

1 放線菌の土からの分離とはたらき

1. はじめに

今年の夏、自然科学部で研究テーマを探していたところ、学校の裏の松林で、セミの抜け殻を見つけた。しかし、落ち葉の中からは、抜け殻は、見つからなかった。

このことが、きっかけで子供の頃もっていた「セミの抜け殻は知らないうちに消える」という謎のことを思い出した。インターネットで調べたところ、はたらいているのは、キチン質を分解する放線菌らしいということが分かった。

そこで、土に住んでいる放線菌に興味を湧いたので、放線菌を培養してみようと思った。

2. 放線菌について

放線菌は核膜が無い原核生物。原核生物は、ふつう、単細胞の細菌類で、孢子については、つくらないか、つくっても内生孢子が一般的である。一方、放線菌はカビのように糸状の菌糸を形成し、菌体の外側に孢子をつくるなど、細菌とは違う性質を持つ。

放線菌は、土の中では、孢子の状態で眠っていることが多いので、培養するためには、温度で刺激を与えて、目覚めさせる必要があり、この温度で刺激を与えることを、温浴という。温浴の際、一般細菌を殺す界面活性剤（SDS）を加えると放線菌を分離しやすくなる。

3. 実験に使うもの

Yeast-Starch-Agar培地 土 セミの抜け殻

土は学校の近くの松原の土、自宅近くの葱畑や部員の人たちが持ってきてくれた土を使った。

採集地：沼津市千本松原の松林 沼津市原のねぎ畑 鳥根県出雲大社 川根町の河原

セミの抜け殻は、沼津千本松原の松林で採集した。

4. 実験の流れ

(1) Yeast-Starch-Agar培地を作る。

酵母エキス 1g、可溶性デンプン 5g、寒天7.5gを蒸留水に溶かし、500mlとする。このとき酵母エキスは、吸湿性があるので、手早く秤量し、最後に加えた。Ph7.3に調整し、オートクレーブで120℃、15分間滅菌、シャーレに移して固めたものを培地として使用した。

(2) 各地で採取した土に純水を加え、温浴する。

純水100mlに自然乾燥した土 1g を入れ、孢子で眠っている状態の放線菌を活発に行動させるために温浴をした。洗剤の有無、温度などの条件はここで設定する。

(3) 温浴したものを1mlとり、培地に植えつけ、35℃で培養する。土と上澄みという条件は植え付けのときに設定する。

(4) きれいに増殖した放線菌のコロニーを単離培養する。

(5) 単離培養した放線菌のはたらきを調べるため、セミの抜け殻（キチン質）を入れ、分解の様子を観察する。

5. 実験の結果

テーマ1 培養条件について

洗剤の有無、土と上澄み、温浴時の温度設定を変えて培養を行った。

実験1 洗剤の有無による培養の様子の違い

(1) 目的

界面活性剤により、放線菌以外の一般細菌を、減らすことができることを確認する。

(2) 方法

沼津市千本松原の松林、沼津市原のねぎ畑、島根県出雲大社それぞれの土を洗剤「有」「無」で温浴した。通し番号と土の種類は表の通りで、1, 5, 8は洗剤「有」、2, 6, 9は洗剤「無」とした。(表1)

(3) 結果

表1 洗剤の有無

	上澄み	
洗剤	有	無
松林	1	2
千本松原	大きな コロニー	細かな細菌 のコロニー
ねぎ畑	5	6
沼津市原	かたまり と細菌	細菌多
出雲大社	8	9
島根県	コロニーあり 細菌少	白い点多

