

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660275

研究課題名(和文)好熱菌発酵産物によるネコブセンチュウ被害軽減作用の研究

研究課題名(英文)A thermophile-fermented compost-mediated reduction in root galling by nematode

研究代表者

児玉 浩明(KODAMA, Hiroaki)

千葉大学・融合科学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70302536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：未利用海産資源を発酵させた好熱菌発酵産物に抗ネコブセンチュウ活性があるのかを実験室レベルで確認を行った。その結果、好熱菌発酵産物に含まれる細菌が存在するときに根こぶ形成が抑制された。ハウス栽培環境において好熱菌発酵産物と有機リン系殺センチュウ剤とを組み合わせることで、効率的にネコブセンチュウ数を減らすことができることも明らかになった。抗ネコブセンチュウ活性を示す可能性のある細菌として植物内部共生菌を単離した結果、すでに抗ネコブセンチュウ活性を有すると報告のある*Paenibacillus polymyxa*とは異なる*Paenibacillus*属細菌が単離された。

研究成果の概要(英文)：Root galling by root-knot nematode was investigated after addition of a compost that had been made by fermentation of marine animals. Root galling was inhibited when the compost-extract was added to the root-knot nematode-infected plants. However, the bacterium-free filtrate of the compost extract did not interfere with root galling by nematode. The combination of an organophosphorus nematicide with a compost effectively reduced the soil nematode under the greenhouse condition. The endophytic bacteria were isolated from the compost-treated plants. These endophytic bacteria were *Paenibacillus* spp. and were different from *Paenibacillus polymyxa* that had been reported to induce mortality of nematode. The role of these isolated *Paenibacillus* on the inhibition of root galling remained to be clarified.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：コンポスト ネコブセンチュウ エンドファイト

1. 研究開始当初の背景

ネコブセンチュウは、農家にとって非常に防除に苦勞している代表的な害虫である。通常行われる土壤消毒では、薬剤の人体への影響が大きい。そのため土壤消毒以外による防除方法を模索する農家が多い。農家は、環境および人体に優しく、ネコブセンチュウ被害を軽減できる方法を期待しているが、現実的に普及している方法はまだないのが現状である。

2. 研究の目的

研究代表者は、未利用海産資源を好熱菌によって発酵させた産物（好熱菌発酵産物）を投与することで、作物中の硝酸含量が低減する仕組みについて研究を行ってきた。好熱菌発酵産物は、小魚・カニ・エビなどの未利用海産資源を自己発酵熟により高温発酵させて得られたものであり、好熱性の*Bacillus*属および類縁のFirmicutes門細菌を中心とした菌相からなる (Niisawa et al. 2008)。申請者はこの好熱菌発酵産物を投与した土壤で栽培した作物の硝酸含量が低下することに着目し研究を行ってきた（平成19年萌芽研究など）。その結果、好熱菌発酵産物を土壤に投与することで、土壤中の硝酸含量が脱窒作用によって低下することが主原因であることを明らかにした (Ishikawa et al. 2012)。土壤の硝酸含量が低下しつつも収量は維持されるため、好熱菌発酵産物には低硝酸下で効率良く窒素源を植物が利用できる仕組みがあると推測されている。また、この好熱菌発酵産物は多くの農家によって使用されているが、農家からネコブセンチュウによる被害が軽減し、土壤殺菌を行わずに栽培できるようになったとの報告が多く寄せられている。本研究では、この好熱菌発酵産物に果たしてそのような抗ネコブセンチュウ活性があるのかどうかを明らかにし、活性が認められた場合には、環境、人体に優しい低コストの抗ネコブセンチュウ資材の開発につなげたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 好熱菌発酵産物による根こぶ形成抑制

ネコブセンチュウ被害が発生している土壤を用いて、実験室において好熱菌発酵産物によるネコブセンチュウ被害抑制効果を確認する。当初は、ネコブセンチュウ汚染土壤を用いて研究室でトマトを栽培し、根こぶ形成を観察する予定であったが、実際に試験してみると根こぶがほとんど形成されなかったため、ベルマン法によりネコブセンチュウを汚染土壤から回収し、一定数のネコブセンチュウを直接植物体に感染させることとした。好熱菌発酵産物は、農家で使用されている形態にあわせ、以下のように調製した。好熱菌発酵産物と水道水を1:100 (v/v) の割合で希釈し、60°C、好気条件下で10時間インキュベートした。得られた懸濁液を100 μmのナイロンメッシュを用いて濾過した溶液を好熱菌発酵産物

