

土壤から分離された一細菌の抗糸状菌性について^{*}

達山 和紀^{**}・江川 宏^{**}・山本 広基^{**}

Kadzunori TATSUYAMA, Hiroshi EGAWA, and Hiroki YAMAMOTO
Studies on the Antifungal Activities of a
Bacterium Isolated from the Soil.

緒 言

戦後の農業に農薬が果して来た役割は極めて大きいものであるが、一方、環境の汚染という問題も生じたために、最近では環境を汚染しない無公害農薬の研究開発が急がれている。

筆者らも無公害農薬の研究開発の一環として微生物間の拮抗現象を利用しようと試みている。1972年、筆者らの一人達山らはチューリップ切花栽培施設における土壤消毒の方法と土壤微生物相との関係を調査する過程で、土壤伝染性の病原菌である *Fusarium* 属菌に拮抗する細菌数種を分離した。このような細菌を土壤中に増殖させることによって、土壤伝染性の病原菌を防除出来ないかと考え、その第一段階としてまずこの細菌の病原糸状菌に対する一、二の生理活性とこの細菌を土壤中に散布した場合の土壤中の微生物の変化について検討したので報告する。

実験材料、方法、および結果

1. 供試菌の *Fusarium* 属菌に対する拮抗現象

Fusarium oxysporum SCHLEICHTENDAHL (KU-f22) および *Botrytis tulipae* (LIBERT) HOPKINS に拮抗する数種の細菌のうちの一つ (TB-3 号菌) について、*Fusarium* 属菌に対する拮抗作用を確認するとともに、培養濾液の抗菌性について検討した。

a. 実験材料および方法

Fusarium 属菌は *F. oxysporum* (KU-f22) を用いた。直径 9cm のペトリ皿に PSA 培地を約 8ml 入れ、固化後 *F. oxysporum* を接種し、25°C、3日間培

養した後、TB-3 号菌を接種し再び 25°C、4日間培養して拮抗作用の有無を検討した。又、TB-3 号菌を PS 培地で 25°C、7日間培養した後に、濾紙円板 (東洋濾紙製、抗生物質検定用) にその濾液を吸収させて、*F. oxysporum* と対峙培養を試み、溶液中に抗菌性物質が産生されるかどうかを検討した。

b. 実験結果

TB-3 号菌は菌体および培養濾液ともに *F. oxysporum* に対して拮抗作用を示した。又、TB-3 号菌の拮抗作用の影響が考えられる *F. oxysporum* の菌糸の先端では、正常の菌糸 (第1図A) に比べて明らかに異常が認められ (第1図B)、対照の菌糸が直線的な生育を示すのに対して、TB-3 号菌による拮抗作用の影響を受けている菌糸は変形し、ところどころに球形のものが認められた。従って、TB-3 号菌が *F. oxysporum* の菌糸生育を阻害する物質を産生することは明らかである。

2. TB-3 号菌培養濾液の数種植物病原菌に対する抗菌性

1.の実験で TB-3 号菌培養濾液中に抗菌性物質の存在が明らかにされたので、植物病原菌数種に対する抗菌性を調査した。

a. 実験材料および方法

供試した植物病原菌は次の8種である。

Alternaria solani (ELLIS et MARTIN) SORAUER IFO-5924

Cladosporium colocasiae SAWADA IFO-6698

Cochliobolus miyabeanus (S. ITO et KURIBAYASHI) DRECHSLER KU-13

Colletotrichum lagenarium (PASSERINI) ELLIS et HALSTED

Fusarium oxysporum SCHLEICHTENDAHL KU-f22

* Studies on the antimicrobial substances (6)

