土壌微生物と植物生育

松清　統

要旨

まず、研究のきっかけとして土壌中の菌について興味を持ち、根粒菌についての研究を始めることとなった。根粒菌を YMA 寒天培地で培養をした時、種類が違うと考えられる 4 つのコロニーが見られた。この 4 つの菌のうちどれが根粒菌なのか判別するためそれぞれを単離して観察することにした。それぞれの菌を単離し、火炎固定し、顕微鏡で観察したところ根粒菌と思われる菌が見られた。

キーワード：根粒菌、培養、桿菌

Ⅰ. はじめに

私は土壌中の菌について興味を持ち、根粒菌の培養についての研究を始めた。

II. 手法 I

根粒菌（*Rhizobium leguminosarum*）を培養する際に外部から雑菌などが混入しないよう無菌環境で行うため、クリーンベンチで培養行う。培養するための培地は YMA 培地、YM 培地を用いた。YMA 培地の成分は酵母エキス 1.0g/L、マンニトール 10.0g/L、リン酸水素二カリウム 0.5g/L、硫酸マグネシウム 0.2g/L、塩化ナトリウム 0.1g/L 炭酸カルシウム 1.0g/L、寒天 15.0g/L で行う。（Vincent,1970）YM 培地は YMA 培地から寒天を除いて作成した液体培地である。まず、ガラスアンプルに入った根粒菌（*Rhizobium leguminosarum*）をしっかりエタノールで滅菌したあと、アンプルにやすりで傷をつけ、滅菌したガーゼで包み、アンプルを開封する。乾燥した根粒菌が入ったガラスアンプルに復元液（YM 培地）を加え、10 分ほど、静置した。懸濁液を数滴ほど 3 つの YMA 培地に加え、コンラージ棒で塗り広げる。インキュベーターに入れ、培養を開始する。

III. 結果 I

培養を開始してから 5 日目に 1 枚目を回収した。6 日目に 2 枚目を回収した。7 日目に 3 枚目を回収した。3 枚の培地には形状の異なる 4 つのコロニーが見られた。それぞれを A,B,C,D とした。A は 7 日目に回収した培地生えていたもので、円形の直径 5mm ほどの大きさの白いコロニーだ。B は 5 日目に回収した培地に生えていたもので、培地の 4 分の 1 ほどの大きさで生えていて、半透明で白いコロニーだ。C は 6 日目に回収した培地に生えていたもので縦長の白く 7cm ほど長さのコロニーだった。D は 7 日目に回収した培地に生えていたコロニーで培地の半分ほどの範囲に生えていた半透明で白いコロニーだ。

IV. 考察 I

4 つのコロニーが生えていたのはコンタミネーションが起こったと考えられる。4 つのコロニーのうちどれが根粒菌かどうかは判断できない。

V.手法 II

4 つのコロニーを単離するため、A,B,C,D のコロニーをループでとり、YMA 培地に塗り広げる。これらを A1,B1,C1,D1 とする。また、A,B,C,D のコロニーをとり、YM 培地に懸濁し、その菌液を YMA 培地にとり、コンラージ棒で塗抹する。これらを A2,B2,C2,D2 とする。インキュベーターで 1 日培養する。　培養して生えたコロニーをとり、スライドガラスに水を垂らしコロニーと混ぜ合わせる。その後、自然乾燥させ、バーナーの炎で塗抹面を上

にして炎に 3 回程度通過させる。スライドガラスが冷えたらサフラニンで染色し、サフラニンが乾いたら上から直接水で洗い流すと、表面が剥がれてしまうので、裏に水を流し水を渡らせて洗い流す。乾燥したら顕微鏡で観察する。

VI.結果 II

インキュベーターから出すと 8 つの培地全てが白く半透明コロニーを培地全体に生やしていた。特に B1,B2 は他の YMA 培地よりも濃くコロニーができていた。火炎固定した A1 から D2 の菌は下の図のようになっていた。

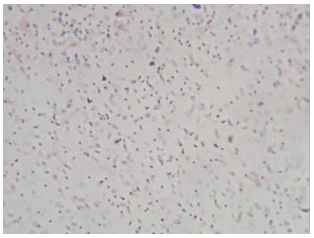


図 1-A1

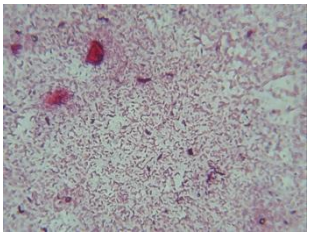


図 2-A2

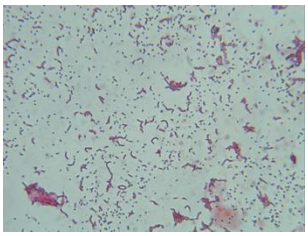


図 3-B1

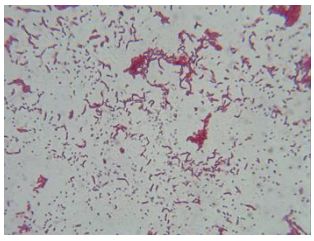
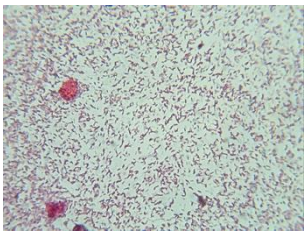
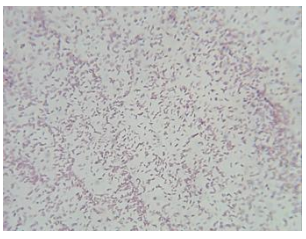


図 4-B2





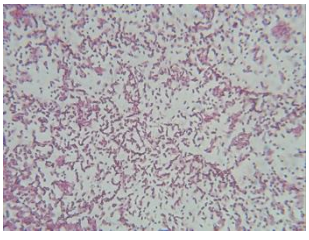


図 5-C1

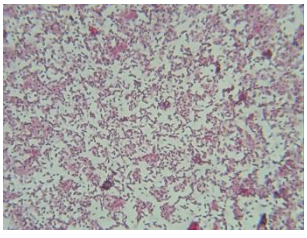


図 6-C2

図 7-D1

図 8-D2

VII. 考察 II

A は棒状で、縦と横の長さはほぼ変わらない。B は棒状で、とても縦長の菌。C はやや短めの棒状の菌。D は球菌。Riangetal（2018）より根粒菌（*Rhizobium leguminosarum*）はやや棒状の桿菌なので C が根粒菌（*Rhizobium leguminosarum*）ではないかと考えられる。

VIII. 結論

今後の展望として、観察する菌の大きさが分かればより正確に菌の考察ができると考えた。

謝辞

アドバイスや研究の協力をしてくださった担当教員の樋口先生、庵原先生、牧田先生に感謝申し上げます。

文　献

Liangetal.(2018)https://edoc.ub.uni-muenchen.de/27218/7/Liang_Juan.pdf?utm_source=chatgpt.com

Vincent(1970)https://studylib.net/doc/27174691/working-with-rhizobia?utm_source=chatgpt.com