

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	従属栄養硝化菌Alcaligenes faecalis No.4を用いた微生物農薬の開発に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	本田直弘
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第4134号, 授与年月日:1999年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第4134号, Conferred date:1999/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

従属栄養硝化細菌 *Alcaligenes faecalis* No.4 を用いた
微生物農薬の開発に関する研究

平成10年度 博士論文
東京工業大学
総合理工学研究科 化学環境工学専攻
96D30110 本田 直弘
指導教官 正田 誠 教授

第 1 章 序論

1-1 緒言	1
1-2 微生物農薬	1
1-3 土壌病害の防除	2
1-3-1 抗生	2
1-3-2 競争	3
1-3-3 寄生	3
1-3-4 捕食	3
1-3-5 溶菌	3
1-3-6 非病原性病原菌による交叉防除（植物体の抵抗性の誘導）	3
1-3-7 アレロパシー	4
1-4 微生物農薬の土壌接種法	4
1-4-1 直接投入	4
1-4-2 担体吸着	4
1-4-3 混植	5
1-4-4 植物への直接接種	5
1-4-5 種子コーティング	5
1-5 <i>Alcaligenes</i> sp. の特性	5
1-5-1 従属栄養硝化	6
1-5-2 生分解性高分子生産	6
1-5-3 難分解性物質分解	6
1-5-4 薬剤耐性	7
1-6 植物病原菌 <i>Rhizoctonia solani</i> K-1	7
1-7 本研究の目的	8
1-8 本研究の概要	8
1-9 参考文献	9
第 2 章 <i>Alcaligenes faecalis</i> No.4 の性質と抗菌物質の同定	
2-1 緒言	15
2-2 実験材料及び方法	16
2-2-1 菌株	16
2-2-2 培地	17

2-2-3	<i>A.faecalis</i> No.4 の同定	17
2-2-4	<i>A.faecalis</i> No.4 の植物病原菌に対する抗菌活性	17
2-2-5	ヒドロキシルアミン (NH_2OH) の定量	17
2-2-6	亜硝酸イオン (NO_2^-)、硝酸イオン (NO_3^-) の定量： イオンクロマトグラフィー	18
2-2-7	硝化産物の植物病原菌に対する抗菌活性の測定法	18
2-2-8	寒天培地からの硝化産物の抽出法	18
2-2-9	NH_2OH の植物病原菌に対する最小阻止濃度 (MIC)	19
2-2-10	<i>A.faecalis</i> No.4 と植物病原菌の混合培養	19
2-2-11	<i>A.faecalis</i> No.4 の平均倍加時間	19
2-2-12	<i>A.faecalis</i> No.4 の炭素源資化性	19
2-2-13	<i>A.faecalis</i> No.4 の抗生物質耐性	20
2-2-14	元素分析	20
2-3	結果	20
2-3-1	<i>A.faecalis</i> No.4 の同定	20
2-3-2	<i>A.faecalis</i> No.4 の植物病原菌に対する抗菌活性	20
2-3-3	硝化産物 (NH_2OH , NO_2^- , NO_3^-) の検量線	21
2-3-4	<i>A.faecalis</i> No.4 の硝化反応	21
2-3-5	<i>A.faecalis</i> No.4 の植物病原菌に対する阻止円と培地中の NH_4^+ 濃度の関係	22
2-3-6	<i>A.faecalis</i> No.4 の植物病原菌に対する阻止円と硝化産物 生産の関係	22
2-3-7	硝化産物の植物病原菌に対する抗菌活性	22
2-3-8	NH_2OH の植物病原菌に対する最小阻止濃度 (MIC)	22
2-3-9	<i>A.faecalis</i> No.4 と植物病原菌の混合培養	23
2-3-10	<i>A.faecalis</i> No.4 の増殖速度：平均倍加時間	23
2-3-11	<i>A.faecalis</i> No.4 の炭素源資化性	23
2-3-12	<i>A.faecalis</i> No.4 の抗生物質耐性	24
2-3-13	<i>A.faecalis</i> No.4 の菌体内高分子生産	24
2-4	考察	24
2-5	結論	27

2-6	参考文献	28
	図、表	33
第3章	<i>A.faecalis</i> No.4による抗菌物質 NH_2OH の生産条件の検討	
3-1	緒言	54
3-2	実験材料及び方法	54
3-2-1	菌株	54
3-2-2	培地	55
3-2-3	NH_2OH の定量法及び培地からの抽出法	55
3-2-4	寒天培地における C/N 比の影響	55
3-2-5	培養条件による影響	55
3-3	結果	56
3-3-1	寒天培地における C/N 比と NH_2OH の生産量と抗菌活性との関係	56
3-3-2	液体培地における培地組成による NH_2OH の生産量の変化	56
3-3-3	培地の pH による NH_2OH の生産量の変化	56
3-3-4	培養温度による NH_2OH の生産量の変化	57
3-4	考察	57
3-5	結論	58
3-6	参考文献	58
	図、表	60
第4章	<i>A.faecalis</i> No.4の土壌における挙動	
4-1	緒言	66
4-2	実験材料及び方法	67
4-2-1	菌株	67
4-2-2	培地	67
4-2-3	土壌	67
4-2-4	土壌検定	67
4-2-5	ストレプトマイシン耐性の確認	68
4-2-6	土壌への菌の接種法および接種土壌の培養	68
4-2-7	土壌からの菌の回収および菌数と NH_2OH の測定	69
4-3	結果	69

4-3-1	トマト栽培施設内の気温と地温の日変化	69
4-3-2	滅菌、非滅菌土壌中の土着微生物の菌数変化	69
4-3-3	滅菌土壌における No.4 株の菌数変化	70
4-3-4	非滅菌土壌における No.4 株の菌数変化	70
4-3-5	<i>A.faecalis</i> No.4 の抗菌物質 NH_2OH の土壌からの抽出と確認	71
4-4	考察	71
4-5	結論	72
4-6	参考文献	72
	図、表	74
第 5 章 <i>A.faecalis</i> No.4 によるトマト苗立枯病の抑制		
5-1	緒言	79
5-2	実験材料及び方法	80
5-2-1	菌株	80
5-2-2	培地	80
5-2-3	植物	80
5-2-4	土壌	80
5-2-5	植物病原菌 <i>R.solani</i> K-1 の培養および土壌への接種	80
5-2-6	<i>A.faecalis</i> No.4 の培養および土壌への接種	81
5-2-7	NH_2OH 標準液の土壌への接種	81
5-2-8	トマト種子の表面殺菌	81
5-2-9	トマト種子の前発芽	81
5-2-10	植物試験	81
5-2-11	植物体の生育度の測定	82
5-2-12	統計解析	82
5-3	結果	82
5-3-1	<i>R.solani</i> K-1 の土壌への接種量と苗立枯病の発病程度の関係	82
5-3-2	<i>A.faecalis</i> No.4 および NH_2OH の土壌への接種による植物体への影響	83
5-3-3	<i>A.faecalis</i> No.4 の培養液の土壌への接種による苗立枯病の抑制効果	83
5-3-4	NH_2OH 水溶液の土壌への接種による苗立枯病の抑制効果	84

5-3-5	植物試験における <i>A.faecalis</i> No.4 の土壌中の菌数測定及び NH ₂ OH の回収の試み	84
5-4	考察	85
5-5	結論	87
5-6	参考文献	87
	図、表	90
第6章	<i>A.faecalis</i> No.4 による植物病抑制の最適条件の検討	
6-1	緒言	100
6-2	実験材料及び方法	100
6-2-1	菌株	100
6-2-2	培地	101
6-2-3	植物	101
6-2-4	土壌	101
6-2-5	植物病原菌 <i>R.solani</i> K-1 の培養および土壌への接種	101
6-2-6	菌体懸濁液、培養上清、殺菌菌体懸濁液の準備	101
6-2-7	<i>A.faecalis</i> No.4 の添加法	101
6-2-8	<i>A.faecalis</i> No.4 の接種するまでの培養時間	101
6-2-9	トマト種子の表面殺菌及び前発芽	102
6-2-10	植物試験	102
6-2-11	植物体の生育度の測定	102
6-3	結果	102
6-3-1	<i>A.faecalis</i> No.4 の添加法による植物病抑制効果	102
6-3-2	<i>A.faecalis</i> No.4 の培養液および菌体懸濁液の添加量による 植物病抑制効果	103
6-3-3	<i>A.faecalis</i> No.4 の接種するまでの培養時間による植物病抑 制効果	103
6-3-4	<i>A.faecalis</i> No.4 の殺菌菌体懸濁液による植物病抑制効果	104
6-4	考察	105
6-5	結論	106
6-6	参考文献	106
	図、表	108

第7章	<i>A.faecalis</i> No.4の抗菌活性消失株の単離と性質の検討及び植物試験	
7-1	緒言	117
7-2	実験材料及び方法	118
7-2-1	菌株	118
7-2-2	培地	118
7-2-3	トランスポゾンによる変異法	118
7-2-4	植物病原菌に対する抗菌活性の評価	119
7-2-5	硝化産物の分析法	119
7-2-6	植物試験方法	119
7-3	結果	119
7-3-1	<i>A.faecalis</i> No.4の抗菌活性消失株の単離	119
7-3-2	変異株 No.4-1株の植物病原菌に対する抗菌活性	119
7-3-3	変異株 No.4-1株の増殖と硝化産物の生産性	120
7-3-4	変異株 No.4-1株の植物試験	120
7-4	考察	120
7-5	結論	122
7-6	参考文献	122
	図、表	124
第8章	結論	
8-1	本研究の結論	131
8-2	今後の展望	132
8-2-1	<i>Alcaligenes faecalis</i> No.4の好氣的脱窒反応の検討	132
8-2-2	有用な機能を持つ遺伝子組み換え株の創製	133
8-2-3	キュウリうどんこ病の抑制の検討	133
8-2-4	<i>Alcaligenes faecalis</i> No.4の土壌接種法の検討	133
8-2-5	NH ₄ ⁺ 過多土壌での土壌改良の検討	134
8-2-6	揮発性抗菌物質の同定	134
8-2-7	化学農薬との混合施用	134

第1章 序論

1-1 緒言

第二次世界大戦以後、日本の農業はそれまでの労働集約型から、資材多投による資本集約型へと急速に転換してめざましい発展を遂げてきた。特に野菜、花卉、果樹栽培では、年間を通して新鮮な生産物を供給できるようになった。しかし、最近では、土壌の理化学性の悪化と地力低下、過剰に施用された化学肥料の流出による水系の汚染、連作による土壌病害の多発、資材および防除コストの高騰による経営の圧迫等、資材多投による資本集約型農業の問題点ばかりが目立ってきた。また、新規の化学農業の開発と利用は、農作業の省力化、農作物の生産性の飛躍的な向上をもたらしたが、化学農業の使いすぎによって、その残留・蓄積による環境の汚染、病原菌の薬剤抵抗性の発達、耕地生態系の単純化、有用微生物の攪乱、人や家畜への悪影響に対する危惧といった問題が生じている。近年、地球規模の環境保全、自然生態系の維持などの重要性が大きく取り上げられており、農業生産が及ぼすこれらの問題を減らす必要性が叫ばれている。

以上のような事情から、経済性を損なうことなく、消費者の食品の安全性への要求に応え、生態系との調和を測って持続性のある農業を支える病害防除技術が生産現場で求められている。そのような技術の一つとして、現在次第に研究が進み、期待されているものに、微生物の有効利用による病害防除がある。微生物は土壌中や植物の根面で、互いに競争、拮抗して共生しながら生存している。このような生態系の中で展開される微生物相互の一般的な競争や拮抗作用は、植物病原菌の増殖を抑制したり、植物病を抑止する力にもなる。環境への影響が少ないために生物防除は大変有望視されており、現在、世界的にも精力的に研究が進められている。

1-2 微生物農業

拮抗微生物の農業としての利用には、拮抗微生物の代謝産物の利用と、拮抗微生物そのものの利用の2つがある(1)。微生物農業は農作物の害虫、病原微生物および雑草に対する病原性、毒性、拮抗作用等を持つ微生物であり、一般に次のような長所がある。

①選択性が高く、標的外生物への影響が少ない

②病害虫に抵抗性が発達しにくい

③開発の費用が安い

④登録に必要な安全性試験が簡単であり、上市までの期間が短い（欧米）

一方、微生物農薬には下記のような欠点もあるため、現時点では微生物農薬が市場に占める割合は1%以下と小さい。

①抗菌スペクトルが小さいために市場が小さい

②植物病の抑制効果が化学農薬と比べ劣る

③残効性がなく、散布回数が多くなる

④製品の保存安定性が低い

⑤量産が困難で製造費が高くつくことが多い

しかし、欧米では環境問題への関心から、微生物農薬に対する関心が高まっており、米国では近年微生物農薬の登録が相次いでいる。また、遺伝子操作を利用して既存の微生物農薬の欠点を克服し、より有効な微生物農薬をより安価に製造する動きも活発である（2）。

1-3 土壌病害の防除

土壌病害を防除する方法として、これまでは化学農薬が一般的であったが、地球規模の環境保全、自然生態系の維持などの問題から、環境に優しい微生物農薬が注目されてきている。微生物農薬となりうる拮抗微生物は他の微生物に対して抗生、競争、寄生、捕食などの作用を示す。これらの作用は病原菌の個体数を減少させたり、その活性を低下させるので、病害の生物防除に利用できる可能性がある。その拮抗微生物の拮抗作用のメカニズムは以下の7種が考えられている。

1-3-1 抗生

抗生は、他の微生物の活性を妨げる物質（抗生物質）を菌体外に分泌することにより、微生物間の競争の中で相手を攻撃して生態的優位を確保することをいう。抗生作用による病害防除で最も効果的で世界的に広く実用されているものに、*Agrobacterium radiobacter* strain 84の生産する抗生物質 agrocin 84の作用による根頭がん腫病の生物防除がある（3）。また、*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

によるコムギ立枯病を抑制する *Pseudomonas fluorescens* は、phenazine-1-carboxylateを生産し、発病抑制に働く（4）。

1-3-2 競争

競争は、微生物間における生存場所と栄養源の奪い合いであり、必要な物質の絶対量が不足したときに起こる。例えば、蛍光性 *Pseudomonas* は siderophore と呼ばれる鉄キレート物質を生産して、植物根面で鉄イオンを優先的に取り込み、土壌生息病原菌による鉄イオンの取り込みを抑制して植物病原菌の増殖活性を低下させ、結果として植物病を抑制することが知られている（5-7）。

1-3-3 寄生

寄生は、ある生物が他の生物（宿主）に気孔や根先から侵入し、その宿主の栄養分を奪取することをいう。宿主を直接的に殺生しないが、栄養分が奪取されることによって宿主の活性が衰え、最終的に宿主は死滅に至る。*Tricoderma harzianum* の施用により小麦、テンサイ、キュウリの苗立枯病が抑制された報告がある（8-10）。

1-3-4 捕食

捕食は、大きな生物が小さい生物を直接餌として摂食することをいう。土壌中に生息する微生物のうちアメーバや線虫の中には、細菌や糸状菌を直接捕食し、微生物を餌にしている食菌性のものがある。食菌性アメーバは、病原菌を捕捉後包囲して細胞壁に丸い穴をあけ、侵入して原形質を吸収する（11）。

1-3-5 溶菌

溶菌には、細胞の内部分解だけで細胞膜の崩壊の伴わない自己溶菌もあるが、細胞壁構成物質であるセルロースやキチンなどを分解する、菌体外酵素を微生物が分泌することによって起こる溶菌もある。*Arthrobacter* や *Serratia* などが溶菌微生物として知られている（12, 13）。

1-3-6 非病原性病原菌による交叉防除（植物体の抵抗性の誘導）

病原性の弱い菌を植物に接種し、次いで病原性の強い菌を接種すると発病は著しく軽減される。このような現象を交叉防御（cross-protection）という。交叉防御は非

病原性菌を用いて宿主の抵抗性を誘導して病害防除をはかる生物的防除法である。非病原性の *Fusarium oxysporum* をサツマイモの苗の切り口に接種すると *F. oxysporum* f. sp. *batatas* によって引き起こされるつる割れ病が抑制された報告がある（14）。また、非病原性 *Rhizoctonia* によるキュウリ苗立枯病の抑制も報告されている（15）。

1-3-7 アレロパシー

アレロパシーとは、生物（微生物を含む）が他の生物に影響を与える現象のことで、日本では他感作用と訳されている。病原菌の生育制御や殺菌に働く物質を利用して防除効果を発現する。日本や中国で古くから伝行的に行われてきた混植、間作、輪作などの農法はアレロパシーを経験的に利用してきた方法と考えられている。ユウガオとネギの混植にはネギがアリシンなど（他感物質）の抗菌物質を放出して、病原菌の生育を抑制することが明らかにされている。

1-4 微生物農薬の土壌接種法

植物病を抑制する拮抗微生物を実際の土壌に接種する方法がこれまでに5種類報告されており、それぞれ特徴や期待している効果が異なっている。その土壌投入法は、微生物を直接土壌に投入する方法、担体に吸着させて土壌に投入する方法、拮抗微生物と親和性のある植物に初めに接種して、その植物を混植する方法、植物に直接接種する方法、種子にコーティングする方法である。

1-4-1 直接投入

拮抗微生物を大量に培養して直接土壌に投入する方法は、一般的には土着の微生物との競争に負けてしまい、ほとんどの場合、直接的な防除効果は期待できない。ただし、特殊な条件である場合は手軽であるため広く利用されている。例えば、ポット栽培などで土の量が少なく一定の土量に対して大量投入が可能な場合、土壌消毒後で土着の微生物が少ない場合、すでに拮抗微生物の定着する場所や栄養がある場合などがある。

1-4-2 担体吸着

拮抗微生物を土壌に直接投入しても、微生物の住みかや栄養が無いために、すでに生息している土壌微生物との競合に負けてしまい、拮抗作用が発揮されにくい。そこで、拮抗微生物を土壌へ定着させるために、初めに拮抗微生物を担体に定着させて、この担体ごと栄養とともに土壌中に投入する方法がある。市販の微生物改良資材の多くは拮抗微生物を担体に吸着させたものである。

1-4-3 混植

拮抗微生物を親和性のある植物に初めに接種し、これを栽培作物の根圏に混植することによって、拮抗微生物を親和性植物の根で増殖して土壌に定着させ、親和性がない栽培作物の防除効果を安定させることができる。ウリ類や果樹類とネギ属植物との混植は、ネギの根に共生する *Pseudomonas* を利用した植物病の防除法である。

1-4-4 植物への直接接種

植物に親和性があり、しかも植物組織内に侵入できる微生物は病原菌や菌根菌などの共生菌である。これらの菌の中で抗菌活性を示す微生物を直接植物に接種する方法である。非病原性の *Fusarium* (14) や *Rhizoctonia* (15)、弱病原菌、菌根菌、共生菌などの接種が報告されている。

1-4-5 種子コーティング

拮抗微生物を種子に接種（コーティング）する方法で、植物の根に親和性があり、しかも種子に混和しても生存できる拮抗微生物を利用する方法である。種子にコーティングされた微生物は植物が発芽するまでは休眠状態にあるが、植物が発芽すると、植物からの滲出物によって活性化し抗菌活性を示す。*Pseudomonas* sp. を使った種子コーティングの手法 (16) や *Enterobacter* によるキュウリと洋なしの苗立枯病の抑制 (17) が報告されている。

1-5 *Alcaligenes* sp. の特性

Alcaligenes sp. は周鞭毛を有するグラム陰性桿菌である。系統的に *Pseudomonas* sp. に近いグラム陰性菌であり、菌の特徴として、従属栄養硝化反応を行う、菌体内に生分解性高分子を生産する、難分解性物質を分解する、高い薬剤耐性

を示すなどが挙げられる。このように利用価値のある興味深い特徴を数多く保持しているため、近年、大腸菌、*Pseudomonas* sp.に次いで盛んに研究が行われている。

1-5-1 従属栄養硝化

Alcaligenes 属の菌は好気条件下で従属栄養硝化反応を行うこと（18-20）や嫌気条件下で脱窒反応を行うこと（21-25）が報告されている。その硝化脱窒に関与する酵素は単離精製されて、各酵素の性質が研究されている（26-31）。最近になって好気条件下で硝化反応と脱窒反応を同時に行う菌が報告されてきた。これらの菌の硝化脱窒能は、培養条件や培養方法など様々な条件で研究されている（32-40）。さらに独立栄養硝化菌の硝化反応との比較も行われている（41, 42）。従属栄養硝化菌の場合、独立栄養硝化菌に比べて菌の増殖速度が速く、大量の菌による硝化脱窒反応が可能であるため、全体の硝化脱窒量が多くなる点から生物学的にも工業的にも非常に注目を集めている（43）。本研究で使用した No.4 株も従属栄養硝化を行い、窒素循環に関与していることが分かってきた。

1-5-2 生分解性高分子生産

Alcaligenes 属の菌は菌体内に大量の生分解性の高分子を生産することが報告されている。*Alcaligenes eutrophus* は butyric acid と pentanoic acid から 3-hydroxybutyrate と 3-hydroxyvalerate の共高分子を生産し、原料の割合や培養時の溶存酸素濃度によって、高分子の組成を変えることができた（44, 45）。さらに、大腸菌への組み換え体による高い生産性を持つ菌株を取得し（46）、その菌の高分子生産量を元株の生産量と比較している（47）。一方、その高分子を分解する酵素が *Alcaligenes* 属の菌体内から単離されており（48）、菌体内で高分子の合成と分解の両方を行うことが分かっている。本研究で使用した No.4 株も菌体内に高分子を生産し、炭素源を菌体内に貯蔵することで他の菌との生存競争に打ち勝ち、優先菌となることが分かってきた。

1-5-3 難分解性物質分解

Alcaligenes 属の菌は多くの難分解性物質を分解することが報告されている。*Alcaligenes eutrophus* JMP134 は 2, 4, 6-トリクロロフェノール、2, 4, 6-トリブロモフェノールを唯一の炭素源として増殖し、芳香族化合物を完全に分解した（49）。

またフェノール誘導によって培地中の高濃度のトリクロロエチレンを40～60%分解した(50)。さらに、*Alcaligenes* sp.にはナフタレンを分解する菌や培養時の溶存酸素濃度によってトリクロロ安息香酸を分解する代謝経路が変わる菌もいた(51, 52)。

1-5-4 薬剤耐性

Alcaligenes 属の菌は非常に高い、薬剤、重金属耐性を示すことが報告されている。*Alcaligenes eutrophus* CH34は菌体内に薬剤耐性プラスミド pMOL28 や pMOL30 をもち、様々な重金属や抗生物質に高い耐性を示した(53)。これらのプラスミドによって、Ni, Co, Cd, Znに対する耐性が5～10倍上昇した。また、プラスミドの塩基配列が決定されており、他の菌の耐性遺伝子と高いホモロジーを示した(54, 55)。本研究で使用した No.4 株は耐性プラスミドを保持しないが、抗生物質に対して高い耐性を示し、他の菌より一般土壌で優先的に存在することが分かってきた。

1-6 植物病原菌 *Rhizoctonia solani* K-1

Rhizoctonia 属は植物病原菌として、土壌中に生息する腐生菌として、あるいはラン科植物の菌根菌として古くから知られている不完全菌である。多くの作物に種々の病気を引き起こし、主として土壌伝染性を示した。*R.solani*は孢子を形成せず、菌核または罹病植物残さでの厚膜化細胞といった耐久体を形成する(56)。通常、温度の上昇に伴って菌糸が活動を始め、宿主植物の根を侵すために、根の表面で短い分岐菌糸の複雑な菌糸集塊をつくる。この侵入子座の下側から多数の侵入菌糸を生じ、その菌糸束を構成する多くの菌糸の協力作用で、無傷の周皮を貫通する(57)。菌は土壌の環境が pH5.0～8.1、湿度 20～80%の条件で増殖しやすく、比較的土壌表面に近い0～0.5cmの深さで活動が活発である(58)。さらに、土壌 1g 当たり 0.1～1個という低い菌密度でも甚大な被害を及ぼす(59)。

本研究では No.4 株の植物病抑制能を検討するために *R.solani* K-1 を使用した。*R.solani* K-1 は神奈川県のカイトウより単離されたもので、菌糸は 10～35℃で生育し、最適温度は 30℃付近である。*R.solani* K-1 の分類型は、培養型 IIIA、菌糸融合群 (Abastinisus Group) AG-4 であり、高温の苗立枯病系に属する(60)。苗立枯病は植物体の幼苗期に感染して皮層などの柔組織を壊死させたり(61)、出芽前に感染して発芽不良を引き起こしたりする植物病である。*R.solani* K-1 は本研究にお

いて使用したトマト（Ponderosa, タキイ種苗（株））に対して発芽後約10日以内に苗立枯病を引き起こした。

1-7 本研究の目的

本研究では、栄養の乏しい培地で高い抗菌活性を示す *Alcaligenes faecalis* No.4 の特徴を検討し、抗菌物質を決定し、さらに微生物農薬として利用するための基礎研究を行った。No.4 株の特徴である、植物病原菌に対する抗菌スペクトルや抗生物質耐性や従属栄養硝化の検討、抗菌物質の同定とその生産を最大にする菌の培養条件の検討、菌の土壌定着性の検討、植物病抑制能とその抑制能を最大にする菌の接種条件の検討を行い、今後 No.4 株を微生物農薬として利用していくための基礎データを得ることを目的とした。さらに、抗菌物質非生産株をトランスポゾン変異によって取得し、その菌の植物病抑制能も検討し、抗菌メカニズムの解明を行った。

1-8 本研究の概要

本論文は以下の第2章～第8章より構成されている。第2章では *Alcaligenes faecalis* No.4 の同定や *in vitro* での抗菌活性や従属栄養硝化反応など No.4 株の様々な特徴を検討して No.4 株の抗菌物質を同定した。第3章では No.4 株の抗菌物質である NH_2OH の生産量を最大にする No.4 株の最適培養条件を検討した。第4章では No.4 株の土壌系での挙動を検討した。第5章及び第6章では No.4 株と抗菌物質 NH_2OH による実際の植物病を抑制できるかどうかと、その抑制能を最大にする菌の土壌接種条件を検討した。第7章では No.4 株の抗菌物質非生産株をトランスポゾン変異によって取得し、その植物病抑制能も検討した。各章の内容は以下に述べる通りである。

第2章は「*Alcaligenes faecalis* No.4 の性質と抗菌物質の同定」と題し、No.4 株の同定を行い、菌の抗菌活性が NH_4^+ に依存して高くなることと菌が従属栄養硝化を行うことから、No.4 株が生産する抗菌物質を同定した。さらに植物病原菌に対する抗菌活性や抗生物質耐性や生分解性高分子生産などを調べ、No.4 株が土壌で優先菌になるのに有利な特徴について検討した。

第3章では「*A. faecalis* No.4 の抗菌物質 NH_2OH 生産条件の検討」と題し、抗菌物質の生産量が最大となる No.4 株の培養条件を培地の組成、培地の初期 pH、培

養温度について検討した。

第4章では「*A.faecalis* No.4の土壌における挙動」と題し、土壌温度や土壌微生物がNo.4株の土壌定着性に及ぼす影響について、滅菌、非滅菌土壌で検討した。

第5章では「*A.faecalis* No.4によるトマト苗立枯病の抑制」と題し、No.4株の培養液によって実際に植物病を抑制できるかどうかを滅菌、非滅菌土壌で検討した。さらにNo.4株が生産する抗菌物質による植物病の抑制も検討し、抗菌物質と病気の抑制効果の相関を調べた。その時の土壌微生物の影響も調べた。

第6章では「*A.faecalis* No.4による植物病抑制の最適条件」と題し、植物病抑制能が最大となるNo.4株の土壌接種法を添加法、添加量、培養時間について検討した。

第7章では「*A.faecalis* No.4の抗菌活性消失株の単離と性質の検討及び植物試験」と題し、トランスボゾン変異によりNo.4株のNH₂OH非生産株を取得し、その菌株の植物病原菌に対する抗菌活性や従属栄養硝化反応について検討した。さらにトマト苗立枯病の抑制効果について元株と比較し、抗菌物質NH₂OHの植物病への関係を実証した。

1-9 参考文献

1. 駒田 旦、稲葉 忠興他編：病害防除の新戦略 全国農村教育協会 (1992)
2. (株)三菱化成安全化学研究所編：1.微生物農薬の開発状況 微生物農薬の現状と安全性評価，化学工学日報社，21-103 (1993)
3. Moore, L. W., and Warren, G.: *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biocontrol of crown gall, Ann. Rev. Phytopathol., 17, 163-179 (1979)
4. Thomashow, L. S., Weller, D. M.: Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, J. Bacteriol., 170, 3499-3508 (1988)
5. Weller, D. M.: Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria, Ann. Rev. Phytopathol., 26, 379-407 (1988)
6. Loper, J. E.: Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain, Phytopathology, 78, 166-172 (1988)

7. Becker, J. O., and Cook, R. J.: Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased growth response of wheat by fluorescent pseudomonads, *Phytopathology*, 78, 778-782 (1988)
8. Hader, Y., Chet, I., and Henis, Y.: Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*, *Phytopathology*, 69, 64-68 (1979)
9. Mihuta, L., and Rowe, R. C.: *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems, *Phytopathology*, 76, 306-312 (1986)
10. Wolffhechel, H., and Jensen, F. D.: Use of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* for the biological control of post emergence damping-off and root rot of cucumbers caused by *Pythium ultimum*, *J. Phytopathol.*, 136, 221-230 (1992)
11. Old, K. M.: Giant soil amoebae cause perforation of conidia of *Cochlioides sativus*, *Trans. Brit. Microl. Soc.*, 68, 277-320 (1977)
12. Latzko, F., and Hampel, W.: Enzyme formation by a yeast cell wall lytic *Arthrobacter* species: Chitinolytic activity, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 44, 185-189 (1995)
13. Kalbe, C., Marten, P., and Berg, G.: Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties, *Microbiol. Res.*, 151, 433-439 (1996)
14. Ogawa, K., and Komada, H.: Biological control of Fusarium wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*, *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 50, 1-9 (1984)
15. Villajuan, A. R., Kageyama, K., and Hyakumachi, M.: Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of cucumber by non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia*, *Eur. J. Plant Pathol.*, 102, 227-235 (1996)
16. Taylor, A. G., and Harman, G. E.: Concepts and technologies of selected seed treatments, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28, 321-339 (1990)
17. Hadar, Y., Harman, G. E., Taylor, A. G., and Norton, J. M.: Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp., *Phytopathology*, 73,

1322-1325 (1983)

18. Verstraete, W.: Heterotrophic nitrification in soils and aqueous media, *Izvestija Akad. Nauk. Ser. Biol.*, 4, 541-558 (1975)
19. Castignetti, D., and Gunner, H. B.: Sequential nitrification by an *Alcaligenes* sp. and *Nitrobacter agilis*, *Can. J. Microbiol.*, 26, 1114-1119 (1980)
20. Nishio, T., Yoshikura, T., Chiba, K., and Inouye, Z.: Effects of organic acids on heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* OKK17, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1574-1578 (1994)
21. Castignetti, D., and Hollocher, T. C.: Vigorous denitrification by a heterotrophic nitrifier of the genus *Alcaligenes*, *Curr. Microbiol.*, 6, 229-231 (1981)
22. Nason, A.: Symposium on metabolism of inorganic compounds. II. Enzymatic pathways of nitrate, nitrite, and hydroxylamine metabolism, *Bacteriol. Rev.*, 26, 16-41 (1962)
23. Payne, W. J.: Reduction of nitrogen oxides by microorganisms, *Bacteriol. Rev.*, 37, 409-452 (1973)
24. Castignetti, D., and Gunner, H. B.: Nitrite and nitrate formation by an *Alcaligenes* sp., *Curr. Microbiol.*, 5, 379-384 (1981)
25. Kester, R. A., De-Boer, W., and Laanbroek, H. J.: Production of NO and N₂O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3872-3877 (1997)
26. De-Gier, J. L., Lubben, M., Reijnders, W. N. M., Tipker, C. A., Slotboom, D., van-Spanning, R. J. M., Stouthamer, A. H., and van-der-Oost, J.: The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*, *Mol. Microbiol.*, 13, 183-196 (1994)
27. Kakutani, T., Beppu, T., and Arima, K.: Regulation of nitrite reductase in the denitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* S-6, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 23-28 (1981)
28. Kakutani, T., Watanabe, H., Arima, K., and Beppu, T.: Purification and properties of a copper-containing nitrite reductase from a denitrifying bacterium, *Alcaligenes faecalis* S-6, *J. Biochem.*, 89, 453-461 (1981)
29. Kukimoto, M., Nishiyama, M., and Beppu, T.: X-ray structure and site-directed mutagenesis of a nitrite reductase from *Alcaligenes faecalis* S-6: roles of two copper atoms in nitrite reduction, *Biochemistry*, 33, 5246-5252 (1994)

30. Wehrfritz, J., Reilly, A., Spiro, S., and Richardson, D. J.: Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*, FEBS Letts., 335, 246-250 (1993)
31. Moir, J. W. B., Crossman, L. C., Spiro, S., and Richardson, D. J.: The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*, FEBS Letts., 387, 71-74 (1996)
32. Otte, S., Grobбен, N. G., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M., and Kuenen, J. G.: Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions, Appl. Environ. Microbiol., 62, 2421-2426 (1996)
33. Robertson, L. A., Dalsgaard, T., Revsbech, N. P., and Kuenen, J. G.: Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry, FEMS Microbiol. Eco., 18, 113-120 (1995)
34. Arts, P. A. M., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.: Nitrification and denitrification by *Thiosphaera pantotropha* in aerobic chemostat cultures, FEMS Microbiol. Eco., 18, 305-316 (1995)
35. Kuenen, J. G., and Robertson, L. A.: Combined nitrification-denitrification processes, FEMS Microbiol. Rev., 15, 109-117 (1994)
36. Van-Niel, E. W. J., Arts, P. A. M., Wesselink, B. J., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.: Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures, FEMS Microbiol. Eco., 102, 109-118 (1993)
37. Arts, P. A. M., Robertson, L. A., Bos, P., and Kuenen, J. G.: Growth of *Thiosphaera pantotropha* in a continuous-flow stirred tank reactor, Wat. Sci. Tech., 26, 2177-2180 (1992)
38. Van-Niel, E. W., Braber, K. J., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.: Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD, Anton. Leeuwenhoek, 62, 231-237 (1992)
39. Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.: Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria, Anton. Leeuwenhoek, 57, 139-152 (1990)
40. Anderson, I. C., Poth, M., Homstead, J., and Burdige, D.: A comparison of NO

- and N₂O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*, Appl. Environ. Microbiol., 59, 3525-3533 (1993)
41. Inamori, Y., Wu, X. L., and Mizuochi, M.: N₂O producing capability of *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi* and *Alcaligenes faecalis*, Wat. Sci. Tech., 36, 65-72 (1997)
 42. Jetten, M. S. M., de-Bruijn, P., and Kuenen, J. G.: Hydroxylamine metabolism in *Pseudomonas* PB16: involvement of a novel hydroxylamine oxidoreductase, Anton. Leeuwenhoek, 71, 69-74 (1997)
 43. Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., de-Vries, S., van-Loosdrecht, M. C. M., and Kuenen, J. G.: Novel principle in the microbial conversion of nitrogen compounds, Anton. Leeuwenhoek, 71, 75-93 (1997)
 44. Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., and Soga, K.: Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids, Appl. Microbiol. Biotechnol., 28, 330-334 (1988)
 45. Lefebvre, G., Rocher, M., and Braunegg, G.: Effects of low dissolved-oxygen concentrations on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Alcaligenes eutrophus*, Appl. Environ. Microbiol., 63, 827-833 (1997)
 46. Hahn, S. K., Chang, Y. K., and Lee, S. Y.: Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*, Appl. Environ. Microbiol., 61, 34-39 (1995)
 47. Sim, S. J., Snell, K. D., Hogan, S. A., Stubbe, J., Rha, C., and Sinskey, A. J.: PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo*, Nature Biotech., 15, 63-67 (1997)
 48. Saito, T., Suzuki, K., Yamamoto, J., Fukkui, T., Miwa, K., Tomita, K., Nakanishi, S., Odani, S., Suzuki, J., and Ishikawa, K.: Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*, J. Bacteriol., 171, 184-189 (1989)
 49. Harker, A. R., and Kim, Y.: Trichloroethylene degradation by two independent aromatic-degrading pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP134, Appl. Environ. Microbiol., 56, 1179-1181 (1990)

