

活性汚泥コンポスト中の植物生長促進作用に関わる根面微生物

森本 正則・今村 真由香・駒井 功一郎

(近畿大学農学部農芸化学科)

Plant growth promoting rhizobacteria in the bio-sludge compost

Masanori MORIMOTO, Mayuka IMAMURA and Koichiro KOMAI

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204
Nakamachi, Nara 631-8505, Japan*

Synopsis

Application of compost made from garbage and bio-sludge shows crop growth promoting effect in the farm. We have evaluated to the plant growth promoting effect of rhizobacteria (PGPR) separated from crop root applied with test compost. Some of separated rhizobacteria showed PGPR effect on the cucumber and tomato growth during inoculation of them. Though, some inhibitory zone was observed on the agar plate with compost suspended by water, all of separated bacteria did not show the antifungal activity against *Fusarium* sp. in vitro test. These facts suggest that PGPR contained in test compost, but these almost effective bacteria may be not incubate using incubation media in this time.

緒 言

我が国の廃棄物排出量は、一般家庭や流通・外食店等から排出される一般廃棄物が約5000万t、産業活動によって排出される産業廃棄物が約4億tであり、近年は横這い傾向であるが依然高水準である¹⁾。平成14年に施行された「食品リサイクル法」や環境問題への関心の高まりから、処理場や食品関連事業所からの有機性廃棄物のコンポスト化処理が注目されている。これらは、ゴミ処理という環境問題のみならず、コンポストを施用することによる連作障害や作柄改善といった農業問題の解決にも役立つと考えられている。

現代農業では、化学肥料に頼ることによる農地への有機物補給不足から土地が劣化することがある。さらに、微量ミネラル不足は、作物の病害虫耐性が低下や連作障害の恐れがある。これは、作物残渣を再び土地に還元させることによって完結するミネラルの循環が断ち切られた結果であり、さらには作物から摂取される微量ミネラル不足による健康問題にも関連しているのである²⁾。またコンポスト化技術は、有機性廃棄物を土壤へ還元するというリサイクルのみならず、焼却処分に伴う大気中への二酸化炭素排出量の低減、焼却灰の埋め立て地問題の解消、有機物の土壤への投入に伴う土壤改良、施肥効果作用など多くの利点を持っている。

さらに汚泥や生ゴミなどの有機性廃棄物を原料としたコンポスト中には、多くの微生物が存在しており、これらの施用は土壤中の微生物フローを多様化する。植物病原菌に対する拮抗性を利用することによる農薬使用低減の可能性も示唆されている。これは、農地へのコンポスト施用により土壤伝染病菌に対して拮抗作用を示す根圏微生物が増加したという研究報告から、コンポストの施用が植物病原菌の増殖を顕著に抑制することが示されている³⁾。

先述のように、コンポスト中には様々な微生物が存在し、特に有用微生物である植物生育促進根圏細菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria : PGPR)は植物に生長促進的に作用することが知

られており、土壤病害の軽減、窒素固定、微生物の化学物質分解能によるバイオレメディエーションなどの効果を持つ。PGPRは、Kioepperらがジャガイモ軟腐病の細菌抑制効果に関する研究で1978年に使い始めた言葉である⁴⁾。既に商品化された事例としてBioCoatやアグロシン84等は、日本でも軟腐病に対する高い防除効果が得られている。この様な有用微生物を用いて土壤病害の抑制や作物の生育促進能を發揮させるためには、微生物を何らかの形で土壤に投入しなければならない。そのために、細菌を種子や土壤に接種する手法はバクテリゼーションと呼ばれ、根面や根圏で増殖する微生物種が都合が良いことから根から分離される根面細菌を用いて多くの研究が行われている⁵⁾。実際、植物病原菌*Ralstonia solanacearum*が引き起こすトマト細菌性萎凋病に対するPGPR3種(*Serratia* sp., 蛍光性シュードモナス, *Bacillus* sp.)の生物学的防除効果が認められたり⁶⁾、ホウレンソウに対して蛍光性シュードモナスが生長促進能を持つことが報告されている⁷⁾。これらはPGPRが、抗菌性物質や酵素などを生産し病原菌の生育を阻止する拮抗微生物としての植物病原菌の生物的防除作用である。このような作用は不特定多数の微生物の拮抗作用によるものと、特定の病害に有効である特定の微生物の拮抗作用に基づくものがある。前者は主として、もともとの土壤中に生活している微生物を有機物施肥や環境調節などにより活性化させ、それによって病原菌の活動や生存を抑制して病害を防除する方法であり、後者は植物病原菌の対抗者、敵対者なるものすべてを生物防除に利用する方法である。糸状菌、細菌、ウイルスなどほぼすべての生物がこれに含まれる。拮抗微生物による病害防除のメカニズムとしては、病原微生物に対する抗菌性物質の生産、病原微生物との競合作用、病原微生物への寄生、弱毒ウイルスによる干渉作用などがある。

