

ハウレンソウにおける植物生育促進根圏細菌利用法の開発

浦嶋泰文*

Key words : 蛍光性 *Pseudomonas*, ハウレンソウ, PGP, 有機物, 画像解析,
微量熱量計, 根定着, 生物発光遺伝子

目 次

I 緒 言	72	1) 種子接種菌密度と根定着菌密度との関係	80
1 本研究の背景と目的	72	2) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 接種種子の保存性	80
2 既往の研究成果	73	3 考 察	81
II ハウレンソウに対するPGPRの検索及び諸性状	75	IV 画像解析装置を用いた蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の運動性解析	81
1 材料及び方法	75	1 材料及び方法	82
1) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の分離	75	1) 画像解析による細菌運動性解析法の検討	82
2) 幼植物試験	75	2) 菌株の運動性に及ぼす塩類集積土壌の土壌溶液の影響	83
3) 水耕栽培試験	75	3) 有機物施用が蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の運動性に及ぼす影響	83
4) 接種菌株のハウレンソウ根面, 根内における生息部位	76	2 結 果	83
5) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 菌株の培養ろ液によるハウレンソウ根の生育反応	76	1) 画像解析による細菌運動性解析法の検討	83
6) ポット栽培試験	77	2) 菌株の運動性に及ぼす塩類集積土壌の土壌溶液の影響	84
2 結 果	77	3) 有機物施用が蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の運動性に及ぼす影響	84
1) 幼植物試験	77	3 考 察	84
2) 水耕栽培試験	77	V 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> のハウレンソウ根への分布における水分移動の重要性	86
3) 接種菌株のハウレンソウ根面, 根内における生息部位	78	1 材料及び方法	86
4) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 菌株の培養ろ液によるハウレンソウ根の生育反応	78	1) 根箱試験	86
5) ポット栽培試験	78	2) 生物発光遺伝子の蛍光性 <i>Pseudomonas</i> への導入	87
3 考 察	79	3) 生物発光のCCDカメラによる検出条件	87
III ハウレンソウへの蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の接種・定着法	79	4) かん水位置による蛍光性 <i>Pseudomonas</i>	
1 材料及び方法	80		
1) 種子接種菌密度と根定着菌密度との関係	80		
2) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> 接種種子の保存性	80		
2 結 果	80		

(平成18年 6月15日受付, 平成18年10月25日)

畑地利用部

*現東北農業研究センター

の根定着	87	する有機物の選定	95
2 結 果	88	2 結 果	96
1) 根箱試験	88	1) 生物発光遺伝子の蛍光性 <i>Pseudomonas</i>	
2) 生物発光遺伝子の蛍光性 <i>Pseudomonas</i>		への導入	96
への導入	88	2) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の根定着を促進す	
3) 生物発光のCCDカメラによる検出条件	89	る有機物の選定	96
4) かん水位置による蛍光性 <i>Pseudomonas</i>		3 考 察	96
の根定着	89	VIII 有機物の併用による蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の	
3 考 察	89	ハウレンソウ生育促進	97
VI 微少熱量計を用いた蛍光性 <i>Pseudomonas</i>		1 材料及び方法	97
の土壤中での増殖解析	90	1) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> と有機物の併用	
1 材料及び方法	90	によるハウレンソウのポット栽培試験	97
1) 微少熱量計を用いた細菌の増殖解析	90	2 結 果	98
2) 接種菌株の増殖に対する有機物の影響		1) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> と有機物の併用	
(希釈平板法による解析)	91	によるハウレンソウのポット栽培試験	98
3) 接種菌株の増殖に対する有機物の影響		3 考 察	98
(微少熱量計による解析)	91	IX 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の同定	98
2 結 果	91	1 材料及び方法	99
1) 微少熱量計を用いた細菌の増殖解析	91	蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の16S rDNA塩基配列	
2) 接種菌株の増殖に対する有機物の影響		解析	99
(希釈平板法による解析)	92	2 結果及び考察	99
3) 接種菌株の増殖に対する有機物の影響		1) H3株	99
(微少熱量計による解析)	92	2) D23株	99
3 考 察	93	3) HS1株	100
VII 有機物施用による蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の		4) HS23株	101
根定着促進	95	X 総合考察	101
1 材料及び方法	95	摘 要	104
1) 生物発光遺伝子の蛍光性 <i>Pseudomonas</i>		謝 辞	104
への導入	95	引用文献	105
2) 蛍光性 <i>Pseudomonas</i> の根定着を促進		Summary	110

I 緒 言

1 本研究の背景と目的

本研究は、西南暖地地方の雨よけハウスを含む集約的施設栽培野菜産地を背景として行われた。最初に、その農業的諸側面を概述し、本研究を開始するに至った背景と展開すべき研究方向について述べる。

高度経済成長に伴う農村労働力の都市への流出、農業生産現場の機械化・施設化の拡大、穀類の輸入量の増加及び食生活の変化による消費ニーズの変化

などによって、我が国の農業は変革を余儀なくされ、野菜等収益性の高い部門への選択的拡大の方向に進んだ。野菜産地においては、化学肥料や農薬等に過度に依存した栽培が一般的となり、土壌環境の悪化や病害虫の多発などによる生産環境の不安定化を来した。

現在では、多くの野菜産地では少数の品目に特化した連作が一般化してきている。その結果、連作障害が問題となっており、連作障害軽減とあわせた野菜の高品質・安定生産技術の確立が強く求められている。

特に、ハウレンソウをはじめとする軟弱野菜は、雨よけ栽培を含む施設化による周年栽培体系が志向されている。降雨から隔離した閉鎖系環境下で栽培されるため、これまで以上に塩類集積や土壤病害による連作障害及び夏季における生育不安定化などの問題が懸念されている⁶⁾。

連作障害の要因としては、土壤病害ないし生理(栄養)障害と土壤病害が同時に起こっている複合障害が全体の85%を占めている⁸⁵⁾。ハウレンソウ萎凋病発病率が20%以上の多発圃場では、土壤の硝酸態窒素、有効態リン酸の過剰蓄積に加え、カリウム過剰などの土壤化学性の悪化も顕著になっている⁵⁾。

このように、連作障害の実態を見ると土壤病害と土壤化学性の悪化が相まって生じており、作物栄養条件(素因)、土壤環境条件(誘因)及び病原菌や寄生性線虫(主因)の三者が絡み合う要因複合的な現象と捉えるべきものと考えられる⁴¹⁾。

連作障害を引き起こさないためには、輪作を行うことが基本であるが、様々な理由により連作を余儀なくされている産地が多い。それぞれの産地では、ひとつの対策技術だけでなく土壤消毒、有機物の施用を中心に様々な対策技術が組み合わされて実施されている⁴⁸⁾。しかし、これらの対策技術の中には、有機物の過剰施用により硝酸態窒素の地下水への溶脱を引き起こすなど環境への負荷が大きいものも含まれている。また、2005年の臭化メチルの全廃に伴う臭化メチル代替技術も確立されていないことから、新たな連作障害対策確立が急務となっている。

一方、近年、農業生産に際しては周辺環境や農産物の安全性への配慮が強く求められているため、農業技術の開発にあたっては農薬や資材の多投入に頼った従来型の農業技術を指向することは許されない状況になっている。そこで、連作障害の複合的な発生要因の解析を基礎とした上で、できるだけ環境への負荷が少ない手法を用いて各発生要因を除去あるいは制御する連作障害対策技術を目指すべきと考える。

農薬や資材に依らない技術として、土壤が本来持っている生物機能を利用した、あるいは土壤微生物の有用機能を利用した環境にやさしい対策技術確立の観点から、植物生育促進根圏細菌(PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria³⁸⁾)などの微生物

機能を利用した作物生育促進や生物防除技術の開発が注目されている。PGPRとは植物の根圏⁴⁵⁾から分離される細菌で、植物の生育に良い影響を及ぼす根圏細菌のことを言う。PGPRとしてこれまで、*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rizobium*, *Serratia* 属等多数の細菌が明らかとなっている⁸¹⁾。これらのPGPRを根圏に接種し、定着させることによる植物病原微生物の生態的防除^{31, 33, 38, 40, 43, 79)}及び植物生育の促進^{11, 50)}を図ろうとする様々な研究が進められている。

連作障害圃場の土壤微生物性に関して注目すべきものとして堀の研究事例が挙げられる³⁰⁾。堀はチンゲンサイの連作により特定の土壤病虫害や生理障害は認められないものの、非作付土壤を用いた圃場に比べてチンゲンサイの生育が60~70%に低下している障害を生育遅延型連作障害と提唱した。さらに、連作と非連作とを比較すると、細菌、放線菌、糸状菌は有意な差は認められないが、連作区では非連作区よりも蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌数が少なく、糸状菌フロラが単純化していることを報告している。そこで我々は、病害が発生している場合には、主因である病原菌を排除しうる土壤消毒等の対策が不可欠であるが、生育遅延型連作障害のような障害に対しては、土壤や根圏に生息する土着性の微生物や有用微生物を活用した対策を行うことが可能と推察している。

そのために、本研究では、連作障害発生圃場における栄養塩類を中心とした土壤化学的環境と根圏微生物(PGPR)を中心とした土壤生物的環境がハウレンソウの生育に及ぼす影響を解析した。その結果を基にして、土壤環境下でPGPRのハウレンソウ生育促進機能を安定的に発現させる技術を開発した。

2 既往の研究成果

本研究では、前節の目的を達成するため、PGPRの検索、効果的な接種法及び定着性・増殖解析等の検討を行ったが、これらの各項目に関連する既存の研究事例について以下に記述する。

PGPRとしての機能を持つものとして多くの細菌種が知られているが、最も研究事例が多いのは主に土壤を生息圏とする蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌(以下、蛍光性 *Pseudomonas*) と呼ばれる微生物群

である。蛍光性 *Pseudomonas* は、作物の根圏や根面に数多く生息する細菌であり、*Pseudomonas fluorescens* や *Pseudomonas putida* などが代表的な種である。蛍光性 *Pseudomonas* は、大きさが $1.5\sim 4\times 0.5\sim 1.0\mu\text{m}$ 、1ないし数本の極鞭毛を持つ好気性の桿菌であり、特定の培地上で水溶性の蛍光物質を産生する⁷¹⁾。

蛍光性 *Pseudomonas* をジャガイモ、テンサイ及びカブなどの種いもや種子表面に接種すると、作物の生育が良好になることが報告されている⁶⁷⁾。例えば、テンサイの種子に蛍光性 *Pseudomonas* をコーティングすると、幼苗の平均重量は無処理のものより20~49%増加し、カブ、ジャガイモ及びトウモロコシ等でも蛍光性 *Pseudomonas* の接種により作物生育量を増加させうる。

蛍光性 *Pseudomonas* の有用機能の発現メカニズムに関しても多くの研究が行われている。土壤病原菌に対する拮抗作用のメカニズムとして、生息場所や養分の奪い合いによる競合、鉄キレート物質であるシデロフォアを産生することによる鉄の競合^{38, 43)}、抗生物質^{31, 33, 40)} 及びシアン化物 (HCN) 等を産生⁷⁹⁾ し、直接的に病原菌の生育を抑制する抗生などがある。植物生育促進のメカニズムとしては、植物ホルモンを産生¹¹⁾ したり、リン溶解菌等の産生する有機酸による難溶性リンの溶解⁵⁰⁾ による植物生育促進などがある。

これらのPGPRを作物栽培に利用するにあたっては、培養物を種子または根など植物体の一部に接種するバクテリアゼーション、または直接土壌への接種が行われる^{16, 23, 24, 25)}。しかしながら、多くの事例では化学薬剤と比較して病害防除効果が小さく、安定的な効果の発現が認められないなど、圃場レベルにおいて、実用に至った事例は少ない。効果が不安定な理由として、接種した微生物が根圏に定着できない、すなわち、根圏定着の安定性の欠如が原因であることが指摘されている⁸¹⁾。

有用微生物の根圏定着に影響するものとして、有用微生物自身の微生物特性と生物的・非生物的環境因子に分けられる。

1) 微生物特性と根圏定着

微生物特性と根圏定着は、大きく4つのプロセス

に分けることができる。すなわち、①土壌中での根近傍への移動、②根への付着、③根の成長に伴う移動、④各プロセスにおける増殖、等である⁵⁷⁾。このうち、土壌中での根近傍への移動及び根の成長に伴う移動には走化性、運動性が関与している。

(1) 走化性、運動性

接種菌を根に定着させるには、伸長を続ける根の先端部に向かって根表面を移動する特性も重要である。この過程は、根分泌物に対する走化性、運動性及び根面付着性が関与していると考えられている^{20, 29, 53, 54, 61, 70)}。

多くの根圏細菌は根からの分泌物に対して強い走化性を示し、これは細菌の根圏定着に重要な特性のひとつであると考えられている⁶¹⁾。蛍光性 *Pseudomonas* の土壌中での根への移動には、鞭毛運動による根分泌物等の化学物質に対する走化性や運動性が大きく関与している^{20, 64, 70)}。そのため、土壌環境が走化性に及ぼす影響の解明は不可欠であるが、これまでに細菌株の走化性の違いや定着に関する環境要因の解明は行われていない。

(2) 根への付着

根への付着性は、根圏定着に重要な特性である。根面付着能を無くした変異株は、根への定着が低下することが知られている⁶⁹⁾。また、細菌の根への定着を Ca^{2+} や Mg^{2+} のような2価の陽イオンが促進し、 Na^{+} や K^{+} のような1価の陽イオンでは促進効果がほとんどみられないことが知られている³⁵⁾。このように、土壌中の養分濃度も根定着に大きな影響を与えているものと思われる。さらに、菌体表面の線毛⁷⁸⁾、鞭毛¹⁷⁾ や植物根から分泌されるAgglutinins^{7, 15)} も根定着に関与していることが知られている。

(3) 増殖

根圏における蛍光性 *Pseudomonas* の増殖速度は、他の根圏微生物との競合に打ち勝てるかどうかの重要な特性であり、増殖速度が根定着の重要な因子である⁶⁴⁾。

(4) 土着菌との競合

接種した蛍光性 *Pseudomonas* の根圏定着に及ぼす最も大きな制限要因は、根圏における土着菌に大きく影響される⁹⁾。

(5) 非生物的要因

接種菌の根圏定着に影響する非生物的要因として

は浸透圧⁴⁴⁾、温度⁶²⁾、pH、イオン組成、炭素源、無機栄養条件、水分含量³²⁾等が考えられる。これらの非生物的要因は蛍光性 *Pseudomonas* の根圏定着に直接的に影響するばかりでなく、植物根の分泌作用への影響を介して間接的にも影響する。

以上のように、土壌に導入した蛍光性 *Pseudomonas* の根定着は、様々な要因によって影響を受けている。そこで、蛍光性 *Pseudomonas* の有用機能を安定的に発揮させるには、用いた菌株の土壌中での挙動、特に根圏での動態と土壌環境要因との関係を把握することが重要である。その結果に基づき、根定着に不適な環境であっても有機物施用等の肥培管理により、人為的に好適な環境を整えることが出来れば、蛍光性 *Pseudomonas* を安定的に根定着させることができると考えられる。

II ホウレンソウに対するPGPRの検索及び諸性状

先に述べたとおり、有用微生物の利用技術に関して多くの研究が行われているが、現状では圃場レベルで安定的な効果を発揮するまでには至っていない。そこで、本研究では、植物の生育促進機能を持つ根圏微生物、すなわちPGPRの安定的な農業利用を目指し、まず、ホウレンソウの根圏より分離した蛍光性 *Pseudomonas* の中からホウレンソウの生育を促進する菌株の検索を試みた。最初に、プレパラート用染色バットを用いた幼植物試験法を開発した。確立した生物検定法を用いて、幼植物段階のホウレンソウ根の生育を促進または抑制する蛍光性 *Pseudomonas* の選抜を行った。次に、選抜した蛍光性 *Pseudomonas* 菌株を、ホウレンソウを収穫期まで水耕栽培試験を行い、ホウレンソウ収穫期においても生育を促進する菌株の選抜を試みた。選抜された菌株について、ホウレンソウ根面、根内における生息部位及び根の伸長促進に関する物質の関与について検討を行った⁷³⁾。さらに、水耕栽培において生育促進機能を示した蛍光性 *Pseudomonas* 株をポット栽培試験に適用し、土耕において生育促進機能が発揮されるか否かを検討した。

1 材料及び方法

1) 蛍光性 *Pseudomonas* の分離

連作来歴の異なる中国農業試験場畑地利用部青野圃場、京都府農総研（ホウレンソウ 10連作跡）、奈良県農試（化成肥料、有機肥料区）、奈良県のホウレンソウ農家の土壌を用いてポリポットを用い、ホウレンソウをガラス温室内で栽培した。ホウレンソウが25cm程度に生育した段階のホウレンソウ根面・根内よりP1培地³⁷⁾を用いて蛍光性 *Pseudomonas* を分離し、培地上に生育した蛍光性コロニーを釣菌し、約500菌株の分離菌株を得た。

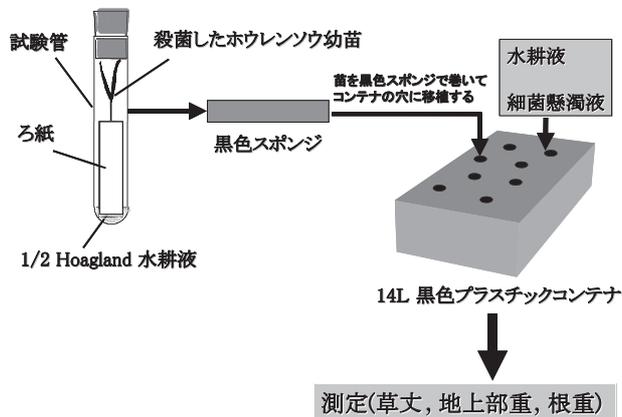
2) 幼植物試験

ホウレンソウ（品種：おかめ タキイ種苗）のネーキッド種子を 10g L^{-1} の塩化ベンザルコニウム溶液で10分間、アスピレーターを用いて脱気しながら殺菌処理した。次に 10g L^{-1} の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間脱気処理した。その後、滅菌水で5分間ずつ6回洗浄した。洗浄した種子を1/10 TSA (Bact Tryptic Soy Broth Agar) 平板培地²¹⁾上で2日間発芽させるとともに、雑菌によるコンタミネーションが無いことを確認した。幼植物検定のための水耕用の容器としてプレパラート用染色バット（容量150mL）を用いた。水耕液としてオートクレープで滅菌した1/10濃度の園試処方水耕液³⁴⁾を150mL分注した。TSB (Bact Tryptic Soy Broth) 液体培地²¹⁾にて28℃で24時間液体振とう培養した供試菌株培養液 (10^8cfu mL^{-1}) 1 mLを添加した後、シーロンフィルム（富士フィルム）で覆った。1染色バットあたり8株ずつ、無菌的に発芽させたホウレンソウ苗を定植した。20℃、湿度80%、12時間照明の人工気象室内で4日間栽培した。4日後の根長と播種時の根長との差から根伸長量を算出した。対照とした無接種の根伸長量との比から、相対根伸長率を算出した。本試験は3反復で行った。

3) 水耕栽培試験

水耕栽培試験の概要を第1図に示した。供試作物としてホウレンソウ（品種：おかめ）を用い、湛液法による水耕栽培を行った。湛液水耕栽培とは第1図に示すように、プラスチックコンテナを用い、水耕液を循環させない方式の水耕栽培である。栽培には黒色のプラスチック製の角形容器（容量14L）を用いた。水耕液として園試処方水耕液の標準濃度を

用いた。TSB培地にて28℃で24時間液体振とう培養した供試菌株（幼植物試験で根の伸長を促進または抑制した菌株）の培養液100mL（ 1×10^8 cfu mL⁻¹）を水耕液に添加した。1容器あたり8株ずつ、第1図に示したように、1/2濃度の Hoagland 水耕液を1 mLと5 cm×5 cmのろ紙を縦に四つ折りしたものを入れた試験管内で無菌的に育苗したハウレンソウ幼苗を定植した。ハウレンソウの収穫期までガラス温室内で約3週間栽培した。対照として菌無接種のTSB培地100mL添加区を設けた。本試験は2反復で行った。対照区の草丈が25cm前後になったときにハウレンソウの地上部重量及び根重を調査した。ハウレンソウの地上部重と根重の対照との比から、それぞれ相対生育率を算出した。



第1図 水耕栽培による生物検定法

4) 接種菌株のハウレンソウ根面、根内における生息部位

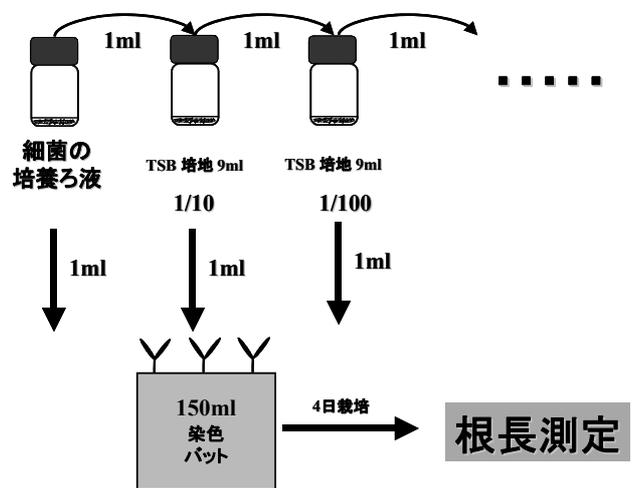
選抜した菌株のハウレンソウ根面、根内における定着性を調べるために、まず選抜菌株の抗生物質耐性変異株を作出し、変異株の接種、回収により定着性を評価した。抗生物質耐性菌株作出には、相野らの方法⁴⁾に準じ、抗生物質（ストレプトマイシン： 200mg L^{-1} 、アンピシリン： 100mg L^{-1} 、ナリジキシン酸： 50mg L^{-1} ）を添加したP1培地³⁷⁾を用いて作出した。TSB培地で液体振とう培養（28℃、24時間）したH3株、D23株及びSW3株のそれぞれの培養菌液を各抗生物質添加培地上に塗抹し、28℃で培養して、生じたコロニーを分離した。それぞれの抗生物質に対して得られた自然薬剤耐性変異株について、さらに相互の抗生物質間で菌液接種を繰り返し、

