

博士學位論文

糶殻燻炭により増殖が促進される微生物の研究

近畿大学大学院
生物理工学研究科生物工学専攻

江 邊 正 平

博士學位論文

籾殻燻炭により増殖が促進される微生物の研究

平成 31 年 1 月 24 日

近畿大学大学院
生物理工学研究科生物工学専攻

江 邊 正 平

目次

| | |
|---------------------------------------|----|
| 第1章 緒論..... | 1 |
| 第2章 燻炭により増殖が促進される微生物の探索 | 6 |
| 2-1 序論..... | 6 |
| 2-2 材料および方法..... | 8 |
| 実験に使用した炭材料 | 8 |
| 炭材料存在下で増殖が促進される微生物の探索 | 9 |
| 単離株の抗真菌活性の評価 | 10 |
| 単離株の液体培養における炭材料の添加効果..... | 10 |
| 単離株が生産する抗真菌活性物質の同定 | 11 |
| 抗真菌活性物質の定量 | 13 |
| 2-3 結果..... | 14 |
| 炭材料の存在下において増殖が促進される微生物の単離 | 14 |
| IA 株の液体培養における炭材料の添加効果..... | 16 |
| IA 株の代謝促進における燻炭の産地および籾殻灰の影響 | 18 |
| IA 株が生産する抗真菌活性物質の同定 | 19 |
| 燻炭添加量が iturin A 生産に与える影響..... | 23 |
| 2-4 考察..... | 24 |
| 2-5 結論..... | 28 |
| 第3章 燻炭が微生物の代謝促進において果たす役割の解明..... | 29 |
| 3-1 序論..... | 29 |
| 3-2 材料および方法..... | 31 |
| 実験に用いた微生物と培養条件..... | 31 |
| 実験に用いた材料と改変 TSB 培地の作製 | 31 |
| 培養濾過上清を用いた抗真菌活性試験..... | 33 |
| リポペプチド系抗生物質 iturin A の定量..... | 34 |
| 統計解析 | 34 |
| 3-3 結果..... | 35 |
| 燻炭が IA 株の増殖と胞子化、抗生物質生産に与える影響 | 35 |
| 燻炭から溶出するイオンによる IA 株の代謝促進効果の検証..... | 36 |
| IA 株の代謝促進におけるマンガンイオンの効果..... | 38 |
| 燻炭に含まれる代謝促進物質の再検討..... | 39 |
| 鱗片状シリカによる IA 株の代謝促進効果..... | 39 |
| 鱗片状シリカとマンガンの組み合わせが IA 株の代謝に与える影響..... | 41 |
| 3-4 考察..... | 44 |
| 3-5 結論..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 第4章 燻炭を用いた微生物資材開発のための知見の集積 | 47 |
| 4-1 序論..... | 47 |
| 4-2 材料および方法..... | 50 |
| 実験に用いた微生物と稲作由来の廃棄物..... | 50 |
| フィターゼおよびシデロフォア生産能の評価..... | 50 |
| IA株を用いた植物病原菌の感染防除試験..... | 51 |
| 米糠を用いたIA株の培養..... | 52 |
| 燻炭米糠培地を用いたIA株の固体培養..... | 53 |
| 4-3 結果および考察..... | 54 |
| IA株によるフィターゼおよびシデロフォア生産能..... | 54 |
| IA株によるキュウリの苗立枯病の感染防除試験..... | 55 |
| IA株の培養における米糠の利用可能性..... | 57 |
| IA株の燻炭米糠培地での培養..... | 59 |
| 燻炭米糠培地を用いたIA株の培養のスケールアップ..... | 61 |
| 4-4 結論..... | 63 |
| 第5章 総括 | 64 |
| 参考文献 | 68 |
| 原著論文 | 77 |
| 謝辞 | |

第1章 緒論

国連（United Nations 2017）の報告では、2050年の世界人口が2017年の人口76億人から98億人にまで増加すると予想している。約1.3倍もの人口増加により食料需要が増加し、今まで以上の食料生産が求められる時代が目前に迫っている。食料の中でも農作物は人間が食料とする食用作物だけでなく家畜のための飼料作物としても必要であり、農作物の生産性の拡大が世界共通の課題になることが予想される。農作物増産のためには耕地面積を拡大するか、単位面積当たりの生産量を向上させる必要がある。しかしながら図1に示すように、2006年から2050年にかけて耕地面積はほとんど増加しないと予想されている。

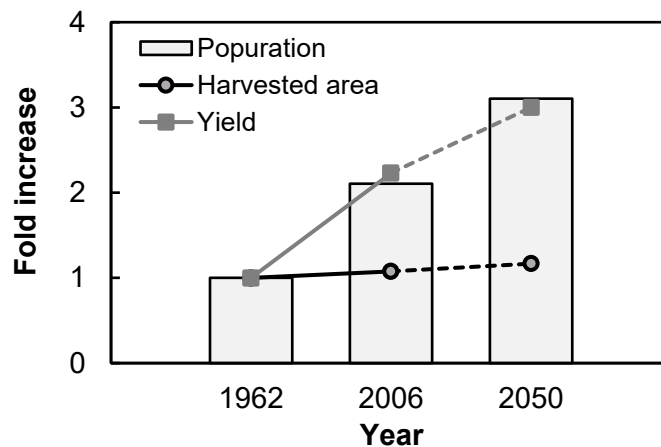


図1 1962 - 2006 - 2050年の世界人口、穀物の耕地面積と収穫量の比較。

1962年のデータを1とした時の倍率を示す。データは“The 2017 revision of world population prospects”と“World agriculture towards 2030/2050 (2012)”を参考にした。

一方、1962年から2006年にかけて耕地面積が増加していないにもかかわらず、穀物収量は約2倍に増加しており、科学技術の発展による農業生産性の向上が認められる。1962

年から 2006 年にかけて単位面積当たりの作物収穫量が増加した背景には肥料や化学農薬といった農業技術が一般に普及したことが大きな要因を占めると考えられる。西尾は 1960 年代の日本では農業廃棄物や畜産排泄物といった未利用有機資源を循環利用した農業を営んでいたが、1970 年以降では有機物資材の使用量が激減し、窒素およびリン肥料の使用量が著しく増加したと報告している（西尾 2002）。また日本国内における農薬の生産量は 1958 年から 1970 年にかけて、使用量は 1986 年まで年々増加した（高野ら 1986）。このように肥料や化学農薬の登場と普及が 1962 年から 2006 年にかけての作物生産性の向上をもたらしたと考えられる。しかしながら肥料の安定的な供給は適正量を超過した過剰量の使用を引き起こし、それは様々な環境問題へと発展していった。過剰な窒素肥料の施肥による収穫物中の高い硝酸濃度は食品や飼料の安全性を脅かし、窒素肥料やリン肥料の過剰な施肥は地下水や河川への流亡による富栄養化を起こした（西尾 2002）。また化学農薬の使用は散布を行う者の健康や食品残留による消費者の健康、また野生動物への影響が問題となった（嘉田 1993, 西尾 2002）。これらの問題は法整備による使用量や生産量の規制、生産そのものの禁止、低毒性農薬の開発などの対策により現在は大きな問題に発展することは少なくなった。しかしながら持続可能的に農業を続けていくためには環境負荷を低減した栽培技術の確立が必要であり、近年では世界的にも農薬や化学肥料の使用を控え自然生態系本来の力を利用する環境保全型農業が推進されている。

農林水産省（2018）は環境保全型農業を「農業の持つ物質循環機能を生かし、生産性との調和などに留意しつつ、土づくり等を通じて化学肥料、農薬の使用等による環境負

荷の軽減に配慮した持続的な農業」と位置付けている。農業の持つ物質循環機能とは、農業において生じる作物の非可食部や家畜排泄物等を堆肥化して農地に還元できること、そしてその施肥が土壌の物理性の改善や植物が必要とする養分、土壌中の微生物の多様化をもたらすことで作物生産に貢献すること、またそのサイクルを繰り返すことが可能なことを指している。このように環境保全型農業は微生物の働きを利用した土づくりを行うことで肥料や農薬の使用を低減することを目的とした農業である。持続可能な農業生産を行う上で環境保全型農業のような廃棄物の循環利用と微生物を利用した作物栽培技術に世界が関心を向けている。

土壌 1 g には 10^7 colony-forming units (cfu) もの微生物が存在しており (Egamberdieva et al. 2007, Berendsen et al. 2012)、それらの微生物は土壌の生物化学プロセスや栄養循環において重要な役割を担っている (Egamberdieva et al. 2018)。つまり土壌微生物の働きが窒素やリン、カリウムをはじめとした植物生長に必須な栄養分を土壌中に供給している。例えば *Azospirillum* 属や *Burkholderia* 属、*Stenotrophomonas* 属等の土壌細菌類には大気中の分子状窒素の還元を行いアンモニアに変換する窒素固定能を有しているものが存在する (Dobbelaere et al. 2003)。また根粒菌はマメ科植物の根に形成した根粒の中で窒素固定を行うことで直接的にアンモニアを植物に供給し、見返りとして植物から光合成産物を獲得するという植物と共生関係を築く細菌である (Berg 2009)。*Burkholderia* 属等の細菌では土壌中において難溶化したフィチン酸などの有機態リンからリン酸を遊離させることで植物への取り込みを促すことが知られている (Unno et al. 2005)。また菌根菌のように植物の根に形成した菌根を

介してリン等の様々な養分元素の吸収を助ける真菌も知られている (Orłowska et al. 2012)。さらにケイ酸塩鉱物からカリウムやケイ酸などを溶解する *Bacillus* 属細菌も存在する (Sheng et al. 2008)。それだけでなく一部の土壌微生物はエチレンやインドール-3-酢酸、サイトカイニン、ジベレリン等の植物ホルモン様物質の生産、もしくは生産阻害を通して植物体内のホルモンバランスを調節することで植物生長の促進を行っている (Glick 2005, Pierik et al. 2006, Berg 2009)。一方、土壌には植物に感染し生長を阻害するだけでなく枯死に至らせる植物病原性微生物も存在しているが、これらの病原性微生物の増殖抑制や拮抗作用を示すことにより植物生長を助ける有用微生物も存在している (Doornbos et al. 2012, Berendsen et al. 2012)。このように直接的もしくは間接的に植物生長促進を行う土壌中の有用微生物を利用することで肥料や農薬の使用量を低減した農業を実現することが期待されている。そこで本研究では微生物による植物生長促進効果を十分に引き出すため、さらに農業廃棄物の有効利用という観点から日本で古くから土壌改良材として利用されてきた燻炭に着目した。

燻炭とはイネの籾殻を比較的低温、低酸素条件下で焼成することで作られる土壌改良材である。土壌への燻炭の施用は微量元素の供給源や土壌 pH の調整剤となること、また土壌の物理性の改善を行うことで植物生長を促進することが知られている (Jien et al. 2015, Smebye et al. 2016, Abrishamkesh et al. 2016)。しかしながら上述のように土壌中には植物生長促進に関わる微生物が存在している。そのため燻炭による作物の生長促進の要因の一つには、土壌中の有用微生物の活性化が含まれているのではないかと考えた。そこで本研究では燻炭と微生物の関わりを明らかにするとともに、その関係を利用

用した微生物資材の開発を目的とした。農業廃棄物から作られる燻炭を用いた微生物資材を作製することで環境保全型農業に貢献する技術となり、さらに持続可能な社会を目指す上で重要であると考えた。

本論文はこの第1章を始めとして、第2章から第4章では「燻炭により増殖が促進される微生物の探索」、「燻炭が微生物の代謝促進において果たす役割の解明」、「燻炭を用いた微生物資材開発のための知見の集積」といった研究について報告し、第5章を本論文の総括とした。

第2章 燻炭により増殖が促進される微生物の探索

2-1 序論

イネは世界中で生産される穀物であり、国際連合食料農業機関によると 2017 年におけるコメ生産量は籾米ベースで約 7.6 億トンであると予想されている (FAO 2017)。そして籾米には約 2 割もの籾殻が含まれるため (Bansal et al. 2006, Wang et al. 2012)、世界では 1 年間に約 1.5 億トンもの籾殻が排出されていることになる。稲作において大量に発生する籾殻は避けることが出来ない農業廃棄物であり、有効な利用方法を探索することは持続可能な社会を実現するためには重要である。

稲作が盛んな日本においては古くから農業廃棄物である籾殻を有効に利用するため燻炭を作製してきた。燻炭はイネの籾殻を炭としては比較的低温、低酸素条件下で焼成することで作られ、農業生産を向上させるための土壌改良材として利用されてきた。燻炭の土壌への施用は作物の生長を促し農業生産を向上させることが知られている (Jien et al. 2015, Smebye et al. 2016, Abrishamkesh et al. 2016)。また燻炭の他にも農業残渣や木材、芝といった未利用バイオマスから作られる炭 (以下、バイオ炭とする) が作物の生産性向上を目的として使用されている (Ishii and Kadoya 1994, Yamato et al. 2006, Warnock et al. 2007, Ogawa and Okimori 2010, Graber et al. 2010)。これらバイオ炭の施用による植物生長促進効果は土壌構造の改善や土壌栄養の保持だと考えられてきたが、近年ではそれら物理的・化学的な土壌改善作用に加えて土壌微生物叢の変化や微生物活性を向上させるといった生物学的側面からの新たなバイオ炭の効果が報告されている (Warnock et al. 2007, Van Zwieten et al. 2010, Graber et al. 2010, Lehmann

et al. 2011)。例えば Ishii と Kadoya はバイオ炭の土壌への施用がリンや窒素などの栄養の取り込みを助ける菌根菌の感染率を向上させることを明らかにした(1994)。Graberらはバイオ炭により植物根圏に生息する酵母や *Trichoderma* 属の真菌数が増加したことを報告している(2010)。その他にもバイオ炭が作物栽培の初期における土壌中のアンモニア酸化微生物の増殖とアンモニア酸化活性を促進したという報告もある (Van Zwieten et al. 2010)。これらの結果はバイオ炭が微生物の代謝を活性化することを示唆しており、微生物の代謝促進剤としてのバイオ炭の効果をうかがわせるものである。しかしながら上述の研究のような植物-土壌-微生物という三者が複雑に影響し合う実験系では直接的なバイオ炭による微生物の代謝促進効果を評価することが難しい。

そこで本研究ではバイオ炭による微生物の直接的な代謝促進効果を評価するため *in vitro* の実験系において燻炭により代謝が促進される微生物の探索を試みた。そしてその微生物による作物生産における有用性を明らかにし、燻炭と微生物を組み合わせ有効利用するための方法を考察した。

2-2 材料および方法

実験に使用した炭材料

本研究では農業廃棄物である籾殻から作製される燻炭（RHB：rice husk biochar）の他に、試薬として購入可能であるため安定した品質を示す炭材料として活性炭素（AC：activated charcoal）を用いた。活性炭素は関東化学株式会社から購入した活性炭素粉末（Cat. No. 01085-02）を使用した。燻炭は秋田県大館市で栽培されたイネの籾殻を原料として秋田県内で野焼き法により作製し（図 2）、乳棒と乳鉢を用いて粉末にしたものを使用した。

また産地の異なる燻炭として、三重県松阪市と和歌山県和歌山市で栽培されたイネの籾殻から作製したものを用いた。また籾殻を完全に燃焼させることにより作製した籾殻灰として、株式会社バイオシリカ研究所から提供を受けたバイオシリカを使用した。この籾殻灰は三重県松阪市で栽培されたイネの籾殻から作製されたものである。



図 2 実験に使用した燻炭（秋田県産）。スケールバーは 1 cm を示す。

炭材料存在下で増殖が促進される微生物の探索

畑から回収した土壌 0.1 g に滅菌蒸留水 1 mL を加え懸濁した後、希釈系列を作製し 1/10 tryptic soy agar (1/10 TSA: Bacto peptone, 2 g/L; glucose, 0.25 g/L; K₂HPO₄, 0.25 g/L; NaCl, 0.5 g/L; and agar, 1.5% (w/v)) に 100 μL 塗布して培養することにより微生物にコロニーを形成させた。次いで各々のコロニーを新しい 1/10 TSA に画線し培養することで微生物の単離を行った。

単離した微生物の増殖が炭材料により促進されるか評価するため、標準的な炭材料として活性炭素 5 g/L を添加した 1/10 TSA (1/10 TSA+AC) を作製した。寒天培地に生育している単離微生物のコロニーを釣菌し Luria-Bertani (LB) 培地に植菌、30°C、200 rpm で終夜培養を行い、1/10 TSA と 1/10 TSA+AC の中心にそれぞれ 10 μL 植菌し、30°C培養器内で培養を行った。培養後、1/10 TSA と 1/10 TSA+AC 上における単離微生物の増殖面積を測定し、比較することで活性炭素により増殖が促進される微生物の選抜を行った。増殖面積の測定は Microsoft Excel のマクロ機能を利用したソフト (10_0! Excel シリーズ 長さ・面積測定 Free、登録名: lenaraf220b.xls) を用いて、撮影した寒天培地の写真から行った。続いて選抜した微生物における燻炭による増殖促進効果を評価するため、燻炭 5 g/L を添加した 1/10 TSA+RHB 培地を作製し 1/10 TSA+AC と同様の方法で試験した。

燻炭により増殖が促進される微生物の同定は、形態観察および 16S rRNA をコードする DNA 遺伝子配列に基づいて行った。16S rRNA 領域遺伝子の PCR には 9F と 1510R のプライマーを用い、配列の決定は ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer System

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。得られた 16S rRNA 遺伝子配列による微生物株の同定は、BLAST 相同性検索を用いた APORON DB-BA12.0 (株式会社テクノスルガ・ラボ、静岡県) および国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA(EMBL)/GenBank) との比較により行った。単離株の系統発生位置を明確にするために隣接接合法 (Saitou and Nei 1987) により分子系統樹を作成した。DNA 遺伝子配列の決定、および系統解析は株式会社テクノスルガ・ラボ (静岡県) に委託した。