** 島根大学農学部, Fac. of Agr., Shimane Univ., Matsue, JAPAN.

** 現在、佐藤造機株式会社, Satoh Agricultural Machine Mfg. Co., Ltd., Iya, Shimane-ken, JAPAN.

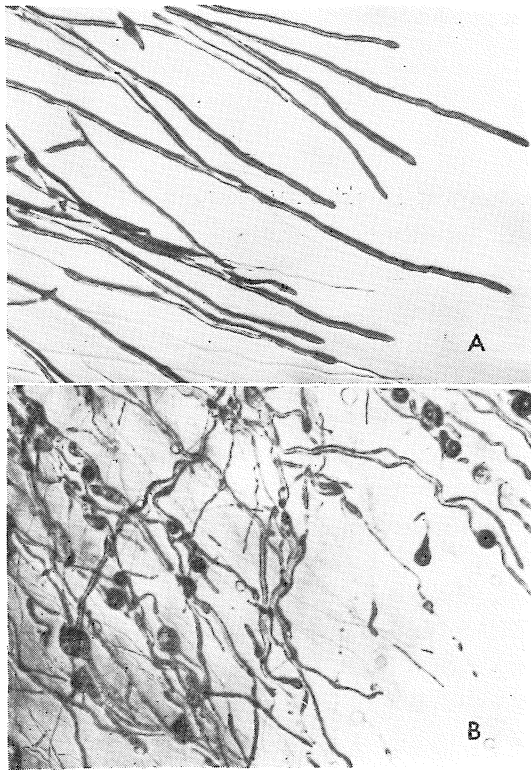


Figure 1. Mycelia of *Fusarium oxysporum*
 A : Normal (×3300)
 B : Abnormal (×3300)

Fusarium oxysporum SCHLEICHTENDAHL 72-S1
Fusarium solani (MARTIUS) APPEL et WOLL-
 ENWEBER IFO-5890
Helminthosporium leptochloae NISHIKADO et
 MIYABE IFO-6634

抗菌性は供試菌をPSA培地で25°C、10日間培養したものから採取した分生胞子を用いて発芽試験を行って検討した。PS培地でTB-3号菌を培養して得られた濾液を等容のn-ブタノールで抽出し、n-ブタノールを揮散させてから、等容の脱イオン水に分散させた溶液中で各病原菌の胞子発芽試験を行なった。発芽所要時間は*C. miyabeanus*については25°C、6時間、その他の病原菌については25°C、24時間後に発芽を調査した。

b. 実験結果

結果を第1表に示した。供試した8菌種のいずれの分生胞子も供試濃度中での発芽は認められなかった。従って、TB-3号菌培養濾

液中には活性の高い抗菌性物質の存在することが明らかにされた。

3. TB-3号菌培養濾液の濃度と *Fusarium* 属菌および *C. miyabeanus* の分生胞子発芽

TB-3号菌培養濾液の抗菌性の強さを知るために、試験液の濃度を変えて分生胞子の発芽を検討した。

a. 実験材料および方法

供試菌は *F. oxysporum* KU-f22, *F. oxysporum* 72-S1, *F. solani*, および *C. miyabeanus* KU-13 の4菌株である。発芽試験の方法は2.と同様に行なった。TB-3号菌をPS培地に25°C、7日間培養したのち、培養液と等容のn-ブタノールで抗菌性物質を抽出し、n-ブタノールを揮散させてから、等容の脱イオン水を加えて溶解させた。この溶液の濃度を1とし、脱イオン水で順次1/2, 1/4, 1/8, 1/16, および1/32と希釈し、発芽試験液とした。

b. 実験結果

第2表に示したように、濃度1/4で*Fusarium*属菌が、又1/8の濃度で*C. miyabeanus*の分生胞子発芽が阻止され、TB-3号菌の培養濾液はかなり強い抗菌性を有することが明らかになった。

更に、*C. miyabeanus*の分生胞子は1/16および1/32の濃度で、第2図に示すような発芽の異常が認められ、*Fusarium*属菌についても1/8の濃度で第3図に示すような発芽時の異常な形態が観察された。

*C. miyabeanus*の発芽の異常は発芽管のかわりに大きな球状のものが認められ、場合によってはこの球状のものから発芽管と思われるものの突出が認められた(第2図C)。

*Fusarium*属菌の胞子発芽の異常は発芽管か又は胞子が数個の球状のもののつながりとして認められたり、発

Table 1. Antifungal effects of the cultural filtrate of the bacterium to several phytopathogenic fungi.