50. Clement, P., Matus, V., Cardenas, L., and Gonzalez, B.: Degradation of trichlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134, FEMS Microbiol. Letts., 127, 51-55 (1995)
51. Krooneman, J., Wieringa, E. B. A., Moore, E. R. B., Gerritse, J., Prins, R., and Gottschal, J. C.: Isolation of *Alcaligenes* sp. strain L6 at low oxygen concentrations and degradation of 3-chlorobenzoate via a pathway not involving (chloro) catechols, Appl. Environ. Microbiol., 62, 2427-2434 (1996)
52. Guerin, W. F., and Boyd, S. A.: Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in *Pseudomonas putida* and an *Alcaligenes* sp. under different culture conditions, Appl. Environ. Microbiol., 61, 4061-4068 (1995)
53. Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., and van-Gijsegem, F.: *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals, J. Bacteriol., 162, 328-334 (1985)
54. Taghavi, S., Provoost, A., Mergeay, M., and van-der-Lelie, D.: Identification of a partition and replication region in the *Alcaligenes eutrophus* megaplasmid pMOL28, Mol. Gen. Genet., 250, 169-179 (1996)
55. Schmidt, T., and Schlegel, H. G.: Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A, J. Bacteriol., 176, 7045-7054 (1994)
56. 我孫子 和雄: 植物病原菌類図説 全国農村教育協会 (1992)
57. 寺中 理明: 基礎微生物学 6 植物病理学 - 植物の病気とその病原 - 培風館 (1986)
58. 「新版 土壤病害の手引」編集委員会編: 新版 土壤病害の手引 日本植物防疫協会 (1984)
59. 小川 圭: 土壤病害をどう防ぐか 農山漁村文化協会 (1988)
60. 牛山 欣司, 西村 十郎, 青野 信男: *Rhizoctonia solani*によるケイトウの茎腐病 (新称) 神奈川県園芸試験場研究報告, 34, 33-37 (1987)
61. 西尾 道徳: 土壤微生物の基礎知識 農産漁村文化協会 (1989)

第2章 *Alcaligenes faecalis* No.4の性質と抗菌物質の同定

2-1 緒言

分類学上 *Alcaligenes* 属は *Pseudomonas* 群に含まれており、系統的に最も類似している菌株には、*Thiobacillus* spp., *Rhodocyclus*, *Pseudomonas* (*pseudomallei* 群)がある(1)。*Alcaligenes* 属は周鞭毛を有する非発酵性のグラム陰性桿菌であり、水、土壌などの自然界に広く分布している(2)。この群に含まれる *Pseudomonas* sp. (3, 4) や *A. faecalis* (5, 6) の中には、プレート上で植物病原菌に対して高い抗菌活性を示す菌株や実際の圃場で植物病を抑制する菌株が報告されており、環境に優しい新規の微生物農薬としての利用に関心が集まっている。これらの候補株は、抗生、競争、寄生、捕食等の拮抗作用によって植物病原菌を抑制している。抗生物質の生産や炭素源や窒素源などの生存に必要な物質の優先的な取り込みによって病原菌の増殖を阻害したり(7-9)、溶菌酵素等によって細胞膜を分解して他の微生物に害を与えたりして、病原菌を抑制している。*P. cepacia* の生産する cepacidine A (10) や *P. syringae* の生産する phytotoxin (11) 等が抗生物質として、*P. fluorescens* sp. strain 267 の生産する pyoverdine (12) や *P. putida* の生産する pseudobactin (13) や *Alcaligenes* sp. の生産する alcaligin (14) が、鉄をキレートする物質 siderophore として報告されている。

当研究室に於いても新規の微生物農薬の開発を目的として植物病を抑制する堆肥に注目し、植物病抑制菌 *Bacillus subtilis* NB22, RB14, YB8 を単離した(15)。そしてこれらの菌株は植物病糸状菌や植物病原細菌に対して幅広い抗菌スペクトルを示すことが明らかになった(16)。またこれらの菌の抗菌物質は、菌が生産するペプチド性抗生物質 iturin A (17, 18) やプリパスタチンであることが分かった(19)。これらの抗生物質は長いアルキル鎖と環状アミノ酸を有する両親媒性の環状ペプチドであり、様々な植物病原菌に強い抗菌活性を示した。さらに NB22 株では土壌安定性を調べ(20)、土壌を用いた植物試験において *Rhizoctonia solani* によるトマト苗立枯病や *Pseudomonas solanacearum* によるトマト青枯病に対して抑制効果を示すことが確認された(21)。また RB14 株は NB22 株以上の植物病原菌の抑制能を示し、植物試験で *R. solani* K-1 によるトマト苗立枯病を抑制することが明らかにされ、その抑制効果は抗生物質 iturin A と界面活性剤 surfactin の相乗効果でさらに高いものに

なった(22)。

ところで、以上のように細菌を微生物農薬として利用する場合、土壌に近い条件で抗菌活性を示し、さらに活性の高い菌株を取得することは、非常に重要なことである。実際に植物が生育する土壌は栄養の乏しいことが多く(23)、貧栄養状態でも高い抗菌活性を示す菌株を微生物農薬として利用することは、圃場での抑制効果を上げるためにも重要である。当研究室では、栄養の乏しい土壌でも有効にはたらく菌株を得るために、植物病原菌に対して抗菌活性を示す菌株を単離し、それらの菌株が合成培地上で植物病原菌に対して形成する阻止円をプレート上で比較した。そして栄養の乏しい合成培地で最も大きな阻止円を形成した菌株を得た。以下、この菌株を No.4 株と称する。No.4 株は微生物農薬として知られている NB22 株より栄養の乏しい培地で大きな阻止円を形成し、両菌株の植物病原菌に対する抗菌スペクトルも異なることから、No.4 株は NB22 株と違う抑制メカニズムによって植物病原菌の増殖を抑制することが考えられた。

本章では No.4 株の様々な性質を検討し、No.4 株の生産する抗菌物質の同定を行った。初めに *in vitro* における様々な植物病原菌に対する抗菌活性を栄養の豊富な L-agar 培地と栄養の乏しい MM-agar 合成培地で調べた。次に No.4 株の抗菌活性が NH_4^+ 濃度に依存することと No.4 株が従属栄養硝化反応を行うことから(24-30)、硝化反応中に生産される硝化産物に注目し、No.4 株の植物病原菌に対する抗菌物質を同定した。さらに No.4 株の増殖速度や炭素源の資化性等の基本的な特徴と No.4 株の属する *Alcaligenes* 属の特徴である抗生物質耐性(31-34)、生分解性高分子の生産(35-37)等の特徴についても調べた。

2.2 実験材料及び方法

2-2-1 菌株

Alcaligenes faecalis No.4 (以後 No.4 株と称する)は 50%グリセリン溶液で -40, -20, -4℃で保存した。この菌の分離源は活性汚泥である。

植物病原菌はまとめて Table 2-3 に示す。植物病原菌は PDA 培地のスラントで室温で保存し、半年に 1 回植え継ぎをした。No.4 株の抗菌物質の同定には、*F.oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119 (以後 *F.oxysporum* J1 と称する)と *Rhizoctonia solani* K-1 (以後 *R.solani* K-1 と称する)を使用した。

2-2-2 培地

使用した培地を Table 2-1 に示す。L-agar 培地と MM-agar 培地はそれぞれ L, MM 培地に agar を 1.5% 添加した。いずれの培地もオートクレーブ (120℃, 20 min., 1.0~1.2 kg/cm²) により滅菌処理した。

2-2-3 *A.faecalis* No.4 の同定

栄養の乏しい MM-agar 培地において、植物病原菌 *F.oxysporum* J1 に非常に強い抗菌活性を示す No.4 株を L-agar 培地、30℃ で 3 日間培養した。増殖してきた菌株を白金耳でかき取り、さらに L-agar 培地に植え継いだ。この操作を 4 回繰り返し、菌を純化した。純化した菌株は *F.oxysporum* J1 に対する抗菌活性を再度確認した後、財団法人日本食品分析センターで同定された。No.4 株の同定は、主な性状を試験した後、腸内細菌以外のグラム陰性桿菌同定キット API20NE (ビオメリュー) によって行われた。

2-2-4 *A.faecalis* No.4 の植物病原菌に対する抗菌活性

植物病原菌 16 種類を使用して、L-agar, MM-agar 培地における No.4 株の抗菌スペクトルを決定した。使用した病原菌のうち、植物病原性糸状菌は、PDA スラント上で 30℃、3~6 日間増殖させ、そこに Tris-HCl バッファー (pH7.0) 6ml を加えて菌体を白金耳でかき出し、攪拌して植物病原菌の菌体懸濁液を調製した。それぞれの懸濁液 200 μ l をプレート上に塗抹し、その上に paper disk (直径 8mm) を置き、No.4 株の培養液 20 μ l 添加した。30℃ で 7 日間培養した後、No.4 株のコロニーの周りに形成された阻止円によって抗菌活性を判断した。植物病原性細菌である *Xanthomonas oryzae* は、L 培地で 30℃、1 日培養した培養液 1ml を、L-agar 培地 99ml に混合し、菌体懸濁プレートを作製した。このプレートに No.4 株の培養液 20 μ l 添加し、糸状菌の場合と同様に抗菌活性を調べた。

また、MM-agar 培地の唯一の窒素源である NH₄⁺濃度を (NH₄)₂SO₄ で 0~100 g/l に調製した培地を作製し、その培地における No.4 株の抗菌活性も測定した。

2-2-5 ヒドロキシルアミン (NH₂OH) の定量

NH₂OH の定量は R.C.Burrell らの方法 (38) を参考にした。分析手順を Fig.

2-1に示す。No.4株の培養液 1mlを遠心分離（8000rpm x 1min.）し、さらにフィルター濾過（ADVANTEC:pore size 0.20 μ m）して除菌液を得た。この除菌液 200 μ lに 0.05M リン酸バッファー（pH6.8）200 μ lと滅菌水 160 μ lを加えた。次にトリクロロ酢酸水溶液（12%）40 μ l、8-キノリノール溶液（1g/100ml脱水エタノール）200 μ l、1.0M NaCO₃水溶液 200 μ lを順に添加した。試薬を添加する度にボルテックスにより十分攪拌した。合計 1mlになった溶液を熱水（約 80℃）で 1分加熱し、15分冷却の後に波長 705nm の吸光度を測定した。NH₂OH の検量線は NH₂OH 標準液を用いて NH₂OH 量と吸光度との相関性から作成した。

2-2-6 亜硝酸イオン（NO₂⁻）、硝酸イオン（NO₃⁻）の定量：イオンクロマトグラフィー

NO₂⁻、NO₃⁻の定量はイオンクロマトグラフィー（HIC-6A, SHIMADZU）で行った。No.4株の培養液 1mlを遠心分離（8000rpm x 1min.）し、さらにフィルター濾過（ADVANTEC:pore size 0.20 μ m）して除菌液を得た。フィルター（C₁₈CARTRIDGES, SEP-PAK）で有機物を除去した後、イオンクロマトグラフィーで NO₂⁻、NO₃⁻を定量した。運転条件は、カラム：Shim-pack IC-A1, SHIMADZU、移動相：1mM p-ヒドロキシ安息香酸と 1mM N,N-ジエチルエタノールアミン（pH7.9）、流速：1.5ml/min.、カラム温度：40℃である。検量線は NO₂⁻（NaNO₂）、NO₃⁻（NaNO₃）標準液を用いて NO₂⁻、NO₃⁻量とピーク面積との相関性から作成した。

2-2-7 硝化産物の植物病原菌に対する抗菌活性の測定法

F.oxysporum J1の孢子懸濁液、*R.solani* K-1の菌糸懸濁液を 200 μ l塗抹した MM-agar培地にペニシリンチューブ（内径 8mm, 外径 10mm）を置き、その中に硝化産物 100mg/lの標準液（NH₂OH, NO₂⁻（NaNO₂）, NO₃⁻（NaNO₃））を 100 μ lずつ添加した。この病原菌プレートで 30℃で 1週間培養後、硝化産物の植物病原菌に対する阻止円を観察した。

2-2-8 寒天培地からの硝化産物の抽出法

PDA培地上に No.4株が植物病原菌に対して形成した阻止円の内側の培地を葉さじでくりぬき、滅菌水 40mlとともにホモジナイザーカップに入れ、ホモジナイズ（10000rpm x 1min., 4℃）した。1時間振盪後、遠心分離（8000rpm x 20min., 4℃）

によって寒天培地を除去し、得られた上清をフィルター濾過 (ADVANTEC: pore size 0.20 μ) により除菌した。この抽出液を分析して、寒天培地に生産された硝化産物を測定した。

2-2-9 NH_2OH の植物病原菌に対する最小阻止濃度 (MIC)

NH_2OH の植物病原菌 *F.oxysporum* J1、*R.solani* K-1 に対する MIC を測定した。 NH_2OH を 0~200mg/l 含む PDA 培地に、*R.solani* K-1 の場合は菌核の角片を置き、*F.oxysporum* J1 の場合は孢子懸濁液 (4.4×10^7 CFU/plate) を塗布した。各プレートに 30℃ で 1 週間培養した後、植物病原菌の生育が完全に阻止された NH_2OH の最低濃度 (MIC) を決定した。

2-2-10 No.4 株と植物病原菌の混合培養

No.4 株の菌体懸濁液 100 μ l (1.1×10^9 CFU/ml) と *F.oxysporum* J1 孢子懸濁液 100 μ l (4.4×10^8 CFU/ml)、*R.solani* K-1 の 5mm 角片をそれぞれ L, MM 培地に同時に植菌し、30℃ で 3 日間混合培養した。培養後の菌の状態を光学顕微鏡で観察し、培地中の硝化産物濃度を測定した。

2-2-11 *A. faecalis* No.4 の平均倍加時間

培地組成や培養温度による No.4 株の平均倍加時間を測定した。L 培地で 30℃、1 日培養した No.4 株の培養液を各培地 40ml に 1% 植菌し、120spm で振とうしながら経時的に培養液をサンプリングして、波長 660nm における吸光度を測定した。吸光度と時間の関係を示す片対数グラフの直線部分 (対数増殖期) の傾きから平均倍加時間を算出した。

2-2-12 *A. faecalis* No.4 の炭素源資化性

一般的な炭素源である糖や菌の代謝に関係する炭水化物を中心に、No.4 株の炭素源の資化性を調べた。さらに大気中の悪臭物質に指定されている低級カルボン酸 (酢酸エチル、プロピオン酸エチル、吉草酸エチル) についても調べた。MM 培地で 30℃、120spm で 1 日培養した培養液から遠心分離 (8000rpm x 1min.) によって菌体を得た。その菌体を Tris-HCl バッファー (pH7.0) で 2 回洗菌し、同量の滅菌水に懸濁し、各物質を唯一の炭素源とする MM 培地に 1% 植菌した。30℃、120spm で 3

日間培養した後、No.4株の増殖の有無から炭素源の資化性を判断した。

2-2-13 *A.faecalis* No.4の抗生物質耐性

抗生物質 0~200mg/lを含むL培地 5mlにNo.4株を1%植菌し、30℃、120spmで3日培養した後、No.4株の増殖の有無から抗生物質耐性を判断した。使用した抗生物質はテトラサイクリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、カナマイシン、アンピシリンである。

2-2-14 元素分析

No.4株の培養液 100mlを遠心分離 (8000rpm x 10min.) し、沈殿した菌体懸濁液を Tris-HCl バッファー (pH6.8) で2回、滅菌水で1回十分に洗浄し、菌体の外側に吸着している物質を取り除いた。次に真空乾燥によって菌体を完全に乾燥させて、さらに乳鉢ですり潰した。粉末状にした菌体を元素分析にかけて、菌体中の各元素 (水素、炭素、窒素、その他) の重量%を測定した。また、No.4株の菌体内に生産される生分解性高分子は K.Soga らの方法によって取得した (37)。乾燥した粉末状の菌体にクロロホルムと蒸留水を加え、分液ロートで有機層を分離抽出した (液層間にできるエマルジョンは飽和 NaCl で除いた)。抽出した有機層をエバポレータで乾燥後、少量のメタノールに再溶解させてヘキサンで再結晶を行った。得られた結晶を元素分析にかけて、菌体内の生分解性高分子に含まれる元素の重量%を計算した。

2-3 結果

2-3-1 *A.faecalis* No.4の同定

No.4株の同定結果を Table 2-2、顕微鏡写真を Fig. 2-2 に示す。同定の結果、No.4株は化学合成従属栄養微生物の *Alcaligenes faecalis* であることが分かった。化学合成従属栄養微生物は、化学物質をエネルギー源として有機化合物を主要な炭素源とする生物である。*Alcaligenes* 属は周鞭毛を有する非発酵性のグラム陰性桿菌で、水や土壌等の自然界に広く分布している。*A. faecalis* は、人畜に定着せず生物に対して病原性を全く示さない微生物であり、これまでに土壌病原菌であるという報告はない。

2-3-2 *A.faecalis* No.4 の植物病原菌に対する抗菌活性

プレート試験による No.4 株の抗菌スペクトルを Table 2-3 に示す。抗菌活性には栄養に富む L-agar 培地と栄養の乏しい合成培地の MM-agar 培地を使用し、抗菌活性の評価には No.4 株コロニーの周囲に形成される阻止円の直径を用いた。No.4 株は今回検討した 16 種類すべての植物病原菌に対していずれかの培地で抗菌活性を示した。No.4 株は糸状菌だけではなく、細菌の *Xanthomonas oryzae* にも抗菌活性を示した。L-agar 培地よりも MM-agar 培地の方が 2 倍程度阻止円が大きく、植物病原菌を効果的に抑制した。No.4 株は栄養が乏しいために抗菌活性が低くなると予想された MM-agar 培地でも植物病原菌に強い抗菌活性を示した。栄養の乏しい一般土壌に No.4 株を施用したときの抗菌活性効果も期待できた。

次に、ポット試験による No.4 株の植物病抑制効果を Table 2-4 に示す。植物試験は 8 種類の植物病について行った。No.4 株培養液の接種は病原菌を散布する前日（予防）か、散布した翌日（治療）に実施した。植物病の抑制効果は A～D の 4 段階で評価し、A：95～100%、B：80～94%、C：60～79%、D：0～59%とした。No.4 株の培養液によるキュウリ葉上でのキュウリうどん粉病原菌 *Sphaerotheca fuliginea* の防除率は 95%以上であった。

2-3-3 硝化産物 (NH_2OH , NO_2^- , NO_3^-) の検量線

吸光度変化による NH_2OH 定量の検量線を Fig. 2-3 に示す。 NH_2OH (mg/l) = $(\text{ABS}_{705\text{nm}} - 0.007) \times 0.1257$ ($R^2=0.998$)、有効範囲は $\text{ABS}_{705\text{nm}}=0\sim0.25$ である。

イオンクロマトグラフィーによる NO_2^- , NO_3^- 定量の検量線を Figs. 2-4, 2-5 に示す。 NO_2^- (mg/l) = $(\text{NO}_2^- \text{のピーク面積} + 1180) / 31650$ ($R^2=0.999$)、有効範囲は NO_2^- (mg/l) = $0\sim1000$ である。 NO_3^- (mg/l) = $(\text{NO}_3^- \text{のピーク面積} + 1755) / 924$ ($R^2=0.999$)、有効範囲は NO_3^- (mg/l) = $0\sim1000$ である。各物質の MM 培地における検出ピーク時間は、 NO_2^- : 3.1min., NO_3^- : 4.2min., SO_4^{2-} : 5.9min., PO_4^{3-} : 5.9min., クエン酸: 18.4min. であった。

2-3-4 *A.faecalis* No.4 の硝化反応

菌の増殖と 2 つの培地中に生産された硝化産物の経時変化を Fig. 2-6 に示す。MM 培地は NH_4^+ が唯一の窒素源であることから、No.4 株は培地中の NH_4^+ を $\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ に硝化することが明らかになった。No.4 株の生産する硝化産物は菌の

対数増殖期に増加しはじめ、定常期にはいると NH_2OH と NO_3^- は一定になり、 NO_2^- は減少した。菌を培養する培地を MM 培地から L 培地にすると、培養速度が 2 倍、菌体量が 5 倍になったが、硝化産物の生産量はほとんど同じであった。

2-3-5 No.4 株の植物病原菌に対する阻止円と培地中の NH_4^+ 濃度の関係

MM-agar 培地中の唯一の窒素源である NH_4^+ 濃度による、No.4 株の植物病原菌に対する抗菌活性の変化を Fig. 2-7 に示す。培地中の NH_4^+ 濃度を 0~100g/l - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ にしても病原菌の生育に支障はなかったが、No.4 株の形成する阻止円の大きさが変化した。 NH_4^+ 濃度が高いほど No.4 株の抗菌活性は強くなった。No.4 株の植物病原菌に対する抗菌活性は培地中の NH_4^+ 濃度に関係があることが分かった。

2-3-6 No.4 株の植物病原菌に対する阻止円と硝化産物生産の関係

Fig. 2-6 に示すように No.4 株は従属栄養硝化反応をして、 NH_4^+ から NH_2OH , NO_2^- , NO_3^- を生産した。そこで、MM-agar 培地に形成された植物病原菌に対する阻止円の内外に含まれる硝化産物を測定した結果を Table 2-5 に示す。No.4 株は液体培養中だけでなく MM-agar 培地中でも硝化反応を行い、 NH_2OH , NO_2^- , NO_3^- を生産した。それぞれの硝化産物量は液体培養の時と同程度であった。硝化産物は植物病原菌に対する阻止円の内側にしか存在しないことから、No.4 株の生産する硝化産物と抗菌活性に相関が認められた。

2-3-7 硝化産物の植物病原菌に対する抗菌活性

No.4 株の硝化反応によって生産された NH_2OH , NO_2^- , NO_3^- の 100mg/l 溶液を調整し、それぞれ 100 μ l を植物病原菌プレートに添加した。3 日間培養後の硝化産物の植物病原菌に対する抗菌活性を Figs. 2-8, 2-9 に示す。*F.oxysporum* J1、*R.solani* K-1 のどちらの病原菌も硝化産物の NH_2OH を添加した部分の周囲にだけ阻止円が形成された。No.4 株の抗菌物質は菌の従属栄養硝化反応中に中間物質として生産された NH_2OH であることが分かった。

2-3-8 NH_2OH の植物病原菌に対する最小阻止濃度 (MIC)

NH_2OH の植物病原菌 *F.oxysporum* J1、*R.solani* K-1 に対する MIC を Table 2-6 に示す。 NH_2OH はプレート上で非常に分解しやすく、実験中に培地の NH_2OH 濃

度は各プレートにつき 30mg/l ずつ減少した。NH₂OH は植物病原菌 *F.oxysporum* J1、*R.solani* K-1 の増殖を抑制し、MIC はそれぞれ 10mg/l, 20mg/l であった。この値は実験中の自然減少 (30mg/l) を考慮した値である。

2-3-9 No.4 株と植物病原菌の混合培養

No.4 株と植物病原菌を 3 日間混合培養した時の NH₂OH 量を測定した。No.4 株と *F.oxysporum* J1 を混合培養した時の写真を Fig. 2-10 に、その培養液中に含まれる NH₂OH 濃度を Table 2-7 に示す。また、No.4 株と *R.solani* K-1 を混合培養した時の写真を Fig. 2-11 に、その培養液中に含まれる NH₂OH 濃度を Table 2-8 に示す。混合培養した培養液は病原菌のみの培地で観察されたような菌糸のかたまりがなく、No.4 株のみの培地と同じように均一に混ざっていた。No.4 株のみの培地には NH₂OH が 7.2~15mg/l 生産されたが、混合培養の培地には No.4 株が生存しているのに NH₂OH がほとんど検出されなかった。このことから No.4 株の生産した NH₂OH が病原菌に作用し、失活したと考えられる。No.4 株と植物病原菌 *F.oxysporum* J1 を混合培養した培養液の光学顕微鏡写真を Fig. 2-12 に示す。混合培養液中の *F.oxysporum* J1 は No.4 株によって細胞膜が切断されており、短い菌糸しか存在していなかった。

2-3-10 *A.faecalis* No.4 の増殖速度：平均倍加時間

培地組成 (MM, L) や培養温度 (20, 30, 37℃) による No.4 株の増殖曲線を Fig. 2-13 に示す。さらにこれらの増殖曲線の対数増殖期の傾きから算出した平均倍加時間を Table 2-9 に示す。No.4 株の最大平均倍加時間は L 培地に 37℃ で培養したときの 1.0h であった。合成培地の MM 培地より複合培地の L 培地の方が増殖速度は 2 倍近く速く、定常期の菌数は 1 桁多かった。増殖速度は培地組成と培養温度に依存しており、栄養が多く温度が高いほど速くなった。定常期の菌数は培地組成にのみ依存しており、栄養が多いほど多くなった。また 60℃ 以上では菌は死滅し、10℃ 以下では増殖しなくなることから、No.4 株は中温菌であることが分かった。

2-3-11 *A.faecalis* No.4 の炭素源資化性

一般的な炭素源である糖や菌の代謝で重要な炭素化合物、低級カルボン酸エチルを唯一の炭素源として培養を行い、No.4 株の炭素源の資化性を Table 2-10 に示す。No.4 株は糖類を全く資化せず、低級カルボン酸のアルキル鎖の炭素数が少ない

酢酸エチル (C₂)、プロピオン酸エチル (C₃) を資化したが、炭素数 4 の吉草酸エチル (C₄) を資化しなかった。

2-3-12 *A.faecalis* No.4 の抗生物質耐性

土壌からの菌を回収する際や遺伝子操作の際に、他の菌株と区別するための指針として、菌の発光 (39) や抗生物質耐性 (32) や菌体の染料生産や PCR (40) 等の方法が報告されている。No.4 株の様々な抗生物質に対する耐性を Table 2-11 に示す。No.4 株は検討したすべての抗生物質に対して幅広く強い耐性を示した。No.4 株が耐性を示す抗生物質の濃度では一般的な土壌微生物はほとんど増殖しないので、土壌からの回収や遺伝子操作の際に非常に便利である。菌は細胞中の耐性プラスミドによって重金属や抗生物質に耐性を示す場合があるが、No.4 株の菌体内には薬剤耐性プラスミドはなかった。

2-3-13 *A.faecalis* No.4 の菌体内高分子生産

No.4 株の乾燥菌体と菌体内高分子の元素分析及び *A.eutrophus* により生産される高分子の元素分析を Table 2-12 に示す。No.4 株の菌体内から抽出された高分子と既知の *A.eutrophus* (37) による生合成高分子の成分 (重量%) は非常に似ていた。抽出した高分子には窒素原子がほとんど含まれていなかった。

2-4 考察

本章では、No.4 株の同定と *in vitro* における No.4 株の各種植物病原菌に対する抗菌活性、硝化反応、高分子生産等について検討した。また、No.4 株の抗菌活性が NH₄⁺ に依存することと No.4 株が従属栄養硝化反応を行うことに注目して、No.4 株の植物病原菌に対する抗菌物質を同定した。さらに、抗菌物質 NH₂OH の植物病原菌 *F.oxysporum* J1, *R.solani* K-1 に対する最小阻止濃度も調べた。

初めに、活性汚泥から単離された植物病原菌に対して非常に高い抗菌活性を示す No.4 株は、グラム陰性桿菌同定キットによって *Alcaligenes faecalis* と同定された。rRNA 配列分析では真正細菌は 10 群に大別されているが、その中で *Alcaligenes* 属は紅色細菌と *Pseudomonas* 属細菌の群の β 群に属していた。*A.faecalis* は、鞭毛の着性が極毛性でないために好気性 *Pseudomonas* 属の定義から外れているが、

Pseudomonas 属と同じ好気性化学合成従属栄養のグラム陰性桿菌であり、*Pseudomonas* 属と類似点が多い (41)。

No.4 株の特徴を検討するにあたり、まず、16 種類の植物病原菌に対する抗菌活性をプレート上で調べた。No.4 株は植物病原性をもつ糸状菌や細菌を問わず、今回調べた全ての病原菌に対して用いた 2 つの培地のいずれかで抗菌活性を示したことから、No.4 株の抗菌スペクトルは非常に広いことが判明した。さらに、培地による抑制効果を比較したところ、合成培地で栄養の乏しい MM-agar 培地の方が、複合培地で栄養の豊富な L-agar 培地よりも大きな阻止円を形成した。このことから No.4 株は栄養の乏しい一般土壌でも優先菌になり、植物病原菌を抑制することが示唆された。当研究室で研究されてきた枯草菌 NB22 株や RB14 株は栄養の乏しい MM-agar 培地では抗菌活性が消失するのに対して、No.4 株は培地の栄養の大小に関わらず、強い抗菌活性を示した。これは No.4 株が定常的に一定の抗菌効果を発揮できることを示しており、長期間にわたる土壌での植物病予防にも有効であることが示唆された。また抗菌スペクトルが広いためにその有効性も高いことが示唆された。*Alcaligenes* 属による植物病原菌の抑制についての報告は少なく、*A.faecalis* MFA1 が植物病原菌 *F.oxysporum* をプレート上で抑制したという報告があるだけである (5, 6)。この論文では培地中の鉄を減少させると抗菌活性が強くなることから、菌が siderophore を生産して鉄分子をキレートし、病原菌の増殖を阻害すると推察している。他の論文では、*Alcaligenes* 属が alcaligin という siderophore を生産することを報告している (14)。*Alcaligenes* 属による植物病の抑制や抑制メカニズムについてはほとんど知られておらず、菌の抗菌物質による抗菌活性を示した報告や土壌を用いた植物試験での抑制効果を示した報告はない。

次に、No.4 株が増殖中に生産する硝化産物を調べたところ、 NH_2OH 、 NO_2^- 、 NO_3^- を生産することが分かった。培地組成による硝化産物の生産量に違いは無く、MM 培地と L 培地でほぼ同じ濃度であった。この濃度はこれまで報告されている *Alcaligenes* 属の生産する濃度と同程度であった。従属栄養硝化菌には *Thiosphaera pantotroph*、*Alcaligenes* sp.、*Pseudomonas* sp. などがあり、これらの菌による従属栄養硝化反応や好氣的脱窒反応の詳細が報告されている (24-31)。土壌中に含まれる有害な NH_3 の酸化反応は硝化菌にしかできないことから、硝化菌は畑作物の生育や畑、草地、森林の窒素循環の鍵となる微生物である (23)。従属栄養硝化能は菌体あたりの生産量は少ないが、菌数が多いために硝化産物の全量は独立栄養硝化菌によ

るものと同程度である(42)。No.4株が増殖して硝化反応をし続けているとすれば最終硝化産物である NO_3^- の濃度が時間と共に増えると考えられるが、培養液中の NH_2OH と NO_3^- 濃度が一定であるのに NO_2^- 濃度だけが減少していることと、培養気相から NO が確認されたことから、No.4株は脱窒反応を行っていることが示唆された。

MM-agar培地中の NH_4^+ 濃度によるNo.4株の植物病原菌*F.oxysporum* J1に対する抗菌活性を観察したところ、 NH_4^+ 濃度が高くなるにつれてNo.4株の抗菌活性は高くなった。またNo.4株の生産する硝化産物は阻止円の内側にしか存在しなかったことから、抗菌物質は窒素に関係のある物質であることが示唆された。さらにNo.4株は硝化反応をして、 NH_4^+ を NH_2OH 、 NO_2^- 、 NO_3^- に酸化することから、抗菌物質は従属栄養硝化反応中に生産される物質であることも示唆された。

次に、No.4株が生産する硝化産物の標準液を植物病原菌*F.oxysporum* J1および*R.solani* K-1を塗布した培地に添加したところ、どちらの病原菌でも NH_2OH を添加した部分にだけ大きな阻止円が形成された。したがってNo.4株の抗菌物質は従属栄養硝化反応の中間生成物の NH_2OH であることが明らかになった。これまでに従属栄養硝化菌がその硝化反応中の中間生成物質によって植物病原菌を抑制した報告はなく、その抗菌物質を決定した報告はない。植物病原菌に対する NH_2OH のMICは*F.oxysporum* J1で10mg/l、*R.solani* K-1で20mg/lであった。No.4株は液体培養中(Fig. 2-6)にMIC値以上の NH_2OH を生産したことから、No.4株は NH_2OH によって植物病原菌を抑制できることが示された。

No.4株と植物病原菌*F.oxysporum* J1および*R.solani* K-1とを混合培養したところ、病原菌は正常に生育できなかった。No.4株の培養液から検出された NH_2OH は混合培養した培養液からは検出されなかった。このことから NH_2OH は病原菌の増殖抑制に使われ、消失したことが示唆された。混合培養した培養液を光学顕微鏡で観察したところ、病原菌から細胞液が浸出していたことから NH_2OH によって*F.oxysporum* J1の細胞膜が分解されることが示唆された。

一般的に NH_2OH は強力な還元剤として知られており、その酸化還元能力によってケトン類をオキシムに酸化したり、遺伝子レベルでは核酸のピリミジン残基を修飾することによってペプチド結合の中のAsn-Gly結合を特異的に切断したりする(43)。 NH_2OH は高い酸化還元能力をもつため、十分な濃度があれば植物病原菌に対して抗菌活性を示すことが示唆された(44, 45)。しかしNo.4株が生産する NH_2OH は硝化反応の中間生成物であるため、菌の硝化反応によって、すぐに NO_2^- へ酸化さ

れてしまう。このことから No.4 株の生産する NH_2OH が植物病原菌に対して作用する時間、部位は非常に限られることが示唆された。

No.4 株を微生物農薬として使用する際の性質を知るために、炭素源の資化性、抗生物質耐性、生体高分子生産について検討した。No.4 株は糖類を資化せず、低級カルボン酸のアルキル鎖の炭素数が少ない酢酸エチルとプロピオン酸エチルを資化したが、吉草酸エチルを資化しなかった。グルコースを資化せず、クエン酸ナトリウムや酢酸エチルを資化することから、No.4 株の主な代謝経路はトリカルボン酸 (TCA) 回路であることが予想された。また β -ケトアジピン酸経路からの TCA 回路のアセチル CoA とコハク酸への変化も考えられた (1, 41)。次に、No.4 株の抗生物質耐性を様々な抗生物質について検討したところ、抗生物質によって阻害する部位が異なるにもかかわらず、No.4 株はこれら全ての抗生物質に高い耐性を示した。色々な薬剤が流入する活性汚泥から単離された No.4 株は汚泥の中で生存し続けるために抗生物質に耐性を示す自然変異を起こしていることが予想された。大量の薬剤を含む栄養の乏しい土壌でも、No.4 株は生存し、優先菌として生存できることが示唆された。また No.4 株は様々な抗生物質に耐性を示すため遺伝子操作をしやすい菌株であることも示唆された。No.4 株には耐性プラスミドが存在しなかったが、*Alcaligenes* sp. には抗生物質耐性、重金属耐性プラスミドを保持する菌株も報告されている (32-34)。次に、No.4 株の生産する生体高分子について検討したところ、これまでに広く研究されている *A.eutrophus* の生体高分子 (37) と元素組成が類似していた。菌体内に高分子を生産し、貯蔵できることは、土壌において他の菌との拮抗作用 (競争) に勝ち、他の菌よりも長時間生存できることが示唆された。

