

## 9123 細菌-ファージ系に対する食塩の作用

村田 晃(佐賀大学)

遺伝子組換え技術で造成した細菌を使用する有用物質生産が工業的スケールで始まっている。ところが最近、欧米諸国において、この細菌を侵すファージの汚染による有用物質生産の異常が報告され始め、わが国でもファージ汚染が認められるようになってきている。これは、長年にわたって細菌利用工業におけるファージ防御に関する研究が行われてきたにもかかわらず、いまだに一般的な防御対策法が確立されていないからである。応用微生物学・発酵学領域において、ファージに関する研究は重要な研究課題の一つであり、新しい観点からのファージ防御法の確立が待たれている。そこで、これまで知見のなかった細菌-ファージ系に対する食塩の作用について検討し、食塩を利用するファージ防御の可能性を探る研究を開始した。

昨年度は、Escherichia coli K-12 と S 1, S 2 ファージを用いて研究した。本年度は、Escherichia coli B と T 1, T 3, T 4, T 5 ファージを用いて研究した。

研究の結果、宿主菌に対する食塩の作用として、0.8 Mで菌の生育を完全に抑制することと、菌のコロニー形成能を喪失させることが分かった。食塩によるコロニー形成能の喪失に対するベタインの影響について検討し、ベタイン添加によってコロニー形成能が回復することが分かった。したがって、食塩の宿主菌に対する作用は、殺菌的なものでなく静菌的なものであると考えられた。遊離ファージに対する食塩の作用については、2 Mという高濃度でも各ファージを不活化しなかった。しかし、食塩は、各ファージの宿主菌への吸着を阻害した。食塩のファージ増殖に対する作用については、T 1, T 3 ファージの場合、0.9 Mでファージ増殖を完全に抑えること、感染中心数の減少はゆるやかであること、T 4, T 5 ファージの場合、0.8 Mでファージ増殖を完全に抑えること、感染中心数の減少は著しいことが分かった。なお、食塩によるファージ増殖抑制にベタインは影響を及ぼさなかった。



## 9123 細菌-ファージ系に対する食塩の作用

村田 晃(佐賀大学)

## 1. 研究目的

遺伝子組換え技術を用いて造成した細菌を使用する有用物質生産が工業的スケールで始まっている。ところが最近、欧米においてファージ汚染による有用物質生産の異常が報告され始め、わが国においてもファージ汚染が認められるようになってきている。これは、長年にわたって微生物工業におけるファージ防除に関する研究が行われてきたにもかかわらず、いまだに、一般的な防除対策法が確立されていないからである。応用微生物学・発酵学領域においてファージの防除に関する研究は、重要な研究課題の一つであり、新しい観点からのファージ防除法の確立が待たれている。更に、バイオテクノロジーの進展に伴って遺伝子組換え技術を用いて造成された細菌の工業的使用が拡大されることを考えると、ファージの防除に関する研究は、ますます重要となるのである。一方、食塩の細菌に対する作用については古くから研究が行われているが、細菌ウイルスであるファージおよびファージ感染菌に対する食塩の作用については研究されていない。

本研究は、これまで知見のなかった細菌-ファージ系に対す食塩の作用について検討し、食塩の新しい生物学的作用を追究するとともに、その応用として、食塩を用いるファージ防除の可能性、すなわち食塩の新しい用途を拓く可能性を探るものである。

1990年度は、研究材料として Escherichia coli K-12 に組換え

遺伝子を導入して造成したセリン生産菌とそのS1, S2ファージを用いて研究した。その結果、高濃度の食塩がファージの増殖を抑えることと、ファージによっては温度を上げることにより低濃度の食塩で有効であることを明らかにした。すなわち、食塩を用いるファージ防除の可能性を示唆した（1990年度 ソルト・サイエンス研究財団助成研究報告集）。

本年度は、細菌-ファージ系に対する食塩の作用の一般性、普遍性あるいは特異性について検討するために、Escherichia coli B とそのT1、T3、T4、T5ファージを用いて研究したので報告する。