抽出液とした。さらに、0.2 μmのフィルターを用いて濾過したものを「フィルター滅菌した好熱菌発酵産物抽出液」とした (Miyamoto et al., 2013)。植物としてトマトを用いた。トマト品種としては実験用ミニトマトであるMicro Tomを用いた。栽培ポットに粒状培土を150g入れ、ポットあたり200mLの水道水を添加し、播種した。播種後、7日目に、センチュウを発芽したトマト芽生えの根本に接種した。接種後52日目に根こぶの形成を観察した。発酵産物抽出液、もしくは、フィルター滅菌した発酵産物抽出液は、100倍に水道水で希釈し、週に1度、100mLずつ散布した。

(2) 好熱菌発酵産物に由来する植物内部共生菌の単離

好熱菌発酵産物によるネコブセンチュウ被害軽減には、好熱菌発酵産物由来の細菌が植物内部共生菌として働き、ネコブセンチュウの活動を抑制している可能性がある。そこで、好熱菌発酵産物を投与した植物から植物内部共生菌を単離することとした。キュウリ種子の表面を殺菌し、Murashige-Skoog寒天培地上に播種した。10日後に、好熱菌発酵産物抽出液、もしくはフィルター滅菌した好熱菌発酵産物抽出液に発芽した実生を1時間浸した。その後、あらかじめオートクレーブ処理により滅菌したロックウールに移植し、アグリポット内で環境からの細菌の混入を防止しながら3週間栽培した。このように栽培した植物体を植物内部共生菌の単離と次世代シーケンスによる菌相解析に用いた。

3週間後、子葉表面をエタノール、次亜塩素酸で殺菌し、最終的には火炎滅菌を行った。表面に細菌が生存していないことを、子葉をTSB寒天培地にこすりつけたのち、TSB寒天培地を23°Cで培養した。植物内部共生菌は、この表面を殺菌した子葉を滅菌水を持ちいて破碎し、その懸濁液をTSB寒天培地にまくことで単離した。単離した細菌は、(GTG)5-rep-PCRによるDNA footprinting解析 (Heyrman et al., 2004) をおこなって、グループ化し、代表的な単離菌については16S rRNA配列を決定して、細菌種の推定を行った。

一方、次世代シーケンス解析による菌相解析においては、3週間栽培した子葉からISOPLANTキット (Nippongene) を用いて単離したtotal DNAを鋳型として、細菌16S rRNA配列の一部 (515-806に相当する部分) をPCRで増幅し、Illumina社のMiseqシーケンサーを用いて行った。得られた配列データは菌相解析用パイプラインソフト (Qiime, Illumina社) によってクラスタリングと微生物の推定を行った。

(3) ハウス栽培における抗ネコブセンチュウ活性試験

キュウリのハウス栽培において、有機リン系殺センチュウ剤 (ネマトリンエース、石原産

業株式会社)と好熱菌発酵産物との併用の効果について検討した。ハウスを2区画にわけ、片方の区画で点滴灌水時に好熱菌発酵産物抽出液を1万倍に希釈したものを施肥した。また、栽培開始時に両方の区画において有機リン系殺センチュウ剤を同様に処理を行った。収穫後に、土100gあたりのネコブセンチュウ数を測定した。

4. 研究成果

(1) 好熱菌発酵産物による根こぶ形成抑制
ベルマン法によりネコブセンチュウ汚染土壌からセンチュウを回収し、得られたセンチュウを実験1では平均500頭、実験2では、平均460頭をトマトに接種した。約50日栽培後、根を観察した(表1)。実験1と実験2の合計では、好熱菌発酵産物抽出液を処理していない対照区とフィルター滅菌した好熱菌発酵産物抽出液処理区では、50%のトマトに根こぶの形成が認められた。一方、好熱菌発酵産物抽出液処理区では、8本のトマトのうち、根こぶが観察されたのは1本のみ(12.5%)であった。したがって、実験室内においても好熱菌発酵産物によるネコブセンチュウ被害軽減作用が観察された。また、フィルター滅菌した好熱菌発酵産物抽出液には、ネコブセンチュウ被害軽減作用が認められなかったことから、好熱菌発酵産物に含まれる細菌が抗ネコブセンチュウ活性を有することが推定された。