単離株の抗真菌活性能の評価

単離した微生物の抗真菌活性能を評価するため、土壌伝播性の植物病原菌である *Rhizoctonia solani* K1 (Phae et al. 1992, Asaka and Shoda 1996) を被験菌として使用した。*R. solani* K1 は potato dextrose agar (PDA) にて継代培養を行い、実験には 3 日から 7 日培養した菌体を用いた。抗真菌活性試験は 1/10 TSA を分注したプレート (直径 9 cm) 上で行い、単離株を 1/10 TSA の端から 2 cm のところに植菌、反対側の 2 cm のところには PDA で生育する *R. solani* K1 をステンレスカップ (直径 6 mm) で切り抜いたアガーピースを植菌した。プレートを 24°C で培養し、経時的に *R. solani* K1 の増殖面積を観察することにより抗真菌活性能の評価を行った。

単離株の液体培養における炭材料の添加効果

単離株の液体培養における炭材料の影響を評価するため、5 g/L の活性炭素 (AC) もしくは燻炭 (RHB) を添加した TSB を作製し、それぞれを活性炭素培地 (TSB+AC)、

燻炭培地 (TSB+RHB) とした。単離株を 2 mL の LB 培地が入った試験管に植菌し、30°C、200 rpm で終夜培養を行った。この前培養液を 20 mL の TSB+AC もしくは TSB+RHB が入った 100 mL 容のフラスコに 1% (200 μ L) 植菌し、30°C、120 rpm で 5 日間の振盪培養を行った。培養後に単離株の全菌数と孢子数の測定を行い、各培地での菌数を比較することにより炭材料の添加効果を評価した。全菌数は希釈平板法により colony-forming units (CFU) を求め算出した。孢子数は培養液を 80°C、30 分間の熱処理を加えた後に希釈平板法を行うことで算出した。

単離株の培養液に抗真菌活性物質が含まれるか評価するため、9,000 $\times g$ で 10 分間の遠心分離を行った後、上澄みをメンブレンフィルター-DISMIC-25cs (孔径 0.20 μ m、アドバンテック東洋株式会社) により濾過した。この菌体を取り除いた培養濾過上清を用いて *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験を行った。PDA の端から 2 cm のところに直径 6 mm のステンレスカップを設置し、その中に培養濾過上清を 200 μ L 添加した。PDA の反対側の 2 cm のところにステンレスカップで切り抜いた *R. solani* K1 を植菌した。プレートを 24°C で培養し、経時的に *R. solani* K1 の増殖面積を観察することにより培養濾過上清の抗真菌活性能を評価した。

単離株が生産する抗真菌活性物質の同定

単離株が生産する抗真菌活性物質を同定するため、培養液 100 mL を 12,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離した後、上澄み液を 12 N の塩酸を用いて pH 2 に調整し 4°C で 2 時間静置した。再び 18,000 $\times g$ で 30 分間遠心分離することにより得た酸沈殿物にメタノール 2

mL を加えることにより抗菌活性物質の粗抽出を行った。メタノール抽出液は減圧下で乾固した後、乾固物に含まれる非活性物質を除去するため、酢酸エチルとアセトンを用いて洗浄を行った (Kodoth et al. 2015)。

続いてメタノールに再溶解した粗抽出物を TLC 分析 (thin-layer chromatography) に供した。シリカゲルプレート 60 F254 (Merck KGaA) に吸着させた粗抽出物を chloroform-methanol-water が 65:25:4 (v/v/v) の割合で混合された溶媒を用いて展開した (Yu et al. 2002, Malfanova et al. 2011)。プレートの乾燥後、物質の存在は紫外線 (UV₂₅₄) 照射下での確認と、ニンヒドリン溶液を噴霧・加熱することによる可視化で確認した。抗菌活性物質の R_f 値を調べるため、他の展開したプレートを用いて *R. solani* K1 に対する TLC バイオオートグラフィーアッセイを以下の方法で行った。0.2 mg の粗抽出物を展開し乾燥させた TLC プレートを PDA 上に置き、プレートから 2.8 cm 離れた位置に *R. solani* K1 を植菌、24°C で培養し、*R. solani* K1 の増殖が抑制されるスポットの R_f 値を調べた。そして抗真菌活性物質を回収するため、別に展開したプレートを用意して TLC バイオオートグラフィーアッセイにおいて *R. solani* K1 の抑制が認められたスポットの R_f 値と同じ場所を切り抜き、エタノールを用いて抽出した。抗菌活性物質を含むエタノール抽出物は減圧下で乾固した後、以後の分析に使用するためメタノールに溶解させた。

抗菌活性物質の同定は HPLC (high performance liquid chromatography) と ESI-TOF MS (electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry) を用いて行った。HPLC のシステムは Jasco LC-2000 (日本分光株式会社) を使用し、カラムは Chromolith

Performance RP-18e column (4.6 mm × 100 mm, Merck KGaA) を用いた。溶出溶媒はアセトニトリルと超純水を 35:65 (v/v) の割合で混合した溶媒を定組成で使用し、流速 2 mL/min でサンプルを溶出、検出は 205 nm で行った。ESI-TOF MS 分析はポジティブイオンモードの Triple TOF 5600+ system (AB Sciex) で行った。HPLC 分取により精製したサンプルはシリンジポンプを用いて直接 TOF MS に供し、500 から 1200 *m/z* の範囲で検出を行った。

抗真菌活性物質の定量

抗菌活性物質 (iturin A) の定量は HPLC を用いて行った。単離株の培養液を等量の 35% (v/v) アセトニトリルと混合、10 分間攪拌した後、9,000 × *g* で 10 分間遠心分離した。得られた上澄みをメンブレンフィルター-DISMIC-13jp (孔径 0.20 μm、アドバンテック東洋株式会社) にて濾過し、20 μL の濾液を分析サンプルとして HPLC 分析に供した。HPLC のシステムは上記抗真菌活性物質の同定の項と同じものを用いた。アセトニトリルと 0.1%ギ酸水溶液を 35:65 (v/v) の割合で混合した溶媒を定組成で使用した。iturin A 濃度は Sigma-Aldrich 社から購入した標準品 (≥95%) を用いた検量線を作製することにより求めた。

2-3 結果

炭材料の存在下において増殖が促進される微生物の単離

炭材料により増殖が促進される微生物を単離するため、土壌から単離した微生物を 1/10 TSA と活性炭素を添加した 1/10 TSA に植菌し培養を行い、その増殖面積を比較評価した。その結果、活性炭素存在下において増殖面積の拡大を示す微生物 IA 株の選抜に成功した。炭材料による IA 株の増殖促進効果を定量的に評価するため、活性炭素寒天培地（1/10 TSA+AC）と燻炭寒天培地（1/10 TSA+RHB）に植菌して培養を行い増殖面積の測定を行った。

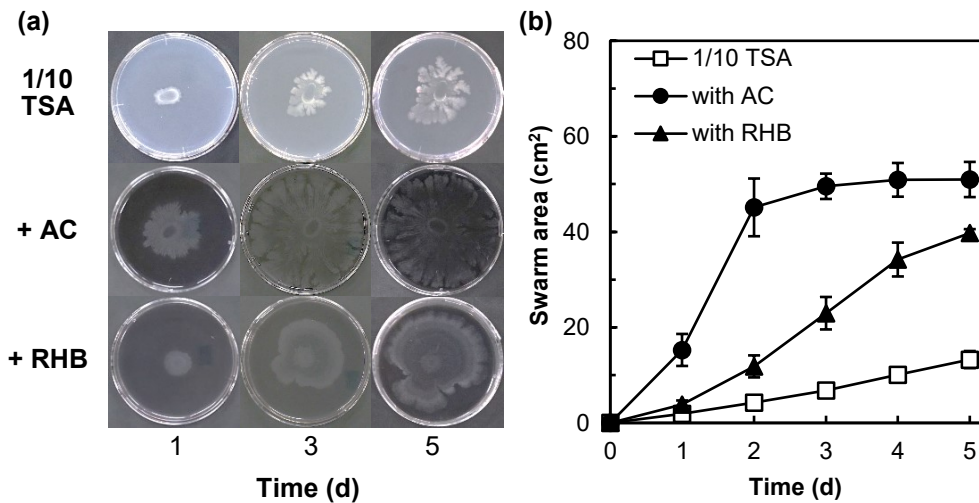


図 3 炭材料添加/非添加寒天培地の寒天培地における IA 株の増殖 (a) と増殖面積 (b) による評価。エラーバーは $n=3$ の標準偏差を表す。

その結果、炭材料非添加の 1/10 TSA では培養 5 日目においても全面まで拡がりきらなかったのに対し、活性炭素 (AC) を添加することで IA 株のコロニーは培養 2 日でブ

レート全面にまで拡大した (図 3)。さらに燻炭 (RHB) の添加も IA 株のコロニー拡大を促進し、5 日目の増殖面積は 1/10 TSA における IA 株の生育面積の 3 倍の値を示した。このことから IA 株を燻炭存在下で増殖が促進される微生物として選抜し、以後の実験に用いた。

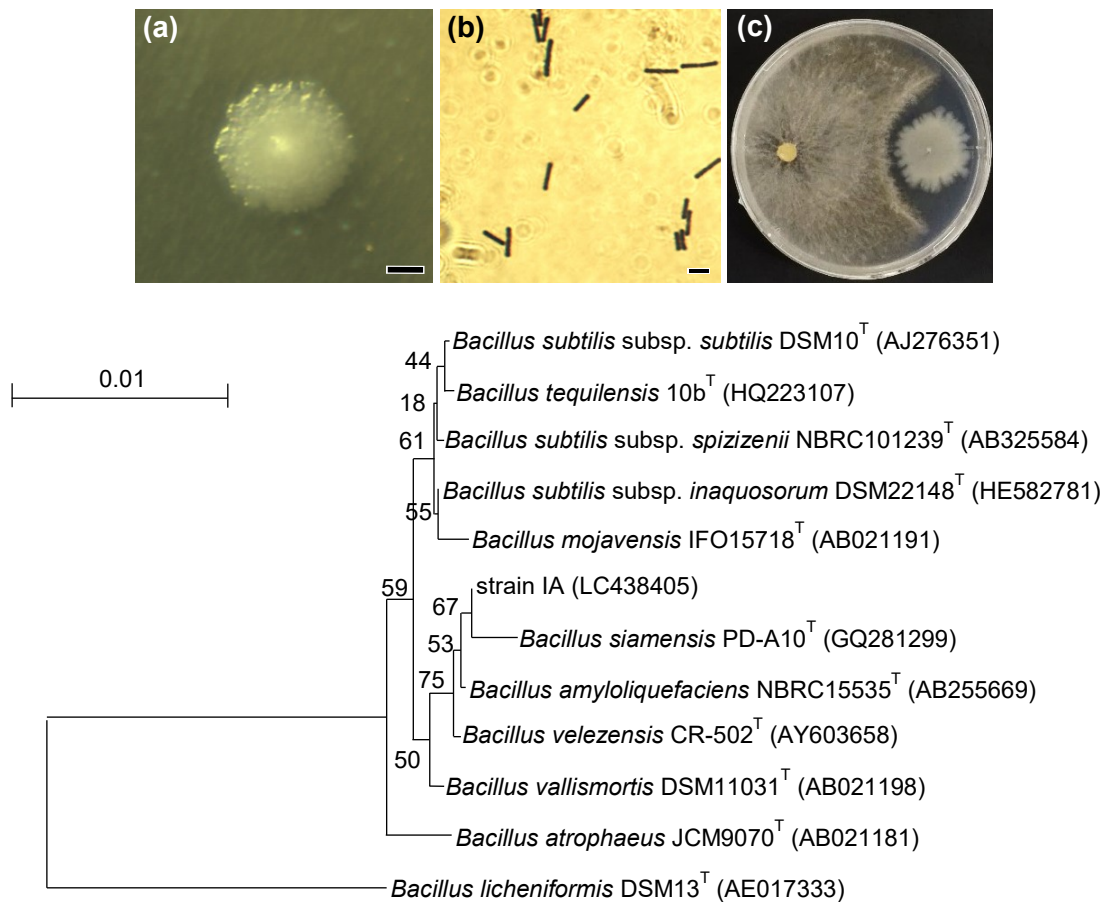


図 4 単離した IA 株の特徴。(a) TSA 上におけるコロニー形成。スケールバーは 1 cm を示す。(b) IA 株のグラム染色。スケールバーは 5 μm を示す。(c) IA 株 (右) による *R. solani* K1 (左) に対する抗真菌活性試験。(d) 近隣結合法により作製された IA 株の 16S rRNA 遺伝子配列と *Bacillus* 属細菌の関係を示す系統樹。分枝上のブートストラップ値は 1,000 回反復のパーセンテージを示す。バーは 1 ヌクレオチドあたり 0.01 置換を示す。

単離に成功した燻炭存在下で増殖が促進される微生物 IA 株の同定を行った。初めに IA 株の形態観察を行ったところ TSA 上では乳白色の乾いたコロニーを形成した (図 4a)。グラム染色を行った結果、IA 株はグラム陽性の桿菌(0.8×3.0 μm)であり (図 4b)、さらに芽胞形成が認められた (data not shown)。IA 株の 16S rRNA 遺伝子配列は *Bacillus siamensis* の基準株 *B. siamensis* PD-A10(GQ281299, Sumpavapol et al. 2010) と 99.4% (1467 bp/1476 bp) の相同性を示した。16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析から、IA 株は *Bacillus* 属が構成するクラスター内に含まれ *B. siamensis* PD-A10 とクラスターを形成する *B. siamensis* に近縁な新規の *Bacillus* 属細菌であると同定した (図 4d)。IA 株の 16S rRNA 遺伝子配列を DDBJ (DNA Data Bank of Japan) のデータベースに登録申請したところ、accession number LC438405 として登録された。

IA 株の液体培養における炭材料の添加効果

上記実験により活性炭素と燻炭を添加した寒天培地では炭材料非添加の培地と比較して IA 株の増殖促進効果が認められた。そこで液体培養における炭材料による IA 株の増殖促進効果を検証した。IA 株を TSB と活性炭素培地 (TSB+AC)、燻炭培地 (TSB+RHB) にて 5 日間培養した後の全菌数と孢子数、pH を測定した。その結果、燻炭培地における IA 株の全菌数は TSB と比較して有意に増加した (約 8 倍)。活性炭素培地では TSB と比較してわずかな全菌数の増加が認められたが (約 2 倍)、有意差は認められなかった (表 1)。IA 株の孢子形成率は TSB、活性炭素培地、燻炭培地においてそれぞれ 0.08%、0.10%、91.1%であった。燻炭は増殖だけでなく孢子化も促進し、燻炭培地における孢子

数は TSB と比較すると 10,000 倍近く増加することが分かった (表 1)。

表 1 液体培養において炭材料が IA 株の増殖に与える影響。

| | Culture medium of strain IA | | | Ratio | |
|---------------------|-----------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------|
| | TSB (A) | with RHB (B) | with AC (C) | B / A | C / A |
| Total cell (CFU/mL) | 6.5×10^6 | 5.4×10^7 * | 1.1×10^7 | 8.3 | 1.8 |
| Spore cell (CFU/mL) | 5.3×10^3 | 4.9×10^7 * | 1.1×10^4 | 9.3×10^3 | 2.2 |
| pH | 7.1 | 8.4 | 7.7 | | |

処理区 (TSB+RHB、TSB+AC) と対象区 (TSB) の比較は Dunnett 検定を用いて行った。有意水準は両側検定で 5 % とし、アスタリスクは有意差を示す ($p < 0.05$)。数値は $n = 3$ の平均値を表す。

Bacillus 属細菌の中には surfactin グループや iturin グループ、fengycin グループと
 いったりポペプチド系の抗真菌活性物質を生産する株が存在する (Romero et al. 2007,
 Mizumoto et al. 2007, Ongena and Jacques 2008, Chen et al. 2008, Arrebola et al.
 2010)。そこで単離した IA 株が抗真菌活性能を有しているか調べるため、IA 株と植物
 病原菌 *R. solani* K1 の対峙試験を行った。その結果、IA 株は *R. solani* K1 の増殖を抑
 制することが分かり (図 4c)、IA 株が抗真菌活性能を有する抗生物質を生産しているこ
 とが示唆された。

そこで TSB と活性炭素培地 (TSB+AC)、燻炭培地 (TSB+RHB) での液体培養後の
 培養濾過上清を用いて *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験を行った。その結果、TSB
 と活性炭素培地の培養濾過上清では滅菌蒸留水と同じく *R. solani* K1 の増殖を抑制しな
 かったが (図 5a-c)、燻炭培地の培養濾過上清を添加したステンレスカップの周りには
R. solani K1 に対する阻止円の形成が認められた (図 5d)。この結果から液体培養では
 燻炭のみが IA 株の増殖と孢子化、抗生物質生産を促進することが分かった。

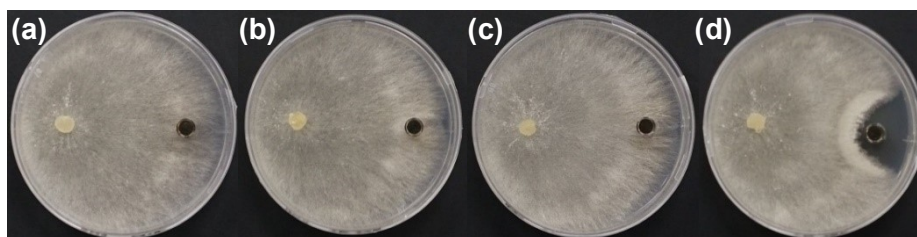


図 5 IA 株の培養濾過上清を用いた *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験。

R. solani K1 (左) と培養濾過上清 200 μ L の入ったステンレスカップ (右)。ステンレスカップには (a) 滅菌蒸留水、(b) – (d) にはそれぞれ TSB、活性炭素培地 (TSB+AC)、燻炭培地 (TSB+RHB) の培養濾過上清を添加した。

IA 株の代謝促進における燻炭の産地および籾殻灰の影響

燻炭が IA 株の増殖と胞子化、抗生物質生産を促進することを見出した。そこで燻炭による代謝促進効果が、これまでに使用してきた秋田県産と異なる産地の燻炭を用いても安定的に得られるかどうかを調べた。和歌山県産の燻炭と三重県産の燻炭を添加した TSB 培地を用いて IA 株の培養を行った結果、生菌数と胞子数はこれまでの試験で用いてきた秋田県産の燻炭と同等の値を示した (図 6a)。さらに培養濾過上清を用いた抗真菌活性試験においても、和歌山県産の燻炭と三重県産の燻炭は秋田県産の燻炭と同様に *R. solani* K1 に対して強い抑制能を示し (図 6b)、産地に関わらず IA 株の増殖と胞子化、抗生物質生産を促進することが明らかとなった。

