

パラコートのだいず根瘤菌の増殖と 根瘤形成におよぼす影響*

山本広基**・達山和紀**・江川 宏**・定岡成行***

Hiroki YAMAMOTO, Kadzunori TATSUYAMA,
Hiroshi EGAWA and Nariyuki SADAOKA
Effects of Paraquat on Growth of *Rhizobium japonicum*
and Root Nodule Formation of Soy Bean Plant

緒 言

除草剤の普及は農業における労働生産性の向上に大きく寄与してきたが、その施用は農業生態系、特に物質循環に深く関わる土壌微生物に対して種々の影響をおよぼし、生息数の減少や、特定の種の優占化あるいは機能の低下などをもたらすことが報告されている^{3),6)}。一方、根瘤菌^{1),4)}の土壌中の役割はよく知られており、除草剤による土壌微生物相の攪乱を検討するにあたって注目すべき対象微生物の一つであろう。そこで筆者らは、我国の畑地で用いられている数種の除草剤のだいず根瘤菌に対する抗菌力を調査し、これらの除草剤のうち、特に著しくだいず根瘤菌の増殖を阻害したパラコートについて二、三の基礎的な試験を行った。

1. だいず根瘤菌の増殖におよぼすパラコート等、数種除草剤の影響

実験材料および方法

培地中におけるだいず根瘤菌の増殖におよぼす除草剤の影響を調査した。

除草剤は、市販のパラコート液剤2種(グラモキソン;有効成分:1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, 24%含有,パラゼット;1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dimethylsulfate, 38%)およびベンチオカーブ乳剤(S-p-chlorobenzyl diethylthiocarbamate, 50%), MCP エチル水和剤(ethyl [(4-chloro-o-tolyl) oxy] acetate, 14%), リニュロン水和剤(3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea, 50

%), NIP 乳剤(2,4-dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether, 25%), CAT 水和剤(2-chloro-4,6-bis(ethylamino)-s-triazine, 50%), DCPA 乳剤(3',4'-dichloropropion anilide, 35%)の計8種を用いた。

培地は酵母エキス・マンニット培地を用い、その49mlを200ml容三角フラスコに入れて高圧滅菌した後、各除草剤の希釈液1ml宛を無菌的に混入し、除草剤の有効成分がそれぞれ所定の濃度になるように調整した。この培地に、あらかじめ酵母エキス・マンニット寒天培地上で生育させた当研究室保存の*Rhizobium japonicum*を接種して24°Cの恒温室内で振とう培養し、0,2,4および8日目の培養液について、分光光度計(日立100-10型)を用いて、600nmにおける吸光度を測定することによって、*R. japonicum*の増殖を比較した。

実験結果および考察

はじめに供試除草剤の濃度がそれぞれ10,40および160ppmとなるように調製された培地中における*R. japonicum*の増殖を調査したが、第1図に示すとおり供試除草剤のなかではパラコート液剤2種による*R. japonicum*の増殖阻害がもっとも著しく、ついでDCPA, NIP, リニュロンによる阻害が認められたが、パラコート液剤は他の除草剤と比較して*R. japonicum*に対する極めて強い抗菌性を有するものと考えられた。

そこでパラコートについて、さらに低い濃度で*R. japonicum*の増殖阻害を調査した結果、第2図に示すとおり2~4ppmの濃度においても若干の阻害を示し、8ppmの濃度では完全にその増殖を阻止した。