これらの観点から、農作物に作柄向上効果を示すコンポスト中に存在する微生物の植物に対する影響を明らかにすることが求められる。現在PGPRを生物肥料として商業的に開発する努力がなされており、その検索と作用機構の研究は急速

に拡大している。PGPRの窒素固定、根圏での養分利用性の増大、根の成長と形態への好影響、有用植物と微生物の共生などを組み合わせた作用機構や生物肥料として利用拡大する試みもみられている⁸⁾。有用微生物には、バイオコントロールの作用を持つ拮抗細菌の他、空中窒素を固定したり植物ホルモンを生産したりして直接植物の生長を促進するもの含まれる。この種の微生物の利用上の最大の問題点は接種効果の不安定さであったが、この接種効果の不安定に対する方策として内生菌との誘導抵抗性が近年注目されてもいる⁹⁾。

過去の関連研究で、活性汚泥を原料とするコンポスト「ゆうき百倍」から単離された糸状菌 (*Penicillium* sp., *Gibberela* sp.) にキュウリなどの生育を促進することが認められている。またこのコンポストが持つ植物病原性の糸状菌に対する拮抗能を検討したところ、コンポストをオートクレーブで滅菌することにより効果が大きく低下したことから、コンポスト中の生物的要因の必要性が示唆される。さらにこのコンポストより単離した糸状菌を土壌接種した場合も同様に、オートク

レーブ処理により植物の生長促進作用が抑制されたことから、微生物の培養土への投入が植物生長に関与していることも認められている。本研究では、植物生長促進作用を示す菌が根面定着細菌に多いという見解から、根面定着性の細菌の単離を試みた。土壌細菌は、 $10^6 \sim 10^8$ /g 程度で存在しており、糸状菌・放線菌と異なり低酸素の環境で生育可能な種もあり、畑土のなかでも大きな働きをしていると考えられている⁹⁾。このような観点から、植物生長促進作用を示すコンポスト「ゆうき百倍」より単離した細菌による植物生長促進作用の確認を目的とした。

材料および方法

1. コンポスト施用による植物の育苗

根面微生物の分離に用いた植物の培養は、上部の直径11.7cm、底部の直径8cm、深さ11.7cmのポットに真砂土とコンポストを培養土として栽培を行った。真砂土にコンポストを重量比2%で加えたもの、重量比2%のコンポストをオートクレー