液体培養の試験において燻炭では IA 株の代謝促進効果が認められたが、活性炭素では認められなかった。この理由を考察するため、籾殻を完全に燃焼させた籾殻灰 (rice husk ash) を用いて IA 株の代謝促進能の評価を試みた。その結果、燻炭と同様に IA 株の増殖と胞子化、抗生物質生産の促進効果が認められた (図 6)。

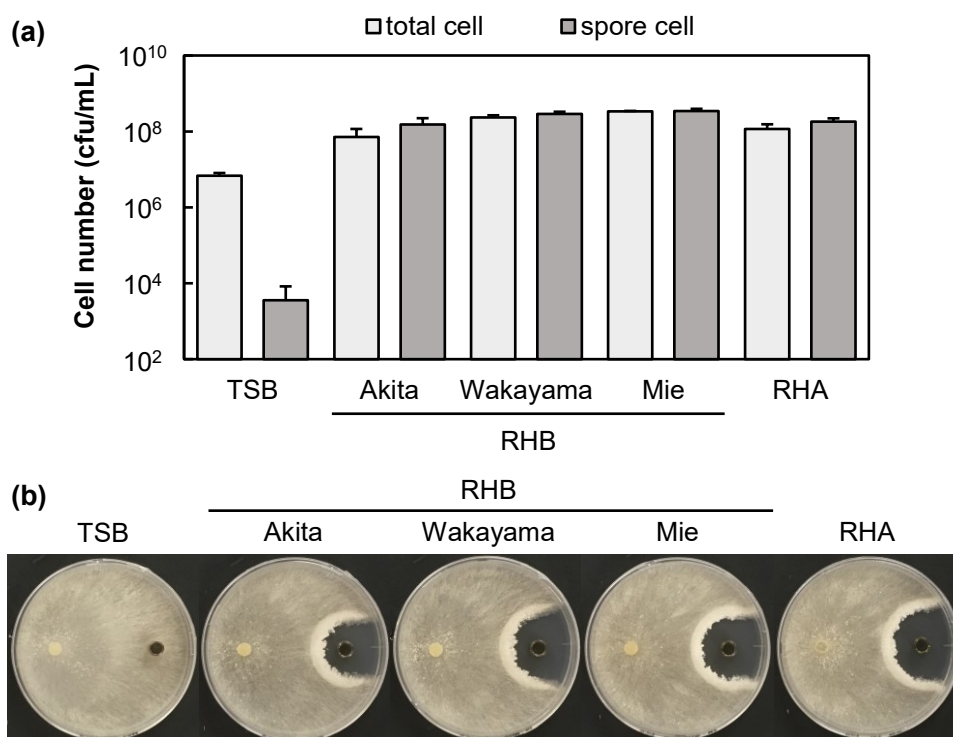


図 6 産地の異なる燻炭（RHB：秋田県産、和歌山県産、三重県産）と籾殻灰（RHA：rice husk ash）を 5 g/L 添加した TSB で 5 日間培養した IA 株の全菌数と孢子数（a）と培養濾過上清を用いた *R. solani* K1 に対する抗真菌活性（b）。エラーバーは $n \geq 3$ の標準偏差を示す。

IA 株が生産する抗真菌活性物質の同定

IA 株が抗生物質を生産しており、その生産が燻炭により促進されることを明らかにした。そこで IA 株が生産する抗真菌活性物質の同定を試みた。初めに IA 株の培養上清から得た粗抽出物を TLC 分析に供した。展開した TLC プレートに UV₂₅₄ 下で観察したところ複数のバンドの存在が認められたため（図 7a）、ニンヒドリン溶液による可視化と、抗真菌活性物質の R_f 値を確認するため *R. solani* K1 を用いたバイオオートグラフィーアッセイを行った。

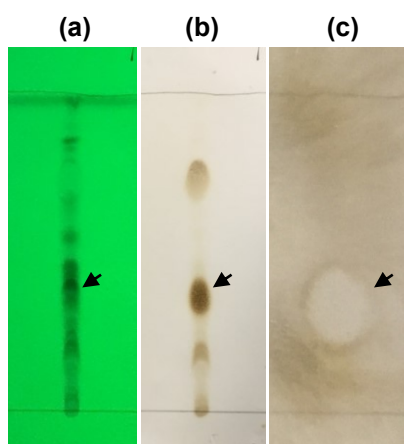


図 7 IA 株が生産する粗抽出物の TLC 分析。展開溶媒 chloroform-methanol-water を 65:25:4 (v/v/v) を用いて展開したプレートにおける UV₂₅₄ 下での観察 (a)、ニンヒドリン反応による可視化 (b)、*R. solani* K1 を用いた TLC バイオオートグラフィーアッセイ (c)

ニンヒドリン反応においては R_f 値 0.19、0.37、0.75 の 3 つのスポットが検出された (図 7b)。粗抽出物 0.2 mg を展開したプレートを用いたバイオオートグラフィーアッセイでは R_f 値 0.37 のスポットが *R. solani* K1 の生育阻害を示した (図 7c)。またその R_f 値 0.37 のスポットはニンヒドリン反応によって最も濃く呈色したスポットと同じであった。Romero ら (2007) は同じ展開溶媒条件下においてリポペプチド系の抗生物質の一つである iturin A の R_f 値が 0.3 であると報告している。そこで Sigma-Aldrich 社から購入した iturin A の標品を TLC プレートで展開し、ニンヒドリン反応による呈色と *R. solani* K1 を用いたバイオオートグラフィーアッセイに供した。その結果、IA 株が生産する抗生物質と同じ R_f 値 0.37 を示し、バイオオートグラフィーアッセイにおいても同様のスポットで *R. solani* K1 に対する抗菌活性が認められた。

IA 株が生産する抗菌活性の詳細な分析を行うため、粗抽出物を展開した TLC プレー

トの R_f 値 0.37 のスポットから抗菌活性物質を回収し HPLC 分析に供した。その結果、図 8b のクロマトグラムに示すように 5 つのピークが認められた。それらピークは iturin A 標品のクロマトグラムにおいても同様に認められた (図 8a)。このことから IA 株が生産する抗真菌活性物質は iturin A であることが強く示唆された。iturin A は 7 個のアミノ酸が β -アミノ酸によって炭素数 14-17 の脂肪鎖と結合しており (図 9)、HPLC 分析においては脂肪鎖の短いものから溶出されるため複数のピークが現れたと考えられた。より詳細に抗菌活性物質を調べるためクロマトグラムの各ピークを分取し、ESI-TOF MS 解析に供した。

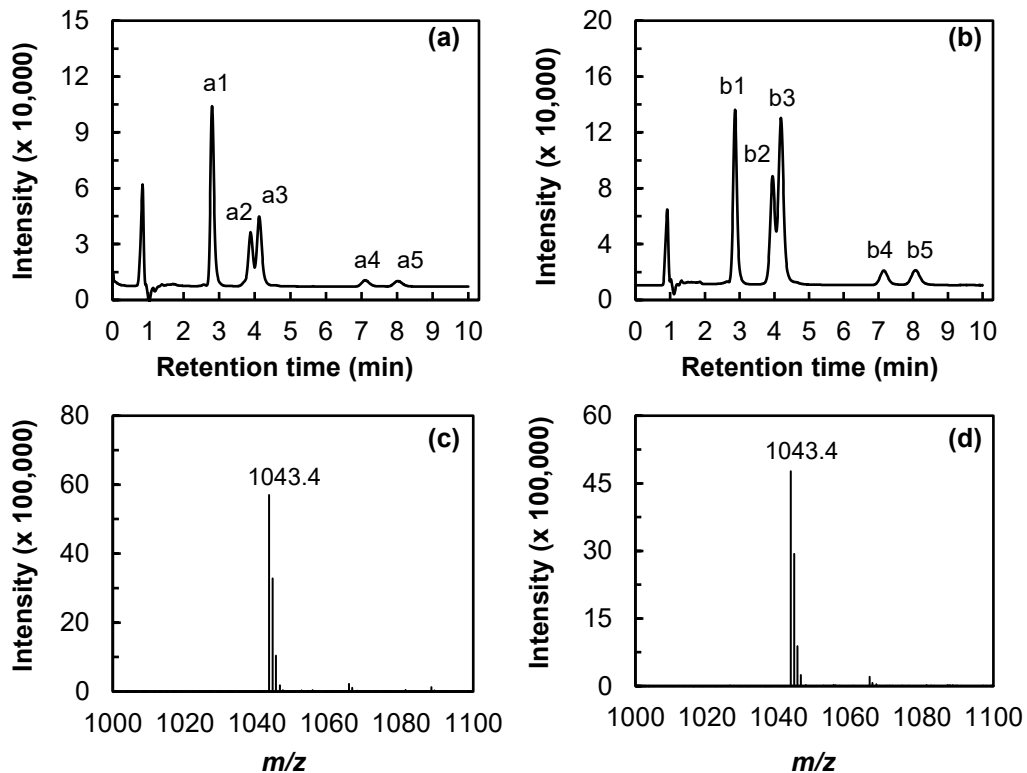


図 8 iturin A 標品 (a) と IA 株が生産する抗菌活性物質 (b) の HPLC 分析。
iturin A 標品のクロマトグラム中ピーク a1 (c) と IA 株抗菌活性物質
のクロマトグラム中のピーク b1 (d) の ESI-TOF MS 解析 (ポジティブ
イオンモード)。

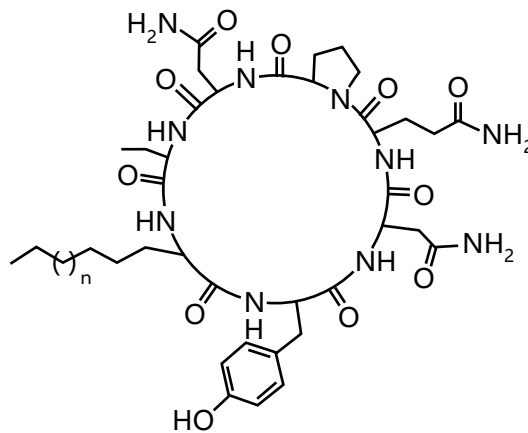


図 9 iturin A の基本構造。脂肪鎖の長さや構造が異なるホモログが存在する。
 iturin A₂ (*n*-C₆)、iturin A₃ (*anteiso*-C₇)、iturin A₄ (*iso*-C₇)、iturin
 A₅ (*n*-C₇)、iturin A₆ (*iso*-C₈)、iturin A₇ (*n*-C₈)

IA 株が生産する抗生物質を ESI-TOF MS 解析した結果、3 種の異なる分子量を有する物質の存在が認められた。図 8b のピーク b1 の[M+H]⁺ ions は m/z 1043.4 (図 8d)、ピーク b2 と b3、そして b4 と b5 の[M+H]⁺ ions はそれぞれ 1057.4 と 1071.4 であった。これらの m/z は iturin A 標品から分取した 5 つのピークの m/z とそれぞれ同等の値を示した。さらに HPLC により分取したピーク a1 と b1 の m/z 1043.4 は iturin A₂ (C₄₈H₇₄N₁₂O₁₄) のモノアイソトピック質量 1042.515 (Yu et al. 2002) に 1 価のプロトンが付加した数値と近似であることから、IA 株が生産する抗生物質のうちピーク b1 を iturin A₂ であると同定した。またピーク b2-5 において認められた分子量が iturin A₂ と 14、もしくは 28 異なる物質を脂肪鎖の長さが異なる iturin A ホモログ (iturin A₃、A₄、A₆、A₇) であると同定した。TLC 分析と HPLC 分析、MS 分析の結果から IA 株が生産する抗生物質を iturin A であると同定した。

燻炭添加量が iturin A 生産に与える影響

IA 株の抗生物質生産が燻炭の添加により促進され、また IA 株が生産する抗生物質が iturin A であると同定した。そこで IA 株の iturin A 生産における燻炭添加量の量的変化を調査した。その結果、燻炭添加量の増加に伴う iturin A 生産量の増加が認められた (図 10)。iturin A 生産量は燻炭添加濃度 30 g/L で頭打ちとなり、その時の生産量 120 mg/L は燻炭を添加しない時 (0 g/L) の約 8 倍の値を示した。IA 株の iturin A 生産は燻炭により促進され、さらに燻炭添加量 30 g/L までは濃度依存的に増加することを明らかにした。

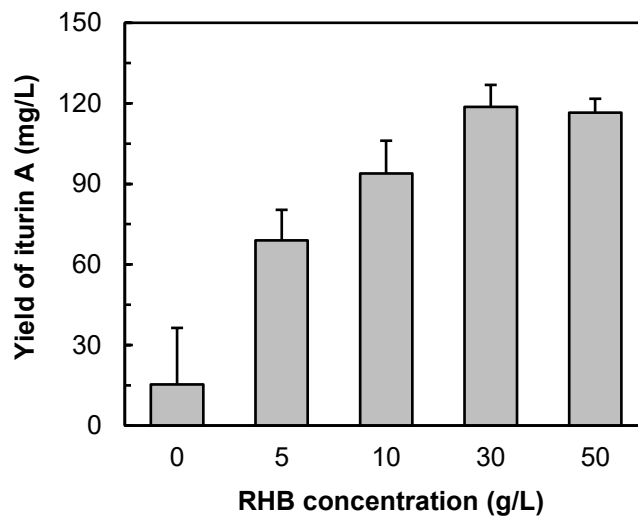


図 10 燻炭添加量の増加が IA 株の iturin A 生産に与える効果。エラーバーは $n=3$ の標準偏差を表す。

2-4 考察

炭材料存在下で増殖が促進される微生物を単離するため、試薬として購入可能であるため安定した品質を示す炭材料である活性炭素を用いた。その結果、活性炭素を添加した寒天培地上において増殖が促進される微生物 IA 株の単離に成功し、さらに燻炭を添加した寒天培地においても増殖促進が認められた。寒天培地上において観察された IA 株の増殖面積の拡大は Kearns and Losick (2004) や Patrick and Kearns (2009) の報告から swarming motility だと考えられた。Sharma and Anand (2002) は細菌による swarming motility は 0.4–1.2%の寒天で固化された培地において認められ、寒天濃度 0.7%が最適であると報告している。加えて Kearns (2010) は 1%以上の寒天濃度では多くの細菌種における swarming motility が阻害され、研究室において固体培地を作製する際に寒天濃度を 1.5%にするのは細菌による swarming motility を阻害するためであると報告している。これらの理由から寒天濃度 1.5%の 1/10 TSA 上で IA 株が swarming motility を行い、活性炭素や燻炭の添加により swarming motility が促進されることは興味深い現象である。また swarming motility は細菌が土壌中において植物根にコロニーを形成する際に重要な能力だと考えられている (Venieraki et al. 2016, Gao et al. 2016)。このことから作物栽培において IA 株と燻炭を利用することで植物の根に素早くコロニー形成することが期待でき、それは IA 株を農業利用する際に価値ある能力の一つになると考えられる。

本研究において用いた 2 種の炭材料である活性炭素と燻炭では IA 株に与える効果に違いが認められた。活性炭素では寒天培地において著しく swarming motility を促進し、

燻炭は寒天培地における swarming motility と液体培地における増殖と胞子化、さらには抗生物質 iturin A 生産を促進した。この代謝促進効果の違いにおいていくつかの理由が考えられた。1つの要因は2種類の炭材料の原料の違いである。活性炭素は一般的にヤシ殻や木材を原料として賦活過程を経ることから高純度の炭素 (C \geq 95%) から構成される。一方で燻炭はイネの籾殻から野焼きによって作製されるため、炭素 (C) の他に様々な不純物が含まれる。燻炭の灰分には Si、Al、Fe、Mn、Mg、Ca、Na、K、Ti、P などが含まれると報告されている (Rao et al. 1989, Alvarez et al. 2015)。それらの元素のうち鉄イオン、マンガンイオンが *Bacillus* 属細菌のリポペプチド系の抗生物質生産を促進することが報告されている (Lin et al. 2007, Huang et al. 2015)。そのため活性炭素と燻炭に含まれる炭素 (C) が swarming motility を促進し、燻炭に不純物として含まれる鉄 (Fe) やマンガン (Mn) が増殖や胞子化、抗生物質生産を促進する可能性が考えられた。実際に籾殻を完全燃焼させることにより炭素をほとんど含まない籾殻灰を 5 g/L となるように添加した TSB にて IA 株の液体培養を行ったところ、燻炭と同等の代謝促進効果を示した。したがって燻炭に含まれる炭素以外の構成成分が IA 株の液体培養における増殖と胞子化、抗生物質生産の促進に寄与していることが示唆された。

また燻炭が自然物由来であるため、IA 株の代謝促進効果が品質によって変化するかを検証した。和歌山県産と三重県産の燻炭を使用した燻炭培地の作製を行い IA 株の培養を行った結果、両産地の燻炭ともにこれまでの実験で使用してきた秋田県産の燻炭と同様の増殖と胞子化、iturin A 生産の促進効果が認められた。この結果から燻炭の品質および産地間での代謝促進効果に違いが無いことが示唆された。さらに燻炭による IA 株

の代謝促進効果の要因となる物質が燻炭に普遍的に含まれていることを示し、世界中で発生する籾殻を燻炭に焼成することで IA 株の代謝促進剤として有効利用できる可能性が示された。

土壌から単離した IA 株を 16S rRNA 領域遺伝子に基づいた同定を行った結果、*B. siamensis* に近縁な新規の *Bacillus* sp. であることが示された。*B. siamensis* は少なくとも 4 種類の抗生物質 (iturin、fengycin、bacillaene、difficidin) を生合成する遺伝子がゲノム上にあることが示されおり (Jeong et al. 2012, Lee et al. 2016)、IA 株も本研究で明らかにした iturin A 以外の抗生物質も生産していることが期待できる。また *B. siamensis* の基準株である PD-A10 株は塩漬けされたカニ (*poo-khem*) から単離された株であり (Sumpavapol et al. 2010)、また他の *B. siamensis* の株も野菜のピクルス (*Phak-dong*) といった食品から単離されている (Meidong et al. 2017)。加えて *B. siamensis* のバイオセーフティーレベルは 1 であり、このため *Bacillus* sp. IA 株もヒトに対して安全な微生物であると考えられる。