最終的に三種の抗生物質に対する耐性変異株であるH3R株、D23R株及びSW3R株を得た。ここで、H3、D23、SW3株を用いた理由としては、抗生物質耐性変異株が得られたためである。

H3R株、D23R株及びSW3R株を用い、2)の水耕栽培試験と同様にハウレンソウを3週間栽培した。栽培後の根に定着している接種菌の菌密度を上記3種の抗生物質を含むP1培地を用い希釈平板法により計数した。根面・根内の菌密度は、根を摩砕して得られた根摩砕液を希釈平板法により計数した。根内の菌密度の測定は、根を0.5gFW当たり30mLの 1g L^{-1} 過酸化水素水中に15秒浸漬する表面殺菌を行った後、0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）で洗浄し、以後根面・根内の菌密度計測の場合と同様の操作を行った。測定は3反復で行った。

5) 蛍光性 *Pseudomonas* 菌株の培養ろ液によるハウレンソウ根の生育反応

試験方法の概要を第2図に示した。TSB培地を用い、供試菌株としてH3、D23およびSW3株を用いた。供試菌株をそれぞれ25℃で24時間液体振とう培養した。その培養液を10,000rpmで1分間遠心後、上澄を採取し、0.2μmのメンブランフィルターを用いて除菌ろ過した。そのろ液（原液）またはTSB培地により10~100,000倍に希釈したろ液1 mLを1/10濃度の園試処方水耕液150mLに添加し、1)で示した染色バットを用いた幼植物試験を行った。対照として菌株を培養していないTSB培地のろ液1 mLを同



第2図 培養ろ液の生物検定法

様に園試処方水耕液に添加して幼植物試験を行った。20℃、湿度80%、12時間照明の人工気象室内で4日間栽培した。4日後の根長と播種時の根長との差から根伸長量を算出した。対照である菌無接種区の根伸長量との比から、対照の根伸長量を1.0としたときの相対根伸長率を算出した。測定は3反復で行った。

6) ポット栽培試験

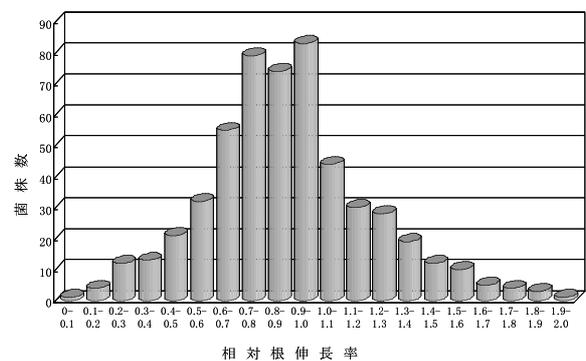
ポット栽培試験には、水耕栽培において生育促進機能を示した蛍光性 *Pseudomonas* 株を供試した。直径12cmの黒色ポリポットに細粒褐色低地土（中国農業試験場畑地利用部青野圃場より採取）を800g入れ、ハウレンソウ種子を播種した。ハウレンソウ種子は、あらかじめ殺菌し、供試菌株の培養液（TSB培地、28℃、24時間振とう培養）に浸漬（30℃、1時間）処理した。ガラス温室において約1カ月間、無接種区の生育が25cm程度になるまで栽培した後、地上部重及び根重を調査し、菌株無接種区の生育を1.0とした相対値を算出した。栽培は3反復で行った。さらに、H3R株の区はポットより根を回収し、根に定着しているH3R株の菌密度を3種の抗生物質（ストレプトマイシン：200mg L⁻¹、アンピシリン：100mg L⁻¹、ナリジキシン酸：50mg L⁻¹）を含むP1培地を用い希釈平板法により計数した。

2 結 果

1) 幼植物試験

1/10濃度の園試処方水耕液とプレパラート用染色バットを用いる方法で、移植したハウレンソウ幼苗は良好に生育した。ハウレンソウを栽培後、菌を接種したハウレンソウの根からは細菌が分離されたが、対照である菌無接種のハウレンソウ根からは細菌が分離されず、菌無接種の場合は無菌状態が保たれていた。第3図に示すように、相対根伸長率の頻度分布はほぼ正規分布を示し、相対根伸長率1.0前後の菌株が多く、根の生育を抑制（相対根伸長率が低い）及び促進する（相対根伸長率が高い）傾向の菌株は少なかった。菌無接種の場合でのハウレンソウの根伸長量の標準偏差を求め、反復数を決めるための有意差検定を行った。その結果、相対根伸長率1.8以上のものを90%の確率で有意と判定するには、8

株の反復数が必要であった⁴⁹⁾。また、生育促進効果判定の再現性も高く、この幼植物試験は、ハウレンソウ根の生育に影響を与える蛍光性 *Pseudomonas* の選抜が可能であり、生物検定法として適当であると判断した。ここで選抜した菌株の基準として、相対根伸長率1.8以上のものを生育促進菌株として選抜した。さらに、相対根伸長率が0.3以下の菌株について、ハウレンソウ根が短い、根毛の発達がみられ根が顕著に太いものが観察された。その菌株に関しても、次の水耕栽培試験に供試した。

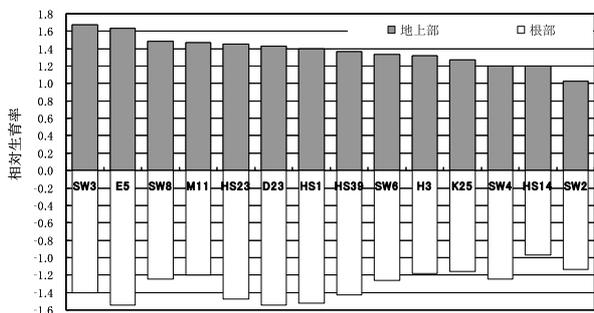


第3図 幼植物検定における相対根伸長率の頻度分布
対照の根伸長量を1.0とする。

2) 水耕栽培試験

無菌的に育苗したハウレンソウに、幼植物試験により選抜した蛍光性 *Pseudomonas* を接種し、ハウレンソウを収穫期まで湛液水耕栽培した。第4図に示すように、収穫時において、ハウレンソウの生育（地上部及び根部）を約50%以上促進する蛍光性 *Pseudomonas* 菌株が数菌株得られた。水耕栽培試験におけるハウレンソウの生育状況は第5図に示した。ハウレンソウの生育を促進するとして選抜された菌株は、幼植物試験からハウレンソウの根の生育を促進する菌株がほとんどであった。しかし、D23株のように幼植物検定試験では根の生育を抑制するが、収穫期までの生物検定ではハウレンソウの生育を促進する菌株もあった。

このように、分離したPGPRの中には2種のタイプが存在し、Aタイプ（生育初期より根の生育を促進）とBタイプ（生育の初期は根の生育を抑制）に分けることができた。ハウレンソウの生育促進機能という観点からみたときに、Bタイプのように初期の根の生育を抑制するようなタイプも最終的に収穫



第4図 ホウレンソウの生育（地上部及び根部）に及ぼす蛍光性*Pseudomonas*属細菌の接種の影響

対照の根伸長量を1.0とする。
無接種を1.0とした相対値で示した。



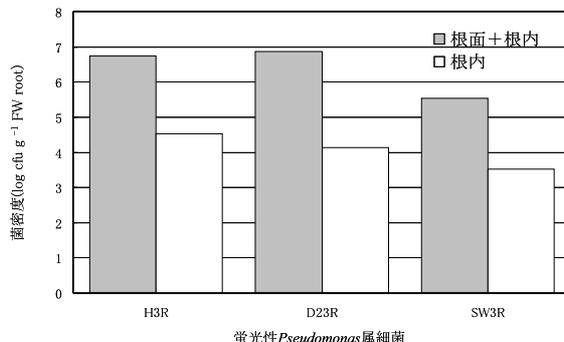
第5図 蛍光性*Pseudomonas*によるホウレンソウの生育促進

期の生育を促進するために有望である。このBタイプに関しては、初期の根の伸長は抑制されているものの根の太さは太い場合が多く見受けられた。また、Bタイプの菌株を接種すると、無接種の場合と比べて、根毛が顕著に増加していることが顕微鏡下で観察された。

3) 接種菌株のホウレンソウ根面、根内における生息部位

第6図に示すように、水耕栽培において生育促進効果を示した菌株の根における生息部位別の菌数は、供試したH3, D23及びSW3株はいずれも根内では $10^3 \sim 10^4 \text{ cfu g}^{-1} \text{ FW root}$ レベルの密度で生息していた。根面+根内では $10^5 \sim 10^7 \text{ cfu g}^{-1} \text{ FW root}$ で、根内の菌密度の100~1,000倍であった。接種した菌株は根内にも生育しているが、多くは根面に定着していることが明らかとなった。このように水耕栽培

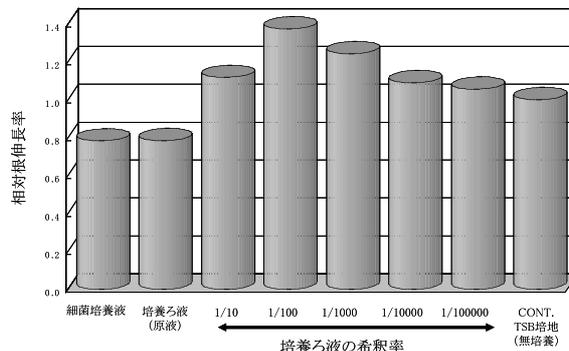
条件では、接種した蛍光性 *Pseudomonas* はホウレンソウ根に定着していた。



第6図 水耕栽培したホウレンソウにおける生息部位別の接種菌密度

4) 蛍光性 *Pseudomonas* 菌株の培養ろ液によるホウレンソウ根の生育反応

第7図に示すように、蛍光性 *Pseudomonas* D23株のTSB 培地培養液をろ過除菌した液は、菌株を接種したときと同様に根の生育を抑制した（相対根伸長率0.8）。そのろ液をTSB 培地にて10倍、100倍及び1000倍に希釈した液を与えると根の生育が促進された。特に100倍希釈液を与えた場合は、相対根伸長量が1.3程度となった。他の菌株（H3, SW3株）において、培養ろ液が細菌培養液を添加した場合と同様にホウレンソウ根の生育を促進する現象は見受けられなかったが、培養ろ液を希釈していくことで、根の生育促進効果は順次判然としなくなった（データ略）。



第7図 ホウレンソウ幼植物根の生育に及ぼす供試菌株 (D23株) の培養ろ液の添加の影響

CONT: 対照 (TSB培地のろ過除菌液)

5) ポット栽培試験

水耕栽培において、ホウレンソウの生育を促進す

る機能を発現させた蛍光性 *Pseudomonas* を土耕（ポット試験）のハウレンソウに供試した。その結果、第1表に示したように、水耕の場合に認められた根重及び地上部新鮮重の顕著な生育促進効果が認められなかった。抗生物質耐性菌株を用いて根に定着した接種菌株密度を調査したところ、検出限界以下 (10^2 cfu g^{-1} FW root) であった。

第1表 土耕栽培における蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の接種効果

菌株	草丈	地上部重	根重
H3	0.99	1.05	0.99
HS23	0.93	1.09	1.04
HS1	1.00	1.18	1.05
M11	1.15	0.91	1.04
E5	0.95	0.91	1.03
SW8	0.97	0.88	1.05
SW3	0.86	1.30	0.92
H3R	0.73	0.98	0.86

数値は無接種区を1.0としたときの相対値

3 考 察

本項において検討した幼植物試験は、ハウレンソウの生育初期段階に影響を与える細菌の選抜に有効であった。ハウレンソウ根から分離した蛍光性 *Pseudomonas* 500菌株について幼植物試験によってハウレンソウ根に対する生育促進効果を調べたところ、95%以上の菌株は見かけ上何の効果も示さなかった。

さらに、幼植物試験で生育抑制効果を示した菌株を収穫期までの水耕栽培試験に供試したところ生育促進効果を示したことから、実用的なPGPRの選抜のためには収穫期までの生物検定が必須であり、幼植物段階での生物検定のみでは有用機能を有した菌株を選抜漏れする可能性も考えられた。本研究において選抜した菌は、湛液水耕栽培条件ではハウレンソウの生育を安定的に促進する機能を有しており、水耕栽培における有用微生物の利用の可能性を示すことができた。

ハウレンソウの生育促進のメカニズムに関しては、BタイプであるD23株では、培養したろ液中に高濃度の場合ハウレンソウ根の生育を抑制し、他方低濃度の場合根の生育を促進するような物質の存在が示唆された。同様の傾向を示す物質としてIAA（インドール酢酸）が報告されている⁶⁷⁾。本研究で

供試した菌株の産生する物質やその生産量については、今後の検討が必要である。また、Aタイプの生育促進メカニズムに関しては不明であるが、培養ろ液が細菌培養液を添加した場合と同様にハウレンソウ根の生育を促進したため、Bタイプの菌株と同様に菌体外に分泌された物質によると推察している。

水耕栽培で生育促進が見られた菌株を土耕に供試した場合は、顕著な生育促進効果は認められなかった。抗生物質耐性菌株を用いて、根に定着した接種菌株密度を希釈平板法により調査したところ、検出限界以下であった。そのことより、接種菌株が根に十分に定着できなかったため、ハウレンソウの生育促進効果が発揮されなかった可能性が推察された。

接種した有用細菌が作物根圏で、その機能を十分に発揮するためには、菌の根定着に関する土壌及び根圏での生態を詳細に調べて、その生態解析に即した接種法の改善を行うことで、接種効率の向上が期待される。

Ⅲ ハウレンソウへの蛍光性 *Pseudomonas* の接種・定着法

細菌を種子や根に接種する手法は、バクテリゼーション (Bacterization) と呼ばれている。バクテリゼーションに関しては、根から分離される根圏細菌を用いて多くの研究が行われてきた^{16, 23, 24, 25)}。

Ⅱにおいて、ハウレンソウ生育促進効果の高い菌を効率的に選抜しうる生物検定法を開発した。その生物検定法を用いて、ハウレンソウの生育を促進する機能を持つ菌株を数菌株選抜した。

ここでは、ハウレンソウの生育を促進する蛍光性 *Pseudomonas* の種子接種法（種子バクテリゼーション）の検討を試みた。最初に蛍光性 *Pseudomonas* のハウレンソウ種子への接種菌密度と根定着との関係について検討した。また、メチルセルロースは、天然パルプを原料とするため安全性が高く、環境や人体への安全性に関しても優れている。そのメチルセルロースを種子接種した菌株の保護物質として活用することで、種子接種した蛍光性 *Pseudomonas* の保存性の向上が図れるか否か検討した⁷⁴⁾。

1 材料及び方法

1) 種子接種菌密度と根定着菌密度との関係

供試菌株は、ハウレンソウに対して生育促進機能を持つ蛍光性 *Pseudomonas* H3株の抗生物質三重耐性菌株H3R株（ストレプトマイシン：200mg L⁻¹，アンピシリン：100mg L⁻¹，ナリジキシン酸：100mg L⁻¹）を用いた。菌株は、TSB (Bact Tryptic Soy Broth) 培地を用いて28℃で24時間の液体振とう培養を行った。菌体培養液を9,000rpmで遠心分離後、菌体を0.01Mのリン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁し、菌密度の異なる菌懸濁液 (10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴cfu mL⁻¹) を調製した。

調製した各菌懸濁液にあらかじめ殺菌処理したハウレンソウのネーキッド種子 (品種：おかめ) を28℃で1時間浸漬 (種子バクテリアゼーション) し、クリーンベンチ内で30分間乾燥させた。

種子に接種した菌量を計測するために、3gの種子を0.01Mのリン酸緩衝液 (pH7.0) 中で、ホモジナイザー (ヒスコトロン NS-51: 10,000rpm) を用いて粉碎し、種子に付着した菌密度を希釈平板法で計数した。測定は3反復で行った。

また、初期 (20日) ハウレンソウ根に定着した接種菌株を計数するために、接種種子を市販培土 (サンサン床土: 育苗床土研究会) を入れた直径12cmの黒色ポリポットに播種し、20℃、湿度80%、明暗12時間の人工気象室内で20日間栽培した。栽培後に、IIに示した方法に準じて、根を磨碎し、根 (根面、根内) に定着した菌密度を上記三種の抗生物質を含むP1培地を用いた希釈平板法によって計数した。測定は3反復で行った。

2) 蛍光性 *Pseudomonas* 接種種子の保存性

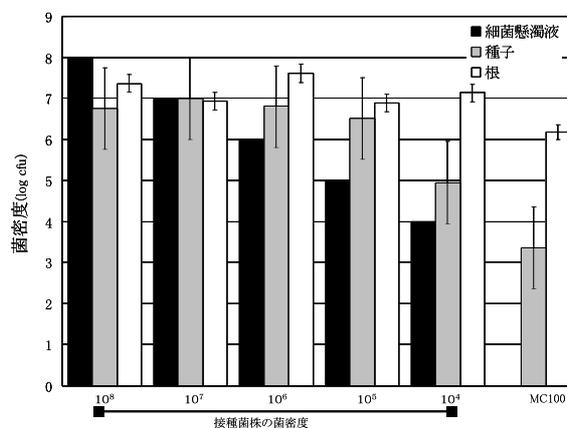
1) と同様にH3R株の10⁸cfu mL⁻¹の菌懸濁液を調製した。菌懸濁液にあらかじめ殺菌処理したハウレンソウのネーキッド種子 (品種：おかめ) を28℃で1時間浸漬 (種子バクテリアゼーション) した。次に、10g L⁻¹メチルセルロース (重合度100あるいは10,000) に1時間浸漬した。これを直ちにクリーンベンチ内で乾燥した (6時間)。乾燥種子をペトリ皿に入れ、4℃と20℃で保存した。経時的に180日まで種子に付着している菌密度を、抗生物質含有P1培地を用いた希釈平板法によって3反復で計数した。

ペトリ皿内の殺菌水にて湿らせたろ紙上に180日間保存したハウレンソウ種子を2日間静置し、発芽した種子数を調査した。

2 結果

1) 種子接種菌密度と根定着菌密度の関係

第8図に示すように、種子を浸漬した菌懸濁液の菌密度が10⁵cfu mL⁻¹以上の場合には、種子に付着した菌密度には差がみられず、10⁶~10⁷cfu seed⁻¹の菌密度であった。10⁴cfu mL⁻¹の場合には種子に定着した菌数は低下し、10⁵cfu seed⁻¹となった。このように、種子1粒あたりの菌密度は浸漬した菌懸濁液の菌密度に応じて10⁷cfu seed⁻¹あるいは10⁵cfu seed⁻¹となった。しかし、その多少に関わらず、ハウレンソウ根に定着した接種菌の菌密度には顕著な差は無く、概ね10⁷cfu g⁻¹の菌密度を示した。



第8図 接種菌株の種子付着菌密度及び根定着菌密度

注) MC100: メチルセルロース (重合度100) 処理種子

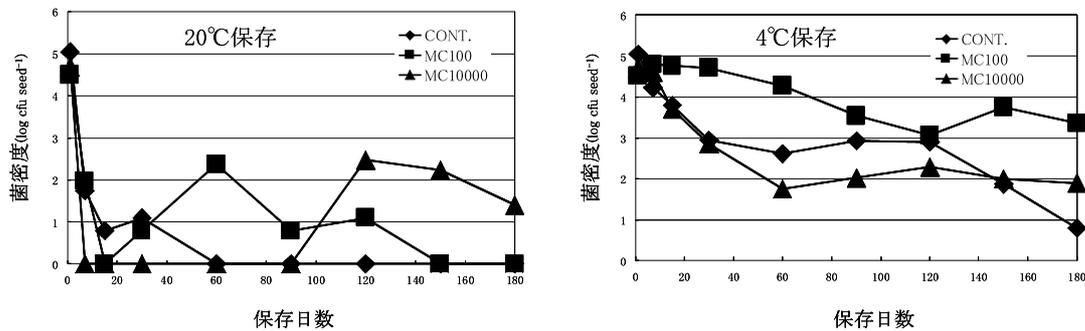
図中の棒は標準偏差を表す。

細菌懸濁液log cfu mL⁻¹ 種子log cfu seed⁻¹

根log cfu g⁻¹ FW root

2) 蛍光性 *Pseudomonas* 接種種子の保存性

バクテリアゼーションした種子の保存期間中における接種菌株の菌密度の変化を第9図に示した。菌株を接種した種子を20℃で保存した場合は、菌密度が急激に減少して、検出限界以下になることもあった。メチルセルロース無処理の対照区は、60日目以降には検出限界以下となった。これに対して、4℃で保存した場合は、菌密度の減少がかなり緩やかであった。種子を重合度100のメチルセルロース (MC100, 10g L⁻¹) で処理することで菌密度の低下が抑えら



