

土壤中のFusarium oxysporum f.sp.raphaniに対する拮抗菌

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
巻/号	621
掲載ページ	p. 21-26
発行年月	1991年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



土壤中の *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* に対する拮抗菌*

豊田剛己**・木村真人**

キーワード *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, 拮抗菌, *Pseudomonas* spp., きゅう肥, 団粒

1. はじめに

前報において、ダイコン萎黄病菌, *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* (以下 F.o.r. と略称) はきゅう肥施用土壤中で生育が抑制されており, その一因が土壤中に生育する活性なグラム陰性細菌によるものと推察した¹⁾. 土壤は周知のとおり微生物にとってその構造, 組成がきわめて不均一な環境である. そこで, 本報告では F.o.r. に対する拮抗菌の分布を, 土壤の種類, 土壤の構成成分(植物遺体, きゅう肥, 無機成分など), 団粒に注目して検討したので以下に報告する.

2. 実験方法

1) 供試土壤, 土壤の前培養, 供試病原菌, F.o.r. 小型分生胞子の調整

前報同様, 名古屋大学農学部附属農場より採取した化学肥料 13 年連用土壤(以下化肥区と略称: 全炭素=0.57%, pH=4.3)およびきゅう肥(100 t/ha) 13 年連用土壤(きゅう肥区と略称: 全炭素=4.6%, pH=6.9)を実験に供した²⁾. 化肥区土壤は最大容水量(MWHC)の45%, きゅう肥区土壤は62%に水分含量を調整後, 30°Cで1週間前培養を行った. また, 以下に述べる実験1においては化肥区土壤をpH=6.6に調整した土壤も実験に供した.

供試病原菌はダイコン萎黄病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* であり, 駒田のフザリウム菌用合成液体培地³⁾中で1週間振盪培養後, 脱脂綿を用いて小型分生胞子を濾過・集菌した.

2) 土壤中の F.o.r. 拮抗菌の計数(実験1)

HERRにより考案された3層寒天法⁴⁾を用い, 下記の3種の寒天層を重ね, F.o.r. の生育阻止円形成の有無により生育してきた菌の拮抗能を判別した.

第1層(ベース): 1.5% 殺菌素寒天 10 ml を殺菌ペト

リ皿に分注し, 固化後ただちに第2層を分注.

第2層(土壤懸濁液層): 1%の素寒天 5 ml に供試土壤の希釈懸濁液を添加したもの.

第1, 2層を分注後 30°C で2日間保存静置.

第3層(被検菌層): あらかじめ Czapek 液体培地で 30°C で3日間培養した F.o.r. をワーリングブレンダーで細断後, これと等容の Czapek 寒天培地(2%の寒天を含む)と混合し, その 5 ml を第2層の上に分注.

第3層まで分注したものを 30°C で7日間静置培養し, F.o.r. に対し生育阻止円を形成したものを F.o.r. に対する拮抗菌とした. なお, 本実験においては, 第3層に Czapek 寒天培地(1%寒天を含む)のみを分注し, 生育してきた菌を計測して全菌数とした.

3) きゅう肥区土壤より分離されたグラム陰性細菌の同定(実験2)

実験1で分離された細菌 10 株の同定を行った. なお, 予備実験の結果, いずれの菌株も非発酵性のグラム陰性細菌であることが判明したので, 同定には Becton Dickinson 社の細菌同定システム“ミニテック YY システム”⁵⁾と, API System 社の非発酵性菌および類似菌同定システム“API 20 NE”⁶⁾をおもに用いた. また糖の発酵性には TSI 寒天培地⁷⁾(栄研)を, カタラーゼテストには 30% H₂O₂⁸⁾を, オキシダーゼテストには Kovac の試薬⁹⁾であるテトラメチル-パラフェニレンジアミン 0.5% 水溶液を, 運動性テストには普通ブイヨン(栄研)+寒天 0.4% 培地を用い, 常法¹⁰⁾で行った.

