

食品の持つ抗菌性を調べる実験の教材化

高橋 大輔

教育学研究科 理科教育専修

鈴木 隆

地域教育文化学部 地域教育学科

加藤 良一

地域教育文化学部 生活総合学科

(平成21年3月11日受理)

要 旨

植物性食品の抗菌性を簡便に調べることができる実験教材として、(A) YEB寒天培地又はPYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を培地表面に0.5ml塗布し、その中央の穴に抗菌性食品を約0.3g入れ、それらをシャーレで24時間培養する方法、(B) YEB寒天培地又はPYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、納豆からの5倍希釈の上澄み液を培地表面に0.5ml塗布し、その中央の穴に抗菌性食品を約0.3g入れ、それらをシャーレで24時間培養する方法、及び(C) 6枚切り又は8枚切りの食パンの耳の部分を切り落とし、さらに1枚の食パンをほぼ均等に4つの四角形の切片にし、その切片の片面のみ腐葉土からの5倍希釈の濾液に浸し、その切片の中央に約0.3gの抗菌性食品を置き、それらを密封容器で5日間培養する方法の3つが簡便で分かりやすいものとして示された。

I はじめに

細菌及び菌類は、私たちの生活の中で多様に活用されている。例えば、抗生物質を生成するアオカビ⁴⁾、枯草菌の一種で大豆から納豆を作る納豆菌⁴⁾、味噌や醤油を作るコウジカビ⁴⁾、及びパンを膨らませるイースト⁴⁾などいくらでもある。また、食品として慣れ親しんでいるキノコも、菌類の中の担子菌に属している⁴⁾⁵⁾。

これらの細菌及び菌類は、理科教育における教材として次のように取り上げられている。中学校「理科2分野」では、自然界のつりあいの学習²⁾で土壌中の微生物の働きによって培地中のデンプンが分解されることを調べる実験¹⁾、高等学校「生物Ⅰ」では、遺伝子の学習として肺炎双球菌の形質転換、高等学校「生物Ⅱ」では、物質の異化の学習で酵母菌のアルコール発酵から嫌気呼吸を確認する実験²⁾²⁶⁾、バイオテクノロジーの応用の学習でバイオリアクタの作成実験³⁾、生活環および二種間競争の学習で細胞性粘菌を利用した二種間競争を観察する実験⁶⁾、物質の同化の学習で光合成細菌、化学合成細菌、及び窒素固定細菌の働き、及び基礎的な培養実験の学習で海洋性発光細菌を用いて最適な生育環境を調べる実験⁷⁾などである。

植物が抗菌性を持つのは、細菌及び菌類などの微生物が外敵として感染するのに対抗する手段であり、動物の免疫系に相当するものと捉えられる。植物はその体内で抗菌性を持つ二次代謝物質を合成し、花、葉、茎、又は根などに常にそれらを存在させておくことにより、微生物の感染に対抗する手段としている¹³⁾。植物の持っているこの抗菌性は、私たちの生活の中にも取り入れられている。その代表的な例として、「寿司」が挙げられる。冷蔵庫のように低温での保存が難しかった時代に、食中毒の危険を減らしながら生魚を食べるために、ご飯に酢を混ぜ、ワサビと一緒に食べることで細菌や菌類の繁殖を抑えようとした先人の知恵は、広く知られている。また、ワサビの抗菌性に着目し、水を添加することで抗菌成分を揮発させるような除菌剤¹⁹⁾も開発されている。さらに、ある植物体からの抽出物は、メチシリン耐性ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸球菌に代表される抗生物質耐性菌に対して抗菌性を示す¹³⁾ことから、これらの抽出物を院内感染を抑える薬剤として適用することが期待されている。また、植物の持つ抗菌性を応用した技術は、特に食品衛生学の分野において近年研究が進んでいる^{7) 8) 9) 10) 11) 12) 13) 14) 15) 16) 17) 20)}。それは、ハーブやスパイスとして²⁴⁾、又は伝統的に生薬として²⁵⁾用いられてきた植物から抽出されたエッセンシャルオイルが抗菌活性を持つことは、多くの植物を材料に研究されてきた。

抗菌性に着目した教材としては、高等学校「生物Ⅰ」で、生体防御の学習として、ニワトリ卵の卵白リゾチームの抗菌効果を調べる実験¹⁸⁾が示されている。しかし、植物の持つ抗菌性に基づいた実験教材は、これまでほとんど報告されていない。

本研究では、抗菌性を学習する実験教材として、食品として広く用いられている植物、特に香辛料や薬味として用いられている食品の持つ抗菌性を、簡便に調べることができる実験例を提唱した。

II 研究方法

1. 材 料

(1) 培 地

5g/ℓ ビーフエクストラクト (Bacto Beef Extract, DIFCO, Code No:0126-01-8)、1g/ℓ イーストエクストラクト (Bacto Yeast Extract, 和光純薬工業株, Code No:2011-06-30)、5g/ℓ ペプトン (Bacto Peptone, DIFCO, Code No:0118-01-8)、 $2 \times 10^{-3} \text{M}/\ell$ 硫酸マグネシウム、5g/ℓ スクロース及び1.5%寒天粉末を含むYEB寒天培地 (pH7.2) を準備し、それをオートクレーブで121℃、15分間滅菌した後、滅菌プラスチックシャーレ (岩城硝子株, Code No:SH90-20) に約20mlずつ分注し固めた。2g/ℓ イーストエクストラクト、2g/ℓ ペプトン、2g/ℓ グルコース及び1.5%寒天粉末を含むPYG寒天培地 (pH7.2) を準備し、それをオートクレーブで121℃、15分間滅菌した後、滅菌プラスチックシャーレに約20mlずつ分注した。

ごはん (福島県産コシヒカリ、パック詰め、200g、イオン株)、食パン① (ソフトでしっとり食パン、4枚切り、イオン株)、食パン② (ソフトでしっとり食パン、6枚切り、イオン株)、食パン③ (ソフトでしっとり食パン、8枚切り、イオン株)、食パン④ (ダブルソフト、1枚の厚さはほぼ①と同じ、山崎製パン株)、及び食パン⑤ (超芳醇、6枚切り、山崎製パン株) は、山形市内のスーパーマーケットでそれぞれ購入した。

(2) 種 菌

細菌及び菌類は、腐葉土の中から抽出された。その腐葉土は、山形大学小白川キャンパスの地域教育文化学部2号館北側の花壇において、土壌表面から深さ50mmまでを採集して得られた。納豆（おかめ納豆 小粒納豆、45g×4、タカノフーズ株）に含まれる納豆菌、ブルーチーズ（アーラブルーチーズ、100g、チェスコ株）に含まれるアオカビ、乳酸菌飲料（ヤクルト、65ml、株ヤクルト）に含まれる乳酸菌も用い、それらは山形市内のスーパーマーケットでそれぞれ購入した。

(3) 抗菌性食品

ワサビ（おろし本わさび、チューブ入り、33g、ハウス食品株）、ショウガ（おろししょうが、チューブ入り、40g、エスピー食品株）、及びニンニク（おろしにんにく、チューブ入り、42g、ハウス食品株）は、山形市内のスーパーマーケットでそれぞれ購入した。

