

超音波処理による土壤微生物の効果的な分離の試み

多田 宜文¹ 小椋 義俊²

要 約

土壤からより多くの種類の微生物を分離することを目的として、土壤の懸濁液を超音波で処理することを試みた。土壤懸濁液を氷水中で超音波処理すると、3分間処理を行った土壤から分離される生菌数（分離生菌数）は最大になるが、処理時間が10分を越えると無処理の場合より生菌数の分離率は低下した。30秒から60秒の処理を行った土壤からの分離生菌数は処理をしなかったものに較べて約3倍に増加した。コロニーとして分離できなかった菌（寒天培地上で増殖できなかった菌）も含めた全菌数では約7倍の増加がみられた。

細かく処理時間を区切って行ったところ、処理時間が5分以内でも処理時間に比例した分離生菌数の増加は見られなかった。土壤の種類によって若干異なるが、処理時間5秒から10秒、30秒から1分、2分から5分の3点で他の処理時間よりも生菌数の高い分離率が見られた。それぞれのピークにおける分離生菌数はほぼ同数であった。これは試験に用いた5種の土壤すべてに観察された。菌体を染色して直接顕微鏡下で菌数を数え、コロニーとして分離されなかった菌も含めた全菌数も生菌数と同様に、どの土壤でも処理時間に比例した直線的な増加は示さず、処理時間が1分を越えると一旦は土壤粒子から遊離された菌が超音波によって物理的な破壊をうけることが示唆された。

それぞれのピークに存在する微生物の種類を形態学的に調べると最初のピークには糸状菌がほとんど見られなかったことを除けば、それぞれのピークに存在する糸状菌、酵母、細菌の種類割合はほぼ同じであった。特にグラム陰性桿菌について同定を行った結果、それぞれのピークに存在する細菌の種類はすべて異なっていた。以上の結果は超音波処理によって土壤粒子に強く結合している菌が遊離され、菌の数が種、数共に増えていることを示している。したがってpH調整や緩衝液の使用を含めて適当な条件下で超音波処理を行えば従来の方法では分離できなかった菌の分離が可能になるかもしれない。

緒 論

この地球上にどれくらいの種類の微生物が存在するのか確かなことは不明であるが、現在

1. Department of Biotechnological Science, Kinki University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Nara Institute of Science and Technology

我々が手にしている微生物の種類はそれらのうちのわずかに10%前後であると言われている。従って多めに見ても我々は全微生物の5分の1以下の種類の微生物にしか遭遇していないことになる。

酒や発酵食品から始まって抗生物質や各種の有機酸、酵素、ビタミンなど我々は微生物から計り知れない恩恵をうけてきた¹⁻²⁾。しかしさらに多くの種類の微生物が存在するとすれば、ましてそれらが未知の微生物であれば、それらの中には我々の想像を越える機能を持つものが存在していてもおかしくはない。現在に至るまで多くの微生物の探索が行われ、多種多様な機能を持つ微生物が見つけれられている³⁻⁴⁾。微生物のソースとしては土壌が圧倒的に多く、世界各地から無数の土壌が集められて微生物の分離がおこなわれてきた。より多くの微生物を探すためには広範囲にソースを集めることも重要であるが、さらに特異な機能を追求しようとするならばソースの拡大だけではなく、分離法、培養法のさらなる検討が必要である。土壌からすべての微生物を分離できない理由はそれらの微生物の培養の困難さ、不安定さ、微生物同士の牽制、土壌粒子との強い親和性など色々あるが、ここでは土壌粒子と微生物の親和性を弱め、より多くの微生物を土壌から遊離させることを試みた。

一般に微生物を土壌から分離するには、土壌を先ず滅菌水などで懸濁し、激しく攪拌することによって土壌粒子中の微生物を遊離させる方法が採られる⁵⁾。しかし土壌中の微生物をできるだけ多く遊離させるためにはこれだけでは不十分である。

微生物を破碎して細胞質成分を分離、精製する際に超音波処理がよく行われる。しかしかなり強烈に処理しても破碎される微生物は必ずしも多くはないことはよく経験される。慎重に行えば超音波処理で必ずしもすべての微生物が損傷を受けるわけではない。そこで我々は土壌の蒸留水懸濁液を超音波処理しても単なる攪拌だけでは土壌粒子から遊離してこない土壌粒子と親和性の強い微生物を分離させる方法について検討を行った。