2-5 結論

栄養の乏しい培地で植物病原菌に対して強い抗菌活性を示す No.4 株は *Alcaligenes faecalis* であった。この菌は栄養の乏しい培地でも様々な植物病原菌に対して幅広い抗菌スペクトルを持つことから、新規の微生物農薬の候補株であった。さらに No.4 株は *Alcaligenes* 属の特徴である従属栄養硝化反応、高い抗生物質耐性、生分解性高分子生産等によって、厳しい環境の中でも生存できることが分かった。No.4 株の植物病原菌 *F.oxysporum* J1 に対する抗菌活性が、培地中の唯一の窒素源である NH_4^+ 濃度に依存し、濃度が高くなるにつれて抗菌活性も増加すること、No.4 株

は従属栄養硝化反応を行い、 NH_4^+ を NH_2OH 、 NO_2^- 、 NO_3^- に酸化することから、No.4株の抗菌物質が硝化産物中にあると考え、硝化産物の標準液による抗菌活性を調べた。その結果、No.4株の抗菌物質が NH_2OH であり、その抗菌物質の植物病原菌 *F.oxysporum* J1と *R.solani* K-1に対する最小阻止濃度はそれぞれ 10mg/l, 20mg/l であることが分かった。

2-6 参考文献

1. Schleifer, K. H., and Stackebrandt, E.: Molecular systematics of prokaryotes, Ann. Rev. Microbiol., 37, 143-187 (1983)
2. Krieg, N. R., and Holt, J. G.: Bergey's manual of systematic bacteriology. (1984)
3. Krishnamurthy, K., and Gnanamanickam, S. S.: Biological control of sheath blight of rice: Induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp., Cur. Sci., 72, 331-334 (1997)
4. Clarkson, J. P., and Lucas, J. A.: The role of antibiotic production by a strain of *Pseudomonas fluorescens* in the suppression of *Pseudocercospora herpotrichoides*, the causal agent of eyespot disease of cereals, J. Appl. Microbiol., 82, 499-506 (1996)
5. Yuen, G. Y.: Reduction of *Fusarium* wilt of carnation with suppressive soils and antagonistic bacteria, Plant Disease, 69, 1071-1075 (1985)
6. Martinetti, G., and Loper, J. E.: Mutational analysis of genes determining antagonism of *Alcaligenes* sp. strain MFA1 against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, Can. J. Microbiol., 38, 241-247 (1992)
7. Moore, L. W., and Warren, G.: *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biocontrol of crown gall, Ann. Rev. Phytopathol., 17, 163-179 (1979)
8. Thomashow, L. S., and Weller, D. M.: Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, J. Bacteriol., 170, 3499-3508 (1988)
9. Weller, D. M.: Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria, Ann. Rev. Phytopathol., 26, 379-407 (1988)
10. Lee, C. H., Kim, S., Hyun, B., Suh, J. W., Yon, C., Kim, C., Lim, Y., and Kim, C.: Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas*

- cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity, J. Antibiot. Tokyo., 47, 1402-1405 (1994)
11. Duffy, B. K., and Defago, G.: Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis, Phytopathology, 87, 1250-1257 (1997)
 12. Marek, K. M., and Skorupska, A.: Physiological parameters influencing the production of siderophore by PGPR *Pseudomonas* sp. strain 267, Acta. Microbiologica. Polonica., 46, 157-165 (1997)
 13. Khalil, R. S., Toth, S. I., van-der-Helm, D., Vidavsky, I., and Gross, M. L.: Structures and characteristics of novel siderophores from plant deleterious *Pseudomonas fluorescens* A225 and *Pseudomonas putida* ATCC 39167, Biochemistry, 36, 4163-4171 (1997)
 14. Nishio, T., Tanaka, N., Hiratake, J., Katsube, Y., Ishida, Y., and Oda, J.: Isolation and structure of the novel dihydroxamate siderophore Alcaligin, J. Am. Chem. Soc., 110, 8733-8734 (1988)
 15. Phae, C. G., Sasaki, M., Shoda, M., and Kubota, H.: Characteristics of *Bacillus subtilis* isolated from composts suppressing phytopathogenic microorganisms, Soil Sci. Plant Nutr., 36, 575-586 (1990)
 16. Phae, C. G., Shoda, M., and Kubota, H.: Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms, J. Ferment. Bioeng., 69, 1-7 (1990)
 17. Tokuda, Y., Ano, T., and Shoda, M.: Characteristics of plasmid stability in *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal-antibiotic iturin producer, J. Ferment. Bioeng., 75, 319-321 (1993)
 18. Hiraoka, H., Asaka, O., Ano, T., and Shoda, M.: Characteristics of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin A and surfactin, J. Gen. Appl. Microbiol., 38, 521-526 (1992)
 19. Hiraoka, H., Ano, T., and Shoda, M.: Molecular cloning of a gene responsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin, J. Ferment. Bioeng., 74, 323-326 (1992)
 20. Tokuda, Y., Ano, T., and Shoda, M.: Survival of *Bacillus subtilis* NB22 and its

- transformant in soil, *Appl. Soil. Ecol.*, 2, 85-94 (1995)
21. Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M., and Ushiyama, K.: Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22, *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 58, 329-339 (1992)
 22. Asaka, O., and Shoda, M.: Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4081-4085 (1996)
 23. 西尾 道德: 土壤微生物の基礎知識 農産漁村文化協会 (1989)
 24. Nishio, T., Yoshikura, T., Chiba, K., and Inouye, Z.: Effects of organic acids on heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis* OKK17, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1574-1578 (1994)
 25. Van-Niel, E. W., Braber, K. J., Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.: Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Alcaligenes faecalis* strain TUD, *Antonie. Leeuwenhoek.*, 62, 231-237 (1992)
 26. Otte, S., Grobber, N. G., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M., Kuenen, J. G.: Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2421-2426 (1996)
 27. Robertson, L. A., Dalsgaard, T., Revsbech, N. P., and Kuenen, J. G.: Confirmation of 'aerobic denitrification' in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry, *FEMS. Microbiol. Eco.*, 18, 113-119 (1995)
 28. Anderson, I. C., Poth, M., Homstead, J., and Burdige, D.: A comparison of NO and N_2O production by the autotrophic nitrifier *Nitrosomonas europaea* and the heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3525-3533 (1993)
 29. Kester, R. A., De-Boer, W., and Laanbroek, H. J.: Production of NO and N_2O by pure cultures of nitrifying and denitrifying bacteria during changes in aeration, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3872-3877 (1997)
 30. Robertson, L. A., and Kuenen, J. G.: Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria, *Anton. Leeuwenhoek*, 57, 139-152 (1990)

31. Kakutani, T., Beppu, T., and Arima, K.: Regulation of nitrite reductase in the denitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* S-6, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 23-28 (1981)
32. Van-der-Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Baeyens, W., Mergeay, M., and Nies, D. H.: Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homeostasis in *Alcaligenes eutrophus*, *Mol. Microbiol.*, 23, 493-503 (1997)
33. Taghavi, S., Provoost, A., Mergeay, M., and van-der-Lelie, D.: Identification of a partition and replication region in the *Alcaligenes eutrophus* megaplasmid pMOL28, *Mol. Gen. Genet.*, 250, 169-179 (1996)
34. Collard, J. M., Corbisier, P., Diels, L., Dong, Q., Jeanthon, C., Mergeay, M., Taghavi, S., van-der-Lelie, D., Wilmotte, A., and Wuertz, S.: Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: mechanisms and applications, *FEMS. Microbiol. Rev.*, 14, 405-414 (1994)
35. Sim, S. J., Snell, K. D., Hogan, S. A., Stubbe, J., Rha, C., and Sinskey, A. J.: PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo [see comments], *Nature Biotechnol.*, 15, 63-67, (1997)
36. Ishihara, Y., Shimizu, H., and Shioya, S.: Mole fraction control of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid in fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus*, *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 422-428 (1997)
37. Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., and Soga, K.: Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 330-334 (1988)
38. Frear, D. S., and Burrell, R. C.: Spectrophotometric method for determining hydroxylamine reductase activity in higher plants, *Anal. Chem.*, 27, 1664-1665 (1955)
39. Prosser, J. I., Killham, K., Glover, L. A., and Rattray, E. A.: Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 16, 157-183 (1996)
40. Flemming, C. A., Leung, K. T., Lee, H., Trevors, J. T., and Greer, C. W.: Survival of lux-lac-marked biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* UG2L in

- soil monitored by nonselective plating and PCR, Appl. Environ. Microbiol., 60, 1606-1613 (1994)
41. Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., and Painter, P. P.: The microbiol world (fifth edition), 12-17 (1986)
 42. Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., Vries, S., Loosdrecht, M. C. M., and Kuenen, J. G.: Novel principles in the microbiol conversion of nitrogen compounds, Antonie. Leeuwenhoek, 71, 75-93 (1997)
 43. Phillips, J. H., and Brown, D. M.: The mutagenic action of hydroxylamine, Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol., 7, 349-368 (1967)
 44. Somers, C. E., and Hsu, T. C.: Chromosome damage Induced by hydroxylamine in mammalian cells, Genetics, 48, 937-943 (1962)
 45. Cohn, N. S.: The effect of hydroxylamine on the rejoining of X-ray-induced chromatid breaks in *vicia faba*, Mutation Res., 1, 409-413 (1964)

Table 2-1 Media.

Medium	Content (g/l)	
L	Polypepton (Nihon Pharmaceutical Co.)	10
	Yeast extract (Oriental Yeast Co.)	5
	NaCl	5
	(pH7.0)	
MM	K_2HPO_4	14
	KH_2PO_4	6
	$(NH_4)_2SO_4$	2
	Trisodium citrate dihydrate	1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
	Glucose	5
PDA (Eiken Chemical Co.)	Potato infusion	200
	Glucose	20
	Agar	15
	(pH5.1)	
PDP	Potatodextrose (DIFCO Laboratories)	24
	Polypepton	1
	(pH5.1)	

Table 2-2 Some characteristics of strain No.4.

Test types	Strain No.4
Shape	coccal rods
Gram stain	—
Spores	—
Mobility	+
Anaerobic growth	+
Oxidase	+
Catalase	+
NO₃⁻ to NO₂⁻	—
Gas from glucose	—
Arginine dihydrolase	—
Gelatin decomposition	—
PNPG	—
Identification	<i>Alcaligenes faecalis</i>

Table 2-3 Suppressive effect of culture broth of *Alcaligenes faecalis* No.4 on plant pathogens *in vitro*.

Plant pathogens	Diameter of inhibitory zone (mm)	
	L-agar medium	MM-agar medium
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> race J1 SUF119	16	20
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> NIAES5117	15	28
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> KEF2R-1	14	20
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-4	19	26
<i>Rhizoctonia solani</i> rm3 5003	23	40
<i>Rhizoctonia solani</i> K-1	24	36
<i>Rhizoctonia solani</i> MAFF726525	14	28
<i>Rhizoctonia solani</i> MAFF726526	20	44
<i>Cercospora kikuchii</i> NIAES5039	21	32
<i>Botrytis cinerea</i> Bot1	17	32
<i>Cochliobolus miyabeanus</i> NIAES5425	15	30
<i>Alternaria mali</i> IFO8984	22	31
<i>Verticillium dahliae</i> Klebahn V-3	8	33
<i>Phomopsis</i> sp.4-2	8	24
<i>Xanthomonas oryzae</i>	18	8
<i>Streptomyces scabies</i> Sy9113	11	11

Table 2-4 Suppressive effect of culture broth of *Alcaligenes faecalis* No.4 on plant pathogens on pot tests.

Plant pathogens	Name of plant diseases	Efficacy
<i>Piricularia oryzae</i>	Blast of rice	D
<i>Cochliobolus miyabeanus</i>	Brown spot of rice	D
<i>Rhizoctonia solani</i>	Sheath blight of rice	D
<i>Puccinia recondita</i>	Leaf rust of wheat	D
<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Powdery mildew of cucumber	A
<i>Botrytis cinerea</i>	Gray mold of cucumber	D
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Downy mildew of cucumber	D
<i>Erwinia carotovora</i>	Bacterial soft rot	D

A ; 95-100 (%), B ; 80-94 (%), C ; 60-79 (%), D ; 0-59 (%)

Table 2-5 Concentrations of nitrification products of *Alcaligenes faecalis* No.4 inside or outside of inhibitory zone against plant pathogens, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119 and *Rhizoctonia solani* K-1.

Nitrification products	Inhibitory zone against <i>F.oxysporum</i> (mg/l)		Inhibitory zone against <i>R.solani</i> K-1 (mg/l)	
	Inside	Outside	Inside	Outside
NH ₂ OH	5	0	12	0
NO ₂ ⁻	5	0	5	0
NO ₃ ⁻	20	0	20	0

Table 2-6 Mimimum inhibitory concentration (MIC) of hydroxylamine against plant pathogens, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119 and *Rhizoctonia solani* K-1.

NH ₂ OH concentration (mg/l)	Growth of	
	<i>F.oxysporum</i> J1	<i>R.solani</i> K-1
0	+	+
5	+	+
10	—	+
15	—	+
20	—	—

Table 2-7 Concentration of hydroxylamine produced by a mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No.4, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119.

Medium	Cultivation		NH ₂ OH concentration (mg/l)
	<i>F.oxysporum</i> J1	<i>A.faecalis</i> No.4	
L	—	+	7.2
L	+	+	0
L	—	—	0
MM	—	+	15
MM	+	+	0.02
MM	—	—	0

Table 2-8 Concentration of hydroxylamine produced by a mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No.4, and *Rhizoctonia solani* K-1.

Medium	Cultivation		NH ₂ OH concentration (mg/l)
	<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	
L	—	+	12
L	+	+	0.05
L	—	—	0
MM	—	+	14
MM	+	+	0.1
MM	—	—	0

Table 2-9 Doubling times of *Alcaligenes faecalis* No.4.

	L medium			MM medium		
	20°C	30°C	37°C	20°C	30°C	37°C
Doubling time (h)	3.0	1.6	1.0	6.8	3.8	1.9

Table 2-10 Availability of carbon sources.

Sole carbon source	
D(+)-glucose	—
L(+)-arabinose	—
D(-)-mannitol	—
N-acetyl-D-glucosamine	—
Maltose	—
Gluconic acid potassium salt	—
<i>n</i> -caproic acid	+
Adipic acid	—
DL-malic acid	+
Trisodium citrate dihydrate	+
Phenyl acetate	+
Ethyl acetate(CH ₃ COOC ₂ H ₅)	+
Ethyl propionate(CH ₃ CH ₂ COOC ₂ H ₅)	+
Ethyl <i>n</i> -valerate(CH ₃ (CH ₂) ₂ COOC ₂ H ₅)	—

Table 2-11 Resistance to antibiotics in *Alcaligenes faecalis* No.4.

Antibiotics	Concentration of antibiotics (mg/l)					
	0	5	10	25	50	100
Ampicillin (Ap)	+	+	+	+	+	+
Chloramphenicol (Cm)	+	+	—	—	—	—
Kanamycin (Km)	+	+	+	+	+	+
Streptomycin (Sm)	+	+	+	+	+	+
Tetracycline (Tc)	+	+	+	—	—	—

Table 2-12 Elementary analysis of the dried cells and the intercellular polymers of *Alcaligenes faecalis* No.4.

	Dry cells (%)	Intercellular polymers (%)	PHB (%)*
H	7	6	7
C	49	56	56
N	14	2	0
(-)	31	37	37

* Reference (29, 34) : Poly β -hydroxybutyrate (PHB) of *Alcaligenes eutrophus* H16

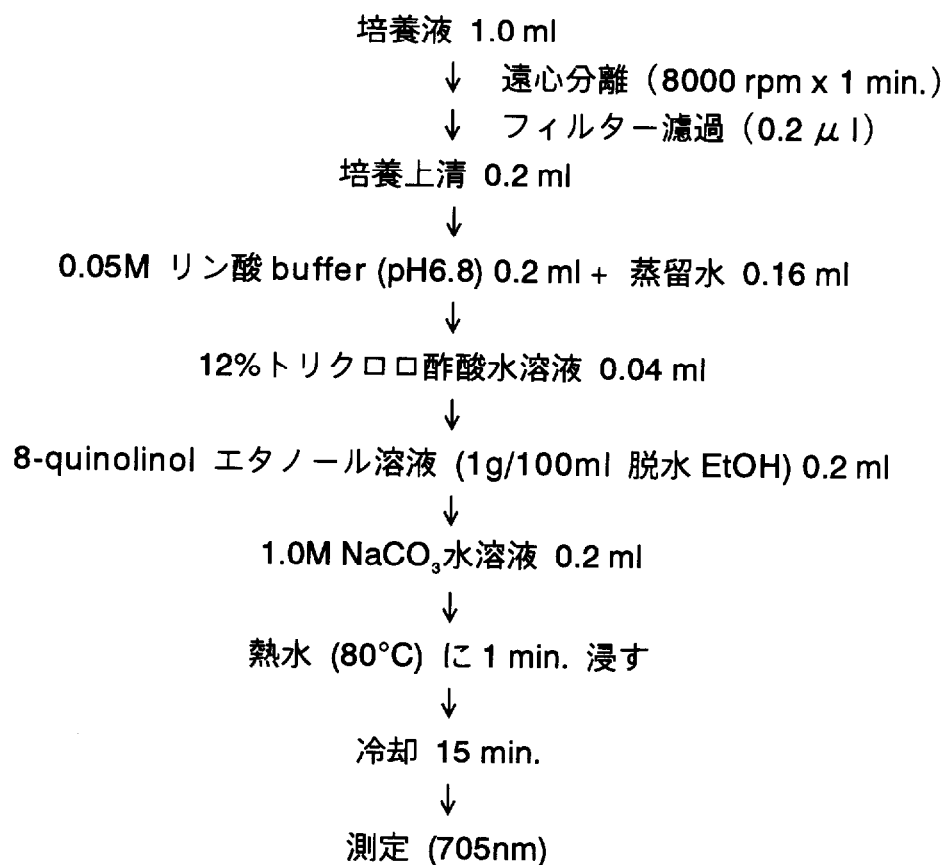


Fig. 2-1 NH_2OH の定量法 ⁽³⁸⁾

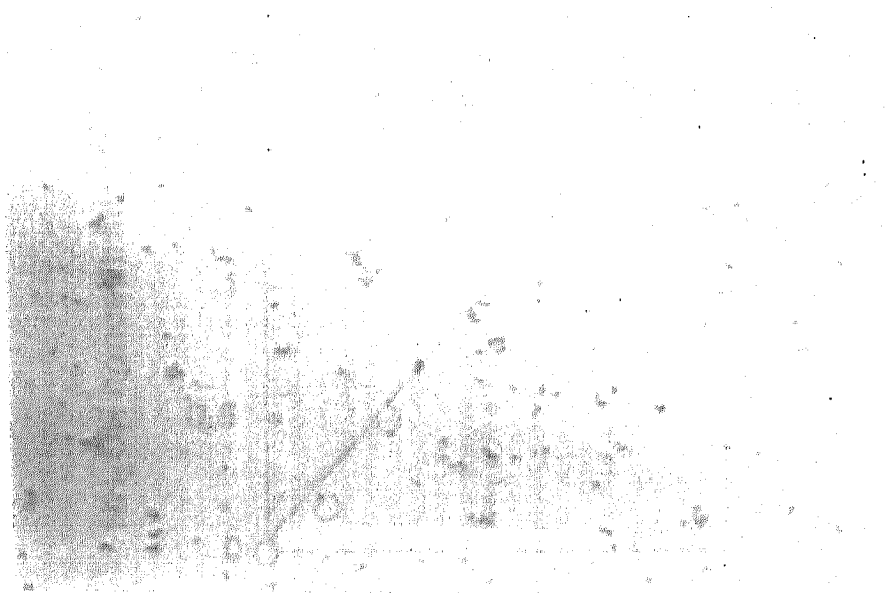
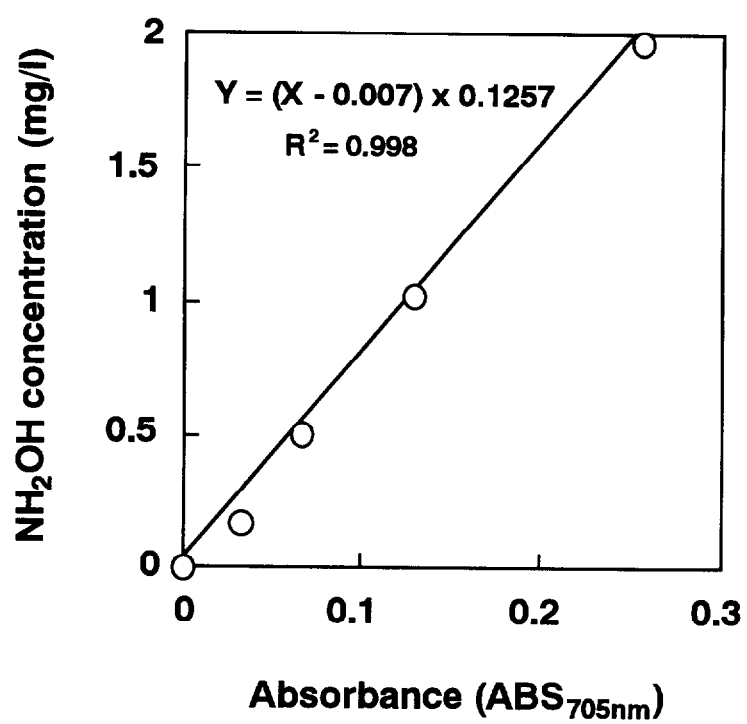
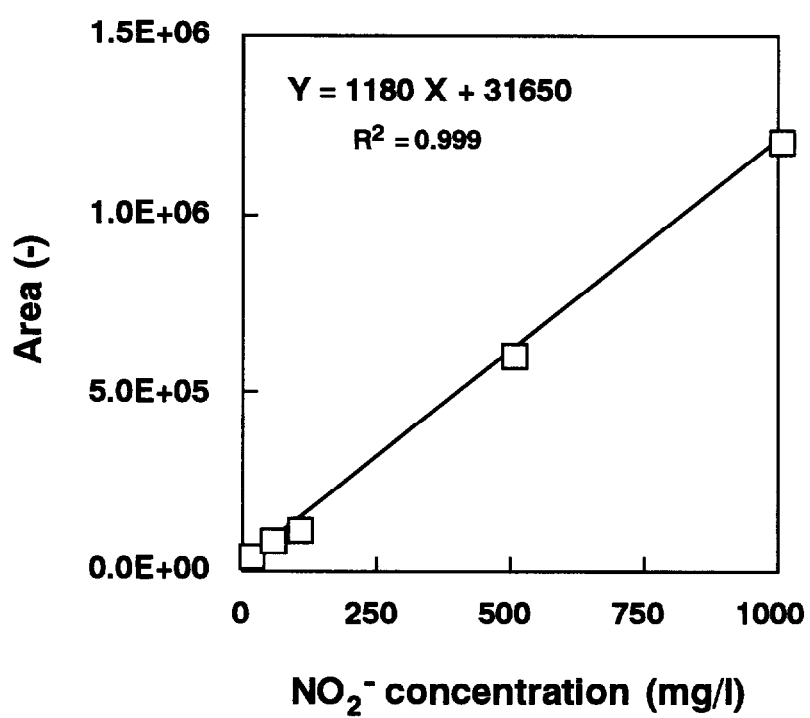
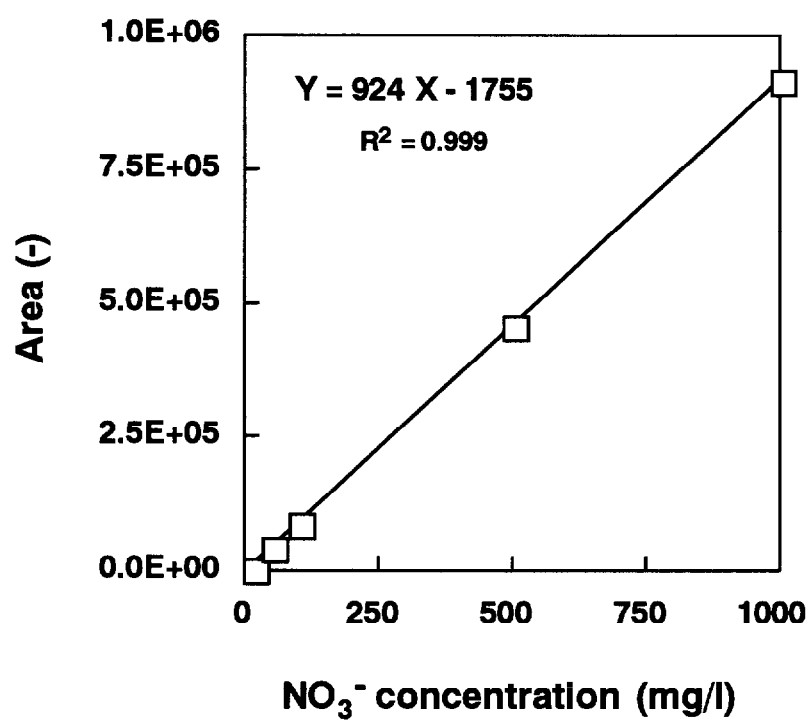


Fig. 2-2 *Alcaligenes faecalis* No.4 (x 1000)

Fig. 2-3 NH₂OHの検量線

Fig. 2-4 NO_2^- の検量線

Fig. 2-5 NO_3^- の検量線

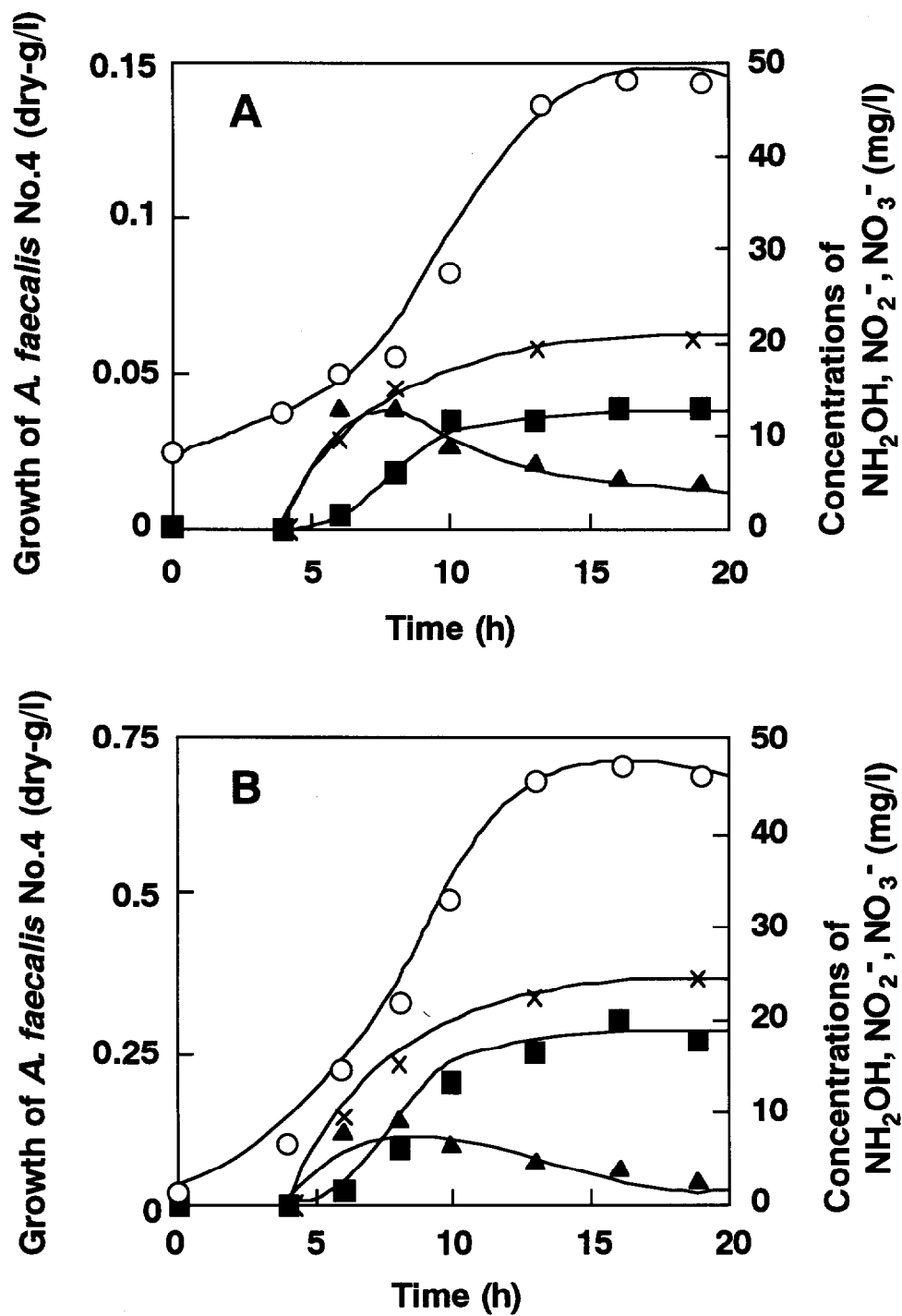


Fig. 2-6 Growth and nitrification products of *Alcaligenes faecalis* No.4 in MM (A), and L (B) media. ○ ; Growth, ■ ; hydroxylamine, ▲ ; nitrite, × ; nitrate

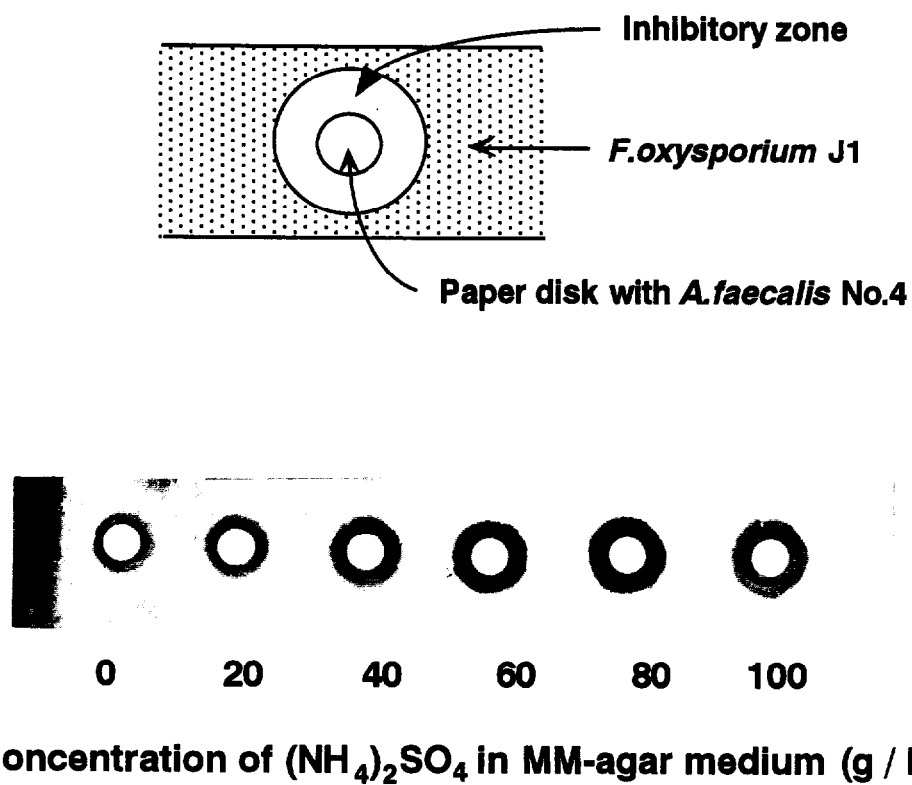


Fig. 2-7 Effect of NH_4^+ concentrations on the inhibitory zone of *Alcaligenes faecalis* No.4 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119 In MM-agar medium.

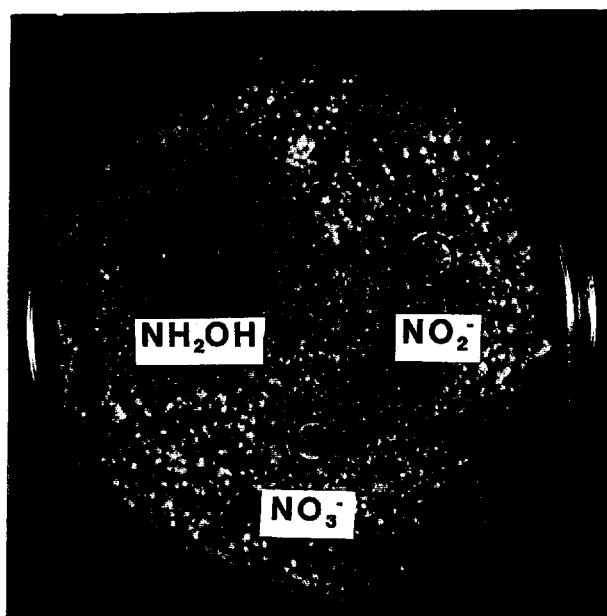


Fig. 2-8 Suppressive effect of nitrification products on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119. Hydroxylamine (NH_2OH); 100 mg/l, sodium nitrite (NO_2^-); 100 mg/l, sodium nitrate (NO_3^-); 100 mg/l

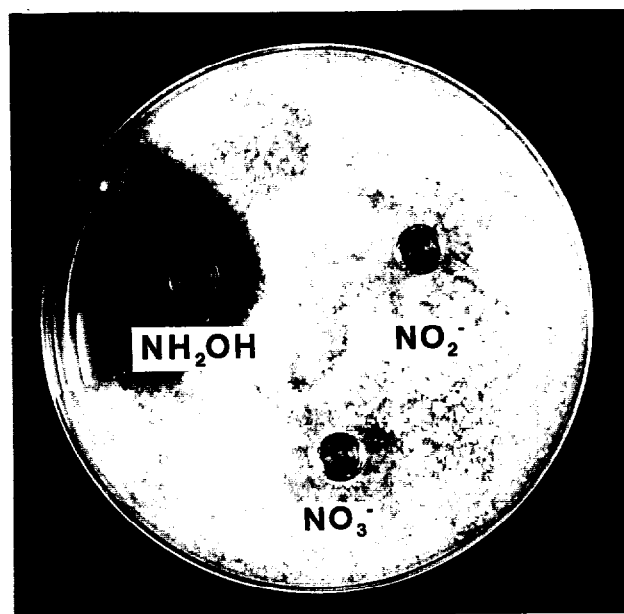


Fig. 2-9 Suppressive effect of nitrification products on *Rhizoctonia solani* K-1. Hydroxylamine (NH_2OH); 100 mg/l, sodium nitrite (NO_2^-); 100 mg/l, sodium nitrate (NO_3^-); 100 mg/l

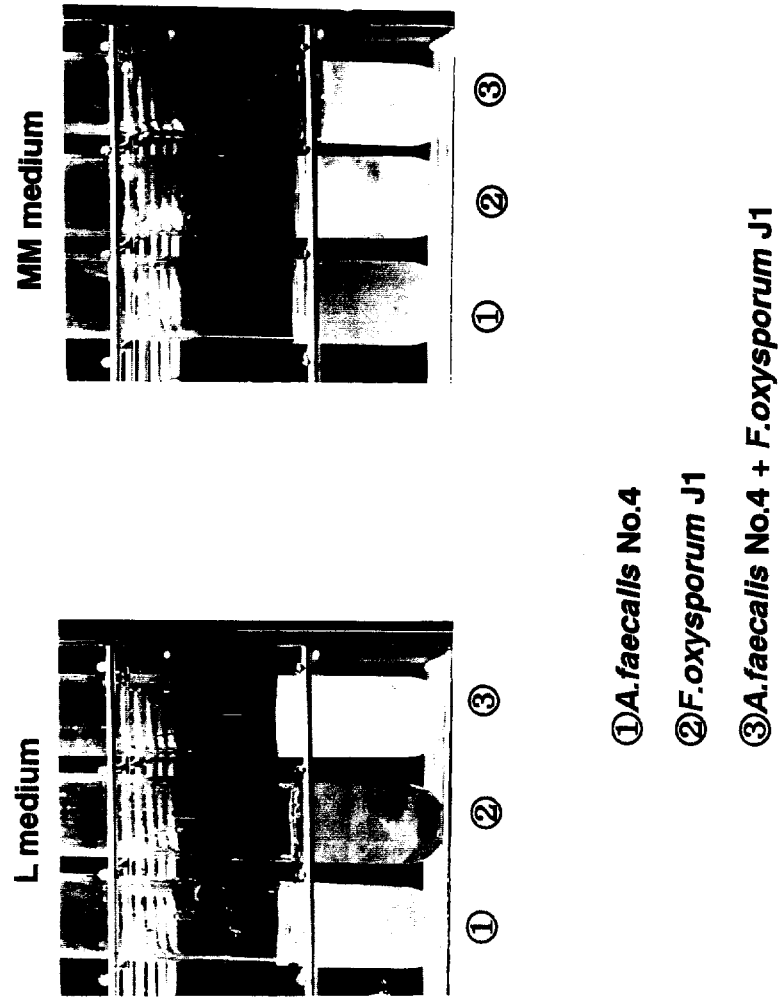


Fig. 2-10 The mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No.4 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119.

