

I - 2. セルロース合成および分解真菌の探索収集 および特性解明

農業環境技術研究所 環境生物部 微生物特性・分類研究室

大久保 博人

I - 2 Exploration of Cellulose-synthesizing /decomposing Fungi and Their Properties

Hiroto OHKUBO

Laboratory of Microbial Systematics, Division of Microbiology,
National Institute of Agro-Environmental Sciences

Kannondai 3-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

1. 目的

近年、用紙類を始めとする木材を原料に用いる製品の大量消費に伴い、森林破壊が急速に進行しつつあり、これを抑えることは地球環境保護のために極めて重要な課題である。その一つの方策として、セルロース原料を微生物生産物で代替し、木材消費を削減することが考えられる。そこで、セルロース合成能を有する鞭毛菌類を探索収集し、その特性を解明して有効な利用法を検討する。また、リサイクルについても考慮する必要があることからセルロースの分解菌についても探索収集を行う。

2. 実施の概要

セルロース合成能を有する鞭毛菌類は植物基質に富む水圏環境に多く生息するので、森林、河川、湖沼の豊富な北海道を探索収集地域に選び、表1に示す日程に従い、平成3年9月24日から28日の5日間探索収集を行った。探索収集地点は道央部の石狩川支流、北海道大学付属植物園、野幌森林公園、支笏湖、洞爺湖およびウトナイ湖湿原周辺などとし、河川、湖沼、水田あるいは畑地（図1）からリター、淡水、土壤を計55点採集し（表2）、研究室に持ち帰った。採集試料からの目的菌の分離は、予備試験で確立された方法に従って行った。なお、セルロース分解菌を目的として採集した森林土壤からは子囊菌類を主対象として分離した。

3. 収集成果

(1) 方法

1) 鞭毛菌類を高頻度で得るため、リター、淡水、湿潤土壌（水田を含む）（以上は主にミズカビ科菌群が生息）、畑土壌（主にフハイカビ科菌群が生息）を採集した。採集試料の運搬には淡水以外はポリエチレンの袋を用いた。

2) 水圈環境（リター、淡水、湿潤土壌）からの採集試料は、捕捉用基質として滅菌アサ種子を加えた滅菌蒸留水中で15℃に保って集積培養し、アサ種子上でコロニー形成を確認後、これをvan Tieghemリングを埋めた硫酸ストレプトマイシン添加素寒天平板培地上に移し、リングから伸長する菌糸の先端を切取る方法で分離した。なお、淡水の採集は前もって基質を入れた滅菌チューブに採水する方法によった。

また、畑土壌試料は滅菌蒸留水で攪拌後、捕捉用基質として滅菌キュウリ種子を土壌表面に置き、15℃で7日間培養し、次にピマリシン、バンコマイシン、PCNB（ペンタゲン水和剤）の混合溶液を表面に塗布した素寒天平板培地上に、このキュウリ種子を移し、伸長する菌糸の先端を切取る方法で分離した。

セルロース合成能の調査はJensen(1962)の方法に従い、Schleiden反応で判定した。すなわち、菌体をヨウ素ヨウ化カリ溶液中に20分間浸漬後、スライドグラス上に移し、それに65%硫酸を滴下して細胞壁が青～紫色に呈色したものとセルロース合成能陽性とした。

3) 森林土壌の試料は基質として滅菌ろ紙断片を土壌表面に置き23℃で長期間培養後、ろ紙上に高い頻度で形成された子実体の胞子を実体顕微鏡下で釣菌し、硫酸ストレプトマイシン添加素寒天平板培地上で画線塗布により発芽した単胞子を寒天ブロックで切り取る方法で分離した。なお、培養期間中はパラジクロルベンゼンを同封し、小動物による食害を防いだ。

セルロース分解能の調査は染谷(1981)の方法に従い、CMC寒天平板法で検討した。すなわち、無機塩類と炭素源のカルボキシメチルセルロース(CMC)を含む寒天平板培地上で分離株を28℃で数日間培養後、平板上にCMC沈殿剤としてヘキサデシルトリメチル臭化アンモニウムを加え、クリアゾーンを生じたものをセルロース分解能陽性とした。

