

報 文

Bacillus 属細菌培養液の抗菌活性と培地組成の検討*

辻 久 生, 辻 美保子**, 上田 博 夫

大阪府立大学農学部

**樟蔭東女子短期大学

(平成元年 3 月 4 日受理)

Antifungal Activity of the Culture Supernatant of *Bacillus* spp.
and Examination of the Culture Medium Compositions*

Hisao TSUJI, Mihoko TSUJI** and Hiroo UEDA

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Mozu-umemachi, Sakai 591, Japan

**Shōin-higashi Women's College, Wakaenishi-shinmachi, Higashiosaka 578, Japan

The culture supernatant of *Bacillus* sp. bacteria showed growth inhibition against several kinds of fungi, especially plant pathogenic fungi. This strain was isolated as a microorganism, which remarkably inhibited the growth of *Fusarium* sp. on a potato-glucose agar medium. The strongest antifungal activity was observed when the strain was aerobically cultured in a medium containing 200 g of potato extract, 20 g of glucose and 2 g of polypeptone per liter of water at pH 6.5 with a reciprocal shaker at 33–35°C for 2 days. The supernatants of about 30-fold dilution and about 20-fold dilution retained the antifungal activity against *Pyricularia oryzae* and *Helminthosporium oryzae*, respectively.

緒 言

農業用薬剤としてイネいもち病菌やイネ紋枯病菌などの植物病原菌に対し, kasugamycin, blasticidin S, valdamycin, polyoxin などの抗生物質が広く使用されている¹⁾. これらは放線菌より分離されたアミノ配糖体および核酸系の抗生物質である. 今回, イネいもち病菌, イネ紋枯病菌を含む種々の植物病原菌(かび)に対し, 広く生育阻害作用を示す抗菌活性物質を生産する *Bacillus* 属細菌を分離した. 本菌の培養液に含まれる抗菌活性物質は, 検索の結果ペプチド化合物と推定される.

Bacillus 属細菌が生産するペプチド系抗生物質については数多くの研究があり²⁾, 抗かび物質として mycobacillin³⁻⁵⁾, bacillomycin⁶⁾ および bacillomycin の類似物

質^{7,8)} などが分離されている. しかし, これらのペプチド系抗生物質は実際には利用されていない.

本菌の培養液を *Helminthosporium oryzae* に微量添加して培養すると, 生育が抑制され, 菌糸の形態の変化, 厚膜化した細胞の形成, 多数の分生胞子の着生などの現象が観察された.

本報では, 分離細菌の培養液の抗菌スペクトルおよび抗菌活性物質生産用培地について検討した結果を報告する.

実 験 方 法

1. 分離細菌

本菌は *Fusarium* sp. に対し強い抗菌活性を有する物質を生産する細菌として分離された.

2. 分離細菌用培地

増殖・保存用培地: 市販ポテトデキスロトーズ寒天培地 (PG 寒天培地, 栄研 E-MF 21) に 0.5 g/l の酵母エキスを添加し, pH 6.2 に調節した培地.

* *Bacillus* 属に属する細菌の一種が生産する抗菌活性物質について (第 1 報)

Studies on the Antifungal Substance Produced by *Bacillus* sp. Bacteria (Part 1).

液体培地: バレイショ 200 g, ブドウ糖 20 g, 蒸留水 1000 ml (PG 液体培地) に 2 g/l のポリペプトンを添加し, pH 6.5 に調節した培地 (PGP 液体培地)。

調製法: バレイショは男爵いもを用い, 剥皮後のいも 200 g を細切し, 蒸留水 1000 ml を加え加熱する。沸騰後20分間おだやかに煮沸させたのち, ガーゼを数枚重ねてろ過し, ろ液を冷却後ブドウ糖, ポリペプトンを加え pH を調節し, 全量を 1000 ml とする。

3. 抗菌活性の測定

検定菌: *Helminthosporium oryzae* IFO 5844 (イネごま葉枯病菌) を使用した。本菌を保存菌株より PG 寒天培地 (pH 5.8±0.1) に接種し 28°C で 3~4 日培養し, 胞子を十分着生させた。検定用には通常接種後10日前後のものを使用した。

測定法: PG 液体培地 (pH 5.8) に 1% の寒天を加えたもの (PG 軟寒天培地) を上層培地とし, 下層培地には PG 寒天培地を用いた。活性の強さは抗生物質の検定法に準じ, 円筒-寒天平板法 (カップ法) により測定し, 検定菌の発育阻止円の直径により判定した。

4. 抗菌活性物質生産用培地の検討

分離細菌の前培養: 増殖用培地をペトリ皿に流し込み平板培地とし, この培地に新鮮な保存菌より菌体を 1 白金耳塗抹し 33~35°C で 1 日培養する。接種菌を懸濁させるためにあらかじめ 100 ml 容三角フラスコに分注した PGP 液体培地に平板培地上の菌体を白金鉤でかきとり懸濁させ十分攪拌する。この菌体懸濁液 1 ml 中に $10^9 \sim 10^{10}$ 個の細菌を含むように調節し, これを接種菌とした。

培地の検討: ブイヨン培地 (Nutrient broth, 栄研 E-MC 35) および PG 液体培地を基本培地とし, これらの培地の pH を 5.5~8.0 まで 0.5 おきに变化させた場合の抗菌活性, および, ブドウ糖添加量を 0.5, 1, 2, 3 および 5% と变化させた場合の活性を調べた。ついで, 一部の培地について, N 源にポリペプトンおよび硫酸を用いた場合の影響, および, C 源にデンプンを用いた場合の影響を調べた。試験用培地を大型試験管に 10 ml 宛分注し, 常法により殺菌したのち前述の方法で調製した接種菌をそれぞれの培地に 1/50 量 (v/v) 接種し, 33~35°C で 2 日間振盪培養 (振幅 70 mm, 毎分 105 回往復) した。培養液は遠心分離 (10,000 rpm, 10 min) し, 上清を 115°C, 10 分間加熱したのち活性の測定に供した。活性の測定はカップに検液を 0.1 ml 注入し 3. に従って行なった。

5. 活性物質生産用培養液の調製

500 ml 容三角フラスコに PGP 液体培地を 150 ml 宛分注して 121°C, 15 分間殺菌し, 前述の方法で調製した接

種菌を 1/50 量 (v/v) 加え, 33~35°C で 2 日間振盪培養する。培養後遠心分離 (10,000 rpm, 15 min) し, 上清を 115°C, 10 分間加熱処理し, 抗菌活性物質分離用培養液とした。

6. 培養液の各種微生物に対する抗菌性

被験菌: Table 2 に示した菌株を用いた。

被験菌の調製: 細菌はブイヨン寒天斜面培地で 37°C で 24 時間培養した新鮮な菌体を 1 白金耳宛ブイヨン液体培地に接種し, 37°C で 20 時間振盪培養を行なった。酵母は新鮮な PG 寒天斜面培地で培養した菌体を 1 白金耳宛 PG 寒天平板培地に接種し, 28°C で 24 時間前培養した。かびは比較的新鮮な PG 寒天斜面培地上の菌体より白金耳を用いて胞子のみを PG 寒天平板培地に接種し, 28°C で培養し, 胞子を十分着生させたのち活性の測定に供した。植物病原菌には胞子のみを鉤菌することの困難なものがあつた, これらは菌糸もしくは菌核を含んだ状態で白金鉤でかきとり培地に移植した。低温菌は 20°C で培養を行なった。

抗菌活性測定用培地: 細菌には下層培地としてブイヨン寒天培地を使用し, 上層培地にはブイヨン軟寒天培地 (培地 1000 ml 中 10 g の寒天を含む, pH 7.2) を調製し使用した。酵母およびかびには下層培地に PG 寒天培地を用い, 上層培地に PG 軟寒天培地を調製し使用した。

抗菌活性テスト: 活性の測定は 3. に準じて行なった。検定に用いる微生物は前培養菌より 1 白金耳宛上層用の軟寒天培地に接種した。活性物質分離用の培養液をカップに 0.2 ml 無菌的に注入し, 細菌は 37°C で 24 時間, 酵母は 28°C で 24 時間培養し, それぞれの発育阻止円の直径を測定した。かびは低温菌のみ 20°C で, その他のかびは 28°C で培養し, 胞子着生後の発育阻止円の直径を測定すると同時に, 胞子形成抑制の有無, 抑制範囲などをも観察した。

実験結果

1. 分離細菌の性状

本細菌はグラム陽性, 好気性~通性嫌気性で芽胞を形成する桿菌 (Fig. 1) であることより *Bacillus* 属に属する細菌である。本細菌は小桿菌で, 楕円形の胞子を内生し, 胞子嚢は膨脹せず, 運動性を有する。PV テスト陽性, ブドウ糖よりガスおよび酸の生成はなく, デンプンおよびタンパク質の分解力の強い細菌である。また, 位相差顕微鏡下で菌体周囲に莢膜様物質を有することが観察された。さらに生理的性質の詳細について現在検討中である。

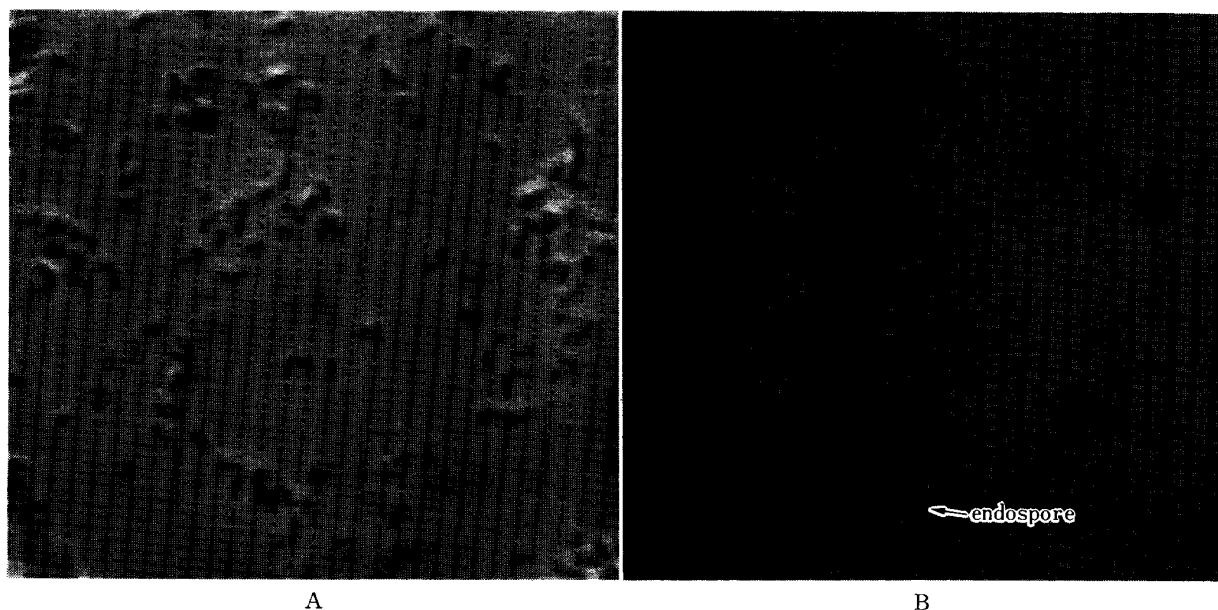


Fig. 1 Photomicrographs of *Bacillus* sp. bacteria.

A: through phase-contrast ($\times 600$), B: with oil-immersion objective ($\times 1,000$).

2. 抗菌活性物質生産用培地の検討

分離細菌は PG 寒天培地上で旺盛な生育を示し、PG 液体培地で 2 日間振盪培養を行なった培養液が種々の植物病原菌（かび）に対し強い生育阻害活性を示した。この抗菌活性物質の分離を試みるにあたり、より活性の強い培養液を得ることが望ましく、種々の組成の培地を調製し、最適培地の検討を行なった。分離細菌はきわめて芽胞を形成しやすい細菌で、培養液を遠心分離して菌体を除去し試験用培養液を得る段階で、遠心上清に芽胞が残存し、抗菌テスト中に発芽増殖して結果の判定の妨げとなる場合がある。除菌ろ過を試みたが、この操作では試料が多量、または多種類の場合には煩雑で長時間を要するところから、加熱処理による滅菌での活性の変化を調べたところ、通常の培地殺菌条件 (121°C , 15 min) でも活性の低下は認められなかった。このことは、この抗菌活性物質が熱安定性の高い物質であることを示唆している。なお、培養液を 115°C , 10 分間加熱処理することによって、残存する芽胞を死滅させることができるので、この条件で加熱処理を行なった培養液を抗菌活性テスト用として実験に供した。

種々の組成の培養液の抗菌活性を測定し、つぎの結果が得られた。

(1) 培地の pH は 6 ~ 7 付近では活性にほとんど差がない。pH 5.5 および pH 7.5 以上では活性は低下した。

(2) ブイヨンのみの培養液の活性は低いが、ブドウ糖を添加すると活性は増大する。

(3) PG 液体培地の場合、ブドウ糖の添加量 2~5% の範囲ではほぼ同等の活性を示した。

(4) PG 液体培地にポリペプトンを 0.2% 添加した培地 (PGP 液体培地) の効果は著しく、0.1% および 0.5% 添加の効果は微弱であった。

これらの結果をもとに、最も抗菌活性の強かった PGP 液体培地のブドウ糖をデンプンにおきかえた培地、および、ポリペプトンを硫酸におきかえた培地で活性を調べた。C 源にデンプンを用いると活性は低下し、ポリペプトン添加の効果が相殺された。N 源に硫酸を加えた場合の活性は、PG 液体培地の活性よりやや低くなる傾向があった。これらの結果の一例を Table 1 に示す。これより、PGP 液体培地の抗菌活性が最大で、この組成の培地を抗菌活性物質生産用培養液として使用した。

3. 各種微生物に対する抗菌活性

分離細菌の培養液の抗菌スペクトルを Table 2 に示す。培養液の抗菌活性は細菌および酵母に対しては弱い。もしくは活性を示さない。植物病原菌を含む多くのかびに対して強い抗菌活性を示し、その発育阻止円周辺部はきわめて明瞭であった。植物病原菌のなかでは、*Pyricularia oryzae* に対してきわめて強く発育を阻止したが、*Phytophthora cactorum* に対してはまったく生育阻止作用を示さなかった。また、*Aspergillus oryzae* および *Rhizopus javanicus* に対する作用も弱い。

4. 希釈培養液の抗菌活性

分離細菌の培養液の生育阻害力の強さを 2 倍希釈による段階希釈によって調べた。被験菌に *P. oryzae* および

Table 1 Comparison of media in antifungal activity.

Culture	Activity
Nutrient broth	+
Glucose (1%)·nutrient broth	+++
Potato·glucose (2%) broth	+++
Potato·glucose (2%)·polypeptone (0.2%) broth	+++++
Potato·glucose (2%)·polypeptone (0.5%) broth	+++
Potato·glucose (2%)·(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.2%) broth	+++++
Potato·soluble starch (2%)·polypeptone (0.2%) broth	+++

The activity was tested by the cylinder plate method. 0.1 ml of each culture broth of *Bacillus* sp. bacteria was poured into each cylinder. *Helminthosporium oryzae* was used as the test organism.

The symbols represent the diameter of an inhibited zone: +, less than 15 mm; ++, from 15 to 18 mm; +++, from 18 to 21 mm; +++, from 21 to 24 mm; +++++, from 24 to 27 mm; ++++++, larger than 27 mm.

Table 2 Comparative antimicrobial spectra of the culture supernatant of *Bacillus* sp. bacteria.

Organisms	Activity
Bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	±-+
<i>Bacillus circulans</i> IFO 3329	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Sarcina lutea</i>	±
<i>Escherichia coli</i> IFO 3301	±
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i> IFO 3851	+
Yeasts	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+
<i>Candida utilis</i>	-
Fungi	
<i>Aspergillus niger</i> IFO 4414	++
<i>Aspergillus oryzae</i>	±--
<i>Penicillium notatum</i>	+++
<i>Penicillium chrysogenum</i> IFO 6143	+++
<i>Rhizopus javanicus</i>	+±±
<i>Mucor javanicus</i> IFO 4569	++
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> IFO 5266	++
<i>Fusarium culmorum</i>	++
Plant pathogens (fungi)	
<i>Alternaria solani</i> IFO 5924	+++
<i>Botrytis cinerea</i> (psychrophiles)	+++
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	++
<i>Helminthosporium oryzae</i> IFO 5844	+++
<i>Pellicularia filamentosa</i> f. sp. <i>sasakii</i> IFO 6330	+++
<i>Rhizoctonia solani</i> I-A	+++
<i>Phytophthora cactorum</i> (psychrophiles)	-
<i>Pyricularia oryzae</i>	++++

The activity was tested by the cylinder plate method. 0.2 ml of culture supernatant was poured into each cylinder.

The symbols represent the diameter of an inhibited zone: -, none; ±, less than 7 mm; +, from 7 to 12 mm; ++, from 12 to 18 mm; +++, from 18 to 30 mm; +++++, larger than 30 mm.

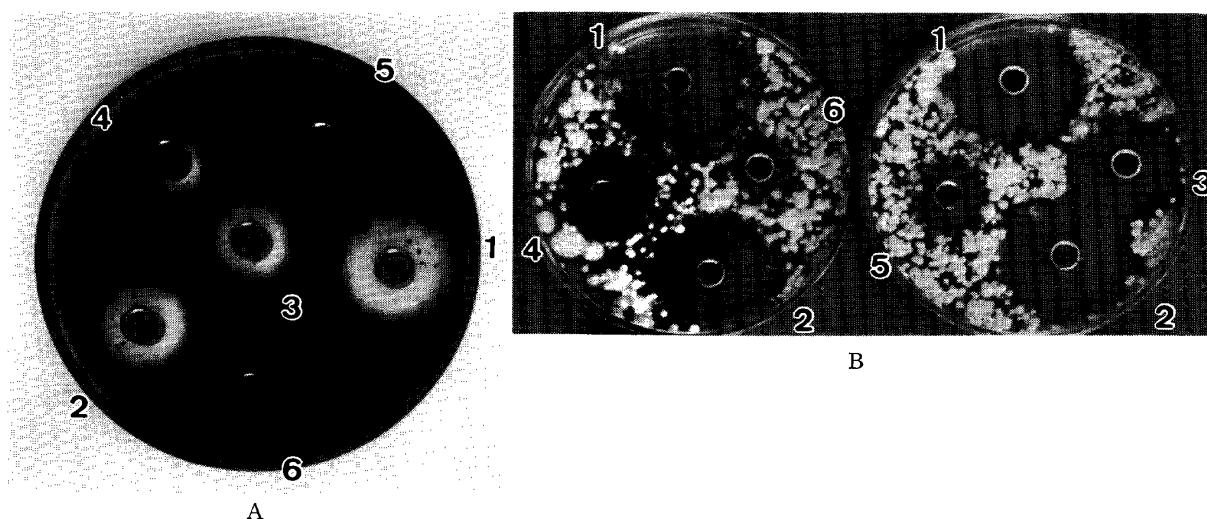


Fig. 2 Antifungal activity of the diluted culture supernatant. *Helminthosporium oryzae* (A) and *Pyricularia oryzae* (B) were used as test organisms.

1: control (culture supernatant), 2: 2-fold dilution to idem 1, 3: 4-fold dilution of idem 1, 4: 8-fold dilution of idem 1, 5: 16-fold dilution of idem 1, 6: 32-fold dilution of idem 1.

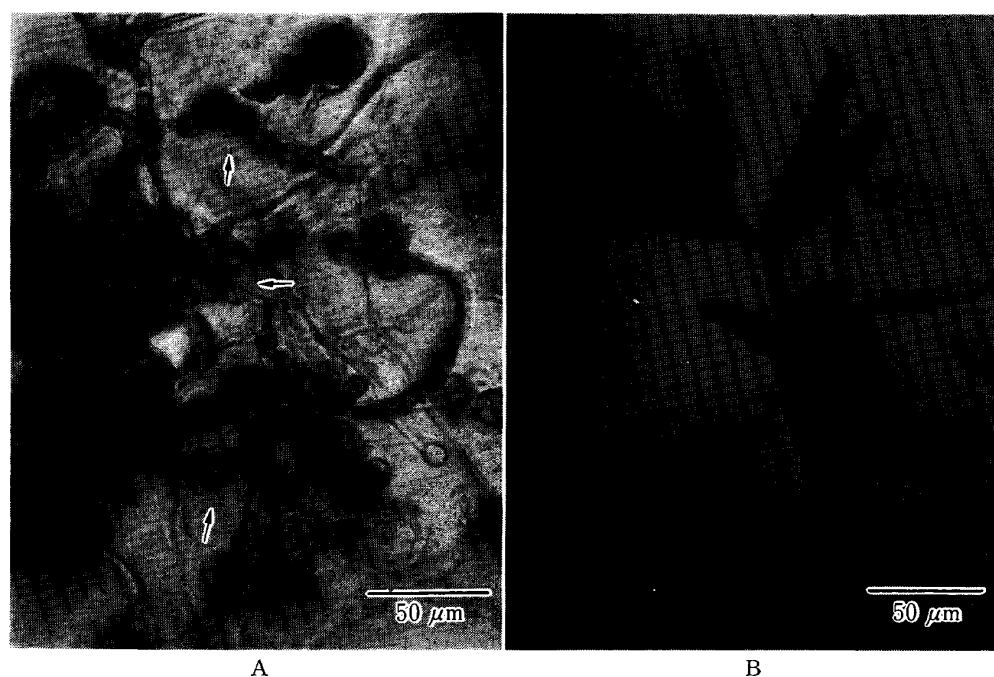


Fig. 3 Photomicrographs of *Helminthosporium oryzae* in the environs of a growth-inhibited zone by the culture supernatant.

A: chlamydospore-like cells on the agar medium, B: macroconidia formed on the short conidiophore.

H. oryzae を用い、カップ法により阻害活性を測定した。その結果を Fig. 2 に示す。 *P. oryzae* に対しては32倍希釈液まで、 *H. oryzae* に対しては16倍希釈液まで生育阻害活性が認められた。

5. 阻止円縁辺の顕微鏡観察

H. oryzae の場合、抗菌テストで見られる阻止円はき

わめて鮮明なスポットを示す。この阻止円縁辺部に生育する菌糸は孢子を着生し、見掛け上孢子密度は高く、斜面培地で培養した種かびと比べ黒色が濃く密集した状態であった。この縁辺部を顕微鏡により観察したところ、阻止円縁辺の寒天培地上には膨脹した球形の細胞、破壊された細胞および厚膜化した細胞が多数存在した。ま

た、厚膜化した細胞から分生子柄が伸長し、その先端部に多数の分生胞子の着生が認められた (Fig. 3).

考 察

分離細菌は常用培地として使用した PGP 液体培地で振盪培養すると、培養液に耐熱性の抗菌活性物質を生成し、この抗菌活性物質は多くのかび、とくに植物病原菌に対し強い生育阻害効果を示した。

本活性物質添加時の阻止円縁辺部の顕微鏡観察において、*H. oryzae* および *P. oryzae* では細胞の著しい変形が観察された。さらに、阻止円縁辺部の培地上には多数の厚膜化した細胞が存在し、分生子柄には多数の分生胞子の着生が認められた。これらの結果より、分離細菌の生産する活性物質は、ある種のかびの形態を著しく変化させる性質を有する物質であると推察される。

この培養液は *P. oryzae* に対しては32倍希釈液まで、*H. oryzae* に対しては16倍希釈液まで十分に活性を維持しており、植物病原菌に対し広い抗菌スペクトルを持つので、本抗菌活性物質を培養液より分離・精製し、化学構造および阻害機構などを解明する予定である。

要 約

1) かび、とくに植物病原菌に対して強い生育抑制作用を示す活性物質を生産する *Bacillus* 属細菌を分離した。

2) 分離細菌を PGP 液体培地で振盪培養するとき、抗菌活性物質の生産量が最大である。

3) この抗菌活性物質のバクテリア、酵母に対する効

果は少ない、あるいは効果はない。

4) 植物病原菌 (かび) に対し広い抗菌スペクトルを示す。とくに、*P. oryzae* に対しては強い生育抑制作用を示す。

5) *H. oryzae* では阻止円縁辺部の境界が明瞭であり、この縁辺部周辺には顕微鏡で多数の厚膜化した細胞が観察され、また、分生胞子の着生が著しい。

この実験を行なうにあたり試験菌を分譲していただいた、武田薬品工業株式会社農薬事業部農薬研究所ならびに中央研究所京都試験農園、および、実験に協力いただいた稻上幸代氏に厚く感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 東出栄治: 微生物 **3**, 473 (1987)
- 2) E. Katz & A. L. Demain: *Bact. Rev.* **41**, 449 (1977)
- 3) S. K. Majumdar & S. K. Bose: *Nature* **181**, 131 (1958)
- 4) A. B. Banerjee & S. K. Bose: *J. Bact.* **87**, 1397 (1964)
- 5) S. Sengupta, A. B. Banerjee & S. K. Bose: *Biochem. J.* **121**, 839 (1971)
- 6) M. Landy, G. H. Warren, S. B. Rosenman & L. G. Colio: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **67**, 539 (1948)
- 7) N. Sharon, A. Pinsky, R. Turner-Graff & J. Babad: *Nature* **174**, 1190 (1954)
- 8) 芝崎 勲・照井堯造: 醸酵工 **31**, 339 (1953); **32**, 115 (1954)