

## 微生物由来揮発性抗菌活性物質の探索

大池 達矢<sup>1</sup>, 江邊 正平<sup>1</sup>, 松川 哲也<sup>1</sup>, 岡南 政宏<sup>1</sup>, 梶山 慎一郎<sup>1</sup>, 阿野 貴司<sup>1</sup>

### 要旨

本研究では、環境土壌から単離した細菌が生産する揮発性有機化合物(Microbial Volatile Organic Compounds : MVOCs)に着目し、MVOCsによる植物病原菌に対する抗真菌活性を試験した。また、植物病原菌に対して強い抗真菌活性を示した細菌を4株選抜し、それらのMVOCsのGC/MS分析を試みた。MVOCsによる抗真菌活性の結果、*Monilinia fructigena*は、使用した植物病原菌の中で最もMVOCsに高い感受性を示す植物病原菌であり、今回使用した20株の細菌全てにおいて、75%以上の増殖抑制率を示した。一方で、*Rhizoctonia solani*および*Fusarium oxysporum*は比較的MVOCsに対し高い感受性を示さず、強い抗真菌活性を示す細菌は少数であった。GC/MS分析の結果、細菌由来のMVOCsは6つ検出され、その内3つのpeakについてライブラリーとの比較によって同定した。

キーワード：揮発性有機化合物、抗真菌活性、微生物農薬

### 1. 緒論

自然環境中において微生物は自身の生育のために様々な抗菌活性物質を生産することが知られている。これらの微生物が生産する抗菌活性物質の一部は、有用物質として我々の生活の中で使用されており、抗生物質や農薬、医薬品として幅広く利用されてきた。特に近年では、作物生産における植物病害防除の研究が盛んに行われている。現行の病害防除の方法は、一般的に化学農薬が主体となっているが、環境や人体に対する影響への懸念や近年のオーガニックフードの需要増加などによって、化学農薬の使用を減らす取り組みが行われている<sup>(1)</sup>。微生物由来である生物防除剤は、比較的環境への負荷が低い防除方法とされており、*Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属、*Trichoderma* 属、放線菌などを用いた研究が報告されている<sup>(2-4)</sup>。しかしながら、このような微生物を用いた抗菌活性物質の研究の多くが不揮発性の抗菌性物質であり、微生物由来の揮発性抗菌活性物質の報告はそれらと比較すると少ないのが現状である。また、揮発性の抗菌活性物質を主体とした微生物製剤や農業資材はほとんど実用化されていない。

近年、一部の微生物が生産する揮発性有機化合物(Microbial Volatile Organic Compounds : MVOCs)が他の微生物の生育に影響を与えると報告されている。例えば、*Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属の細菌によって生産されるMVOCsが植物に対して病原性を有する真菌や細菌に対しても抗菌活性を示し、様々な病原性を低下させる事が報告されている<sup>(1,5)</sup>。また、抗菌活性のみならず、*P. fluorescens* が生産する2-butanoneなどのMVOCsはシロイヌナズナの生長を促進することも報告されており、MVOCsは、広義的な農薬の概念として幅広い可能性を有している<sup>(6)</sup>。このように、MVOCsは様々な活性を示すことから作物病害の防除剤としての利用や農作物の輸送、貯蔵などに関連するポストハーベストへの利用、植物生長促進を期待した製剤など様々な農業資材としての可能性を有していると考えられる。

原稿受付 2020年1月20日、受理日 2020年2月26日

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科, 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

しかしながら、その一方で、抗真菌活性を有する MVOCs 生産菌やその化合物に関する知見は少なく、MVOCs と抗真菌活性および複数の植物病原菌への効果などの関連性も明確になっていないのが現状である。よって本研究では、MVOCs を微生物農薬として利用する為の基礎的知見を得るため、環境土壌から採取した細菌の植物病原菌に対する揮発性の抗真菌活性試験および MVOCs の同定を試みた。また、今回得られた MVOCs と抗真菌活性の結果から、植物病原菌と MVOCs の関連性についても報告する。

