

氏 名(本籍) ナ 諏 訪 ユウ 裕 一

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 309 号

学位授与年月日 昭和 61 年 6 月 12 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 水田土壌中の細菌の類別と変動に関する  
研究

論文審査委員 (主 査)

教授 服 部 勉 教授 大 平 幸 次

助教授 伊 崎 和 夫

## 論文内容要旨

はじめに。

土壌中には多様な細菌が存し、諸物質を変化させながら増殖や死滅をくりかえし、動的平衡と呼ばれる状態にある。この動態を支配する主要な要因のひとつに、個々の細菌の増殖特性があげられる。

Winogradskyは土壌中の細菌集団が変動する場合、その増殖に必要な栄養物の種類によつて発酵型と固有型とに分けられることを提案した。すなわち前者は土壌に添加される易分解性有機物を栄養として増殖し、後者は土壌腐植のような難分解性有機物を栄養物とするとした。この提案は土壌中の細菌集団の観察と比較的よく対応するものであるが、多様な細菌集団の類別法としては細菌学的基準が明確でなく、さらに検討が必要であると考えられてきた。

本研究では、(1)水田土壌から単離された各種細菌の増殖と栄養物濃度との関連性を検討し、(2)この関連性に基ついた細菌の類別法を化学的に再検討した。(3)栄養物を土壌に添加することによつてひきおこされる細菌集団の増殖過程を上記類別法によつて解析した。(4)異なる濃度の栄養物で増殖して優占的となる細菌グループを特徴づけ、各グループの優占条件を解明した。

### 第I章 単離細菌の増殖におよぼす栄養物濃度の影響

まず、水田土壌から単離した菌株の増殖と栄養物濃度の関係を検討した。すなわち、100倍希釈肉汁寒天平板から単離した細菌について常用濃度の肉汁(NB)を指数的に希釈した一連の培地での増殖速度を測定し、Fig. 1の結果を得た。菌株によつて20分から数時間の倍加時間が示された。単離菌には、高濃度の肉汁で強く阻害されるもの、また低濃度の肉汁で増殖しない菌株もみとめられた(Fig. 1)。各菌株が増殖を示す栄養物濃度範囲は多様であり、(Fig. 2)。一般に肉汁で増殖を阻害される細菌は、阻害されない細菌に比べ低い増殖速度をもつた(Fig. 1)。

この結果をもとに、細菌をFig. 2のように類別した。すなわち、NBからNB/1000の濃度範囲で増殖する細菌をType I、より低濃度(NB/10000)でも増殖する細菌をType II、NB/10からNB/1000の濃度で増殖する細菌をType III、より低濃度(NB/10000)で増殖する細菌をType IVとした。さらに

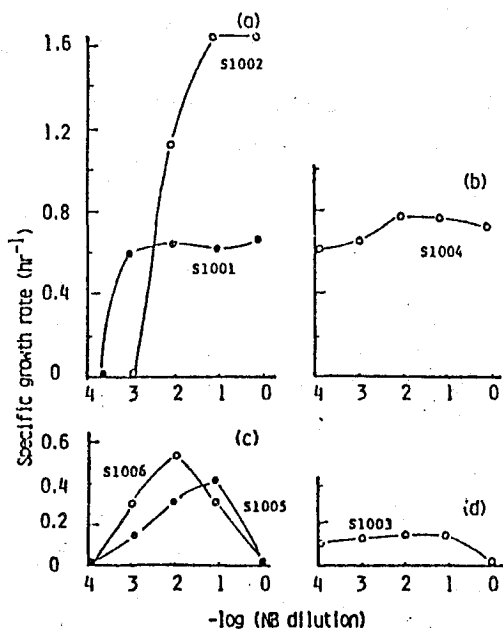


Fig. 1 Growth rates of some organisms isolated from soil as a function of nutrient concentration. Growth rate was estimated by the plate count method.

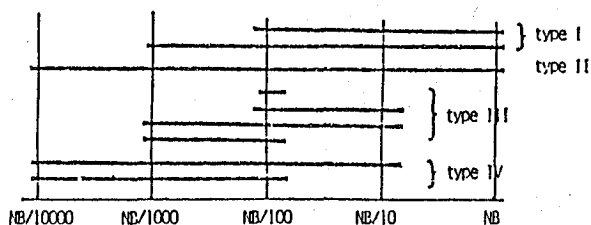


Fig. 2 Growth range of organisms isolated from soil as a function of nutrient concentration. Growth was confirmed by turbidity except in the case of NB/10000 where growth was determined by the plate count method.

