

森林土壌に形成される菌核の微生物担体としての有効性評価

野々山 弥^{1*}・成澤 才彦²・太田 寛行²・渡邊真紀子^{1,3}

¹ 東京工業大学大学院総合理工学研究科環境理工学創造専攻, ² 茨城大学農学部資源生物科学専攻, ³ 首都大学東京都市環境科学研究科都市環境科学専攻

(2009年8月31日受付 2009年10月13日受理)

Evaluation of Efficiency as Microbial Cell Carrier of Fungal Sclerotia Found in Forest Soil

Yaya Nonoyama^{1*}, Kazuhiko Narisawa², Hiroyuki Ohta², and Makiko Watanabe^{1,3} (*Department of Environmental Science and Technology, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama 226-8502*¹; *Department of Bioresource Science, College of Agriculture, Ibaraki University, Ami-machi, Ibaraki 300-0393*²; *Department of Geography, Graduate School of Urban Environmental Science, Tokyo Metropolitan University, Hachioji, Tokyo 192-0397*³) *Seibutsukogaku*: **87**, 518-522, 2009.

Fungal sclerotia, the resting bodies formed by ectomycorrhizal fungi, are found in forest soils and characterized by their hard, black, and spherical structure. Bacteria are detected in their porous internal structure of the sclerotium. It has been known that porous materials containing microbial cells have an advantage to maintain activities of useful microbes in soil. The objective of this study is to characterize phylogenetically the bacterial community inside the sclerotium grains and evaluate the efficiency of sclerotia as microbial cell carrier. Bacteria were isolated from four sclerotia by culturing on DNB agar medium and isolates were subjected to 16S rRNA gene analysis. The autoclave-treated sclerotium was then immersed in a pure culture of the isolated bacteria to check the behavior of bacteria. The experiment using eight strains including *Ralstonia pickettii*, demonstrated that the maximum counts of viable cell found in sclerotium and rate of cell adsorption into sclerotium were 8.7×10^7 CFU \cdot g⁻¹ and $10^2 - 10^6$ CFU \cdot h⁻¹, respectively.

[**Key words**: sclerotium, microbial cell carrier, bacterial flora, viable cell counts, rate of cell adsorption]

菌核は、糸状菌類の休眠体であり、過酷な環境において形成され、乾燥や低温に耐えることのできる構造を持つ耐久体である。菌核は、糸状菌の生育に適した環境になると菌糸伸長をはじめプロパギュールの役割を担っている¹⁾。植物病理学の分野では、*Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfisii*により形成される、植物に対する初期の感染源としての菌核を扱った研究が多くなされており、感染を抑制するために菌核形成因子や発芽因子についての研究が多くされている²⁻⁴⁾。一方、菌核と細菌の関係の研究としては、菌核に対する拮抗細菌とそれに対する防御応答としての菌核からの揮発性物質の放出について報告されている⁵⁾。また、*R. solani*, *S. rolfisii*の場合、土壌に菌核を入れると、菌核表面に微生物が増殖する。この微生物活性の増加は、“菌圏(菌核周囲の土壌)効果”と定義

されている^{6,7)}。

本研究で対象とする菌核は、しばしば酸性森林土壌で見られ、粒径0.1-5 mm程度の黒色球体で、内部にセル(3-15 μm)構造を持つ(Fig. 1)。隣り合うセルは0.2-0.8 μm程度の隔壁孔でつながっている(Fig. 1dの矢印)。形態的特徴から*Cenococcum geophilum*(以下、Cg)などを含む根部内生[外生]糸状菌(dark septate endophytic fungi, DSE菌)により形成されたと推定される。Cgは外生菌根菌で、きわめて広い範囲に生息し、北極から熱帯まで世界中に分布しており、特に過酷な土壌環境で多くみられる⁸⁾。そのため、Cgの形成する菌核は世界中に分布しているが、植物病原菌の菌核に比べると研究の蓄積が少なく、その生態には不明な点が多い。酸性森林土壌から分離される菌核について、Cgにより形成され、数

