

E. coli の硝酸塩還元作用による Aureomycin の定量*

中 野 道 紀

Quantitative Analysis of Aureomycin by the Nitrate Reducing Action of *E. coli*

By

Michinori NAKANO

It was Goth, Bush (1944) who investigated the method determining quantitative analysis of penicillin by means of the suspension of *staphylococcus*. Subsequently Nielson, Foter (1946) also described the method determining quantitative analysis of antibiotics with the suspension of *E. coli*.

On the other hand the author has recognized that it is possible to determine the method of quantitative analysis of aureomycin by the electric colorimetric method of nitrite which was reduced from *E. coli* TYCC 9637 after its cultivation of 37°C24 hours in nitrate media. The results obtained are as follows:

1. The author made the suspension of *E. coli* with nitrate media, and putting some of it a large test-tube, added to it aureomycin solution of the concentration, and determined nitrite which had been reduced from *E. coli* after the cultivation of 37°C24 hours by the colorimetric method.
2. $\text{KNO}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ media has been found suitable for the analysis of nitrite.
3. When *E. coli* within 10^8 — 10^9 /ml was inoculated into $\text{KNO}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ media, nitrite reduced from *E. coli* enabled us to determine by means of the dilution of suitable concentration.
4. Nitrite which had been reduced from *E. coli* after the cultivation of 37°C24 hours in $\text{KNO}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ media, was $1.85 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ per one *E. coli* inoculated, and it decreased to $1.66 \times 10^{-9} \mu\text{g}$ in the same media containing $100 \mu\text{g}$ aureomycin. This was 1/10 lower as compared with the former.

Aureomycin は比色法¹⁾又は Bioassay²⁾により定量される。

著者は *E. coli* の硝酸塩還元作用を利用して、この定量を試みた。

GOTH, BUSH (1944)³⁾は *Staphylococcus* の浮游液を使つて Penicillin の定量を行い又 NIELSON, FOTER (1946)⁴⁾は *E. coli* を使つて抗生物質を定量する方法を述べているが、著者は *E. coli* を24時間培養した後、その生成亜硝酸塩の比色定量から Aureomycin の定量が可能であることを知つたので報告する。

*水産講習所研究業績 第230号, 1957年7月25日 受理

使用菌株: *E. coli* TYCC 9637

実 験 方 法

A 測定前の *E. coli* の培養

M/10 磷酸塩緩衝液にて 4~5 回遠沈洗滌 (4000rpm) した後, 冷蔵庫に貯蔵した *E. coli* の適量 ($10^4 \sim 10^9$ /ml) を含む懸濁液を作り, その 18ml 宛を大試験管に分注し, これに各濃度の AM 溶液 2ml を加えて, 培地の AM 濃度を夫々 2.5, 25, 50, 75, 100 μ g としたもの及び AM を含まぬ培地 2ml を加えたものを対照として, 37°C 24 時間培養した後, 直ちに氷冷し, 10 分後 Amberlite IR-120 小量を加えて充分振盪し, 4000rpm 20 分遠沈した後, その上澄 10ml (濃度の濃すぎる時及び薄い時は適量) を共栓試験管にとり, 亜硝酸塩の定量に供した。

E. coli 接 種 量

上記方法により *E. coli* の接種量を変えて 37°C 24 時間培養した後, 下記測定法に従い硝酸塩還元による生成亜硝酸塩を定量して, その適量を決めた。結果は第 1 表に示す如く接種量が多ければ透過率は 2.0 を示し, 少い時は定量出来なかつた, この適量は培地 20ml に対し 4~8 mg (wet) ($10^5 \sim 10^9$ /ml) である。

Table 1. Relation between the concentration of *E. coli* TYCC 9637 and transmittance of nitrite reduced from nitrate after cultivation of 37°C 24 hours.

E. coli Concentration		Transmittance of nitrite (%)
mg/20ml (wet)	No./ml	
4	1.5×10^4	46.7
6	—	24.0
8	2.7×10^9	2.0

Table 2. Composition of NaNO₃ · Glucose Media.