2. 培養および抗菌効果

(1) YEB寒天培地又はPYG寒天培地で腐葉土中の細菌及び菌類又は納豆菌を培養

腐葉土約50gを300ml用ビーカーに入れ、そこに蒸留水を50ml加えて（2倍希釈）攪拌した。そして、10分間静置して、上澄み液を得た。また、納豆約10gを100ml用ビーカーに入れ、そこに蒸留水を20ml（3倍希釈）、40ml（5倍希釈）、又は90ml（10倍希釈）加えて攪拌した。そして、5分間静置して、上澄み液を得た。滅菌プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の中央に、滅菌済みコルクボーラーを用いて、直径4mm、7mm、又は10mmの穴を開けた。そして、その培地表面に、腐葉土からの上澄み液、又は納豆からの3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を、それぞれ0.1ml、0.5ml、又は1.0mlコンラージ棒を用いて塗布した。次に、その中央の穴に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ0.1g、0.3g、又は0.5g入れた（図1）。穴に入れる抗菌性食品の量は、直径4mmの穴では0.1g、直径7mmの穴では0.1g又は0.3g、及び直径10mmの穴では0.1g、0.3g、又は0.5g、それぞれ入れることができた。最後に、プラスチッ

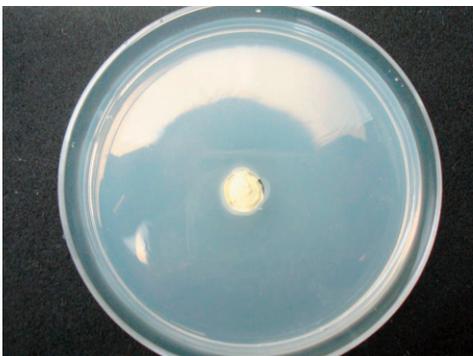


図1 PYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、納豆からの5倍希釈の上澄み液を0.5mlその培地表面に塗布し、その中央の穴にワサビを0.3g入れた様子。

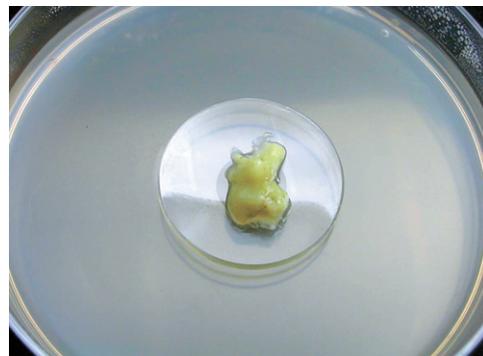


図2 YEB寒天培地の表面に腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を0.5ml塗布し、その培地中央に時計皿を置き、そこにワサビを0.3g加えた様子。

クシャーレをパラフィルムで密閉した後、25℃で24時間培養した。

腐葉土約50gを300mlビーカーに入れ、そこに蒸留水を50ml加えて（2倍希釈）攪拌した。そして、10分間静置して、上澄み液を得た。また、納豆約10gを100mlビーカーに入れ、そこに蒸留水を40ml加え（5倍希釈）攪拌した。そして5分間静置して、上澄み液を得た。滅菌プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、腐葉土又は納豆からの上澄み液を、それぞれ0.5mlコンラージ棒を用いて塗布した。そして、その培地中央に時計皿（直径：30mm、ガラス製）を置き、そこに抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ約0.3g入れた（図2）。最後に、プラスチックシャーレをパラフィルムで密閉し、25℃で24時間培養した。

(2) YEB寒天培地又はPYG寒天培地でブルーチーズのアオカビ又は乳酸菌飲料の乳酸菌を培養

ブルーチーズの中に含まれるアオカビを、滅菌したピンセットを用いて取り出し、100ml用ビーカーに入れた。そこに蒸留水を100ml加えて攪拌し、懸濁液を得た。また、乳酸菌飲料は希釈しないでそのまま用いた。滅菌プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、その懸濁液又は乳酸菌飲料を、それぞれ0.1ml、0.3ml、又は0.5mlコンラージ棒を用いて塗布した。最後に、プラスチックシャーレをパラフィルムで密閉し、25℃で5日間培養した。

(3) ごはんで納豆菌を培養

納豆約10gを100ml用ビーカーに入れ、そこに蒸留水を10ml（2倍希釈）、40ml（5倍希釈）、又は90ml（10倍希釈）を加えて攪拌した。そして、5分間静置して、上澄み液を得た。ごはん50gをスクリュウ培養容器（直径：80mm、高さ70mm、ポリカーボネイト製、株ベルディ）の底に敷き詰め、そこに納豆1粒をごはんの中央に置く、納豆1粒をごはんの表面にこすり付ける、又は納豆からの2倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を平筆（14号平筆、馬毛＋ナイロン10%、株大創産業）でごはんの表面に塗布した。最後に、スクリュウ培養容器に蓋をして、25℃で培養した。

(4) 食パンで腐葉土中の細菌及び菌類を培養

腐葉土約50gを300ml用又は500ml用ビーカーに入れ、そこに蒸留水を50ml（2倍希釈）、100ml（3倍希釈）、200ml（5倍希釈）、又は450ml（10倍希釈）を加えて攪拌した。そして、10分間静置して上澄み液を得、それを濾紙（アドバンテック東洋株No2、直径240mm）で濾過し濾液を得た。また、納豆約10gを100ml用ビーカーに入れ、そこに蒸留水を10ml（2倍希釈）、20ml（3倍希釈）、40ml（5倍希釈）、又は90ml（10倍希釈）加えて攪拌した。そして、5分間静置して、上澄み液を得た。次に、食パン①、食パン②、食パン③、食パン④、食パン⑤、食パン⑥、又は食パン⑦において、その耳の部分包丁で切り落とし、さらに1枚の食パンをほぼ均等に4つの四角形の切片にした。そこに腐葉土又は納豆からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を平筆を用いて表面にそれぞれ塗布した。また、腐葉土又は納豆からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を約20mlそれぞれガラスシャーレに入れ、その切片の片面のみを



図3 6枚切り食パンの耳を除き、さらにその1枚を4つの四角形の切片にし、その切片を腐葉土からの5倍希釈の濾液に片面のみ浸し、その切片の中央にワサビを約0.3g置いた様子。



図4 YEB寒天培地の表面に腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を0.5ml塗布し、24時間培養した後の様子。

1秒浸す、又はその切片全体を1秒浸した。次に、それらの切片は、上澄み液を付けた面が上になるようにして、それぞれスクリー培養容器の底に置いた。なお、全体を浸したその切片は、表裏の区別がないこととした。そして、抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ約0.3gその切片の中央に直径10mm程度になるように置いた(図3)。最後に、スクリー培養容器の蓋をして25℃で3日間又は5日間培養した。また、同様の方法を、スクリー培養容器の代わりに密閉式保存容器(縦:130mm、横:90mm、高さ50mm、容量400ml、蓋をパッキンで密閉できるもの、ポリプロピレン製)を用いても行った。

III 結 果

1. 培養系の確立

(1) YEB寒天培地又はPYG寒天培地で腐葉土中の細菌及び菌類を培養

プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液をそれぞれ0.1ml、0.5ml、又は1.0mlコンラージ棒を用いて塗布し、24時間培養した。0.1ml塗布したものは、その培地表面の一部に細菌の増殖が見られない部分があった。0.5ml塗布したものは、細菌がその培地の表面全体に様に広がった(図4)。1.0ml塗布したものでは、その上澄み液が培地の表面に溜まってしまい、その表面に様な菌の増殖はなかった。また、YEB寒天培地とPYG寒天培地の間で、その細菌の増殖に大きな差はなかった。