*連絡先 〒226-8502 神奈川県横浜市緑区長津田4259 G5-10

E-mail: nonoyama@depe.titech.ac.jp

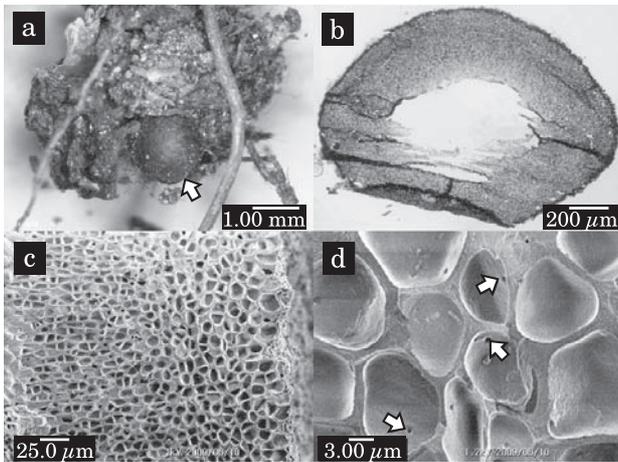


Fig. 1. Sclerotium recovered from forest soil; a) photograph of a sclerotium (denoted by an arrow) found in soil, b) a photomicrograph of a sclerotium sliced by freezing microtome, c) a scanning electron-micrograph of sclerotium internal structure, and d) cell geometry and septal pore (denoted by arrows) of sclerotium internal structure.

年間土壌中に残存すると考えられるという報告⁹⁾や、*Cg* 菌根および *Cg* 菌核を含む周囲の土壌から抗生物質が検出されたことが報告されている¹⁰⁾。これまでに筆者らは、新潟県妙高山からの *Cg* の菌核における培養可能な細菌群集について報告している¹¹⁾。さらに、岐阜県御嶽山の土壌において、菌核内部と土壌の微生物群集構造の違いをクローンライブラリー法により確認している¹²⁾。

一方、土壌中で有用微生物を効率的に機能させるためには、微生物担体が有効であることが知られている。一般に、土壌に有用菌を直接投入しても土着の微生物との拮抗で効果が上がらないことが多いが、担体に有用菌を保持させてから土壌に投入することで、その活性を保つことができる¹³⁾。担体を含む微生物資材としては、多孔質である木炭やセラミックスなどを利用した病害防除、脱臭・堆肥化を目的とした研究が多く行われている¹⁴⁾。

菌圏の微生物活性は高く、それら細菌の菌核への定着に対して、菌類が防御のために抗生物質を生成することがわかっている⁵⁻⁷⁾。にもかかわらず、菌核内部を他の土壌微生物が生息空間として利用しており、菌核内外では細菌相が異なることが報告されている^{11,12)}。これは、構造だけでなく生物学的な因子も含めた菌核の特殊性からきているものと考えられる。菌核は、内部にセル構造を持ち、菌核内部に細菌が分布する担体のような役割を担っていると推察される。

土壌中から採取された菌核内部の細菌相を明らかにすることで、自然環境中の菌核と細菌の関係を解析することができ、また、オートクレーブ処理した菌核への細菌の定着を調べることで、生物学的な因子を除いて単純化した菌核への細菌の定着を考察することができる。これ

らの結果は、新たな微生物担体を設計するヒントを得ることにつながる。また、担体として使用する上で細菌の封入をコントロールすることが重要であるため、菌核の最大保持細菌数や細菌定着速度を調べることで、担体としての基本情報を得られる。そこで、本研究では、土壌から採取した菌核の細菌相を調べると共に、オートクレーブ処理した菌核への細菌の定着を測定することで、菌核の微生物担体としての有効性評価を行い、新たな微生物担体設計の基本情報を得ることを目的とした。その方法として、土壌から採取した4つの菌核における細菌相を培養法により解析した。さらに、菌核内部から分離した細菌8株を用いて、それぞれの細菌におけるオートクレーブ処理した菌核内部への定着を分析した。

実験方法

土壌サンプリングと菌核の採取 2007年および2008年8月に岐阜県御嶽山の湯の花峠（標高2103 m、コメツガ林）で採取された表土A層の土壌を供試土壌とした。菌核試料は、4°Cで保存した供試土壌から、wet sieving法¹⁵⁾により、0.5、1.0、2.0 mmの篩を用いて採取した。

