

緩衝液の種類及び濃度と細菌の呼吸との関係

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

矢 部 芳 郎
秋 田 悦 示
秋 田 和 男

〔昭和32年6月8日受稿〕

緒 言

細菌を洗滌する事により多くの基質に対するその呼吸が低下する事はよく知られている¹⁾。そしてこの呼吸活性の低下は、菌を緩衝液で洗滌する事、更にこれに諸種金属イオンを添加する事によりかなりの程度まで防ぐ事が出来る事が報告されている²⁾。更に又、グルタミン酸、アラニン等を基質とした場合、それに対する細菌の脱アミノ反応の至適 pH は緩衝液の種類により異なる事が Gale³⁾により報告されている。又、磷酸緩衝液の様なものでも、余り高濃度であると阻害が出てくる事がある⁴⁾。更に細菌による酵素反応と pH との関係等を調べる際、細菌浮游液と反応に使用する緩衝液の間に相互作用がおり、そのために pH の移動が招来される。著者等は以後の研究に、殊に pH に関係した細菌の生理的研究に資するため、細菌の洗滌、浮游及び反応液を如何にすべきかという問題を、主として緩衝液の種類、濃度及び pH との関係に於て検討した。

実験材料及び方法

1. 使用菌：教室保存の白色ブドウ球菌を普通寒天平板上に 37°C, 18 時間培養したものをを使用した。
2. 使用緩衝液⁵⁾：磷酸緩衝液、硼酸緩衝液及びフタル酸緩衝液。
3. 呼吸活性：ワールブルグ検圧計を用い、常法に従つて行つた。
4. 使用基質：グルタミン酸 (終濃度

10⁻² M), 使用に當つて、各反応液の pH に修正した。

5. 菌量：プルフリッヒ比色計を用い、混濁度を比較する事により測定し、調製した。

6. pH 測定：ガラス電極及び東洋濾紙の両方によつた。

7. 呼吸活性測定までの菌に対する操作：菌採取→2回洗滌→菌浮游→菌浮游液を反応用緩衝液に添加。

実 験 結 果

第1節 反応緩衝液の濃度と呼吸との関係

普通寒天平板上に 37°C, 18 時間、白色ブドウ球菌を培養し、後、菌を M/100 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で2回洗滌し、同じ緩衝液に浮游させた。これを各濃度緩衝液を入れた容器に加え、酸素消費量を測定した。

表 1 反応緩衝液の濃度と呼吸

磷酸緩衝液終濃度	酸素消費量 μ l		反応液 pH	
	グルタミン酸	自己呼吸	反応前	反応後
0.15 M	294	75	7.7	7.7
0.05 M	268	62	7.7	7.7
0.024 M	233	61	7.7	7.7
0.016 M	231	60	7.7	7.7
0.01 M	193	60	7.6	7.6

菌量 30 mg (湿菌), グルタミン酸終濃度 10⁻²M, 37.5°C, 30分, 気相空気。

表 1 にみる様に、呼吸活性は 0.15 M 磷酸緩衝液に於て最も高く、それより稀薄になるにつれて低下した。

以下の実験の反応緩衝液としては、総べて M/15 のものを使用した。

第2節 菌洗滌液と呼吸との関係

菌を採取後、M/50, M/100, M/200, M/300 及び 0.85% 食塩水で2回洗滌し M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で呼吸活性を測定した。

表2 菌洗滌液と呼吸

洗滌及び浮游に使用した液	酸素消費量 μ l	
	グルタミン酸	自己呼吸
M/50 磷酸緩衝液 (pH7.2)	224	32
M/100 " (")	216	32
M/200 " (")	211	34
M/300 " (pH7.0)	212	33
0.85% 食塩水	176	33

菌浮游液 1ml (湿菌量 30 mg), グルタミン酸 (10⁻¹M) 0.3 ml, M/5 磷酸緩衝液 (pH7.2) 1 ml, 水を加えて全量を 3ml とする。37.5°C, 30分, 気相空気。

表2にみる様に、活性は M/50 のもので洗滌したものに於て最も高かつたが、それ以下の濃度のものに於ても、余り著明な活性の低下はみられなかつた。然し 0.85% 食塩水で洗滌したものではかなり低下していた。従つて以下の実験には M/50 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で洗滌したものを使用した。