第9図 種子に接種した菌株の保存期間中における菌密度の変化

CONT：無処理

MC100：メチルセルロース（重合度100）処理

MC10000：メチルセルロース（重合度10000）処理

れ、比較的長期（6カ月）にわたり種子の接種菌密度を高く維持（ $10^3 \sim 10^4 \text{cfu seed}^{-1}$ ）した。重合度10,000のメチルセルロース（MC10000, 10g L^{-1} ）処理では無処理の場合と比較し、菌密度は同等もしくは低くなった。180日間保存した後の種子の発芽率は、いずれの処理区においても90%以上と高く、4°Cにおける保存及びメチルセルロースによる処理はハウレンソウ種子の発芽に悪影響がなかった。

3 考 察

蛍光性 *Pseudomonas* は、種子にコーティングして播種すると、種子の周りでアミノ酸及びカルボン酸等からなる種子分泌物を利用して増殖し、幼根に沿って増殖を続け、根圏に定着すると考えられている^{39, 61}。その際に、発芽種子圏でいかに早く増殖させるかが根圏定着にとって重要である。種子にどの程度の菌密度があればPGPRの有用機能が発揮されるかは、様々な環境要因の影響を受けると考えられる。本試験で用いた菌に関しては、 $10^4 \text{cfu seed}^{-1}$ 程度以上あれば根に十分に定着しうることが判明した。

農業現場での有用微生物の利用にあたっては、バクテリアゼーションした種子における菌密度の保存性も大きな課題である。このような研究は、近年、根圏細菌を用いて国内外を問わず盛んに研究がなされている^{16, 23, 25, 56, 80}。コーティング素材としても、メチルセルロースをはじめ多くの研究が行われている。メチルセルロースは保水能力が高く、種子を乾燥した際に細菌の細胞を乾燥から保護する機能を持

つ。また、接種細菌の種子への付着を促進する機能も持っている²⁴。特に、種子バクテリアゼーションの際にメチルセルロースなどの保水性の高い資材を用いることは、耐乾性の芽胞を作らない蛍光性 *Pseudomonas* を利用する場合に必要な不可欠な技術である。

メチルセルロース処理と低温保存を併用することで接種菌の種子上での菌密度が維持され、本方法は蛍光性 *Pseudomonas* の種子バクテリアゼーションに有効な方法であると推察された。ハウレンソウ種子の菌密度と根定着菌密度との関係の結果より、菌密度は若干低いものの $10^3 \sim 10^4 \text{cfu seed}^{-1}$ 菌密度の種子を土壤に播種した場合に、接種菌はハウレンソウ根に十分に定着可能であった。メチルセルロースを用いて、4°Cで保存する方法は、種子バクテリアゼーションの方法として有効な技術である。

IV 画像解析装置を用いた蛍光性 *Pseudomonas* の運動性解析

近年のコンピューターの能力向上及び画像解析ソフトウェアの開発により、蛍光画像利用による微生物バイオマス測定等の研究成果が報告されている⁵¹。さらに、医学分野において細菌の運動性解析にコンピューターを利用した報告がある^{36, 63}。

そこで、土壌ECをはじめとする化学性等、様々な土壌環境要因が蛍光性 *Pseudomonas* の挙動に与える影響把握のひとつのアプローチとして、画像解析装置を用いた細菌の運動性解析法について検討し

た。最初に、動画解析ソフトを用いることにより土壤溶液中での細菌の運動性を解析する方法を検討した⁷²⁾。次に、得られた画像解析法を用い、有機物を施用した土壤より採取した土壤溶液中での蛍光性 *Pseudomonas* の運動性を測定することを試みた。

1 材料及び方法

1) 画像解析による細菌運動性解析法の検討

境らは、塩類集積土壤における肥料成分として Ca^{2+} の増加により蛍光性 *Pseudomonas* の走化性または運動性が抑制されると報告している⁶⁰⁾。その報告では、軟寒天法を用いて、運動性に対する高濃度塩化カルシウム耐性菌と非耐性菌とを類別していた。画像解析法の有効性を判断するために、同様の類別が画像解析法を用いても可能であるのか否かを検討した。高濃度カルシウム耐性菌を得るために、中国農業試験場畑地利用部青野圃場の塩類集積ハウレンソウハウス ($\text{EC}:\text{EC}:1.38\text{dS m}^{-1}$) の土壤を採取し、0.01Mリン酸バッファー (pH7.0) で懸濁後、P1培地に土壤懸濁液をプレティングし28℃で培養した。得られたコロニーについて、境らの報告⁵⁹⁾に基づいて、150mMのカルシウム濃度のTSB培地 (塩化ナトリウム無添加) を用いて、菌株の増殖活性を測定するカルシウム耐性試験を行い、高濃度カルシウム耐性菌を選抜した。

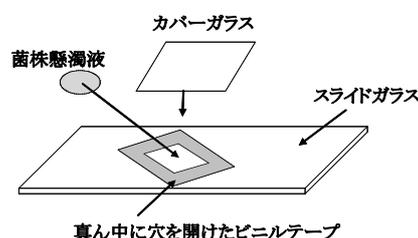
軟寒天法と画像解析試験には、高濃度塩化カルシウム非耐性菌であるH3株及び高濃度塩化カルシウム耐性菌株HR5株を供試した。画像解析法は、菌株を1/10濃度のTSB培地 (塩化ナトリウム無添加) において28℃で24時間振とう培養した。培養菌液を9,000rpm、5分間遠心して集菌した。集菌した菌株を0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) にて洗浄した。この操作を2回繰り返して、洗浄集菌後、菌株を0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に懸濁した。

菌株懸濁液0.01mLを塩化カルシウム濃度 (0, 25, 50, 100, 150, 200mM) の異なる水溶液1mLに添加した。28℃で1時間静置後、通常のスライドガラス上にビニールテープなど耐水性の粘着テープに貼り付けてホールスライドガラスとして用いるビニールテープ法⁶⁶⁾によりプレパラートを作製した (第10図)。光学顕微鏡 (800倍) にセットしたCCDカメラ (Charge Coupled Deviceカメラ, SONY DXC-151A)

で1/30秒ごとに12秒間の動画像をコンピューターに取り込んだ。

第11図に示したように、取り込んだ画像を動画解析ソフト (株式会社ライブラリー 東京都中央区) により、菌株の運動性 (運動速度) を計測した。計測法は以下の通りである。追跡したいターゲットの細菌細胞を画面上で指定し、対象物を自動認識させた。対象物の面積重心を計測しながらセミオートで追跡を行わせた (12反復)。本方法により二次元の座標から移動距離、速度等の二次元データが算出可能である。蒸留水中の細菌の運動速度を100とした時の得られた細菌の運動速度の相対値を算出し、相対運動速度とした。

一方、TSB軟寒天培地 (寒天濃度0.3% 塩化ナト



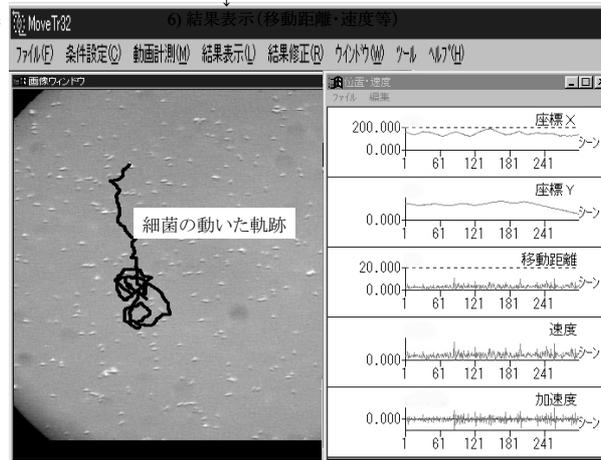
第10図 画像解析に利用したビニールテープ法の概要

画像解析ソフトウェア

連続画像の取り込み (顕微鏡、CCDカメラ)

動画解析ソフトウェア

- 1) 連番画像ファイル指定
- 2) キャリブレーション設定 (ターゲットの抽出)
- 3) 追跡ターゲット (菌株) の指定
- 4) 追跡 (セミオート)
- 5) 結果ビデオ表示
- 6) 結果表示 (移動距離・速度等)



第11図 画像解析ソフトウェア処理手順及び画面

リウム無添加)に供試菌株を接種し、28℃で24時間培養し、軟寒天培地上でのコロニーの広がりを確認する軟寒天法^{1, 60)}を用いて、菌株の運動性に及ぼす塩化カルシウム濃度の影響についても検討した。測定は3反復で行った。

2) 菌株の運動性に及ぼす塩類集積土壌の土壌溶液の影響

塩類集積が菌株の運動性に与える影響について検討するために、塩類集積土壌(ホウレンソウ連作土壌EC:1.38dS m⁻¹)及び塩類非集積土壌(非作付土壌EC:0.04dS m⁻¹) (中国農業試験場畑地利用部青野圃場, 細粒褐色低地土壌)を用いた。最大容水量の60%に調整し、各土壌より遠心(pF4.2, 15分間)法により土壌溶液を採取した。土壌溶液を0.2μmのメンブレンフィルターで濾過除菌し、その土壌溶液に、1)と同様に培養及び洗浄し、0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁した菌株(H3株)懸濁液を添加した。画像解析法を活用し、蒸留水中の細菌の運動速度を100とした時の得られた細菌の運動速度の相対値を算出し、相対運動速度とした。

3) 有機物施用が蛍光性 *Pseudomonas* の運動性に及ぼす影響

IIにおいて選抜した水耕栽培でホウレンソウの生育を促進する蛍光性 *Pseudomonas* (H3, D23, HS1, HS23株)を供試した。

供試有機物として、京都府北部で容易に入手可能な有機物と蛍光性 *Pseudomonas* の選択培地に用いられる試薬を用いた。有機物(数字はC/N比を示す)として、イナワラ牛糞堆肥(12.8), イナワラ馬糞堆肥(13.3), オガクズ馬糞堆肥(17.8), オガクズ豚糞堆肥(12.6), バーク堆肥(32.7), イナワラ(39.5), エンバク桿(26.9), ススキ桿(30.0)及びモミガラ(52.0)を用いた。試薬としてグルコース, シュクロース, デオキシコール酸ナトリウム, トレハロース, ベタイン1水和物及び馬尿酸ナトリウムを用いた。

土壌は細粒褐色低地土(中国農業試験場畑地利用部青野圃場より採取)と中粗粒灰色低地土(中国農業試験場畑地利用部位田圃場より採取)を1:1の比率で混合した土壌を使用した。混合土壌を利用した理由として、中国農業試験場畑地利用部青野圃場

の細粒褐色低地土は水を供給した後に乾燥すると強力に固化してしまう性質のために、ポット試験の利用には適さない。そのため、砂質である中粗粒褐色低地土を混合し、排水性を高めるなどしてポット試験に適するように調整した土壌を培土として用いた。

有機物はイナワラ牛糞堆肥を100t ha⁻¹施用したときの炭素量に合わせて、相当量を施用した。また、試薬はイナワラ牛糞堆肥を10t ha⁻¹施用したときの炭素量に合わせて、相当量を施用した。その土壌を最大容水量の60%に保ち、25℃で30日間培養した。培養後に、pF4.2で15分間遠心し土壌溶液を採取した。各供試菌株の土壌溶液中における運動性は、1)に記載した画像解析法により解析した。また、土壌溶液中のpHや陽イオン含量は、pHメーター及び原子吸光分光光度計を用い、常法により測定した。測定は3反復で行った。

2 結 果

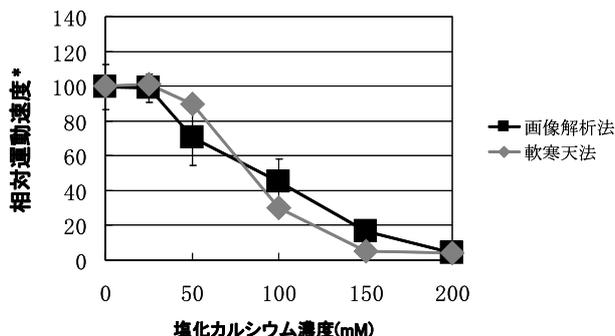
1) 画像解析による細菌運動性解析法の検討

軟寒天法に比べ、画像解析法は試料の量が少なくても解析可能であるために、解析用試料として土壌溶液等を利用できることがメリットとして考えられる。画像解析法において、多くの個体の中からランダムに抽出してサンプル数を10以上にすることにより、得られる相対運動速度の測定値のばらつき程度を平均値に対する割合で示す変動係数が20%程度となることを確認した。

H3株の運動性に及ぼす塩化カルシウムの影響について、軟寒天法による解析結果を第12図に示した。150mMのような高濃度塩化カルシウム条件においては、コロニーの広がりが抑制され、H3株の運動性は高濃度塩化カルシウムに感受性があると判断された。同様に、画像解析装置を利用した運動性解析法においても、H3株は150mM以上の高濃度塩化カルシウム条件において、相対運動速度が顕著に低下する傾向にあった。

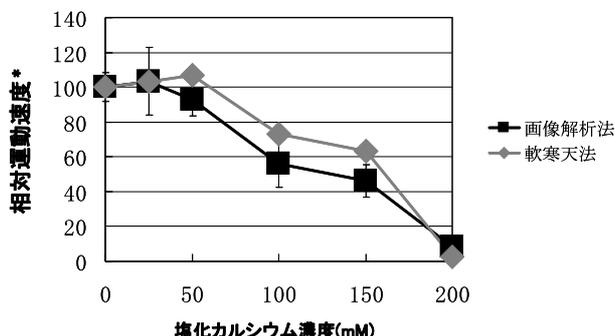
第13図に示すように、高濃度塩化カルシウム耐性菌株であるHR5株の運動性は、H3株に比べ150mMまでの高濃度塩化カルシウムにおいても抑制が緩和された。以上の結果より、塩化カルシウムによる菌株の運動性抑制効果は、軟寒天法及び画像解析法に

て同様に解析可能であった。



第12図 非塩類耐性菌株の運動性評価における軟寒天法と画像解析法の比較 (H3株)

* 蒸留水中の細菌の運動速度を100とした相対値

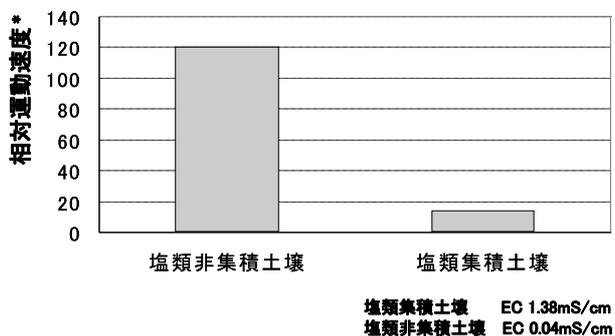


第13図 塩類耐性菌株の運動性評価における軟寒天法と画像解析法の比較 (HR5株)

* 蒸留水中の細菌の運動速度を100とした相対値

2) 菌株の運動性に及ぼす塩類集積土壌の土壌溶液の影響

第14図に示したように、塩類集積土壌及び非集積土壌から採取した土壌溶液中では、蒸留水中の運動



第14図 塩類集積土壌及び非集積土壌から採取した土壌溶液中における細菌の運動性 (H3株 画像解析法)

* 蒸留水中の細菌の運動速度を100とした相対値

性を100とした場合、H3株の相対運動速度はそれぞれ120±11.9及び15±1.3であった。供試した土壌溶液中の組成を第2表に示した。このように、従来の軟寒天法を用いて塩類非耐性菌株であると判断されたH3株の運動性が、塩類集積土壌においても抑制されることが、画像解析法を用いて解析可能であった。

3) 有機物施用が蛍光性 Pseudomonas の運動性に及ぼす影響

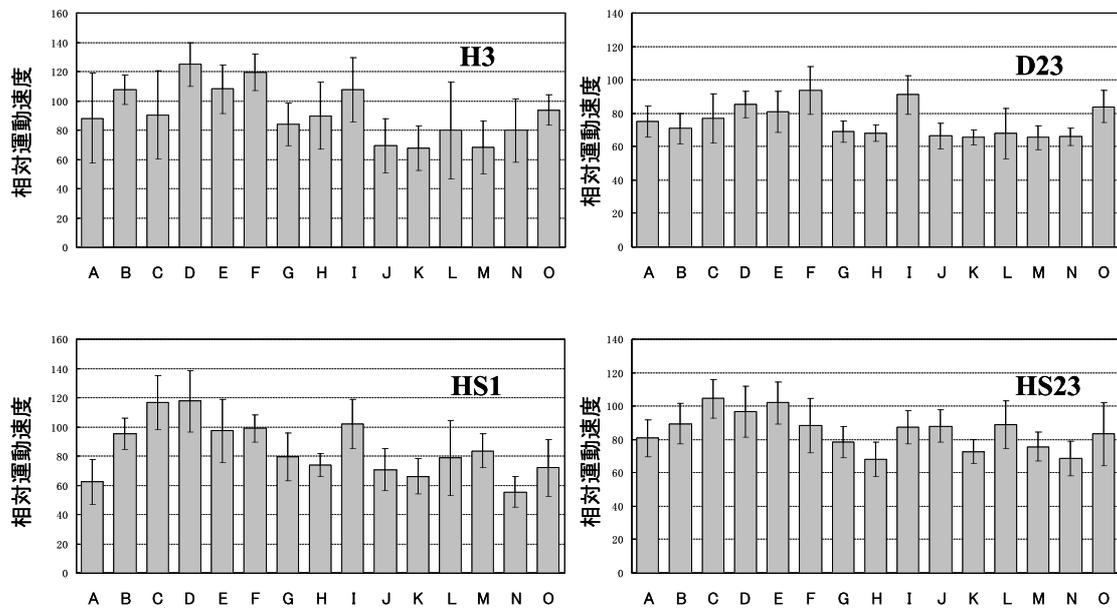
第15図に示したように、有機物施用が菌株の運動性に与える影響は菌株ごとに異なっていた。相対運動速度は、H3株ではエンバク桿やススキ桿施用区で高まり、グルコース、シュクロース及びトレハロース施用区で低下した。D23株では、いずれの処理区でも蒸留水中の運動速度より低下したが、その中でも、ススキ桿やオガクズ豚糞堆肥施用区で相対運動速度は高かった。HS1株ではエンバク桿やイナワラ馬糞堆肥施用区で高まり、イナワラ、シュクロース及びベタインー水和物施用区で低下した。HS23株ではイナワラ馬糞堆肥やオガクズ馬糞堆肥施用区で高まり、モミガラ、シュクロース及びベタインー水和物施用区で低下した。ここでは4菌株についての検討しか行っていないが、菌の運動性に有機物施用が大きな影響を与えている可能性が示唆された。

一方、第2表に示すように、土壌溶液中の塩濃度をみると施用した有機物により、かなり変動したが、塩類の濃度は菌株の運動性を抑制した塩類集積土壌のそれに比べて顕著に低かった。

3 考 察

蛍光性 Pseudomonas の土壌中における根への移動は、鞭毛運動による走化性(運動性)によって行われるため、運動性は細菌の根圏定着に關与する重要な特性のひとつである。

軟寒天法は、それ自体簡便な方法であり、個別の塩類濃度等が細菌の運動性に与える影響の解析は可能である。しかし、土壌溶液等の試料に關しては解析することができない。画像解析装置を利用した方法の利点として、運動データの数値化も可能であり、様々な条件を比較解析することができる。さらに、供試試料が少量で解析可能であるため、運動性解析用の試料として土壌溶液等の環境中の試料も利



第15図 各種有機物の添加が蛍光性 *Pseudomonas* の運動性にあたる影響

相対運動速度は、蒸留水中の細菌の運動速度を100とした相対値。

A：イナワラ， B：イナワラ牛糞， C：イナワラ馬糞， D：エンバク桿， E：オガクズ馬糞， F：ススキ桿， G：パーク堆肥， H：モミガラ， I：豚糞堆肥， J：グルコース， K：シュクロース， L：デオキシコール酸ナトリウム， M：トレハロース， N：ベタインー水和物， O：馬尿酸ナトリウム

第2表 有機物施用した土壌より採取した土壌溶液のpH及び陽イオン濃度

	pH	陽イオン種(mg L ⁻¹)			
		K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
イナワラ	5.76	146	23	730	85
イナワラ牛糞	5.64	1936	426	1240	390
イナワラ馬糞	5.75	201	488	980	280
エンバク桿	5.56	139	36	600	6
オガクズ馬糞	5.20	630	291	1090	290
ススキ桿	5.79	85	ND	520	35
パーク堆肥	5.76	100	181	820	125
モミガラ	5.94	131	29	775	125
豚糞堆肥	5.56	618	590	1600	480
グルコース	5.62	109	ND	955	195
トレハロース	5.68	106	ND	1080	195
ベタインー水和物	5.33	277	43	1050	215
馬尿酸ナトリウム	8.11	66	1470	490	ND
対照	5.63	65	4	640	65
塩類集積土壌	5.40	764	1632	10260	3400

ND<0.1mg L⁻¹

用できることなどが挙げられる。画像解析法は、軟寒天法を用いた場合と同様の解析結果が得られたために、細菌の運動性を解析する優れた方法である。

次に、画像解析法を用いて、肥培管理が細菌の運動性にどのような影響を与えるのか解析を行った。

塩類集積土壌から採取した土壌溶液中で、H3株の運動速度は低下したことから、塩類集積が細菌(H3株)の運動性にストレス要因として作用していることが画像解析法により解析可能であった。このように、土壌中で実際に細菌が生息している条件に