4) きゅう肥, 植物遺体中の拮抗菌数(実験3)

ピンセットを用いて, きゅう肥区土壤の 2 mm 以下の画分から植物遺体, きゅう肥塊を分別した. 次いで, 完熟堆肥とこれら植物遺体, きゅう肥塊, 分画後の土壤それぞれの全菌数, F.o.r. 拮抗菌数を計数した. なお拮抗菌の計数には HERR の 3 層寒天法を一部改変したものをを用い, 第1層に 1.5% 素寒天, 第2層にはきゅう肥区土壤の 10⁻⁴ 土壤希釈液に加えて完熟きゅう肥, 土壤中のきゅう肥の 10⁻⁴ 希釈液, さらに 10 倍希釈した普通ブイヨン培地(NB: 肉エキス 3 g, ペプトン 10 g, 塩化ナトリウム 5 g, 蒸留水 1000 ml, pH 7.0)を使用した.

* 土壤中におけるダイコン萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*) の生態(第3報)

** 名古屋大学農学部 (464-01 名古屋市千種区不老町) 1990年2月22日受理

日本土壤肥科学雑誌 第62巻 第1号 p.21~26 (1991)

5) 土壤中の各種きゅう肥塊の拮抗菌数 (実験 4)

きゅう肥区土壌を 4mm, 2mm, 1mm 孔径の篩を用いて 4mm 以上, 4~2mm, 2~1mm の各画分に篩別し, おおのこの土壌画分から残存しているきゅう肥塊をピンセットを用いて分別採取した. 各試料の懸濁液をブレンダーを用いて分散させ, 全菌数, 拮抗菌数を測定した.

6) 各種粒径の団粒, 団粒の内外部の拮抗菌数 (実験 5)

あらかじめ 4mm の篩を通したきゅう肥区土壌を実験に供した. この土壌を 2, 1, 0.5 の篩を用いて 4~2mm, 2~1mm, 1~0.5mm, 0.5mm 以下の 4 種類に分画した. このときできる限り土壌中のきゅう肥塊を除去した. 次に, 服部の洗浄-音波法¹¹⁾に従って, 各供試土壌を以下のように団粒外部, 内部に分画した. すなわち, 200 ml 容三角フラスコに滅菌水道水 100 ml と分画した供試土壌 1g を入れ, 10 分間往復振盪した後, 1 分間静置後上清液を順次希釈したものを団粒外部試料とした. 団粒内部試料としては, 10 分間往復振盪した後の試料を, 1 分間静置して上清を除き, 新たに殺菌水道水を 100 ml 加えて 2 分間超音波処理したものを使用した. これら各画分の団粒外部, 内部試料懸濁液につき実験 1 の方法により, 全菌数, 拮抗菌数を測定した. また菌数測定に用いた試料の一部を乾燥し, その重量からそれぞれの画分 1g 当たりの菌数を求めた.

7) 土壌のシルト, 粘土画分の拮抗菌数 (実験 6)

粒径 30 μm 以下の画分の採取には, 200 ml 容三角フラスコに滅菌水 100 ml と実験 5 で篩別した 0.5mm 以下のきゅう肥区土壌 1g を入れ 5 分間振盪後, その全量を 1l のシリンダーに移し, 滅菌水で 1l にした後よく分散させた. 静置 30 秒, 2 分, 10 分後に, 水面より 10 cm 下位の部位から 10 ml を逐次殺菌メスピベットで採取した. また, 10 分間静置後の上清をさらに 5 μm , 次いで 1 μm の Membrane フィルターを通過させ, 濾液中に存在する微生物を“遊離”の微生物とした.

粒径 30 μm 以上の大型団粒の分画には, 先に行った操作中 1l のシリンダーの底部に沈殿した土壌を, 46 μm 孔径の篩で篩別し, 500~46, 46~30 μm の両画分を得た. 以上の方法で得られた試料を超音波処理した後 (遠心分離によって得られた試料は除く), 実験 1 の方法で全菌数, 拮抗菌数を測定した. また菌数測定に用いた試料の一部を乾燥し, その重量からそれぞれの画分 1g 当たりの菌数を求めた.