肉汁(NB)で増殖する細菌 Type I と Type II を NB 細菌,  
NBで増殖できない細菌 Type III と Type IV を DNB 細菌と総  
称することにする。

## 第二章 化学分類の手法を中心とした NB 細菌と DNB 細菌の類別

NB/DNB 細菌の類別法を化学分類的な立場から再検討した。

水田土壌より単離した73株のNB/DNB細菌をPMY/10培地で27°Cで培養した。凍結乾燥菌体を塩酸-メタノール法で処理して菌体脂肪酸メチルエステル試料とし、ガスクロマトグラフで分析した。それぞれの菌体脂肪酸組成の類似度を、太田のDNB細菌についての結果を加え、次式で計算した。

$$r = \frac{\sum a_i b_i - n \frac{\sum a_i}{n} \frac{\sum b_i}{n}}{\sqrt{\sum a_i^2 - n \left( \frac{\sum a_i}{n} \right)^2} \sqrt{\sum b_i^2 - n \left( \frac{\sum b_i}{n} \right)^2}}$$

ここで  $r$  は類似度、 $a_i$  は  $a$  株の脂肪酸  $i$  のピーク面積、 $b_i$  は  $b$  株の脂肪酸  $i$  のピーク面積、 $n$  はピーク数である。

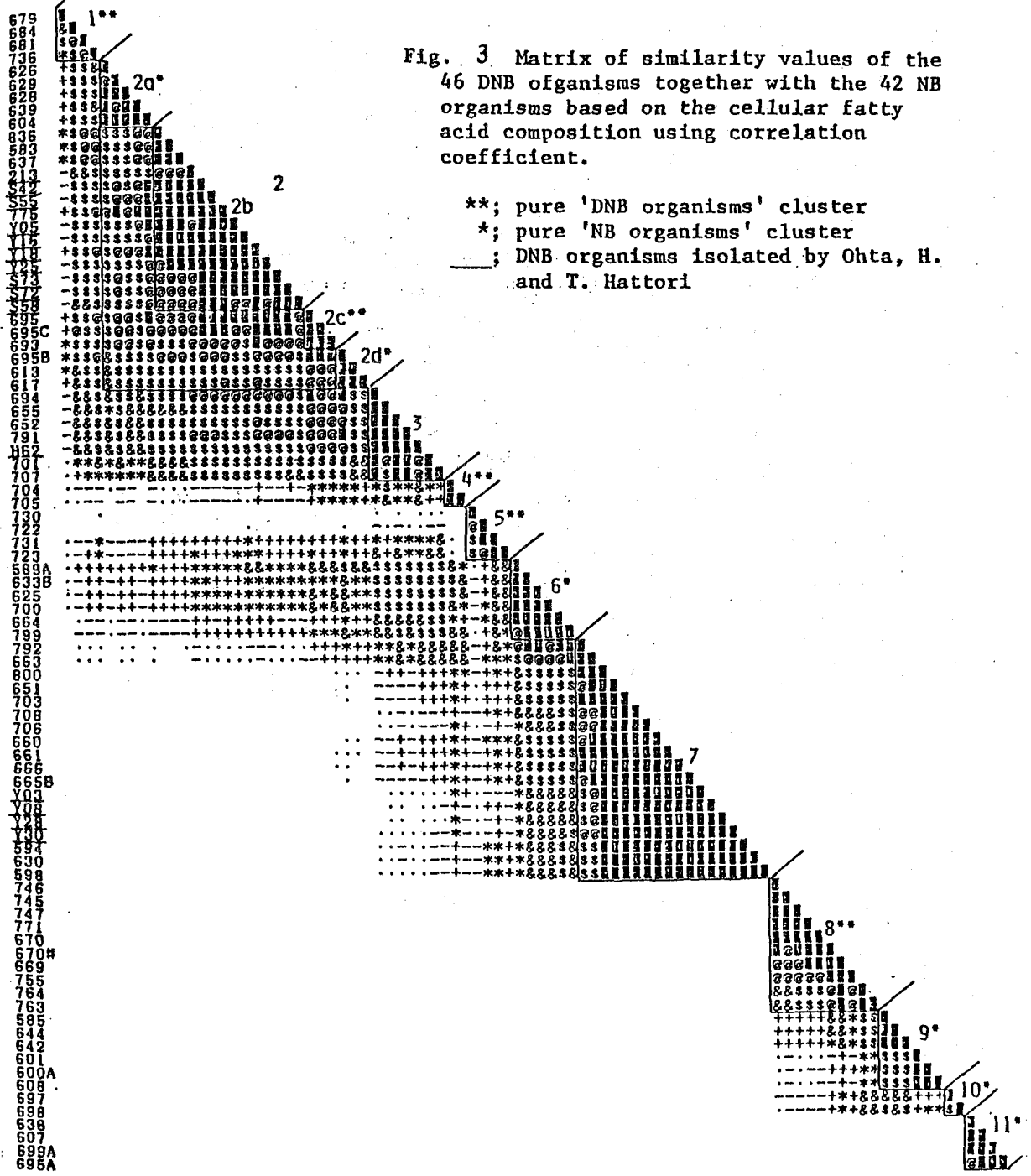
類似度を基に平均連結法によるクラスタ分析を行ない、その結果から Fig. 3 の類似度マトリクスを得た。比較された88株は85%ないし90%類似度レベルで、クラスタ 1, 2a, 2b, 2c, 2d, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 の14クラスタに類別された。各クラスタでは、おおむねキノン種などに一致がみられた。クラスタ 1, 2c, 4, 5, 8 は DNB 細菌だけから成り、クラスタ 2a, 2d, 6, 9, 10, 11 は NB 細菌だけから成り、たことは注目される。クラスタ 2b, 3, 7 は DNB 細菌と NB 細菌から成った。