## 2. 研究方法

2. 1 ファージ T1、T3、T4およびT5ファージを使用した。

2. 2 細菌 T系ファージの宿主菌として、Escherichia coli Bを使用した。

2. 3 培地 ファージおよび細菌の培養には、通常のブイヨン培地を使用した。

2. 4 培養条件 斜面培養の1白金耳を液体培地に接種し、モノ振盪培養装置を使用して、約15時間振盪培養した。更に、新しい液体培地に2%接種し、2~3時間振盪培養し、培養液の660 nmにおける吸光度が約0.2に達したものを対数増殖期の菌細胞として使用した。培養温度は37℃である。培養液の吸光度は、光電比色計を用いて660 nmの吸光度を測定した。

2. 5 ファージおよび細菌の計数 ファージの計数は、重層法によるプラーク・カウント法によった。細菌の計数は、重層法によるコロニー・カウント法によった。

2. 6 ファージの吸着 宿主菌にファージを m.o.i. 約1になるように混和し、37℃で5分間吸着させた。次いで、冷希釈液で100倍希釈し、遠心分離、上澄の未吸着ファージを計数してファージの吸着率

を求めた。

2. 7 ファージの増殖 一段階増殖実験法で行った。すなわち宿主菌にファージを m.o.i. 約 0.1 になるように混和し、37℃で3分間吸着させた。次いで、抗ファージ血清を混和し、2分間中和反応を行った後、その一部をブイヨン培地にとり、感染菌数が約 2000 になるようにした。これを37℃で培養し、経時的に感染中心数を計数した。

2. 8 その他 その他の実験方法は、常法によった。

### 3 研究結果

#### 3. 1 宿主菌に対する食塩の作用

T系ファージの宿主である Escherichia coli Bに対する食塩の作用について検討した。Fig. 1にその結果を示す。図の左側に示すように、培養液に食塩を添加すると、その濃度に応じて培養濁度が一時的に急上昇した。培養濁度（生育）に及ぼす食塩の作用は、0.2M付近からみられ始め、0.8Mでは生育が完全に阻害された。しかし、この生育阻害濃度およびより高濃度において、培養濁度の減少（溶菌）はみられなかった。図の右側に示すように、コロニー形成単位は、食塩の0.4 M以上では、一度減少して10～60分後に増加した。しかし、1.2 Mでは減少したままで増加はみられなかった。

#### 3. 2 食塩によるコロニー形成能喪失に対するベタインの影響

Rothらは、Escherichia coli CA8000 に対する食塩の作用について高濃度（0.8M）では、コロニー形成能が失われるが、ベタインを添加するとコロニー形成能が回復することから、食塩の作用は、殺菌的なものでなくて静菌的なものであると考えている。また、著者らも前報で報告したように、Escherichia coliの K-12 の場合も CA8000 の場合と同様、高濃度食塩（1.2 M）によるコロニー形成能喪失は、殺菌的なものでなく静菌的なものと考えられる結果を得ている。

そこで、高濃度食塩（1.2 M）による Escherichia coli Bのコロ

ニー形成能喪失に及ぼすベタインの影響について検討した。

Fig. 2 にベタインの濃度を変えたときの結果を示す。食塩添加30分後に2, 10, 40 mMのベタインを添加すると、ベタイン添加30分後からコロニー形成単位数が増加し始めた。増加の割合は、ベタインの濃度が高いほど大きく、図示していないが40 mM・240分では、0.2 (最初の20%)まで増加した。

Fig. 3 はベタインの添加時間を変えたときの結果を示す。食塩添加後、5, 10, 30, 60分に10 mMのベタインを添加すると、添加時間に関係なく、培養60分後からコロニー形成単位数が増加し始めた。このことは、食塩添加による培地の浸透圧の急変により損傷を受けた直後では、細菌がベタインを取り込むことができず、取り込むにはある程度の時間が必要であることと、取り込んだ後はすぐにコロニー形成能が回復し始めるということを示唆する。

いずれにせよ、T系ファージの宿主である Escherichia coli B の場合も、Escherichia coliのCA8000やK-12の場合と同様、高濃度食塩によるコロニー形成能喪失は、殺菌的なものでなく静菌的なものであると考えられる。