## 2. 材料と方法

### 2. 1 微生物

揮発性抗真菌活性試験に使用した細菌は、環境中から採取した 360 菌群の中から単離し、*Rhizoctonia solani* に対して抗真菌活性を示す 20 株を選抜した。これらの細菌の培養には、1/10 TSA 培地を使用した。1/10 TSA は、Polypepton-S 0.2%(日本製薬株式会社), glucose 0.025%, NaCl 0.05%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.025 %, agar 1.5%)で保存した。また、植物病原菌は、*Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* SBD, *Monilinia fructigena*, *Rhizoctonia solani* K-1 の 4 種を使用し、終濃度 ampicillin 20 µg/mL と kanamycin 50 µg/mL を含む Potato Dextrose Agar 培地で保存した。全て室温(25±1℃)で培養を行った。

### 2. 2 MVOCs による抗真菌活性試験

単離菌 20 株が生産する MVOCs による抗真菌活性試験を行った。試験方法は、Huang らの方法を改変し行った<sup>(7)</sup>。2 mL の 1/10 TSB 培地に植菌し、室温、200 rpm で 2 日間振盪培養した。各培養液 100 µL を TSA 培地に全面塗布し、室温で 3 日間培養した。培養後、各菌株の培地と植物病原菌の寒天片(φ 6 mm)を中心に置いた TSA 培地を上下に組み合わせ、パラフィルムで密封し、培養を行った(図 1)。またコントロールとして、同様に未植菌の TSA 培地と植物病原菌を植菌した TSA 培地を上下に組み合わせ、培養を行った。植物病原菌の生育面積から抑制率を算出し(式 1)、生育抑制能の有無を評価した。試験したシャーレは、全て 9 cm シャーレ(体積; 130 mL)に各培地を 15 mL 加えて作製し、空気層は 100 mL となるように調整した。

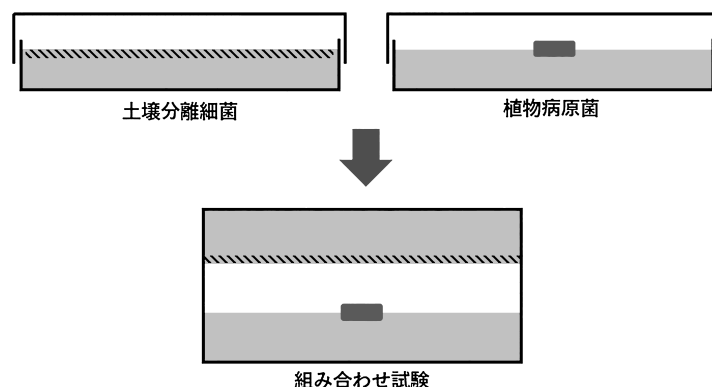


図 1 組み合わせ試験の模式図

$$\text{抑制率(\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{真菌生育面積 (MVOCs処理)}}{\text{真菌生育面積 (コントロール)}} \right] \times 100 \quad \dots \text{式 1}$$

## 2. 3 MVOCs の GC/MS 分析

MVOCs による抗菌活性が認められ、強い抗真菌活性を有していた 4 株について GC/MS 分析を試みた。まずは、GC/MS を用いて各菌株が生産する MVOCs の抗菌活性物質を分析した。1/10 TSB 培地を 2 mL 加えた試験管で 200 rpm、室温で 2 日間振盪培養した。各培養液を TSA 培地に 100  $\mu$ L 塗布し、室温で 3 日間静置培養した。MVOCs の抽出は、Mono Trap<sup>TM</sup> (DCC18, GL Sciences)を用いて行った。蓋が下になるように置いたシャーレ内に Mono Trap を設置し、3 日間 MVOCs を吸着させた。また、コントロールとして細菌を植菌していない TSA 培地を用いて同様の操作を行った。Mono Trap をバイアルに回収し、ジクロロメタン 200  $\mu$ L 加え、5 分間超音波処理を行い抽出した。抽出液を GC/MS (SHIMADZU QP-2010 Ultra)を用いて分析した。分析条件は、カラム Rtx-5MS(28.2 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m)、全流速 10.4 mL/sec、キャリアガスは He、線速度 46.4 cm/sec、スプリットなし、カラム温度 50 $^{\circ}$ C で 0-5 分保持し、5-20 分の間に 50-200 $^{\circ}$ C に上昇、20-25 分の間 200 $^{\circ}$ C で保持し、イオン源温度 200 $^{\circ}$ C、インターフェイス温度 280 $^{\circ}$ C、スキャン範囲 m/z 35-500、イオン化法は電子イオン化法(EI)で行った。得られた各ピークの MS スペクトルについては、NIST ライブラリーとのシミラリティー検索により化合物の同定を行った。

