

環境要因による枯草菌の芽胞形成への 影響について

徳島県立城南高等学校
応用数理科

高麗 渚央 坂本 陽光 徳元 優樹

目次

1. 概要..... 1

2. 動機、目的..... 1

3. 準備物..... 1

4. 予備実験..... 2

5. 実験 1 4

6. 実験 2 6

7. 実験 3 7

8. 結論..... 9

9. 今後の展望..... 9

10. 参考文献..... 10

11. 謝辞..... 10

1. 概要

一部の細菌は、体内に芽胞を形成する。芽胞とは、高温や乾燥などの過酷な環境下での生存を可能にする耐久性の高い構造である。本研究では、枯草菌を対象とし、さまざまな条件下で培養し、芽胞が形成されやすい条件について研究した。具体的には、温度、培地のペプトン濃度、音波照射（周波数：Hz）の3つの環境要因における芽胞形成の傾向を調べた。実験の結果、50℃での高温、ペプトン濃度を低下させた低栄養、70Hzの低周波数の音波照射条件下で芽胞形成が促進される傾向が見られた。今後は、それぞれの環境要因における芽胞形成割合がピークになる値などについてより詳しく調査したい。

2. 動機・目的

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の一種である納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) は、納豆を作るために必要な細菌であると共に、芽胞を形成する芽胞菌である。芽胞とは、生存に不利な環境下において形成する構造で、高温、乾燥、酸性環境、化学薬品などに対する高い耐久性を持つ。そのため、高温での発酵が可能であったり、生きて腸にまで届かせることができるプロバイオティクスの商品として活用されたりしている。私たちはこの現象に興味を持ち、枯草菌の培養並びに芽胞形成について調べてみたところ、最適培養温度は30℃～37℃で芽胞形成が起こるとあったが、他の文献では40℃～50℃ともあり、最適培養温度と芽胞形成について検証することとした。また、貧栄養条件で芽胞形成が起こるとあったため、学校で用意できるLB寒天培地での枯草菌の培養において、最も芽胞形成が進む栄養条件についても検証することとした。

さらに、100～1000 Hzの音刺激によってアルコール発酵が促進される現象が報告されており、音波が酵母菌の生育に影響を与えることが知られている。このことに興味を持ち、音波と枯草菌の芽胞形成について調べたが、既存の研究は見つからなかったため、音波と芽胞形成について検証を行うこととした。

枯草菌は砂漠などの過酷な環境下での土壌改良や水質改善に活用されている。音波により芽胞形成が変化することが分かれば、音波の活用により、これらの過酷な環境下での土壌改良や水質改善の効果を高められる可能性があると考え、研究を行った。

3. 準備物

- ・枯草菌（徳島大学教養大学院からいただいたもの）
- ・LB培地
- ・インキュベーター/冷蔵庫
- ・ガスバーナー
- ・スライドガラス
- ・白金耳（プラスチック製）
- ・ヴィクトリアブルー液
- ・位相差顕微鏡
- ・スピーカー
- ・音源(PC)
- ・サウンドモニターソフト (FFT Wave)
- ・ソフトウエア「R」

4. 予備実験：時間経過による芽胞形成率の変化

培養何日後で芽胞形成がピークとなるか検証し、今後の実験における観察日数を設定する。

方法

1. 培地の調製

枯草菌の培養には LB 寒天培地を用いた。LB 寒天培地の作成には、標準寒天培地 23.5g (酵母エキス 2.5g, ペプトン 5.0g, ブドウ糖 1.0g, 寒天 15g) に、ペプトン (5.0 g)、酵母エキス (2.5 g)、塩化ナトリウム (10.0 g) を蒸留水 1000mL に加え、フラスコに入れて混合した後、121℃、20 分間オートクレーブ処理を行い、滅菌した。調製した培地は使用まで室温で一晩静置した。

2. 培養条件

枯草菌を、白金耳を用いて LB 寒天培地上に塗布し、枯草菌の最適培養温度と考えられる 30℃のインキュベーターで約 12 時間培養してコロニーを形成させた。コロニー形成後に、培養温度を 50℃に変化させ、5 日間培養し、1 日ごとにサンプルを採取して芽胞形成率を調べた。温度を 30℃から 50℃に変化させたのは、枯草菌に温度ストレスを与えることで、芽胞形成が促されると考えたからである。なお、30℃で 1 日培養したところ、コロニーが形成され、顕微鏡で枯草菌の菌体が観察できた。

