

氏 名 (本籍)	そめ 染	や 谷	たかし 孝
学位の種類	農	学	博 士
学位記番号	農 博 第	2 8 4	号
学位授与年月日	昭和 5 7 年	3 月 2 5 日	
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農芸化学専攻		
学位論文題目	水田土壌の好気性セルロース分解菌に関する研究		

論文審査委員 (主 査)

教授 古 坂 澄 石 教授 高 橋 甫

助教授 服 部 勉

論文内容要旨

緒言

農耕地に有機物資材を堆肥化して還元することは、地力増強の目的から、また家畜排泄物の処理対策上から、広く行われている。このような圃場では、有機物資材の主成分であるセルロースの分解が重要な問題となる。しかし、化学的側面からの研究はなされているものの、セルロース分解の直接の担い手であるセルロース分解菌については、近年余り研究がなされていない。

ところで、水田土壌の微生物は、低栄養状態におかれていると想定され、セルロースおよびその分解産物が主要な栄養の供給源となる可能性がある。したがって、セルロース分解菌の研究は水田土壌微生物の生態をより深く解明する上でも、大きな契機となりうるものと思われる。

本研究では、まず、セルロース分解菌の計数法の確立をはかった。諸計数法の比較検討から、CMC寒天平板法が最も優れた方法であることを明らかにした。次いで、この方法を用いて、水田土壌の好気性セルロース分解菌の動態を、厩肥長期連用圃場と長期無肥料区圃場の調査を通じて明らかにした。

1. セルロース分解菌計数法の確立

(1) CMC寒天平板法の検討

この方法は、HANKINら(1977)が、微生物のCxセルラーゼ活性検出法として提出したものである。これをセルロース分解菌の計数に適用しうるか否かを検討した。

本法は、無機塩類のほかに炭素源として carboxymethyl cellulose (CMC) を含む培地を用い (Table 1)、培養後、平板上に CMC 沈殿剤をかけ流すことによって、残存する CMC を沈殿白濁させ、微生物コロニーによる CMC の分解を、clear zone として検出するものである。

土壌希釈懸濁液を CMC 寒天平板に接種して 30°C で培養したとき、clear zone 数 (CMC 分解菌数) を計測するための至適培養日数は 6 日ないし 8 日であった。これより培養日数が延長すると、clear zone が拡散し、zone どうしが重なり合い、また zone のコントラストが低下することによって計数値が減少した。また、全コロニー数は、clear zone 数の数十倍ないし百倍ほど多かった。すなわち、平板上には CMC 分解菌でないコロニーが多数出現した。このような非 CMC 分解従属栄養性細菌の存在によって、CMC 分解菌の増殖ないし活性発現が抑制される可能性があったので、培地中の有機不純物を除去するために、寒天のかわりにシリカゲルを用いて平板培地を調製した。しかしながら、このような培地でも、非 CMC 分解従属栄養性細菌の増殖は抑

えることができず、問題点として残された。

ところで、本法は、CMC分解活性を検出するものであるが、セルロース分解のメルクマールとして使用できるかは明らかでない。そこで、本法を用いて二種の土壌から分離したCMC分解菌50株を調べたところ、それらはすべて、セルロース分解活性（濾紙片崩壊活性）を持っていた。また、後述する圃場調査において分離した計516株のCMC分解菌は、すべてセルロース分解活性を持っていた。また逆に、本法とは異なる培地を用いて三種の土壌から分離したセルロース分解菌24株は、すべてCMC分解活性を持っていた。

上記の結果にもとづき、CMC寒天平板法によって、セルロース分解菌をまちがいに数えられることを明らかにした。

(2) セルロース分解菌計数法の比較検討

CMC寒天平板法と、他の既往の方法であるMPN法（希釈頻度法）、セルロースパウダー寒天平板法とを比較した結果（Table 1, Fig. 1）、CMC寒天平板法は、他の方法より数十倍から数百倍多い細胞数を与えた。また、その測定誤差は、他の方法よりも小さいものであった。

