

報 文

拮抗能を持つ放線菌を利用したフザリウム病害の抑制  
第2報：有機物の選抜と拮抗放線菌利用資材の調製

高木 滋 樹<sup>1</sup>・北村 章<sup>1</sup>・丸本 卓哉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>フマキラー株式会社

〒739-04 広島県佐伯郡大野町梅原1-11-13

<sup>2</sup>山口大学農学部

〒753 山口市吉田1677-1

Control of Fusarium Disease Using Antagonistic Actinomycetes  
II. Selection of Organic Matter and the Preparation of  
Microbial Materials Containing Antagonistic Actinomycetes

Shigeki TAKAKI<sup>1</sup>, Akira KITAMURA<sup>1</sup> and Takuya MARUMOTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fumakilla Ltd., 1-11-13 Umehara, Ohno, Hiroshima, 739-04 Japan

<sup>2</sup>Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753 Japan

Effects of various organic materials on the microbial flora and the activities of selected antagonistic Actinomycetes to *Fusarium oxysporum* in soil were investigated. Thereafter, a sample of antagonistic microbial *Material A* (mixture of selected antagonistic Actinomycetes and organic matter, compost made of photosynthetic bacterial sludge: CPBS) was prepared and tested for its antagonistic activity to *F. oxysporum* and the fixation rate in soil.

1. Compost made of photosynthetic bacterial sludge (CPBS) was selected as an organic material which promotes the Actinomycetes activity in soil.
2. Antagonistic effect of *Material A* on radish yellows and Fusarium wilt of cucumber caused by *F. oxysporum* f. sp. *raphani* and f. sp. *cucumerinum* was observed. The effect was more pronounced in the case of the mixture of five antagonistic Actinomycetes than when only a single species was used.
3. The number of Actinomycetes in four different soil samples were increased by the application of *Material A* and they maintained a relatively constant level. However, the number of *F. oxysporum* was not affected by the application.
4. Activities and fixation rates of applied antagonistic Actinomycetes in soil and in/on radish roots varied with each microbial species, respectively.

Key Words: antagonistic actinomycetes, *Fusarium oxysporum*, organic material, radish yellows, fusarium wilt

序 言

筆者らは、第1報において *Fusarium oxysporum* に拮抗能を有する放線菌を選抜し、これらの菌株のダイコン萎黄病に対する発病抑制効果を確認した。しかし、拮抗菌による発病抑制効果を安定して発揮させるためには、施用拮抗菌の土壤への定

着を容易にすることと、拮抗菌が活動しやすい土壤条件を整備することが必要である。そのためには、拮抗微生物に対する栄養源としての有機物資材の検討が重要である。

しかしながら、有機物は多種多様であり、微生物の生育や増殖に与える影響は一様ではない。また、堆肥などはそれ自体多量の微生物を含んでおり、もし多量施用されれば、土壤微生物相に与える影響は大きい。松田<sup>1)</sup>は有機物施用によって土壤

病害が抑制または逆に助長されるという両極端の結果を報告している。つまり、土壤病害の抑制策として有機物を施用し、成功した例<sup>2,3,4)</sup>も少なくないが、常に効果が得られるとは限らず、まだ不安定な要素を多く持っていると考えられる。

著者らは、有機物と土壤病原菌に対して拮抗能を有する微生物を組み合わせることによって、このような不安定さを減少させ、安定的に土壤病害を抑制できるのではないかと推察した。

そこで本報では、各種の有機物が土壤微生物相に与える影響を調査し、土壤中で放線菌を選択的に活性化させる有機物の選抜を行った。そして、選抜された有機物を拮抗放線菌と組み合わせた拮抗放線菌利用資材を調製し、ダイコン萎黄病およびキュウリつる割病に対する発病抑制効果および拮抗放線菌の土壌及び根部への定着について検討した。

