

初めて微生物を扱う学生向けの微生物分離・観察実験の組み立て

- 「夏休み自由研究お助け隊」を通して -

木澤 祥恵^{a)}

筑波大学生命環境科学等技術室 (応用生物化学系)

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

「夏休み自由研究お助け隊 2005」で独自テーマ「醗酵とは?かびとは?」を受けたことを契機として、今年度開催の「夏休み自由研究お助け隊 2010」まで6回にわたり微生物の分離・観察実験のテーマを担当した。受講生の理解を深め、より微生物に関心を持ってもらえるよう各年でテーマの内容、取り上げる微生物の種類など様々な取り組みを行ったので、その推移、問題点、今後の課題などについて報告する。

キーワード: 微生物、学生実験、夏休み自由研究、筑波大学社会貢献

1. はじめに

「夏休み自由研究お助け隊 2005」の実行委員の方から、独自テーマ「醗酵とは?かびとは?」に対応できないかという相談をいただいた際、せっかく微生物に興味を持っていたのだからと受講生の方と連絡を取り、どのようなことに興味があるか問い合わせてみたところ、食品の醸造などに興味があるとの回答をいただいた。受講生が一人だけということもあり、筆者が担当している生物学類、生物資源学類の学生実験とオーバーラップする形で実験を組み立ててみた。

中学校の理科第二分野では植物、動物は取り上げられているが、微生物についてはほとんど触れられていないのが現状で、ましてや実験材料として扱う機会は皆無に近い。高校の生物 I、II にしても同じ状況であるため、逆に中学生でも、補助できる人数が多ければ、大学生と同じような手技が可能であるのではと考えた。

そこで、滅菌済みの培地を入れたシャーレを数種類用意し、興味のある醸造食品を持ってきてもらって、受講生自身でシャーレに植菌し、そのシャーレを持ち帰って観察するという流れを作ってみた。それだけでは物足りないので、その場で顕微鏡観察ができる乳酸菌(ヨーグルト)、事前にスライドカルチャーで生育させた *Aspergillus oryzae* (コウジカビ)、*Mucor rouxii* (ケカビ) などを用意して顕微鏡観察をしてもらった。

①滅菌済みの培地に興味のあるサンプルを植菌し、生育させて観察する。②微生物を顕微鏡で観察する。という2点は、今年度開催の「夏休み自由研究お助け隊 2010」に至るまで、細かい修正をしながら継続している。日程、取り上げる微生物、準備する培地の選択などについては、改善が必要と考えられた時点で変更を行った。その推移について報告する。

表 1 培地組成

培地名	組成 (/蒸留水 1000 ml)	pH	Agar
PDA 培地	Potato Extract 4.0g グルコース 20.0 g	5.4-5.8	2%
1/10 2YT 培地	ポリペプトン 1.6g イーストエキス 0.1g NaCl 0.05 g	7	2%
BCP 加プレートカウントアガール培地	イーストエキス 2.5g ポリペプトン 5.0g グルコース 1.0g ポリソルベート 80 1.0g L-システイン 0.1g BCP(プロモクレゾールパープル) 0.04g	7	2%
LB 培地	カゼイン由来ペプトン 10.0 g イーストエキス 5.0g NaCl 10.0 g	7	2%

^{a)} E-mail: kizawa.yoshie.ge@un.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-6628

2. 実験内容の推移

2.1 テーマ内容の推移

「夏休み自由研究お助け隊 2005—『醗酵とは？かびとは？』」では、主に醸造食品をサンプルとして実験を組み立てた。醸造食品は納豆、味噌、ビール、醤油、ヨーグルトなど、確かに生産工程では微生物を使っているが、流通過程での過発酵、雑菌の混入などを防ぐため綿密な滅菌工程を経ているものが多く、そのまま培養しても微生物の生育が認められないものが多かった。

この過程を踏まえ、乳酸菌にターゲットを絞って次年度は「夏休み自由研究お助け隊 2006—『ヨーグルトの乳酸菌を観察しよう』」にテーマを切り替え、ヨーグルトに含まれる乳酸菌を BCP 加プレートカウントアガール培地（日本製薬株式会社製、以下、BCP 培地と表記する）のシャーレ上で培養し（図 1 参照）、更に 10%スキムミルク水溶液がヨーグルトの乳酸菌を植菌したことで乳酸の産生により固まる現象の観察を行い（図 2 参照）、それぞれについて顕微鏡観察を行った（図 3 参照）。ヨーグルトの乳酸菌については受講生の関心も高く、好評だったが、①乳酸菌には嫌気性の菌が多く、好気培養だけでは乳酸菌の生育が認められない場合が多いので、シャーレの培地に植菌後、培地を重層する形で嫌気培養を行う必要がある。②顕微鏡観察した場合の菌の形態にバリエーションが少ない。③受講生が自分でシャーレに植菌した微生物を顕微鏡観察することができない。などの課題を残した。