NB, DNB 両細菌が混在するクラスタのうちクラスタ 3 ではキノン種の相違で NB 細菌と DNB 細菌は類別された。クラスタ 2b では、脂肪酸 minor component と、細胞形態の相違で類別された。クラスタ 7 において、脂肪酸組成、キノン種、細胞形態によつて NB/DNB 細菌は類別されなかつたが、たが、分類学的に重要な性質とされる炭素源の資化性および硝酸還元能で両者間に相違がみられた (Table 1)。すなわち、NB 細菌は硝酸還元能をもたず、グルコースを資化しない。一方、DNB 細菌の多くは硝酸還元能をもった。

各クラスタの類縁関係を Fig. 4 の樹状図で示した。18:1 を脂肪酸 major component とする細菌からなるクラスタ (1, 2a, 2b, 2c, 2d, 3) のうち、DNB 細菌だけから成るクラスタ 1 は他との隔たりが大きく、またクラスタ 2c はキノン種で他と區別された。16:0 および 16:1 を脂肪酸 major component とする細菌からなるクラスタ (4, 5, 6, 7) の中でも、分岐酸を major component とする細菌からなるクラスタ (8, 9, 10, 11) の中で

Fig. 3 Matrix of similarity values of the 46 DNB organisms together with the 42 NB organisms based on the cellular fatty acid composition using correlation coefficient.

\*\* ; pure 'DNB organisms' cluster  
 \* ; pure 'NB organisms' cluster  
 — ; DNB organisms isolated by Ohta, H. and T. Hattori



SYMBOLS: . 30 to 40; - 40 to 50; + 50 to 60; \* 60 to 70  
 & 70 to 80; & 80 to 90; @ 90 to 95; # 95 to 100



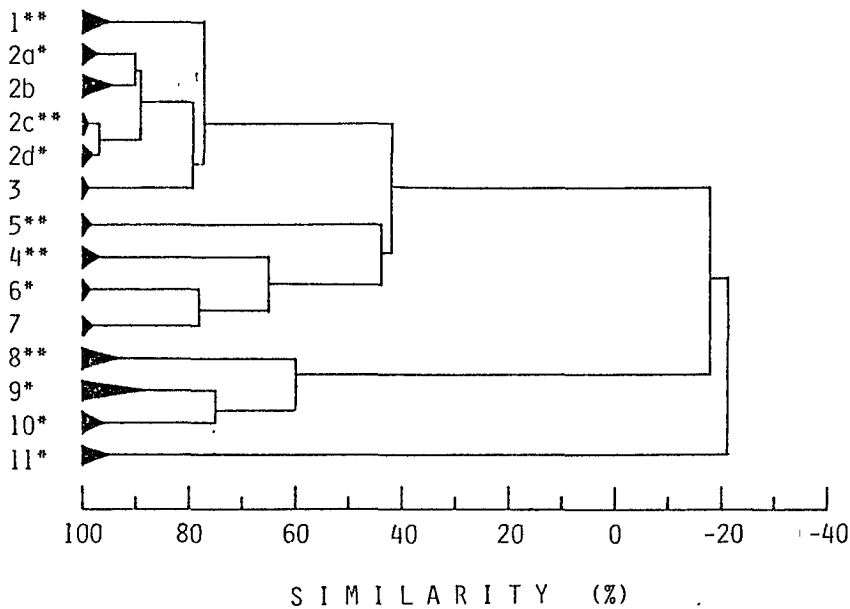


Fig. 4 Simplified dendrogram by average-linkage of the mean inter-group similarity values between the clusters of similarity matrix. \* ; "pure NB organisms cluster", \*\* ; "pure DNB organisms cluster".

も DNB 細菌だけからなるクラスター (4, 5, 8) は他との隔たりが明確である。

水田土壌細菌の NB 細菌と DNB 細菌の類別は、有機物や塩に対する感受性の相違にとどまらず、他の生化学的生理学的性質の違いをも反映し、分類学的な基礎をもつと結論された。

### 第三章 土壌中の細菌集団の増殖過程の解析

本章では、土壌に栄養物を添加した際、まず顕著な増殖を示すのはどのようなグループか、また増殖がみられないのはどのようなグループかを解明した。

NB/100 液体培地で土壌中の細菌集団を培養し、約 2 時間毎に試料採取し、NB/100 寒天平板で計数した。細菌数は 6 時間目まで増加せず、その後 10 時間目からは指数的に増加した。

平板計数の際、平板上に形成されるコロニー数と、平板を培養した時間との関係をプロットすると Fig. 5 のようなコロニー形成 (CF) 曲線がみとめられた。土壌細菌集団を 6 又は 8 時間培養した時のサンプルの平板上では、

2つのCF曲線 (curve IとII), 又14.5時間培養のサンプルでは1つのCF曲線がみとめられた。それぞれのCF曲線は、パラメータ $\lambda$ の値によって特徴づけられるが、curve Iの $\lambda$ 値は、いずれもcurve IIの $\lambda$ 値よりも大きいことが注目された。

コロニー形成曲線は、FORモデルによって解釈される。すなわち、パラメータ $\lambda$ は細胞集団が飢餓状態から増殖状態に移行する速度を意味していると考えられる。したがって、curve Iに対応する細菌は速やかに増殖開始するが、curve IIの細菌グループは遅くゆるやかにしか増殖を開始しないことになる。

