

PDA培地を赤く染める謎の微生物

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部

坂原一夏 北村夢風 喜納明日華

はじめに: 普段、部活で使用している実験室には多種多様な微生物が培養されている。放置された PDA 寒天培地に赤く染まっているものがあった (図 1)。微生物が試験管内に混入し、その微生物が赤色物質を生産したと考え、微生物の特定を進めた。種類も名前も分からないために、この微生物を仮に X 株と名づけて研究を進めた。さらに、赤色物質の生産に関与する培地成分を検討した。その結果を報告する。



図 1 赤く染まった PDA 培地

研究の項目:

1. 赤色物質生産菌 (X 株) の継代培養
2. X 株の微生物同定 (顕微鏡観察-図 2)
3. 赤色物質の生産に関与する培地成分の研究



図 2 オリンパス CX 日立 SU1510

1. 赤色物質生産菌(X 株)の継代培養

PDA 寒天培地に塗抹培養を行った (図 3)。

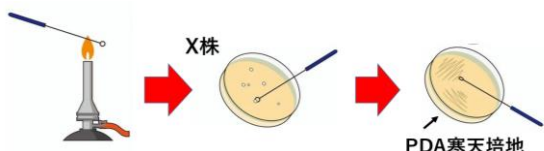


図 3 X 株を PDA 培地に継代培養



図 4 継代培養後の X 株生育状況

30°C で培養後、菌の生育は良好で、表層は白色で粉状であることを観察した。1 週間後には培地全面を赤く染めた (図 4)。

2. X 株の微生物同定

2-1) 生物顕微鏡観察

倍率 900 倍で観察した (図 5)。菌糸状を確認したが、細菌のようにも見え、かびか細菌か区別するのは困難であった。

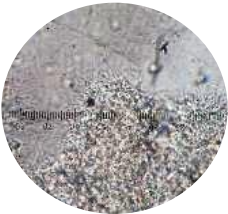
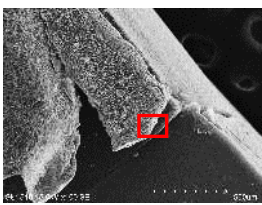


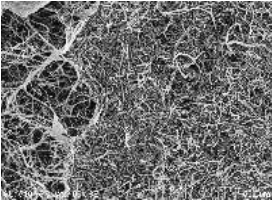
図 5 X 株の生物顕微鏡観察 (×900)

2-2) 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

PDA 寒天に生育した X 株コロニーを切り取り試料を作成して細胞像を 1 万倍まで拡大して観察した (図 6)。観察画像の菌糸幅が $1\mu\text{m}$ 程度でかびの菌糸幅が $10\mu\text{m}$ 程度であることから、放線菌の可能性が高いと考えられた。生物顕微鏡で細菌に見えたのは、胞子で $1\sim 2\mu\text{m}$ の大きさを観察できた。



×100



×1.0 K



×10.0 K

図 6 走査電子顕微鏡による X 株細胞像

3. 赤色物質の生産に関与する培地成分の研究

X 株は PDA 培地成分であるポテトエキスの主成分であるデンプン (約 1.5%) とブドウ糖 (1%) を資化し、赤色物質を生産すると考えられ、生産に関与する成分の探索に向けて培地区分を策定した。

3-1) 条件 1. デンプンとブドウ糖を含む培地の培養

試薬であるデンプンとブドウ糖の培地の含有比率を区分して A、B、C とした (表 1)。窒素源^{*}は培地の 0.5% を添加した。X 保存株のコロニーから各培地に接種 (塗抹) し 25°C で 5 日間培養した。培養後の結果はデンプンおよびブドウ糖単独の培地 (A、B) で菌の生育は弱く、複数の培地 (C) で生育は良好であった (図 7)。A、B、C とも培地が赤くなる兆しは見えなかった。

^{*} 窒素源成分の割合はニトorgen

ベース 10%、酵母エキス 0.1%、カザミノ酸 0.1%である。

区分\培地成分	デンプン	ブドウ糖	窒素源
A	1.5	0	0.5
B	0	1.5	0.5
C	0.75	0.75	0.5

表 1 デンプンとブドウ糖の培地含有比率 (%)



図 7 X 株培養の培地成分の検討
左から区分 A、B、C

3-2) 条件 2. PDA 培地 (D) とポテトエキス単独培地 (E) の培養

デンプンやブドウ糖が直接赤色物質の生産に関与しないと考えて PDA 培地 (D) とポテトエキス単独培地 (E) の区分を設定した。菌を接種 (塗抹) し、25°C で 5 日間培養した。培養後の結果 (図 8)、E は赤色を呈さなかった。ポテト抽出成分のデンプン以外の成分とブドウ糖を含む培地の関与が示唆された。

