

土壤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

森田智有

2020

Summary	1
和文要旨	3
第一章 序論	5
第二章 <i>Bacillus</i> 属細菌株由来の揮発性物質による糸状菌生育抑制効果	7
2-1. 緒言	7
2-2. 材料および方法	8
2-3. 結果および考察	11
第三章 <i>Bacillus</i> 属細菌株含有微生物資材による浴室防黴の現場実証試験	22
3-1. 緒言	22
3-2. 材料および方法	22
3-3. 結果および考察	23
第四章 揮発性抗菌物質生産 <i>Bacillus</i> 属細菌株を利用したハウスミカン汚損低減	26
4-1. 緒言	26
4-2. 材料および方法	27
4-3. 結果および考察	29
第五章 土壌および堆肥に存在する揮発性抗菌物質生産菌の分離, 同定, および抗菌活性	36
5-1. 緒言	36
5-2. 材料および方法	37
5-3. 結果および考察	39

第六章 総合考察 . . . . . 46

謝辞 . . . . . 48

引用文献 . . . . . 48

## Summary

Recently, microorganisms that produce antifungal volatiles have received much attention. To obtain biocontrol agents for suppression of food-deteriorating fungi during storage of agricultural products, bacteria producing volatile organic compounds (VOCs) with strong antifungal activity were screened and isolated from various environmental samples. Among 136 bacterial isolates, strain TM-R showed the strongest and broadest antifungal activity. Based on physiological and genetical characterization, the bacterium was identified as *Bacillus pumilus*. The effects of VOCs produced by the bacterium, which was grown on four types of agar media (nutrient, Trypto-Soya, Luria-Bertani, and TM Enterprise), were examined against six species of fungi (*Alternaria alternata* NBRC31188, *Aspergillus niger* NBRC33023, *Cladosporium cladosporioides* NBRC4459, *Curvularia lunata* NBRC100182, *Fusarium oxysporum* NBRC30701, and *Penicillium italicum* NBRC32032) in both small- and large-scale tests (plate and 12-L tests, respectively). In the plate test, the bacterium markedly suppressed the mycelial growth of five fungi (*A. alternata* NBRC31188, *C. cladosporioides* NBRC4459, *C. lunata* NBRC100182, *F. oxysporum* NBRC30701, and *P. italicum* NBRC32032) but promoted the growth of *A. niger* NBRC33023. In the 12-L test, the degree of growth inhibition decreased; however, the bacterium grown on TMEA still exhibited the strongest inhibition, especially against *P. italicum* NBRC32032 (growth inhibition rate of 93%). Surprisingly, the growth of *A. niger* NBRC33023 was promoted even more strongly (-36%) by the bacterium on TMEA than in the plate test (-9%). Twenty-two of 32 VOCs detected by GC-MS were identified using three databases (NIST 2011, AromaOffice, and AroChemBase). The species and concentration of detected VOCs differed greatly among growth media. To identify causative antifungal VOCs, the correlation between growth inhibition of *P. italicum* NBRC32032 by the bacterium grown on each of the four media vs. the relative abundance of individual VOCs was estimated. As a result, four VOCs (methyl isobutyl ketone, ethanol, 5-methyl-2-heptanone, and S-(-)-2-methylbutylamine) were

determined to be the predominant antifungal VOCs. To the best of my knowledge, this study is the first to specify causative antifungal VOCs using such an approach.

For application to biocontrol, the effect of VOCs produced by the *B. pumilus* TM-R was examined in bathrooms and on citrus fruit. In the bathroom test, the number of fungi developed on the walls in the treated bathrooms in which the biocontrol agent containing *B. pumilus* TM-R was placed was markedly lower than that in the control bathrooms without the biocontrol agent and its effect was not affected by the difference in households and seasons. In the citrus fruit test, the growth of the fungi, *C. cladosporioides* SK-1 isolated from citrus and inoculated on the surface of mandarin orange was also strongly inhibited compared to the control.

To investigate the distribution of bacteria that have ability to produce antifungal volatiles in the environments, many bacteria were isolated from soil and compost. Among 208 bacterial isolates, 184 (88%) isolates produced volatiles that inhibit the growth of one or more of test fungi (*A. niger* RR, *C. cladosporioides* SK-1, and/or *P. italicum* D2) in the dual plate test. As for *A. niger* RR, its growth was even promoted by volatiles produced by 116 (56%) isolates. In the 12-L test, degree of growth inhibition decreased comparing with those in the dual plate test probably due to larger test volume. However, only one strain (SNB2) absolutely inhibited the growth of *C. cladosporioides* SK-1. Based on 16S rRNA gene sequence, ten strains were identified as either of *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Microbacterium* sp., *Lysobacter* sp., *Flavobacterium* spp., and *Pseudomonas* sp.

These results showed that *B. pumilus* TM-R has ability to suppress the growth of various fungi by producing volatiles and useful for the control of crop deterioration and mold development in bathroom. The present study has revealed that bacteria that have ability to produce antifungal volatiles widely distributed in soil and compost. Microbial volatiles may be one of the important factors of the soil fungistasis and interactions among soil microorganisms

## 和文要旨

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。

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 *Bacillus pumilus* 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 (*Alternaria alternata* NBRC31188, *Aspergillus niger* NBRC33023, *Cladosporium cladosporioides* NBRC4459, *Curvularia lunata* NBRC100182, *Fusarium oxysporum* NBRC30701, および *Penicillium italicum* NBRC32032) に与える影響を、シャーレ貼り合わせ試験および 12 L 容器試験において検討した。シャーレ貼り合わせ試験では、*B. pumilus* TM-R は 5 種類 (*A. alternata* NBRC31188, *C. cladosporioides* NBRC4459, *C. lunata* NBRC100182, *F. oxysporum* NBRC30701, および *P. italicum* NBRC32032) の菌糸成長を顕著に抑制したが、*A. niger* NBRC33023 の発育を逆に促進した。12 L 容器試験において、発育抑制効果は減少したが、TMEA 培地で培養した *B. pumilus* TM-R は強い抑制効果を保ち、特に *P. italicum* NBRC32032 を 93% 抑制した。驚くべきことに、12 L 容器試験 (-36%) における TMEA 培地で培養した *B. pumilus* TM-R による *A. niger* NBRC33023 の発育促進効果はシャーレ貼り合わせ試験 (-9%) よりも増強された。

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 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。抗菌活性の起因物質を特定するために、4 種類の培地で *B. pumilus* TM-R を培養した時の *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。その結果、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。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、浴室防黴の現場実証試験および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、糸状菌数が数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。また、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、詳細な技術的検討を行うならば、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の応用が期待される。

4. *B. pumilus* 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* D2) 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。12L容器試験では、生育抑制効果はおおむね減少したが、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, *Microbacterium* 属, *Lysobacter* 属, *Flavobacterium* 属, または *Pseudomonas* 属のいずれかの菌種と同定した。

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 株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および堆肥に広く存在し、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。

## 第一章 序論

植物病原性糸状菌は農作物の生産および貯蔵過程において損失を引き起こす主要な要因の一つである。この防除のために、化学合成抗菌剤が使用されてきた。しかし、ヒトの健康や環境への悪影響(Usallら, 2016)および耐性菌の出現(Drobyら, 2016)への懸念などから、化学合成抗菌剤に頼らない防除技術の開発が求められている。

代替手段の一つとして、拮抗微生物による生物防除が注目されており(Fridlenderら, 1993; Hassanら, 2017; Larkin & Fravel, 1998), なかでも揮発性抗菌物質を生産する微生物への関心が高まっている。揮発性物質は、低分子量のため、常温常圧で気化しやすく、拡散しやすいという特徴を持つ。これまでに *Botrytis cinerea* (Fiddaman & Rossall, 1994; Liuら, 2008; Rojas-Solísら, 2018; Zhangら, 2013), *Fusarium* spp. (El-Hasanら, 2018; Elkahouiら, 2014; Fiddaman & Rossall, 1994; Liuら, 2008; Tycら, 2015), *Penicillium* spp. (Arrebolaら, 2010; Liら, 2010), *Rhizoctonia solani* (Elkahouiら, 2014; Fiddaman & Rossall, 1994; Liuら, 2008; Tycら, 2015), および *Sclerotinia sclerotiorum* (Fernandoら, 2005; Fiddaman & Rossall, 1994; Liuら, 2008)などの種々の植物病原性糸状菌に対して、揮発性物質による抗菌活性（以後、遠隔抗菌活性と呼称する）を示す細菌や糸状菌が報告されている。また、より実用的な利用に向けた研究として、約7Lの容器における試験では、桜桃の病変部の減少が確認され(Gotor-Vilaら, 2017), 実規模の貯蔵室における試験では、レモンの腐敗の減少(Mercier & Smilanick, 2005)が確認されている。

微生物は種々の代謝経路を経ることにより、アルコール、アルデヒド、アルカン、アルケン、芳香族化合物、窒素化合物、および硫黄化合物などの様々な揮発性物質を生産する(Schmidtら, 2015)。その中でジメチルジスルフィド、ジメチルトリスルフィド、およびアセトインなどのいくつかの物質が遠隔抗菌活性の起因物質であると報告されている(Arrebolaら, 2010; Liら, 2010; Tycら, 2015)が、起因物質の特定に成功した報告は限られている。これは、ほとんどの



微生物由来の揮発性物質の濃度が低く(Elkahoui ら, 2014), 組成が複雑で, その濃度や組成は多くの要因, すなわち培養基質, 培養条件, および微生物の生理状態に影響を受ける(Tyc ら, 2015)ためである.

これまで, 生物防除に有用な強い抗菌活性を持つ微生物の分離とその性質に焦点が当てられてきた. 有用菌のスクリーニングは様々な環境試料を用いて行われており, 土壌はその主要な分離源のひとつである. しかし, 土壌中で揮発性抗菌物質を生産する細菌の種類や存在量についての報告はごく限られている. 土壌から無作為に分離した細菌のスクリーニング結果として, Mackie と Wheatley (1999) はほぼ全ての株が, Zou ら (2007) は約 3 割の株が揮発性物質により被験糸状菌の生育を抑制したと報告している. このような遠隔抗菌活性の報告はイギリスと中国の土壌を分離源としたもので, 日本の土壌での研究例は筆者が知る限りはない.

揮発性抗菌物質生産菌を生物防除剤として利用するため, 本研究では以下の 6 つを目的とした. (1) 環境試料から強い遠隔抗菌活性を持つ細菌を分離・同定する, (2) 種々の糸状菌に対する遠隔抗菌活性を検討する, (3) 異なる培地において分離株が生産する揮発性物質を同定する, (4) 起因物質を特定するために, 遠隔抗菌活性の強さとそれぞれの揮発性物質の濃度の相関関係を検討する, (5) 強い遠隔抗菌活性を持つ細菌株の微生物資材化(浴室防黴およびハウスミカン汚損低減)への応用を検討する, (6) 遠隔抗菌活性を持つ細菌の環境中での普遍性について検討する.

## 第二章 *Bacillus* 属細菌株由来の揮発性物質による糸状菌生育抑制効果

### 2-1. 緒言

植物病原性真菌は農作物の生産および貯蔵過程において損失を引き起こす主要な要因の一つである。この防除のために、収穫前後の農産物に対して化学合成された殺真菌剤が使用されてきた。しかし、ヒトの健康や環境への悪影響 (Usall ら, 2016) および耐性菌の出現 (Droby ら, 2016) への懸念などから、その利用は年々制限されてきている。

代替手段の一つとして、拮抗微生物による生物防除に注目が集まっている (Fridlender ら, 1993; Hassan ら, 2017; Larkin & Fravel, 1998)。より近年では、揮発性抗菌物質を生産する微生物への関心が高まっている。揮発性物質は、低分子量のため、常温常圧で気化しやすく、拡散しやすいという特徴を持ち、多くの微生物が揮発性抗菌物質を生産することが知られている。例えば、*Bacillus* spp. (Arrebola ら, 2010; Chaurasia ら, 2005; Liu ら, 2008), *Streptomyces* spp. (Li ら, 2010; Wang ら, 2013), その他複数の細菌 (Garbeva ら, 2014), および糸状菌 *Muscodor albus* (Strobel ら, 2001) である。また、揮発性抗菌物質生産菌は農産物の貯蔵中における生物燻蒸剤としての利用が見込まれている (Mercier & Smilanick, 2005)。

ジメチルジスルフィド、ジメチルトリスルフィド、およびアセトインなどのいくつかの物質が遠隔抗菌活性の起因物質であると報告されている (Arrebola ら, 2010; Li ら, 2010; Tyc ら, 2015) が、起因物質の特定に成功した報告は限られている。これは、ほとんどの微生物由来揮発性物質の濃度が低く (Elkahoui ら, 2014)、組成が複雑で、その濃度や組成は多くの要因、すなわち培養基質、培養条件、および微生物の生理状態に影響を受ける (Tyc ら, 2015) ためである。

揮発性抗菌物質生産菌を生物防除のための微生物資材として利用するために、本章では以下の4つを目的とした。(1) 環境試料から強い遠隔抗菌活性を持つ細菌を分離・同定する、(2) 異なる培地を用いて種々の糸状菌に対する遠隔抗菌活性を検討する、(3) 異なる培地において分離株が生産する揮発性物質を

同定する，(4) 起因物質を特定するために，遠隔抗菌活性の強さとそれぞれの揮発性物質の濃度の相関関係を検討する．

## 2-2. 材料および方法

### 供試菌株

本章の研究では，案浦 (2007) がグリストラップから分離した *Bacillus* TM-R 株を供試菌株として用いた．供試までは  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し，nutrient agar (NA, 栄研化学) 培地で  $30^{\circ}\text{C}$ ，24 時間培養したものを試験に用いた．

### *Bacillus* TM-R 株の同定

*Bacillus* TM-R 株を 16S rRNA 遺伝子配列により同定した．真正細菌に対するユニバーサルプライマー (10F および 1541R) を用いて PCR 増幅し，NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) により精製した．BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて標識し，Genetic Analyzer 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems, USA) により配列を決定した．相同性解析には DDBJ BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn>) を用いた．

### 被験糸状菌株

被験糸状菌として 6 種の糸状菌，*Alternaria alternata* NBRC31188，*Aspergillus niger* NBRC33023，*Cladosporium cladosporioides* NBRC4459，*Curvularia lunata* NBRC100182，*Fusarium oxysporum* NBRC30701，および *Penicillium italicum* NBRC32032 を用いた．これらの糸状菌は potato dextrose agar (PDA, 栄研化学) 培地で  $30^{\circ}\text{C}$ ，1~3 日の前培養の後，供試した．

### *Bacillus* TM-R 株による遠隔抗菌活性

NA 培地で培養した *Bacillus* TM-R 株を白金耳で掻き取り、0.85%滅菌生理食塩水に懸濁した。懸濁液 200  $\mu$ L を 1.8 mL の液体培地、nutrient broth (NB), trypto-soya broth (TSB), Luria-Bertani broth (LB) および TM エンタープライズ製培地 (TMEB) に接種し、30°C で 18 時間前培養した。この培養液 100  $\mu$ L をそれぞれの液体培地に寒天を 15 g/L 添加した培地（以後、それぞれ NA, TSA, LBA, および TMEA とする）に塗抹接種した。

被験糸状菌は滅菌したコルクボーラー（直径 7 mm）を用いて培地ごと発育した菌糸をくり抜き、菌糸プラグを作成し、新しい PDA 培地の中心に設置した。

シャーレ貼り合わせ試験では、*Bacillus* TM-R 株を接種したそれぞれの培地と被験糸状菌の菌糸プラグを接種した PDA 培地の蓋を外し、向かい合わせにしてサージカルテープで固定した。被験糸状菌の孢子が落下しないよう、*Bacillus* TM-R 株を接種した培地を上側になるようにし、30°C で 5 日間培養した。*Bacillus* TM-R 株を接種していないそれぞれの培地を対照区として用いた。

培養後、糸状菌の直径を測定し、菌糸生育抑制率（%）を以下の式を用いて算出した。

$$\text{菌糸生育抑制率 (\%)} = \frac{\text{対照区直径 (mm)} - \text{処理区直径 (mm)}}{\text{対照区直径 (mm)} - 7} \times 100$$

12 L 容器試験では、密閉可能なプラスチック容器（216 mm × 309 mm × 300 mm、実容積 12 L）を用いた。容器内の殺菌のため、99%エタノール 100 mL を入れて密封し、壁面に十分に行き渡らせ、エタノールを除去した後、クリーンベンチ内の紫外灯照射下で乾燥させた。この容器の内部側面に、蓋を外した被験糸状菌を接種した PDA 培地 3 枚および *Bacillus* TM-R 株を接種した 4 種類の培地のうちのいずれか 1 枚を両面粘着テープで固定した。容器を

密閉して 30°C で 5 日間培養した後、被験糸状菌の菌糸直径を測定した。*Bacillus* TM-R 株を接種していないそれぞれの培地を対照区として用い、上記の式を用いて菌糸生育抑制率を算出した。

#### *Bacillus* TM-R 株が生産する揮発性物質の捕集

*Bacillus* TM-R 株が生産する揮発性物質の捕集にはシリカモノリス捕集剤 MonoTrap® (RGC18 TD, ジーエルサイエンス) を用いた。前述の 4 種類の培地に *Bacillus* TM-R 株を接種し、空のシャーレと向かい合わせにし、サージカルテープで固定した。これを *Bacillus* TM-R 株が上となるようにして 30°C で 18 時間培養した。一度サージカルテープを外し、速やかに 2 個の MonoTrap® を空のシャーレに入れ、再度密閉した後、さらに 30°C で 24 時間保持した。捕集期間はガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) に悪影響を与える余剰水分が MonoTrap® に付着することを防ぐため 24 時間とし、誘導期および対数増殖期の初期を避けて捕集を行なった。捕集後 MonoTrap® を速やかに加熱脱着用ガラス管 (直径 7 mm × 長さ 90 mm, ジーエルサイエンス) に移した。GC-MS 分析の前に内部標準物質として 10 ng のトルエン-d8 (富士フイルム和光純薬) を MonoTrap® に添加した。

#### *Bacillus* TM-R 株が生産する揮発性物質の同定

MonoTrap® の分析には、加熱脱着装置 (TD: TurboMatrix650: Perkin Elmer) を装備した GM-MS (6890N/5973inert: Agilent Technology) を用いた。分析にはキャピラリーカラム, DB-5MS (60 m × 0.32 mm ID × 0.5 μm; Agilent J&W) を用い、スキャンモード (m/z 30-350) で分析した。GC-MS の昇温条件は、50°C (2 min) → 5°C/min → 100°C (0 min) → 10°C/min → 250°C (30 min) とした。物質の同定には Chemstation (Agilent), AromaOffice (西川計測), および AroChemBase (Alpha M.O.S.) を用いた。

## 遠隔抗菌活性起因物質の推定

遠隔抗菌活性起因物質の推定のために、菌糸生育抑制率と内部標準物質に対する各揮発性物質の濃度の相関係数を確認した。菌糸生育抑制率は揮発性物質に最も感受性の高かった *P. italicum* NBRC32032 のものを用い、揮発性物質の濃度として内部標準物質であるトルエン-d8 に対する相対存在量を算出した。

### 2-3. 結果および考察

#### *Bacillus* TM-R 株の同定

*Bacillus* TM-R 株の 16S rRNA 遺伝子解析は、*Bacillus pumilus* および *Bacillus altitudinis* に対して 100% (1,513/1,513), *B. altitudinis*<sup>T</sup> JCM13350 に対して 99.9% (1,482/1,484), *B. pumilus*<sup>T</sup> NBRC12092 に対して 99.6% (1,468/1,474) の相同性を示した。しかし、系統樹 (図 2-1) が示すように、*B. pumilus* は近縁種と 16S rRNA 遺伝子配列が極めて類似しており、その解析だけでは区別が難しい (Liu ら, 2013)。当研究室の田中 (2014) は API50CHB を用いて、TM-R 株を *B. pumilus* と同定した (同定確率 98%) (田中, 2014)。Shivaji ら (2006) は標準菌株である *B. pumilus*<sup>T</sup> NBRC12092 および *B. altitudinis*<sup>T</sup> JCM13350 の資化性パターンを報告している。*Bacillus* TM-R 株は *B. altitudinis*<sup>T</sup> JCM13350 よりも *B. pumilus*<sup>T</sup> NBRC12092 との共通点が多いため (表 2-1), TM-R 株は *B. pumilus* と同定するのが妥当と考えられる。*B. pumilus* のいくつかの株は水溶性物質および揮発性物質による抗真菌作用が報告されている (LIU ら, 2008; Munimbazi & Bullerman, 1998) ほか、食中毒の原因菌として報告されているものもある (From ら, 2007)。*Bacillus* TM-R 株は、*Bacillus* 属細菌の病原因子である溶血毒素 (hemolysin) および DNA 分解酵素を有していないことが確認されている (田中, 2014)。

#### *B. pumilus* TM-R 株による遠隔抗菌活性

4種類の培地上で *B. pumilus* TM-R 株が生産する揮発性物質が6種類の被験糸状菌に与える影響をシャーレ貼り合わせおよび12 L 容器において検討した。揮発性物質による影響の例としてシャーレ貼り合わせ試験における結果を図2-2に示す。*A. alternata* NBRC31188 に対しては生育抑制効果を示す一方、*A. niger* NBRC33023 に対しては生育促進効果を示した。

シャーレ貼り合わせ試験(図2-3A)において、*B. pumilus* TM-R 株は *P. italicum* NBRC32032 に対して最も強い抑制作用を示した(95~100%)、*C. cladosporioides* NBRC4459 および *A. alternata* NBRC31188 に対しても強い抑制作用を示し(82~100%および81~97%)、*C. lunata* NBRC100182 および *F. oxysporum* NBRC30701 に対しては中程度の抑制だった(46~86%および36~71%)。一方、*A. niger* NBRC33023 の生育は抑制されるどころか促進された(-72~-9%)。培地別に見ると、*A. niger* NBRC33023 を除き、TMEA 培地が *B. pumilus* TM-R による抑制効果を最も引き出した(71~100%)。*A. niger* NBRC33023 に対する生育促進効果は NA, TSA, および LBA 培地で培養した時に強く(-60~-72%)、TMEA 培地で培養した時だけ弱かった(-9%)。

12 L 容器における生育抑制効果(図2-3B)はシャーレ貼り合わせ試験よりも低下したが、TMEA 培地で培養した時に最も強い抑制効果を示した(*A. niger* NBRC33023 を除く)。TMEA 上の *B. pumilus* TM-R は *P. italicum* NBRC32032 および *A. alternata* NBRC31188 を強く抑制し(93%および77%)、*C. cladosporioides* NBRC4459, *C. lunata* NBRC100182, および *F. oxysporum* NBRC30701 に対して中程度の抑制効果を示した(17~39%)。容器の増大に伴い、揮発性物質の濃度が低下したと考えられるが、*A. niger* NBRC33023 に対する生育促進効果(-36%)はシャーレ貼り合わせ試験の結果(-9%)よりも増加した。12 L 容器における抑制効果減少の程度は培地によって異なっており、NA および TMEA 培地は約100%から80%への緩やかな減少だったが、TSA および LBA 培地は40%程度まで顕著に減少した。

TM-R 株と同じ *B. pumilus* の中には揮発性物質の生産によって多くの糸状菌 (*Ascochyta citrullina*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria solani*, *B. cinerea*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium gramineum*, *F. oxysporum*, *Phoma arachidicola*, *R. solani*, *S. sclerotiorum*, および *Verticillium dahliae*) の生育を抑制する株があることが報告されている (Liu ら, 2008). しかし, *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *C. lunata*, および *P. italicum* に対する遠隔抗菌活性は筆者が知る限りない. また, 細菌由来の揮発性物質による糸状菌の生育促進効果として, *Burkholderia cepacia* および *Staphylococcus epidermidis* が *R. solani* の生育を促進することが報告されている (Vespermann ら, 2007) が, *B. pumilus* による *A. niger* の生育促進効果についてもまだ報告はなされていない.

#### *Bacillus* TM-R 株が生産する揮発性物質の同定

異なる 4 種類の培地上で *B. pumilus* TM-R が生産する物質を GC-MS で検出し, 対照区に存在しないピークをデータベース (NIST library, AromaOffice, および AroChemBase) を用いて同定した. 検出した 32 物質のうち, 22 物質を同定した (表 2-2). 培地ごとの検出した物質と同定した物質は以下の通りである; NA 培地では 24 物質中 17 物質, TSA 培地では 17 物質中 15 物質, LBA 培地では 12 物質中 12 物質, そして TMEA 培地では 18 物質中 17 物質. 検出された物質は培地によって大きく異なっており, 4 種類の培地で共通して検出されたのは 9 つの物質だけだった (methyl isobutyl ketone, ethyl 2-methylpropanoate, 3-methyl-butanoic acid, methyl pentanoate, ethyl 2-methylbutanoate, 5-methyl-2-hexanone, 2-heptanone, 6-methyl-2-heptanone, および 5-methyl-2-heptanone). また, 3 つの物質 (3-methylbutanol, unidentified peak 4, および octadecane) が, 最も強い抑制効果を示した TMEA 培地からのみ検出された.



## 遠隔抗菌活性起因物質の推定

遠隔抗菌活性起因物質を推定するために、12 L 容器試験における *P. italicum* NBRC32032 の菌糸生育抑制率とそれぞれの物質の内部標準物質に対する相対濃度の相関を算出した（表 2-3）。*P. italicum* NBRC32032 を選んだのは、最も揮発性物質に対する感受性が高かったからである。8 物質（methyl isobutyl ketone, ethanol, 5-methyl-2-heptanone, S-(-)-2-methylbutylamine, ethyl 2-methylpropanoate, 6-methyl-2-heptanone, ethyl phenylacetate, および 3-methyl-1-butanamine）の濃度は生育抑制率と高い相関関係を示した（ $R^2 > 0.7$ ）。このうち、methyl isobutyl ketone, ethanol, 5-methyl-2-heptanone, および S-(-)-2-methylbutylamine はもっとも高い相関（ $R^2 = 0.97 \sim 0.99$ ）を示した（図 2-4）。

細菌が生産する揮発性物質の組成は培地によって異なること（Garbeva ら, 2014）や、遠隔抗菌活性の強さが培地の種類によって変化すること（Arrebola ら, 2010; Fiddaman & Rossall, 1994; Gotor-Vila ら, 2017）は既に報告されている。しかし、この二つの事柄を関連づけて検討している報告は筆者が知る限りない。本研究では、*B. pumilus* TM-R 株が生産する揮発性物質の組成が培地によって変化し、結果として遠隔抗菌活性の強さが変化することを実証した。また、揮発性物質の相対濃度と遠隔抗菌活性の強さから、4 種類の揮発性物質が主要な起因物質であると推定した。筆者が知る限り、このような手法で起因物質を推定した報告はない。

本研究では一般的なシャーレ貼り合わせ試験だけでなく、12 L 容器でも試験を行なった。その結果、培地による生育抑制効果の差が明確となり、上記の起因物質推定に繋がった。

*B. pumilus* TM-R が生産した揮発性物質はほとんどの被験系状菌の生育を抑制したが、*A. niger* NBRC33023 に対しては抑制効果が確認されなかった。Vespermann ら（2007）は *A. niger* が揮発性物質に対して抵抗的であることを報告しており、本研究もこれと一部合致する。また、本研究では *A. niger*

NBRC33023 は抑制されないどころか、生育が促進された。これは揮発性物質の中に糸状菌の生育を抑制するものと促進するものが含まれていることを示している。シャーレ貼り合わせ試験において、TMEA 培地で培養した *B. pumilus* TM-R 株は、*A. niger* NBRC33023 に対して非常に弱い生育促進効果（生育抑制効果として-9%）を示した一方で、12 L 容器試験ではその効果が増大した（同-40%）。試験に用いた 12 L 容器はシャーレ貼り合わせ試験の容積（約 90 mL）の 130 倍程度であり、揮発性物質もそれに応じて希釈されると考えられる。*B. pumilus* TM-R が生産する揮発性物質には糸状菌の生育を抑制するものと促進するもののどちらも含まれており、気相の増加に伴って、抑制効果を持つ物質がその閾値を下回ったものの、促進効果を持つ物質は閾値を上回っていたのだろう。生育促進効果が試験容積の増大とともに増強されるという結果は TMEA 培地でのみ観察された。これは *B. pumilus* TM-R が生産する揮発性物質の組成が培地で異なっていたためだろう。

本研究で *B. pumilus* TM-R が生産した 32 の物質のうち、これまでに抗菌活性が確認されているのは 3-methylbutanol および dimethyl disulfide の 2 つだけである (Li ら, 2010; Toffano ら, 2017)。これらの物質は、本研究では生育抑制率との相関が確認されず、遠隔抗菌活性の起因物質とは認められなかった。代わりに、4 つの揮発性物質（methyl isobutyl ketone, ethanol, 5-methyl-2-heptanone, および S-(-)-2-methylbutylamine）が遠隔抗菌活性の主要な起因物質として推定された。これらのうち、エタノール以外は揮発性抗菌物質としての報告はない。これらの揮発性物質による生育抑制効果を確認するために、純粋標品を用いたさらなる試験が必要だろう。

本研究で同定された 24 物質のうち、methyl pentanoate, ethyl phenylacetate, および 5H-1-pyridine はこれまで細菌由来の揮発性物質としての報告がない。

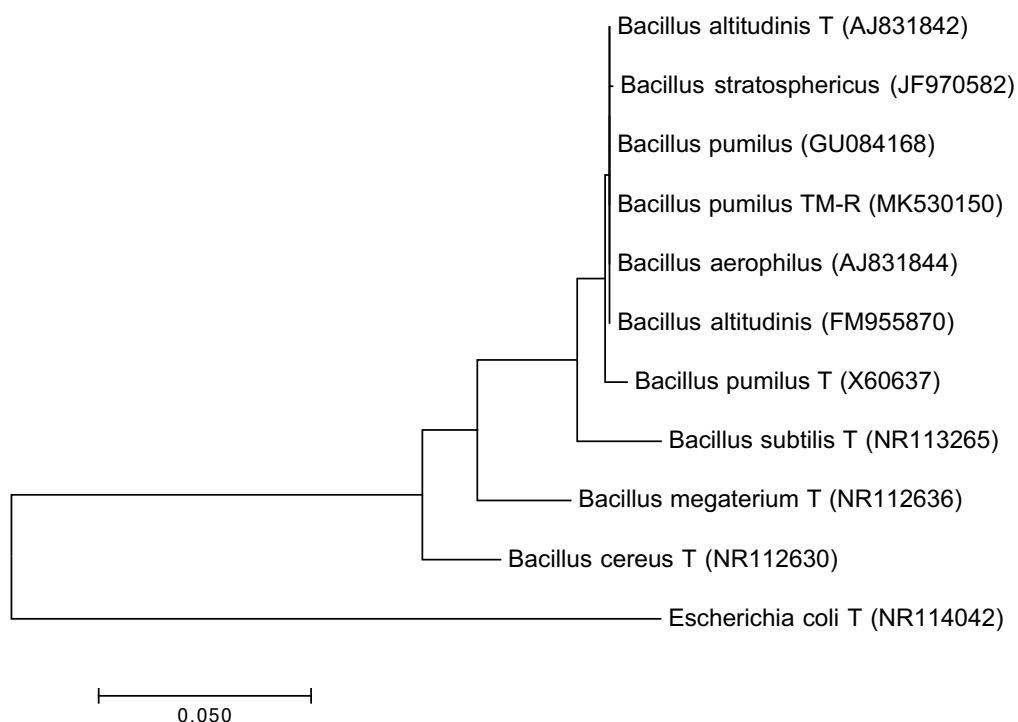


図 2-1. *Bacillus* TM-R および近縁種の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統樹（最尤法）

表 2-1. *Bacillus* TM-R, *Bacillus pumilus*<sup>T</sup> および *Bacillus altitudinis*<sup>T</sup> の資化性の比較

Substrate	<i>Bacillus</i> TM-R <sup>1)</sup>	<i>B. pumilus</i> <sup>T</sup> NBRC12092 <sup>2)</sup>	<i>B. altitudinis</i> <sup>T</sup> JCM13350 <sup>2)</sup>
Glycerol	-	-	+
D-Arabinose	-	-	+
L-Sorbose	-	-	+
Inositol	-	-	+
D-Sorbitol	-	-	+
N-Acetylglucosamine	+	-	+
D-Cellobiose	+	-	+
Inulin	-	-	+
D-Raffinose	-	+	-

1) 田中（2014）より引用

2) Shivaji ら（2006）より引用

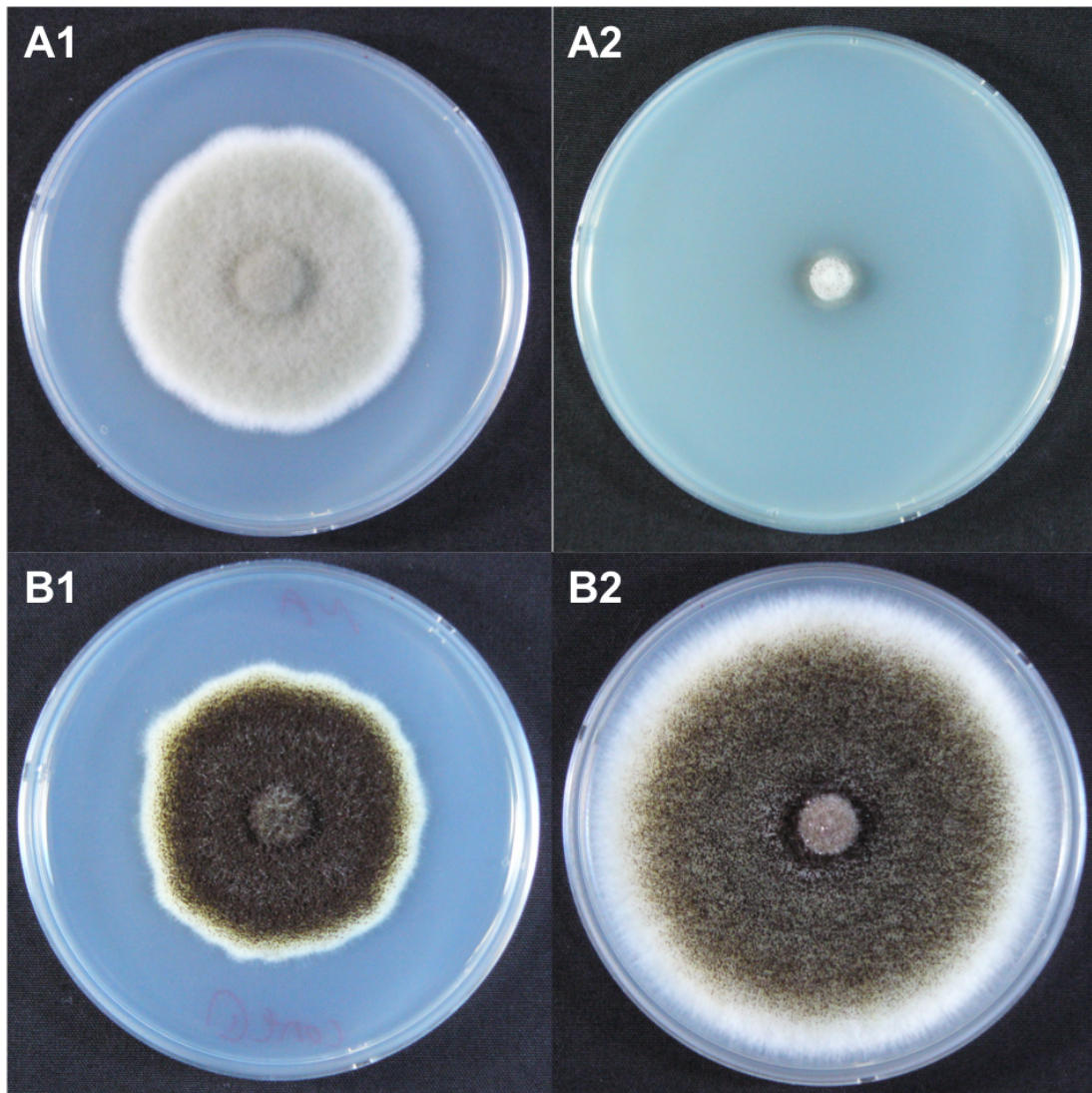


図 2-2. *Bacillus pumilus* TM-R 由来揮発性物質がシャーレ貼り合わせ試験において被験系状菌に与える影響. 被験系状菌 *Alternaria alternata* および *Aspergillus niger* を *B. pumilus* TM-R 無接種区 (それぞれ A1 および B1) および接種区 (それぞれ A2 および B2) で培養. *B. pumilus* TM-R は nutrient agar 培地で培養.

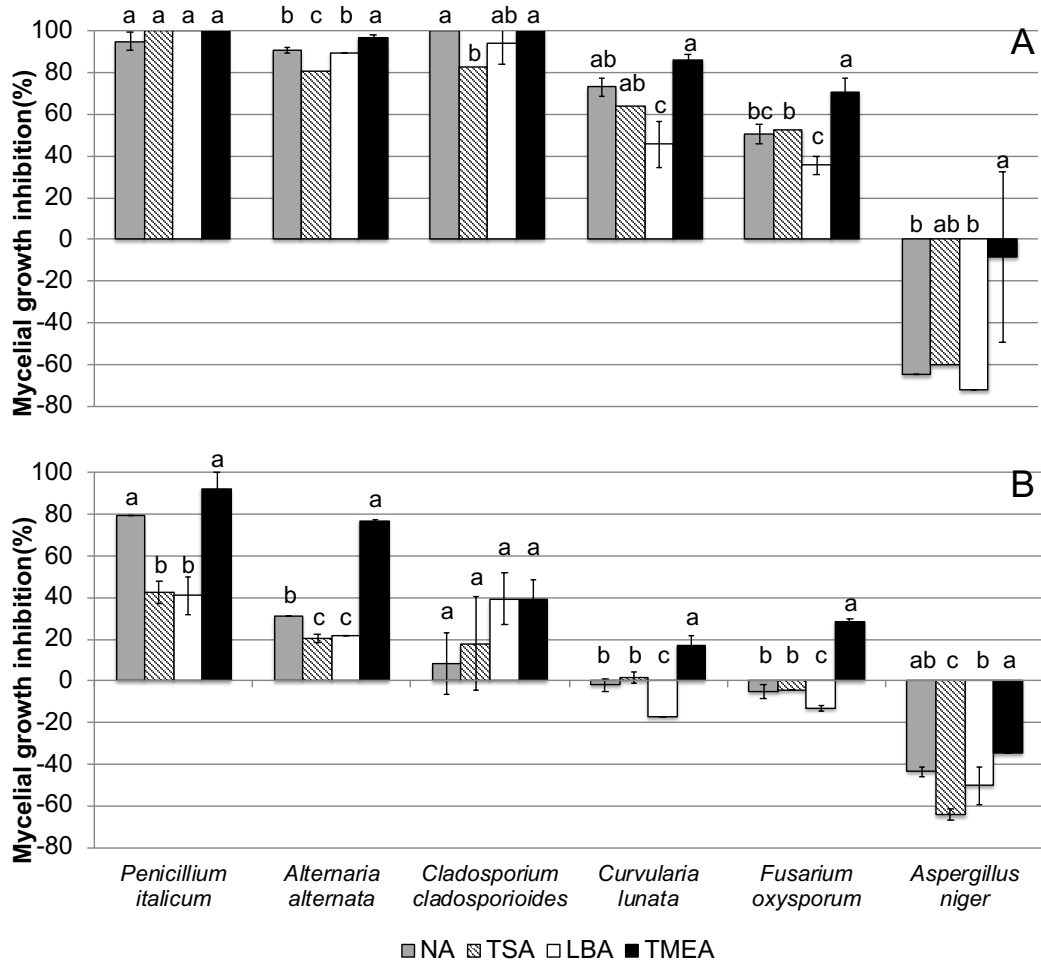


図 2-3. *Bacillus pumilus* TM-R 由来揮発性物質がシャーレ貼り合わせ試験 (A) および 12 L 容器試験 (B) において被験糸状菌菌糸成長に与える影響. データは 3 連の平均. 異なるアルファベットは各培地の平均値において有意差があることを示す ( $P < 0.05$ , Tukey's HSD test).

表 2-2. 異なる培地で培養した *Bacillus pumilus* TM-R が生産する揮発性物質の同定

Peak	Retention Index	Compound	Identification*	Detection in Medium			
				NA	TSA	LBA	TMEA
1	458	Ethanol	annotated	+			+
2	671	2-Pentanone	identified		+	+	+
3	681	3-Methyl-1-butanamine	annotated	+	+		+
4	701	S-(-)-2-methylbutylamine	annotated	+			+
5	709	unidentified peak 1	unidentified		+		
6	709	unidentified peak 2	unidentified	+			
7	718	unidentified peak 3	unidentified	+			
8	724	3-Methylbutanol	annotated				+
9	729	unidentified peak 4	unidentified				+
10	734	Methyl isobutyl ketone	identified	+	+	+	+
11	750	Ethyl 2-methylpropanoate	identified	+	+	+	+
12	755	Dimethyl disulfide	identified			+	
13	803	unidentified peak 5	unidentified	+			
14	814	3-Methyl-butanoic acid	annotated	+	+	+	+
15	825	Methyl pentanoate	identified	+	+	+	+
16	835	unidentified peak 6	unidentified	+			
17	849	Ethyl 2-methylbutanoate	identified	+	+	+	+
18	851	Ethyl 3-methylbutanoate	annotated		+	+	+
19	852	unidentified peak 7	unidentified	+			
20	860	5-Methyl-2-hexanone	annotated	+	+	+	+
21	892	2-Heptanone	identified	+	+	+	+
22	925	2,5-Dimethylpyrazine	identified	+			
	925	2,6-Dimethylpyrazine	identified	+			
23	958	6-Methyl-2-heptanone	annotated	+	+	+	+
24	969	5-Methyl-2-heptanone	annotated	+	+	+	+
25	981	1-Octen-3-ol	identified		+		
26	1160	2-Decanone	identified	+	+		
27	1167	unidentified peak 8	unidentified	+	+		
28	1262	Ethyl phenylacetate	identified	+	+		+
29	1345	Indole	annotated	+			
	1345	5H-1-Pyridine	annotated	+			
30	1367	unidentified peak 9	unidentified	+			
31	1373	unidentified peak 10	unidentified	+			
32	1799	Octadecane	identified				+

\* identified ; AromaOffice および/または Arochem Search において保持指標が一致し, NIST library においても高いヒット率 (70%以上) が得られた物質. annotated ; 上記のうち, いずれか一つに該当した物質. unidentified ; 上記のいずれにも該当しなかった物質.

表 2-3. 揮発性物質の相対濃度と *Penicillium italicum* に対する生育抑制率の相関関係

Peak No.	Compound	R <sup>2</sup>	Slope	y-intercept
10	Methyl isobutyl ketone	0.99	190	15
1	Ethanol	0.98	11	43
24	5-Methyl-2-heptanone	0.97	160	11
4	S-(-)-2-methylbutylamine	0.97	230	42
11	Ethyl 2-methylpropanoate	0.88	79	19
23	6-Methyl-2-heptanone	0.86	64	6.3
28	Ethyl phenylacetate	0.85	110	34
3	3-Methyl-1-butanamine	0.72	100	36
17	Ethyl 2-methylbutanoate	0.59	200	30
7	unidentified peak 3	0.54	180	54
9	unidentified peak 4	0.54	240	54
32	Octadecane	0.54	22	54
21	2-Heptanone	0.49	34	49
20	5-Methyl-2-hexanone	0.46	200	27
12	Dimethyl disulfide	0.34	-190	71
5	unidentified peak 1	0.30	-280	71
25	1-Octen-3-ol	0.30	-120	71
2	2-Pentanone	0.25	53	52
14	3-Methyl-butanoic acid	0.21	-83	85
6	unidentified peak 2	0.16	120	59
8	3-Methylbutanol	0.16	120	59
13	unidentified peak 5	0.16	140	59
16	unidentified peak 6	0.16	100	59
19	unidentified peak 7	0.16	190	59
22	2,5-Dimethylpyrazine	0.16	6.9	59
	2,6-Dimethylpyrazine			
29	Indole	0.16	91	59
	5H-1-Pyridine			
30	unidentified peak 9	0.16	110	59
31	unidentified peak 10	0.16	140	59
18	Ethyl 3-methylbutanoate	0.08	79	55
15	Methyl pentanoate	0.00	-28	68
27	unidentified peak 8	0.00	14	62
26	2-Decanone	0.00	13	63

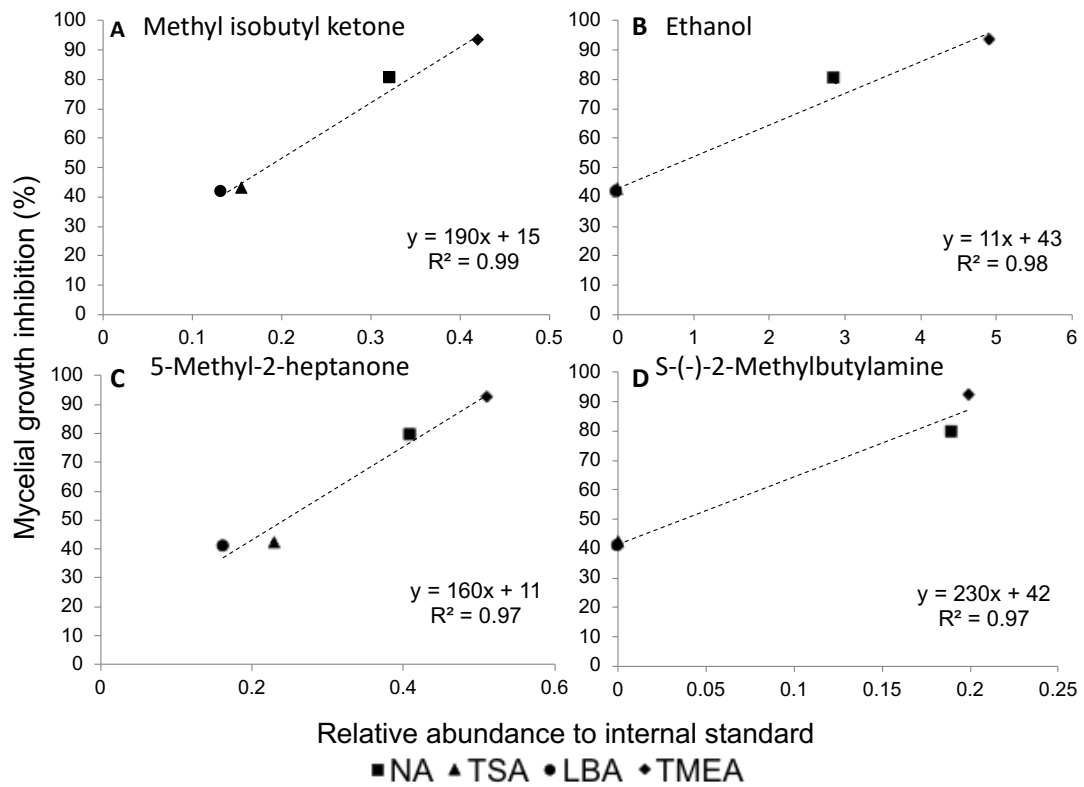


図 2-4. 主要な揮発性物質の相対濃度と *Penicillium italicicum* に対する生育抑制率の相関関係



### 第三章 *Bacillus* 属細菌株含有微生物資材による浴室防黴の現場実証試験

#### 3-1. 緒言

第二章の通り，グリストラップから分離された細菌 *B. pumilus* TM-R は揮発性抗菌物質を生産することにより，広範囲の種類糸状菌に対して発育抑制作用を示した．そこで，(有)T.M エンタープライズ(長崎市梁川町 2 番 35)との共同研究のもと，本菌を粘土鉱物(パイライト)に含有させて安定化させることにより，浴室でカビの発育を抑制する微生物資材として商品化されている(「バイオお風呂のカビきれい」)．浴室に発生する主要なカビは *Cladosporium* 属菌であり(Moriyama ら, 1992)，*B. pumilus* TM-R がこれを強く抑制することが商品化の基礎原理である．しかし，実際の浴室におけるカビの発育抑制の程度や期間の実証試験は行われていない．

そこで本章では，モニター家庭の浴室に本製品を設置し，浴室壁面上の糸状菌数を継時的に測定することで，本製品の現場有効性を検証した．

#### 3-2. 材料および方法

試験家庭として同一のマンション内の 6 世帯に協力を依頼し，これを 3 世帯ずつグループ A およびグループ B の二つに分けた．各グループの浴室床面積は約 1.8~2.7 m<sup>2</sup> で，グループ間に差がないよう設定した．各世帯の浴室の天井と壁面を綺麗に清掃したのち，グループ A の浴室天井には製品各 1 個を設置し(図 3-1)，グループ B は無設置とした．12 月~翌年 9 月の 9 ヶ月間，通常通り浴室を使用してもらい，その後，各世帯の浴室の天井と壁面を再度清掃した後，グループ A の浴室から製品を取り除き，グループ B に新たに製品各 1 個を設置し，9 月~翌年 6 月の 9 ヶ月間試験した．これにより，季節的影響による結果の偏りを消去するよう努めた．

試料採取地点として，天井面に 30 cm 四方の枠を設定した．0.01% Sodium dodecyl sulfate (SDS, 富士フィルム和光純薬) 添加滅菌生理食塩水を少量浸した滅菌脱脂綿(4 cm×4 cm)を滅菌ピンセットでつまみ，試験天井面を 2,

3回繰り返し拭き取った(図 3-2)。この脱脂綿を 0.01% SDS 添加滅菌生理食塩水 10 mL の入った遠心管(15 mL 容)に入れ、分析機関へ冷蔵輸送した。

分析時に遠心管を 1 分間ボルテックスにより振とうし、その上清を PDA 培地に接種して 30°C で 5 日間培養し、コロニー数から壁面の単位面積当たりの糸状菌数を算定した。

### 3-3. 結果および考察

試験開始時、両グループの糸状菌数は検出限界(0.01 cfu/cm<sup>2</sup>)以下~0.7 cfu/cm<sup>2</sup>であった(図 3-3, 3-4)。9ヶ月後、グループ B(無設置区)の天井面の糸状菌数は 300 cfu/cm<sup>2</sup>~460 cfu/cm<sup>2</sup>だったのに対し、グループ A(設置区)では検出限界以下~60 cfu/cm<sup>2</sup>であり、無設置区と比べて著しく低かった。

再清掃後の糸状菌数は検出限界以下~0.02 cfu/cm<sup>2</sup>で、清掃により糸状菌が十分除去されたと認められた。設置区と無設置区を入れ替えて 9ヶ月後、グループ A(無設置区)の糸状菌数は 130 cfu/cm<sup>2</sup>~1200 cfu/cm<sup>2</sup>だったのに対し、グループ B(設置区)の糸状菌数は検出限界以下~130 cfu/cm<sup>2</sup>であり、無設置区と比べて明らかに低かった。

これらのことから、製品の設置は浴室天井面の糸状菌数を大きく低減させることが明らかとなった。設置区と無設置区を入れ替えても同様の結果が得られたことは、これが各家庭の浴室使用状況の違いによるものではないことを示している。また、製品は 9ヶ月以上有効である可能性が示唆された。

このように現場試験により、遠隔抗菌活性を利用した浴室カビ防止製剤の効果が検証された。このような製品は、世界的にも他に類を見ない。



図 3-1. 天井に設置した製品



図 3-2. 試験区画からの採取

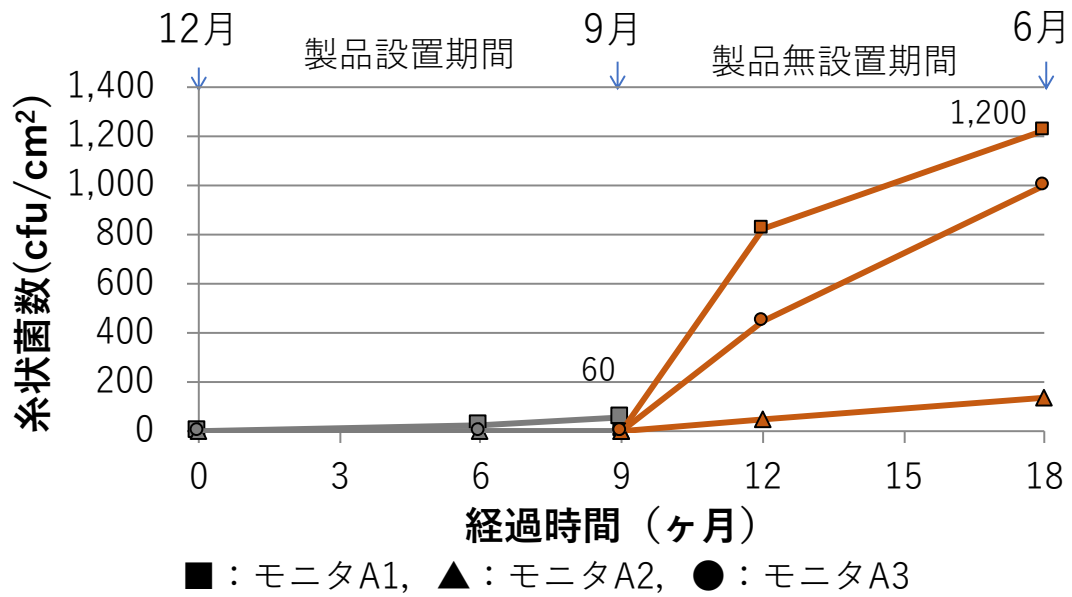


図 3-3. グループ A における糸状菌数の変動

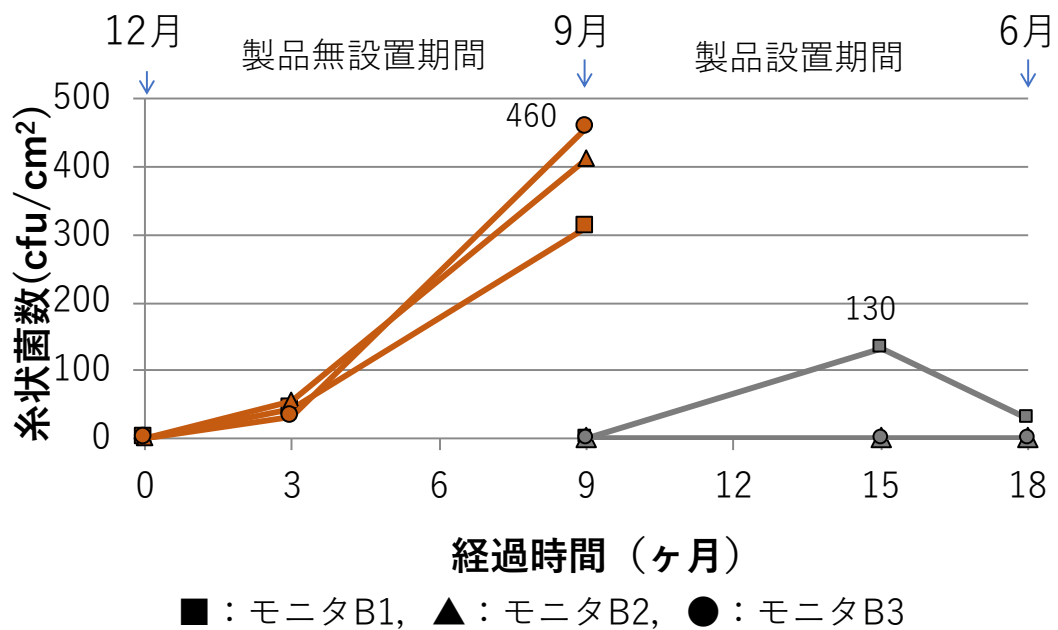


図 3-4. グループ B における糸状菌数の変動

## 第四章 揮発性抗菌物質生産 *Bacillus* 属細菌株を利用したハウスミカン汚損低減

### 4-1. 緒言

温州ミカンはかつては日本の家庭で最も消費量の多い果実であったが、消費者の嗜好の変化などにより消費が減少し、一人当たりの購入数量は2013年以降はバナナ、リンゴに次いで第3位となっている(農林水産省, 2019a)。それでも、2018年度で国内栽培面積は39,600 ha、収穫量は773,700 t、出荷額は約1,400億円で(e-Stat, 2019; 農林水産省, 2019b)、依然我が国で生産される主要な果実としての地位を占めている。

なかでもハウスミカンは糖度が高く、露地ミカンが市場にない4月から9月に出荷されるため、高級ミカンとして贈答用を中心に高値で流通している。その栽培面積(2018年産)は全国で403 ha、収穫量は20,100 tで(e-Stat, 2019)、出荷額は約200億円である。このうち約3分の1を佐賀県が占めており、次いで愛知、大分、愛媛などが続く(e-Stat, 2019)。

ハウスミカンが高価格で取引されるためには、優れた品質と外観が求められる。しかし、糖度の高いハウスミカンでは、収穫後の保蔵および流通・販売時に、主に *Cladosporium* 属糸状菌による果皮の汚損(すす斑病)の発生が問題となっている(Tashiro ら, 2013)。特に外観が重視されるハウスミカンでは、本菌により果皮が少しでも汚損されただけで価格の大幅な低下につながる。加えて、*Aspergillus* 属糸状菌および *Penicillium* 属糸状菌によるポストハーベスト病害も問題になっている(Tashiro ら, 2012; 田代, 1996; 田代ら, 2003)。

現在、植物病害の防除には主に化学合成殺菌剤が使用されている。ハウスミカンにおいても、すす斑病や各種ポストハーベスト病害に対して数種類の薬剤が普及している(田代ら, 2016; 田代 & 井手, 2007)。しかし、耐性菌の出現や、作業従事者の薬液被曝による健康被害、および環境への悪影響の懸念などから、化学合成殺菌剤に頼らない防除技術の開発が求められている。

代替技術の一つとして、細菌や糸状菌を用いた生物防除の研究が進められている(Sharma ら, 2009). 特に近年では、直接的な接触の必要がない揮発性物質の利用が注目され、貯蔵中のカンキツ類や果菜類の糸状菌による汚損を防ぐための有用な技術として期待されている(Elkahoui ら, 2014; Mercier & Smilanick, 2005).

第二章の通り、*B. pumilus* TM-R は各種の糸状菌に対して増殖抑制効果を持つ揮発性物質を生産する. シャーレ貼り合わせ法および 12 L 規模の密閉容器を用いた試験により、本菌は、*Penicillium* sp., *Alternaria* sp., および *Cladosporium* sp.などの糸状菌に対して強い増殖抑制効果を示し、その主要な揮発性抗菌物質として、methyl isobutyl ketone, ethanol, 5-methyl-2-heptanone, および S-(-)-2-methylbutylamine を同定した(Morita ら, 2019).

そこで本研究では、ハウスミカンの主要な汚損菌である *Cladosporium* 属糸状菌に対して有効な揮発性抗菌物質を *B. pumilus* TM-R が生産することに着目し、果皮表面に *Cladosporium* 属糸状菌の胞子を塗布したハウスミカン果実と本菌の培養物を密閉容器内に入れてインキュベートし、汚損が低減されるか検証した. 加えて、本菌による増殖抑制効果のメカニズム解明のために、胞子の発芽・伸長に対する本菌の影響を観察した.

#### 4-2. 材料および方法

##### 供試菌株

*B. pumilus* TM-R 株を供試菌株として用いた. 供試までは $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、NA 培地で  $30^{\circ}\text{C}$ , 24 時間培養したものを試験に用いた.

##### 被験糸状菌株

被験糸状菌株として、*C. cladosporioides* SK-1 を用いた. これは佐賀県上場営農センターにおいて、腐敗した柑橘類から分離された株である. 被験糸状菌株は PDA 培地で  $30^{\circ}\text{C}$ , 5 日間の前培養の後、試験に供試した.

ミカン上における糸状菌生育抑制効果

*B. pumilus* TM-R を NB 培地に接種し、30°Cで18時間静置培養した。その100  $\mu$ L を NA 培地に塗抹接種した。

前培養した被験糸状菌の培地に0.01% SDS 添加滅菌生理食塩水をそれぞれ約10 mL 載せ、コンラージ棒で胞子を掻き取り、ボルテックス処理して胞子懸濁液を得た。これを3倍希釈 PDA 培地に添加し、被験糸状菌胞子懸濁液(0.5%寒天含有：約800 spores/mL)を作成した。これを果実上部表面にミカン1個当たり10箇所直径約3 mm となるように10  $\mu$ L をスポット接種した。

*B. pumilus* TM-R を接種した NA 培地1枚と、接種果実2個を1.9 L 容のプラスチック製密閉容器に入れて密封し、30°Cで7日間静置した(図4-1)。対照区として *B. pumilus* TM-R を接種していない NA 培地1枚を入れ、同様の操作を行った。汚損程度を接種した箇所ごとに0(汚損未発生)から3(汚損度大)までの整数の点数をつけ(図4-2)、容器当たり20箇所の汚損指標を求め、それらの平均値を算出した。試験は3反復で実施した。

*B. pumilus* TM-R による糸状菌分生子発芽抑制試験

*B. pumilus* TM-R を NB 培地に接種し、30°Cで18時間静置培養した。その100  $\mu$ L を NA 培地に塗抹接種し、30°Cで18時間培養した。この培養を直径13 mm および直径22 mm のコルクボーラーでそれぞれ切り抜いて培地ディスクを得た。これらを培養面を上にしてシャーレの蓋の中心にそれぞれ設置したものを、シャーレの面積比2%および6%として試験に用いた。

*C. cladosporioides* SK-1 を PDA 培地にて25°Cで7日間前培養し、その培養表面にペーパーディスク(直径6 mm, 厚さ0.8 mm)を押し当て分生子を付着させた。このペーパーディスクの分生子が付着した面を上にして空のシャーレ内に3枚置き、上記 *B. pumilus* TM-R 株の培地ディスクを設置したシ

ヤーレの蓋を向かい合わせにしてパラフィルムで固定した。 *B. pumilus* TM-R 株を接種した側が上となるように静置し、25°Cで24時間または48時間インキュベーションし、揮発性抗菌物質を曝露させた（図4-3）。その後、ペーパーディスクを新しいPDA培地表面に押し付け、分生子を付着させた。このPDA培地を25°Cで24時間培養後、光学顕微鏡を用いて分生子の発芽の有無を観察した（1処理区あたり1,000個）。

#### 4-3. 結果および考察

ハウスミカン果実に *C. cladosporioides* SK-1 をスポット接種し、30°Cでインキュベーションした。対照区では糸状菌のスポット箇所に菌糸と胞子の発育が顕著で、すす斑病の病徴が明確に発現したが、*B. pumilus* TM-R 接種区では7日後においても病徴は少なく、菌糸生育抑制効果が明瞭に認められた（図4-4）。インキュベーション4日後では対照区の汚損指標は1.6となり、TM-R接種区では半分以下の値で有意に低く（ $p < 0.01$ ）、さらに7日後には対照区では2.5となり、TM-R接種区ではその約半分の値であった（表4-1）。

以上の結果から、*B. pumilus* TM-R がハウスミカンの汚損を低減する効果が小容積規模ではあるが検証できた。農産物の腐敗防止に対して揮発性抗菌物質を産生する微生物を利用する試みは、*Bacillus amyloliquefaciens* を用いた7L規模の試験でオウトウ(Gotor-Vilaら, 2017)に関して、また数m<sup>3</sup>規模の貯蔵庫で糸状菌 *Muscodor albus* を用いてレモン(Mercier & Smilanick, 2005)に関して検討されている。一方現場規模の病害防除法として、パセリうどんこ病菌 *Oidium* sp.の空気伝播による発病の抑制がハウス内で試験され効果を上げている(Koitabashi, 2005; Koitabashi & Tsushima, 2007)。また、*Cladosporium* 属糸状菌の発育を抑制する揮発性抗菌物質を産生する微生物に関しては、Chaurasiaら(2005)の報告があるが、農産物等への応用へは言及がない。本研究結果から、ミカン果実の保管・流通時における糸状菌による汚損低減の可能性が初めて示された。



### *B. pumilus* TM-R による糸状菌分生子発芽抑制

*C. cladosporioides* SK-1 の分生子に *B. pumilus* TM-R を対峙培養し、揮発性抗菌物質に 24 時間または 48 時間曝露させた後に、分生子の発芽・伸長を観察した。この時、*B. pumilus* TM-R の接種培地の面積比を 2% と 6% の 2 通りにして、その効果を比較検討した。その結果、24 時間の曝露では面積比の違いに関わらず分生子の発芽抑制効果は認められなかったが、48 時間の曝露では分生子の発芽・伸長が著しく強く抑制され（図 4-5）、面積比 2% で分生子発芽率は 2%、同 6% で 1% であった（図 4-6）。特に、面積比が 2% と小さくても分生子の発芽が約 98% も抑制されたことは、抑制効果が極めて強いことを示すものである。

上記の結果は、*C. cladosporioides* SK-1 の分生子の発芽抑制には、曝露 24 時間ではまったく不十分であるが 48 時間では十分であることを示している。これは、*B. pumilus* TM-R による揮発性抗菌物質の生産速度や分生子への作用時間が一定程度必要であるためと考えられる。また、*B. pumilus* TM-R の面積比が小さくても効果が高かったことは、本菌が被験糸状菌に対して強い抑制能を有していることを支持している。

細菌由来の揮発性抗菌物質に晒された糸状菌では菌糸および分生子に形態異常が起きることが種々報告されている (Arrebola ら, 2010; Chaurasia ら, 2005; El-Hasan ら, 2018; Elkahoui ら, 2014; Garbeva ら, 2014; Li ら, 2010; Liu ら, 2008)。 *B. pumilus* TM-R の場合もこれらの報告と同様であり、分生子の発芽・伸長の抑制によって、発育抑制効果が発揮されていると考えられる。

水野と谷口 (1971) は温州ミカンの貯蔵温度と貯蔵中における腐敗果発生率の関係を検討し、2°C~20°C の範囲では低温であるほど腐敗果が発生しにくいと報告している。また、JA 倉敷かさや (2016) および JA 静岡経済連柑橘委員会 (2016) はミカンの貯蔵を低温 (5°C および 8°C) で行なっていると

紹介している。そのため、少なくとも長期貯蔵する場合、実際の貯蔵温度は本試験（30℃）よりも大幅に低いものと推察される。低温であればミカン上における糸状菌の活性も低下し、抑制効果がより顕著に現れる可能性がある。しかし同時に、細菌株が生産する揮発性物質の量や組成も変化する可能性があるため、より詳細な試験が必要である。

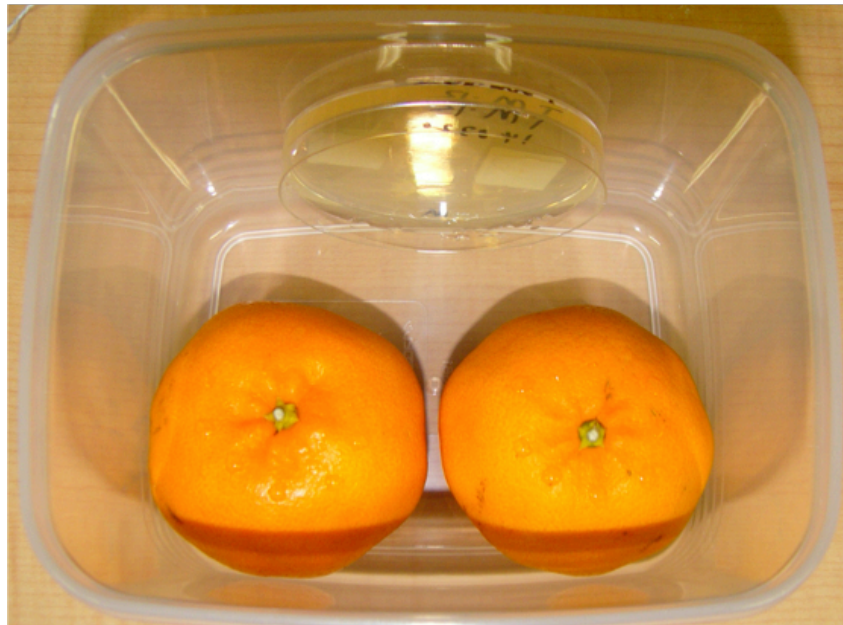


図 4-1. インキュベーションの様子

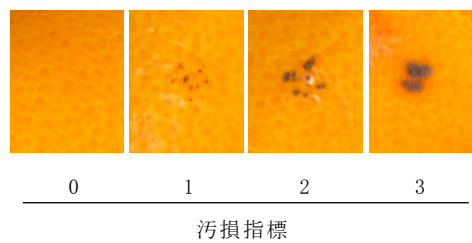


図 4-2. ミカン汚損指標による汚損程度の評価

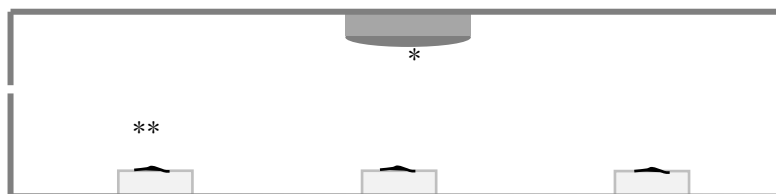


図 4-3. *B. pumilus* TM-R による *C. cladosporioides* の分生子発芽抑制試験法

\* *B. pumilus* TM-R を培養した培地

\*\* *C. cladosporioides* 分生子を付着させたペーパーディスク



図 4-4. *Cladosporium cladosporioides* によるミカン汚損の *Bacillus pumilus* TM-R による防止効果  
30°C, 7 日後. 上: 無処理区, 下: 処理区

表 4-1. *B. pumilus* TM-R によるミカン汚損の低減効果\*

	4 日後	7 日後
対照区	1.57a±0.08	2.48a±0.09
TM-R 区	0.58b±0.12	1.37b±0.09

\* 数値は一箇所あたりの汚損指標（3 反復試験の平均値±標準誤差）  
同一試験日で異なるアルファベットが付いている平均値は有意に異なることを示す（ $p < 0.01$ , Tukey の HSD 検定）

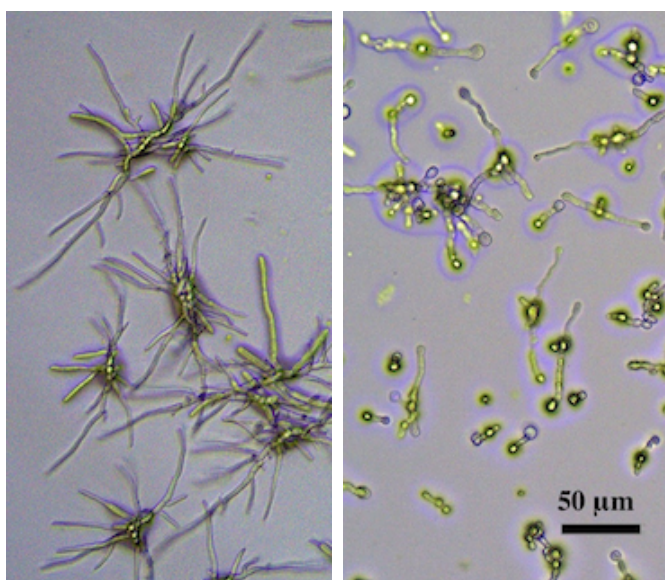


図 4-5. *C. cladosporioides* の分生子の発芽伸長に及ぼす *B. pumilus* TM-R の効果  
*B. pumilus* TM-R 株の揮発性抗菌物質に被験糸状菌胞子を曝露させた後、PDA 培地に移して 25°C で 24 時間培養した。左：無処理胞子，右：48 時間曝露胞子

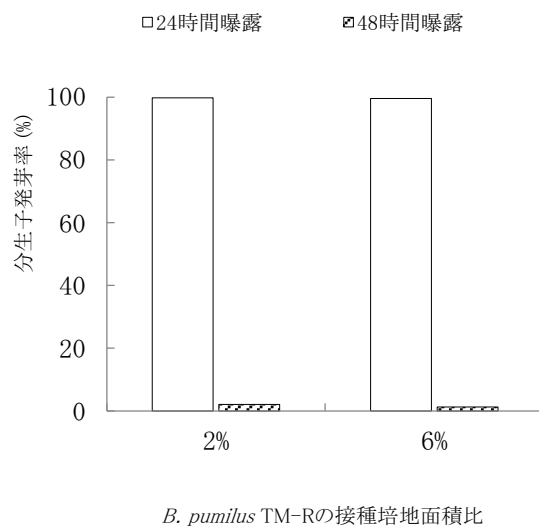


図 4-6. *C. cladosporioides* 分生子の発芽抑制に及ぼす *B. pumilus* TM-R の接種量および暴露時間の影響  
(佐賀県上場営農センター田代暢哉博士提供)

## 第五章 土壌および堆肥に存在する揮発性抗菌物質生産菌の分離、同定、および抗菌活性

### 5-1. 緒言

現在、植物病害の防除には主に農薬が使用されている。しかし、耐性菌の出現や、作業従事者への健康被害、および環境への悪影響の懸念などから、農薬に頼らない防除技術の開発が強く求められている。

代替技術の一つとして、細菌や糸状菌を用いた生物防除の研究が進められている(Sharma ら, 2009)。特に近年は、直接的な接触の必要がない揮発性物質の利用に注目が集まっており、貯蔵中の柑橘類や果菜類の糸状菌による汚損を防除する有用な技術として期待されている。これまでに *Botrytis cinerea* (Fiddaman & Rossall, 1994; Liu ら, 2008; Rojas-Solís ら, 2018; Zhang ら, 2013), *Fusarium* spp.(El-Hasan ら, 2018; Elkahoui ら, 2014; Fiddaman & Rossall, 1994; Liu ら, 2008; Tyc ら, 2015), *Penicillium* spp.(Arrebola ら, 2010; Li ら, 2010), *Rhizoctonia solani* (Elkahoui ら, 2014; Fiddaman & Rossall, 1994; Liu ら, 2008; Tyc ら, 2015), および *Sclerotinia sclerotiorum* (Fernando ら, 2005; Fiddaman & Rossall, 1994; Liu ら, 2008)などの種々の植物病原性糸状菌に対して、抗菌活性を示す揮発性物質を生産する細菌や糸状菌が報告されている。より実用的な利用に向けて、約 7 L の容器における桜桃の病変部の減少(Gotor-Vila ら, 2017)や貯蔵室におけるレモンの腐敗の減少(Mercier & Smilanick, 2005)が確認されている。しかしこれらは、発症を 100%抑制するものではなく、試験期間も 1 週間程度であるため、効果の一層の向上が求められている。

このように、生物防除に有用な強い抗菌活性を持つ微生物の分離とその性質に焦点が当てられてきた。有用菌のスクリーニングは様々な環境試料を用いて行われており、土壌はその主要な分離源のひとつである。しかし、土壌中で揮発性抗菌物質を生産する細菌の種類や存在量についての報告はごく限られている。土壌から無作為に分離した細菌のスクリーニング結果として、

Mackie と Wheatley (1999) はほぼ全ての株が, Zou ら (2007) は約 3 割の株が揮発性物質により被験糸状菌の生育を抑制したと報告している. 遠隔抗菌活性の報告はイギリスと中国の土壌を分離源としたもので, 日本の土壌での研究例は筆者が知る限りはない.

そこで本研究では, 佐賀県内の土壌および堆肥から細菌を多数分離し, ミカンを汚損する *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, および *Penicillium italicum* に対する遠隔抗菌活性の有無について判定し, その生態学的意義について考察した.

## 5-2.材料および方法

### 細菌の分離

佐賀県内から採取した土壌 8 点 (森林土壌 4 点, 畑土壌 3 点, 園芸培土 1 点) および牛ふん堆肥 4 点の計 12 点を試料として用いた. 試料 10 g に滅菌生理食塩水 95 mL を加え, ホモジナイザー (エースホモジナイザー, 日本精機製作所) を用いて 15,000 rpm で 15 分間分散処理した. この分散液を 1.8 mL の滅菌生理食塩水を用いて適宜希釈し, その 100  $\mu$ L を NA 培地に塗抹接種した. 30°C で 7 日間培養した後, 発育したコロニーから外観が異なるものを釣菌し, 純化した.

### 被験糸状菌株

被験糸状菌株として, *A. niger* RR, *C. cladosporioides* SK-1, および *P. italicum* D2 を用いた. これらは佐賀県上場営農センターにおいて, 腐敗した柑橘類から分離された株である. 被験糸状菌株は PDA 培地で 30°C, 3~5 日間の前培養の後, 試験に供試した.

### 分離細菌株による遠隔抗菌活性

分離細菌株を NB 培地に接種し, 30°C で 18 時間静置培養した. その 100



μL を NA 培地に塗抹接種した。

前培養した被験糸状菌 3 菌種の培地に 0.01% SDS 添加滅菌生理食塩水をそれぞれ約 10 mL 載せ、コンラージ棒で胞子を掻き取り、ボルテックス処理して胞子懸濁液を得た。ヘマチトメータ(トーマ型, カヤガキ)を用いて胞子濃度を測定し、約  $10^3$  spores/mL となるように 0.01% SDS 添加滅菌生理食塩水で調製した。

シャーレ貼り合わせ試験では、3 種の被験糸状菌の胞子懸濁液各 20 μL を 1 枚の PDA 培地に距離を置いてスポット接種した。この PDA 培地と、分離株を塗抹接種した NA 培地を、蓋を外して向かい合わせにし、サージカルテープで固定した。NA 培地を上となるように静置し、30°C で 7 日間培養した。分離株を接種していない NA 培地(対照区)と比較し、抑制効果の有無を目視で判定した。

12 L 容器試験では、第二章と同じ密閉式のプラスチック容器を用い、同様に内部を殺菌した。この容器の内部の側面に、分離細菌株を 100 μL 塗抹接種した NA 培地 1 枚と、被験糸状菌の胞子懸濁液 100 μL を塗抹接種した PDA 培地 3 枚を、いずれも蓋を外した後、両面粘着テープで固定した(図 5-1)。容器を密閉し、30°C で 5 日間培養した。分離株を接種していない培地を対照区とし、以下の式を用いて抑制効果を判定した。これらの試験は全て 2 反復で実施した。

$$\text{コロニー形成抑制率(\%)} = 1 - \frac{\text{処理区のコロニー数}}{\text{対照区のコロニー数}} \times 100$$

#### 分離株の同定

分離細菌株のうち 11 株について、16S rRNA 遺伝子配列により菌種同定した。真正細菌に対するユニバーサルプライマー(10F および 1541R)を用いて PCR 増幅し、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) により精製した。BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied

Biosystems)を用いて標識し、Genetic Analyzer 3130 DNA sequencer(Applied Biosystems, USA)により配列を決定した。相同性解析には DDBJ BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/blastn>)を用いた。

### 5-3. 結果および考察

#### 細菌株の分離

土壌 8 点および牛ふん堆肥 4 点、計 12 点の試料の希釈懸濁液をそれぞれ NA 培地に接種し培養した結果、土壌で  $4.1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^8$  cfu/g 乾土、牛ふん堆肥で  $1.0 \times 10^8 \sim 1.5 \times 10^9$  cfu/g 乾物の細菌数を得た。これらの高次希釈の培養から釣菌し、計 208 株の細菌株を得た。

#### 分離細菌株による遠隔抗菌活性試験

シャーレ貼り合わせ試験による分離細菌株の遠隔抗菌活性の一例を図 5-2 に示す。対照区と比べて、糸状菌の菌糸成長が抑制された場合の他、*A. niger* RR の生育を促進した場合も見られた。細菌分離株 208 株のうち、184 株(88%) が被験糸状菌のいずれかに対して遠隔抗菌活性を示した(表 5-1)。これは Mackie と Wheatley (1999) の報告に匹敵する高頻度で、Zou ら (2007) の結果よりも高い値であった。また、*C. cladosporioides* SK-1 および *P. italicum* D2 に対して同時に抑制作用を示す株が大部分を占めた(150/184 株, 82%)。このように、森林土壌、畑土壌、園芸培土、および牛ふん堆肥のいずれからも遠隔抗菌活性を有する細菌が高率で検出されたことは、土壌や堆肥中に生息する多くの細菌がこのような能力を広く有していることを示すものと考えられる。Chuankun ら (2004) は、被験糸状菌に土壌由来の揮発性物質を暴露し、約 8 割の土壌が複数の糸状菌に対して抑制効果を示したことから、揮発性物質は土壌静菌作用の一要素として働くと報告している。これらのことは、揮発性物質による抗菌作用が、土壌などの環境中で微生物間の相互作用および生存競争に大きく関与している可能性を示している。ただし、現時点

では試料数が限られているため、より多くの試料を用いて同様の結果が得られるか確認していく必要がある。

*A. niger* RR を抑制する分離株は 208 株中 16 株であった一方で、逆に生育を促進する分離株が 116 株 (56%) 確認された (表 5-1)。Vespermann ら (2007) は *A. niger* が細菌由来の揮発性物質に対して抵抗的で、むしろ生育が促進される場合があることを報告している。しかし、揮発性物質がどのようなメカニズムで糸状菌の生育を促進するかについての報告は、筆者が知る限り見あたらない。

貼り合わせ試験で抑制効果が高かった分離株 6 株に対して 12 L 規模での抗菌活性試験を行った。その結果、SNB2 株は *C. cladosporioides* SK-1 に対して 100% のコロニー形成抑制率を示した (表 5-2)。*C. cladosporioides* は、すす班病を柑橘類にもたらしことが報告されており (Tashiro ら, 2013)、SNB2 株はこの生物防除剤としての活用が期待される。一方、*P. italicum* D2 に対するコロニー形成抑制率は全ての分離株が 10% 未満であり、抑制効果が低かった。これは、12 L 容器の気相が、貼り合わせ試験の約 130 倍と増大したことで、揮発性物質の濃度が低下したためであると考えられる。ただし、コロニー形成抑制率では明瞭な抑制効果が認められなかったものの、SNB2 など一部の株では、被験糸状菌菌糸の成長抑制が観察された (図 5-3)。細菌由来の揮発性抗菌物質に晒された糸状菌では菌糸および分生子に形態異常が起きることが報告されている (Arrebola ら, 2010; Chaurasia ら, 2005; El-Hasan ら, 2018; Elkahoui ら, 2014; Garbeva ら, 2014; Li ら, 2010; Liu ら, 2008)。本試験でも同様の現象が起こっている可能性があるため、今後の検討課題である。

#### 分離細菌株の同定

分離株 11 株の同定結果とそれらの遠隔抗菌活性の性状を表 5-3 に示す。遠隔抗菌活性を有する 10 株のうち 6 株がグラム陽性菌 (*Arthrobacter* 属、

*Bacillus* 属, および *Microbacterium* 属) であり, 4 株がグラム陰性菌 (*Flavobacterium* 属, *Lysobacter* 属, および *Pseudomonas* 属) であった. *Arthrobacter humicola* および *Flavobacterium compostarboris* は属レベルでは遠隔抗菌活性を有する株が報告されているが(Garbeva ら, 2014), 種レベルで遠隔抗菌活性を報告したのは本研究が初めてである. Arrebola ら (2010) は, *Bacillus* 属の細菌が 3-hydroxy 2-butanone を生産し, その純粋標品が抗菌活性を持つことを見出している. また, Elkahoui ら (2014) も *Pseudomonas* 属細菌が dimethyl disulfide および dimethyl trisulfide を生産し, その純粋標品による抗菌活性を確認している. しかし, これらの研究では, 細菌が生産する揮発性物質の濃度と, 活性が認められた濃度の比較は行われていないため, 実態を反映していない可能性がある. また, 細菌由来の揮発性物質は濃度が低く (Elkahoui ら, 2014), 培養条件によっても変化する (Garbeva ら, 2014; Li ら, 2010; Tyc ら, 2015) ため, 遠隔抗菌活性の起因物質を特定できた研究は少ない.

細菌由来の揮発性物質は, 糸状菌に対してのみならず, 細菌の生育を抑制または促進する事例が報告されている (Tyc ら, 2015). さらに, 糸状菌由来の揮発性物質についても同様の報告がある (Strobel ら, 2001). 多様な微生物種が何らかの揮発性抗菌物質を生産することについては, これまでにも報告があるが (Garbeva ら, 2014), 土壌由来の揮発性物質の組成や濃度と土壌静菌性との関係性を扱った報告はない. 今後, 土壌に存在する微生物が生産している揮発性物質の網羅的解析を行い, 物質の同定を進めるならば, 土壌の微生物間の生存を巡る相互作用に新しい知見をもたらすと考えられる.

本研究の結果は, 土壌および堆肥中に遠隔抗菌活性 (揮発性物質生産による微生物の生育抑制) を有する細菌が広く存在し, 揮発性物質が微生物間相互作用因子として機能している可能性を示すものである. また, 土壌は生物防除に有望な微生物の分離源としても重要であることを改めて明らかにした.

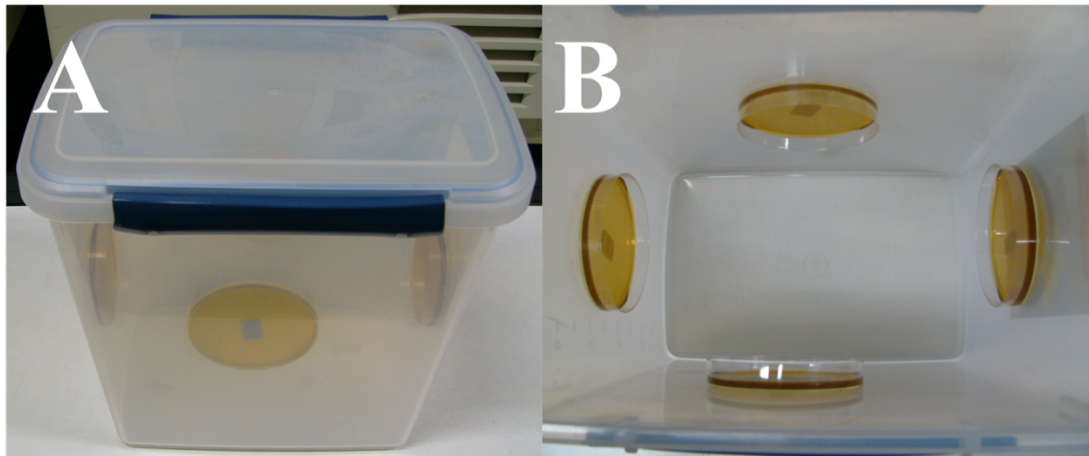


図 5-1. 12 L 容器試験の外観 (A) および内部状態 (B)

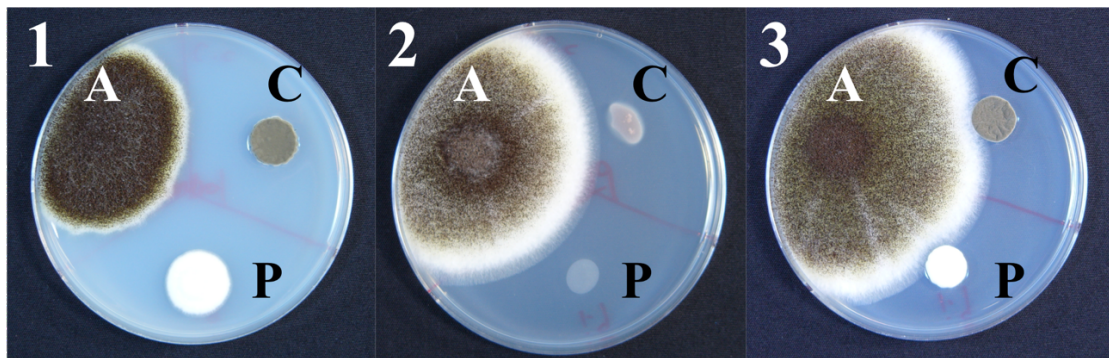


図 5-2. シャーレ貼り合わせ試験において細菌分離株由来揮発性物質が被験糸状菌 *Aspergillus niger* RR (A), *Cladosporium cladosporioides* SK-1 (C), および *Penicillium italicum* D2 (P) の生育に与える影響. それぞれ対照区 (1), DIZ29 (2), および HKA7 (3).

表 5-1. シャーレ貼り合わせ試験における土壌および堆肥からの分離株由来揮発性物質による被験糸状菌生育抑制のまとめ

Source	Number of isolates	Number of isolates showing							
		inhibition against						promotion of	
		A <sup>a</sup> +C <sup>b</sup> +P <sup>c</sup>	C+P	A only	C only	P only	None	A only	None
Forest soil 1 (depth 0-3 cm)	15	0	15	0	0	0	0	7	8
Forest soil 2 (depth 3-15 cm)	15	1	14	0	0	0	0	3	12
Forest soil 3 (depth 15-50 cm)	15	0	15	0	0	0	0	9	6
Forest soil 4 (depth 1-15 cm)	18	1	6	0	0	3	8	10	8
Upland soil 1 (depth 1-15 cm)	14	0	13	0	0	0	1	6	8
Upland soil 2 (depth 1-15 cm)	38	0	30	0	1	2	5	26	12
Upland soil 3 (depth 1-15 cm)	19	0	11	0	0	6	2	9	10
Garden soil (depth 1-15 cm)	15	0	9	0	2	1	3	12	3
Cattle manure compost 1	23	14	7	0	2	0	0	0	23
Cattle manure compost 2	19	0	19	0	0	0	0	19	0
Cattle manure compost 3	9	0	8	0	0	1	0	9	0
Cattle manure compost 4	8	0	3	0	0	0	5	6	2
Total	208	16	150	0	5	13	24	116	92
				184 (88%)			(12%)	(56%)	(44%)

<sup>a</sup> *Aspergillus niger* RR, <sup>b</sup> *Cladosporium cladosporioides* SK-1, <sup>c</sup> *Penicillium italicum* D2

表 5-2. 12 L 容器試験において土壌および堆肥から分離した細菌由来揮発性物質が被験系状菌の生育に与える影響

Source	Isolates No.	Fungal growth inhibition rate (%) against <sup>a</sup>		
		A <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>
Cattle manure compost 1	UBE3	<10	29	<10
Cattle manure compost 1	UBE5	14	<10	<10
Cattle manure compost 1	UBE6	<10	<10	<10
Cattle manure compost 1	UBE12	39	22	<10
Cattle manure compost 1	UBE20	22	<10	<10
Forest soil 2 (depth 3-15 cm)	SNB2	<10	100	<10

<sup>a</sup> Fungal growth inhibition rate (%) = 100 × (1 - 処理区のコロニー数/対照区のコロニー数)

<sup>b</sup> *Aspergillus niger* RR, <sup>c</sup> *Cladosporium cladosporioides* SK-1, <sup>d</sup> *Penicillium italicum* D2

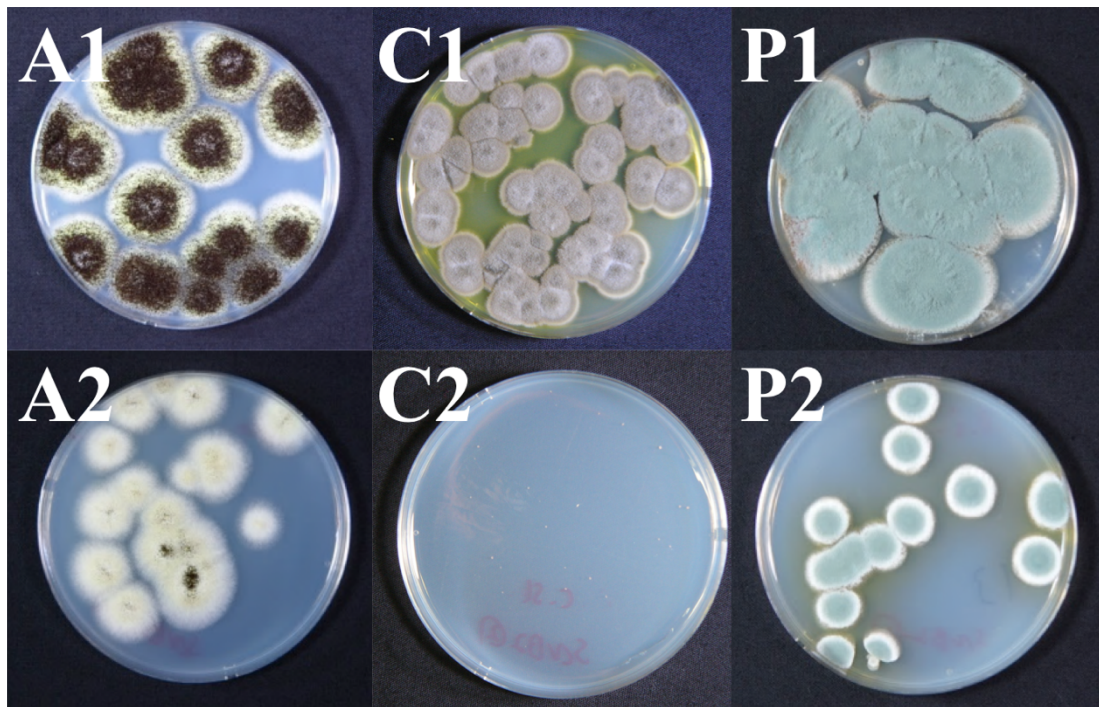


図 5-3. 12 L 容器試験において分離株 SNB2 由来揮発性物質が被験系状菌に与える影響. *Aspergillus niger* RR, *Cladosporium cladosporioides* SK-1, および *Penicillium italicum* D2) の分離株無接種区 (それぞれ A1, C1, および P1) および接種区 (それぞれ A2, C2, および P2).

表 5-3. 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分離株の同定

Source	Isolates No.	Species identified	Similarity (shared bases)	Fungal growth			
				inhibition			promotion
				A <sup>a</sup>	C <sup>b</sup>	P <sup>c</sup>	A <sup>a</sup>
Upland soil 3	DIZ4	<i>Arthrobacter humicola</i>	99% (537/538)	-	+	+	+
Upland soil 3	DIZ29	<i>Arthrobacter</i> sp.	100% (514/514)	-	+	+	+
Forest soil 4	HKA24	<i>Bacillus acidiceler</i>	100% (578/578)	-	+	+	+
Garden soil	TIH3	<i>Bacillus pumilus</i>	99% (571/574)	-	+	+	+
Garden soil	TIH7	<i>Bacillus thuringiensis</i>	100% (438/438)	-	+	+	+
Garden soil	TIH8	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>	100% (451/451)	-	+	+	+
Garden soil	TIH14	<i>Lysobacter soli</i>	100% (520/520)	-	+	+	+
Garden soil	TIH2	<i>Flavobacterium compostarboris</i>	99% (420/421)	-	+	-	+
Garden soil	TIH4	<i>Flavobacterium</i> sp.	99% (483/484)	-	+	-	+
Garden soil	TIH1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	100% (252/252)	-	-	+	+
Forest soil 4	HKA7	<i>Agromyces</i> sp.	100% (486/486)	-	-	-	+

<sup>a</sup> *Aspergillus niger* RR, <sup>b</sup> *Cladosporium cladosporioides* SK-1, <sup>c</sup> *Penicillium italicum* D2



## 第六章 総合考察

本研究において分離した TM-R 株は *B. pumilus* と同定された。 *B. pumilus* のいくつかの株は水溶性物質および揮発性物質による抗真菌作用が報告されている (Liu ら, 2008; Munimbazi & Bullerman, 1998)。 *Bacillus* 属細菌は耐久細胞である芽胞を形成することがよく知られている。芽胞は乾燥, 熱, 紫外線照射, および有機溶媒への抵抗性が報告されており (Y. Huang ら, 1992; Romero ら, 2007), 微生物資材の含有菌として利用する際に保存性の向上が見込まれる。

*B. pumilus* TM-R は, *A. alternata* NBRC31188, *C. cladosporioides* NBRC4459, *C. lunata* NBRC100182, *F. oxysporum* NBRC30701, および *P. italicum* NBRC32032 に対して一定の抑制作用を示した。これらの糸状菌は種々の植物に対して病原性を示すことが報告されている (Akinbode, 2010; Caccioni ら, 1998; Dean ら, 2012; Mamgain ら, 2014; Tashiro ら, 2013)。本菌を用いることで植物病害の低減に寄与することが期待される。また, 第三章で示した通り, 本菌を利用した微生物資材の有効性は浴室規模でも数ヶ月間確認されており, 農産物病害の防除に限らず, 住環境を始めとした糸状菌による汚染も防げる可能性がある。

微生物由来の揮発性物質は濃度が低く (Elkahoui ら, 2014), 培地組成などの培養条件によっても変化する (Garbeva ら, 2014; Li ら, 2010; Tyc ら, 2015)。また, 微生物由来揮発性物質の分析に統一された手法はなく, ヘッドスペースの容積, 捕集剤の有無, 捕集剤および GC カラムの種類などが複雑に組み合わさっており, 各研究間の結果を一様に比較することができない。また, Effmert ら (2012) は, 報告されている微生物由来揮発性物質が 800 物質程度で, 分離・同定された微生物の種類 ( $10^6$  種類) を考えると氷山の一角でしかないと述べている。現在では mVOC データベース (<http://bioinformatics.charite.de/mvoc/>) に 2,000 物質近くが登録されているが, それでも微生物由来揮発性物質に関する研究はまだ十分ではない。

細菌由来の揮発性物質は, 糸状菌に対してのみならず, 細菌の発育を抑制ま

たは促進する事例が報告されている(Tyc ら, 2015). また殺線虫作用も報告されている(Gu ら, 2007). さらに, 糸状菌由来の揮発性物質についても同様に, 細菌および糸状菌の発育抑制または促進の報告がある(Strobel ら, 2001). また, 第五章では土壌および堆肥に遠隔抗菌活性を有する細菌が広く存在する可能性を示した. Chuankun ら(2004)は, 被験糸状菌に土壌由来の揮発性物質を暴露し, 約8割の土壌が複数の糸状菌に対して抑制効果を示したことから, 揮発性物質は土壌静菌作用の一要素として働くと報告している. これらのことは, 揮発性物質による相互作用が, 土壌などの環境中で微生物間の生存競争に大きく関与し, 微生物生態系形成の重要な要因となっている可能性を示している. 一方で, 細菌由来の揮発性物質が植物の生育を促進する事例が報告されている. 例えば, *Pseudomonas* 属細菌によるタバコ(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc)の生育促進(Park ら, 2015), *Pseudomonas* 属細菌および *Stenotrophomonas* 属細菌の接種によるトマト(*Lycopersicon esculentum* cv. Saladette)の生育促進, および *Pseudomonas* 属細菌および *Burkholderia* 属細菌の同時接種による *Populus deltoide* の根バイオマス増加および光合成能力の改善(Timm ら, 2016)が報告されている. さらに, タバコおよびトウモロコシの全身誘導抵抗性を誘導することによって病害を抑制するという報告(Huang ら, 2012)もある. これらのことは微生物由来揮発性物質が植物病害の低減および植物生育促進の両面から農産物の生産量増加に寄与できる可能性を示唆している.

本研究では, 揮発性物質の生産により *B. pumilus* TM-R が種々の糸状菌に対して発育抑制作用を示した. 特に糸状菌 *C. cladsporioides* に対する遠隔抗菌作用が強いことを利用し, 本糸状菌が主な原因となっているハウスミカンの汚損低減および浴室空間の防黴に利用できることを示した. さらに, 抗真菌性揮発性物質を生産する多様な細菌が土壌および堆肥に広く存在していることを明らかにした. これは, 環境中に生息する細菌には遠隔抗菌活性を有するものが広く分布することを示し, 土壌静菌性(soil fungistasis)および微生物生態系における微生物相互作用において大きく寄与している可能性を示すと考えられた.

## 謝辞

本研究を行う上で、微生物資材試料の提供をしていただきました(有)T.Mエンタープライズの碓正男社長，被験糸状菌株の提供をしていただきました佐賀県上場宮農センター元所長の田代暢哉博士に厚く御礼を申し上げます。

また，本研究を行う上で数々のご指導をいただきました染谷孝名誉教授，上野大介准教授，龍田典子博士，土壤微生物学研究室の皆様，環境分析化学研究室の皆様に心より感謝を申し上げます。

なお，本学位論文の一部は下記論文にて発表した。

Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., & Ueno, D. (2019). Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon*, 5 (December 2018), <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01817>

森田智有・龍田典子・田代暢哉・上野大介・染谷 孝(2020):

揮発性抗菌物質生産菌によるハウスミカン汚損防止の基礎的研究.環境技術, 49(2) (印刷中)

## 引用文献

- 1) Akinbode, O. A. (2010). Evaluation of antifungal efficacy of some plant extracts on *Curvularia lunata*, the causal organism of maize leaf spot. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 4 (11), 797–800.
- 2) 案浦謙二. (2007). 微生物資材の品質評価と性能向上に関する研究. 佐賀大学農学部 2006 年度修士論文.
- 3) Arrebola, E., Sivakumar, D., & Korsten, L. (2010). Effect of volatile

- compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, 53 (1), 122–128.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.010>
- 4) Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A., & Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 73–79.
  - 5) Chaurasia, B., Pandey, A., Palni, L. M. S., Trivedi, P., Kumar, B., & Colvin, N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiological Research*, 160 (1), 75–81.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.013>
  - 6) Chuankun, X., Minghe, M., Leming, Z., & Keqin, Z. (2004). Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biology and Biochemistry*, 36 (12), 1997–2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.020>
  - 7) Dean, R., Kan, J. A. L. V. K., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Pietro, A. D. , Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster., G. D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13 (4), 414–430.  
<https://doi.org/10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X>
  - 8) Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
  - 9) e-Stat 政府統計の総合窓口. (2019). 平成 30 年度産果樹出荷統計.  
<https://www.e-stat.go.jp/stat->

search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500215&tstat=000001013427  
&cycle=7&year=20180&month=0&tclass1=000001032287&tclass2=00000103  
2927&tclass3=000001134463 (2019 年 11 月 21 日 閱 覽).

- 10) Effmert, U., Kalderás, J., Warnke, R., & Piechulla, B. (2012). Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology*, 38 (6), 665–703. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0135-5>
- 11) El-Hasan, A., Schöne, J., Höglinger, B., Walker, F., & Voegelé, R. T. (2018). Assessment of the antifungal activity of selected biocontrol agents and their secondary metabolites against *Fusarium graminearum*. *European Journal of Plant Pathology*, 150 (1), 91–103. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1255-0>
- 12) Elkahoui, S., Djebali, N., Yaich, N., Azaiez, S., Hammami, M., Essid, R., & Limam, F. (2014). Antifungal activity of volatile compounds-producing *Pseudomonas* P2 strain against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (August 2015), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1772-3>
- 13) Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37 (5), 955–964. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.021>
- 14) Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1994). Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 76 (4), 395–405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01646.x>
- 15) Fridlender, M., Inbar, J., & Chet, I. (1993). Biological control of soilborne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biology and Biochemistry*, 25 (9), 1211–1221. <https://doi.org/10.1016/0038->

0717(93)90217-Y

- 16) From, C., Hormazabal, V., & Granum, P. E. (2007). Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology*, *115*(3), 319–324.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005>
- 17) Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., & de Boer, W. (2014). Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. *FEMS Microbiology Ecology*, *87* (3), 639–649. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12252>
- 18) Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., & Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, *64*, 219–225.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
- 19) Gu, Y. Q., Mo, M. H., Zhou, J. P., Zou, C. S., & Zhang, K. Q. (2007). Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, *39* (10), 2567–2575.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.05.011>
- 20) Hassan, N., Nakasuji, S., Elsharkawy, M. M., Naznin, H. A., Kubota, M., Ketta, H., & Shimizu, M. (2017). Biocontrol potential of an endophytic *Streptomyces* sp. strain MBCN152-1 against *Alternaria brassicicola* on cabbage plug seedlings. *Microbes and environments*, *32* (2), 133–141.  
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME17014>
- 21) Huang, C., Tsay, J., Chang, S., & Yang, H. (2012). Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus*. *Pest Manag Sci.*, *68* (9), (September 2011), 1306–1310. <https://doi.org/10.1002/ps.3301>
- 22) Huang, Y., Wild, B. L., & Morris, S. C. (1992). Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Annals of*

- Applied Biology*, 120(2), 367–372.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1992.tb03433.x>
- 23) JA 静岡経済連柑橘委員会. (2016). 冷風貯蔵庫でじっくり熟成【JA なんすん】. <https://www.shizuokamikan.jp/topics/detail/45> (2019年11月21日閲覧).
- 24) JA 倉敷かさや. (2016). みかんの収穫・貯蔵のポイント. [https://www.ja-kurakasa.or.jp/farming/fruit\\_vegetable/201611/index.html](https://www.ja-kurakasa.or.jp/farming/fruit_vegetable/201611/index.html) (2019年11月21日閲覧).
- 25) Koitabashi, M. (2005). New biocontrol method for parsley powdery mildew by the antifungal volatiles-producing fungus Kyu-W63. *Journal of General Plant Pathology*, 71 (4), 280–284. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0198-z>
- 26) Koitabashi, M., & Tsushima, S. (2007). Studies on biocontrol of air-borne plant disease by a filamentous fungus producing antifungal volatiles. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 41(4), 261–265.  
<https://doi.org/10.6090/jarq.41.261>
- 27) Larkin, R. P., & Fravel, D. R. (1998). Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis*, 82(9), 1022–1028.
- 28) Li, Q., Ning, P., Zheng, L., Huang, J., Li, G., & Hsiang, T. (2010). Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on Citrus microcarpa. *Postharvest Biology and Technology*, 58 (2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.06.003>
- 29) Liu, W. wei, Mu, W., Zhu, B. yu, Du, Y. chen, & Liu, F. (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. *Agricultural Sciences in China*, 7 (9), 1104–1114. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60153-4](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60153-4)
- 30) Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., & Shao, Z. (2013).

- Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS ONE*, 8 (11), 1–11.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080097>
- 31) 農林水産省. (2019a). 果樹をめぐる情勢 (令和元年 9 月版) .  
<http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/fruits/attach/pdf/meguzi1909050.pdf>  
(2019 年 11 月 21 日閲覧)
- 32) 農林水産省. (2019b). 青果物卸売市場調査 (平成 30 年年間計及び月別結果) .  
[http://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka\\_gaiyou/seika\\_orosi/h30/index.html](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/seika_orosi/h30/index.html)  
(2019 年 11 月 21 日閲覧)
- 33) Mackie, A. E., & Wheatley, R. E. (1999). Effects and incidence of volatile organic compound interactions between soil bacterial and fungal isolates. *Soil Biology and Biochemistry*, 31 (3), 375–385. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00140-0)
- 34) Mamgain, A., Roychowdhury, R., & Tah, J. (2014). Review: *Alternaria* pathogenicity and its strategic controls. *Research Journal of Biology*, 1, 1–9.
- 35) Mercier, J., & Smilanick, J. L. (2005). Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodora albus*. *Biological Control*, 32(3), 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.12.002>
- 36) 水野進 & 谷口保. (1971). 温州ミカンの貯蔵における温度の影響. 園芸学会雑誌, 41 (2), 207–214. <https://doi.org/10.2503/jjshs.41.207>
- 37) Morita, T., Tanaka, I., Ryuda, N., Ikari, M., & Ueno, D. (2019). Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon*, 5 (December 2018), <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01817>
- 38) Moriyama, Y., Nawata, N., Tsuda, T., & Nitta, M. (1992). Occurrence of moulds in Japanese bathrooms. *International Biodeterioration and*



*Biodegradation*, 30, 47–55.

- 39) Munimbazi, C., & Bullerman, L. B. (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J Appl Microbiol*, 84 (6), 959–968.
- 40) Park, Y., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, J. M., & Park, K. (2015). Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461 (2), 361–365.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.039>
- 41) Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M. del C., Macías-Rodríguez, L., & Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13 (November 2017), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.007>
- 42) Romero, D., Vicente, A. De, Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J., Arrebola, E., Francisco M. Cazorla, Oscar P. Kuipers, Michel Paquot, & Alejandro Pérez-García. (2007). The Iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (4), 430–440.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- 43) Schmidt, R., Cordovez, V., Boer, W. De, Raaijmakers, J., & Garbeva, P. (2015). Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME Journal*, 9(11), 2329–2335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.42>
- 44) Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50 (3), 205–221.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>

- 45) Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M.ほか. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1465–1473. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.64029-0>
- 46) Strobel, G. A., Dirksie, E., Sears, J., & Markworth, C. (2001). Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 147(2001), 2943–2950. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-11-2943>
- 47) 田中一成. (2014). 遠隔抗菌活性を有する微生物資材に関する研究. 佐賀大学農学部 2013 年度修士論文.
- 48) 田代暢哉. (1996). ハウスミカンに発生した *Aspergillus* 属菌による果実腐敗. 植物防疫, 50 (1), 30–31.
- 49) 田代暢哉 & 井手洋一. (2007). ハウスミカンの果実腐敗を引き起こすこうじかび病菌 *Aspergillus niger* のイミノクタジン酢酸塩およびベノミルに対する感受性と両剤の混用による抗菌活性の増大. 日植病報, 73 (3), 191.
- 50) 田代暢哉, 井手洋一, & 納富麻子. (2003). ハウスミカンに発生した *Aspergillus flavus* によるこうじかび病 (病原菌追加). 日本植物病理學會報, 69 (1), 21.
- 51) 田代暢哉, 山口尚司, 中島幸一, 正司和之, 松尾洋一, & 山口正洋. (2016). ハウスミカンすす斑病に対する Evidence-based control (EBC) の実践. 日植病報, 82 (1), 79.
- 52) Tashiro, N., Manabe, K., & Ide, Y. (2012). First report of whisker mold, a postharvest disease on citrus caused by *Penicillium ulaiense* ( in Japan ). *Journal of General Plant Pathology*, 78(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0363-0>

- 53) Tashiro, N., Noguchi, M., Ide, Y., & Kuchiki, F. (2013). Sooty spot caused by *Cladosporium cladosporioides* in postharvest Satsuma mandarin grown in heated greenhouses. *Journal of General Plant Pathology*, *79* (2), 158–161. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0430-1>
- 54) Timm, C. M., Pelletier, D. A., Jawdy, S. S., Gunter, L. E., Henning, J. A., Engle, N.ほか. (2016). Twopoplar-associated bacterial isolates induce additive favorable responses in a constructed plant-microbiome system, *Frontiers in Plant Science*, *7* (April), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00497>
- 55) Toffano, L., Fialho, M. B., & Pascholati, S. F. (2017). Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biological Control*, *108*, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.02.009>
- 56) Tyc, O., Zweers, H., de Boer, W., & Garbeva, P. (2015). Volatiles in inter-specific bacterial interactions. *Frontiers in Microbiology*, *6* (DEC), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01412>
- 57) Usall, J., Ippolito, A., Sisquella, M., & Neri, F. (2016). Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, *122*, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.002>
- 58) Vespermann, A., Kai, M., & Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology*, *73* (17), 5639–5641. <https://doi.org/10.1128/AEM.01078-07>
- 59) Wang, C., Wang, Z., Qiao, X., Li, Z., Li, F., Chen, M.ほか. (2013). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiology Letters*, *341* (1), 45–51.

<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12088>

- 60) Zhang, X., Li, B., Wang, Y., Guo, Q., Lu, X., Li, S., & Ma, P. (2013).

Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atropaeus* CAB-1.

*Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (21), 9525–9534.

<https://doi.org/10.1007/s00253-013-5198-x>

- 61) Zou, C. S., Mo, M. H., Gu, Y. Q., Zhou, J. P., & Zhang, K. Q. (2007).

Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil*

*Biology and Biochemistry*, 39 (9), 2371–2379.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.009>