表1 好熱菌発酵産物による根こぶ形成阻害

	実験1	実験2	総計
対照区	1/4	3/4	4/8
好熱菌処理区	0/4	1/4	1/8
滅菌好熱菌処理区	2/4	2/4	4/8

注：数値は接種した本数と根こぶが形成された本数を示す。

(2) 好熱菌発酵産物に由来する植物内部共生菌の単離

(1)の結果から、好熱菌発酵産物に含まれる細菌が抗ネコブセンチュウ活性を示している可能性がある。しかし、好熱菌発酵産物抽出液にネコブセンチュウを入れても、ネコブセンチュウ自体の活動や生存率は変化しないため、好熱菌発酵産物に含まれる細菌が直接、ネコブセンチュウに作用してその活性を低下させることは考えにくい。そこで、好熱菌発酵産物に含まれる細菌の中に植物内部共生菌として働く細菌があり、その細菌の共生によって根こぶが形成されにくい状況が生じているのではないかと考え、植物内部共生菌として働く細菌の単離を行った。環境からの菌の混入を防止した状況下で好熱菌発酵産物抽出液を処理したキュウリ子葉から、植物内部共生菌を単離した。得られたコロニーについては、(GTG)5-rep-PCRによるDNA footprintingによりグループ化し、代表的な株については、16S

rRNA配列を決定し、菌株の属レベルでの同定を行った。その結果、図1に示したように、34のコロニーが得られ、(GTG)5-rep-PCRによるDNA footprintingにより3つのグループに分類された。16S rRNA配列より、それぞれ、*Paenibacillus*属細菌、*Brevibacillus*属細菌、*Lysinibacillus*属細菌であると同定された。



図1 好熱菌発酵産物を処理したキュウリ子葉から単離された植物内部共生菌。培養によって得られた34個のコロニーを(GTG)5-rep-PCRによって分類した。

次に培養困難な植物内部共生菌も含め、好熱菌発酵産物を処理した植物体で観察される細菌種を次世代シーケンス解析により調べた(図2)。上記と同じように環境からの菌の混入を防止した状態で、好熱菌発酵産物抽出液で処理を施したキュウリ子葉からtotal DNAを調製し、細菌16S rRNA配列を次世代シーケンス解析を行った。その結果、*Paenibacillus*属細菌に加えて、*Pseudomonas*属、*Enterobacter*属、*Chryseobacterium*属、*Bradyrhizobium*属細菌が同定された。これらの細菌は植物内部共生菌としては単離されていない。その理由としては、(a)植物表面に生息するepiphyte菌である可能性、(b)植物内部共生菌であるが、今回表面殺菌に火炎滅菌過程を入れているため、熱に弱い細菌である可能性が考えられる。一方、*Lysinibacillus*属細菌が植物内部共生菌として単離されているが、次世代シーケンス解析からは同種の16S rRNA配列が同定されていない。この原因としては、植物内部共生菌としては非常にマイナーな種類であるが、火炎滅菌による熱処理に強く、結果として内部共生菌として多く単離されたことが考えられた。そこで、実際に、単離された*Lysinibacillus*属細菌を熱処理して生存率を測定したところ、95°C、30分の熱処理でも80%の菌が生存しており、耐熱性の高い菌種であることが確認された。

