

牛氣腫疽菌 芽胞에 對한 몇가지 化學劑의 發芽促進 試驗

서울市立農業大學

徐 富 甲

1. 緒 論

芽胞形成菌에 있어서의 發芽促進이나 芽胞形成 抑制作用을 爲한 化學藥品의 使用法이라는가 또는 各種 要因을 添加하는 方法에 對하여서는 이미 오래前부터 여러 學者들에 依하여 研究된 바 있으나 牛氣腫疽菌에 對한 이와 같은 研究는 아직 없는것으로 알고 있다.

Kaplan과 Williams(1941)는 嫌氣性細菌間의 芽胞形成率을 研究한 結果 培地內에 1%의 醱酵性 糖類의 存在는 芽胞形成을 抑制하나 1% lactose의 存在는 오히려 芽胞形成率을 促進할것이며 同時에 1% 醱酵性 糖 培地라 할지라도 一定한 少濃度의 窒素分이 含有되었을 때에 限하여서만 芽胞形成이 抑制될 수 있다는 事實을 밝힌 바 있다.

또 Tarr(1933)와 Evans (1943)는 芽胞形成菌을 培養하기 前에 加熱을 하면 發芽能力이 促進된다 하였고, Knaysi(1945)는 正常 菌體가 酵素의 存在下에서 飢餓 狀態로 되었을 때에 芽胞形成이 가장 잘 促進되는 同時에 이것이 發育하기에 滿足할만한 條件에 놓여지게 되면 發芽하기 始作한다고 하였다.

한편 Foster와 Wynne(1948), 그리고 Klienberger-Nobel(1951) 등은 培地中에 oleic acid 나 linoleic acid와 같은 脂肪酸이 存在할 때에는 發芽能力이 遲延되거나 不規則해지는 反面에 80°C에서 短時間 加熱을 하면 오히려 發芽能力이 促進됨을 確認한 바 있다.

그리고 Foster와 Heiligman(1949)는 芽胞形成 阻止가 K-ion에 關係있을 뿐 아니라 礦物性鹽類 混合을 強化시킨 Pepton 培地에서는 더욱 芽胞形成이 抑制된다는 事實을 實驗 報告한 바 있다.

Hills(1949)와 Powell(1950)은 L-alanine이 加熱하지 않은 炭疽菌 芽胞의 發芽를 刺戟한다 하였으며, Foster(1950)은 Bacillus larvae를 培養할 때에 培地內에 芽胞形成 阻止因子가 存在하며 이 因子를 除去하는데는 活性炭素를 加入하므로써 吸着시킬 수 있다고 하였다.

또 Hills(1950)는 芽胞形成 好氣性桿菌의 發芽는 加熱하던가 L-alanine이나 manganese을 混合 添加한 培地에서 培養하므로써 促進된다고 밝혔다.

그런데 Harrell(1954)은 芽胞의 L-alanine 固定作用은 簡單하게 吸着되는것이 아니라고 하였던 바 그後 모든 學者들은 이에 關心을 갖고 L-alanine의 効用性에 對하여 많은 研究를 하였던 것이다.

그 밖에도 Mudd(1951)는 Bacillus cereus가 glucose 添加로 芽胞形成이 刺戟되며, D-alanine에 依하여 芽胞形成이 阻止되지만 이 때 酵母 抽出液을 使用하면 그 阻止作用을 除去할 수 있다 하였고, Levinson과 Sevag(1953)는 Bacillus megaterium의 芽胞는 加熱하고 加熱하지 않음에 따라 그의 發芽率에 큰 差異를 招來할 뿐만 아니라 加熱하지 않는 代身에 manganese을 添加할 때에는 加熱했을 때 처럼 發芽率이 促進되며, L-alanine도 芽胞의 蛋白分解酵素로서 能動性이 있으므로 發芽를 促進시킨다고 提唱한 바 있다.