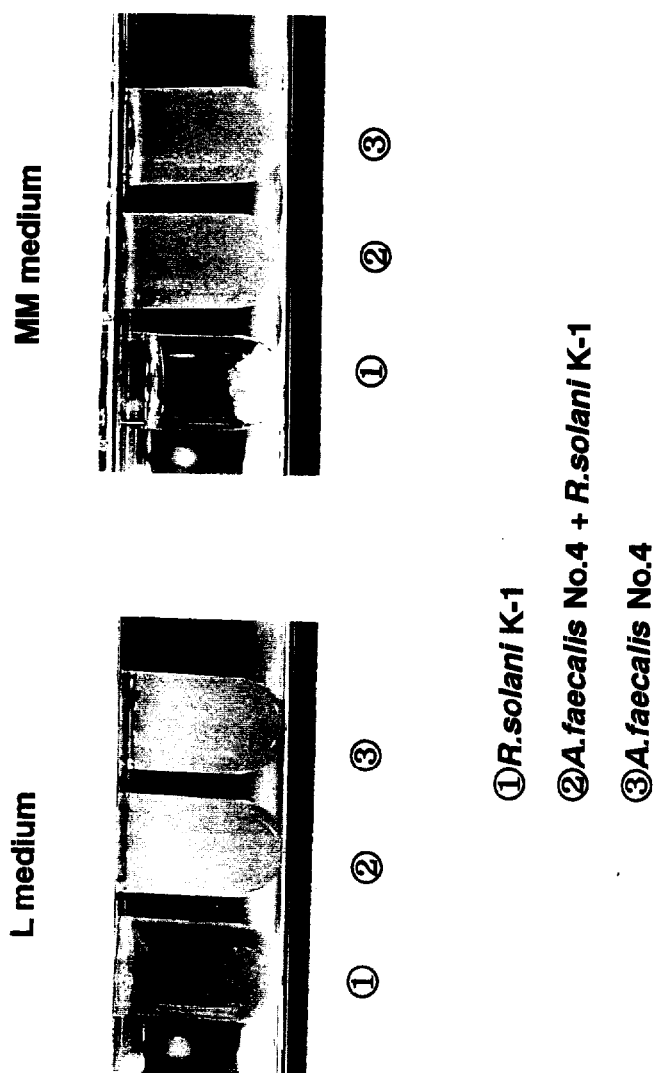


Fig. 2-11 The mixed culture of *Alcaligenes faecalis* No.4 and *Rhizoctonia solani* K-1.

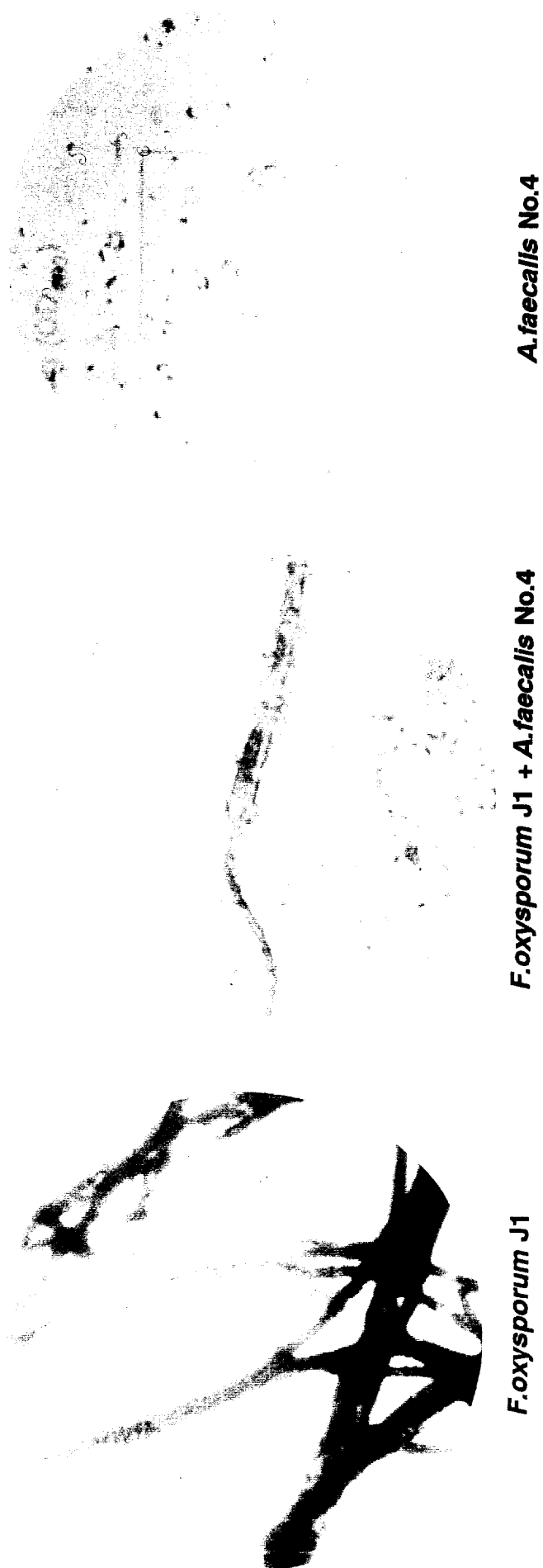


Fig. 2-12 Morphological change of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119 cultivated with *Alcaligenes faecalis* No.4 in MM medium at 30°C for 3 days. (x 1000)

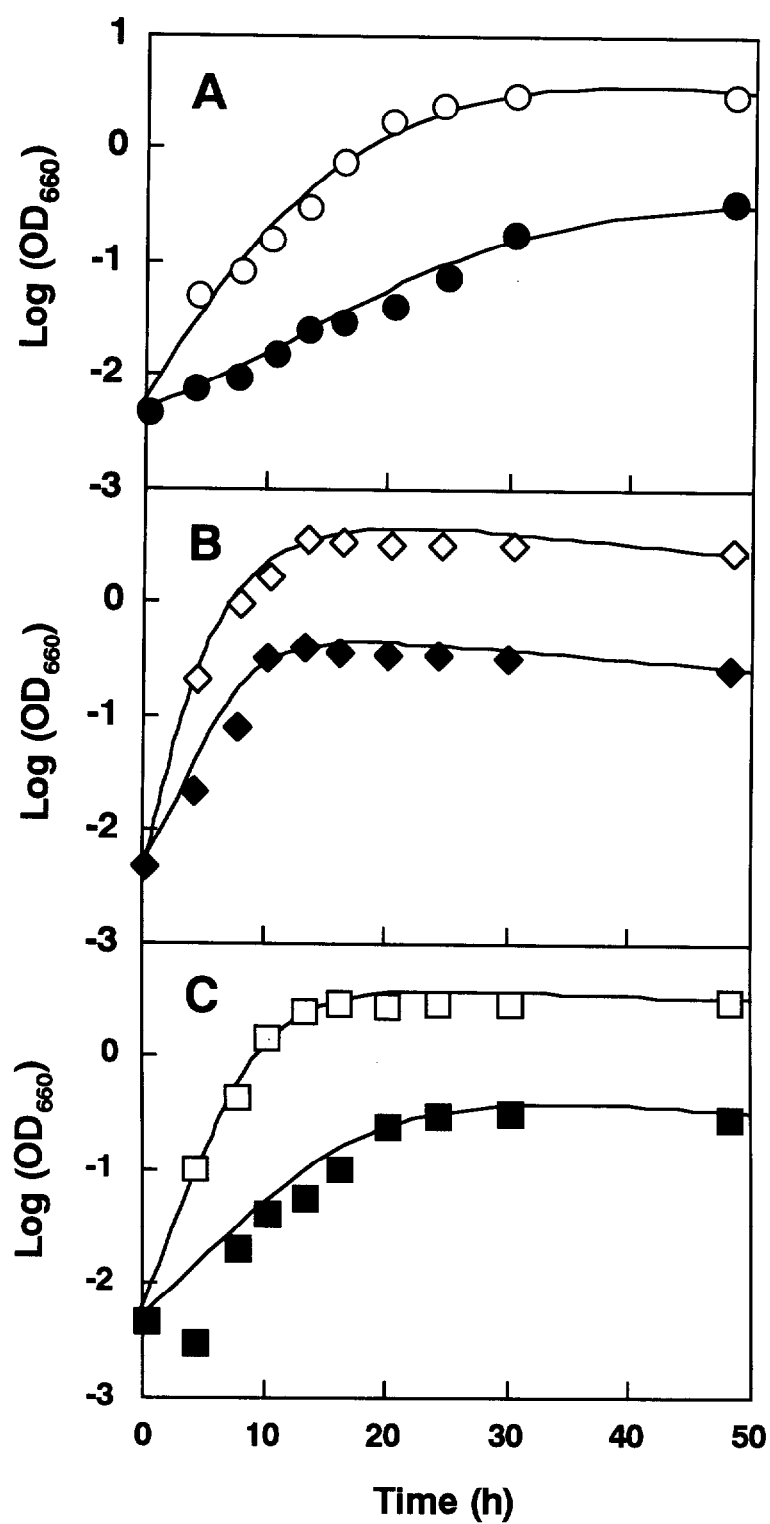


Fig. 2-13 Growth curve of *Alcaligenes faecalis* No.4 at 20°C (A), 30°C (B), and 37°C (C), in L (open), and MM (close) media.

第3章 *A.faecalis* No.4による抗菌物質 NH_2OH の生産条件の検討

3-1 緒言

拮抗微生物を用いて植物病を抑制する時に、拮抗微生物の抗菌活性を増加させる方法が多数報告されている。拮抗微生物が土壤中で優先菌となるようにパーミキュライトのような担体を混合して菌の土壤定着性を改良する方法（1, 2）、菌体周囲の条件（培地やpHや温度）によって菌の生産する抗菌物質の生産性を増加させる方法（3, 4）、逆に菌体内の改良（抗菌物質の生合成、制御遺伝子の組み換えやUV変異）によって抗菌物質の生産性を増加させる方法（5, 6）などが報告されている。しかし現在まで決定的な方法は確立されておらず、拮抗微生物ごとに最適な条件を調べているのが現状である。

本研究では新規の微生物農薬の開発を目的として、第2章では植物病原菌に対して抗菌活性を示すNo.4株の同定とその菌の様々な性質について検討した。No.4株は培地によらず幅広い抗菌活性を示し、他の *Alcaligenes* 属の菌株と同様に、従属栄養硝化反応をすることも明らかになった。No.4株の抗菌活性が培地の唯一の窒素源である NH_4^+ 濃度に依存したことから、No.4株が生産する硝化産物の抗菌活性を調べ、抗菌物質が硝化反応の中間生成物の NH_2OH であることが明らかになった。さらに NH_2OH の植物病原菌 *F.oxyspoum* J1, *R.solani* K-1 に対する最小阻止濃度はそれぞれ 10mg/l, 20mg/l であった。本章では NH_2OH の生産量を最大にする No.4 株の培養条件を検討した。 NH_2OH 生産の培養条件を液体培養、寒天培養で検討し、実際に土壤中 No.4 株による植物病抑制の植物試験をする際の培養の目安とした。液体培養では培地組成、培地の初期 pH、培養温度を変え、寒天培養では培地組成の C/N 比を変えて検討した。また寒天培養では培地組成の C/N 比と植物病原菌に対する抗菌活性の関係も検討した。

3-2 実験材料及び方法

3-2-1 菌株

A.faecalis No.4

植物病原菌には *F.oxysporum* J1 を使用した。

3-2-2 培地

使用した培地を Table 2-1 に示す。L-agar 培地と MM-agar 培地はそれぞれ L, MM 培地に agar を 1.5% 添加した。いずれの培地もオートクレーブ (120°C, 20 min., 1.0~1.2 kg/cm²) により滅菌処理した。MM-agar 培地は窒素源の量を一定 (2 g/l) にし炭素源の添加量を変化して各種の C/N 比の培地を作製した。

3-2-3 NH₂OH の定量法及び培地からの抽出法

NH₂OH の定量は 2-2-5 に述べた方法に従った。寒天培地からの NH₂OH の抽出は 2-2-8 に述べた方法に従った。

3-2-4 寒天培地における C/N 比の影響

MM-agar 培地の炭素源の濃度によって培地中の C/N 比を変化させ、寒天培地における No.4 株の NH₂OH の生産量を測定した。MM-agar 培地の C/N 比を 1/9~2 (w/w) にした培地に病原菌 *F.oxysporum* J1 の孢子懸濁液 4.4 x 10⁷ (CFU/plate) を塗布した。No.4 株を MM 培地で 30°C, 120spm, 15h 前培養した後、新しい MM 培地に 1% 植菌して 30°C, 120spm, 6~7h 培養した。培養した菌をペーパーディスク (直径 8mm, Thick) に 10 µl 添加し、*F.oxysporum* J1 を塗布した MM-agar 培地に置き、No.4 株の植物病原菌に対する阻止円を形成させた。30°C, 3 日間培養後、阻止円内外に含まれる NH₂OH 量と阻止円の大きさを測定し、NH₂OH の生産量と抗菌活性の関係を調べた。

3-2-5 培養条件による影響

培地組成、培地の初期 pH、培養温度による、No.4 株の NH₂OH 生産への影響を検討した。No.4 株を培養する培地には MM と L 培地、培地の初期 pH は 5, 7, 9 とした。pH の調製には 2N HCl と 2N NaOH を使用した。培養温度は 20, 30, 37°C の 3 種類で培養した。

3-3 結果

3-3-1 寒天培地における C/N 比と NH_2OH の生産量と抗菌活性との関係

MM-agar 培地の唯一の窒素源である $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の量を 2 g/l に固定し、炭素源であるクエン酸ナトリウムの添加量によって寒天培地の C/N 比を変化させた時の C/N 比と No.4 株の NH_2OH の生産量、抗菌活性の関係を調べた。結果を Fig. 3-1 に示す。培地の C/N 比が 1~2 付近で植物病原菌 *F.oxysporum* J1 に対する抗菌活性（阻止円の面積）が最大を示した。また培地の C/N 比が 1~3/2 付近で阻止円内の NH_2OH の生産量は最大になった。 NH_2OH の生産量と抗菌活性の大きさが対応していることがわかった。

3-3-2 液体培地における培地組成による NH_2OH の生産量の変化

MM 培地と L 培地を使用して、培地組成による No.4 株の増殖と NH_2OH の生産量を測定した。結果を Fig. 3-2 に示す。L 培地では、対数増殖期後期から生産され、定常期に約 10mg/l で一定の値となった。MM 培地では、対数増殖期前期から生産され、定常期に約 12mg/l で一定の値となった。培地組成によって最終的な NH_2OH 生産量はほとんど変わらなかったが、No.4 株が NH_2OH を生産しはじめるまでの時間は MM 培地の方が短かった。No.4 株を培養し続けると、定常期にはいつてから 2 日目で NH_2OH が減少し始め、3~4 日目で無くなった（データ示さず）。

3-3-3 培地の pH による NH_2OH の生産量の変化

初期 pH を変化した時、No.4 株の菌の増殖、培地の pH 変化、 NH_2OH の生産量を経時的に測定した。MM 培地での結果を Fig. 3-3、L 培地での結果を Fig. 3-4 に示す。L 培地では、菌の増殖速度、定常期の菌数ともに同程度であり、初期 pH による違いはなかった。初期 pH に関わらず、菌の培養によって培地の pH は 8 に収束した。 NH_2OH の生産は、培地の pH が 7 以上になり、菌の増殖が対数増殖後期になった頃から始まり、定常期には一定の値を示した。初期 pH9 の場合、菌の増殖に従って pH は低下したが、対数増殖後期になり、菌が NH_2OH を生産し始めると pH は増加の傾向を示した。L 培地の初期 pH によって NH_2OH 生産はほとんど変わらなかった。MM 培地では、初期 pH5 の培地で No.4 株は増殖しなかったが、死滅してはいなかった。初期 pH7 と 9 の場合、定常期の菌数は同程度であるが、菌の増殖速度は初期 pH の高い

pH9の方が速かった。また No.4 株が NH_2OH を生産し始めるまでの時間も初期 pH がアルカリ性 (pH=9) の方が短かった。緩衝液で pH を一定値 (pH5, 7, 9) に固定したところ、中性から弱アルカリ性の培地の方が NH_2OH の生産や菌の増殖に適していることが分かった。

3-3-4 培養温度による NH_2OH の生産量の変化

初期の培地 pH7 とし、各培養温度による No.4 株の増殖と NH_2OH の生産量を経時的に測定した。L 培地での結果を Fig. 3-5、MM 培地での結果を Fig. 3-6 に示す。L 培地では、菌の増殖速度は温度に依存しており、温度が高くなるにつれて増殖速度は速くなったが、定常期の菌数は同程度であった。 NH_2OH の生産は 30°C が最もよく、 20°C の 2 倍の生産量であった。しかし 30°C より温度を上げた 37°C では全く生産しなくなった。また生産の時期は 30°C では対数増殖前期から定常期にはいるまでで最も長く、 20°C では対数増殖後期から定常期であった。MM 培地でも、菌の増殖速度は温度に依存し、定常期の菌数は一定であった。 NH_2OH 生産は 30°C が最もよく、 37°C の 2 倍の生産量であった。しかし 30°C より温度を下げた 20°C では全く生産しなくなった。この結果は L 培地の場合と逆の結果であった。また生産の時期は培養温度に関わらず対数増殖前期から定常期までで共通していた。最終的な NH_2OH 生産は両培地ともに 30°C で最適となった。

3.4 考察

寒天培地における培地組成の C/N 比と NH_2OH の生産量、植物病原菌 *F.oxysporum* J1 に対する抗菌活性を検討した。寒天培地中の C/N 比を変化させた時、C/N 比=1~3/2 で NH_2OH の生産が最大となり、その C/N 比のとき抗菌活性も最大を示した。 NH_2OH の生産量が病原菌に対する抗菌活性 (阻止円の大きさ) に依存していることから、No.4 株は抗菌物質 NH_2OH によって植物病原菌を抑制することが確認された。

次に、液体培養における培地組成、培地の初期 pH、培養温度による No.4 株の NH_2OH の生産量を検討した。L 培地、培地の初期 pH=7、培養温度 30°C で NH_2OH の生産量が最大の 20mg/l となった。No.4 株の培養速度は、培地に栄養が多く、培地

pHが高く、培養温度が高いときに最も速くなったことから、検討した全ての条件（培地組成、培地の初期 pH、培養温度）に依存することが明らかになった。No.4 株の定常期の菌数は培地の栄養分（培地組成）にのみ依存していた。No.4 株は栄養の豊富な L 培地では低温の 20℃でも NH_2OH を生産することから、No.4 株を施用した土壌で植物病抑制効果が期待された。一般的に抗生物質や溶菌酵素等の抗菌物質を生産する時期は菌の増殖の対数後期から定常期にかけてであり、この時期に No.4 株による NH_2OH の生産量も増加した。

3-5 結論

本章では、No.4 株の植物病原菌に対する抗菌活性能力を増加させるために抗菌物質である NH_2OH の生産量を最大にする菌の最適培養条件を検討した。寒天培地の C/N 比が 1~3/2 のときに、病原菌に対する抗菌活性が最も高くなり、 NH_2OH の生産量も最大値を示したことから、培地組成の最適 C/N 比は 1~3/2 であることが明らかとなった。液体培地の培地組成、培養温度、培地の初期 pH による NH_2OH の生産性を検討したところ、No.4 株の NH_2OH の最適生産条件は初期 pH7 の L 培地、培養温度 30℃であった。 NH_2OH の生産量は培養温度に大きく依存し、生産の時期は培地組成、培養温度、初期 pH に依存していることが明らかになった。

3-6 参考文献

1. You, C. B., Lin, M., Fang, X. J., and Song, W.: Attachment of *Alcaligenes* to rice roots, *Soil. Biol. Biochem.*, 27, 463-466 (1995)
2. Scher, F. M., Kloepper, J. W., and Laliberte, M.: Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: Relationship to bacterial motility, chemotaxis, and generation time, *Phytopathology*, 78, 1055-1059 (1988)
3. Ahring, B. K., Schmidt, J. E., Winther, T., Nielsen, M., Macario, A. J., and de-Macario, E. C.: Effect of medium composition and sludge removal on the production, composition, and architecture of thermophilic (55°C) acetate-utilizing granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2538-2545 (1993)

4. Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., and Defago, G.: Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity, *Phytopathology*, 82, 190-195 (1992)
5. Fenton, A. M., Stephens, P. M., and O'Gala, F.: Exploitation of gene(s) involved in 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3873-3878 (1992)
6. Graeme, T., Cook, K. A., and Faull, J. L.: Effect of ultraviolet-induced mutants of *Trichoderma harzianum* with altered antibiotic production on selected pathogens *in vitro*, *Can. J. Microbiol.*, 37, 659-664 (1992)

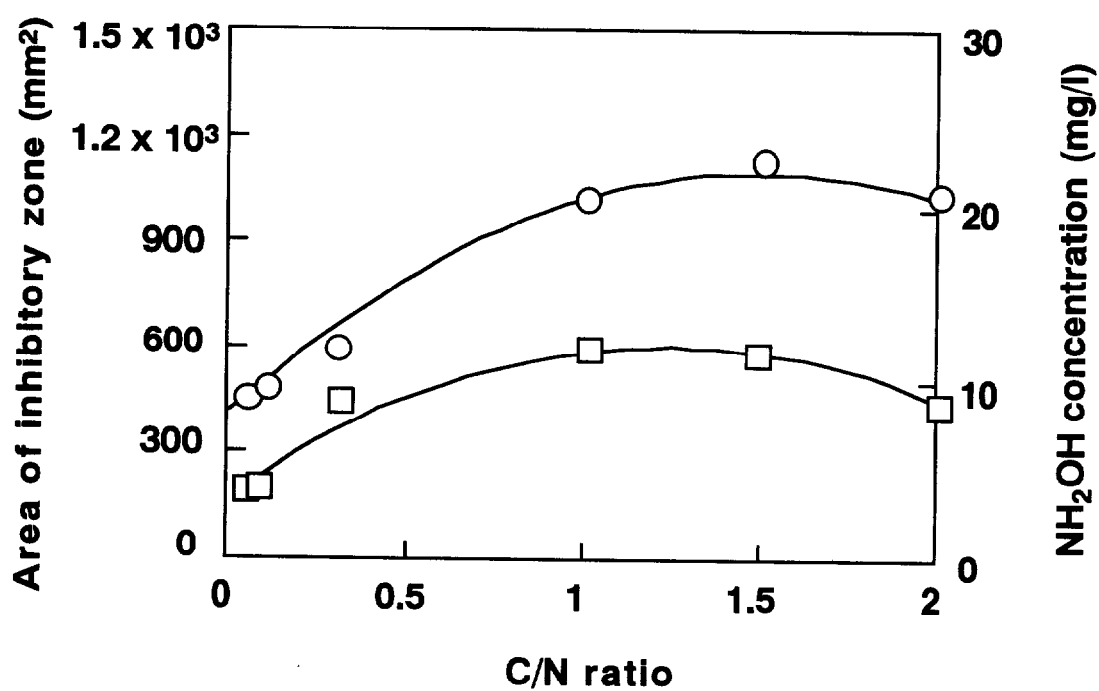


Fig. 3-1 Effect of C/N ratio in MM-agar medium on NH_2OH concentration (□) and area of inhibitory zone to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race J1 SUF119 (○). (30°C, 3days cultivation)

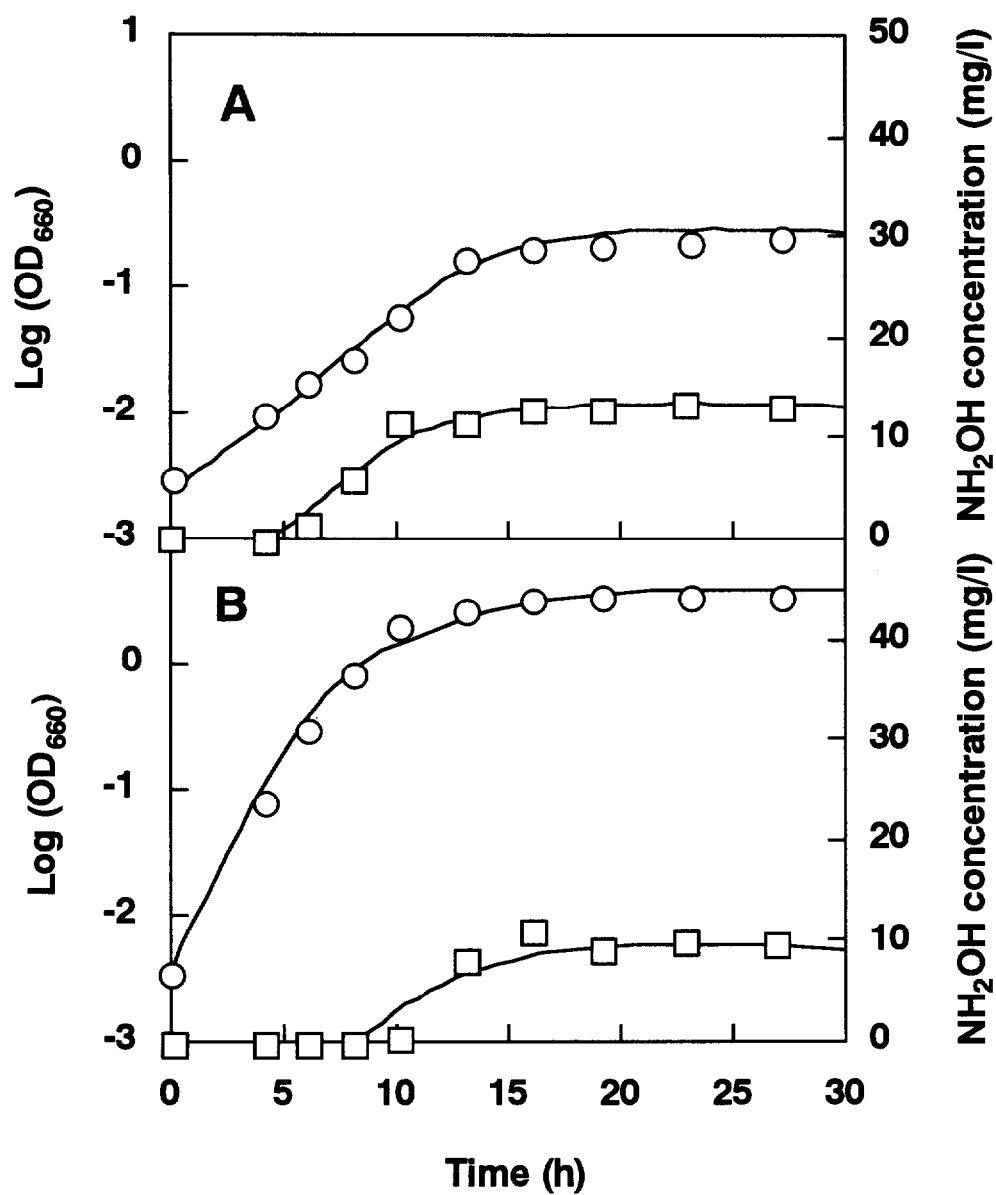


Fig. 3-2 Growth (○) and NH_2OH production (□) by *Alcaligenes faecalis* No.4 in MM medium (A) and L medium (B). (30°C)

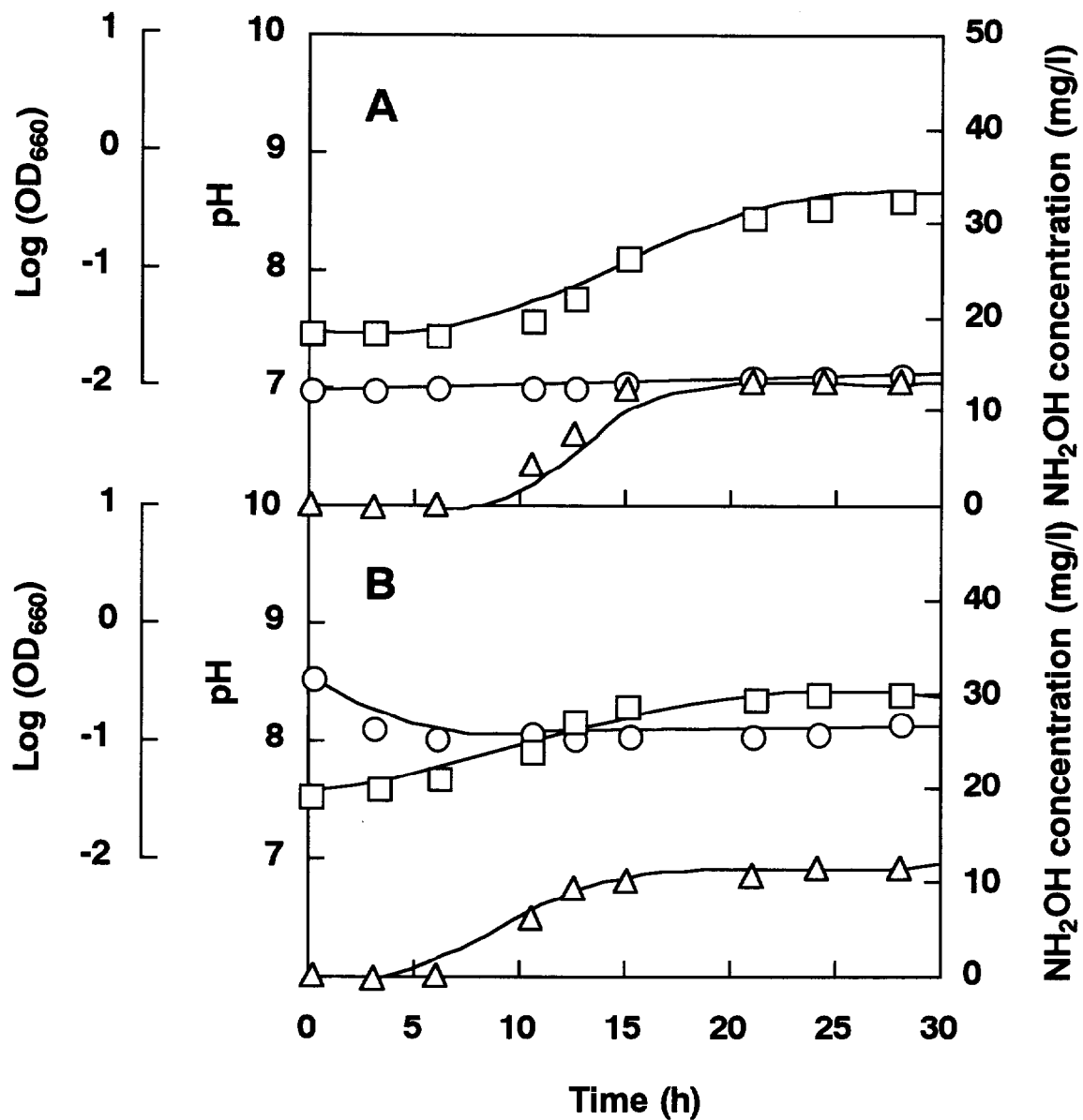


Fig. 3-3 Change in growth (□), pH (○) and NH₂OH concentration (Δ) when *Alcaligenes faecalis* No.4 was cultivated at initial pH 7 (A) and 9 (B) in MM medium.

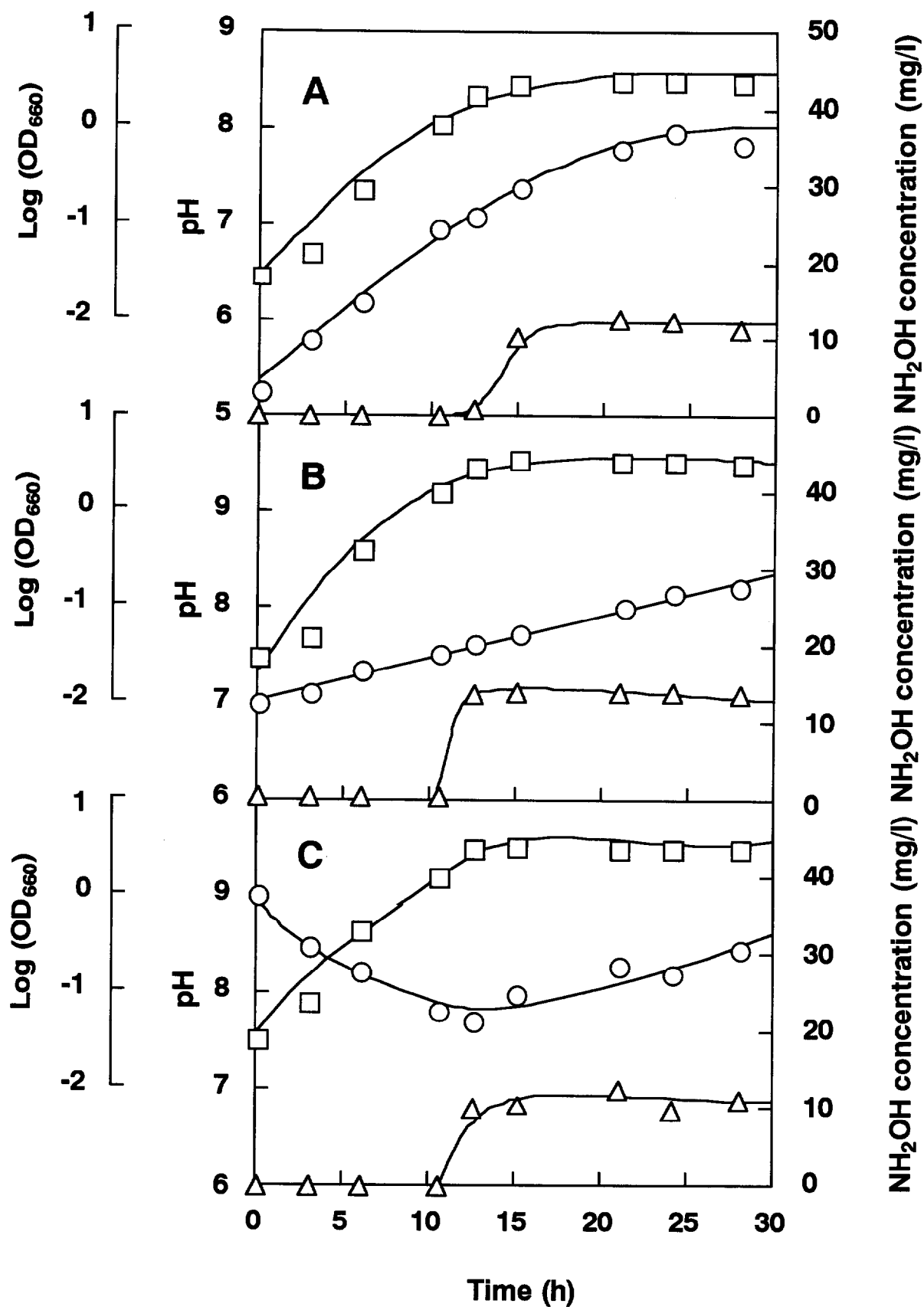


Fig. 3-4 Change in growth (□), pH (○) and NH_2OH concentration (△) when *Alcaligenes faecalis* No.4 was cultivated at initial pH 5 (A), 7 (B) and 9 (C) in L medium.