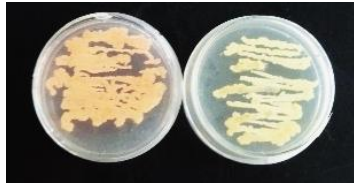


図 8 X 株の培地成分の検討
左: 区分 D 右: 区分 E

3-3) 条件 3. ポテトエキス代替培地 (F) の培養

ポテトとさつまいもの成分含量が比較的近い値を示していることから、さつまいもエキスも赤色物質生産に関与するのではないかと考えた。さつまいもエキス培地 (F) について 3-1, 2 同様の方法で培養した。培養後、F 培地は赤く染まり、ポテトエキスと同様の反応を示した (図 9)。ポテトとさつまいも両者に共通して含有する成分とブドウ糖が反応したと考えられる。ポテトとさつまいもの成分表から両者に比較的多いカリウム (0.48g/100g) の関与を疑った。



図 9 X 株の F 培地における培養試験

3-4) 条件 4. カリウム添加培地 (G) の培養

仮説として放線菌 X 株の赤色生産物質生成はデンプン (5%) + ブドウ糖 (1%) + ペプトン (0.5%) + 酵母エキス (0.3%) + 塩化カリウム (0.4%) の含有培地 (G) でポテト培地を代替できると考えた。前と同様に放線菌 X 株コロニーを種菌として塗抹して培養した。培養後、培地は赤色を呈さなかった (図 10)。赤色物質生産にカリウムが関与すると期待し



図 10 X 株のカリウム G 培地の培養試験

たが、関与しなかった。

3-5) 条件 5. 培地成分の糖類資化性試験

X 株の PDA 培地を赤く染める成分として、ポテトエキス + ブドウ糖が必須であった。必須成分であるブドウ糖を代替できる糖の存在を探るべく、11 種類の糖類資化性試験を行った。単糖類である果糖 (Fru)、ガラクトース (Gal)、マンノース (Man)、トレハロース (Tre)、キシロース (Xyl)、二糖類のショ糖 (Suc)、麦芽糖 (Mal)、乳糖 (Lac)、三糖類のラフィノース (Raf)、糖アルコールのマンニトール (Mani)、キシリトール (Xyli) を含む窒素源添加培地の X 株培養により、ブドウ糖代替の可能性を検討した。対照としてブドウ糖 (Gul) および糖類無添加培地 (Sf) も作成し、放線菌 X 株コロニーを種菌として培地に塗抹し 25°C で 5 日間培養した。培養結果 (図 11) から、培地の赤色変化に関与する糖類は Gul、Gal、Man、Xyl の単糖類と Mani で、特にマンニトール



図 11 X 株の糖類資化性試験による赤色物質生産反応

3-6) 条件 6. 培地 pH による X 株の赤色物質生産

X 株の色素生産について関与するポテトエキスの成分解明には到達できていないが、培地 pH における X 株の色素生産について調べた。PDA 培地の pH を 4.0~9.0 の 6 区分に設定した。前と同様の方法で培養 (25°C、5 日間) した。培養結果 (図 12) から、培地 pH が 5.0 で最も赤く染まり、pH7.0 以上では呈色反応がなかった。pH4.0 でも赤く染まるが、菌糸の生育が弱いことが分かった。

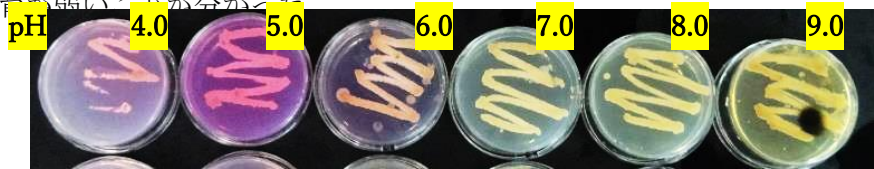


図 12 X 株の赤色物質生産における培地 pH の影響

課題と展望: 放線菌は抗生物質を生産するものが多く、製品の約 2/3 は放線菌由来と知られている。今後、X 株の赤色物質生産に関わる培地成分であるポテト微量成分の特定に向けて取り組むとともに、放線菌 X 株の抗菌性について調べたい。また、放線菌 X 株の DNA 分析を行いよりはっきりとした種類を特定し、後の実験の参考にしたい。