

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19106

研究課題名(和文)嫌気性細菌の中鎖脂肪酸生産能を利用した革新的土壌消毒法の開発

研究課題名(英文)A novel anaerobic soil disinfestation using VFA-producing Clostridium

研究代表者

天知 誠吾 (AMACHI, SEIGO)

千葉大学・大学院園芸学研究院・教授

研究者番号：80323393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Clostridium sp. E801株の生産する揮発性脂肪酸の1種、カプロン酸がトマト萎凋病菌を完全に消毒できることがわかった。カプロン酸による消毒効果は青枯病菌に対しても認められた。さらに、トマト萎凋病菌に対する生育阻害効果は、低温条件かつ好気条件でも確認された。カプロン酸を土壌に添加するだけで、土壌中のトマト萎凋病菌を完全に消毒できた。E801株の生育を最適化し、最大120 mMのカプロン酸を生産することに成功した。以上の結果より、E801株またはカプロン酸を用いた土壌消毒法を特許として申請した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌還元消毒(ASD)は、幅広い作物の病原菌に対し消毒効果を示すが、冷涼地域では還元化が進行せず、効果が不安定である。また、土壌くん蒸剤と比較して処理費用も高い。従って、低温かつ低コストで消毒効果を発揮できれば、ASDは世界中で利用可能な革新的技術となり得る。本研究より、カプロン酸を土壌に施用することで、簡単に土壌を消毒できることがわかった。また、その効果は低温下でも発揮されることが示唆された。さらに、E801株を用いて安価な酢酸とエタノールから高濃度カプロン酸を発酵生産できることもわかった。今後、圃場試験などを通してさらに検討を進めることで、革新的な土壌消毒法の実現に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Caproate, one of volatile fatty acids produced by Clostridium sp. E801, was found to eliminate Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici (Fol) conidia. Similar effect was also observed against Ralstonia solanacearum, a wilt disease bacterium. Interestingly, caproate suppressed Fol growth even at a low temperature under aerobic conditions. Furthermore, soils amended with caproate eliminated Fol conidia completely within 2 weeks. Finally, growth condition of strain E801 was optimized, and up to 120 mM caproate was successfully produced.

研究分野：環境微生物学

キーワード：土壌還元消毒 ASD カプロン酸 Clostridium トマト萎凋病菌 青枯病菌 揮発性脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

病原体の蓄積による作物の連作障害を防止し、生産性を維持するために、土壌消毒は必須の技術である。臭化メチルは土壌くん蒸剤として広く利用されてきたが、オゾン層破壊能が高いため2005年に原則使用が禁止された。現在土壌くん蒸剤としてクロロピクリンや1,3-ジクロロプロペンがよく用いられているが、前者は刺激性や人畜への毒性が非常に強いこと、後者は発がん性の疑いがあることから、作業員曝露による健康被害の危険性や住宅地近辺での使用が制限されるといった欠点がある。これに対し近年、安全性が高く環境にやさしい土壌消毒法、いわゆる土壌還元消毒 (Anaerobic Soil Disinfestation: ASD) が注目されている。ASDではまず、米糠、小麦フスマ、糖蜜、低濃度エタノール等の易分解性有機物を土壌に混和し、灌水した後、土壌表面をプラスチックフィルムで被覆・密閉する。これにより種々の土壌微生物が活性化し、土壌中の酸素を消費して土壌は急激に還元状態 (酸欠状態、嫌気状態) になる。この状態が数週間持続することで、土壌中の生物相が変化し、常在の微生物と比較して物理化学的・生物的な環境変化に弱い植物病原菌や植物寄生性線虫の密度が顕著に低下する。

ASDは、日本とオランダで同時期に独立して開発された土壌消毒法で、近年ではアメリカや中国でも注目を集めているが、その消毒メカニズムについては不明な点が多い。有機物の分解に伴う微生物の呼吸により、土壌中の酸化還元電位 (Eh) が低下するが、これは消毒の主要因子とは考えられていない。一方、嫌気性細菌の働きにより酢酸やプロピオン酸、酪酸といった有機酸が生成し、鉄・マンガンの還元により Fe^{2+} や Mn^{2+} が生成する。しかしながら、これら有機酸や金属イオンが消毒に関与するという直接的な証拠も得られていない。さらに、次世代シーケンサーを用いた解析等により、ASDでは *Clostridium* 属細菌が優占することが世界共通の現象として知られている。このため、*Clostridium* 属細菌が消毒に何らかの働きをしていると推測されるが、その詳細は明らかではなかった。

2. 研究の目的

ASDは幅広い作物の土壌病原性微生物に対して顕著な密度低減効果を示すことから、現在国内の30都道府県で実用的に利用されている。一方、欧米など冷涼な地域では、土壌の還元化が進行せず、効果が不安定になるという欠点がある。また、土壌くん蒸剤と比較して、1回の処理費用が高くなる点も欠点である。従って、低温かつ低コストで消毒効果を発揮できれば、ASDは世界中で利用可能な革新的な汎用技術となり得る。我々は最近、低濃度エタノールを炭素源としたASD処理を行った土壌より、トマト萎凋病菌に対し強い消毒活性を有する *Clostridium* 属細菌 (E801株) を分離することに成功し、その消毒活性の本体が中鎖脂肪酸の1種カブロン酸 (ヘキサノ酸) である可能性を見出した。そこで本研究では、E801株の生産するカブロン酸の植物病原微生物に対する消毒効果を明らかにし、これを土壌に混和するだけで土壌消毒処理が可能か検討を行った。またE801株によるカブロン酸生産条件の最適化を行った。

