

ダンゴムシとワラジムシのフンから 防カビ物質を抽出したい！

島根県 出雲市立第三中学校 3年

片岡 証人

※ ダンゴムシを④、ワラジムシを⑤と書くことにする。

研究を始めた理由

飼育ケースは一度も掃除したことがないのに、カビや悪臭がまったく発生していない?! と小5で気付いて以来、「④⑤にはカビや悪臭を防ぐ力があるのでは?」と考え、それを実証、性質解明、物質同定するため取り組んできた。『④⑤が防カビ力をもつ』という益虫の面を具体的に見つけたい。

研究の目的

④⑤のフンに含まれる防カビ物質を、活性を保ったまま抽出できる方法を見つける。それに伴って、防カビ物質の性質もを見つける。

研究の方法 (各実験の方法は省略)

一昨年の結果「フンを加熱したら防カビ力が失われた」をもとに、「防カビ物質はタンパク質やペプチドではないか?」と仮説を立てた。これらを抽出できるであろう溶媒として3種類を想定した。

ア：蒸留水 イ：界面活性剤 Tween80 (1%水溶液)

ウ：有機溶媒 アセトニトリル (50%水溶液)

これらの溶媒を使用し、④⑤の雌雄それぞれのフンについて、防カビ物質を抽出できるか、以下の2種類の方法で実験する。(図1)

カビの生育を阻止した円の有無、発生したカビのコロニーの個数

研究の結果

まずは、フン抽出液を染み込ませたペーパーディスクを置くと同時に、被検菌液を噴霧する手順で

実験1 防カビ物質は界面活性剤 Tween80 で可溶化できるか。

(生育阻止円で比較)

- どの種類も生育阻止円を確認できなかった。
- フン抽出液の濃度が薄いか、被検菌の濃度が高すぎるか、かもしれない。
↓コロニー数で比較する方法に切り替えて再実験する

実験2 防カビ物質は界面活性剤 Tween80 で可溶化できるか。

(コロニー数で比較)

- 一昨年までの結果のような、フン全体がもつ防カビ力ほどの有意差までは出なかった。→ Tween80 では、防カビ物質全量の抽出は困難かもしれないが、一部は抽出できている可能性がある。

↓溶媒を変え、有機溶媒アセトニトリルで実験を行う

実験 3 防カビ物質は有機溶媒アセトニトリルで抽出できるか。

(コロニー数で比較)

- 昨年までの結果のような、フン全体がもつ防カビ力ほどの有意差までは出なかった。→原因はいろいろ考えられる。

↓フン抽出液のペーパーディスクを置いて 72 時間後に、被検菌液を噴霧する手順に変更して

実験 4 防カビ物質は蒸留水で抽出できるか。(生育阻止円で比較)

- どの種類も、生育阻止円は確認できなかった。

↓溶媒を変えて、有機溶媒アセトニトリルで実験を行う

実験 5 防カビ物質は有機溶媒アセトニトリルで抽出できるか。

(生育阻止円で比較)

- どの種類も、生育阻止円が確認できるものはなかった。

抽出液の成分がペーパーディスクに残ってしまっているからかもしれない。

↓フン抽出液を培地に直接滴下して、乾燥後に、被検菌液を噴霧する手順で

実験 6 防カビ物質はどんな溶媒で抽出できるか。(生育阻止円で比較)

- どの溶媒でも生育阻止円が確認できるものはなかった。
- フン全体で防カビ効果があったのと同量のフンの抽出液を使い切っても、防カビ効果は確認できなかった。

もしかしたら「溶媒では抽出できないもの」なのか？

⇒「フンの常在微生物」の可能性もあるかも！

仮説を立てなおして、防カビ効果をもつのは

エ：「フンの成分そのものの物質」か？

オ：「フンの常在微生物」か？

カ：「フンの常在微生物が発する物質」か？

↓フンの懸濁液をフィルターを通さずにそのまま培地に塗布し、そこへ被験菌を噴霧すれば、防カビ効果の現れ方のちがいで 3 者の判断ができるはず。

実験 7 防カビ力を示す微生物を単離培養し、同定する。

7-1：フンそのままの懸濁液を培養後に被験菌を噴霧し、発生した生育阻止円の中央にいる微生物を観察する

- 4 種類すべて、カビや細菌などの微生物が多数存在した。
- ㊸♂, ㊸♀, ㊸♂では微生物に近いほど、被験菌が抑えられていた。
⇒ 境目がグラデーションなので「常在微生物が発する物質」が拡散して被験菌を抑えている可能性が高い。
- フンの微生物に由来する可能性が高い。

7-2 : 7-1 で生育阻止円を発生させた (円の中央にいる) 微生物を
単離培養し、同定する

⇒ 3 種類が単離された

A : *Aspergillus niger*

B : *Pseudomonas plecoglossicida*

C : *Penicillium citrinum*

- Aは、抗生物質生産菌であることが報告されている。
Bは、同じ属に抗生物質生産菌がある。
Cは、カビ毒の生産菌であるという報告があった。
- 他の培地を使えば別の菌が活性するかもしれない。今後調べる。
- 抗生物質生産菌などが生育阻止円をつくることを考えると、
昨年度見つけた同心円も、その類かもしれない。

