

枯草菌が産生する抗生物質に関する研究

静岡県立浜松西高等学校
科学研究部自然科学班 2年 堀尾いぶ希

1 動機と目的

中学二年生の文化祭のときに何気なく、生物室の机を拭いた雑巾が臭いということに気づき、この臭いの原因は、雑巾についている雑菌なのではないかと考えた。そこで、雑巾はなぜ臭いのか、臭いや臭いの原因となっている菌の抑制物質は何かを調べることにし、取り組んだ。しかし、この実験に関する周辺の状況を調べていくうちに、雑巾の臭い物質やその菌について、既に解明されていることが分かった。そこで、それまでの実験の一環で掘っていた、雑巾の絞り汁が特定のいくつかの菌の増殖を抑えることについて詳しく調べることにした。この研究では、濃縮した雑巾の絞り汁に寒天を加え、寒天培地とし、雑巾の菌液を撒いた。その結果、濃縮した雑巾の絞り汁によって特定の雑巾の菌の増殖が抑制された。このことから、雑巾の絞り汁に特定の菌の増殖を抑える作用があることが分かった。¹⁾ また、その後の実験で雑巾の菌を培養したところ、枯草菌のコロニーの周囲では特定の菌の増殖が抑制されたことが分かった(図1)。よって、雑巾の絞り汁中に含まれる抗菌作用の一つの原因は枯草菌が産生した物質ではないかと考えた。そして、この研究では枯草菌が産生する抗生物質に着目した。

枯草菌(学名:*Bacillus subtilis*)とは、空気中や土壌の中など、自然界にどこにでも存在する細菌の一種である。人に無害で、納豆菌は枯草菌の一種である。増殖に適さない環境下においては芽胞を形成し、生き延びる。好気性で増殖能力が高い。

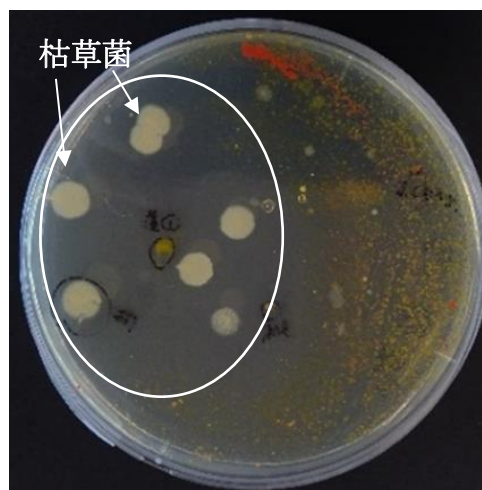


図1 枯草菌による細菌の増殖抑制

2 方法

(1) 実験に使用する雑巾について

本実験で用いる雑巾は本校生物室の清掃に使われているもので、主に実験台を拭いて乾燥させたものである。18cm×30cmの大きさのものを使った。

(2) 寒天培地（標準寒天培地）の調製

bacto tryptone (0.5%) , yeast extract (0.25%) , ブドウ糖 (0.1%) , Ager (1.5%) , を正確に量りとり、三角フラスコに入れた。三角フラスコの口をアルミホイルで二重にかぶせ、オートクレーブで高圧蒸気滅菌 (121 度, 20 分) した。滅菌後、クリーンベンチの中で直径 10 cm のシャーレに移した。寒天が固化するのを待ち、使用まで冷蔵保存した。

(3) 液体培地の作製

bacto tryptone (0.5%) , yeast extract (0.25%) , ブドウ糖 (0.1%) を正確に量りとり、三角フラスコに入れた。三角フラスコの口をアルミホイルで二重にかぶせ、オートクレーブで高圧蒸気滅菌 (121 度で 20 分) した。使用まで冷蔵保存した。

(4) 寒天培地での菌の培養

マイクロピペットで菌液 100 μ l を標準寒天培地に撒いた。スプレッターでシャーレ全体に広げた。37°Cで一晩培養させた。

(5) 液体培地での菌の培養

液体培地を 1ml, マイクロチューブに移した。白金耳で、寒天培地で培養した菌を採取し、液体培地に入れた。37°Cで一晩培養させた。

(6) 雑巾の菌の採取

ガスバーナーの火の下で (火炎滅菌) 行った。両手にビニール手袋をつけ、雑巾を 1 枚、消毒済みのトレイにいれた。雑巾に滅菌水約 150ml をしみこませ、絞った。その後、絞り汁をマイクロピペットに移し、クリーンベンチ内で 100 μ l, 標準寒天培地に撒いた。スプレッターでシャーレ全体に広げ、37°Cで一晩培養させた。