## 実験方法

### 1. 有機物の選抜

土壤中の放線菌密度を高める有機物を検索する目的で、植物由来の有機物としてエノキ茸培養残渣 (RM: Residue of mashroom), バーク (BK: Bark) 及びコーヒー粕 (RCE: Residue of coffee extract), 排水処理コンポストとして下水処理活性汚泥発酵物 (SC: Sludge compost), 光合成細菌処理汚泥 (PBS: Photosynthetic bacterial sludge) 及び光合成細菌処理汚泥発酵物 (CPBS: Compost of photosynthetic bacterial sludge), 家畜糞及び厩肥として乾燥鶏糞 (FB: Feces of broiler), 発酵豚糞 (PC: Pig compost) 及び発酵牛糞 (CC: Cow compost), その他として木炭 (CHA: Charcoal), キチン (CHI: Chitin) 及びキトサン (CHT: Chitosan) が土壤微生物相に与える影響を調査した。使用した土壌は、広島県大野町の砂壤土 (第1報) であり、その中に含まれる有機物、微生物の影響を少なくするため熱水抽出をした後の残渣を風乾して使用した。

前記風乾土壌に熱水抽出前の土壌を微生物接種源として1/100加え、水分20%に調製したのち24時間25°Cで前培養した。この土壌20gを100ml三角フラスコに入れ、各有機物0.5gを添加混合し、25°Cで培養を行い、0, 1, 2, 3, 4, 8週間後に土壌微生物数を希釈平板法で測定した。

8週間目の菌密度について以下の式で菌数比を

算出した。

菌数比 =  $\log_{10}$  (有機物添加区の微生物数/有機物無添加区の微生物数)

### 2. 資材の調製

調査した有機物の中で最も放線菌密度を高めたCPBS 1kgに対し、第1報で選抜された拮抗菌放線5株<sup>5)</sup>をそれぞれ5日間培養したグルコースブイヨン液体培地を50mlずつ、計250ml混合した。発酵槽にて2週間培養を行い、拮抗菌添加CPBS資材 (以下資材Aとする) を調製した。単一放線菌株については、CPBS中の微生物の影響を除外するため、オートクレーブ殺菌したもの1kgに対し、各菌株の培養液50mlを添加して同様に調製した (CPBS-1~CPBS-5, Table 3)。

#### 1) 資材Aの性質

資材Aの菌密度及び化学性を測定した。菌密度は希釈平板法で測定し、全窒素はケルダール法で、全炭素はチューリン法で、pHはガラス電極法で測定した。

#### 2) 土壤微生物相に与える影響

資材Aが土壤微生物相に与える影響を実験1.と同様に調査した。

増殖倍率は以下の計算式で算出した。

増殖倍率 =  $\log_{10}$  (各有機物添加土壌の微生物数/初期無処理区微生物数)

### 3. 資材Aの発病抑制効果

#### 1) ダイコン萎黄病に対する効果

資材Aのダイコン萎黄病に対する発病抑制効果をポット試験で確認し、CPBS及び各菌添加資材 (CPBS-1~CPBS-5) と比較した。

方法は、第1報<sup>6)</sup>で報告したように、岡山県で分離されたダイコン萎黄病菌 *F. oxysporum* f. sp. *raphani* を使用し、大野土壌を用いた殺菌土と発病土を5:1の比率で混合した土壌をa/5,000のポットに詰め供試土壌とした。

供試土壌に各資材を20g/ポット添加混合し、1週間後にダイコン種子 (タキイ種苗, 耐病総太り) をポットあたり12粒播種した。播種2週間後にポットあたり3株残して間引きを行い、播種4週間後に収穫した。