このような計数値の大きな違いが、CMC寒天平板法と他の方法との間に生ずる原因の解析を行った。まずMPN法については、計測時においてセルロース分解陰性であった培養管中における、セルロース分解菌の存在の有無を調べたところ、多数の培養管から検出された。そこで、このような培養管も反応陽性として、あらためて菌数を算定すると、最初に得られた菌数よりも数十倍から数百倍大きい値となり、CMC寒天平板法によって得られた菌数と一致した。すなわちMPN法では、セルロース分解菌が接種され、生存しているにもかかわらず、濾紙片が切断されない培養管が多数生じ、これらが菌数の過少評価の原因となったものと結論した。

セルロースパウダー寒天平板法については、CMC寒天平板法によって得られたセルロース分解菌が、この培地上では、clear zoneを作らなかったことから、供試した土壌中では、セルロースパウダー寒天平板法では検出することができないセルロース分解菌が多数存在したものと推定した。

上記のことから、CMC寒天平板法は、従来の他の方法では捕え得なかった微生物を検出できることを、明らかにした。

2. 圃 場 調 査

CMC寒天平板法を用いて、大曲水田圃場（秋田県大曲市東北農試栽培第一部）の長期厩肥連

用区（厩肥 10t / 10a・年）と長期無肥料区とを対象に、好気性セルロース分解菌の調査を行った（1980年5月～12月）。

(1) 土壌サンプリング方法の確立

圃場調査において再現性ある結果を得るためには、土壌サンプリング方法が重要となる。そこで、土壌の物理性が大きく変わる、しろかき前後にわたって、圃場から多点試料（各 500 ml）をランダムに採取し、それぞれホモジナイザー処理により土壌希釈液を調製し、セルロース分解菌の菌数を測定した（Fig. 2）。その結果、無肥料区、厩肥連用区ともに、多点試料間の菌数のバラツキは、変動係数（ $(s_{n-1} / \bar{x}) \times 100$ ）として 12% から 25% であった。この値から、サンプリングに必要な土壌試料の点数は、抽出誤差を 30% 許容すると、5点となった。

なお、多くの土壌試料を取り扱うための便宜から、5点の土壌試料を合併して一つの試料として分析する簡便法を、以下の調査では用いた。この場合、5点の土壌試料についてそれぞれ分析した結果の平均値と、合併試料の値とが、よく一致することを、あらかじめ確かめておいた。

(2) 好気性セルロース分解菌の巨視的動態

作土層 1~11cm における好気性セルロース分解菌の菌数と菌群構成の季節的変動を、春から冬にかけて調査した（Fig. 3）。なお、CMC 寒天平板上のセルロース分解菌のコロニーは、形態にもとづいて、*Micromonospora*、*Streptomyces*、その他の放線菌、糸状菌、細菌の 5 菌群に分け、各菌群の菌数を分別計数した。

好気性セルロース分解菌の全菌数は、無肥料区で 10^5 cells/g 乾土、厩肥 10t 連用区で 10^6 のレベルを保ち、両区とも、荒起こし（厩肥施用）直後、盛夏期、および冬期に菌数のピークが見られた。優占菌群は、無肥料区では *Streptomyces* と細菌が時期により交互し、厩肥連用区では菌相が単純化し、常に *Micromonospora* が優占した。なお、両区から、四つの異なる時点において分離した *Streptomyces* と *Micromonospora* の菌株の同定を行ったところ、前者 140 株は 44 の種に相当するグループに分かれ、極めて多様であったのに対し、後者 228 株はすべて同一種、*M. chalybeata* であった。

厩肥連用量の違いによる各菌群の菌数変化を調べた結果（Fig. 4）、厩肥連用量に最もよく対応して、*Micromonospora* の菌数の著しい増加が認められた。次いで、*Streptomyces* がやや増加した。他の菌群は、0t（無肥料区）から 3t との間で、数倍増加したものの、それ以上の厩肥連用量の増加に対しては、大きな変化を示さなかった。