Phytopathogenic fungi	Germination of conidia
<i>Alternaria solani</i>	—*
<i>Cladosporium colocasiae</i>	—
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	—
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	—
<i>Fusarium oxysporum</i> 72-S1	—
<i>Fusarium oxysporum</i> KU-f22	—
<i>Fusarium solani</i>	—
<i>Helminthosporium leptochloae</i>	—

* — not germinated.

芽管の形態に明らかに異常なものが認められた。

4. TB-3 号菌およびその培養濾液を散布した土壌中の細菌および糸状菌数の変化

TB-3 号菌およびその培養濾液の散布の土壌微生物相に及ぼす影響を知るために散布後の微生物相の変化を調査した。

a. 実験材料および方法

土壌は島根大学農学部の実験圃場の植壤土（含水量11.3%，Turyn 法による有機物含量2.7%，pH = 7.2）を用い、10cm の素焼植木鉢に入れて次に示す処理をした後、昼25°C、8,000 lux 夜20°C のファイトトロン中に置き、処理後0、1、3、7、14日後に表層から約 1cm の深さの土壌を採取し、平板稀釈法によって菌数を測定した。灌水は水分条件が菌数に著しく影響することを考慮して、試料採取後に植木鉢を水槽内に置いて下から吸水させた。菌の分離は、細菌については PSA 培地、糸状菌についてはローズベンガル 1/30,000 およびストレプトマイシン 1/30,000 を含む PSA 培地

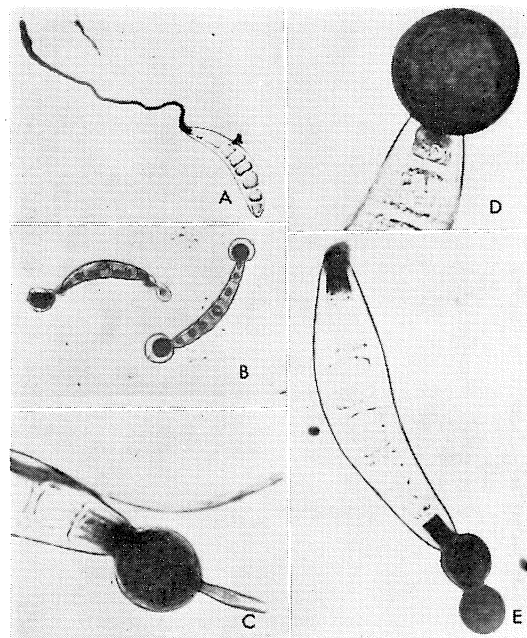


Figure 2. Conidial germination of *Cochliobolus miyabeanus* in n-butanol extracts of the broth.

- A : Normal germination (×450)
- B : Abnormal germination (×450)
- C, D, E : Abnormal germination (×1800)

Table 2. Effect of dilution of cultural filtrate of the bacterium to the conidium germination of *Fusarium* species and *Cochliobolus miyabeanus*.

Phytopathogenic fungi	Conc. of cultural filtrate of the fungus*						
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	0
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	—	—	—	—	—!	++!	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> 72-S1	—	—	—	+++	+++	+++	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> KU-f22	—	—	+	+++	+++	+++	+++
<i>Fusarium solani</i>	—	—	—	++!	+++	+++	+++

* Originally cultural filtrate of the bacterium was established as the concentration "1".

! It was recognized abnormal germination of the conidia of phytopathogenic fungi.

を用いた。土壌の処理は

- 1) TB-3 号菌の培養（PS 培地 100ml/200ml 三角フラスコ、25°C、7日間）濾液を 1 鉢当たり 20ml を散布。
- 2) 同上の濾液を等容の n-ブタノールで抽出後、n-ブタノールを揮散させてから等容の水でおきかた