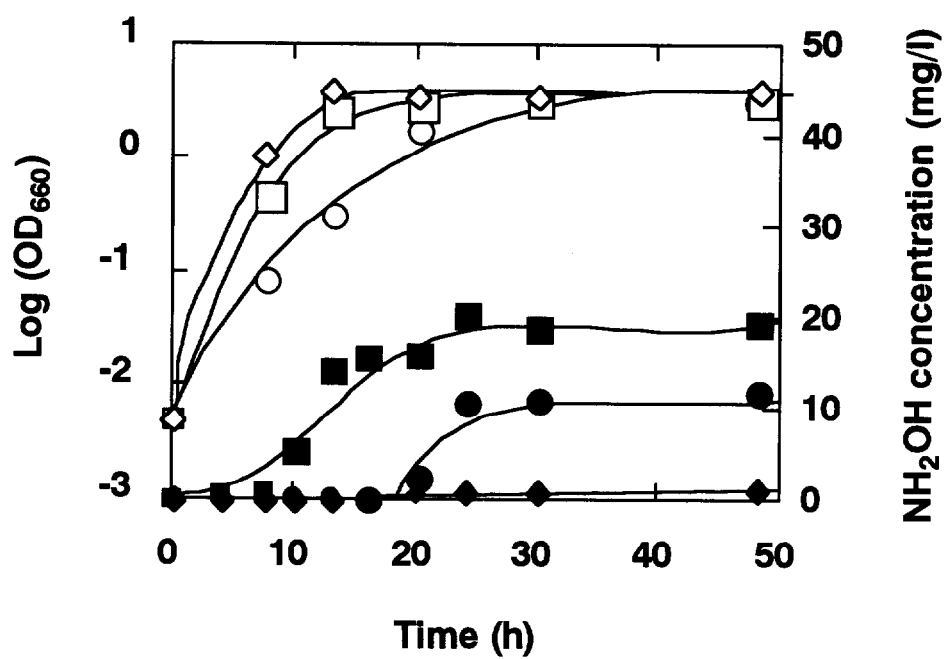


Fig. 3-5 Effect of temperatures on growth and NH₂OH concentration in L medium.

Growth: 20°C (○), 30°C (□), 37°C (◇)

NH₂OH concentraion: 20°C (●), 30°C (■), 37°C (◆)

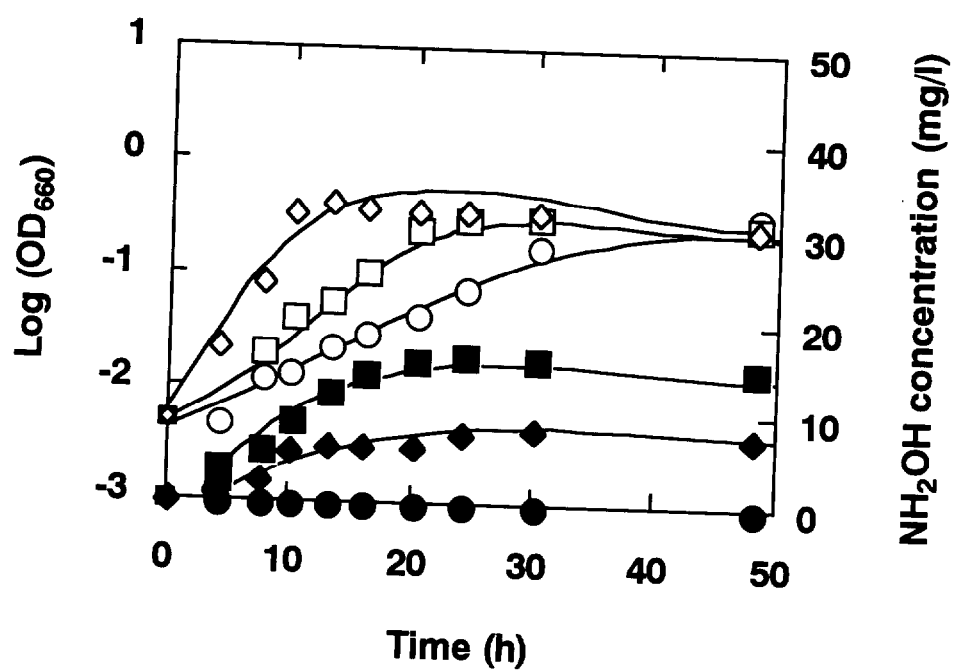


Fig. 3-6 Effect of temperatures on growth and NH₂OH concentration in MM medium.
Growth: 20°C (○), 30°C (□), 37°C (◇)
NH₂OH concentraion: 20°C (●), 30°C (■), 37°C (◆)

第4章 *A.faecalis* No.4の土壌における挙動

4-1 緒言

一般に微生物農薬には、微生物そのものを農薬として使用する場合と、微生物が生産する代謝産物を使用する場合がある(1)。前者のように微生物菌体そのものを利用する場合には拮抗微生物の土壌定着性が問題となる。実際に植物病を防除するためには、病原菌以外の他の土着微生物に拮抗して土壌に定着することが必要であり、定着率が高ければ防除効果の維持にも有利である。したがって、植物病の抑制菌の土壌における挙動を調べることは重要である。これまで土壌での生態に関する報告は *Pseudomonas* 属の論文がほとんどである。土壌中での菌の挙動を詳しく観察するためには他の菌が存在する土壌で目的の菌を特異的に検出が必要であり(2)、その方法には蛍光遺伝子(3)、*lacZ*遺伝子(4)導入による菌の発光と染色や抗生物質耐性(5, 6)等が報告されている。またこれらの検出法を使った *Pseudomonas* 属の土壌での挙動も報告されている(7-9)。さらに根圏での定着性を観察した報告もある(10-12)。また *Alcaligenes* 属は *Pseudomonas* 属と同じ系統であるため、土壌での特徴は *Pseudomonas* 属と同様であることが期待された。

本研究では新規の微生物農薬の開発を目的として、第2章では植物病原菌に対して抗菌活性を示す No.4 株の同定と特徴について検討し、栄養の乏しい培地での抗菌スペクトルの広さ、強い薬剤耐性、炭素源の貯蔵等から No.4 株が新規の微生物農薬として非常に有効であることを示した。さらに植物病原菌に対する No.4 株の抗菌物質が菌の従属栄養硝化反応中に生産される NH_2OH であることを示した。第3章では No.4 株の抗菌物質である NH_2OH の最適生産条件を決定した。No.4 株の植物病の防除効果を植物試験で検討する際には NH_2OH の最適生産条件で培養した培養液を使用することにした。これまでの研究は *in vitro* におけるものであったので、次の段階として、実際の土壌を使用した時の No.4 株の挙動と植物病抑制効果を調べる必要がある。本章では実験で用いる土壌に関する基礎的な物性を調べた後、その土壌における No.4 株の挙動を温度 15, 30℃ で調べた。また、滅菌土壌からの No.4 株の抗菌物質である NH_2OH の回収を行った。土壌には後の章で述べるトマト苗立枯病抑制の植物試験と同じものを使用した。土壌中の土着微生物から No.4 株を特異的に検出するために抗生物質耐性マーカーが必要であるが、No.4 株は Table 2-11 に示した

ように様々な抗生物質に耐性を持つので、今回はマーカーとしてストレプトマイシン 100mg/l を使用した。

4-2 実験材料及び方法

4-2-1 菌株

A.faecalis No.4 (Sm^r)

No.4 株は抗生物質ストレプトマイシン 100mg/l に耐性を示す。

4-2-2 培地

使用した培地を Table 2-2 に示す。いずれの培地もオートクレーブ (120℃, 20min., 1.0~1.2 kg/cm²) により滅菌処理した。

4-2-3 土壌

本研究では淡色黒ボク土（神奈川県秦野産，腐植 5%以下，土性 CL）と土壌改良材のパーミキュライトを 4:1 (w/w) になるように混合した土壌を使用した。淡色黒ボク土の特性を Table 4-1 に示す。実験には、同じ場所からではあるが取得時期の異なる 2 種類の淡色黒ボク土を使用した。組成、pH、飽和容水量等の土壌特性はほぼ同じなので同様の土壌とみなして使用した。さらに土壌には肥料として、過リン酸石灰 (P₂O₅ 17%) と燐加安 42 号 (14-14-14%) を土壌 5kg に対してそれぞれ 50g (P₂O₅ 8.5g 相当), 25g (N 3.5g 相当) を添加した。過リン酸石灰は CaSO₄ と Ca(H₂PO₄)₂ の混合物で、最も代表的なリン酸肥料である。また燐加安 42 号は (NH₄)₂SO₄, K₂SO₄ および重過リン酸石灰の混合物である。これらの添加により、N, P₂O₅, K₂O が 100g の土壌中でそれぞれ 70mg, 240mg, 70mg となる。土壌から NH₃OH を抽出する実験では、2N NaOH によって土壌 pH を酸性から中性 (pH 7.0) にした。土壌は 2 重にした滅菌袋 (キノバック NT-25W, 日昌(株)) に封入し、オートクレーブ (120℃, 60min., 1.0~1.2 kg/cm²) を 2 回かけることにより滅菌処理をした。

4-2-4 土壌検定

使用した土壌に関して以下の方法で含水率、pH、最大容水量を調べた。

i) 含水率；乾燥させたるつばに適当量の土壌を秤量した後、105℃で 12 時間以上乾

燥させ、乾燥重量を測定した。乾燥前後の重量差により、含水率を求めた。

ii) pH (ガラス電極法) ; 土壌の pH は土壌に蒸留水を加えた懸濁液の pH で求めた。土壌に対する水の比が、日本では国際土壌学会において土壌反応委員会が決定した 1:2.5 が採用されているため、それに従った(13)。風乾土 10g に蒸留水 25ml を加え、よく攪拌して 5 分間放置した。測定前に再び攪拌して懸濁状態にしてから pH を測定した。

iii) 最大容水量 ; Hilgard 法 (14) に従い土壌の最大容水量を求めた。計器 (重量 A) として、底に直径 1mm の穴を 4mm の間隔であけた底板を持つ、深さ 10mm, 直径 56mm, 内容積 25ml の黄銅製円筒容器を使用した。計器の底面外側に濾紙 (重量 E) を貼付し、これに風乾土を入れて秤量 (重量 B) し、風乾土の重量を算出した。次に、ガラスシャーレに深さ 1mm 程度になるように水を入れ、土壌を詰めた計器を静かに浸漬した。水が土壌の表面を浸して 1 時間後、計器を取り出し底部の濾紙を除いた。そして濾紙で計器の外側の水分を除き、直ちに秤量 (重量 C) して、最大容水量を以下の式から算出した。

$$\text{乾土*の重量 (g) ; } D = \frac{(B-A-E) \times (100 - \text{風乾土*含水率})}{100}$$

$$\text{吸収された水分 (g) ; } W = C - A - D$$

$$\text{最大容水量 (g / 100g-dry soil) } = W \div D \times 100$$

* ; 本研究では、水分を除いた土壌 (乾燥土壌) を乾土、自然乾燥した土壌を風乾土と呼ぶ。

4-2-5 ストレプトマイシン耐性の確認

A. faecalis No.4 は幅広い抗生物質耐性を持ち、ストレプトマイシン (Sm) を 100mg/l 含む L-agar 培地にも増殖することが Table 2-11 で示された。そこで No.4 株の菌体懸濁液を白金耳で Sm を 100mg/l 含む L-agar 培地に塗抹し、30℃で 1 日間静置培養した。No.4 株が Sm を含まない L-agar 培地と同様に生育することを確認した。

4-2-6 土壌への菌の接種法および接種土壌の培養

No.4 株は L 培地、30℃で 15 時間前培養をした後、さらに L 培地、30℃で 6

～7時間培養を行い、遠心（7500rpm x 10min.）して菌を集めた。集めた菌体を0.85%NaCl水溶液（pH7.0）で2回洗浄し、滅菌水に再懸濁した。菌体を十分に懸濁させて土壌に接種し、土壌をよく混合した。さらに土壌中の水分量が最大容水量の60%になるように滅菌水で調整した。菌体を接種した土壌は、15℃または30℃の暗所に静置した。

4-2-7 土壌からの菌の回収および菌数とNH₂OHの測定

土壌から均等に採取してきた土8gを秤量済みの50ml三角フラスコに入れ、土壌の重量を測定した。ここに0.85%NaCl水溶液（pH7.0）20mlを添加し、振とう（140spm x 15min.）して土壌から菌を分離した。土着微生物の生菌数を測定する際は、得られた土壌懸濁液を二分し、ひとつはそのまま希釈して、もう一方は菌の熱耐性を調べるために80℃の熱水に10min.浸した後に希釈して、それぞれPDA、L-agar培地に塗布し、30℃で2日間培養した。No.4株の土壌中の生菌数を測定する際は、この土壌懸濁液を希釈してSmを100 mg/l含むL-agar培地に塗布し、30℃で2日間培養した。土壌中のNH₂OHを測定する際には、土壌を遠心分離（10000rpm x 10min.）して得られた上清を2-2-5で述べた方法により測定した。

4-3 結果

4-3-1 トマト栽培施設内の気温と地温の日変化

冬期トマト栽培施設ビニールハウス内の気温と地温の日変化を測定した。測定場所は神奈川県横浜市緑区、測定日は1995年1月31日である。ハウス内の気温は地上から高さ1.5m、地温は地面から深さ15cmで調査した。結果をFig. 4-1に示す。ハウス内の気温は冬期にも関わらず昼には一端30℃程度まで上昇し、夜間は12℃程度まで低下した。ハウス内の湿度は手が汗ばむ程度であった。一方、地温は15℃前後で一日中ほぼ一定であった。

4-3-2 滅菌、非滅菌土壌中の土着微生物の菌数変化

No.4株の土壌における挙動を検討するために使用した土壌には、初めから生息する種々の土着微生物がいる。そこで、滅菌、非滅菌土壌中に存在する土着微生物の種類と菌数を測定した。結果をFig. 4-2, Table 4-2に示す。土壌中に生息する菌

の種類は様々であり、それぞれを識別することは不可能であった。滅菌土壌には 10^1 以下 (CFU/g-dry soil) の土壌微生物しか存在しなかったが、非滅菌土壌には 10^5 程度以下 (CFU/g-dry soil) 定着していた。非滅菌土壌では、細菌培養用の L-agar 培地のほうが、糸状菌培養用の PDA 培地より多くの菌数が観察された。また、胞子化等による熱耐性 (80°C , 10min.) を示す微生物がその中の約 1/4 であった。さらに、非滅菌土壌を暗所で 14 日間静置培養したところ、L-agar 培地に現れた微生物は同じ菌数であったが、PDA 培地に現れた微生物は 2 倍に増加していた。14 日間の静置培養によって糸状菌だけが増殖した。

4-3-3 滅菌土壌における No.4 株の菌数変化

滅菌土壌には土着の微生物がほとんど存在していないことが明らかになったので、滅菌土壌における No.4 株の土壌定着性を調べた。結果を Fig. 4-3 に示す。培養時間とともに土壌中に生存する No.4 株の菌数が次第に減少した。No.4 株を 7.5×10^8 (CFU/g-dry soil) 土壌に添加して、 30°C で 35 日間培養すると、菌数は 3.2×10^6 (CFU/g-dry soil) に減少し、その減少率は約 1/200 であった。また、 15°C では 9.0×10^7 (CFU/g-dry soil) に減少し、その減少率は約 1/10 であった。温度が低いほど菌の土壌定着性がよく、トマト栽培施設内の地温の平均である 15°C では、35 日間培養しても十分安定に存在した。

4-3-4 非滅菌土壌における No.4 株の菌数変化

非滅菌土壌には土着微生物が 10^5 (CFU/g-dry soil) 存在することが明らかになったので、土着微生物が存在する非滅菌土壌における No.4 株の土壌定着性を調べた。結果を Fig. 4-4 に示す。非滅菌土壌でも培養時間とともに菌数が次第に減少した。No.4 株を 7.5×10^8 (CFU/g-dry soil) 土壌に添加して、 30°C で 35 日間培養すると、菌数は 2.9×10^5 (CFU/g-dry soil) に減少し、その減少率は約 1/2000 であった。また、 15°C では 9.0×10^7 (CFU/g-dry soil) に減少し、その減少率は約 1/10 であった。温度が低いほど土壌定着性がよく、トマト栽培施設内地温の平均である 15°C では 35 日間培養しても十分安定に存在した。

温度 15°C では、土着微生物の菌数によらず滅菌、非滅菌土壌ともに No.4 株の生菌数はあまり減少しなかった。温度 30°C では、滅菌土壌よりも土着微生物の多い非滅菌土壌のほうが、No.4 株の生菌数の減少が速かった。

4-3-5 No.4株の抗菌物質 NH_2OH の土壌からの抽出と確認

土壌 (pH7.0) に No.4 株の菌体懸濁液を添加し、滅菌土壌中の菌数変化と NH_2OH 生産を測定した (Table 4-3)。菌体懸濁液を 5.9×10^8 (CFU/g-dry soil) 添加したところ、1日目の菌数は 2.6×10^9 (CFU/g-dry soil) に増加し、その時 NH_2OH は $4.8 (\mu\text{g/g-dry soil})$ 検出された。2日目になると、菌数は 7.6×10^8 (CFU/g-dry soil) に減少し、 NH_2OH は検出されなかった。

4-4 考察

本章では、No.4 株を微生物農薬として利用する際に重要な条件のひとつである、土壌における菌の定着性と抗菌物質である NH_2OH の生産について検討した。土壌には野菜の栽培に広く用いられている淡色黒ボク土を使用し、滅菌・非滅菌土壌における挙動を培養温度 15, 30℃で検討した。

初めに、実際にトマト栽培に使用されているハウス内の気温と地温の日変化を調べたところ、気温は平均 20℃で上下 7℃近く変化した。地温は 15℃付近で一定であった。土壌生息微生物の菌数は温度 15℃で測定するのが適当であることが明らかになった。次に、土壌中に生息する微生物の種類と菌数を調べたところ、種類は様々であり、それぞれを識別することは不可能であった。滅菌土壌はほとんどの微生物が死滅していた。一方、非滅菌土壌からは菌が 10^5 程度 (CFU/g-dry soil) 検出された。土壌には細菌より、糸状菌のほうが多く、14日間静置培養によって糸状菌だけが増加したことから、次章から使用する植物病原糸状菌 *R.solani* K-1も土壌中で増加することが示唆された。

土壌中での No.4 株の挙動を滅菌、非滅菌土壌、温度 15, 30℃で調べたところ、温度 15℃では No.4 株は土壌中で 10^7 (CFU/g-dry soil) 程度で安定に存在し、温度 30℃では培養時間とともに減少し、滅菌土壌で 10^6 (CFU/g-dry soil) 程度、非滅菌土壌で 10^5 (CFU/g-dry soil) 程度で安定した。実際に使用される土壌の地温は 15℃程度であるため、この条件では No.4 株は非常に安定して存在することが分かった。No.4 株の土壌定着性が非滅菌土壌で悪いのは土壌微生物との拮抗作用 (競争) によるものと考えられた。

最後に土壌における No.4 株の NH_2OH の生産量を測定した。 NH_2OH の標準液を土壌に接種しても土壌の触媒反応によってすぐに NO_3^- に酸化されるため、これまで土壌からの NH_2OH の抽出は不可能であった。土壌から NH_2OH が検出できない理由として土壌が酸性であることや土壌の触媒作用が考えられたので、土壌を中性にして NH_2OH が分解しにくい土壌を作製した。その土壌における No.4 株の NH_2OH 生産を測定したところ、滅菌土壌中で No.4 株が若干増殖し、その際に抗菌物質である NH_2OH を生産することが明らかになった。

4-5 結論

No.4 株は地温 15°C で滅菌・非滅菌土壌に関わらず、 10^7 (CFU/g-dry soil) 程度で安定に存在し、 30°C でも滅菌土壌では 10^6 (CFU/g-dry soil) 程度、非滅菌土壌では 10^5 (CFU/g-dry soil) 程度で存在した。非滅菌土壌中に存在する土着微生物は 10^5 (CFU/g-dry soil) であり、実際の植物試験の地温は 15°C であるため、No.4 株は土壌中で優先菌であり、非常に長時間安定して存在することが分かった。また、No.4 株は土壌中で抗菌物質である NH_2OH を生産することが分かった。

4-6 参考文献

1. 駒田 旦, 稲葉 忠興他編 : 病害防除の新戦略 全国農村教育協会 (1992)
2. Nautiyal, C. S.: A method for selection and characterization of rhizosphere-competent bacteria of chickpea, *Cur. Microbiol.*, 34, 12-17 (1997)
3. Flemming, C. A., Leung, K. T., Lee, H., Trevors, J. T., and Greer, C. W.: Survival of *lux-lac*-marked biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* UG2L in soil monitored by nonselective plating and PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1606-1613 (1994)
4. Prosser, J. I., Killham, K., Glover, L. A., and Rattray, E. A.: Luminescence-based systems for detection of bacteria in the environment, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 16, 157-183 (1996)
5. Ramos, J. L., Duque, E., and Gonzalez, M. I.: Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL

- plasmid, Appl. Environ. Microbiol., 57, 260-266 (1991)
6. Nautiyal, C. S.: A method for selection and characterization of rhizosphere-competent bacteria of chickpea, Curr. Microbiol., 34, 12-17 (1997)
 7. Thompson, I. P., Lilley, A. K., Ellis, R. J., Bramwell, P. A., and Bailey, M. J.: Survival, colonization and dispersal of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* SBW25 in the phytosphere of field grown sugar beet, Bio / Technology, 13, 1493-1497 (1995)
 8. Devliegher, W., Arif, M. A. S., and Verstraete, W.: Survival and plant growth promotion of detergent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK₂, Appl. Environ. Microbiol., 61, 3865-3871 (1995)
 9. Ronchel, M. C., Ramos, C., Jensen, L. B., Molin, S., and Ramos, J. L.: Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation, Appl. Environ. Microbiol., 61, 2990-2994 (1995)
 10. Van-Overbeek, L. S., Eberl, L., Givskov, M., Molin, S., and van-Elsas, J. D.: Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil, Appl. Environ. Microbiol., 61, 4202-4208 (1995)
 11. Van-Overbeek, L. S., Van-Veen, J. A., Van-Elsas, J. D.: Induced reporter gene activity, enhanced stress resistance, and competitive ability of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strain released into a field plot planted with wheat, Appl. Environ. Microbiol., 63, 1965-1973 (1997)
 12. Kragelund, L., and Nybroe, O.: Competition between *Pseudomonas fluorescens* Ag1 and *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pHP4) during colonization of barley roots, FEMS Microbiol. Ecol., 20, 41-51 (1996)
 13. 日本土壤肥料学会監修: 土壤標準分析・測定法 博友社 (1986)
 14. 永井 伸明: 土壤の実験法 木屋製作所 (1970)

Table 4-1 Characteristics of soils.

Characteristics	Old Soil (Akatsuchi)	New Soil (Akatsuchi)
Texture	Low humic andosol	Low humic andosol
C (%)	0.91	0.89
N (%)	0	0
Moisture content (%)	12.7	12.9
Maximum water holding capacity (g / 100g-dry soil)	137	117
Bulk density (g / 100ml)	52.2	64.8
pH (1 : 2.5, H ₂ O)	5.91	6.13

Table 4-2 Population of microorganisms in soils (CFU / g-dry soil) .

	L-agar medium		PDA medium	
	heat treatment		heat treatment	
	(80°C, 10 min.)		(80°C, 10 min.)	
Sterilized soil	10 ¹ >	10 ¹ >	10 ¹ >	10 ¹ >
Non-sterilized soil (0 day)	8.7 x 10 ⁵	2.3 x 10 ⁵	6.3 x 10 ⁵	1.0 x 10 ⁵
Non-sterilized soil (14 days)	9.0 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁵

Table 4-3 Production of hydroxylamine by cell suspension of *Alcaligenes faecalis* No.4 in sterilized soil (pH 7.0).

Time (days)	<i>A. faecalis</i> No.4 (CFU / g-dry soil)	Hydroxylamine (μ g / g-dry soil)
0	5.9×10^8	0
1	2.6×10^9	4.8
2	7.6×10^8	0

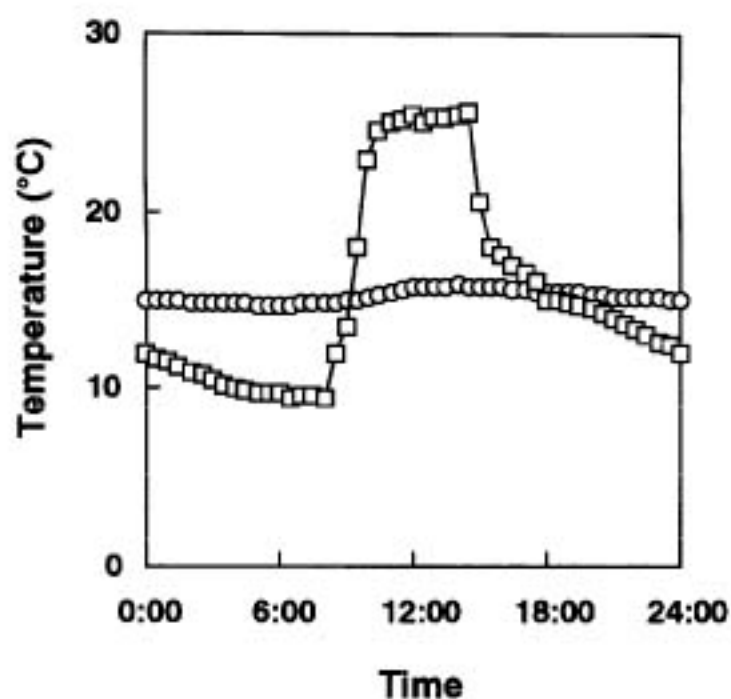


Fig. 4-1 Changes in atmospheric temperature (□) and the soil temperature (○) in a greenhouse of tomato cultivation (Date: Jan. 31, 1995, Midori-ku, Yokohama).

Atmospheric temperature was measured at 1.5 m above the soil surface and soil temperature at 15 cm below the surface

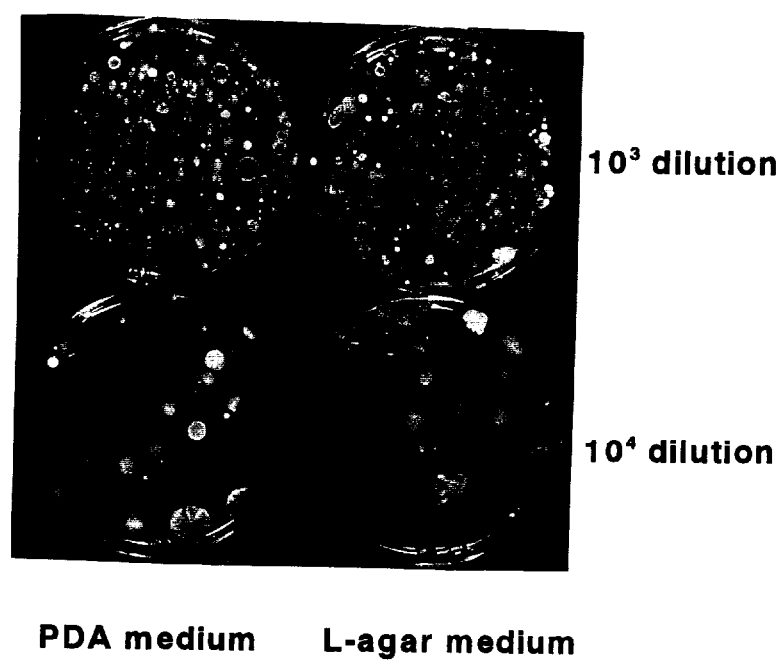


Fig. 4-2 Population of microorganisms in non-sterilized soil.

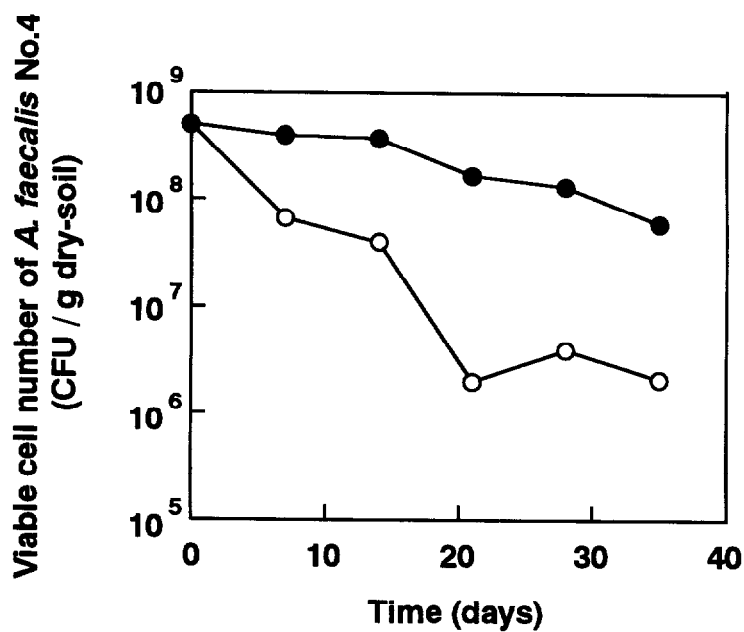


Fig. 4-3 Population dynamics of *Alcaligenes faecalis* No.4 in sterilized soil. ● ; 15°C, ○ ; 30°C

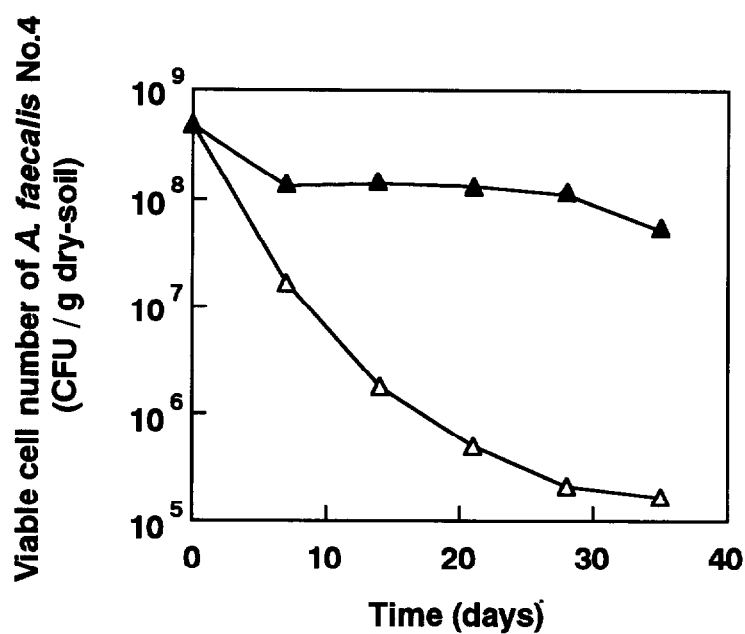


Fig. 4-4 Population dynamics of *Alcaligenes faecalis* No.4 in non-sterilized soil. ▲ ; 15°C, △ ; 30°C

第5章 *A.faecalis* No.4 によるトマト苗立枯病の抑制

5-1 緒言

近代農業における土壌病害の防除には過剰な量の化学農薬が使用されており、その結果、化学農薬の土壌への残留等の環境問題が生じている(1)。これらの問題を解決するひとつの手段として微生物農薬の開発が急がれている。これまでに拮抗微生物が色々な植物病を抑制することが報告されてきた。*Pseudomonas* はグラム陰性菌の中で最も研究がなされており、様々な植物病を抑制した(2-5)。*R.solani* や *Pythium* や *Fusarium* によるトマト苗立ち枯れ病を抑制する拮抗微生物には、*Streptomyces lydicus* WYEC (6), *Enterobacter cloacae* (7), *Gliocladium virens* strain (8), *G.virens* strain GL-21 (9), *Actinoplanes* spp. (10), *Bacillus subtilis* Cot1 (11), *B.subtilis* NB22 (12), *B.subtilis* RB14 (13), *Trichoderma* spp. (14), *T.harzianum* (15) など多数報告されている。また非病原性の *R.solani* による病気の抑制も報告されている(16)。

第2章では No.4 株の特徴を検討し、No.4 株が栄養の乏しい条件でも様々な病原菌に対して幅広い抗菌活性を示すことを *in vitro* で明らかにした。さらに No.4 株の植物病原菌に対する抗菌物質を NH_2OH と決定した。第3章では No.4 株の抗菌物質である NH_2OH の生産の最適培養条件を求めた。第4章では No.4 株の土壌定着性を検討し、土壌生息微生物のいる非滅菌土壌でも 10^5 (CFU/g-dry soil) で1か月以上安定に存在することを確認した。これらの結果から、No.4 株は新規の微生物農薬として非常に有望であり、この菌の土壌での植物病の抑制を検討することは興味深いことである。拮抗微生物が *in vitro* で植物病原菌に強い抗菌活性を示したとしても、必ずしも土壌試験で植物病を抑制するとは限らない。そこで本章では、*in vitro* で植物病原菌に対して抗菌活性を示す No.4 株が実際に植物病を抑制できるかどうかを検討した。使用した植物病は *R.solani* K-1 によるトマト苗立枯病であり、人工気象器内でポット試験を行い抑制効果を検討した。また第2章で No.4 株の抗菌物質が NH_2OH であると同定されているため、No.4 株が生産する量の NH_2OH 水溶液によって植物病を抑制できるかどうかも検討した。初めに、植物体が十分植物病に感染する植物病原菌 *R.solani* の土壌接種量を決定し、次に、土壌に添加する No.4 株量と NH_2OH 量による植物体への影響を検討し、さらにその病原菌の発病条件と No.4 株の接種条件での、

No.4株培養液による苗立枯病の抑制試験を実施した。また、 NH_2OH 標準溶液による植物病の抑制も検討した。

5-2 実験材料及び方法

5-2-1 菌株

A.faecalis No.4 (Sm^r)

