

Bacillus sp. AB89 の産生する抗菌物質について

井上 志の・金 京姫・西岡 正憲・古屋 成人・高浪 洋一・松山 宣明
(九州大学農学部)

Production of antibiotic(s) by *Bacillus* sp. AB89. Shino INOUE, Hyung Hee KIM, Masanori NISHIOKA, Naruto FURUYA, Yoichi TAKANAMI and Nobuaki MATSUYAMA
(Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812)

微生物の産生する生理活性物質を農薬として利用しようという試みは、長年なされており、既にブラストサイジン S^{1,4)}、カスガマイシン^{1,4)}がイネいもち病を対象に、バリダマイシン¹⁾がイネ紋枯病に、ポリオキシシン^{1,4)}が果樹、蔬菜病害に実用化されている。

これらの抗生物質は放線菌由来のものが大部分であるが、現在その源を植物の葉面、あるいは根圏に生息する放線菌以外の微生物や植物病原菌にも求めるべく様々な研究がなされている。

今回イネ葉上から分離された *Bacillus* 属の1細菌が広い抗菌スペクトラムを示す物質を産生していることを認めた。本実験はこの分離株 *Bacillus* sp. AB89 の抗菌物質産生性を明らかにし、純化・精製法を確立する目的で行ったものである。

材料および方法

1 *Bacillus* sp. AB89 の抗菌物質産生性

1) 供試菌株

Bacillus sp. AB89 についてその抗菌物質産生性を検討した。指示菌として Table 1 に示した各種植物病原細菌6菌株および植物病原糸状菌7菌株を用いた。細菌はジャガイモ半合成培地(ジャガイモ300g 煎汁液1ℓ, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2g, Ca(NO₃)₂ 0.5g, Peptone 5g, ショ糖15g, 寒天15g, pH 7.0) に高層培養し、流動パラフィン重層法によって25℃で保存中のものを用いた。また糸状菌はジャガイモ・ショ糖斜面培地(ジャガイモ200g 煎汁液1ℓ, ショ糖20g, 寒天20g) で継代培養したものを用いた。

Table 1. Phytopathogenic bacteria and fungi used as indicators for testing productivity of antibacterial substance(s)

Indicator	Source	Abbreviation
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> 489-4	LSPPM ^{a)}	E. c.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> N6102-1	KNAES ^{b)}	X. c.
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> Q7463	NIAES ^{c)}	X. o.
<i>Pseudomonas glumae</i> Ku8116	KU ^{d)}	P. g.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 1-SKRa	NIAES	A. t.
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> N6601	NIAES	C. m.
<i>Rhizoctonia solani</i> 31	KCC ^{e)}	R. s.
<i>Alternaria mali</i> A4-7-1	NIAES	A. m.
<i>Botrytis cinerea</i> (R)	NRIVK ^{f)}	B. c.
<i>Helminthosporium maydis</i> C7-1-1	NIAES	H. m.
<i>Pestalotia funerea</i> Ka-5	KAES ^{g)}	P. f.
<i>Pyricularia oryzae</i> Naga 69-150	NAES ^{h)}	P. o.
<i>Septogloeum mori</i>	KU	S. m.

a) Laboratory of Seed and Post-Harvest Disease, Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Thailand

b) Kyushu National Agricultural Experiment Station

c) National Institute of Agro-Environmental Sciences

d) Kyushu University

e) Kumiai Chemical Co., Ltd.

f) National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, Kurume Branch

g) Kagoshima Agricultural Experiment Station

h) Nagano Agricultural Experiment Station

2) 供試培地

細菌の継代、保存、抗菌物質の産生および抗菌活性の検定には、ジャガイモ半合成培地を用いた。また液体培地には、ジャガイモ半合成液体培地を用いた。糸状菌の継代、保存、前培養には、ジャガイモ・ショ糖寒天培地を用いた。

3) 抗菌活性の検定方法

抗菌活性はペニシリンカップ法によって検定した。200mlのジャガイモ半合成液体培地が入った500ml容坂口フラスコに *Bacillus* sp. AB89 (約 10^7 cfu/ml) を接種し、