(2) YEB寒天培地又はPYG寒天培地で納豆菌を培養

プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、納豆からの5倍希釈の上澄み液をそれぞれ0.1ml、0.3ml、又は0.5mlコンラージ棒を用いて塗布し、24時間培養した。0.1ml塗布したものは、その培地の表面に一部納豆菌の増殖が見られない



図5 YEB寒天培地の表面に納豆からの5倍希釈の上澄み液を0.5ml塗布し、24時間培養した後の様子。



図6 6枚切り食パンの耳を除き、さらにその1枚を4つの四角形の切片にし、その切片を腐葉土からの5倍希釈の濾液に片面のみ浸し、24時間培養した後の様子。

部分があった。0.3ml及び0.5ml塗布したものでは、納豆菌が培地の表面に一樣に広がった(図5)。次に、YEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、納豆からの3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を、それぞれ0.5mlコンラージ棒を用いて塗布し、24時間培養した。3倍希釈の上澄み液を塗布すると、納豆菌の増殖が培地表面に濃淡のついた模様状に見られた。5倍希釈の上澄み液を塗布すると、納豆菌は培地表面に一樣に増殖していた。10倍希釈の上澄み液を塗布すると、その培地表面の一部に納豆菌の増殖がない部分できた。また、YEB寒天培地とPYG寒天培地の間で、納豆菌の増殖に大きな差はなかった。

(3) YEB寒天培地又はPYG寒天培地でアオカビを培養

プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、アオカビの懸濁液をそれぞれ0.1ml、0.3ml、又は0.5mlコンラージ棒を用いて塗布し、5日間培養した。全ての実験区の結果は、培養1日後で培地の表面全体に一樣なアオカビの増殖を確認したが、5日間培養を行っても孢子形成による青色への変色はわずかに見られるだけだった。また、YEB寒天培地とPYG寒天培地の間で、アオカビの増殖に大きな差はなかった。

(4) YEB寒天培地又はPYG寒天培地で乳酸菌を培養

プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、乳酸菌飲料をそれぞれ0.1ml、0.3ml、又は0.5mlコンラージ棒を用いて塗布し、5日間培養した。全ての実験区の結果は、5日間培養しても乳酸菌は全く増殖しなかった。

(5) ごはんで納豆菌を培養

ごはんをスクリュウ培養容器の底に敷き詰め、そこに納豆1粒をごはんの中央に置く、納豆1粒をごはんの表面にこすり付ける、又は納豆からの2倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を平筆でごはんの表面に塗布し、蓋をして5日間培養した。納豆1粒をごはんの中央に置いたものは、3日間培養しても納豆の粒の周囲にだけ納豆菌が増殖した。納豆1粒をごはんの表面にこすりつけたものでは、培養1日後に納豆菌の増殖によるコロ

ニーの形成がごはんの表面の一部に見られ、培養3日後にはさらに納豆菌の増殖を確認できたがごはんの表面全体に様に納豆菌を増殖させることはできなかった。平筆で納豆からの2倍希釈、3倍希釈、及び5倍希釈の上澄み液をごはんの表面に塗布したものは、培養2日後に納豆菌の増殖によるコロニー形成がごはんの表面の一部に見られたが、5日間培養してもごはんの表面全体に様に納豆菌を増殖させることはできなかった。平筆で納豆からの10倍希釈の上澄み液をごはんの表面に塗布したものは、納豆菌以外の他の菌でごはんの表面が汚染された。

(6) 食パンで腐葉土中の細菌及び菌類を培養

食パン①、食パン②、食パン③、食パン④、又は食パン⑤の切片に、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を、平筆を用いてその表面に塗布した。また、腐葉土からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液をそれぞれガラスシャーレに入れ、その切片の片面のみを1秒浸す、又はその切片全体を2倍希釈の上澄み液に1秒浸した。次に、それらの切片は、それらの上澄み液を付けた面が上になるようにして、それぞれスクリュウ培養容器の底に置き、蓋をして5日間培養した。平筆で食パン⑤の切片の表面にその2倍希釈の上澄み液を塗布したものは、切片の表面全体に様な菌糸の増殖を確認することはできなかった。食パン⑤の切片の片面のみその2倍希釈、3倍希釈、及び5倍希釈の上澄み液に浸したものは、菌糸の増殖がその切片の表面全体にはっきりと見られた(図6)。食パン⑤の切片の片面のみその10倍希釈の上澄み液に浸したものは、菌糸の増殖がその切片全体に見られたが、その増殖は他の実験区と比較して遅かった。食パン⑤の切片の全体をその2倍希釈の上澄み液に浸したものでは、全ての実験区で、切片の形が崩れて液体状にスクリュウ培養容器の底に広がってしまった。次に、食パン①、食パン②、食パン③又は食パン④の切片の片面のみ腐葉土からの5倍希釈の上澄み液に浸したものは、菌糸の増殖が全ての切片の表面全体にはっきりと見られた。

(7) 食パンで納豆菌を培養

食パン⑤の切片に、納豆からの2倍希釈、3倍希釈、又は5倍希釈の上澄み液を、平筆を用いて表面にそれぞれ塗布した。また、納豆からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液をそれぞれガラスシャーレに入れ、その切片の片面のみを1秒浸す、又はその切片全体を1秒浸した。次に、それらの切片は、上澄み液を付けた面が上になるようにして、それぞれスクリュウ培養容器の底に置き、蓋をして5日間培養した。平筆で納豆からの2倍希釈の上澄み液をその切片の表面に塗布したものは、納豆菌の増殖によるコロニー形成がその切片の表面の一部にわずかに見られたが、その切片の表面全体に納豆菌を増殖させることはできなかった。平筆で納豆からの3倍希釈及び5倍希釈の上澄み液をその切片の表面に塗布したものは、納豆菌の増殖によるコロニー形成がその切片の表面の一部に見られたが、納豆菌をその切片の表面全体に様に増殖させることはできなかった。その切片の片面のみ納豆からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、及び10倍希釈の上澄み液に浸したものは、全ての実験区で、その切片の表面全体に様に納豆菌の増殖が見られた(図7)。その切片全体を納豆からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、及び10倍希釈の上澄み液に浸したものでは、全ての実験区で、その切片の形が崩れて液体状にスクリュウ培養容器の底に広がってしまった。

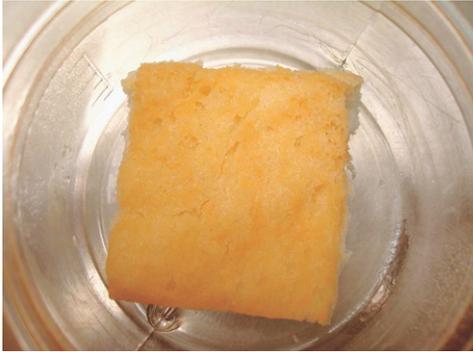


図7 6枚切り食パンの耳を除き、さらにその1枚を4つの四角形の切片にし、その切片を納豆からの5倍希釈の上澄み液に片面のみ浸し、24時間培養した後の様子。



図8 PYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を0.5mlその培地表面に塗布し、その中央の穴にワサビを0.3g入れ24時間培養した後の様子。