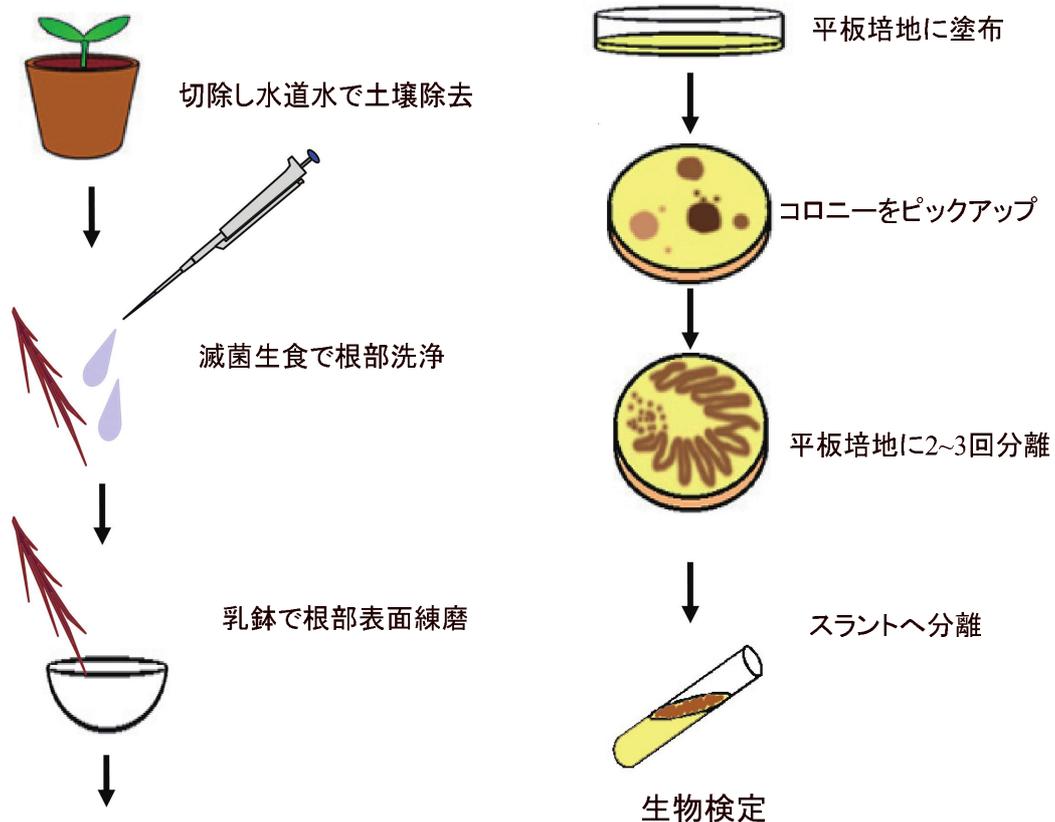


Fig. 1. Separation of rhizobacteria from the root incubated with test compost.

ブ処理して加えたもの、そして真砂土のみの処理区を設けた。これらにそれぞれトマト（大型福寿：（株）タキイ種苗）を1箇所3粒ずつ3箇所に、キュウリ（霜しらず地這：（株）サカタのタネ）を1箇所1粒ずつ3箇所に播種、ガラス温室にて30日間栽培し、生長度合を観察した。また、施肥コンポスト量の変化による植物生長の変化を調べるため、コンポスト重量比10%、0.5%にて同様に植物の育苗を行った。

2. 根面微生物の分離

コンポストを真砂土の重量比2%で含有した培養土で栽培したトマトまたはキュウリの根を切断し、水道水で十分洗浄し土壌を取り除いた。次に滅菌生理食塩水（0.9%）で根部を十分に洗浄した後、滅菌した乳鉢に根と少量の滅菌生理食塩水を入れ、乳棒を用いて、根の表面を擦り、根面定着性の細菌をそり落とした。このようにして作製した根面細菌懸濁液を10段階希釈しPDA・SCD平板培地へ100ml塗布した後、28℃、48時間培養した。培養後、プレートに出現したコロニーをピックアップし、それぞれの平板培地に2～3回純化操作を行った後、スラントへ保存した（Fig. 1）¹⁰。

