コロニー形成時間の異なる細菌群集の性質の比較

森 川 和 子*・大 塚 真 理**

東京農工大学一般教育部

〒183 府中市幸町3-5-8

(受付 1991 年 3 月 15 日 — 受理 1991 年 8 月 27 日)

Characteristics of bacterial communities having different colony forming time on agar plates

KAZUKO MORIKAWA and MARI OTSUKA

*Laboratory of Biology, Tokyo University of Agriculture and Technology
3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu, Tokyo 183, Japan*

Summary: Bacterial communities in epilithon on the river bed were examined at the Tamagawa River by a plate count method. Colonies developed on 1/2 PYG agar plates were classified into four groups according to the colony forming time. Incubation periods which were needed for the colony formation were between 0 and 48 hours for group A, 24 and 72 hours for group B, 120 and 168 hours for group C, and 288 and 336 hours for group D. Generic compositions and diversity indexes of the four groups were similar each other. On the other hand, positive reaction against morphological and physiological characterization (specific total activity) of these groups were quite different each other. Group A, which contains the organisms having the fastest colony forming time, had high specific total activity. On the other hand, group D, which is constituted with the bacteria having the slowest colony forming time, had lowest specific total activity. Most bacterial strains of the group A grew rapidly on the 1/2 PYG agar medium, too. However, the group D included organisms which grew both rapidly and slowly on this medium. Based on these results, the colony formation of the bacteria seemed to prescribe largely by the physiological conditions of the cells at the time when cells were placed on the agar plates.

諸 言

自然界に生息している細菌群集の存在状態は、実に多様である。今まさに分裂しようとしているもの、ちょうど分裂が終わった状態にあるもの、休眠状態にあるものなど、又生理活性の高いものもあるし、非常に低いものもある。この様に多様な存在状態にある自然界の細菌群集の動態を解析する1つの手段として、用いる培養基組成や培養温度など検討されるべき問題はあ

るものの、平板培養法は有用な情報を与えてくれる。平

板上に生じたコロニーを経時的に計数することによって、そこに生息している細菌群集を構成している個々の細菌の存在状態の一側面を把握することができる。

自然環境に生息している細菌群集を平板法で計数する場合、平板上のコロニーは同時に肉眼で識別される大きさになるわけではない。服部¹⁾は、経時的に平板上に形成されるコロニーを計数することによって、コロニー形成は一次反応式に従って起こることを明らかにした。これら平板上にコロニーが形成される確率は、平板に置かれた細菌の生理状態によって決まるとしている。清水等²⁾は、コロニー形成の過程を追って細菌群集を分離同定した結果、分離に用いる培養基の組成によってコロニーが出現する時間に差があると報告し

* Corresponding author

** 現住所 徳山曹達株式会社つくば研究所
つくば市和台 40

た。そして、コロニー形成が確率によって決まるとしても、それは培養条件によって左右されるような相対的なものであろうと報告している。

本報では、自然環境に生息している細菌群集を平板法を用いて計数する場合、コロニー形成時間が異なる細菌株間にどのような生理的性質の違いがあるか、またそれは自然界における細菌群集のどのような側面を反映しているかについて明らかにしようとしたものである。多摩川において河床の石面付着層を対象に、平板上に生じたコロニーをその形成時間に基づいて4つのグループにわけて鈎菌し、各グループを構成する細菌株の属構成ならびに生理的な性質について検討した結果を報告する。

材料および方法

石面付着層の採取：1986年4月9日、多摩川の是政橋下流右岸において、水深20 cmの河床の石を静かに取り出し、石の上面の付着層5×5 cm²を採取した。これを河川水200 mlに懸濁して現場の水温と同じ温度で実験室に持ち帰り、120秒間超音波処理(Nihon Seiki 28 kHz)したものを付着層サンプルとした。採取

方法の詳細は前報に述べた⁴⁾。この付着層の付着物乾量は11.82 mg・cm⁻²、クロロフィル量は16.7 μg・cm⁻²であった。また、付着層採取時の水温は16.5°C、pH 8.40、DO 9.46 ppm (129.3%)、DOC 4.93 mgC・l⁻¹であった。