図 1. 乳酸菌を植菌した BCP 培地
乳酸産生による pH 低下で培地の色が黄変する。

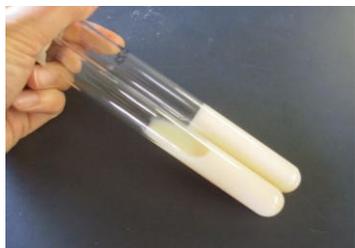


図 2. 10%スキムミルク水溶液
右側の乳酸菌を植菌したスキムミルク溶液
は乳酸産生による pH 低下で一晩で固まる。

「夏休み自由研究お助け隊 2007—『ヨーグルトの乳酸菌を観察しよう』」では日程を半日ずつ 2 日間連続する、という形を取り、受講生自身がシャーレに植菌した微生物を 2 日目に顕微鏡観察することが可能になった。嫌気培養も、培地を重層するので

はなくアネロパックを使用した簡便な方法を採用することができた。ただ、②の問題点、「顕微鏡観察した場合の菌の形態にバリエーションが少ない。」を改善することはできなかった。



図 3. 乳酸菌の顕微鏡写真（ヨーグルト由来）

「夏休み自由研究お助け隊 2007—『身近な微生物を観察してみよう』」では乳酸菌に限定せず、PDA 培地（ポテトデキストロース寒天培地：日本製薬株式会社製）、LB 培地（Merck 社製）、更に乳酸菌の分離用に BCP 培地、また、キムチなどの乳酸発酵を行う漬物をサンプルとして想定し、BCP 培地に 5%食塩添加した培地を用意した。10%スキムミルク水溶液が乳酸の産生により固まる現象の観察も併せて行った。

サンプルとしては土壌、川の水、自家製味噌、果物、ヨーグルト等バラエティーに富み（図 4 参照）、受講生 3~4 名の間でもお互いのシャーレを見せ合ったり、顕微鏡観察できたものを見比べたりすることができた。

今回は、サンプル及び培地にかなり幅を持たせたため、実験自体は楽しくできたという意見が受講生からは挙がってきた半面、全体に結果をまとめる段階で方向性が散逸してしまったことが新しい課題となった。

これを踏まえて、「夏休み自由研究お助け隊 2008—『身近な微生物を観察してみよう』」では培地の種類を PDA 培地と 1/10 2YT 培地、さらに乳酸菌用の BCP 培地の 3 種類に絞り込んだ。PDA 培地と 1/10 2YT 培地は栄養価の極端に異なる培地の比較ができるように選定し、BCP 培地はヨーグルトがサンプルとして持ち込まれた場合にのみ使用することとした。

この年に「微生物」＝「植物プランクトン（ミカヅキモなど）、動物プランクトン（ミジンコなど）」と解釈していた受講生がいたため、翌年からは「夏休み自由研究お助け隊 2009—『身近な微生物（細菌・酵母・カビ）について調べてみよう』」、「夏休み自由研究お助け隊 2010—『微生物：細菌・酵母・カビについて調べてみよう』」、など具体的な表記をするように心がけた。実験内容、使用する培地などについては 2008 以降大きな変化は加えていない。



図 4. ユニークな分離源の例
セミの羽から分離したバクテリア

2.2 実験日程の推移

「夏休み自由研究お助け隊 2005—『醗酵とは？かびとは？』」、「夏休み自由研究お助け隊 2006—『ヨーグルトの乳酸菌を観察しよう』」では、半日の実験とし、説明、植菌、顕微鏡観察を行って、植菌済みのシャーレを持ち帰る形式を取った。この形式ではその後のシャーレの状態がこちらで把握できず、実験がやりっ放しで終わってしまう可能性があるため、「夏休み自由研究お助け隊 2007—『身近な微生物を観察してみよう』」からは2日間連続、半日ずつという形式を取った。1日分の培養を学内で行うことができるため、アネロパックを用いた嫌気培養(図5参照)など、培養条件のバリエーションが広がること、自分で植菌した微生物を顕微鏡観察できることなど利点が多く、その後は今年度までこの日程を採用している。