Components	Amount
NaNO ₃	0.2
P-amiobenzoic acid	0.5
CaCl ₂ · 6H ₂ O	0.5
Glucose	10
M/10 phosphate buffer solution (pH 6.47)	100 (ml)

Diluted with CO₂ free distilled water to 1000 ml finally.

b) KNO₃ · C₂H₅OH Media

第 3 表に示す培地は *E. coli* を接種して 37°C 24 時間培養後の亜硝酸塩生成量が多く, その生成亜硝酸塩を光電比色定量する場合, その値が比較的安定であることを認めたのでこの培地を使用することにした。

B 光電比色計による亜硝酸塩の定量

培 地

次に示す a) · b) の培地について夫々 *E. coli* 懸濁液として, その 18ml に各使用濃度の AM 溶液 2ml を加えたもの及び対照とについて 37°C 24 時間培養後, その生成亜硝酸塩を比色定量して決めた。

a) NaNO₃ · Glucose Media

第 2 表に示す培地は亜硝酸塩の定量に操作が複雑で不適當とした。

Table 3. Composition of KNO₃ · C₂H₅OH Media.

Components	Amount
K ₂ HPO ₄	0.5
KNO ₃	10.
C ₂ H ₅ OH	5. (ml)
M/10 phosphate buffer solution (pH 6.47)	100. (ml)

Diluted with CO₂ free distilled water to 1000 ml finally.

測定法

Griess が考案の Ilosvary, Lunge 法によつて行つた。即ち試料10mlにM/10磷酸塩酸緩衝液 (pH 6.47) 10ml を加えて更に GR 試薬約 0.2g を入れて5分間振盪した後、20°C の水槽に5分間浸漬して測定した。(室温20°C位時は30~60秒振盪して可及的迅速に測定した。)測定値は1~10分の最も安定した透過率を採つた。室温20°C内外では5~9分が適当であつた。

検量線は精秤せる NaNO_2 を蒸溜水にとかして NO_2 態N量0.1mg/ml のものを原液とし、蒸溜水で NO_2 態Nを $1\mu\text{g/ml} \sim 0.1\mu\text{g/ml}$ としたものと、及 $\text{KNO}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 培地にて NO_2 態N $1\mu\text{g/ml} \sim 0.1\mu\text{g/ml}$ としたものについてその透過率より作成した。この場合、蒸溜水にて調製したものは、その10ml 及 M/10磷酸緩衝液 (pH 6.47) 10ml を加えた。 $\text{KNO}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 培地にて調製した場合はこの10ml に AM 100 μg の溶液 1ml を加え更に M/10 磷酸緩衝液 (pH 6.47) 9ml を加えた。

AM による黄色着色は培地に対しその濃度 100 μg の場合でも亜硝酸塩定量にあまり影響せず、AMの濃度差による着色差は亜硝酸塩定量に差支えないことを確めた。

検量線は第1図に示した。

試薬

a) Griess Reagent (GR)

次の組成からなるもので、これは充分注意して粉末とした後褐色瓶に貯蔵した。

α -naphthylamine 1.0g, sulphanylic acid 10.3g, tartaric acid 89.2g

b) Aureomycin Solution (AM)

AM は武田製薬オウレオマイシン (九大富山研究室分析値94%) 0.100g を蒸溜水100ml にとかして、冷蔵庫に貯蔵し、培養時使用濃度に希釈して培地18ml に対し2ml を加えた。これは其の都度調製した。

実験結果

1) 検量線は上記方法により第1図を得た。

この場合蒸溜水にて作成したものと $\text{KNO}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 培地にて作成したものはその値に差が認められたが完全に平行した。

