

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	モリタ トシユキ 森田 智有
審査委員	主査 佐賀大学 准教授 上野 大介
	副査 佐賀大学 教授 田中 宗浩
	副査 鹿児島大学 教授 境 雅夫
	副査 琉球大学 教授 鬼頭 誠
	副査 鹿児島大学 准教授 樽木 直也
審査協力者	佐賀大学 名誉教授 染谷 孝
題 目	土壌および環境から分離した細菌が生産する揮発性抗菌物質による糸状菌の生育抑制 Fungal growth inhibition by volatiles produced by bacterial isolates from soil and environments
<p>本研究では、農産物の貯蔵時における糸状菌による腐敗を抑制する生物防除剤を得るため、強い揮発性抗菌物質を生産する細菌を種々の試料から分離選抜し、その抗菌スペクトラムや主要な抗菌物質を解明し、ハウスミカンの汚損低減などへの応用を検討した。</p> <p>1. 土壌、堆肥、およびグリストラップから分離した 136 株の細菌のうち、最も強い抗菌活性と広い抗菌スペクトルを示した TM-R 株を生理学的および遺伝子学的特徴から <i>Bacillus pumilus</i> と同定した。4 種類の寒天培地 (nutrient agar, Trypto-Soya, Luria-Bertani, および TMEA 培地) のそれぞれにおいて本菌が生産する揮発性物質が 6 種類の糸状菌 (<i>Aspergillus niger</i> NBRC33023, <i>Cladosporium cladosporioides</i> NBRC4459, <i>Penicillium italicum</i> NBRC32032, 他) に与える影響を検討した。シャーレ貼り合わせ試験では、TM-R は 5 種類 (<i>C. cladosporioides</i> NBRC4459, <i>P. italicum</i> NBRC32032, 他) の菌糸成長を顕著に抑制したが、<i>A. niger</i> NBRC33023 の発育を逆に促進した。12 L 容器試験においては発育抑制効果は減少したが、TMEA 培地で培養した TM-R は強い抑制効果を保ち、特に <i>P. italicum</i> NBRC32032 を 93% も抑制した。</p> <p>2. GC-MS で検出された揮発性物質 32 物質のうち、22 物質を 3 種類のデータベース (NIST</p>	

2011, AromaOffice, および AroChemBase) により同定した。検出された揮発性物質の種類および濃度は発育させる培地によって大きく異なっていたことから、抗菌活性の起因物質の特定に応用した。すなわち 4 種類の培地で TM-R を培養した際の *P. italicum* NBRC32032 の抑制率と各揮発性物質の相対濃度の相関関係を検定した結果、4 物質 (methyl isobutyl ketone, ethanol, 5-methyl-2-heptanone, および S-(-)-2-methylbutylamine) が主要な抗菌物質と推定された。起因物質まで特定している報告は少なく、このような手法で抗菌活性の起因物質を特定したのは本研究が初めてである。

3. 本菌の生物防除剤としての利用に向けて、浴室防霉の現場実証試験を行った。本菌を含有する微生物資材を設置した浴室では未設置の浴室と比較し、浴室天井壁面の糸状菌数が約 9 ヶ月間低い値に保たれ、その効果は家庭や季節に関係しないことが確認された。さらに、ハウスミカン上における糸状菌の発育抑制効果を検討し、腐敗したミカンから分離した糸状菌 *C. cladosporioides* SK-1 のハウスミカン果皮上での発育を有意に抑制することを確認した。今後、詳細な技術的検討がなされるならば、化学合成殺菌剤に替わるポストハーベスト処理技術として実用化されることが期待される。

4. TM-R よりも強い抗菌活性と広い抗菌スペクトルを示す細菌を得るため、土壌および堆肥から細菌を無作為に多数分離した。腐敗したミカンから分離した 3 種類の被験糸状菌 (*A. niger* RR, *C. cladosporioides* SK-1, および *P. italicum* 2) に対するシャーレ貼り合わせ試験において、208 株の細菌のうち 184 株 (88%) が 1 菌種以上の発育を抑制した。*A. niger* RR は揮発性物質に抵抗的であり、逆に 116 株 (56%) により発育が促進された。12 L 容器試験では、生育抑制効果はおおむね減少した。SNB2 株は *C. cladosporioides* SK-1 を完全に抑制したが、抗菌スペクトルは *B. pumilus* TM-R より狭かった。16S rRNA 遺伝子配列により、10 株を *Arthrobacter* 属, *Bacillus* 属など 6 菌種のいずれかであると同定した。これらの結果から、新たに分離した細菌株よりも *B. pumilus* TM-R が依然優れていることが判明した。同時に、抗真菌性揮発性物質を生産する細菌が土壌や堆肥に広く存在することが判明し、揮発性物質が微生物間相互作用因子や土壌静菌作用因子として働いている可能性が示された。

以上のように本論文は、農産物の貯蔵時における糸状菌による腐敗を抑制する生物防除剤を得る目的で、強い揮発性抗菌物質を生産する細菌を分離選抜し、その抗菌スペクトラムや主要な抗菌物質を解明し、ハウスミカンの汚損低減などへの応用技術の基礎を作った。本研究の成果は、化学合成殺菌剤に替わるポストハーベスト処理技術の基盤として価値が高く、学位論文として十分価値のあるものと判定した。