## 3. 結果と考察

本研究では、新たな農業資材の実用化に向けた基礎的な知見を得るため、微生物が生産する揮発性の抗真菌活性物質に着目した。まず、環境土壤中から 360 の菌群を採取し、対峙培養および植物病原菌 *R. solani* に対する抗真菌活性試験を行うことで、20 株の MVOCs 生産菌を選抜した。次に、これらの 20 株の細菌の MVOCs における抗真菌スペクトルを検証するため、4 種の植物病原菌(*R. solani*、*F. oxysporum*、*M. fructigena*、*S. rolfsii*)を用いた試験を行った。その結果、*R. solani* および *F. oxysporum* は今回の試験の中では比較的 MVOCs に対して高い感受性を示さず、強い抗真菌活性を示す細菌は少数であった(図 2 A, B)。*R. solani* と *F. oxysporum* に対して 60%以上の抑制率を示した土壌分離細菌の菌株数はそれぞれわずか 3 株 (MYI, OME1, THS2) と 4 株 (KIE, NGT, SZK, TNN2) であった。一方で *M. fructigena* は、本試験の中で最も MVOCs に高い感受性を示す植物病原菌であり、今回使用した土壌分離細菌 20 株全てによって増殖が 75%以上抑制された (図 2 C)。*S. rolfsii* は、*M. fructigena* 程感受性が高くなかったものの、土壌分離細菌 19 株によってその増殖が 60%以上抑制され、その内 9 株で 75%以上抑制された。特に THS2 は最も強く *S. rolfsii* を抑制した(図 2 D)。これらの結果から、*F. oxysporum* と *S. rolfsii* に強い抑制を示す TNN1、*R. solani* に強い抑制を示す MYI、*F. oxysporum* に強い抑制を示す SZK、*R. solani* と *S. rolfsii* に強い抑制を示す THS2 の 4 株を選抜し、MVOCs の GC/MS 分析に使用した。