なお試験は1区3ポット、合計9植物個体で行った。

発病程度は前報<sup>6)</sup>と同様に評価し、発病率、発病度及び防除価を算出した。

#### 2) キュウリつる割病に対する抑制効果

CPBS, または各菌添加資材 (CPBS-1~CPBS

-6) を土壌に1:10の比率で混合後、約1ヶ月25°Cで静置した。CPBS-6は、オートクレーブ殺菌したCPBSに5株の拮抗放線菌を混合添加して調製した。高知県で分離されたキュウリつる割病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* の分生孢子懸濁液を土壌に噴霧し、約1ヶ月25°Cで静置した。これらの資材を混合した土壌とつる割病菌を混合した土壌を1:1の比率で混合して腰高シャーレに入れ、キュウリ種子(タキイ種苗、四葉キュウリ)を25粒播種し10日及び17日後に発病を観察した。

### 3) 拮抗菌の土壌及び根部への定着

上記ダイコン萎黄病抑制効果の検定試験において土壌(深さ3~5cm)とダイコン根部の全放線菌と選抜放線菌の密度を希釈平板法で測定した。根の場合には、水洗後、殺菌水中で磨砕して供した。

培地上で生育した放線菌が添加した拮抗菌であるかどうかの確認は、生育したコロニーについて、添加拮抗菌と対峙培養を行い、形態的な観察、色素生成により判別を行った。

### 4. 土壌中の放線菌及び *F. oxysporum* 密度に与える資材A添加の影響

実際にダイコン萎黄病が発生している4ヶ所の土壌を用いて、土壌中の放線菌密度および *F. oxysporum* 密度に与える資材A添加の影響を調べた。方法は実験方法1.と同様である。

使用した土壌は岡山県真庭郡八束村土壌(黒ボク土)、宮崎県宮崎郡田野町土壌(黒ボク土)、福島県大沼郡昭和村土壌(赤色土)及び広島県佐伯郡大野町土壌(砂壤土)の4種類である。土壌の理化学性および生物性をTable 1に示した。

## 結果及び考察

### 1. 有機物のスクリーニング

各種有機物添加後8週間目の細菌、放線菌、糸状菌及び *F. oxysporum* の菌数比をFig. 1に示した。調査した有機物は四つのタイプに分類された。第一のタイプとして、木炭及び活性汚泥は微生物数に影響を与えなかった。第二として、キトサン、乾燥鶏糞、発酵豚糞及び発酵牛糞はすべての微生物数を増加させた。第三として、パーク、エノキ茸培養残渣及びコーヒー粕は糸状菌数及び *F. oxysporum* の菌数を増加させた。第四として、キチン、PBS及びCPBSは細菌数及び放線菌数を増加させた。これらの結果は有機物の種類によって土壌微生物相に与える影響が異なることを示している。したがって、導入する有機物の種類によって拮抗菌の定着、活動及び *F. oxysporum* の活性ひいては発病に与える影響は異なるかと推察された。

本試験の結果からは、供試した有機物のうち最も放線菌密度を高めたCPBSを選抜し、これに第1報<sup>9)</sup>で選抜した拮抗放線菌を添加した資材を調製することにした。

### 2. 資材の調製

#### 1) 資材Aの性質

資材AはpHが中性であり、C/N比も10に近い化学性を示した(Table 2)。また、細菌、放線菌密度が高く、*F. oxysporum* は検出されなかった。

添加した拮抗放線菌は5株とも棲息が確認された。

#### 2) 土壌微生物相に与える影響

資材Aは、その中の細菌、放線菌密度が高い(Table 2)ので、これを添加した土壌ではCPBSもしくはキチンと比較して初期放線菌密度が高くなり、その高い密度は8週間目まで維持された(Fig.