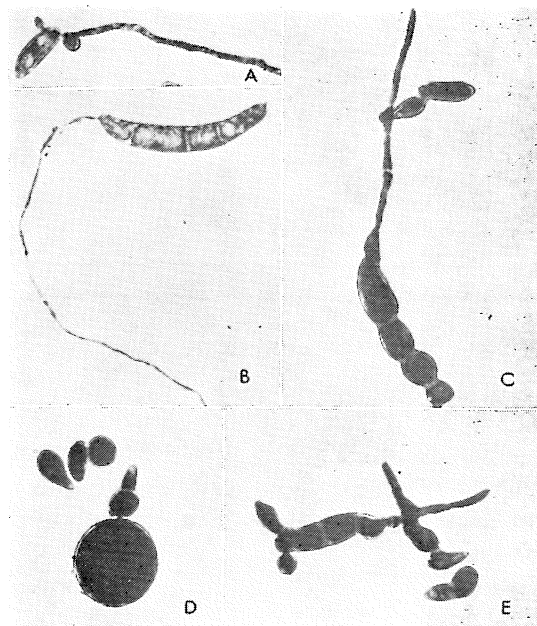


Figure 3. Conidial germination of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* in n-butanol extracts of the broth.

- A, B : Normal germination of *F. oxysporum* (×1800)
- C : Abnormal germination of *F. oxysporum* (×1800)
- D, E : Abnormal germination of *F. solani* (×1800)

溶液を1鉢当り 20ml を散布

3) 上記2区の対照として脱イオン水を1鉢当り 20ml を散布.

の3区を設け殺菌土壌, 非殺菌土壌のそれぞれについて検討した.

b. 実験結果

1) 土壌細菌数に及ぼす影響 (第4図)

抽出物を散布した土壌においては殺菌土壌, 非殺菌土壌のいずれにおいても, 7日後までの細菌数は対照区を下まわったが, その後はむしろ対照区より多かった.

又, TB-3 号菌処理区については加えた TB-3 号菌も細菌数に含まれているため, 対照区の約3倍の菌数を示した. しかしその消長パターンは対照区と酷似しており添加した TB-3 号菌量だけが多いという影響にとどまった.

2) 糸状菌数に及ぼす影響 (第5図)

非殺菌土壌については, TB-3 号菌, 抽出物処理区ともに, 対照区を下まわっており, 又菌数の増減が極めて少なかった. 殺菌土壌についても, 抽出物処理区は対照区とほぼ同じで, TB-3 号菌処理区ではその消長パター

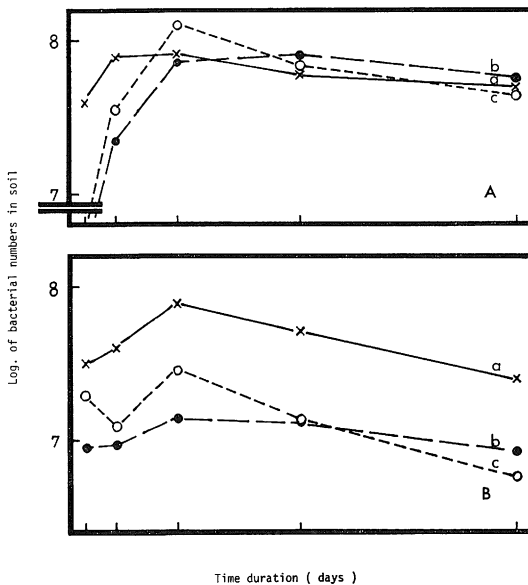


Figure 4. Numbers of bacteria in the soils after spraying the bacterial suspension and its extract solution.

- A: Sterilized soil
- B: Non-sterilized soil
- a: Spraying the bacterial suspension
- b: Spraying the extract solution of the bacterial filtrate
- c: Spraying deionized water (as control)

ンは同じであったが全数において多かった.

5. TB-3 号菌およびその抽出物散布土壌に接種した *F. oxysporum* の消長

前項の実験によって TB-3 号菌の培養濾液等の散布による土壌微生物相の攪乱は少ないと思われたので, 散布による *F. oxysporum* に対する効果を検討した.