近い試料である土壤溶液中の細菌の運動性を解析することにより、細菌の運動性に及ぼすストレス要因が解析可能であり、接種菌の運動性の低下を引き起こさないような肥培管理の指針作成に貢献する。

さらに、様々な有機物の施用が蛍光性 *Pseudomonas* の運動性に及ぼす影響について解析した。これは、有機物施用することで蛍光性 *Pseudomonas* の生理活性、ひいては運動性を高め、結果として蛍光性 *Pseudomonas* の根定着を促進することができるという仮説に基づいている。その結果、菌株ごとに運動性を促進する有機物は異なったが、いくつかの有機物については、ほぼ共通して菌株の運動性を高める傾向が認められ、その有機物としてエンバク桿、ススキ桿、イナワラ及びイナワラ馬糞堆肥があげられた。

また、第2表に示したように、有機物施用した土壤から抽出した土壤溶液中の塩濃度は塩類集積土壤から抽出した土壤溶液中の塩濃度に比べてかなり低く、蛍光性 *Pseudomonas* の運動性にカルシウムイオン (150mM) が影響を与えるといった境らの報告⁶⁰⁾ に比べても、はるかに低かった (1.2~40mM)。そのため、今回の有機物施用に伴う蛍光性 *Pseudomonas* の運動性の低下には塩類濃度は関与していないと判断した。

Toyota and Ikedaは、菌株の運動性は根方向または根に沿った菌株の移動に重要な役割を果たしていると報告している⁷⁰⁾。有機物施用により菌株の運動性を促進することは、結果として、菌株の根定着を促進することになると思われる。本項では、根近傍における菌の挙動に深く関与していると思われる土壤中での菌の運動性について、画像解析装置を用いて検証を行った。この結果と他の根定着に関する検証結果とを組み合わせることで、接種菌の根圏定着を把握することが可能になる。そのため、蛍光性 *Pseudomonas* の他の根圏定着因子について以後の項でさらに検討することとした。

V 蛍光性 *Pseudomonas* のハウレンソウ根への分布における水分移動の重要性

前項では、接種した細菌の運動性を評価する手法の確立と、運動性に及ぼす土壤塩類集積の影響や有

機物添加の影響等について検討した。菌株の根近傍の移動には運動性が重要な要因である。しかし、根に沿った接種菌株の移動に関しては、走化性や運動性の影響は小さく¹²⁾、土壤中での水の動きの影響が大きいことが想定される。実際にかん水に伴う土壤中の水の流れの重要性を指摘している報告もある¹³⁾。

本項では、運動性を有している蛍光性 *Pseudomonas* を用いて、根に沿った移動における土壤中の水分含量及びかん水に伴う水の流れの影響について検討した。そのために、根箱と抗生物質耐性菌を用いて土壤水分及びかん水位置を変えた試験を行った。さらに、生物発光遺伝子 (*Lux*) 遺伝子を蛍光性 *Pseudomonas* に導入し、CCDカメラを用いて観察することで、蛍光性 *Pseudomonas* のハウレンソウ根定着状況を解析の可能性を試みた。生物発光 (*Lux*) 遺伝子は、海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* や *Vibrio harveyi* の生物発光システムである。これらの細菌は *Lux* 遺伝子を持ち、以下の反応により生物発光を行う。

$R-CHO + FMNH_2 + O_2 \rightarrow R-COOH + FMN + H_2O + \text{light}$
FMN:flavin mononucleotide

Sakaiらは、常に発現するように構築した *Vibrio harveyi* 由来の生物発光遺伝子 *luxAB* を根圏より分離した *Pseudomonas putida* に導入した⁵⁸⁾。その結果、この菌株のハウレンソウ根圏における分布状況を示すとともに、土着の微生物が接種菌株の定着を阻害する要因になっていることを証明した。生物発光遺伝子を導入した蛍光性 *Pseudomonas* を用いて、かん水位置を変えたポット試験を行い、蛍光性 *Pseudomonas* の根に沿った移動における土壤水の流れの影響を解析した⁷⁵⁾。

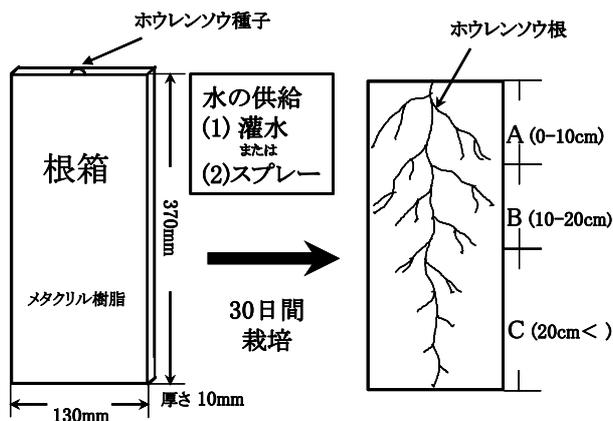
1 材料及び方法

1) 根箱試験

供試菌株として、Ⅲで用いたストレプトマイシン、アンピシリン及びナリジキシン酸の抗生物質三重耐性蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌 H3R 株 (ハウレンソウの生育促進作用を示す) を供試した。菌株のハウレンソウへの接種法として種子接種法を用いた。種子接種法は、H3R 株を TSB 培地において 24 時間液体振とう培養した培養菌液に、あらかじめ殺菌処理し

た種子を1時間浸漬する方法を用いた。第16図に示したように、根箱（メタクリル樹脂製：高さ×幅×厚さ=37cm×13cm×1cm）に、一定量の市販培土（サンサン床土：育苗床土研究会）を詰め、ホウレンソウ‘おかめ’を播種した。気温28℃、湿度70%、明暗12時間の人工気象器内でかん水量（1, 10, 50, 100mL day⁻¹ 根箱上部からかん水）及び土壌の水分含量を一定（最大容水量の30, 50, 60, 80%になるように根箱側面から霧吹きにてかん水）にして、30日間栽培した。

栽培終了後、根箱から根及び土壌を取り出した。それを第16図に示したようにA（0-10cm）、B（10-20cm）及びC（20-37cm）の3層に分けた。根（根面・根内）の各部位及び根箱の土壌中のH3R株の菌密度を、上記3種の抗生物質を含有するP1培地を用いて希釈平板法により計数した。根の菌密度は、根を摩砕して得られた根摩砕液を土壌の菌密度は0.01Mのリン酸バッファー（pH7.0）に懸濁した液を希釈平板法に用いた。菌密度の測定は3反復で行った。



第16図 根箱試験の概要

2) 生物発光遺伝子の蛍光性 *Pseudomonas* への導入

生物発光遺伝子の受容菌として、水耕栽培でホウレンソウの生育促進効果を示した蛍光性 *Pseudomonas* H3, HS1株を用いた。供与菌として *E.coli* S17-1株 (Plasmid pKPlux: Tn5-Lux保有 (九州大学より供与)) を用いた。このトランスポゾンベクター pKPluxは mini-Tn5luxAB¹⁸⁾ のテトラサイクリン耐性遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子に組換えたもの

である。接合伝達法により、供与菌のプラスミドを受容菌である蛍光性 *Pseudomonas* に導入し、プラスミドのトランスポゾンTn5を受容菌の染色体に転移させた。接合伝達法は以下の通り行った。供与菌と受容菌を混合し、LB寒天培地上で28℃で8時間培養した。培養後、混合菌液を0.01Mのリン酸バッファー（pH7.0）で洗浄・懸濁し、その菌懸濁液をP1培地（カナマイシン50mg kg⁻¹含有）に接種した。28℃で3日間培養し、出現したコロニーを1/10濃度のTSA培地、次いでP1培地（カナマイシン50mg kg⁻¹含有）で再分離した。

3) 生物発光のCCDカメラによる検出条件

生物発光遺伝子標識蛍光性 *Pseudomonas* をホウレンソウに種子接種し、121℃で1時間オートクレーブ滅菌した市販培土（サンサン床土）を入れた直径10cmの黒色ポリポットにて、20℃、湿度80%、12時間照明の人工気象室内で2週間栽培した。栽培後に根を取り出し、根を殺菌水にて洗浄した。ここで、殺菌した市販培土を用いたのは、土着菌の競合を取り除き接種菌株をホウレンソウ根に確実に定着させるためである。P1培地（カナマイシン 50mg kg⁻¹含有）上にホウレンソウ根を置き、24時間培養した。培養後、1-デカナルを添加し、微弱光用冷却CCDカメラ（BS-30C ビットラン株式会社 埼玉県行田市）を用いて、細菌の発する微弱光を検出可能なCCDカメラの温度及び露光時間等の撮影条件を検討した。

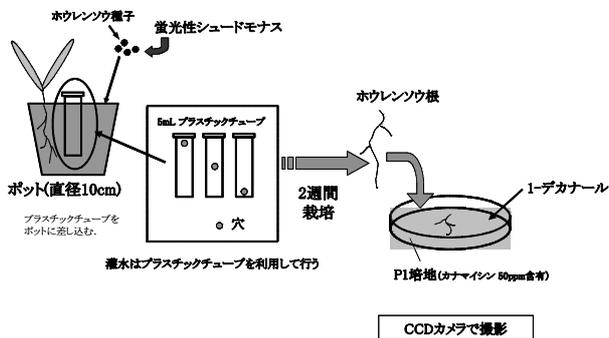
4) かん水位置による蛍光性 *Pseudomonas* の根定着

H3株から作出した生物発光遺伝子組換体のH3-4株を用いた。根箱試験と同様に殺菌したホウレンソウ種子に菌株を種子接種した。その種子を、市販培土（サンサン床土）をつめた直径10cmのポリポットに播種した。

第17図に示したように、5 mLのプラスチックチューブに上、中及び下のいずれかに穴を開けてポットに差し込んだ。このプラスチックチューブを用いてかん水することにより、プラスチックチューブの穴より水が出るために、上方、中ほどまたは下方からかん水を行うことが可能となる。全てのポットは

最大容水量の50%になるように、かん水を行った。同様にプラスチックチューブを使用せずポット全体からのかん水区も設けた。上方からのかん水区をTop, 中ほどからのかん水区をCenter, 下方からのかん水区をBottom及びポット上面全体からのかん水区をCont.とした。

2週間, 気温28℃, 湿度70%, 明暗12時間の人工気象器内で栽培した。栽培後に, ポットから根を取り出し, 根を滅菌水で洗浄した後にP1培地 (カナマイシン 50mg kg⁻¹含有) に静置して, 28℃で20時間培養した。培養後に1-デカナルを添加し, 3) で検討した撮影条件を用い, CCDカメラで撮影した。測定は3反復で行った。



第17図 かん水位置による蛍光性*Pseudomonas*の根定着試験

2 結果

1) 根箱試験

根箱試験における接種菌株の根及び土壌への移動の結果を第3表に示した。土壤水分が一定となるように霧吹きを用いてかん水した場合(根箱内で上方から下方への水の流れが少ない)は, 根箱の水分含量が最大容水量の30~80%と土壤水分の多少に関わらず, ホウレンソウの株元であるA部分の根からは接種菌株の菌密度は6.14~6.58 log cfu g⁻¹ FW-rootと同程度であった。これに対して, B部分の根からは, 80%の多水分条件以外では接種菌株は検出されなかった。根の先端であるC部分の根からは, どの水分条件の根箱からも接種菌株が検出されなかった。

第4表に示したように, 根箱上方から, かん水量を一定にした場合(根箱内で, 上方から下方への水の流れがある), 1mL day⁻¹とかん水量が少ない場合は, 根の株元であるA部分の根からは他のかん水

第3表 土壤水分が一定の場合のH3R菌株のホウレンソウ根への移動

	ホウレンソウ根の菌密度(log cfu g ⁻¹ FW-root)			
	30%	50%	60%	80%
A	6.42±0.14	6.53±0.09	6.14±0.11	6.58±0.16
B	ND	ND	ND	5.61±0.21
C	ND	ND	ND	ND

ND: 検出限界 ND<1.82 FW: 新鮮重

A, B, Cは根箱における根の位置を示す。

A (0-10cm) B (10-20cm) C (20-37cm)

第4表 かん水量が一定の場合のH3R菌株のホウレンソウ根への移動

	ホウレンソウ根の菌密度(log cfu g ⁻¹ FW-root)			
	1mL	10mL	50mL	100mL
A	5.95±0.24	5.51±0.03	5.98±0.06	6.17±0.04
B	ND	5.80±0.05	5.81±0.21	6.08±0.01
C	ND	5.98±0.11	5.93±0.05	5.25±0.07

ND: 検出限界 ND<2.39 FW: 新鮮重

A, B, Cは根箱における根の位置を示す。

A (0-10cm) B (10-20cm) C (20-37cm)

第5表 かん水量が一定の場合のH3R菌株の根箱中の土壌への移動

	根箱土壌中の菌密度(log cfu g ⁻¹ DW-soil)			
	1mL	10mL	50mL	100mL
A	3.62±0.05	4.75±0.27	4.96±0.23	3.22±0.64
C	ND	4.51±0.18	5.60±0.12	5.12±0.08

ND: 検出限界 ND<1.39 DW: 乾物重

A, Cは根箱における土壌の位置を示す。

A (0-10cm) C (20-37cm)

量の根箱と同程度の5.95 log cfu g⁻¹ FW-root 検出された。しかし, B, C部分の根からは検出限界以下であった。これに対して, かん水量が10~100mL day⁻¹の場合は, A, B, C部分のいずれの根からも5.51~6.17 log cfu g⁻¹ FW-rootの接種菌株が検出され, 根先端の菌密度は, 株元と同程度であった。

同様に, 第5表に示したように, かん水量が1 mL day⁻¹の場合以外はC部分の土壌から接種菌株が検出された。さらに, かん水量が10mL及び50mL day⁻¹の場合はA, C部分の土壌の接種菌密度は概ね同程度であり, かん水量の多い100mL day⁻¹の場合はA部分の菌密度は低めで, C部分の菌密度が高かった。多量のかん水により接種菌が根箱下部に移送されたものと思われる。

2) 生物発光遺伝子の蛍光性 *Pseudomonas* への導入

生物発光遺伝子のH3株及びHS1株への導入に接合

伝達法により、蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の組換体を作成することが可能であった。H3株から作出した組換体をH3-4株、HS1株から作出した組換体HS1-2株とした。供与したトランスポゾン、受容菌の染色体に導入されるために、プラスミドの状態では存在させる場合より、導入した形質が安定的に維持される。また、組換えによって受容菌株が運動性を喪失していないことを顕微鏡下の観察と軟寒天法による運動性解析により確認した（データ略）。

3) 生物発光のCCDカメラによる検出条件

栽培後の根をP1培地（カナマイシン 50mg kg^{-1} 含有）上に静置し、 28°C で20時間培養後、1-デカナルをしみこませたろ紙をペトリ皿内に置き、CCDカメラで微弱光の撮影を行った。組換微生物の定着した根を、CCDカメラで微弱光を撮影した場合、 -20°C 3分間露光の条件で撮影することで、根に定着した組換体を検出することが可能であった。露光時間が短いと検出できず、露光時間が長いと画像にノイズが発生し検出ができなかった。

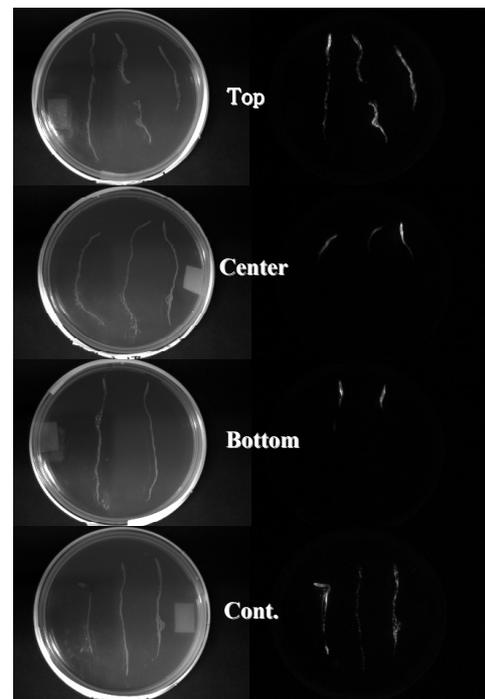
4) かん水位置による蛍光性 *Pseudomonas* の根定着

生物発光遺伝子導入した接種菌株のハウレンソウ根面での挙動は、第18図に示したように、慣行であるポット上面全体からかん水を行った場合には、H3-4株は根の全体に定着していた。また、ポット上方からかん水を行うと、同様にH3-4株が根全体から検出された。これに対し、ポット中ほどからのかん水やポット下部からのかん水では、H3-4株がハウレンソウの根の上方だけから検出され、根の下部では検出できなかった。

3 考 察

土壌中の微生物は2価の陽イオンの介在により、土壌粒子に吸着されている³⁵⁾。また、Hasebeらは土壌中では水の侵入程度によって細菌の移動は土壌により異なることを示し、この違いは土壌有機物の表面荷電の差に基づいていることを示唆した²⁶⁾。このように、細菌細胞は土壌粒子に吸着されて土壌中で自由に移動できないと思われる。

根箱試験においては、菌株が運動性を有している



第18図 ホウレンソウ根に定着したH3-4株のCCDカメラ（ -20°C 3min）での検出（右側）

にも拘わらず、根箱内で上方から下方への水の流れが無い場合には、根箱下部において接種菌株が検出できなかった。それに対し、根箱上方からのかん水を行い、根箱内に上方から下方への水の流れが存在する場合には、根箱下部において接種菌株が検出された。この結果より、種子接種した菌株は、かん水に伴う水の流れにより根箱下部まで移送されることが判明した。

生物発光遺伝子を用いた解析においても同様な傾向が認められた。上方からかん水した場合のように、土壌中で上方から下方への土壌水の流れが存在する場合は、菌株が種子から根の生育に伴い根の先端へ移動していた。これに対し、下方からかん水した場合のように、土壌中で上方から下方への水の流れが無い場合には、接種菌株は根の先端部では検出されず、接種菌株の根先端への移動が認められないことが明らかとなった。

これら二つの試験結果から、土壌中の水の流れが種子接種した菌株の根の生育に伴った移動に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

このように、土壌中で細菌が比較的長距離を移動するには土壌中の水の流れの影響を受けることが明らかとなった。ただし、根近傍のような比較的近距離

の移動には運動性や走化性などの細菌の特性が関与していると思われる^{20, 64, 70}。すなわち、根定着に伴う土壌中での細菌の移動・分布には2つの機構が関与していると判断される。土壌中の水の流れや毛管水の流れにのった細菌細胞の受動的移動と根近傍において細菌が根分泌物等に対する走化性や運動性による能動的移動である。この両機構を十分に把握することが、細菌の土壌中移動を解析する上で必要不可欠である。

VI 微少熱量計を用いた蛍光性 *Pseudomonas* の土壌中での増殖解析

これまでに蛍光性 *Pseudomonas* の運動性に関する検討を行った。本項では、根圏における増殖に焦点を当てて蛍光性 *Pseudomonas* の土壌中での挙動解析を試みた。

高感度の半導体温度センサーとローノイズアンプ（微少の電圧変化を増幅し検出感度を上げる）の開発により、微生物の物質代謝の際に生じる微少な熱量の有意な差を検出することが可能となった。熱測定法を応用し、微少熱量計を用いて、土壌のバイオマスを測定する方法の有効性が検討されてきた⁸⁴。微少熱量計を用いて微生物の増殖の際に発生する熱を経時的に測定すると、増殖熱変化曲線（微生物増殖のサーモグラム）が得られる。このサーモグラムを速度論的に解析することで、微生物の増殖状況が解析可能となる。大阪府立大学の高橋らのグループは酵母の生育系の熱測定を行い、速度論的解析法を導入した⁶⁸。さらに金野は土壌微生物活性測定への熱測定の応用可能性を検討した^{27, 42}。

ここでは、土壌中における蛍光性 *Pseudomonas* の増殖状況を把握するため、微少熱量計による蛍光性 *Pseudomonas* の土壌中での増殖解析を行った。その解析法を活用して、塩類集積など微生物の増殖にストレスとなるような環境要因を解析可能かどうか検討した。

蛍光性 *Pseudomonas* は従属栄養細菌であり、増殖には炭素源となる有機物を必要とする。有機物を併用することで、蛍光性 *Pseudomonas* の増殖を促進し、ひいては根圏定着性を高めることができるのではないかと推察される。最適な炭素源を選抜する