Table 1 Soil properties

		Soil			
		Showa	Yatuka	Tano	Ohno
pH(H <sub>2</sub> O)		6.35	6.84	6.34	6.80
EC	µs/cm	83	57	137	128
Total nitrogen	%	0.148	0.270	0.521	0.169
Organic carbon	%	1.859	3.971	6.964	2.036
Bacteria	CFU/g dry soil	4.66×10 <sup>7</sup>	2.17×10 <sup>7</sup>	6.19×10 <sup>7</sup>	5.54×10 <sup>7</sup>
Actinomycetes	〃	3.89×10 <sup>6</sup>	7.41×10 <sup>4</sup>	9.33×10 <sup>4</sup>	2.69×10 <sup>4</sup>
Fungi	〃	2.67×10 <sup>4</sup>	9.62×10 <sup>3</sup>	1.01×10 <sup>5</sup>	4.61×10 <sup>5</sup>
<i>F. oxysporum</i>	〃	5.89×10 <sup>3</sup>	3.16×10 <sup>3</sup>	3.23×10 <sup>2</sup>	2.82×10 <sup>3</sup>

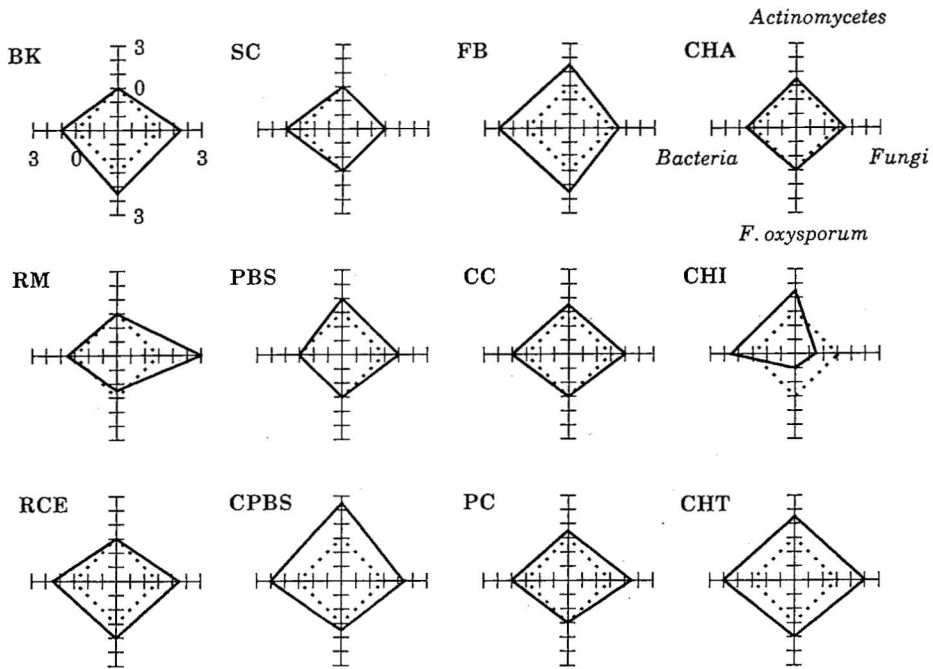


Fig. 1 Effect of amendment of organic materials on soil microorganisms

Every axis (left; Bacteria, right; Fungi, upper; Actinomycetes, under; *F. oxysporum*) indicates the proportion of the number of microorganisms at 8 weeks after the application of organic materials.

BK; Bark, RM; Residue of mushroom, RCE; Residue of coffee extract, SC; Sludge compost, PBS; Photosynthetic bacterial sludge, CPBS; Compost made of photosynthetic bacterial sludge, FB; Feces of broiler, CC; cow compost, PC; Pig compost, CHA; Charcol, CHI; Chitin, CHT; Chitosan

2)。 *F. oxysporum* の密度は、無処理区と同様の推移を示した。

キチン添加区においては、有機物のスクリーニングの結果 (Fig. 1) と同様に *F. oxysporum* の密度が低下した。こうした *F. oxysporum* 密度の低下によりキチンの発病抑制効果<sup>5,6,7)</sup>が発現されるものと推察される。

3. 資材Aの発病抑制効果

1) ダイコン萎黄病に対する効果

CPBS添加区において、ダイコン萎黄病の発病抑制が観察され (Table 3), 選抜した有機物・CPBSはダイコン萎黄病に対してキチンと同様、抑制的に働くことが確認された。