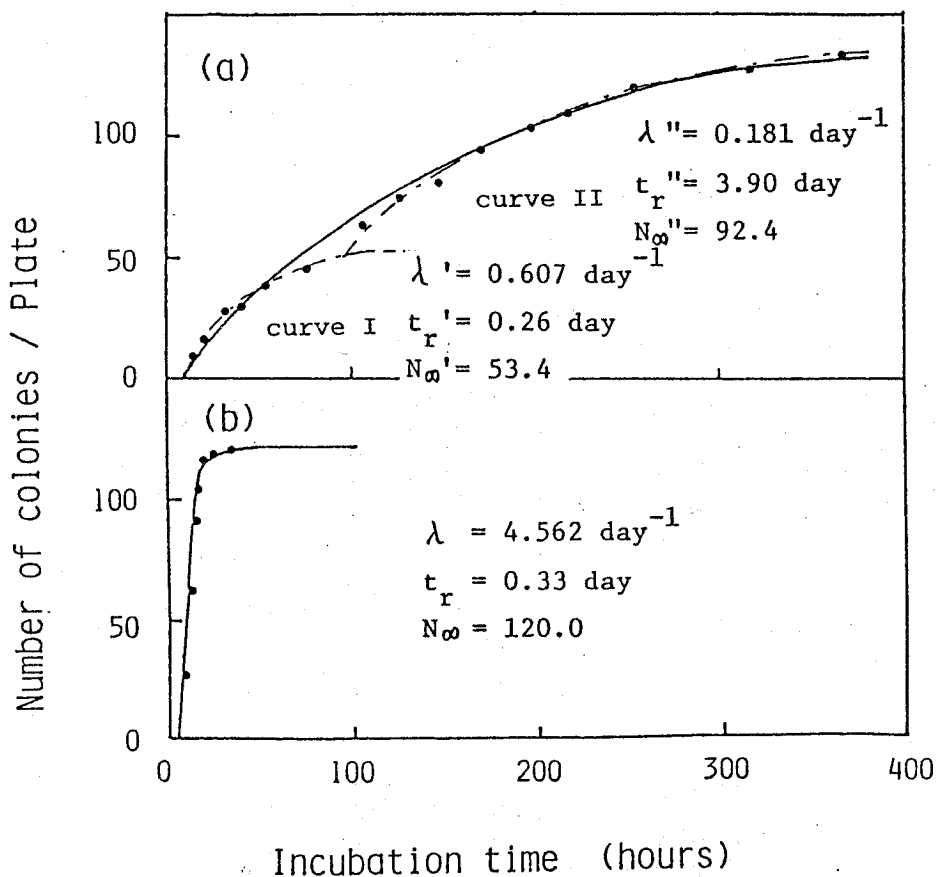


Fig. 5 Plate counting data and colony forming curves of bacterial population sampled from (a) 6 hours' and (b) 14.5 hours' soil culture with NB/100. Dilution; (a) x10, (b) x100000.



Table 2 Number of NB organisms and DNB organisms in each population.

| Time of soil incubation (hours) | Group        | Number of isolates |              |               |
|---------------------------------|--------------|--------------------|--------------|---------------|
|                                 |              | Total              | NB organisms | DNB organisms |
| 1                               |              | 45                 | 12 ( 2)*     | 33            |
| 6                               | (as a whole) | 27                 | 8 ( 2)       | 19            |
|                                 | I            | 9                  | 8 ( 2)       | 1             |
|                                 | II           | 18                 | 0 ( 0)       | 18            |
| 8                               | (as a whole) | 26                 | 18 (11)      | 8             |
|                                 | I            | 19                 | 17 (11)      | 2             |
|                                 | II           | 7                  | 1 ( 0)       | 6             |
| 14.5                            |              | 20                 | 20 (20)      | 0             |

\* The number in parentheses are the number of spore-forming organisms.

以上の考察は、curve I, IIのそれぞれに対応する細菌集団の単離株の類別によつて確された。すなわち、curve IはNB細菌で、curve IIはDNB細菌で特徴づけられた。生理的性質、細胞形態、および菌体脂肪酸組成を検討した結果、curve Iのあるものは14.5時間目の細菌グループにもみられ、一方、curve IIとNB/100培養開始直後の土壌細菌集団には、分類的に共通する細菌がみられた(Table 2)。NB細菌は栄養物の添加に、より早く対応するグループと結論された。

## 第IV章 NB/DNB細菌の集積条件

栄養物濃度が土壌中の各種細菌グループの増殖におよぼす影響を検討した。NB/10, NB/100, NB/10000培地で土壌中の細菌集団を培養し、細菌数をNBおよびNB/100寒天平板で計数した。