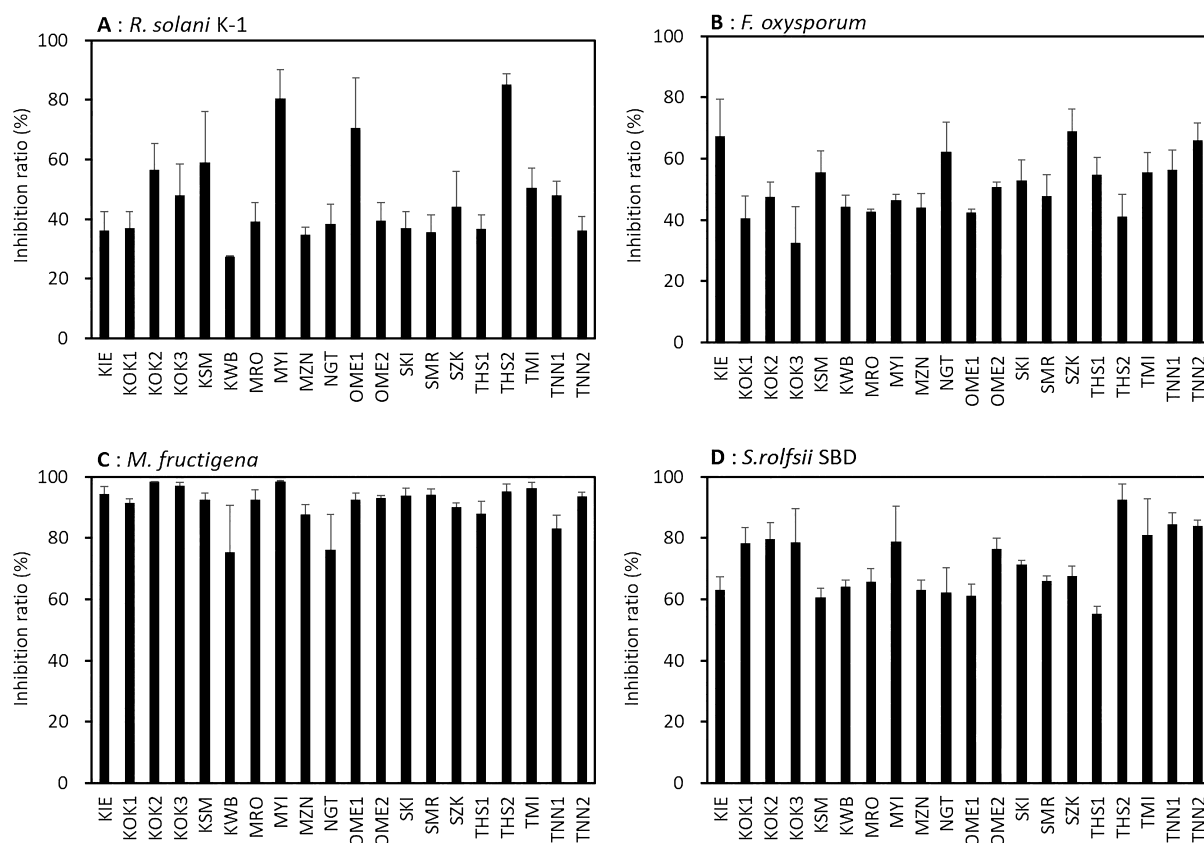


図 2 細菌 20 株の MVOCs による抗真菌活性

A : *R. solani* に対する抗真菌活性、B : *F. oxysporum* に対する抗真菌活性

C : *M. fructigena* に対する抗真菌活性、D : *S. rolfsii* に対する抗真菌活性

選抜した細菌 4 株を用いて GC/MS 分析を行った。各菌株の MVOCs は、活性炭を主体とした吸着材で回収し、溶媒抽出したものを GC/MS 分析に供した。図 3 にはまず、選抜した 4 株の total ion chromatogram (TIC) を示す。コントロールとして PDA 培地の VOCs を測定し、培地由来の VOCs と MVOCs を区別した。その結果、retention time (RT) の順に peak 1-6 までの MVOCs が検出された。各々のピークの RT は順に 7.2、7.9、10.4、12.7、16.2、23.8 min であった。各菌株において、TNN1 は peak 2, 3, 4 が検出され (図 3 A)、MYI は今回の試験の中では最も多く MVOCs が検出され、peak 3 を除く 5 つが検出された (図 3 B)。SZK および THS2 は peak 3, 6 が検出された (図 3 C, D)。