3. 結果および考察

実験 1 土壌中の F.o.r. 拮抗菌の計数

第 1 表に示したように, 全菌数, 拮抗菌数とも pH 4 の化肥区土壌に比べ, pH 7 の化肥区土壌, きゅう肥区土壌で 10 倍以上高い値を示した. しかし, 拮抗菌数, 全菌数に対する拮抗菌数の割合はいずれもきゅう肥区土壌で最も高く, とくにその割合は化肥区 (pH=4, pH=7) の 2 倍以上であった. 他方, 完全きゅう肥には全く拮抗菌は検出されなかった. これら拮抗菌を鈎菌・単離しその種類を調べたところ (第 2 表), 化肥区土壌ではいずれの pH においても, 拮抗菌のほとんどが放線菌であった. これに対し, きゅう肥区土壌ではグラム陰性拮抗菌が全体の 2 割を占めているのが注目された. 前報において, きゅう肥区土壌の F.o.r. 生育抑制効果がストレプトマイシン (抗細菌性タンパク質合成阻害剤) の添加により低下し, 他方バンコマイシン (抗グラム陽性菌性細胞膜成分合成阻害剤) の添加では影響されないことを報告した¹²⁾が, 本実験の結果はきゅう肥区における F.o.r. の生育抑制にグラム陰性細菌が関与していることを改めて明らかにしたものと見える. また, 化肥区, きゅう肥区とも放線菌が拮抗菌として計数されたが, これら放線菌は土壌中で休止状態で存在し, F.o.r. の生育抑制への寄与は少ないものと判断された.

実験 2 きゅう肥区土壌より分離されたグラム陰性細菌の同定

同定を試みた 10 株すべてがグラム陰性の非発酵性菌であった (第 3 表). また, 10 株中 9 株に運動性が認められた. 生化学検査 (ミニテック YY システム) より,

第 1 表 化肥区, きゅう肥区土壌およびきゅう肥中の拮抗菌数

	全菌数 ($\times 10^6$ /g)	拮抗菌数 ($\times 10^5$ /g)	割合 (%)
化肥区土壌 (pH 4)	2.7	0.55	2.0
化肥区土壌 (pH 7)	46	6.4	1.4
きゅう肥区土壌 (pH 7)	29	13	4.6
きゅう肥	0.88	<0.001	0

第 2 表 化肥区, きゅう肥区土壌中に生育する拮抗菌の種類

	グラム 陰性細菌 (%)	グラム 陽性細菌 (%)	放線菌 (%)
化肥区土壌 (pH 4)	5	0	95
化肥区土壌 (pH 7)	0	0	100
きゅう肥区土壌 (pH 7)	22	2	75

第3表 グラム陰性拮抗菌の菌学的性質

	1-1	1-2	1-4	1-5	1-7	1-8	1-9	4-4	4-5	4-13
グラム染色	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
形態	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
運動性	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+
TSI	A/-	A/-	A/-	A/-	A/-	A/-	A/-	A/-	A/-	A/-
リジン デカルボキシラーゼ	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
オルニチン デカルボキシラーゼ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アルギニン デカルボキシラーゼ	-	-	+	-	-	+	V ^W	+	+	-
ウレアーゼ	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
ONPG	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
インドール産生性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸塩還元	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
資化性										
グルコース(嫌気)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルコース(好気)	+	+	+	+	+	+	+	V ^W	V ^W	V ^W
マンノース	+	+	+	+	+	+	+	V ^W	V ^W	V ^W
マンニット	-	+	+	+	+	+	+	V ^W	V ^W	V ^W
シュクロース	+	+	+	+	+	+	+	V ^W	V ^W	V ^W
キシロース	-	+	+	+	+	+	+	V ^W	V ^W	V ^W
クエン酸塩	+	-	+	V ⁺	+	+	+	+	+	+

API20NE より、1-1 が *Pseudomonas cepacia*, 1-4 が *P. pseudomallei*, ミニテック YY システムより、1-4 が *P. pseudomallei*, 1-5 が *Agrobacterium radiobacter*, 1-7 が *P. paucimobilis*, 4-4 が *P. mallei*, 4-5 が *P. aeruginosa*, 4-13 が *P. maltophilia* と同定された。