(2) 結果

1) 水圈環境の試料からは、15採集地点の45点の試料から計191株を得た。鞭毛菌類の分離頻度はリターや湿潤土壌の試料で高く、淡水試料では低かった。畑土壌の試料からは、2地点で採集した10点の試料から計50株を得た。さらに、これらの分離株からミクロマニプレーターを用いて单遊走子、单厚膜胞子または单菌糸分離を行い、純粹分離株を併せて121株得た。セルロース合成能は、純粹分離株から各試料区毎に1株を抽出し、計43株を対象に調査した。対象株の全てがセルロース合成能を示したが、強い発色は水圈環境の試料からの分離株に多くみられた。高い合成能を示した菌株について、落枝試料（支笏湖畔採集）からの菌株を、*Saprolegnia* sp., 水田土壌試料（江別市篠津採集）からの菌株を、*Dictyuchus* sp. と同定した。

2) 森林での6採集地点、19点の試料から計158株を得た。セルロース分解能陽性株のうち、数株を*Chaetomium* sp., *Gliocladium* sp., *Staphylocrichum* sp., *Trichoderma* sp. と同定した。

4. 所 感

今回の探索収集においては所期の目標であるセルロース合成能を持つ菌株を多数得ることができた。今後はセルロースを高収量で回収できる菌株を選抜すると共に、回収システムを開発していく必要がある。また、工業生産への対応も考慮して、製紙関係の専門家との共同研究が望まれる。さらに今回分離された菌群は、長期保存が難しいことが知られているので、保存法の改良も必要である。分離菌株は引続き特性を評価し、同定後ワーキングからベースコレクションに移す予定である。

この探索収集では、北海道農業試験場烟病害研究室長の本間善久技官および種苗管理センター胆振農場の三木信雄技官に事前調整、試料提供、採集地への移動等、多大な御協力を承った。特に今回は東北地方に大きな被害をもたらした台風19号の余波を受け、天候不順の中での採集であった。ここに改めて深謝申し上げる。最後に貴重な探索収集の機会を提供して下さった技術会議事務局、農業生物資源研究所の関係各位に厚く御礼申し上げる。

表1. 探索・収集日程表

年月日（曜日）	行 程	行 動 内 容
1991年 9月24日（月）	筑波 →札幌市	北海道農業試験場烟病害研究室：訪問、打合せ；同農試圃場：採集
9月25日（火）	札幌市 →広島町 →江別市・当別町 →札幌市→千歳市	野幌森林公園：採集 石狩川周辺：採集 北海道大学付属植物園：採集、移動
9月26日（水）	千歳市 →千歳市西部 →洞爺村→苫小牧市	種苗管理センター胆振農場：訪問、打合せ ヒメマスふ化場、支笏湖畔：採集 洞爺湖畔：採集、移動
9月27日（木）	苫小牧市 →登別市 →白老町 →苫小牧市	大湯沼、クッタラ湖畔：採集 白老川河口、ポロト湖畔：採集 ウトナイ湖畔：採集
9月28日（金）	苫小牧市→筑波	

表2 収集点数表

採集地区分	採集地 点 数	試 料 点 数			分離菌株数		
		リター	淡 水	土 壤	リター	淡 水	土 壤
河 川	4	3	4	—	15	5	—
湖 沼	9	21	10	3	100	15	21
水 田	2	—	—	4	—	—	35
烟 地	2	—	—	10	—	—	50
森 林	6	—	—	19	—	—	158
合 計	23	24	14	36	115	20	264