그리고 Church와 Halvorson(1954)은 Bacillus terminalis를 비롯한 Bacillus subtilis 그리고 Bac. megaterium 등의 加熱芽胞液에다 L-alanine을 添加시키면 한층 더 發芽促進됨을 確認한 바 있는데, Levinson과 Hyatt(1955)는 Bacillus megaterium의 發芽와 呼吸은 L-alanine과 manganese에 依하여 促進된다고 하였으며 이때 0.2mM의 L-alanine과 0.1mM의 manganese의 使用은 芽胞의 發芽率과 呼吸率을 最高로 促進하지만 0.2mM의 D-alanine은 0.2mM의 L-alanine이 刺戟한 發芽率을 完全히 解消시키는 反面, 加熱에 依한 것이나 0.1mM의 manganese에 依한것에 對하여서는 局限的으로 發芽率을 還元 消滅시킴을 確認하였던 바 있다.

그러나 通性嫌氣性菌인 牛氣腫疽菌에 對한 그와 같은 研究는 아직 없는 것으로 믿고 있기 때문에 著者는 以上과 같은 根據에 立脚하여 牛氣腫疽菌의 純粹한 發育型을 可及의 效果의로 多量 集菌해볼 意圖에서 本 試驗을 實施하였던 것이다.

이러한 目的을 爲하여서는, 먼저 牛氣腫痘菌 靑川株 芽胞濃縮液을 만들어서 保存해 놓고 發芽 促進率의 基準을 確認하기 爲하여 L-alanine 을 添加한 培地에서 그의 最適 使用 Mol 濃度를 策定하는 同時에 最高 有效 發芽에 所要되는 基準時間을 策定한 다음, 다시 이것을 基礎로 하여 他種의 化學劑와의 結合時의 効率도 아울러 比較 試驗하였던 것이다.

2. 材料 및 方法

① 菌株 :

菌株로서는 家畜衛生研究所로 부터 分讓받은 牛氣腫痘菌 靑川株를 選定 使用하였다.

② 培地 및 培養 :

가. 母培地 : 母培地(基本培地)로서는 嫌氣性 培養用 Liver-Liver Bouillon(LLB, Difco)와 Cooked Meat Medium(CMM, 日本 榮研)의 二種을 使用하였으며 그 處方은 다음과 같다.

LLB: Rx Liver extracts 1000ml
 Liver piece 5pieces/10ml ※
 Pepton 1g
 Sodium chloride 5g
 Dextrose 5g

final pH. 7.4. Autoclaved at 15 pound for 20 minutes. ※ Liver extracts.

CMM: Rx. Distilled water 1000ml
 Bovine heart muscle 500g※
 Polypopton 10g
 Dextrose 2g
 Sodium Chloride 5g

final pH. 7.4. Autoclaved at 15 pound for 20 minutes. ※ Dried powdery.

나. 濃縮芽胞液의 處理

牛氣腫痘菌 芽胞의 培養濃縮方法으로서는 培養出發 種子로서 靑川株 芽胞液을 먼저 母培地에 다 30mg/ml 의 比率로 加入하여 37°C에서 48時間 培養한 다음 70°C의 恒溫槽에서 30分間 加熱處理하였고, 이 過程을 3回 繼續 反復하였다. 이리하여 얻은 最終 濃縮芽胞液은 本格的 培養種子로서 採擇하였으며 使用時까지는 모두 4°C에서 保存하였다.

다. 發芽促進用 化學劑의 使用基準 選定 및 發芽基礎試驗.

發芽促進用 化學劑로서는 Merck 會社製인 L-alanine, D-alanine, 그리고 Manganes 등을 選定하였다.

특히 發芽促進率의 基準度를 定하기 爲하여 採擇된 基礎試驗用 化學劑로서는 Merck 會社製인 L-alanine(C₃H₇NO₂ MW, 89.09)을 使用하였다. 卽 滅菌된 母培

地로 L-alanine을 各各 0.1, 0.2, 0.4, 0.5mM로 稀釋한 試驗培地를 所定의 各 試驗管에다 一定量式 分注하여 所定의 容量을 加入한 다음 Levinson(1955)法에 따라 加熱과 無加熱群으로 區分된 最終 濃縮芽胞液을 同量 添加하여 全量이 10ml가 되도록 하여 37°C에서 15時間 동안 增殖 發芽시키면서 每 時間別로 總 6回數 鏡檢하였다.

라. 染色과 鏡檢

最終 濃縮芽胞液으로서의 發芽率을 測定하기 爲하여 使用된 染色液으로서는 0.5% methylene blue와 5% marachite green 및 0.5% safranin-O 溶液을 使用하였다.

