

Title	水系における微生物の生存性に関する研究
Author(s)	九川, 文彦
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35887
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【3】

氏名・(本籍)	く	かわ	み	ひ
学位の種類	丸	川	文	彦
学位記番号	薬	学	博	士
学位授与の日付	第	8146	号	
学位授与の要件	昭和63年3月25日			
	薬学研究科応用薬学専攻			
	学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	水系における微生物の生存性に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教授	近藤	雅臣	
	(副査)			
	教授	岩田平太郎	教授	三浦喜温
			教授	内田 駿

論文内容の要旨

微生物は、生息する環境ごとに一定の個体のまとまり(群)を形成し、その個体群が相互に生存に影響しあうことによって大きな微生物相を形成している。この微生物相が、本来その環境をすみか(niche)としない他の微生物群によって侵攻を受けたとき、侵攻する側の微生物群が先住者である微生物相よりいかなる作用を受けるのかは、微生物生態学における微生物間の相互作用についての重要な課題である。

そこで著者は、上記の微生物個体群間相互作用を研究する一つのモデルとして、遺伝子工学で使われる宿主微生物(枯草菌、大腸菌、*Pseudomonas putida*、パン酵母)の多量外部環境漏出時におけるこれらの生存性に着目し、その検討を行った。次に、その生存性が漏出環境に存在する他の微生物群(生物群)により、いかなる影響を受けるのかについて主として枯草菌を用いて解析を行った。

まず、河川水、海水を用い、各々の試験菌株について両環境水中での生存性を検討した。また環境水は、原水群、フィルター群、オートクレーブ群の3群に分け、その各々の中で生存性を比較検討した。その結果、各環境水原水群においては速度に差はあったが、いずれの試験菌ともに死滅した。中でも枯草菌は、河川水、海水ともに試験開始後3日目において定量限界以下にまで達する著しい生菌数の減少が認められた。同程度の著しい生菌数の減少は、海水中的の大腸菌、*P. putida*にも認められたが、酵母は、4試験菌種中、生存性低下の最もゆるやかな菌株であった。さらに、原水群での生存性低下が3群中最大であったため、環境水中に存在する生物的因子により試験菌株の生存性低下が誘起されることが示された。そこで、4試験菌種の中から枯草菌を用い、生存性に影響を与える因子の検討を行った。

まず最初に、枯草菌の持つアミノ酸栄養要求性マーカーと生存性との間の関係を調べたが、両者の間に顕著な差はみられなかった。そこで、原水群中に存在する生物呈致死因子の検索を試みた。まず、環

境水中の原生動物と細菌とを分離するために、2種類のメンブランフィルターを用いてろ過した環境水、および、環境水原水の3群を用いて、*B. subtilis* N I G 1121 P株の生存性実験を行ったが、原水群と10 μ mフィルターろ過水群の間に生存性の差は認められなかった。したがって、主として環境水原水群中の細菌群により枯草菌の生存性低下がおこることが示された。

次に重層トリプトン平板培地を用いて、枯草菌に対して致死作用を示す細菌の検索を行った。環境水より分離して実験に供した菌株の中に、枯草菌に対して溶菌環の形成を示すものはみつからなかったが、分離菌のコロニーを水洗により取り除いたとき、下層の枯草菌が増殖していない現象を示す菌群が認められ、また、それらの菌群は約20%の割合で環境水中に存在していることがわかった。そこで、擬似河川水として人工栄養水培地を作成し、枯草菌とこれらの菌群の混合培養を行ったが、枯草菌の生存性がコントロールのそれと比べていずれも低下していた。また、分離培養器を用いた培養実験においても枯草菌の生存性低下が認められた。したがって、重層トリプトン培地で示された枯草菌に対する成育阻止の現象は、両者がある生存に必要な栄養源を奪い合い、枯草菌がその競争に負け死滅に至るものと推察された。そこで次に、種々の培養液中で生存競争実験を行い、枯草菌と生存競争菌が競争している栄養源の特定と、そのメカニズムの解析を試みた。

まず初めに、生存競争現象がプラスミドが導入されていない枯草菌においても起こる現象であるか否かを調べる目的で、間接酵素抗体法の改良型であるコロニープロット法を確立し、親株である*B. subtilis* N I G 1121株と神崎川より分離されたNo.20, 44, 81株の3生存競争菌株との混合培養生存性実験をおこなった。その結果、混合系内における*B. subtilis* N I G 1121株の生菌数は、単独系コントロールに比べて、実験3日目において $10^{1.5}$ オーダーの低下を示し、生存競争現象は親株でもおこることが明らかとなった。また枯草菌の親株、形質転換株間での生存性には差が認められなかった。

そこで、以降は枯草菌として主に形質転換株である*B. subtilis* N I G 1121 P株（以下21 P株と略す）を用い、生存競争菌としては、神崎川より分離されたNo.81株を用いて実験を行った。

さて、人工栄養水中で21 P株とNo.81株との間に生存競争現象が起こることが確認されたので、人工栄養水をその構成成分である人工河川水と、トリプトン溶液に分け、各々における生存競争実験をおこなった。その結果、有機栄養源としてトリプトン溶液を用いた場合に、混合系中の21 P株の生存性がコントロールのそれより低下する事実が明らかとなった。このことより生存競争現象は、有機栄養源の存在と関係したものであるという可能性が強く示唆された。

そこで、有機栄養源として新たにアミノ酸混合液を用いて実験を行い、枯草菌21 P株と分離菌No.81株がいかなるメカニズムで競争をおこなっているのかを、培養液中に残存するアミノ酸を定量することによって解析した。その結果、両菌株はAsp, Asn, Ser, Argを共通して取り込み、他のほとんどのアミノ酸については取り込みを示さなかった。またこの4種のアミノ酸については、枯草菌とNo.81株の間の取り込み速度が大きく異なり、混合系ではこれらの各アミノ酸はNo.81株によって実験開始後1日でほぼ完全に使い切られてしまうことがわかった。

以上の結果より、生存競争現象は、枯草菌とNo.81株が共通して取り込む数種のアミノ酸に対して、No.81株の取り込み速度が圧倒的に高く、そのために枯草菌が必要とする栄養源を取り込めず死滅に到る現

現象であると推察された。なお、Aspを単一の有機栄養源とする培養系を用いた生存競合実験によっても、上記の現象を確認することができた。

したがって、自然環境水系中における枯草菌の生存性は、主として原水中に存在する生存競合菌によって誘起されるものであることを解明することができた。

論文の審査結果の要旨

細菌、酵母などの自然河川、海水中での生存性について検討し、一般にこれらの環境中で常在する菌種以外のものは比較的急速に死滅することを明らかにした。そして、この死滅が物理化学的要因よりもむしろ生物的要因によるものと判断し、さらに環境常在菌との栄養競合現象によるものであることを明らかにした。

これらの研究は、自然環境中における微生物の生態の一部を明らかにしたもので、学位授与に値するものと判断した。