細菌の計数：付着層サンプルを滅菌水道水を用いて10⁻⁴に希釈後、1/2 PYG 平板(ポリペプトン1 g、イーストエキス0.5 g、グルコース0.25 g、寒天15 g、水道水1,000 ml、pH 7.0) 50枚に各0.1 mlを平面塗抹した。これを20°Cで培養後、経時的に生じたコロニー数を計数した。Fig. 1に50枚のうち代表的な1枚の平板からえたコロニー形成曲線を示した。このコロニー形成曲線は2-4成分からなっているとも考えられるが、これを1成分と仮定して、石栗等²⁾によるコロニー形成時間(t)と、コロニー数(N)の関係式 $\ln(N_0 - N) = \ln N_0 - \lambda(t - tr)$ に基づいて最初の7点をもとに計算した λ の値は0.249、 tr は31.2時間であった。なお、本サンプルのアクリジンオレンジ染色による全菌数は、 1.6×10^9 cell・cm⁻²、1/2 PYG 平板による生菌数は 8.8×10^7 cell・cm⁻²であった。

細菌グループの決定：予備実験の結果を考慮して、コロニー形成過程のできる限り多くの部分を代表でき

Fig. 1. Changes in the number of colonies of the river epilithon at the Tamagawa River developed on the 1/2 PYG agar plates. Bars correspond to the periods of picking up the colonies from the agar plates.

るように、培養時間を以下のように決定した。平板培養後、0-48時間に生じたコロニーを計8枚の平板からすべて釣菌して50株を得、これをAグループとした。残りの42枚の平板に培養後24時間目までに生じたコロニーに印をつけて除き、培養後24-72時間に生じたコロニーを計2枚の平板から60株釣菌してBグループとした。同様に120-168時間に生じたコロニーを計4枚の平板から釣菌して51株を得てCグループとし、288-336時間に平板に生じたコロニーを計25枚の平板から釣菌して50株を得てDグループとした。各グループに相当するコロニー形成時間をFig. 1の下に示した。釣菌したコロニーを繰り返し画線培養した結果、Aグループ65、Bグループ61、Cグループ49、Dグループ38の純粋株を継代可能な菌株として得た。

属レベルでの細菌の種類の決定：純粋分離した213菌株についてグラム染色、芽胞染色、コロニーの色・性状、細胞の形態、鞭毛のつきかた、酸素要求性、運動性、オキシダーゼ活性、カタラーゼ活性、OFテスト(グルコース・シュエクロス・ラフィノース・でんぷん・グリセリン)、ゼラチンの液化能、リトマスミルクに対する反応を検査した。これらの検査方法については前報によった⁹⁾。また、カルボキシメチルセルロース(CMC)の分解能については染谷⁹⁾に従って検査した。これらの結果をもとにして、細菌株の属をBergey's Manual of Systematic Bacteriology^{3,8,10,11)}に従って決定した。さらに、これらの属を1つの分類単位としてShannonの多様度指数($\bar{H}$)⁶⁾を計算した。

全活性の計算：分離して諸生理学的性質を検査した各々の菌株について、運動性の有るもの、オキシダーゼ活性・カタラーゼ活性・ゼラチンの液化能・リトマスミルクの反応・CMCの分解能が(+)であるもの、グルコース・シュエクロス・ラフィノース・でんぷん・グリセリンのOFテストでpH変化を示したものを、OFテストにおいて糖をいれていないブランクでアルカリ性を示したものの計12項目について(+)の項目数の合計を各々の細菌株の全活性(Specific total activity)とした。

増殖パターンの決定：純粋分離した菌株をサンプル採取後50日目に1/2 PYG スラントに白金耳を用いて接種し、接種後2, 3, 7, 14日目にスラント面での菌株の増殖状態を観察した。その場合、スラント面に接種した菌株がみえはじめた時期が、2日目のものをパターン1, 3日目のものをパターン2, 7日目をパターン3, 14日目以降をパターン4とした。増殖のみられな