Bacillus 属細菌は環境中に普遍的に存在する微生物であり (Slepecky and Hemphill 2006, Santoyo et al. 2012)、*Bacillus* 属の中にはりポペプチド系の抗菌活性物質を生産する種も含まれる (Romero et al. 2007, Mizumoto et al. 2007, Ongena and Jacques 2008, Chen et al. 2008, Arrebola et al. 2010)。そのため *Bacillus* 属細菌は世界中で微生物農薬の候補株として盛んに研究が行われており、また既に微生物農薬として販売されているものも存在している。日本だけでも *Bacillus amyloliquefaciens* AT-332、*B. amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* D747、*Bacillus subtilis* HAI-0404、*B. subtilis* Y

1336 の 4 種類の *Bacillus* 属細菌を用いた微生物農薬が販売されている (van Lenteren et al. 2018)。これらの微生物農薬は植物病原菌の感染防除効果を主として利用される。しかしながら本研究で発見した IA 株と燻炭の組み合わせは燻炭の土壌改良材としての効果に加えて、燻炭による IA 株の swarming motility 促進による根への素早いコロニー形成と抗真菌活性物質 iturin A 生産の促進により土壌改良材と微生物農薬の機能を兼ね備えた有用な農業資材の開発に繋がることが示唆された。

2-5 結論

本研究では炭材料存在下で増殖が促進される微生物の単離に初めて成功した。また燻炭が微生物の胞子化と抗生物質生産といった二次代謝の促進効果を有することを初めて見出した。本研究では *Bacillus* 属細菌 IA 株における代謝促進効果を明らかにしたが他の微生物種でも認められる可能性があり、燻炭と微生物の関係を深く知るためには燻炭による他の微生物における代謝活性を評価していく必要があると考える。燻炭は農業廃棄物であるイネの籾殻を原料とする低コストかつ、簡便に作製可能な資材である。そのため燻炭による微生物の代謝促進効果は農業分野においてのみならず様々な分野への展開が期待できる。微生物代謝の促進という観点から微生物発酵による有用物質生産や食品製造などの様々な分野に応用できる可能性がある。

第3章 燻炭が微生物の代謝促進において果たす役割の解明

3-1 序論

第2章の研究において燻炭存在下で増殖促進を示す微生物の探索を行った。その結果、燻炭（rice husk biochar：RHB）を添加した寒天培地上において swarming motility が促進される *Bacillus* 属細菌 IA 株の単離に成功した。さらに IA 株の液体培養において燻炭が存在すると増殖と孢子化が促進されることを見出した。また IA 株はリポペプチド系の抗生物質 iturin A を生産しており、その生産量が燻炭を添加して培養を行うことで増加することを明らかにした。この結果から燻炭と IA 株を組み合わせることで、燻炭がもつ土壤改良材としての効果に加え、病原菌から植物を防除する効果も備えた微生物資材を開発することが可能であると考えた。

IA 株が属する *Bacillus* 属の細菌は周辺環境の栄養が減少すると芽胞を形成することが知られている（Setlow 2006, Hirota et al. 2010）。芽胞は低栄養もしくは栄養がほとんど無い条件下では休眠状態にあり、栄養条件が良くなると栄養細胞として活動を再開するといった特徴をもつ極めて耐久性の高い細胞構造である（Setlow 2006）。芽胞の形成は乾燥に対する高い耐性を示すため、開発した微生物資材を乾燥させて保存が可能という点から品質を安定的に保つ上で必要な特性であると考えられている（Ongena and Jacques 2008）。

Bacillus 属細菌を用いた微生物資材を開発する上で芽胞形成に加えて特に重要なのが surfactin や iturin、fengycin といった様々なリポペプチド系の抗生物質を生産する株が

存在することである (Romero et al. 2007, Mizumoto et al. 2007, Ongena and Jacques 2008, Chen et al. 2008, Arrebola et al. 2010)。IA 株もリポペプチド系の抗生物質の一種である iturin A を生産しており、その生産が燻炭存在下で促進されることを明らかにした。iturin A は幅広い植物病原性の真菌 (*Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Botrytis cinerea*, *Botrytis elliptica*, *Colletotrichum musae*, *Sclerotium rolfsii*, *Glomerella cingulata*, *Rhizoctonia solani*) に対して抗真菌活性を示すことが報告されている (Hsieh et al. 2008)。

以上のことから、燻炭により孢子化と抗生物質 iturin A 生産が促進される IA 株を燻炭と組み合わせることで強力な微生物資材を開発することが可能になると考えた。燻炭による IA 株の代謝促進メカニズムを理解することは、燻炭と IA 株を組合わせた微生物資材の開発プロセスや、その資材の施用効果を説明すると上で重要である。そこで本研究では燻炭による IA 株の増殖と孢子化、iturin A 生産の促進メカニズムを明らかにすることを目的に実験を行った。

3-2 材料および方法

実験に用いた微生物と培養条件

燻炭存在下で増殖、胞子化、および抗生物質 iturin A 生産が促進される微生物 *Bacillus* 属細菌 IA 株を用いた。Luria-Bertani (LB) 培地にて培養した IA 株を 100 mL 容のフラスコに添加した 20 mL の tryptic soy broth (TSB: Bacto peptone, 20 g/L; glucose, 2.5 g/L; K₂HPO₄, 2.5 g/L; NaCl, 5.0 g/L)、もしくは次項に記す改変した TSB に 1% (200 μL) 植菌し 30°C、120 rpm で 5 日間培養を行った。培養後に単離株の全菌数と胞子数の測定を行い、各培地での菌数を比較評価した。IA 株の全菌数は希釈平板法により colony-forming units(CFU)を求めることで算出した。胞子数は IA 株の培養液を 80°C、30 分間の熱処理後に希釈平板法を行い CFU から算出した。

実験に用いた材料と改変 TSB 培地の作製

燻炭 (rice husk biochar : RHB) は秋田県大館市で栽培されたイネの籾殻を原料として秋田県内で野焼き法により作製されたものを使用した。実験には乳棒と乳鉢を用いて粉末にした燻炭を使用した。燻炭 (RHB) 培地は TSB に 5 g/L の燻炭を添加し、オートクレーブ処理 (121°C、15 分) に供することで作製した。濾過燻炭培地 (FRHB : filtrated RHB) は燻炭培地をメンブレンフィルター-DISMIC-25cs (孔径 0.20 μm、アドバンテック東洋株式会社) を用いて濾過することで作製した。

燻炭抽出液 (ESR : extracted solution from RHB) は蒸留水 30 mL に燻炭 0.15 g を添加した 5 g/L の燻炭懸濁液をオートクレーブ処理 (121°C、15 分) し、静置後の上清

をメンブレンフィルターDISMIC-25cs（孔径 0.20 μm ）で濾過することで作製した。燻炭抽出液(ESR)培地は、燻炭抽出液に TSB 成分を溶解し、オートクレーブ処理(121°C、15分) することで作製した。

燻炭抽出液中のケイ酸イオン濃度、マンガンイオン濃度はそれぞれ株式会社共立理化学研究所の水質測定用試薬セット No. 20D（シリカ低濃度）もしくは No. 28（マンガン）を用いた。ケイ酸イオン濃度の測定原理はモリブデン青法、マンガンイオンの測定原理は過よ素酸カリウム法に基づいた試験法である。また各イオンの濃度は検量線を作製することで求めた。

燻炭抽出液に含まれる代謝促進物質を明らかにするため、メタケイ酸またはオルトケイ酸を TSB にそれぞれ終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （二酸化ケイ素として）添加した培地、カルシウム、マグネシウム、アルミニウム、鉄、マンガン を 10 μM 添加した培地を作製した。また各無機化合物は以下のものを使用した。メタケイ酸はメタケイ酸ナトリウム九水和物 ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、富士フイルム和光純薬株式会社、Cat. No. 199-02445、規格含量: 98.0+%)、オルトケイ酸はオルトケイ酸ナトリウム水和物 ($\text{Na}_4\text{SiO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 、Sigma-Aldrich 社、Cat. No. 28-3530-5、等級 CP)、カルシウムは塩化カルシウム (CaCl_2 、片山化学工業、Cat. No. 05-0570-5、JIS 特級)、マグネシウムは硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、富士フイルム和光純薬株式会社、Cat. No. 131-00405、試薬特級)、アルミニウムは塩化アルミニウム (AlCl_3 、富士フイルム和光純薬株式会社、Cat. No. 011-12322、規格含量: 98.0+%)、二価鉄は硫酸鉄(II)七水和物 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、富士フイルム和光純薬株式会社、Cat. No. 098-01085、試薬特級)、三価鉄は塩化鉄(III)六水和物

($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、富士フイルム和光純薬株式会社、Cat. No. 095-00875、試薬特級)、マンガンは硫酸マンガ(II)五水和物 ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、富士フイルム和光純薬株式会社、Cat. No. 139-00825、試薬特級) を用いた。水和物量が不明であったオルトケイ酸ナトリウム水和物 ($\text{Na}_4\text{SiO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) は適当な濃度の水溶液を調製し前述の水質測定用試薬セット No. 20D とメタケイ酸ナトリウム九水和物 ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) の検量線を用いて水和物量を求め分子量を概算することにより TSB に終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (二酸化ケイ素として) となるように添加した。

高純度の二酸化ケイ素試料として、AGC エスアイテック株式会社 (福岡) の鱗片状シリカ (製品名: SUNLOVELY、含有量 >99.8%) と Sigma-Aldrich 社の非晶質シリカ粉末 (fumed silica、Cat. No. 381276、含有量 99.8%) を使用した。鱗片状シリカ (scaly silica: SS) 培地、および非晶質シリカ (fumed silica: FS) 培地は 5 g/L の鱗片状シリカ、もしくは非晶質シリカをそれぞれ TSB に添加することで作製した。

培養濾過上清を用いた抗真菌活性試験

IA 株の培養濾過上清を用いた植物病原菌 *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験は以下の方法で行った。また *R. solani* K1 は potato dextrose agar (PDA) にて継代培養を行い、実験には培養 3 日から 7 日の菌体を用いた。IA 株の培養液を 9,000 $\times g$ で 10 分間の遠心分離を行った後、上澄みをメンブレンフィルター-DISMIC-25cs (孔径 0.20 μm) により濾過した。この培養濾過上清を用いて *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験を行った。PDA の端から 2 cm のところに直径 6 mm のステンレスカップを設置し、その中

に培養濾過上清を 200 μL 添加した。PDA の反対側の 2 cm のところにステンレスカップで切り抜いた *R. solani* K1 を植菌した。24°C で培養を行い、*R. solani* K1 の増殖面積を観察することにより培養濾過上清の抗真菌活性能を評価した。

リポペプチド系抗生物質 iturin A の定量

IA 株が産生する抗生物質 iturin A の定量は HPLC を用いて行った。IA 株の培養液を等量の 35% (v/v) アセトニトリルと混合、10 分間攪拌した後、9,000 $\times g$ で 10 分間遠心分離した。得られた上澄みをメンブレンフィルター-DISMIC-13jp (孔径 0.20 μm 、アドバンテック東洋株式会社) を用いて濾過滅菌し、20 μL の濾液を分析サンプルとして HPLC に分析に供した。HPLC のシステムは Jasco LC-2000 (日本分光株式会社) を使用し、カラムは Chromolith Performance RP-18e column (4.6 mm \times 100 mm, Merck KGaA) を用いた。溶出溶媒はアセトニトリルと 0.1%ギ酸水溶液を 35:65 (v/v) の割合で混合した溶媒を定組成で使用した。iturin A 濃度は Sigma-Aldrich 社標準品 ($\geq 95\%$) を用いた検量線を作製することにより求めた。

統計解析

各処理区的全菌数と孢子数、iturin A 生産量の違いを多重比較法 (Tukey 法) にて有意水準 5% で検定した。また全菌数と孢子数は 10 を底とした対数値に変換した後、検定を行った。

3-3 結果

燻炭が IA 株の増殖と胞子化、抗生物質生産に与える影響

燻炭による IA 株の代謝促進における役割を明らかにするため、初めに燻炭を懸濁した水をオートクレーブ処理し、濾過することにより得られる燻炭抽出液（ESR：extract solution from RHB）に着目した。熱水抽出により得られた燻炭抽出液中に IA 株の代謝を促進する物質が含まれるか検証するため、燻炭抽出液から作製した燻炭抽出液培地を用いて IA 株の培養を行った。

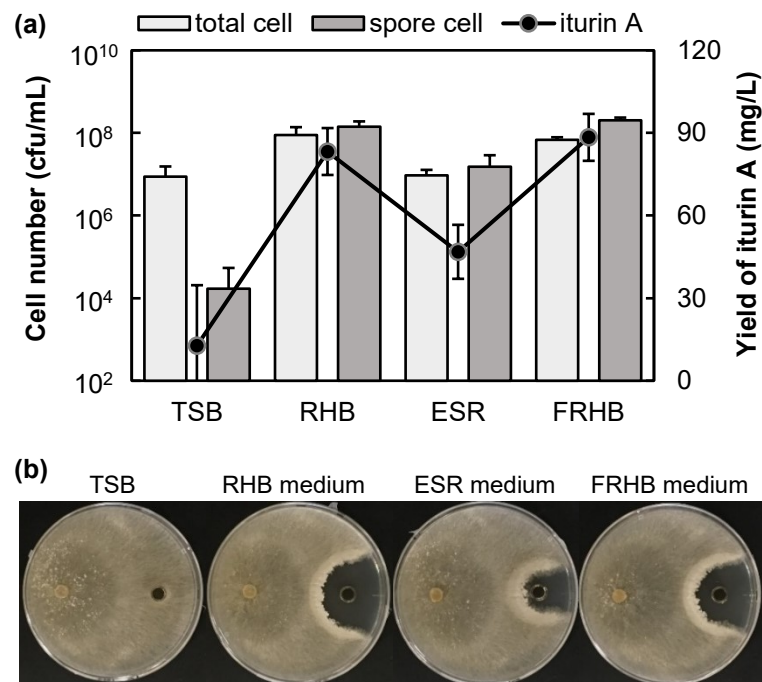


図 11 燻炭抽出液（ESR）と燻炭濾過（FRHB）培地による IA 株の培養 5 日目における増殖と胞子化、iturin A 生産の促進効果 (a)。エラーバーは $n \geq 3$ の標準偏差を示す。培養濾過上清を用いた *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験 (b)。

結果、燻炭抽出液（ESR）培地における IA 株の iturin A 生産量は TSB より 4 倍高い値を示した（図 11a）。さらに燻炭抽出液培地で培養した IA 株の孢子数を TSB での孢子数と比較すると 1,000 倍以上の増加し、孢子数と iturin A 生産量において TSB と燻炭抽出液（ESR）培地間でそれぞれ有意差（5%）が認められた。加えて燻炭抽出液培地の培養濾過上清を用いた抗真菌活性試験において *R. solani* K1 に対して抑制効果を示した（図 11b）。この結果から燻炭抽出液（ESR）には IA 株の孢子化と抗生物質生産を促進する代謝促進物質が含まれることが示唆された。

燻炭から溶出するイオンによる IA 株の代謝促進効果の検証

イネは土壌中のケイ酸を取り込み二酸化ケイ素として籾殻に蓄積することから、灰分の 90%以上（全体の約 45%）を二酸化ケイ素が占めることが知られている（Alvarez et al. 2015）。そこで燻炭抽出液にはケイ酸イオンが含まれており、ケイ酸イオンが IA 株の代謝促進に関与しているのではないかと考えた。そこで燻炭抽出液（ESR）中に含まれるケイ酸イオンの定量を行った。その結果、96.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のケイ酸イオンが含まれていることが分かった。そこでメタケイ酸ナトリウム (Na_2SiO_3)、オルトケイ酸ナトリウム (Na_4SiO_4) をそれぞれ TSB に終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し IA 株の培養を行った。しかしながらケイ酸イオンを添加した培地において TSB と同等の全菌数、孢子数、iturin A 生産量を示し、ケイ酸イオンでは代謝促進効果が認められなかった。次に燻炭の灰分成分の約 10%（全体の約 5%）を占める微量元素元素に着目した。微量元素元素として Al、Fe、Mn、Mg、Ca、Na、K、Ti、P などが含まれると報告されており

(Rao et al. 1989, Alvarez et al. 2015)、イオン化した微量金属元素による IA 株の代謝促進効果を検証した。

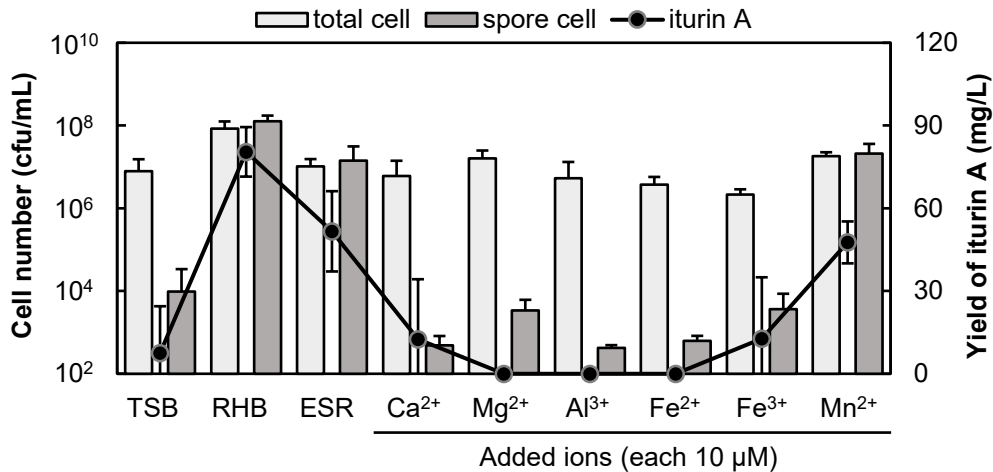


図 12 燐炭灰分に含まれる微量元素による IA 株の培養 5 日目における増殖と胞子化、iturin A 生産の促進効果。エラーバーは $n \geq 3$ の標準偏差を示す。

