

乳酸菌と植物の共生

4年C組 市瀬 拓人

指導教諭 矢野 幸洋

指導教諭 櫻井 昭

1. 要約

乳酸菌は整腸作用などがあり人間の体に良いとされている。これを植物に適用すると動物の体内での働きと同じ効果が得られると予想し、乳酸菌を植物に取り込ませてその効果を確認めた。また、乳酸菌を用いた自然農薬の開発とその働きの確認実験を行い、効果の一部が確認できた。

キーワード 乳酸菌、乳酸、アデノシン三リン酸、自然農薬

2. 研究背景と目的

植物は乳酸菌の存在する特定の環境下においては、通常の栄養剤と同じくらい植物を長持ちすることが、筆者のこれまでの研究で分かっている。

しかし、これにはどのような物質が関与しているのかが不明であった。まず、その物質を特定し、それからその物質の特定の活用方法を見出すことにした。

次に、その物質が植物にどのように影響し、かつ、どのように用いると最も効果的なのかについて、実用化も視野に入れて追求することにした。

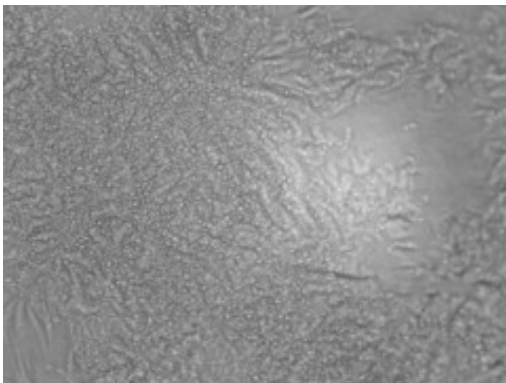


図1 乳酸菌の単離培養(×400)

3. 研究内容

乳酸菌についての基礎実験を行い、次に課題の解決のための実験を行った。

§1 基本事項

主にヨーグルトに用いられている菌には乳酸菌とビフィズス菌があり、乳酸菌は縦に長い形（桿菌という）をしておりビフィズス菌はY字型の菌である。

この中でも今回は乳酸菌について研究することにした。乳酸菌は原核生物に分類され *Lb. casei* (カゼイ菌) などが有名である。乳酸菌も種類により様々な特徴があるが、全ての乳酸菌についていえることはペプチドグリカンと呼ばれる細菌特有の細胞壁が一般的な細菌よりも厚いという特徴である。

これまでに乳酸菌は動物の小腸などに生息し、悪玉菌を破壊する生物であるとされてきた。しかし、最近では植物などからも乳酸菌が発見されている。

また、乳酸菌は動物の腸内の悪玉菌を撃退するだけでなく外界においても様々な雑菌や細菌を撃退することが証明されている。

§2 基礎実験

《基礎実験Ⅰ》カタラーゼ陰性の確認

乳酸菌はカタラーゼという物質を含まず、陰性を示す。

(1)実験方法

乳酸菌を過酸化水素水に浸す。酸素が発生するとカタラーゼ陽性菌、何も発生しなければカタラーゼがないのでカタラーゼ陰性菌となる。一部の孢子で増える乳酸菌はカタラーゼ陰性を示さない。

(2)実験結果

ヨーグルトに含まれる乳酸菌はカタラーゼ陰性だった。

《基礎実験Ⅱ》グラム染色法

細菌は主に、グラム染色法という染色方法で大きく2種類に分けることができる。この種類の違いは、細菌で細胞壁にあたりとされているペプチドグリカンの有無、又は厚みの違いである。

このグラム染色法は、ペプチドグリカンの有無、又は厚みの違いを利用して、細胞膜の染色を行った後、エタノールで洗う。洗浄しても陽性菌であれば、しっかりと染色されているので染色液がペプチドグリカンに残り、観察できるというものである。

(1)実験方法

・使用薬品

ルゴール(Lugol)液：

ヨウ素 1g、ヨウ素カリウム 2g、蒸留水 300ml (先ずヨウ素カリウムを少量の蒸留水に溶かし、次にヨウ素液を加

え、溶かしてから残りの蒸留水を加える。)

