

# 水稻の鉄コーティング種子から発生するヒドロキシラジカルと細菌増殖抑制効果

誌名	日本土壌肥料学雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	藤原, 加奈子 重政, 東里 鹿嶋, 智之 小野, 広樹 正岡, 淑邦
巻/号	83巻4号
掲載ページ	p. 412-417
発行年月	2012年8月

# 水稻の鉄コーティング種子から発生するヒドロキシラジカルと細菌増殖抑制効果

藤原加奈子<sup>1,2</sup>・重政東里<sup>1</sup>・鹿嶋智之<sup>1</sup>・小野広樹<sup>1</sup>・正岡淑邦<sup>1</sup>

キーワード 細菌増殖抑制, 水稻, 鉄コーティング種子, 二価鉄, ヒドロキシラジカル

## 1. はじめに

水稻種子の表面に鉄粉で被膜を作り、比重を高めて鍍とし、湛水した水田に直播出来る鉄コーティング種子の製造とその栽培技術が山内によって開発された(2004)。水をスプレーしながら種子の表面を還元鉄粉と焼石膏の混合物で覆い、酸化させて生成された錆をバインダー(のり)として使いコーティング層を形成する技術である。田植え作業の大幅な軽減や鳥害予防が可能で、国内外に普及されつつある(山内, 2010)。さらに鉄コーティング種子は利用過程で水稻育苗期に発生する種子伝染性の病害の発生を抑制するという付加価値が見いだされている(井上ら, 2009)が、その作用機作は明らかでない。

一方、水稻種子の表面でコーティング層を形成する錆は二価と三価の酸化鉄が混在する複雑な形態で、湛水条件下で二価鉄イオンが溶出すると推測されるが動態は明らかでない。二価鉄が存在するとフェントン反応(McNaught and Wilkinson, 1997a)が生じて活性酸素が発生しやすい。活性酸素は周辺の有機物等を強力に酸化分解させるため、植物に対しての有害作用と有害微生物への増殖抑制効果を両有する。また水田土壌中は還元状態のため、鉄は二価の形態で存在して水溶化し易く水稻の鉄過剰症の発生も散見される(但野, 1976; Yamauchi and Peng, 1995)。二価鉄を多く含む水田土壌では湛水直播水稻の出芽や苗立ちが抑制されるという報告もある(萩原・井村, 1993)。以上、水田環境では二価鉄の活発な作用が観察されている。本研究は水中の鉄コーティング種子周辺で発生する二価鉄イオンが細菌の増殖抑制に関与すると推測し、苗立枯病菌(*Pseudomonas plantarii*)を使用して影響を検討した。この細菌を選んだのは水稻育苗期に発生する種子伝染性病害の代表的罹病菌であること(井上ら, 2009)、また生菌数の計測が容易である等の理由である。

## 2. 材料及び方法

水稻(*Oryza sativa*, 品種ヒノヒカリ)の鉄コーティング種子は近畿中国四国農業研究センターの山内稔氏から提供された。鉄粉の皮膜は還元鉄粉(DOWA IP クリエーション製 DSP317)と焼石膏(睦化学工業製陶磁器型材用焼石膏 A 級)を使用して作製された。試験の内容に応じて鉄の被膜割合(以後種子重に対する使用した鉄粉重の割合を鉄コーティング比と呼ぶ)が0.1, 0.25, 0.5, 1のものを使用した。水田での試験は広島県立農業技術センター(広島県東広島市八本松町原, 沖積砂壤土)内で行った。

### 1) 活性酸素の細菌増殖抑制効果

苗立枯病菌(NBRC 104884)を(独)製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター生物資源課(NBRC)より入手した。菌を入手した際に同封されていた還元液を使用して培養後、おおよその菌数をNBRC推奨のNB(Nutrient broth)培地(関東化学株式会社製・東京都)を用いた平板培養法で確認し(増殖させた菌液をあらかじめ平板培養法でシャーレに塗布し、生菌数を計数)、それをもとに生菌数 $10^5 \sim 10^4$  CFU/mLの範囲になる一定濃度の苗立枯病菌の培養液を調整した。滅菌した15 mL遠沈管にオートクレーブで滅菌した鉄コーティング比0, 0.1, 1の種子を各10粒加えたのち、滅菌脱塩蒸留水を9 mL加え、菌培養液をそれぞれの遠沈管に1 mL加えた。25°Cで24時間静置培養した後同じく平板培養法を使用して生菌数を計数した。平板培養法では菌液を滅菌脱塩蒸留水で10, 100, さらに1000倍に希釈した後、各懸濁液100  $\mu$ LをNB培地に塗布して25°Cで2日間培養後、生菌数を計数した。試験は3反復で実施した。