後者が透過率が小さく、測定時比較的安定であつた。

AM 濃度差による着色の影響は殆んど認められなかつた。

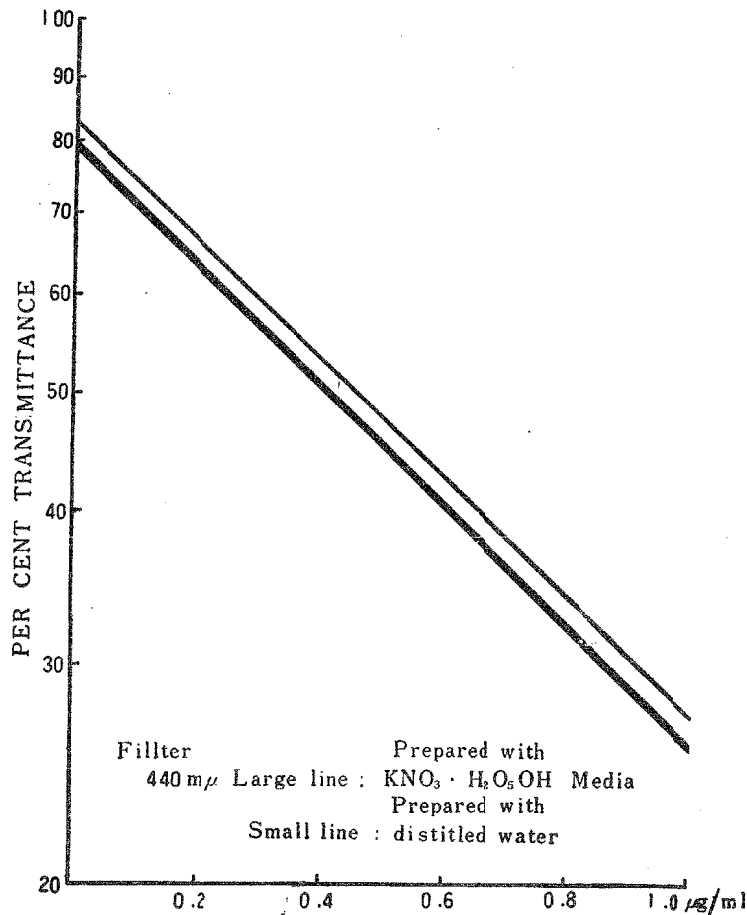


Fig. 1. Relationship between quantity of NaNO_2 and transmittance.

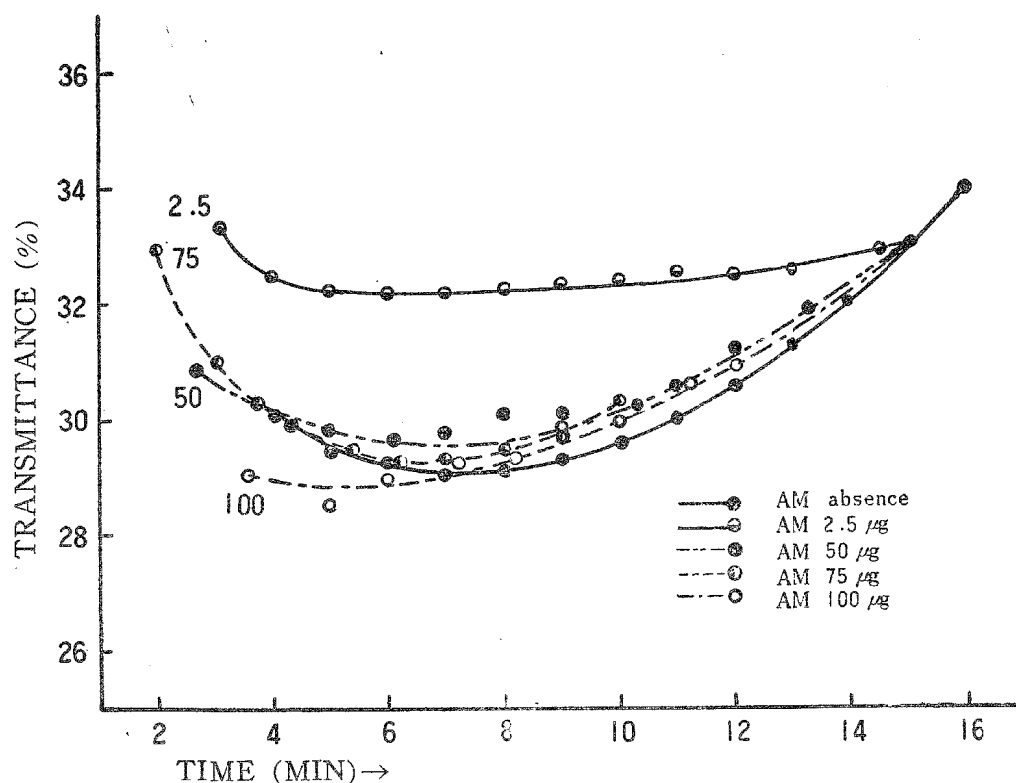


Fig. 2. Comparative transmittance change after adding the Griess reagent due to the different aureomycin concentration.