3. 根面微生物の土壌接種試験

上部直径11.7cm、底部の直径8cm、深さ11.7cmのポットに真砂土を入れ、トマトとキュウリの種子を播種した。供試作物の出芽を確認した後、スラントに保存しておいた分離菌をSCD液体培地に懸濁し、28℃の振とう培養で100 rev. 24時間前培養した。培養後OD550=0.5に調整した分離菌懸濁液体培地（80ml）を植物の生育土壌に土壌散布した。培地の散布は1回目から6、12日後に土壌灌注を行い、30日間植物育苗を行った¹¹。またブランクとして水のみを、コントロールとしてSCD液体培地（80ml）を生育土壌に土壌散布した。

4. 分離菌の植物病原菌との拮抗作用

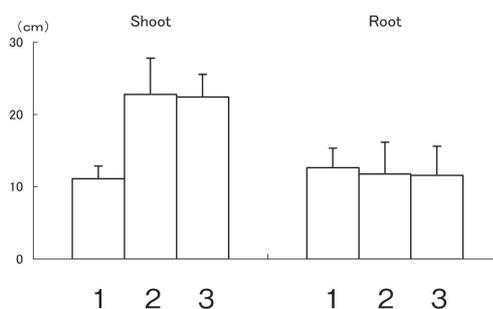
植物病原菌を滅菌生理食塩水に懸濁し十分に攪拌した後、ターンテーブル上のPDA平板培地に100ml塗布した。コンラージ棒で均等にした後、

供試菌を白金耳でPDA平板培地の3箇所に植菌した。トマト由来の10検体、キュウリ由来の7検体の分離菌すべてにおいて同様に試験し、28℃で48時間培養した。PDA平板培地の3箇所に植菌した周辺に阻止円が確認され際、活性有りとして評価した。

結果

1. コンポスト施用による植物の育苗

供試植物にトマトを用いて、コンポストの培養土重量比2%混和処理区と、オートクレーブ処理したコンポストの培養土重量比2%混和処理区を比較すると、地上部、地下部とも顕著な差は認めら



供試植物：トマト コンポスト2% (w/w) 混和区

1：真砂土のみ

2：オートクレーブ処理コンポスト混和区

3：無処理コンポスト混和区

Fig. 2. Plant growth promoting effect by compost application.



1：無処理コンポスト混和区

2：オートクレーブ処理コンポスト混和区

3：真砂土のみ

Plate 1. Effect of compost application on the root part of test crops.

れなかった。しかし、真砂土のみを培養土とする育苗区と比較すると、両コンポスト処理区とも植物生長促進効果が認められ、特に地上部において明確であった。地下部における長さの変化はあまり認められなかったが、その重量が両コンポスト区において増加していることから、生長促進効果が認められたと考えた。地上部において、コンポスト混和処理区とオートクレーブ処理コンポスト混和処理区の変化が少し認められるものもあった (Fig. 2, Plate 1)。

2. 根面微生物の分離

コンポストを培養土重量比2%混和して育苗したトマトの根面菌を、PDA培地を用いて分離したものはTP-A～Jの10種類であり (Plate 2)、SCD培地を用いて分離したのもTS-A～Jの10種類であった (Plate 3)。また同様にコンポストを培養土重量比2%混和して育苗したキュウリの根面菌を、

PDA培地を用いて分離したものはCP-A～G, I, Jの9種類であり (Plate 4)、SCD培地を用いて分離したものはCS-A～Gの8種類であった (Plate 5)。本研究で使用したものはSCD培地を用いて分離した菌で液体培地を用いて培養可能であった菌種でのみである。

3. 根面微生物の土壌接種試験

コンポストを培養土重量比2%混和して育苗した供試植物トマトから分離した根面細菌をSCD液体培地にて前培養し、OD₅₅₀ = 0.5 に調整し、真砂土のみで育苗したトマトに散布したところ、培地のみを散布したコントロールに比べ、分離菌TS-F, G, I, Jに植物生長促進作用が確認された。特に分離菌TS-Gにおいてはコントロールに比べ、約170%も生長促進効果が見られた。しかし、培地を散布せず水のみで供試植物トマトを育苗したブランクと比較すると、地上部におい



Plate 2. Isolated germs from the tomato root using by PDA medium.