### 2) 二価鉄イオン濃度とラジカルの測定

1)で行った鉄コーティング種子の入った水溶液中の二価鉄イオンを2, 2'-ビピリジル法(山内, 2001)で測定した。活性酸素は化学発光法を使用し、ルミネッセンサー(ATTO株式会社製PSN AB-2200)にて試験液100  $\mu$ Lに対してルミノール液(ATTO株式会社製細菌数計測用発光試薬BACTOLUMIX)を100  $\mu$ L加えて反応させた(以後ルミノール法と称する)。本方法は活性酸素の定量と定性を簡易に行う目的で使用した。発生する活性酸素がルミノールと反応する際に発する青色の化学発光量(Jimenez and Navas, 2002)を検出するもので活性

<sup>1</sup> 広島大学大学院生物圏科学研究科(〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4)

<sup>2</sup> 現在、横浜植物防疫所成田支所(〒282-0004 成田市古込字古込1-1 成田国際空港 第2旅客ターミナルビル内)

Corresponding Author: 正岡淑邦

2012年2月7日受付・2012年4月17日受理

日本土壌肥科学雑誌 第83巻 第4号 p. 412~417 (2012)

酸素計測に一般に使用されている (Hirayama and Yida, 1997). 化学発光量を時間軸で積分した値 (以後発光量と称する) で示した.

次に鉄コーティング比 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 の種子を各 3 粒ずつ, 25 mL の脱塩蒸留水を加えたバイアル瓶に浸漬して 1 時間静置し, 時々軽く攪拌した. その後各試験液の二価鉄イオン濃度と活性酸素を前述の方法に準じて測定した. 試験は 3 反復で実施した.

### 3) 活性酸素の識別と定量

活性酸素種を識別するために活性酸素消去剤を併用し, 発光量の変化を比較した. 鉄コーティング種子 5 粒 (鉄コーティング比 0.25) を 30 mL 容量のバイアル瓶に入れ, 脱塩蒸留水を 25 mL 加え静置し, 時々軽く振って 1 時間経過させた. スーパーオキシド消去剤 (Shimomura *et al.*, 1998) として Superoxide dismutase ; SOD (和光株式会社製, 3000 unit/g にリン酸カリウム緩衝液 1 mL を注入), 過酸化水素消去剤 (Mueller ら, 1997) のカタラーゼを和光株式会社製ウシ肝臓由来 (10 unit/10  $\mu$ L に調整) から, ヒドロキシルラジカル消去剤 (Hirayama and Yida, 1997) のクロロゲン酸 10 mM (和光株式会社製を 0.354 g に脱塩蒸留水を加え 100 mL に定容) を用いた.

1 時間経過した試験液を 100  $\mu$ L に対して無処理区は脱塩蒸留水を 50  $\mu$ L, SOD, カタラーゼ, クロロゲン酸は各々 10, 50, 50  $\mu$ L を添加し, 続いてルミノール液を 100  $\mu$ L 添加して発光量を測定した. 試験は 3 反復で実施した.

### 4) ルミノール法と ESR 法との比較

電子スピン共鳴分析装置 (Bruker 社製 E500) を使用して Electron Spin Resonance (ESR) 法でラジカルを測定した. スピントラップ剤には 5, 5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) を使用し, ラジカル種の再確認と ESR スペクトルの面積値から濃度を測定した. 供試液には鉄イオン総量として 15 mg/L になるようにクエン酸鉄, 硫酸第一鉄, 市販の二価鉄栄養資材 (鉄力あくあ; 愛知製鋼株式会社製) を脱塩蒸留水で調製した. 各水溶液の pH は無調整で行った. 同時にルミノール法で各発光量を測定し比較した. 本文中に本試験で得られた結果からルミノール発光量と ESR によるラジカル濃度値を参考に, ルミノール発光量に相当するラジカル濃度換算値を併記した. 実験 4) 以降の結果では図中に発光量をヒドロキシラジカル濃度に換算して示した.

### 5) 活性酸素が発生する環境と持続時間

活性酸素が発生する条件を明らかにするため, 水溶液中の酸素濃度と, 二価鉄イオン濃度の関連性を比較した. 30 mL バイアル瓶に鉄コーティング比 0.25 の種子 5 粒を加え, 脱塩蒸留水 25 mL を加えた. 無処理区; 時々軽く手でふりまぜる, 窒素区; 窒素ガス通気 (20 mL/分), 酸素区; 酸素ガス通気 (20 mL/分) として, 1 時間処理した. 窒素あるいは酸素の通気はパスツールピペット先端をバイアル瓶底辺部に挿入して発泡させた. ルミノール発光量, 二価鉄イオン並びに ORP 計 (Hikari Bellcom 社製

ORPick HB-03) による酸化還元電位を測定した.