菌核内部の細菌の分離と同定 菌核内部の細菌相の分析は、採取した菌核の中で、4つの菌核（粒径約2.7、2.2、1.6、および1.2 mm）を選んで供試した。それぞれの湿重量は、9.2 (Sc1)、6.4 (Sc2)、2.4 (Sc3)、および1.7 mg (Sc4)であった。この4個の菌核について、Ohta *et al.* (2003)¹¹⁾の方法に従い、100倍希釈肉エキス (DNB) 寒天培地で培養して菌核内部の細菌を分離し、分離株の16S rRNA遺伝子 (16S rDNA) を解析した。

菌核の滅菌処理前後の比較 オートクレーブ処理法 (121°C, 20分) により土壌から採取した菌核を滅菌し、菌核の構造や内部細菌の有無を観察した。菌核のセル構造は電子顕微鏡 (Keyence VE-9800) で観察し、さらに、フーリエ変換赤外分光光度計 FT-IR (Shimadzu IRPrestige-21) を使用して、オートクレーブ処理前後の菌核の化学構造の変化を分析した。オートクレーブ処理後の菌核の内部細菌の有無は、先に述べた方法と同じように、DNB寒天培地に接種、培養して行った。

細菌純粋培養液の菌核浸漬実験 菌核内部から分離した細菌のなかから、アランダムに分離株8株を選んで、それぞれDNB液体培地で純粋培養し、培地の影響を減らす¹⁶⁾ ために培養液を1000倍希釈した溶液にオートクレーブ処理した菌核を浸した。一定の浸漬時間 (1、5、10、15、24、48、および80 h) ごとに菌核を取り出し、滅菌水で10回洗浄¹¹⁾ した後、滅菌水を加えてガラス棒ですり潰して調製した菌核懸濁液中の細菌数をDNB寒天培地による希釈平板法により測定し、最大菌

数, 定着速度を算出した.

実験結果

菌核内部の細菌の分離と同定 御嶽山の土壌から採取した4つの菌核内部から分離された細菌相は, 菌核個々で異なる結果となった (Fig. 2). Sc1からは *Proteobacteria*, Sc2からは *Actinobacteria* の細菌のみが分離された. 一方, Sc3とSc4からは, さまざまな種類の細菌が検出された. 分離された細菌相の中で優先する細菌と分離された割合は, それぞれ Sc1, *Ralstonia* 属 (71%); Sc2, *Arthrobacter* 属 (45%); Sc3, *Bacillus* 属 (69%); Sc4, *Nocardioiodes* 属 (50%) であった.

菌核の減菌処理前後の比較 オートクレーブ処理した菌核の表面構造を電子顕微鏡で観察した結果, 処理により球体にはひびが入り, 多少セル構造が破損しているものも一部あったが, ほぼ構造を維持していることを確

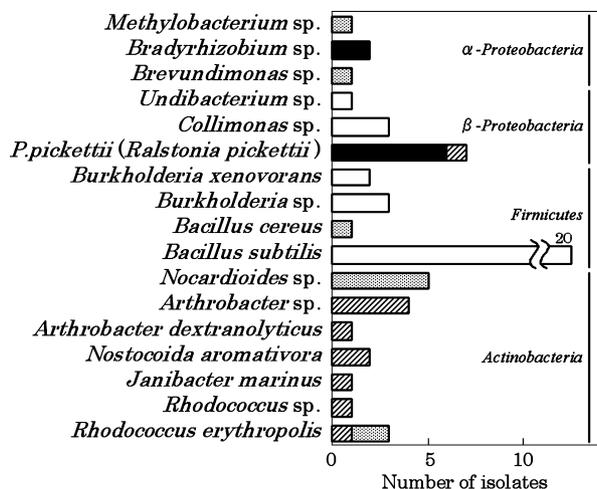


Fig. 2. Identification of bacteria recovered from the four sclerotium samples. Sclerotium samples (fresh weight) : ■, Sc1 (9.2 mg); ▨, Sc2 (6.4 mg); □, Sc3 (2.4 mg); ▩, Sc4 (1.9 mg).

認した. 表面の状態もほぼ変化が見られなかった. Fig. 3に, FT-IRにより測定したスペクトルを示す. オートクレーブ前後で, スペクトルのピークに違いは見られなかった. これらのことから, オートクレーブ処理により, 菌核の構造が, 物理的, 化学的に大きく変化することはないと判断された. オートクレーブ処理した菌核懸濁液を DNB 寒天培地で培養した結果, 細菌はまったく検出されなかった.

