

汚泥コンポストの植物生長促成活性に関わる微生物と、 それらの代謝産物

森本正則、松本朋子、駒井功一郎

近畿大学農学部農芸化学科

The Fungi in Bio-sludge Composts and Its Metabolites Relate with PGPR Effect

Masanori MORIMOTO, Tomoko MATSUMOTO and Koichiro KOMAI

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204
Nakamachi, Nara 631-8505, Japan

Synopsis

Sometime, the compost products made from bio-sludge and containing paper strips, showed plant growth promoting effect in the field. We have evaluated to separating various fungi from bio-sludge compost that have PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) effect against some crops inoculating test into the incubation soil. Test fungi separated from the compost using by multiple dilution method and colonization on the PDA agar plate. And, the surface of autoclaved oat serials kept each fungus and inoculated by mixing 3% w/w to incubation soil for PGPF (Plant Growth Promoting Fungi) evaluation. As a result, we have recognized PGPF effect and have identified by 18S-rDNA analysis, following similarity analysis compared with on-line database.

All tested fungi showed PGPF effect against cucumber plant compared from growth of the control plant. And the fungus have produced red pigment, have identified as *Penicillium* sp. by 18S-rDNA analysis. The red pigment have isolated and identified as naphthoquinone dimmer, xanthomegnin using by EtOAc extraction of mycelium and silica gel column chromatography separation. These data suggested that various fungi maybe effect on the plants growth in the field. Though, some metabolites produced by these fungi showed antibacterial activity, these metabolites maybe act as suppressor of the soil borne plant disease.

緒言

活性汚泥や食品汚泥などの有機性廃棄物、古紙などを原料としたコンポストの施用によって植物生長促進活性が認められることがある。これらの生長促進要因がコンポスト中に存在する微生物やその代謝物によって引き起こされる可能性を検討すべく、微生物土壌接種試験によって導入微生物の植物生長促進活性を評価した。コンポストからの微生物分離は、生理食塩水による段階希釈後に各種寒天平板培地を用いた培養によって各種微生物を分離した。分離した糸状菌の土壌接種は、オートクレイブ処理したオオムギ麦粒に糸状菌を接種後、真砂土を基本とする培養土へ混合することで実施した。さらに各種植物を用いた生物検定において生長促進効果の認められた糸状菌の同定には、18S-rDNA解析を用いた。

汚泥コンポストより分離した糸状菌3種の導入は、いずれもキュウリやトマトの生育を促進した。そのうち赤色色素生産菌は、18S-rDNA解析の結果から *Penicillium* sp. と同定し、本種の生産する赤色色素は一般細菌に対して抗菌活性を示した。培養菌体より抽出・単離した抗菌性赤色色素は各種機器分析データよりナフトキノンドイマー、Xanthomegnin であると同定した。この糸状菌の代謝産物について植物生長促進活性試験や抗菌活性試験などの詳細な検討を行ったのでここに概要を報告する。

材料および方法

1. コンポスト由来糸状菌の生産する抗菌活性物質

1-1 菌の培養と抗菌活性物質の抽出

コンポスト「ゆうき百倍」より分離した3種類の糸状菌のうち2種類が *Penicillium* 属であり、その内の1種が他の糸状菌に対して阻止円を形成することから、抗菌活性物質を生産している可能性が示唆された。5リットル三角フラスコにPD液体培地約500mlを分注し *Penicillium* sp. を植菌した。28℃で静置培養し、培養期間の目安として液体培地が赤色に変色した時を培養の終点とした。

減圧濾過によって菌体と液体培地を分離し、それぞれ酢酸エチルを用いて抽出を行った。

1-2 抗菌活性物質の単離・同定

静置培養によって得られた培養液および菌体抽出物において抗菌活性を示す画分は、酢酸エチル可溶画分に認められ、この活性成分は培養液および菌体の両方の抽出物に確認できた。これらには TLC 分析によって同一の成分が含まれていることが確認できたことから、両抽出物を統合した。その後、抽出物は4℃の冷暗所に保管中に黒色沈殿が生じた。この沈殿物には抗菌活性が認められ、主成分は2種の色素化合物であった。これらの抗菌活性成分を単離するにあたり、この抗菌活性の認められた黒色沈殿の量が十分に得られなかったため、同一成分を含み多量に得られた酢酸エチル相をシリカゲルクロマトグラフィーによって Fr. 1~Fr. 5 に分画した。(Fig. 1)

