

抗菌物質産生性細菌 AB89 について

I. 産生菌の諸性質ならびに抗菌物質抽出法

川波 政和・飯山 和弘・古屋 成人・松山 宣明

(九州大学農学部)

On an antibiotic producing *Bacillus* sp. AB89. I. Characteristics of the producer bacterium and the extraction of antibiotic substance(s). KAWANAMI Masakazu,

Kazuhiro IYAMA, Naruto FURUYA and Nobuaki MATSUYAMA (Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81)

Key word: *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum*, antibiotic

葉面微生物と病原微生物との拮抗現象は、生物的防除や新規農薬開発への道を拓くものとして関心を集めている。先に筆者らは、イネ葉上から分離された *Bacillus* sp. AB89 株が、各種重要植物病原細菌ならびに糸状菌に対して幅広い抗菌スペクトラムを示す物質を産生することを明らかにした¹⁾。今回、本分離株の種名を明らかにするとともに、本菌の産生する抗菌物質の純化・精製法について検討を行ったので報告する。

材料および方法

1. 細菌学的諸性質の検討

Bergey's Manual 第8版の方法に準拠し、グラム反応、培養試験、炭水化物の分解と利用性試験、デンプンおよびアルギニン加水分解試験、カタラーゼ、オキシダーゼ活性およびチロシン分解試験等の細菌学的諸性質を検討した。

2. *Bacillus* sp. AB89 株の抗菌物質産生性検定

ジャガイモ半合成液体培地 (ジャガイモ (300g) 煎汁 1ℓ, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2g, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.5g, ペプトン 5g, シュクロース 15g/pH 7.0) 200ml を 500ml 容坂口フラスコに入れ、*Bacillus* sp. AB89 株を接種し、30℃で3日間振とう培養した。遠心分離 (6000rpm, 20分間) により除菌した培養濾液を濾過滅菌し、濾液の抗菌活性を9種の重要植物病原細菌および *Bacillus cereus* を指示菌として、ペニシリンカップ法¹⁾により検定した。

3. 抗青枯病細菌物質の抽出

本菌は30℃, 3日間, PS 液体培地中で培養し、6000rpm で20分間遠心分離を行い、その培養濾液を濃縮、1-ブタノールで粗抽出した。この試料を乾固し、メタノールで再溶解したものを、シリカゲル薄層クロマト

グラフィック (TLC) に供試した。吸着剤としては、Wakogel B-10 (和光純薬) を、展開溶媒としては1-ブタノール-エタノール-28%アンモニア水 (1:2:1, v/vh) を用いた。展開後、365nm 紫外線照射下で検出を行った。これらを12の分画に分け、吸着剤を掻き取り、メタノールで溶出を行い、各分画について抗菌活性を調べた。抗菌活性の検定は、*Ralstonia solanacearum* (synonym: *Pseudomonas solanacearum*²⁾ C319-SR を指示菌として用い、ペーパーディスク法¹⁾ならびにペニシリンカップ法によって行った。TLC 上から得られた活性分画をメタノールで溶出し、高速液体クロマトグラフィック (HPLC) (分析条件: カラム; MS C-18, 溶離液; 60% メタノール, 流速; 5ml/min, 検出; 235nm) に供試した。

結果および考察

本菌はグラム陽性菌で運動性があり、菌体細胞が4-5μm であるのに対し、2-3μm の芽胞を形成しているのが認められた。また、45℃での生育、pH 5.7での生育、7%NaCl 存在下での生育、クエン酸の利用性、アラビノース、マンニトールおよびキシロースの分解性、アセトイン分解性、デンプン加水分解性、レシチナーゼの検出、硝酸塩の還元性およびカゼインの分解性の各項目において陽性反応を示した。また、10℃での生育、アルギニンの加水分解性およびチロシンの分解性の各項目において陰性反応を示した。以上のように、本菌の性質は、試験を行ったすべての項目に関して *Bacillus subtilis* と一致したため、本菌を *Bacillus subtilis* の一系統と同定し、以後 *Bacillus subtilis* AB89 株と呼称することにした (Table 1)。

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of *Bacillus* sp. AB89

Characteristic	<i>B. sp.</i> AB 89	<i>B. subtilis</i> ^{a)}	<i>B. cereus</i> ^{a)}	<i>B. licheniformis</i> ^{a)}	<i>B. circulans</i> ^{a)}
Gram reaction	+ ^{b)}	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+
Oval spore	+	+	+	+	+
Growth at 45°C	+	d	+	+	+
Growth at 10°C	-	d	d	-	d
Growth at pH5.7	+	+	+	+	d
Growth in 7% NaCl	+	+	d	+	d
Growth in anaerobic agar	-	-	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	+	+	-
Acid from arabinose	+	+	-	+	+
Acid from mannitol	+	+	-	+	+
Acid from xylose	+	+	-	+	+
VP test	+	+	+	+	-
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	-	-	NT	+	NT
Lecithinase activity	+	+	-	+	NT
NO ³⁻ to NO ²⁻	+	+	+	+	d
Decomposition of casein	+	+	+	+	d
Decomposition of tyrosine	-	-	+	-	-