### 3. 3 ファージに対する食塩の作用

遊離状態にあるT1、T3、T4およびT5ファージに対する食塩の作用について検討した。Table 1にその結果を示す。

食塩は2Mという高濃度でも、T1、T3、T4およびT5ファージに対して不活化作用を示さなかった。

### 3. 4 ファージの吸着に対する食塩の作用

T1、T3、T4およびT5ファージの宿主菌 (Escherichia coli B) への吸着に対する食塩の作用について検討した。Table 2にその結果を示す。

食塩は、濃度が高くなるにつれて、ファージの種類による程度の違

いはあるが、T 1、T 3、T 4 および T 5 フェージの吸着を阻害した。この食塩による吸着阻害は、T 1 フェージで顕著であった。

### 3. 5 フェージの増殖に対する食塩の作用

T 1、T 3、T 4 および T 5 フェージの増殖に対する食塩の作用について検討した。Fig. 4 にその結果を示す。

T 1 フェージの場合、食塩の濃度が高くなるにつれて、潜伏期が次第に延長しバースト・サイズが次第に減少した。そして、0.9 M およびそれ以上の濃度では、フェージの増殖は完全に抑制された。このとき、感染中心数の減少はゆるやかであった。

T 3 フェージの場合も、T 1 フェージの場合とほぼ同様であった。すなわち、食塩の濃度が高くなるにつれて、潜伏期が次第に延びバースト・サイズが次第に減少した。0.9 M およびそれ以上の濃度では、フェージ増殖は完全に抑制された。感染中心数の減少は、ゆるやかであった。

T 4 フェージの場合、食塩の濃度が高くなるにつれて、潜伏期が次第に延長しバースト・サイズが次第に減少した。そして、T 1 および T 3 フェージに比べ、より低濃度の 0.8 M でフェージの増殖は完全に抑制された。このとき、感染中心数の減少は、T 1 および T 3 フェージに比べ、急激であった。

T 5 フェージの場合も、T 4 フェージの場合とほぼ同様であった。すなわち、食塩濃度が高くなるにつれて、潜伏期が次第に延びバースト・サイズが次第に減少した。0.8 M およびそれ以上の濃度では、フェージ増殖は完全に抑えられた。感染中心数の減少は、急激であった。いずれにせよ、食塩がフェージの増殖を抑制することが分かった。

### 3. 6 食塩によるフェージ増殖抑制に対するベタインの影響

食塩による T 1、T 3、T 4 および T 5 フェージ増殖抑制に対するベタインの影響について検討した。Fig. 5 に T 3 および T 4 フェージの結果を示す。

1.2 Mの食塩を作用させると、ファージ増殖は完全に抑制され、感染中心数が減少した。このとき、食塩添加 10, 30, 60 分後に10 mMのベタインを添加したが、ベタイン無添加のコントロールとほとんど変わらず、ファージの増殖が再開されバーストがみられることはなかった。図示していないが、T 1およびT 5ファージの結果は、それぞれT 3およびT 4ファージの場合とほぼ同様であった。すなわち、ベタインは、食塩によるファージ増殖抑制に対して影響を及ぼさないことが分かった。

#### 4 考察

新しいファージ制御を目指し、Escherichia coli B とそのT 1, T 3、T 4およびT 5ファージを用いて、宿主菌とファージに対する食塩の作用について検討した。

宿主菌に対する食塩の作用について、食塩を添加すると培養濁度が一時的に急上昇することがあった。この間、総菌数に変動はみられないので、この培養濁度の上昇は、浸透圧の急変による菌細胞の一時的な変化（原形質分離、脱水など）によるものであろう（形態学的変化は顕微鏡で観察）。食塩の0.4 ~ 1.0Mでは、コロニー形成単位数が一度減少した後、10 ~ 60 分後に増加し始めた。これは、食塩に対する生理的適応によって細菌の生育が始まるためと考えられる。

1.2 Mでは、コロニー形成単位数の増加はみられなかった。しかしながら、1.2 M食塩によって失われたコロニー形成能がベタインによって回復することから、高濃度食塩によるコロニー形成能の喪失は、殺菌的なものでなく静菌的なものであると考えられる。既報の Escherichia coli K-12 の場合と同じような結果なので、Escherichia coli のB と K-12 の間に特別な違いはないのであろう。Rothらの CA8000 と比べると、Bは、生理的適応が早くて大きいといえる。また、耐塩性がより強いということもいえる。