圃場に施用する直前の厩肥中のセルロース分解菌は、 10^7 cells/g 乾物のレベルで、その優占菌群は細菌であった。また、*Micromonospora* と *Streptomyces* は低い菌数でのみ検出された。

このように、施用直前の厩肥中のフロラと厩肥連用区土壌のフロラとは、大きく異なっていた。

(3) 好気性セルロース分解菌の微視的動態

土壌を粒径と比重の違いにもとづく物理的分画法によって6つの画分に分け、微生物分析を行った。得られた画分は、F 1 ($\geq 0.5\text{ mm}$, light fraction (organic debris)), F 2 ($\geq 0.5\text{ mm}$, heavy fraction (minerals)), F 3 ($0.5 \sim 0.074\text{ mm}$, light fraction (organic debris)), F 4 ($0.5 \sim 0.074\text{ mm}$, heavy fraction (minerals)), F 5 ($\leq 0.074\text{ mm}$, filtrate), および FR ($\geq 0.5\text{ mm}$, 新鮮水稻根)である。

厩肥 10t 連用区におけるセルロース分解菌の各画分における分布を Fig. 5 に示す。厩肥投与後、F 1 の菌数が一時的に大きく増加した。その他の画分での変化は比較的少なかった。F 1 と F 3 は、ともに粗大有機物を主とする画分である。その乾物重は、両者合わせて乾土の約 10% であったが、菌数の約半分が、両画分に集中していた。

これらの画分におけるセルロース分解菌の乾物重当たりの菌密度は (Fig. 6), $F 1 \geq F 3 > F 5 > F 2 \approx F 4$ の順で大きく、F 1 において厩肥投与後に一時的なピークがあったほかは、ほとんど季節的变化は見られなかった。ところが、これらとは対照的に、FR (新鮮水稻根画分) において、7月から12月にかけて、10月をピークとした著しい増殖がみられた。

なお、無肥料区では、F 1, F 3 の菌密度は、厩肥 10t 連用区の場合よりも、それぞれ一ケタ低い値であった。このことから、無肥料区と厩肥連用区とでは、粗大有機物に質的違いがあることが推定された。すなわち、無肥料区で g 乾土当たりのセルロース分解菌数が低い原因は、単に基質となる粗大有機物の量が少ないばかりではなく、菌密度を制限する何らかの要因が存在することが示唆された。

上記各画分におけるセルロース分解菌の菌群構成を、Fig. 7 に示す。厩肥投与一週間後 (5月 16日) に F 1, F 2 で大きな変化が見られたことを除くと、F 1 ~ F 5 では常に *Micromonospora* が優占していた。

厩肥投与後における F 1, F 2 での優占菌群は、黄色色素を生成する細菌で、この菌の出現は、Fig. 5, 6 における F 1 での菌数の増大に対応するものである。しかし、この黄色色素生成細菌は、2週間で急激に増殖して消滅した一過性のもので、単離した菌株のセルロース分解活性も強いものでなかったことから、この菌の増殖は、セルロースの分解によるものではなく、厩肥由来の、より利用しやすい基質によるものと推定した。

ところで、F 1 ~ F 5 における *Micromonospora* の優占とは対照的に、FR (新鮮水稻根画分) では、常に細菌が優占していた。すなわち、Fig. 6 でみられた FR におけるセルロース分解菌の著しい増殖の主体は細菌であった。この現象を確かめるために、圃場から直接、水稻根を切株ご

と掘り出して調べた。その結果、無肥料区、厩肥10t連用区とも、10月と12月の水稲根試料（計14点）はすべて、細菌が、セルロース分解菌の90%以上を占めていた。なお、この時期の水稲根は、主に外側の部分（表皮、外皮）で著しい分解を受けていた。

（4）水田圃場における粗大有機物の収支と、その微細化・分解モデル

水田土壌生態系におけるセルロース分解菌の寄与を評価する目的で、圃場における粗大有機物の分解量と、その分解速度について検討した。なお、粗大有機物は、セルロースを主成分として含み、また、定量が容易であることから、セルロースの第1次近似として取り扱った。