土壌を超音波処理して微生物を効率よく分離させる試みは服部⁶⁻⁷⁾や Ramsay⁸⁾ による報告があり、一定時間の処理によってかなりの数の微生物が分離されているが、我々はさらに処理時間の詳細な検討を試みると共に、処理時間と分離される微生物の種類についても簡単な検討を試みた。

材料と方法

1. 供試土壌

本実験に用いた土壌はすべて本学近辺の畑から採取した。土壌の採取は降雨の直後はさけ、

日当たりの良い場所を選んだ。採取した土壌は速やかに紙の上に広げ砂利、枯れ草などを除いた後、直射日光をさけて一夜乾燥させた。乾燥した土壌は乳鉢で細粉し、ふるいにかけてものを瓶に入れて4℃に保存し、当日もしくは翌日に速やかに使用した。

2. 超音波処理

土壌2.5 gを50mlの滅菌水で懸濁し、超音波処理を行った。発熱による損傷を避けるために試料は常に氷水中につけた状態で処理した。超音波発信機はエスエムテー社のGSD-300を用い、Vレベル4.0で処理した。処理時間が長く検体が加熱される場合は途中で処理を休み、試料の冷却を待って処理を再開した。処理された土壌懸濁液はさらにボルテックスで3分間振とうさせ、その上澄み液を菌数算定用の検体とした。ボルテックスで3分間振とうさせただけのものを無処理とした。

3. 生菌数の算定

生菌数を算定するための培地はnutrient broth (DIFCO) を10倍希釈したものに寒天(バクトアガー、DIFCO) を1%加えた寒天培地($\times 1/10$ NA)を用いた(希釈平板法)⁹⁾。超音波処理を行った土壌懸濁液を適当な濃度まで希釈してその10 μ lを培地上に塗布して30℃で3-4日間培養し、出現するコロニー数より生菌数を算定した。処理検体あたりディッシュは5枚用い、その平均値をコロニー数とした。培養日数と共にコロニー数は増加するが4日以上たつと糸状菌が培地表面を覆うようになるので3-4日目に算定を行った。

4. 全菌数の算定

全菌数の算定は染谷の測定法を採用した¹⁰⁾。菌体をエチジウムブロミド(EB、ナカライ)で蛍光染色した後、落射蛍光顕微鏡(BH2-REC、オリンパスで蛍光染色された細胞数をカウントした。超音波処理した土壌懸濁液を滅菌水で50倍に希釈した。この1 mlを0.1M 燐酸緩衝液(pH7.2)で200 μ g/mlになるように調製したEB液の1 mlと混合して3分間室温に放置した。混合液をメンブレインフィルター(pore size 0.2 μ m、diameter 25mm)で濾過し、数mlの燐酸緩衝液で洗った。フィルターをスライドグラスにのせ検鏡($\times 1,000$)した。励起フィルターはブルーフィルターを用いた。それぞれ10個の任意の区画の細胞数を数え、その平均値を細胞数とした。

5. 顕微鏡によるコロニーの観察

それぞれの時間処理された土壌懸濁液を希釈してその5 μ lをそれぞれ5枚の寒天培地に塗布し、30℃で培養した。生じたコロニーを検鏡して大きさ、形態、色、光沢等が異なるコロニーを選別し、分離培養した。培養された菌はさらに糸状菌(放線菌を含む)、酵母、細

菌にその形態、大きさなどから分類した。細菌についてはグラム染色を行い、グラム陽性、陰性、球菌、桿菌の別を調べた。特にグラム陰性桿菌については細菌同定キット（IDテスト、日水製薬）を用いて簡易同定を行った。

結果および討論

1. 超音波処理による分離菌（生菌）の増減

数分毎に処理を中断し、試料の発熱を抑えながら最長30分間超音波処理をし、分離生菌数の増減を調べた（Fig. 1）。処理時間が3分前後までは処理時間が長くなれば分離される生菌数も増加する傾向にあるが、それ以上になると分離生菌数は低下した。少なくとも5分間程度の処理では分離菌数は処理時間と共に右肩上がりに増加することを予想したが、3分間を限度として分離される生菌数よりも超音波処理によってダメージを受ける菌の方が多くなることが示された。超音波で3分間処理した土壌からは無処理土壌に較べて約3倍の分離生菌数が得られた。処理時間が10分をすぎると分離生菌数は減少し、20分以後は無処理と差が無くなった⁷⁾。