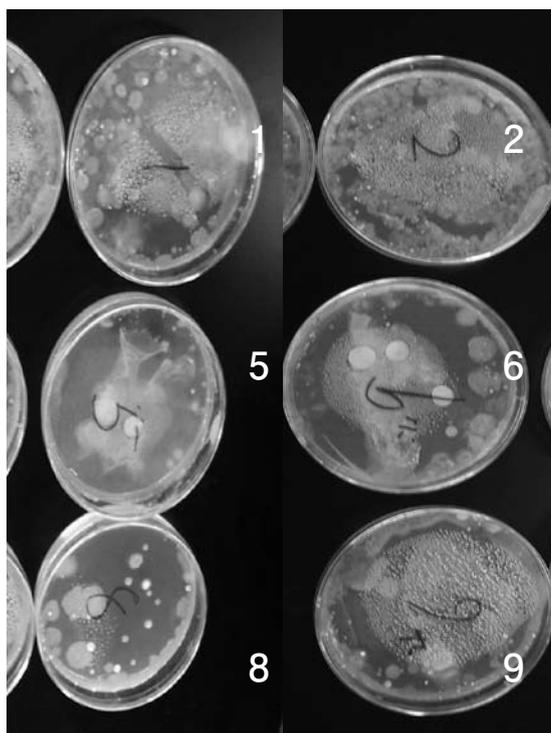


図3 培地の様子 洗剤有り 洗剤なし

(4) 考察

これらの結果から、洗剤「有」の方が洗剤「無」より一般細菌の増え方が少ないことが確かめられた。

実験2 土と上澄みの違い

(1) 目的

土と微生物の結びつきを調べるため、土そのものを入れたときと上澄みだけのときとの放線菌の増え方の違いを比較する。

(2) 方法

上澄み液と土そのものをいれたときの違いを比べるために両方とも洗剤を入れて温浴した。沼津市千本松原の松林、沼津市原のねぎ畑、島根県出雲大社それぞれの土を「上澄み」「土入り」で植え付けをした。通し番号と土の種類は表の通りで、1, 5, 8は「上澄み」、3, 7, 10は「土入り」とした。(表2)

(3) 結果

1と3を比べると1の「上澄み」に比べ3の「土入り」では、コロニーの数が3のほうがかなり多くなっている。5と7を比べても、コロニーの数が7の方が多いことが分かる。8と10では、他

の土よりも大きく差がでた。土そのものをいれた方は、菌糸も観察された。

(4) 考察

「上澄み」よりも、「土入り」のほうが、細菌類、放線菌ともに多く得られたことから、土の中の微生物は土と強く結合していると考えられる。

実験3 温浴をするときの温度

(1) 目的

孢子で眠っている状態の放線菌を活発に行動させるために温浴をする。その時に35℃、80℃、120℃で、温度差をつけて、放線菌の目覚めの変化や雑菌の量の変化を比べる。

(2) 方法

土は沼津市千本松原の松林のものを使った。温度ははじめ35℃、80℃の2種類で実験を行ない、洗剤は「有」「無」の両方、植え付けは「上澄み」とした。その後120℃を追加した。120℃はオートクレーブを使った。普通120℃は滅菌と言うが、ここでは温浴時の温度を比べたかったので、温浴という言葉をもそのまま使う。通し番号と温度は表の通りとした。(表3)

(3) 結果

予想では、80℃になると一般細菌も放線菌もみんな死んでしまって、何も増殖しないと思った。しかし、80℃で温浴した23と35℃で温浴した1を比べると、コロニーの数は1の方が23より多いものの、23にも一般細菌のコロニーが見られた。また、1には見られないカビが、23では発生した。

追加として、120℃で温浴したものを培養した18、19は、洗剤の有無関係なく、一般細菌は見られず、カビが発生した。

(4) 考察

この結果から、80℃でも一般細菌は、死滅しないことが分かった。一般細菌は、孢子の状態です土の中におり、この孢子は80℃では死滅しないが、120℃で死滅すると思われる。