実験には灰分中の微量金属元素を含む試薬、塩化カルシウム (CaCl_2)、硫酸マグネシウム (MgSO_4)、塩化アルミニウム (AlCl_3)、硫酸鉄 (FeSO_4)、塩化鉄 (FeCl_3)、硫酸マンガン (MnSO_4) を用い、これらの試薬を各々 TSB に終濃度 $10 \mu\text{M}$ となるように添加し IA 株の培養を行った。その結果、硫酸マンガン (MnSO_4) を添加した TSB において最も高い胞子数と iturin A 生産量が認められた (図 12)。マンガンイオンを添加した TSB における胞子数、iturin A 生産量はそれぞれ 10^7 cfu/mL 、 48 mg/L であり、燐炭抽出液 (ESR) と同等の胞子化、抗生物質生産の促進効果が認められた。また微量元素を添加した TSB の中で胞子数と iturin A 生産量において TSB との有意差が認められ

たのはマンガンイオン (Mn^{2+}) 添加培地のみであった。このことからマンガンイオン (Mn^{2+}) が IA 株の代謝促進に関与していることが示された。

IA 株の代謝促進におけるマンガンイオンの効果

燻炭灰分の微量元素元素を用いた試験により、燻炭抽出液に含まれる代謝促進物質がマンガンイオンであることが分かった。そこで燻炭抽出液に含まれるマンガンイオンの定量を試みた。しかしながら燻炭抽出液に含まれるマンガンイオン濃度は検出限界 (5 μM) 以下であった。そこでマンガンイオン (Mn^{2+}) の終濃度が 100、10、1、0.1 μM となるように添加した TSB を作製し IA 株の培養を行った。その結果、IA 株の孢子化と iturin A 生産は全てのマンガンイオン濃度において促進された (図 13)。しかしながら 1 μM と 0.1 μM における孢子濃度は 100 μM 、10 μM に比べると低かった。これらの結果から燻炭抽出液に含まれるマンガンイオン濃度は 0.1–5 μM の間であることが示唆された。

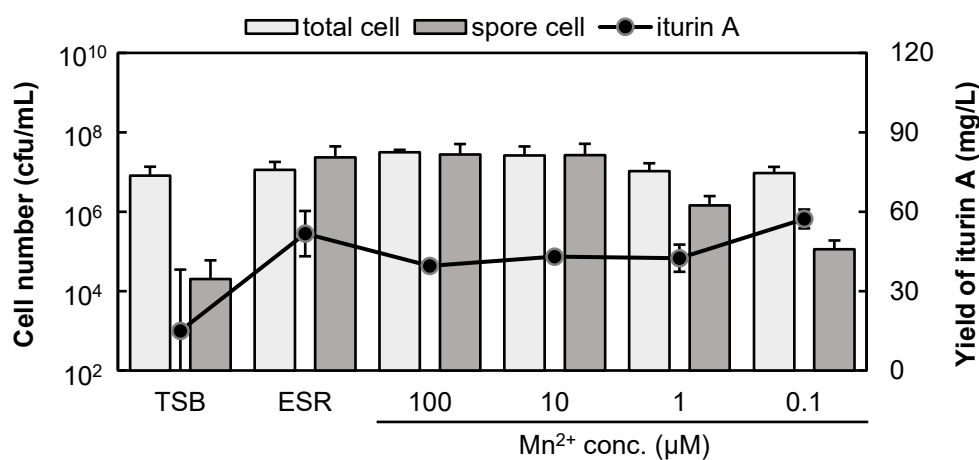


図 13 IA 株の培養における増殖と孢子化、iturin A 生産におけるマンガン濃度の効果 (5 日目)。エラーバーは $n \geq 3$ の標準偏差を示す。

燻炭に含まれる代謝促進物質の再検討

燻炭抽出液（ESR）培地での IA 株の培養は胞子化と iturin A 生産を促進したが、その促進効果は増殖と胞子化、iturin A 生産の全てにおいて燻炭（RHB）培地よりも有意（5%）に低下した（図 11）。このことから IA 株の代謝促進における他の要因の存在が示唆された。燻炭培地と燻炭抽出液培地における違いが固体としての燻炭の存在の有無、つまり燻炭が培地成分と接触することが重要ではないかと考えた。

そこで燻炭（RHB）培地を濾過することにより燻炭濾過（FRHB）培地を作製した。燻炭濾過（FRHB）培地での培養の結果、燻炭（RHB）培地と同等の生菌数と胞子数、iturin A 生産量を示した（図 11a）。燻炭濾過培地は固体燻炭と培地成分が接触した後に濾過を行うことで燻炭を取り除いた培地である。そのため燻炭が TSB に含まれる代謝阻害物質を吸着したことが IA 株の代謝促進を引き起こすことが示唆された。また燻炭濾過培地では代謝阻害物質の吸着に加えて、燻炭から溶出したマンガンイオンの効果も付与されることで燻炭（RHB）培地と同等の代謝促進効果を示したと考えられる。つまり燻炭濾過培地による代謝促進効果には少なくとも 2 つの要因が関わることが考えられた。すなわち燻炭から溶出するマンガンイオン（ Mn^{2+} ）の効果と、燻炭による代謝阻害物質の吸着である。

鱗片状シリカによる IA 株の代謝促進効果

燻炭による培地中の代謝阻害物質の吸着が IA 株の代謝促進効果に関与することが示唆された。そこで燻炭灰分の 90%以上を占める二酸化ケイ素に再び着目した。前述の通

りケイ酸イオンは IA 株の代謝活性を促進しなかった。しかしながら燻炭の構成成分のうち二酸化ケイ素が約 45%だとしても溶出したケイ酸イオンは一部であり、大半は固体の二酸化ケイ素として燻炭に残存していることが考えられた。そこで工業的に生産されるため高純度の二酸化ケイ素から成る鱗片状シリカ (>99.8% SiO₂) に着目した。鱗片状シリカを TSB に添加した鱗片状シリカ (SS) 培地を作製し、IA 株の培養を行った。その結果、鱗片状シリカ (SS) を添加して培養を行うことで全菌数と孢子数は増加しなかったが、iturin A 生産量が TSB より 4 倍高い値を示した (図 14)。

さらに鱗片状シリカによる培地中の代謝阻害物質の吸着能とそれに伴う代謝促進効果を検証するため、燻炭濾過 (FRHB) 培地と同様の方法にて、鱗片状シリカ濾過 (FSS: filtrated SS) 培地を作製した。鱗片状シリカ濾過 (FSS) 培地で IA 株の培養を行ったところ、鱗片状シリカ (SS) 培地と同様に iturin A 生産のみの促進効果が認められた。この結果は鱗片状シリカ培地における iturin A の生産の促進において培養液中に鱗片状シリカが存在する必要としないことを示した。

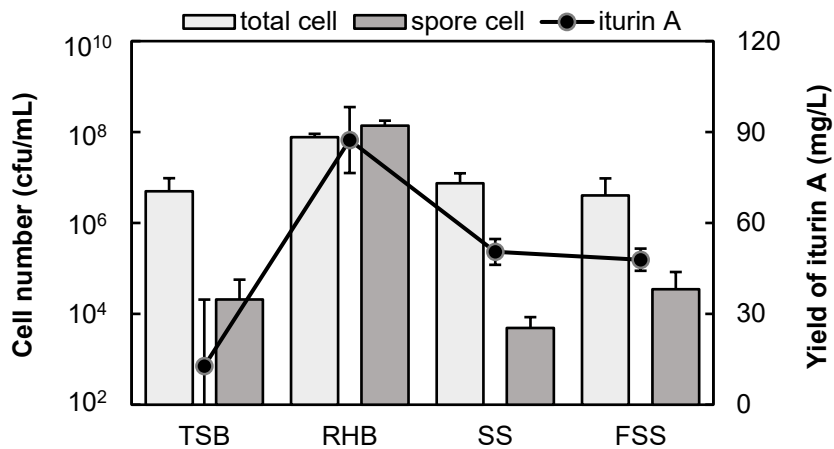


図 14 鱗片状シリカ (SS) が IA 株の増殖と孢子化、iturin A 生産に及ぼす影響 (5 日目)。エラーバーは $n \geq 3$ の標準偏差を示す。

次に IA 株の iturin A 生産の促進に二酸化ケイ素材料中のケイ酸塩の構造が関与するか調べるため、非晶質シリカ (FS) 培地を用いて IA 株の培養を行い、培養後の培養濾過上清を用いて *R. solani* K1 に対する抗菌活性試験を行った。その結果、非晶質シリカ (FS) 培地の培養濾過上清では *R. solani* K1 に対して抗菌活性を示さず (図 15)、非晶質シリカは IA 株の iturin A 生産を促進しないことが示された。以上の結果は二酸化ケイ素が TSB 中の代謝阻害物質の吸着を示唆したが、それにはケイ酸塩の構造が関与することを明らかにした。

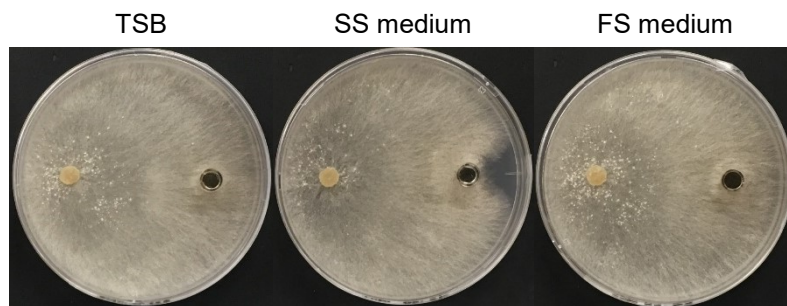


図 15 IA 株の培養濾過上清を用いた *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験。ステンレスカップには TSB、鱗片状シリカ (SS) 培地、非晶質シリカ (FS) 培地の培養濾過上清 200 μ L を添加した。

鱗片状シリカとマンガンの組み合わせが IA 株の代謝に与える影響

燻炭による IA 株の代謝促進において少なくとも 2 つの要因が関与していることを示した。1 つは燻炭から溶出するマンガンイオンであり、もう 1 つは二酸化ケイ素による代謝阻害物質の吸着である。燻炭抽出液培地とマンガンイオンを添加した培地では IA 株の孢子化と iturin A 生産を促進することを明らかにし (図 11、図 12、図 13)、鱗片状シリカ培地と濾過鱗片状シリカ培地では IA 株の iturin A 生産のみを促進することを明

らかにした (図 14)。しかしながら燻炭培地は IA 株の孢子化と iturin A 生産だけでなく、増殖も促進する。燻炭による増殖促進効果が 2 つの要因が組み合わさることで生じる相加効果ではないかと考え、燻炭抽出液 (ESR) 培地に鱗片状シリカ 5 g/L を添加しオートクレーブ処理後に濾過することで鱗片状シリカを取り除いた FSS×ESR 培地を製し、IA 株の培養を行った。

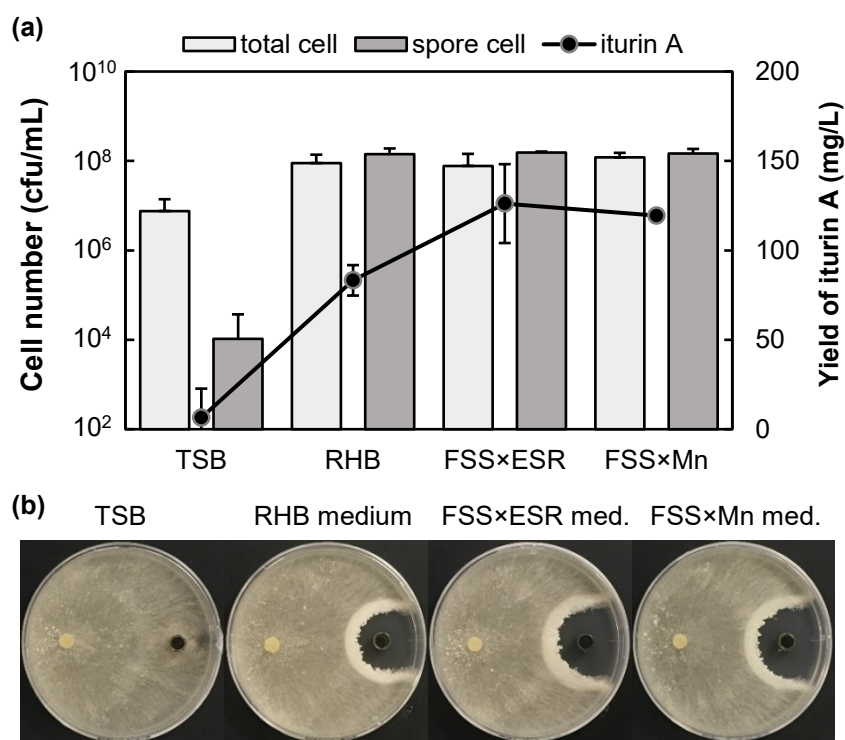


図 16 1 μ M のマンガンイオンを添加した鱗片状シリカ濾過 (FSS×Mn) 培地における IA 株の増殖と孢子化、iturin A 生産の促進効果 (a)。エラーバーは $n \geq 3$ の標準偏差を示す。培養濾過上清を用いた *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験 (b)。

その結果、増殖と孢子化、iturin A 生産の全てが促進され、全菌数、孢子数、iturin A 生産量はそれぞれ 10^8 cfu/mL、 10^8 cfu/mL、126 mg/L であった (図 16a)。加えて、培養

濾過上清を用いた *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験においても強い抑制効果を示した(図 16b)。さらに FSS×ESR 培地における IA 株の全菌数と孢子数の値は燻炭(RHB)培地と同等の値であったが、iturin A 生産量においては燻炭(RHB)培地よりも有意(5%)に増加した。

FSS×ESR 培地において燻炭培地と同等の代謝促進効果が認められた。そこで鱗片状シリカ濾過培地に 1 μ M のマンガンイオンを添加した FSS×Mn 培地を作製し、IA 株の代謝促進効果の評価を行った。FSS×Mn 培地での培養の結果、燻炭(RHB)培地、FSS×ESR 培地と同様に IA 株の増殖と孢子化、iturin A 生産の促進効果が認められた(図 16a)。つまり燻炭による IA 株の増殖と孢子化、iturin A 生産の促進は、燻炭から溶出するマンガンイオンと燻炭に含まれる二酸化ケイ素が組み合わせることでもたらされることが考えられた。

3-4 考察

第2章において *Bacillus* 属細菌 IA 株の培養を燻炭存在下で行うことで増殖と胞子化、iturin A 生産が促進することを明らかにした。このことは IA 株と燻炭を組み合わせることによって強力な微生物資材の開発が可能になることを示しており、微生物資材を開発するためには IA 株の代謝促進メカニズムを明らかにする必要があると考えた。初めに燻炭を蒸留水に懸濁してオートクレーブ処理に供することにより得られる燻炭抽出液を用いた実験を行った。その結果、燻炭抽出液には IA 株の胞子化と iturin A 生産を促進する物質が含まれることが示された。そして燻炭の灰分に含まれる微量元素に着目することでマンガンイオン (Mn^{2+}) が IA 株の胞子化と iturin A 生産に重要であることが示された。*Bacillus* 属細菌の研究においてマンガンイオン (Mn^{2+}) 濃度の上昇に伴ってリポペプチド系の物質である surfactin の生産量が向上したという報告がある (Huang et al. 2015)。その理由としてマンガンイオン濃度の増加と硝酸還元活性の上昇が正の相関を示し、その結果として surfactin 生産が促進されたと考察されている。そのため IA 株の iturin A 生産においても燻炭から溶出する微量なマンガンイオンが IA 株の硝酸還元活性を上昇させている可能性が考えられる。より詳細な燻炭による IA 株の iturin A 生産の促進メカニズムを調べるには、IA 株においてもマンガンイオンを添加した培地や燻炭抽出液培地で培養した際に硝酸還元活性が上昇しているのか調べる必要がある。

次に燻炭全体の 45%以上を占めるとされる二酸化ケイ素に着目し、高純度の二酸化ケイ素から構成される鱗片状シリカ (SS) を用いて IA 株の培養を行ったところ IA 株の iturin A 生産を促進することが分かった。この結果から燻炭に含まれる二酸化ケイ素が

代謝促進に重要であり、また代謝阻害物質を吸着していることが示唆された。鱗片状シリカ (SS) においてケイ酸塩は層状ケイ酸 (フィロケイ酸塩) の構造をとっている。一方で燻炭中のケイ酸塩の結晶構造は作製時の焼成温度が高温になるにつれて非晶質から結晶質へと変化することが報告されている (Yang et al. 2015)。そこで IA 株の iturin A 生産の促進にケイ酸塩の構造が関与するか調べるため、非晶質シリカ (FS) を用いて IA 株の培養を行った。しかしながら非晶質シリカでは IA 株の iturin A 生産の促進効果が認められなかった。このことから代謝阻害物質の吸着にはケイ酸塩の構造が重要であることが考えられた。

燻炭による IA 株の代謝促進には燻炭から溶出するマンガニオンと燻炭中に含まれる結晶質の二酸化ケイ素が関わることを示した。そしてこれらが持つ代謝促進効果が組み合わせることで燻炭による IA 株の増殖と胞子化、iturin A 生産の促進に寄与していることが示された。本研究からマンガニオンと二酸化ケイ素を組み合わせることで燻炭による代謝促進効果を再現することが可能となり、燻炭により増殖が促進される微生物の探索や活性促進効果の検証を安定的に行う実験系が構築出来る可能性が示された。

3-5 結論

本研究では *Bacillus* 属細菌 IA 株の増殖と胞子化、iturin A 生産の促進における燻炭の役割を明らかにすることに成功した (図 17)。つまり燻炭から溶出するマンガンイオンが胞子化と iturin A 生産を促進する。燻炭を構成する二酸化ケイ素による代謝阻害物質の吸着が iturin A 生産を促進する。そしてマンガンイオンと二酸化ケイ素の効果が組み合わせることが燻炭による増殖と胞子化、iturin A 生産の促進において重要だということを示した。本研究は燻炭と IA 株を組み合わせた微生物資材の施用効果を説明する上で重要な知見となることを期待できる。