次に活性酸素の発生持続時間を測定した. 鉄コーティング比 0, 0.1, 1 の種子各 25 粒を 50 mL ビーカーへ移し, 脱塩蒸留水 50 mL を加え, 水の蒸発を防ぐためにサランラップで上部を覆い静置した. 加水直後から 1, 4, 8, 24 時間後, さらに 2, 3, 5, 6, 7, 9, 12 日後に活性酸素 (ルミノール法) を測定した. なお, 計測されているものが活性酸素であることの確認のため, 12 日目に鉄コーティング比 1 の試験液にクロロゲン酸を加え発光量を測定した. 試験は 3 反復で実施した.

### 6) 水田土壌から発生する活性酸素の確認

2010 年 5 月 14 日に広島県立農業技術センターにて代かき作業時に水田土壌水中に発生する活性酸素を測定した. 湛水田の水深は約 5 cm であった. ルミネッセンサーを水田脇のあぜ地に設置し, 代かき直後 (2~5 分後) の泥水を採取して水溶液の発光量と二価鉄イオン濃度を 3 反復測定した.

### 7) 鉄コーティング種子の発芽率と初期生育

鉄コーティング比 0.5 の種子と鉄コーティングしていない種子, 各々 100 粒を直径 8.5 cm のシャーレに播種し, 25  $^{\circ}$ C で培養し 1 週間後に発芽率を比較した. 試験は 5 反復行った.

次にグロスキャビネット (昼間 25  $^{\circ}$ C, 夜間, 20  $^{\circ}$ C) を使用し, 円筒状の 1 L ポット (内径 11 cm) に含水率 33% の水田土壌 (沖積砂壤土, 広島県農業技術センターより提供) 500 g (湿重) を加え, 水道水を 500 mL 加えて攪拌し, 土壌が沈降して水溶液が透明になった後, 水深 5 cm の湛水田環境下にして各 10 粒播種し, 13 日目に水面から出芽した個体数を比較した. 試験は 5 反復行った.

### 8) 統計処理

鉄コーティング比の違いや水溶液への通気処理による差の比較は分散分析を, 種子の発芽・成育に関する平均値の比較には t 検定を行った.

## 3. 結 果

### 1) 細菌の増殖抑制効果と活性酸素の発生

苗立枯病菌は鉄コーティング比 0 で顕著な生菌数が認められたが, 0.1, 1 とともに著しく低下し, 増殖抑制効果は鉄コーティング比 0.1 で十分に認められた (表 1). 一方, 二価鉄イオン濃度と発光量は鉄コーティング比が大きくなるほど上昇した (図 1). 鉄コーティング種子から溶出した二価鉄イオン濃度が高いほどルミノール発光量は高まった.

### 2) 活性酸素の発生確認と識別

種子の入った水溶液の pH は鉄コーティング比の程度により若干異なるが, およそ 6.0 から 6.5 であった. 図 2 に活性酸素消去剤によるルミノール発光量の変化を示した. 100  $\mu$ L 当り無処理区は  $388 \times 10^4 \pm 4.3 \times 10^4$  ( $\pm$ 以下の数値は標準誤差, 以下同様) となった. これはヒドロキシラジカル濃度換算値 0.23  $\mu$ M に相当する (以後同様にラジ

表 1 鉄コーティング種子の鉄コーティング比と苗立枯病菌の増殖濃度の関係

鉄コーティング比	生菌数 CFU/mL	発光量 ×10 <sup>4</sup> /100 μL	二価鉄イオン mg/L
0	383 × 10 <sup>4</sup> ± 7 × 10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	0.02 ± 0.0001 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.03 <sup>a</sup>
0.1	7 ± 1 <sup>b</sup>	266 ± 2 <sup>b</sup>	5.40 ± 0.68 <sup>b</sup>
1	51 ± 20 <sup>b</sup>	366 ± 3 <sup>c</sup>	29.94 ± 1.34 <sup>c</sup>

数値は平均値 ± 標準誤差を示す。  
3 反復行い、異符号間に 5% 水準で有意差あり。

表 2 脱塩蒸留水中に発生する活性酸素量に及ぼす通気気体の影響

処理	発光量 ×10 <sup>4</sup>	二価鉄 mg/L	酸化還元電位 mV
無処理	290x ± 14 <sup>a</sup>	3.73 ± 0.1 <sup>a</sup>	200 ± 24 <sup>a</sup>
窒素 酸素	70x ± 0.1 <sup>b</sup>	3.25 ± 0.17 <sup>a</sup>	-57 ± 14 <sup>b</sup>
酸素	0.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	0.98 ± 0.2 <sup>b</sup>	209 ± 3 <sup>a</sup>