カビも同様に孢子の状態です土の中におり、この孢子は120℃でも死滅しないことが分かった。

テーマ2 放線菌のはたらき セミの抜け殻の分解

実験4

(1) 目的

最初の「セミの抜け殻は消える」という疑問が、今回、培養した放線菌による分解であることを確認するため、放線菌と思われるコロニーを単離した中に入れた。

(2) 方法

実験1の通し番号1、3、8の培地から放線菌と思われるコロニーを単離し、それぞれ2つの培地に植え継ぎ、継代培養した。培地にはもとの通し番号にa bの記号をつけた。3は菌糸が発生したので、菌糸だけ移したものをa、培地の下から移したものをbとした。菌糸が十分広がったところでセミの抜け殻を入れた。セミの抜け殻は、土を取り除いたものを胸と腹の部分を使った。(表4)

セミの抜け殻は、放線菌らしきコロニーが、培養できた3-aと8-aに入れた。(表5)

(3) 結果

表4 単離培養の結果

1 a (松林 上澄み) 菌糸がない	b 少し増えた
3 a (松林 土 aは菌糸だけ単離) 菌糸が発生	b (培地の下から採って単離) 一般細菌が多い
8 a (出 上澄み) 雑菌 カビと放線菌のコロニー	

表5 セミの抜け殻を入れた結果

3 aバラバラになっていた。	8 a菌糸がまとわりついてしたが、特に変化はなかった。
----------------	-----------------------------

(4) 考察

放線菌が、入っていた8-aよりも、カビが入っていた3-aの方が、セミの抜け殻を多く分解していたので、今回培養できた放線菌よりも3-aのカビの方が、セミの抜け殻を分解していると思われる。そこでセミの抜け殻から分解者を探すことにした。

図7、8 分解の様子



3-a 松林



8-a 出雲

テーマ3 セミの抜け殻を培養し、分解者を培養する

実験5

(1) 目的

抜け殻の分解者は、抜け殻自体についている可能性を示唆された。そこで、抜け殻を培養し、分解者を分離することにした。

(2) 方法

セミの抜け殻1gに純水100mlを加え、120℃で温浴をして、それを培地に植え付けた。セミの抜け殻は、松林で採取した。

(3) 結果

通し番号20は、白いコロニーと茶色い一般細菌に別れていた(図9)。この白いコロニーは、放線菌だと思われたが、蓮見教授に見ていただいたところカビということだった。

(4) 考察

今回培養できた抜け殻(キチン質)の分解者は、この白いカビであることが分かった。

6. 実験1～5をまとめて

出雲大社の8の土から放線菌を培養することができた。

上澄みと土そのものでは、土そのものの方が、多くのコロニーが得られたので、土の中の微生物は土と強く結合していると思われる。

培養条件は、洗剤が有で、120℃で温浴をすると、一般細菌が増殖しにくい。

分離培養した放線菌では、セミの抜け殻を分解できなかったが、3-aのカビによって、キチン質であるセミの抜け殻を分解できたので、3-aのカビはキチン質を分解できることを確認できた。

セミの抜け殻から分解者として、カビが培養できた。

7. おわりに

今回の実験では、放線菌は培養できたが、他の細菌と分離することができなかったため、今後、培地の性質を変えて、放線菌を分離したい。

また、放線菌が分離できたら、セミの抜け殻のほかにも、入れるものを変えて、はたらきの比較をしたいと考えている。

土壌微生物のうち分解者の中心はカビであり、放線菌はそのカビを分解するはたらきがあるらしい。

分解者の種類の移り変わりについても調べてみたい。

海にも放線菌はいるそうなので、学校の前の千本の海から放線菌を培養したい。

8. 謝辞

放線菌の判定には国立沼津工業高等専門学校 蓮見教授および竹口准教授に判定をしていただいた。
この場をお借りして御礼申し上げます。

9. 参考文献

飯村研 - 放線菌 - http://www.ab11.yamanashi.ac.jp/ABF/No1/index_.html

早川研究室http://www.ab11.yamanashi.ac.jp/ABF/No1/hayakawa/about_hosenkin1.html