Fig. 6 に示したようにいずれの濃度条件でも、細菌の

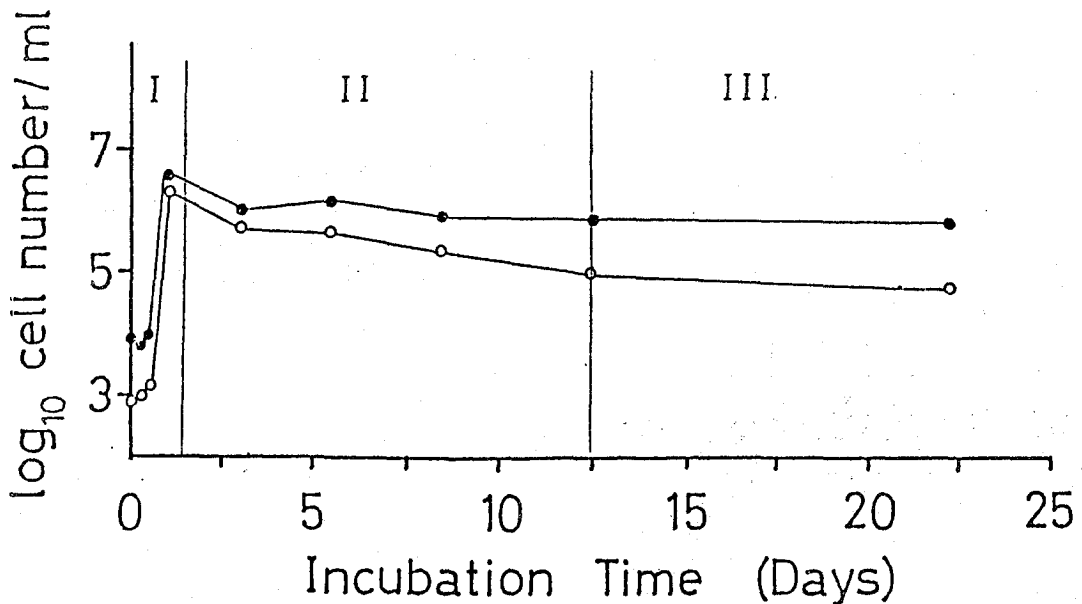


Fig. 6 Changes in number of cells in soil bacterial population cultivated with NB/10000 at 27°C.  
 (○—○); NB count, (●—●); DNB count.

変動には三つ時期がみとめられた。すなわち、細菌数の急激な増加がおこるⅠ期、ゆるやかな減少がみられるⅡ期、変化の少ないⅢ期である。NBおよびNB/100 寒天平板計数値に基づき、各栄養物濃度条件での DNB 細菌の比率を推定した。NB/10 ではⅠ期～Ⅲ期で 0%, NB/100 ではⅠ期 0%, Ⅱ期約 50%, Ⅲ期 60%, NB/10000 ではⅠ期約 40%, Ⅱ期 50~70%, Ⅲ期 90%と推定された。NB/100 寒天平板を用いて各栄養物濃度条件の培養から単離した細菌での DNB 細菌の比率は、いづれの場合も、この推定値と一致した。この結果は NB 細菌と DNB 細菌の集積条件は異なっていることを示す。すなわち、1000 ppm レベルの有機炭素を含む NB/10 では NB 細菌が、1 ppm レベルの有機炭素を含む NB/10000 では DNB 細菌が集積された。

各栄養濃度条件のⅡ期で集積した細菌を菌体脂肪酸組成に基づいて類別した。その結果も Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9 に示した。85% (又は 90%) 類似度レベルで NB/10 集積菌は 8 (サブ) クラス (Fig. 7), NB/100 集積菌は 9 (サブ) クラス (Fig. 8), NB/10000 集積菌は 6 クラスに類別された。これらの類似関係を求め、各条件での集積菌の相違を検討した。全 24 (サブ) クラスは Table 3 のように 85% 類似度レベルで A~K の 11 クラスにまと

627  
579  
641  
836  
583  
637  
618  
580  
607#  
578  
605  
604  
639  
629  
606  
628  
626  
617  
613  
603  
599  
576  
631  
589 A  
593  
590 C  
620 A  
643  
595  
620 B  
590 A  
589 B  
633 B  
625  
621  
588  
623 B  
647  
587  
590 B  
633 A  
656  
665 A  
594  
630  
598  
650 A  
648  
640  
592 A  
596 A  
600 B  
585  
642  
644  
592 B  
611  
632 B  
614  
650 B  
591  
634 A  
608  
600 A  
601  
584  
638  
607