各菌添加資材区 (CPBS-1 ~ CPBS-5) においては、いずれの菌株も CPBS 添加区より発病抑制効果は高かった。5株を混合培養した資材A添加

Table 2 Characteristics of Material A containing 5 antagonistic Actinomycetes

		Material A
Bacteria	CFU/g d.m.	$1.91 \times 10^9$
Actinomycetes	〃	$1.71 \times 10^8$
Fungi	〃	$7.25 \times 10^5$
<i>F. oxysporum</i>	〃	ND*
pH		7.3
EC	$\mu\text{s}/\text{cm}$	1890
Total nitrogen	%	2.01
NH <sub>3</sub> -nitrogen	mg/100 g d.m.	182.09
NO <sub>3</sub> -nitrogen	〃	6.17
Organic carbon	%	25.63
C/N		12.8

\*Not detected

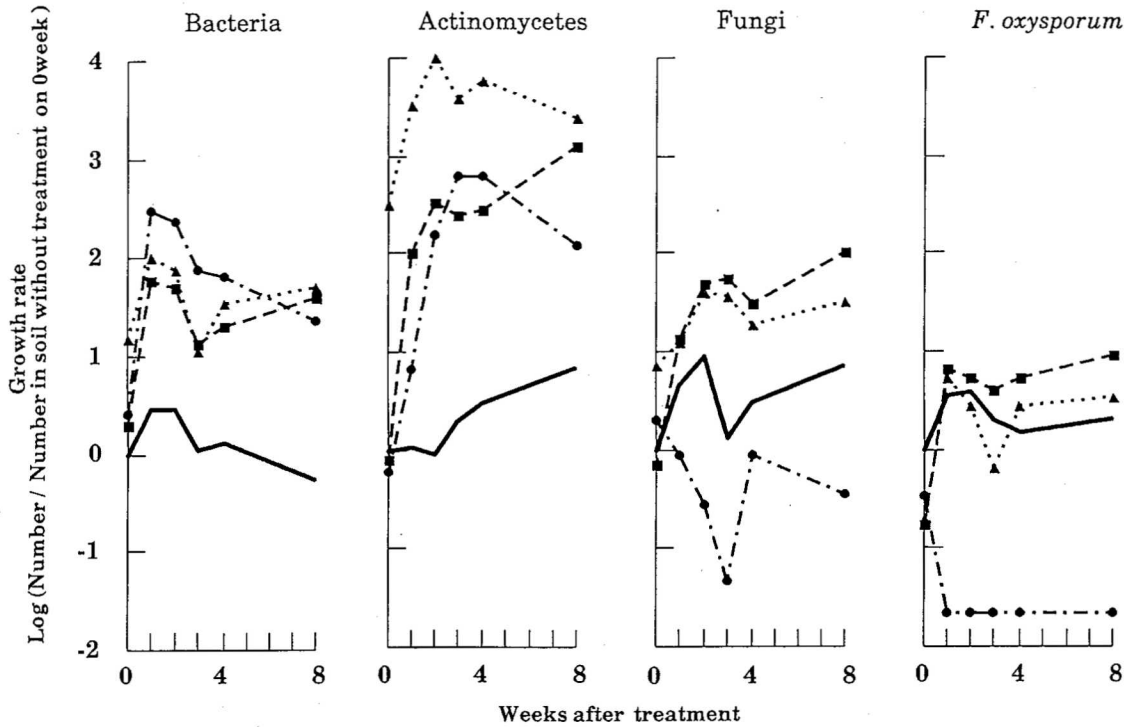


Fig. 2 Changes in the growth rate of microorganisms in the soil amended with some organic materials