Plate 4. Isolated germs from the cucumber root using by PDA medium.



Plate 3. Isolated germs from the tomato root using by SCD medium.

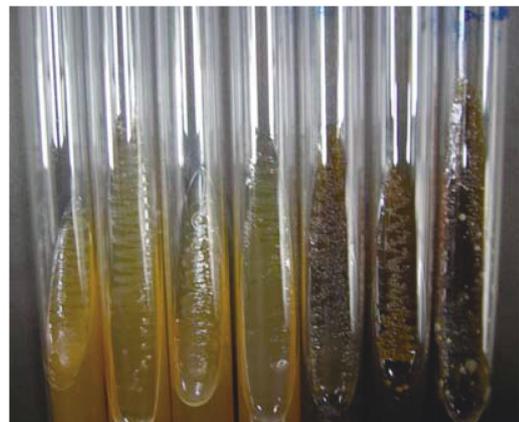


Plate 5. Isolated germs from the cucumber root using by SCD medium.

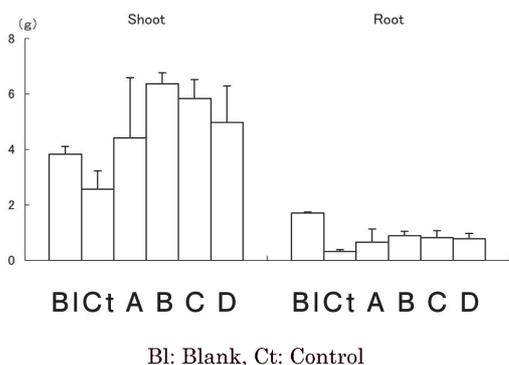


Fig. 3. Effect of inoculation of rhizobacteria (CS-X) from cucumber root on the cucumber seedling growth.

て同程度の生長促進効果確認されたものは分離菌 TS-G だけであり、また分離菌 TS-G も地下部や重量においては植物生長抑制効果が確認され、培地による植物生長抑制効果が認められたが、すべての分離菌に共通して、特に地下部においては培地による植物生長抑制効果が顕著に現れた (Fig. 3)。供試植物のトマトに散布した SCD 液体培地の OD₅₅₀ = 0.5 中には、分離菌により多少の差はあるものの約 8.96×10^8 cfu/ml の細菌が存在していた。

4. 分離菌の植物病原菌との拮抗作用

予備的な試験から抗菌性を示す微生物の存在が予想されたが (Plate 6)、植物病原菌 *Fusarium oxysporum* を用いて拮抗性を確認したところ、供試植物トマト、キュウリ根部からの分離菌には、いずれも活性が認められなかった。



Plate 6. Antibiotic bacteria in test compost.

考 察

供試コンポスト処理区とオートクレーブ処理コンポスト処理区を比較すると、供試コンポスト処理区に植物生長促進作用が認められたことから、供試コンポストに含まれる植物栄養成分だけではなく、なんらかの微生物が植物生長促進に影響を及ぼしていることが推測された。オートクレーブ処理により滅菌されない微生物として *Bacillus* 属細菌や酵母などの芽胞形成微生物があるが、これらは土壤病害を軽減し、作物の生育を促進する効果がある拮抗微生物であることが広く知られている¹²⁾。

キュウリをコンポストの培養土重量比 2% 混和処理区で育苗した際、オートクレーブ処理したコンポストの培養土 2% 混和処理区と比較すると、地上部、地下部ともに、コンポスト混和処理区の植物生長促進作用が確認されたが、特に地下部の重量での植物生長促進作用は著しいものがあった。この根面より分離した根面細菌は、植物生長促進作用が高い種があると推測した。しかし、トマトにおいては同様の処理間で植物生長に差が認められなかったことから、この根面より分離した菌には植物生長促進作用が期待できない。しかし、培養土に混和したコンポスト量の重量比 10%、0.5% においては、地上部に差は認められないものの、地下部には顕著に物生長の差を確認できた。吉川によると植物生育促進根圏細菌 (PGPR) である *Pseudomonas* の接種によって地下部に植物生長が確認されたが、地上部には顕著な植物生長が確認されなかったという報告もあることから¹³⁾、地下部の方が接種菌の影響を受けやすいと推測された。