数値は平均値 ± 標準誤差を示す。  
異符号間に 5% 水準で有意差あり。

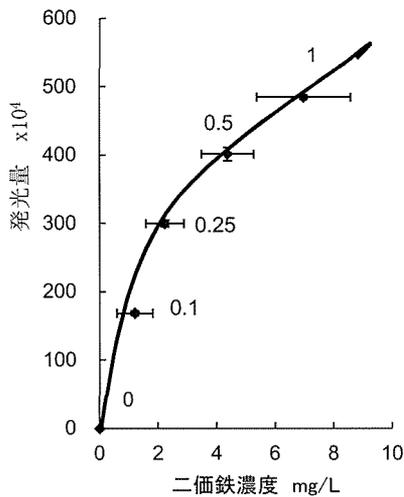


図 1 鉄コーティング比別二価鉄濃度とルミノール発光量の関係  
図内の数値は鉄コーティング比、図中の軸は標準誤差

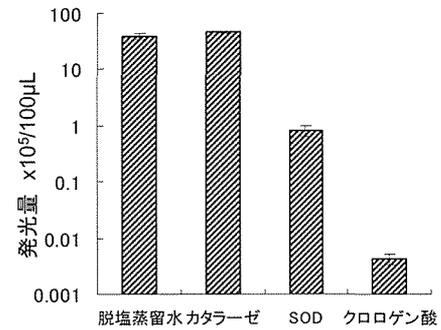


図 2 活性酸素消去剤による活性酸素発生量の変化

カル濃度を括弧内に併記する). SOD 添加では  $8.1 \times 10^4 \pm 0.2 \times 10^4$  ( $0.06 \mu\text{M}$ ) と低下して 78% が消去され、クロロゲン酸添加では  $430 \pm 90$  ( $0 \mu\text{M}$ ) となりラジカルはほぼ消失した。カタラーゼ添加区は発光量の減少が認められなかった。以上より鉄コーティング種子を水に浸漬すると活性酸素が発生し、その殆どは酸化力の強いヒドロキシラジカルであり、スーパーオキシドも同時発生することが明らかになった。

ESR 解析から活性酸素はヒドロキシラジカルであることを再確認した。ルミノール液による発光量と ESR によるヒドロキシラジカル濃度の間には高い正の相関が認められた (図 3)。鉄イオンとして  $15 \text{ mg/L}$  になるように脱塩蒸留水に溶解したが水溶液中に二価鉄イオンとして存在する濃度はそれぞれクエン酸鉄、硫酸第一鉄、鉄力あくあが  $0.2, 15.0, 15.0 \text{ mg/L}$  であった。ラジカル濃度は二価鉄濃度に依存している。二価鉄イオン濃度が等しい硫酸第一鉄と鉄力あくあでヒドロキシラジカル発生量が若干異なる理由は不明であるが 2 種類の測定法で得られた値には高い正の相関があった。鉄コーティング比 0.1 と 1 の種子 15 粒の種子を  $15 \text{ mL}$  の水溶液に浸漬した時発生するヒドロキシラジカルはおおむね  $88 \text{ nM}$  及び  $107 \text{ nM}$  と推定した。

3) 活性酸素の発生条件と発生量の持続性

ルミノール発光量は、無処理、窒素、酸素区それぞれ

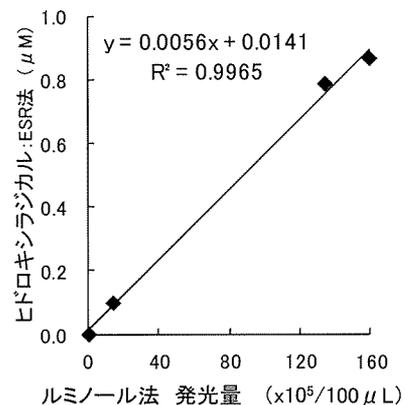


図 3 ESR 法とルミノール法によるヒドロキシラジカル発生量の比較

が  $100 \mu\text{L}$  あたり  $290 \times 10^4 \pm 14 \times 10^4$  ( $0.17 \mu\text{M}$ )、 $70 \times 10^4 \pm 0.1 \times 10^4$  ( $0.5 \mu\text{M}$ )、 $0.7 \times 10^4 \pm 0.1 \times 10^4$  ( $0.02 \mu\text{M}$ ) となった (表 2)。二価鉄イオン濃度は各処理区それぞれが  $3.73, 3.25, 0.98 \text{ mg/L}$ 、酸化還元電位は  $200, -57, 209 \text{ mV}$  となった。

