13 mV とわずかに上昇する。ここで分離菌を投入すると急速に 70 乃至

図 1



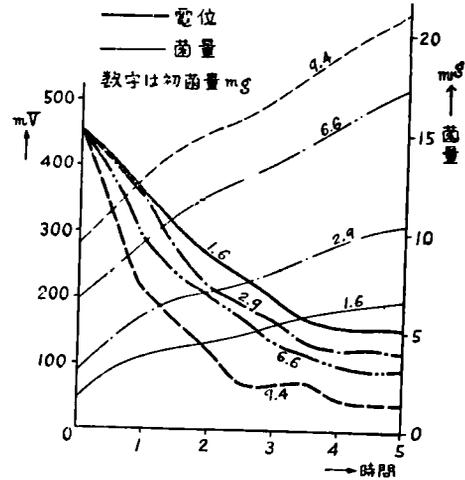
80 mV 降下し初めより 7 時間まで漸次ゆるやかに下降する。測定開始 2 時間では 275 mV 下降したが分離操作後上清液では 190 mV 上昇しており、45 分間に更に 10 mV 上昇し分離菌投入によりややゆるやかに下降する。測定開始 3 時間では 330 mV 降下し上清液で 225 mV 上昇 45 分後の分離菌投入でやや急速に降下する。測定開始 4 時間は 385 mV 降下、上清液で 255 mV 上昇 45 分後の分離菌投入後は上述の場合程著明な電位降下がなく約 50 分後に急速に降下して低電位に達する。この分離菌投入後の電位降下の遅れとその降下程度とは分離までの時間の遅いもの程大きい傾向を示している。上清液のみの 30 分間の電位が 10 乃至 13 mV 上昇する点は何れも共通しているが、分離までの時間の遅いもの程やや低い電位を示していることは注目される。

2) 酸化還元電位と増殖菌量との関係

三口コルベンを使用して 30 cc のブイヨンに *Sal. typhi* 57 S 1.6 mg, 2.9 mg, 6.6 mg, 9.4 mg を夫々浮遊し流動パラフィンを重ねて 30 分毎に酸化還元電位を測定すると共に光電管比色計によつて増

殖した菌量を測り 5 時間の電位降下と菌量の増加の関係を求めると図 2 の如くなる。即ち 1.6 mg で

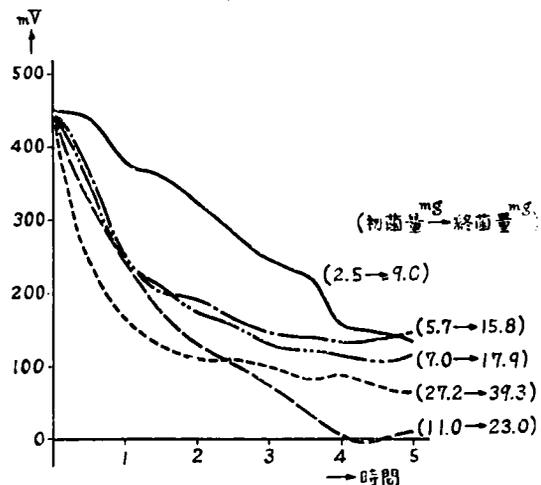
図 2



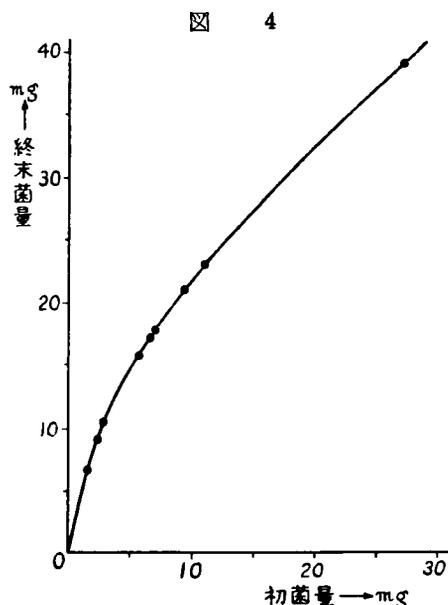
は 4 時間まではほぼ直線的に 290 mV 電位降下を示して安定し、菌量は初め急速に増加するが 2 時間 30 分頃に増加率は最低となり後再び上昇して 5 時間後に 6.6 mg を呈する。初菌量を 2.9 mg, 6.6 mg, 9.4 mg と増量するにつれて電位降下は初め急速に次で漸次緩慢となり 4 時間後にはほぼ安定し、2.9 mg は 325 mV 降下して 10.4 mg に、6.6 mg は 355 mV 降下して 17.2 mg に、9.4 mg は 410 mV 降下して 21.1 mg に増量する。而して菌量曲線は何れも 1.6 mg のものに似て初めの 1 時間は急速に増加するが、2 時間頃にやや緩慢となり 2 時間 30 分から 3 時間の附近に反曲点が認められ 4 時間で再び菌量は増加の度を増している。