単離した赤色結晶物の抗菌活性成分および抗菌活性を示さない濃青色固形物を各種機器分析によって構造解析を行った。しかし、濃青色固形物については多くの重水素化溶媒に充分溶解せずシグナルの弱い¹H-NMRデータのみが得られた。

1-3 抗菌試験

菌体の酢酸エチル抽出物に含まれる主要な2つの化合物についての抗菌試験は10% DMSOを含むLB液体培地を用い、サンプル濃度500~15ppmおよび10% DMSOを含む液体培地をコントロールとしたマイクロプレート法で行った。最小阻害濃度は2日後の菌の増殖を目視で確認し、最小阻止濃度(MIC)とした。

2. 抗菌活性物質 Xanthomegnin の生物活性

2-1 植物生長試験

培養試験管の底に濾紙を敷き、クロロホルムで所定濃度に調製した被験液を2mlずつ注下した。減圧デシケーターにてクロロホルムを完全に留去した後、蒸留水2mlずつを試験管に分注し、供試作物としてあらかじめ発芽させておいたレタス幼苗を置床した。試験管はアルミ箔で封をし、25℃で10日間培養した後に子葉長(cotyledon length)、胚軸長(hypocotyl length)、幼根長(radicle

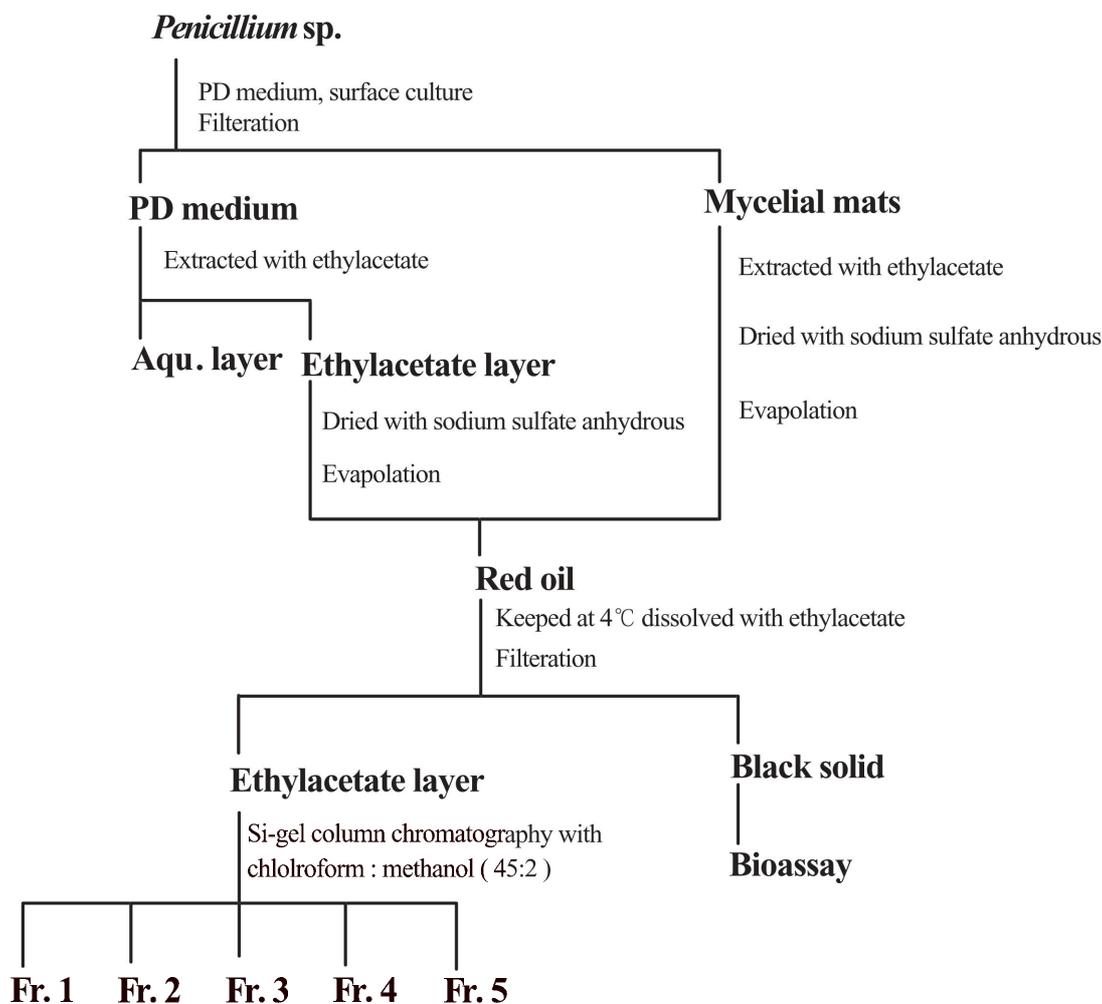


Fig. 1 Scheme for fractionation of anti-biotic compound in *Penicillium* sp.

length)、鮮重量 (weight) を測定した。トマト、キュウリにおいても同様の試験を行い、17日後に地上部重量 (cotyledon weight)、地下部重量 (radicle weight) を測定した。なお、コントロールとしてキャリアー溶媒のみを2ml 注下した処理区を用いた。結果は1個体あたりの平均値の対照区に対する百分率 (%) で表した。