表4 硼酸緩衝液中の呼吸

硼酸緩衝液終濃度	菌浮游に使用した液	酸素消費量 μ l (基質グルタミン酸)				反応液 pH	
		10'	30'	60'	120'	反応前	反応後
M/10	M/100 磷酸緩衝液 (pH7.2)	46	122	253	510	8.0	8.0
	蒸溜水	41	114	230	458	8.0	8.0
M/15	M/100 磷酸緩衝液 (pH7.2)	47	134	280	575	7.9	7.9
	蒸溜水	47	127	257	525	8.0	8.0
M/20	M/100 磷酸緩衝液 (pH7.2)	51	144	297	616	7.8	7.9
	蒸溜水	50	136	275	558	7.9	8.0
M/30	M/100 磷酸緩衝液 (pH7.2)						
	蒸溜水	55	155	307	625	7.9	8.0

菌量 30 mg (湿菌), グルタミン酸終濃度 10⁻²M, 37.5°C, 気相空気。

* 表4にみる如く硼酸緩衝液の濃度の高いものは或程度呼吸を阻害した。又磷酸緩衝液に

第3節 菌浮游液と呼吸との関係

菌を採取後、M/50 磷酸緩衝液で2回洗滌し遠沈したものを、M/50, M/100, M/300, 0.85% 食塩水及び蒸溜水に浮游した。調製後1時間以内にこれら浮游液の呼吸活性を測定し、比較した。

表3 菌浮游液と呼吸

菌浮游に使用した液	酸素消費量		反応液 pH	
	グルタミン酸	自己呼吸	反応前	反応後
M/50 磷酸緩衝液 (pH7.2)	215	26	7.6	7.6
M/100 " (")	219	34	7.7	7.7
M/300 " (")	217	31	7.7	7.7
0.85% 食塩水	220	32	7.7	7.7
蒸溜水	221	35	7.7	7.7

容器内容及び実験条件は、反応液 pH 以外は、表2と同様。

表3にみる様に各種濃度の磷酸緩衝液に浮游したのも、食塩水或は蒸溜水に浮游したのも、総べてその活性の差を示さなかつた。

第4節 硼酸緩衝液中の呼吸

菌を採取後、M/50 磷酸緩衝液で2回洗滌し遠沈したものを、M/100 磷酸緩衝液及び蒸溜水に夫々浮游した。これらの呼吸を pH 8.0 に調製した M/10, M/15, M/20 及び M/30 の硼酸緩衝液 (夫々終濃度) 中で測定した。*

菌を浮游させたもの—従つて反応液中に磷酸が微量ではあるが存在するもの—では蒸溜水

に菌を浮遊させたもの一従つて反応液中に磷酸のないもの一よりも呼吸が高く、これは殊に長時間呼吸させた場合著明であつた。然し菌を M/100 磷酸緩衝液 (pH 7.2) に浮遊させたものを M/20 以下の濃度 (終濃度) の硼

酸緩衝液に入れた場合、その反応液の pH は約 0.2 程低下した。

第5節 フタル酸緩衝液中の呼吸

硼酸緩衝液の場合と同様にして呼吸を測定した。*

表 5 フタル酸緩衝液中の呼吸

フタル酸緩衝液終濃度	菌浮遊に使用した液	酸素消費量 μ l (基質グルタミン酸)				反応液 pH	
		10'	30'	60'	120'	反応前	反応後
M/10	M/100 磷酸緩衝液 (pH7.2)	27	79	185	445	6.1	6.4
	蒸溜水	22	62	150	382	6.0	6.2
M/15	M/100 磷酸緩衝液 (pH7.2)	31	94	215	503	6.1	6.6
	蒸溜水	31	90	202	475	6.0	6.4
M/20	M/100 磷酸緩衝液 (pH7.2)	33	102	230	554	6.1	6.7
	蒸溜水	33	98	217	500		
M/30	M/100 磷酸緩衝液 (pH7.2)						
	蒸溜水	35	105	235	560	6.0	6.7

容器内容及び実験条件は表 4 と同様。

* 表 5 にみる様にフタル酸緩衝液の濃度の高いものの中では呼吸は軽度に低下した。又反応液中に磷酸の存在する場合、存在しない場合よりも呼吸が高かつた。又フタル酸緩衝液の濃度が M/20 (終濃度) 以下になると、反応前後の pH の移動が極めて著明であつた。

総括及び考按

細菌の生理的研究を行うに當つて、所謂静止菌の調製は最も基本的な、而も重要な操作の一つである。何故ならこの操作の適否により、以後の実験の成否が左右されるからである。著者等は出来るだけ活性の高い、而も静止菌という条件にかなつた菌を調製するには如何にすべきかという事を検討するために前記の様な実験を行つた。以下簡単にその総括及び考按を試みる。

細菌の洗滌に蒸溜水或は生理的食塩水を使用した場合、磷酸緩衝液を使用した場合よりも呼吸活性は低下する。従つて洗滌には磷酸緩衝液が最も良い。更に高い活性を保持する静止菌を得ようと思えば、食塩添加磷酸緩衝液、或は赤沢¹⁾等の報告より考えられる様に、