ために、有機物を添加した土壌に菌株を接種し、微少熱量計で測定することにより、土壌中で蛍光性 *Pseudomonas* の増殖を促進する有機物の選定を試みた。

1 材料及び方法

1) 微少熱量計を用いた細菌の増殖解析

IVで用いた塩類集積土壌（ハウレンソウ連作土壌 EC:1.38dS m⁻¹）及び塩類非集積土壌（非作付土壌 EC:0.04dS m⁻¹）（中国農業試験場畑地利用部青野圃場、細粒褐色低地土壌）10 gを試料瓶に入れ、121℃で60分間オートクレーブ殺菌した。グルコースを0.1 gと硫酸アンモニウム（グルコースのC/Nを20に調整）またはベタインー水和物0.1 gを添加した。これらは各々水溶液を作成し、0.2 μmのフィルターを通して除菌した後に、相当量を添加した。TSB培地にて28℃で24時間液体振とう培養したH3株の培養液を0.01Mのリン酸バッファー（pH7.0）で洗浄、懸濁し、その菌懸濁液を0.1mL（1×10⁷cfu mL⁻¹）試料瓶に添加した。菌株接種後、試料瓶を速やかに微少熱量計（株式会社日本医化器械製作所 大阪市西区）の試料セル内にセットした。微少熱量計には試料セルと比較セルがあり、微生物の代謝により発生した熱は、セル底面に接触する熱-電圧変換素子を通して、それに接している恒温体に吸収される。この間に変換された熱起電力は、比較セルと試料セルの差をとって電圧増幅器に入り、経時変化として記録計に記録される。このように、増殖する際に生じる熱量をモニタすることで土壌中での微生物の増殖状況が解析可能である。ここでは、H3株の増殖活性に及ぼす塩類集積土壌の影響を解析した。測定は3反復で行った。

次に、塩類濃度（Ca, Mg, K）を変化させた土壌を塩化カルシウム、塩化マグネシウムおよび塩化カリウム水溶液を加えることで作製した。その土壌を試料瓶に10 g入れた。グルコースを0.1 gと硫酸アンモニウム（グルコースのC/Nを20に調整）を水溶液で試料瓶に加え、H3株の菌株懸濁液0.1mL（1×10⁷cfu mL⁻¹）試料瓶に添加した。菌株接種後、試料瓶を速やかに微少熱量計の試料セル内にセットした。微少熱量計により、H3株の増殖活性に及ぼす塩類濃度の影響を解析した。

本項で、増殖測定に用いた微少熱量計により得られたサーモグラムから、真の温度変化 $f(t)$ が次式で表される。

$$f(t) = g(t) + K \int g(t) dt$$

$g(t)$ ：見かけの温度変化

K ：熱伝導定数またはNewtonの冷却定数

時間 t と $\ln [f(t + \Delta t) - f(t)]$ の間には、対数増殖期には直線関係があり、その勾配が比増殖速度となる。土壤微生物の比増殖速度及び平均細胞分裂時間を定量的に求めることができる。比増殖速度と平均細胞分裂時間の間には“平均細胞分裂時間 = 0.693 / 比増殖速度”の関係がある⁴²⁾。本報告では比増殖速度を増殖比較のパラメーターとして用いた。

2) 接種菌株の増殖に対する有機物の影響（希釈平板法による解析）

供試菌株として、ホウレンソウの生育を促進する機能を持つ蛍光性 *Pseudomonas* H3株の抗生物質三重耐性菌株H3R株を用いた。供試有機物（数値はC/N比を示す）として、イナワラ (39.5)、オガクズ豚糞堆肥 (12.6)、モミガラ (52.0)、イナワラ牛糞堆肥 (12.8)、オガクズ馬糞堆肥 (17.8)、牛糞ベレット堆肥 (11.4)、ススキ桿 (30.0)、エンバク桿 (26.9)、イナワラ馬糞堆肥 (13.3)、バーク堆肥 (32.7)、ベタイン 1 水和物 (4.3)、馬尿酸ナトリウム (7.7)、トレハロース及びグルコースを用いた。C/N比が20以上の有機物は硫酸アンモニウムによりC/N比を20に調整した。イナワラ等の有機物は70℃にて乾燥後、粉碎して、1 mmの篩を通過したものをを用いた。また、対照として有機物無施用区を設けた。

ポリエチレン製のふた付きポット（直径8 cm、高さ10cm）に土壤300 g（中国農業試験場畑地利用部青野圃場、細粒褐色低地土壤）を入れた。そのポットにイナワラ牛糞堆肥 (C:257.7g kg⁻¹ N:20.2g kg⁻¹) を30t ha⁻¹（水分含量75%）施用した時の炭素量に合わせて相当量の各有機物を添加した。次にTSB培地にて28℃で24時間液体振とう培養したH3R株の培養液を0.01Mのリン酸バッファー（pH7.0）で洗浄、懸濁し、その菌懸濁液を1 mL（1×10⁷cfu mL⁻¹）ポットに添加した。土壤水分を最大容水量の60%に保ち、28℃で培養した。ポットより経時的

に土壤を10 g採取し、土壤中の全細菌、放線菌、糸状菌並びに接種した蛍光性 *Pseudomonas* H3R株の菌密度を希釈平板法を用いて計数した。細菌及び放線菌は1/10TSA培地、糸状菌はローズベンガル培地²¹⁾、蛍光性 *Pseudomonas* H3R株は抗生物質含有P1培地によりそれぞれ計数した。菌密度の測定は3反復で行った。

3) 接種菌株の増殖に対する有機物の影響（微少熱量計による解析）

供試した有機物資材は、京都府北部で容易に入手可能な有機物と、蛍光性 *Pseudomonas* の選択培地に用いられ、蛍光性 *Pseudomonas* を選択的に増殖できる可能性の高い試薬（ベタイン 1 水和物、馬尿酸ナトリウム等）である。滅菌土壤10 gに滅菌した各種有機物をイナワラ牛糞堆肥を100t ha⁻¹施用したときの炭素量に合わせて、相当量を施用した。また、試薬はイナワラ牛糞堆肥を10t ha⁻¹施用したときの炭素量に合わせて、相当量を施用した。C/N比が20以上の有機物は硫酸アンモニウムによりC/N比を20に調整した。その土壤にH3、D23、HS1またはHS23株を個別にTSB培地にて28℃で24時間液体振とう培養した培養液を0.01Mのリン酸バッファー（pH7.0）で洗浄、懸濁し、その菌懸濁液を0.1mL（1×10⁷cfu mL⁻¹）添加した。菌株接種後、速やかに微少熱量計の試料セル内にセットした。微少熱量計により熱生成のサーモグラムを得て、そのサーモグラムを元に、各種有機物を添加した時の各菌株の比増殖速度を算出した。測定は3反復で行った。

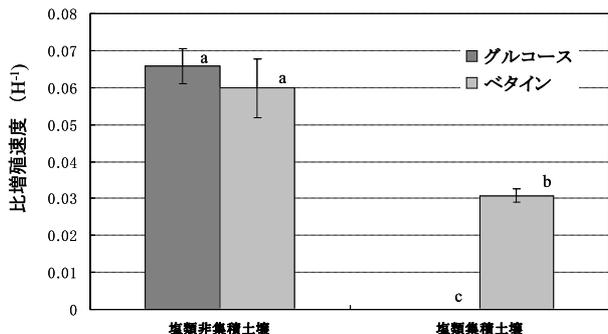
2 結 果

1) 微少熱量計を用いた細菌の増殖解析

供試したH3株は、IVで示したように塩類非耐性菌株⁵⁹⁾である。これを塩類集積土壤に接種し、炭素源であるグルコース等を添加し微少熱量計で解析を行った結果を第19図に示した。塩類集積土壤では比増殖速度が明らかに低下し、グルコース添加の場合はほぼ0にまで、ベタインの場合は対照の1/2程度にまで低下した。

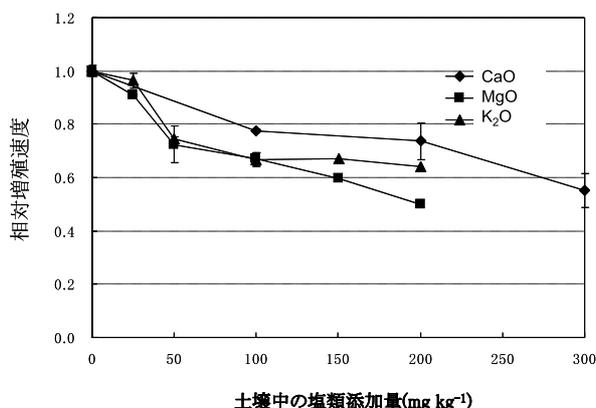
塩類濃度の影響をみると、第20図に示したように、H3株の増殖活性は塩類濃度の上昇に伴い低下していた。土壤診断基準値内で植物生育にとって適正範

圃の塩類濃度（粘質土壌，果菜・葉菜類），すなわち，CaO (200-350mg kg⁻¹)，MgO (20-40mg kg⁻¹)，K₂O (20-30mg kg⁻¹)⁸⁾であっても，増殖活性は無添加と比べてCaでは2/3，K及びMgでは4/5程度に低下していた。



第19図 塩類集積土壌における蛍光性*Pseudomonas* (H3株)の増殖

図中異なるのアルファベットは5%水準での有意性を示す。
 塩類非集積土壌EC 0.03dS m⁻¹
 塩類集積土壌EC 1.33dS m⁻¹



第20図 蛍光性*Pseudomonas*の増殖における塩類濃度の影響

相対増殖速度
 塩類無添加の比増殖速度を1.0としたときの相対値
 塩類非添加土壌
 CaO (120mg kg⁻¹)，MgO (24mg kg⁻¹)，K₂O (8mg kg⁻¹)
 土壌診断基準値
 CaO (200-350mg kg⁻¹)，MgO (20-40mg kg⁻¹)，
 K₂O (20-30mg kg⁻¹)

2) 接種菌株の増殖に対する有機物の影響（希釈平板法による解析）

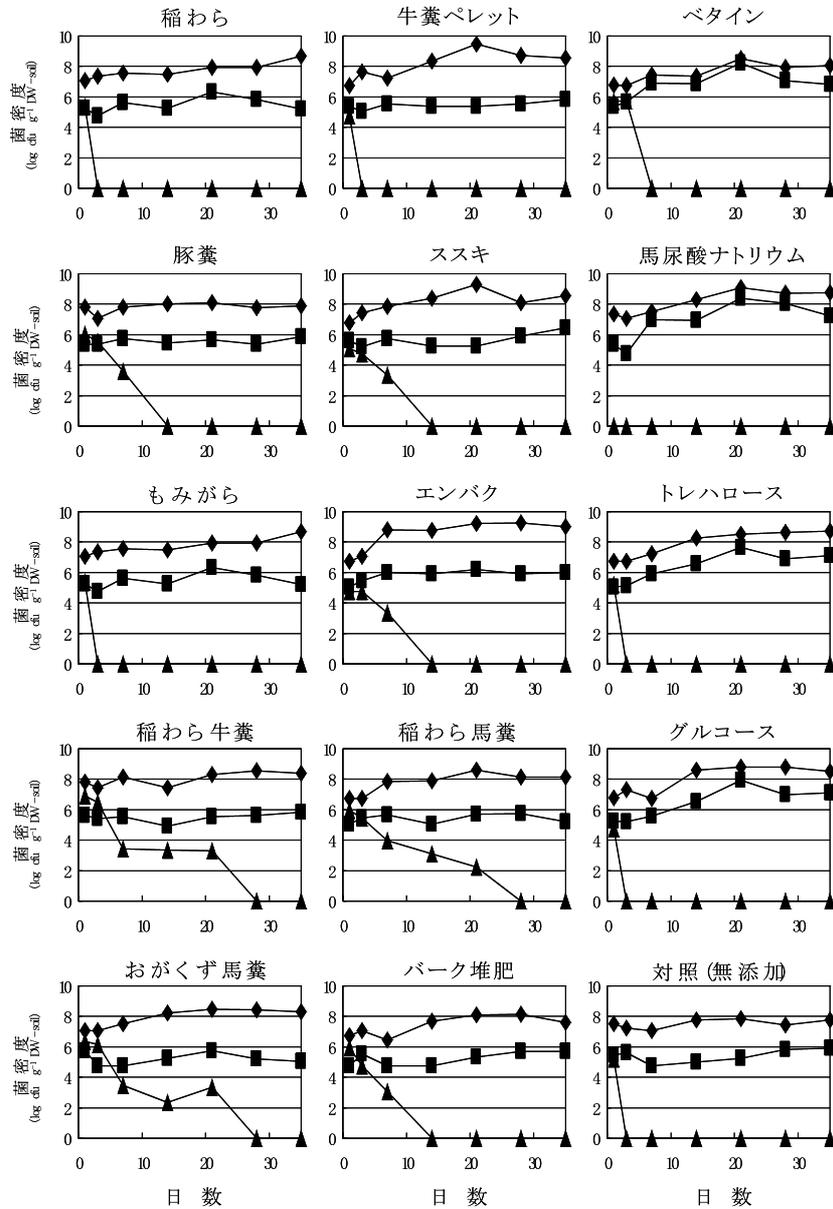
各種の有機物資材を施用した土壌中における細菌，糸状菌及び接種菌株の菌密度の推移を第21図に示した。全細菌及び放線菌数は，供試した有機物間

での違いがみられなかった。すなわち，ほぼ一定の菌密度 (10⁷~10⁸cfu g⁻¹ 乾土) で推移し，有機物の無施用と比較して大差がなかった。糸状菌は，堆肥等の有機物を施用した場合はほぼ一定の菌密度で推移 (10⁵~10⁶cfu g⁻¹ 乾土) し，有機物無施用と比較して大差がなかった。しかし，ベタイン等の低分子炭素源を施用すると，堆肥等に比べ菌密度が高く推移 (10⁷~10⁸cfu g⁻¹ 乾土) した。

接種した蛍光性 *Pseudomonas* の菌密度は，有機物を施用しないと速やかに低下し，3日目で検出限界以下となった。同様の傾向はモミガラ，牛糞ペレット，トレハロース及びグルコースを添加した場合も見受けられた。馬尿酸ナトリウムを添加した場合は対照よりも速やかに菌密度が低下し，1日後には検出限界以下となった。イナワラ，豚糞堆肥，ススキ桿，エンバク桿及びパーク堆肥も同様の傾向を示したが，有機物無添加に比べると接種菌密度の低下が緩やかであり，14日後に検出限界以下になった。ベタイン1水和物はそれらと対照との中間の傾向であった。イナワラ牛糞堆肥，オガクズ馬糞堆肥及びイナワラ馬糞堆肥を添加した場合は検出限界以下になるのが28日目と遅く，対照に比べて接種菌が土壌中に大幅に高い菌密度であった。

3) 接種菌株の増殖に対する有機物の影響（微量熱量計による解析）

蛍光性 *Pseudomonas* の土壌中での増殖に及ぼす各種有機物添加の影響を第22図に示した。蛍光性 *Pseudomonas* の土壌中での比増殖速度を高める有機物として，H3株ではベタイン，グルコース，エンバク桿及びススキ桿，D23株ではベタイン，グルコース，エンバク桿，シュクロース及びトレハロース，HS1株ではイナワラ，ススキ桿，モミガラ，オガクズ馬糞及びグルコース，HS23株ではエンバク桿，シュクロース，馬尿酸ナトリウム，ベタイン及びグルコースであった。各菌株に共通して認められる有機物として，試薬ではグルコース，シュクロース，ベタイン及びトレハロース等があげられた。同様に有機物ではエンバク桿，ススキ桿及びイナワラ馬糞等があげられた。さらに，いずれの菌においても，対照として設定した有機物無添加の場合には，サーモグラムがほとんど変化せずピークが検出されな



第21図 有機物施用が菌密度におよぼす影響

◆細菌・放線菌 ■糸状菌 ▲蛍光性*Pseudomonas* H3株

かったため、比増殖速度が算出できなかった。

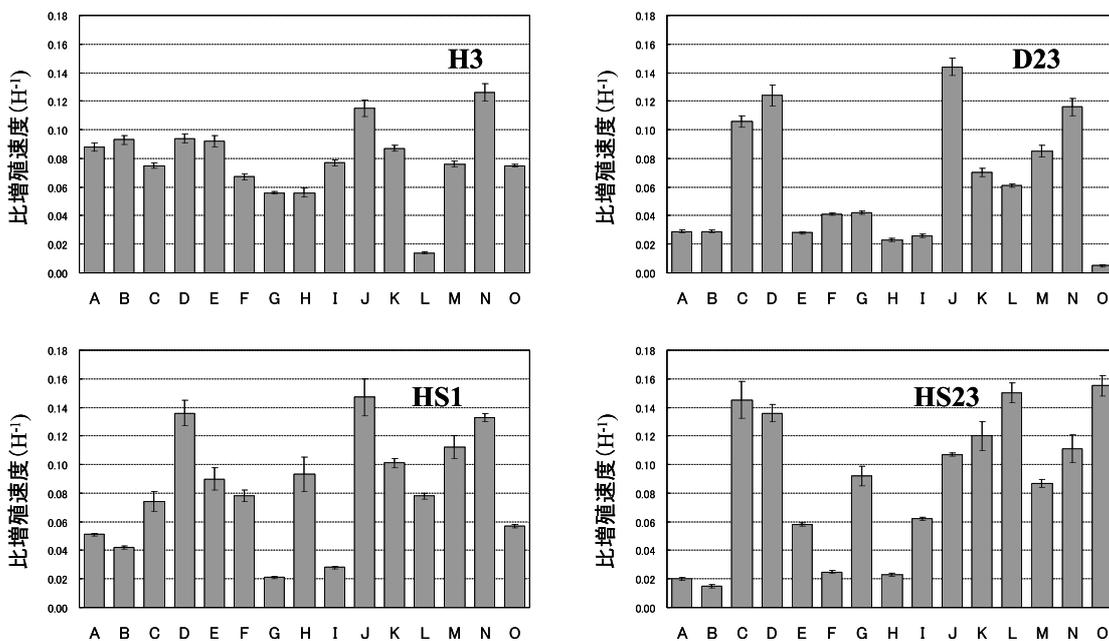
3 考察

蛍光性 *Pseudomonas* の根定着にとって、根面及び根圏における増殖速度は、根圏定着の菌株間の競争を決める重要な特性である^{52, 64}。根圏環境で増殖速度が高い菌株が優先して根に定着できる。

塩類集積土壌において炭素源があるにもかかわらず、塩類非耐性菌株であるH3株の増殖が抑制されることが微少熱量計を用いて解析可能であった。こ

の結果から、微少熱量計は微生物の増殖に対してストレスとなる塩類集積のような要因を解析可能と判断された。第20図において、ベタインの場合は、塩類集積土壌におけるH3株の増殖抑制が緩和されている。植物を高塩類条件で栽培した場合に、浸透圧調節のために細胞質にベタインが蓄積されることは知られており、蛍光性 *Pseudomonas* の場合にも、ベタインが浸透圧調節に関与しているために、塩類集積土壌での増殖抑制が緩和されたと推察した。

土壌中の養分含量(塩類濃度)と蛍光性 *Pseudomonas*



第22図 蛍光性*Pseudomonas*の増殖に及ぼす有機物施用の影響

比増殖速度 = 0.693 / 平均細胞分裂時間

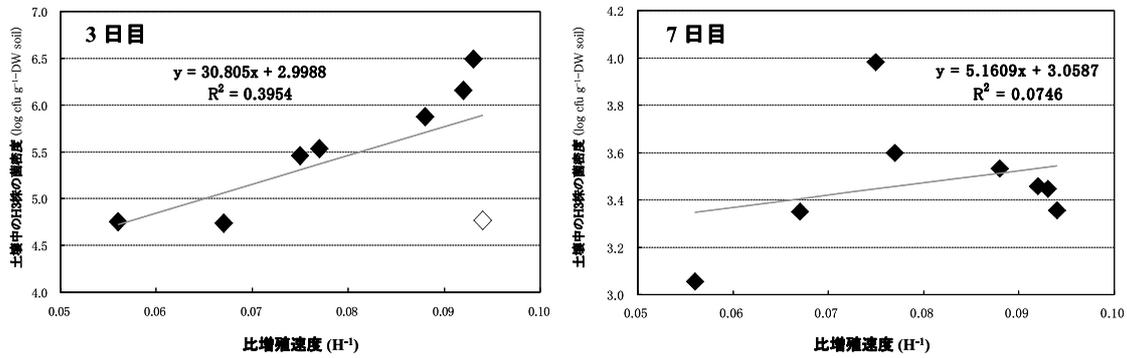
A : イナワラ, B : イナワラ牛糞, C : イナワラ馬糞, D : エンバク桿, E : オガクズ馬糞, F : ススキ桿, G : パーク堆肥, H : モミガラ, I : 豚糞堆肥, J : グルコース, K : シュクロース, L : デオキシコール酸ナトリウム, M : トレハロース, N : ベタイン1水和物, O : 馬尿酸ナトリウム

の増殖の関係は、Ca、K及びMgがいずれも作物に対しては適正域にあったにもかかわらず、蛍光性*Pseudomonas*の増殖は抑制された。現行の塩類濃度の適正域は作物生育に主眼をおいて設定されており、土壌微生物の活性等は考慮されていない。このように、植物生育に適正な養分含量であっても土壌微生物にはストレスとなっている可能性が示唆された。今後、有用微生物の農業利用にあたっては塩類濃度の適正域、ひいては土壌診断基準を土壌微生物活動の面からも設定すべきであると思われる。

微量熱量計を用いて、菌の増殖に対する炭素源としての有機物の評価が可能であり、非根圏における菌の増殖が期待される有機物が選抜できる。しかし、オートクレーブ殺菌による有機物の変性が問題となる。オートクレーブ殺菌した有機物の炭素源としての適切な評価が可能か否かを検討するため、第21図と第22図の関連を解析し、その結果を第23図に示した。第21図に示した3日目の菌密度とH3株の比増殖速度との間に有意では無いが、正の関係 ($R^2=0.3954$) が認められた。さらに、エンバク桿では、比増殖速度は高いにもかかわらず、3日目の土壌中の菌密度