次に同じ実験に於て初菌量を 2.5 mg, 5.7 mg, 7.0 mg, 11.0 mg, 27.2 mg とし 5 時間後の菌量のみを測定し電位降下との関係を求めると図 3 の如く

図 3



なり電位降下は一般に初菌量の増加するに従い急速で而も低い数値に安定するが、初菌量 27.2 mg に於ては 2 時間30分までは急速に降下するけれどもその後は初菌量の少い場合に比べて却つて高い電位で安定している。ここで初菌量を横軸にとり 5 時間後の終末菌量を縦軸にとつて曲線を画くと図 4 の如く拋物線近似曲線が得られた。



3) 酸化還元電位変動物質の半透膜透過と拡散に就て

i) 半透膜を隔てて菌浮游液内と液外に電極を挿入した場合

半透膜としてセロハン及び膀胱膜、又普通濾紙及び東洋濾紙 (No. 50) を夫々使用し特殊試験管内は無菌 1/50M 磷酸緩衝液、試験槽内は 1/50M 磷酸緩衝液 150 cc に菌量 500 mg を浮游しグルコース $10^{-2}M$ を基質として加え特殊試験管内に電極 A、試験槽内に電極 B、C を挿入して電位を時間的に測定した。

測定開始時の電位 450 mV に対しセロハンは図 5 の如く電極 A の位置では 70 分間で 160 mV 上昇し次でやや降下 2 時間後にほぼ 120 mV 上昇したままで安定する。電極 B は 2 時間 30 分で 300 mV 降下して安定し電極 C は 75 分間で 0 mV を越えて負の電位となり 3 時間後に 550 mV 降下して安定した。

半透膜を膀胱膜とすると図 6 の如く電極 A では 35 分間で 130 mV 上昇し 3 時間後に 80 mV 上昇したままで安定、電極 B では 35 分間で 250 mV 下降し 70 分後に 225 mV 降下したままで安定、電極 C は 75 分で 0 mV を越えて負の電位となり 4 時間後に

図 5
セロハン

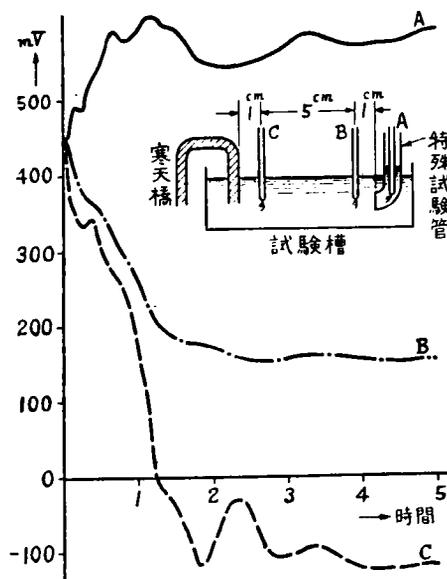
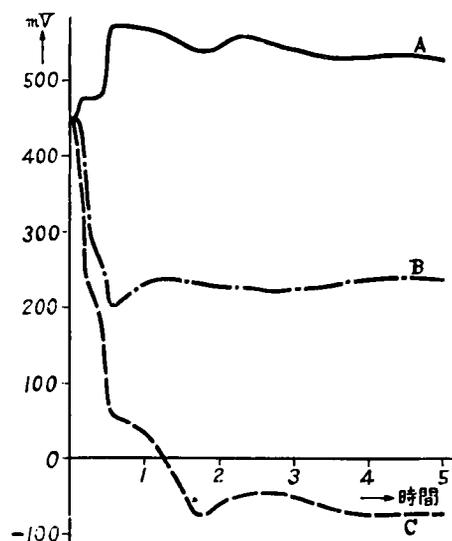


図 6
膀胱膜



520 mV 降下して安定した。

普通濾紙では図 7 の如く電極 A では 5 時間で漸次 100 mV 降下し、電極 B では 1.5 時間に 125 mV 降下したが後に徐々に 90 mV 上昇する、電極 C は 2 時間 15 分後に 315 mV 降下し 5 時間で 355 mV 降下して安定した。