菌核浸漬実験 浸漬実験に使用した菌核から分離した細菌分離株について Table 1にまとめた. 1000倍希釈肉エキス培地での培養液にオートクレーブ処理した菌核を浸し, 浸漬時間ごとの内部細菌数の変化を確認した結果を Fig. 4と Table 1に示した. 実験に用いた細菌分離株は, *Bacillus* sp. Sc-iso-25株を除いてすべて培養液に浸す時間と共に菌核内部細菌数が増加し, 24時間以降はほぼ一定の値を保つ傾向が見られた. Fig. 4に示した *Ralstonia pickettii* Sc-iso-06株の最大菌数は 8.7×10^7 CFU \cdot g⁻¹, 定着速度は 1.6×10^6 CFU \cdot h⁻¹であり, 8株の中で最大菌数が最も多く, また定着速度も高かった. 供試細菌7株は, *R. pickettii* Sc-iso-06株を使用した実験と同様に菌核内か

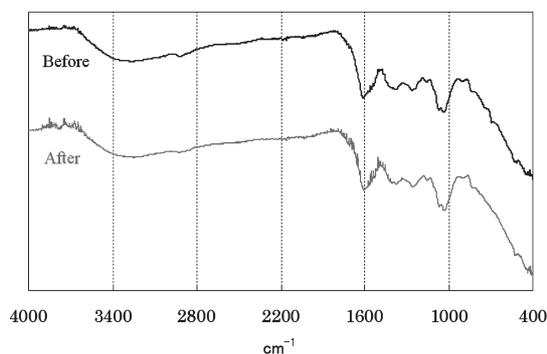


Fig. 3. FT-IR spectra of sclerotium samples before and after autoclave treatment.

Table 1. Viable cell counts found in sclerotium and rate of cell adsorption calculated by immersion test.

Strain	Closest relatives [homology %]	Viable cell counts found in sclerotium (CFU \cdot g ⁻¹)	Rate of cell adsorption (CFU \cdot h ⁻¹)
Sc-iso-05	<i>Bradyrhizobium</i> sp. JR016 [100]	4.8×10^7	2.4×10^5
Sc-iso-06	<i>Ralstonia pickettii</i> ATCC 27512 [100]	8.7×10^7	1.6×10^6
Sc-iso-10	<i>Janibacter melonis</i> C6 [99]	8.3×10^5	7.6×10^4
Sc-iso-19	<i>Arthrobacter dextranolyticus</i> DiSz [99]	1.6×10^7	3.7×10^5
Sc-iso-25	<i>Bacillus cereus</i> KSC_UV5b [99]	0	—
Sc-iso-28	<i>Methylobacterium</i> sp. PB138 [100]	2.9×10^7	1.1×10^5
Sc-iso-30	<i>Brevundimonas</i> sp. EMB 340 [99]	1.9×10^5	3.8×10^2
Sc-iso-45	<i>Nostocoida aromativora</i> NCI-4 [99]	2.1×10^7	1.7×10^5

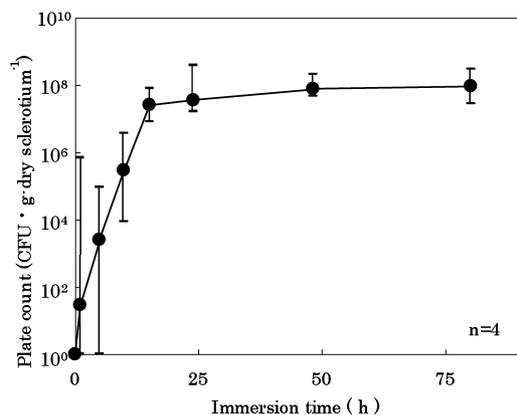


Fig. 4. Time course of bacterial cell adsorption into an autoclave-treated sclerotium. *R. pickettii* Sc-iso-06 was used. Plate count was expressed in the mean and standard deviation of four replicates.