ファージに対する食塩の作用については、ファージ不活化作用は認められなかった。一方、ファージの宿主菌への吸着は、食塩によってかなり阻害された。しかしながら、この吸着阻害の程度は、最も著し



いT1ファージで5分間・83%の阻害率であって、完全なものではなかった。すなわち、食塩のファージ吸着阻害作用は、実用的価値がほとんどないと考えられる。

ファージ増殖に対する食塩の作用は、T1およびT3ファージの場合、0.9Mで増殖を完全に抑制し、T4およびT5ファージでは、0.8Mで増殖を完全に抑制した。すなわち、食塩は、高濃度でファージの増殖を完全に抑制するが分かった。しかし、食塩によるファージ増殖の完全抑制は、宿主菌の生育が完全に抑えられる0.8M以上においてであり、ファージ増殖抑制と宿主菌生育阻害との間に選択的な濃度差がない。また、有効な食塩濃度が高すぎる。したがって、食塩の効果的な使い方について工夫しない限り、実用上の価値はほとんどないと考えられる。

この点、前報では、食塩と高温培養の組合わせについて検討し、ファージによっては、37℃から42～43℃に上げることによって低濃度の食塩でファージの増殖を抑えることができることを明らかにしている。すなわち、培養温度を上げることによって、ファージの増殖抑制と宿主菌生育阻害の間の選択的な濃度差を大きくすることができることと、有効な食塩濃度を下げることができることを示しているのである。食塩の共存下で比較的温和な熱処理を行うこの方法は、更に検討し工夫することによって、実用化できる可能性があると期待される。

## 5. 今後の課題

Escherichia coli BとそのT1、T3、T4およびT5ファージの系について、食塩濃度と温度を変えて検討する。

これまでの研究は、Escherichia coliのK-12とBについて検討したものである。次に、その他の多数の細菌-ファージ系について同様な研究を行い、細菌-ファージ系に対する食塩の作用の一般性、普遍性あるいは特異性について検討しなければならない。

更に、細菌およびファージに対する食塩の諸作用について、生化学的レベルで検討する必要がある。

Table 1. Effect of NaCl on free phages

Concn. (M)	Survival (%)			
	T1	T3	T4	T5
0	100	100	100	100
1	90-100	90-100	90-100	90-100
2	90-100	90-100	90-100	90-100

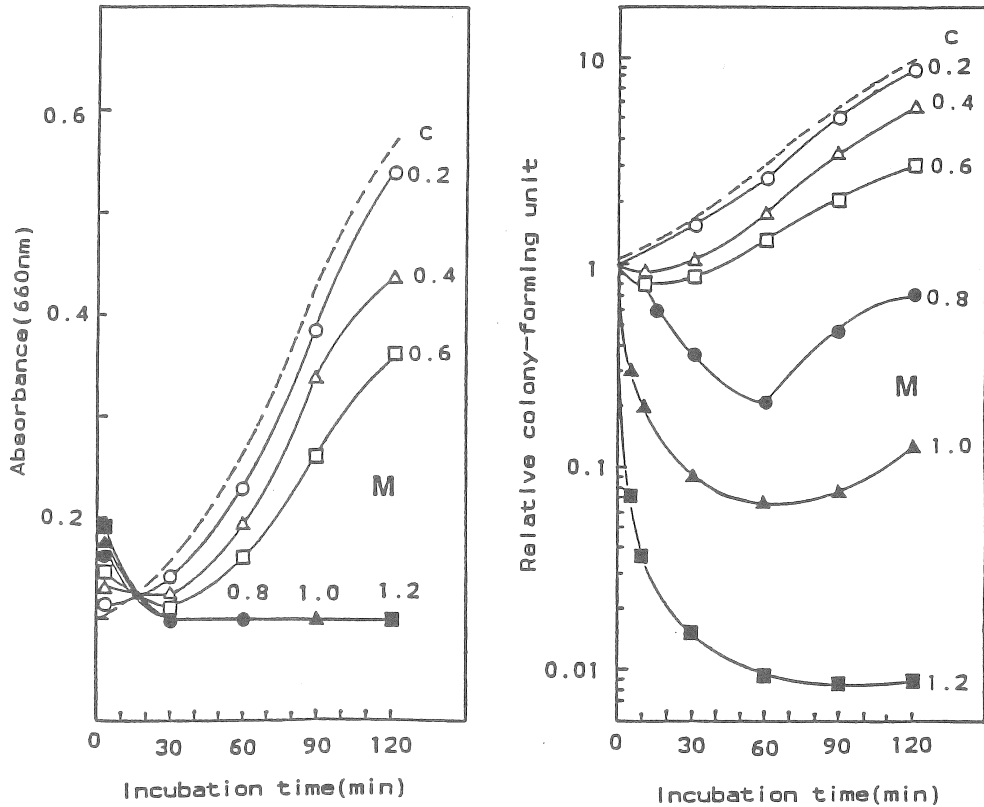
Phages ( $4 \times 10^7$  PFU/ml) were incubated in nutrient broth (pH 7) with NaCl at 37°C for 120 min.