2. 抗菌性の効果

(1) YEB寒天培地に時計皿を用いて抗菌性食品を入れ、腐葉土中の細菌及び菌類を培養

プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地の表面に、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を、0.5mlコンラージ棒を用いて塗布した。そして、その培地中央に時計皿(直径:30mm)を置き、そこに抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクをそれぞれ約0.3g入れ、24時間培養した。ワサビを入れたものは、細菌に対して完全な抗菌効果を示し、細菌は培地表面に全く増殖しなかった。ショウガ及びニンニクを入れたものでは、培地の表面全体に細菌のコロニーが形成されて抗菌効果は確認できなかった。

(2) YEB寒天培地又はPYG寒天培地に穴を開けて抗菌性食品を入れ、腐葉土中の細菌及び菌類を培養

プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の中央に、直径4mm、7mm、又は10mmの穴を開け、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を、それぞれ0.5mlコンラージ棒を用いてその培地表面に塗布した。そして、その中央の穴に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ0.1g(直径4mm、7mm、及び10mmの穴に)、0.3g(直径7mm及び10mmの穴に)、又は0.5g(直径10mmの穴に)入れ、24時間培養した。ワサビを入れた全ては、高い抗菌効果を示し、細菌の増殖は全くなかった(図8、表1)。ショウガを0.1g入れると、穴の中心から細菌が増殖できない距離の直径(阻害範囲)は、直径4mmの穴、直径7mmの穴、及び直径10mmの穴で、それぞれ14mm、19mm、及び21mmとなった(表1)。ショウガを0.3g入れると、それらの阻害範囲は、直径7mmの穴及び直径10mmの穴で、それぞれ26mm及び28mmとなった(表1)。ショウガを0.5g入れると、その阻害範囲は、直径10mmの穴で33mmとなった(図9、表1)。ニンニクを0.1g入れると、それらの阻害範囲は、直径4mmの穴、直径7mmの穴、及び直径10mmの穴で、それぞれ19mm、21mm、及び22mmとなった(表1)。ニンニクを0.3g入れると、それらの阻害範囲は、直径7mmの穴及び直径10mmの穴で、それぞれ26mm及び30mmとなった(表1)。ニンニクを0.5g入れると、その阻害範囲は、直径10mmの穴で30mmとなった(図

表1 YEB寒天培地上での腐葉土からの細菌の増殖に及ぼす抗菌性食品の阻害。YEB寒天培地の中央に直径4mm、7mm、又は10mmの穴を開けた。そして、その培地表面に腐葉土からの2倍希釈の上澄み液をそれぞれ0.5ml塗布した。次に、その中央の穴に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ0.1g（直径4mm、7mm、及び10mmの穴に）、0.3g（直径7mm及び10mmの穴に）、又は0.5g（直径10mmの穴に）入れた。最後に、プラスチックシャーレをパラフィルムで密閉した後、25℃で24時間培養した。それらの数字は、穴の中心から細菌が増殖できない距離の直径（阻害範囲）をmmで示した。

抗菌性食品の種類	抗菌性食品の量	穴の大きさ(直径)		
		4mm	7mm	10mm
ワサビ	0.1g	>90	>90	>90
	0.3g	—	>90	>90
	0.5g	—	—	>90
ショウガ	0.1g	14	19	21
	0.3g	—	26	28
	0.5g	—	—	33
ニンニク	0.1g	19	21	22
	0.3g	—	26	30
	0.5g	—	—	30



図9 PYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を0.5mlその培地表面に塗布し、その中央の穴にショウガを0.5g入れ24時間培養した後の様子。



図10 PYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を0.5mlその培地表面に塗布し、その中央の穴にニンニクを0.5g入れ24時間培養した後の様子。

10、表1)。なお、これらはYEB寒天培地を用いた結果で、PYG寒天培地を用いてもほぼ同様の結果が得られ、YEB寒天培地とPYG寒天培地の間で細菌の増殖に大きな差はなかった。このように、穴に入れられた抗菌性食品の量と阻害範囲で示された抗菌性の強さには、関連性は見られなかった（表1）。

(3) YEB寒天培地又はPYG寒天培地に穴を開けて抗菌性食品を入れ、納豆菌を培養

プラスチックシャーレに入ったYEB寒天培地又はPYG寒天培地の中央に、直径10mmの

表2 PYG寒天培地上での納豆菌の増殖に及ぼす抗菌性食品の阻害。PYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開けた。そして、その培地表面に納豆からの3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液をそれぞれ0.5ml塗布した。次に、その中央の穴に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ0.3g入れた。最後に、プラスチックシャーレをパラフィルムで密閉した後、25℃で24時間培養した。それらの数字は、穴の中心から細菌が増殖できない距離の直径（阻害範囲）をmmで示した。

上澄み液の濃度 (納豆菌の濃度)	抗菌性食品の種類		
	ワサビ	ショウガ	ニンニク
3倍	>90	26	30
5倍	>90	26	28
10倍	>90	29	31

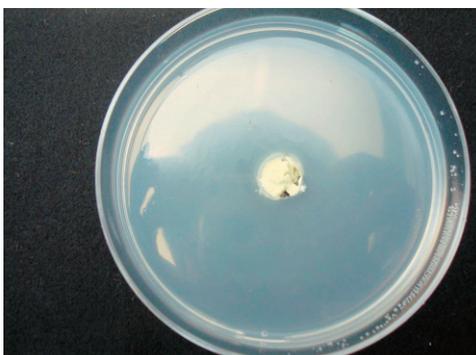


図11 PYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、納豆からの5倍希釈の上澄み液を0.5mlその培地表面に塗布し、その中央の穴にワサビを0.3g入れ24時間培養した後の様子。

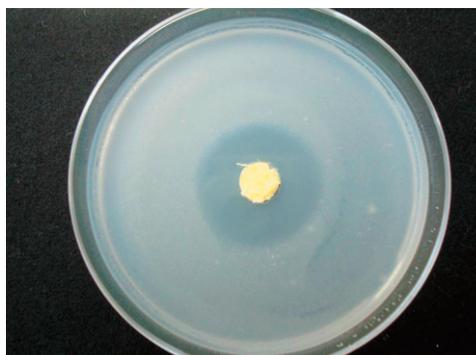


図12 PYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、納豆からの5倍希釈の上澄み液を0.5mlその培地表面に塗布し、その中央の穴にショウガを0.3g入れ24時間培養した後の様子。

穴を開け、納豆からの3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を、それぞれ0.5mlコンラージ棒を用いてその培地表面に塗布した。そして、その中央の穴に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ0.3g入れ、24時間培養した。ワサビを入れると、高い抗菌性を示し、納豆菌の増殖は全くなかった（図11、表2）。ショウガを入れると、穴の中心から納豆菌が増殖できない距離の直径（阻害範囲）は26～29mmとなり（図12、表2）、納豆菌の濃度を低くするとその阻害範囲は広くなった。ニンニクを入れると、その阻害範囲は28～31mmとなり（図13、表2）、納豆菌の濃度とその阻害範囲に関連性はなかった。なお、これらはPYG寒天培地を用いた結果で、YEB寒天培地を用いてもほぼ同様の結果が得られ、YEB寒天培地とPYG寒天培地の間で、納豆菌の増殖に大きな差はなかった。