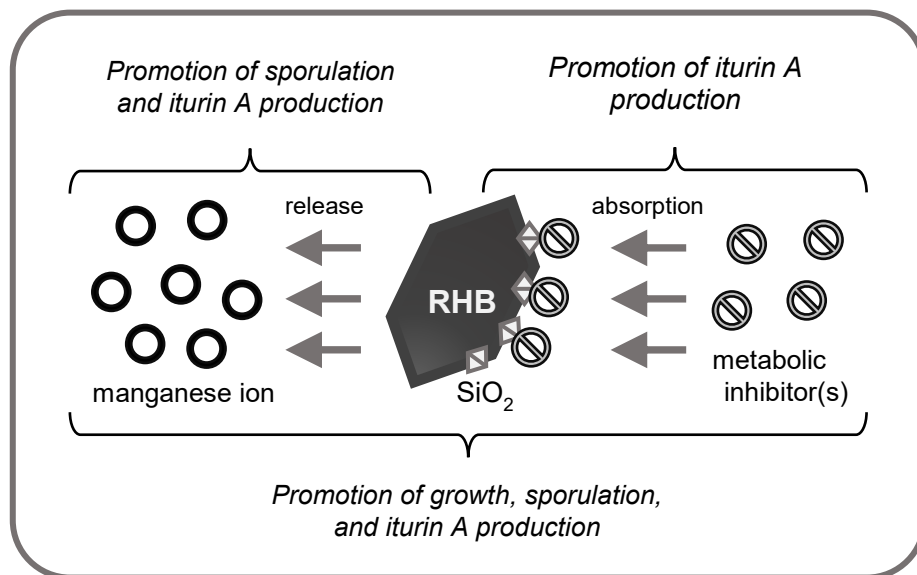


図 17 燻炭 (RHB) による IA 株の増殖と胞子化、iturin A 生産の促進メカニズム。燻炭から溶出するマンガンイオンが胞子化と iturin A 生産を促進 (上左)。燻炭を構成する二酸化ケイ素が代謝阻害を吸着することによる iturin A 生産の促進 (上右)。それらの要素が組み合わさることによって IA 株の増殖と胞子化、iturin A 生産を促進 (下)。

第4章 燻炭を用いた微生物資材開発のための知見の集積

4-1 序論

土壌 1 g には 10^7 colony-forming units (cfu) もの微生物が存在している (Egamberdieva et al. 2007, Berendsen et al. 2012)。それら微生物は土壌の生物化学プロセスや栄養循環において重要な役割を担うことが知られているが (Egamberdieva et al. 2018)、その中には作物に害を為す病原菌も存在している (Berendsen et al. 2012)。病原菌による農作物の被害は大きく、病原菌が原因とされる世界の主要 8 作物(コムギ、コメ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ワタ、オオムギ、テンサイ) の損失量は 10% 以上だと見積もられている (豊田 2018)。そのため環境保全型農業を実現するためには有用微生物を用い、病原性微生物の植物への感染をいかに防除するかが課題になってくる。

微生物資材は土壌改良資材の一種であり土壌などに施用された際に含有微生物の働きにより植物栽培に資する資材とされている (竹腰 2018)。微生物資材の開発は (1) 効果的な新しい微生物のスクリーニング、(2) 大量生産のための培養プロセスの構築、(3) 製品の製剤化の 3 段階に分けることが出来る (Vassilev et al. 2017)。これまでの研究により微生物資材の候補となり得る微生物として *Bacillus* 属細菌 IA 株の単離に成功した。IA 株は燻炭を添加した寒天培地で培養を行うことで、土壌中における植物根へのコロニー形成に重要な能力だと考えられている swarming motility (Venieraki et al. 2016, Gao et al. 2016) が促進される。さらに IA 株は植物病原菌 *Rhizoctonia solani* K1 の生

育抑制能を有しており、抗生物質 iturin A を生産していることを明らかにした。加えて IA 株の iturin A 生産が燻炭存在下で促進されることを見出した。これらのことから農業廃棄物である燻炭と IA 株を組み合わせることで、植物の根に素早くコロニー形成し植物病原菌の感染を防除する微生物資材を開発することが出来るのではないかと考えた。しかしながら IA 株が実際に植物を病原菌の感染から防除できるかは明らかにしておらず IA 株による感染防除能を評価する必要がある。

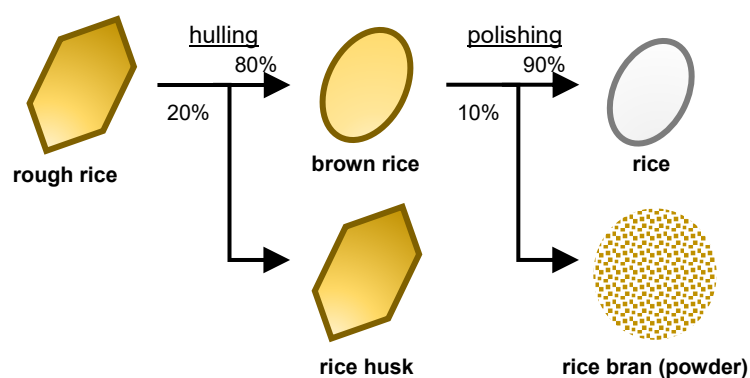


図 18 粃米から粃摺り (hulling)、精米過程 (polishing) を経て排出される農業廃棄物とその割合 (w/w)。

微生物資材の開発において培養プロセスのコストを低くすることが求められる。そこで培養基質として粃殻と同じく稲作由来の農業廃棄物である米糠に着目した。粃米を白米にする過程において、粃米から約 2 割の粃殻 (Bansal et al. 2006, Wang et al. 2012) と玄米から約 1 割の米糠が排出される (Phongthai and Rawdkuen 2015)。つまり粃米 1 kg 当たり 200 g の粃殻と 80 g の米糠が非可食部の稲作廃棄物として生じる (図 18)。米糠は鉄やリン、マグネシウムなどの微量ミネラルや 13% 程度のタンパク質、12% 程度

の繊維質が含まれるため (Phongthai and Rawdkuen 2015)、微生物変換による有用物質生産のための基質として研究が行われており (Oliveira et al. 2011)、IA 株を用いた微生物資材を作製する際の培養基質として利用出来るのではないかと考えた。

そこで本研究では燻炭と IA 株を組み合わせた微生物資材の開発を目指して、IA 株の作物栽培における有用性の評価、および米糠と燻炭を組み合わせた IA 株の培養方法の検討を行った。

4-2 材料および方法

実験に用いた微生物と稲作由来の廃棄物

本研究では燻炭存在下において増殖が促進される *Bacillus* 属細菌 IA 株を用いた。IA 株の前培養は tryptic soy agar (TSA) 上の IA 株のシングルコロニーを釣菌し 2 mL の Luria-Bertani (LB) 培地に植菌、30°C、200 rpm で終夜培養することにより行った。

燻炭 (rice husk biochar : RHB) は秋田県大館市で栽培されたイネの籾殻を原料として秋田県内で野焼き法により作製されたものを使用した。また実験には 1 g 当たり 8 mL の体積を示す未破碎の燻炭を使用した。米糠 (rice bran : RB) は粉末状のものを使用し、保存は-30°Cで行った。

フィターゼおよびシデロフォア生産能の評価

IA 株の植物生長促進能を検証するため、有機態リンであるフィチン酸からリン酸を遊離させるフィターゼ生産の有無を PSM (phytase screening medium) 寒天を用いて、植物への鉄の取り込みを助けるシデロフォア生産の有無を CAS (chrome azurol S) 寒天培地を用いて評価した。PSM 寒天は Gulati ら (2007) の論文を参考に phytin (calcium phytate, 東京化成工業株式会社) 5 g、glucose 10 g、(NH₄)SO₄ 0.3 g、MgSO₄·7H₂O 1 g、CaCl₂ 0.1 g、MnSO₄·5H₂O 0.016 g、FeSO₄·7H₂O 0.018 g を蒸留水に溶解して 1 L にした後、寒天 20 g を加えオートクレーブ処理 (121°C、15 分) 後に、プレートで固化させることにより作製した。

CAS 寒天培地は Payne (1994) の論文を参考に以下の手順で作製した。60.5 mg の

CAS を蒸留水 50 mL に溶解した (A 液)。FeCl₃·6H₂O 2.7 mg を 10 mL の 10 mM HCl に溶解した (B 液)。72.9 mg の HDTMA (hexadecyltrimethyl-ammonium) を蒸留水 40 mL に溶解した (C 液)。A 液の入ったビーカーに B 液を加え、その後 C 液を少しずつ A と B の混合溶液の入ったビーカーに加えた。これをオートクレーブ処理することにより CAS blue 溶液 (100 mL) を作製した。続いて PIPES (piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)) 30.24 g を蒸留水に溶解し、50%(w/v) NaOH 溶液を用いて pH 6.8 に調整した。その溶液に 1/10 tryptic soy broth (1/10 TSB) の培地成分を添加して蒸留水で 900 mL に定容し、再度 pH を 6.8 に調整後に寒天 15 g を加えてオートクレーブ処理することにより栄養培地を作製した。オートクレーブ後に CAS blue 溶液 100 mL と栄養培地 900 mL を混合し、プレートで固化させることにより CAS 寒天培地を作製した。

TSA 上で生育する IA 株のシングルコロニーを釣菌し PSM 寒天と CAS 寒天培地の中心に植菌、30°C で培養を行った。IA 株の増殖により形成されるコロニー周辺の培地の変色によりフィターゼおよびシデロフォア生産能の評価を行った。

IA 株を用いた植物病原菌の感染防除試験

IA 株による植物病原菌に対する植物感染防除試験を行うため、植物体としてキュウリ (霜知らず 地はい胡瓜、株式会社アタリヤ農園、千葉県)、植物病原菌として多くの作物に苗立枯病菌を引き起こす *Rhizoctonia solani* K1 (Phae et al. 1992, Asaka and Shoda 1996) を用いた。植物の栽培用土壌にはタキイたねまき培土 (タキイ種苗株式会

社、京都)を用いた。IA株はTSBで培養した培養液を $9,600 \times g$ で10分間遠心分離を行い、培地成分を除去し、滅菌蒸留水で再懸濁することにより全菌数、孢子数がそれぞれ 4×10^8 cfu/mL、 2×10^8 cfu/mLとなるIA株の懸濁液を作製し実験に使用した。

滅菌蒸留水 97.5 mL に IA 株懸濁液 2.5 mL を懸濁した後、培土 250 mL に混合することでキュウリ栽培用土壌を作製した。キュウリは1ポット当たり種子8粒を播種し、 24°C 、12時間の明暗周期で発芽および生育させた。播種から3日後に *R. solani* K1 のアガーピース (直径 6 mm の半月型) をポットの中心に植菌した。*R. solani* K1 の植菌後、7日目と14日目の倒伏したキュウリ個体の割合と枯死した個体割合からIA株の植物病原菌に対する感染防除能を評価した。*R. solani* K1 は potato dextrose agar (PDA) にて継代培養を行い、実験には3日間培養した菌体を用いた。

米糠を用いたIA株の培養

米糠寒天は蒸留水 1 L に米糠 10 g と寒天 15 g を添加し、オートクレーブ処理後にプレート1枚当たり 10 mL で固化させた。TSA 上で生育するIA株のシングルコロニーを釣菌し米糠寒天に画線、 24°C 培養器内で培養を行うことによりIA株が米糠を利用できるか評価した。

米糠懸濁液は 0.02 g、0.1 g、0.2 g、0.6 g の米糠を 100 mL 容のフラスコに各々加え、それらフラスコに蒸留水 20 mL を添加しオートクレーブすることにより作製した。その懸濁液にIA株のLB培地での前培養液を1% (200 μL) 植菌し、 24°C 、120 rpm で5日間培養を行った。IA株の全菌数は希釈平板法により colony-forming units (CFU) を求

めることで算出した。胞子数は IA 株の培養液を 80°C、30 分間の熱処理後に希釈平板法を行い CFU から算出した。

燻炭米糠培地を用いた IA 株の固体培養

2 g の燻炭を入れた 100 mL 容のコニカルビーカーにそれぞれ 0.5% (w/w) の米糠懸濁液を 4 mL、6 mL、8 mL、10 mL、12 mL 添加し、オートクレーブすることで燻炭米糠培地を作製した。燻炭米糠培地に IA 株の LB 培地での前培養液を 20 μ L (燻炭 1 g 当たり 10 μ L) 植菌し、24°C で 5 日間静置培養を行った。燻炭培養物の全菌数は 5 mL チューブに培養物 0.2 g を回収し滅菌蒸留水 2 mL を添加後に 30 分間攪拌することにより得られる懸濁液を用いて希釈平板法により colony-forming units (CFU) を求めて算出した。胞子数は培養物懸濁液を 80°C、30 分間の熱処理後に希釈平板法を行い CFU から算出した。また添加した燻炭 1 g 当たりの全菌数と胞子数は燻炭培養物 1 g を 50°C 培養器の中で乾燥させることにより培養物の水分含有量を求め、その値から算出した。

4-3 結果および考察

IA 株によるフィターゼおよびシデロフォア生産能

Bacillus 属細菌は抗生物質生産能だけでなく植物の生長促進に寄与すると考えられているフィターゼやシデロフォアを生産する能力を有していることが知られている (Milagres et al. 1999, Gulati et al. 2007)。フィターゼは有機体リンであるフィチン酸からリン酸を可溶化させる酵素であり、シデロフォアは酸化鉄をキレートすることにより可給態にする化合物である。そこで IA 株によるフィターゼ生産およびシデロフォア生産能を検証した。フィターゼ生産能検証用培地である PSM 寒天とシデロフォア生産能検証用培地である CAS 寒天培地の中心に IA 株を植菌し培養を行った。

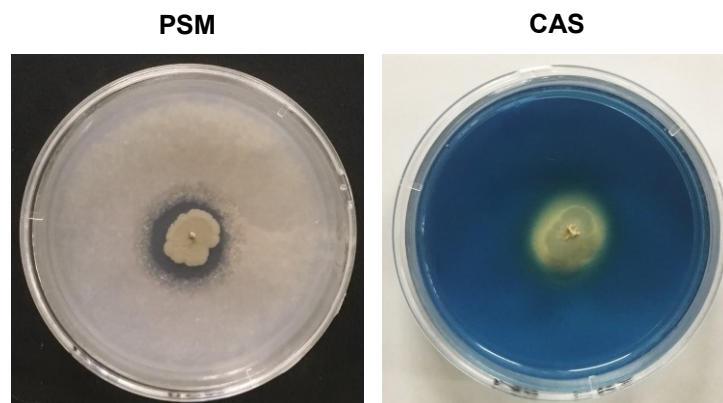


図 19 PSM 寒天と CAS 寒天培地における IA 株のフィターゼ生産能とシデロフォア生産能の検証。IA 株を各寒天培地の中心に植菌し培養した。

その結果、PSM 寒天では IA 株のコロニー形成とフィチン酸の可溶化によるクリアゾーンの形成が認められた (図 19)。CAS 寒天培地においても IA 株によるコロニー形成

と培地中の鉄のキレートによる青からオレンジ色への変色が認められた。以上の結果から IA 株がフィターゼとシデロフォアを生産しており、土壌への IA 株の接種が植物へのリン酸と鉄の取り込みを助ける可能性が示唆された。

IA 株によるキュウリの苗立枯病の感染防除試験

世界中に分布している *R. solani* は広い宿主範囲を示し、さらに感染時期によって同じ宿主であっても異なる症状を引き起こす病原菌である。植物体にとって幼苗期は組織が未熟であるために病原菌の攻撃を受けやすい。そのため幼苗期における感染防除は特に重要であるとされる (Lewis and Lumsden 2001)。そこで IA 株を用いることでキュウリの幼苗への *R. solani* K1 感染を防除できるか試験した。IA 株が約 10^9 cfu/pot 存在する土壌 (300 mL) でキュウリの栽培を行い、そこに *R. solani* K1 を植菌することで苗立枯病の感染防除能を評価した。図 20a に *R. solani* K1 の植菌 14 日目における IA 株の感染防除能を示す。IA 株を植菌していないポットでは 8 個体全てが倒伏したのに対し、IA 株を植菌したポットでは半数の 4 個体しか倒伏しなかった。また IA 株の植菌により枯死個体数においても低下が認められ、IA 株がキュウリ幼苗への *R. solani* K1 の感染を防除できることが示された。*R. solani* K1 を植菌して 7 日目と 14 日目における倒伏個体と枯死個体の割合を図 20b に示す。IA 株を植菌したポットでは 7 日目において 10% 近い倒伏個体率の減少と、さらに 15% の枯死個体率の減少が認められた。14 日目においては IA 株による防除効果がより顕著に認められ、IA 株による 30% 以上の倒伏個体率と枯死個体率の減少が認められた。

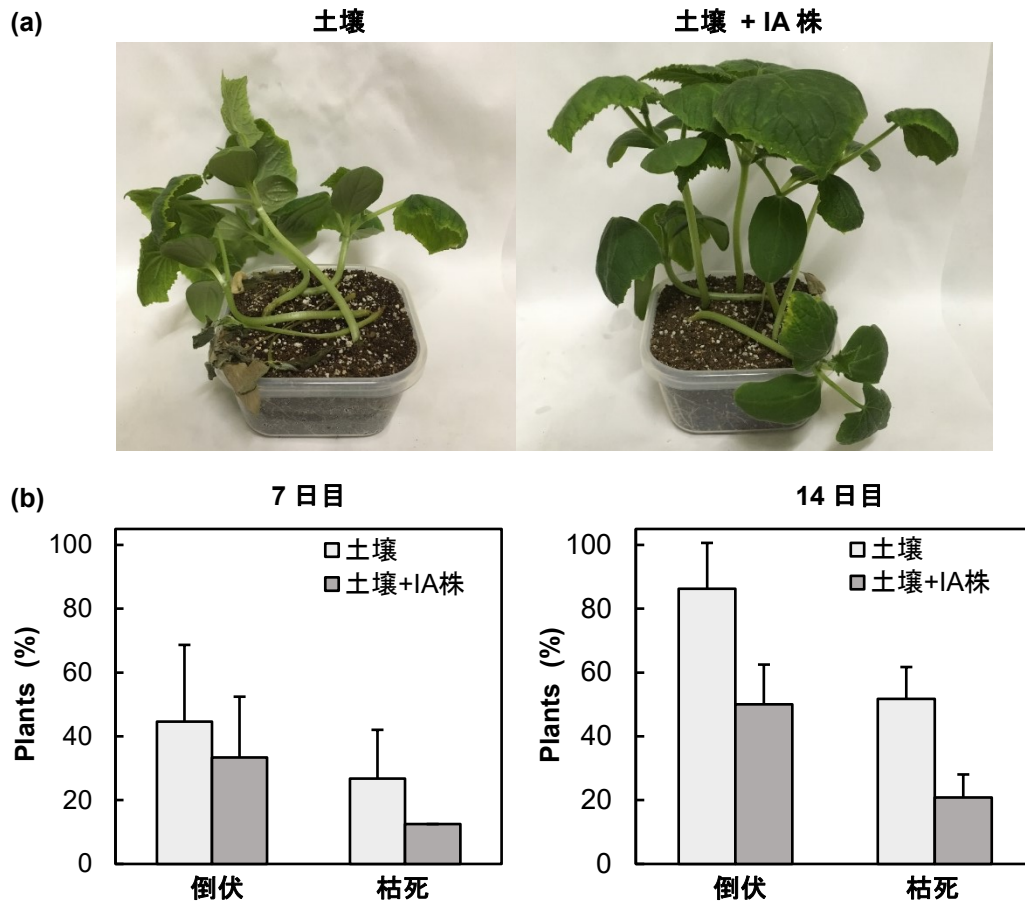


図 20 キュウリを用いた IA 株による *R. solani* K1 の感染防除試験。(a) *R. solani* K1 の植菌 14 日目における IA 株の防除能。(b) *R. solani* K1 の植菌 7 日目と 14 日目における倒伏個体と枯死個体の割合。個体数は 1 ポット当たり 7 もしくは 8 である。エラーバーは $n = 3$ の標準偏差を表す。