ら細菌が検出され、最大菌数は $10^5 \sim 10^7$ CFU · g⁻¹、定着速度は $10^4 \sim 10^5$ CFU · h⁻¹ であった。それに対し、*Brevundimonas* sp. Sc-iso-30株、*Bacillus* sp. Sc-iso-25株の2株における菌核への定着は、異なる傾向を示した。*Brevundimonas* sp. Sc-iso-30株については、定着速度が 3.8×10^2 CFU · h⁻¹ と他の細菌に比べて遅く、最大菌数も 1.9×10^5 CFU · g⁻¹ と少なかった。また、*Bacillus* sp. Sc-iso-25株については、他の細菌分離株と同様に浸漬後の菌核の洗浄液からは細菌が検出されたにもかかわらず、純粋培養液に浸漬した菌核からは内部細菌がほぼ検出されなかった。細菌の種類によって、菌核内部への定着の最大菌数および定着速度は、それぞれ固有の値を持つが、供試細菌のほぼすべてが菌核内部に定着した。

考 察

御嶽山の土壌から採取した供試した4つの菌核内部からは17種類の細菌が検出され、内部細菌相は菌核個々で異なる結果を示した。これらの結果において規則性は見られず、菌核内部の細菌相は菌核の大きさに依存しないと考えられる。しかし、どの菌核においても45–71%と比較的高い割合で優先する細菌が存在することは、新潟県妙高山の土壌から採取された菌核において、*Sphingomonas* 属細菌が52%と高い割合で優先した¹¹⁾ことと一致した。

御嶽山の表土から採取した菌核の AMS¹⁴C 年代は、modern ~ 1800年であったことが報告されている¹⁷⁾。土壌中の菌圏の微生物活性が高いにもかかわらず、このように菌核が分解されずに土壌中に長期間安定して残存できるのは、自然環境の中ではすべての細菌に利用されにくいためであると考えられる。しかしながら、本実験結果より、土壌中の菌核内部には多種の細菌が定着してい

ることが示唆された。以上より、菌核は細菌が定着できる長期間使用可能な微生物担体の役割を担っていると考えられる。

オートクレーブ処理した菌核を1000倍希釈した細菌分離株の純粋培養液に浸し、浸漬時間ごとの内部細菌数の変化を確認した結果、ほとんどの細菌分離株は、菌核内部細菌数が培養液に浸す時間と共に増加し、24時間以降はほぼ一定の値を保つ傾向が見られた。このことから、オートクレーブ処理した菌核においては、細菌の移動が比較的速い時間で起こることが示唆された。本実験結果より、15時間までは細菌数の標準偏差が大きいことから、菌核個々の構造の違いやオートクレーブ処理による破損の状態などで内部への定着速度が変わることがわかる。また、24時間以降の細菌数の標準偏差が小さいことから、24時間の値が内部に定着できる細菌の最大菌数であると考えられる。菌核の構造に着目した定着試験を行った結果、オートクレーブ処理した菌核内部への細菌の定着速度は細菌種で固有であるが、培養液に24時間浸漬することで十分に細菌が定着することが明らかとなった。このことから、菌核は微生物封入のコントロールが容易であり、微生物担体の構造に適していることが示唆された。

菌核に定着した *R. pickettii* Sc-iso-06株の最大菌数は約 10^8 CFU · g⁻¹ であり、供試細菌の中で最も菌核内部に定着した。この細菌は、菌核 Sc1 から分離された細菌の71%を占め、他の細菌より優先していたことから、菌核内部に定着しやすい細菌であったと考察できる。*Bradyrhizobium* sp. Sc-iso-05株、*Arthrobacter* sp. Sc-iso-19株、*Methylobacterium* sp. Sc-iso-28株、*Janibacter* sp. Sc-iso-10株、および *Nostocida* sp. Sc-iso-45株の5株は *R. pickettii* Sc-iso-06株を使用した実験と同様に菌核内から細菌が検出され、最大菌数は $10^5 \sim 10^7$ CFU · g⁻¹ と同等の細菌数であった。さらに、土壌からの分離株1株についても同様の結果が得られたが、分離源との関係については今後明らかにした上で、有効性を明らかにしていく予定である。それに対し、*Brevundimonas* sp. Sc-iso-30株は定着速度が遅く、*Bacillus* sp. Sc-iso-25株については純粋培養液に浸漬しても菌核内部から細菌がほぼ検出されなかった。最も近縁な *Bacillus cereus* は、低栄養な培地への移動により休眠細胞を形成する能力を持つ芽胞形成菌である¹⁸⁾ ために、菌核内部に定着できなかった可能性が高いと考えられる。以上の結果から、オートクレーブ処理した菌核からは、生物学的な因子を除いて単純化した菌核の構造に着目した結果が得られ、ほぼすべての供試細菌の定着に適していることが明らかとなった。