更にこれに諸種金属イオンを添加したものを洗滌に使用すればよい事が考えられる。然しこれも飽くまで実験目的によるのであつて、金属イオン或は無機イオンの作用をしらべるための実験に當つては、これらの物質を含まないもので洗滌すべきである。

又菌を洗滌し遠沈して、再浮遊さす液は、反応に使用する緩衝液が磷酸緩衝液である場合は、蒸溜水、生食水及び磷酸緩衝液の何れでもいいが、反応に使用する緩衝液が磷酸緩衝液以外の、例えば硼酸或はフタル酸緩衝液等の場合、磷酸緩衝液 (極く稀薄でもよい) に菌を浮遊させておく方が活性の低下が少ない。殊に長時間反応を行う場合にはこの事が必要である。但しこの場合高濃度 (M/100 以上) のものに浮遊させると、反応液の pH が変わるのでよくない。又菌を調製後長時間浮遊し放置しておく場合には、蒸溜水はよくないのは勿論である。然し各 pH 別に活性を測定する (例えば至適 pH をしらべる) 様な場合、蒸溜水に浮遊させた菌を各 pH の緩衝液に加えていくと反応液の pH が移動しないので便利である。

又菌を実際に呼吸させる反応液に使用する緩衝液は、所要 pH に応じて適当に変えねばならない。磷酸緩衝液を使用した場合には、少なくとも著者等の場合、M/15 までは呼吸阻害は認められず、寧ろ多少呼吸が高い様であつた。然し硼酸及びフタル酸緩衝液を使用した場合、濃度が高くなる程呼吸が低下した。従つて余り高濃度は避けなければならない。然し余り低濃度では反応時、pH が著しく移動する。著者等の実験では、M/15 (終濃度) が、これら両面から考えて最も適当と思われた。

以上を要約すると、活性の高い静止菌を調製するには、一般的にいつて、食塩、金属イオン等諸物質を添加した磷酸緩衝液で菌を洗滌、浮遊させ、これを M/15 (終濃度) 程度の所要 pH の各種緩衝液に加えて呼吸を測定するのが最も良好の様である。但し、これもあくまで実験目的によるのであつて、以上の洗滌、浮遊等の使用液及び操作を、実験目

的に応じて適当に変える事により、始めて合理的な実験が行える訳である。

結 論

1. 高い呼吸活性を保持する静止菌を得るためには、蒸溜水或いは生理的食塩水で洗滌するよりも、磷酸緩衝液で洗滌するのが良い。
2. 静止菌を調製後、短時間内に使用する時には、菌の浮遊液は、蒸溜水、生理的食塩水、磷酸緩衝液の何れであつても、その呼吸活性に著明な差はない。
3. 硼酸緩衝液及びフタル酸緩衝液は高濃度では呼吸を阻害する。然し、pH の移動を少なくするためには M/15 (終濃度) 程度が適当である。磷酸緩衝液は M/15 でも呼吸を阻害しない。
4. 硼酸緩衝液或はフタル酸緩衝液を反応に使用した場合、微量の磷酸イオンが存在すれば呼吸の低下が少い。

文 献

- 1) 古坂：酵素化学シンポジウム，2集，61，1949.
- 2) 赤沢：岡山医学会雑誌，66，1010，1954.
- 3) Gale, E. F. & Epps, H. M. R.: Biochem. J., 36, 609, 1942.
- 4) ワールブルグ検定計，南江堂，110，1954.
- 5) 江上等：標準生化学実験，文光堂，596，1953.

Studies on the Influence of Buffer on the Bacterial Respiration

By

Yoshiro Yabe
Yoshimi Akita
Kazuo Akita

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

The preparation of resting cells is one of the most important and most fundamental procedures for the physiological studies on bacteria. In order to know how we should do to get the resting cells suitable to the purposes of experiments, the author studied the influence of washing and suspending on the respiratory activity of bacteria. The results are summarized

as follows :

1) For the purpose to obtain the resting cells of high respiratory activity, washing with phosphate buffer is better than that with distilled water or physiological saline solution.

2) When the prepared resting cells are used in a short time after the preparation, the respiratory activity is the same regardless of the sorts of the suspending solutions, distilled water, saline solution and phosphate buffer.

3) Borate and phthalate buffers of high concentration somewhat inhibit the respiration. However, in order to make the shift of pH less, M/15 (final concentration) is good. Phosphate buffer, even of M/15, does not inhibit the respiration.

4) In borate or phthalate buffers, the fall of respiratory activity is diminished by the addition of small amount of phosphate.