実験 8 : 実験 7 で見つけた「防カビ力をもつ種類」は、
昨年見つけた円のように「デンプンを分解する力」をもっているか

- BとCがデンプンを分解していた。

研究から分かったこと

- 防カビ力は「フンの常在微生物」に由来する。
- 防カビ「物質」については、抽出に適する条件を見つけるまでは保留
- 防カビ力をもつ常在菌は、少なくとも3種類。
A : *Aspergillus niger* (黒コウジカビの仲間)
B : *Pseudomonas plecoglossicida* (シュードモナス属の細菌)
C : *Penicillium citrinum* (ペニシリンをつくるカビの仲間)
- 一昨年「加熱すると、防カビ力が低下するがゼロになるわけではない」については、常在菌A, B, Cの耐熱性の差で説明がつく。
- 一昨年「㊸が㊸よりも防カビ力が弱い」のは、常在微生物3種類のうち㊸には2種類しかないから、という説明もありうる。今後検証する。
- Bは防カビ力もデンプン分解能力も高かったため、応用価値がありそうだ。

まとめ

“常在微生物”に至った時はとてもうれしかった。今後、常在微生物の発する防カビ成分の特定に取り組む。

㊦㊧が腐敗防止に役立っていたことを発見できたので、㊦㊧と人間と自然が共存できる生活スタイルを発信したい。

また、同定できた微生物 3 種類のうち、2 種類は既知、あと 1 種類は防カビ力もデンプン分解力も両方あったので、生物由来の安全な薬品等を開発してみたい。

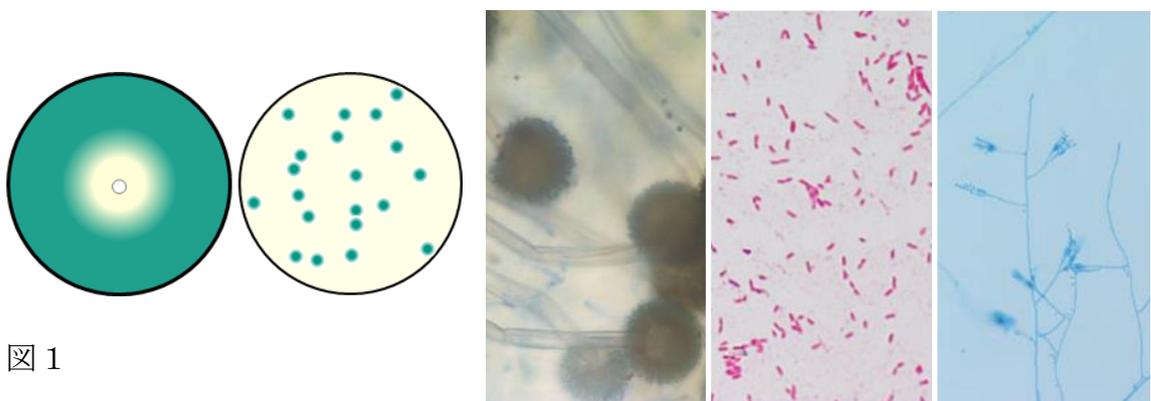
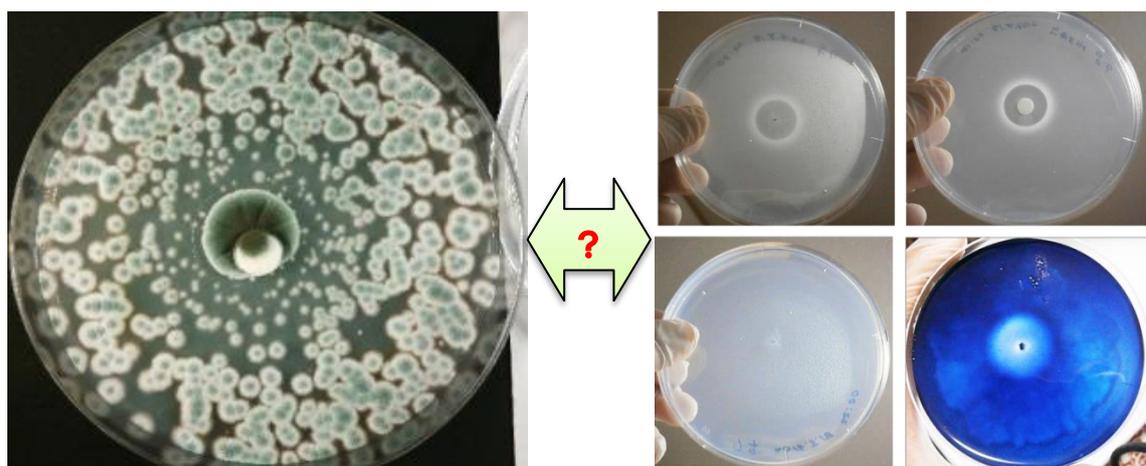


図 1

生育阻止円…防カビ物質が、
 周囲のカビの生育を阻止した円
 コロニー…カビの集合体

防カビ力をもっていたフンの常在微生物
 A 顕微鏡 200 倍 B 1000 倍 C 200 倍



(左) 実験 5 - 1 ダンゴムシのオスのフンで実験 1 回目

(右) フンから広がった いろいろな種類の円