かったものは(-)と表した。

結 果

1. 4グループの細菌群集の属構成

コロニー形成時間の異なる4グループの細菌群集の属レベルでの細菌の種類構成は、Table 1のとおりであった。4つのグループ間の種類構成に顕著な違いはみられず、多様度指数(Shannon $\bar{H}$)も大きな差はなかった。全体として、*Flavobacterium*の値がやや高いほかは優占種は認められなかった。平板から釣菌した当初、各グループのコロニー数はほぼ同数であったが、継代培養して性質を検査することができた菌株数は、AグループからDグループにいくにしたがって減少した。多摩川是政における河床付着層の細菌群集の各属は、コロニー形成時間をもとにすると、出現時期が比較的初期に限られている属(6属)、コロニー形成に1週間以上要する属(3属)があることが明らかになった。しかし、どのグループにも検出された属が4属、出現時期が一定しないものが8属あり、これらが半数以上を占めていた。

2. 各グループの生理学的性質

2-1 高分子化合物の分解能

Fig. 2にゼラチンの液化能、リトマスミルクに対する反応、およびCMCの分解能を示した。ゼラチン液化の形態は様々であったがこれらを合計すると、ゼラチンを液化した細菌株はAグループからDグループにいくにしたがって減少した。しかし、液化がみられなくともゼラチン培地で増殖した菌株は全体の約90%で、この割合はA, B, Cグループでほとんど差がなかった。リトマスミルクに対する反応をみると、ラブ酵素を形成したりpHの変化がみられた菌株は全体として少なく、菌体の増殖が確認された菌株の割合も少なかった。CMCの分解については、分解によるclear zoneを形成したものの割合がCグループにやや多かったが、ゼラチン液化能・リトマスミルクに対する反応と同様、Dグループの細菌株の反応は弱かった。

2-2 OFテスト

5種類の糖に関してOFテストを行った結果をFig. 3に示した。糖類を加えていないブランク実験でpHの変化がみられた菌株の割合は、AグループからDグループにいくにしたがって減少した。この減少の傾向は検査した糖類の全てについて等しく、各グループで

Table 1. Bacterial generic compositions in the epilithon at the Tamagawa River classified into four groups according to the colony forming time on the 1/2 PYG plates.

Bacterial generic composition	Incubation periods (hour)			
	Group A 0-48	Group B 24-72	Group C 120-168	Group D 288-336
<i>Cytophaga</i>	0 (0.0%)	4 (6.6%)	2 (4.1%)	0 (0.0%)
<i>Pseudomonas</i>	2 (3.1)	1 (1.6)	0	0
<i>Pseudomonas</i> (OX-) ^a	1 (1.5)	6 (9.8)	1 (2.0)	0
<i>Xanthomonas</i>	0	1 (1.6)	0	0
<i>Flavobacterium</i>	8(12.3)	11(18.0)	4 (8.2)	5(13.2)
<i>Aeromonas</i>	4 (6.2)	0	0	0
<i>Alcaligenes</i>	2 (3.1)	0	1 (2.0)	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	1 (1.5)	3 (4.9)	1 (2.0)	0
<i>Moraxella</i>	3 (4.6)	1 (1.6)	0	0
<i>Acinetobacter</i>	4 (6.2)	4 (6.6)	4 (8.2)	3 (7.9)
<i>Caulobacter</i>	1 (1.5)	0	1 (2.0)	2 (5.3)
<i>Micrococcus</i>	7(10.8)	1 (1.6)	4 (8.2)	1 (2.6)
<i>Staphylococcus</i>	2 (3.1)	1 (1.6)	0	0
<i>Streptococcus</i>	0	2 (3.3)	1 (2.0)	0
<i>Corynebacterium</i>	3 (4.6)	0	1 (2.0)	1 (2.6)
<i>Arthrobacter</i>	3 (4.6)	0	1 (2.0)	1 (2.6)
<i>Bacillus</i>	3 (4.6)	3 (4.9)	5(10.2)	4(10.5)
<i>Lactobacillus</i>	2 (3.1)	2 (3.3)	3 (6.1)	0
<i>Nocardia</i>	0	0	0	1 (2.6)
<i>Actinomycetales</i>	0	0	2 (4.1)	4(10.5)
Yeast	0	0	6(12.2)	4(10.5)
not identified	16(24.6)	12(19.7)	10(20.4)	7(18.4)
no growth	3 (4.6)	9(14.8)	2 (4.1)	5(13.2)
Total number	65	61	49	38
Shannon's index ($\bar{H}$)	2.523	2.249	2.489	2.129