Table 2. Effect of NaCl on adsorption of phages

Concn. (M)	Phage adsorbed (%)			
	T1	T3	T4	T5
0	80	45	95	95
1	35	30	70	55
2	15	25	55	40

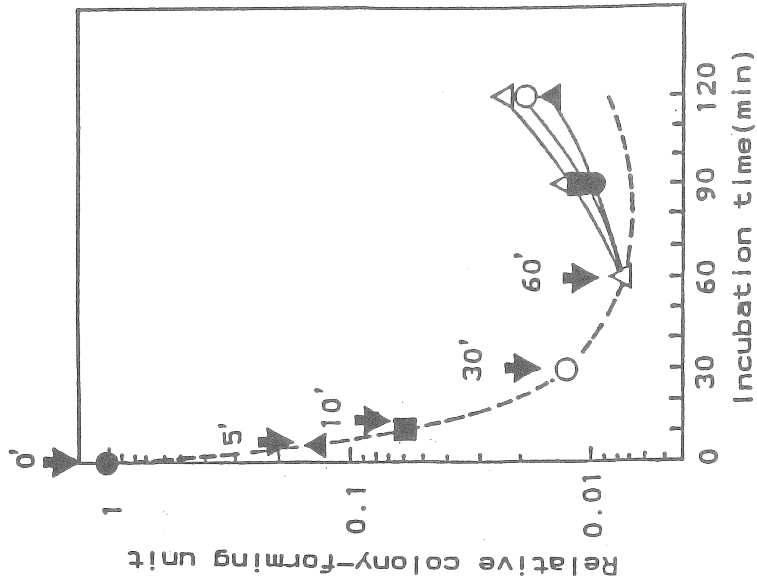
Bacterial cells ( $2 \times 10^8$  cells/ml) were mixed with phages at m.o.i. 1, and the mixture were incubated with NaCl at 37°C. The unadsorbed phages were assayed with 100-fold dilution of adsorption mixture, following the sedimentation of the adsorbed phagers by centrifugation.

Fig. 1.



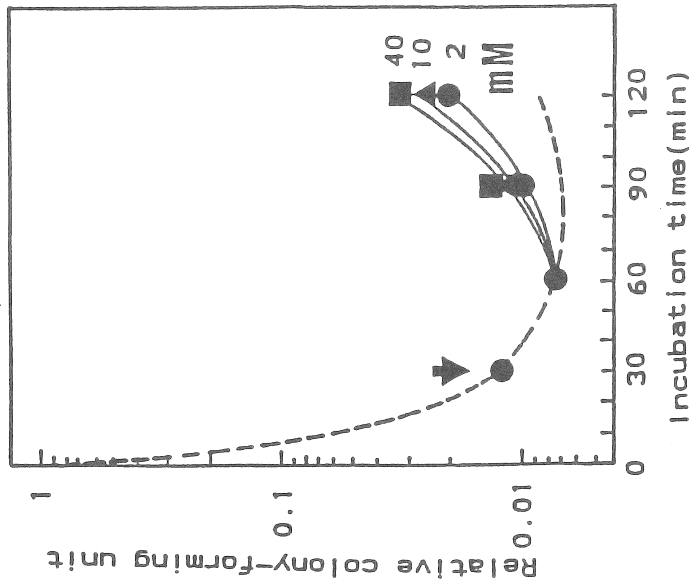
Effects of NaCl on cellular growth and colony-forming ability of *Escherichia coli* B

Fig. 3.