V⁺, 不定, 大多数は陽性; V^W, 不定, 陽性の場合には弱い。

10 株中 6 株は *Pseudomonas pseudomallei*, *P. cepacia*, *P. paucimobilis*, *P. maltophilia*, *P. mallei*, *Agrobacterium radiobacter* と同定された。残りの 4 株は未同定のまま残された。以上の結果より、グラム陰性拮抗菌の多くは *Pseudomonas* 属菌であると推察された。

実験 3 きゅう肥, 植物遺体中の拮抗菌数

これまでの実験より、きゅう肥区土壤には数%の

F.o.r. に対する拮抗菌が存在するが、きゅう肥からは拮抗菌が検出されず、F.o.r. 拮抗菌がきゅう肥の土壤中での分解過程で生じてくるものと推察された。そこで、土壤に残存する植物遺体、きゅう肥中の拮抗菌数を測定した。また、きゅう肥と土壤では拮抗菌の生育する環境の栄養条件が異なり、拮抗菌はそれぞれの環境に適応して生育しているものと予想される。そこで拮抗菌の計数に際して使用する培地の栄養条件についても併せ

第4表 拮抗菌数に及ぼす培地の影響

第 2 層	全菌数 ($\times 10^7/g$)	拮抗菌数 ($\times 10^5/g$)	割合 (%)	
きゅう肥区土壤	土壤抽出液	4.6	6.4	1.4
	完熟きゅう肥抽出液	4.3	6.2	1.4
	きゅう肥塊抽出液	4.6	7.4	1.6
	1/10 NB	8.8	5.0	0.57
完熟きゅう肥	1/10 NB	23	0.02	0.00
	完熟きゅう肥抽出液	10	0.56	0.06
植物遺体	1/10 NB	4.2	3.5	0.84
	土壤抽出液	1.4	2.2	1.6
きゅう肥塊	1/10 NB	13	3.4	0.27
	完熟きゅう肥抽出液	5.0	4.8	0.96

第5表 きゅう肥および土壌中のきゅう肥残渣に生育する拮抗菌数

	全菌数 ($\times 10^7/\text{g}$)	拮抗菌数 ($\times 10^5/\text{g}$)	割合 (%)
きゅう肥(施用前)	10	0.56	0.06
きゅう肥(4mm~)	14	3.4	0.25
(4~2mm)	12	6.8	0.56
(2~1mm)	20	11	0.55

検討することとした。

第4表に示したように、きゅう肥区土壌の拮抗性は、計数時の培地を栄養条件のよい 1/10 NB 培地にすることにより拮抗菌数、全菌数に対する拮抗菌数の割合ともに減少した。しかし、土壌抽出液よりは栄養条件がよいと考えられる完熟きゅう肥および土壌塊から調整した抽出液培地では、拮抗菌数、その割合ともに土壌抽出液を用いた場合との相違は認められなかった。また、土壌と比べて栄養条件がよいと考えられる完熟きゅう肥、土壌中の植物遺体やきゅう肥塊においても、培地を 1/10 NB 培地に変えることにより、拮抗菌数、全菌数に対する拮抗菌数の割合がともに減少した。本実験においても実験 1 同様完熟きゅう肥にはごくわずかの拮抗菌しか計数されなかったが、土壌中のきゅう肥塊には完熟きゅう肥ときゅう肥区土壌の中間程度の拮抗菌が計数された。以上の結果より、拮抗菌はきゅう肥を土壌に施用することにより生育してくるものと推察された。また、植物遺体にもきゅう肥区土壌と同程度の拮抗菌が存在していた。

実験 4 拮抗菌の生育場所—きゅう肥の土壌中での分解過程と関連して—

実験 1 および 3 より完熟きゅう肥には F.o.r. 拮抗菌がきわめて少数しか存在していないが、土壌中のきゅう肥塊には比較的多く存在し、きゅう肥が分解されていく過程で拮抗菌が増殖してくるものと推察された。この推定をさらに検討するため、篩別した各土壌画分中のきゅう肥塊に存在する F.o.r. 拮抗菌数を測定した。