キュウリ幼苗での IA 株による感染防除試験を行った結果、IA 株により *R. solani* K1 による病害が軽減されることが分かった。IA 株が生産する iturin A は強い抗真菌活性を示すだけでなく、植物の防御応答を誘導することで病害レベルを軽減することが示唆されている (Yamamoto et al. 2015, Kawagoe et al. 2015)。そのため IA 株が *R. solani* K1 による病害を軽減したメカニズムとして、土壌中での iturin A 生産による *R. solani*

K1 の増殖抑制効果だけでなく、植物の防御応答の誘導も関係する可能性が考えられた。また土壌への炭の施用が植物の抵抗性に関与する防御シグナル伝達経路を活性化する可能性があることも報告されている (Elad et al. 2010 and 2012, Meller et al. 2012)。これらの研究から IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材は、土壌中での抗生物質生産による病害防除だけでなく、植物の抵抗性の向上による病害防除を兼ね備えた資材になることが期待される。

IA 株の培養における米糠の利用可能性

次に IA 株が米糠を培養基質として利用し、増殖できるか検証した。1% (w/v) 米糠寒天を作製し IA 株の画線培養を行った。その結果、米糠寒天上での IA 株の増殖が認められた (図 21)。また IA 株が生育した周辺は IA 株が存在しないところに比べて米糠の分解により培地が透明になっていることが観察され、IA 株が米糠を基質として利用していることが確認できた。さらに米糠 0.2 g を蒸留水 20 mL に懸濁して作製した 1%米糠懸濁液においても IA 株が増殖出来ることが示された (図 22)。



図 21 1% (w/v) 米ぬか寒天培地による IA 株の培養 (培養 5 日目)。

そこで IA 株の培養における最適な米糠懸濁液の濃度を求めるため、0.1-3.0% (w/v) の米糠懸濁液を作製し IA 株を培養、5 日目に菌数算定を行った。米糠懸濁液での IA 株の培養により全菌数と孢子数は米糠 (rice bran : RB) 濃度に依存して増加する傾向が認められた (図 22a)。

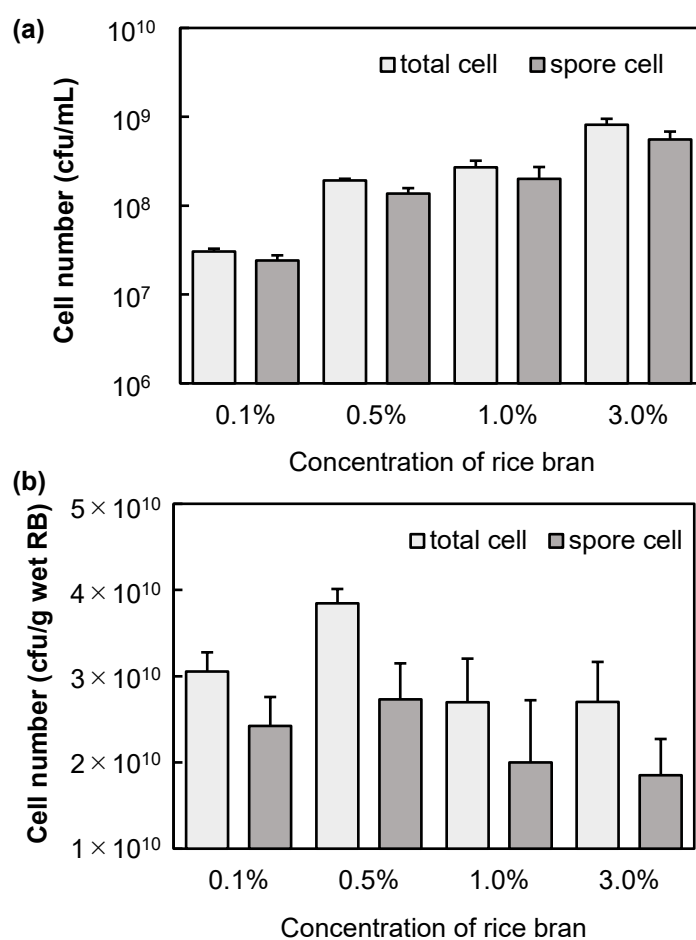


図 22 液体培養における米糠濃度が IA 株の増殖に及ぼす影響。培養 5 日目の米糠懸濁液 1 mL 当たり (a)、米糠 1 g 当たり (b) で換算した全菌数と孢子数を示し、エラーバーは $n = 3$ の標準偏差を表す。

しかし米糠などの未発酵の有機質材料を土壤に施用すると植物病原性の真菌を含む糸状菌の増殖を著しく増加させることが報告されており (野口 2003)、微生物資材を作製

する際には可能な限り米糠濃度を低くすることが望ましいと考えた。そこで IA 株による米糠の利用率と増殖の関係を調べるため、添加した米糠 1 g 当たりの菌数に換算した (図 22b)。その結果、米糠懸濁液 0.1、1.0、3.0%ではほとんど同等の全菌数と孢子数を示した。しかしながら 0.5%の米糠懸濁液では他の濃度より僅かに高い全菌数と孢子数を示し、最も効率よく米糠を利用して増殖していることが示唆された。この結果から IA 株の培養における米糠濃度は 0.5%が最適であると判断し、以後の実験では 0.5%米糠懸濁液を使用した。

IA 株の燻炭米糠培地での培養

IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材を作製する際、米糠を用いて培養した IA 株と燻炭を混ぜるのではなく、初めから燻炭と米糠を用いて培養することが出来ればそのまま資材化が可能であり、資材の作製プロセスが簡便になるのではないかと考えた。初めに IA 株が燻炭と米糠を用いた培地で培養できるのか検証した。2 g の燻炭に 10 mL の 0.5%米糠懸濁液を添加し作製した燻炭米糠培地に IA 株を植菌して 5 日間培養を行った (図 23a)。この時の IA 株前培養液の全菌数は 2×10^8 cfu/mL、孢子数は 6×10^4 cfu/mL だったことから植菌直後の乾燥燻炭 1 g 当たりの全菌数と孢子数はそれぞれ 2×10^6 cfu、 6×10^2 cfu と計算できる。そして 5 日間の培養後に乾燥燻炭 1 g 当たりの全菌数と孢子数はともに 4×10^8 cfu まで増加した。つまり IA 株の菌数が 200 倍に増加し、またそれらの細胞のほとんどが孢子化していることが分かった。

この実験から燻炭と米糠を組み合わせた燻炭米糠培地において IA 株の培養が可能で

あることが示された。また IA 株燻炭培養物を用いて植物病原性真菌 *R. solani* K1 に対する抗真菌活性試験を行ったところ強い抑制効果を示した (図 23b)。

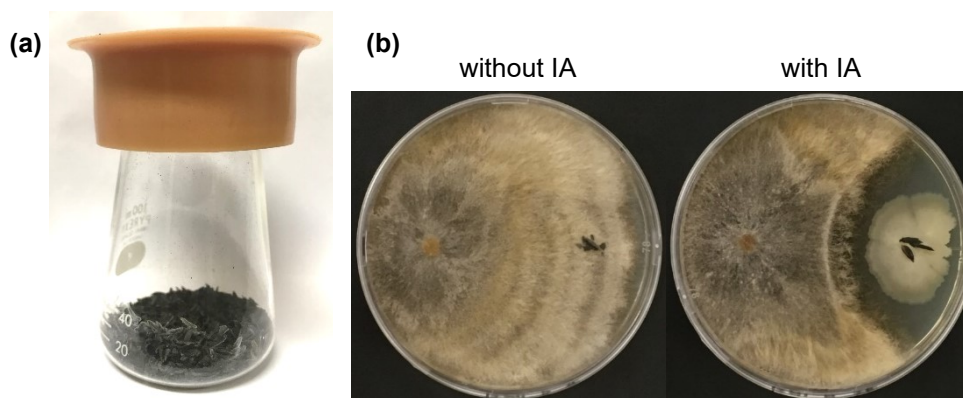


図 23 燻炭米糠培地での IA 株の培養(a)と IA 株燻炭培養物による *R. solani* K1 の抑制試験 (b)。左：未培養の燻炭米糠培地、右：IA 株燻炭培養物。

2 g の燻炭に 10 mL の 0.5%米糠懸濁液を添加した燻炭米糠培地を用いることで IA 株の培養が可能であることが分かった。しかしながら作製した微生物資材の保存中に混入した雑菌が増殖することを防ぎ、また資材を軽量化するために培養物を乾燥させることが重要だと考えた。そして早く乾燥させるためには添加する液体の量を出来る限り少なくすることが望ましい。そこで IA 株の培養に適した最低の米糠懸濁液の添加量を求めるため、燻炭 2 g に対して 0.5%米糠懸濁液を 4–12 mL の範囲で添加した燻炭米糠培地を作製し IA 株の培養を行った。5 日間の培養の結果、6 mL 以上の米糠懸濁液の添加により IA 株の全菌数が 10^8 cfu/g を上回った (図 24)。しかし培養物を乾燥させた後には孢子細胞しか残らないと考えられるため、孢子数に着目したところ 8 mL の米糠懸濁液の添加により IA 株の孢子数が 10^8 cfu/g を上回った (図 24)。この結果から燻炭 1 g あ

たり 4 mL の米糠懸濁液の添加が培養に適していることが示された。実際に IA 株燻炭培養物を乾燥させた後に菌数算定を行ったところ、孢子数と全菌数が同等の値を示し、全ての細胞が孢子化していることが示された。

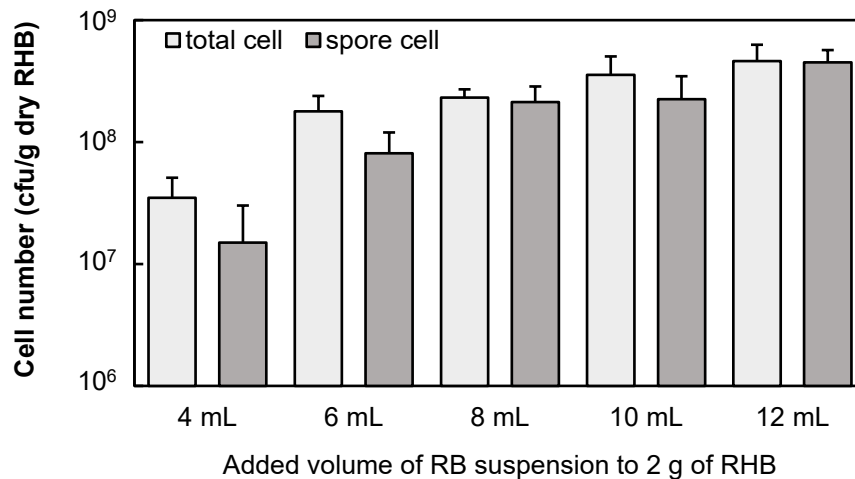


図 24 燻炭固体培養における米糠懸濁液 0.5% (v/w) の添加量の最適化。菌数は燻炭培養物 1 g (乾燥) 当たりで換算した全菌数と孢子数で示した。エラーバーは $n = 3$ の標準偏差を表す。

燻炭米糠培地を用いた IA 株の培養のスケールアップ

これまでの実験では燻炭 2 g、(高さ約 0.8 cm、容量約 16 mL) を用いて IA 株の培養を行った。微生物資材を開発するためには IA 株燻炭培養物の培養規模をスケールアップ可能であるか評価する必要があると考えた。*Bacillus* 属細菌などの好気性微生物をフラスコや試験管などで液体培養を行う際には通気を目的に振盪を行う (Doran 2013)。しかしながら一部の *Bacillus* 属細菌は液体培地を静置して培養を行うと気液界面にバイオフィーム形成する能力があることが知られている (Branda et al. 2001)。今回、使用

している未破碎の燐炭の大きさ（長径 7 mm、短径 2 mm）はビーカーなどの容器に充填すると燐炭間に隙間が生じる。さらに燐炭が多孔質であることから米糠懸濁液を保持することが考えられ、そのため米糠懸濁液を吸った燐炭一粒一粒の周りには通気せずとも空気が存在する環境になることが期待できる。このことから燐炭を高く積み上げても *Bacillus* 属細菌のような好気性菌の培養に適した環境となるのではないかと考えた。

そこで容積 250 mL と 1 L のプラスチックボトルを用意し、それぞれのボトルに燐炭を 120 mL（高さ約 4.5 cm、重量 15 g）、480 mL（高さ約 8.0 cm、重量 60 g）を充填、0.5%米糠懸濁液を 60 mL、240 mL を各々加えた燐炭米糠培地を作製した。この培地を用いて IA 株の培養を 5 日間行い、乾燥燐炭 1 g 当たりの孢子数を求めた。その結果、全ての容量において 10^8 cfu/g を上回る孢子数を示した（図 25）。この結果から高く積み上げた燐炭米糠培地において IA 株の培養が可能であり、大量培養するための方法になり得ることが示された。

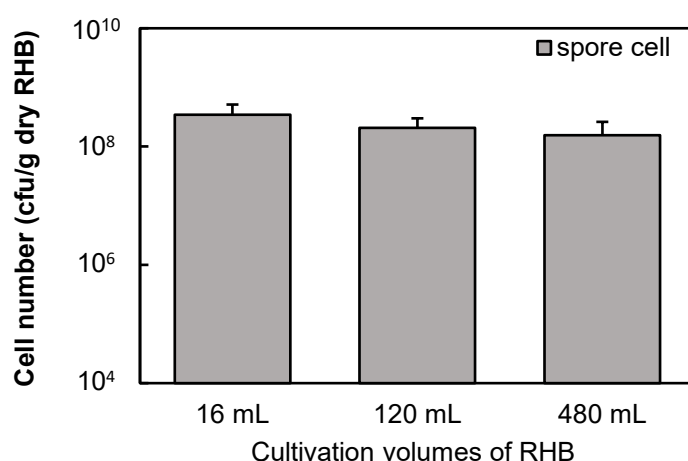


図 25 スケールアップした燐炭米糠培地での IA 株の培養。菌数は燐炭培養物 1 g（乾燥）当たりで換算した孢子数を示した。エラーバーは $n \leq 3$ の標準偏差を表す。

4-4 結論

IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材を開発するため、IA 株による植物生長促進活性の評価と IA 株と燻炭を組み合わせた培養方法の検討を行った。その結果、IA 株が植物生長促進に貢献すると報告されているフィターゼとシデロフォアの生産能を有していることが示唆された。キュウリ幼苗を用いた感染防除試験では IA 株が *R. solani* K1 による病害を軽減することを示した。そして IA 株が稲作廃棄物である米糠を基質として増殖できることが示された。さらに米糠懸濁液と燻炭を合わせた燻炭米糠培地を作製して IA 株の培養を行ったところ、IA 株の孢子数が燻炭 1 g 当たり 10^8 cfu を越える培養物が作製出来た。また燻炭米糠培地での IA 株の培養をスケールアップすることが可能であり大量生産できる可能性が示された。本研究により IA 株と燻炭を組み合わせた微生物資材は植物病原菌による病害防除だけでなく、植物生長促進効果も期待できる資材になることが示唆された。

第5章 総括

持続可能な社会を目指す上で、農業廃棄物や土壌微生物を有効に利用して作物生産を向上させる環境保全型農業への移行が求められている。そこで本研究では日本において古くから籾殻を焼成することで作製される土壌改良材である燻炭と土壌微生物の關係に着目し、燻炭を用いることで土壌微生物の増殖や植物生長促進活性を活性化することで作物生産の増加に寄与することが出来るのではないかと考えた。

第2章では燻炭により増殖が促進される微生物の探索を試みた。その結果、燻炭を添加した寒天培地上で *swarming motility* が促進される *Bacillus* 属細菌 IA 株の単離に成功した。さらに燻炭を添加した培地を用いて IA 株の液体培養を行うことで燻炭非添加の培地より高い全菌数と孢子数が認められ、特に孢子数は 10,000 倍近く高い値を示した。さらに燻炭添加培地の培養濾過上清を用いて植物病原菌である *Rhizoctonia solani* K1 に対する抗真菌活性試験を行ったところ増殖抑制効果が認められ、燻炭が IA 株の抗生物質生産も促進していることを明らかにした。IA 株が生産する抗生物質の同定を行ったところ、強い抗真菌活性を示すリポペプチド系の抗生物質 *iturin A* であることを明らかにした。また燻炭の添加量を増やすことで *iturin A* 生産量が最大で 8 倍増加することが分かった。以上のように燻炭存在下で代謝活性が促進する *Bacillus* 属細菌 IA 株の単離に成功し、IA 株と燻炭を用いることで植物病原菌の感染防除効果と燻炭による土壌の改良効果を併せ持つ微生物資材を開発できる可能性が示された。