2-2 殺線虫活性試験¹⁾

サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は、ナスの根こぶを蒸留水に浸漬させることで抽出した。各処理濃度に調製した Xanthomegnin メタノール溶液 (3% 未満) をセンチュウの入った直径1.5cm のシャーレに加え、処理濃度 10 ppm 50 ppm 100 ppm の 200 μl 溶液となるように調製した。25°C・48時間後、処理溶液中のセンチュウの生存率をA、コントロール中でのセンチュウ生存率Bとして致死率を算出した。

$$\text{致死率 (\%)} = (B - A) B^{-1} \times 100$$

結果

1. *Penicillium* sp. の生産する抗菌活性物質

TLC 上で黄色を示す赤色結晶物は、*E. coli* に対して 500 ppm でごくわずかな抗菌活性が認められ、*B. subtilis* においては 60 ppm で生育阻害活性が認められた。しかし、TLC 上で赤色を示す濃青色固形物は、*E. coli*、*B. subtilis* 共に生育阻害活性が認められなかった。

抗菌活性が認められた化合物 I および抗菌活性の認められなかった化合物 II は、各種機器分析の結果より以下の化合物と同定した。

Compound I : Red cryst. (EtOAc). Sinters > 260° ~ 270° $\lambda_{\text{max}} = 382 \text{ nm}, 259 \text{ nm}, 282 \text{ nm}$, FABMS (triethanolamine) 597 (M^+Na), ¹NMR δ (CDCl₃)