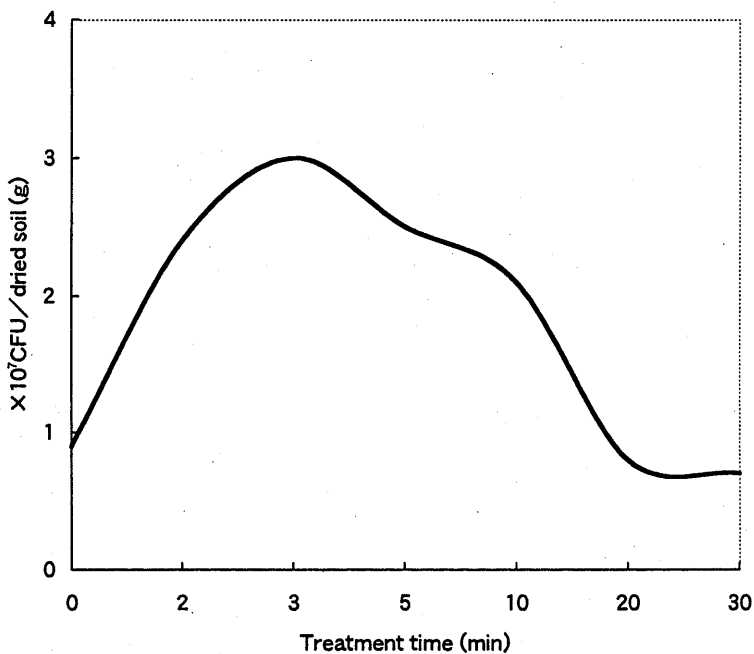


Figure 1 The change of viable cell number of isolated microorganisms during the long time ultrasonic treatment

以上の結果から処理時間を10分間に限定し、特に最初の60秒間を小刻みに超音波処理して分離生菌数を調べた (Fig. 2)。図に示したように3種類の土壌 (A, B, C) で同様のパターンが得られた。土壌によって多少ずれが見られるが、処理時間が5秒から10秒 (ピーク 1)、続いて30秒から60秒 (ピーク 2)、そして2分から5分処理 (ピーク 3) の3点で分離生菌数のピークが観察された。このほかにも2種類の土壌で行ったが、超音波発信チップと処理液面との接触距離の微妙な違いなどによってピークの位置に若干のずれが見られるものの同様のパターンが得られたので、土壌の質が違う場合は別にして⁸⁾ 少なくとも畑の土壌一般にこのようなパターンが得られるものと考えられる。無処理に較べて処理土壌からはそれぞれのピークで2ないし3倍の分離生菌数が得られた。後で示すように、それぞれのピークに存在している菌の種類は異なるものが多いことから、超音波処理して得られる総分離生菌数は単に分離される菌の絶対数が増加するだけではなく、通常の攪拌による方法だけでは分離されにくい種類の菌の数をも含めている可能性がある。分離生菌数のピークが見られるのは5分間処理までで、それ以上処理時間が長くなると分離生菌数の減少が見られるのみであった。