は低くなっており、他の有機物区に比べ、プロットが大幅にずれている。その理由としては、微量熱量計の解析では有機物を殺菌処理しているため、H3株にとって資化しやすい物質がオートクレーブ殺菌に伴う熱変性により生じ溶出し、比増殖速度は高まったが、希釈平板法による解析では有機物を殺菌処理していないためにその資化しやすい物質が溶出なかったためではないかと推察された。エンバクの値を除くと、正の相関係数 ($R^2=0.9167$) が認められた。エンバク桿以外の有機物に関しては、土壌中の菌密度と比増殖速度との間の相関関係が高く、オートクレーブによる変性は問題ないと思われた。しかしながら、第23図に示したように7日目の土壌中の菌密度と比増殖速度との間には相関関係が認められなかった。

以上の微量熱量計を用いた解析により、蛍光性*Pseudomonas*の土壌中での増殖解析を行うことが可能である。さらに、蛍光性*Pseudomonas*の増殖を促進する有機物の選抜が可能であり、接種した蛍光性*Pseudomonas*の土壌中における増殖に関する基礎データが得られた。



第23図 有機物を添加した土壌におけるH3R株の土壌中の菌密度とH3株の比増殖速度の関係

3日目と7日目は接種後の日数を示す。

3日目グラフの白抜きのプロットはエンバク桿区を示す。

VII 有機物施用による蛍光性 *Pseudomonas* の根定着促進

これまで、根定着促進を目的として有機物を施用した場合の接種菌株や土着菌の菌密度の変化について検討を進めた。

接種菌の根定着には、土着菌の影響は重要な要因である。そのため、微生物が生息している場での微生物を検出できるマーカー遺伝子の活用による解析が必須と判断される。そのようなマーカー遺伝子のひとつとして生物発光遺伝子がある^{10, 58)}。

本項では、蛍光性 *Pseudomonas* のハウレンソウ根への定着促進のために、接種菌株と有機物を併用した。それにより、土着微生物の影響を抑制しつつ蛍光性 *Pseudomonas* のハウレンソウ根定着を促進させることが可能か否か検討を試みた。そのために、Vで用いた生物発光遺伝子 (*Lux*) 遺伝子を導入した蛍光性 *Pseudomonas* を用い、有機物施用が蛍光性 *Pseudomonas* の根定着に及ぼす影響について検討した⁷⁶⁾。

1 材料及び方法

1) 生物発光遺伝子の蛍光性 *Pseudomonas* への導入

Vで示したように、生物発光遺伝子の受容菌として、水耕栽培でハウレンソウの生育促進効果を示した蛍光性 *Pseudomonas* 菌株 H3, D23及びHS23株を用いた。それらの菌株に生物発光遺伝子を導入した。遺伝子導入により作出した菌株をH3-4, D23-2及びHS23-1株とした。

2) 蛍光性 *Pseudomonas* の根定着を促進する有機物の選定

供試菌株としてH3-4, D23-2及びHS23-1株を用いた。使用有機物として、VIで用いた有機物及び試薬を用いた。C/N比が20以上の有機物は硫酸アンモニウムによりC/N比を20に調整した。有機物はイナワラ牛糞堆肥を100t ha⁻¹施用したときの炭素量に合わせて施用した。また、試薬はイナワラ牛糞堆肥を10t ha⁻¹施用したときの炭素量に合わせて施用した。

土壌は細粒褐色低地土（中国農業試験場畑地利用部青野圃場より採取）と中粗粒灰色低地土（中国農業試験場畑地利用部位田圃場より採取）を1：1の比率で混合した土壌を使用した。土壌（800g、非殺菌）に供試有機物を混和し、直径10cmの黒色ポリポットに入れた。そのポットに供試菌株を接種したハウレンソウ種子を播種した。Vで用いたプラスチックチューブ（チューブ下に穴を開けた）を用いて最大容水量の50%になるようにポット下部よりかん水を行った。上方からかん水を行った場合はかん水むらが激しく、水がより浸入していく部分とそうでない部分とが生じたためポット下方からかん水を行った。2週間栽培後、根を取り出し洗浄した。洗浄した根をP1培地（カナマイシン50mg L⁻¹含有）上にて24時間培養した。培養後、1-デカナルを添加し、Vに示した方法（第17図）により微弱光冷却CCDカメラにて撮影した。接種菌の根定着は、◎：根の全体に定着、○：根のほぼ全体（2/3程度）に定着及び×：根に定着せず（接種した部分のみには定着）の3段階で評価した。解析は3反復で行った。

2 結 果

1) 生物発光遺伝子の蛍光性 *Pseudomonas* への導入

接合伝達法により蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の組換え体は、作出可能であった。供与したトランスポゾン、受容菌の染色体に導入されるために安定的に導入した形質が維持される。組換えによって受容菌株が運動性および増殖活性を喪失していないことは、Vで用いたH3-4株と同様にD23-2株、HS23-1株についても確認した。

2) 蛍光性 *Pseudomonas* の根定着を促進する有機物の選定

蛍光性 *Pseudomonas* の根定着結果を第6表及び第24図に示した。蛍光性 *Pseudomonas* の根への定着を促進する有機物として、H3株とエンバク桿またはベタインを併用することにより、接種菌株が根全体に定着していた。また、モミガラ、ススキ桿及びイナワラ馬糞を併用することにより、接種菌株が根のほぼ全面に定着した。D23株と馬尿酸ナトリウムの併用で接種菌株が根全体に定着し、ススキ桿、エンバク桿またはイナワラ馬糞の併用により接種菌株が根のほぼ全面に定着した。HS23株とイナワラ牛糞、オガクズ馬糞、ススキ桿、ベタインまたはエンバク桿の併用により接種菌株が根全体に定着し、イナワラ馬糞の併用により接種菌株が根のほぼ全面に定着した。

3 考 察

IIにおいて、水耕栽培で生育促進効果の認められた蛍光性 *Pseudomonas* を土耕に供試したところ、顕著な生育促進効果が認められなかった。その原因のひとつとして、接種した蛍光性 *Pseudomonas* が

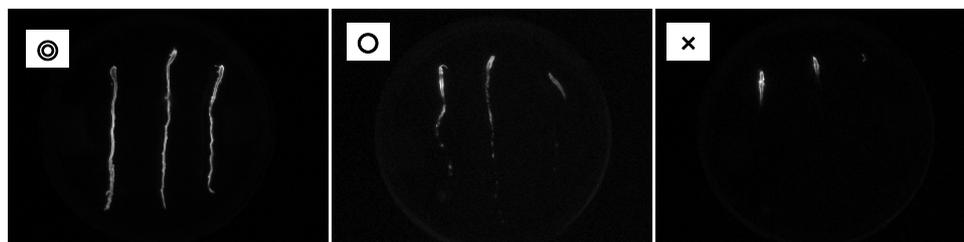
ホウレンソウ根に定着しなかったことがあげられた。Wellerは、根定着を接種した微生物がいかにして根に沿って分布し、土着菌との競合に打ち勝ち増殖できるかという過程として定義している⁸¹⁾。この根定着過程は2段階に大別され、第1段階は根への接触、第2段階は根面における増殖とされている³²⁾。さらに、Wellerが示したように、微生物特性だけでなく様々な環境要因が根定着には関与している。我々は、炭素源としての有機物を併用することで、接種した蛍光性 *Pseudomonas* の根定着を促進できるのではないかと考え、生物発光遺伝子を導入した蛍光性 *Pseudomonas* を用いて土壤中での挙動を解析した。

第6表に示すように、蛍光性 *Pseudomonas* との併用によりその根定着を促進する有機物は菌株ごとに異なった。しかしながら、促進効果が認められた

第6表 蛍光性 *Pseudomonas* の根定着における有機物施用の影響

有機物	<i>Pseudomonas</i> strains		
	H3-4	D23-2	HS23-1
イナワラ	×	×	×
豚糞堆肥	×	×	×
モミガラ	○	×	×
イナワラ牛糞	×	×	◎
オガクズ馬糞	×	×	◎
ススキ桿	○	○	◎
エンバク桿	◎	○	○
イナワラ馬糞	○	○	○
パーク堆肥	×	×	×
ベタイン-水和物	◎	×	◎
馬尿酸ナトリウム	×	◎	○
トレハロース	×	○	×
グルコース	×	×	×
シュクロース	×	×	×
デオキシコロール酸ナトリウム	○	○	○
無添加	×	×	×

◎：根の全体に定着 ○：根のほぼ全体に定着
×：根に定着せず



第24図 CCDカメラによる生物発光遺伝子導入菌株の検出例

◎：根の全体に定着 ○：根のほぼ全体に定着 ×：根に定着せず

有機物にはバタインや馬糞堆肥のように共通した有機物もあり、これらの有機物を併用することで、蛍光性 *Pseudomonas* を作物根へ定着させることが可能になると推察される。相野らは有機質資材を施用した圃場においてトマトを栽培し、根面での蛍光性 *Pseudomonas* 数、細菌数、糸状菌数及び接種した蛍光性 *Pseudomonas* (*Pseudomonas putida* FP-16R) 数と施用資材との関係を調べた。その結果、全細菌数及び全糸状菌数には顕著な差違が認められなかったが、蛍光性 *Pseudomonas* 数は、総じて、稲わら及び馬糞堆肥で多い傾向を認めた⁴⁾。蛍光性 *Pseudomonas* の選択培地に用いられている馬尿酸は、馬をはじめとする草食動物の尿中に多量に含まれている。相野らの結果や本研究の結果で馬糞堆肥が根定着を促進しているのは、尿に含まれる馬尿酸の働きも関与しているのではないかと思われる。このように有機質資材の施用が、接種した蛍光性 *Pseudomonas* の挙動に大きな影響を及ぼしていることは明らかである。

また、Toyota and Ikedaはモデル細菌としてトマト青枯病、メロンつる割病に対して有効な拮抗菌 *Pseudomonas fluorescens* MelRC2 Rif を対象として根圏定着因子についてとりまとめ、根定着に関する遺伝的性質及び諸環境要因を明らかにした⁷⁰⁾。それによれば、根面定着を大きく規定するのは、根面における土着菌との相互作用である。それにより菌の潜在的な根面定着能の9割が損なわれ、特に同種に属するきわめて近縁な菌群との競合が、ひときわ激しいと結論づけている。これまで、微生物の土壌への接種を成功させるには接種菌の土着菌との競合力を高め生存・増殖させることが指摘されている^{28, 77, 82)}。Devliegherらは接種菌の接種時の高い菌密度を維持するには選択的な炭素源の施用は必須であろうと示唆している¹⁹⁾。本研究で用いている有機物は接種菌のみが資化できる炭素源ではないが、有機物と接種菌との併用する本研究の方法は、蛍光性 *Pseudomonas* の根定着力を高めるのに極めて有効であると推察される。

本研究の最終段階として、接種菌を根に安定的に定着させることで、接種菌のハウレンソウ生育促進機能が安定して発現されるのか土耕で検証する必要がある。

VIII 有機物の併用による蛍光性 *Pseudomonas* のハウレンソウ生育促進

圃場において、蛍光性 *Pseudomonas* の有用機能を発揮させ、安定的で十分な効果を得るには、接種菌株の根圏定着の不安定さが大きな障害である。前項において、生物発光遺伝子 (*Lux*) 遺伝子を用いた解析を行った。その結果、蛍光性 *Pseudomonas* を接種する際に増殖基質としての有機物を併用することにより、土着菌との競合に打ち勝ち、安定して根に定着させることが可能と推定された。

そこで本項では、生物発光遺伝子を用いた解析により選抜された有機物と蛍光性 *Pseudomonas* を土壌に施用することで根定着の促進をはかり、その結果、蛍光性 *Pseudomonas* の生育促進効果が土耕でも、安定して発現されるか否かの検証を試みた⁷⁶⁾。

1 材料及び方法

1) 蛍光性 *Pseudomonas* と有機物の併用によるハウレンソウのポット栽培試験

供試菌株として、前項の根定着解析で根全体に定着させ得る有機物の種類の多かったHS23菌株を用いた。

市販の13Lのポットに土壌（細粒褐色低地土壌と中粗粒灰色低地土壌の1：1混合土壌）を12kg入れた。窒素施肥量が150kg ha⁻¹になるように化成肥料（硝燐安加里604：多木化学）を施肥した。有機物は、オガクズ馬糞、イナワラ馬糞、ススキ桿及びバタインを供試し、それぞれ全層に混合して施用した。施肥量はバタイン以外はイナワラ牛糞堆肥を100t ha⁻¹施用した場合の炭素量に合わせた。バタインはイナワラ牛糞堆肥を10t ha⁻¹施用した場合の炭素量に合わせて施用した。

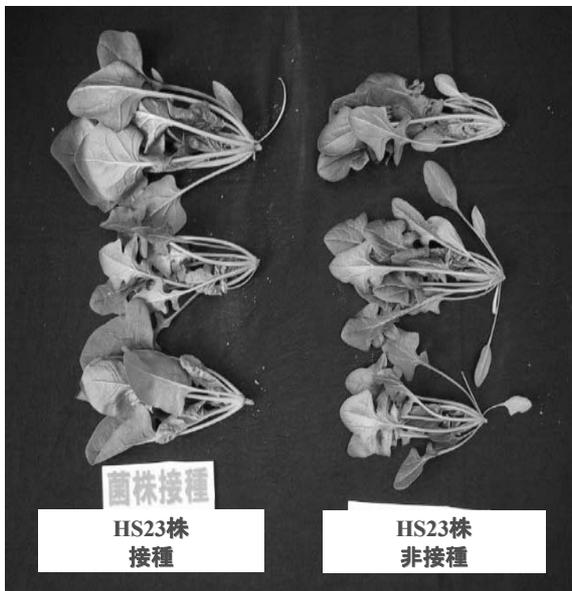
肥料及び有機物を施用後、供試菌株を種子接種したハウレンソウネーキッド種子（強力オーライ：タキイ種苗）を播種した。播種量はポットあたり30粒で2条に播種した。かん水はかん水チューブを用い、ガラス温室内で栽培した。1カ月間栽培後、ハウレンソウの生育重を測定した。同時に、有機物のみ施用、供試菌株のみ接種、供試菌株及び有機物無施用土壌でも、それぞれハウレンソウを栽培し、供試菌株及び有機物無施用土壌のハウレンソウの生育を100と

したときの相対生育量を算出し、蛍光性 *Pseudomonas* と有機物の併用によるハウレンソウの生育促進効果を比較した。栽培試験は2反復で行った。

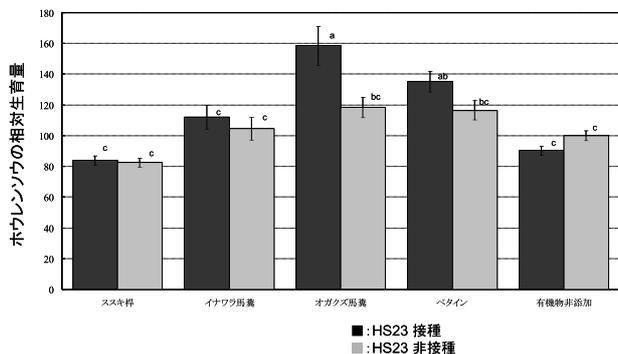
2 結 果

1) 蛍光性 *Pseudomonas* と有機物の併用によるハウレンソウのポット栽培試験

ポット試験の結果を第25図及び第26図に示した。HS23株とススキ桿の併用ではハウレンソウの生育促進効果は認められず、対照（生育率100）と比べ生育率約83と、逆に生育が抑制された。しかしながら、オガクズ馬糞またはベタインとHS23株を併用



第25図 土耕におけるハウレンソウの生育
接種菌株：HS23株 有機物：オガクズ馬糞



第26図 有機物を併用した場合の蛍光性*Pseudomonas*のハウレンソウ生育促進効果

ハウレンソウの相対生育量

HS23株を接種と有機物を添加しなかった場合のハウレンソウの生育を100としたときの相対値

図中の異なるアルファベットは5%水準での有意性を示す。

すると対照と比べ生育率がそれぞれ約160及び135と、ハウレンソウの生育が安定的に促進された。イナワラ馬糞とHS23株を併用すると、対照と比べ生育率が約115となり、効果はやや低いもののハウレンソウの生育が安定的に促進された。有機物のみの施用ではハウレンソウの生育は促進されず、むしろススキ桿のように生育を抑制する例もあった。

3 考 察

前項において選抜された根定着を促進する有機物と蛍光性 *Pseudomonas* との併用効果を検証した。有機物と蛍光性 *Pseudomonas* であるHS23株とを接種してハウレンソウを栽培したところ、ススキ桿の場合はHS23株の生育促進効果が認められなかった。その理由としてススキ桿のみ施用した場合でもハウレンソウの生育が抑制された。施用量が多すぎることによるススキ桿施用による窒素飢餓等の悪影響が出たのではないかと考えられた。オガクズ馬糞またはベタインとHS23株を施用した場合は、HS23株によるハウレンソウ生育促進効果が認められた。その結果、接種菌株と有機物とを併用する方法は、有用微生物の安定的農業利用にとって重要な技術であると推察された。

有機物のみを施用した場合は、ハウレンソウの生育促進は認められなかった。従って、生育促進効果は有機物施用のみの影響ではないと判断した。

以上の結果から、蛍光性 *Pseudomonas* とその根定着を促進する有機物を併用することで、土耕においても蛍光性 *Pseudomonas* の生育促進機能を安定的に発揮させることが可能であった。蛍光性 *Pseudomonas* を単独で接種しただけでは、土着菌との競合で根定着できない場合が多い。しかし、蛍光性 *Pseudomonas* の根定着解析により選抜された有機物を併用することで、蛍光性 *Pseudomonas* を根に安定的に定着させることが可能である。その結果として、蛍光性 *Pseudomonas* の生育促進効果を安定的に発揮させることが可能であると判断された。

Ⅹ 蛍光性 *Pseudomonas* の同定

前項までの試験に、主として用いたH3株、D23株、HS1株及びHS23株について16S rDNAの塩基配列解

析により同定を試みた。

1 材料及び方法

蛍光性 *Pseudomonas* の16S rDNA塩基配列解析

抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCRにより16S rDNAのうち5'末端側約500bpの領域を増幅した。その後、増幅された塩基配列をシーケンシングし、菌株の16S rDNA部分塩基配列を得た。PCRにはMicroSeq500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Applied Biosystems, CA, USA) を使用した。PCRからサイクルシーケンスまでの基本操作はApplied Biosystems社のプロトコールに従った。

データベースMicroSeq Bacterial 500 Libraryに対する解析

解析ソフトウェアとしてMicroSeq Microbial Identification System Softwareを、相同性検索を行う際のデータベースとしてMicroSeq Bacterial 500 Library v.0023 (Applied Biosystems, CA, USA) を使用した。

2 結果及び考察

1) H3株

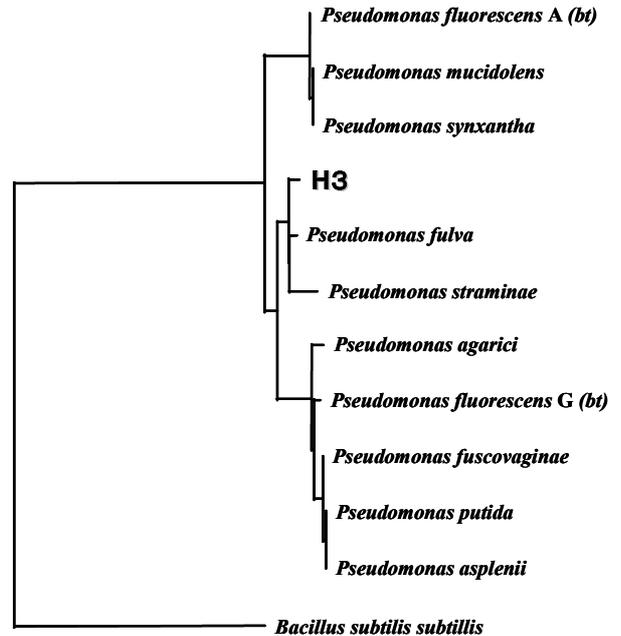
MicroSeqを用いた塩基配列解析の結果、16S rDNA塩基配列は相同率98.85%で *Pseudomonas fulva* の16S rDNAに対して最も高い相同性を示した。分子系統樹では*P. fulva*及び*P. straminea*の16S rDNAとクラスターを形成した(第27, 28, 29図)。

16S rDNAの塩基配列を用いた解析では基準株に対して97%以上を示す場合、その検体は基準株と同種である可能性を考慮する必要がある。今回の相同性検索では97%以上の相同性を示す配列として*P. fulva* 及び*P. straminea* 由来の16S rDNAが検索され、H3株が*P. fulva*または *P. straminea* に帰属する可能性が考えられる。ただし、各塩基配列は完全に一致しておらず、H3株が*P. fulva*及び *P. straminea*

```
TGGAGAGTTTGTCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGACAGGCTAACACATGCAAGTC
GAGCGGATGAAGGGAGCTTGTCTCTGAATTCAGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
GAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCC
TACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTGGGAT
AGCTAGTTGGTGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGAT
GATCAGTCACTGGAAGTGAAGCAGGCTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGGCAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCTCT
CGGATTGTAAGCACTTAAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAACTCTGCAATTTT
GACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAATCTGTGCCAGCAGCGCGGTA
```