第4図に示す通り, TB-3 号菌を散布した土壌において, 散布後14日後に至るまで対照区に比べて細菌数が多く, これが散布した TB-3 号菌の存在によるものとするれば, TB-3 号菌の活性は14日後まで維持されている可能性があると考えられた. そこで *Fusarium* 属菌を土壌に散布して, 土壌中においても *Fusarium* 属菌が TB-3 号菌の拮抗作用を受けるかを検討した.

a. 実験材料および方法

4 a の材料および方法に従って行なった. 土壌に施用した処理は

- 1) PS 培地 30ml/100ml の三角フラスコに27°C, 10日間培養した *F. oxysporum* KU-f22 の菌そうを 100ml の脱イオン水とともにミキサーで粉碎した菌糸懸濁液を 20ml 散布
- 2) 4 a で用いた TB-3 号菌培養液と上述の *Fusarium* 菌糸懸濁液とを混合したものを 20ml 散布

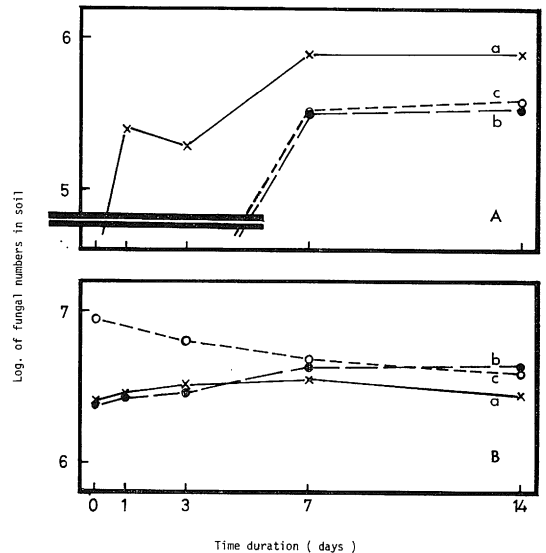


Figure 5. Numbers of fungi in the soils after spraying the bacterial suspension and its extract solution.

- A: Sterilized soil
- B: Non-sterilized soil
- a: Spraying the bacterial suspension
- b: Spraying the extract solution of the bacterial filtrate
- c: Spraying deionized water (as control)

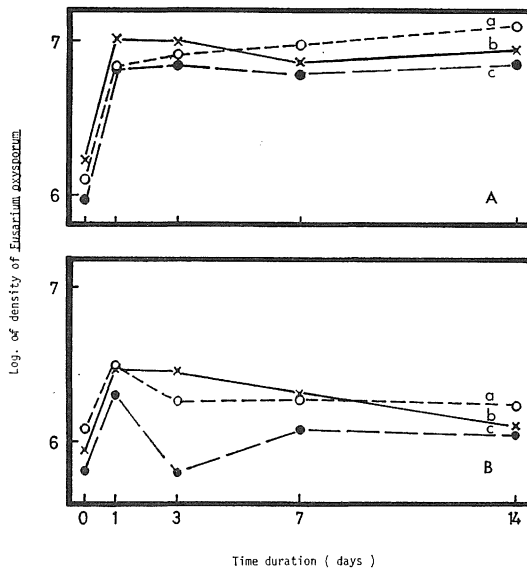


Figure 6. Density of *Fusarium oxysporum* in the soils mixed with the bacterial suspension and its extract solution.

A: Sterilized soil

B: Non-sterilized soil

a: Spraying deionized water and the mycelia of *Fusarium oxysporum*

b: Spraying the bacterial suspension and the mycelia of *Fusarium oxysporum*

c: Spraying the extract solution of bacterial filtrate and the mycelia of *Fusarium oxysporum*

3) 4 a で用いた TB-3 号菌培養液抽出物と *Fusarium* 菌糸懸濁液を混合したものを 20ml 散布の 3 区を設けて、殺菌および非殺菌土壌で検討した。

b. 実験結果 (第 6 図)

殺菌土壌の対照区においては、1, 3, 7, 14 日後と徐々に *Fusarium* 属菌は増加して行くのに対して、TB-3 号菌処理区、抽出物処理区ともに 1, 3 日後までの増加にとどまり、その後の増減はほとんどなかった。又、非殺菌土壌においても、抽出物処理区では対照区の約 $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ の *Fusarium* 属菌が分離されたにすぎず、TB-3 号菌処理区についても 3 日後に若干増えた以外は対照区とほぼ同じであった。