2. 土壌に混入したパラコートの土壌細菌、とくにだいず根瘤菌におよぼす影響

前項のようにパラコート液剤は培地中において*R. japonicum*に対する強い抗菌性を示したが、土壌中に

* 本研究は文部省科学研究費特別研究環境科学(I)による補助金によって行われた。

** 島根大学農学部、耕地環境保全学研究室
Fac. of Agric., Shimane Univ., Matsue 690, JAPAN

*** 現在、岡山県倉敷地方振興局、農林事業部
Okayama Pref. Office, Okayama, 700, JAPAN

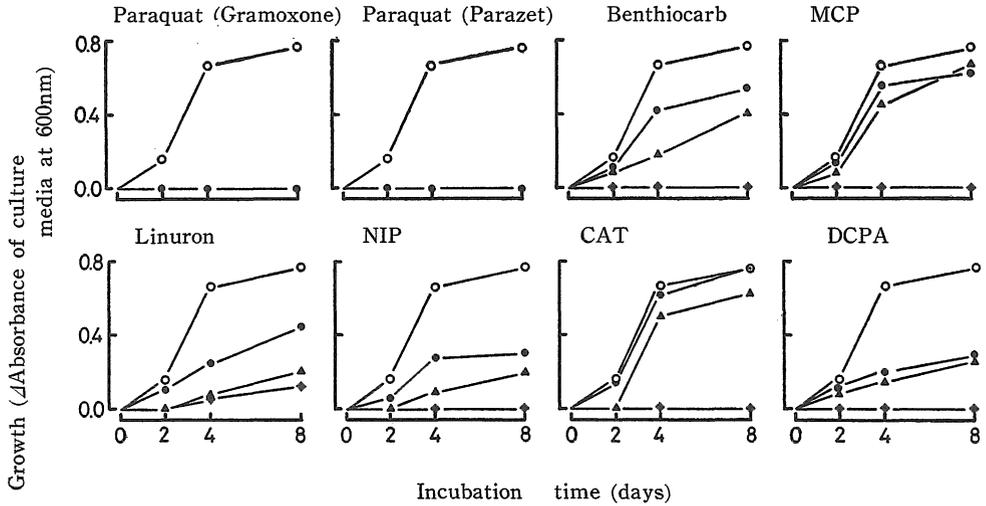


Figure 1 Growth of *R. japonicum* in yeast extracts-mannitol medium contained herbicides. Symbols: control (○-○), 10ppm (●-●), 40ppm(▲-▲), 160ppm(◆-◆)

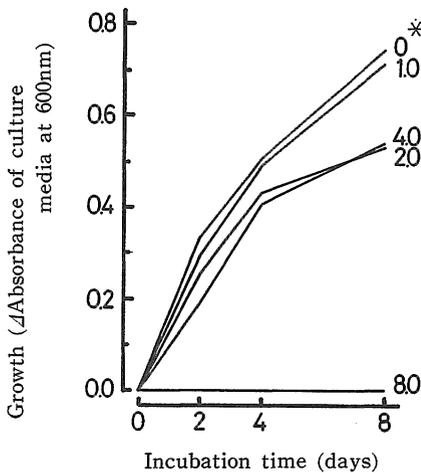


Figure 2 Growth of *R. japonicum* in yeast extracts-mannitol medium contained paraquat in various concentrations.

* Paraquat content of the medium (ppm)

においては土壤粒子に強く吸着されることによって不活化され、また微生物による分解も受け難いことが報告されている^{2),7)}。したがって培地中で認められた抗菌性も土壤中においては弱められるものと考えられる。一方、土壤に吸着されたパラコートが土壤微生物に対して全く影響がないものかどうか不明である。

そこで土壤中におけるパラコート液剤の抗菌性とその *R. japonicum* の増殖におよぼす影響を調査した。

実験材料および方法

島根大学農学部の除草剤無散布圃場より採取した土壤

(Sandy clay loam, 有機物含量 1.50%, 全窒素 0.11%, 最大容水量 40.0%, pH_{KCl} 5.7) にその水分含量が 20% (最大容水量の 50%) となるように、またパラコートが乾土 1g 当り 1, 2 および 4mg となるようにパラコート液剤 (グラモキシオン) の希釈液を散布し、試験管に 10g 宛充填後アルミ箔で覆い、28°C の湿室内に静置した。0, 8, 16 および 32 日後、それぞれの土壤から平板希釈法によって土壤細菌の経時的分離を試み、土壤中におけるパラコートの細菌におよぼす影響を調査した。分離用培地はアルブミン寒天培地を用い、28°C で 7 日間培養の後、コロニー数を計数した。

R. japonicum に対する影響は、土壤から *R. japonicum* だけを選択分離することが困難であるので間接的な方法を用いた。すなわち土壤 10g に水分含量が 20% となるように、またパラコートが乾土 1g 当り 1, 2, 3, 4 および 6mg となるようにパラコート液剤の希釈液を散布し、24 時間室温で放置後、48ml の蒸留水を加えて 30 分間往復振とう器で振とうし、遠心分離 (3,000rpm, 30分) して得た上澄液 40 ml と酵母エキス・マンニット培地 10ml を 200ml 容三角フラスコに入れて高圧滅菌した。このようにして調整した培地に、あらかじめ培養した *R. japonicum* を接種して 28°C の恒温室内で振とう培養し、土壤から水抽出されたパラコートの *R. japonicum* の増殖におよぼす影響を調査した。なおパラコートの抗菌性は、120°C, 10 分間の高圧滅菌処理によって不活化されないことを予備試験で確認した。

上記の方法による水抽出液中のパラコートの量は、アオウキクサ (*Lemna paucicostata* Hegelm) を検定植

物として推定し、これを土壤粒子に吸着されていないパラコートの量とした。すなわち、水抽出液を適宜希釈した液中でアオウキクサを照明下、24時間培養し、枯死にいたる障害の程度を調査して既知濃度のパラコート液剤の希釈液中のそれと比較した。