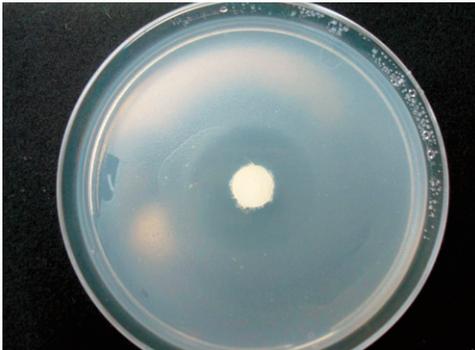


図13 PYG寒天培地の中央に直径10mmの穴を開け、納豆からの5倍希釈の上澄み液を0.5mlその培地表面に塗布し、その中央の穴にニンニクを0.3g入れ24時間培養した後の様子。



図14 6枚切り食パンの耳を除き、さらにその1枚を4つの四角形の切片にし、その切片を腐葉土からの5倍希釈の濾液に片面のみ浸し、その切片の中央にワサビを約0.3g置いて5日間培養した後の様子。



図15 6枚切り食パンの耳を除き、さらにその1枚を4つの四角形の切片にし、その切片を腐葉土からの5倍希釈の濾液に片面のみ浸し、その切片の中央にショウガを約0.3g置いて5日間培養した後の様子。



図16 6枚切り食パンの耳を除き、さらにその1枚を4つの四角形の切片にし、その切片を腐葉土からの5倍希釈の濾液に片面のみ浸し、その切片の中央にニンニクを約0.3g置いて5日間培養した後の様子。

(4) 食パンに抗菌性食品を置き、腐葉土中の細菌及び菌類を培養

食パン①、食パン②、食パン③、食パン④、又は食パン⑤を切片にし、腐葉土からの5倍希釈の上澄み液をガラスシャーレに入れ、その切片の片面のみを1秒浸した。次に、その切片をスクリュウ培養容器の底に置き、その切片の中央に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを約0.3g置き、蓋をして5日間培養した。食パンの切片にワサビを置いた結果は、食パン①及び食パン④を用いると細菌及び菌類が増殖してその切片の表面は薄く茶色になり、食パン②、食パン③、及び食パン⑤では細菌及び菌類はそれぞれ全く増殖はしなかった(図14、表3)。食パンの切片にショウガを置いた結果は、食パン⑤を用いると、抗菌性食品を置いていない結果と比較して、菌類の菌糸の成長は遅かった(図15、表3)。食パンの切片にニンニクを置いた結果は、食パン⑤では、抗菌性食品を置いていな

表3 食パンでの腐葉土からの細菌及び菌類の増殖に及ぼす抗菌性食品の阻害。食パン①（4枚切り）、食パン②（6枚切り）、食パン③（8枚切り）、食パン④（山型食パン、1枚の厚さは①とほぼ同じ）、又は食パン⑤（6枚切り）の耳の部分を除き、さらに1枚の食パンをほぼ均等に4つの四角形の切片にした。腐葉土からの5倍希釈の濾液を約20mlそれぞれガラスシャーレに入れ、その切片の片面のみを1秒浸した。次に、それらの切片は、上澄み液を付けた面が上になるようにして、それぞれスクリュー培養容器の底に置いた。そして、抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ約0.3gその切片の中央に置いた（対照区は抗菌性食品を置かない）。最後に、スクリュー培養容器の蓋をして25℃で5日間培養した。それらの記号は、食パンの切片での細菌及び菌類の増殖に及ぼす抗菌性食品の阻害の強さを「+」の数で示した。

食パンの種類	対照区	ワサビ	ショウガ	ニンニク
食パン① (4枚切り)	+	++	—	—
食パン② (6枚切り)	+	+++	++	++
食パン③ (8枚切り)	+	+++	—	—
食パン④ (4枚切りとほぼ同じ厚さ)	+	++	—	—
食パン⑤ (6枚切り)	+	+++	++	++

＋：細菌及び菌類がかなり増殖した

++：細菌及び菌類がわずかに増殖し、パンの表面が少し変色した

+++：細菌及び菌類が全く増殖しなかった

—：実験を行わなかった

い結果と比較して、菌類の菌糸の成長は遅かった（図16、表3）。また、同様な培養をスクリュー培養容器の代わりに密閉式保存容器を用いて行っても、両者の容器の間で菌糸の成長に大きな差はなかった。

(5) 食パンに抗菌性食品を置き、納豆菌を培養

食パン⑤を切片にし、納豆からの5倍希釈の上澄み液をガラスシャーレに入れ、その切片の片面のみを1秒浸した。次に、その切片をスクリュー培養容器の底に置き、その切片の中央に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを約0.3g置き、蓋をして5日間培養した。全ての実験区で、抗菌性食品が納豆菌の増殖を全く阻害せず、納豆菌が増殖してその切片の表面は茶色になった。

IV 考 察

植物はその体内で抗菌性を持つ二次代謝物質を合成し、それらを花、葉、茎、又は根などに常に存在させておくことにより、微生物などの感染に対抗する手段としている。それらの抗菌性を我々の生活の中に取り入れている例には、以下のようなものがある。ワサビの抗菌性に着目し、水を添加することでその抗菌成分を揮発させるような除菌剤が開発されている¹⁹⁾。また、ある植物体からの抽出物は、メチシリン耐性ブドウ球菌やバンコマイ

シン耐性腸球菌に代表される抗生物質耐性菌に対して抗菌性を示すことから、これらの抽出物を院内感染を抑える薬剤として適用する¹³⁾ことが期待されている。食品衛生学の分野では、ワサビやカラシ、マスタードに含まれるアリルイソチオシアネートはシクロデキストリンとの複合体の形成やマイクロカプセル化によって、その強い抗菌性を生かし、それらを食品に添加する研究が進んでいる⁸⁾¹⁰⁾。ショウガはその成分であるオイゲノールが、ニンニクではジアリル二硫化物がそれぞれ抗菌効果を持ち、それらを食品に添加することが考えられている¹²⁾²⁰⁾。柑橘類であるレモン、オレンジ、グレープフルーツやベルガモットについても研究され、食中毒の原因菌に対して抑制効果を示すことが報告²¹⁾²²⁾²³⁾されている。ハーブとして用いられているタイム、オレガノ、ローズマリー、セージ、クミン、クローブなどの様々な植物を材料として、その抗菌性も報告²⁴⁾されている。

抗菌性に着目した教材としては、高等学校「生物Ⅰ」の中の生体防御の学習として、ニワトリ卵の卵白リゾチームの抗菌効果を調べる実験が示された¹⁸⁾。これは、納豆菌（グラム陽性菌）又は大腸菌（グラム陰性菌）を寒天培地上にそれぞれ塗って広げ、その中央に卵白（リゾチーム）を染み込ませた濾紙を置き、それらを培養してリゾチームの抗菌効果を調べるものである。これらの抗菌性の強さは、濾紙の周辺にそれらの菌の増殖が見られない阻害範囲として観察される。また、卵白を滅菌水で希釈し、その濃度と抗菌性の強さも確認できる。この実験教材により、ニワトリの卵が発生過程で細菌から守られている生体防御の仕組みの例を学習できる。

前記の実験教材は、生体防御としての動物の抗菌性を取り上げたものである。しかし、植物の持つ抗菌性に基づいた実験教材は、今まで報告されていない。そこで、本研究では、香辛料や薬味として用いられている植物性食品の抗菌性を簡便に調べることができる実験教材を開発することにした。