第27図 H3株の16S rDNA塩基配列の結果

塩基置換率 23.354%



第28図 H3株の16S rDNAと相同性検索で得られた配列による分子系統樹

BLAST : 522 H3

- 1.15% 522 *Pseudomonas fluva*
- 2.68% 522 *Pseudomonas staminea*
- 3.45% 522 *Pseudomonas fluorescens G (bt)*
- 3.83% 522 *Pseudomonas agarici*
- 4.02% 522 *Pseudomonas fuscovaginae*
- 4.41% 522 *Pseudomonas putida*
- 4.41% 522 *Pseudomonas asplenii*
- 4.60% 522 *Pseudomonas fluorescens A (bt)*
- 4.60% 522 *Pseudomonas mucidolens*
- 4.60% 522 *Pseudomonas synxantha*

第29図 MicroSeq Bacterial 500 Libraryに対するH3株の相同性検索の結果

に近縁であるものの、これらの菌種とは系統的に異なる菌株である可能性もある。これを分類的に判断するためにはDNA-DNA相同値を比較することが必要あり、現時点ではH3株は*Pseudomonas* sp.とすることが妥当である。

2) D23株

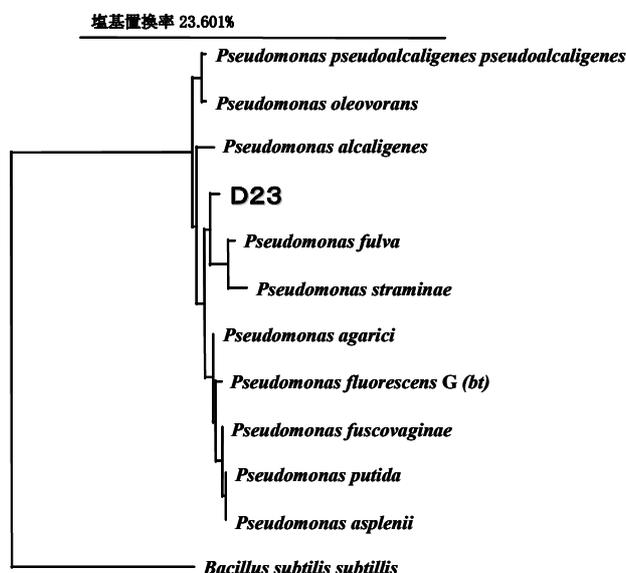
MicroSeqを用いた塩基配列解析の結果、16S rDNA塩基配列は相同率95.75%で*Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* biotype G, *P. asplenii*及び*P. fuscovaginae*の16S rDNAに対して最も高い相同性を示した。分子系統樹では*P. fulva*及び*P. straminea*の16S

rDNAとクラスターを形成した (第30, 31, 32図)。

D23株は *Pseudomonas* に帰属する菌株と考えられるが、16S rDNA塩基配列には I U B コードによる混合塩基表示が多く含まれるため特定の塩基配列が決定できなかった。このような配列についての相対率決定は難しく、比較した菌株同士は得られた相対率よりも近縁である可能性もある。これを分類

```
TGGAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTC
GAGCGGATGAmrGAGCTTGCTCykrATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGA
ATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTA
CGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTC
GGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGgywkTAmryTAATACkyTrswrTTTTGACG
TTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTA
```

第30図 D23株の16S rDNA塩基配列の結果



第31図 D23株の16S rDNAと相対率検索で得られた配列による分子系統樹

BLAST : 522 D23

- 4.21% 522 *Pseudomonas putida*
- 4.21% 522 *Pseudomonas fluorescens G (bt)*
- 4.21% 522 *Pseudomonas asplenii*
- 4.21% 522 *Pseudomonas fuscovaginae*
- 4.41% 522 *Pseudomonas fluva*
- 4.41% 522 *Pseudomonas agarici*
- 5.17% 522 *Pseudomonas alcaligenes*
- 5.75% 522 *Pseudomonas pseudoalcaligenes pseudoalcaligenes*
- 5.94% 522 *Pseudomonas oleovorans*
- 5.94% 522 *Pseudomonas straminiae*

第32図 MicroSeq Bacterial 500 Libraryに対するD23株の相対率検索の結果

に判断するためにはDNA-DNA相対値を比較することが必要あり、現時点ではH3株は*Pseudomonas* sp.とすることが妥当である。

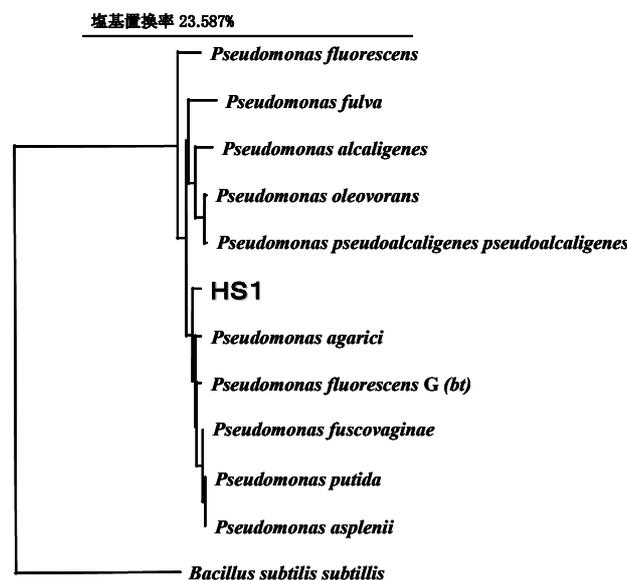
3) HS1株

MicroSeqを用いた塩基配列解析の結果、16S rDNA塩基配列は相対率98.66%で*Pseudomonas fluorescens* biotype G及び*P. agarici* の16S rDNAに対して最も高い相対性を示した。分子系統樹では *Pseudomonas* の16S rDNAが形成するクラスター内に含まれたが、単独で枝を形成した (第33, 34, 35図)。

16S rDNAの塩基配列を用いた解析では基準株に対して97%以上を示す場合、その検体は基準株と同種である可能性を考慮する必要がある。今回の相対率検索では97%以上の相対性を示す配列として*P. fluorescens* biotype Gや*P. agarici* など複数の既知種由来の16S rDNAが検索され、HS1株のこれらについて種の異同を判断することはできない。これを分

```
TGGAGAGTTTGTATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTAACACATGCAAGTC
GAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCCTGfTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG
AATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGCTTCGAAAGGAGCCTAATACCGCATAACGTCCT
ACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATT
AGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGAT
GATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
AATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTT
CGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGTTTT
GACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCCGGTA
```

第33図 HS1株の16S rDNA塩基配列の結果



第34図 HS1株の16S rDNAと相対率検索で得られた配列による分子系統樹

BLAST : 522 HS1
 1.34% 522 *Pseudomonas fluorescens* G (bt)
 1.34% 522 *Pseudomonas agarici*
 1.72% 522 *Pseudomonas fuscovaginae*
 1.92% 522 *Pseudomonas putida*
 1.92% 522 *Pseudomonas asplenii*
 4.02% 522 *Pseudomonas oleovorans*
 4.02% 522 *Pseudomonas pseudoalcaligenes pseudoalcaligenes*
 4.41% 522 *Pseudomonas fluva*
 4.41% 522 *Pseudomonas fluorescens*
 4.60% 522 *Pseudomonas alcaligenes*

第35図 MicroSeq Bacterial 500 Libraryに対するHS1株の同源性検索の結果

類的に判断するためにはDNA-DNA相同値を比較することが必要あり、現時点ではHS1株は *Pseudomonas* sp.とすることが妥当である。

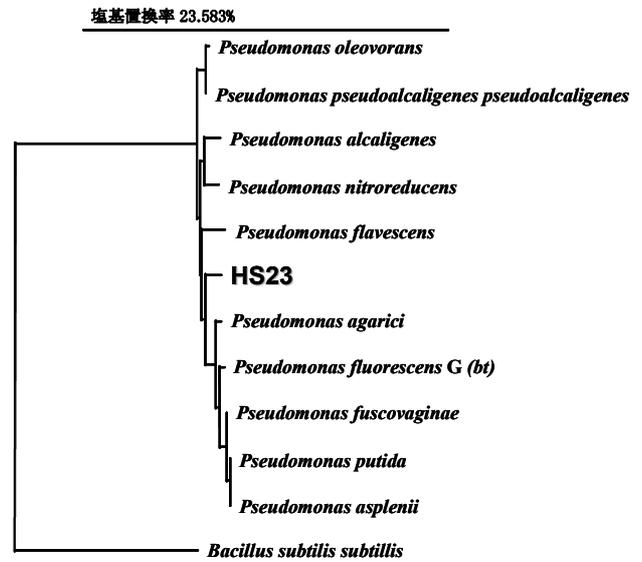
4) HS23株

MicroSeqを用いた塩基配列解析の結果、16S rDNA塩基配列は相同率97.70%で*Pseudomonas oleovorans*及び*P. pseudoalcaligenes* subsp. *pseudoalcaligenes*の16S rDNAに対して最も高い同源性を示した。分子系統樹では*Pseudomonas*の16S rDNAが形成するクラスター内に含まれたが、単独で枝を形成した(第36, 37, 38図)。

16S rDNAの塩基配列を用いた解析では基準株に対して97%以上を示す場合、その検体は基準株と同種である可能性を考慮する必要がある。今回の同源性検索では97%以上の同源性を示す配列として*P. alcaligenes*, *P. oleovorans*, *P. pseudoalcaligenes* subsp. *pseudoalcaligenes*由来の16S rDNAが検索され、HS23株がこれらのいずれかに帰属する可能性が考えられる。ただし、各塩基配列は完全に一致しておらず、HS23株がこれらの菌株と近縁であるものの、系統的に異なる菌株である可能性もある。これを分類的に判断するためにはDNA-DNA相同値を比較することが必要あり、現時点ではHS23株は *Pseudomonas* sp.とすることが妥当である。

TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCCGACAGGCTAACACATGCAAGTC
 GAGCGGATGAAGAGAGCTTGCTCTCTGATTCAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAG
 GAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGCTCTCGAAAGGGACGCTAATACCGCATACTGCC
 TACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATT
 AGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGAT
 GATCAGTCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
 AATAITGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATCGCCGTTGTGTAAGAAGTCTT
 CGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAATTAATACTTTGCTGTTT
 GACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTA

第36図 HS23株の16S rDNA塩基配列の結果



第37図 HS23株の16S rDNAと同源性検索で得られた配列による分子系統樹

BLAST : 522 HS23
 2.30% 522 *Pseudomonas oleovorans*
 2.30% 522 *Pseudomonas pseudoalcaligenes pseudoalcaligenes*
 2.68% 522 *Pseudomonas alcaligenes*
 3.26% 522 *Pseudomonas putida*
 3.26% 522 *Pseudomonas asplenii*
 3.45% 522 *Pseudomonas agarici*
 3.45% 522 *Pseudomonas fuscovaginae*
 3.83% 522 *Pseudomonas nitroreducens*
 3.83% 522 *Pseudomonas fluorescens* G (bt)
 3.83% 522 *Pseudomonas flavescens*

第38図 MicroSeq Bacterial 500 Libraryに対するHS23株の同源性検索の結果

X 総合考察

近年、野菜生産地においては連作障害が大きな問題となっている。特に葉菜類を中心として、施設化による周年生産が指向されており、それに伴い作土への肥料成分の蓄積や塩類のアンバランス化が問題となっている⁶⁵⁾。また、環境保全的な観点から、化学肥料や農薬への依存度の低い、有機質資材や微生物資材等を用いた栽培技術が求められている。そこで、蛍光性 *Pseudomonas* をはじめとする有用微生物を用いた農業生産技術は、今後ますます注目されてくると思われる。そこで、本研究では連作障害の軽減の1つの方法として、有用微生物を利用した技術開発を目指した。

有用微生物の農業生産への利用には、その有用機能を安定的に発揮させる技術開発が必要である。根圏細菌による生育促進に関しては、細菌性肥料として *Azotobacter*, *Pseudomonas* 属細菌やリン溶解菌などの有用微生物について、根圏に定着させるための接種技術の開発が進められた^{22, 47)}。しかし、農業現場への微生物の利用に関しては、根粒菌の場合を除き^{47, 55)}、これまで広範な研究がなされてきたにも拘わらず、圃場レベルでの成功例はきわめて少ない。その原因としては、接種した菌の土壌及び根圏への定着の不安定さが挙げられる⁸¹⁾。

本研究では、最初に水耕栽培条件での生物検定法を利用し、蛍光性 *Pseudomonas* の中からハウレンソウの根の生育を促進するPGPRを選抜した。水耕栽培条件では土着菌の影響が少ないために、生育に対する影響を安定的に発揮させることが可能であった。

また、選抜した菌株のハウレンソウ生育促進機能に関しては菌体外に分泌された物質の関与が推定された。Suslow and Schroth は、植物根圏にはPGPRとは対照的に病原菌とは異なる機作によって植物の生育を抑制する有害な根圏細菌DRB (Deleterious Rhizobacteria) の存在を報告している⁶⁷⁾。DRBとして *Enterobacter*, *Klebsiella* をあげている。さらに、PGPRとDRBにおける植物ホルモンであるIAA (インドール酢酸) の産生能について検討したところ、DRBの産生するIAA量は $0.45\sim 9.25\ \mu\text{g mL}^{-1}$ で、PGPRの産生量である $0.1\ \mu\text{g mL}^{-1}$ 以下よりはるかに多い量が産生されていた⁶⁷⁾。このPGPRまたはDRBをテンサイ種子にコーティングして播種するとテンサイ根の初生根長はPGPRの場合は伸長が促進されるのに対しDRBでは根伸長が抑制された⁶⁷⁾。本研究における菌体外分泌物質もこのIAAと同様の物質でないかと推察され、その産生量の違いがAタイプとBタイプの違いに現れているのではないかと推察された。この生育促進物質については、未だ研究の余地が残っている。

水耕栽培で生育促進がみられた菌をポット栽培試験に供試した場合、顕著な生育促進効果が認められなかった。その原因として、接種菌が根に十分に定着できていないことが考えられた。そのため、土着菌による静菌作用のある土耕条件下で蛍光性 *Pseudomonas*

の生育促進機能を発現するには、接種菌を作物根に安定して定着させるためのさらなる検討が必要と判断された。

これまで多くの有用微生物の研究では、実験室レベルではその効果がみられても、圃場条件ではその効果がみられない場合が多い。これは接種菌が根圏に安定して定着できないことが原因と考えられている⁸¹⁾。PGPR利用技術の開発には、作物根圏もしくは植物根に効率的に定着させる方法の開発が重要である。そこで我々は、土壌中における蛍光性 *Pseudomonas* の挙動を把握した上で、接種方法及び栽培管理方法を検討することが重要であるとの仮説を設定した。その仮説をもとに、ハウレンソウに対して生育促進機能を持つ蛍光性 *Pseudomonas* の土壌中での根定着に関連する生態解析 (運動性、増殖及び根定着) を行った。その解析結果に基づいた接種法を活用することにより、有用微生物の機能を安定的に発揮させる方法が開発できると判断した。

本研究では、運動性と増殖という2つの特性に着目し検討を行った。他の特性、細胞表面の多糖質や鞭毛等の特性は個々の細菌それ自体に由来するものであり、肥培管理等で人為的に改善することができない特性であるため、本研究では検討しなかった。ここでは、菌が生息している環境に近い条件で、肥培管理等が運動性や増殖に及ぼす影響について画像解析法による土壌溶液中の運動性解析及び微量熱量計による土壌中での増殖解析を行った。

画像解析法は有機物施用等の土壌管理や様々な環境条件における細菌の運動を詳細に解析するのに有効な方法である。また、運動性を促進する有機物の選定も可能であった。有機物施用に伴う運動性促進のメカニズムについては不明である。しかし、有機物及びその分解物が細菌の運動性のエネルギー源になり、その結果、鞭毛運動等が促進され運動性が高まることも考えられる。ただし、運動性を抑制する有機物としてグルコースやシュクロースがほぼ共通して認められるので、増殖に対するエネルギー源とは異なる機構が関与していることが示唆される。そのメカニズムについては、今後の研究を待たねばならない。

微量熱量計は、菌体の代謝や増殖過程における熱発生から速度論的に代謝や増殖などを解析する機器

であり、応用面では土壌中のバイオマスを測定することが可能である⁴²⁾。本方法の利点としては、直接土壌を解析できることであり、細菌が実際に存在する環境に近い条件での菌の増殖を解析できる利点を持っている。細菌の土壌中での挙動解析に有効な解析法であると判断された。

画像解析法や微量熱量計が接種した菌の土壌中の生態解析にとって極めて有用なツールとなる。この二つの方法を用いた解析により以下のことが明らかとなった。1) 肥培管理が接種微生物の運動性や増殖に与える影響。2) 微生物接種と適切な有機物施用を組み合わせによる、接種菌の運動性や増殖の促進。

画像解析で得られた運動性及び微量熱量計で得られた増殖結果は、蛍光性 *Pseudomonas* の根定着性を直接的に示すindexではない。しかしながら、根定着を促進させる可能性のある有機物や土壌条件を運動性と増殖の観点からスクリーニングするのに有効な方法となる。

効率的に接種菌を定着させる方法の1つとして、有機物を栄養源とし、増殖や運動性を高めることで根定着を促進させることができるか否かを検討した。すなわち、接種菌の菌密度を維持できるような有機物を接種菌と併用することで、安定的に接種菌を根圏に定着させる技術の開発が可能となる。生物発光遺伝子は、遺伝子を導入した細菌の分布を把握するのに有効なツールである⁸³⁾。したがって、本研究では、マーカーとして生物発光遺伝子を蛍光性 *Pseudomonas* に導入して、有機物施用下での根定着過程の解析を行った。その結果、生物発光遺伝子導入した接種菌の追跡が可能となり、蛍光性 *Pseudomonas* の根定着を促進する有機物が菌ごとに選抜できた。さらに、生物発光遺伝子を用いた解析では、単に菌密度の増加を計測しただけではなく、可視的に根定着を解析し、その結果を基に有機物の有効性が選定されることに特徴がある。

画像解析法及び微量熱量計を用いた解析結果と生物発光遺伝子を用いた根定着解析結果との比較を行った。土壌中の土着菌株の資化能が高いと思われるグルコースとシュクロースを除き、H3株では比増殖速度及び相対運動速度と根定着の間で有意差は認められないものの正の関係を示す傾向があった。また、

HS23株では比増殖速度と根定着の間に相関は認められなかったものの、相対運動速度と根定着との間に正の関係が認められた。これは非根圏で接種菌株を増殖させたり、運動性を促進することにより根への接触機会が増加し、結果的に根定着が促進されたためと推察された。有機物と蛍光性 *Pseudomonas* を併用することで、作物根へ安定的に定着させることが可能と判断された。これは非根圏での接種菌の増殖や、運動性の促進により根との接触機会を増やすこと根定着を促進したものと判断される。

根定着を促進する有機物と接種菌を併用することで、その菌のハウレンソウ生育促進機能が土耕で安定的に発現するか否かを検証した。その結果、接種菌と有機物との併用により、接種菌のハウレンソウの生育促進効果が安定的に発現することが判明した。有機物と接種菌の併用は、有用微生物の農業利用にとって重要な技術であると推察される。

今回の併用した有機物の施用量は、実施用量としては多量であるため、農業現場における利用にあたっては、有機物を根圏周辺に局所施用する等の工夫が必要になる。また、太陽熱処理等の土壌消毒技術と組み合わせれば、土着菌の競合が低下した土壌での、さらなる定着促進が予想される。それらの処理により、植物生育促進効果をはじめとする有用機能発現の効率化が可能になる。本研究において、PGPRの農業利用には、接種菌と有機物の併用技術が安定的な有用微生物機能の発揮をもたらすという一定の成果を得ることができた。ただし、実用的な面からは、圃場への接種法や有用微生物の数作に及ぶ効果の持続等、未だ研究の余地を残している。

今後の持続的農業生産のためには、環境保全の観点からの技術開発が必要不可欠のものとなってきており、微生物を利用した農業技術の開発はますます重要になってきている。そのためには、根圏における微生物制御及び有用微生物利用技術開発が必要である。本研究で用いた解析法や有用機能の安定発現のための接種菌と有機物の併用法は、その技術開発研究のための一助となる。今後の、本研究の展開方向としては、近年の研究進展が著しい分子生物学的手法と組み合わせにより、根圏生態系の解析は今後ますます発展していくと思われる。1) マーカー遺伝子として、緑色蛍光タンパク質GFPの遺伝子を用

いたより詳細な根定着解析。2) PCR増幅産物の増加をリアルタイムでモニタリングし、解析することでDNAやRNAの正確な定量遺伝子の定量化が可能となるリアルタイムPCR。3) 遺伝子解析情報を元に各遺伝子の機能予測実験を行ったり、データベース化された実験結果を元に遺伝子間の相互作用を予測したりするなど、主に遺伝子に関する情報をコンピュータによって分析するバイオインフォマティクス技術。以上の方法を活用し、接種菌の根圏での詳細な解析を行うことで、根圏及び土壤中における制御が可能となる。その結果、農業現場において有用微生物を安定活用できる方法を開発可能になると思われる。さらに別の視点では、持続的農業の推進には、土壤微生物相全体の健全化といった視点からの技術開発も必要となると思われる。そのために、D G G E技術やリン脂質脂肪酸及びキノンのようなバイオマーカー等を利用した土壤微生物群集構造解析も益々重要になる。

