

〔醸酵工学会誌 第67巻 第3号 147-152. 1989〕

## オルトフェニルフェノールの *Escherichia coli*- ファージ系および *Bacillus subtilis*- ファージ系に対する作用

呉 偉巍<sup>2</sup>・久野 倫子<sup>1</sup>・加藤富民雄<sup>1</sup>・村田 晃<sup>1\*</sup>佐賀大学農学部応用生物科学科<sup>1</sup>, 西北大学生物学系微生物学科<sup>2</sup>

(昭和64年1月6日受付 平成元年2月3日受理)

Effects of *o*-phenylphenol on *Escherichia coli*-phage systems and *Bacillus subtilis*-phage systems. WEI-WEI WU,<sup>2</sup> MICHIKO HISANO,<sup>1</sup> FUMIO KATO,<sup>1</sup> and AKIRA MURATA<sup>1\*</sup> (Department of Applied Biological Sciences, Saga University, Saga 840,<sup>1</sup>; Department of Microbiology, Northwest University, Xian, People's Republic of China<sup>2</sup>) Hakkokogaku 67: 147-152. 1989.

We had found that *o*-phenylphenol (OPP) induced marked premature lysis of phage-infected cells in the *Lactobacillus casei*-phage J1 system.

This paper describes the effects of OPP on *Escherichia coli*-phage systems (T1, T3, T4, T5, and  $\phi \times 174$ ) and *Bacillus subtilis*-phage systems (M2 and SPO1). OPP was bactericidal at  $8-10 \times 10^{-4}$  M. At these concentrations, it did not affect the infectivity of free phages or adsorption of phages onto host cells. It inhibited the growth of phages. The number of infective centers decreased with T4, T5, M2, and SPO1, but not with T1, T3, and  $\phi \times 174$ .

OPP induced moderate premature lysis of cells infected with T4 and T5, while it inhibited the lysis of cells infected with T1, T3, and  $\phi \times 174$ . It induced mild lysis of cells infected with M2 and SPO1, but this was not specific for phage-infected cells.

著者らは、細菌利用工業におけるファージ制御に食品添加物を用いるという、食品添加物の新用途の開発を目指して、食品添加物として公定されているビタミンC,<sup>1-6)</sup> エリソルビン酸,<sup>7)</sup> 保存料および殺菌料,<sup>8-11)</sup> 低級脂肪酸モノグリセリド<sup>12)</sup> などのファージに対する作用について一連の研究を行っている。

オルトフェニルフェノール (OPP) は、食品添加物の保存料として公定されていて、柑橘類の腐敗防止に使用されているが、ファージに対する作用については研究されていなかった。そこで、OPP の *Lactobacillus casei*-J1 ファージ系に対する作用について研究したが、そのとき、OPP がファージ感染菌の早期溶菌を誘起

することを見出した。<sup>13)</sup>

一般に知られているファージ感染菌溶菌剤は、潜伏期の前半に添加したときには溶菌を起こさず、潜伏期の後半に添加したときに溶菌を起こす。<sup>14)</sup> これは、作用機序からみて、感染後期に合成されるファージエンドリジンの細胞内蓄積と関係があるためである。つまり、溶菌の本質は、ファージエンドリジンの働きによる酵素的なものである。

これに対して、OPP による溶菌は、ファージエンドリジンが合成されない感染初期に添加しても直ちにみられる非酵素的なものである。その作用機序として、ファージの感染によって透過性の増大した細胞膜を通過して OPP が細胞内に入り、細胞の表面圧が著しく増大するために、物理的に溶菌が誘起されると考え

\* 連絡先, Corresponding author

ている。<sup>13)</sup>

本報では、ファージ感染菌に対する OPP の早期溶菌誘起作用が、*Lactobacillus casei*-J1 ファージ系に特異的なものか、他の菌-ファージ系でもみられる一般的なものかを知るために、*Escherichia coli* の5つのファージ系および *Bacillus subtilis* の2つのファージ系を用いて研究した結果を報告する。