以上の結果から殺菌土壌中では、*Fusarium* 属菌は TB-3 号菌の拮抗作用あるいは抽出物の影響を受けて、無処理区の程度まで増殖出来なかったと考えられるが、非殺菌土壌においては、他菌との関係などの影響もあって TB-3 号菌と *Fusarium* 属菌との拮抗現象が明確に現われなかったものと考えられた。

考 察

Fusarium 属菌に拮抗作用を有する土壌から分離された細菌 TB-3 号菌はその培養濾液中に *Fusarium* 属菌、*Cochliobolus miyabeanus* などの分生孢子発芽を阻止する物質が含まれていることは明らかである。

細菌の産生する抗菌性物質には、バチリン²⁾、ズブチリン³⁾、バチロマイシン⁴⁾ など古くから多くの報告があり、又、吉井らは *Bacillus fumicolaris* の産生する *Fumicolarin* のイネごま葉枯病に及ぼす影響について報告している。筆者らの供試した抽出物がこれらの抗菌性物質のうちの一つと一致するものかどうか今後検討したい。又、分生孢子発芽時の球状の発芽管については、ポリオキシンの作用と類似している⁷⁾ので、TB-3 号菌の抗菌性はポリオキシンと同じような機作⁸⁾によって生ずる可能性も考えられた。

抗菌性物質を産生する微生物を土壌中に加用して植物の疾病を防除するという試みも古くから行なわれてい⁹⁾るが、*in vitro* の実験では成功しても *in vivo* の実験では成功していない例が多い。筆者らの研究結果でも TB-3 号菌の土壌への加用によって *F. oxysporum* の土壌中での増殖が阻止されていることは推定されたが、疾病の発現との間の関係については今後くわしく検討しなければならない課題であると考えられた。

摘 要

Fusarium 属菌に拮抗作用を示す細菌数種を土壌から分離した。このうちの二細菌 (TB-3 号菌の生理活性を *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Cochliobolus miyabeanus* などの分生孢子発芽試験で検討した結果、すべての供試菌に対して抗糸状菌性を示した。又、*F. solani* および *C. miyabeanus* の分生孢子発芽管の異常が認められた。

TB-3 号菌菌体およびその n-ブタノール抽出物を土壌中に加用し、土壌微生物の変化を観察したが、細菌数および糸状菌数ともに対照区とほとんど差異は認められなかった。更に、TB-3 号菌菌体および n-ブタノール抽出物加用土壌中に *F. oxysporum* を接種し、その消長を調査したが、対照区に比べて *F. oxysporum* の増殖が少ない傾向が観察された。

引 用 文 献

1. 達山和紀・吉野蕃人・田中寛美：生物環境調節，11：165~167，1973.
2. Foster, J. W. and Woodruff, H. B.: J. Bacteriol., 51: 363, 1946.

3. Jansen, E. F. and Hirschmann, D. J. : Arch. Biochem., 4 : 297, 1944.
4. Landy, M., Roseman, G. H., and Colio, L. G. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 67 : 539, 1948.
5. 梅沢純夫 : 抗菌性物質, 東京, 1955.
6. 吉井啓・浅田泰次・木曾皓・秋田孝雄 : 日植病報, 23 : 150~154, 1948.
7. 江口潤・佐々木茂樹・太田農夫也・赤柴健夫・土山哲夫・鈴木三郎 : 日植病報, 34 : 280~288, 1968
8. 佐々木茂樹・太田農夫也・江口潤・古川晴・赤柴健夫・土山哲夫・鈴木三郎 : 日植病報, 34 : 272~279,
9. Waksman, S. A. : The Actinomycetes, Maryland, 1961.

Summary

Antifungal effects of a soil-bacterium (TB-3) against several phytopathogenic fungi were studied. Conidial germinations of *Fusarium oxysporum*, *Cochliobolus miyabeanus* and several other phytopathogenic fungi were inhibited strongly in the broth of bacterium or n-butanol extracts of the broth, and if the conidia germinated in the diluted solution, form of the germ-tube were abnormal. Spraying of the broth or n-butanol extracts of the broth had no effect on soil microflora, however, the spraying were effective to decrease the density of *Fusarium oxysporum* inoculated in the soil.