土壌から採取された菌核の細菌相の解析およびオート

クレーブ処理した菌核への細菌の定着測定の結果から、菌核はさまざまな細菌の定着が可能であり、微生物封入のコントロールが容易であることが明らかとなり、微生物担体の構造として有効であることが示唆された。菌核の構造をヒントに微生物担体を設計することで、細菌の定着に適した新たな微生物担体の提案が可能であると考えられる。

要 約

糸状菌が形成する休眠体である菌核は、土壌からしばしば検出され、多孔質である内部から細菌が検出されることが知られている。一方、土壌中で有用微生物を効率的に機能させるために、多孔質の微生物担体が有効であることが知られている。本研究では、菌核の微生物担体としての有効性評価を行い、新たな微生物担体を設計するヒントおよび基本情報を得ることを目的とした。その方法として、土壌から検出された菌核内の細菌相を解析すると共に、オートクレーブ処理した菌核への細菌分離株の定着について細菌種間の比較を行った。供試菌核4個の内部細菌をDNB寒天培地により分離し細菌相を比較した結果、土壌中の菌核内部には、多種の細菌が定着していたことが明らかとなった。どの菌核においても45–71%で優先する細菌がそれぞれ存在した。オートクレーブ処理した菌核を細菌の純粋培養液に浸し、内部への定着を確認した結果、細菌の種類によって菌核内部への定着の最大菌数および定着速度はそれぞれ固有の値を持つが、供試細菌のほぼすべてが菌核内部に定着することが明らかとなった。菌核は、さまざまな細菌の定着が可能であり、微生物封入のコントロールが容易であることから、微生物担体の構造として有効であると考えられる。

文 献

- 1) Ainsworth, G. C. and Sussman, A. S. (eds): *The fungi*, Vol. II, p. 101-108, Academic press, New York (1966).
- 2) Hausner, G. and Reid, J.: *Mycoscience*, **40**, 393–400 (1999).
- 3) Moromizato, Z., Ishizaki, F., Takara, K., and Tamori, M.: *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **57**, 649–656 (1991).
- 4) Guo, Q., Arakawa, M., Inagaki, K., and Adachi, T.: 名城大農学報, **42**, 1–8 (2006).
- 5) Fravel, D. R., Connick, Jr. W. J., Grimm, C. C., and Lloyd, S. W.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3761–3764 (2002).
- 6) 内記 隆, 宇井格生: 北海道大学農学部邦文紀要, **6**, 430–436 (1969).
- 7) Gilbert, R. G. and Linderman, R. G.: *Can. J. Microbiol.*, **17**, 557–562 (1971).
- 8) LoBuglio, K. F.: *Ectomycorrhizal Fungi*, *Cenococcum*, p.287–309, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1999).
- 9) Trappe, J. M.: *Can. J. Bot.*, **47**, 1389–1390 (1969).
- 10) Krywolap, G. N., Grand, L. F., and Casida, J. L. E.: *Can. J. Microbiol.*, **10**, 323–238 (1963).
- 11) Ohta, H., Yagi, M., Suzuki, J., Fujitake, N., and Watanabe, M.: *Microbes Environ.*, **18**, 126–132 (2003).
- 12) 野々山 弥, 成澤才彦, 太田寛行, 渡邊真紀子: 第22回日本微生物生態学会講演要旨集, p.80 (2006).
- 13) 竹内 雍 監修: 多孔質体の性質とその応用技術, p. 1002–1026, フジ・テクノシステム, 東京 (1999).
- 14) 野口勝憲: 土と微生物, **49**, 51–67 (1997).
- 15) Brundrett, M.: *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*, p.167–168, ACIAR (1996).
- 16) 木嶋利男: 拮抗微生物による病害防除, 農山漁村文化協会, 東京 (1994).
- 17) Watanabe, M., Sato, H., Matsuzaki, H., Kobayashi, T., Sakagami, N., Maejima, Y., Ohta, H., Fujitake, N., and Hiradate, S.: *Soil Sci. Plant Nutr.*, **53**, 125–131 (2007).
- 18) Claus, D. and Berkeley, R. C. W.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2, p.1105–1139, Springer-Verlag, New York (1986).