納豆菌とカビの増殖力の強さの関係

遠藤 雄介

要旨

本研究では、納豆菌(*Bacillus subtilis var.natto*)が既に増殖を抑制することが確認されているボトリティスシネレア（*Botrytis cinerea*）を含む他属のカビの増殖を抑制するかについて検証した。本研究ではボトリティスシネレア、コウジカビ(*Aspergillus*)、アオカビ(*Penicillium*)の三種を対象とし納豆菌と共に培養し、カビ単独で培養させてある培地や他種のカビ、他種の培地で育てたカビの増殖範囲を比較した。その結果、ボトリティスシネレアとアオカビでは納豆を同一の培地に同時に培養させると菌糸の伸長を抑制された。一方、コウジカビでは抑制はされたものの他の二種のカビより抑制効果は弱く、コウジカビのみを LB 培地で培養させたものでは部分的な増殖が確認された。これらの結果から、納豆菌のカビへの増殖抑制効果はカビの種類や培地条件に依存する可能性があると考えられる。

キーワード：増殖力（増殖速度)、菌糸、培地

Ⅰ. はじめに

一部のカビは植物を枯らす「植物の病原菌」として作用している。一方、納豆菌(*Bacillus subtilis var.natto*)を含む *B.subtilis* は植物病害の生物的防除手段として生物農薬に用いられているものもある（ボトキラー水和剤，インプレッション水和剤）。納豆菌はジピコリン酸や Surfactin、細胞壁分解酵素など納豆菌がなんらかの抗菌物質によりカビの増殖を抑制することが示唆されている（河村ら、2013）。また、PSA 培地上において納豆菌が増殖することにより他のカビの生育環境を減らし、抑制することが報告されている（蘭ら、1988）。生育環境の競争がカビの増殖を抑制しているものとすると、納豆菌はカビに対して直接的な作用はしておらず、カビの増殖の抑制具合はカビ自身の増殖力と納豆菌の増殖力に依存すると考えられる。ほかにカビの栄養源となる有機物を分解することでカビの増殖を抑制することも報告されている（木村、2005）。この作用により納豆菌がカビの増殖を抑制しているとすると、納豆菌はカビに対して直接作用しておらず、カビの増殖の抑制具合は納豆菌の栄養分解力に依存すると考えられる。現在、ボトリティスシネレア（*Botrytis cinerea*）は納豆菌により増殖力が抑制され、これは納豆菌による菌糸細胞壁に対する合成阻害か、あるいは分解作用が関与している可能性が示唆されている（橋本ら、2012）。このように納豆菌がカビの増殖を抑制する仕組みには複数の可能性が示唆されている。仕組みによっては非特異的にカビを抑制する可能性があるため、抑制の仕組みについて明らかにするために、本実験ではカビ抑制効果の仕組みについて考察することで、納豆菌のカビの増殖を抑制する作用は特異的であるかについて検討した。本実験により、具体的にどのような特徴を持つカビに対して効果をもち、どのような性質を持つカビに対して効果が小さいあるいは効果がないことを考察する。

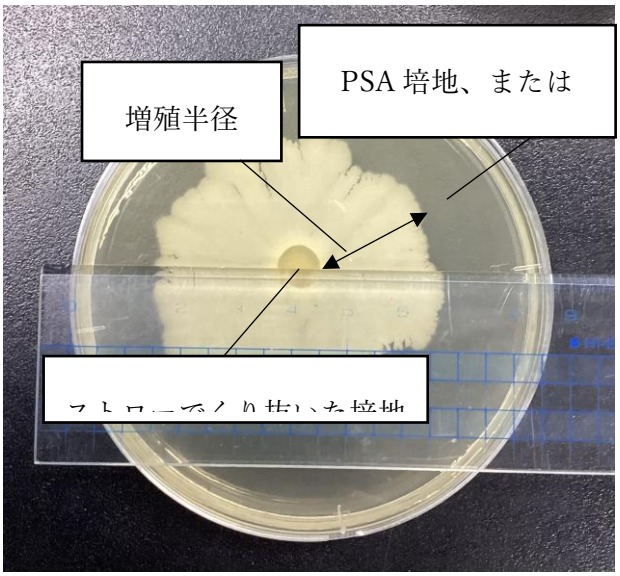
Ⅱ. 手法

実験 1 で用いたカビはコウジカビ(*Aspergillus*)(こうじや里村)、ボトリティスシネレア（*Botrytis cinerea*)(NBRC5365)、アオカビ(*Penicillium*)(NBRC5473)(いずれも BSL-1)である。納豆菌は LB 培地（水 500m、寒天 7.5g、NaCl 5g、ペプトン 5g、酵母エキス 2.5g）で培養し、カビは PSA 培地（純水 500mL、40mm 角切りしてあるジャガイモ 100g、スクロース 10g、寒天 10g を混ぜ合わせたのちに蓋をしてオートクレーブをかけたもの）で培養した。なお、保存してあるカビは復元液（純水 500ml、ペプトン 2.5g、イースト抽出