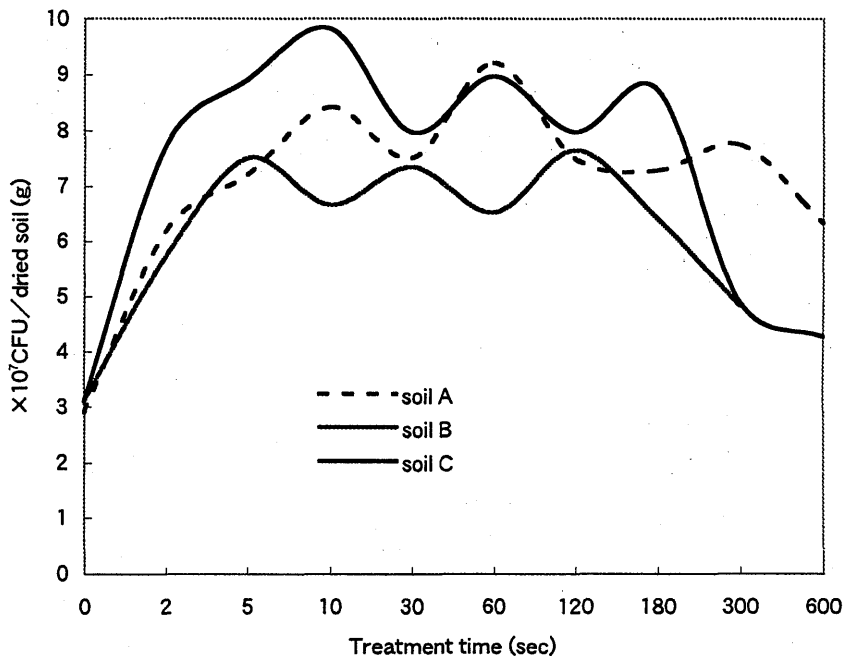


Figure 2 The increase and decrease of the viable cell number of microorganisms isolated from soils by short time ultrasonic treatment

これは超音波処理によって一旦は土壌粒子から遊離された菌がさらに処理を受けることによって死滅するためと考えられる。図に示した処理時間は等間隔ではないので、等間隔に細かく処理を行えばもっと多くのピークが得られる可能性はあるかもしれない。しかしFig. 1で示したように超音波処理による効果はほとんどが2-3分間以内に集中しているので、多少処理時間をつめてみても大きな変化はないと思われる。

このパターンは春から初秋にかけて採取した土壌では再現性はきわめて高いが、同じ場所でも冬場に採取した土壌では再現性が低い傾向がある。その理由は不明であるが、おそらく季節によって同じ場所でも微生物の種類、数にかなりの変化があることがその要因であろう。

2. 超音波処理で遊離する全菌数

菌の生死を問わず、土壌粒子から遊離されるすべての菌数（全菌数）を顕微鏡下で調べた（Fig 3 A）。生菌数と違い全菌数は処理時間に比例して増加すると考えられたが、図に示すように処理時間が60秒までは全菌数の増加が見られたが、それ以上になると全菌数の増加が見られなくなった。60秒処理の土壌からは無処理土壌にくらべて約7倍の菌数を得られた。

同じ処理土壌で同時に分離生菌数の変動も調べてみた（Fig. 3 B）。全菌数では二つのピーク、生菌数では3つのピークが得られたが、それぞれのピーク的位置はすべて異なっていた。これは別に同様の検討を行った他の2種の土壌でも同じ結果であった。分離生菌数のピークと全菌数のピークが異なるのは超音波処理に対する感受性の異なる菌が多数存在するためと思われるが、詳細は不明である。分離生菌数と全菌数それぞれにおける最も分離率の高いピークに存在する菌数を較べると、超音波処理を1分間行った時の全菌数 6.7×10^8 / gに対して、処理時間2分の分離生菌数は 2.6×10^7 CFU / gで、全菌数は生菌数の約25倍であった。また処理時間1分間での分離生菌数は 1.8×10^7 CFU / gで生菌数は全菌数のわずか3%弱にすぎない。

全菌数の正確な測定は困難で、菌体以外の混入粒子をも数えてしまう可能性と本研究で用いた希釈平板法の培地ではコロニーを作らない菌が多いことを考慮に入れても、1分間の超音波処理でかなりの菌が細胞の破碎には至らないが、コロニーを形成する能力を喪失することを示している。