初めに、細菌や菌類を短期間で大量に増殖できる培養系を確立する必要があった。そこで、YEB寒天培地、PYG寒天培地、ごはん、及び食パンを培地として用い、そこに腐葉土中の細菌及び菌類、納豆菌、アオカビ、又は乳酸菌を増殖させることを試みた。

YEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液をそれぞれ0.1ml、0.5ml、又は1.0mlを塗布し、24時間培養した。0.5ml塗布すると細菌がその培地の表面全体に一樣に広がった（図4）が、0.1ml及び1.0ml塗布したものはそうにならなかった。YEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、納豆からの5倍希釈の上澄み液をそれぞれ0.1ml、0.3 ml、又は0.5ml塗布し、24時間培養した。0.3ml及び0.5ml塗布すると納豆菌が培地の表面に一樣に広がった（図5）が、0.1ml塗布したものではありません。YEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、納豆からの3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を、それぞれ0.5mlを塗布し、24時間培養した。5倍希釈の上澄み液を塗布すると納豆菌は培地表面に一樣に増殖していたが、3倍及び10倍希釈した上澄み液を塗布したものではありません。また、YEB寒天培地とPYG寒天培地の間で、細菌及び納豆菌の増殖に大きな差はなかった。YEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、アオカビの懸濁液をそれぞれ0.1ml、0.3ml、又は0.5mlを塗布し、5日間培養した。全ての実験区の結果は、孢子形成による青色への培地の変色はわずかに見られるだけだった。YEB寒天培地又はPYG寒天培地の表面に、乳酸菌飲料をそれぞれ0.1ml、0.3ml、又は0.5mlを塗布し、5日間培養した。全ての実験区の結果は、5日間培養しても乳酸菌は全く増殖

しなかった。ごはんをスクリュウ培養容器の底に敷き詰め、そこに納豆1粒をごはんの中央に置く、納豆1粒をごはんの表面にこすり付ける、又は納豆からの2倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を平筆でごはんの表面に塗布し、蓋をして5日間培養した。結果は、全ての実験区で、ごはんの表面全体に一樣に納豆菌を増殖させることはできなかった。食パン①、食パン②、食パン③、食パン④、又は食パン⑤の切片に、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を、平筆を用いてその表面に塗布した。また、腐葉土からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液をそれぞれガラスシャーレに入れ、その切片の片面のみを1秒浸す、又はその切片全体を2倍希釈の上澄み液に1秒浸した。そして、それぞれスクリュウ培養容器の底に置き、蓋をして5日間培養した。食パン⑤の切片の片面のみその2倍希釈、3倍希釈、及び5倍希釈の上澄み液に浸したものは、菌糸の増殖が早くその切片の表面全体に菌糸が広がった(図6)。食パン①、食パン②、食パン③、又は食パン④の切片の片面のみその5倍希釈の上澄み液に浸したものは、菌糸の増殖が全ての切片の表面全体にはっきりと見られた。よって、食パンの種類を限定しなければ、その切片の片面のみに腐葉土からの5倍希釈の上澄み液を浸すのが、最も適切な方法と言える。食パン⑤の切片に、納豆からの2倍希釈、3倍希釈又は5倍希釈の上澄み液を、平筆を用いて表面にそれぞれ塗布した。また、納豆からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液をそれぞれガラスシャーレに入れ、その切片の片面のみを1秒浸す、又はその切片全体を1秒浸した。そして、蓋をして5日間培養した。その切片の片面のみその2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、及び10倍希釈の上澄み液に浸したものは、全ての実験区で、その切片の表面全体に一樣に納豆菌の増殖が見られた(図7)が、それ以外の実験区ではそのようにならなかった。以上の結果から、(a) YEB寒天培地又はPYG寒天培地をオートクレーブで121℃、15分間滅菌した後、滅菌プラスチックシャーレに約20mlずつ分注し固めたものを準備し、それらの培地に、腐葉土に蒸留水を加えて2倍に希釈し攪拌し、10分間静置して得られた上澄み液を0.5mlコーンラージ棒を用いて塗布し、25℃で24時間培養する方法、(b) 同様に準備したYEB寒天培地又はPYG寒天培地に、納豆からの5倍希釈の上澄み液を0.5mlコーンラージ棒を用いて塗布し、25℃で24時間培養する方法、(c) 食パンの耳の部分を含む部分を包丁で切り落とし、さらに1枚の食パンをほぼ均等に4つの四角形の切片にし、それを腐葉土からの5倍希釈の上澄み液を濾紙で濾過した濾液に片面のみ浸し、25℃で5日間培養する方法、及び(d) 食パンを同様に切片にして、それを納豆からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液に片面のみ浸し、25℃で5日間培養する方法が、細菌、菌類、及び納豆菌を短期間で大量に培養できるものとして挙げられた。

次に、前記(a)～(d)の方法で、そこに抗菌性食品をそれぞれ加えて培養すると、それらの抗菌性をはっきりと示せるか調べた。

YEB寒天培地の表面に、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液を、それぞれ0.5mlを塗布した。そして、その培地中央に時計皿を置き、そこに抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクをそれぞれ約0.3g入れ、24時間培養した。ワサビを入れたものは、細菌に対して完全な抗菌効果を示し、細菌は培地表面に全く増殖しなかった。ショウガ及びニンニクを入れたものでは、培地の表面全体に細菌のコロニーが形成されて抗菌効果は確認できなかった。これは、抗菌性食品が培地に接触していないため、揮発性の抗菌性成分を持つワサビのみが作用し、ショウガとニンニクの場合は、揮発性の抗菌性成分がないか、その

