

根粒菌の単離実験

マメ科植物は自身の根に根粒菌を共生させ、根粒菌からの窒素固定産物を受け取り、根粒菌にとっての住処を提供している。根粒菌には大きく分けて、**Rhizobium** 属 (R 属) と呼ばれるグループと **Bradyrhizobium** 属 (B 属) と呼ばれるグループが存在し、前者は酸性物質を産生するため、**BTB** 培地の色が黄色く変化する。後者は塩基性物質を産生するため、同培地を青色に変化させる。コロニーの外見は正円で周縁はなめらかで、中心部が盛り上がった形をしており、やや光沢があるのが特徴である。

実験の目的

マメ科植物に寄生する根粒菌の単離

実験に用いたもの

ダイズ (部室裏で栽培したものを使用。あらかじめ根を水洗した。)

KBM-BTB 寒天培地 (コージンバイオ)

マイクロピペット

マイクロチューブ 100 μ l

95%エタノール (根粒の表面殺菌に用いた)

ピンセット

ライター (火炎滅菌に用いた)

コンラージ棒 (塗布培養に用いた)

自作白金耳 (画線培養に用いた) 注を参照。

滅菌水

ビーカー

無菌箱

注：箸の先に、先をループ状にしたニクロム線を括り付けたものである。

実験方法

部室裏で栽培されていたダイズを実験開始直前に根ごと引き抜いた。

次に、ダイズの根についていた土壌を水道水で洗い流した。

ダイズの根に形成されていた根粒をピンセットでつぶさないように摘み取り、95%エタノールの中に1分間浸し、表面殺菌した。

1分間表面殺菌したのち、根粒をエタノール中から取り出し滅菌水の中に入れエタノールを完全に洗い流した。

根粒を1つずつ100 μ l マイクロチューブの中に入れ、その中に滅菌水5

0 μ l を
適量注入した。そしてマイクロチューブ内で根粒をコンラージ棒の柄で押しつぶした。

得られた根粒菌懸濁液をマイクロピペットで30 μ l とり、BTB 寒天培地上に注ぎ、あらかじめ火炎滅菌しておいたコンラージ棒で培地上に塗布した。

実験結果

塗布培養した培地のうちのいくつかに、周りの色を黄色に変化させたコロニーと青色に変化させたコロニーがそれぞれあった。

考察

コロニーの周りの色が変わったということはその細菌が培地に物質（菌体外多糖）を放出し、培地にふくまれていた BTB と反応した結果だと考えられる。

参考文献

- ・『新編 土壤微生物実験法』 土壤微生物研究会編 養賢堂

次に菌体外多糖を放出したコロニーだけを選び、単離した。

コロニーの単離とダイズへの接種実験

培地上から根粒菌と思われるコロニーを探し、そのコロニーを他の培地に単離、培養し、植物（今回はダイズを用いた）に接種を行った。接種ダイズが接種後に根粒を形成すれば単離したコロニーは根粒菌だったことが示される。（コッホの原則）

実験の目的

根粒菌と思われるコロニーの単離とダイズへの接種

実験に用いたもの

KBM-BTB 寒天培地（コージンバイオ）

マイクロピペット

マイクロチューブ 100 μ l

ライター（火炎滅菌に用いた）

自作白金耳（画線培養に用いた）

滅菌水

バーミキュライト（ダイズを栽培するための用土として用いた）

ダイズ（種子）

実験方法

菌体外多糖を産生し、コロニーの周りの培地の色が変わっていたコロニーを選び、そのコロニーのみを BTB 培地に自作白金耳を用いて画線培養した。

数日間 25℃付近で培養し植菌したコロニーの周りを変色していることを確認した。

培養培地のシャーレに滅菌水を多量に入れ、あらかじめ火炎滅菌しておいた白金耳でコロニーを溶かし、菌懸濁液を作った。

あらかじめダイズをバーミキュライトで種子から発芽させた。今回の実験で用いたダイズ苗は播種から 10 日経ったものを使用した。

ダイズ苗の株元に菌懸濁液を注ぎ、そのまま栽培を続けた。

土壌から植菌して 20 日経過したところで、ダイズ苗をバーミキュライトから静かに引き抜き、根粒形成の有無を調べた。

実験結果

いずれのコロニーの懸濁液もダイズ苗に根粒を形成することはなかった。

考察

根粒が形成されなかった原因は大きく 3 つ考えられる。一つは、分離した菌が根粒菌ではなく、他の菌体外多糖を産生する菌であった可能性である。しかし最初の実験において多くの塗布培養に用いた BTB 培地から同様の性質を持つコロニーが形成されていたのでその可能性は低いと考えられる。もう一つは、根粒菌がうまくダイズの根にたどり着かなかった可能性である。土壌中の細菌の移動速度、移動距離は小さいため、株元に接種した根粒菌の大半がそこから大して移動せずにとどまったと考えられる。もう一つはダイズの生育段階が影響した可能性である。マメ科の植物は根粒菌と共生関係にあるが、根粒の形成数にはダイズのシグナル分子が関わっていることが知られている。根粒菌と共生する際に、根粒菌が空気中の窒素を固定し宿主に窒素固定産物を提供する代わりに、宿主となる植物は根粒菌に光合成産物を与えなくてはならず、播種から 20 日のダイズ苗にはまだ根粒菌を養っていける量の光合成産物を生産することが出来ていなかったため、根粒を形成しなかったと考える。

感想

根粒形成にはダイズの生育段階が関与しているとみて、今後も研究を重ねて行く所存である。