

アッケシソウ根圏に生息する植物生育促進細菌の同定

広島大学大学院生物圏科学研究科

上田 晃弘

【研究の背景】

人間の健康状態は体内や体表に生息する細菌群の影響を受ける。例えば、腸内細菌や口腔内細菌はそれぞれ腸の活動や虫歯の発生などに関わっているが、そこに生息している細菌種を解析することは宿主生物への影響を把握するうえで重要である。植物の根にも多くの細菌種が生息しているが、その細菌が植物に与える影響は不明な部分が多い。

アッケシソウは高等植物では極めて高い耐塩性を有しており、植物の耐塩性機構の解明のための研究材料として非常に有用であるが、その植生の減少から絶滅が危惧されている。本研究では、野生環境に自生するアッケシソウの生態系理解やその保護を目的として、アッケシソウの根の表面および内部に生息する細菌を単離し、これらの細菌群が持つ植物生育促進効果について調査を行った。

細菌が持つ植物生育促進効果の仕組みにはいくつかあるが、本研究ではそのうち、(1) 土壤に蓄積された無機能難溶性リン（リン酸カルシウム）の可溶化能、(2) 土壤に蓄積された難溶性鉄を可溶化するシデロフォアの生産能、(3) 植物ホルモンの一種であるオーキシン生産能、(4) 植物根圏や土壤粒子表面での細菌の定着能に関わるバイオフィーム、の4種類について調べた。

なお、リンや鉄は植物の生育に必須な元素であるが、土壤中では植物にとって利用することが容易ではない形態（難溶性）で蓄積されることが多く、多くの植物にとってこれらの元素の欠乏症がしばしば起こっている。また、オーキシンは植物の生長促進機能を待つホルモンであり、細菌によるこれら物質の供給は植物の生育に寄与すると考えられている。バイオフィームとは細菌が物質表面に定着する時に形成する膜であり、細菌が生産・放出する粘性多糖類に細菌自身が取り込まれた複合体である。

【材料および方法】

1. 材料

本研究では、平成28年9月2～6日まで別寒辺牛湿原に滞在し、アッケシソウ群生の有無の調査を行うとともに、そこに自生するアッケシソウ10個体の採取を行った。アッケシソウ10個体の根を滅菌水中で激しく数回洗浄し、付着している土壌を取り除いた。その後、アッケシソウの根を滅菌した乳棒と乳鉢を使って滅菌水中ですりつぶし

た。すりつぶした根抽出液の上清を LB 寒天培地 (10g/L Tryptone, 5g/L Yeast extract, 10g/L NaCl, 15g/L Agar) に塗布し、28°Cで 48 時間静置培養を行った後、コロニーを形成した 625 種類の細菌を単離した。単離した細菌は終濃度 15%(v/v) Glycerol を添加して、超低温冷凍庫内で保存した。

単離された細菌 625 種はそれぞれ LB 液体培地 (10g/L Tryptone, 5g/L Yeast extract, 10g/L NaCl) で振盪培養器内で 28°Cで 24 時間、125 rpm の条件で培養を行った。その培養液の一部を使用して、以下の活性を測定した。

2. リン酸カルシウム可溶化能

難溶性リン酸カルシウム可溶化能の有無は以下の通りに検定を行った。LB 液体培地で 24 時間振盪培養を行った細菌培養液 5 μ L を NBRIP 培地 (5g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 5g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g/L KCl, 0.1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10g/L Glucose, 15g/L Agar) に塗布した。NBRIP 培地は 120°C、20 分間、オートクレーブ器で高圧滅菌を行った。恒温培養器内で 28°C、3 ~ 5 日開静置培養を行った。NBRIP 培地は難溶性リン酸カルシウムのため、白濁した培地となるが、リン酸カルシウム可溶化能を持つ細菌コロニー周辺ではリン酸カルシウムの可溶化により培地が透明化される。コロニー周辺に透明化ゾーンが形成されるかどうかでリン酸カルシウム可溶化能の有無を判断した。