液 1.5g、硫酸マグネシウム 0.5g 水溶液）に数分浸し、PSA 培地に移した。

次に納豆菌とカビをそれぞれ LB 培地と PSA 培地で培養した。まず、納豆菌を培地に塗り広げ、すぐに培養し対策カビを PSA 培地ごとストロー（First.253）でくり抜き、柄付き針で培養させてある面を下向きにして、納豆菌を塗り広げた培地に移した。その後、37℃の環境下で 5 日間培養し、実験値をとった。実験 2 では PSA 培地に納豆菌を塗り広げ、すぐにコウジカビ(*Aspergillus*)(購入元こうじや里村）一粒を中央に置いた。この培地を 4℃、25℃、37℃の環境下で 5 日間培養し、実験値をとった。その後、全ての培地を 37℃の環境下で 2 日間培養し、実験値をとった。なお、カビ単独で培養させたものは 1 つのみ行い、カビと納豆菌を一緒に培養させたものは 3 つ行い、その増殖半径の平均値をとり、そこからストローの半径を引いた値を実験値とした。

図 1 実験の様子



III. 結果

実験 1. カビの種類に関する実験

表 1 各カビと納豆菌の有無によるカビの増殖半径

	納豆菌	増殖半径の平均値(mm)	
		PSA 培地	LB 培地
ボトリティスシネレア	×	31.6	19.0
	○	なし	なし
コウジカビ	×	33.0	あり(※1)
	○	11.0	なし
アオカビ	×	26.0	31.1
	○	なし	なし

※1 コウジカビのみを LB 培地に培養させると飛び飛びでコウジカビが確認されたが目視できる菌糸はなかった。

ボトリティスシネレアは納豆菌が存在しない PSA 培地上では 31.6mm、LB 培地上では 19.0mm の増殖が見られ、納豆菌が存在する条件では PSA 培地でも LB 培地でもボトリティスシネレアの増殖は見られなかった。コウジカビは納豆菌が存在しない条件下では 33.0mm、LB 培地上では飛び飛びでコウジカビが確認される特異的な増殖が見られた。コウジカビは納豆菌が存在する PSA 培地上において 11.0mm の増殖が認められたが、LB 培地上ではコウジカビの増殖は認められなかった。アオカビは納豆菌が存在しない PSA 培地上では 26.0mm、LB 培地上では 31.1mm の増殖が観られた。アオカビは納豆菌が存在する条件では PSA 培地でも LB 培地でも増殖が見られなかった。このように納豆菌の増殖を抑制する作用はコウジカビにおいて、他の二つのカビと比べると小さかった。

実験 2. 温度に関する実験

表 2 各温度におけるコウジカビの増殖半径

温度(℃)	納豆菌	5 日間の増殖半径（mm）	37℃移行後 2 日間の増殖半径(mm)
4	×	なし	21.0
	○	なし	2.0
25	×	17.0	24.0
	○	3.2	8.1（※2）
37	×	17.4	24.6
	○	2.6	18.4（※2）

※2 コウジカビの増殖は目視できたが途中で菌糸が途切れていた。なお、その菌糸欠損区域には納豆菌が確認された。

コウジカビは 4℃で培養すると納豆菌の有無にかかわらず、増殖が認められなかった。また、本実験ではコウジカビの生育の最適温度に最も近い 25℃においては納豆菌が存在している培地において最も増殖した。また、納豆菌の生育の最適温度に

最も近い 37℃においては納豆菌が存在する条件下において 25℃における納豆菌が存在する条件下よりも増殖は認められなかった。実験 2 で使った培地を 37℃で培養すると全ての培地で増殖が認められた。しかし、25℃、37℃の納豆菌が存在するという条件において菌糸が途切れるという結果になった。