— : No treatment    ■ : CPBS    ▲ : Material A    ● : Chitin

Table 3 Control of radish yellows by application of organic materials

Treatment	Infection (%)	Degree of infection	Suppression (%)
No treatment	77.8	63.0 ± 6.4****	—
CPBS*	66.7	51.9 ± 6.4	17.7
CPBS-1(+15-1-2**)	55.6	22.2 ± 11.1	64.7
CPBS-2(+15-1-4**)	55.6	33.3 ± 11.1	47.1
CPBS-3(+66-1-1**)	44.4	29.6 ± 28.0	53.0
CPBS-4(+67-1-4**)	55.6	33.3 ± 0.0	47.1
CPBS-5(+83-2-3**)	44.4	25.9 ± 6.4	58.8
Material A***	22.2	14.8 ± 25.7	76.5

\* Compost made of photosynthetic bacterial sludge

\*\* Sample number of selected antagonistic Actinomycetes (TAKAKI *et al.* 1992)

\*\*\* Material A contains a mixture of five antagonistic Actinomycetes

\*\*\*\* S.D.

区は、各菌株を単独で混合した各菌添加資材区 (CPBS-1~CPBS-5) よりさらに発病抑制効果は高くなった。

これらの発病抑制効果は、第1報<sup>9)</sup>で報告した有機物を加えない拮抗菌単独の発病抑制効果と比較して、いずれの菌株でも高いことから、拮抗菌を有機物と組み合わせることの重要性が確認された。

## 2) キュウリつる割病に対する抑制効果

CPBSと15-1-4株または83-2-3株を組み合わせた場合顕著な発病抑制効果が確認されたが、他の菌株の場合は効果が低く、同じ有機物と組み合わせてもその中に棲息する菌種によって発病抑

制効果は異なった (Table 4)。

拮抗菌5株を混合したCPBS-6添加区においては、各単独菌株と選抜された有機物とを組み合わせた資材より効果はさらに大きかった。この結果は複数の拮抗菌を組み合わせることにより防除効果が高まることを示している。ただCPBS-6は殺菌したCPBSを用いたため、資材Aと同じではないが、複数拮抗菌の混合効果は明らかであると知られる。

## 3) 拮抗菌の土壌及び根部への定着

最終調査時における土壌と根部放線菌密度は資材処理区の方が無処理区より高かった (Table 5)。いずれの菌株も土壌及び根部から再分離されたが、菌株によって菌密度は異なった。

このことより、同じ有機物と組み合わせても、菌株ごとに土壌及び根部における定着、活動は異なることが推察された。

また、土壌においては15-1-4株以外は土壌放線菌に対する添加放線菌の占有率は50%以上を示し、根部においては、83-2-3株以外は占有率が低かった。このように、資材の添加により根部で増加した放線菌は、導入した拮抗菌のみではなく土着の放線菌密度も高くなった。

## 4. 土壌中の放線菌及び *F. oxysporum* 密度に与える資材A添加の影響

資材A添加区では、4種類のいずれの土壌においても無処理区に比べ放線菌密度が高まった (Fig. 3)。 *F. oxysporum* 密度においては、資材Aの影響は観察されず、ほぼ無処理区と同様の推移を示した。その結果、資材Aは *F. oxysporum* に対する相

Table 4 Control of Fusarium wilt of cucumber wilt by CPBS and each antagonistic Actinomycetes

Treatment	Infection (%)	
	10 days	17 days
No treatment	87.5	100.0
CPBS*	62.5	95.0
CPBS-1(+15-1-2**)	85.0	100.0
CPBS-2(+15-1-4**)	22.5	22.5
CPBS-3(+66-1-1**)	42.5	45.0
CPBS-4(+67-1-4**)	77.5	100.0
CPBS-5(+83-2-3**)	17.5	47.5
CPBS-6***	7.5	10.0

\* Compost made of photosynthetic bacterial sludge

\*\* Sample number of selected antagonistic Actinomycetes (TAKAKI *et al.* 1992)