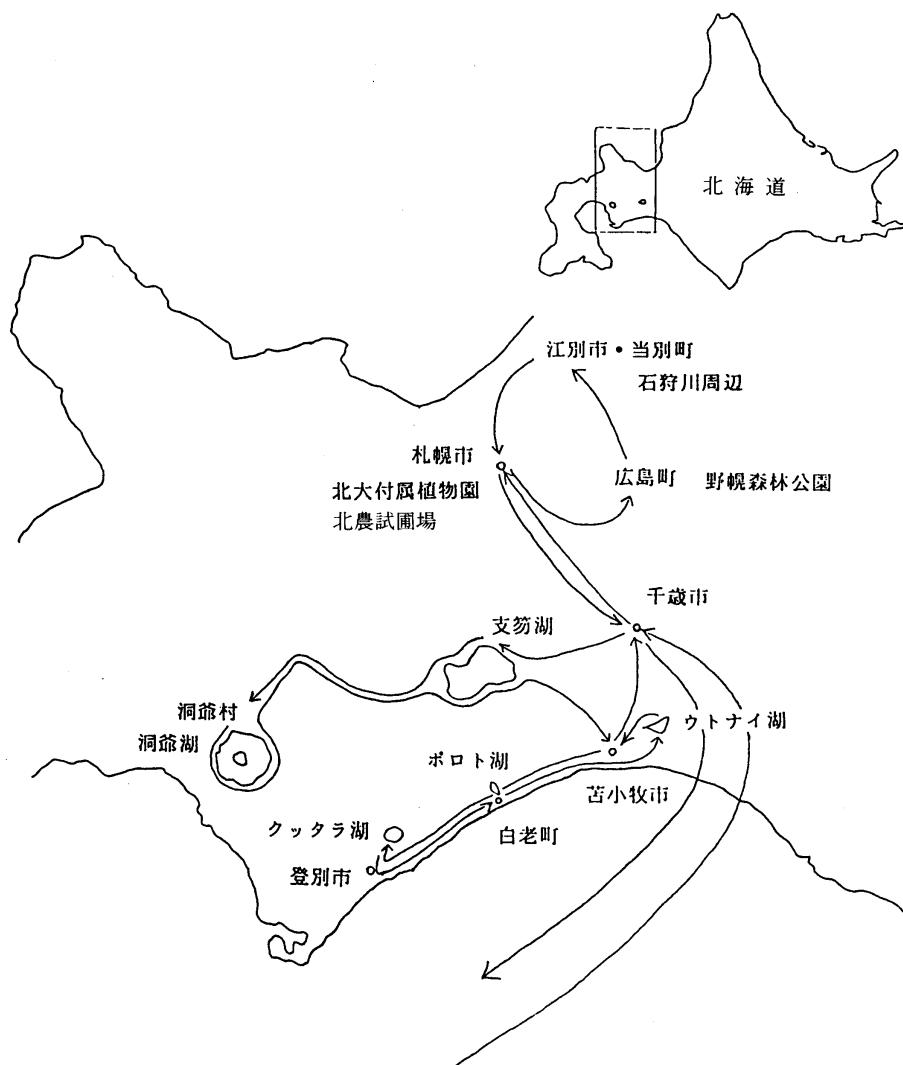


図1. 探索収集の行動図

表3. 国内微生物遺伝資源の現地収集実績（3年度調査分）

微生物群	微生物種類	利用区分	菌株整理番号	対象微生物（属・種名または目的微生物）	分離源	収集年月日	収集場所	特記事項
100	04	40	L 1 - 1	Saprolegniaceous fungus	リター	1991. 9.25	札幌市中央区北大付属植物園	セルロース合成能：中
100	04	40	L 2 - 1	"	"	1991. 9.26	千歳市蘭越千歳川	" : 中
100	04	40	L 3 - 1	"	"	"	千歳市水産庁北海道ヒメマスふ化場	" : 低
100	04	40	L 4 - 1	"	"	"	千歳市支笏湖畔	" : 高
100	04	40	L 5 - 1	"	"	"	"	" : 中
100	04	40	L 6 - 1	Pythiaceous fungus	"	"	"	" : 中
100	04	40	L 7 - 5	<i>Saprolegnia</i> sp.	"	"	"	" : 高
100	04	40	L 8 - 2	Saprolegniaceous fungus	"	"	"	" : 高
100	04	40	L 9 - 1	Pythiaceous fungus	"	"	"	" : 低
100	04	40	L10 - 1	"	"	"	有珠郡洞爺村洞爺湖畔	" : 中
100	04	40	L11 - 1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	L13 - 1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	L14 - 1	Saprolegniaceous fungus	"	"	"	" : 中
100	04	40	L15 - 1	"	"	"	"	" : 中
100	04	40	L16 - 5	Pythiaceous fungus	"	1991. 9.27	登別市クッタラ湖畔	" : 低
100	04	40	L17 - 1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	L18 - 2	Saprolegniaceous fungus	"	"	"	" : 中
100	04	40	L19 - 1	Pythiaceous fungus	"	"	白老郡白老町白老川	" : 中
100	04	40	L20 - 2	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	L21 - 1	Saprolegniaceous fungus	"	"	白老郡白老町ボロト湖畔	" : 中
100	04	40	L22 - 2	"	"	"	"	" : 中
100	04	40	L23 - 1	"	"	"	苫小牧市ウトナイ湖畔	" : 中
100	04	40	L25 - 2	"	"	"	"	" : 中
100	04	40	W 6 - 1	"	淡水	1991. 9.26	千歳市水産庁北海道ヒメマスふ化場	" : 中
100	04	40	W 9 - 1	"	"	"	有珠郡洞爺村洞爺湖畔	" : 中