無肥料区および厩肥10t連用区圃場における粗大有機物の供給量（水稲残渣、雑草、厩肥中の粗大有機物、の各量）と現存量を、(3)で用いた画分に相当する粒径ごとに測定した（有機物量の測定は、灼熱損量によった）。ついで、これらの実測値を、粗大有機物の微細化・分解モデル（分解は、すべて一次反応と仮定）にあてはめることによって、分解速度を、粒径ごとに求めた。分解の半減期は、0.5mm以上の粒径で1.7年（無肥料区）および1.2年（厩肥10t連用区）、0.5～0.074mmで5.5年および2.4年、0.074mm以下で21年および8.9年であった。また、粗大有機物の分解によって生ずる水溶性有機物は、無肥料区では、年間66kg C/10a、厩肥10t連用区では、262kg C/10aと推定した。

3. 論 議

厩肥10t連用圃場において、厩肥からの持ち込み菌数を算定すると、厩肥投与前の圃場の菌数の約20%に当たるセルロース分解菌が、厩肥から加わったことになる。毎年、このように多量の菌数が厩肥から加わるにもかかわらず、厩肥連用区の優占菌群は、厩肥における優占菌群である細菌ではなくて、*Micromonospora*であった。したがって水田土壌では、セルロース分解菌の水田土壌固有の安定した菌群構成が成立しており、厩肥の連用によって、その菌群構成は、厩肥とは異なる別の固有の型に変化すると結論した。

Streptomyces と *Micromonospora* を合わせると、厩肥連用区では、年間を通じてセルロース分解菌フロアの9割以上、無肥料区では約半分を占めた。水田土壌のセルロース分解菌の既往の研究では、*Cytophaga* などの細菌類が報告されていたが、本研究によって、むしろ放線菌に注目すべきことが示された。本研究では、水田土壌のセルロース分解菌の計数と分離を、新しい技法を導入することによって、供試土壌をあらかじめ集積培養せずに行った。したがって、もとの土壌におけるフロアを、攪乱することなく把握しえた。このことが、既往の研究と異なる結果を

得た最大の原因と推察される。

微視的分布の調査からは、セルロース分解菌のフロラが、粗大有機物の質的違いに対応して成立していることが明らかとなった。すなわち、新鮮水稲根の外皮では、細菌を主としたセルロース分解菌の急激な増殖があった。この部位での分解は、菌数の増減からみると、約半年間にわたると推定された。一方、新鮮水稲根以外の粗大有機物画分では、*Streptomyces* と細菌（無肥料区）、または、*Micromonospora*（厩肥連用区）が、主要な菌群であった。このような粗大有機物は、圃場において、一年から数十年の半減期で緩慢に分解すると推定した。

ところで、厩肥10t連用区では、粗大有機物の大部分は厩肥に由来する。したがって *Micromonospora* は、水田土壤において、厩肥由来の難分解性粗大有機物の分解を行っている と推定された。*Micromonospora*の菌数が、厩肥連用量の増加に最もよく対応して増加した事実はこの推定を支持する。

Micromonospora に属する単離株は、すべて、*M. chalcea* と同定された。これらの株は、絶対好気性ではあったが、低酸素濃度条件下でも増殖した。また本菌種は、セルロースのみならず、リグニン、キチン、ペクチンなど、多種類にわたる高分子有機物を分解し得ることが知られている。このような諸性質は、高水分、低酸素濃度条件下にある水田土壤において、難分解性粗大有機物を分解するのに適しているといえる。

さて、このようなセルロース分解菌の活動により、また、他の種々の微生物の関与のもとに、水田土壤の粗大有機物は、分解を受けて微細化しつつ、一部は水溶性有機物となる。この水溶性有機物の量は2-(4)で見積ったが、これがすべて、水田土壤の従属栄養性細菌に利用されるとしても、その量は、従属栄養性細菌の維持エネルギーを、やっとなかなか程度であると推定した。このことは、粗大有機物画分(F 1, F 3)では、セルロース分解菌のみならず、アルブミン培地や100倍希釈肉汁培地で測定される従属栄養性細菌の菌密度が、しろかき直後を除いては、ほとんど増減しなかったという事実によって支持される(100倍希釈肉汁培地に関する知見は、太田寛行氏の学位論文(本学, 1981年度)による)。