一方、土壤中におけるダイズ根瘤菌の活性を示す指標として、パラコート液剤を散布した土壤でダイズを栽培し、根瘤着生におよぼす影響を調査し、パラコートの根瘤菌の活性におよぼす影響を検討した。この実験では、パラコート液剤を乾土 1g 当り 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 および 2.0mg 散布した土壤を調整して素焼植木鉢に入れ、ダイズ（品種：アカザヤ）を播種して昼 25°C（12時間）、夜 20°C のファイトトロン内で 1ヶ月間栽培後、根瘤着生数を調査した。

実験結果および考察

第 3 図にパラコート液剤処理土壤から経時的に分離される細菌数を示した。0.1mg/g 乾土の処理土壤においても分離される細菌数は若干減少した。また 1.0 および 2.0mg/g 乾土の処理土壤では無処理区の約 50% に減少して推移し、32日目まで回復は認められなかった。供試濃度のパラコートは土壤中において一般の細菌数を減少させるものと考えられた。第 4 図にアオウキクサを用いた検定によって推定される各処理土壤から水抽出されたパラコートの量を示した。抽出液中のパラコートは、2.0mg/g 乾土以下の処理土壤では全く検出できなかったが、4.0mg/g 乾土以上の処理土壤では処理されたパラコートの量が増加するにしたがって抽出液中のパラコートは急激に増加し、供試土壤によるパラコートの吸着はおよそ 2.0～4.0mg/g 乾土であると推定された。このことと、第 3 図の結果、すなわち土壤細菌数が 1.0

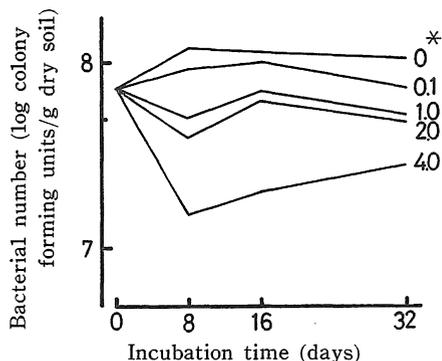


Figure 3 Effects of paraquat on quantitative changes in soil bacteria. * Paraquat content of soil (mg/g dry soil)

mg/g 乾土の処理区で無処理区の50%に減少して推移したことを考え併せると、土壤中の細菌は吸着されているパラコートとの接触によっても何らかの影響を受けているものと考えられた。

第 5 図に 2.0～6.0mg/g 乾土のパラコート液剤を処理した土壤からの水抽出液培地中における *R. japonicum* の増殖を示した。ただし、それぞれの処理区からの水抽出液に対して 1/5 容の培地を添加しているので、理論的にはそれぞれ 1.6, 2.4, 3.2 および 4.8mg/g 乾土の処理土壤からの抽出液によって試験されたことになる。図には示されていないが、1.0mg/g 乾土 (0.8mg/g 乾土相当) 以下の処理土壤からの水抽出液中では、*R. japonicum* の増殖阻害は認められず、2.0mg/g 乾土以上処理した土壤の水抽出液を含む培地中で増殖阻害が認められ、アオウキクサを用いた検定によってパラコートの存在が認められた第 4 図の成績と同様、2.0～4.0mg/g 乾土の処理土壤を境に土壤に吸着されないパラコートが急激に増加するものと考えられた。

一方、根瘤の着生におよぼすパラコートの影響は、第 6 図に示すとおり、1.0mg/g 乾土の処理区で着生数は約 60% の阻害を受け、2.0mg/g 乾土の処理区では完全に阻害され、一般の土壤細菌の場合と同様、水抽出されない、土壤に吸着していると考えられるパラコートの影響が示唆された。この成績は、パラコートの直接の殺菌作用による根瘤菌数の減少にもとづくものか、あるいは根瘤菌のダイズの根への侵入、根瘤形成の阻止によるものかは明らかでないが、水抽出液中の根瘤菌の増殖の結果を併せて考えると菌数の減少よりもむしろ侵入、根瘤

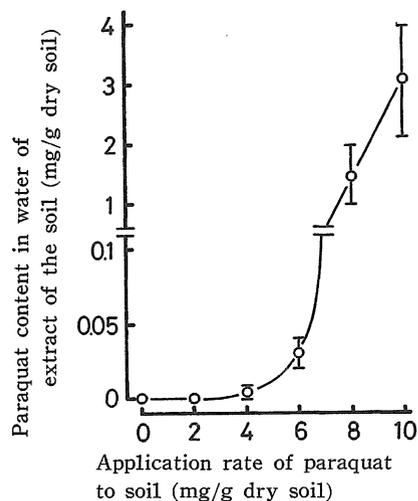


Figure 4 Paraquat content in water extract of the paraquat-treated soil. The content was estimated using Lemna assay.