30℃で振とう培養 (90回/分、振幅60mm) した。経時的に菌液を分取し、遠心 ($7,500 \times g$, 20分) して菌体を除いた培養濾液を、ミリポアフィルターで除菌して試料液とした。また熱が抗菌活性に及ぼす影響を調べるため、培養液に120℃、20分のオートクレーブ処理を行い、抗菌活性の検定を行った。

糸状菌においては、ジャガイモ・ショ糖寒天培地で28℃、2~10日間培養した後、直径9mmの滅菌したコルクボーラーで菌叢の周辺部から菌叢ディスクを抜き取り、ジャガイモ・ショ糖寒天平板の中央に移植した。その後、

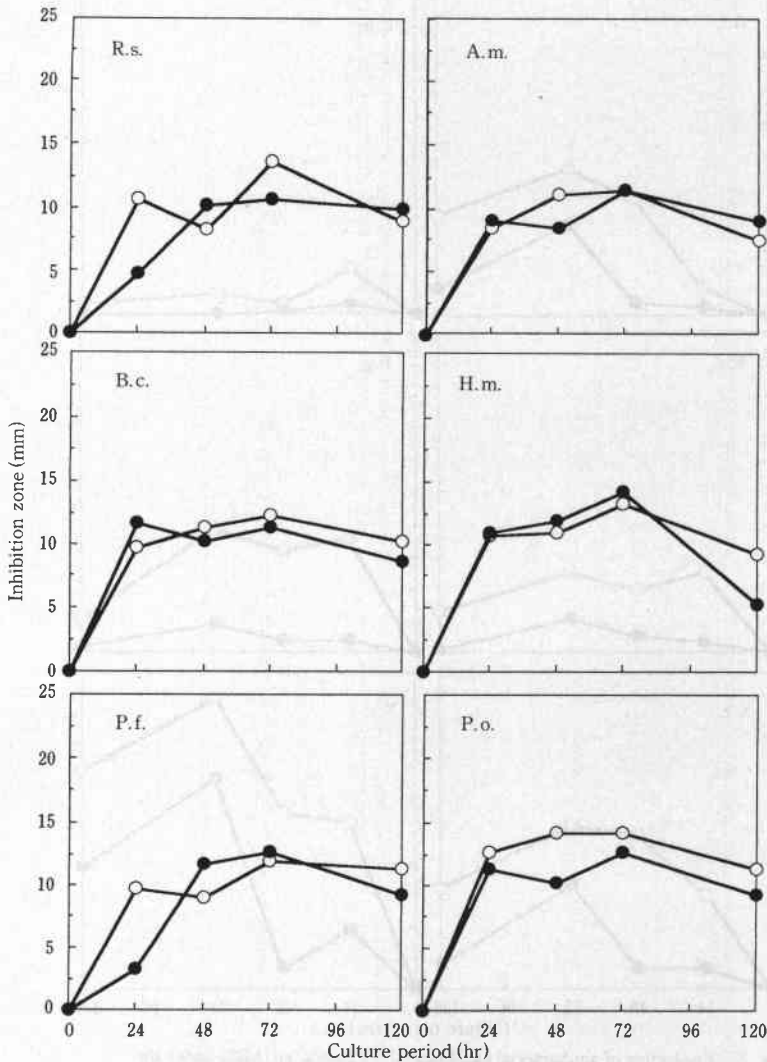


Fig. 1. Production of antifungal substance(s) by *Bacillus* sp. AB89 under the shake culture conditions in PS liquid medium.