第5表に示したように、土壌へ施用前の完熟きゅう肥にはほとんど拮抗菌は存在しなかったが、土壌中に残存しているきゅう肥塊には拮抗菌が検出されその数は粒径が低下するにつれて増加するとともに、全菌数に対する拮抗菌数の比率も増加した。

実験 5 拮抗菌の生育部位—団粒の大きさ、団粒の内部、外部と関連して—

団粒外部、内部とも、団粒サイズが小さくなるにつれて全菌数が増加する傾向を示した。これは大きな団粒ほど一次鉱物の混入が多いためと考えられた。また F.o.r.

第6表 団粒の大きさ、団粒の内部、外部に関連した拮抗菌の生育部位

団粒サイズ (mm)		全菌数 ($\times 10^7/\text{g}$)	拮抗菌数 ($\times 10^5/\text{g}$)	割合 (%)
4~2	外*	18	85	4.6
	内**	3.9	9.6	2.5
2~1	外	24	109	4.6
	内	5.2	9.2	1.8
1~0.5	外	69	384	5.5
	内	5.5	17	3.1
0.5~	外	82	269	3.4
	内	14	28	2.1

* 外, 団粒外部; ** 内, 団粒内部。

拮抗菌数も団粒外部、内部ともに粒径が小さくなるにつれて増加していた(第6表)。

ところで、これら菌数を団粒の外部と内部で比較すると、全菌数、F.o.r. 拮抗菌数はともに団粒内部より外部に多く、また全菌数に対する拮抗菌数の割合は団粒外部で 3~6%、内部で 2~3% と、団粒外部のほうが内部に比べ多数を占めていた。なおこの拮抗菌の割合には、団粒の大きさによる影響は認められず、いずれの画分もほぼ同一の値を示した。

実験 6 拮抗菌の生育部位—土壌のシルト、粘土画分と関連して—

第7表に示したように、土壌粒子に吸着されていない微生物はきわめて少なく、拮抗菌数も少なかったが、拮抗菌数の全菌数に占める割合は、31 μm 以下の微粒子に吸着された微生物のそれよりもやや高く、また 46 μm 以上の大きな粒子に吸着された微生物のそれに比べてはるかに高い値を示した。31 μm 以下の微粒子に吸着されている微生物は、46 μm 以上の粗粒子に吸着されている微生物に比べて、拮抗菌数、拮抗菌数の全菌数に占める割合はいずれも 5 倍以上の高い値を示した。

本実験 5, 6 の結果は団粒内部より団粒外部に拮抗菌が多く、また、全菌数に対する拮抗菌数の割合も高いことを支持している。さらに実験 6 の結果より、拮抗菌は微粒子(小さい耐水性団粒)、団粒外部に多く計数され、拮抗菌は微粒子に選択的に存在すると考えられた。

第7表 粒径画分に関連した拮抗菌の生育部位

画 分	全菌数 ($\times 10^6/\text{g}$)	拮抗菌数 ($\times 10^5/\text{g}$)	割合 (%)
46 μm 以上	88	4.7	0.54
31 μm 以下	98	25	2.5
15 μm 以下	130	33	2.6
遊離態	0.19	0.072	3.8

4. 要 約

文 献

前報において、*Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* (F.o.r.) はきゅう肥施用土壌中で生育が抑制されており、その一因がグラム陰性細菌によることを明らかにした。そこで、本報告では F.o.r. に対する拮抗菌の分布を、土壌の種類、土壌構成成分、団粒に注目して研究した。得られた結果を要約すると、

1) 化肥区に比べ、F.o.r. の拮抗菌数、全菌数に占める拮抗菌数の割合はいずれもきゅう肥区土壌で高かった。また、完熟きゅう肥からはほとんど拮抗菌が計数されなかった。