本実験で使用した、コンポスト中の微生物数は、 1.6×10^6 cfu/g であり、通常のコンポスト中の細菌数である $10^6 \sim 10^8$ cfu/g 存在⁵⁾ と比較すると若干少ないものであった。コンポスト懸濁液を平板培地で培養した微生物中には、他の菌に対して拮抗性を示ものが確認されたが、抗菌性物質や酵素などを生産し病原菌の生育を阻止する拮抗微生物による植物生長促進作用が多数確認¹⁴⁾ されていることから、この拮抗活性を示した微生物による植

物生長促進作用が期待される。

コンポスト施用土壌で育苗した供試植物の根面より分離した根面細菌に抗菌活性を示す種が存在するかを調査したところ、*Fusarium oxysporum* に対し抗菌活性を示す種は認められなかった。しかし、他の病原性微生物に対する拮抗作用の有無の確認など行う必要がある。

SCD培地を用いた分離菌の土壌接種試験では、トマトでは分離菌TS-F, G, I, Jに、キュウリでは分離菌CS-A, B, C, Dに若干の植物生長促進作用が確認された。中でも分離菌CS-Bはコントロールに対して170%の植物生長促進作用が確認された。土壌中に灌注した分離菌は、供試植物トマトは 8.96×10^8 cfu/ml、キュウリでは 8.88×10^8 cfu/mlの処理濃度で80 mlずつ散布したため、それぞれ 7.17×10^{10} cfu/ml、 7.10×10^{10} cfu/mlの供試菌を土壌に灌注したことになる。先述したように、本研究で使用したコンポスト中には 1.8×10^6 cfu/gの微生物が存在していたため、SCD培地により土壌に灌注した菌数はコンポスト培養土重量比10%混和処理した際よりも多量であったことがわかる。しかし、PGPRの根圏密度が 10^5 cfu/g以下の場合に植物生長促進作用の効果が劣る¹⁵⁾という報告があることから、分離菌灌注後の土壌の実際の分離菌の根圏定着密度を調べる必要があると考えられる。また、両植物においてSCD培地による植物生長抑制作用が確認された。SCD培地には、カゼイン製ペプトン、ダイズ製ペプトン、塩化ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、グルコースが含まれている。塩化ナトリウムによるタマネギの生長が抑制される¹⁶⁾報告があることや、2価の陽イオン(Ca^{2+} や Mg^{2+})は菌体の根への付着を促進するが、1価の陽イオン(Na^+ や K^+)には促進効果はほとんどなく、過剰に存在するとむしろ付着を阻害し、土壌中の無機イオンの濃度や組成が根への付着に影響を及ぼすと考えられる¹⁷⁾ことなどから、SCD培地に含まれる通常量よりも多いナトリウム塩が何らかの理由で、植物の生長を抑制したと思われた。さらに、日照時間や温度・湿度など供試植物の生育環境、さらにはSCD培地の灌注による土壌中の雑菌の増殖などによりSCD培地による影響が顕著に発

現したと考えられる。いずれにせよSCD培地を使用しない分離菌の供試植物への接種方法の検討が必要である。例えば、SCD培地をTSB培地に変更⁷⁾や種子をを滅菌後菌培養液に浸し種子に供試菌を付着させるバクテリゼーションなどである。しかしながら、キュウリ根面からの分離菌CS-A, B, C, Dは、地上部においてブランク以上の生長が認められ、この分離菌による植物生長促進作用は高いものであると推測された (Fig. 3)。

