

細菌の増殖の観察

担当：片山葉子・多羅尾光徳

目的

細菌の増殖 growth を測定するには、(1) 顕微鏡による検鏡法 microscopic examination、(2) 寒天平板上に形成させた集落の数から培地中の細菌を求める集落計数 colony counting 法、(3) 培地中の細菌の濁度 turbidity を吸光光度計 spectrophotometer を用いて測定する比濁法 nephelometry、(4) タンパク質 protein などの細胞構成成分を測定する、などの方法がある。今回は、比濁法を用いて細菌が増殖する様子を観察する。

材料と方法

1. 培地・試薬・器具

- (1) 細菌培養用液体培地 liquid medium (P Y G培地。各班 1 つ)

ペプトン, 5 ; 粉末酵母エキス, 5 ; ブドウ糖, 1 ; リン酸水素二カリウム, 1 (単位は g/L)
pH 7.0~7.2 に調整する。

100 mL を坂口フラスコ Sakaguchi flask に入れ、シリコセン®をした後にオートクレーブ滅菌する。

- (2) 比濁度測定用のブランク・希釈用培地 (各班 1 つ)

(1)と同じ組成の培地 100 mL を 200 mL 容三角フラスコに入れ、シリコセン®をした後にオートクレーブ滅菌する。

- (3) 乾熱滅菌済みピペット

5 mL のメスピペット measuring pipette を各班 8 本、1 mL のメスピペットを各班 5 本。

1 本ずつ新聞紙に包み、乾熱滅菌 dry heat sterilization (180℃, 15 分)する。

- (4) サンプルング用試験管

- (5) 吸光光度計、吸光光度計用キュベット cuvette (各班 2 つ)

- (6) 使用微生物

Escherichia coli IAM12119

前日に前培養培地に植えつけて 30℃で振盪培養 shaking culture したものを、接種用菌液とする。

2. 操作手順

- (1) 前日から培養している細菌の接種用菌液 10 mL を、坂口フラスコの培地に無菌的に接種する。

- (2) ただちによく混和し、滅菌済み 5 mL メスピペットを用いて菌液 5 mL を試験管に移す。これを培養開始時の比濁度を測定するための菌液とする。

- (3) 坂口フラスコはただちに恒温振とう培養器にて 30℃でかくはんしながら培養する。

- (4) 採取した菌液をキュベットに7分目ほど注意深く入れ、吸光光度計を用いて 660 nm の波長 wave length で比濁度を測定する (OD₆₆₀ 値)。ブランク試料 blank sample には 1.(2)のブランク・希釈用培地を用いる。順番等の都合でただちに測定できない場合は、試験管に菌液を入れたまま水中に置いておく。
- (5) 最初の1時間目は 30 分ごとに、その後は1時間ごとにサンプリング sampling を行い、その都度(4)と同じ要領で菌液のOD₆₆₀ 値を測定する。細菌の成長にともなってOD₆₆₀ 値が 0.6 以上になってからは、希釈用培地を用いて 0.05~0.6 の範囲となるように希釈 dilute してから測定する。
- (6) 定常期 stationary phase になったと思われる時点で培養を終了してよい。

3. データの記録

培養時間 (hr.)	希釈率	OD ₆₆₀ 値	実際の OD ₆₆₀ 値
0			
0.5			
1			
2			
3			
4			
5			
6			

対数増殖期の比増殖速度： _____ / h

比増殖速度の求め方

細菌は二分裂 binary fission しながら連続的に増殖するから、無限に短い時間 dt に新たに増加した生物量 biomass dB は以下の関係式で表現される。

$$dB/dt = \mu B \quad (1)$$

このとき B は時間 t における生物量、 μ は比増殖速度 specific growth rate である。

(1)式の微分方程式 differential equation を解くと、(2)式が得られる。

$$B = B_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

このとき B_0 は時間 0 における生物量, e は自然対数の底 base of natural logarithm (ネイピア数 Napier's constant ともいう) である。

(2)式の両辺の自然対数をとると,

$$\log B = \mu t + \log B_0 \quad (3)$$

となり, 横軸を時間, 縦軸を生物量の自然対数とする片対数グラフ semilogarithm graph では, 対数増殖期 logarithmic phase には傾き μ の直線が得られる。

なお, 縦軸を生物量の常用対数 common logarithms (10 を底とする対数) とする片対数グラフでは, 以下の式の通りとなる。

$$\log_{10} B = 0.434 \mu t + \log_{10} B_0 \quad (4)$$

ただし, $\log_{10} e = 0.434$ としている。