

氏 名(本籍) はし 橋 もと 本 とも 知 よし 義

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 3 7 2 号

学位授与年月日 昭 和 63 年 3 月 25 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 土壌細菌フローラのコロニー形成に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 服部 勉 教授 大平 幸次

教授 伊崎 和夫

## 論文内容要旨

土壌中には多種多様の細菌が存在し、土壌生態系の維持においてそれぞれ重要な役割を演じている。これらの細菌の研究には、主として希釈平板法が用いられる。すなわち土壌中の細菌細胞を平板上で培養し、増殖させ、コロニーを形成させる。そして形成されたコロニー数を数えたり、このコロニーから各細菌の純粋培養株を得ることによって土壌中の細菌群を研究する方法である。

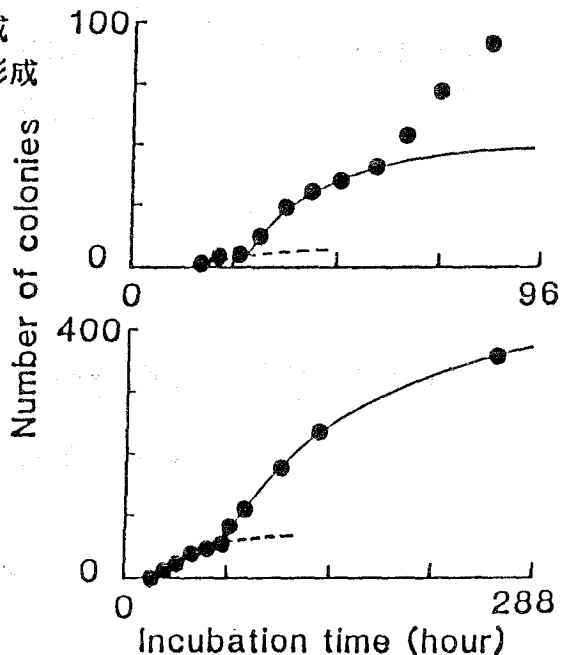
本研究では、土壌中の多様な細菌群が平板上でどのようにコロニーを形成するかを解明し、土壌微生物研究における平板法のより効果的な利用法を確立することを目指している。すなわち、(1)土壌中の細菌が平板上で形成するコロニー数の増加を経時的に計数し、コロニー形成が、いくつかの曲線により表されることを示し、(2)これら曲線に対応する各細菌の増殖特性を単離菌株により検討し、土壌中の発酵型細菌と固有型細菌がそれぞれ異なった曲線に沿ってコロニーを形成することを明らかにした。次に、(3)コロニー形成曲線の解析法を低濃度農薬に感受性を持つ少数の細菌の検出と定量に応用することを試みた。最後に、(4)このコロニー形成曲線の解析法を窒素サイクルを担う硝化細菌などの計数法である最確値法(Most Probable Number法：MPN法)に適用する可能性を検討した。

### 第1章 土壌細菌フローラのコロニー形成

#### (1) 土壌中の細菌フローラのコロニー形成

適当に希釈した土壌試料を土壌浸出液(SE)培地中で培養し、12日間、経時的に平板上に形成されるコロニー数を計数した。その結果、コロニー数は培養の全期間を通して増加し続けることが認められた(第1図)。すなわち、このコロニー形成の過程は、培養時間をいくつかの区間に分けることにより、各区間の計数値をFORモデルのコロニー形成曲線で表すことができた。以下各区間の曲線をコロニー形成の成分曲線と呼ぶことにする。

土壌中の多種類の細菌のコロニー形成がいくつかの成分曲線により表されることは、平板上の土壌細菌がコロニー形成速度の違いによっていくつかのグループに分かれることを示唆している。