第3章では燻炭が IA 株の増殖や孢子化、抗生物質生産を促進するメカニズムの解明を試みた。燻炭から溶出する微量金属元素と燻炭重量の約半分を占める二酸化ケイ素に

着目して実験を行った。その結果、マンガンイオンを培地に添加することで IA 株の孢子化と iturin A 生産が促進することを明らかにした。次に高純度の二酸化ケイ素から構成される鱗片状シリカを培地に添加して IA 株の培養を行ったところ iturin A 生産が促進された。また結晶構造を有する二酸化ケイ素が培地中の代謝阻害物質を吸着することが iturin A 生産の促進に寄与することが示唆された。さらにマンガンイオンと鱗片状シリカを組み合わせた培地で IA 株の培養を行うことで燻炭と同等の増殖と孢子化、iturin A 生産の促進効果が認められた。以上の結果から燻炭から溶出するマンガンイオンと燻炭に含まれる二酸化ケイ素が IA 株の代謝促進において重要であることを明らかにした。これらの結果はマンガンイオンと二酸化ケイ素を組み合わせることで燻炭により代謝が促進される微生物の探索や活性促進効果の検証を安定的に行う実験系を構築出来る可能性を示した。

第 4 章では *Bacillus* 属細菌 IA 株と燻炭を用いた微生物資材開発のための知見の集積を行った。IA 株がフィターゼやシデロフォアを生産し植物生長を促進できる可能性が示唆された。さらにキュウリを用いた *R. solani* K1 の感染防除試験において IA 株が倒伏個体率および枯死個体率を低下させることに成功した。IA 株の培養に稲作由来の廃棄物である米糠を用いたところ増殖と孢子化が認められ、微生物資材を開発する際に未利用有機資源である米糠が利用できることを示した。さらに燻炭と米糠を組み合わせた燻炭米糠培地において IA 株が培養できることを明らかにし、IA 株の孢子数が乾燥重量 1 g 当たり 10^8 cfu を越える培養物の作製に成功した。以上のように稲作廃棄物である燻炭と米糠を用いることで IA 株の培養に成功し、それは植物病原菌の感染を防除するだけ

でなく植物生長を促進する微生物資材となりうる可能性が示された。

本研究では燻炭と微生物の関わりを明らかにするとともに、その関係を利用した微生物資材の開発を目的として実験を行った。その結果、燻炭により増殖が促進される *Bacillus* 属細菌 IA 株の単離に成功した。また燻炭による IA 株の代謝促進が燻炭から溶出するマンガニオンと燻炭に含まれる二酸化ケイ素の相加的な効果によるものだと明らかにした。そして IA 株と稲作廃棄物である燻炭と米糠を用いることで病害防除と植物生長促進が期待できる微生物資材を開発できる可能性を示した。燻炭と IA 株の微生物資材による農業への施用効果のイメージを図 26 に示す。燻炭による植物への効果として土壌改良材としての生長促進効果や、炭で知られている防御応答の活性化等が期待できる。また燻炭による微生物への効果として、土壌中での IA 株の増殖と孢子化、抗生物質生産を促進することや他の微生物の植物生長促進作用を活性化することが期待できる。さらに IA 株による植物への効果として抗生物質生産による植物病原菌からの感染防除やフィターゼやシデロフォア生産による植物生長促進効果が期待できる。本研究において開発した農業廃棄物から作られる微生物資材は肥料や農薬に頼らない環境保全型農業に貢献する技術となるに違いない。

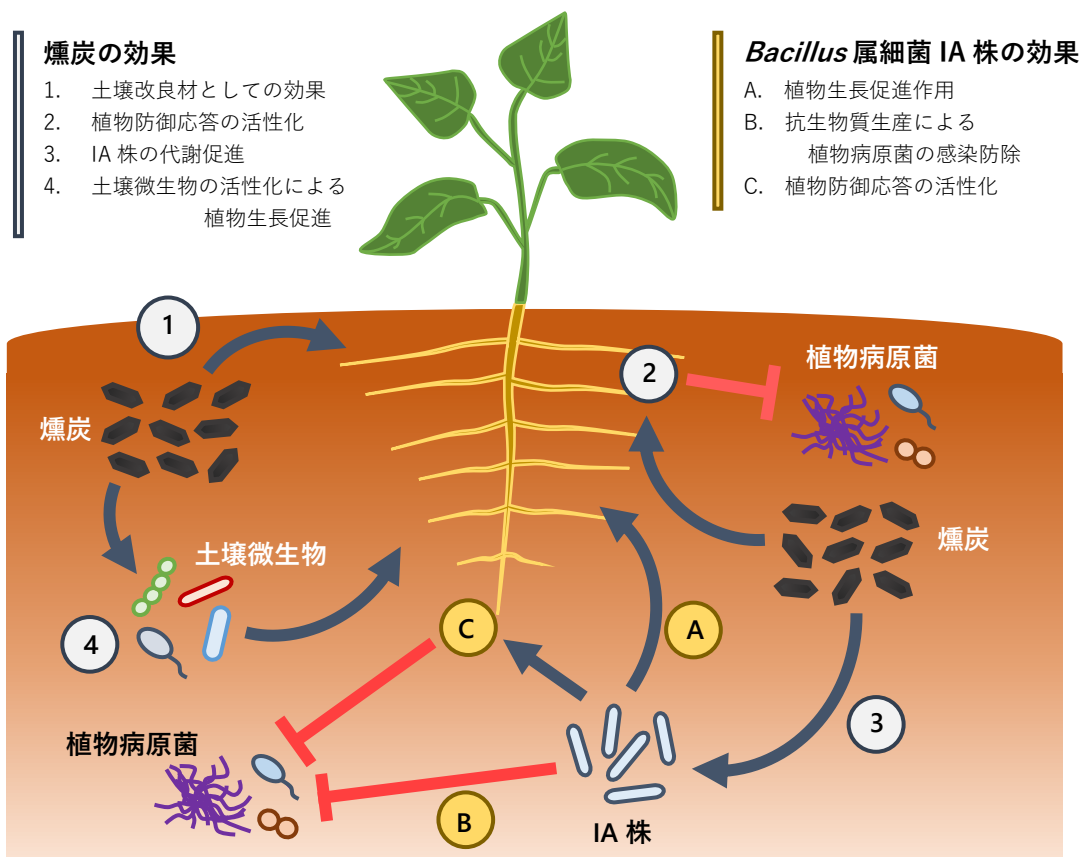


図 26 燻炭と *Bacillus* 属細菌 IA 株が作物栽培に与える影響の予想図。

参考文献

- Abrishamkesh S, Gorji M, Asadi H, Bagheri-Marandi GH, Pourbabaee AA (2016) Effects of rice husk biochar application on the properties of alkaline soil and lentil growth. *Plant, Soil and Environment* 61:475–482
- Alvarez J, Lopez G, Amutio M, Bilbao J, Olazar M (2015) Physical activation of rice husk pyrolysis char for the production of high surface area activated carbons. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 54:7241–7250
- Arrebola E, Jacobs R, Korsten L (2010) Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of applied microbiology* 108:386–395
- Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and environmental microbiology* 62:4081–4085
- Bansal V, Ahmad A, Sastry M (2006) Fungus-mediated biotransformation of amorphous silica in rice husk to nanocrystalline silica. *Journal of the American Chemical Society* 128:14059–14066
- Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17:478–486
- Berg G (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84:11–18
- Branda SS, Gonzalez-Pastor JE, Ben-Yehuda S, Losick R, Kolter R (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:11621–11626
- Chen H, Wang L, Su CX, Gong GH, Wang P, Yu ZL (2008) Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in applied microbiology* 47:180–186

- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22:107–149
- Doornbos RF, van Loon LC, Bakker PAHM (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32:227–243
- Doran PM (2013) Mass transfer. In: *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, pp 379–444
- Egamberdieva D, Hua M, Reckling M, Wirth S, Bellingrath-Kimura SD (2018) Potential effects of biochar-based microbial inoculants in agriculture. *Environmental Sustainability* 1:19–24
- Egamberdieva D, Kamilova F, Validov S, Gafurova L, Kucharova Z, Lugtenberg B (2007) High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology* 10:1–9
- Elad Y, Cytryn E, Harel YM, Lew B, Graber ER (2012) The biochar effect: plant resistance to biotic stresses. *Phytopathologia Mediterranea* 50:335–349
- Elad Y, David DR, Harel YM, Borenshtein M, Kalifa H Ben, Silber A, Graber ER (2010) Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *Phytopathology* 100:913–921
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2012) *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017) *Rice market monitor*, XX, 4
- Gao S, Wua A, Yua X, Qiana L, Gao X (2016) Swarming motility plays the major role in migration during tomato root colonization by *Bacillus subtilis* SWR01. *Biological Control* 98:11–17

- Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters* 251:1–7
- Graber ER, Meller HY, Koltun M, Cytryn E, Silber A, Rav David D, Tsechansky L, Borenshtein M, Elad Y (2010) Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant and Soil* 337:481–496
- Gulati HK, Chadha BS, Saini HS (2007) Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34:91–98
- Hirota R, Hata Y, Ikeda T, Ishida T, Kuroda A (2010) The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Bacteriology* 192:111–116
- Hsieh FC, Lin TC, Meng M, Kao SS (2008) Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A. *Current Microbiology* 56:1–5
- Huang X, Liu J, Wang Y, Liu J, Lu L (2015) The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 29:381–389
- Ishii T, Kadoya K (1994) Effects of charcoal as a soil conditioner on citrus growth and vesicular-arbuscular mycorrhizal development. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 63:529–535
- Jeong H, Jeong DE, Kim SH, Song GC, Park SY, Ryu CM, Park SH, Choi SK (2012) Draft genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613T. *Journal of bacteriology* 194:4148–4149

- Jien SH, Wang CC, Lee CH, Lee TY (2015) Stabilization of organic matter by biochar application in compost-amended soils with contrasting pH values and textures. *Sustainability* 7:13317–13333
- Kawagoe Y, Shiraishi S, Kondo H, Yamamoto S, Aoki Y, Suzuki S (2015) Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in *Arabidopsis* plants by activating SA and JA signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460:1015–1020
- Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews Microbiology* 8:634–44
- Kearns DB, Losick R (2004) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 49:581–590
- Kodoth PS, Rajeswari M, Alice D, Thiruvengadam R (2015) Exploiting novel rhizosphere *Bacillus* species to suppress the root rot and wilt pathogens of chickpea. *African Journal of Microbiology Research* 9:1098–1104
- Lee MH, Lee J, Nam Y Do, Lee JS, Seo MJ, Yi SH (2016) Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from *chungkookjang*, a Korean traditional fermented soybean food. *International Journal of Food Microbiology* 221:12–18
- Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D (2011) Biochar effects on soil biota – A review. *Soil Biology and Biochemistry* 43:1812–1836
- Lewis JA, Lumsden RD (2001) Biocontrol of damping-off of greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 20:49–56
- Lin HY, Koteswara Y, Wu WS, Tzeng YM (2007) Ferrous ion enhanced lipopeptide antibiotic iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* B128. *International Journal of Applied Science and Engineering* 5:123–132

- Malfanova N, Kamilova F, Validov S, Shcherbakov A, Chebotar V, Tikhonovich I, Lugtenberg B (2011) Characterization of *Bacillus subtilis* HC8, a novel plant-beneficial endophytic strain from giant hogweed. *Microbial Biotechnology* 4:523–532
- Meidong R, Doolgindachbaporn S, Jamjan W, Sakai K, Tashiro Y, Okugawa Y, Tongpim S (2017) A novel probiotic *Bacillus siamensis* B44v isolated from Thai pickled vegetables (*Phak-dong*) for potential use as a feed supplement in aquaculture. *The Journal of General and Applied Microbiology* 63:246–253
- Meller YH, Elad Y, David D, Borenstein M, Shulchani R, Lew B, Graber ER (2012) Biochar mediates systemic response of strawberry to foliar fungal pathogens. *Plant and Soil* 357:245–257
- Milagres AMF, Machuca A, Napoleão D (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 37:1–6
- Mizumoto S, Hirai M, Shoda M (2007) Enhanced iturin A production by *Bacillus subtilis* and its effect on suppression of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:1267–1274
- Ogawa M, Okimori Y (2010) Pioneering works in biochar research, Japan. *Australian Journal of Soil Research* 48:489–500
- Oliveira M dos S, Feddern V, Kupski L, Cipolatti EP, Badiale-Furlong E, de Souza-Soares LA (2011) Changes in lipid, fatty acids and phospholipids composition of whole rice bran after solid-state fungal fermentation. *Bioresource Technology* 102:8335–8338
- Ongena M, Jacques P (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology* 16:115–125

- Orłowska E, Godzik B, Turnau K (2012) Effect of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates on growth and arsenic accumulation in *Plantago lanceolata* L. *Environmental Pollution* 168:121–130
- Patrick JE, Kearns DB (2009) Laboratory strains of *Bacillus subtilis* do not exhibit swarming motility. *Journal of Bacteriology* 191:7129–7133
- Payne SM (1994) Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in enzymology* 235:329–344
- Phae CG, Shoda M, Kita N, Nakano M, Ushiyama K (1992) Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. *Japanese Journal of Phytopathology* 58:329–339
- Phongthai S, Rawdkuen S (2015) Preparation of rice bran protein isolates using three-phase partitioning and its properties. *Food and Applied Bioscience Journal* 3:137–149
- Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJW, Voesenek LACJ (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science* 11:176–183
- Rao GR, Sastry ARK, Rohatgi PK (1989) Nature and reactivity of silica available in rice husk and its ashes. *Bulletin of Materials Science* 12:469–479
- Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola E, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M, Pérez García A (2007) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe interactions* 20:430–440
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425

- Santoyo G, Orozco-Mosqueda M del C, Govindappa M (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology* 22:855–872
- Setlow P (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101:514–525
- Sharma M, Anand SK (2002) Swarming: A coordinated bacterial activity. *Current Science* 83:707–715
- Sheng XF, Zhao F, He LY, Qiu G, Chen L (2008) Isolation and characterization of silicate mineral-solubilizing *Bacillus globisporus* Q12 from the surfaces of weathered feldspar. *Canadian Journal of Microbiology* 54:1064–1068
- Slepecky RA, Hemphill HE (2006) The genus *Bacillus*—nonmedical. In: *The Prokaryotes*. Springer US, New York, pp 530–562
- Smebye A, Alling V, Vogt RD, Gadmar TC, Mulder J, Cornelissen G, Hale SE (2016) Biochar amendment to soil changes dissolved organic matter content and composition. *Chemosphere* 142:100–105
- Sumpavapol P, Tongyonk L, Tanasupawat S, Chokesajjawatee N, Luxananil P, Visessanguan W (2010) *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (*poo-khem*) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:2364–2370
- United Nations (2017) *World Population Prospects. The 2017 Revision*
- Unno Y, Okubo K, Wasaki J, Shinano T, Osaki M (2005) Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environmental Microbiology* 7:396–404

- van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A (2018) Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl* 63:39–59
- Van Zwieten L, Kimber S, Morris S, Chan KY, Downie A, Rust J, Joseph S, Cowie A (2010) Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. *Plant and Soil* 327:235–246
- Vassilev N, Malusa E, Requena AR, Martos V, López A, Maksimovic I, Vassileva M (2017) Potential application of glycerol in the production of plant beneficial microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 44:735–743
- Venieraki A, Tsalgaidou PC, Georgakopoulos DG, Dimou M, Katinakis P (2016) Swarming motility in plant-associated bacteria. *Hellenic Plant Protection Journal* 9:16–27
- Wang W, Martin JC, Fan X, Han A, Luo Z, Sun L (2012) Silica nanoparticles and frameworks from rice husk biomass. *ACS Applied Materials and Interfaces* 4:977–981
- Warnock DD, Lehmann J, Kuyper TW, Rillig MC (2007) Mycorrhizal responses to biochar in soil – concepts and mechanisms. *Plant and Soil* 300:9–20
- Yamamoto S, Shiraishi S, Suzuki S (2015) Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? *Letters in Applied Microbiology* 60:379–386
- Yamato M, Okimori Y, Wibowo IF, Anshori S, Ogawa M (2006) Effects of the application of charred bark of *Acacia mangium* on the yield of maize, cowpea and peanut, and soil chemical properties in South Sumatra, Indonesia. *Soil Science and Plant Nutrition* 52:489–495

- Yang H, Liu B, Chen Y, Li B, Chen H (2015) Influence of inherent silicon and metals in rice husk on the char properties and associated silica structure. *Energy & Fuels* 29:7327–7334
- Yu G, Sinclair J, Hartman G, Bertagnolli B (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* 34:955–963
- 三郎高野, 俊金子, 敬子泉 (1986) 農薬の歴史的変遷について. *生活科学研究* 8:61–69
- 嘉田良平 (1993) 環境保全型農業の課題と方向. *日本農薬学会誌* 18:S201–S206
- 竹腰恵 (2018) 微生物農薬・微生物資材の現状. In: 豊田剛己 (ed) *土壤微生物学*, 1st edn. 朝倉書店, pp 171–172
- 西尾道徳 (2002) 土壤微生物と物質循環: 1. 物質循環に起因した農業・環境問題と土壤微生物. *日本土壤肥料学雑誌* 73:185–191
- 豊田剛己 (2018) 植物病原微生物の種類と制御. In: 豊田剛己 (ed) *土壤微生物学*, 1st edn. 朝倉書店, pp 88–109
- 農林水産省 (2018) 環境保全型農業の推進について: 生産局農業環境対策課
- 野口勝憲 (2003) 有機質肥料と有効微生物利用による微生物資材の開発. *日本土壤肥料学雑誌* 74:593–596

原著論文

Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano (2019) Components of rice husk biochar in promoting the growth, sporulation and iturin A production of *Bacillus* sp. strain IA. *Zeitschrift für Naturforschung C*. (proof print)

Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Tetsuya Matsukawa, Masahiro Okanami, Shin'ichiro Kajiyama, Takashi Ano (2019) Promotion of lipopeptide antibiotic production by *Bacillus* sp. IA in the presence of rice husk biochar. *Journal of Pesticide Science*. volume 44, issue 1, pages 33-40.

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導していただいた環境生物工学研究室の阿野貴司教授と岡南政弘講師に心より感謝致します。先生方から研究の面白さだけでなく研究に取り組む姿勢を教えていただいたおかげで現在の私があると思っています。本研究をまとめるにあたり、ご助言、ご指導をしていただきました秋田求教授にこの場を借りてお礼を申し上げます。化合物の同定でお世話になっただけでなく、論文投稿の際にもご相談に乗っていただきました生物機能物質工学研究室の梶山慎一郎教授と松川哲也講師に深く御礼申し上げます。そして同じ研究室でともに学び、実験を行ってきた環境生物工学研究室の皆様にも感謝致します。