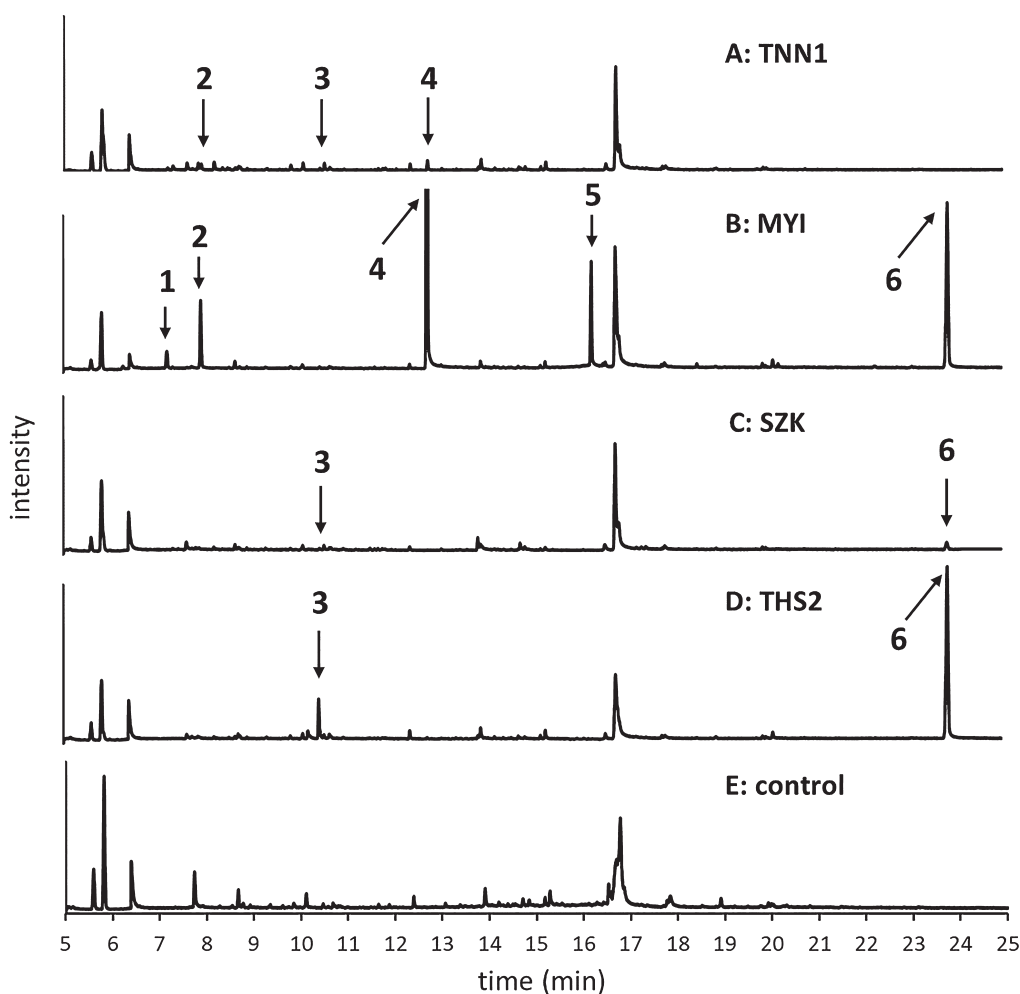


図 3 各細菌が生産する MVOCs の GC/MS 分析

MVOCs は活性炭を主体とした吸着材で回収し、溶媒抽出したものを GC/MS 分析に供した。

培地由来の VOCs は除き、細菌由来の MVOCs と判断したものを RT 順に peak1-6 とした。

A : TNN1 由来 MVOCs の TIC、B : MYI 由来 MVOCs の TIC

C : SZK 由来 MVOCs の TIC、D : THS2 由来 MVOCs の TIC

E : Control (PDA 培地由来 VOCs の TIC)

次に各ピークの MS スペクトルを分析した結果を図 4 に示す。GC/MS 分析およびライブラリー検索の結果、peak 1 は、硫黄を含む化合物である thiopivalic acid であると考えられる(図 4 A, B)。本化合物の抗真菌活性試験は病原性酵母に対して行われているものの、活性は認められていなかったため、生産菌である MYI の抗真菌活性は別の化合物である可能性が示唆された<sup>(8)</sup>。続いて、peak 2 の化合物は、こちらも硫黄を含む化合物である dimethyl trisulfide であると同定した(図 4 C, D)。この化合物は、*Shewanella algae* や *Bacillus* 属細菌などの幅広い菌で生産されており、*Aspergillus flavus* などの真菌だけでなく、*Serratia marcescens* や *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus* などの細菌に対する抗菌活性などが報告されている<sup>(9,10)</sup>。