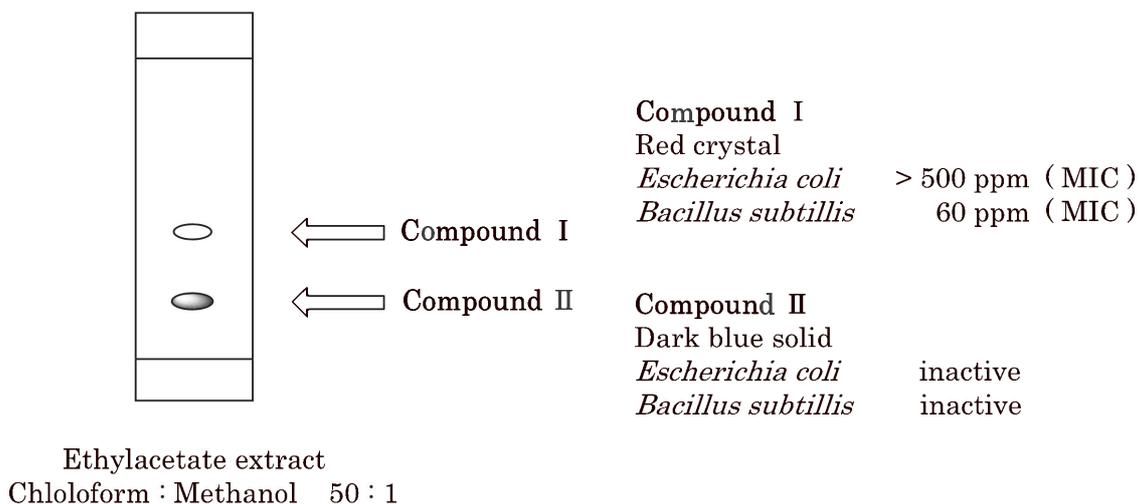


Fig.2 Anti-bacterial activity of pigments produced by *Penicillium* sp.

ppm: 13.20 (1H, s), 7.51 (1H, s), 4.66 (1H, br, s), 4.17 (3H, s), 3.14 (2H, s), 1.54 (3H, d, $J = 6.5$ Hz), ^{13}C NMR δ (CDCl_3) ppm 180.0, 162.9, 158.1, 148.3, 134.8, 122.9, 116.9, 114.8, 114.7, 71.4, 61.5, 36.2, 20.6. IR (cm^{-1}): 3271.0, 1716.5, 1678.0.

以上の結果を文献値と照らし合わせた結果、この化合物を Xanthomegnin であると同定した^{2,3)} (Fig. 3)。化合物 II についても構造解析を行ったが、研究室保有の重水素化溶媒のいずれにも十分溶解せずシグナルの弱い ^1H -NMRのみ得られ構造決定には至らなかった。

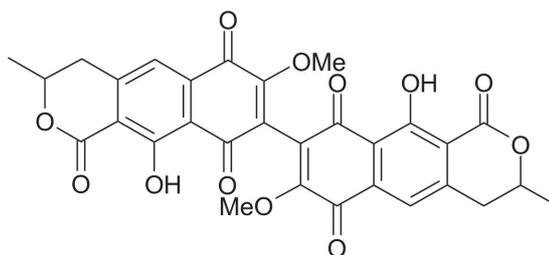


Fig. 3 Chemical structure of xanthomegnin

2. Xanthomegninの生物活性

2-1 植物生長試験

レタス幼苗試験

Xanthomegninの植物の生長に及ぼす影響を

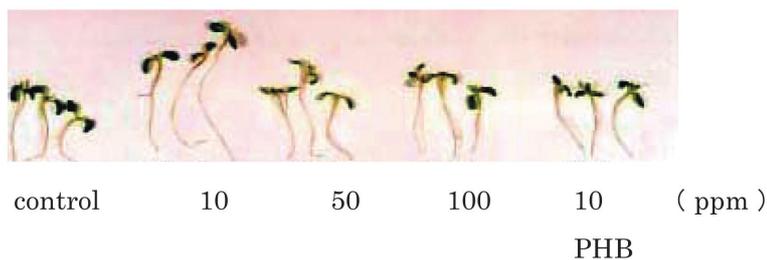


Table.1 Effect of xanthomegnin on the growth of lettuce seedlings

concentration (ppm)	Xanthomegnin			p-Hydroxybenzoate
	10	50	100	10
cotyledon length	93.8	103.6	106.6	103.9
hypocotyl length	105.5	109.0	123.3	109.7
radicle length	119.7	160.9	189.1	105.8
weight	100.4	100.8	103.5	103.9

n = 30 (% of control)

検定するために、レタスの幼苗を用いて植物生長試験を行った。Xanthomegninが抗菌活性物質であることから、同様に抗菌物質であるp-Hydroxybenzoateを比較として用いた (Table. 1)。

Xanthomegnin処理区で幼根の生長が促進されている他はp-Hydroxybenzoateとの顕著な違いは認められなかった。キノン系化合物の多くは生物

活性が高く植物に対して生長阻害活性を示すことが多いが、今回の試験では100ppmでも植物生長阻害活性は認められなかった。

トマト・キュウリ幼苗試験

以前、コンポストから分離した菌類の土壌接種試験でトマト、キュウリを供試植物として用いたことから、これらの植物に対しても植物生長阻害試験を行った (Table. 2)。