窒素区の二価鉄イオン濃度は対照区とほぼ等しいが、酸化還元電位がマイナスで発光量が無処理区の 1/4 以下であった。酸素区は酸化還元電位が無処理区とほぼ等しいが二価鉄イオン濃度が 1/3 以下に大きく低下し、発光量は無処理区の 1% 以下となった。

図 4 に 12 日間の活性酸素の発生濃度を示した。発生は処理 1 時間から 24 時間後が最も高く  $100 \mu\text{L}$  あたりルミノール発光量  $251 \times 10^4 \pm 24 \times 10^4$  ( $0.15 \mu\text{M}$ ) から  $344 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$  ( $0.21 \mu\text{M}$ ) を示し、その後低下するが 12 日後も  $91 \times 10^4 \pm 4 \times 10^4$  ( $0.07 \mu\text{M}$ ) を維持した。鉄コー

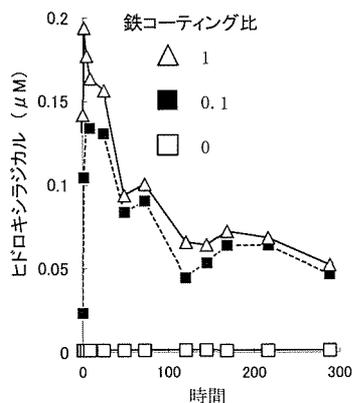


図4 鉄コーティング種子から発生する活性酸素の持続時間

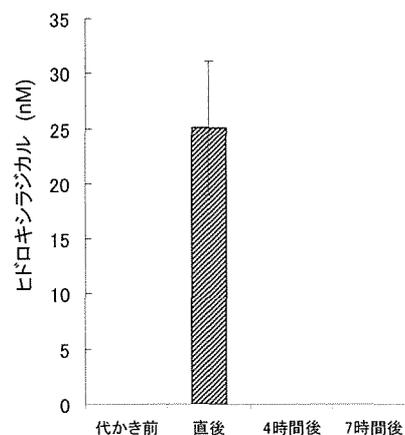


図5 水田の代かき前後の水中で発生するヒドロキシラジカル

ティング比1は0.1よりも加水初期のラジカル発生量が高いが、24時間以降はほぼ等しかった。図示していないが12日後の発光量はクロロゲン酸により消去されたので活性酸素の大部分はヒドロキシラジカルと推定した。

#### 4) 水田土壌から発生する活性酸素

代かき直後の土壌溶液からラジカルが検出された(図5)。図示していないがクロロゲン酸の添加でこのラジカルは殆ど消去されたのでヒドロキシラジカルと判断した。ラジカルは代かき前に殆ど検出されないが、直後(2~5分)は $19 \times 10^4 \pm 5.4 \times 10^4$  (25 nM)となり、4時間以降ラジカルは認められない。二価鉄は代かき前、直後、4時間後には各々0.4, 10.1, 1.0 mg/L、7時間後には0 mg/Lとなった。代かき直後(2~5分)のみ活性酸素が発生し、その持続時間は短かった。

#### 5) 鉄コーティング種子の発芽率

鉄コーティング種子の発芽率は $97.4 \pm 0.4\%$ 、コーティングしていない場合は $95.2 \pm 0.8\%$ となり、鉄コーティング種子の発芽率がやや優ったが有意差は認められなかった。またポット試験で播種後13日目に葉を水面から出した個体数は鉄コーティング種子では $3.4 \pm 1.2$ 本、コーティングしていない場合は $3.8 \pm 0.8$ 本で、有意差が認められなかった。

## 4. 考 察

### 1) 活性酸素の細菌増殖抑制効果

本研究から水溶液中で鉄コーティング種子の鉄錆から二価鉄イオンが遊離し、その結果ヒドロキシラジカルが発生することを明らかにした。このラジカルが苗立枯病菌の増殖を抑制すると考えられる。二価鉄イオンを含む水溶液は大腸菌をはじめとして種々の細菌に殺菌効果があり、細菌の完全な死滅は二価鉄イオン濃度が100 μM位から現れる(村田ら, 2008)。本研究の鉄コーティング比0.1で測定された二価鉄イオン濃度は5.4 mg/Lであり、およそ100 μMである。細菌の増殖抑制効果が認められた既報の鉄濃度に匹敵する。但し、二価鉄が殺菌効果を示す理由は明らか