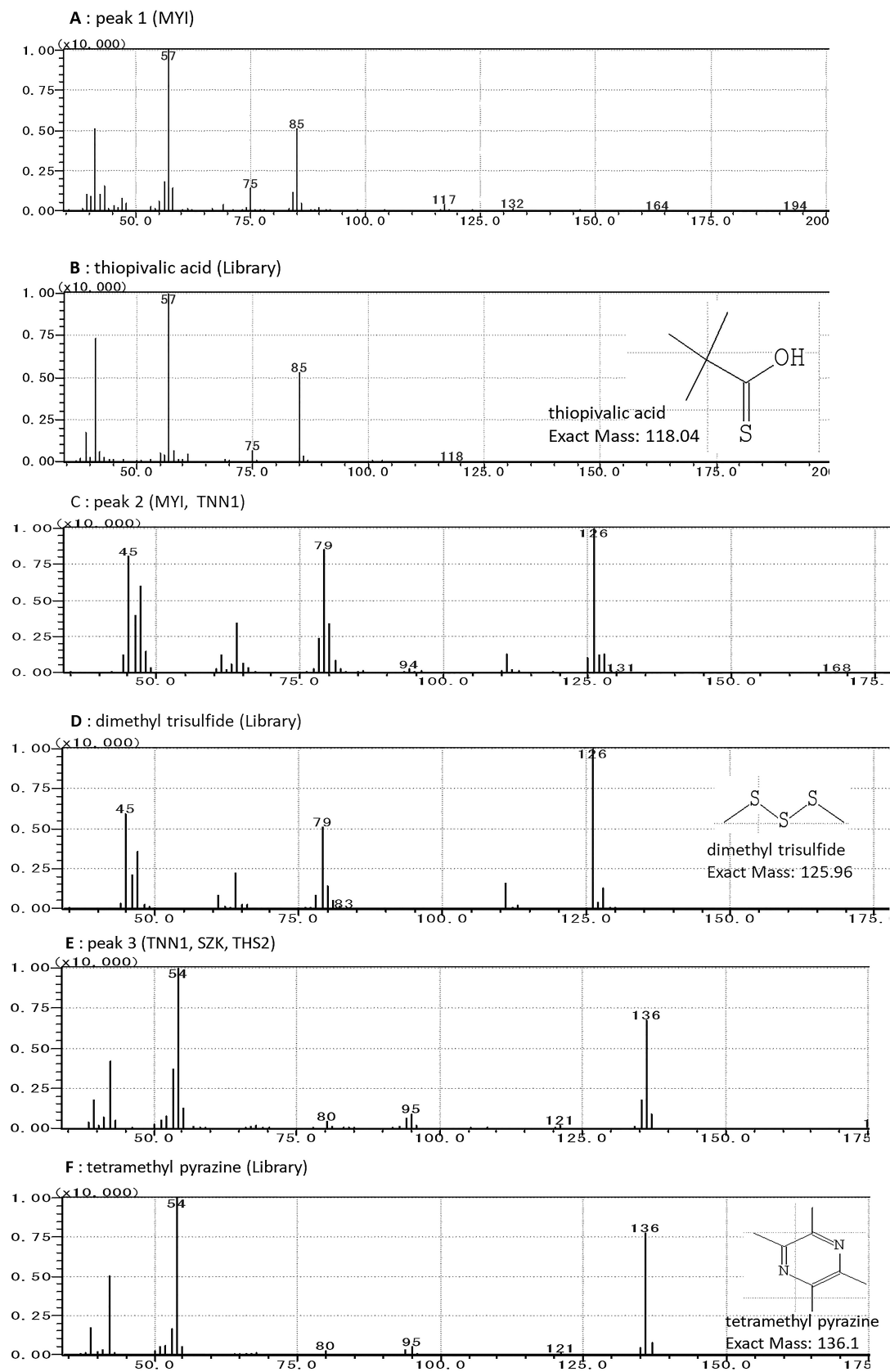


図 4 GC/MS 分析によって得られた MVOCs (peak 1-3) の MS スペクトル

A : peak 1 の MS スペクトル、B : thiopivalic acid の MS スペクトル

C : peak 2 の MS スペクトル、D : dimethyl trisulfide の MS スペクトル

E : peak 3 の MS スペクトル、F : tetramethyl pyrazine の MS スペクトル

Peak 3 はライブラリー検索の結果、tetramethyl pyrazine であると同定した(図 4 E, F)。本化合物も *Stenotrophomonas rhizophila* P69 による生産が報告されており、他にも methyl pyrazine、dimethyl pyrazine、trimethyl pyrazine の生産が報告されている<sup>(11)</sup>。この中でも trimethyl pyrazine は *Fusarium solani* の菌糸生長を阻害すると報告されているが<sup>(12)</sup>、tetramethyl pyrazine に関しては文献調査の結果、抗真菌活性試験の報告がなされていないため、標品を用いた抗真菌活性試験が必要である。