以上のように、水田土壤微生物への栄養供給という問題は、セルロース分解菌の生態的役割の重要な一面である。

なお、好気性セルロース分解菌の菌数は、湛水後の2ヶ月間は低下した。この時期に、嫌気性セルロース分解菌が、どの程度活動するかについては、今後の検討を要する。

Table 1 Counting methods of cellulose decomposing microorganisms in paddy soils

method	medium* (additions) (g/l)	incubation period	detection
MPN method	filter paper	7 weeks	decomposition of filter paper
Cellulose powder agar plate method	Whatman cellulose powder**(4), agar (10)	4 weeks	clear zones
CMC agar plate method	CMC-Na***(5), agar (10)	6,8,12 and 14days	clear zones (after precipitation of CMC****)

- * basal mineral salts ; NH_4NO_3 (0.3), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5), K_2HPO_4 (1), KCl (0.5), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (trace).
- ** CC31; microgranular form, sieved through a 74 μm mesh.
- *** Sodium carboxymethyl cellulose; DS=0.6-0.8, n=500.
- **** precipitator; 1% aqueous hexadecyltrimethylammonium bromide solution.

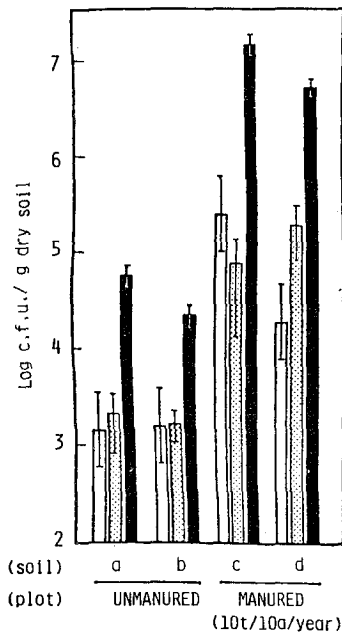


Fig. 1 Counts of aerobic cellulose decomposers in paddy soils by three different methods. Soils were sampled on September 17, 1979.

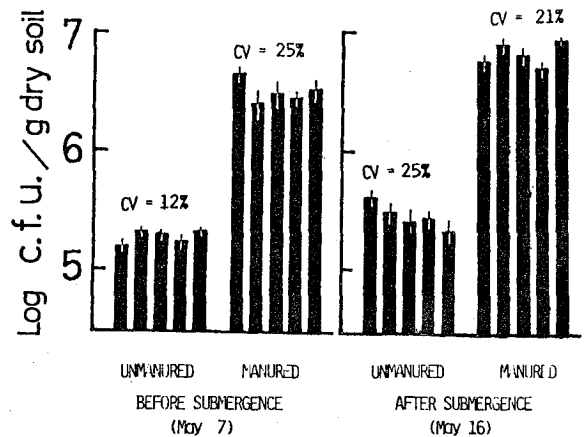
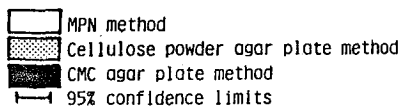


Fig. 2 Variation in the numbers of aerobic cellulose decomposers in five soil samples taken from Ohmagari paddy field.

CV: coefficient of variation, $(s/\bar{x}) \cdot 100\%$.
Narrow bar shows standard deviation for 5 plates.