東洋濾紙 (No. 50) は図 8 の如く電極 A、B、C 共に電位変化は少く 30 乃至 100 mV の降下に止まるが電位曲線の形は上述の半透膜の場合と共通点を示している。

図 7

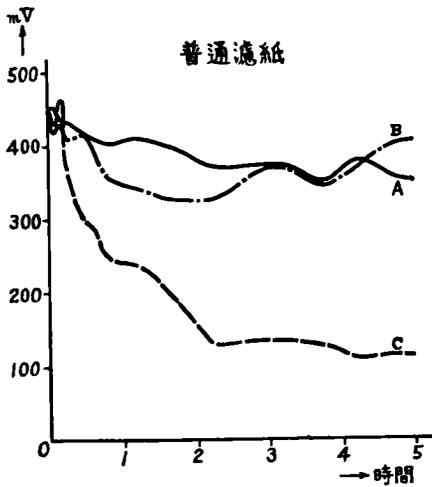
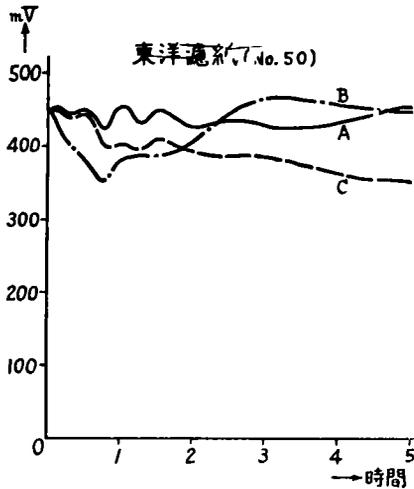
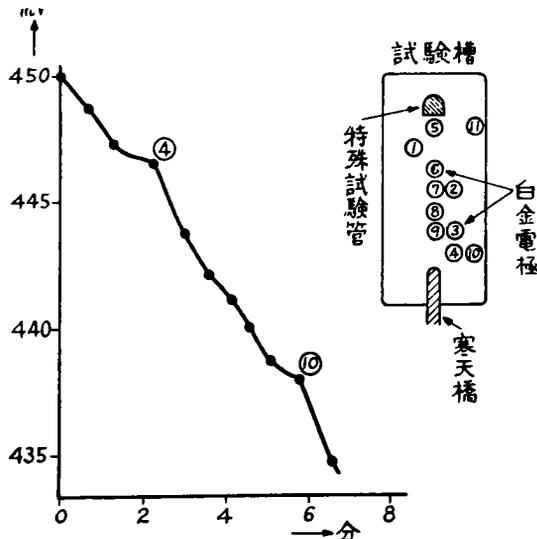


図 8



ii) 特殊試験管内に菌浮游液を入れ半透膜外に電極を挿入した場合
特殊試験管内には 1/50M 磷酸緩衝液 5 cc に菌量

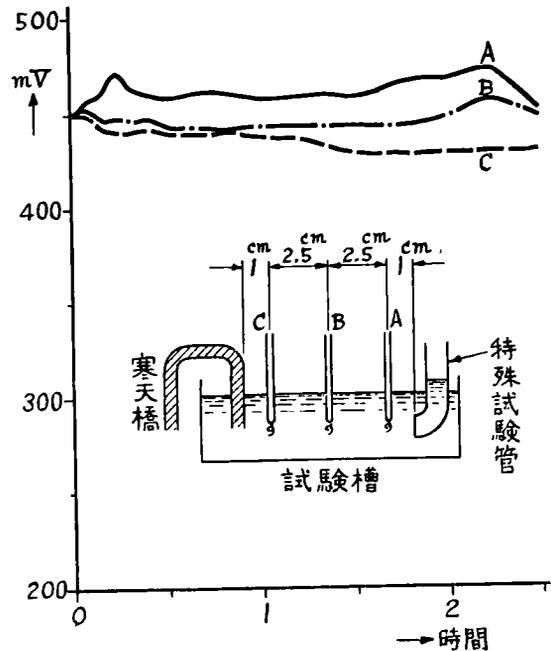
図 9



100 mg を浮游し半透膜としてセロハンを用い図9の如く無菌 1/50M 磷酸緩衝液 150 cc を入れた試験槽内に挿入, 電極を半透膜外に置いて酸化還元電位を平面的に位置を定めた順序で時間的に測定した. 電位降下は平均して 5 分間当り 11.8 mV であるが電極の平面的位置が菌浮游液に最も遠い④と⑩の直前で電位曲線に著明な反曲点が認められる.