3. 芽胞形成率の測定

芽胞形成率は、コロニー形成後の 1 日ごとに算定した。培養後の培地から枯草菌を白金耳で採取し、スライドガラス上に薄く塗布した後、火炎固定を行った。固定したサンプルをヴィクトリアブルー溶液で単染色し、位相差顕微鏡（倍率：1,000 倍）を用いて観察した。

枯草菌はグラム陽性菌であり、ヴィクトリアブルーを用いたグラム染色では、細胞壁の成分であるペプチドグリカンが染色されるが、芽胞は非常に強固な外層であるケラチン様タンパク質でおおわれているため、染色液が内部まで浸透せず、染まらずに透明に見える。この現象を用いて、菌体数（青紫色）並びに、菌体内に芽胞（半透明）が存在する数を数え、芽胞形成率を算出した。また、ピントが合っていない菌体は染色されているにもかかわらず半透明に見える場合もあることから、同じ視野で 3 つ程度ピントを変えた写真を撮り、染色されている菌体と染色されていない芽胞を識別した。十分に確認できなかったものは、カウントから外した。

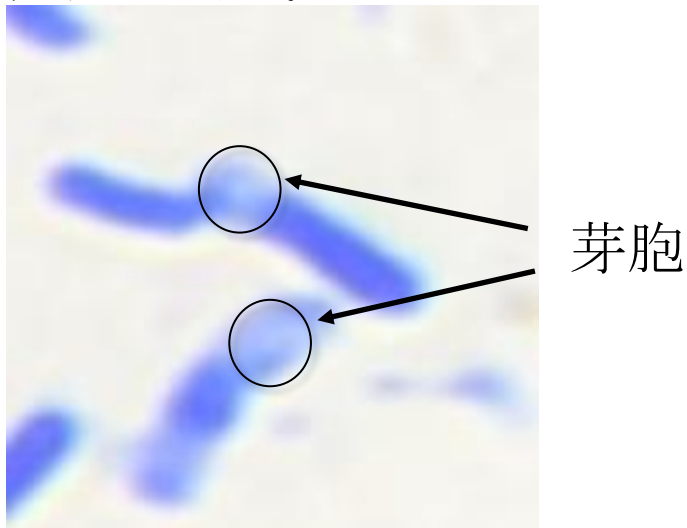


図 1：菌体内に形成されている芽胞

ヴィクトリアブルー染色（グラム染色）した枯草菌 *Bacillus subtilis* を位相差顕微鏡にて 1000 倍にて観察した画像。菌体内に形成された芽胞は染色されないため透けて見える。

芽胞形成率は、一視野内に観察される全菌体数に対する菌体内部に芽胞が形成された菌体の数の割合(%)として算出し、以下の式で表した：

$$\text{芽胞形成率}(\%) = (\text{芽胞を形成した菌体の数} / \text{全細菌数}) \times 100$$

各日数（1日目、2日目、3日目、4日目、5日目）において、3つの視野を観察し、それぞれの芽胞形成率を算出した後、その平均値を芽胞形成率とした。

結果

30℃で培養し、コロニー形成させた後、50℃で培養させた。芽胞形成率は、培養1日後15.6%、2日後38.7%、3日後42.7%、4日後42.6%、5日後46.2%であった（図2）。増加割合については、1日後から2日後においては2.48倍、2日後から3日後においては1.26倍、3日後から4日後においては0.99倍、4日後から5日後においては1.08倍であった。