これらの結果より、植物生長促進効果はコンポスト含有土壌で育苗した植物の根面細菌によるものと推測されるが、分離菌の土壌接種法に関するさらなる検討が必要である。また、植物生長促進作用が見られた分離菌の同定の必要がある。トマト根面からの分離菌Jに関しては、液体SCD培地で培養した際に甘酒のように小さい粒ができていたため、細菌ではなくカビや放線菌である可能性がある。放線菌は抗生物質や菌体外酵素を生産し、培地上で強い抗菌活性を示すため、生物防除分野でも古くから注目されて来たがその実用例は意外と少ない。植物生長が確認された分離菌はグラム陽性菌、陰性菌ともに存在していた。ジャガイモ塊茎表皮の全細菌数は 10^{8-9} cfu/g FWで、グラム陰性細菌が多い程そうか病が少ないとの報告もあるが、*Bacillus*や*Serratia*などグラム陽性の植物生育促進根圏細菌 (PGPR) に関する報告も多数あり¹⁷⁻¹⁹⁾、グラム陽性菌、陰性菌の差による植物生長への影響は少ないと考えられる。

今後の微生物による植物生長促進効果の評価には、有用菌を分離、選抜だけではなく、そのメカニズムや生態の解明、さらにはその機能の増強や育種が必要となる¹⁷⁾。これら植物生育促進根圏細菌 (PGPR) を利用した生物的防除法の開発が行われることで、「無農薬・減農薬」指向を満足できるものとなり、農業における「環境負荷低減」、「食の安全」の繋がると考えられる²⁰⁾。

引用文献

- 1) 末松広行：食品リサイクル法、大成出版社、(2002)
- 2) 山内文男：生ゴミ処理とコンポスト化、食の科学、**212**, 46-56, (1995)
- 3) de Brito Alvarez, M. A. Antoun H. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (1) 194-199, (1995)
- 4) 穴戸雅弘：バイオコントロール研究会レポート、**6**, 42-50, (1999)
- 5) 山根一郎：土と微生物と肥料のはたらき、農山漁村分化協会、37-41, (1998)
- 6) Jian-Hua Guo et al.: Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria, *Biological Control*, **29**, 66-72, (2004)
- 7) 浦島泰文：ホウレンソウ種子へのPGPRの接種・定着法、日本土壤肥料学雑誌、**74** (2), 157-162, (2003)
- 8) Vessey J. K. : Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant Soil*, **255** (2), 571-486, (2003)
- 9) 穴戸雅弘：PGPR物語：今昔そして未来、植物防疫、**53** (8), 316-320, (1999)
- 10) 豊田秀吉：植物土壌病害の抑止対策、博友社
- 11) A. Khalid, M. et al: Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat, *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 473-480, (2004)
- 12) 梅谷献二・加藤肇：農業有用微生物 その利用と展望、養賢堂、(1990)
- 13) 吉川正巳：Pseudomonas putida RSA9株が産出する植物生長促進物質、近畿中国農業研究成果情報、193-194, (2004)
- 14) 伊阪実人：拮抗性非病原細菌とその利用、特にBacterizationについて、植物細菌病談話会講要、**12**, 43-37, (1983)
- 15) Chang P-T. and Randle W M: Sodium chloride in nutrient solutions can affect onion growth and flavor development, *A. Journal of the American Society for Horticultural Science*, **39** (6), 1416-1420, (2004)
- 16) 小川奎：微生物によって誘導される作物の病害抵抗性、植物防疫 **51** (3), 116-121, (1997)
- 17) 境雅夫：養分集積土壌における蛍光性シュードモナスの生態 化学と生物、**30** (5), 282-283, (1992)
- 18) 谷井昭夫ほか：塊茎バクテリアゼーションによるジャガイモそうか病、黒あざ病の生物防除、日植病北海道部会シンポ講要、7-9, (1987)
- 19) 南嶋陽一ほか：現代微生物学入門、南山堂、(2002)
- 20) 畔上耕児：ファージ利用による植物細菌防除開発の試み、農業および園芸、**79** (12), 1261-1266, (2004)