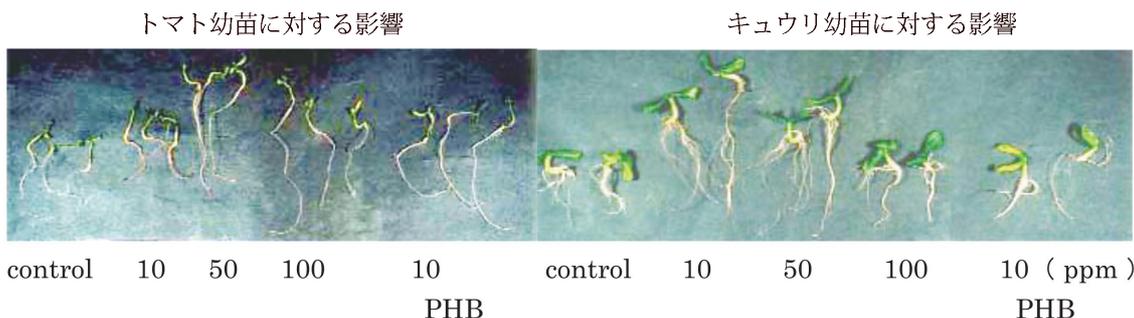


Table.2 Effect of xanthomegnin on the growth of plants seedlings

	Xanthomegnin			p-Hydroxybenzoate
	10	50	100	10 (ppm)
tomato				
cotyledon weight	104.9	105.1	102.5	108.2
weight	110.2	120.1	118.6	128.1
normal growth	93.3	100.0	93.3	73.3
cucumber				100.0
cotyledon weight	114.5	97.1	91.0	84.5
weight	103.8	116.8	126.1	91.9
normal growth	60.0	93.3	60.0	50.0

tomato : n = 15 cucumber : n = 10 (% of control)

normal growth of control tomato : 50% cucumber : 20%

トマトにおいて、地上部重量はコントロールと顕著な差は見られないが、根の生育に対し抗菌物質が有利に作用している可能性が考えられる。

固体サイズの大きいキュウリにおいてもトマトと同様に、根の生育に対し有利に作用していると思われる。トマトではコントロール中で腐敗せずに生育した個体数は50%であり、キュウリにおいては20%であった。抗菌物質を処理した区では腐敗をおこさずに生育した個体数がコントロール処理区より多かったことからXanthomegninに腐敗防止効果があることが考えられる。

2-2 殺線虫活性試験

Xanthomegninに殺虫活性があるという報告⁴⁾があることからXanthomegninの殺線虫活性試験を行った (Table. 3)。

フィリピンでの調査時に、鶏糞処理ジャガイモ栽培の試験圃場では線虫による被害が見られるが、コンポスト処理試験圃場では線虫被害が見られなかった。今回の試験において、100ppmで致死率70.1%という高い殺線虫活性が認められたことよりXanthomegninがこの事例のような線虫に対する防除効果を持つという可能性が示唆された。

Table.3 Effect of Xanthomegnin on Nematicidal Activity (%)

	Concentration (ppm)		
	10	50	100
Xanthomegnin	16.2	44.1	70.1

(48h after treatment)

考 察

静置培養によって得られた培養液および菌体抽出物において抗菌活性を示す画分は、酢酸エチル可溶画分であった。この画分は培養液および菌体の両方から抽出され、TLCによって同一の成分と確認した。さらに活性成分は菌体より効率良く酢酸エチルによって抽出されることから、菌体からの酢酸エチル抽出物を用いてシリカゲルクロマトグラフィーによる活性化化合物の分画を行った。単離された活性成分は赤色結晶物質であり、抗菌活性を示さない濃青色固形物と共に酢酸エチル抽出画分に存在していた。赤色結晶物はTLC上で黄色、溶液中で黄から橙色を示し、濃青色固形物はTLC上で赤色、溶液中でも赤から濃青色を示すことから、菌床が赤色を呈しているのはこの二つの化合物によるものと考えられる。また、*Penicillium. sp*繁殖活動初期に見られる培地の黄変は赤色化合物の溶液の色と似ているように思える。