A液：

クリスタルバイオレット 0.3g、
95%エタノール 20ml

B液：

シュウ酸アンモニウム 0.8g、
蒸留水 80ml

混合液：

前日に A 液と B 液を混合し、使用当日に濾過する。

・染色方法

①スライドガラスに白金耳で蒸留水を1滴と乳酸菌をいれ、よく伸ばす。

②乾燥させる。

③ガスバーナーの上を3回ほど通す(固定される)。

④染色用混合液を1滴、滴下する(1~3分)。

⑤染色トレーで洗う(2回)。

⑥乾燥させる。

⑦ルゴール液を1滴、滴下する(1分)。

⑧染色トレーで洗う(2回)。

⑨乾燥させる。

⑩エタノールを1滴、滴下する(30秒)。

⑪染色トレーで洗う(2回)。

⑫乾燥させる。

⑬サフラニン液を1滴、滴下する(1分)。

⑭染色トレーで洗う(2回)。

⑮完全に乾かす。

⑯顕微鏡で観察する。

※これを、染色時間を1分、2分、3分と3種類をそれぞれ5回ずつ施し、合計15種類実施した。

(2)実験結果

図2のように乳酸菌の細胞壁(ペプチド

グリカン) が赤紫色に染まった。

よって、グラム陽性菌である乳酸菌と確かめられた。

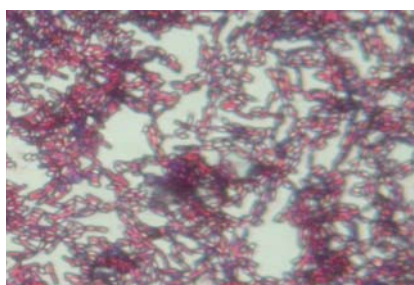


図2 グラム陽性を示す乳酸菌

§3 課題実験

《実験Ⅰ》植物の生育に対する乳酸菌の効果の研究

乳酸菌は植物の生育にとって肥料の役割をするのではないかと思い、乳酸菌水溶液の中でオオカナダモを培養するという実験を行った。

(1)仮説

オオカナダモは乳酸菌なしの状態より、乳酸菌水溶液で培養するほうが枯れずに長持ちし、よく生育する。

(2)実験方法

- ①乳酸菌(市販のヨーグルトに含まれているもの)を一晩約35℃で培養させる。
- ②次の3つのフラスコを用意する。
 - A: 栄養分と①の乳酸菌を入れたもの
 - B: Aと同じ濃度の栄養分をAと等量入れたもの(乳酸菌は入れない)。
 - C: 栄養分のかわりにAと等量の水を入れたもの(乳酸菌は入れない)。
- ③A~Cを同じ環境条件下において、2日目に、オオカナダモを同じ分量入れる。
- ④2週間ほど培養し、オオカナダモの様子を観察する。

(3)実験結果

それほど大きな違いは無かったが、やや乳酸菌入りの培養液で育てたオオカナダモの方がしっかりと育っていた。

(4)考察

少なくとも乳酸菌の生成物は植物に対して何らかの影響をもたらしている。

《実験Ⅱ》植物に効果のある物質の特定

実験Ⅰにおいて、乳酸菌が植物の成長過程において何らかの良い影響をもたらしているということが分かったので、次に、乳酸菌の生成する物質のうちの何が植物に働いているのかを調べる実験を行った。

(1)仮説

乳酸菌は以下のような働きを行っている。

* 基本反応式



によって乳酸菌によって生成される物質はC₃H₆O₃(乳酸)とATP(アデノシン三リン酸)であり、そのどちらかが影響を与えていると考えられる。

(2)実験方法



図3 左から市販の養分、ATP、乳酸

前ページの図3は、左から市販の養分・ATP・乳酸をそれぞれ1%の濃度の水溶液にオオカナダモを同量ずつ入れ培養したものである。市販の養分は比較のために用いた。

(3)結果

3日後には明らかな違いが出ていた。市販の養分は大変よく育ち、ATPは一部が枯れ、乳酸は大半が枯れてしまった。

(4)考察

おそらく市販の養分はそれぞれの物質の割合や濃度が適量になっている為良く育った。

しかし、今回用いたATPや乳酸は植物に対しての分量が適量とはいえなかったため、枯れてしまったと思われる。

《実験Ⅲ》乳酸の最適濃度

前回の実験では薬品の濃度が1種類だった。今回は、乳酸に着目して様々な濃度で実験を行った。

(1)仮説

実験ⅡにおいてATPと乳酸の量が適切でなかったと推定される。よって、乳酸の濃度をいろいろに変えて行う。おそらく適当な濃度というものがあるだろう。

(2)実験方法

乳酸水溶液を 10^{-1} mol/L~ 10^{-8} mol/Lまでの濃度で作成し、それぞれについて同質量のオオカナダモを培養する。

(3)結果

10^{-1} mol/L のときは大半が枯れてしまった。また、 10^{-8} mol/L と 10^{-6} mol/L を比べると、この場合は濃度が薄い方が濃度の濃い方よりも効果があった。