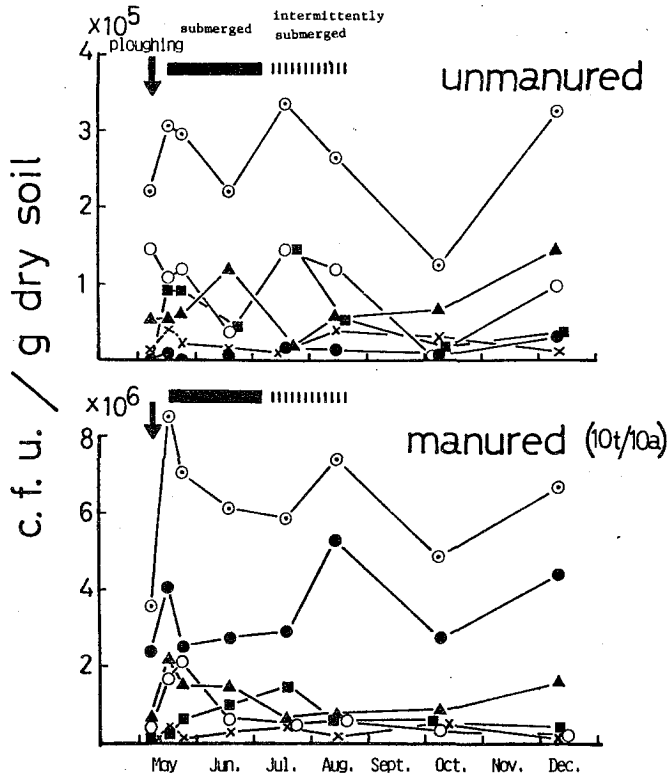


Fig.3 Changes in the counts of aerobic cellulose decomposers in paddy soils from spring to winter

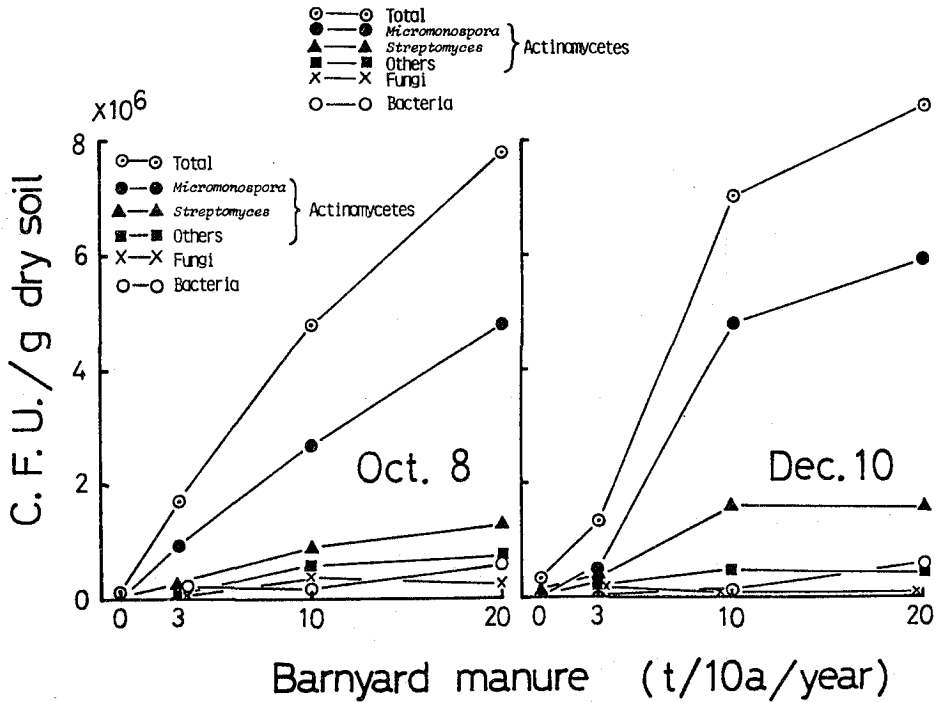


Fig.4 Influence of annual application of barnyard manure on the counts of aerobic cellulose decomposers in paddy soils