成分が細菌の増殖を抑制できるほど強くないためであると思われる。そこで、YEB寒天培地又はPYG寒天培地の中央に、直径4mm、7mm、又は10mmの穴を開け、腐葉土からの2倍希釈の上澄み液をそれぞれ0.5ml培地表面に塗布した。そして、その中央の穴に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ0.1g、0.3g、又は0.5g入れ、24時間培養した。ワサビを入れた全ては、高い抗菌効果を示し、細菌の増殖は全くなかった(図8、表1)。ショウガ及びニンニクを入れると、その穴から細菌が増殖できない範囲(阻害範囲)が同心円状に見られた(表1)。なお、YEB寒天培地とPYG寒天培地の間で、これらの結果に大きな差はなかった。穴に入れられた抗菌性食品の量と阻害範囲で示された抗菌性の強さには関連性は見られなかった(表1)ので、直径10mmの穴を寒天培地に開けて、その中に抗菌性食品を約0.3g入れると、その穴がそれで隙間なく埋まり、その操作もしやすいので、このように行うのが最も適していると分かった。YEB寒天培地又はPYG寒天培地の中央に、直径10mmの穴を開け、納豆からの3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液を、それぞれ0.5mlその培地表面に塗布した。そして、その中央の穴に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを、それぞれ0.3g入れ、24時間培養した。ワサビを入れると、高い抗菌性を示し、納豆菌の増殖は全くなかった(図11、表2)。ショウガを入れるとその阻害範囲は26~29mmとなり(図12、表2)、ニンニクを入れると阻害範囲は28~31mmで(図13、表2)、納豆菌の濃度を低くするとその阻害範囲は必ずしも広くはならなかった。よって、納豆菌の濃度は5倍希釈が適当と思われる。なお、これらはPYG寒天培地を用いた結果で、YEB寒天培地を用いてもほぼ同様の結果が得られ、YEB寒天培地とPYG寒天培地の間で、納豆菌の増殖に大きな差はなかった。食パン①、食パン②、食パン③、食パン④、又は食パン⑤を切片にし、腐葉土からの5倍希釈の上澄み液にその切片の片面のみを1秒浸した。次に、その切片をスクリュウ培養容器の底に置き、その切片の中央に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを約0.3g置き、蓋をして5日間培養した。食パンの切片にワサビを置いた結果は、食パン①(4枚切り)及び食パン④(①とほぼ同じ厚さ)を用いると細菌及び菌類が増殖してその切片の表面は薄く茶色になった。食パン②(6枚切り)、食パン③(8枚切り)、及び食パン⑤(6枚切り)では細菌及び菌類はそれぞれ全く増殖はしなかった(図14、表3)。これは、食パンが4枚切りで厚いと、パンの培地としての量が多いことが影響しているのかもしれない。食パンの切片にショウガ及びニンニクを置いた結果は、食パン⑤を用いると抗菌性食品を置いていない結果と比較して、菌類の菌糸の成長は遅かった(図15、16、表3)。また、同様の培養をスクリュウ培養容器の代わりに密閉式保存容器を用いて行ったが、その結果はスクリュウ培養容器の場合のそれとほぼ同じであり、これに用いる容器は密封できるものであればその形が違って問題ないことが分かった。食パン⑤を切片にし、納豆からの5倍希釈の上澄み液にその切片の片面のみを1秒浸した。次に、その切片をスクリュウ培養容器の底に置き、その切片の中央に抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニクを約0.3g置き、蓋をして5日間培養した。全ての実験区で、抗菌性食品が納豆菌の増殖を全く阻害せず、納豆菌が増殖してその切片の表面は茶色になった。

今まで全ての結果をまとめると、植物性食品の抗菌性を簡便に調べることができる実験教材として、次の3つが適切であると分かった。(A) YEB寒天培地又はPYG寒天培地を前記(a)と同様に準備する。次に、腐葉土に蒸留水を加えて2倍に希釈し攪拌し、10分間

静置して上澄み液を得る。それらの寒天培地の中央に滅菌済みコルクボーラーで直径10mm穴を開け、その上澄み液を0.5mlコンラージ棒を用いて塗布する。そして、中央の穴にその抗菌性食品を約0.3g入れ、そのシャーレを密封後25℃で24時間培養する。(B) YEB寒天培地又はPYG寒天培地を前記(a)と同様に準備する。次に、納豆に蒸留水を加えて5倍に希釈し攪拌し、5分間静置して上澄み液を得る。それらの寒天培地に同様に直径10mmの穴を開け、その上澄み液を0.5mlコンラージ棒を用いて塗布する。そして、中央の穴にその抗菌性食品を約0.3g入れ、そのシャーレを密封後25℃で24時間培養する。及び、(C) 腐葉土に蒸留水を加え5倍希釈にして攪拌し、その上澄み液を濾紙で濾過し濾液を得る。次に、6枚切り又は8枚切りの食パンを前記(c)と同様に切片にする。その濾液約20mlをガラスシャーレに入れ、そこにその切片の片面のみを浸して密閉容器に入れ、その切片の中央にその抗菌性食品を約0.3g置いて、その容器に蓋をして25℃で5日間培養する。

中学校「理科第2分野下」の中の食物連鎖を学習する箇所では、分解者の働きを調べるため、土壤中から小動物を採集しその観察を行う実験教材が取り上げられている。ここで分解者として扱われるべき菌類及び細菌類は、これまで学習してはいない。そこで、土壤中の菌類と細菌類をその分解者であると確認する実験教材として、本研究の結果から前記(c)の方法を新たに示すことができる。また、高等学校「生物I」の中の環境に対する生物の反応と調節を学習する箇所では、動物の体液の働きとして生体防御を取り上げている。そこで、この同じ箇所、植物の生体防御である抗菌性代謝物質の働きに着目し、本研究の結果から前記(A)、(B)、及び(C)の実験教材を新たに示すことができる。なお、前記(A)及び(B)は、食品衛生学の分野において抗菌性の強さを測定する際に用いられる1つの方法¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾と結果的に同様になったが、病原性細菌などを用いずに、腐葉土中の細菌及び菌類又は納豆菌を用いて安全性を考慮している点に工夫がある。

V 要 約

YEB寒天培地、PYG寒天培地、ごはん、又は食パンを培地として用い、そこに腐葉土中の細菌及び菌類、納豆菌、アオカビ、又は乳酸菌を増殖させると、(a) YEB寒天培地又はPYG寒天培地をオートクレーブで121℃、15分間滅菌した後、滅菌プラスチックシャーレに約20mlずつ分注し固めたものを準備し、それらの培地に、腐葉土に蒸留水を加えて2倍に希釈し攪拌し、10分間静置して得られた上澄み液を0.5mlコンラージ棒を用いて塗布し、25℃で24時間培養する方法、(b) 同様に準備したYEB寒天培地又はPYG寒天培地に、納豆からの5倍希釈の上澄み液を0.5mlコンラージ棒を用いて塗布し、25℃で24時間培養する方法、(c) 食パンの耳の部分の部分を包丁で切り落とし、さらに1枚の食パンをほぼ均等に4つの四角形の切片にし、それを腐葉土からの5倍希釈の上澄み液を濾紙で濾過した濾液に片面のみ浸し、25℃で5日間培養する方法、及び(d) 同様に切片にした食パンを、納豆からの2倍希釈、3倍希釈、5倍希釈、又は10倍希釈の上澄み液に片面のみ浸し、25℃で5日間培養する方法の4つが、細菌、菌類、及び納豆菌を短期間で大量に培養できるものとして挙げられた。また、ごはんを培地として用いる方法、及びアオカビ及び乳酸菌を寒天培地で培養する方法はうまくいかなかった。

前記(a)～(d)の方法で、そこに抗菌性食品としてワサビ、ショウガ、又はニンニク

をそれぞれ加えて培養した。その結果、次の3つの方法が、植物性食品の抗菌性を簡便に調べることができる実験教材として適切であった。(A) YEB寒天培地又はPYG寒天培地を前記(a)と同様に準備する。次に、腐葉土に蒸留水を加えて2倍に希釈し攪拌し、10分間静置して上澄み液を得る。それらの寒天培地の中央に滅菌済みコルクボーラーで直径10mm穴を開け、その上澄み液を0.5mlコンラージ棒を用いて塗布する。そして、中央の穴にそれらの抗菌性食品を約0.3g入れ、そのシャーレを密封後25℃で24時間培養する。(B) YEB寒天培地又はPYG寒天培地を前記(a)と同様に準備する。次に、納豆に蒸留水を加えて5倍に希釈し攪拌し、5分間静置して上澄み液を得る。それらの寒天培地に同様に直径10mmの穴を開け、その上澄み液を0.5mlコンラージ棒を用いて塗布する。そして、中央の穴にそれらの抗菌性食品を約0.3g入れ、そのシャーレを密封後25℃で24時間培養する。及び(C) 腐葉土に蒸留水を加え5倍希釈にして攪拌し、その上澄み液を濾紙で濾過し濾液を得る。次に、6枚切り又は8枚切りの食パンを前記(c)と同様に切片にする。その濾液約20mlをガラスシャーレに入れ、そこにその切片の片面のみを浸して密閉容器に入れ、その切片の中央にそれらの抗菌性食品を約0.3g置いて、その容器に蓋をして25℃で5日間培養する。また、前記(d)の方法を用いると、抗菌性をはっきりと示すことはできなかった。