No.4株は抗生物質ストレプトマイシン 100mg/lに耐性を示す。

R.solani K-1 (トマト苗立枯病病原菌) は、PDP培地で継代培養し、室温で暗所に保存した。継代は2週間間隔で行い、その都度トマト種子の発芽試験 (*R.solani* K-1によるトマト種子の発芽率) で病原性をチェックした。

5-2-2 培地

使用した培地を Table 2-1に示す。いずれの培地もオートクレーブ (120℃, 20min., 1.0~1.2 kg/cm²) により滅菌処理した。

5-2-3 植物

本研究で使用したトマトは Ponderosa (タキイ種苗 (株)) である。この品種は各種植物病害に対して全く抵抗性を持たず、80%以上の発芽率を示す。

5-2-4 土壌

本研究で使用した土壌を Table 4-1に示す。土壌は2重にした滅菌袋 (キノバック NT-25W, 日昌 (株)) に封入し、オートクレーブ (120℃, 60min., 1.0~1.2 kg/cm²) を2回かけることにより滅菌処理をした。

5-2-5 植物病原菌 *R.solani* K-1の培養および土壌への接種

PDPプレート上で増殖させた *R.solani* K-1を、白金耳で寒天培地ごと約5mm角片に切り取り、200ml三角フラスコ中のPDP培地 (40ml) に植菌した。これを28℃で7日間静置培養し、生育した菌系マットを滅菌水 40ml とともにホモジナイザー (EX-3, (株) 日本精機製作所) でホモジナイズ (8000rpm x 1min.) した。この菌系懸濁液を土壌に接種し、よく混合した。

5-2-6 *A.faecalis* No.4 の培養および土壌への接種

No.4 株を L 培地 5ml に 1% 植菌し、30℃, 120spm で 16 時間前培養した後、L 培地 150ml (500ml 坂口フラスコ) に 1% 植菌し、30℃, 120spm で 1 日培養した。この培養液 50ml を土壌に接種し、よく混合した。

5-2-7 NH_2OH 標準液の土壌への接種

標準液の調製には $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ を使用した。標準液は No.4 株の培養液 50ml に含まれる NH_2OH 濃度と同程度になる 10mg/l と、大過剰となる 50mg/l (滅菌土壌)、20mg/l (非滅菌土壌) を調製した。この標準液 50ml を土壌に接種し、よく混合した。

5-2-8 トマト種子の表面殺菌

種子を 70% エタノールに 1min. 浸漬し、滅菌蒸留水で十分に洗浄した。さらに 0.5% NaClO 水溶液に 10min. 浸漬し、滅菌蒸留水で十分に洗浄し、種子の表面を殺菌した。洗浄は NaClO の臭いがなくなるまで行った。

5-2-9 トマト種子の前発芽

本研究で使用しているトマトの種子が 80% 以上の発芽率を示すことは保証されているが、本研究では種子の前発芽を行い、トマト苗立枯病抑制の試験の対照の発芽率をほとんど 100% にした。5-2-8 の方法で表面殺菌した種子を 1.5% agar プレート上に接種し、人工気象器内で 3 日間生育させて、根が 5~10mm 程度に伸長した発芽種子のみを植物試験に使用した。

5-2-10 植物試験

植物試験の手順を Fig. 5-1 に示す。土壌はプラスチック製のポット (直径 90mm, 高さ 80mm) に 1 ポットあたり約 150g になるように入れ、土壌の含水量が最大容水量の 60% となるように滅菌蒸留水を添加した。含水率が最大容水量の 60~80% となる状態が土壌微生物の活動に最適とされている (17)。 *R.solani* K-1 を土壌に接種する場合には、5-2-5 の方法で菌系マットを土壌に接種した後、トマトを播種するまで 5 日間定着させた。以後各ポットは人工気象器 (LPH-200-RDS, 日本医科器械製作所 (株)) 内に静置した。人工気象器の運転条件は、温度 30℃, 湿度 90%, 蛍光灯

照射（約 10000lux）16h/dayとした。一般的に *R.solani* の生育は湿度が高いほど良い。No.4 株や NH_2OH を土壤に接種する場合には、トマトを播種する3日前に 5-2-6、5-2-7の方法で培養液や標準液を 50ml 接種し、混合した。接種しないポットの土壤も同様に混合した。トマトの種子は、5-2-9の方法で前発芽させたものを1ポットあたり9粒ずつ播種した。植物試験中、各ポットには土壤の含水率が最大容水量の60%となうように滅菌蒸留水を毎日1回添加し、播種後14日間トマトを生育させた。

5-2-11 植物体の生育度の測定

播種後14日目に各ポットのトマトの罹病率、乾燥重量、葉丈を調べ、生育度を評価した。地上に出芽しなかったもの、出芽したが生育が停止したもの、生育途中で地際部が褐変して次第にくびれたもの、さらに倒伏、枯死したものを苗立枯病に感染したものとして扱い（18）、1ポット中で苗立枯病に感染したトマトの本数を全体の9本で割ることにより罹病率を算出した。また、植物体の地上部を収穫して、105℃で一晩乾燥させたものの重量を測定し、1ポットあたりの合計値を乾燥重量とした。生育してきた植物体の葉の先端から地上部までの長さの平均を全体の9本で割ることにより植物体の葉丈を算出した。

5-2-12 統計解析

植物試験は、すべての条件を複数回実施してトマトの生育度の平均値を求め、Fisher's protected LSD (least significant difference) testにより有意差の有無を判断した（19）。

5-3 結果

5-3-1 *R.solani* K-1の土壤への接種量と苗立枯病の発病程度の関係

土壤に接種する *R.solani* K-1の菌系マット接種量を1ポットあたり 1/8, 1/4, 1/2, 1枚として、病原菌の滅菌、非滅菌土壤への接種量による苗立枯病の発病程度を調査した。滅菌土壤での結果を Table 5-1-1、非滅菌土壤での結果を Table 5-1-2 に示す。滅菌土壤、非滅菌土壤ともに、*R.solani* K-1の菌系マットの接種量と苗立枯病の発病程度には相関が観察され、菌系マットの接種量の増加に伴って罹病率が増加し、植物体の地上部分の乾燥重量と葉丈は減少した。ただし、1ポットあたり 1/2 枚接種

した場合と1枚接種した場合とでは、乾燥重量に大きな差は見られなかった。今後、植物試験では1ポットあたり菌糸マットを1枚接種することにした。

5-3-2 *A.faecalis* No.4 および NH_2OH の土壌への接種による植物体への影響

土壌に接種する No.4 株培養液と菌の抗菌物質である NH_2OH 水溶液が植物体に生育阻害を及ぼすかどうかを検討した。No.4 株の液体培養液中に生産される NH_2OH 量は 10mg/l 以下であることから、土壌中の NH_2OH 濃度を 10mg/l (0.5mg/pot) と 20mg/l 又は 50mg/l (1.0mg/pot 又は 2.5mg/pot) になるようにした。滅菌土壌での結果を Table 5-2-1、非滅菌土壌での結果を 5-2-2 に示す。No.4 株培養液 50ml や NH_2OH 水溶液 (10mg/l ~ 50mg/l) 50ml を添加しても、植物体の生育阻害は観察されなかった。トマトは全て生育し、地上部分の乾燥重量や葉丈にも大きな差は見られなかった。 NH_2OH が高濃度で存在すると植物体に変異を起こすが、25mg/l 程度では生育に影響はなかった。逆に、植物体の生長が良くなり乾燥重量が増加したポットも認められた。

5-3-3 *A.faecalis* No.4 の培養液の土壌への接種による苗立枯病の抑制効果

R.solani K-1 の菌糸マットを1ポットあたり1枚接種した土壌に、No.4 株の培養液 50ml を接種して、苗立枯病の抑制効果を調べた。滅菌土壌での結果を Table 5-3-1 と Fig. 5-2、非滅菌土壌での結果を Table 5-3-2 に示す。罹病率の結果を Fig. 5-3 に示す。滅菌土壌では、病原菌 *R.solani* K-1 および No.4 株の培養液を接種しなかったコントロールのポットで播種したトマトが全て正常に生育した。また No.4 株の培養液 50ml だけを添加したポットではほとんどのトマトが正常に生育し、コントロールのポットと有意な差はなかった。しかし、*R.solani* K-1 のみを接種したポットでは病気が強く発生して、85%の罹病率を示した。トマトの地上部分の乾燥重量や葉丈もコントロールに比べて著しく低下した。*R.solani* K-1 とともに No.4 株の培養液 50ml を添加したところ、罹病率は 46%に低下した。葉丈や乾燥重量も *R.solani* K-1 のみを接種したポットに比べて大幅に回復した。一方、非滅菌土壌では、*R.solani* K-1 のみを接種したポットの罹病率は 78%であり、葉丈や乾燥重量を比較して、滅菌土壌の場合より発病程度は若干弱めでバラツキがあった。このような条件の中でも、*R.solani* K-1 とともに No.4 株の培養液 50ml を添加すると、罹病率は 46%に低下した。他の土着の微生物の有無に関係なく苗立枯病の抑制効果が観察された。No.4 株の培養液

50ml を発病土壌に添加することで、滅菌・非滅菌土壌にかかわらず、実際にトマト苗立枯病を抑制できることが分かった。

5-3-4 NH_2OH 水溶液の土壌への接種による苗立枯病の抑制効果

R.solani K-1 の菌系マットを 1 ポットあたり 1 枚接種した土壌に、 NH_2OH 水溶液 50ml を接種して、苗立枯病の抑制効果を調べた。滅菌土壌での結果を Table 5-4-1 と Fig. 5-4、非滅菌土壌での結果を Table 5-4-2 に示す。罹病率の結果を Fig. 5-5 に示す。滅菌土壌では、病原菌 *R.solani* K-1 を接種しなかったコントロールのポットでは播種したトマトが全て正常に生育した。*R.solani* K-1 のみを接種したポットでは 85% の罹病率を示し、地上部分の乾燥重量や葉丈もコントロールに比べて著しく低下した。*R.solani* K-1 とともにポットあたり NH_2OH 0.5mg, 2.5mg を添加したところ、罹病率はそれぞれ 61%, 33% に低下した。植物体の葉丈や乾燥重量も *R.solani* K-1 のみを接種したポットに比べて回復した。 NH_2OH 濃度が高いほど罹病率は減少し、植物体の葉丈や乾燥重量も増加した。一方、非滅菌土壌では、*R.solani* K-1 のみを接種したポットの罹病率は 50% であった。*R.solani* K-1 とともにポットあたり NH_2OH 0.5mg, 1.0mg を添加しても、罹病率はそれぞれ 43%, 44% であり、ほとんど抑制されなかった。非滅菌土壌では、土による吸着や分解に加えて土着の微生物による NH_2OH の分解がおり、苗立枯病が抑制されなかったと考えられる。 NH_2OH 水溶液を土壌に添加すると、他の土着微生物が存在しない滅菌土壌では植物病を抑制できるが、土着微生物が存在する非滅菌土壌では植物病を抑制できなかった。

5-3-5 植物試験における *A.faecalis* No.4 の土壌中の菌数測定及び NH_2OH の回収の試み

No.4 株の培養液の土壌接種時（0 日目）とトマトの種子の播種時（3 日目）とトマトの生育終了時（17 日目）にポットより土壌をサンプリングし、No.4 株の土壌中の菌数を測定した。特にトマトの生育終了時の測定には根を含む根圏土壌を使用した。結果を Fig. 5-6 に示す。滅菌土壌では、No.4 株の培養 0 日目は 5.0×10^8 (CFU/g-dry soil) であるが、3 日目には菌数の微量な増加を示し、17 日目では 4.0×10^7 (CFU/g-dry soil) になり、添加時から比べると 1 桁オーダーが減少した。一方、非滅菌土壌では、0 日目は滅菌土壌と同じ菌数であるが、滅菌土壌と違い時間が経つにしたがって菌数は減少し続けた。最終的に 17 日目では 1.8×10^6 (CFU/g-dry soil)

になり、0日目から2桁オーダーが減少した。植物試験中では、非滅菌土壌より滅菌土壌のほうが、No.4株の土壌定着性が10倍高かった。

また、土壌接種時（0日目）とトマトの種子の播種時（3日目）とトマトの生育終了時（17日目）に、植物試験中の土壌に含まれる NH_2OH の回収を試みたが、土壌から NH_2OH は検出されなかった。

5-4 考察

本章では、No.4株を土壌に接種し、*R.solani*K-1によるトマト苗立枯病を抑制できるかを検討した。またNo.4株の抗菌物質である NH_2OH を接種したときの植物病の抑制効果も検討した。滅菌土壌と非滅菌土壌を使用して土着の微生物の影響も観察した。

初めに植物病原菌*R.solani*K-1の土壌接種量による苗立枯病の発病程度を植物体の生育度で調べた結果、植物病原菌の土壌接種量と植物病の発病程度に相関があり、1ポット当たり菌系マットを1枚土壌に接種すると十分な発病を示すことが分かった。滅菌土壌と比べて非滅菌土壌における発病は低いことから、土着微生物による拮抗作用が示唆された。土壌に菌系マットを1枚以上接種しても苗立枯れ病の発病は変わらなかった。今後の植物試験では、滅菌土壌でも非滅菌土壌でも、植物病を発病させるために1ポット当たり菌系マットを1枚土壌に接種することにした。次に、No.4株の培養液と菌が生産する抗菌物質 NH_2OH 水溶液の土壌への接種による植物体への影響を検討した。 NH_2OH 水溶液はNo.4株が生産する量と過剰量の2種類について調べた結果、No.4株と NH_2OH の土壌への接種による植物体の生育阻害は滅菌土壌でも非滅菌土壌でも全く観察されなかった。非滅菌土壌に NH_2OH を添加したポットでは、植物体の生育促進が観察されたポットもあった。土着微生物によって分解された NH_2OH を植物が栄養にしたと考えられた。

以上の結果をふまえて、No.4株培養液によるトマト苗立枯病の抑制効果を人工気象器内でポット試験により検討した。また、土着微生物の影響も検討するために土壌を滅菌する場合としない場合について実験を行った。病原菌を接種しないコントロールのポットでは播種したトマトが全て正常に生育し、土壌の滅菌の有無の影響は特に認められなかった。一方、病原菌のみを接種したポットでは病気が強く発生し、滅菌土壌系の罹病率は85%、非滅菌土壌系で罹病率は78%であった。非滅菌土壌系の

方が若干低いのは、土着微生物の No.4 株に対する静菌作用などによるものと示唆された。病原菌を接種した土壤に No.4 株の培養液 50ml を添加したところ、滅菌土壤系でも非滅菌土壤系でも、植物体の罹病率は低下し、生育した植物体の乾燥重量と葉丈も回復し、病気は抑制された。No.4 株を土壤に添加することで実際に植物病を抑制することが証明された。No.4 株の培養液によって植物病の抑制が確認されたことから、今後、さらに有用な微生物農業とするために、No.4 株の培養条件、接種法など様々な条件検討が必要である。

ポット試験における土壤からの No.4 株の回収を行ったところ、試験前 10^8 (CFU/g-dry soil) であった菌数が試験後に滅菌土壤で 10^7 (CFU/g-dry soil) に、非滅菌土壤で 10^6 (CFU/g-dry soil) 回収された。滅菌土壤よりも非滅菌土壤のほうが 1 桁菌数が少なかった。これは第 4 章に示された土壤微生物との拮抗作用（競合）の影響が考えられた。植物体の無い Fig. 4-3 と Fig. 4-4 の結果と植物体が生育している根圏での菌数 (Table 5-5) から、No.4 株は普通の土壤より植物体がある根圏での定着性のほうが高かった。根圏には植物体からの滲出物があり栄養が高く、菌がよく生息している (17)。No.4 株の植物体の根圏土壤での定着性は高かったが、このことは第 2 章で示したように No.4 株が栄養の乏しい状態でも幅広い抗菌スペクトルを示すこと、強い抗生物質耐性を持つこと、炭素源を菌体内に貯蔵できることから予想された。No.4 株は土壤接種後、菌数を若干増加してから減少し始め、最終的に安定に存在した。土壤中で菌が増殖することから、No.4 株は菌の増殖の対数増殖期に生産する NH_2OH を土壤中でも生産することが示唆された。しかし、植物試験における土壤からの NH_2OH の回収を試みたところ、 NH_2OH の検出はできなかった。No.4 株の近傍に *R.solani* K-1 が存在する場合、No.4 株は抗菌物質である NH_2OH によって植物病を抑制するが、それ以外の場合、No.4 株の生産する NH_2OH は土壤の触媒作用によってすぐに分解されてしまうことが考えられた。

次に No.4 株が生産する NH_2OH による苗立ち枯れ病の抑制効果を検討した。病原菌を接種しないポットでは播種したトマトが全て正常に生育し、土壤の滅菌の有無の影響は特に認められなかった。一方、病原菌のみを接種したポットでは植物病を発病し、滅菌土壤系の罹病率は 85%、非滅菌土壤系で罹病率は 50% になった。病原菌の病原性は土壤に接種するときの気温や湿度によって違うことが経験上考えられる。非滅菌土壤系の罹病率が極端に悪いのは、植物病原菌を土壤に接種するときの温度が高かったために、病原性が低下したことが示唆された。病原菌を接種した土壤にポッ

ト当たり NH_2OH 0.5mg, 2.5mg を添加したところ、滅菌土壌系で植物体の罹病率は低下し、生育した植物体の乾燥重量と葉丈も回復し、病気は抑制された。滅菌土壌系では NH_2OH 量を増やすとさらに病気を抑制した。しかし非滅菌土壌系では NH_2OH の添加による植物病の抑制効果は観察されず、 NH_2OH の添加量を増やしても効果はなかった。土壌微生物が存在すると NH_2OH は分解されることが示唆された。

5-5 結論

No.4 株の培養液を土壌へ接種することで *R.solani* K-1 によるトマト苗立枯病は抑制された。No.4 株が培養液中に生産する NH_2OH 量を接種することで、滅菌土壌では植物病は抑制されたが、非滅菌土壌では抑制されなかった。No.4 株は土壌中で抗菌物質 NH_2OH を生産して植物病を抑制し続けるが、土壌に接種された NH_2OH 標準液は土着微生物に分解されて、すぐに抑制しなくなることが分かった。この点からも No.4 株は新規の微生物農薬として非常に有望である。

5-6 参考文献

1. 駒田 旦, 稲葉 忠興他編 : 病害防除の新戦略 全国農村教育協会 (1992)
2. Walker, R., Emslie, K. A., Allan, E. J.: Bioassay methods for the detection of antifungal activity by *Pseudomonas antimicrobica* against the grey mould pathogen *Botrytis cinerea*, J. Appl. Bacteriol., 81, 531-537 (1996)
3. Russo, A., Moenne, L. Y., Fedi, S., Higgins, P., Fenton, A., Dowling, D. N., O'Regan, M., and O'Gara, F.: Improved delivery of biocontrol *Pseudomonas* and their antifungal metabolites using alginate polymers, Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 740-745 (1996)
4. Krishnamurthy, K., and Gnanamanickam, S. S.: Biological control of sheath blight of rice: Induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp., Cur. Sci., 72, 331-334 (1997)
5. Clarkson, J. P., and Lucas, J. A.: The role of antibiotic production by a strain of *Pseudomonas fluorescens* in the suppression of *Pseudocercospora herpotrichoides*, the causal agent of eyespot disease of cereals, J. Appl.

- Microbiol., 82, 499-506 (1996)
6. Walter, M., and Don, L.: Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots, Appl. Environ. Microbiol., 61, 3119-3128 (1995)
 7. Van-Dijk, K., and Nelson, E. B.: Inactivation of seed exudate stimulants of *Pythium ultimum* sporangium germination by biocontrol strains of *Enterobacter cloacae* and other seed-associated bacteria, Soil Biol. Biochem., 30, 183-192 (1998)
 8. Lumsden, R. D., Walter, J. F., and Baker, C. P.: Development of *Gliocladium virens* for damping-off disease control, Can. J. Plant Pathol., 18, 463-468 (1996)
 9. Eyal, J., Baker, C. P., Reeder, J. D., Devane, W. E., and Lumsden, R. D.: Large-scale production of chlamydospores of *Gliocladium virens* strain GL-21 in submerged culture, J. Ind. Microbiol. Biotech., 19, 163-168 (1997)
 10. Khan, N. I., Filonow, A. B., and Singleton, L. L.: Augmentation of soil with sporangia of *Actinoplanes* spp. for biological control of *Pythium* damping-off, Bio. Sci. Technol., 7, 11-22 (1997)
 11. Berger, F., Li, H., White, D., Frazer, R., and Leifert, C.: Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouses, Phytopathology, 86, 428-433 (1996)
 12. Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M., and Ushiyama, K.: Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22, Ann. Phytopath. Soc. Japan, 58, 329-339 (1992)
 13. Asaka, O., and Shoda, M.: Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14, Appl. Environ. Microbiol., 62, 4081-4085 (1996)
 14. Cliquet, S., and Scheffer, R. J.: Biological control of damping-off caused by *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* using *Trichoderma* spp. applied as industrial film coatings on seeds, Eur. J. Plant Pathol., 102, 247-255 (1996)
 15. Kok, C. J., Hageman, P. E. J., Maas, P. W. T., Postma, J., Roozen, N. J. M., Van-Vuurde, J. W. L.: Processed manure as carrier to introduce *Trichoderma harzianum*: Population dynamics and biocontrol effect on *Rhizoctonia solani*,

- Bio. Sci. Technol., 6, 147-161 (1996)
16. Villajuan, A. R., Kageyama, K., and Hyakumachi, M.: Biocontrol of *Rhizoctonia* damping-off of cucumber by non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia*, Eur. J. Plant Pathol., 102, 227-235 (1996)
 17. 西尾 道德: 土壤微生物の基礎知識 農産漁村文化協会 (1989)
 18. 新城 明久: 生物統計学入門 朝倉書店 (1990)
 19. Kim, D. S., Weller, D. M., and Cook, R. J.: Population dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R₁₂ and *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN₁₀ in the rhizosphere of wheat, Phytopathology, 87, 559-564 (1997)

Table 5-1-1 Effect of inoculation mass of *Rhizoctonia solani* K-1 on occurrence of damping-off of tomato after planting tomato in sterilized soil.

<i>R.solani</i> K-1 (a mat of the fungus / pot)	Leaf length (mm)	Shoot weight (mg dry / pot)	Diseased ratio (%)
0	98	558	0
1/8	71	444	28
1/4	62	375	39
1/2	55	135	50
1	18	118	83

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.

Table 5-1-2 Effect of inoculation mass of *Rhizoctonia solani* K-1 on occurrence of damping-off of tomato after planting tomato in non-sterilized soil.

<i>R.solani</i> K-1 (a mat of the fungus / pot)	Leaf length (mm)	Shoot weight (mg dry / pot)	Diseased ratio (%)
0	119	638	2
1/8	112	543	11
1/4	71	494	33
1/2	67	424	50
1	56	410	63

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.

Table 5-2-1 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4 culture broth and hydroxylamine solutions on the growth of tomato seedlings for 14days in sterilized soil.

Treatment	Leaf length (mm)	Shoot weight (mg dry / pot)	Diseased ratio (%)
Control	124 ^a	838 ^a	0 ^a
Culture broth of <i>A.faecalis</i> No.4, 50ml / pot	123 ^a	844 ^a	0 ^a
NH ₂ OH 0.5mg / pot*	119 ^a	889 ^a	0 ^a
NH ₂ OH 2.5mg / pot**	122 ^a	805 ^a	0 ^a

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

*50ml of 10mg/l NH₂OH solution was added to a pot. **50ml of 50mg/l NH₂OH solution was added to a pot.

Table 5-2-2 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4 culture broth and hydroxylamine solutions on the growth of tomato seedlings for 14days in non-sterilized soil.

Treatment	Leaf length (mm)	Shoot weight (mg dry / pot)	Diseased ratio (%)
Control	119 ^a	638 ^a	1 ^a
Culture broth of <i>A.faecalis</i> No.4, 50ml / pot	115 ^a	624 ^a	2 ^a
NH ₂ OH 0.5mg / pot*	122 ^a	639 ^a	0 ^a
NH ₂ OH 1.0mg / pot***	120 ^a	645 ^a	0 ^a

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

*50ml of 10mg/l NH₂OH solution was added to a pot. ***50ml of 20mg/l NH₂OH solution was added to a pot.

Table 5-3-1 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4 culture broth on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14days after planting tomato in sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	16 ^a	47 ^a	85 ^a
+	+	64 ^b	328 ^b	46 ^b
-	+	118 ^c	713 ^c	2 ^c
-	-	120 ^c	772 ^c	0 ^c

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 5-3-2 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4 culture broth on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14days after planting tomato in non-sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	26 ^a	77 ^a	78 ^a
+	+	58 ^b	208 ^b	46 ^b
-	+	121 ^c	603 ^c	2 ^c
-	-	124 ^c	636 ^c	0 ^c

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 5-4-1 Effect of hydroxylamine solutions on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14days after planting tomato in sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	NH ₂ OH	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	16 ^a	47 ^a	85 ^a
+	0.5mg / pot*	56 ^b	371 ^b	61 ^b
+	2.5mg / pot**	81 ^c	635 ^c	33 ^c
-	-	120 ^d	772 ^d	0 ^d

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

*50ml of 10mg/l NH₂OH solution was added to a pot. **50ml of 50mg/l NH₂OH solution was added to a pot.

Table 5-4-2 Effect of hydroxylamine solutions on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14days after planting tomato in non-sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	NH ₂ OH	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	67 ^a	424 ^a	50 ^a
+	0.5mg / pot*	69 ^a	285 ^b	43 ^a
+	1.0mg / pot***	63 ^a	260 ^b	44 ^a
-	-	119 ^b	638 ^c	2 ^b

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

*50ml of 10mg/l NH₂OH solution was added to a pot. ***50ml of 20mg/l NH₂OH solution was added to a pot.

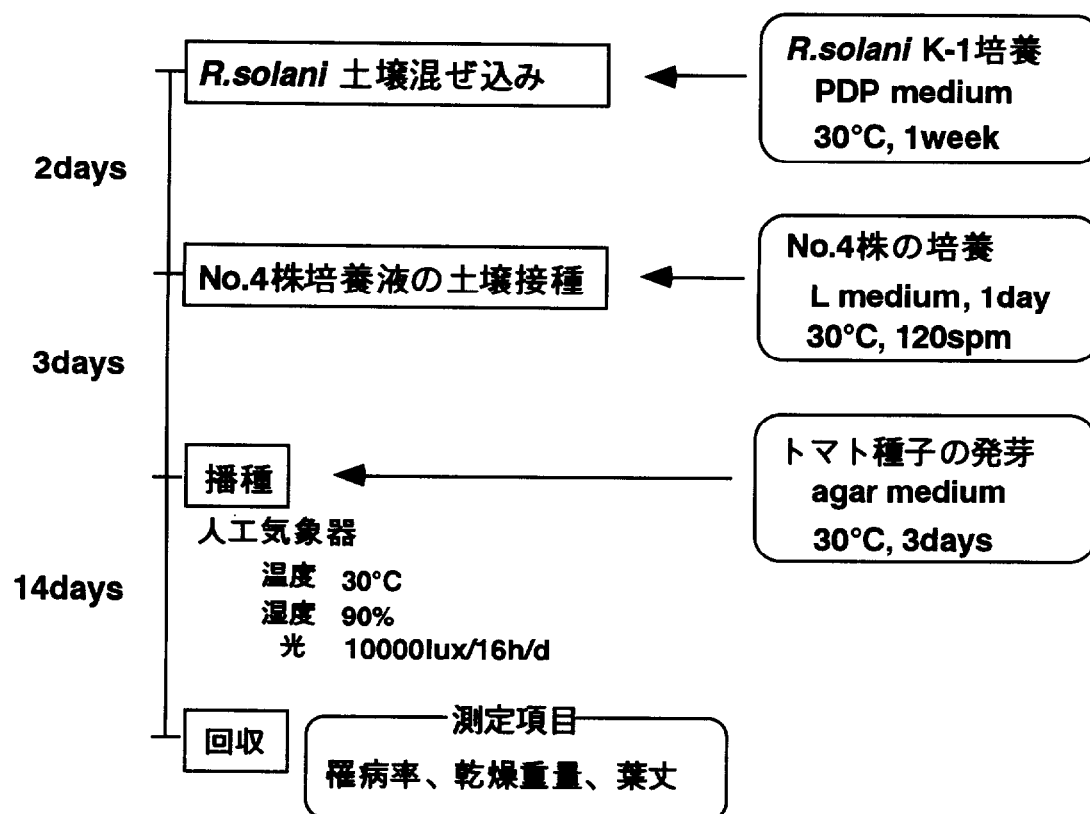


Fig. 5-1 No.4株による苗立枯病抑制の植物試験法

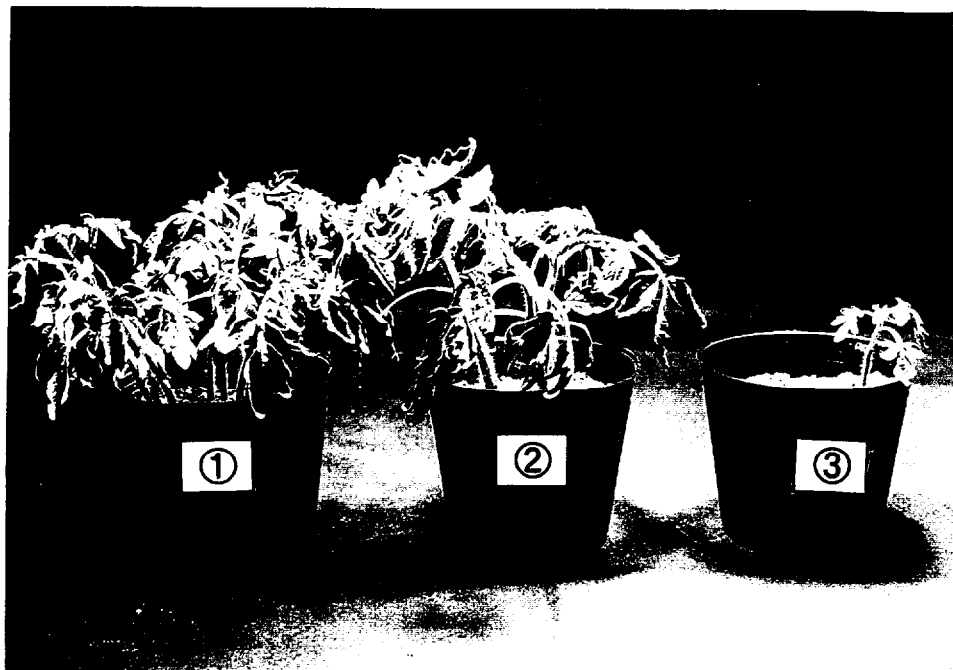


Fig. 5-2 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4 culture broth on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil.

**①; Control (without *R.solani* K-1 and *A.faecalis* No.4),
②; *R.solani* K-1 + *A.faecalis* No.4, ③; *R.solani* K-1**

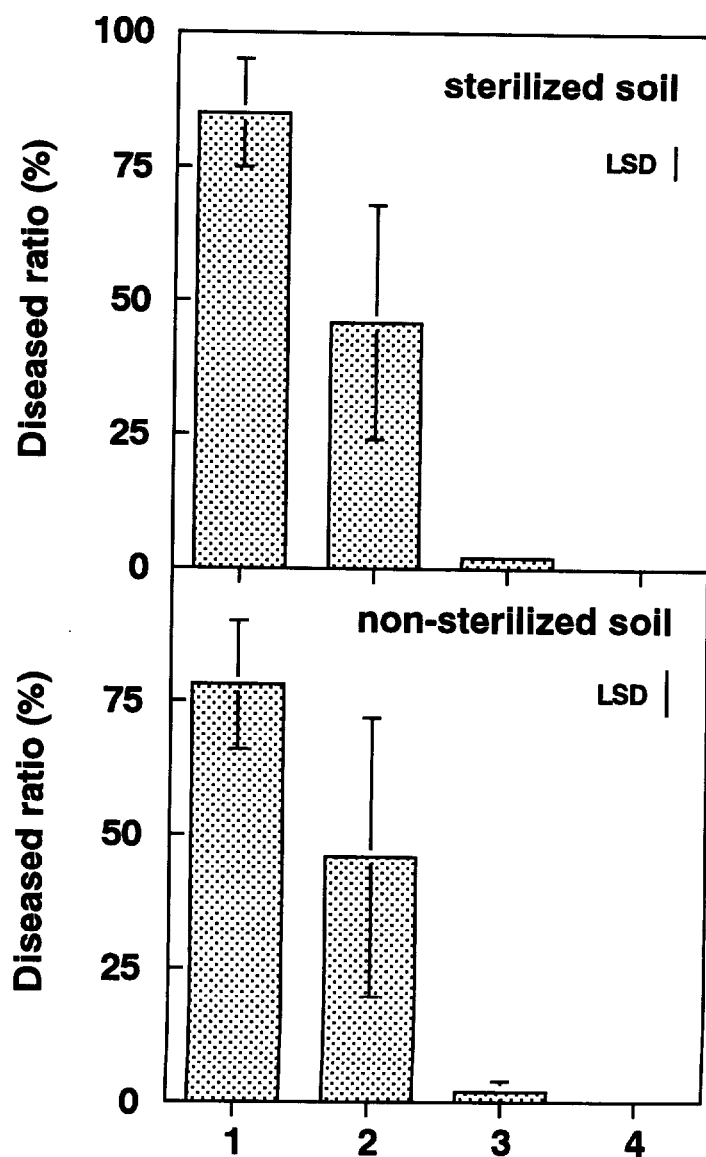


Fig. 5-3 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4 culture broth on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in soils. 1 ; *R.solani* K-1, 2 ; *R.solani* K-1 + *A.faecalis* No.4, 3 ; *A.faecalis* No.4, 4 ; Control

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.

Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.



Fig. 5-4 Effect of hydroxylamine solutions on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil.