図5. アネロパックを用いた嫌気培養

2.3 使用する培地の推移

乳酸菌の分離用培地については BCP 培地を継続して使用している。乳酸菌の分離に使用される培地として、他にも GYP 白亜寒天培地が挙げられるが、1日の培養でははっきりとした乳酸の産生を示すハロ(培地に加えた炭酸カルシウムが乳酸により溶解してコロニーの周りに透き通った部分ができる現象)を観察できないことから BCP 培地を選定した。

土壌、水などの一般環境からのサンプルを扱う場合の培地については、生物学類、生物資源学類の学生実験で一般的に使われる培地を使用している。

PDA 培地(ポテトデキストロース寒天培地:日本製薬株式会社製)はカビ、酵母の生育に適していると言われており、ジャガイモの熱水抽出物(Potato Extract)とグルコースが主成分であるため、聞き慣れない培養基に比べて受講生に馴染みがあるかと思いい、「富:栄養培地」代表として使用している。一方の 1/10 2YT 培地は、イーストエキスとポリペプトン、食塩を含む 2YT 培地を 1/10 に希釈した培地で、「貧:栄養培地」代表として使用している。土壌、水など環境サンプルではこちらの培地に生育しやすい菌も多く、2種類の培地に同様に植菌することで栄養要求性などの違いを考察できるようにしている。

3. 問題点及び今後の課題

3.1 基本的な微生物の説明

受講生には事前に簡単な説明と、微生物の分離源となるサンプルの準備を依頼する文書を送っている。

実験当日には PowerPoint で作成した資料を使って主な説明を行っているが、実験に時間を割くためなかなかゆっくりと説明を行うことが出来ない。実際の実験内容とは別に、中学生でも理解できるような冊子を作り、実験後でも読み返せるよう配布したいと考えている。

3.2 結果のまとめ方

結果をまとめる方法については、それぞれの使用するサンプルの種類が異なるため具体的な対応を行ってこなかったが、環境サンプルの培地を2種類に絞り込んだ段階で結果を記入するためのシートを作成する必要性を感じている。

携帯電話のカメラやデジタルカメラで生育状態を記録している受講生が多いが、写真を撮りっぱなしでどのデータかが分からなくならないよう、シャーレを目視で観察する場合のコロニーの特徴をその場でノートに具体的に記載できるよう色、形状、特徴等をまとめて言葉で表現するための指導が必要である。

3.3 テーマを担当する側の問題点

今回この報告書をまとめてみて、実際に持ち込まれたサンプルの種類と対応についてのまとめ、結果の追実験など、当日の忙しさに紛れて対応できなかった部分や整理しきれない部分が沢山あることを痛感した。今後は指導すると同時に、毎年のデータをどのように残すか、方法を検討したいと考えている。

謝辞

初めてテーマ担当として参加した「夏休み自由研究お助け隊 2005」以来、今年度に至るまで当日の指導の補助をして下さっている生命環境科学等技術室応用生物科学系の技術職員の皆さんをはじめ、「夏休み自由研究お助け隊」運営にかかわる実行委員の皆さん、ご協力いただいた大学執行部、関係各支援室、研究科に心より感謝申し上げます。

本検討の一部は、日本学術振興会 科学研究費補助金(奨励研究) 20934009 によるものである。

参考文献

- [1] 安藤昭一編著, 初めて学ぶ人のための微生物実験マニュアル 第2版 技報堂出版
- [2] 細野明義著, ヨーグルトの科学—乳酸菌の贈り物—八坂書房

Formulation of experiments to isolate and examine microorganisms for students
handling microorganisms for the first time
— The Summer Workshop for Middle School Students —

Kizawa Yoshie

Institute of Applied Biochemistry, Technical Service Office for Life and Environmental Sciences,
University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8572 Japan

Given the opportunity to present the original topic of “What is fermentation? What is mold?” at the 2005 Summer Workshop for Middle School Students, we have supervised the topic of experiments to isolate and examine microorganisms in the 6 subsequent workshops up to the 2010 Summer Workshop for Middle School Students held last year. In order to increase students’ level of understanding and foster greater interest in microorganisms, we have taken various approaches each year to aspects like topic content and types of microorganisms covered. Here, we report on changes in and problems with these approaches and topics for the future.

Keywords: microorganisms, student experiments, Summer Workshop, social contribution by Tsukuba University