3. シデロフォア生産能

シデロフォア生産能の有無は以下の通りに検定を行った。LB 液体培地で 24 時間振盪培養を行った細菌培養液 5 μ L を CAS 培地に塗布した。CAS 培地は 760mL 蒸留水に 100mL 改変 M9 最小培地塩 (6g/L Na_2HPO_4 , 3g KH_2PO_4 , 1g NH_4Cl , 5g NaCl, 30g PIPES, 8mL 50%(w/w) NaOH)、10mL 20% Glucose、30mL 10% Casamino acids, 60mL CAS 溶液 (60.5mg Chrome azunol S in 10mL of 1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10mM HCl)、40mL 1.8%(w/v) Hexadecyltrimethyl ammonium) に 15g/L Agar を加えて作成した。各培地成分は 120°C、20 分間、オートクレーブ器で高圧滅菌を行った。恒温培養器内で 28°C、1 ~ 2 日開静置培養を行った。CAS 培地は青色の固形培地であるが、細菌がシデロフォアを生産して培地から Fe を遊離させた際には培地が赤色へと変化する。コロニー周辺に赤色ゾーンが形成されるかどうかでシデロフォア生産能の有無を判断した。

4. オーキシン生産能

オーキシン生産能の有無は以下の通りに検定を行った。1 μ g/mL の L-tryptophan を

添加した LB 液体培地で 28°C、125rpm、48 時間振盪培養を行った。その細菌培養液 50μL に 100μL の Salkowsky 溶液 (81.11mg FeCl₃6H₂O in 50mL of 35% HClO₄) を添加し、恒温培養器内で 28°C で 1 時間、静置した。反応後、培養液が赤色に変化したものをオーキシン生産能有り、と判断した。

5. バイオフィルム形成能

バイオフィルム形成能の以下の通りに検定を行った。それぞれの細菌コロニーを 200μL の LB 液体培地を添加した 96 穴プレートに接種し、恒温培養器内で 28°C、24 時間静置培養を行った。その後、96 穴プレート内に付着していない細菌を水道水で 3 回洗浄した後、付着した細菌および形成されたバイオフィルムを 0.1% (v/w) Crystal violet 溶液で 30 分間、室温で染色した。染色後、96 穴プレートを水道水で 3 回洗浄して余分な Crystal violet 溶液を除去した後、95% (v/v) エタノールを添加した。細菌がバイオフィルムを形成してよく付着した場合、Crystal violet による紫色の染色が濃くなるため、染色の濃淡によりバイオフィルム形成能の有無を判断した。

【結果および考察】

トキタイ川河口域を中心に干潮時にアッケシソウ植生分布を調べた。湖面より 1～5 m 程度の泥湿地帯にアッケシソウ群落が数か所見られたが、最大のものでも 10 m² 程度の群落であった。湖面よりもさらに内地の植生はヨシ群落がほとんどを占めており、アッケシソウ植生は湖面からヨシ群落までの間に限られていた。群落を構成するアッケシソウはほとんどが草丈 20cm 以下であったこと、また下位葉が枯死している個体が多かったことから、アッケシソウの生育には好ましくない要因の存在が示唆された。アッケシソウ群落の土壌環境は、pH は弱アルカリ性であったほか、塩分濃度 (EC 植) は 2～3 dS/m と海水の約半分程度であった。

アッケシソウ根圏から単離された 625 種の細菌について、植物の生育促進に関わる特性の評価を行った。その結果、難溶性リンの可溶化能を持つものが 318 種、難溶性鉄の可溶化に関わるシデロフォア生産能を持つものが 155 種、植物ホルモンであるオーキシン生産能を持つものが 263 種、存在することが分かった。これらの細菌のうち、根圏定着能に関与するバイオフィルム形成能を有するものは 290 種あった。バイオフィルム形成能の高さは植物根圏や土壌粒子表面での定着能の高さと考えられている。これら植物生育促進効果を持つ細菌の多くがバイオフィルム形成を行うことで、アッケシソウ根圏やその土壌で定着し、アッケシソウの生育を促進しているのかもしれない。