第1図 SE培地平板上での土壌中の細菌フローラのコロニー形成曲線

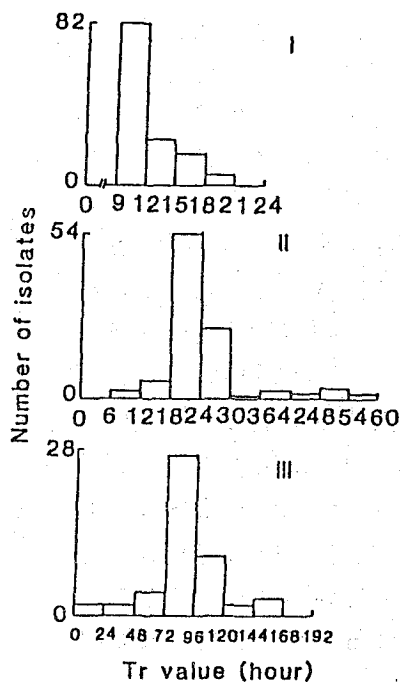
(2) 各成分曲線に対応する細菌の特性

土壌中の多種類の細菌はいくつかのグループに分かれ、それぞれ異なる成分曲線に沿ってコロニーを形成するという前節の推定を実験的に裏づけるために、次の検討を行った。コロニー計数した平板上から成分曲線毎に菌株を単離し、純粋に培養した。各培養菌株の平板上でのコロニー形成を観測し、その結果をFORモデルにより解析した。いずれの単離菌株のコロニー形成過程も、FORモデルでよく表された。このモデルのコロニー形成開始までの時間を表すパラメーター $tr$ の値は、各菌株の増殖速度を反映するとされる。

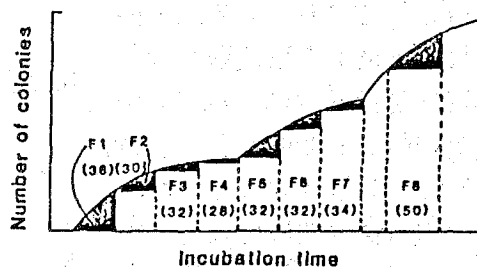
ここで単離した各菌株の $tr$ 値は、第2図のように分布した。図に示したように、成分曲線毎に、異なる範囲で $Tr$ 値は分布した。すなわち、土壌中の細菌フローラは平板上での増殖速度の違いによりいくつかのグループに分かれてコロニーを形成し、それぞれのグループが各成分曲線に対応すると考えることができる。

各成分曲線を構成する細菌集団は、その成分曲線上で一様にコロニーを形成することがFORモデルから期待される。そこで第3図に示すように、土壌中の細菌フローラのコロニー形成を培養時間によっていくつかに分け、それぞれの区分から単離した菌株のコロニー形成における $tr$ 値の分布を比較した。

各区分に対応する単離菌株の $tr$ 値の分布は、3つのグループに分かれた(第4図)。F1-4、それぞれから単離した菌株の $tr$ 値は、いずれも同じ分布を示した。F5-7由来単離菌株も互いに同じ分布を示し、F1-4の分布とは異なる