\*\*\* CPBS-6 contains a mixture of five antagonistic Actinomycetes

Table 5 Effect of application of antagonistic Actinomycetes on the number of Actinomycetes in soil and roots

	No treatment	CPBS+each antagonistic Actinomycetes				
		15-1-2	15-1-4	66-1-1	67-1-4	83-2-3
Soil Actinomycetes*	5.01×10 <sup>6</sup> (100)	2.20×10 <sup>7</sup> (445)	1.02×10 <sup>7</sup> (204)	2.69×10 <sup>7</sup> (537)	3.31×10 <sup>7</sup> (661)	3.24×10 <sup>7</sup> (647)
Applied**	—	1.78×10 <sup>7</sup>	2.95×10 <sup>5</sup>	2.63×10 <sup>7</sup>	3.09×10 <sup>7</sup>	6.16×10 <sup>7</sup>
Occupation ratio***	—	76.2	2.9	97.8	93.4	52.6
Roots Actinomycetes	1.02×10 <sup>4</sup> (100)	2.29×10 <sup>5</sup> (505)	7.08×10 <sup>5</sup> (3401)	1.66×10 <sup>6</sup> (3093)	1.00×10 <sup>6</sup> (1480)	5.24×10 <sup>5</sup> (794)
Applied	—	1.02×10 <sup>4</sup>	1.58×10 <sup>4</sup>	1.41×10 <sup>4</sup>	1.25×10 <sup>5</sup>	3.72×10 <sup>5</sup>
Occupation ratio	—	5.2	2.2	0.8	12.5	71.5

\* Actinomycetes cfu/g dry soil or CFU/g fresh root

\*\* Applied actinomycetes *ibid*

\*\*\* Occupation ratio is expressed as the (number of applied actinomycetes)/(number of actinomycetes)×100 (%)

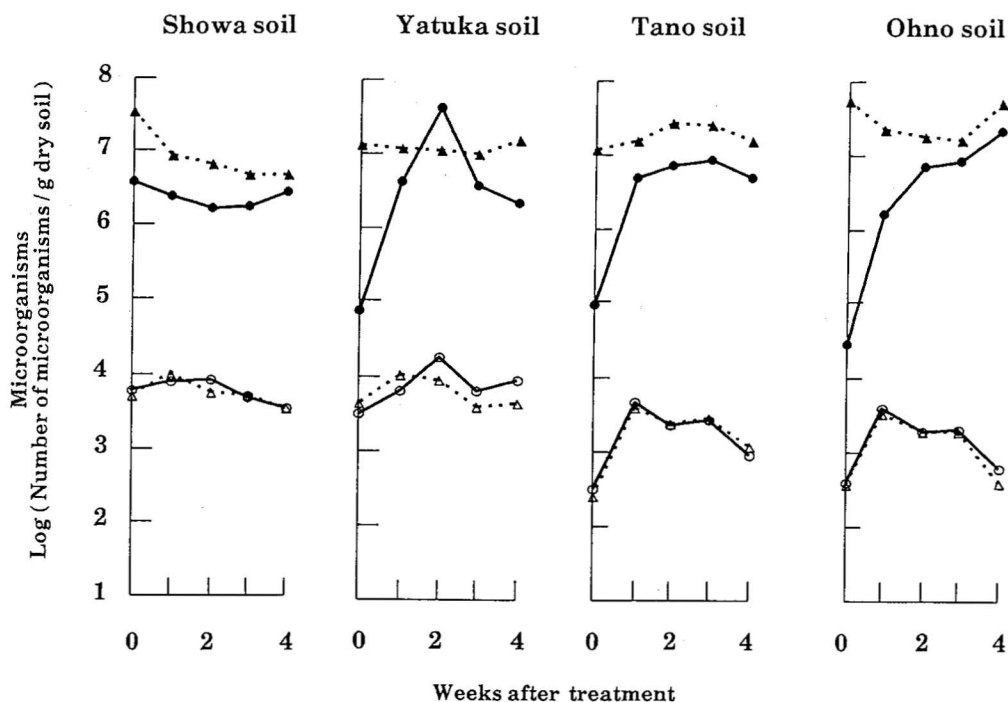


Fig. 3 Changes in the number of actinomycetes and *F. oxysporum* in soils amended with *Material A*