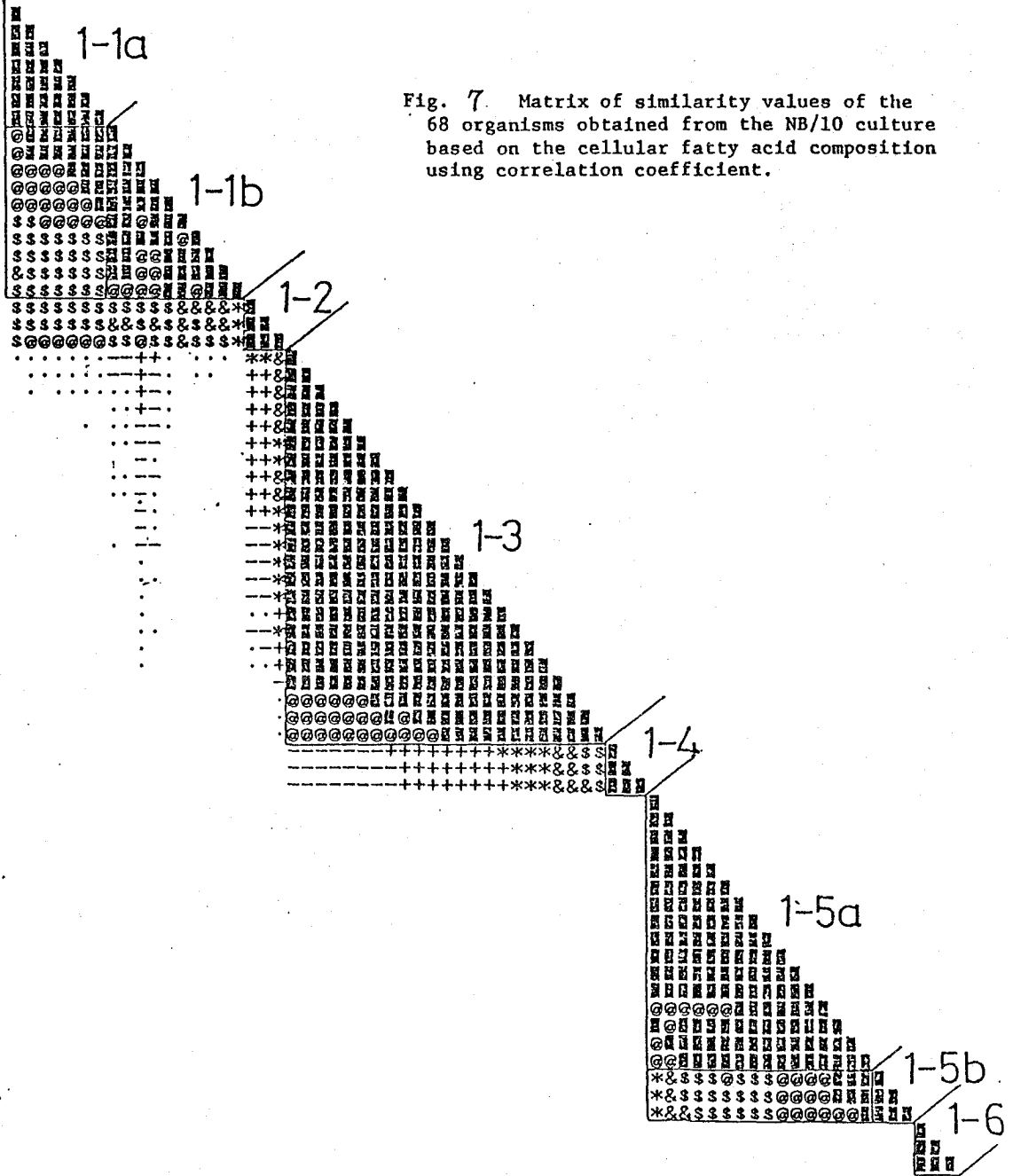


Fig. 7. Matrix of similarity values of the 68 organisms obtained from the NB/10 culture based on the cellular fatty acid composition using correlation coefficient.

SYMBOLS: . 60 to 65; - 65 to 70; + 70 to 75; \* 75 to 80  
& 80 to 85; \$ 85 to 90; @ 90 to 95; ■ 95 to 100