第2図 各成分曲線から単離された菌株の $tr$ 値ヒストグラム



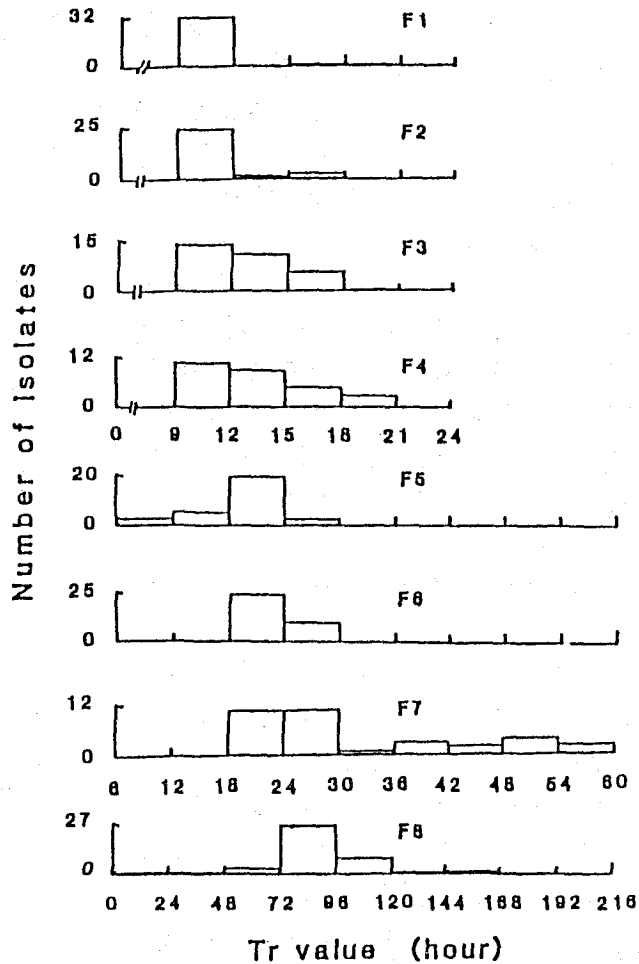
第3図 菌株単離区間の模式図  
括弧内は単離成功菌株数

った。F5の場合には、F1-4の細菌グループとの重なりが認められた。そしてF8由来単離菌株はF1-4, F5-7いずれとも異なる分布を示した。

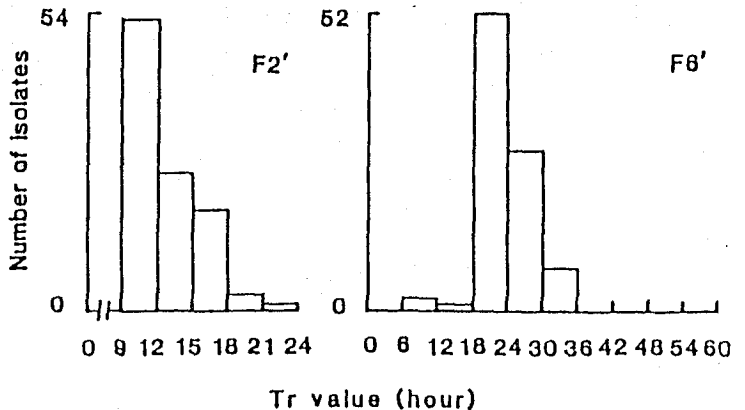
細菌グループのtr値分布特性をさらに詳しく検討するために、F2に相当する区間から101株、F6から91株、それぞれ新たに菌株を単離し、tr値の分布ヒストグラムを調べた(第5図)。F2'はF1-4の細菌グループと、そしてF6'はF5-7の細菌グループと同じtr値の分布パターンを一層明瞭に示した。

各成分曲線から単離された菌株のNB/DNBテストから、成分曲線I, IIは主に栄養豊富な肉汁(NB)培地で増殖するNB細菌により構成されており、一方成分曲線IIIはNB培地上では増殖しないがNB培地を100倍希釈したDNB培地上で増殖するDNB細菌(低栄養細菌)により構成されていた。前者の細菌群は発酵型細菌、後者は固有型細菌に対応すると考えられる。