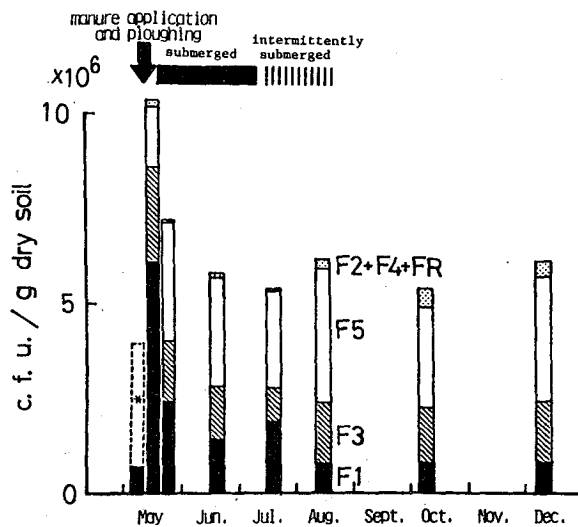


Fig.5 Changes in the distribution of aerobic cellulose decomposers in soil fractions from spring to winter (manured plot; 10t/10a/year)
* not measured

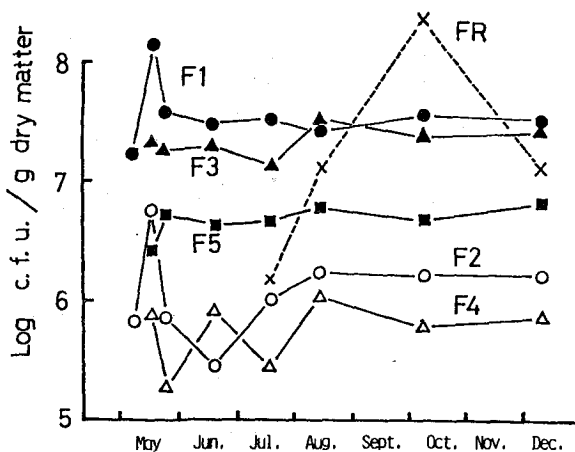


Fig.6 Changes in the cell density of aerobic cellulose decomposers in soil fractions from spring to winter (manured plot; 10t/10a/year)