(7) 菌の単離

標準寒天培地で培養した雑巾の菌のコロニーに白金耳につけた。白金耳を新鮮な寒天培地につけ、線を描くようにして菌を撒いた。単離する際は一つのコロニーから菌を採取した。

(8) 赤菌について

抗生物質の抑制を図る指標菌として、赤菌を用いた。生物室内の雑巾の絞り汁から採取・単離した(図2)。一つのコロニーから単離したため、すべて同一の菌である。単離後、液体培地で培養し、菌液とした。枯草菌により増殖が抑制されることを再確認した(図3)。



図2 赤菌の単離



図3 枯草菌による赤菌の増殖抑制

(9) 枯草菌の培養上清の調製

生物室内の雑巾の絞り汁から枯草菌を採取・単離し、液体培地で一晚培養(37℃)した。枯草菌を遠心分離(1,500G, 30分)して沈殿させ、その上澄みをオートクレーブで滅菌(121℃, 20分)した。使用まで冷蔵保存した。

(10) 10倍濃縮の枯草菌の培養上清の調製

(9)と同様の手順で枯草菌の培養上清を500ml調製した。1Lのビーカーに移し、電気コンロで加熱した。水分を蒸発させ、50mlになるよう濃縮した。

(11) 枯草菌が抗生物質を産生して赤菌の増殖を抑制していることの確認

枯草菌の培養上清を、新鮮な標準液体培地に対して表1に示すように割合を変えて混合した。その混合液に寒天(1.5%)を加え、オートクレーブで滅菌(121℃, 20分)し、寒天培地とした。そして、赤菌の菌液を100μl, 上記寒天培地に撒いた。

表1

	枯草菌の培養上清	標準液体培地
0%	0ml	20ml
20%	4ml	16ml
40%	8ml	12ml
60%	12ml	8ml
80%	16ml	4ml
100%	20ml	0ml

(12) ろ紙をシャーレの中央に置く実験

より簡便な増殖抑制効果活性の評価方法の検討として、1 cm角のろ紙に枯草菌の培養上清を染み込ませ、赤菌を撒いた標準寒天培地の中央に置いた。

通常濃度の枯草菌の培養上清では増殖抑制効果活性が見られなかったため、同様の実験を10倍濃縮の枯草菌の培養上清でも行った。

(13) ペーパークロマトグラフィーによる抗生物質の分離

10倍濃縮の枯草菌の培養上清をマイクロピペットで取り、ペーパークロマトグラフィー用ろ紙(18cm×2cm)の原点に100 μ lつけ、これを4枚用意した。ろ紙を水で展開(図4)し、乾燥させた。ろ紙を4つに区画し、原点の反対側からABCDとした(図5)。



図4 ペーパークロマトグラフィー(展開中)

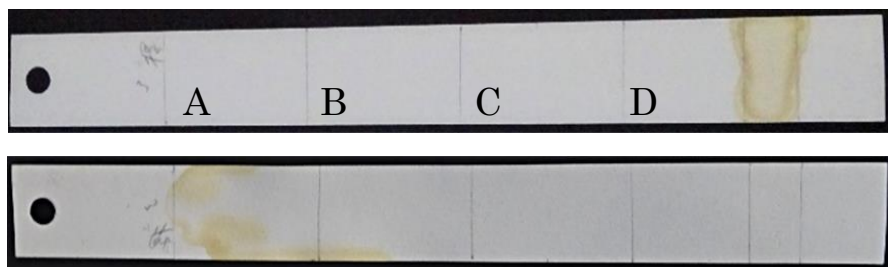


図5 ペーパークロマトグラフィーによる展開(上:展開前 下:展開後)

(14) ろ紙からの分離物質の抽出

展開したろ紙(4枚)をABCDに切断し、それぞれ10mlの液体培地に入れ、スターラーで10分攪拌し、抽出した(図6)。その抽出液に寒天(1.5%)を加え、寒天培地とした。その培地を用いて赤菌の増殖の検討をした。

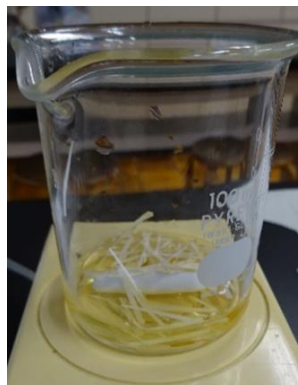


図6 ろ紙からの分離物質の抽出

3 結果

(1) 枯草菌上清による赤菌の増殖抑制効果

寒天培地に占める枯草菌の培養上清の割合が大きいほど、赤菌の増殖が抑制された(図7).