染色方法으로서는 Powell(1950)法에 準하여 0.5% methylene blue 單染色으로 우선 發芽型을 染色 鏡檢하는 한편, 芽胞染色用으로는 5% marachite green 과 0.5% safranin-O를 使用하여 對比 染色하는 Wirtz法을 應用하였다. 卽, 培養 試驗後 60, 120, 180, 240, 300分과 15時間別로 培養基液 1滴(約 0.05ml)을 slide glass 上에다 滴下한 다음 1cm² 面積으로 均等 塗沫하고 前記 各 染色法에 依據하여 直接鏡檢을 하여 每 視野當의 菌數比 發芽數 乃至는 芽胞菌數를 30視野 計測 平均하는 한편 L-alanine 稀釋度別 時間別 發芽率을 換算하였다.

이 試驗에서 얻은 結果로서 本格的인 培養에 使用된 L-alanine의 最適 發芽促進 稀釋濃度와 時間의 限界基準을 設定하였다.

對照群으로서는 L-alanine 無添加 母培地만을 使用하여 上記와 同一한 過程으로 比較試驗을 하였다.

마. L-alanine에 對한 其他 化學劑와의 結合添加上의 發芽比較試驗 :

L-alanine의 最適 發芽促進率을 보이는 有效濃度에

Table 1. Combined system and molar concentration of various chemicals which contained in the CMM Culture Medium

Chemicals	L-alanine	Manganes	D-alanine
No			
1	0	0	0
2	0.5mM	0	0
3	0	0.1mM	0
4	0	0	0.2mM
5	0.5mM	0	0.2mM
6	0.5mM	0.1mM	0
7	0	0.1mM	0.2mM
8	0.5mM	0.1mM	0.2mM

Remark: CMM is Cooked Meat Medium

對한 比較試驗을 하기 爲하여 0.1mM, manganese 과 0.2mM, D-alanine 을 各各 單用 또는 結合添加하고 그에 對한 濃縮芽胞의 發芽比較試驗을 하였는데 여기에서의 結合 添加 系統을 詳述하자면 Table 1 과 같다.

바. 發育型의 集菌:

各種 化學劑를 添加하여 發芽 比較試驗으로 策定된 바, 0.5mM, L-alanine, 0.1mM manganese 를 含有한 alanine-manganese-LLB(AM LLB)와 AM CMM 의 兩培

地로 15時間동안 大量 增殖 發芽시킨 發育型의 培養 基를 만들어서 다음의 4 가지 處理를 하였다.

AMLLB 培養基는 0.5% formalin 比로 滅菌하거나 또는 121°C 에서 20分間 高壓滅菌을 하였으며, AMCMM 培養基로는 5% formalin 比로 滅菌하거나 121°C 에서 20分間高壓滅菌을하여 總 4種類를 集菌하였다.

集菌方法은 滅菌된 培養基를 各各 無菌의으로 滅菌된 Cotton-gauze 로 濾過하여 20,000/rpm Sharple 로 集

Table 2. Comparison of the germination responses of spore to L-alanine on the LLB and CMM, at 15 hours cultures.

Distinct		Unheated spore						*Heated spore					
Incubation time Mol, conc, L-alanine		60	120	180	240	(min) 300	(hrs) 15	60	120	180	240	(min) 300	(hrs) 15
C	△Control	5	10	16	19	20	25	8	12	21	25	28	31
	0.1	25	28	30	37	40	46	40	43	48	56	61	65
	M 0.2	30	32	38	45	46	47	41	45	50	57	62	66
	M 0.4	34	36	40	46	48	50	45	60	70	75	78	79
	0.5mM	36	45	47	51	55	65%	47	65	72	78	81	91%
L	△Control	5	8	15	16	17	20	8	12	20	23	25	30
	0.1	25	26	27	35	39	44	42	45	49	56	60	63
	L 0.2	29	30	37	43	45	46	40	44	50	56	61	64
	L 0.4	32	32	39	45	46	47	44	59	67	74	76	77
	B 0.5mM	34	43	46	50	53	64%	45	62	70	73	79	90%

Remark; CMM; Cooked Meat Medium

LLB; Liver-Liver Bouillon

*; Treated at 70°C for 30 minutes.