かにされていなかった。鉄コーティング比0.1並びに1の種子ではラジカル濃度が100 nM前後と推定した。酸化チタンを用いて発生するヒドロキシラジカルが大腸菌の生存に影響する濃度は数nM位からと報告されており(Cho et al., 2004)、本研究で発生したラジカルの細菌に対する酸化分解力は大きい。

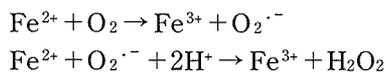
ラジカルは種子を脱塩蒸留水に浸漬して均一な二価鉄イオン濃度にしたのち測定されたが、水田に播種した場合、二価鉄イオンは濃度勾配を生じて種子周辺で濃度が高まる。水田での種子表面ではより高濃度のラジカルが播種初期に発生すると推定する。ヒドロキシラジカルの半減期は $10^{-9}$ 秒と極めて短く(Sies, 1993)一瞬の発生のみであれば、水稻種子表面の複雑な隙間に存在して時間経過に伴い増殖する多くの細菌に接触できる機会が減り、増殖抑制効果が期待できない。本実験では少なくとも12日間ラジカル発生が持続した。この結果のみで水田に直播された種子付近で発生するラジカルの持続時間を推測することは容易でないが、種子周辺ではしばらく高濃度のラジカル発生が持続することで細菌と接触する機会が増え、増殖を抑制すると考えられる。

本研究では苗立枯病菌のみの増殖抑制作用を検討したが井上ら(2009)は鉄コーティング種子により苗立枯病の他に、もみ枯細菌病、褐条病、ばか苗病、ごま葉枯病、いもち病に対して同様な発病抑制効果を報告しており、これらの細菌への増殖抑制作用は本研究と同様なラジカル発生で説明できると考える。

### 2) ヒドロキシラジカルの発生条件

フェントン反応、またはハーバーワイス反応(McNaught and Wilkinson, 1997b)はいずれも過酸化水素が必要でその量が律速となる。本研究は過酸化水素を使用しないで水溶液中に二価鉄イオンと酸素の共存だけでヒドロキシラジカルの発生を確認した。上記の反応では説明がつかない現象である。一方、Qian and Buettner(1999)は水溶液中で二価鉄イオンと酸素が反応してスーパーオキサイドが発生し、さらに二価鉄と反応して過酸化水素を發

生させ、その結果フェントン反応が生じる現象を報告している。この反応は産生する活性酸素量が鉄濃度に依存することになる。式は次のとおりである。



上記反応の後に以下のフェントン反応が発生する。



Huang (2003) は水系で二価鉄と酸素が反応して生じるフリーラジカルが生物に最重要な影響を及ぼすと述べ、さらにフェントン/ハーバーワイス反応で鉄は触媒の役割を持つのに対し、二価鉄と酸素の反応は鉄が自動酸化的反応で消費されると述べている。本研究でも鉄コーティング種子からは勿論、その他安定した二価鉄イオンを保持できる製品、「鉄力あくあ」や、水に溶かすと一部が二価鉄となるクエン酸鉄、二価鉄イオンを発生する硫酸第一鉄からも水溶液中でヒドロキシラジカルが検出される。その発生量は三価を含む鉄濃度全体ではなく、二価鉄イオン濃度と溶存酸素に依存する。鉄コーティング種子から発生するラジカルは二価鉄イオン濃度に依存して増減し、またスーパーオキシドも検出された。これらの結果は鉄コーティング種子周辺で Qian and Buettner (1999) らの提案する反応が発生していると推定する。しかし二価鉄イオンと酸素が共存する水溶液中で 12 日間にわたりラジカル発生が継続する事は、これらの反応が一瞬に生じないことを意味する。その理由は不明であるが本研究から過酸化水素を加えなくても水溶液環境下でヒドロキシラジカルが発生し、細菌の増殖抑制性につながる事が明らかになった。

さらに鉄コーティング種子から発生するラジカルは水稻の発芽や初期生育にほとんど悪影響しない結果を得た。時により水稻種子の鉄コーティング処理は発芽率と発芽速度を低下させるが、それは鉄コーティング層が種子の生育を物理的に抑制するためであろうと推定されている (山内, パーソナルコミュニケーション)。農家に普及中の鉄コーティング種子は鉄コーティング比 0.5 以下のものが多く、このレベルの鉄の被膜では発芽抑制は認められない。