Effects of different added-time of 10 mM betaine on rehydration of colony-forming ability in 1.2 M NaCl upshocked culture of Escherichia coli B

Fig. 2.



Effects of different concentrations betaine on rehydration of colony-forming ability in 1.2 M NaCl upshocked culture of Escherichia coli B

Fig. 4.

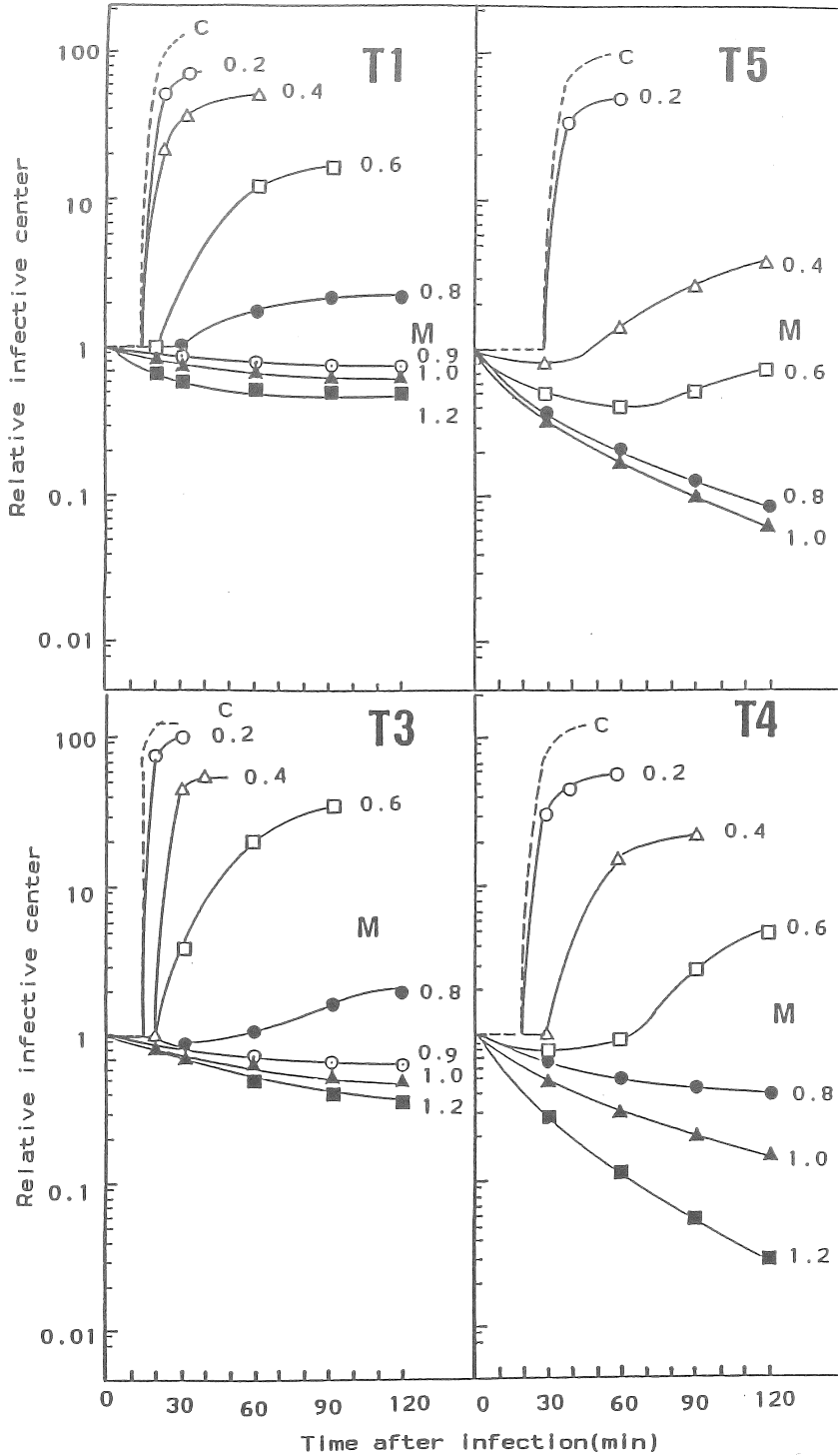
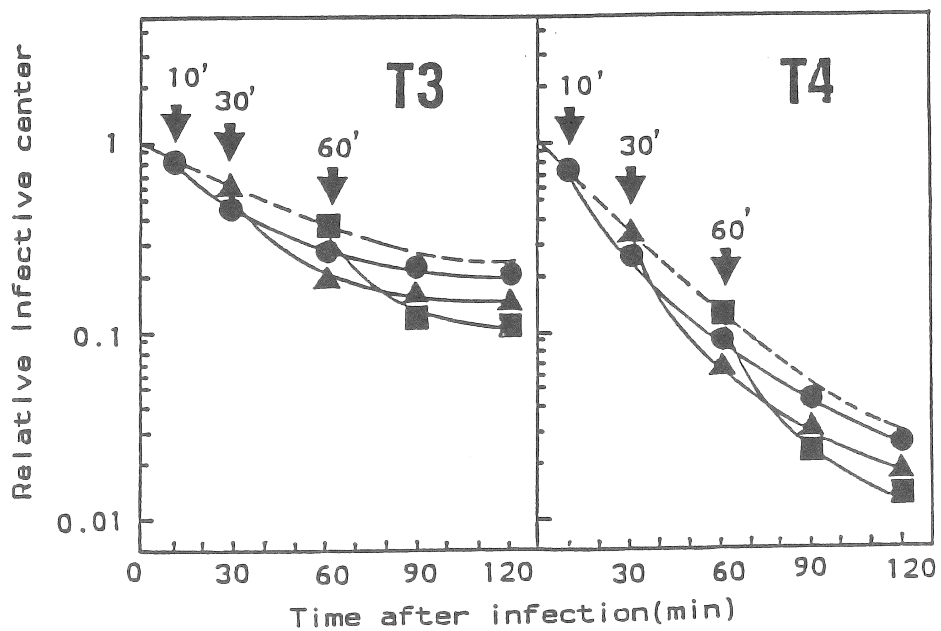