以上第1章では、土壤中の多種類の細菌が、コロニー形成曲線によっていくつかの細菌グループに類別されることを明らかにした。



第4図 各区間から単離された菌株のtr値ヒストグラム



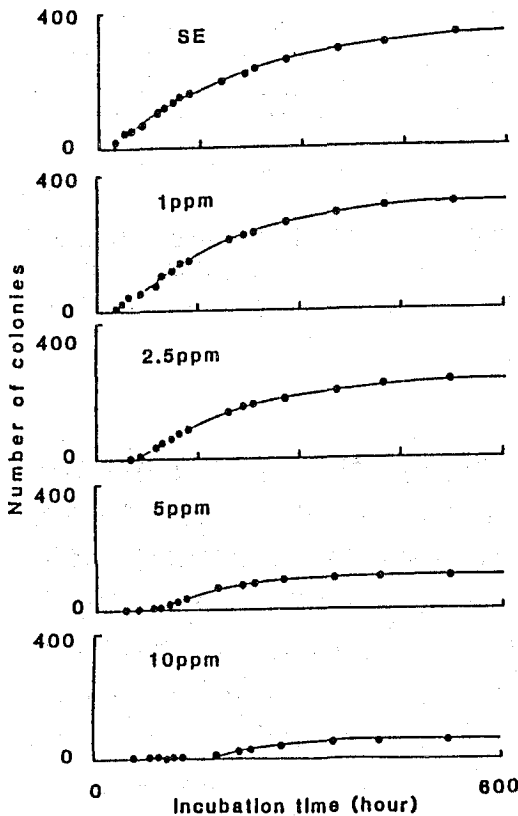
第5図 F2, F6から単離された菌株のtr値ヒストグラム

## 第2章 農薬添加培地上でのコロニー形成

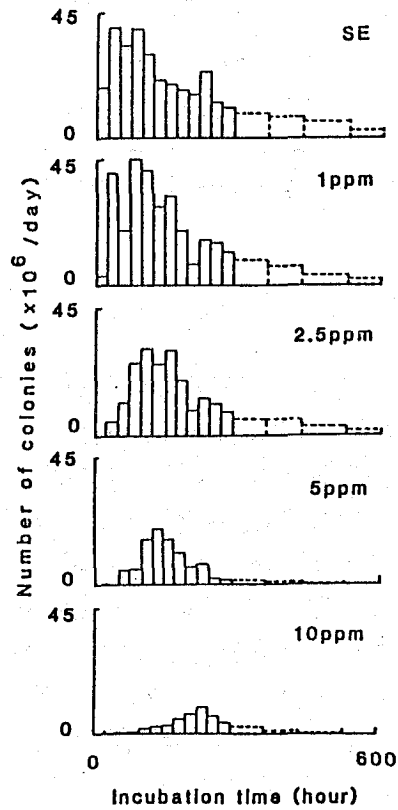
第1章で導入した細菌フローラのコロニー形成曲線の解析法を応用して、これまで研究が困難であった低濃度農薬に感受性を示す土壤中の少数の細菌の検出を試みた。

適当に希釈した水田試料を土壤浸出液に何段階かのpentachlorophenol (PCP) を添加した培地中で培養し、経時的にコロニー数を計数した。最終的に形成されるコロニー推定数は、1ppm添加培地平板上での推定値と無添加のそれとに差が認められなかった。2.5ppm添加の場合は、3割ほど少ない推定値が得られた(第6図)。平板上に形成されるコロニーをまとめて扱い、1ppmのPCPに感受性を示す細菌を検出することはきわめて難しいと考えられる。

そこで、第1章のコロニー形成成分曲線の考えを導入し、低濃度農薬感受性菌の検出を試みた。その結果、第7, 8図に示したように、成分曲線IとIIは農薬添加により大きく影響されることが認められた。これは、成分曲線IとIIに対応する細菌集団に農薬感受性菌が含まれるためだと考えられる。



第6図 PCP添加SE培地平板上での土壤中の細菌フローラのコロニー形成曲線



第7図 PCP添加SE培地平板上での土壤中の細菌フローラの24時間当りのコロニー形成数のヒストグラム

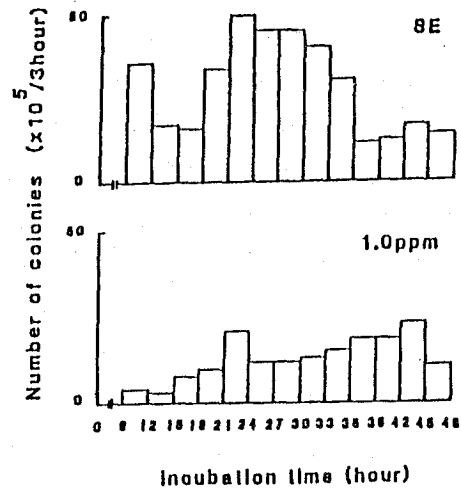
成分曲線 I と II に対応する細菌集団の中に低濃度の農薬に感受性を持つ細菌が含まれることを確かめるために、以下の実験を行った。農薬無添加培地平板上の成分曲線 I と II に対応するコロニーから単離した菌株について、1ppmのPCP添加培地平板上でのコロニー形成を検討した。その結果、成分曲線 I と II に対応する細菌集団には多数の農薬感受性菌が含まれることが裏づけられた（第1表）。