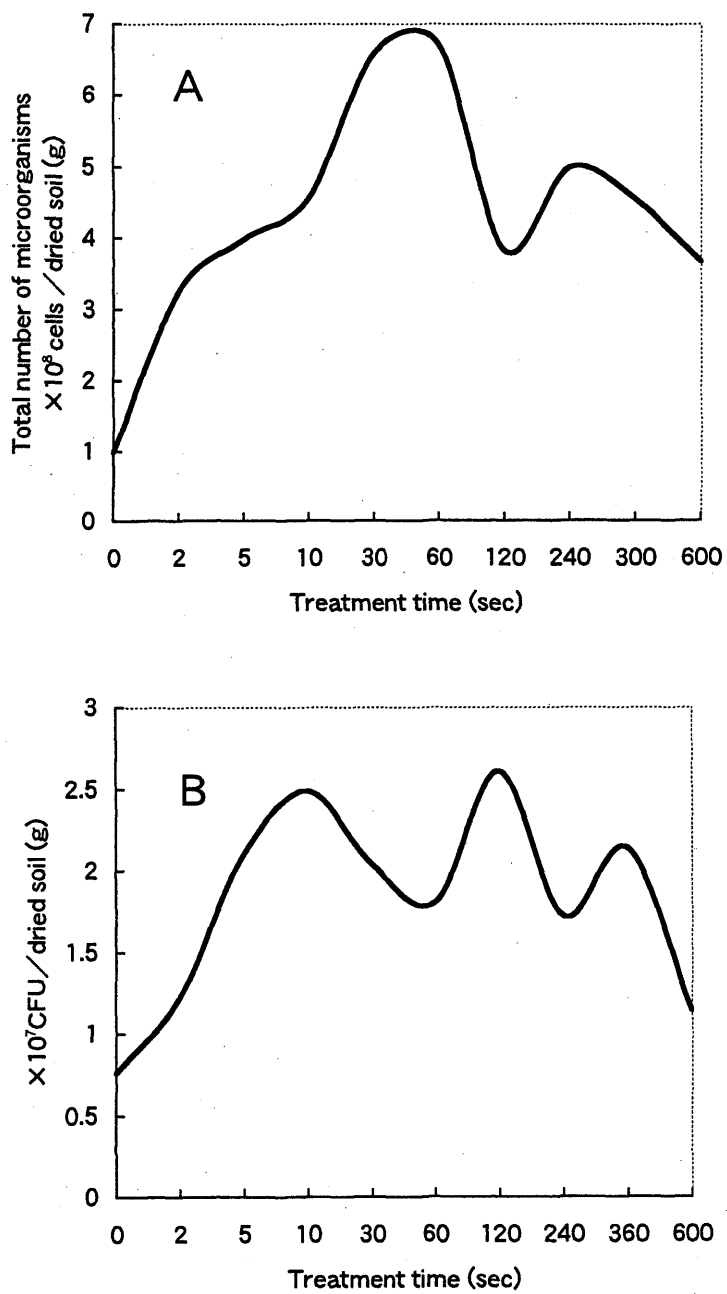


Figure 3 A comparison between total cell number (A) and viable cell number (B) of microorganisms isolated from soil by ultrasonication

3. 分離生菌数のピークに存在する菌の種類

Fig. 2 で見られる 3 つのピークは超音波処理を 10 分間続ける間に土壌粒子から遊離される菌群が少なくとも 3 グループあることを示している。最初に遊離され、分離される菌は土壌粒子との結合が比較的ゆるやかなものであり、以下結合の強さに比例して遊離が遅れることになると考えられる。従って超音波処理を行うことによって異なる種類の菌を分別して得られると共に、土壌粒子との親和性が高く通常の方法では分離し難い菌をも分離することが可能になると考えられる。先に見たように超音波処理によって死滅する菌が多いことから、出力を下げて処理を行えばもっと良い結果が得られるかもしれない。

Table 1 The kinds of microorganisms isolated at different peaks

Microorganisms	peak 1	peak 2	peak 3
Mold and Actinomycetes	1	4	5
Yeast	1	2	1
Bacteria	4	6	8

得られた 3 つのピークから分離された菌群をそれぞれ放線菌を含む糸状菌、酵母、放線菌以外の細菌に分けてみた (Tab. 1)。5 秒間処理のピーク (ピーク 1) からの糸状菌の分離が少ないのはその形態からみてうなずける。それ以外では処理時間と菌の種類分布にはほとんど変化が認められなかった。土壌の種類や採取時期によって多少の変動はあり得るが、超音波の処理条件を変えるだけで特定の微生物種を選択的に分離するのは困難と思われる。また、この結果は土壌処理液のごく一部についてのみ調べたもので、さらに主に形態観察のみによるプリミティブな分類を行っただけである。それゆえ、必ずしも実体を反映しているわけではないがそれぞれのピークの相対的な比較を知る参考になると考える。