Fig. 5.



Effects of 10mM betaine on inhibition of phage growth by 1.2 M NaCl

## Effect of Salt on Bacteria-Phage System

### Part 2. Effect of salt on Escherichia coli B and phages T1, T3, T4 and T5

Akira Murata, Hiromu Tani, Daisuke Sato,  
Fumio Kato and Kohzo Kanda  
Department of Applied Biological Sciences,  
Saga University

#### Summary

Phage contamination is a serious problem in industrial fermentation processes employing bacteria. This problem has not been solved yet, although much work has been done. With the recent development of recombinant DNA technology, genetically modified bacteria have been increasingly employed for the large-scale production of useful substances. Studies on the prevention of phage contamination and the control of phages in industrial processes are currently of importance.

Effect of salt on phages has not been studied yet in relation to phage control. Therefore, we previously investigated the effect of salt on phages S1 and S2 and Escherichia coli K-12.

This paper describes the effect of salt on phages T1, T3, T4 and T5 and Escherichia coli B.

Salt completely inhibited the growth of bacterial cells at 0.8 M and more. Under these concentrations, colony-forming activity of cells decreased. This loss of colony-forming activity was not the results of cellular death, because the colony-forming ability was restored after treatment with betaine. Salt did not affect the infectivity of free phages. It inhibited the adsorption of phages onto host cells. It completely inhibited the growth of phages T1 and T3 at 0.9 M and more. It completely inhibited the growth of phages T4 and T5 at 0.8 M and more. With phages T1 and T3 the decreases in the infective centers were slow, but they were rapid with phages T4 and T5. The loss of plaque-forming activity was not restored after treatment of betaine.

These findings suggest the possible use of salt or the control of phages in industrial processes.