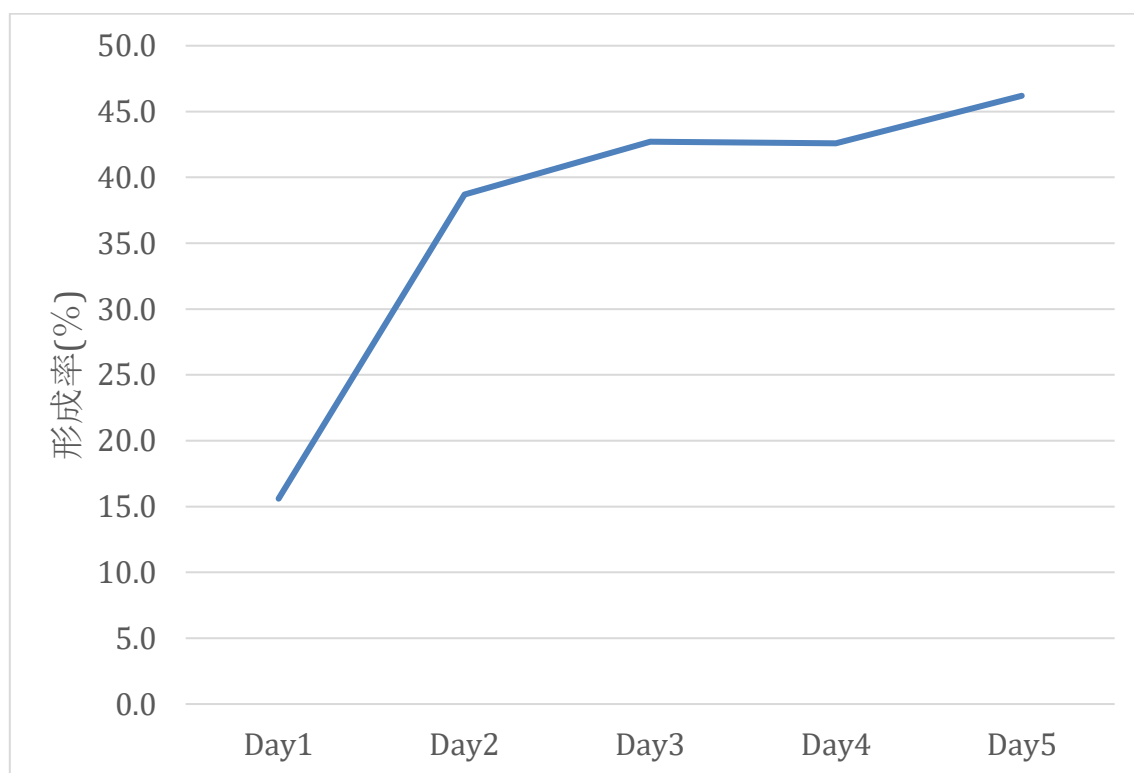


図2：50℃での培養における各日数の芽胞形成率

考察

芽胞形成率は1日後から2日後に2.48倍に増加しており、この期間に芽胞が最も形成されると考えられる。2日後から3日後においては、1.26倍に変化しており、やや増加しているが、3日後から4日後、4日後から5日後はほとんど増加しておらず、今後の実験において芽胞形成率を測定するためには、培養3日後までの測定が最適であると考えられる。

5. 実験1：温度の影響

仮説1

枯草菌の最適生育温度から外れた高温または低温の環境は、細菌にとってストレスとなり、芽胞形成を促進すると仮説を立てた。これは、芽胞が不利な環境下で形成されるという特性に基づき、最適温度から離れた条件（特に高温または低温）が芽胞形成を誘導すると考えたためである。

方法1

1. 培地の調製

LB 寒天培地は予備実験と同様に調製した。

2. 培養条件

枯草菌の芽胞形成に対する温度の影響を調べるため、異なる温度条件下で培養実験を行った。白金耳を用いて LB 寒天培地上に枯草菌を均一に塗布し、30℃のインキュベーターで約 12 時間培養してコロニーを形成させた後、8つの温度条件（-20℃、0℃、10℃、20℃、30℃、40℃、50℃、60℃）に設定したインキュベーターに移し、3日間培養をした。培養3日間においては、1日ごとにサンプルを採取して芽胞形成率を調べた。

3. 芽胞形成率の測定

芽胞形成率は、コロニー形成後の3日間（培養1日目、2日目、3日目）について調べた。測定方法は予備実験と同様で、各温度および各日数（1日目、2日目、3日目）において、3つの視野を観察し、それぞれの芽胞形成率を上記式に基づいて算出した後、その平均値を最終的な芽胞形成率とした。

4. 仮説検定

仮説検定を行った。ソフトウェア「R」を使用し、芽胞形成率について、Kruskal-Wallis 検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果1

0℃、-20℃では、形成されていたコロニーが見られたため、顕微鏡にて観察したが、芽胞は見られなかった（形成率 0%）。10℃以上では、芽胞が見られ、高温であるほど、また時間が経つにつれ芽胞形成率が上昇した。ただし、60℃においては、培地が乾燥し硬化したため、初日のみしかコロニーを採取できず、その割合は 7.9%であった（図 3）。

培養3日目における温度ごとの芽胞形成率について比較してみると、30℃（17.1%）から 40℃（33.6%）へ 1.96 倍増加しており、最も高い割合であった。仮説検定では、3日目における芽胞形成率については有意差が見られた（ $p = 0.004$ ）（図 4）。また、50℃に近づくほど、培地でのコロニーが成長していた（図 5）。