○ : non-treated ● : heat-treated

R. s. : *Rhizoctonia solani*, A. m. : *Alternaria mali*,

B. c. : *Botrytis cinerea*, H. m. : *Helminthosporium maydis*,

P. f. : *Pestalotia funerea*, P. o. : *Pyricularia oryzae*

ペニシリンカップを対峙させ試料を注入後、28℃、2～10日間培養し、カップ周辺に生じた阻止帯の幅を計測することによって抗菌活性の検定を行った。

また細菌については、指示菌（約 10^7 cfu/ml）を重層したジャガイモ半合成培地上にペニシリンカップをおき、試料を注入後、30℃、24～48時間培養し、ペニシリンカップの周囲に生じた阻止帯の幅を測定することによって抗菌活性を検定した。

2 指示菌の形態観察

上記のようにして生じた阻止帯境界部分を、針で掻き

取りスライドグラスにのせ200倍で観察した。対照区として、同一平板培地上の生育障害を受けていない菌叢部分および検定平板に指示菌のみを培養した場合の菌叢を観察した。

結果および考察

1 *Bacillus* sp. AB89 の抗菌物質生産性

Bacillus sp. AB89 は *Rhizoctonia solani* や *Pyricularia oryzae* など供試したほとんどの糸状菌に対して抗菌活性を示すことが明らかとなった。またその活性は72時間培養

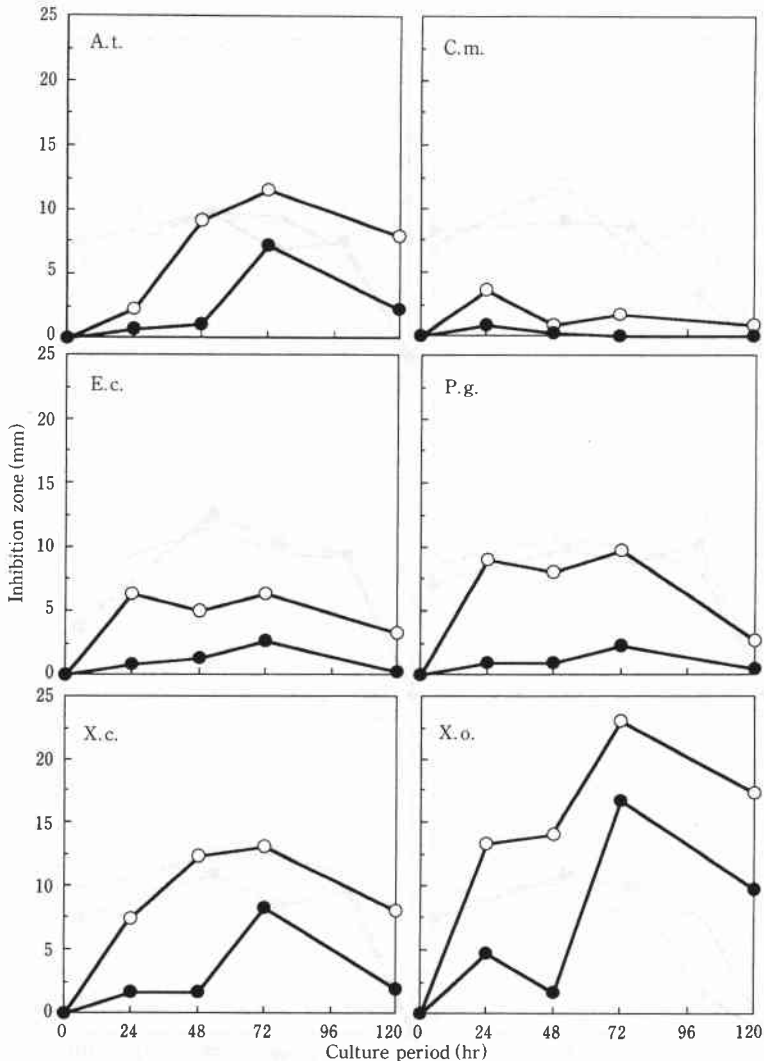


Fig. 2. Production of antibacterial substance(s) by *Bacillus* sp. AB89 under the shake-culture conditions in PS liquid medium.