第2章では、コロニー形成曲線を利用して、多種類の細菌フローラの中に含まれる低濃度PCPに感受性を持つ少数の細菌集団を効率よく検出、単離する手法について明らかにした。

第1表 PCP感受性菌の構成比率

成分曲線	PCP感受性菌
I	73.7% (56/76) <sup>a</sup>
II	64.9% (50/77)
III	15.0% (3/20)

a: (PCP感受性菌数/単離菌株数)



第8図 PCP添加SE培地平板上での土壤中の細菌フローラの3時間当りのコロニー形成数のヒストグラム

### 第3章 コロニー形成解析のMPN法への応用

#### (1) MPN法へのFORモデルの適用

土壤生態系での窒素やイオウのサイクルを担う硝化細菌、イオウ細菌等の計数には、一般にMPN法が用いられる。これは、まず適当に希釈した土壤試料を主として液体培地中に分注する。細菌細胞の接種された試験管では、適当な培養時間の後に増殖が確認される。この増殖の確認された試験管本数から試料中の細胞数を推定するという手法である。このMPN法においても、増殖の確認された試験管本数は経時的に増加する。増殖の確認された試験管には2細胞以上接種されなかったと仮定できる程高い希釈段階では、各試験管中の細胞の増殖過程を、平板上での各細胞の増殖過程と同様に考えてよいものと思われる。そこで、MPN法のデータにコロニー形成曲線の考え方が適用する可能性を検討した。

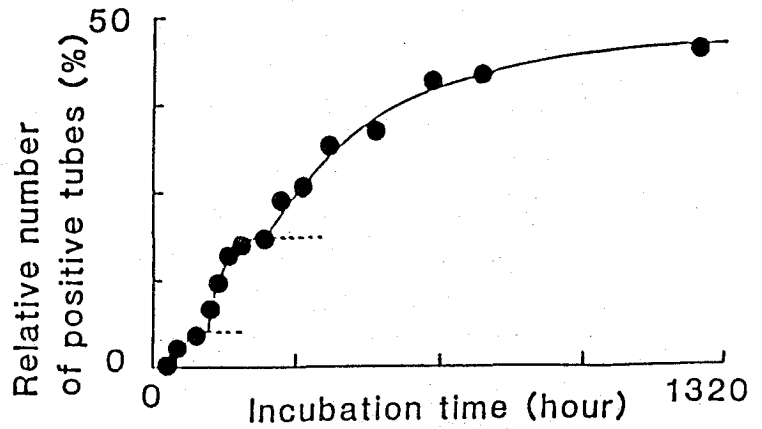
適当に希釈した水田試料をDNB培地中で培養し、平板法ではコロニー数を、そしてMPN法では増殖の確認された試験管本数を経時的に計数した。MPN法では、希釈段階毎に90本の試験管を用意した。第1章で検討したように、平板法では土壌中の多種類の細菌のコロニー形成が、3つの成分曲線により表された。MPN法における増殖の確認された

試験管本数が経時的に増加する過程は、3つの区間に分けることにより、それぞれFORモデルの曲線を用いて表すことができた(第9図)。この結果は、平板法と同様MPN法にもコロニー形成曲線の考え方が適用できることを示す。

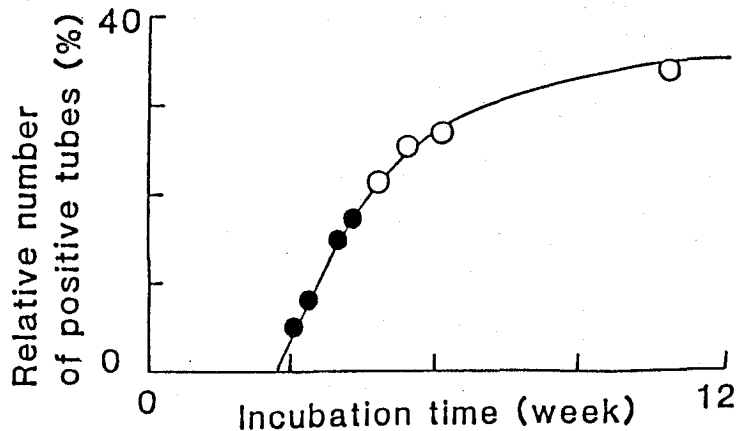
(2) 硝化細菌の細菌密度を推定する培養時間

硝化細菌の細菌密度を推定するためには、一般に3, 4週間培養した後の増殖の確認された試験管本数を用いる。しかしこの培養期間後にも増殖の確認された試験管本数がしばしば増加するという難点がある。例えば水田土壌中のアンモニア酸化細菌の場合、増殖の確認された試験管本数は10週間以上増加し続けた