### 3) 水田土壌中に発生する活性酸素

二価鉄イオンからヒドロキシラジカルが発生する本試験液には脱塩蒸留水を使用した。現実の水田水は多種多様な成分を含むためヒドロキシラジカル発生条件が異なると推定する。しかし、Huang (2003) は肝臓細胞という種々の成分を含む「水溶液」内で酸素濃度が高く、二価鉄イオンが存在すると同反応由来のラジカル発生がフェントン反応よりも大きくなると説明しており、多様な成分を含む水溶液中でこのラジカル発生は生じる事が明らかにされている。鉄コーティング種子由来のヒドロキシラジカルは水田水中でも十分に発生すると推定する。

本研究では水田水が代かき等により、土壌と混合されると短時間であるが、ヒドロキシラジカルが発生し、その濃

度は図 3 から 25 nM 程度と推定され、細菌の増殖抑制性効果のある濃度と考えられた。Nakatani ら (2006) はミスト中に発生する fM レベルのヒドロキシラジカルでも赤松の成育に影響するとしており、それに比べて水田土壌の攪拌で生じるヒドロキシラジカル濃度は数千倍高い。畑土壌と比較して水田土壌で病害が発生しにくい理由に湛水による土壌の「還元殺菌」が考えられているが、水田水中でのヒドロキシラジカル発生も関与すると推定する。

ラジカル発生は代かき作業のほか、湛水田土壌表面に生息する多くの水生生物の活動により頻りに田面土壌が攪拌されても土壌中の二価鉄イオンが水中に放出されて生じると推定する。活性酸素は生物に対して有害視されることが多いが、上記のような仕組みで発生するものは短時間であり、発生濃度も低いと推定され、水田環境で保全的役割をもつと考えられる。

一方、微生物中には窒素固定エンドファイトのように水稻の成育を促進する (Isawa *et al.*, 2010) 場合もあり、鉄コーティング種子から発生するヒドロキシラジカルはそれらの効果を低下させる事が推定される。鉄コーティング種子による細菌増殖抑制効果が全ての場面で水稻成育に効果的だと断言できないが、苗立ち時の種々の病原体感染リスクを低下させる効果を持つと考えられる。

以上より、鉄コーティング種子の有する細菌の増殖抑制効果は水溶液中で鉄錆から二価鉄イオンが遊離して水中の酸素と反応し、ヒドロキシラジカルが発生して細菌に作用すると結論した。湛水した水田環境は土壌が混濁するとヒドロキシラジカルが発生しやすく、畑地に比べて細菌の増殖抑制作用が生じやすいと推定された。

## 5. 要 約

鉄コーティング種子は水稻の直播栽培技術として開発されたが、水稻育苗期の種子伝染性病害の抑制にも効果がある。その原因を明らかにする目的で水稻苗立枯病菌を用いて検討した。種子を被膜している鉄錆から二価鉄イオンが遊離し、ヒドロキシラジカルやスーパーオキシドが発生した。これらのラジカルが細菌の増殖抑制作用を示すと結論した。鉄コーティング比が大きいほど二価鉄イオン濃度が上昇し、ヒドロキシラジカルの発生量が大きくなり、少なくとも 12 日間継続発生した。ヒドロキシラジカルの発生には水溶液中に酸素と二価鉄イオンの共存が必須である。さらに水田土壌は代かきのような土壌と水の攪拌によってヒドロキシラジカルが容易に発生する環境であることも明らかにした。

謝 辞：鉄コーティング種子の提供並びに研究遂行上、有益な助言をいただいた近畿中国四国農業研究センターの山内稔氏に、水田土壌の提供や試験に協力いただいた広島県立総合技術研究所農業技術センターに、鉄力あくあ資材を提供頂いた愛知製鋼株式会社に感謝します。