①; Control, ②; *R.solani* K-1+NH₂OH 2.5mg/pot, ③; *R.solani* K-1+NH₂OH 0.5 mg/pot, ④; *R.solani* K-1

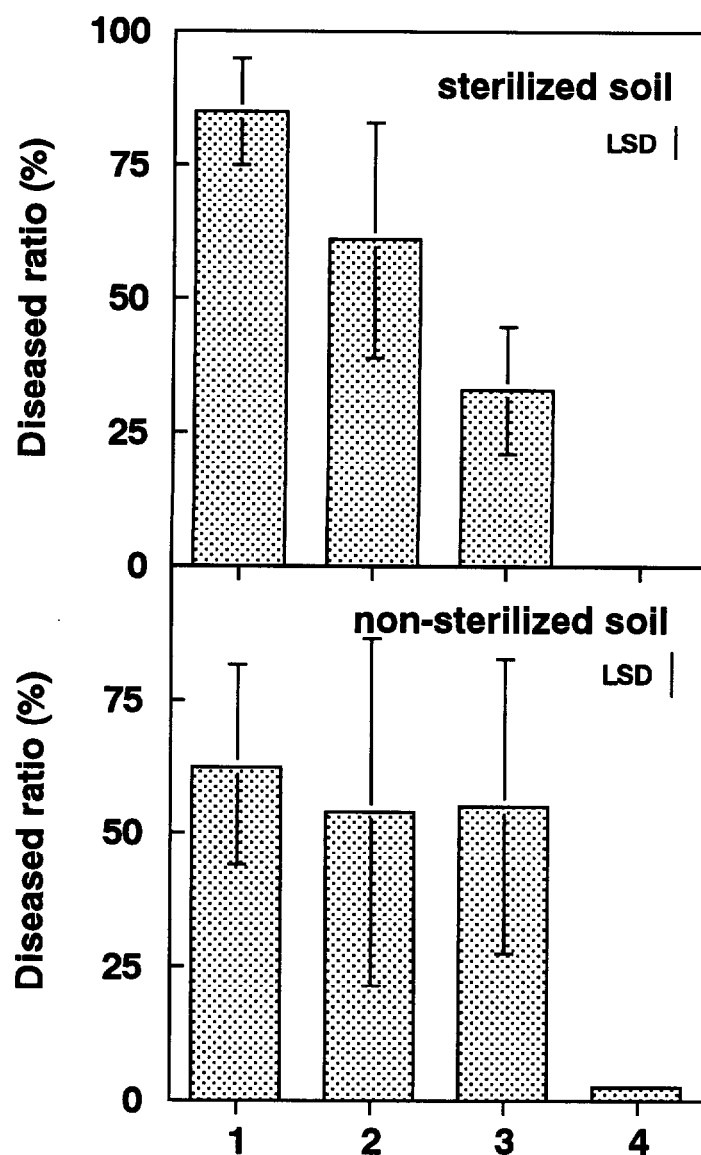


Fig. 5-5 Effect of hydroxylamine solutions on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil. 1 ; *R.solani* K-1, 2 ; *R.solani* K-1+ NH_2OH 0.5 mg/pot, 3 ; *R.solani* K-1+ NH_2OH 2.5 mg/pot, 4 ; Control

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.
Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

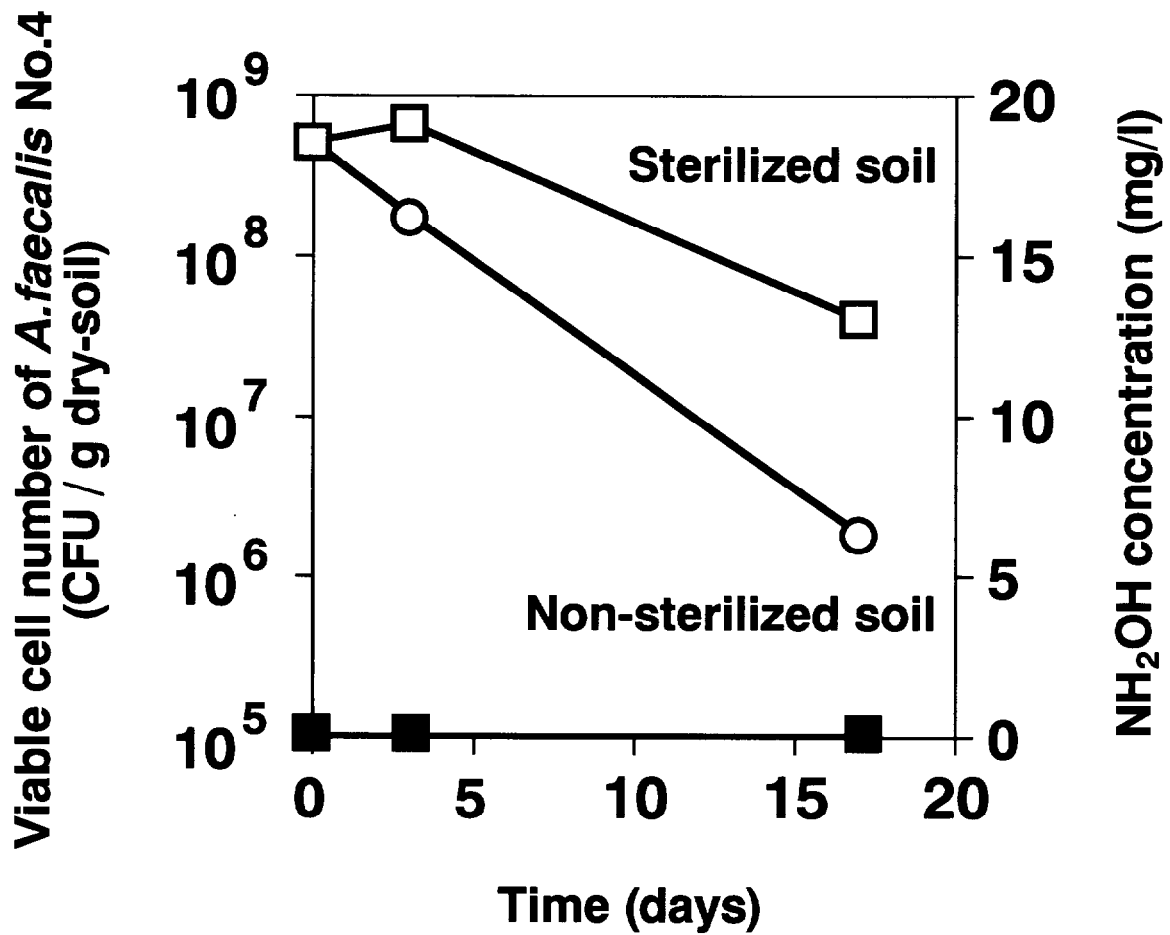


Fig. 5-6 Populations of *Alcaligenes faecalis* No.4 and amounts of hydroxylamine in soils.

Sterilized soil: Cell ; □ , NH₂OH ; ■
 Non-sterilized soil: Cell ; ○ , NH₂OH ; ●

第6章 *A.faecalis* No.4 による植物病抑制の最適条件の検討

6-1 緒言

微生物の2次代謝産物の生産は、その菌の状態（対数増殖期や定常期）やその菌の周囲の環境（培養法（液体培養、固体培養など）、栄養分、温度、他の菌の存在の有無等）で著しく変化する（1-7）。土壤中における代謝産物の生産は、菌の周囲の環境以外に、菌の状態や土壤に存在する量によって変化することが予想された。拮抗微生物によって植物病を抑制する時にも、菌を土壤に接種する際の菌の状態や量が重要である。

本論文の第2章ではNo.4株の特徴を検討して抗菌物質を同定した。No.4株が栄養の乏しい条件でも様々な病原菌に対して幅広い抗菌活性を示すことを *in vitro* で明らかにし、No.4株の植物病原菌に対する抗菌物質を NH_2OH と決定した。第3章ではNo.4株の抗菌物質である NH_2OH の生産を最大にする最適培養条件を求めた。第4章ではNo.4株の土壤定着性を検討し、土壤微生物のいる非滅菌土壤でも 10^5 (CFU/g-dry soil) で1か月以上安定に存在することを確認した。また土壤におけるNo.4株の抗菌物質である NH_2OH の生産を確認した。第5章ではポット試験でNo.4株の培養液が植物病原菌 *R.solani* K-1によるトマト苗立枯病を抑制することを確認した。本章では土壤試験での抑制効果をより明確にするために、No.4株を土壤に接種する際の最適条件を検討した。No.4株の土壤接種法を培養液、培養液を遠心して菌体を除いた培養上清、菌体のみの菌体懸濁液の3通りで行った。また接種量を培養液、菌体懸濁液それぞれ0~100mlで、菌の培養時間を1~3日と変化させて検討した。また、No.4株の菌体懸濁液とその菌体を殺菌した死滅菌体による植物病の抑制効果も観察した。

6-2 実験材料及び方法

6-2-1 菌株

A.faecalis No.4 (Sm^r) はストレプトマイシン 100mg/l に耐性を示す。

植物病原菌として、*R.solani* K-1（トマト苗立枯病病原菌）を使用した。

6-2-2 培地

使用した培地を Table 2-1 に示す。いずれの培地もオートクレーブ (120℃, 20min., 1.0~1.2 kg/cm²) により滅菌処理した。

6-2-3 植物

本研究で使用したトマトは Ponderosa (タキイ種苗(株)) である。この品種は各種植物病害に対して全く抵抗性を持たず、80%以上の発芽率を示す。

6-2-4 土壌

本研究で使用した土壌を 4-2-3 に示す。土壌は 2 重にした滅菌袋 (キノバック NT-25W, 日昌(株)) に封入し、オートクレーブ (120℃, 60min., 1.0~1.2 kg/cm²) を 2 回かけることにより滅菌処理をした。

6-2-5 植物病原菌 *R.solani* K-1 の培養および土壌への接種

5-2-5 の方法で増殖した *R.solani* 菌糸マットをポットあたり 1 シートずつ土壌に接種し、よく混合した。

6-2-6 菌体懸濁液、培養上清、殺菌菌体懸濁液の準備

30℃、L 培地で 1 日培養した No.4 株の培養液 50ml を遠心分離 (12000rpm x 10min.) し、菌体と上清に分けた。沈殿した菌体を滅菌水で 2 回洗菌し、初めと等量の滅菌水 50ml に再懸濁させた。これを菌体懸濁液とした。一方、遠心分離によって菌体と分離された溶液の方を培養上清とした。菌体懸濁液をオートクレーブ (120℃, 20min., 1.0~1.2 kg/cm²) により菌を死滅させた溶液を殺菌菌体懸濁液とした。

6-2-7 *A.faecalis* No.4 の添加法

6-2-6 で述べたように No.4 株を培養し、菌の培養液、菌体懸濁液、培養上清をそれぞれ 50ml ずつ土壌に接種し、よく混合した。また添加量については、培養液、菌体懸濁液のそれぞれ 0~100ml を土壌に添加した。

6-2-8 *A.faecalis* No.4 の接種するまでの培養時間

No.4株をL培地5mlに1%植菌し、30℃, 120spmで16時間前培養した後、L培地150ml（坂口フラスコ）に1%植菌し、30℃, 120spmで1～3日間培養したものを使用した。培養時間の異なる培養液50mlを土壤に接種し、よく混合した。菌の培養時間によって培養液中に含まれるNH₂OH量が異なることが分かっている。

6-2-9 トマト種子の表面殺菌及び前発芽

6-2-3で示したトマトの種子を使用して、5-2-8と5-2-9の方法で前発芽して、トマトの種子の条件のそろえた。

6-2-10 植物試験

5-2-10の条件と同じ条件の温度30℃, 湿度90%, 蛍光灯照射（10000lux）16h/dayでトマトの生育を行った。

6-2-11 植物体の生育度の測定

5-2-11の方法で生育した植物体の葉丈、地上部の乾燥重量を測定した。

6-3 結果

6-3-1 *A.faecalis* No.4の添加法による植物病抑制効果

R.solani K-1の菌糸マットを1ポットあたり1枚接種した土壤で、No.4株の土壤接種法による苗立枯病の抑制効果を調べた。No.4株の添加には培養液、菌体懸濁液、培養上清を使用した。滅菌土壤における結果をTable 6-1、非滅菌土壤における結果をTable 6-2に示す。また両方の土壤における罹病率の結果をFig. 6-1に示す。滅菌土壤の病原菌*R.solani* K-1を接種しなかったコントロールのポットでは播種したトマトが全て正常に生育した。しかし、*R.solani* K-1のみを接種したポットでは病気が強く発生して、82%の罹病率を示した。植物体の地上部分の乾燥重量や葉丈もコントロールに比べて著しく低下した。*R.solani* K-1とともにNo.4株の培養液、菌体懸濁液、培養上清を添加したところ、罹病率はそれぞれ17%, 22%, 46%に低下した。植物体の葉丈や乾燥重量も*R.solani* K-1のみを接種したポットに比べて大幅に回復した。培養液と菌体懸濁液の抑制効果が同程度で最も高かった。培養上清は他の2つに比べて抑制効果が弱い、罹病率は*R.solani* K-1のみのポットの半分に低下していた。一

方、非滅菌土壌の *R.solani*K-1のみを接種したポットの罹病率は78%であり、植物体の葉丈や乾燥重量を比較しても、滅菌土壌の場合より発病程度は弱く標準偏差が大きかった。このような条件で、*R.solani* K-1とともに No.4 株の培養液、菌体懸濁液、培養上清を添加したところ、罹病率はそれぞれ46%, 35%, 74%を示した。培養液と菌体懸濁液の抑制効果が同程度で最も高かったが、培養上清の抑制効果は無いと考えられた。培養液と菌体懸濁液のポットでは、植物体の葉丈や乾燥重量は *R.solani*K-1のみを接種したポットに比べて大幅に回復した。

6-3-2 *A.faecalis* No.4 の培養液および菌体懸濁液の添加量による植物病抑制効果

*R.solani*K-1の菌糸マットを1ポットあたり1枚接種した土壌で、No.4株の土壌接種量による苗立枯病の抑制効果を調べた。No.4株の添加には培養液と菌体懸濁液の0~100mlを使用した。培養液の滅菌土壌における結果をTable 6-3、非滅菌土壌における結果をTable 6-4に示す。両方の土壌における罹病率の結果をFig. 6-2に示す。また、菌体懸濁液の滅菌土壌における結果をTable 6-5、非滅菌土壌における結果をTable 6-6に示す。両方の土壌における罹病率の結果をFig. 6-3に示す。滅菌土壌の病原菌 *R.solani*K-1を接種しなかったコントロールのポットでは播種したトマトが全て正常に生育した。しかし、*R.solani*K-1のみを接種したポットでは病気が強く発生して、培養液で82%、菌体懸濁液で85%の罹病率を示した。植物体の地上部分の乾燥重量や葉丈はコントロールに比べて著しく低下した。*R.solani*K-1とともにNo.4株の培養液、菌体懸濁液25, 50, 100mlを添加したところ、罹病率はそれぞれ培養液で25%, 12%, 15% (Table 6-3) 菌体懸濁液で31%, 20%, 16% (Table 6-5) に低下した。植物体の葉丈や乾燥重量は *R.solani*K-1のみを接種したポットに比べて大幅に回復した。培養液、菌体懸濁液の接種量が多くなるに従って、抑制効果も高くなった。一方、非滅菌土壌の *R.solani* K-1のみを接種したポットの罹病率は、培養液で72%、菌体懸濁液で54%であり、滅菌土壌の場合より発病程度は弱く、標準偏差も大きかった。このような条件でも、*R.solani* K-1とともに No.4 株の培養液、菌体懸濁液25, 50, 100mlを添加したところ、罹病率はそれぞれ培養液で25%, 12%, 21% (Table 6-4)、菌体懸濁液で26%, 13%, 14% (Table 6-6) に低下した。植物体の葉丈や乾燥重量も *R.solani* K-1のみを接種したポットに比べて大幅に回復した。

6-3-3 *A.faecalis* No.4 の接種するまでの培養時間による植物病抑制効果

R.solani K-1の菌糸マットを1ポットあたり1枚接種した土壌で、No.4株の培養時間による苗立枯病の抑制効果を調べた。No.4株の接種には培養時間1~3日の培養液を使用した。滅菌土壌における結果をTable 6-7に、非滅菌土壌における結果をTable 6-8に示す。また罹病率の結果をFig. 6-4に示す。滅菌土壌では、病原菌*R.solani* K-1を接種しなかったコントロールのポットでは播種したトマトが全て正常に生育した。しかし、*R.solani* K-1のみを接種したポットでは病気が強く発生して、78%の罹病率を示した。植物体の地上部分の乾燥重量や葉丈もコントロールに比べて著しく低下した。*R.solani* K-1とともに培養時間1, 2, 3日のNo.4株の培養液を添加したところ、罹病率はそれぞれ8%, 22%, 47% (Table 6-7)に低下した。植物体の葉丈や乾燥重量も*R.solani* K-1のみを接種したポットに比べて大幅に回復した。培養液の培養時間が長くなるに従って、抑制効果は低くなった。一方、非滅菌土壌では、*R.solani* K-1のみを接種したポットの罹病率は44%であり、植物体の葉丈や乾燥重量を比較しても、滅菌土壌の場合より発病程度は弱く、標準偏差が大きかった。このような条件でも、*R.solani* K-1とともに培養時間1, 2, 3日のNo.4株の培養液を添加したところ、罹病率はそれぞれ0%, 9%, 11% (Table 6-8)に低下した。植物体の葉丈や乾燥重量も*R.solani* K-1のみを接種したポットに比べて大幅に回復した。培養液の培養時間が長くなるに従って、抑制効果は低くなった。

6-3-4 *A.faecalis* No.4の殺菌菌体懸濁液による植物病抑制効果

R.solani K-1の菌糸マットを1ポット当たり1枚接種した土壌で、No.4株の死滅菌体懸濁液による苗立枯病の抑制効果を調べた。No.4株の添加には生きているNo.4株の菌体懸濁液と熱処理によって死滅した菌体懸濁液を使用した。滅菌土壌における結果をTable 6-9に示す。病原菌*R.solani* K-1を接種しなかったコントロールのポットでは播種したトマトが全て正常に生育したが、*R.solani* K-1のみを接種したポットでは病気が強く発生して62%の罹病率を示した。植物体の地上部分の乾燥重量や葉丈もコントロールに比べて著しく低下した。*R.solani* K-1とともにNo.4株の菌体懸濁液と死滅した菌体懸濁液を添加したところ、菌体懸濁液を添加したポットでは罹病率が22%に減少したが、死滅した菌体懸濁液を添加したポットでは罹病率が低下しなかった。

6-4 考察

本章では No.4 株を土壤に接種する際の最適条件を検討した。No.4 株の土壤接種法を培養液、培養液を遠心して菌体を除いた培養上清、菌体懸濁液の 3 通りで、接種量を培養液、菌体懸濁液それぞれ 0~100ml で、菌の培養時間を 1~3 日で検討した。また、No.4 株の菌体懸濁液とその菌体を殺菌した死滅菌体による植物病の抑制効果も検討した。

No.4 株の土壤接種法による植物病抑制効果を調べたところ、滅菌、非滅菌土壤のどちらでも、培養液と菌体懸濁液は苗立枯病を抑制した。培養上清の抑制効果は、培養液と菌体懸濁液の場合と比べて、滅菌土壤では弱く、非滅菌土壤では観察されなかった。このことから、No.4 株の培養上清に含まれる抗菌物質 NH_2OH は土壤中で非常に分解しやすく、土壤微生物が存在するとさらに分解されやすいことが明らかになった。No.4 株の抗菌物質 NH_2OH は変異物質であるが、土壤のように様々な物質や微生物が存在する状態では、あまり問題にならないことが示唆された。No.4 株は対数増殖期から定常期にかけて NH_2OH を生産することから (Fig. 2-6)、No.4 株は土壤中で増殖し、 NH_2OH を生産していることが示唆された。No.4 株の菌体を土壤に接種することで植物病の抑制を持続できることが示された。

No.4 株の土壤への接種量による苗立枯病の抑制効果を調べたところ、培養液、菌体懸濁液ともに No.4 株の接種量が増えるにしたい植物病の抑制効果は増加したが、50ml 以上になると抑制効果は頭打ちになった。このことから、No.4 株の土壤最適接種量は 50ml であることが示された。

No.4 の接種するまでの培養時間による苗立枯病の抑制効果を調べたところ、No.4 株の培養時間 1 日目が最も植物病を抑制し、培養時間を長くするに従って植物病の抑制効果は減少した。培養 1 日の No.4 株は対数増殖期から定常期の状態にあり、最も NH_2OH を生産する時期と重なった (Fig. 2-6)。培養 2~3 日目の培養液中に NH_2OH は無いにもかかわらず、2 日、3 日目の培養液もかなりの抑制効果を示したことは、菌体そのものの効果が大きいことが考えられた。

No.4 株の菌体懸濁液とその菌体を殺菌した死滅菌体による植物病の抑制効果を調べたところ、菌が生存しないと植物病を抑制しなかった。したがって、No.4 株の植物病抑制には菌体自体が必要であることが示唆された。

6-5 結論

No.4 株を土壤に接種する方法を培養液、培養液を遠心して菌体を除いた培養上清、菌体懸濁液の3通りにして、接種量を培養液、菌体懸濁液をそれぞれ0~100mlで、菌の培養時間を1~3日にして、No.4株の最適条件を求めた結果、植物病の抑制を培養1日目のNo.4株培養液、菌体懸濁液をポットあたり50mlずつ土壤に接種する時に植物病を最も抑制することが分かった。また死滅菌体による植物病抑制効果が観察されなかったことから、植物病を抑制するためにはNo.4株の菌体が必要であることが分かった。

6-6 参考文献

1. De-Vuyst, L., Callewaert, R., and Crabbe, K.: Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions, *Microbiology*, 142, 817-827 (1996)
2. Chalot, M., and Brun, A.: Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas, *FEMS Microbiol. Rev.*, 22, 21-44 (1996)
3. Flores, A., Chet, I., and Herrera, E. A.: Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene *prb1*, *Curr. Genet.*, 31, 30-37 (1997)
4. Sayler, G. S., Layton, A., Lajoie, C., Bowman, J., Tschantz, and M., Fleming, J. T.: Molecular site assessment and process monitoring in bioremediation and natural attenuation, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 54, 277-290 (1995)
5. Margesin, R., and Schinner, F.: Low-temperature bioremediation of a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 482-486 (1998)
6. Margolles, C. E., Hayes, C. K., Harman, G. E., and Penttila, M.: Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2145-2151 (1996)

7. Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., and Caldwell, D. E.: The role of interactions, sessile growth and nutrient amendments on the degradative efficiency of a microbial consortium, *Can. J. Microbiol.*, 40, 331-340 (1994)

Table 6-1 Effect of different methods of applying *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	11 ^a	100 ^a	82 ^a
+	Culture broth	71 ^b	450 ^b	17 ^b
+	Cell suspension	80 ^c	572 ^c	22 ^b
+	Supernatant	45 ^d	351 ^d	46 ^c
-	-	82 ^c	659 ^e	0 ^d

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 6-2 Effect of different methods of applying *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in non-sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	26 ^a	77 ^a	78 ^a
+	Culture broth	58 ^b	208 ^b	46 ^b
+	Cell suspension	80 ^b	422 ^c	35 ^b
+	Supernatant	30 ^{ac}	152 ^{ab}	74 ^a
-	-	122 ^d	560 ^d	0 ^c

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 6-3 Effect of different volumes of culture broth of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	10 ^a	168 ^a	82 ^a
+	Culture broth 25ml	62 ^b	495 ^b	25 ^b
+	Culture broth 50ml	70 ^c	529 ^b	12 ^c
+	Culture broth 100ml	34 ^d	206 ^{ac}	15 ^c
-	-	97 ^e	706 ^d	0 ^d

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 6-4 Effect of different volumes of culture broth of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in non-sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	29 ^a	168 ^a	72 ^a
+	Culture broth 25ml	62 ^b	495 ^b	25 ^b
+	Culture broth 50ml	70 ^c	516 ^b	12 ^c
+	Culture broth 100ml	34 ^d	466 ^c	21 ^d
-	-	117 ^e	606 ^d	0 ^e

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 6-5 Effect of different volumes of cell suspension of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	10 ^a	76 ^a	85 ^a
+	Cell suspension 25ml	72 ^b	502 ^b	31 ^b
+	Cell suspension 50ml	80 ^c	561 ^b	20 ^c
+	Cell suspension 100ml	84 ^c	593 ^{bc}	16 ^c
-	-	87 ^{cd}	666 ^d	0 ^d

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 6-6 Effect of different volumes of cell suspension of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in non-sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	59 ^a	242 ^a	54 ^a
+	Cell suspension 25ml	88 ^b	422 ^b	26 ^b
+	Cell suspension 50ml	101 ^c	526 ^c	13 ^c
+	Cell suspension 100ml	92 ^b	407 ^b	14 ^c
-	-	124 ^d	636 ^d	0 ^d

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 6-7 Effect of different incubation times of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	16 ^a	146 ^a	78 ^a
+	1day	84 ^b	620 ^b	8 ^b
+	2days	65 ^c	535 ^c	22 ^c
+	3days	35 ^d	346 ^d	47 ^d
-	-	88 ^b	751 ^e	0 ^e

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 6-8 Effect of different incubation times of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in non-sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	76 ^a	310 ^a	44 ^a
+	1day	123 ^b	510 ^b	0 ^b
+	2days	113 ^b	460 ^b	9 ^c
+	3days	107 ^{bc}	440 ^b	11 ^c
-	-	127 ^{bd}	629 ^c	0 ^b

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 6-9 Effect of the viable and dead cell suspensions of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	<i>A.faecalis</i> No.4	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	48 ^a	224 ^a	62 ^a
+	Viable cells	107 ^b	501 ^b	22 ^b
+	Dead cells	60 ^c	298 ^a	59 ^a
-	-	129 ^d	613 ^c	0 ^d

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

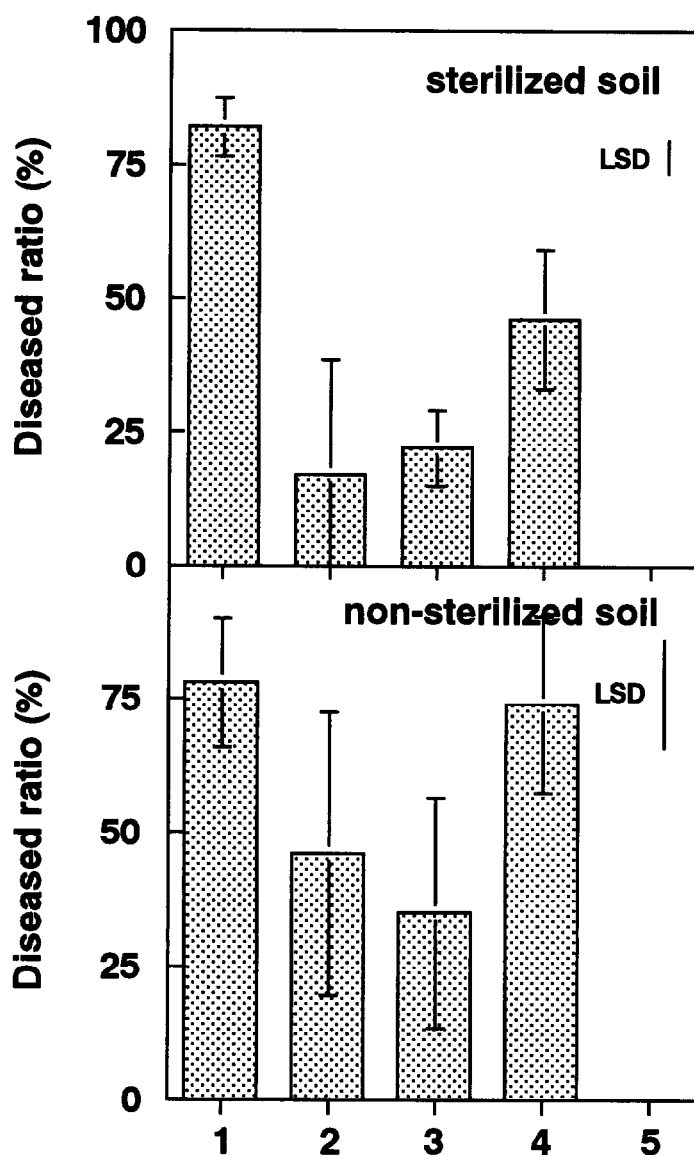


Fig. 6-1 Effect of different methods of applying *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in soils. 1; *R.solani* K-1, 2; *R.solani* K-1+Culture broth, 3; *R.solani* K-1+Cell suspension, 4; *R.solani* K-1+Supernatant, 5; Control

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.
Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

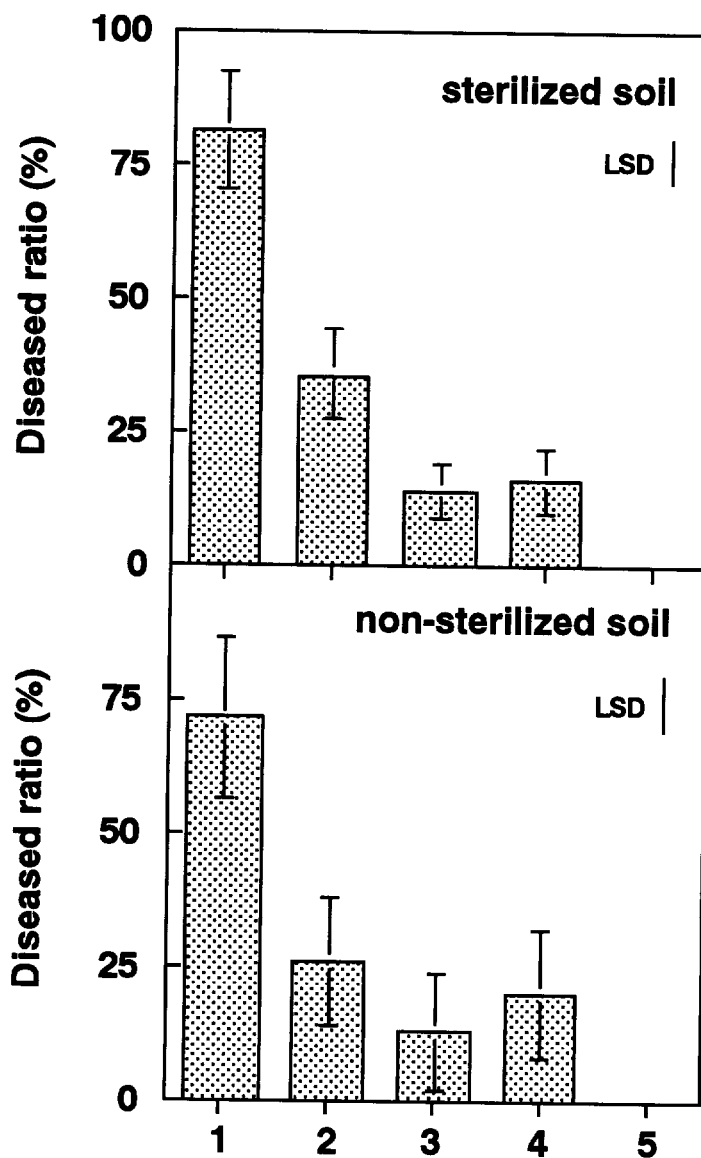


Fig. 6-2 Effect of different volumes of culture broth of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in soils.
 1; *R.solani* K-1, 2; *R.solani* K-1 + culture broth 25ml, 3; *R.solani* K-1 + culture broth 50ml, 4; *R.solani* K-1 + culture broth 100ml, 5; Control

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.
 Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

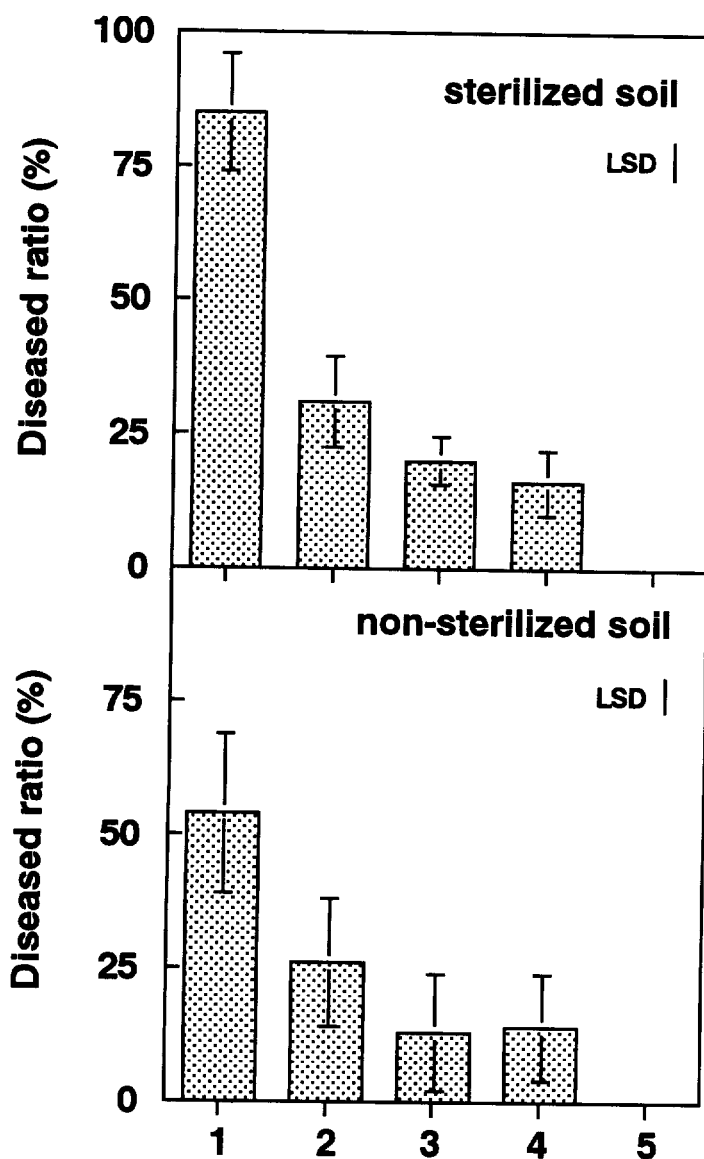


Fig. 6-3 Effect of different volumes of cell suspension of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in soils. 1; *R.solani* K-1, 2; *R.solani* K-1 + cell suspension 25ml, 3; *R.solani* K-1 + cell suspension 50ml, 4; *R.solani* K-1 + cell suspension 100ml, 5; Control

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.
Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

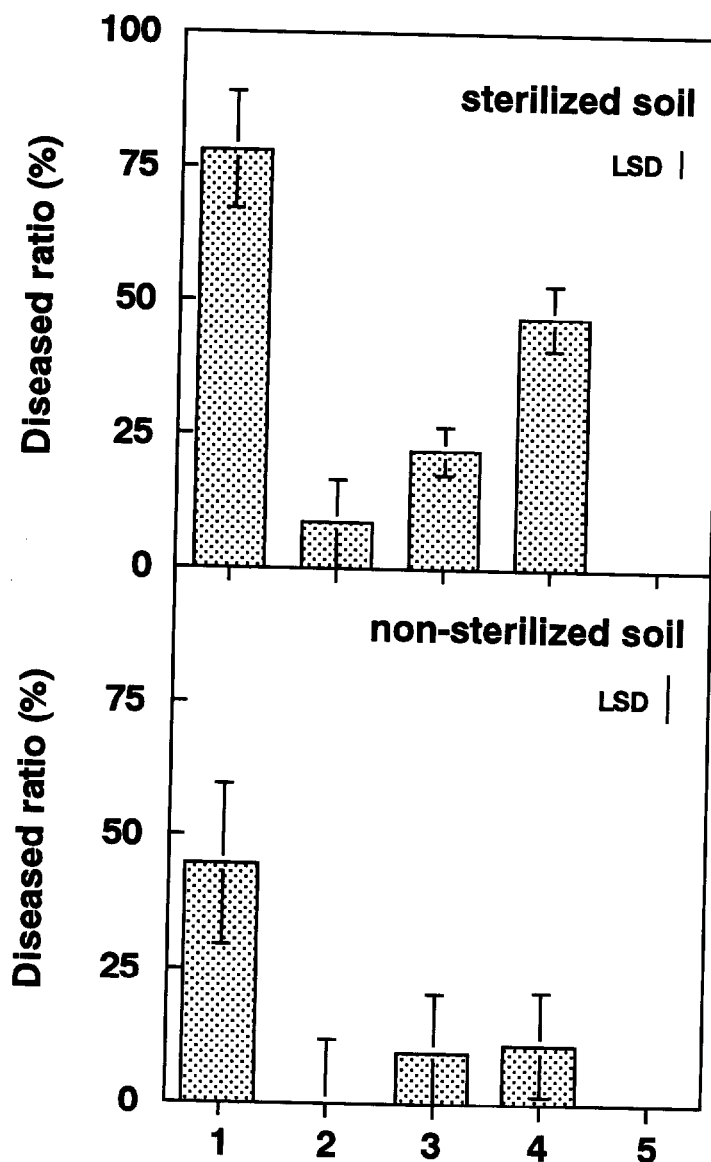


Fig. 6-4 Effect of different incubation times of *Alcaligenes faecalis* No.4 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in soils. 1; *R.solani* K-1, 2; *R.solani* K-1 + Incubation time 1day, 3; *R.solani* K-1 + Incubation time 2days, 4; *R.solani* K-1 + Incubation time 3days, 5; Control

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.
Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

第7章 *A.faecalis* No.4の抗菌活性消失株の単離と性質の検討及び植物試験

7.1 緒言

微生物の代謝や活性について現在得られている詳細な情報の大部分は、特異的な細胞機能を失った変異株の研究によるものである。一つの変異はある特定の遺伝子産物の機能を変化させたり消失させたりするので、遺伝子型の変化が細胞の表現型に与える影響を観察することによって、その遺伝子産物の細胞機能を推定することができる。最近、トランスポゾンと呼ばれる転移遺伝因子による変異法は、興味のある機能を示す遺伝子を欠損させた変異株を得る時によく使われている(1, 2)。トランスポゾンによる変異の特徴として、トランスポゾンは細菌の遺伝子の様々な場所に転移できるために変異の起きる効率がよく(2, 3)、欠損させた遺伝子の同定が容易であることがある(4)。他の突然変異やUV照射法や変異剤による変異法では(5, 6)、変異株を使って菌の特異的な細胞機能を検討することは可能であるが、欠損した機能をコードしている染色体上の位置を遺伝子レベルで評価することは非常に困難である。トランスポゾン変異に使われる mobilizable プラスミドはこれまでに数多く報告されている(2, 7)。プラスミドはグラム陰性菌用やグラム陽性菌用など受容菌の性質によって用意されて、すべてのプラスミドには選択圧をかけて分離しやすいように、栄養要求性、抗生物質耐性、温度感受性をコードする遺伝子が導入されている。*A.faecalis* No.4のようなグラム陰性菌に最もよく使用されているプラスミドはpSUP系である。このプラスミドは、R.Simonらによって開発された、グラム陰性菌に変異をかける新しいベクター系(pSUP系)である(2)。この系を使って、Kodamaらは *Pseudomonas testosteroni* からフタル酸分解酵素の遺伝子を同定した(8)。また、Loperらは *Alcaligenes* sp. strain MFA1 から植物病原菌 *Fusarium oxysporum* に対して抗菌活性を示す遺伝子を取得した(9)。Harkerらは *Alcaligenes eutrophus* JMP134 からトリクロロエチレン分解酵素の遺伝子を取得した(4, 10)。本章で用いた pSUP2021 は R.Simon (Universitat Bielefeld) から提供されたものであり、抗生物質アンピシリン、クロラムフェニコール、ネオマイシンに耐性を示すプラスミドである。

第2章では No.4 株の生産する硝化産物の植物病原菌 *F.oxysporum* J1, *R.solani* K-1 に対する抗菌活性を *in vitro* で検討し、 NH_2OH が抗菌物質であることを示した。第4章では NH_2OH によるトマト苗立枯病抑制を植物試験によって検討し、 NH_2OH が関与していることを示した。本章では No.4 株に変異をかけて抗菌活性消失株を取得し、さらにこの菌の特徴を検討し、植物試験で植物病の抑制試験を行い、No.4 株が生産する NH_2OH が植物病原菌に対する抗菌物質であることを明確に示す。

7-2 実験材料及び方法

7-2-1 菌株

トランスポゾン変異に使用した菌株とプラスミドを Table 7-1 に示す。*Escherichia coli* S17-1 (pSUP2021) は R.Simon から得た (2)。

植物病原菌には *F.oxysporum* J1 と *R.solani* K-1 を使用した。

7-2-2 培地

使用した培地を Table 2-1 に示す。必要に応じて抗生物質を使用し、選択圧はストレプトマイシン 100mg/l、ネオマイシン 100mg/l とした。

7-2-3 トランスポゾンによる変異法

トランスポゾン (Tn5) を含むプラスミドとして pSUP2021 を使用した。トランスポゾン変異は Rella らの方法に従った (3)。プラスミド pSUP2021 はネオマイシン耐性と Tn5 をもち、接合によって *E.coli* S17-1 からストレプトマイシン耐性の No.4 株の菌体内へ移動する。*E.coli* S17-1 と No.4 株はそれぞれ対数増殖後期まで L 培地、30℃、120spm で培養した。遠心分離 (10000rpm x 2min.) で集菌し、同量の滅菌水に再懸濁した。体積比が 1:1 になるように両菌株を混合し、100 μ l を L-agar 培地に塗布した。30℃で1日培養後、増殖してきた菌株をストレプトマイシン 100mg/l とネオマイシン 100mg/l を含む L-agar 培地にレプリカし、1日培養した。さらにプレート上に増殖してきた変異株コロニーから、植物病原菌 *F.oxysporum* J1 および *R.solani* K-1 に対して *in vitro* で抗菌活性を示さない (阻止円を形成しない) 変異株を得た。

7-2-4 植物病原菌に対する抗菌活性の評価

No.4 株とその変異株の植物病原菌に対する抗菌活性を 2-2-4 に述べた方法で調べた。植物病原菌として *F.oxysporum* J1 と *R.solani* K-1 を使用した。これらの病原菌は元株である No.4 株によって増殖を抑制される菌株である。植物病原菌の懸濁液 100 μ l を PDA 培地に塗布し、その上に No.4 株や変異株をレプリカした。30°C で 3 日間培養後、菌株の周囲に形成された阻止円によって抗菌活性を評価した。

7-2-5 硝化産物の分析法

No.4 株の液体培養中の硝化産物量 (NH_2OH , NO_2^- , NO_3^-) を 2-2-5 と 2-2-6 に述べた方法により測定した。

7-2-6 植物試験方法

R.solani K-1 によるトマト苗立枯病に対する抑制効果を 5-2-10 に述べた方法により調べた。

7-3 結果

7-3-1 *A.faecalis* No.4 の抗菌活性消失株の単離

トランスポゾンによって No.4 株に変異をかけ、植物病原菌に対して抗菌活性を示さない菌株を取得した。*E.coli* (pSUP2021) と No.4 株の接合によって、*A.faecalis* No.4 のストレプトマイシン耐性とネオマイシン耐性をもつ株が 1.9×10^{-4} の頻度で 175 株得られた。得られた耐性株を PDA 培地に移し、*F.oxysporum* J1 と *R.solani* K-1 に対する抗菌活性を調べたところ、2 種類の抗生物質に対して耐性を示し、さらに菌株の周囲に阻止円を形成せず、植物病原菌の増殖を阻害しなかった株は 1 株であった（今後この変異株を No.4-1 株と称する）。

7-3-2 変異株 No.4-1 株の植物病原菌に対する抗菌活性

No.4-1 株の植物病原菌 *F.oxysporum* J1 と *R.solani* K-1 に対する抗菌活性を *in vitro* で調べた。*F.oxysporum* J1 の結果を Fig. 7-1 に、*R.solani* K-1 の結果を Fig. 7-2 に示す。変異株は植物病原菌に対して抜けるような透明な阻止円を形成せずに病原菌に覆われた。No.4-1 株は元株の持っていた抗菌活性能力を失っていた。

7-3-3 変異株 No.4-1株の増殖と硝化産物の生産性

No.4株と変異株 No.4-1株の増殖曲線及び硝化産物の生産をL培地で測定した結果を Fig. 7-3 に示す。また、MM, L培地、30℃で培養したとき、増殖の速度（倍加時間）を Table 7-2 に示す。No.4株の倍加時間はMM培地で3.8h、L培地で1.6hであり、変異株のNo.4-1株では、MM培地で4.0h、L培地で1.8hとなり、ほぼ同じ値であった。また定常期の菌数は同じ程度であった。菌の増殖に関して元株と変異株に違いはなかったが、変異株 No.4-1株は元株で観察される従属栄養硝化反応を全く行わず、従って硝化産物（ NH_2OH , NO_2^- , NO_3^- ）を生産しなかった。このことから変異株 No.4-1株は NH_2OH 非生産株であることが分かった。

7-3-4 変異株 No.4-1株の植物試験

植物病原菌 *R.solani* K-1による苗立枯病の抑制を、No.4株と変異株 No.4-1株の培養液を感染土壌に接種することで調べた。滅菌土壌における結果を Table 7-3 に、非滅菌土壌における結果を Table 7-4 に示す。両方の土壌における罹病率を Fig. 7-4 に示す。滅菌土壌では、病原菌 *R.solani* K-1を接種しなかったコントロールのポットでは播種したトマトが全て正常に生育した。*R.solani* K-1のみを接種したポットでは病気が発生して、65%の罹病率を示した。植物体の地上部分の乾燥重量や葉丈もコントロールに比べて著しく低下した。*R.solani* K-1とともにNo.4株と変異株 No.4-1株の培養液50mlを土壌に接種したところ、罹病率はそれぞれ33%と65%となった。No.4株を接種したポットは、葉丈や乾燥重量も *R.solani* K-1のみを接種したポットに比べて大幅に回復した。しかし、No.4-1株を接種したポットでは全く回復しなかった。一方、非滅菌土壌では、*R.solani* K-1のみを接種したポットの罹病率は46%であり、滅菌土壌の場合より発病程度は若干弱めで、標準偏差が大きかった。この条件で、*R.solani* K-1とともにNo.4株と変異株 No.4-1株の培養液50mlを接種すると、罹病率はそれぞれ11%と39%になった。変異株であるNo.4-1株は、滅菌土壌と同様に植物病を抑制しなかった。

7-4 考察

本章では、No.4株の抗菌活性消失株 No.4-1株を単離し、性質の検討及び植

物試験を元株と比較した。

トランスポゾンによる変異には、通常グラム陰性菌で広く用いられているプラスミド pSUP2021とその供与体である大腸菌 *E.coli* S17-1を使用した。変異によって No.4 株への変異が起こる頻度は 1.9×10^{-4} であり、同じグラム陰性菌の *Rhizobium meliloti* の頻度の 10^{-4} と同程度であった (2)。トランスポゾンを使用した変異は *A.faecalis* No.4 でも他のグラム陰性菌と同様に行えることが分かった。

得られた変異株 175 株の植物病原菌 *F.oxysporum* J1 と *R.solani* K-1 に対する抗菌活性を検討した。病原菌を含む培地に変異株をそれぞれレプリカして、抗菌活性を阻止円の有無を調べたところ、175 株中、阻止円の全く形成されなかった菌株は 1 株であった。元株より阻止円の小さくなった株や大きくなった株も観察されたが、これは染色体に抗菌物質の生産を制御する部位が存在することを意味している。さらに、No.4-1 株の様々な植物病原菌に対する抗菌活性を調べたところ、すべての病原菌に対して抗菌活性を示さなかった。このことから、No.4-1 株は、トランスポゾン変異によって、元株の染色体にコードされていた抗菌物質の生合成遺伝子に変異がかかり、抗菌物質を生産しなくなったことが明らかになった。

次に、得られた抗菌物質非生産株である No.4-1 株による従属栄養硝化反応を検討した。元株では菌の増殖過程で硝化反応をして NH_2OH , NO_2^- , NO_3^- を生産したが、No.4-1 株では、菌の増殖速度と定常期の菌数ともに元株と変わらないにも関わらず、硝化反応は全く行わなかった。以上の結果から、No.4 株はトランスポゾン変異により硝化反応の中間物質である NH_2OH を生産しなくなり、それによって植物病原菌に対する抗菌活性もなくなることが示唆された。つまり硝化反応で生産された NH_2OH が No.4 株の抗菌物質であることが示された。

変異株と元株によるトマト苗立枯病の植物試験を滅菌土壌と非滅菌土壌で検討した。どちらの土壌でも No.4 株の培養液 50ml は植物病を抑制していたが、抗菌物質を生産しない No.4-1 株の培養液 50ml はほとんど植物病を抑制しなかった。No.4-1 株は、プレート試験による *R.solani* K-1 の増殖抑制と植物試験によるトマト苗立枯病の抑制をいずれも示さなかった。No.4 株は抗菌物質 NH_2OH を生産することで植物病原菌を阻害し、植物病を抑制することが示唆された。

今回得られた変異株 No.4-1 株は、*A.faecalis* No.4 の硝化反応、特に NH_2OH の重要性や土壌中での植物病抑制のメカニズムを調査する上で非常に役立つであろう。

7-5 結論

No.4 株にトランスポゾン変異をかけて植物病原菌に対する抗菌活性が消失した株を単離し、菌の特徴を検討した結果、変異株 No.4-1 は元株の特徴である従属栄養硝化反応を行わず、植物試験においてはトマト苗立枯病を抑制しなくなった。したがって、No.4 株が生産する NH_2OH が植物病原菌に対する抗菌物質であることが明確になった。

7-6 参考文献

1. Berg, D. E., and Berg, C. M.: The prokaryotic transposable element Tn5, *Bio / Technology*, 1, 417-435 (1983)
2. Simon, R., Priefer, U., and Puhler, A.: A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria, *Bio / Technology*, 1, 784-791 (1983)
3. Rella, M., Mercenier, A., and Haas, D.: Transposon insertion mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* with a Tn5 derivative: application to physical mapping of the *arc* gene cluster, *Gene*, 33, 293-303 (1985)
4. Kim, Y., and Harker, A. R.: Cloning and characterization of the regulatory genes *phlR1* and *phlR2* involved in phenol metabolism from *Alcaligenes eutrophus* JMP134, *Mol. Cells.*, 31, 620-629 (1997)
5. Van-Waasbergen, L. G., Kidambi, S. P., and Miller, R. V.: Construction of a *recA* mutant of *Burkholderia* (formerly *Pseudomonas*), *cepacia*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 59-65 (1998)
6. Zhu, W., Yamasaki, H., and Mironov, N.: Frequency of HPRT gene mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine corresponds to replication error phenotypes of cell lines, *Mutat. Res.*, 26, 398, 93-99 (1998)
7. Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., and Puhler, A.: Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria, *Gene Transfer*, 640-659, Academic Press Inc. (1986)

8. Lee, J., Omori, T., and Kodama, T.: Identification of the metabolic intermediates of phthalate by Tn5 mutants of *Pseudomonas testosteroni* and analysis of the 4, 5-dihydroxyphthalate decarboxylase gene, J. Ferment. Bioeng., 77, 583-590 (1994)
9. Martinetti, G., and Loper, J. E.: Mutational analysis of genes determining antagonism of *Alcaligenes* sp. strain MFA1 against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*, Can. J. Microbiol., 38, 241-277 (1992)
10. Kim, Y., Ayoubi, P., and Harker, A. R.: Constitutive expression of the cloned phenol hydroxylase gene(s) from *Alcaligenes eutrophus* JMP134 and concomitant trichloroethylene oxidation, Appl. Environ. Microbiol., 62, 3227-3233 (1996)

Table 7-1 Strains and plasmid.

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>Alcaligenes faecalis</i>		
No.4	Antagonist of <i>F.oxysporum</i> J1 and <i>R.solani</i> K-1, Sm ^r , NH ₂ OH ⁺	this work
Mutant	No.4 :: Tn5, Sm ^r , Nm ^r , NH ₂ OH ⁻	this work
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	pRP4-2 (Tc :: Mu) (Km :: Tn7) integrated in chromosome	(3)
Plasmid		
pSUP2021	Mob ⁺ , Tn5 (Nm ^r)	(3)

Table 7-2 Doubling times of *Alcaligenes faecalis* No.4 and non-hydroxylamine-producing mutant, No.4-1 in two media.

	Doubling time (h)	
	L medium	MM medium
Mutant, No.4-1	1.8	4.0
<i>A.faecalis</i> No.4	1.6	3.8

Table 7-3 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4 and non-hydroxylamine-producing mutant, No.4-1 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	Bacteria	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	43 ^a	230 ^a	65 ^a
+	<i>A.faecalis</i> No.4	71 ^b	394 ^b	33 ^b
+	Mutant, No.4-1	37 ^a	162 ^a	65 ^a
-	-	121 ^c	632 ^c	0 ^c

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

Table 7-4 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4, non-hydroxylamine-producing mutant, No.4-1 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in non-sterilized soil.

Treatment		Leaf length	Shoot weight	Diseased ratio
<i>R.solani</i> K-1	Bacteria	(mm)	(mg dry / pot)	(%)
+	-	72 ^a	406 ^a	46 ^a
+	<i>A.faecalis</i> No.4	112 ^b	543 ^b	11 ^b
+	Mutant, No.4-1	73 ^a	352 ^a	39 ^a
-	-	122 ^b	657 ^b	0 ^c

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot. Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

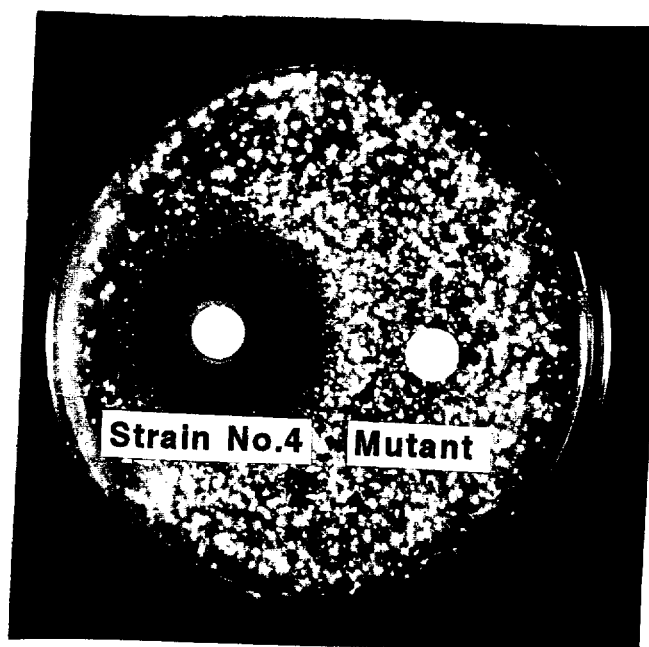


Fig. 7-1 Antifungal activity of *Alcaligenes faecalis* No.4 and non-hydroxylamine-producing mutant, No.4-1 against *Fusarium oxysporum* f. sp.*lycopersici* race J1 SUF119 *in vitro*.

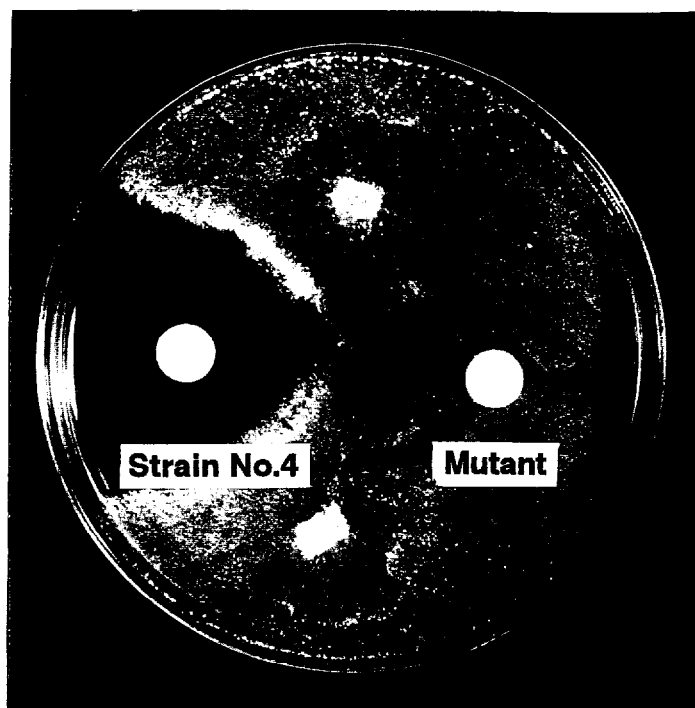


Fig. 7-2 Antifungal activity of *Alcaligenes faecalis* No.4 and non-hydroxylamine-producing mutant, No.4-1 against *Rhizoctonia solani* K-1 *in vitro*.

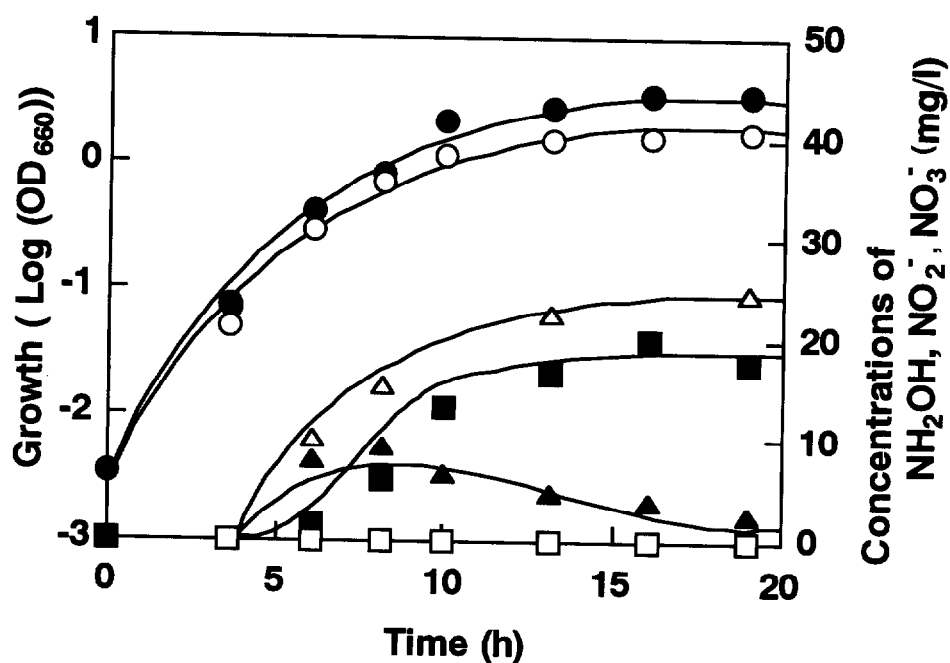


Fig. 7-3 Growth and production of nitrogen products of *Alcaligenes faecalis* No.4 and non-hydroxylamine-producing mutant, No.4-1 in L medium. *A. faecalis* No.4 : ●; Growth, ■; NH₂OH, ▲; NO₂⁻, △; NO₃⁻, Mutant, No.4-1: ○; Growth, □; NH₂OH

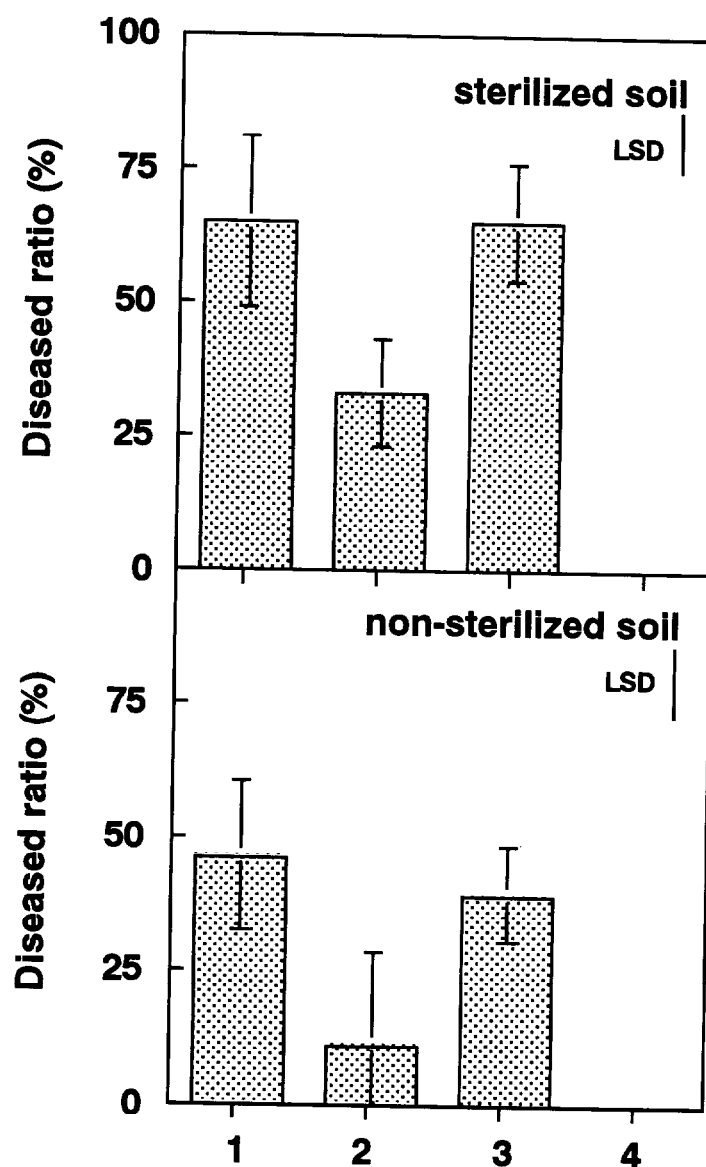


Fig. 7-4 Effect of *Alcaligenes faecalis* No.4 and non-hydroxylamine-producing mutant, No.4-1 on the suppression of damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani* K-1 14 days after planting tomato in soils. 1; *R.solani* K-1, 2; *R.solani* K-1 + *A.faecalis* No.4, 3; *R.solani* K-1 + Mutant, No.4-1, 4; Control

Each datum is an average of six pots containing 9 seeds / pot.
Means in any column with the same letter are not significantly different at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) analysis.

第8章 結論

本章では第2章～第7章までの内容を総括し、本研究で得られた結論を述べ、今後の展望を述べる。

8-1 本研究の結論

本研究を行った結果、以下のような知見が得られた。

(1) *Alcaligenes faecalis* No.4株は *in vitro* で16種類の植物病原菌に対して強い抗菌活性を示した。その抗菌活性は栄養の乏しい培地中でも栄養の豊富な培地と同様の効果を示した。No.4株は病原糸状菌ばかりでなく病原細菌にも抗菌性を示し、幅広い抗菌スペクトルを有することが明らかになった。また、No.4株は *Alcaligenes* 属特有の従属栄養硝化反応や、高い抗生物質耐性や、生分解性の高分子生産を行う菌株であることが明らかになった。

(2) No.4株の植物病原菌に対する抗菌活性が NH_4^+ に依存することと、No.4株が従属栄養硝化反応をして NH_4^+ を NH_2OH , NO_2^- , NO_3^- に酸化することに注目して、No.4株の抗菌物質が従属栄養硝化反応中に生産される NH_2OH であることが明らかになった。また、抗菌物質 NH_2OH の *F.oxysporum* J1と *R.solani* K-1に対する最小阻止濃度は、それぞれ 10mg/l, 20mg/lであることが分かった。

(3) No.4株の抗菌物質 NH_2OH の生産量を最大にする菌の最適培養条件は、初期 pH7.0 の L 培地に培養温度 30℃で培養することであることが明らかになった。この培養によって No.4株は NH_2OH を 20mg/l 近く生産することが分かった。

(4) No.4株を土壌に接種したところ、栄養細胞で長期間安定に存在し、No.4株の土壌定着性が高いことが明らかになった。土壌の滅菌の有無による土壌安定性に違いはみられず、土壌微生物の影響を受けないことが分かった。土壌温度が高いと土壌微生物の影響を受けやすくなり、土壌定着性が低くなることも分かった。また、No.4株は滅菌土壌 (pH 7) 中で抗菌物質の NH_2OH を生産することが分かった。

(5) No.4株の培養液を土壤に接種することにより、*R.solani* K-1によるトマト苗立枯病が抑制され、No.4株が実際に植物病を抑制することが明らかになった。土壤の滅菌の有無で抑制効果に違いはみられず、土壤微生物の影響を受けないことも分かった。また、接種したNo.4株は根圏で安定に存在しており、根圏定着性があることも分かった。No.4株の抗菌物質である NH_2OH を接種することによって、滅菌土壤では植物病が抑制されたが、土壤微生物の存在する非滅菌土壤では NH_2OH の植物病抑制効果は無くなることが分かった。

(6) 実際の土壤で*R.solani* K-1によるトマト苗立枯病を抑制するためのNo.4株の最適接種条件は、培養1日目の培養液や菌体懸濁液をポットあたり50ml接種することであることが明らかになった。土壤の滅菌の有無で抑制効果に違いはみられず、土壤微生物の影響を受けないことも分かった。No.4株の植物病抑制には必ず菌体が必要であることが分かった。

(7) No.4株にトランスポゾンにより変異をかけて抗菌活性を示さない株を単離した。変異株No.4-1株は従属栄養硝化反応を行わず、元株の抗菌物質である NH_2OH を生産しないことが明らかになった。さらに変異株No.4-1株を土壤に接種したところ、*R.solani* K-1によるトマト苗立枯病を抑制しないことが明らかになった。以上のことから、No.4株の抗菌物質は NH_2OH であり、No.4株はこの NH_2OH を使って植物病を抑制することが明確になった。

8-2 今後の展望

本研究で得られた知見をもとに今後の課題と展望について考察する。

8-2-1 *Alcaligenes faecalis* No.4の好氣的脱窒反応の検討

生物的な硝化脱窒反応は下水、污水处理に使用され、アンモニアを窒素ガスにまで分解している。これまでは硝化反応を行う好気槽と脱窒反応を行う嫌気槽の2つの槽に分けて污水处理をしていたが、現在、好氣的脱窒反応を行う硝化菌による単槽での処理が試みられている。これはコストや簡易性の面から非常に有効であり、処理場の

縮小や取り扱いの簡便性が期待できる。本研究の第2章で述べたように、No.4株も硝化反応と好氣的脱窒反応を行う菌のため同様な処理が可能である。また No.4 株は高い薬剤耐性を示すことから、様々な汚水の同時処理が期待できる。

8-2-2 有用な機能を持つ遺伝子組み換え体の創製

トランスポゾン変異は菌の特異的な性質を欠損させた変異株を取得する手段の一つであり、近年、その変異法の簡便性と取得した変異株の遺伝子操作法の確立によって使用頻度が高まっている。本研究の第7章でもトランスポゾン変異によって No.4 株の抗菌活性消失株を単離したが、遺伝子操作は全く行っていない。変異株から欠損された部位を含む遺伝子を取得し、その配列から酵素の生合成遺伝子や制御遺伝子を決定することは非常に興味深い。その遺伝子を操作することによって抗菌物質である NH_2OH を大量に生産する株を得ることも期待できる。

8-2-3 キュウリうどんこ病の抑制の検討

現在実際の圃場で植物病原菌 *Sphaerotheca fuliginea* によるイチゴのうどん粉病が非常に問題となっている。イチゴが病気に感染するとその地区全体で発生し、収穫に大きな影響を及ぼす。またイチゴは付加価値が高く需要が高い。神奈川県農業試験場や農協においても化学農薬ベノミルによる植物病の抑制試験が試みられており、効果は上がってきている。しかし十分な抑制効果は得られていない。一方、No.4 株の培養液をキュウリの葉上に噴霧することにより、菌は植物病原菌 *S. fuliginea* によるキュウリうどん粉病を 95%以上抑制した。したがって、No.4 株は植物試験においてイチゴのうどん粉病にも効果を示すことが期待できる。また、うどん粉病抑制効果を簡易的に測定する方法が開発されており、このリーフディスク法を用いて No.4 株のうどん粉病の抑制効果を *in vitro* で検討することもできる。さらに、*S. fuliginea* との抗菌メカニズムを検討し、本研究で示された *R. solani* K-1 に対する抗菌メカニズムと比較検討することができる。

8-2-4 *Alcaligenes faecalis* No.4 の土壌接種法の検討

第1章で述べたように No.4 株を直接接種する方法では圃場で実際に使用することは不可能である。また No.4 株が土壌中で抗菌物質を定常的に生産し続けることは困難である。そこで病原菌と拮抗する根圏付近に菌を集中させた種子コーティング法や、

菌の周囲の環境を整えるために栄養分や住みかとなる担体へ菌を吸着させた資材を使用する方法が考えられる。種子コーティング法は菌が少量ですみ、実際の圃場でも有効な方法であるため、近年種子コーティングによる植物病抑制の論文が報告されている。本研究で使用した No.4 株は土壤微生物であるため植物の根との相性が良いことが予想されることから、種子コーティングは No.4 株の新しい土壤接種法として興味深い。一方、担体を使用する方法は、市販の土壤改良材が同じ方法を採用していることから分かるように、非常に有効であり、抑制効果の持続が期待できる。本研究で使用した No.4 株はアンモニアを酸化することによって抗菌物質を生産することから、微量のアンモニアを添加することによってさらなる抑制効果が期待できる。さらに担体に No.4 株が資化できる物質を使用することによって、土壤への影響を最低限にすることが可能である。

8-2-5 NH_4^+ 過多土壤での土壤改良の検討

アンモニア態肥料の過剰な添加によって植物は生育阻害を起こす。第2章で述べたように No.4 株は従属栄養硝化反応によりアンモニアイオンを硝酸イオンへ酸化するため、No.4 株を NH_4^+ 過多土壤へ接種すると、アンモニア過多の軽減と硝酸態肥料の増加が期待される。

8-2-6 揮発性抗菌物質の同定

拮抗微生物による土壤病害の防除に関する論文は多数報告されているが、揮発性抗菌物質による防除は極めて少ない。これは抗菌活性のある揮発性物質の測定法が確立しておらず、菌体外に生産される多数の低分子物質から抗菌物質を同定するのは困難なことが原因である。No.4 株は揮発性抗菌物質を生産するが、まだ物質の同定はされていない。しかし No.4 株の場合、硝化脱窒反応から生産される NO か NO_2 か N_2O であることも予想される。揮発性抗菌物質の同定は菌による新規の植物病原菌の抑制方法の発見につながり、硝化脱窒反応と植物病原菌の増殖抑制の全く異なる現象をさらに結びつけることができる。

8-2-7 化学農薬との混合施用

拮抗微生物による土壤病害の防除に関する論文は多数報告されているが、実用化した例は極めて少ない。これは第1章で述べたように微生物農薬だけの接種では効果が

弱いことや、第4章で述べたように他の土壌微生物との拮抗作用により活性や定着性が低下することが原因である。これらを解決する方法として微生物農薬と化学農薬とを同時に使用する施用法が注目されている。この方法を適用するためには拮抗微生物が化学農薬に耐性を有することが必要であるが、以下の効果が期待できる。①化学農薬の使用量を軽減できる。②それぞれを単独で使用するよりも相乗効果や幅広い病害防除効果が期待できる。③強力な耐性菌の出現を防止できる。実際に化学農薬と微生物農薬との組み合わせによる高い植物病抑制効果を示した論文が報告されている。本研究で使用した No.4 株は高い薬剤耐性を示す菌であるため、市販の化学農薬にも耐性を示すことが期待される。また、馴養によってこの耐性を高めることも可能であろう。このように化学農薬に耐性を示す菌と化学農薬を併用することによりさらに高い植物病抑制効果が期待できる。

謝 辞

本研究を行う行うに際し、終始適切なご指導とご鞭撻を賜りました正田誠教授に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるに当たり、日頃より多くの助言、激励を賜りました阿野貴司助教授、助手の奥野和政博士、菅野靖史博士に感謝申し上げます。

日々の実験において的確で貴重な助言をいただきました技官の平井光代博士に深く感謝いたします。

本研究の植物試験を行う際に、土壌や病原菌などをお譲り下さるとともに、大変貴重なご助言も下さいました神奈川県農業総合研究所の北宣裕氏、藤原俊六郎氏、折原紀子氏にお礼申し上げます。

本研究の変異株取得を行う際に、トランスポゾンをお譲り下さいました Bielefeld 大学の R.Simon 氏にお礼申し上げます。

最後に、お世話になった正田・阿野研究室の全ての皆様に心よりお礼申し上げます。