△; Control. Contains glucose but L-alanine was not added.

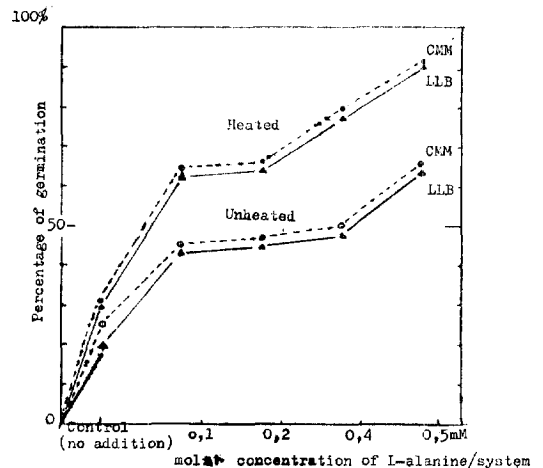
菌한 다음 滅菌된 生理食鹽水로서 100倍로 再浮遊 稀釋시켜서 一担 500/rpm, 2~5分間 遠心分離를 하여 沈渣를 버리고 그의 上濁液을 다시 3回 가량 3,000/rpm 으로 15分間式 遠沈하였다. 이 沈渣는 直刻 化學天秤으로 秤量하여 滅菌 生理食鹽水로 60mg/ml 가 되도록 浮遊시켜 4°C 에 保存하면서 各種 目的에 따라 使用키로 하였다.

3. 試驗成績

가. 發芽促進率 策定을 爲한 基礎培養 成績

牛氣腫菌의 發育型만을 比較的 純粹하게 얻어 불意圖에서 加熱處理한 最終 濃縮芽胞液과 無加熱 處理한 것을 特定한 發芽促進劑인 amino 酸系의 L-alanine 을 各 0.1, 0.2, 0.4, 0.5mM 式을 含有케한 LLB 와 CMM 의 母培地에다 接種하여 時間別 또는 그의 含有 濃度別로 發芽率을 相互 比較試驗하였던 바 다음 Table 2 와 Fig 1 에서 보는 바와 같은 成績을 얻었다.

Fig. 1. Diagram of the germination responses of spore to L-alanine in the both LLB and CMM at 15 hours cultures.



即 加熱處理 培養群은 無加熱處理 培養群에 比하여 培養時間別로나 發芽促進劑 濃度 比率로 볼 때 매우 큰 差異點을 發見하였다.

따라서 兩者間에는 어떤 培地를 使用하던 간에 培養後 15時間間에 約 26% 가량의 差로 發芽率이 增加 促進됨을 認定 할 수 있었다. 그러나 L-alanine 을 添加하지 않은 對照群은 역시 母培地の 種類差에는 큰 影響이 없었다 하더라도 加熱과 無加熱의 兩者間에 있어서는 約 6~10%의 發芽率이 增加되었고 또 0.5mM, L-alanine 을 添加했을 때에는 0.1%~0.4mM 를 含有시켰

을 때 보다는 芽胞發芽 促進率에 顯著한 隔差를 나타냈고, 發芽 出發點으로서는 培養後 60分에 벌써 큰 效果를 나타내기 시작하였으며 特히 培養 5時間(300分)까지는 별로 큰 差異가 없었으나 15時間이 되어서는 最大의 發芽率을 보이었던 것이다. 그리고 이러한 結果는 加熱芽胞의 接種 培養時에 더욱 顯著한 效果를 보이였다.

即 이러한 發芽 促進率은 培養時間과 L-alanine 의 含有濃度에 比例하여 相當한 發芽가 進行 持續되어 特히 加熱處理 芽胞培養群에서는 90~91%의 發芽率을 보이

Table. 3. Comparison of the germination rate of unheated and heated spores in CMM which contained various chemicals