^a OX-; oxidase activity negative

一定の割合を示していた。しかし、個々の菌株の反応は一樣ではなく OF テストで反応のみられない菌株は、ブランク実験で反応がみられなかった菌株と必ずしも一致していなかった。ブランク実験で pH 変化がみられなかった菌株の割合を除くと、4つのグループにおける好氣的酸化・発酵・アルカリ変化という OF テストの結果はほぼ等しかった。

2-3 全活性

Table 2 にグループ毎にそれぞれの全活性を示した菌株数と、そのグループの全活性の平均値を示した。測定項目全部について活性を示した菌株はなく、最大の値は 11 であった。4 グループの平均値は A グループ

から D グループにいくにしたがって減少し、速くコロニーを生じるグループの活性は高く、遅く生じるグループの活性は低かった。A グループでは 11 項目について (+) の値を示した菌株が 3 株あり、50% 以上が 8 以上の値を示した。B グループでは 11 の値を示した菌株がやはり 3 株あったが、50% の菌株は 6 以上で、C グループでは最高が 9 であり、3 のものが最も多く 11 株 23.4% を占め、D グループでは、60% 以上の菌株が 2 以下の値であった。

3. スラントにおける増殖パターン

サンプル採取後 50 日目にスラントに接種した菌株

Fig. 2. Responses of the four bacterial groups to high molecular compounds. Symbols in gelatin liquefaction, a; stratiform, b; funnel-shape, c; tubular, d; bag-shape, +; cells increased, -; no cell increased. Symbols in litmus milk reaction, r; rabu enzyme formed, b; change to alkali, a; change to acid, +; cells increased, -; no cell increased. Symbols in CMC decomposition, h; halo formed, +; cells increased, -; no cell increased.

が、何日目からスラント面で増殖が観察されたかを示したのが Fig. 4 である。各グループの菌株数が異なるので、グループ毎の全菌株に対する割合で示した。ス

ラント上に白金耳で接種した菌体が肉眼で見えるコロニーを形成するまでの時間は接種量によってバラツキが生じる。しかし、多くの場合、ここで用いた範囲内での大まかなグループわけの結果を左右するほどのものではない。厳密には平板上にコロニーを形成させて観察する必要があるが、この値は肉眼で見えるコロニーを形成する時間、すなわち各菌株の FOR モデルの tr の値を近似的にグループ化したものと考えてよい。個々の細菌株について tr の測定を行わなくても、 tr の値を一定の幅で区切ってグループ分けするのには、この方法で十分であろう。A グループのほとんどの菌株がパターン 1 でサンプル接種後に釣菌した時間と同じ時間にコロニーを形成した。B グループの菌株も、パターン 1 が多かったが、パターン 2 が 18% 含まれていた。C グループはパターン 2 がパターン 1 を上回り、D グループではパターン 3・4 が他のグループより多く含まれていたが、パターン 1 も 50% 近く認められた。