### 実験方法

**試薬** OPP は、東京化成工業㈱の *o*-フェニルフェノールナトリウムを使用した。その他の試薬は、和光純薬工業㈱の製品を使用した。

**菌-ファージ系** *Escherichia coli* B の T1, T3, T4, T5 ファージ、*Escherichia coli* C の  $\phi$ ×174 ファージ、および *Bacillus subtilis* Y の M2, SP01 ファージを使用した。この7種のファージは、それぞれ、形態、その他の性状が相違している。<sup>7)</sup>

**培地** 通常のブイヨン培地に  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.05%) と  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.03%) を添加したものをを使用した。pH は7.0である。

**培養** 斜面培養の1白金耳を液体培地に接種し、モノ一式振盪培養装置(中島製作所)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2~4容量%接種して3~4時間振盪培養し、培養液の660nmにおける吸光度が約0.4になっ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°Cである。

**培養濁度の測定** L型試験管を用いて培養し、スペクトロニック20光電比色計(島津-Bausch-Lomb)で660nmの吸光度を測定した。

**菌およびファージの計数** 通常のコロニーカウント法および重層法によるプラークカウント法によった。

**ファージの吸着** 菌( $2 \times 10^8$  cells/ml)にファージを m.o.i. 約1になるように混和し、37°Cで5分間吸着させた。次いで、氷冷したリン酸緩衝液(0.01 M, pH 7.0)で100倍希釈し、遠心分離(8,000 rpm, 15分)、上清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。

**ファージの一段階増殖** 菌( $2 \times 10^8$  cells/ml)にファージを m.o.i. 約0.1になるように混和し、3分間吸着させた。次いで、2分間の血清処理を行った後、感染菌数が  $1 \times 10^3$ /ml になるように培地で希釈した。これを培養し、経時的に感染中心数(感染菌+遊離ファージ)を計数した。培養温度は37°Cである。

**その他** ファージに関するその他の実験方法は、Adams<sup>15)</sup> がまとめて記載した標準法によった。

### 実験結果

**菌に対する OPP の作用** ファージの宿主菌である *Escherichia coli* の B と C、および *Bacillus subtilis* Y に対する OPP の作用について検討した。

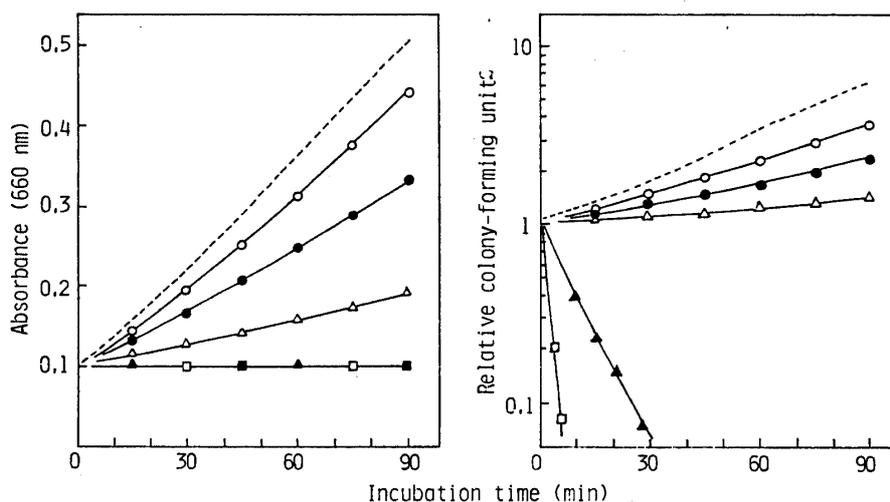


Fig. 1. Effects of *o*-phenylphenol on cell growth and colony-forming ability of *Escherichia coli* B.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were incubated in bouillon broth with OPP at 37°C. The initial number of cells is represented as 100%.