Various stimulates of germination	Percentage of germination											
	Unheated spore incubation						Heated spore incubation					
	(min)						(hrs)					
Incubation time	60	120	180	240	300	15	60	120	180	240	300	15
Control *(no addition)	5	10	16	19	20	25%	8	12	21	25	28	30%
0.5mM, L-alanine	36	45	47	51	55	65	47	65	72	78	81	91
0.1mM, manganese	15	20	25	29	43	73	20	29	38	40	63	92
0.2mM, D-alanine	4	4	6	9	10	12	5	5	9	10	15	19
L-ala. +D-ala.	7	10	18	25	28	61	10	21	26	30	37	72
L-ala. +Mn	20	24	38	38	45	88	25	31	42	47	70	100
Mn. +D-ala.	5	7	20	25	28	60	10	20	27	30	45	70
L-ala. +Mn. +DA.	13	20	25	30	35	63	20	29	32	43	48	78

Remark: * No addition of chemicals to the CMM. but present a glucose in CMM.

Fig 2. The germination rate of heated spore in CMM which contained as variable chemicals, at 15 hours of cultivation

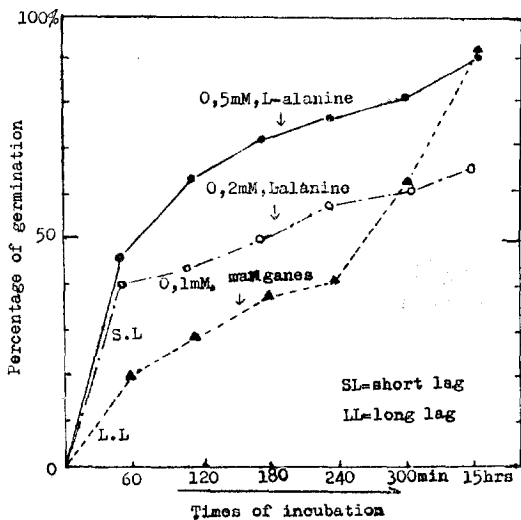
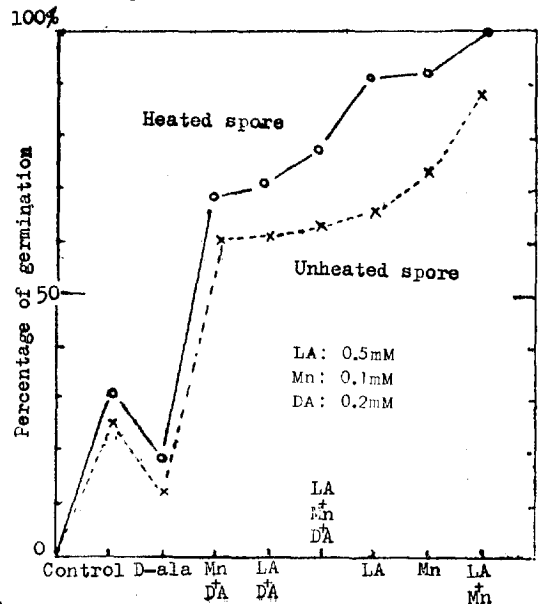


Fig. 3. Comparison of the germination effects of manganese and L-alanine for the heated spore up to 15 hours of cultivation.



있었다.

나. L-alanine에 대한 各種化學劑添加別로 본 發芽 比較試驗成績 :

基本 培養試驗成績으로서 策定된 L-alanine의 最適 使用濃度인 0.5mM를 土台로 하여 各種 化學劑를 混合 含有한 母培地에다 最終으로 얻은 濃縮芽胞液을 1/5量 比로 每 試驗群에다 接種培養한 다음 1~15時間동안 繼續하여 每時間別로 發芽率을 相互 比率하였던 바 음 Table 3과 Fig. 2, 3에서 보는 바와 같은 成績을 얻었다.

即 培養時間別로 모두 發芽 增加率을 보이었으나 어떤 條件이던간에 加熱處理 培養群은 無加熱群에서 보다는도 모두 發芽促進이 높았으며(Fig. 2), 0.5mM, L-alanine과 0.1mM, manganese의 單用 添加培養時에는 15時間後에는 兩者間에 큰 差異가 없었으나 培養初期의 結果로는 L-alanine인 경우 47%라는 越等히 急速한 發芽 促進이 進行된 反面에 manganese는 不過 20%에 지나지 않았었다 (Fig 3).