次にそれぞれのピークから分離された細菌についてグラム染色を行いそれぞれの形態を比較した (Tab. 2)。それぞれのピークにおける細菌はグラム染色の態度や形態観察からすべて異なる細菌であると判定された。その内のグラム陰性桿菌についてキットによる簡易同定を行いそれぞれのピークに存在するグラム陰性桿菌の差異を調べたところ各ピークに共通の細菌はみられなかった (Tab. 2)。

Table 2 The morphological variation of bacteria and identification of gram-negative bacteria isolated at three different peaks.

bacteria	peak 1	peak 2	peak 3
gram-positive cocci	0	1	1
gram-positive bacilli	2	3	3
gram-negative cocci	0	1	0
gram-negative bacilli	2	1	4

peak 1 *Pseudomonas diminuta*
Xanthomonas maltophilia

peak 2 *Serratia liquefaciens*

peak 3 *Pseudomonas alcaligenes*
Agrobacterium radiobacter
 2 strains could not be identified

今回、1種の土壌で試みた限りでは、土壌懸濁液を超音波処理した場合、分離される菌数が増加するだけでなく、処理時間によって分離される菌の種類が異なる結果が得られた。特に一定の時間までは処理時間を長くするほど多くの種類の細菌が得られると共に、同定困難な細菌が現れる傾向があることが分かった。また、短時間の超音波処理でも細胞の破碎はないがコロニーの形成を困難にさせる傾向があるので、出力や処理時間を調整することによってできるだけ菌に対する影響を避けて実施すれば従来の方法では分離されなかった菌を分離することが可能になると期待される。

文 献

- (1) 村尾澤夫、荒井基夫 (1995) 応用微生物学、2版、110~282、培風館、東京
- (2) Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation J. General. Appl. Microbiol., 3, 193-205
- (3) Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, bacteria and Eucarya, 87, 4576-4579

- (4) 五十嵐泰夫、児玉徹 (1989) 生物炭酸固定とその利用、微生物、6、525~534、
- (5) 微生物研究法懇談会編 (1975) 微生物学実験法、初版、50~69、講談社サイエンティフィック、東京
- (6) 服部勉 (1966) 土壤中のグラム陰性細菌群の変動性、土肥誌、37、298~301
- (7) 服部勉 (1966) 土壤団粒中の細菌群の分布と変動、土肥誌、37、302~304
- (8) Ramsay, A. (1987) Extraction of bacteria from soil: Efficiency D of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography, Soil Biol. Biochem., 16, 475-481
- (9) Gray T. R. G. (1968) The Ecology of Soil Bacteria, 158-170, Liverpool Univ. Press, Liverpool
- (10) Someya, T. (1995) Three-dimensional observation of soil bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope, Soil Microorganisms, 46, 61-69

Summary

Yoshifumi Tada, Yoshitoshi Ogura

Ultrasonication was used to isolate microorganisms from soils more efficiently. The cell number of viable microorganisms isolated from soil increased with the length of ultrasonic treatment time within 3 minutes but it decreased when the treatment time exceeded 10 minutes. The viable cell number isolated from soil with three minutes' treatment increased three times more than by the ordinary method. Detailed studies showed that the continuous increase of isolated viable cell number was not found in proportion to treatment time even within three minutes and the maximum number of viable cells was found at three different points, 5 to 10 seconds, 30 to 60 seconds and 2 to 5 minutes of treatment. The same results were found in five different soils respectively. The total cell number that was detected under microscope also did not increase in proportion to the treatment time after the treatment time exceeded 60 seconds. These results indicated that the viable cells isolated from the soil once were fatally damaged by too much ultrasonication. Bacteria, yeast and mold were found after each treatment period. Less mold was discovered in the first treatment of 5 to 10 seconds. Identification of the bacteria at the three points showed that there were different kinds of bacteria respectively. The longer the soil was treated by ultrasonication, the more kinds of bacteria were isolated. These results suggest that new kinds of microorganisms can be isolated from soil by using ultrasonication in appropriate conditions.

Key word: soil, ultrasonication, isolation of microorganisms