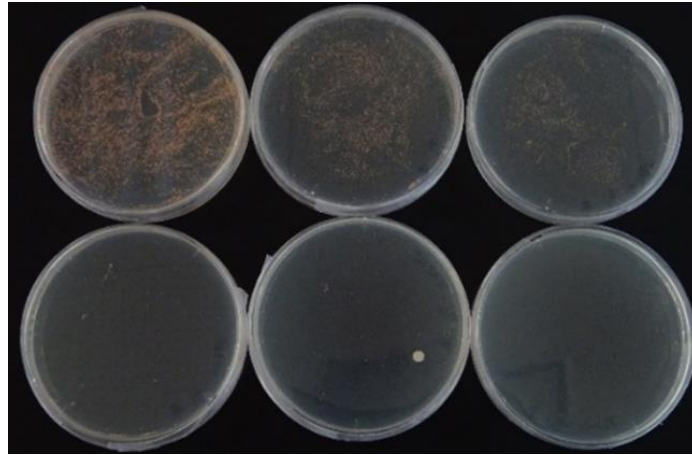


図7 赤菌の増殖における枯草菌の培養上清の影響

(2) より簡便な増殖抑制効果活性の評価方法の検討

通常の枯草菌の培養上清では増殖抑制効果が確認されなかった(図8)が、10倍濃縮の枯草菌の培養上清では赤菌に対する増殖抑制効果が確認できた(図9).

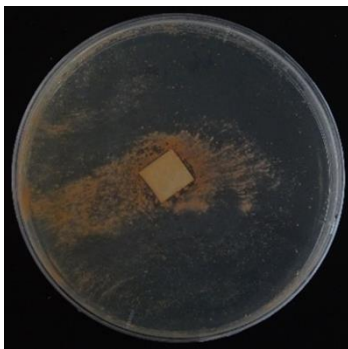


図8 赤菌の増殖における
枯草菌の培養上清の影響
(ろ紙浸潤法)

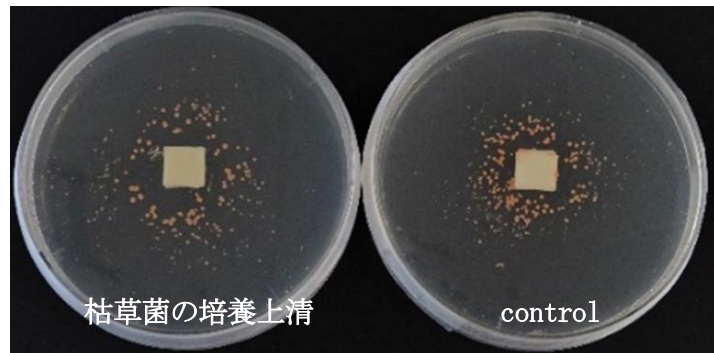


図9 赤菌の増殖における
枯草菌の培養上清の影響
(10倍濃縮の枯草菌の培養上清)

(3) ペーパークロマトグラフィーによる抗生物質の分離

赤菌の増殖がA画分の抽出物によって抑制された(図10).

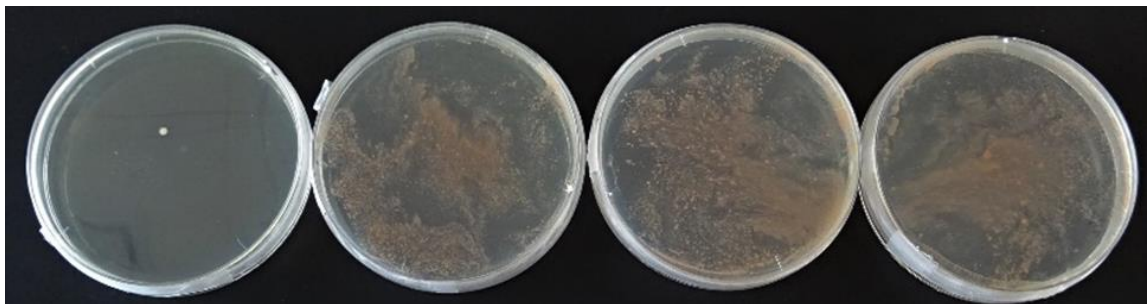


図10 赤菌の増殖における各画分の影響

4 考察

(1) 枯草菌上清による赤菌の増殖抑制効果

寒天培地に占める枯草菌の培養上清の割合が大きいほど、赤菌の増殖が抑制された(図7)。このことから、枯草菌が赤菌の増殖を抑制する抗生物質を産生していると考えられる。