그러나 0.2mM, D-alanine 만을 含有한 培養基에서는 培養 15時間後에 있어서 L-alanine이나 manganese 등의 單用時와 比較하여 볼 때 12~19%라는 相當히 낮은 發芽率을 보인 同時에 D-alanine을 含有한 其他 모든 培養群에서도 大體로 發芽率이 不良하였음을 確認할 수 있었다.

그런데 0.5mM, L-alanine과 0.1mM manganese의 2種 類를 含有한 加熱 培養群에서는 培養後 15時間이 되면 100%의 最高發芽率을 나타냈었다 (Table 3).

따라서 氣腫菌 發育型을 純粹하게 生産하는데는 0.5mM, L-alanine과 0.1mM, manganese이 混合 含有된 CMM에서 發育增殖시키는 便이 有利하다는 確證을 얻게 된 것이다.

4. 考 察

Hible(1899)는 腦組織을 加熱하여 乳劑化한 培地가 嫌氣性菌의 增殖에 適合함을 認定한 以來 Robertson(1916)은 腦組織代身에 牛心臟肌肉을 같은 方法으로 만들어서 使用하였던 바 그 效果에 있어서 前者에 比하여 別로 큰 差異가 없음을 再 確認한 바 있다.

要컨대 이러한 Cooked meat medium에다 嫌氣性菌을 接種하였을 때에는 마치 LLB에서의 酸素分壓 低下의 原理와 同一한 結果를 얻을 수 있으므로 空氣의 進入을 遮斷하는 일이 없이도 心臟肌肉 顆粒片의 存在 때문에 培地 自體의 電位가 低下되는 同時에 이를 長期間 保存하기 爲해서는 培養基를 室溫에 두어도 無妨하다는 理由로서 充分히 이를 反證할 수 있다. 이와같이

本 培地에서는 一定한 分裂增殖이 間斷없이 되풀이 되어 생긴 代謝性產物의 蓄積에 依한 害가 적은 까닭으로 少量의 菌接種量으로도 迅速하게 增殖하며 또한 長期間 生存이 可能하다는 根據를 잡을 수 있는 것이다.

따라서 Levinson과 Sevag(1953, 1954)는 이러한 特性이 있는 培地에다 特定한 L-alanine이나 manganese을 添加하였을 때에는 한층 그의 發芽率이 促進될 뿐만 아니라 芽胞의 蛋白分解酵素能을 活性化한다고 提案한 바 있다. 即 이와 같은 多樣性은 gelatin이나 egg albumin의 加水分解能動性뿐만 아니라 芽胞蛋白質을 分解 消滅시키는 데에 도움이 되며 氣腫菌에 對하여서는 遲延의이고 持續性있는 最大發芽率을 보이게 되는 것은 當然하고도 明白한 일이라 하겠다.

여기서의 L-alanine의 影響은 氣腫菌에 對한 本物質의 酸化로 因하여 部分的인 作用을 하는 同時에 觸媒的인 能動性을 發揮하는 까닭이라 하겠다.

여기서 著者は 위와 같은 學理的인 根據에 立脚한 牛氣腫菌의 發芽試驗結果에 對하여 考察하자면, 培養前에 芽胞液을 70°C에서 30分間 加熱 處理한 다음 濃縮시켰던 바 加熱하지 않고 培養했을 때 보다는도 越等한 發芽率을 보였는데 이것은 加熱로 因하여 芽胞蛋白質이 刺戟을 받아 培養에 依한 分解能이 加速化되었기 때문이라 하겠다.

따라서 이 加熱處理는 manganese과 같은 發育促進劑만큼의 目的을 達成할 수는 없겠지만 比較的 그에 類似한 結果를 얻을 수 있었던 것이다. 특히 L-alanine만을 添加하였던 바 發芽出發이 迅速하고 急激히 上昇하였으나 manganese만은 使用하였던 바 發芽出發은 遲延되고 時間의 經過에 따라서 終末的인 發芽率은 오히려 L-alanine만은 添加했을 때 보다는도 若干의 上昇率(92%)를 表示하였으며, L-alanine과 manganese를 混合 添加할 때에는 한층 더 發芽 促進이 進行되어 培養後 15時間이 되면 100%의 發芽率을 보이고 있으나 이것은 manganese이 芽胞蛋白質 分解酵素들의 作用을 活性化하는 物質인 故로 L-alanine의 amino酸을 放出시키는 役割때문에 manganese의 發芽 遲延性을 加速促進시키는 能力이 補強되므로 持續的인 發芽를 하여 終末에는 最大 發芽率을 나타내고 있는 것으로 믿어 진다.