—○— : non-treated —●— : heat-treated

A. t. : *Agrobacterium tumefaciens*, C. m. : *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*,

E. c. : *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, P. g. : *Pseudomonas glumae*,

X. c. : *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, X. o. : *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

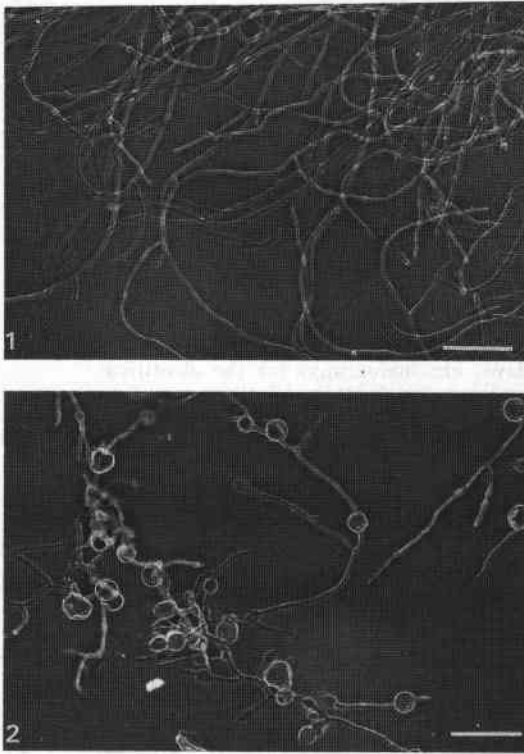


Fig. 3. Effect of antifungal substance(s) on hyphae.

(bar = 50 μ m) Indicator: *Septogloeum mori*

1: Non-treated

2: Treated with culture filtrate of *Bacillus* sp. AB89

養のろ液で強く、熱処理による活性の低下は認められなかった (Fig. 1)。

一方、細菌においては *X. c. pv. citri*, *X. o. pv. oryzae* には強い抗菌活性を示しているのに対して、*C. m. subsp. michiganensis* に対してはほとんど抗菌活性を示さず、指示菌による差異が認められた。また活性のピークは糸状菌の場合と同様に培養72時間目のろ液に認められたが、

熱処理により活性が低下することが明らかとなった (Fig. 2)。

これらのことから *Bacillus* sp. AB89 は耐熱性、易熱性の数種類の抗菌物質を産生していることが推察される。

2 指示菌の形態観察

顕微鏡観察を行った結果、*P. oryzae*, *H. maydis*, *S. mori* においては菌糸先端部が膨潤しているのが認められた (Fig. 3)。八重樫らは *P. oryzae* においては菌糸からも付着器が形成されると報告している⁹⁾が、この付着器形成は菌糸のベトリ皿などの接触により誘発されるとしており、本実験で観察された菌糸先端の膨潤は付着器とは異なると判断した。

また、この様な菌糸の膨潤を起こす物質として、キチン合成阻害剤であるポリオキシシン、あるいはステロール合成阻害剤であるトリアリロールなどが挙げられる。前者は、細胞壁成分であるキチンへのアセチルグルコサミンの取り込み阻害、後者はステロール、特にエルゴステロールの生合成阻害によるとされている^{3,8,9)}。

本抗菌物質は細胞膜⁹⁾あるいは細胞壁^{2,7)}に何らかの影響を与えているものと考えられるが、詳細な作用機構については今後更に検討する予定である。

引用文献

- 1) 石崎 寛 (1987) 農業科学 養賢堂:10-57.
- 2) Lewis, J. A. and Papavizas, G. C. (1987) *Phytopathology* 77: 699-703.
- 3) 日本農芸化学会 (1985) 抗生物質 朝倉書店: 195-211.
- 4) 西澤吉彦・鈴木幸男 (1974) 最新農業概論 東京広川書店:92-105.
- 5) Ohta N., Kakiki, K. and Misato, T. (1970) *Agr. Biol. Chem.* 34:1224-1234.
- 6) 大野雅二・大村 智 (1987) 抗生物質研究の最先端 東京化学同人:16-24, 120-172.
- 7) Siegel, M. R. (1981) *Plant Disease* 65:986-989.
- 8) 鈴木直治 (1978) 農業の生理作用 南江堂:257-270.
- 9) Yae-gashi, H. et al. (1987) *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 53: 203-209.

(1993年4月28日 受領)