GR投入后5~9分の透過率が小さく安定した値を示した。即第2図の如くである。

2) *E. coli* TYCC 9637 の硝酸塩還元作用による AM の定量

実験の方法は前記A及Bに従って行つた。

今、最初の *E. coli* 接種量を 30mg/100ml とした培地を 18ml 宛分注し、AM 濃度を 100µg・50µg・25µg・2.5µg とした場合について、この方法を検討してみよう。

この場合、遠沈した上澄 0.2ml をとり定量し、第4表に示す結果を得た。

Table 4. Transmittance change of nitrite reduced from *E. coli* TYCC 9637 after cultivation of 37°C 24 hours in different aureomycin concentration of media.

AM Concns. (µg/ml)	Times				
	1	2	3	4	5
2.5	28.0	28.2	28.0	28.0	28.0
25	30.4	30.2	30.2	30.2	30.2
50	37.0	37.0	37.2	37.0	37.0
100	48.2	48.2	48.0	48.0	48.0
absence	26.0	26.0	26.2	26.0	26.0

この値から *E. coli* TYCC 9637 の 37°C 24 時間培養による亜硝酸塩生成量は第1図を用いて次の如く計算出来る。

E. coli 培養液 0.2ml 中の NO₂ 態 N は第1図にて 1.0µg/ml に当る。この検量線は KNO₃・C₂H₅OH 培地にて作成してあるから、この培養液中の亜硝酸態 N 量は 50µg/ml に当る。この培養時の菌数は 2.7×10⁹/ml (培養時、普通寒天平板培養した) である故 菌1個あたりの亜硝酸態 N 生成量は 50µg/

2.7×10⁹/24hrs = 1.85×10⁻⁸µg/24hrs である。AM 100µg の場合は同様計算して

$1.77 \times 10^{-9} \mu\text{g}/24\text{hrs}$ でこの AM は 94% である故 $1.66 \times 10^{-9} \mu\text{g}/24\text{hrs}$ で 1/10 以下に低下している。従つてこの様にして *E. coli* の硝酸塩還元作用による亜硝酸塩生成量を定量して Aureomycin を定量出来る。

摘 要

E. coli TYCC 9637の硝酸塩還元作用を利用して Aureomycin の定量を試み極めて簡単に定量出来た、その方法は

1) *E. coli* を硝酸塩を含む培地の懸濁液とし、これに既知濃度のAM溶液を加え37°C24時間培養後その生成亜硝酸塩を光電比色定量する。

2) この培地としては $\text{KNO}_3 \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 培地が適当である。

3) *E. coli* 接種量は $10^5 \sim 10^9/\text{ml}$ なら亜硝酸塩定量時適当に希釈して定量出来る。

4) この培地を使つて37°C24時間培養後の亜硝酸塩生成量は接種菌量1個当り $1.85 \times 10^{-8} \mu\text{g}/24\text{hrs}$ でAM濃度100 μg の場合は $1.6 \times 10^{-9} \mu\text{g}/24\text{hrs}$ で1/10以下に低下している。

文 献

- 1) SNELL, F. D. and C. T. SNELL. 1954. *Colorimetric Methods of Analysis* 3rd ed. Vol. 3. D. Van Nostrand Co. Inc.
- 2) BAINARD, H. D. 1949. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70**, 318.
DORNBUSH A. C. 1948. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 218.
DOWLING et. al. 1949. *J. Clin. Invest.*, **28**, 983.
WHITLOOK C. M. 1949. *J. Lab. Clin., Med.* **32**, 12.
RANDALL et al. 1949. *J. Clin. Invest.*, **28**, 940.
桂 重鴻・原 義雄: 1951. *J. Antib.*, **4** (B), 52.
小島碩夫・川上保雄・鳥井敏雄・芦田昭夫: 1950. *J. Antib.*, **3**, 786.
片桐 謙・井上正男・下平正文: 1951. *J. Antib.*, **4**, 373.
宮村定男・金沢 裕: 1951. *J. Antib.*, **4**, 380.
大久保滉・古川牧一・藤本安男: 1951. *J. Antib.*, **4**, 576.
- 3) GOTH and BUSH. 1944. *Ind. Eng. Chem.*, (Anal. Ed.) **16**, 451.
- 4) NIELSON and FOTER. 1946. *J. Bact.*, **51**, 404.