그리고 L-alanine 使用濃度は 0.1~0.5mM의 使用範圍中, 0.5mM의 濃度を 含有한 培養基에서 가장 效果的인 結果를 얻을 수 있었던 것에 比하여 볼 때 Levinson과 Hyatt(1955)가 報告한 바 0.2mM, L-alanine에서 그 目的을 達成할 수 있었다는 點에서 差異點을 찾아 볼 수 있겠으나, 이것은 芽胞菌이라 할지라도 酸素에 對한 抵抗力 如否와 酸素의 消費性 如何에 따라서 L-alanine

의 Mol 量이 달라질 수 있는 까닭이다.

即 牛氣腫菌은 通性嫌氣性菌인 까닭에 그의 呼吸에 있어서 單純히 酸素만이 使用되는것이 아니라 L-alanine 과 같은 amino 酸類가 呼吸과 發育增殖에 利用되기 때문이며, 偏性 好氣性 芽胞形成菌인 때 보다는 오히려 더 많은 L-alanine 의 Mol 量이 所要된 것으로 看做된다.

따라서 Levinson 이 試驗한 報告와 著者の 研究 試驗 結果로서 共通되는 點이 있다면, 그것을 芽胞의 發芽 始作이 培養後 60 分間 부터 뚜렷해질 뿐만 아니라 時間的으로도 比例하여 上昇率을 보인 點이라 하겠다.

그리고 0.2mM, D-alanine 의 單用인 때는 勿論이고 L-alanine 이나 manganese 에다 各各 同一한 比率로 D-alanine 을 混合 使用하더라도 다 같이 發芽率이 遲延乃至는 不實했음은 또한 一致되는 것이다.

即 이것은 D-alanine 이 L-alanine 으로서의 發芽促進力을 可逆시킬 뿐만 아니라, 加熱에 依한 濃縮芽胞의 發芽率이라던가 Manganese 에 依한 發芽促進率을 還元하기 때문에 牛氣腫菌의 發芽性을 抑制하는 것으로 解釋된다.

要컨대 通性嫌氣性菌인 牛氣腫菌의 發育型을 比較의 純粹하고 迅速하게 그리고 量產하기 爲해서는 濃縮 芽胞液을 70°C 에서 30 分間 加熱 處理한 다음 0.5mM, L-alanine 과 0.1mM, Manganese 을 混合 含有한 CMM 에서 15 時間 동안만 培養한다면 從來에 常用되어 오던 18~24 時間인 培養時間 보다는 3~9 時間 가량의 時間의 短縮이 可能할 뿐 더러, 거의 完全할 정도로 發芽를 具顯시킬 수 있다는데 本 試驗成績으로서의 意義가 있다고 본다.

5. 結 論

牛氣腫菌의 發育型 菌體를 可及의 純粹하게 얻어 볼 目的으로 芽胞 發芽促進試驗을 實施하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) 通性嫌氣性菌인 氣腫菌의 發育培地로서는 Cooked meat medium 이 Liver-Liver Bouillon 보다는 優秀하였다.

2) 氣腫菌 芽胞液을 CMM 에다 培養하기에 앞서 70°C 에서 30 分間 加熱處理한 다음 接種을 하였던 바 發芽率이 促進되었다.

3) CMM 에서의 氣腫菌 芽胞의 發芽를 迅速하게 促進시키기 爲해서는 0.5mM, L-alanine 이 最適合하였다.

4) 0.2mM, D-alanine 을 添加한 CMM 에서는, 加熱處理 芽胞 濃縮液을 培養할지라도 모두 發芽가 抑制되었다.

5) 0.1mM, manganese 添加만으로는 發芽 出發이 遲延되나 最終 發芽率은 0.5mM, L-alanine 만을 添加하였을 때 보다는 높았었다.

6) 0.5mM, L-alanine 과 0.1mM, Manganese 의 混合 添加는 manganese 로 하여금 L-alanine 의 發芽促進力을 補強시켜서 發芽率을 100%로까지 上昇시켰다.