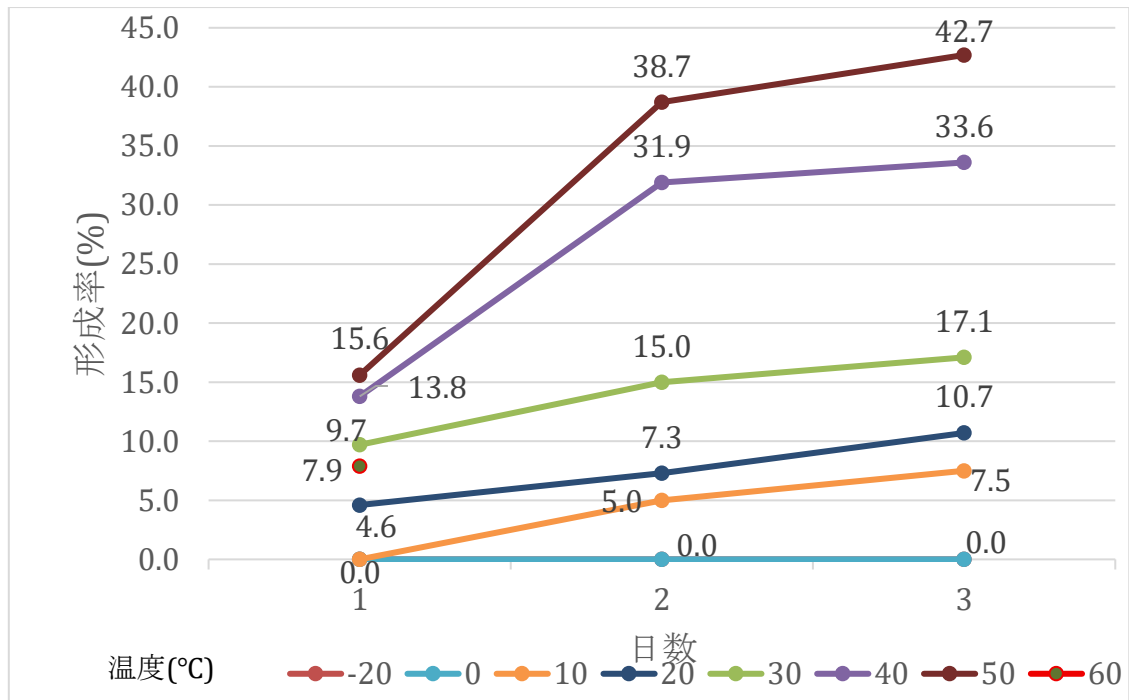


図3：各温度における3日間の芽胞形成率の推移

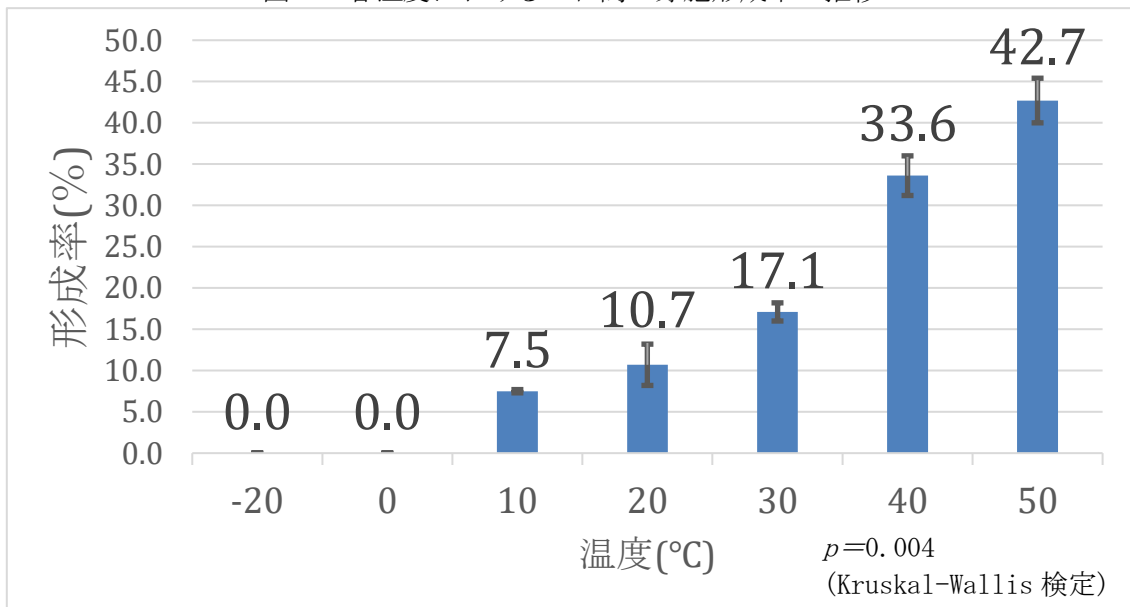


図4：各温度における3日目の芽胞形成率



図5：それぞれの温度で3日培養した時のコロニーの様子（左から0°C、30°C、50°C）

考察 1

0℃と-20℃で、芽胞が形成されなかったのは、細菌の代謝が活性化されなかったからだと考えられる。芽胞形成は、細菌がストレスを受容した際の防御反応であるが、低温では芽胞形成が起こる代謝も抑制されるため、低温ストレスでは、芽胞形成が起こらなかったと考えられる。

また、最適培養温度である 30℃でも 17.1%が芽胞を形成した。これは、枯草菌が何らかのストレスを受容した可能性がある。最も可能性があるのは、栄養成分の減少である。寒天培地の培養のため、培養後、生育場所での栄養成分が減少し、そのストレスを受容したため、芽胞を形成したと考える。

さらに、30℃から 40℃に培養温度が変化した際、芽胞形成割合は 1.96 倍に増加している。この理由は 2 つ考えられる。1 つは、高温ストレスによるものである。枯草菌の最適培養温度は 30℃とされており、30℃を越える温度は高温ストレスとなるためである。もう 1 つの理由が、培地の栄養分の不足である。調べてみると、枯草菌の最適培養温度 30℃では、代謝が安定し、長期的に枯草菌が生育出来る温度であり、それ以上の温度では、酵素反応が速いため分裂速度が速くなるが、代謝負荷や酸化ストレスが高まり、安定的に生育出来ないとあった。実際、コロニーも 30℃で培養したものより、50℃で培養したものが大きくなっていた(図 5)。40℃以上の温度では、急速に分裂が進み、培地の栄養成分をより消費したため、栄養ストレスが強くなり、芽胞形成が進んだ可能性が考えられる。60℃ではコロニー形成が起きなかったため、生育不可能な温度領域であると考えられる。

6. 実験 2：栄養分濃度の影響