100	04	40	W13 - 1	Pythiaceous fungus	"	1991. 9.27	白老郡白老町白老川	" : 低
100	04	40	WS 1 - 1	Saprolegniaceous fungus	水田土壤	1991. 9.25	江別市篠津	" : 中
100	04	40	WS 2 - 2	<i>Dictyuchus</i> sp.	"	"	"	" : 高
100	04	40	WS 3 - 1	Saprolegniaceous fungus	"	"	石狩郡当別町	" : 中
100	04	40	WS 4 - 1	Pythiaceous fungus	"	"	"	" : 低

微生物群	微生物種類	利用区分	菌株整理番号	対象微生物（属・種名または目的微生物）	分離源	収集年月日	収集場所	特記事項
100	04	40	WS 5-1	Saprolegniaceous fungus	湿潤土壌	1991. 9.26	千歳市支笏湖畔	セルロース合成能：中
100	04	40	WS 6-5	"	"	"	有珠郡洞爺村洞爺湖畔	" : 中
100	04	40	WS 7-1	"	"	1991. 9.27	苫小牧市ウトナイ湖畔	" : 中
100	04	40	PS 1-1	Pythiaceous fungus	パレイショ畑土壌	1991. 9.24	札幌市豊平区羊ヶ丘北農試圃場	" : 低
100	04	40	PS 2-1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	PS 3-1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	PS 4-1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	PS 5-1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	BS 1-1	"	テンサイ畑土壌	"	"	" : 中
100	04	40	BS 2-1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	BS 3-1	"	"	"	"	" : 中
100	04	40	BS 4-1	"	"	"	"	" : 低
100	04	40	BS 5-1	"	"	"	"	" : 低
100	04	50	FS 3-3	<i>Gliocladium</i> sp.	森林土壌	1991. 9.25	札幌市広島町野幌森林公园	セルロース分解能
100	04	50	FS 5-2	<i>Staphylotrichum</i> sp.	"	"	"	"
100	04	50	FS 9-3	<i>Trichoderma</i> sp.	"	"	"	"
100	04	50	FS 10-3	"	"	"	"	"
100	04	50	FS 14-1	<i>Chaetomium</i> sp.	"	1991. 9.26	千歳市支笏湖畔	"
100	04	50	FS 17-1	"	"	1991. 9.27	登別市クッタラ湖畔	"
100	04	50	FS 19-1	<i>Staphylotrichum</i> sp.	"	1991. 9.28	苫小牧市中野	"