次に図10の如く電極 A, B, C を菌浮游液に対して一定位置に固定し時間的に電位変化を測定した. 半

図 10

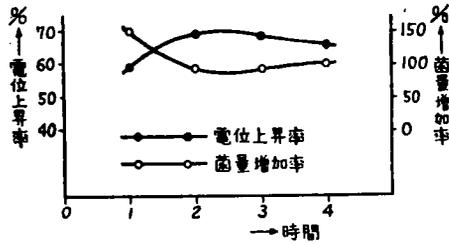


透膜セロハンを隔てて菌浮游液に最も近い位置では菌投入後15分間は電位は 20 mV 上昇し最も遠い位置では 10 mV の降下を示し中間のものはほぼ両者の間にある. 30分以後は電位は安定するが菌浮游液に遠いものほど低電位を示している.

IV. 総括及び考按

以上著者は *Sal. typhi* 57 S 型菌を用いて先づ上述の方法で細菌浮游液の酸化還元電位降下を測定しつつ 1, 2, 3, 4 時間目に菌体を分離し, 夫々の上清液の電位変動を測定し一定時間後に夫々分離した菌体を浮游せしめて電位変化を観察したが, ここで細菌浮游液の電位降下値で菌体分離上清液の示す電位上昇値を除いて, これを菌体分離による電位上昇率と名付けて%で示すと図11の如く 1 乃至 4 時間の間ではほぼ 59 乃至 69% を示し 2 時間と 3 時間の間で約 70% の最高値が得られた. 菌体を分離された上清液の電位が 100% の上昇を示さず 60~70% で止まるこ

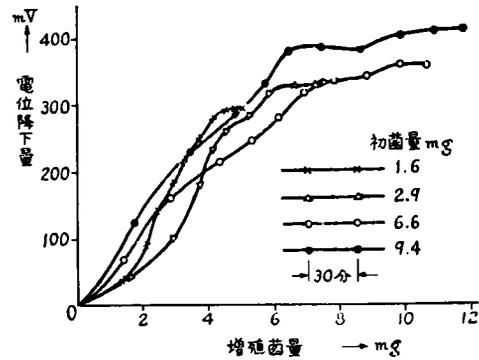
図 11



とは興味ある問題で、菌体を分離した上清液中に低電位物質が存在することが考えられ、且つ、上清液に於ける45分間の電位観察では各時間共に10乃至13 mV の電位上昇が認められることからこの物質は漸次に低電位能を失うものと推察される。一方細菌浮游液中では細菌は増殖しておりその量的関係を観察するため光電管比色計により菌量を測定し電位降下との関聯を追求した。この場合電位時間曲線の比較検討を便利にするため測定開始後2乃至4時間で250乃至400 mV の電位降下を示すように菌量を選び又外来条件からの影響を少なくするために培地条件を変更したが、初菌量と5時間後の終末菌量との関係は図4に示すように初菌量 1.6 mg から終末菌量 39.3 mg の間で拋物線近似曲線が得られた。図2の酸化還元電位と菌量との曲線の中から図1の電位降下曲線に最も近い曲線である初菌量 6.6 mg と 9.4 mg 菌量曲線の1乃至4時間の各時間の正切を求めて菌量増加率と名付け、2曲線からの平均値を求めて曲線にすると図11の如くなり2時間と3時間の間に最低値を有し図中の電位上昇率曲線の横軸に対する近似鏡像曲線が得られた。即ち増殖菌量の増加率が大きいときは菌体を分離された上清液の電位上昇率は少く、低電位物質の低電位能の大きいことが示され、反対に菌量増加率の小さいときは上清液中の低電位物質の能力は小さいことが示され両者の間には鏡像近似の関係が見られた。この傾向を図示するために横軸に終末菌量から初菌量を差引いた増殖菌量をとって縦軸に電位降下量をとつて曲線を描くと図12の如く増殖菌量7乃至8 mg 位まではほぼ電位降下量に正比例するが、更に菌量が増加しても電位降下は増加しないで飽和状態にあることが観察された。

次で図5に示したように細菌浮游液を半透膜で隔

図 12



絶した場合は無菌液中の電極電位は初め上昇しその後ほぼ一定値を保っている。半透膜、セロハンと膀胱膜でこの傾向が強く普通濾紙と東洋濾紙 (No. 50) では弱い。又半透膜を隔てた無菌緩衝液に最も遠い電極電位は電位降下が常に最大であり、半透膜に近い電極電位との中間に存在している。