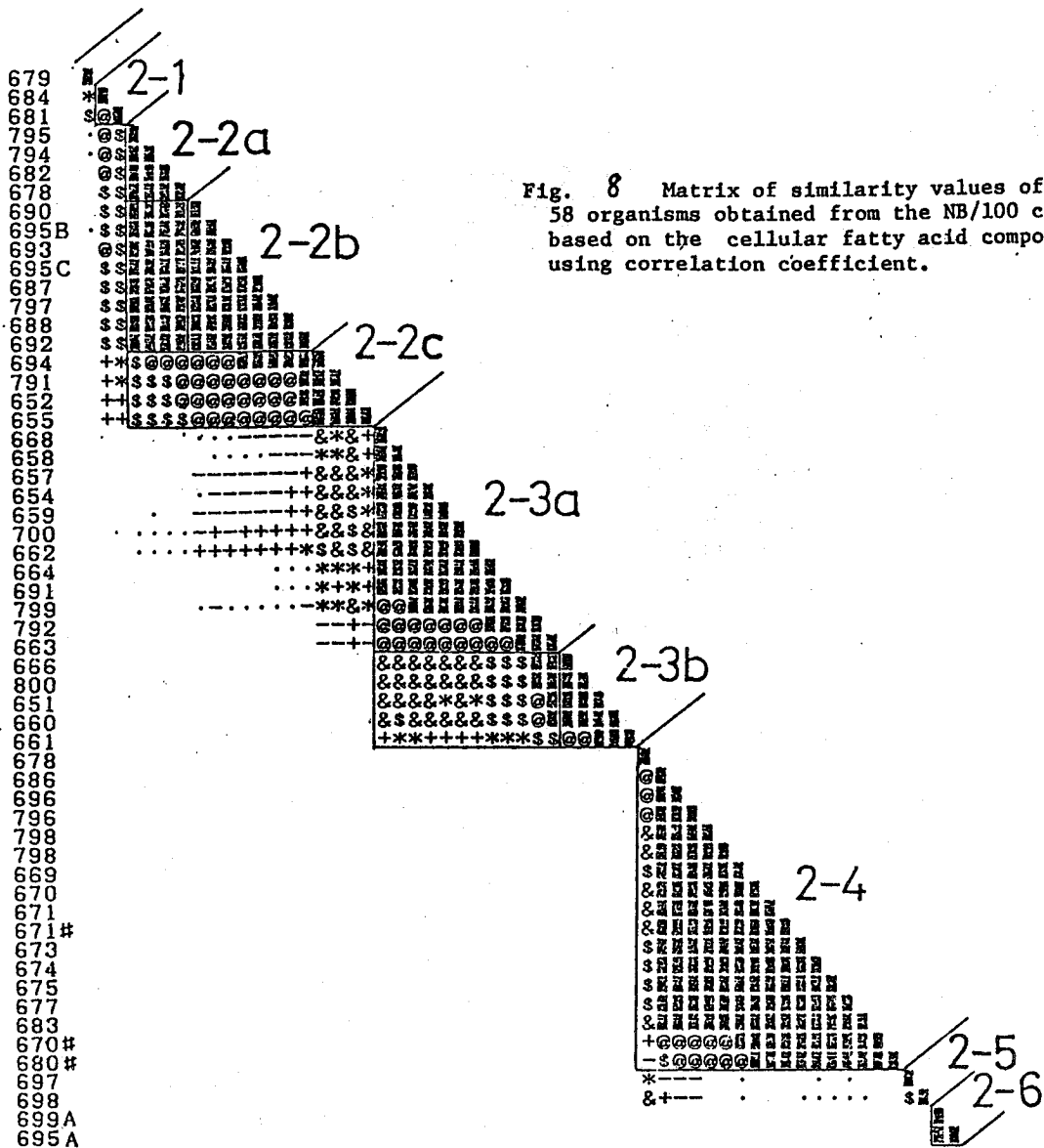


Fig. 8 Matrix of similarity values of the 58 organisms obtained from the NB/100 culture based on the cellular fatty acid composition using correlation coefficient.

SYMBOLS: . 60 to 65; - 65 to 70; + 70 to 75; \* 75 to 80  
 & 80 to 85; \$ 85 to 90; @ 90 to 95; ■ 95 to 100

められた。この結果から、Fig. 10に模式化したように、NB/10集積菌とNB/10000集積菌にはほとんど類似関係がみられないものの、NB/100集積菌の大部分がNB/10又NB/1000集積菌の一部に近い脂肪酸型であり、ことが示された。

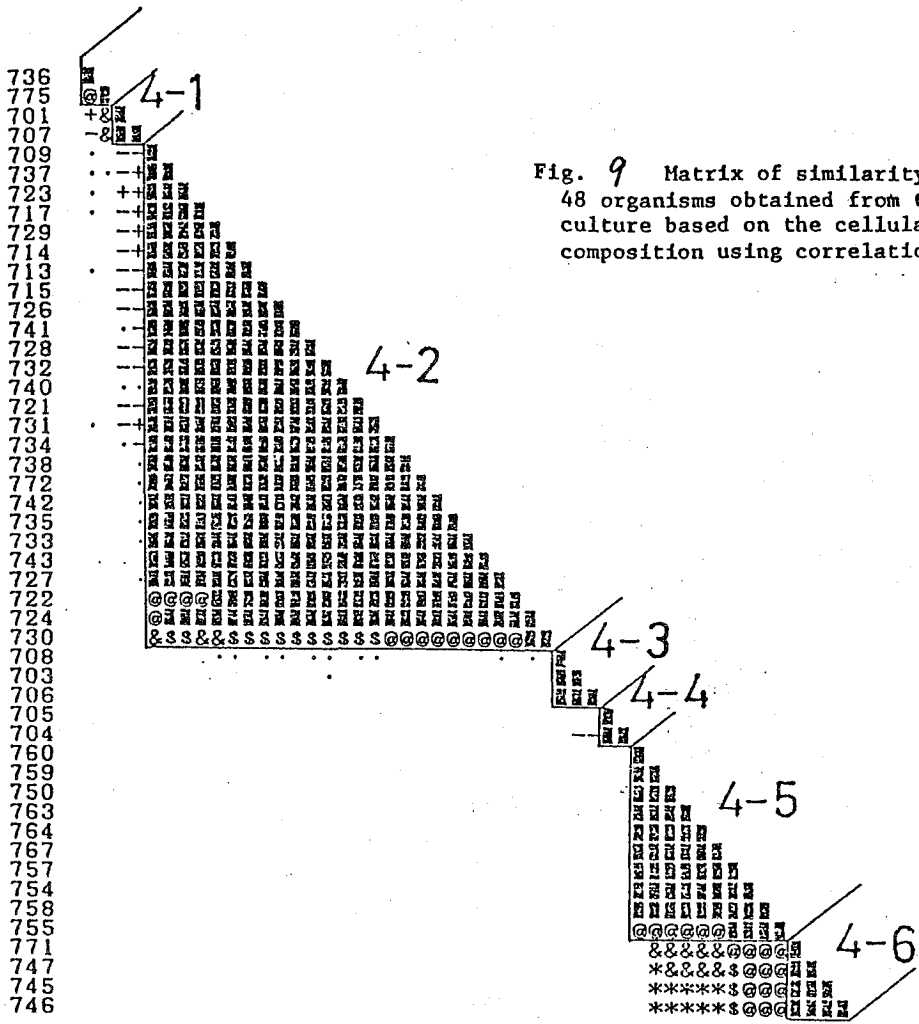


Fig. 9 Matrix of similarity values of the 48 organisms obtained from the NB/10000 culture based on the cellular fatty acid composition using correlation coefficient.