7) 發芽促進劑를 全然 加入하지 않은 CMM 에서의 發芽率은 添加했을 때 보다는 不振한 同時에 加熱處理를 한 便이 加熱하지 않았을 때 보다는 約 6% 가량의 上昇率을 보이었다.

8) 氣腫菌 發育型의 最適集菌時間은 培養後 15 時間이다.

REFERENCES

- Churce, B.D., Halvorson, H., and Halvorson, H. O.: 1954 Studies on spore germination: its independence from alanine recemese activity. *J. Bacteriol.*, 68, 393—399
- Evans, F.R., and Curran, H.R.: 1943 The accelerating effect of sublethal heat on spore germination in mesophilic aerobic bacteria. *J. Bacteriol.*, 40, 513—523.
- Foster and Wynne: 1948, 55 623. *Jour. Bacteriology.*
- Foster, J.W., and Heiligman, F.: 1949 Mineral deficiencies in complex organic media as limiting factors in the sporulation of aerobic bacilli. *J. Bacteriol.*, 57, 613—615.
- Foster, J.W., and Hardwick, W.A., and Guirard, Bererly.: 1950 Antisporulation factors in complex organic media. I. Growth and sporulation studies on *Bacillus larvae*. *J. Bacteriol.*, 59, 463—470.
- Harrell, W.K., and Halvorson, H.O.: 1954 Some studies on the germination of spores following brief exposure to L-alanine. *Bacteriol. Prac.*, P. 30
- Hibler: *Centr. Bakt.*, 25, 513, 1899.
- Hills, G.M.: 1949 Chemical factors in germination of sporebearing aerobes. *Biochem. J. (London)*, 45, 363—370.
- Hills, G.M.: Chemical factors in germination on the influence of species, strain and conditions of growth. *J. Gen. Microbiol.*, 4, 38—47.
- Kaplan and John W. Williams: 1941 Spore formation among the anaerobic *Bacillus mycoides*. *J. Bacteriol.*, 49, 473 617.
- Klienberger-Nobel, E.: *J. Bact.*, 61, 145, 1951.
- Levinson, H.S., and Srvag, J.G.: 1953 Stimulation of

- germination and respiration of the spore of *Bacillus megaterium* by manganese and monovalent anions. *J. Gen. Physiol.* 36, 617—629.
- Levinson, H.S., and Sevag, M.G.: 1954 Manganese and the proteolytic activity of spore extracts of *Bacillus megaterium* in relation to germination. *J. Bacteriol.*, 67, 615—616.
- Levinson, H.S., and Sevag, M.G.: 1955 The stimulation of germination and respiration of *Bacillus megaterium* spores by manganese, L-alanine and heat. *J. Bacteriol.*, 70, 368.
- Mudd, S. et al.: *J. Bact.*, 62, 729, 1951.

Studies on the Effects of Some Chemicals on the Germinative Stimulation of *Clostridium chauvoei* Spore

Boo Kap Seo, D.V.M.

Dept. of Vet. Science,
Seoul Municipal College of Agriculture
Seoul, Korea

The effects of some chemicals for the germinative stimulation of *Clostridium chauvoei* spore studied. The results obtained were as follows:

1. Cooked meat medium (CMM) was superior to Liver-liver bouillon (LLB) for cultivation of the organisms.
2. Heating the organisms at 70°C for 30 minutes prior to cultivation in CMM stimulated the germination rate.
3. The addition of 0.5mM L-alanine to CMM was found to be most effective for the rapid germination of the spores.
4. The addition of 0.2 mM D-alanine to CMM inhibited the germination of the spores even if the spores were heat treated.
5. The addition of 0.1mM manganese retarded the germination time, but the final germination rate was greater with 0.1mM manganese than with 0.5mM L-alanine.
6. The addition of both 0.5mM L-alanine and 0.1mM manganese stimulated the germination rate to 100 per cent.
7. The germination rate was greater with the addition of germination stimulants than without any stimulants. The germination rate was approximately 6 per cent greater with prior heat treatment than without heat treatment.
8. The optimum time for the harvest of vegetative forms of the organisms was 15 hours after cultivation in the media which contain suitable germination stimulants.