(第10図)。そこで比較的短い培養時間のデータにFORモデルを適用し、最終的に確認される試験管本数を推定し、最終的に確認された試験管本数と比較することを試みた。培養開始から4週間後までの経時的なデータを用いて、最終的に確認される試験管数を推定したが、その推定値は、11週間後の実測値とほとんど一致した。



第9図 増殖の確認された試験管本数の経時的増加



第10図 土壌中の硝化細菌の増殖の確認された試験管本数の経時的増加  
試験管本数は75本を100%とする相対表示  
曲線は黒丸のデータから推定した

第3章では、MPN法のデータがコロニー形成曲線の考え方により解析できることを示し、長時間の培養を必要とする細菌フローラの細菌密度を比較的短い培養時間内に予測できることを明らかにした。

#### まとめ

本研究では水田土壌中の多様な細菌フローラのコロニー形成曲線を解析して、以下のことを明らかにした。

1. 土壌中の多種類の細菌のコロニー形成は、いくつかの成分曲線に沿ってFORモデルで表された。
2. 各成分曲線は他の成分曲線とそれぞれ異なる細菌集団から構成されていた。ひとつの成分曲線を構成する細菌集団は、単離菌株のtr値がグループとしてまとまった分布をする特性を持つ。また、成分曲線I, IIは発酵型細菌、成分曲線IIIは固有型細菌によって構成されていた。
3. 農薬添加培地上でのコロニー形成曲線の解析から、低濃度農薬(PCP)に感受性を示す少数の細菌集団を効率よく検出することができた。
4. 硝化細菌を計数するMPN法に対して、コロニー形成曲線の考え方を適用する可能性を検討した。FORモデルにより、硝化細菌の細菌密度を比較的短い培養時間後に予測可能となった。



## 審査結果の要旨

細菌を平板上で培養しコロニーを形成させる方法は、土壌細菌フローラ研究の主要な手段の1つである。本研究は、こうしたコロニー形成と培養時間との間の関係を解析したものである。

第1章では、土壌細菌フローラのコロニー形成が段階的に進行し、各段階がコロニー形成曲線として表現できることを示した。また各段階においてコロニーを形成した細菌の増殖速度（ $tr$ 値によって測定）は、それぞれ同形のヒストグラムを形成することを明らかにした。これらのヒストグラムの比較的研究から、土壌細菌フローラはコロニー形成曲線によっていくつかのグループに類別できることを示した。

第2章では、土壌細菌フローラ中の農業感受性菌の検出、コロニー形成曲線を応用することを試みた。すなわち、農業添加と無添加の両平板を使用し、同一試料を接種し、培養することによってえられるコロニー形成曲線の比較によって、特定の成分曲線に農業添加の影響が特に著しく認められていることを示した。こうした特定の成分曲線に対応して、無添加平板上でコロニーを形成した細菌を単離、培養して農業への感受性を調べた結果、感受性菌が多く存在することが認められた。本研究で使用した農業はpenatachloro-phenolで、1 ppmの微量添加で感受性を示す細菌を見いだしたことは興味あることである。

第3章では、コロニー形成曲線の考えを硝化菌のMPN法による測定に応用できることを扱っている。硝化菌の増殖は遅く長時間培養してもその測定は不完全で、従来より難題の1つとされていた。著者は、MPN法における硝化菌増殖(+)の試験管の数がコロニー形成曲線と同じように増加していくことを示し、最終(+)試験管本数の予測を可能にした。

以上、本研究は土壌細菌フローラの研究法に新しい可能性を開拓したといえる。よって審査委員一同は、著者に農学博士の学位を授与するに値すると認定した。