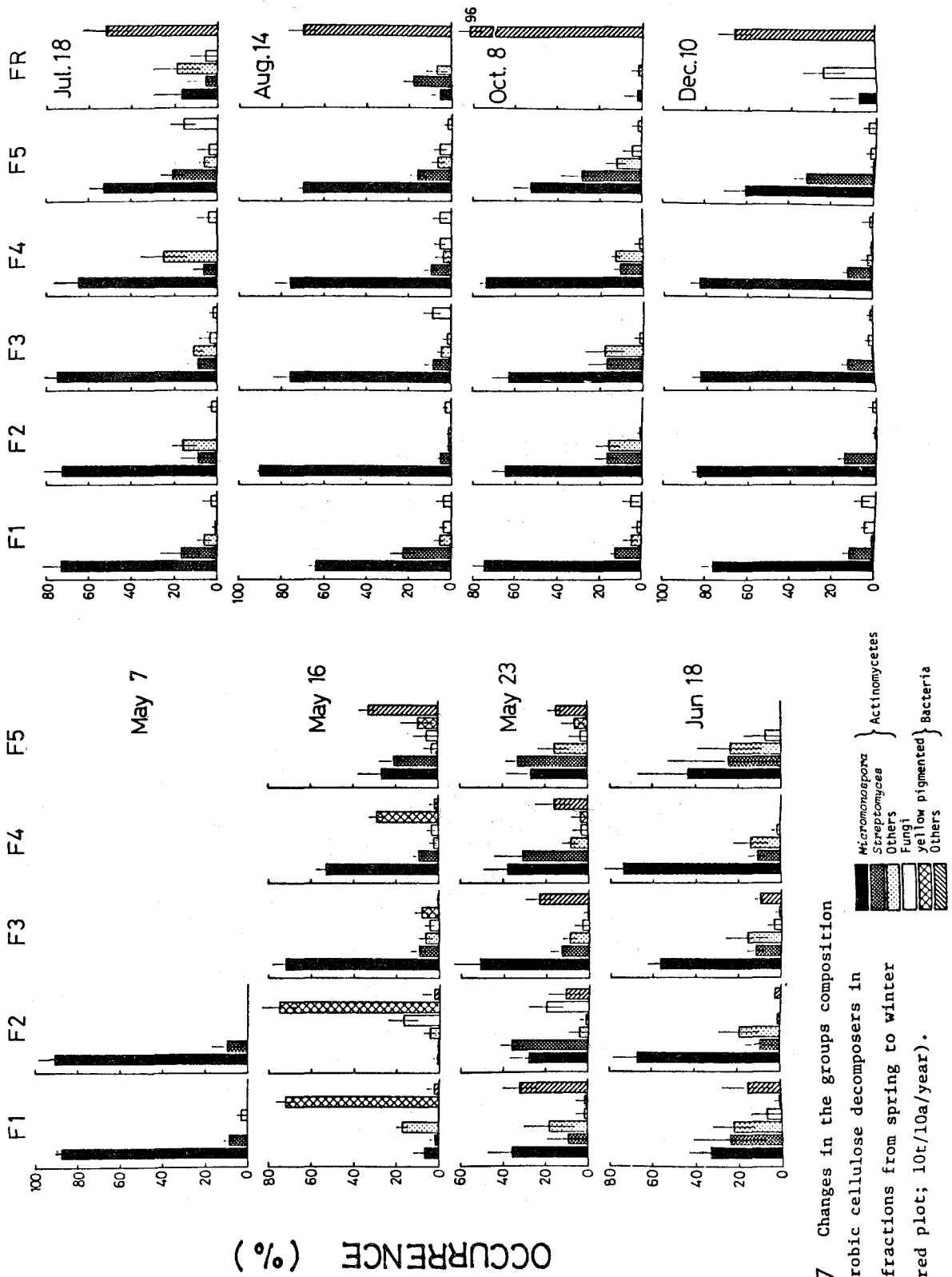


Fig. 7 Changes in the groups composition of aerobic cellulose decomposers in soil fractions from spring to winter (manured plot; 10t/10a/year).

審査結果の要旨

水田土壤中におけるセルロース物質は、微生物の主要なエネルギーおよび炭素源であるにもかかわらず、セルロース分解微生物の計類と分離の方法が十分に確立されて来なかったため、僅かの研究がなされて来たにすぎない。

本論文は先づセルロース分解菌の計数法に検討を加え、カルボキシメチルセルロース (CMC) を炭素源とする培地を用いることによって、セルロース片を用いた最確値法やセルロース粉末を用いた平板法に較べ、10~100 倍の菌数を計測しうることおよびより多くの微生物種を単離しうることを明らかにした。

ついで、CMC寒天平板法を用いて、大曲水田圃場（大曲市東北農業試験場栽培第一部）の長期厩肥連用区（主として厩肥10 t/10a・年）と長期無肥料区について好気性セルロース分解菌の調査を行った。

調査に先立ち土壤サンプリングの方法、サンプル数と抽出誤差の検討を行い、5 点の試料を縮分合併して2 試料の分析を行えば約30%の誤差で調査しうることを明らかにした。

この方法を用いて年間調査を行った結果、厩肥区では *Micromonospora chalcea* のみが優占すると云う極めて興味ある結果を得た。他方無肥料区では *Streptomyces* 及び細菌が優占した。ついで、これら微生物群の微視的分布と動態についても検討した。微生物群は粗大有機物上に高密度に存在し、無機物画分にくらべ10~100 倍の密度であった。また、全微生物数は厩肥投与直後を除き、年間を通じてほぼ一定密度を保つと同時に、優占フロラ像は土壤の全体像と同一であった。同時に調査した新鮮根面上の微生物フロラは細菌優占型であり、その増殖像も有機物画分とは明確に異なるものであった。

他方、水田土壤生態系における粗大有機物の分解量と分解速度についても、分解の数学モデルを作成して算定した。

以上の成果は土壤中における有機物分解における好気性セルロース分解菌の動態に多くの新発見を加えたものであり、博士の学位を与えるに十分なものと判定した。