SYMBOLS:    . 60 to 65;    - 65 to 70;    + 70 to 75;    \* 75 to 80  
              & 80 to 85;    \$ 85 to 90;    @ 90 to 95;    ■ 95 to 100

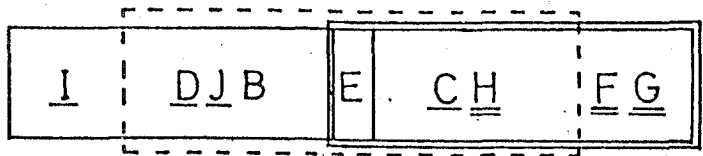


Fig. 10 Relationship between bacterial group and nutrient concentration of enrichment culture.

□ ; NB/10, [ ] ; NB/100, □ ; NB/10000

— ; NB organisms, = ; DNB organisms.

Table 3 Grouping of clusters of Fig. 7 ,  
Fig. 8 , and Fig. 9 .

| Aggregate clusters | Clusters                    |
|--------------------|-----------------------------|
| A                  | 2-1                         |
| B                  | 1-1a, 1-1b, 2-2a, 2-2b, 1-2 |
| C                  | 2-2c, 4-1                   |
| D                  | 1-3, 2-3a                   |
| E                  | 2-3b, 1-4, 4-3              |
| F                  | 4-4                         |
| G                  | 4-2                         |
| H                  | 4-6, 2-4, 4-5               |
| I                  | 1-5a, 1-5b                  |
| J                  | 1-6, 2-6                    |
| K                  | 2-5                         |

まとめ。

水田土壌中に住む多様な細菌は、その増殖を支える栄養物の濃度範囲によつて、大きくNB細菌とDNB細菌の2群に類別される。本研究によれば、これらの多くは菌体脂肪酸組成やキノン組成からも互いに区別される。又これらの菌体成分だけでは区別を確認しにくい細菌グループでも形態や他の生理的性質を考慮すれば、明確な区別を見出しうる。

一方、水田土壌中の細菌集団に栄養物を添加した場合、栄養物の濃度にかかわらず、NB細菌の細胞数はすみやかに増大する。DNB細菌は栄養物濃度があるレベル（有機炭素として 100ppm）以下の場合、ゆるやかにその細胞数の増大をみせる。このような両細菌群の行動の違いは、平板計数の際に見られるコブ形成曲線の解析からも認められる。

以上の結果は Winogradskyが提案した発酵型細菌、固房型細菌という抽象概念は、NB/DNB細菌として具体的

に把えうることを示している。土壌中の物質変化は、これら2群の細菌の活動に負うところが多く、その動的平衡はこれら2群の異なる増殖特性に大きく依存しているものと思われる。

## 審査結果の要旨

土壌中では、多くの種類の微生物などが活動しており、各微生物がどのような数で、どのように活動しているかを適確にとらえ、それを解析することが、今日切実にもとめられている。

本研究では、まず第1章で、土壌中の多様な微生物がさまざまな濃度の栄養培地中で増殖する場合、それぞれ特有の濃度範囲の存在することを認め、この濃度範囲の特性から、IからIVまでの四つのタイプに類別している。さらにこれら四つのタイプを肉汁培地(NB)で増殖できるものと100分の1希釈培地(DNB)で増殖できるが、NB培地ではできないものと大別した。前者をNB細菌、後者をDNB細菌と呼んでいる。

第2章では、化学分類の手法を中心に、これら土壌からの単離細菌の分類を試みている。脂肪酸組成比から、88菌株が14のクラスターに類別され、その中5クラスターはDNB細菌のみからなり、6クラスターはNB細菌のみからなっていることを認めた。残りの3クラスターでは両者の細菌が含まれていたが、より詳細な検討により、そこでもNB、DNB両細菌が分れることが解明された。こうして、NB、DNB細菌という類別が、分類学的基礎をもつことを示した。

第3章では、土壌細菌群を、DNB培地中で培養した際生ずる各細菌グループの増殖を検討した。その結果、各細菌グループの動向は、平板上でのコロニー形成曲線にいち早く反映されて、ついで個体数の増加が認められることを明らかにした。

第4章では、土壌中で優勢な活動をしているDNB細菌グループがどのような条件の下で主要なグループとなるかを解明し、肉汁培地を一万分の1程度に希釈した低栄養条件で、こうした現象が起こることを明らかにした。

以上のように本研究では、これまで充分解明されえなかった土壌中の多様な細菌群の分類学的に意味をもつ類別を確立し、この方法を適用してその変動を解明した。この成果は農学博士の称号に値するものと考えられる。