考 察

肉眼で識別できるコロニーを形成するまでの時間が異なる 4 グループの細菌群集を属構成でみた結果、各グループの属構成に大きな違いはなかった。各グループを構成している個々の細菌属には、早くコロニーを形成する属や、遅くコロニーを形成する属があり (Table 1), 属によって一定しているようにも思われた。早くコロニーを形成するのは、*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxella*, *Staphylococcus* といった属で、遅く出現するのは *Nocardia*, *Actinomycetales*, *Yeast*, であった。しかし、属によって出現時間が決まっているものの割合は全体の半数以下で、コロニーを形成する時間が様々である属、また一定しない属が半数以上あり、結果として 4 つのグループを属構成という点でみると差が認められなかったことになる。このことは、属構成の多様性という観点からみるとより明らかなで、4 つのグループの中に優占種となる属を持つものではなく多様度指数の値はほぼ等しい。また、属構成の内容は 4 つのグループで異なるが、グループとしての特徴は認められなかった。

コロニー形成時間の異なる 4 グループの細菌群集の属レベルでの種類構成に特徴的な差異が認められなかったのに対して、高分子化合物の分解能、糖類の発酵性、および全活性は、早くコロニーを形成した A グ

Fig. 3. OF-test reaction on the five carbohydrates of each bacterial group. Symbols were f; fermentation, o; oxidation, a; change to alkali, n; no color change was observed.

Table 2. Distributions of the specific total activity of four groups classified by colony forming time. Values correspond to the number of strains which have each specific total activity and the percentage show the ratio to the total strain number of each group.

Total activity	Group			
	A	B	C	D
11	3 (4.8%)	3 (5.8%)	0	0
10	5 (8.1)	4 (7.7)	0	0
9	15(24.2)	7(13.5)	3 (6.4%)	3 (9.1%)
8	10(16.1)	8(15.4)	2 (4.3)	0
7	4 (6.5)	3 (5.8)	1 (2.1)	2 (6.1)
6	3 (4.8)	3 (5.8)	7(14.9)	2 (6.1)
5	6 (9.7)	2 (3.8)	3 (6.4)	0
4	7(11.3)	9(17.3)	6(12.8)	1 (3.1)
3	2 (3.2)	6(11.5)	11(23.4)	3 (9.1)
2	3 (4.8)	2 (3.8)	6(12.8)	10(30.3)
1	4 (6.5)	4 (7.7)	6(12.8)	10(30.3)
0	0	1 (1.9)	2 (4.3)	2 (6.1)
average	6.24	5.90	4.30	3.62

Fig. 4. Patterns of the colony developing time of each bacterial strain of the four groups inoculated to the 1/2 PYG agar slants. Pattern 1, 2, 3, and 4 correspond to the strains which showed visible colonies at 48, 72, 168, and 336 hours of incubation time, respectively. The values show the percentage of the number of the strains to total bacterial number of each group.

ループの菌株の方が圧倒的に高く、ゆっくりとコロニーを形成した細菌株では低かった。

平板上にコロニーが形成されるまでの時間は、細菌細胞が分裂を開始するまでの待ち時間と、コロニーとして目に見える大きさに増殖するまでの時間を加算したものである。Fig. 2, Fig. 3で明らかなように早くコロニーを形成するグループと、ゆっくりコロニーを形成するグループでは有機物の分解能が大きく異なっており、これは数種類の物質に対する反応が同じであったことから、早くコロニーを形成する菌株とゆっくりコロニーを形成する菌株の差は、細菌細胞のエネルギー源となる物質の分解能が高いかあるいは低いかの差ということになる。本報には詳述しなかったが、このことはスラントに接種した各細菌株の増殖量からも明らかであった。スラントの接種面での菌体量の増え方はAグループからDグループにいくにしたがって

減少し、増殖量が小さい菌株の割合はAグループからDグループにいくにしたがって多くなった。接種量は等しいのに、Aグループでは多くの細菌株で接種したスラント面に多量の菌株が認められたのに対して、Dグループの菌株のスラント面には1つのコロニーが小さく、点在してみえるような増殖しか起こらなかった。また、50日目にスラントに接種した菌株がスラント面で肉眼でみえるようになる時期を比較すると (Fig. 4), Aグループはパターン1が圧倒的に多かったが、Bグループでは遅いものが混じり、C・Dグループにいくにしたがって肉眼でみえるコロニーを形成する時間にばらつきがみられるようになった。増殖のパターンすなわちコロニーを形成し始める時間は、当初コロニーを釣菌した平板上でのコロニーの出現時間と同じく、AグループからDグループにかけて遅いものが増えており、コロニー形成時間が遅い菌株は活性が低いと