IV. 考察

表 1、2、3 からボトリティスシネレアとアオカビ、コウジカビは納豆菌と一緒に培養させると菌糸の伸長が抑制された。このことから確かに納豆菌はカビに対して何かしらの作用を起こしており、その作用によって増殖が抑制されていると言える。表 2 からコウジカビにとっての最適温度におけるコウジカビの増殖半径は納豆菌にとっての最適温度におけるコウジカビの増殖半径より大きかった。最適温度において栄養分解の速度が上がると考えるとコウジカビは37℃より25℃の条件で納豆菌は25℃より 37℃の条件で栄養分解速度が最速になることから栄養獲得競争による抑制効果の可能性を考えることができる。しかし、実験 2 において、37℃に移行する前に表 2 から 25℃と 37℃の条件下において納豆菌はコウジカビの増殖を抑制することが確認されているため、納豆菌が栄養獲得競争により増殖を抑制していると考えると、この時点で培地に存在していた栄養は既に枯渇していると考えることができる。しかし、この二つの条件でコウジカビを培養していたものは 37℃に移行した後、増殖半径の広がる速さにおいて、移行前より明らかに早くなっていたため、37℃移行前も栄養は枯渇していると考えることはできない。そのため、納豆菌は栄養獲得競争により増殖を抑制しているとは考えにくい。また、表 2 から納豆菌が最適温度である 37℃という条件下において納豆菌は最もコウジカビの増殖を抑制している。そのため、納豆菌は最適温度において納豆菌は最も抗菌物質分泌作用が活発化すると考えると、抗菌物質による作用の可能性を考えることができる。コウジカビの PSA 培地、納豆菌ありという条件下において、納豆菌は全体に分布させていてコウジカビが増殖するための領域がとても少なかったにもかかわらずわずかながら増殖していることから、納豆菌は生育環境の競争による抑制をしているとは考えにくい。以上のことから納豆菌は抗菌物質によってカビの増殖を抑制している可能性が高いと考えることができる。また、実験 1 において、表 1 から納豆菌はアオカビやボトリティスシネレアに対する増殖抑制作用に対して、コウジカビに対する増殖抑制作用はあったものの弱かったと言える。これはコウジカビは様々な種類の酵素をもち、分解できる栄養も異なることが知られており（一島 2015)、これらの酵素は納豆菌が生産する抗菌物質に対してコウジカビの出すとわかっているプロテアーゼなどの強力なタンパク質分解酵素により抗菌物質を無効化することで抗菌物質に対して強い競合作用を示す可能性を考えることができる。また、コウジカビの細胞壁にたくさん存在しているα-1,3-グルカンという糖でできている物質は外部分子がコウジカビの細胞壁と結合しにくくする特徴があり、その特性から抗菌物質が細胞内まで作用しにくくなるため、抗菌物質の作用が弱まる可能性が示唆されている（Zhang et al、2017)。コウジカビはこの物質を細胞壁に持つことによって納豆菌の出す抗菌物質に対して耐久性を持っている可能性などがあると考えられる。

V. 結論

本研究から納豆菌が期待できるカビの増殖を抑制する作用の大きさはカビの種類によって異なることが示唆された。また、納豆菌のカビの増殖抑制作用は生育環境の競争によるものであるという可能性と栄養の獲得競争によるものという可能性は棄却できると考えられる。以上のことから納豆菌のカビの増殖を抑制する仕組みは納豆菌が生産、分泌する抗菌物質よるものである可能性が高いと考えることができる。

謝辞

本研究は SSH による助成金により成り立っており文部科学省、また、実験方法の検討や考察におけ

る議論など研究の多面的な面でサポートしていただいた庵原先生をはじめとする市川高校理科教員に感謝を申し上げる。

文　献

蘭道生（1988）：微生物の環境適応および共生における生物情報の認識•伝達機構の解明

阿久津克己、河村郁恵、中島雅己、橋本俊祐（2012）：納豆菌（*Bacillus subtilis var. natto*）によるイチゴの灰色かび病に対する抑制効果

一島英治（2015）：国際的に認知される日本の国菌

Silai Zhang,Hiroki Sato,Sakurako Ichinose,Mizuki. Tanaka,Ken Miyazawa,Akira Yoshimi,Keietsu Abe,Takahiro Shintani,Katsuya Gomi(2017): Cell wall α-1,3-glucan prevents α-amylase adsorption onto fungal celli