V. 結 論

- 1) *Sal. typhi* 57 S 型菌の液体培地に於ける電位は菌体を分離することによつてほぼ60乃至70%急に上昇して安定するがその後もなお多少上昇の傾向を示し、培養経過時間の長いもの程一般に低電位を示している。更に分離した菌体の再投入による電位降下は実験開始後の時間経過の短いもの程、再投入後の電位降下は一般に緩やかな傾向がある。
- 2) 増殖中の細菌の単位時間に於ける菌量増加率と菌体分離による上清液の電位上昇率との間には鏡像的相関比例関係がある。
- 3) 各一定の medium に於いて細菌浮游 medium と他とを半透膜で隔絶したとき、電位降下は細菌浮游 medium より遠い部分程大きい数値を示し、細菌浮游 medium の電位は逆に上昇する傾向が認められ、半透膜セロハン及び膀胱膜ではその傾向が著明で濾紙は弱い。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を頂いた恩師村上教授に深甚の謝意を表し、併せて種々御協力をして下さつた教室員各位並びに小野、青山の両氏に厚く御礼申し上げます。

文

献

1) Potter, M. C. : Proc. Roy. Soc., 84, 260, 1911.

2) Gillepsie, R. W. H. J. Soil Sci., 9, 199, 1920.

- 3) Cannan, R. K., Cohen, B., and Clark, W. M. : V. S. Pub. Health Rep., Suppl., 55, 1926.
- 4) Aubel, E., Aubertin, E., and Mauriaie : Compt. Rend. Soc. Biol. 98, 589, 1928.
- 5) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 24, 512, 1930.
- 6) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 24, 669, 1930.
- 7) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 24, 676, 1930.
- 8) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 24, 1551, 1930.
- 9) Knight, B. C. J. G. : Bioch. Jour., 24, 1066, 1930.
- 10) Knight, B. C. J. G. : Bioch. Jour., 24, 1075, 1930.
- 11) Lepper, E. H., and Martin, C. J. : Brit. J. Exp. Path. 11, 45, 1930.
- 12) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 25, 169, 1931.
- 13) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 25, 858, 1931.
- 14) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 25, 1447, 1931.
- 15) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 25, 1452, 1931.
- 16) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 25, 1641, 1931.
- 17) Hewitt, L. F. : Bioch. Jour., 25, 2068, 1931.
- 18) Green, D. E. : Bioch. Jour., 27, 1044, 1933.
- 19) Yudkin, J. : Bioch. Jour., 29, 1130, 1935.
- 20) 福見秀雄 : 昭和16年4月, 実験医学雑誌, 25, 4, 515.
- 21) 福見秀雄 : 昭和16年10月, 実験医学雑誌, 25, 10, 18.
- 22) 鎌倉勝夫, 和田照子 : 昭和18年7月, 大阪医学会雑誌, 42, 後, 1807.
- 23) 鎌倉勝夫, 中村正堯, 和田照子 : 昭和18年8月, 大阪医学会雑誌, 42, 後, 1881.
- 24) 山田晃 : 昭和18年7月, 大阪医学会雑誌, 42, 後, 1816.
- 25) 秋田和男 : 昭和32年10月, 岡山医学会雑誌, 69, 10, 2605.

Studies on the Bacterial Metabolism by Means of Oxidation-Reduction Potential

I: Oxidation-Reduction Potential in the Culture Media of Salmonella typhi

By

Maomi UEDA

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

In order to study some physiological aspects of bacteria, using *Sal. typhi* 57S as the test organism, the author measured the oxidation-reduction potential of the culture media with the lapse time. Salt solution, bouillon and M/50 phosphate buffer were used as the fundamental culture media, and lactate and glucose as the substrates. The results were as follows:

- 1) The potential of the liquid media of *Sal. typhi* 57S is lower in longer time culture. By separation of bacteria, this potential rapidly rises by about 60 to 70%, and then becomes stable, though still shows the tendency of some rise. By re-pouring the separated bacteria into the original culture media, the potential falls again, and this fall is generally milder when the first culture time is shorter.
 - 2) There are a symmetrical correlation between the increasing rate of growing bacteria and the rising rate of potential of the culture media by separation of bacteria.
 - 3) In a medium, in which a collodion membrane is placed to separate the bacteria-containing and non-containing part, the fall of potential is more marked in the part far from the bacteria-containing part, and, on the contrary, the potential of the bacteria-containing part shows a rising tendency. This phenomenon is marked when the two parts are separated by cellophane or bladder membrane, and not so marked by filter paper.
-