同時に、コロニー形成に要する時間、すなわち FOR モデルの1つの係数 tr の値が長いということが明らかになった。このように、A グループの菌株は D グループの菌株より有機物の分解能が高く、かつすばやくコロニーを形成する菌株であった。B グループの菌株のコロニー形成は、釣菌時にはわずか 24 時間の違いであったが、パターン 2 の菌株が 20% 混じり活性もやや低くグループの構成が変わり、C グループではさらにその傾向が強くなった。D グループではパターン 3 が 30% 近く混じっており、グループとしてコロニー形成時間がヘテロな構成であったといえる。

服部¹⁾は自然界の細菌群集によるコロニー形成曲線はいくつかの成分曲線からなり、平板上のコロニー形成現象が母細胞集団の生理的状态に関する情報をも秘めているとしている。清水⁷⁾は、平板上にコロニーをつくるまでの日数は細菌の種類によって比較的一定しており、多くの細菌細胞は栄養濃度が低くなるとコロニーの出現が遅くなるだけでなくコロニーが現れるまでの時間の幅が広がると報告した。そして、細菌群集の中でコロニーをつくる確率というものがあるとしても、それは培養基濃度等、細菌のおかれている環境によって規定されるような相対的なものであろうとした。本報で得られた結果は、多摩川の河床付着層の細菌群集をコロニー形成時間でみると、出現時期が決っているものがある反面、半数以上は出現時間が不定であり、早くコロニーを形成するグループは活性が高いが、遅いグループはヘテロな群集になっており、平板上におけるコロニー形成はその細菌株が持っている遺伝的な性質と、細菌細胞が平板におかれた時点での生理的状态に基づいて決まる事を示唆している。A グループのような活性の高い細菌株はいつも早くコロニーを形成するが、D グループはコロニー形成時間がパターン 1 からパターン 4 まで混じっており、細菌細胞が平板に接種された時の生理的状态に基づいてコロニー形成が行われたのであろう。これらの細菌株を再び混合した後平板に接種し、コロニー形成時間

の違いで分離したならば、A グループの細菌株は A グループとして釣菌されるであろうが、D グループの細菌株は異なるグループで釣菌される可能性がある。今後検討される必要があろう。

なお本研究の一部は、とうきゅう環境浄化財団の助成金によって行われた。ここに報告して感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 服部 勉, “微生物学の基礎” 学会出版センター 1986. pp. 99-115.
- 2) Ishikuri, S., Y. Suwa, and T. Hattori. 1984. Method for mathematical analysis of bacterial count data. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **30**, 249-253.
- 3) Krieg, N.R., and J.G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, 1984.
- 4) 森川和子. 1984. 多摩川上流域における好気性従属栄養細菌数の季節変動とその環境要因との関係について. *陸水学雑誌* **45**: 69-78.
- 5) Morikawa, K. 1987. Characteristics of generic composition of aerobic heterotrophic bacteria in periphyton at an oligotrophic region in the Tamagawa River. *Jpn. J. Limnol.*, **48**: 55-65.
- 6) Shannon, C.E., and W. Weaver. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, 1963, pp. 117.
- 7) 清水 潮, 塚本久美子, 木暮一啓. 1982. 寒天培地平板上での海洋細菌の増殖. *大槌臨海研究センター報告* **8**: 69-76.
- 8) Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
- 9) 染谷 孝, 古坂澄石. 1981. 水田土壌の好気性セルロース分解菌——方法上の諸問題をめぐって——. *土と微生物* **23**: 23-31.
- 10) Staley, J.T., M.P. Bryant, N. Pfennig, and J.G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 3. Williams & Wilkins, Baltimore, 1989.
- 11) Williams, S.T., M.E. Sharpe, and J.G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 4. Williams & Wilkins, Baltimore, 1989.