実験 1 より、適温培養温度や高温下での培養における芽胞形成の要因は、栄養分の減少であることが示唆されたため、培地の栄養分濃度と芽胞の形成の関連について、検証を行った。栄養分については、生育に大きく関与するタンパク質をつくるためのペプトンの量を調節した。

仮説 2

タンパク質成分であるペプトンの量を減らすと、貧栄養ストレスにより芽胞形成率が増加する。

方法 2

1. 培地の調製

ペプトンの量を調節した LB 寒天培地を作成した。実験 1 や予備実験で作成した LB 寒天培地から 4g ペプトンを減らしたもの（ペプトン量 6g/L）、LB 寒天培地と同じもの（ペプトン量 10g/L）、LB 寒天培地にペプトンを 4g 加えたもの（ペプトン量 14g/L）の 3 種類を作成した。培地はオートクレーブ滅菌後、室温で一晩静置した。

2. 培養条件

実験 1 の結果から、50℃での培養が最も高い芽胞形成率を示したため、実験 2 ではすべての培養を 50℃に設定したインキュベーター内で行った。白金耳を用いてそれぞれの LB 寒天培地上に枯草菌を均一に塗布し、50℃で 3 日間培養した。実験 1 とは異なり、30℃でのコロニー形成ステップを省略した。実験 2 で、50℃でもコロニー形成が起き、芽胞を観察可能なことが分かったためである。

3. 芽胞形成率の測定

芽胞形成率の求め方は予備実験および実験 1 と同様であり、染色後に位相差顕微鏡を用いて培養 3 日目の菌体を観察した後、実験 2 と式によって算定した。

4. 仮説検定

実験 1 と同様に仮説検定を行った。「R」を使用し、芽胞形成率について、Kruskal-Wallis 検定および Dunn 検定を行った。有意水準を $p < 0.05$ とした。

結果 2

LB 寒天培地での培養では、芽胞形成率は 56.5%であり、実験 1 での値より少し大きい値となった。また、ペプトンを減らした培地では 76.5%と LB 寒天培地の 1.35 倍であった。ペプトン量増やした培地では、50.5%で LB 寒天培地の 0.89 倍であった。

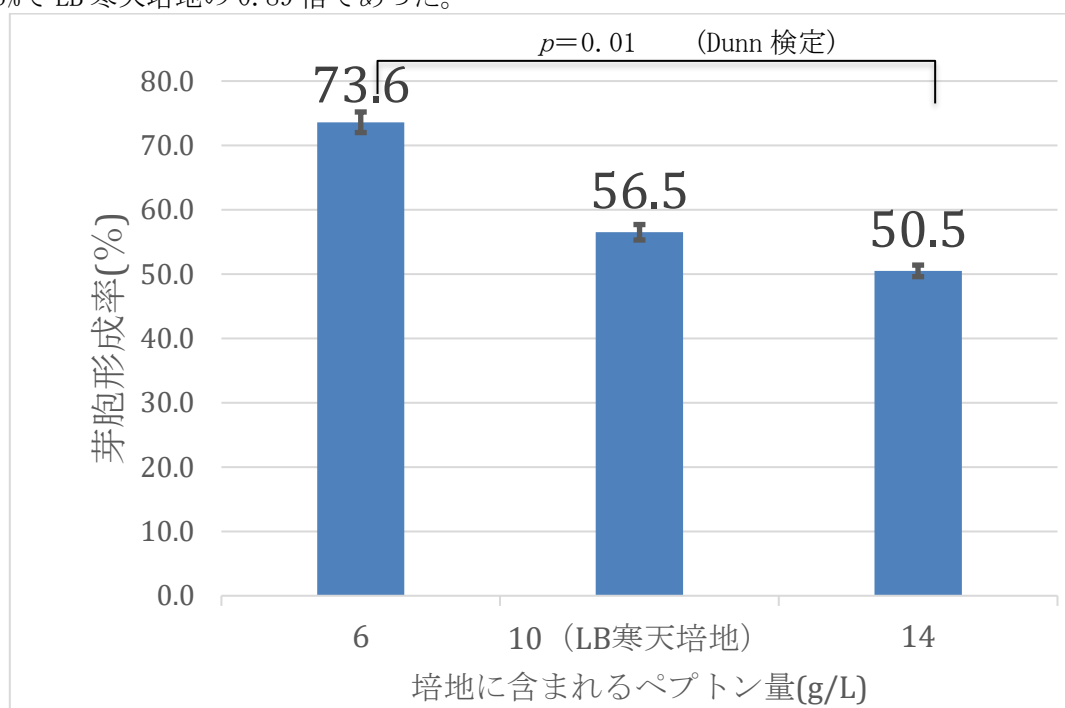


図 6 : ペプトン濃度の変化による芽胞形成率の変化(温度 50℃で培養)

考察 2

LB 寒天培地での芽胞形成率は 56.5%であり、実験 1 50℃での培養での値よりやや大きい値となった。実験 1 では 30℃で 1 日培養を行った後、50℃での培養を行ったが、本実験では初めから 50℃で培養したため、温度ストレスが強くなり、やや高い値となったと考えられる。また、ペプトン量を減らした培地（ペプトン 6g/L）で芽胞形成率が 1.35 倍高くなったのは、50℃での培養で枯草菌の増殖速度が速くなり、ペプトンを大量に消費したため、貧栄養のストレスが大きく出たと考える。逆に、ペプトンを増やした培地（ペプトン 14g/L）で、芽胞形成率が 0.89 倍となったのは、枯草菌増殖の際にペプトン消費が起きたが、ペプトンを 4g 加えたことで、貧栄養のストレスが軽減された可能性が示唆される。

7. 実験 3 : 音波照射の影響

仮説 3

音波は、空気の振動である。音波を照射させることで、枯草菌が物理的ストレスを感じ、芽胞形成が促進され则认为した。また、周波数により枯草菌が受け取る物理ストレスも変化すると考え、その検証を行った。

方法 3

1. 培地の調製

実験 3 では、予備実験および実験 1 と同じ LB 寒天培地を使用した。

2. 培養条件および音波照射

枯草菌の芽胞形成に対する音波照射の影響を調べるため、異なる周波数および振幅条件下で培養を行った。当初、50℃での培養を計画したが、音波照射に使用するスピーカーの損傷リスクを考慮し、十分な芽胞形成が観察される 30℃に設定した。

白金耳を用いて LB 寒天培地上に枯草菌を均一に塗布し、30℃で 3 日間音波を照射しながら培養を個行った。音波を直接枯草菌に照射するため、音波照射下で枯草菌を培養する装置の作成を行った。装置は、直接音波照射をするために、培地に蓋をしないこととした。そのため、培地の乾燥対策として、培地の上に、高さ約 8 cm の円形のプラスチック容器を被せた。容器上部にスピーカーの出力口に合わせて開口部を作り、開口部にスピーカーを上から配置し、培地に音波を照射した(図 7)。音源は、スピーカーを PC に接続し、音波発生サイト「5 Hz~21kHz サンプル音源 (<http://www.op316.com/tubes/tips/wav2.htm>)」を用いて発生させた。照射した音波の周波数および振幅は「FFT Wave」アプリで測定し、設定した周波数、振幅であるか確認した。設定した条件は以下の通りである。振幅を 60 dB とし、周波数〔音波照射なし（装置のみ設置）、70 Hz、10,000 Hz、18,000 Hz〕の 4 つで培養した。

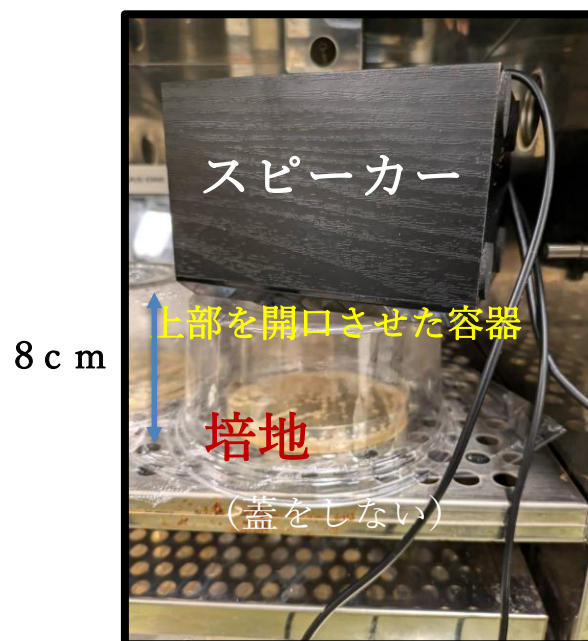


図 7：音波照射装置設での培養の様子

3. 芽胞形成率の測定

芽胞形成率の算定方法は実験 1 および実験 2 と同様で、各条件において上記式で算定し、3 視野の平均値を芽胞形成率とした。

4. 仮説検定

実験 1、2 と同様に仮説検定を行った。「R」を使用し、芽胞形成率について、Kruskal-Wallis 検定および Dunn 検定を行った。有意水準を $p < 0.05$ とした。

結果 3

装置のみを設置し、培養してもすべての培地でコロニーが形成された。装置のみを設置したものの芽胞形成率は 5.3%と低かったが、音波を照射すると大きくなった。振動数と芽胞形成率について見ると、70Hz で 64.2%、10000Hz で 48.1%、18000Hz で 28.9%であり、振動数が大きくなると、芽胞形成率が高くなった ($p=0.02$) (図 8)。

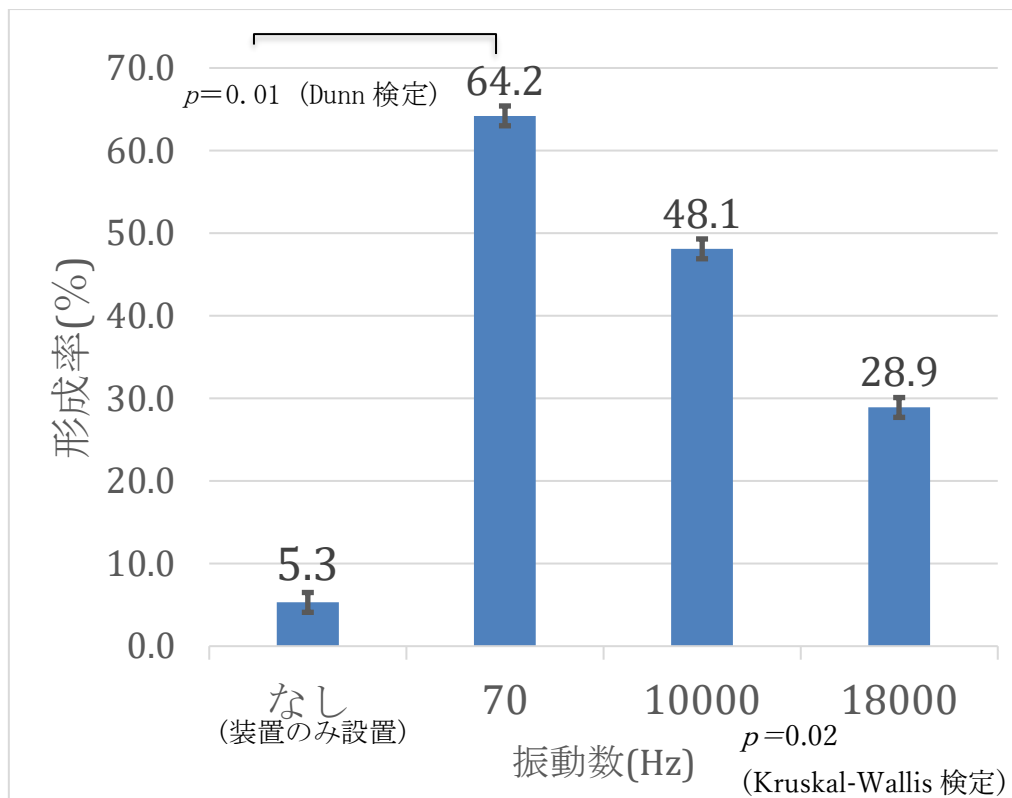


図 8：振動数の変化による芽胞形成率の変化（振幅は 60dB で固定、30℃で培養）

考察 3

装置を設置してもコロニー並びに芽胞が形成された。実験 1 における 30℃培養の芽胞形成率は 17.1%、装置設置のみの培養では 5.3%であるため、装置設置による芽胞形成の影響は少ないと考えられる。また、すべての周波数での音波照射によって芽胞形成率が増加していることから、音波照射により枯草菌が物理ストレスを受容し、芽胞形成が促進されたと考えられる。

周波数については、70Hz の周波数で 64.2%と最も高く、10000Hz、18000Hz と高周波になるほど、芽胞形成率が低下した。これは、高周波により、細胞内代謝が低下し、芽胞形成が抑制されたと考える。大腸菌では、高周波を当てた場合は、細胞膜の物質輸送や細胞内代謝が抑制され、増殖率や抗生物質受容性が低下する現象が報告されている。枯草菌の場合も同様に、高周波の照射により、芽胞形成を含む細胞内代謝が低下したことで、芽胞形成率が減少する可能性が示唆された。

8. 結論

枯草菌の芽胞は、高温、低栄養、低周波の音波照射の条件で形成されやすい傾向にある。高温では、細胞増加が促進されることで栄養分の枯渇が起きると共に温度ストレスも受容するため芽胞形成率が増加すると考えられる。また、低周波の音波照射では、音波による物理ストレスにより芽胞形成が促進されるが、高周波になると芽胞形成代謝が抑制される可能性が示唆される。

9. 今後の展望

高温による芽胞形成率の増加は、分裂速度の増加による栄養分の枯渇の可能性が示唆されたが、分裂速度の増加については、コロニーの目視にのみしか確認できていない。そのため、希釈してコロニー数をカウントすることで、分裂速度を数値化すると共に、培地に存在する成分量について成分分析にて求めることで、枯草菌の増加と栄養成分の減少、芽胞形成率の関係について詳しく調査したい。

また、低周波の音波照射により、芽胞形成率の増加が起き、高周波では、細胞内代謝の抑制により、芽胞形成率の低下が起こる可能性が示唆された。400Hz 周辺に芽胞形成率のピークがあると考えられる。これから周波数を細かく設定し、芽胞形成率と周波数の関係について詳しく求めていき、効率的な芽胞形

成法について提案していきたい。

10. 参考文献

- ・ Jacquelyn G. Black、ブラック微生物学 第3版
- ・ 医療情報科学研究所 他, 病気がみえる vol.6 免疫・膠原病・感染症 第2版
- ・ 館田一博・松本哲哉・岩田敏 他、Qシリーズ 新微生物学 第2版
- ・ Jeffery Errington & Lizah T. van der Aart、Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse、*Microbiology (Reading)* 2020 年 166(5):425-427. DOI:10.1099/mic.0.000922.
- ・ Souvik Banerjee, Sushmita Bhattacharya, Saptarshi Ghosh 、Effect of Different Sound Frequencies on the Growth and Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli*、*International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, Vol. 7, Issue 3 (2018), pp. 616–624

11. 謝辞

本研究の実施にあたり、徳島文理大学薬学部薬学科微生物学研究室 坂口義彦准教授には、細菌の培養法や染色法のご指導をはじめ、多岐にわたるご助言とご協力を賜った。

また、徳島大学教養教育院 渡辺稔教授には、細菌や培地の提供をはじめ、研究全般にわたり貴重なご助言とご支援をいただいた。

ここに両氏に深く感謝の意を表する。