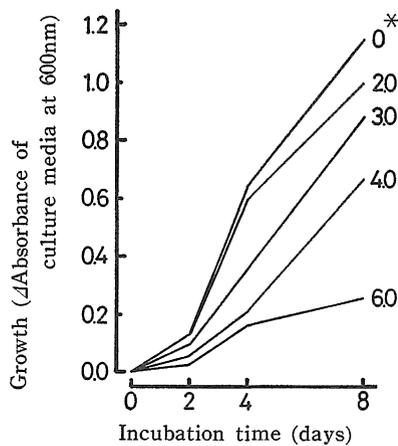


Figure 5 Growth of *R. japonicum* in mixture solution of 4 parts of water extracts of soil and 1 part of yeast extracts-mannitol medium. * Paraquat content of soil (mg/g dry soil) from which free paraquat was extracted with water.

形成の阻害によるものではないかと考えられる。

本実験で供試したパラコート液剤の濃度は、圃場で常用される濃度よりはるかに大きく、実際のダイズ栽培におよぼす影響についてはさらに検討が必要であるが、パラコートの吸着容量は、土性によって著しく異なり、とくに砂質土ではその不活化能力は小さいので、継続的な散布は遊離のパラコートを増加させ、土壤微生物間の平衡を崩し、根粒形成能の低下を招く等の危険があると考えられる。

摘 要

パラコート等、数種除草剤の *R. japonicum* の増殖におよぼす影響を除草剤を混入した培地中で試験した。増殖阻害はパラコートが最も著しく、8ppm でその増殖を完全に阻止した。パラコート処理した土壤の水抽出液を用いて土壤中における *R. japonicum* におよぼすパラコートの影響を検討したところ、乾土 1g 当り 2~4mg

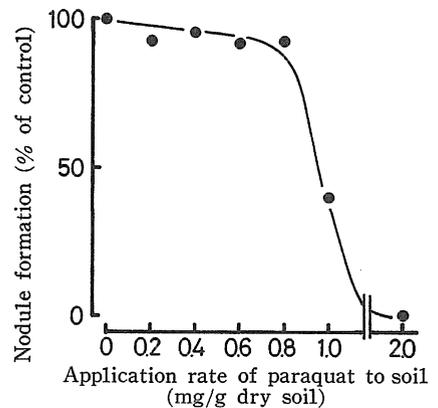


Figure 6 Effects of paraquat on root nodule formation of soy bean plant.

以上の処理土壤からの抽出液で阻害が認められ、アオウキクサを用いた検定においても乾土 1g 当り 2~4mg 以下のパラコートは土壤に強く吸着された。一方、土壤中の細菌数およびダイズの根粒着生数は乾土 1g 当り 1mg の処理土壤で対照区に比べ半減し、土壤に吸着されたパラコートも *R. japonicum* を含めた土壤細菌に対して影響をおよぼしているものと考えられた。

引用文献

- 1) 土壤微生物研究会編：土壤微生物実験法, 216-217, 養賢堂 東京, 1975
- 2) グラモキソン編集委員会編：グラモキソン, 35-70, グラモキソン協議会, 1973
- 3) GREAVES, M. P., H. A. DAVIS, J. A. P. MARSH and G. I. WINGFIELD: CRC Critical Reviews in Microbiology, 5(1), 1-38, 1976
- 4) 石沢修一：微生物と植物生育, 87-94, 博友社 東京, 1977
- 5) KNIGHT, B. A. G and T. E. TOMLINSON: J. Soil Sci., 18, 233, 1967
- 6) ROSLYCKY, E. B. : Can. J. Microbiol., 23, 426-433, 1977
- 7) TU, C. M. and W. B. BOLLEN: Weed Res., 8, 28-37, 1968

Summary

Effects of paraquat and some herbicides on the growth of *Rhizobium japonicum* were tested by liquid culture using media added these herbicides (formulation on the market). The growth were clearly inhibited, particularly by paraquat. In the media contained 8ppm of paraquat, the growth of *R. japonicum* was inhibited completely. Effects of paraquat on *R. japonicum* in soil was determined by the growth in media mixed with water extracts of paraquat-treated soil. Estimation of paraquat in the water extracts was made by Lemna assay. It was estimated that paraquat applied to soil at the rate of 2-4mg and below/g dry soil was adsorbed strongly on soil particles. Nevertheless, paraquat-treated soil at the rate of 1mg/g dry soil resulted in decreased soil bacterial populations and root nodule formation of soy bean plant under those in non-treated soil. Judging from the results, it is likely that adsorbed paraquat on soil particles also affects to *R. japonicum* in the soil.