2) 化肥区土壌に生育する F.o.r. 拮抗菌のほとんどが放線菌であったのに対し、きゅう肥区土壌ではグラム陰性拮抗菌が全体の約2割を占めており、その多くは *Pseudomonas* 属の細菌と同定された。

3) 土壌中に施用されたきゅう肥の分解に伴って拮抗菌がきゅう肥塊中で増殖し、その菌数はきゅう肥塊の粒径が低下するにつれて増大した。

4) F.o.r. 拮抗菌数は、粒径の小さな団粒ほど、また団粒内部に比べ外部に多く生育していた。

謝 辞 本研究を行うにあたり、終始適切にご指導をいただいた名古屋大学農学部教授鍛塚昭三博士、土壌試料の採取にご協力いただいた名古屋大学農学部附属農場教授吉田重方博士、および有益なご助言をいただいた名古屋大学農学部教授道家紀志博士、同助教内野不二博士に感謝の意を表します。

- 1) 木村真人・豊田剛己・鍛塚昭三：土壌中におけるダイコン萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*) の生態 (第2報)、きゅう肥連用土壌の *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* 抑制機構、土肥誌, **62**, 14~20 (1991)
- 2) 木村真人・豊田剛己・鍛塚昭三：土壌中におけるダイコン萎黄病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*) の生態 (第1報)、化学肥料およびきゅう肥連用土壌における *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* の生育、同上, **61**, 586~591 (1990)
- 3) 「新版土壌病害の手引き」編集委員会編：新版 土壌病害の手引き, p.320, 日本植物防疫協会, 東京 (1983)
- 4) HERR, L.J.: A method of assaying soils for numbers of actinomycetes antagonistic to fungal pathogens. *Phytopathology*, **49**, 270~273 (1959)
- 5) 山中喜代治・村田葉子・豊田隆子・藪内英子：ミニテックによるブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌の同定-Y-Yシステムについて一、臨床と細菌, **7**, 232~242 (1980)
- 6) 山中喜代治・三好典子・藪内英子：非発酵性グラム陰性桿菌28菌種1グループ204株を用いた API20NE の評価、臨床と細菌, **11**, 513~527 (1984)
- 7) MACFADOIN, J.F. 著, 竹内美文・藪内英子・三輪谷俊夫監訳：病原細菌の生化学的検査法, 原著第2版, p.154~162, 医学書院, 東京 (1984)
- 8) MACFADOIN, J.F. 著, 竹内美文・藪内英子・三輪谷俊夫監訳：病原細菌の生化学的検査法, 原著第2版, p.44~49, 医学書院, 東京 (1984)
- 9) MACFADOIN, J.F. 著, 竹内美文・藪内英子・三輪谷俊夫監訳：病原細菌の生化学的検査法, 原著第2版, p.209~217, 医学書院, 東京 (1984)
- 10) MACFADOIN, J.F. 著, 竹内美文・藪内英子・三輪谷俊夫監訳：病原細菌の生化学的検査法, 原著第2版, p.180~183, 医学書院, 東京 (1984)
- 11) 服部 勉：土壌団粒中の細菌群の分布と変動, 土肥誌, **37**, 302~304 (1966)

Antagonists against *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* in Soil

Koki TOYOTA and Makoto KIMURA

(Fac. Agric., Nagoya Univ.)

It was known from the previous report that the growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani* was suppressed in the farmyard manure (FYM) amended soils, which was partly due to the gram-negative bacteria. In this report, the distributions of antagonists, with special attention to the soil types, constituents, and aggregates, were investigated.

The results obtained were as follows:

1) The number of antagonists and the percentage of antagonists to total microorganisms were higher in FYM-soil than in chemical fertilizer (CF)-soil. On the other hand, only a few antagonists were counted in FYM.

2) Antagonists isolated in CF-soil were almost all actinomycetes; but in FYM-soil, gram-negative bacteria, some of which were identified to be *Pseudomonas* spp., occupied about 20% of total antagonists.

3) Antagonists grew in or near FYM with degradation of FYM incorporated into soils; those