引用・参考文献

- 1) 戸田盛和、ほか47名(2004)「文部科学省検定済教科書 中学校理科2分野下」大日本図書 pp.77
- 2) 水野丈夫、原襄、石川統、ほか13名(2001)「文部科学省検定済教科書 高等学校生物I B」東京書籍pp.67-70、pp92-94
- 3) 水野丈夫、石川統、岩槻邦男、重井陸夫、ほか6名(2002)「文部科学省検定済教科書 高等学校生物II」東京書籍pp.37-43、pp.55,56、pp.73、pp.158
- 4) 夏緑(2008)「ウイルスと微生物がよ〜くわかる本」秀和システムpp.14,15、pp.20,21、pp.40,41、pp.56-67、pp.92,93
- 5) 三浦登、ほか44名「文部科学省検定済教科書 中学校理科2分野下」東京書籍pp.85
- 6) 高橋和成(2000)「身近な細胞性粘菌を利用した教材の開発」平成12年度東レ理科教育賞受賞作品集 http://www.toray.co.jp/tsf/rika/rik_012.html
- 7) 和田実(2008)「海洋性発光細菌を用いた微生物教材の開発と実践」日産科学振興財団 理科/環境教育助成 成果報告書
- 8) Pedro A. Chacon, Roberto A. Buffo, Richard A. Holley(2006) . Inhibitory effects of microencapsulated allyl isothiocyanate(AIT)against Escherichia coli O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed, finely chopped beef. International Journal of Food Microbiology 107, 231-237.
- 9) D. Nadarajah, J.H. Han, R.A. Holley(2005) . Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. International Journal of Food Microbiology 99, 269-279.
- 10) Xuehong Li, Zhengyu Jin, Jing Wang(2007) . Complexation of allyl isothiocyanate by α -

- and β -cyclodextrin and its controlled release characteristics. Food Chemistry 103,461-466.
- 11) D. Nadrajah, J.H. Han, R.A. Holley(2005) . Use of mustard flour to inactivate Escherichia coli O157:H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging. International Journal of Food Microbiology 99, 257-267.
 - 12) Milagros Uhart, Nicole Maks and Shdhana Ravishankar(2006) . Effect of spices on growth and survival of Salmonella typhimurium DT 104 in ground beef stored at 4 and 8C. Journal of Food safety 26, 115-125.
 - 13) Nguyen Thi Dung, Jung Min Kim, Sun Chul Kang(2008) . Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil the ethanol extract of Cleistocalyx operculatus(Roxb.)Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology 46, 3632-3639.
 - 14) E.L.Souza, T.L.M Stamford, E.O.Lima, V.N.Trajano(2007) . Effective of Origanum vulgare L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. Food Control 18, 409-413.
 - 15) Bin Shan, Yi-Zhong Cai, jhon D.Brooks, Harold Corke(2007) . The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. International Journal of Food Microbiology 117, 112-119.
 - 16) Xiaoli Liu, Mouming Zhao, Jinshui Wang and Luo Wei(2008) . Effectiveness of phyllanthus emblica L. essential oil to inhibit the growth of Food-Spoiling yeasts. Journal of Food Safety 28, 261-275.
 - 17) Feyza Oke, Belma Aslim, Sahlan Ozturk, Senol Altundag(2009) .Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of Satureja cuneifolia Ten. Food Chemistry 112, 874-879.
 - 18) 佐藤富浩 (2005) 「ニワトリ卵の生体防御」平成17年度東レ理科教育賞 受賞作品集
http://www.toray.co.jp/tsf/rika/rik_017.html
 - 19) 特許庁ホームページ「抗菌性化合物とその応用」<http://www.jpo.go.jp/index.htm>
 - 20) Pongsak Rattanachaikunsopon and Parichat Phumkhachorn(2008) . Diallyl Sulfide Content and Antimicrobial Activity against Food-Borne Pathogenic Bacteria of Chives(*Allium schoenoprasum*). Biosci. Biotechnol. Biochem 72(11) ,2987-2991.
 - 21) K.Fisher, C.Rowe and C.A. Phillips(2007) . The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. Applied Microbiology 44(2007) ,495-499.
 - 22) K.Fisher and C.A. Phillips(2006) . The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. Applied Microbiology. 101(2006) ,1232-1240.
 - 23) M.Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernandez-Lopez and J.Pepez-Alvarez(2008) . Antibacterial activity of Lemon(*Citrus lemon* L.), Mandarin(*Citrus reticulate* L.), Grapefruit(*Citrus paradise* L.) and Orange(*Citrus sinensis* L.) Essential oils. Journal of Food Safety, 28, 567-576.

- 24) Manuel Viuda-martos, Yolanda Ruiz-Navajas, Juana Fernandez-Lopez and Jose Angel Perez-Alvarez(2008) . Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food and Technology*,2008,43,526-531.
- 25) Sheng-Hsien Lee, Ku-Shang Chang, Min-Sheng Su, Yung-Sheng Huang(2007) . Effect of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control*,18,1547-1554.
- 26) 田中隆荘、ほか22名「文部科学省検定済教科書 高等学校生物Ⅱ」第一学習社pp.95
- 27) 文部科学省（2008）「中学校学習指導要領解説 理科編」大日本図書pp.91
- 28) 文部科学省（2008）「中学校学習指導要領解説 技術・家庭編」大日本図書pp.53
- 29) 文部科学省（2005）「高等学校学習指導要領解説 理科編・数理編」大日本図書pp.133-135、pp.136-138
- 30) 安藤昭一（2003）「微生物実験マニュアル（第2版）」技報堂出版pp21-38.

Summary

Daisuke Takahashi¹⁾, Takashi Suzuki²⁾, Ryoichi Kato³⁾ :
Teaching materials of antimicrobial activity of food

The following three methods were shown as easy teaching materials of antimicrobial activity of plant food. (A) A hole of 10mm diameter was opened in the center of YEB or PYG agar medium, 0.5 ml of the supernatant extracted from leaf mold and diluted twice was extended on the surface of this medium, about 0.3 g of antimicrobial food was put into the hole, and there were cultured in a Petri dish for 24 hours. (B) A hole of 10mm diameter was opened in the center of YEB or PYG agar medium, 0.5 ml of the supernatant extracted from fermented soybeans (Natto) and diluted five times was extended on the surface of this medium, about 0.3 g of antimicrobial food was put into the hole, and there were cultured in a Petri dish for 24 hours. (C) A loaf of bread was divided into six or eight equal parts, the edge of the slice was removed, the slice was divided into quarters, the supernatant extracted from leaf mold was diluted with water five times and filtrated with filter paper, one side of the piece of the slice was immersed in the filtrate, about 0.3 g of antimicrobial food was put on the center of the piece, and there were cultured in a sealed container for 5 days.

- 1) Science Education Course, Graduate School of Education, Yamagata University
- 2) School Education, Faculty of Education, Art and Science, Yamagata University
- 3) Food and Nutrition, Faculty of Education, Art and Science, Yamagata University