●: Actinomycetes, No treatment      ▲: Actinomycetes, *Material A*  
○: *F. oxysporum*, No treatment      △: *F. oxysporum*, *Material A*

対的放線菌密度を高めたことになる。

以上の結果から、拮抗放線菌を利用した微生物資材の調製に関して、数種の拮抗菌を組み合わせること及び培地に適当な有機物を選択することによって、病原性 *F. oxysporum* に対する病害抑制効果を高めることができ、現地圃場において実用可能な資材調製の一応のめどがついたと思われた。ただし、第1報で述べたように、選抜した菌株はpH中性付近で生育が良好で抗菌活性が高いと考えられるために、極端に高かったり低かったりする土壌pHの影響を小さくしながら病害抑制効果を高める施用方法を検討する必要があると推察された。

第3報においては、調製した拮抗微生物資材を用いて行ったフザリウム病害の抑制に関するポット及び圃場試験の結果を中心に報告する。

### 要 旨

1) キチンと同様に土壌内で特異的に放線菌密度

を高める有機物をスクリーニングした結果、光合成細菌処理汚泥発酵物 (CPBS) が選抜された。

2) 第1報で選抜した5株の拮抗菌をCPBSに添加・培養させた資材を調製した。調製した資材は細菌、放線菌密度が高く、添加した拮抗放線菌の存在が確認された。

3) CPBSと拮抗放線菌を組み合わせた資材のダイコン萎黄病及びキュウリつる割病に対する発病抑制効果を検討した結果、発病抑制効果が確認された。発病抑制効果は第1報で報告した拮抗菌のみの場合よりも有機物と拮抗菌を組み合わせた場合で大きく、また単菌株よりも複数の拮抗菌を組み合わせた場合に顕著であった。

4) ダイコン萎黄病発病抑制試験において、添加した各菌株は土壌及び根部より再分離されたが、菌株によって菌密度は異なり、菌株により土壌及び根部での定着とその活動は異なると推察された。

5) 4種類の異なった土壌において、拮抗菌を含

む資材Aは放線菌密度を高め、*F. oxysporum* 密度には影響を与えなかった。

6) 以上のように放線菌密度を選択的に高める有機物と拮抗菌を組み合わせた資材は各種土壌で放線菌密度を高め、ダイコン及びキュウリにおいて発病を抑制した。しかしその作用については今後の解明が必要である。

#### 参考文献

- 1) 松田 明(1981)土壌伝染病の生態的防除手段としての輪作と有機物施用, 植物防疫, **35**, 108-114
- 2) 松尾卓見ら(1980)作物のフザリウム病, 349-356, 全国農村教育協会, 東京
- 3) 松田 明(1978)土壌病害からみた有機物のほ場施用法, 植物防疫, **32**, 231-237
- 4) 松口龍彦(1986)根圏微生物の機能と作物の生育, 農業技術, **41**, 451-457
- 5) 孫工弥寿雄・野村良邦(1988)キチン質有機物の土壌施用によるキャベツ萎黄病の防除効果と拮抗微生物による効果発現機構, 農業及び園芸, **63**, 867-872
- 6) MITCHELL, R. and ALEXANDER, M. (1962) Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **26**, 556-558
- 7) 駒田 旦・竹内昭志郎・井上義孝(1965)ダイコン萎黄病の生態学的研究, 土と微生物, **7**, 41-48
- 8) 高木滋樹・北村 章・丸本卓哉(1992)拮抗能を持つ放線菌を利用したフザリウム病害の抑制 第1報:拮抗菌のスクリーニング, 本誌, 本号, 35-40