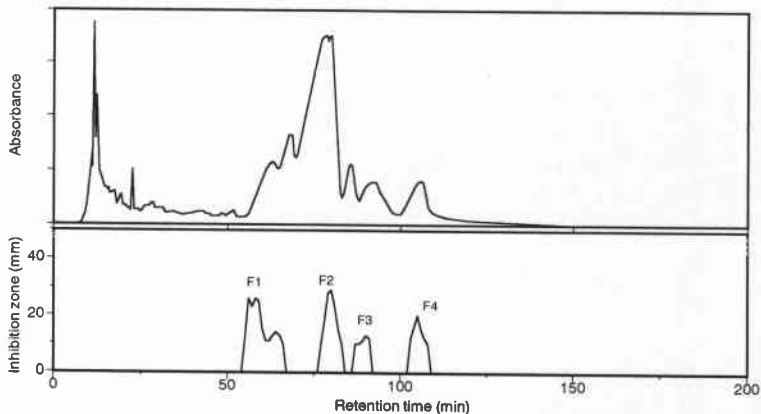
a) Data cited from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition (R. E. Buchanan, N. E. Gibbons) and the results of this study.

b) + : positive reaction, - : negative reaction, d : reactions differ, NT : not tested.

Table 2. Antibacterial spectrum of the substances produced by *Bacillus subtilis* AB89

Indicator	Activity ^{a)}
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATCC23308 ^T	+++
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>avenae</i> ATCC19860 ^T	++
<i>Bacillus cereus</i> 1029	+
<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> ATCC10248 ^T	+
<i>Burkholderia glumae</i> 2	+
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> ATCC27794 ^T	++
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> EH8519	++
<i>Ralstonia solanacearum</i> C319-SR	+++
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> MAF301861	++
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ATCC35933 ^T	+++

a) Activity index (diameter of inhibition zone): -, Not detected; +, 0-5mm; ++, 5-10mm; +++, 10-15mm.

Fig. 1. HPLC chromatogram of the antibiotics produced by *Bacillus subtilis* AB89.

Bacillus subtilis AB89 株のジャガイモ半合成液体培養濾液は、供試した10種類の指示菌すべてに対して抗菌活性を示した (Table 2)。特に、ナス科青枯病細菌 (*R. solanacearum*) に対して、安定かつ強い抗菌活性を示すことが明らかとなったため、本病原細菌を指示菌として、抗菌物質の鈍化を試みた。

本細菌の産生する抗青枯病細菌物質は、培養濾液より1-ブタノールで抽出可能であった。本試料を濃縮乾固後、メタノールに再懸濁し、シリカゲル薄層クロマトグラフィーによる分離を試みた結果、Rf 値0.2付近の無色の分画に抗菌活性が認められた。この活性分画をHPLCに供試したところ、さらに4つの活性分画に分離された (Fig.1)。この結果より、*Bacillus subtilis* AB89 株は、少なくとも4種類以上の抗青枯病細菌物質を産生していることが明らかとなった。

これまでに、*Bacillus subtilis* がイチュリンやサーファクチンといった環状ペプチドを産生するという報告³⁾が

なされている。これらの物質は、 α -アミノ酸と β -アミノ酸を含み、 β -アミノ酸に種々の側鎖が結合している環状ペプチド系抗生物質⁴⁾である。本細菌もこのような物質を産生している可能性が考えられる。今後は、本細菌の産生する複数の抗菌物質を各々純化、構造決定し、植物細菌病防除薬剤としての利用性について検討する予定である。

引用文献

- 1) 井上志之・金 京姫・西岡正憲・古屋成人・松山宣明 (1993) 九病虫研究会報 39: 56-59.
- 2) 佐藤昭二・後藤正夫・土居養二 (1991) 植物病理学実験法 219-223.
- 3) PHAE. C. G., SHODA, M. and KUBOTA, H. (1990) J. Ferment. Bioeng. 69: 1-7.
- 4) 正田 誠 (1995) 植物防疫 49 178-183.
- 5) YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. and NISHIUCHI, Y. (1995) Microbiol. Immunol. 39 897-904.

(1997年4月30日受領)