摘 要

表題：ホウレンソウにおける植物生育促進根圏細菌利用法の開発

著者名：浦嶋泰文

PGPRをはじめとする有用微生物の農業利用には、その有用機能を安定的に発揮させる技術開発が必要である。本研究では、最初に水耕栽培条件で蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌の中からPGPRを選抜した。選抜された菌は水耕栽培条件では、土着菌株の影響が少ないために生育促進効果を安定的に発揮させることが可能であった。しかし、土耕に供試すると生育促進効果が判然としなくなった。その原因として、接種した菌株が根に定着できていないことが考えられた。土耕において蛍光性 *Pseudomonas* の機能を安定的に発揮させるには、蛍光性 *Pseudomonas* を根に定着させることが重要である。そのため、土壌及び根圏での蛍光性 *Pseudomonas* の挙動解析が重要であった。また、種子バクテリアゼーションの方法を検討し、重合度100のメチルセルロース処理を行い、4℃で保存する方法が有効であった。

蛍光性 *Pseudomonas* の根定着に関連する生態解析（運動性、増殖及び根定着）を行った。その解析

結果に基づいた接種法を活用することにより、有用微生物の機能を安定的に発揮させる方法が開発できると判断した。蛍光性 *Pseudomonas* の種子から根への移動に土壤中に水の流れの重要性を明らかにした。接種菌の菌密度を維持できるような有機物を接種菌と併用することで、安定的に接種菌を根圏に定着させる技術の開発が可能であると思われる。蛍光性 *Pseudomonas* は従属栄養細菌であり、増殖には炭素源となる有機物を必要とする。有機物を蛍光性 *Pseudomonas* と併用することで、蛍光性 *Pseudomonas* の増殖を促進し、ひいては根圏定着性を高めることができるのではないかと推察し、有機物と蛍光性 *Pseudomonas* の土壤中（土壤溶液中）での運動性や増殖について画像解析法や微量熱量計を用いて解析した。また、生物発光遺伝子を蛍光性 *Pseudomonas* に組み込み根圏定着を促進する有機物の選定を試みた。

その結果、菌株ごとに根定着に有効な有機物を選定した。選定された有機物を菌株とともに併用することで、土耕においても蛍光性 *Pseudomonas* の生育促進効果を安定的に発揮させることが可能となった。

謝 辞

本研究を取りまとめるにあたり、終始貴重なご指導、ご助言とご校閲を賜った九州大学大学院農学研究大学院金澤晋二郎教授、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センターの堀兼明氏に心より深甚な謝意を表します。また、研究の端緒を与えていただいた前九州大学教授松口龍彦博士に心より謝意を表します。本論文の作成にあたり、懇切なご教示とご校閲を賜った独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター企画管理部長・新田恒雄博士に深く謝意を表します。

本研究の遂行上、生物発光遺伝子の提供等、終始貴重なご助言、ご協力を賜った九州大学大学院農学研究大学院（現 鹿児島大学農学部）境雅夫博士に深く謝意を表します。また、終始貴重なご助言・ご示唆を賜った塩見文武氏（前 九州農業試験場業務科長）、

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター須賀有子氏及び福永亜矢子氏に心から感謝の意を表します。また、研究遂行に際し、多大なるご助力を賜った独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター研究支援センター業務第1科の尾花実雄氏、西岡和哉氏、岡田敏壽氏及び岩本辰弘氏に深く謝意を表します。さらに曾我徹氏、藤本裕也氏及び長澤鹿津子氏に深く謝意を表します。

注 釈

本論文は九州大学に学位論文として提出されたものを基にしている。

引用文献

- 1) Adler, J. 1966 : Chemotaxis in bacteria, *Science*, 153, 708 - 716.
- 2) Ahmad, J. S. and Baker, R. 1987a : Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77, 182 - 189.
- 3) Ahmad, J. S. and Baker, R. 1987b : Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77, 358 - 362.
- 4) 相野公孝・土屋健一・河本征臣・吉倉惇一郎 1993 : トマト青枯病に対する拮抗菌 *Pseudomonas putida* FP-16株のトマト根への定着性, 土と微生物, 41, 25 - 29.
- 5) 赤司和隆 1975 : 土壤病害と肥培管理, 農業技術体系 土壤施肥編 第1巻 土壤の働きと根圏環境 (IV 根と根圏微生物—根圏微生物の働き) 土壤と根圏IV 118 - 124.
- 6) 赤司和隆 1990 : 土壤・肥培管理によるハウレンソウの土壤病害対策 農業技術体系 土壤施肥編 第5 - 1巻 畑の土壤管理 (土壤管理の実際—直接的土壤病虫害対策) 畑216 - 28 ~ 216 - 33.
- 7) Anderson, A. J., Habibzadegah-Tari, P. and Tepper, C. S. 1988 : Molecular studies on the role of a root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 375 - 380.
- 8) 安西徹郎 1996 : 土壤の化学性の診断方法と基準, 土壤診断の方法と活用, 87 - 112, 農文協, 東京
- 9) Baker, K. F., Cook, R. J. and Garrett, S. D. 1974 : Biological control of plant pathogens. APS, USA.
- 10) Beauchamp, C. J., Kloepper, J. W. and Lemke, P. A. 1992 : Luminometric analysis of plant root colonization by bioluminescent pseudomonads. *Can. J. Microbiol.*, 39, 434 - 441.
- 11) Benizri, E., Courtade, A., Picard, C. and Guckert, A. 1998 : Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biol. Biochem.*, 30, 1481 - 1484.
- 12) Boelens, J., Woestyne, M.V. and Verstraete, W. 1994 : Ecological importance of motility for the plant growth-promoting rhizopseudomonas strain ANP15. *Soil Biol. Biochem.*, 26, 269 - 277.
- 13) Bowers, J. H. and Parke, J. L. 1993 : Colonization of pea (*Pisum sativum* L.) taproots by *Pseudomonas fluorescens*: Effect of soil temperature and bacterial motility. *Soil Biol. Biochem.* 25, 1693 - 1701.
- 14) Bull, C. T., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 1991 : Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, 81, 954 - 959.
- 15) Chao, W. L., Li, R. K. and Chang, W. T. 1988 : Effect of root agglutinin on microbial activities in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1838 - 1841.
- 16) 築尾嘉章 1993 : 種子バクテリアゼーションによるテンサイ苗立枯病の防除 —ペレット種子への拮抗細菌の導入—, 植物防疫, 47, 130 - 133.
- 17) Croes, C. L., Moens, S., van Bastelaere, E. and Vanderleyden, J. 1993 : The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to

- wheat roots. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 2261–2269.
- 18) de Lorenzo, V., Herrero, M. Jakubzik, V. and Timmis, K. N. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172, 6568–6572.
- 19) Devliegher, W., Sysmsul, Arif, M. A. and Verstraete, W. 1995 : Survival and plant growth promotion of detergent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3865–3871.
- 20) de Weger, L. A., van der Vlugt, C. I. M., Wijfjes, A. H. M., Bakker, P. A. H. M., Schippers, B. and Lugtenberg, B. 1987 : Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J. Bacteriol.*, 169, 2763–2773.
- 21) 土壤微生物研究会編 1992 : I. 培地および特殊溶液の組成と作り方, 土壤微生物実験法, 379–397, 養賢堂, 東京
- 22) エ・エフ・ベレゾワ他, 原田竹治訳 1957 : 細菌性肥料, 1–180, 理論社, 東京
- 23) Geels, F. P. and Schippers, B. 1983a : Reduction of yield depressions in high frequency potato cropping soil after seed tuber treatments with antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp., *J. Phytopathol.*, 108, 207–214.
- 24) Geels, F. P., and Schippers, B. 1983b : Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. *Phytopath Z.*, 108, 193–206.
- 25) Geels, F. P., Schmidt, E. D. L. and Schippers B. 1985 : The use of 8-hydroxyquinoline for the isolation and prequalification of plant growth-stimulating rhizosphere pseudomonads. *Biol. Fertil. Soils*, 1, 167–173.
- 26) Hasebe, A., Koike, J. and Katou, H. 2003 : Strong retardation in the transport of *Burkholderia cepacia* during infiltration into a volcanic ash soil. *Microbes and Environments*, 18, 32–37.
- 27) Hashimoto, M. and Takahashi, K. 1982 : Calorimetric studies of microbial growth : Quantitative relation between growth thermograms and inoculum size. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1559–1564.
- 28) Heijnen, C. E., Hok-A-Hin, C. H. and Van Veen, E. L. 1992 : Improvements to the use of bentonite clay as protective agent, increasing survival levels of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.*, 24, 533–538.
- 29) Heinrich, D. and Hess, D. 1984 : Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. *Can. J. Microbiol.* 31, 26–31.
- 30) 堀 兼明 1994 : 農耕地における土壌診断の研究ならびに診断指標と手法の開発 3 土壌の微生物特性診断, 土肥誌, 65, 578–584.
- 31) Howell, C. R. and Stipanovic, R. D. 1980 : Suppression of *Phytophthora ultimum* - induced damping - off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*, 70, 712–715.
- 32) Howie, W. J., Cook, R. J. and Weller, D. M. 1987 : Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology*, 77, 286–292.
- 33) Howie, W. J. and Suslow, T. V. 1991 : Role of antibiotic biosynthesis in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol. Plant - Microbe Interact.*, 4, 393–399.
- 34) 池田英男 1994 : 培養液の種類と管理, 三訂施設園芸ハンドブック, 442–447, 施設園芸協会, 東京
- 35) James, D. W. J., Suslow, T. V. and Steinback, K. E. 1985 : Relationship between rapid, firm adhesion and long-term colonization of roots by bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50,

- 392–397.
- 36) Karim, Q. N., Logan, R. P. H., Puels, J., Karnholz, A. and Worku, M. L. 1998 : Measurement of motility of *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Escherichia coli* by real time computer tracking using the Hobson Bac-Tracker. *J. Clin. Pathol.*, 51, 623–628.
- 37) Katoh, K. and Itoh, K. 1983 : New selective media for *Pseudomonas* strains producing fluorescent pigment. *Soil Sci. Plant Nutr*, 29, 525–532.
- 38) Klopper, J. W., Leong J., Teinze, M. and Schroth, M. N. 1980 : Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 286, 885–886.
- 39) Klopper, J. W., Scher, F. M., Laliberte, M. and Zaleska, I. 1985 : Measuring the spermosphere colonizing capacity (spermosphere competence) of bacterial inoculants. *Can. J. Microbiol.*, 31, 926–929.
- 40) Klopper, J. W. and Schroth, M. N. 1981 : Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology*, 71, 1020–1024.
- 41) 駒田 亘・門間敏幸 1989 : 総合農業研究叢書第16号 (連作障害総合防除システム開発の手引き), 13–32.
- 42) 金野隆光 1984 : 土壤微生物活性測定への微少熱量計の応用, 45–64, 日本土壤肥料学会編, 博友社, 東京
- 43) Leong, J. 1986 : Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. P hytopathol.*, 24, 187–209.
- 44) Loper, J. E., Haack, C. and Schroth, M. N. 1985 : Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 416–422.
- 45) Lynch, J. M. 1990 : The rhizosphere. John Wiley Sons, New York.
- 46) 前田乾一 1975 : 土壤水分 (移動と吸収の変動要因) 農業技術体系 土壤施肥編 第1巻 土壤の働きと根圏環境 (Ⅲ 根圏における養分の動態—移動と吸収の変動要因) 土壤と根圏Ⅲ 53–58.
- 47) Menkina, R. A. 1963 : Bacterial fertilizers and their importance for agricultural plants. *Ann.Rev.Phytopathol.*, 21, 297–301.
- 48) 門間敏幸・駒田 亘 1989 : 総合農業研究叢書第16号 (連作障害総合防除システム開発の手引き), 1–12.
- 49) 森口繁一編 1982 : 反復数のきめ方 (1) 差の検出, 数値表B, 2–3, 日科技連, 東京
- 50) 西尾道徳・木村龍介 1986 : リン溶解菌とその農業利用の可能性, 土と微生物, 28 31–40.
- 51) 岡野正豪・築城幹典・斎藤元也 1990 : 画像処理による土壤中の微生物の識別, 土と微生物, 35, 35–37.
- 52) O'sullivan, D. J. and O'gara, F. 1992 : Traits of *Pseudomonas* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.*, 56, 662–676.
- 53) Parco, S. Z., Dilwrth, M. J. and Glenn, A. R. 1994 : Motility and the distribution of introduced root nodule bacteria on the root system of legumes. *Soil Biol. Biochem.* 26, 297–300.
- 54) Reinhold, B., Hurek, T. and Fendrik, I. 1985 : Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.* 162, 190–195.
- 55) Rhijn, van P. and Vanderleyden, J. 1995 : The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.*, 59, 124–142.
- 56) 李 王休・生越 明 1986 : テンサイ種子のバクテリゼーションに関する研究 II. テンサイ根面細菌の立枯病菌に対する抗菌性とテンサイ生育促進効果. 日植病報, 52, 175–183.
- 57) 境 雅夫 1992 : 養分集積土壌における蛍光性 *Pseudomonas* の生態, 化学と生物, 30, 282–283.
- 58) Sakai, M., Futamata, H., Ozawa, H., Sueguchi, T., Kim, J. and Matsuguchi, T. 1997 : Use of

- bacterial bioluminescence for monitoring the behavior of rhizobacteria introduced to plant rhizosphere. *Soil Sci. Plant Nutri.*, 43, 395–404.
- 59) Sakai, M., Futamata, H., Urashima, Y. and Matsuguchi, T. 1995 : Effect of cations on the growth of fluorescent pseudomonad isolates from spinach roots growth in soils with different salinity levels. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 41, 605–611.
- 60) Sakai, M., Ozawa, H., Futamata, H. and Matsuguchi, T. 1996 : Effect of calcium ion on spinach root colonization by fluorescent pseudomonads through chemotaxis. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 42, 323–331.
- 61) Scher, F. M., Kloepper, J. W. and Singleton, C. A. 1985 : Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates in vitro and in soil. *Can. J. Microbiol.*, 31, 570–574.
- 62) Seong, K-Y., Hofte, M., Boelens, J. and Verstraete, W. 1991 : Growth, survival, and root colonization of plant growth beneficial *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 at different temperatures. *Soil Biol. Biochem.*, 23, 423–428.
- 63) Shigematsu, M., Meno, Y., Misumi, H. and Amako, K. 1995 : The measurement of swimming velocity of *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas aeruginosa* using the video tracking method. *Microbiol. Immunol.*, 39, 741–744.
- 64) Simons, M., van der Bij, A. J., Brand, I., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A. and Lugtenberg, B. J. J. 1996 : Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol.Plant-Microbe Interact.*, 9, 600–607.
- 65) 相馬 暁 1986 : 塩基の富化とその問題点 農業技術体系 土壌施肥編 第5–1巻 畑の土壌管理 (連作障害, 土壌病害と土壌管理—化学性悪化と連作障害) 畑 22–26.
- 66) 杉山純多・渡辺 信・大和田紘一・黒岩常祥・高橋秀夫・徳田 元 1999 : 新版 微生物学実験法, 62, 講談社サイエンティフィック, 東京
- 67) Suslow, T. V. and Schroth, M. N. 1982 : Role of deleterious bacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology*, 72, 111–115.
- 68) Takahashi, K. 1973 : Design of a calorimeter for the continuous study of heat production during anaerobic microbial growth. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2743–2747.
- 69) Tari, P. H. and Anderson, A. J. 1988 : *Fusarium* wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2037–2041.
- 70) Toyota, K. and Ikeda, K. 1997 : Relative importance of motility and antibiosis in the rhizoplane competence of a biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* MelRC2Rif. *Biol. Fertil. Soils*, 25, 416–420.
- 71) 豊田剛己 2000 : 系統分類群と土の細菌 γ -プロテオバクテリアに属する土壌細菌, 新・土の微生物 (5) 系統分類からみた土の細菌, 142–148, 日本土壌微生物学会編, 博友社
- 72) 浦嶋泰文・須賀有子・福永亜矢子・堀 兼明 2001 : 画像解析による細菌の運動性解析, 土肥誌, 72, 85–87.
- 73) 浦嶋泰文・堀 兼明 2003 : ホウレンソウに対するPGPRの検索, 土肥誌, 74, 157–162.
- 74) 浦嶋泰文・堀 兼明 2003 : ホウレンソウ種子へのPGPRの接種・定着法, 土肥誌, 74, 163–168.
- 75) Urashima, Y., Sakai, M., Suga, Y., Fukunaga, A. and Hori, K. 2004 : Gravitational water flow enhances the colonization of spinach roots in soil by plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Soil Sci. Plant Nutri.*, 50, 277–281.
- 76) Urashima, Y., Suga, Y. and Hori, K. 2005 : Growth promotion of spinach by fluorescent *Pseudomonas* strains under application of organic materials. *Soil Sci. Plant Nutri.*, 51, 841–847.
- 77) Van Elsas, J. D. and Heijnen, C. E. 1990 :

Methods for the introduction of bacteria into soil: a review *Biol. Fertil. Soils* 10, 127 – 133.

- 78) Vesper, S. J. 1987 : Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 1397 – 1403.
- 79) Voisard, C., Keel, C., Haas, D. and Defago, G. 1989 : Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.*, 8, 351 – 358.
- 80) Weller, D. M. and Cook, R. J. 1983 : Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73, 463 – 496.
- 81) Weller, D. M. 1988 : Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26, 379 – 407.
- 82) Wessendorf, J. and Lingens, F. 1989 : Effect of culture and soil condition on survival of *Pseudomonas fluorescens* R1 in soil. *Appl. Microb. Biotechnol.* 31, 97 – 102.
- 83) White, D., Leifert, C., Ryder, M. H. and Killham, K. 1996 : Lux gene technology – a strategy to optimize biological control of soil-borne diseases. *New Phytol.*, 133, 173 – 181.
- 84) 山野秀樹 1984 : 微生物の成育と熱生成, 土壤のバイオマス—土壤生物の量と代謝—, 5 – 44, 日本土壤肥料学会編, 博友社, 東京
- 85) 野菜試験場 1984 : 最近における野菜・花きの連作障害の実態, 研究資料, 第18号

Development of the Application Method for the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria

Yasufumi URASHIMA*

Summary

Rhizobacteria have the potential effect to be useful in agriculture for plant disease control and plant growth promotion. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are soil bacteria that when applied to seeds or roots, are able to colonize plant roots and stimulate plant growth. Strains of fluorescent *Pseudomonas*, particularly *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*, belong to a major group of PGPR. Fluorescent *Pseudomonas* strains (hereafter referred to us “fluorescent *Pseudomonas*”) are able to suppress soil-borne pathogens or promote plant growth.

We selected PGPR with the function that promoted the elongation of spinach root using the small-scale sterilized hydroponic culture bioassay system. Several fluorescent *Pseudomonas* strains which promote growth (the above-ground and root) of the spinach over about 50% was obtained. In the hydroponic culture, inoculated fluorescent *Pseudomonas* has sufficiently colonized on the spinach root. There was no remarkable growth-promoting effect, in the case of the fluorescent *Pseudomonas* were inoculated to the spinach in soil culture, while growth promoting effects of the spinach were observed in hydroponic culture.

When the bacterized seeds were preserved at 4°C, the decrease of the bacterial population on the seeds were considerably gentle. And, the lowering of the bacterial population on the seeds were held by soaking the seed in the 10g L⁻¹ methyl cellulose (100 degrees of polymerization). And, the bacterial population on the seeds were maintained high for a long time (180 days), in the case of methyl cellulose were used.

Root colonization by a plant growth-promoting *Pseudomonas* was examined to determine whether gravitational water flow affects the bacterial distribution on spinach roots. The effect of the gravitational water flow by irrigation is important for the spread of colonization of spinach roots by Fluorescent *Pseudomonas* strains.

We considered that the application of organic materials with fluorescent *Pseudomonas* would promote the PGPR colonization to spinach roots. Therefore, we investigated the behavior of PGPR in the soil treated with or without organic materials. Firstly, motility analysis of Fluorescent *Pseudomonas* strains were carried out. The motility speed of Fluorescent *Pseudomonas* strains in this soil solution was analyzed using the image analysis method. The result showed that organic materials that promote the motility of fluorescent *Pseudomonas* are different for each strain. Secondly, growth of Fluorescent *Pseudomonas* strains were analyzed using calorimeter. The method using the calorimeter can monitor directly the growth of inoculated bacterial strain in the soil. The results showed that organic matters that promote the growth of Fluorescent *Pseudomonas* strains are different in each strain. The image analysis system was useful to analyze the motility, and the calorimeter for the growth.

Department of Upland Farming

*National Agricultural Research Center for Tohoku Region

Introducing a marker gene into an inoculated strain is an effective way to analyze the actual behavior of the inoculated strain in soil. We introduced a bioluminescence reporter gene of bacterial luciferase into some fluorescent *Pseudomonas* isolates as a marker to monitor their behavior in the rhizosphere. The transformed strains are bioluminescent and thus provide a rapid and very accurate tool for studies on the population dynamics and spatial distribution of specific bacteria in environmental samples .

In conclusion, the expression of the growth-promoting function of fluorescent *Pseudomonas* in soil culture could be obtained with the application of an appropriate organic material as a carbon source to each of PGPR strains. Though fluorescent *Pseudomonas* inoculated in soil solely could not colonize the roots due to competition with indigenous microorganisms, the application of organic materials promoted the colonization, resulting in the plant growth-promoting effect of PGPR. Consequently, the method consisting of the use of the appropriate organic materials could be effective for the utilization of fluorescent *Pseudomonas* in agriculture.