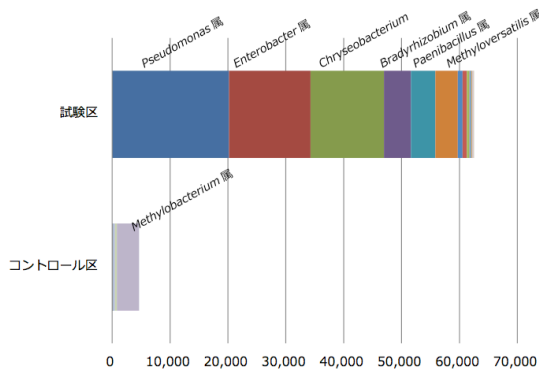


図2 好熱菌発酵産物を処理したキュウリ子葉における微生物菌相。横軸はリード数。コントロール区では好熱菌発酵産物のかわりに滅菌水にキュウリアル生を浸した。

(3) 有機リン系殺センチュウ剤と好熱菌発酵産物の併用によるネコブセンチュウ数の低減効果について

農家ではネコブセンチュウ対策として土壤消毒もしくは、有機リン系殺センチュウ剤などを用いて、ネコブセンチュウを防除する。しかし、完全にネコブセンチュウを防除することは少ないのが現状である。そこで、キュウリの栽培ハウスにおいて2つの区画に分割し、片方の区画では有機リン系殺センチュウ剤のみの処理、もう一つの区画では有機リン系殺センチュウ剤で処理を行ったうえで、好熱菌発酵産物抽出液を1万倍に希釈したものを混ぜて、灌水を行った。収穫後にネコブセンチュウ数を測定したところ、有機リン系殺センチュウ剤のみの処理区では30gあたり、20頭のネコブセンチュウが観察されたが、有機リン系殺センチュウ剤+好熱菌発酵産物抽出液処理区では、ネコブセンチュウは観察されなかった。

まとめ

今回の研究により、好熱菌発酵産物に含まれる細菌が、抗ネコブセンチュウ活性の原因であることが明らかになった。そのような細菌の候補として好熱菌発酵産物由来する植物内部共生菌を単離したところ、*Paenibacillus*属細菌が単離された。培養法に依存しないキュウリ子葉サンプルに含まれる細菌の網羅的解析においても、*Paenibacillus*属細菌は主要な菌であったことから、好熱菌発酵産物を処理することによって、*Paenibacillus*属細菌が植物内部共生菌として働いていることが明らかになった。興味深いことに、抗ネコブセンチュウ活性を示す*Paenibacillus*属細菌が知られている。*Paenibacillus polymyxa*の培養液にはセンチュウの卵の孵化の阻害と、幼個体を殺す活性があることが報告されている (Khan et al., 2008)。今回、単離された

植物内部共生菌は、*Paenibacillus barcinonensis*に最も近縁であるため、報告されている*Paenibacillus polymyxa*とは異なる菌種であるが、今後、単離した菌を用いた抗ネコブセンチュウ活性について調べる必要がある。また、好熱菌発酵産物と有機リン系殺センチュウ剤との併用により、ネコブセンチュウ数を効率よく減少させることも明らかになった。これらの知見をもとに、環境にやさしい効率的なネコブセンチュウ被害軽減の方法が確立されることが期待される。

(引用文献)

- Heyrman et al. (2004) *Bacillus novalis* sp. nov., *Bacillus vireti* sp. nov., *Bacillus soli* sp. nov., *Bacillus bataviensis* sp. nov. and *Bacillus drentensis* sp. nov., from the Drentse A grasslands. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:47-57
- Ishikawa et al. (2012) Denitrification in soil amended with thermophile-fermented compost suppresses nitrate accumulation in plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 1349-1359
- Khan et al. (2008) A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode. *Bioresour. Technol.* 99: 3016-3023
- Miyamoto et al. (2013) Potential probiotic thermophiles isolated from mice after compost ingestion. *J. Appl. Microbiol.* 114: 1147-1157
- Niisawa et al. (2008) Microbial analysis of composted product of marine animal resources and isolation of antagonistic bacteria to plant pathogen from the compost. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54: 149-158

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

西川あずさ・渡邊凌・井藤俊行・宮本浩邦・児玉浩明 (2014) 「好熱菌発酵産物投与下で栽培した植物の内部寄生菌に関する研究」 2014年9月10日 第66回日本生物工学会大会(札幌コンベンションセンター、札幌)講演要旨集、p126

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「土壌・水質汚染の改善、温暖化ガス発生抑制、並びに植物の機能性を向上させる微生物資材、及び発酵産物の製造方法」
発明者: 宮本浩邦、児玉浩明、宮本久、西内巧、石川一人、小川和男、井藤俊行、上平拓也、大島健志朗、須田亙、服部正平

権利者：日環科学株式会社、千葉大学、株式会社三六九、京葉プラントエンジニアリング株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2013/67907

出願年月日：平成 25 年 6 月 28 日

国内外の別：PCT 出願のため国内および国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 浩明 (KODAMA, Hiroaki)

千葉大学・大学院融合科学研究科・教授

研究者番号：70302536

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

宮本 浩邦 (MIYAMOTO, Hirokuni)

日環科学株式会社