赤菌の増殖に必要な培地成分を枯草菌が消費した結果である可能性も考えられるが、新鮮な標準寒天培地をベースとした比較実験より、その可能性は低いと考えている。

また、枯草菌の抗生物質はオートクレーブで加熱をしてもその効果が見られることから、比較的熱に強い分子であると考えられる。

この抗生物質を単離することができれば、抗生物質のより詳細な解析や、抗菌剤として利用できるのではないかと考えた。そこで、ペーパークロマトグラフィーによる抗生物質の分離を試みることにした。

(2) より簡便な増殖抑制効果活性の評価方法の検討

抗生物質の分離の度合いを判定する方法として、寒天培地に目的の物質を混ぜ込む方法があるが、この方法では手間がかかる上、大量の物質を必要とする。そこで、より簡便な増殖抑制効果活性の評価方法を検討するため、枯草菌の培養上清を染み込ませたろ紙を、赤菌を撒いたシャーレの中央に置く方法を試みた。

その結果、この方法では増殖抑制効果が確認されなかった(図8)。これは抗生物質が低分子であったため、標準寒天培地上で直ちに拡散してしまったのではないかと考える。このことから、枯草菌は、持続的に抗生物質を産生し続けることで抗菌作用を維持しているものと思われる。

10倍に濃縮した枯草菌の培養上清を染み込ませたろ紙を用いた結果、赤菌に対する増殖抑制効果が確認できた(図9)。同時に、10倍に濃縮した枯草菌の培養上清には、10倍に濃縮された標準液体培地の成分も含まれているため、赤菌の増殖を促進する効果もあった。ろ紙の近傍では、濃縮液の赤菌への増殖抑制効果が増殖促進効果を上回ったため、ろ紙の周りで増殖抑制効果が確認されたのだと考えられる。

この抗生物質の有無の評価方法では、赤菌に対する増殖促進効果と増殖抑制効果のどちらも見られてしまった。また、時間がたつとろ紙以外の場所でも時間の経過に伴って培地全体から赤菌の増殖が見られてしまうため、どのタイミングで増殖抑制効果活性を図るのかも難しい。よって、評価方法としてこの方法は適切でないと判断した。

(3) ペーパークロマトグラフィーによる抗生物質の分離

赤菌の増殖がA画分の抽出物によって抑制されたことから(図10)、A画分に抗生物質が含まれていると考えられる。A画分は最も移動距離の長い画分であるため、抗生物質はセルロースに吸着しにくい物質だと考えられる。培地成分との分離が確認できれば、抗生物質をより高い純度で分離したことになり、より詳細な解析や抗菌剤としての利用が期待される。

5 反省と課題

クリーンベンチを用いたが、無菌操作に苦勞し、時間がかかってしまった。今回評価に用いた赤菌は、植え継いでいくうちに主に増殖能力に変化が見られるなど、安定した培養が困難であったため、赤菌や他の菌の安定培養を目指したい。菌によっては枯草菌による増殖抑制効果が見られないものもあるので、赤菌以外の菌でも検討し、抗生物質としての汎用性を調べたい。枯草菌が抗生物質を産生する最適な条件(温度、培地の成分など)についても調べたい。そして、簡便な活性評価方法の確立に向け、検討を続けていきたい。今回のペーパークロマトグラフィーの実験では、展開液に水を用いたが、より培地の分離を図るため、エタノールとの混合液など、展開液の組成を変えて実験を行いたい。また、今回は展開したろ紙を4つに分けたが、より細かく分けてRf値を出したい。

6 結論

枯草菌は、抗生物質を産生して特定の菌の増殖を抑制していることが分かった。また、枯草菌の抗生物質は、比較的熱に強い分子、低分子、セルロースに吸着しにくい物質であると推定される。

7 今後の展望

枯草菌が産生する抗生物質についてはいくつか同定されているので、今回の研究で見られた増殖抑制効果がこれらの抗生物質と同一のものによるか、新規のものによるか確認したい。そして、枯草菌は人に対して無害であることから、この抗生物質を安全な抗菌剤として活用したい。

8 謝辞

本研究を進めるにあたり、浜松西高等学校鈴木満先生には実験道具の調達や操作方法など多大な指導を賜りました。厚く感謝を申し上げます。

9 参考文献

1)堀尾いぶ希：「雑巾の絞り汁中の抗菌作用について」

静岡県小・中・高等学校児童生徒理科研究発表論文集 2020 年度版 p 77～80

2)中村朝夫：「ペーパークロマトグラフィー —展開溶媒によって異なる分離の機構」 化学と教育 65 卷 12 号 (2017)

3)稲岡隆史：「枯草菌の物質生産能を向上させる手法」 食糧-その科学と技術- No. 53 (2015)