本研究では MVOCs として後 3 つの化合物を検出しており、GC/MS 分析において peak 4-6 それぞれの  $m/z$  は順に 158、190、256 の分子イオンを持つ化合物であると推測しているが、今のところ同定には至っておらず、今後より詳細な分析が必要であると考えられる。その一方で、これらの化合物の分子イオンに同位体の  $M+2$  のピークがいずれも検出されており、dimethyl trisulfide などの硫黄化合物も検出されていることから peak 4-6 の化合物も硫黄を含む化合物ではないかと考えられる。

最後に、これらの MVOCs による抗真菌活性と peak 1-6 までの化合物を比較したところ、*R. solani* においては、MYI と THS2 の 2 種の細菌において高い抗真菌活性が認められていることから、共通する peak 6 が *R. solani* に対して強い抗真菌活性を有しているのではないかと考えられる。Peak 6 の化合物は未同定ではあるが、硫黄を含む化合物ではないかと推測しており、MYI においては dimethyl trisulfide の生産も認められていることから、硫黄を含む MVOCs が *R. solani* の防除に有効ではないかと推測される。また、*S. rolsii* においては、抗真菌活性の強さの順に THS2、TNN1、MYI、SZK であったことから、peak 3 が抗真菌活性に影響しているのではないかと考えられる。Peak 3 は、tetramethyl pyrazine であると同定したものの、抗真菌活性に関しては不明であることから他の pyrazine 類を含め抗真菌活性について追及する必要がある。*M. fructigena* および *F. oxysporum* に関しては、本試験において抗真菌活性として有効な MVOCs を推定することができなかった。前者は感受性が高い結果、使用した細菌全てにおいて強く抑制され、後者は MVOCs による抑制は認められるものの、今回の試験において分析した化合物 peak との関連性を見い出すことができなかった。しかしながら、*F. oxysporum* に抗真菌活性を示す MVOCs は今回注目した化合物以外の MVOCs である可能性が高く、pyrazine 類および dimethyl trisulfide などの硫黄を含む化合物ではない別の化合物であると推測している。

本研究では、植物病原菌の生育を抑制する MVOCs 生産菌とそれらが生産する化合物を 3 種同定することができた。MVOCs による農業資材への利用は、一時的な密閉空間内で処理することにより、作物の表面全体を処理することができ、換気によってすぐさま処理を終了させることができるなどの利点を有している。MVOCs による農業資材が実用化されれば、貯蔵庫内やコンテナ内での保存や輸送中の抗菌処理などの利用も期待される。また、本研究において MVOCs による抗真菌活性は植物病原菌毎に感受性が大きく異なることが示されていることから、各作物、各植物病原菌に強い抑制活性を示す MVOCs やその生産菌が必要となる。よって今後、MVOCs を農業資材として活用するためにはより多くの MVOCs 生産菌やその化合物について知見を収集することが重要であると考えられる。

#### 4. 結論

本研究では、環境土壌中から植物病原菌に対する抗真菌活性を有する MVOCs 生産菌を 4 株単離した。GC/MS 分析の結果から 6 つの化合物を MVOCs として検出した。ライブラリー検索の結果、6 つの化合物の内、thiopicvalic acid、dimethyl trisulfide、tetramethyl pyrazine の 3 つの MVOCs を同定することができた。これらの MVOCs のうち、明確に強い抗真菌活性が報告されていたのは dimethyl trisulfide のみであり、他の MVOCs に関しては標品を用いた抗真菌活性を行う必要がある。また、今回は未同定であ