## 文 献

- Cho, M., Chung, H., Choi, W., and Yoon, J. 2004. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO<sub>2</sub> photocatalytic disinfection. *Water Res.*, 38, 1069–1077.
- 萩原素之・井村光夫 1993. 二価鉄の土壌添加が水稻直播水稻の出芽・苗立ちに及ぼす影響. 北陸作報, 28, 35–38.
- Hirayama, O., and Yida, M. 1997. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging ability by chemiluminescence. *Anal Biochem.*, 251, 297–299.
- Huang, X. 2003. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutat. Res.*, 533, 153–171.
- 井上博喜・山内 稔・宮川久義 2009. 種子の鉄コーティング処理によるイネ育苗期病害の防除. 日植病報, 75, 164–169.
- Isawa, T., Yasuda, M., Awazaki, H., Minamisawa, K., Shinozaki, S., and Nakashita, H. 2010. Azospirillum sp. strain B510 enhances rice growth and yield. *Microbes Environ.*, 25, 58–61.
- Jimenez, A. M., and Navas, M. J. 2002. Chemiluminescence methods (Present and future). *Grasas Aceites*, 53, 64–75.
- McNaught, A. D., and Wilkinson, A. 1997a. Fenton reaction. In IUPAC compendium of chemical terminology, 69, p. 1274. The Gold Book, 2<sup>nd</sup> ed., Blackwell Science.
- McNaught, A. D., and Wilkinson, A. 1997b. Harber–Weiss reaction. In IUPAC compendium of chemical terminology, 69, p. 1277. The Gold Book, 2<sup>nd</sup> ed., Blackwell Science.
- Mueller, S., Riedel, H. D., and Stremmel, W. 1997. Direct evidence for catalase as the predominant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -removing enzyme in human erythrocytes. *Blood*, 90, 4973–4978.
- 村田 晃・日高敏勝・神田康三・加藤富民雄 2008. 二価鉄の殺菌作用と作用機構. 佐賀大農彙, 93, 141–155.
- Nakatani, N., Akane, S., Chiwa, M., Kobayashi, T., and Sakugawa, H. 2007. Roles of hydroxyl radical generating/ scavenging mechanisms in pseudo polluted dew in reducing the foliar CO<sub>2</sub> assimilation rate and biomass production of Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) seedlings. *Environ. Exp. Bot.*, 60, 159–169.
- Shimomura, O., Wu, C., Murai, A., and Nakamura, H. 1998. Evaluation of five imidazopyrazinone-type chemiluminescent superoxide probes and their application to the measurement of superoxide anion generated by *Listeria monocytogenes*. *Anal. Biochem.*, 258, 230–235.
- Qian, S. Y., and Buettner, G. R. 1999. Iron and dioxygen chemistry is an important route to initiation of biological free radical oxidations: An electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Free Radical Bio. Med.*, 26, 1447–1456.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 215, 213–219.
- 但野利秋 1976. 水稻の鉄過剰障害対策に関する作物栄養学的研究. 北大農邦文紀要, 10, 22–68.
- Yamauchi, M., and Peng, X. X. 1995. Iron toxicity and stress-induced ethylene production in rice leaves. *Plant Soil*, 173, 21–28.
- 山内 稔 2001. 湛水土壤中における二価鉄濃度の迅速測定法. 平成12年度総合農業試験研究推進会議, 農研センター資料, 191–195.
- 山内 稔 2004. 水稻の鉄コーティング湛水直播. 農及園, 79, 947–953.
- 山内 稔 2010. 鉄コーティング湛水直播と種子の大量製造技術による稲作の省力・規模拡大. 農及園, 85, 70–75–75.

### Coating rice seeds with reduced iron powder induces the production of hydroxyl free radicals, leading to antimicrobial activity

Kanako FUJIWARA<sup>1,2</sup>, Azusa SHIGEMASA<sup>1</sup>, Tomoyuki KASHIMA<sup>1</sup>, Hiroki ONO<sup>1</sup> and Yoshikuni MASAOKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima Univ.,

<sup>2</sup> Present Address: Yokohama Plant Protection Station, The Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan

An iron coating for rice seeds increases the specific gravity and improves direct sowing in flooded paddies. This reduces labor requirements and improves rice production handling system. The coated seeds also exhibited desirable antimicrobial activity, but the reason for this activity was unclear. We examined the antimicrobial activity after inoculation of the coated seeds with pathogenic *Pseudomonas plantarii* in sterilized deionized and distilled water. The bacterium's growth rate decreased markedly and the bacteria disappeared. Seed coated with iron at ratios of 0.1 and 1.0 (w/w) showed similar levels of antimicrobial activity. The concentration of hydroxyl free radicals increased with increasing iron ratio. The presence of Fe<sup>2+</sup> and hydroxyl radicals was confirmed by chemoluminescence and electron spin resonance methods, respectively. When the radicals were scavenged by chlorogenic acid, the main radical components were hydroxyl radicals. The antimicrobial activity appears to result from damage caused by the radicals, and a hydroxyl radical concentration of around 80 nM completely eliminated the bacteria. The presence of both Fe<sup>2+</sup> and oxygen in solution is essential for hydroxyl radical production, and autoxidation of Fe<sup>2+</sup> is believed to induce production of these radicals, though without the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that occurs in the Fenton reaction. Radical formation continued for at least 12 days in the laboratory, and we predict that small amounts of radicals would be produced shortly after adding water to paddy soils, thereby triggering autoxidation and free radical formation and extending the antimicrobial function.

**Key words:** antimicrobial agent, ferrous iron, hydroxyl radical, seed coating, rice seed