抗菌活性の認められた赤色結晶物は260~270℃付近で黒変した。これを各種機器分析によって構造解析したところ、¹³C-NMRや¹H-NMRのデータからはナフトキノン2重体の片側分のスペクトルしか得られないが、¹H-NMRの13.20 ppmの水酸基のシグナルがダブルピークになることにより二量体であるとうかがえられ、既知化合物のナフトキノン誘導体Xanthomegninであると推察した。また、文献記載のIRやUVなどの機器分析データとも比較したところ非常に良く一致したため、この化合物であると同定した。抗菌活性の認められない濃青色固形物は研究室保有の重水素化溶媒のいずれにも十分に溶解せず、ごく弱い¹H-NMRスペクトルデータが得られたのみで化合物の同定には

至らなかったが、結晶性が高く水や有機溶媒にも溶解しにくいことから、自然界の生態系でも固体で存在し活性は示さないと推察でき、活性体であるXanthomegninが役割を終えた後、形を変え不活性化したものではないかと考えられる。

Xanthomegninの生物活性は、抗菌活性はもとより殺虫活性、ミトコンドリアに対する脱共役作用、遺伝子複製実験において陽性であるが正常細胞に対しては影響を与えず抗腫瘍活性を持つということが知られている。キノン系の化合物は生物活性を有することが多いこともありXanthomegninの植物に対する生長試験を行ったが、レタス、キュウリ、トマトのいずれにおいても阻害活性は認められず、特に根の部分の生育に対して有利に作用しているように思えた。比較として用いた抗菌物質p-Hydroxybenzoateにおいても同様の結果を示すことから、抗菌物質が植物の根の部分で土壌病原菌や根部の腐敗を防除し、植物に対してよい影響を与えていると考えられる。同様な知見は蛍光性シュードモナスでも認められている⁵⁾。以前、コンポストから分離した菌類の土壌接種試験においても同様にトマト、キュウリの主根長がコントロールと比較して伸長し、植物の生育が良好であったことよりXanthomegninの土壌接種試験でも同様の効果が期待される。さらに、殺線虫試験においては100 ppmの処理濃度で高い殺線虫活性が認められており、コンポスト施用土壌における線虫防除効果との関連性が示唆された。

土壌病害は植物の根から感染することから拮抗微生物を利用し、病原菌の密度を低下させ病原菌の活動を抑制して発病を軽減させようという生物的防除剤の開発が期待されている。

現時点でも生物的防除剤としてワタ稲立枯病に有効な*P. fluorescens*のピート製剤があり、糸状菌である*Tarlaromyces*や*Gliocladium virens*もアルギン酸塩と粘土鉱物の混合物でカプセル化して良好な結果が得られている。しかし、製剤・施用等の作業期間に生物活性が低下するなど、施用後根圏で速やかに定着して効果を発揮しなければならないなどの問題点があり実用化された例は極めて

少ないのが現状である。今後のさらなる実用化のために微生物の機能が発揮される土壌の物理学的要因についても明らかにすること、また、製剤化した微生物の効果的な施用法の開発が必要であると考えられる。

引用文献

- 1) Yasuko Kimura, Satoshi Nakahara, and Shozo Fujioka: Aspyrone, a Nematicidal Compound Isolated from the Fungus, *Aspergillus melleus*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(8), 1375–1376, 1996
- 2) Axel Zeek, Peter Ruß, Hartmut Laatsch, Wolfgang Loeffler, Herbert Wehrle, Hans Zähner und Hartwig Holst : Isolierung des Antibioticums, semi-Vioxanthin aus *Penicillium citreo-viride* und Synthese des Xanthomegnins *Chem. Ber.* 112, 957–978, 1979
- 3) Thomas J. Simpson, ¹³C Nuclear magnetic resonance spectra and biosynthetic studies of Xanthomegnin and related pigments from *Aspergillus sulphureus* and *melleus*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 592–595, 1977
- 4) Kayser, O., Kiderlen, A. F., Laatsch, H., Croft, S. L., 2000. In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. *Acta Tropica.* 77, 307–314.
- 5) Nakata K, Harada N, Sumitomo K, Yoneda K: Enhancement of plant stem growth by flocculation of the antibiotic-producing bacterium, *Pseudomonas fluorescens* S272, on the roots. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64(3), 459–465, 2000