った残りの化合物は、分子イオンピークに特徴的な同位体ピークが検出されていることから硫黄を含む化合物ではないかと推測している。今後これらの化合物を同定し、標品を用いた抗真菌活性を行い、MVOCsの農業資材としての利用について基礎的な知見を得る予定である。

## 5. 参考文献

- (1) Raza, W., Wang, J., Wu, Y., Ling, N., Wei, Z., Huang, Q. and Shen, Q. (2016) Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Applied microbial and cell physiology* 100, 7639-7650.
- (2) Asaka, O. and Shoda, M. (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4081-4085.
- (3) Ramette, A., Frapolia, M., Fischer-LeSaux, M., Gruffaz, C., Meyer, J. Défago, G., Sutra, L. and Moënné-Loccoz, Y. (2011) *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology* 34, 180-188.
- (4) Watanabe, S., Kumakura, K., Izawa, N., Nagayama, K., Mitachi, T., Kanamori, M., Teraoka, T., and Arie, T. (2007) Mode of action of *Trichoderma asperellum* SKT-1, a biocontrol agent against *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Pesticide Science* 32, 222-228.
- (5) Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M., Macías-Rodríguez, L., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E. and Santoyo, G. (2015) Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control* 81, 83-92.
- (6) Park, Y., Dutta, S., Ann, M., Raaijmakers, M. J. and Park, K. (2015) Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461, 361-365.
- (7) Huang, R., Li, Q. G., Zhang, J., Yang, L., Che, J., H., Jiang, H. D. and Huang, C. H. (2011) Control of Postharvest *Botrytis* Fruit rot of Strawberry by Volatile Organic Compounds of *Candida intermedia*. *The American Phytopathological Society* 101, 859-869.
- (8) McVeigh, I., Evans, Z., Field, L. and Hanley, W. (1969) Inhibitory effects of organic sulfur compounds on *Histoplasma capsulatum*. *Mycopathologia* 37, 349-356.
- (9) Gong, A., Li, H., Shen, L., Zhang, J., Wu, A., He, W., Yuan, Q., He, J. and Liao, Y. (2015) The *Shewanella algae* strain YM8 produces volatiles with strong inhibition activity against *Aspergillus* pathogens and aflatoxins. *Frontiers in Microbiology* 6, Article 1091.
- (10) Tyc, O., Zweers, H., De Boer, W. and Garbeva, P. (2015) Volatiles in Inter-Specific Bacterial Interactions. *Frontiers in Microbiology* 6, Article 1412.
- (11) Kai, M., Hausteine, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B. and Piechulla, B. (2009) Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 1001-1012.
- (12) Guevara-Avendaño, E., Bejarano-Bolívar, A. A., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Méndez-Bravo, A., Von Wobeser, E., A., Sánchez-Rangel, D., Guerrero-Analco, J., A., Eskalen, A. and Reverchon, F. (2019) Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*,



*Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. Microbiological Research 219, 74-83.

## 英文抄録

## Screening of antifungal volatile compounds derived from microorganisms

Tatsuya Ohike<sup>1</sup>, Shohei Ebe<sup>1</sup>, Masahiro Okanami<sup>1</sup>, Tetsuya Matsukawa<sup>1</sup>,  
Shin'ichiro Kajiyama<sup>1</sup>, and Takashi Ano<sup>1</sup>

In this study, we focused on microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by bacteria isolated from environmental soils and tested the antifungal activity of MVOCs against plant pathogens. Subsequently, 4 strains of bacteria showing strong antifungal activity against plant pathogens were selected and their MVOCs were analyzed by GC/MS. As a result of antifungal activity by MVOCs, *Monilinia fructigena*, a plant pathogen, showed the highest sensitivity to MVOCs among the 4 plant pathogens used. Its growth inhibition rate was 75% or more in all of the 20 strains tested in this study. On the other hand, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* were relatively less sensitive to MVOCs, and few bacteria showed strong antifungal activity against them. As a result of GC/MS analysis, 6 MVOCs were detected, and 3 peaks were identified from the chemical library.

Key words: microbial volatile organic compounds, antifungal activity, biological control

---

Received 20 January 2020, Accepted 26 February 2020.

1. Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan.