

## 微生物の培養

30924 安藝織恵

30925 枝沢 梓

30927 柏田啓子

### ●概要●

フン便中の大腸菌の数や納豆中の納豆菌の数はどのくらいなのだろうかという身近な関心を解決するために、私たちはそれぞれの菌を培養し、その数を調べた。この実験で、私たちは特殊培地と一般培地を使い、大腸菌納豆菌を培養した。

How many bacteria do dung and fermented soybeans have? We cultivated the bacteria and counted the number of them to solve this question. In this experiment, we used special culture plates and normal culture plates to cultivate the bacteria.

### ●はじめに●

大腸菌とは？

大腸菌は、環境中に存在するバクテリアの中で主要な種の一つである。腸内細菌でもあり、温血動物（鳥類、哺乳類）の消化管内、特に大腸に生息する。バクテリアの代表として、各種の研究で材料とされるほか、遺伝子を組み込んで有用な化学物質の生産にも利用される。

大腸菌は無害であるが、いくつかのケースでは疾患の原因となることがある。



大腸菌(ウィキペディアより)

納豆菌とは？

納豆菌(学名 : bacillus subtilis natto)は、枯草菌(学名 : Bacillus subtilis)の一種である。学名も大変似ていて、稲の藁に多く生息し、納豆を作るときに利用されている。納豆菌に関する詳しい資料はほとんどなかった。

ここで枯草菌とは、土壌中や空气中に飛散している空中雑菌の一つで、枯れた草の表面などからも分離されることが多い。枯草菌は自然界に普遍的に存在する原核生物の一種で、 $0.7\sim 0.8\times 2\sim 3\ \mu\text{m}$ の大きさの好気性の細菌である。

培地について

培地とは、微生物を培養するための栄養素などを含む液体(液体培地)またはそれを寒天などで固化したものの(固体培地)のことをいう。微生物の培養条件の中でも、培地選択・設定はとても重要である。

今回は一般培地と大腸菌用の特殊培地を使って実験を行った。

**一般培地**：非選択的にできるだけ多くの微生物を生育させるための培地。

**特殊培地**：特定の微生物だけを選択的に生育させる培地。

## ●実験の目的●

ウサギのフンの中の大腸菌と納豆の中の納豆菌を培養し、できたコロニーの数を数える。そして実験結果を元に1gの検体中の菌のおおよその数を推定する。

## ●実験の手順●

### I. 培地を作る

市販の培地の粉を溶かして2種類の培地(一般培地、大腸菌用の特殊培地)を作る。シャーレに培地溶液を流し入れる作業はクリーンベンチ内で行う。表面が軽く乾く程度まで置いておく。

#### 一般培地 成分

標準プレート寒天培地 SPC 400ml 用

【組成/1リットル】	pH 7.0±0.1
カゼインペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.5 g
ブドウ糖	1.0 g
カンテン	15.0 g

#### 特殊培地 成分

デキソレート寒天培地(大腸菌用) DESO 400ml 用

【組成/1リットル】	pH 7.3±0.2
ペプトン	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
デキソール酸ナトリウム	1.0 g
クエン酸第二鉄	1.0 g
クエン酸ナトリウム	1.0 g
乳糖	10.0 g
リン酸2水素ナトリウム	2.0 g
リユートラルレッド	33.0mg
カンテン	16.0 g



完成した培地

### II. 検体の採取

ウサギのフンと納豆をそれぞれ1gずつ取る。ウサギのフンはとれたてホヤホヤの柔らかいものがよい。

### III. 希釈する

採取した検体に純粋49mlを加えて粉碎してきた懸濁液を原液とする。この原液を100倍に希釈したものを①、①を100倍に希釈したものを②、②を100倍に希釈したものを③とする。

### IV. 培地にぬる

混濁液の上澄みをマイクロピペットで0.1ml量とり、培地におとしてコンラージ棒で均一に広げる。シャーレの蓋を下にして恒温器中、36℃で培養する。



### V. 観察

数時間培養した後、カウンターを使ってできたコロニーの数を数え、平均値を出す。その結果をもとに1gの検体中の菌のおおよその数を計算する

## ●実験結果●

午後6時から午前10時まで培養した結果、以下のようなになった。

ウサギのフン

一般培地に数個のコロニーが見られるだけで、特殊

培地には変化がなかった。

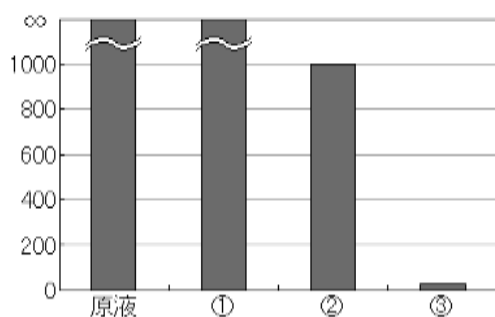
### 納豆

多数のコロニーが見られた。懸濁液の濃度によって観察できるコロニーの数が異なる。結果は次の表のようになった。

原液と①ではシャーレ全体にたくさんのコロニーが広がり、数を数えることは不可能だった。②では平均 1001 個のコロニーが、③では平均 22.75 個のコロニーが観察できた。上の表の平均値をグラフにすると次のようになった。

	コロニーの数				平均
原液	測定不可能				
①	測定不可能				
②	794	980	1130	1100	1001
③	19	31	23	18	22.75

コロニーの数(平均)



コロニーの数の平均値から納豆 1g に含まれる納豆菌のおおよその数を計算する。

### ②の場合

$$1001 \times 1000 \times 100 \times 50 = \underline{5.0 \times 10^9}$$

納豆 1g に含まれるに納豆菌の数は  $5.0 \times 10^9$  個

### ③の場合

$$22.75 \times 1000 \times 100 \times 100 \times 50 = \underline{1.1 \times 10^{10}}$$

納豆 1g に含まれるに納豆菌の数は  $1.1 \times 10^{10}$  個

同じ結果になるはずだが、値に誤差が生じている。



納豆菌のコロニー(②)



納豆菌のコロニー(②)

### ●考察●

結果を参考に市販の納豆 1 パック (50g 前後) あたりの納豆菌を計算してみると

$$1.1 \times 10^{10} \times 50 = 5.5 \times 10^{11} = 550000000000 \text{ 個}$$

となり、私たちは普段納豆 1 パックあたりにつき 5500 億もの納豆菌を摂取しているということにな

る。これは信じられないような数だ！

失敗した理由を自分たちなりに考えてみた。

なぜ大腸菌を塗った培地にはコロニーが見られなかったのか？

I.培地自体が不適であった。

(成分・作り方等)

II.フンの中に大腸菌がいなかった。

(これはほとんど考えられない。)

III.懸濁液を作った際に死滅した。

なぜ計算で求めた大腸菌の数に誤差が生じたのか？

I.コロニーが多数重なっていたため正確に数えることができなかった。

II.懸濁液の混ぜ方が不十分だったため菌同士が離れなかった。

#### ●今後の展望●

培養の際、細菌繁殖の環境条件(培地成分・温度・pH等)を変えて培養してみたい。条件次第で繁殖状況が変わってくるはずだ。もしかすると今回観察できなかった大腸菌が見られるかもしれない。

さらに身の回りで、どんな細菌がどんな密度で生息しているのか調べるとき応用することができそう。例えば、口の中や皮膚なんかを調べてみても面白いのではないのかと思う。

#### ●感想●

この実験をするにあたって普段見られない高価な器具(オートクレーブ・クリーンベンチ等)ばかりで、はじめは取り扱いに手間取ったが、実験を重ねるにつれしだいに慣れていって手早くこなせるようになった。1回目の実験で大腸菌のコロニーが見られなか

った時から、条件を変えて何度も挑戦したが、結局期待通りの結果が得られなかった。失敗が重なり、原因も不明だったので、なぜ上手くいかないんだろうと不安になりあきらめようとしたこともあった。しかし最終的に納豆菌で培養に成功し、結果を元に計算して出した値がなかなかいいところまでいっていると分かった。今まで苦勞した分本当に嬉しかった。未だに大腸菌が出なかった理由が分からないので、はっきりした理由を知りたい。

今回はじめて自分たちで課題を決め、研究をやってみて、一つの結果を得るのには惜しめない時間とあきらめられない根気が必要だということがわかった。これから大学へ向かう私たちにとって良い経験になったと思う。

実験には不十分な面も多々あったが、その分は大学に行って深めたい。

#### ●参考文献●

新版・微生物学実験法

ビギナーのための微生物実験ラボガイド

ウィキペディア <http://www.wikipedia.org/>