つまり、 10^{-6} mol/L は 10^{-1} mol/L よりも、

また 10^{-8} mol/L よりも効果があった。

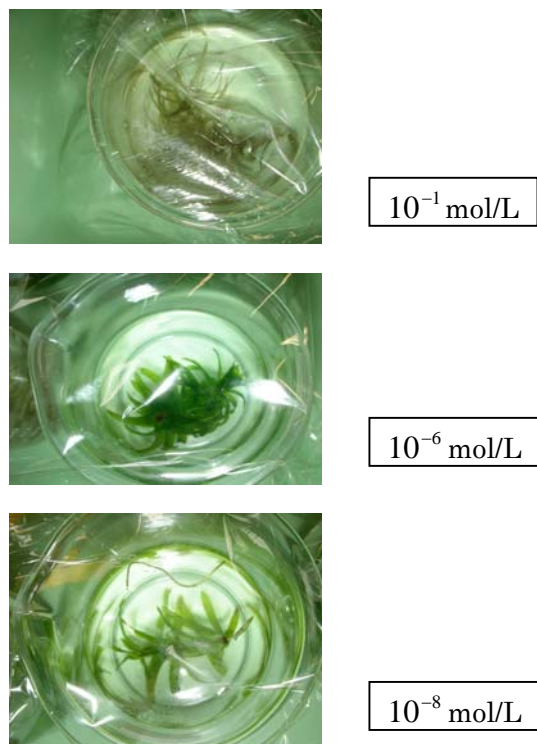


図4

(4)考察

実験結果より、濃度が濃すぎても薄すぎても効果がないと言えるが、適当な濃度であれば、植物に何らかの効果をもたらしているということがわかる。

《実験Ⅳ》乳酸の抗菌作用と濃度

前回の実験で、適当な量の乳酸があれば、植物に有益であるということであった。このことをさらに詳しく調べてみると、乳酸菌には抗菌作用があり、そのことと関係している可能性がある。つまり、乳酸菌がつくる乳酸のもつ外界から侵入した菌に対する抗菌作用が影響していることが考えられるため、乳酸に注目した。この実験は乳酸を含むLB培地と乳酸を含まないLB培地を作成し、両者を比較し、雑菌の繁殖度合

を観察比較するものである。

(1)仮説

乳酸菌の抗菌作用は生成する乳酸と関係があると考えられるので、乳酸が含まれている培地は雑菌が繁殖しないであろう。

(2)実験方法

①乳酸菌を次の濃度に調整した LB 培地を作成する。

10^{-1} mol/L、 10^{-2} mol/L、 10^{-3} mol/L
同時に乳酸を含まない LB 培地を作成する。

② ①の培地を室内に3日間放置する。

(3)結果

下の写真のように乳酸($C_3H_6O_3$)の濃度が高ければ高いほど雑菌が繁殖しなかった。

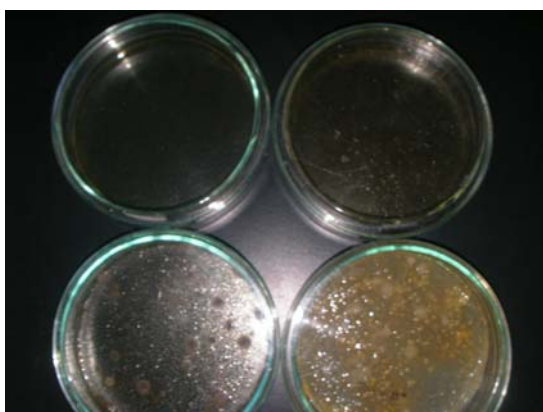


図5 1mol (左上)、 10^{-1}mol/L (右上)、 10^{-2}mol/L (左下)、乳酸なし(右下)

(4)考察

乳酸菌が殺菌・除菌効果を持つのは、乳酸菌の生成する乳酸のためであると推測できる。

5. 今後の課題

今回の乳酸菌を用いた実験で、乳酸菌の単離培養のほか、自然やヒトにやさしい農薬の開発に向けた大きな一歩を踏みだした。具体的には、乳酸菌の生成する乳酸が様々

な雑菌に対して抗菌作用を持っていることが証明された。

また、これからはこのことを利用して乳酸が最もよく効く雑菌類を発見し、乳酸菌を用いた人体や土地に無害な自然農薬の実用化に向けて研究を進めたいと思う。

6. 参考文献

- [1]「キャンベル生物学」、Neil A. Campbell、Jane B. Reece 著、小林興監訳、丸善株式会社
- [2]「フォトサイエンス生物図録」、鈴木孝仁監修、数研出版

7. 謝辞

今回の実験において(株)グリコ乳業の瀧澤さんには、多くの助言を頂戴し、乳酸菌についての文献を郵送していただきました。この場をお借りして感謝いたします。

また、日頃の SSH サイエンス研究会の活動等において指導をしていただいた本校教諭の矢野先生、櫻井先生には深く感謝しております。ありがとうございました。

最後になりましたが、今、この論文を読んでもらっている全ての方々にもこの研究を知っていただいたことに感謝いたします。

8. 資料

(1)固形ゲル LB 培地成分

LB 培地は細菌類の培養に向いている培地である。

- Luria-Bertani 25g
- (LB 培地用試薬 : Tryptone, Bacto 10g • Yeast extract, bacto 5g • NaCl 10g)
- Agar, Powole (寒天粉末) 1.5g

・蒸留水 100ml

(2)主に使用したヨーグルトの成分

種類別	発酵乳
無脂乳固形分	11.5%
乳脂肪分	3.0%
原料名	乳製品、生乳、 乳たんぱく質濃縮物

・栄養成分 (100 g)

エネルギー	70kcal
たんぱく質	5.0 g
脂質	3.0 g
炭水化物	5.8 g
ナトリウム	48mg
カルシウム	160mg

(3)主に使用した牛乳の成分

無脂乳固形分	8.3%以上
乳脂肪分	3.5%以上
原料名	生乳 100%

・栄養成分 (100ml)

エネルギー	64kcal
たんぱく質	3.1 g
脂質	3.6 g
炭水化物	4.7 g
ナトリウム	4.6mg
カルシウム	103mg