Concentrations of OPP: ---, 0 M; ○,  $2 \times 10^{-4}$  M; ●,  $4 \times 10^{-4}$  M; △,  $6 \times 10^{-4}$  M; ▲,  $8 \times 10^{-4}$  M; □,  $1 \times 10^{-3}$  M; ■,  $2 \times 10^{-3}$  M.

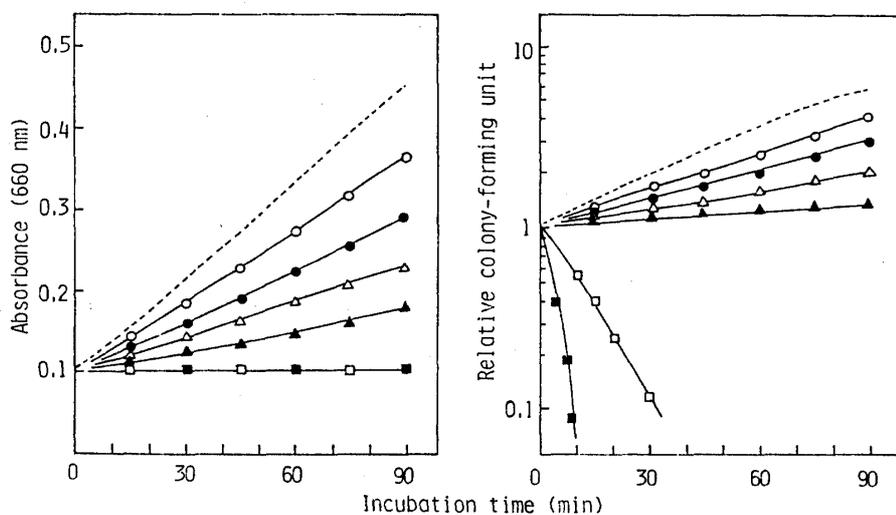


Fig. 2. Effects of *o*-phenylphenol on cell growth and colony-forming ability of *Bacillus subtilis* Y.

See the legend to Fig. 1.

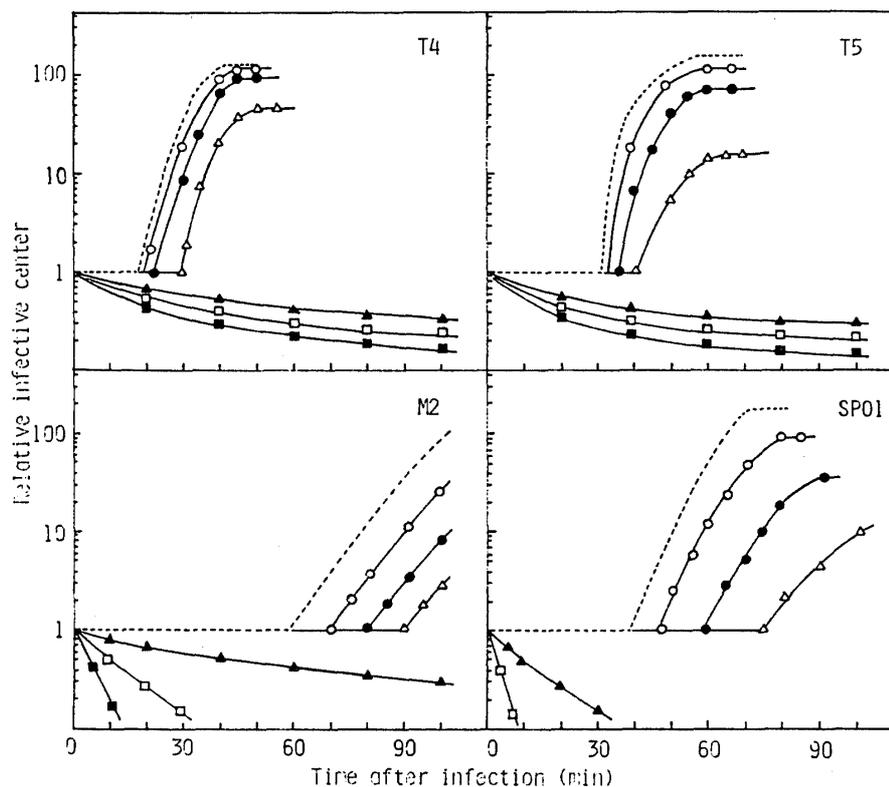


Fig. 3. Effects of *o*-phenylphenol on one-step growth of phages.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were infected with phages (m.o.i., about 0.1). After 3 min of adsorption and 2 min of antiserum treatment, the infected cells were diluted 1:2000 into bouillon broth with OPP and incubated at 37°C. The number of initial infected cells is represented as 1.

Concentrations of OPP: see the legend to Fig. 1.

Fig.1 に *Escherichia coli* B に対する OPP の作用を示す。図の左側に示すように、培養濁度（生育）に及ぼす影響は、 $1 \times 10^{-4}$  M 付近からみられはじめ、 $8 \times 10^{-4}$  M で生育は完全に阻害された。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。この実験において、培養液から経時的に試料を採り、コロニー形成単位の計数を行った。図の右側に示すように、菌の生育が完全に阻害される濃度では、コロニー形成単位が次第に減少した。すなわち、 $8 \times 10^{-4}$  M およびそれ以上の濃度では、OPP は殺菌的に作用することが示された。それ以下の濃度では、コロニー形成単位の減少はみられず、OPP の作用は静菌的であった。

また、*Escherichia coli* C に対する OPP の作用について検討した。*Escherichia coli* B との違いは、 $8 \times 10^{-4}$  M では静菌的で、生育を完全に阻害し殺菌的に作用する濃度が、 $1 \times 10^{-3}$  M と少し高いことだけであった。

Fig.2 に *Bacillus subtilis* Y に対する OPP の作

用を示す。生育は、 $1 \times 10^{-4}$  M すぎから濃度が高くなるにつれて次第に阻害され、 $8 \times 10^{-4}$  M で完全に阻害された。 $1 \times 10^{-3}$  M およびそれ以上の濃度では、*Escherichia coli* の場合と違って、培養濁度の減少、すなわち溶菌がみられた。また、この濃度では、コロニー形成単位の著しい減少がみられた。それ以下の濃度では、コロニー形成単位の減少はみられず、OPP の作用は静菌的であった。

**ファージに対する OPP の作用** 遊離状態にある7種のファージに対する OPP の直接作用について検討した。その結果、殺菌的濃度の  $2 \times 10^{-3}$  M においても、ファージに対して不活化作用を示さないことが分かった。

**ファージの吸着に対する OPP の作用** 7種のファージの宿主菌への吸着に対する OPP の作用について検討した。その結果、殺菌的濃度の  $2 \times 10^{-3}$  M においても、ファージの吸着を阻害しないことが示された。

**ファージの増殖に対する OPP の作用** 7種のフ

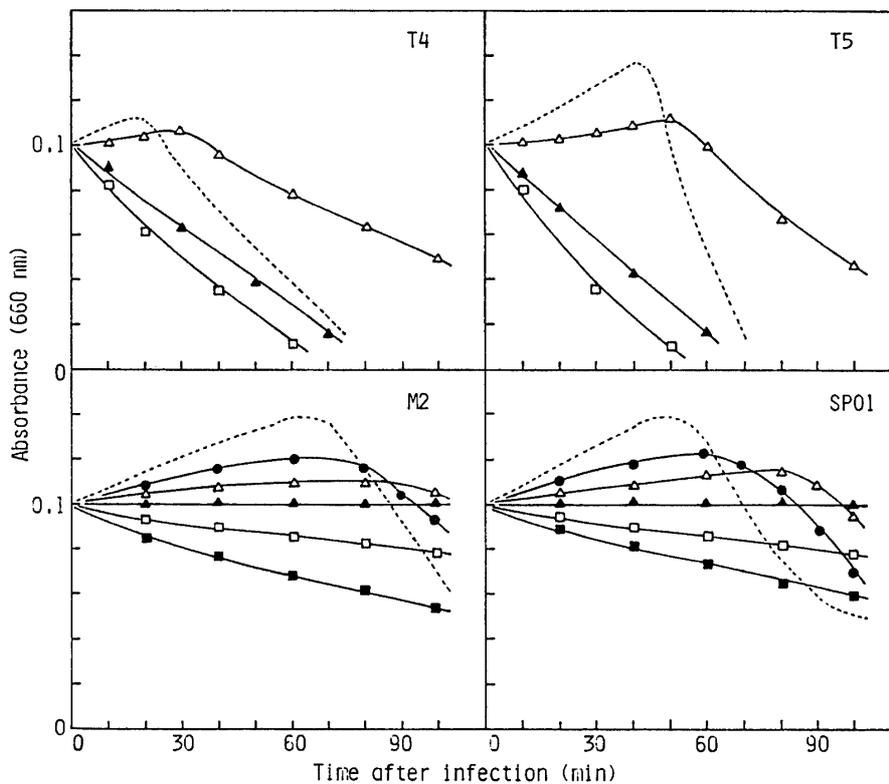


Fig. 4. Effects of *o*-phenylphenol on lysis of phage-infected cells.

Bacterial cells ( $2 \times 10^8$ /ml) were infected with phages (m.o.i., about 1) and the infected cells were incubated with OPP at 37°C.

Concentrations of OPP: see the legend to Fig. 1.

フェージの増殖に対する OPP の作用について、一段階増殖実験法で検討した。

*Escherichia coli* B を宿主とする T1, T3, T4, T5 フェージでは、宿主菌の殺菌的濃度である  $8 \times 10^{-4} \text{M}$  およびそれ以上において、フェージの増殖は完全に阻害された。T1 と T3 フェージでは、感染中心の減少はみられなかったが、Fig. 3 に示すように、T4 と T5 フェージでは、比較的ゆるやかな感染中心の減少がみられた。 $8 \times 10^{-4} \text{M}$  以下の濃度では、いずれのフェージとも、潜伏期の延長とバーストサイズの減少がみられた。なお、宿主菌の生育に影響しない  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  以下の濃度では、フェージ増殖に対する影響はみられなかった。

*Escherichia coli* C を宿主とする  $\phi \times 174$  フェージでは、殺菌的濃度の  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  およびそれ以上において、フェージの増殖は完全に阻害されたが、感染中心の減少はみられなかった。 $8 \times 10^{-4} \text{M}$  およびそれ以下の濃度では、T系フェージの場合と同様であった。

*Bacillus subtilis* Y の M2 と SP01 フェージでは、Fig. 3 に示すように、宿主菌の生育が完全に阻害される  $8 \times 10^{-4} \text{M}$  およびそれ以上の濃度において、フェージの増殖は完全に阻害された。また感染中心の減少がみられたが、同じ濃度では、SP01 フェージの方が著しかった。 $8 \times 10^{-4} \text{M}$  以下の濃度では、潜伏期の延長とバーストサイズの減少がみられた。 $1 \times 10^{-4} \text{M}$  以下の濃度では、フェージ増殖に対する影響はみられなかった。

フェージ感染菌の溶菌に対する OPP の作用 7 種のフェージについて、フェージ感染菌の溶菌に対する OPP の作用を検討した。

*Escherichia coli* B を宿主とする T1, T3, T4, T5 フェージでは、殺菌的濃度の  $8 \times 10^{-4} \text{M}$  およびそれ以上において、T1 と T3 フェージの場合、溶菌は完全に阻害された。これに対して、T4 と T5 フェージでは、Fig. 4 に示すように、OPP を添加すると直ぐにフェージ感染菌の溶菌が始まり、数十分以上にわたって続くことが示された。

*Escherichia coli* C を宿主とする  $\phi \times 174$  フェージでは、殺菌的濃度の  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  およびそれ以上で、フェージ感染菌の溶菌は完全に阻害された。

*Bacillus subtilis* Y を宿主とする M2 と SP01 フェージでは、Fig. 4 に示すように、殺菌的濃度の  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  およびそれ以上において、濁度のゆるやかな減少がみられた。生育は完全に阻害するが静菌的な  $8 \times$

$10^{-4} \text{M}$  では、濁度の減少はみられなかった。

7種すべてのフェージにおいて、OPP 無添加の対照では、溶菌に先立って濁度が上昇するが、OPP を添加した場合には、このような濁度の上昇はほとんどみられなかった。また、 $8 \times 10^{-4} \text{M}$  以下の濃度では、濁度がある程度上昇してから溶菌するが、溶菌開始は遅れ、溶菌速度も低下することが示された。なお、 $1 \times 10^{-4} \text{M}$  以下の濃度では、フェージ感染菌の溶菌に対する影響はみられなかった。

## 考 察

OPP のフェージに対する作用については、従来知見がなかった。そこで著者らは、*Lactobacillus casei*-J1 フェージ系を用いて研究し、次のことを知った。<sup>13)</sup> (1)OPP は、宿主菌に対して  $2 \times 10^{-3} \text{M}$  で殺菌的に作用する。(2)殺菌的濃度においてフェージを不活化しない。(3)フェージの吸着を阻害しない。(4)フェージの増殖を阻害する。このとき感染中心が急速に減少する。(5)フェージ感染菌の早期溶菌を誘起する。

本研究は、*Escherichia coli* の5つのフェージ系(T1, T3, T4, T5,  $\phi \times 174$ ) および *Bacillus subtilis* の2つのフェージ系(M2, SP01) に対する OPP の作用について研究したものである。

宿主菌に対する OPP の作用は、菌株によって少し相違するが、 $8 \sim 10 \times 10^{-4} \text{M}$  では殺菌的であった。既報の *Lactobacillus casei* の  $2 \times 10^{-3} \text{M}$  に比べ、半分以下の濃度である。

OPP の殺菌的濃度において、フェージ不活化作用はみられず、またフェージの吸着に対する阻害もみられなかった。これは、J1 フェージの場合と同じである。

OPP は、フェージの増殖を阻害したが、宿主菌の殺菌的濃度においてであり、フェージの増殖阻害と宿主菌の生育阻害との間に選択的な濃度差は認められなかった。*Bacillus subtilis* Y-SP01 フェージ系では、静菌的な濃度でもフェージ増殖は阻害されたが、宿主菌の生育は完全に抑えられる濃度であり、ここでも選択的な濃度差はみられない。

本研究は、細菌利用工業におけるフェージ制御を目的とするものであるが、*Lactobacillus casei*-J1 フェージ系の場合と同様、*Escherichia coli* と *Bacillus subtilis* のフェージ系においても、使い方を工夫しない限り、OPP を用いるフェージ制御は、実用上の価値がほとんどないと考えられる。

OPP の殺菌的濃度でファージの増殖が阻害される  
とき、T4, T5, M2, SP01 ファージでは、感染中心の  
減少がみられた。 *Escherichia coli* の T4 と T5 ファ  
ージでは、比較的ゆるやかな減少であったが、 *Bacillus*  
*subtilis* の M2 と SP01 ファージでは、急速な減少で  
あった (Fig. 3)。 M2 と SP01 ファージにおける感染  
中心の減少は、 *Lactobacillus casei* の J1 ファージの  
場合と類似しており、早期溶菌によるようにみえたが、  
実際に培養濁度を測定すると、著しい溶菌はみられず、  
培養濁度のゆるやかな減少が続くだけであった (Fig.  
4)。 *Bacillus subtilis* Y の場合、ファージ非感染菌で  
もOPP のこの濃度では、培養濁度のゆるやかな減少  
がみられるので (Fig. 2)、ファージ感染菌の培養濁度  
減少は、ファージと無関係なものであると考えられる。  
したがって、感染中心の著しい減少は、早期溶菌によ  
るものではなく、感染菌細胞内におけるファージゲノ  
ムの喪失ないし複製阻害によるものであろう。

これに対して、T4 と T5 ファージにおける感染中  
心の減少は、早期溶菌によるものである (Fig. 3, 4)。  
しかし、この場合、OPP によるファージ感染菌の早期  
溶菌は、OPP の添加から溶菌完了まで数十分以上を  
要する穏和なものであって、約10分で溶菌が完了する  
J1 ファージの場合とは違っている。早期溶菌の作用機  
序については、J1 ファージの場合と基本的には同様で  
あって、ファージの感染によって透過性の増大した細  
胞膜を通過して OPP が細胞内に入り、細胞の表面圧  
が著しく増大するために、物理的に溶菌すると考えら  
れる。

#### 要 約

食品添加物の保存料として公定されているオルトフ  
ェニルフェノールの *Escherichia coli* の5つのファ  
ージ系 (T1, T3, T4, T5,  $\phi \times 174$ ) および *Bacillus subtilis*  
の2つのファージ系 (M2, SP01) に対する作用につい  
て研究し、次のことが分かった。

(1)宿主菌に対して  $8 \sim 10 \times 10^{-4}M$  で殺菌的に作用  
する。(2)殺菌的濃度において、ファージを不活化しな  
い。(3)ファージの吸着を阻害しない。(4)ファージの増  
殖を阻害する。T4, T5, M2, SP01 ファージでは、感  
染中心が減少する。(5)T4 と T5 ファージでは、ファ  
ージ感染菌の早期溶菌を誘起する。しかし、既報の  
*Lactobacillus casei*-J1 ファージ系の場合に比べると、  
溶菌速度が遅い。(6)M2 と SP01 ファージでみられる  
感染中心の減少は、早期溶菌によるものではない。

#### 文 献

- 1) Murata, A., Kitagawa, K., Saruno, R.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 294-296 (1971).
- 2) Murata, A., Kitagawa, K., Inmaru, H., Saruno, R.: *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2597-2599 (1972).
- 3) Murata, A., Kitagawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1145-1151 (1973).
- 4) Murata, A., Oyadomari, R., Ohashi, T., Kitagawa, K.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 261-269 (1975).
- 5) Murata, A., Uike, M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 347-354 (1976).
- 6) Murata, A., Suenaga, H., Hideshima, S., Tanaka, Y., Kato, F.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1481-1487 (1986).
- 7) Murata, A., Kawasaki, M., Motomatsu, H., Kato, F.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 559-567 (1986).
- 8) 村田 晃, 白浦義則: *農化*, **47**, 65-72 (1973).
- 9) 村田 晃: *農化*, **47**, 217-222 (1973).
- 10) 村田 晃, 池田光宏, 光武隆久, 添田栄一, 猿野琳次郎: *農化*, **47**, 267-274 (1973).
- 11) Murata, A., Mitsutake, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1763-1764 (1973).
- 12) 村田 晃, 築山真一, 加藤富民雄, 猿野琳次郎: *醸酵工学*, **56**, 718-724 (1978).
- 13) 村田 晃, 呉 偉巍, 新田直樹, 加藤富民雄: *農化*, **60**, 1017-1021 (1986).
- 14) Brown, A.: *J. Bacteriol.*, **71**, 482-490 (1956).
- 15) Adams, M. H.: *Bacteriophages*, pp. 443-522, Interscience Publishers, New York (1959).