3. 研究の方法

(1) E801株の培養上清がトマト萎凋病菌の生育に与える影響

pH4.0、4.5、5.0、5.5に調整したGlucose-Yeast extract-Peptone (GYP)培地を試験管に分注し、トマト萎凋病菌の分生子懸濁液を希釈し、 10^3 cells mL^{-1} となるように添加した。その後、無機塩培地で1週間培養したE801株の培養上清、 $100^\circ C$ で20分間熱処理した培養上清のいずれかを添加し、 $30^\circ C$ 、180 rpmで3日間振とう培養した。各培養液を適当に希釈し、PDA培地に塗抹・培養した後、コロニー数を計数した。また同様の試験を、培養上清の代わりに酢酸、酪酸、またはカブロン酸を1 mM添加した系でも実施した。

(2) カブロン酸がトマト萎凋病菌の生菌数に与える影響

pH5.0または5.5に調整したMES緩衝液を試験管に分注し、トマト萎凋病菌の分生子懸濁液を希釈し、 10^3 cells mL^{-1} となるように添加した。ここに酢酸、酪酸またはカブロン酸を終濃度1、3、5 mMとなるよう添加し、 $30^\circ C$ で7日間静置培養した。コロニー数の計数は(1)と同様に行った。同様の試験を、トマト萎凋病菌の代わりに青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) を用いても実施した。

(3) カブロン酸が低温条件でトマト萎凋病菌の生育に与える影響

5 mMの酢酸、酪酸またはカブロン酸を含むGYP培地を調製し、塩酸でpHを4.0、4.5、5.0、5.5に調整した。これをオートクレーブ滅菌後、別滅菌しておいた寒天粉末と混合し固化した。この寒天培地上に、予め培養しておいたトマト萎凋病菌の培養液15 μL を載せ、 $15^\circ C$ で20日間培養後、コロニーサイズを観察した。

(4) カブロン酸を添加した土壌がトマト萎凋病菌の生菌数に与える影響

ガラス瓶にヤシ殻培地と滅菌水を加え、窒素ガスで脱気後、密栓した。トマト萎凋病菌の分生子懸濁液を希釈し、終濃度 10^6 cells g^{-1} となるように添加した。ここに終濃度3 mMの酢酸、酪

酸、またはカブロン酸を添加し、30°C でインキュベートした。適宜サンプリングを行い、コロニー数の計数を(1)と同様に行った。また同様の試験を、千葉大学園芸学部実験圃場で採取した黒ボク土を用いて実施した。

(5) E801 株によるカブロン酸生産の最適化

無機塩培地に種々の濃度の酢酸とエタノールを添加し、E801 株を嫌気培養に供した。適宜サンプリングを行い、酢酸、酪酸、カブロン酸の濃度を液体クロマトグラフィーにて定量した。

4. 研究成果

(1) E801 株の培養上清がトマト萎凋病菌の生育に与える影響

E801 株の培養上清がトマト萎凋病菌の生育に与える影響を調べるため、E801 株の培養上清、または熱処理した培養上清を添加した GYP 培地で振とう培養し、培養後の生菌数を測定した(表 1)。培養開始時の生菌数は 3.0 Log CFU mL⁻¹ であった。培養上清を添加しなかった場合、生菌数は pH に関わらず 5.1~5.7 Log CFU mL⁻¹ となり、トマト萎凋病菌の増殖が見られた。これに対し、培養上清を添加した場合は、pH5.0 と 5.5 では 4.5~6.0 Log CFU mL⁻¹ と一定の増殖を示したものの、pH4.0 と 4.5 では有意な生菌数が確認されなかった。熱処理した培養上清も、これとほぼ同じ結果が得られた。以上のことから、E801 株の培養上清にはトマト萎凋病菌の生育を強く阻害する物質が含まれることがわかった。またその物質は、熱に安定で pH 依存的な生育阻害効果を持つことから、何らかの有機酸であると考えられた。

表 1. E801 株の培養上清がトマト萎凋病菌の生育に与える影響

培地 pH	Log CFU mL ⁻¹		
	無添加	培養上清添加	熱処理培養上清添加
4.0	5.58 ± 0.12	<0.5	<0.5
4.5	5.10 ± 0.13	<0.5	<0.5
5.0	5.35 ± 0.30	4.49 ± 0.094	5.73 ± 0.11
5.5	5.66 ± 0.036	6.04 ± 0.082	5.64 ± 0.028

E801 株の培養上清に含まれる有機酸を液体クロマトグラフィーで定量したところ、酢酸、酪酸、カブロン酸が検出された。そこで次に、これら揮発性脂肪酸がトマト萎凋病菌の生育に与える影響を調べた(表 2)。添加する脂肪酸の濃度は 1 mM とした。酢酸と酪酸は似たような挙動を示し、トマト萎凋病菌の生菌数は pH に関わらず 5.0~6.2 Log CFU mL⁻¹ となった。これに対し、カブロン酸を添加した場合は、pH5.0 と 5.5 では 2.4~3.4 Log CFU mL⁻¹ と接種時の生菌数が維持されていたものの、pH4.0 と pH4.5 では有意な生菌数が確認されなかった。以上のことから、E801 株の培養上清に含まれるトマト萎凋病菌の生育阻害物質は、カブロン酸であることが強く示唆された。

表 2. 各種揮発性脂肪酸がトマト萎凋病菌の生育に与える影響

培地 pH	Log CFU mL ⁻¹		
	酢酸	酪酸	カブロン酸
4.0	5.5 ± 0.084	5.0 ± 0.053	<0.5
4.5	5.6 ± 0.051	5.4 ± 0.017	<0.5
5.0	5.8 ± 0.025	5.6 ± 0.041	2.4 ± 0.045
5.5	6.2 ± 0.072	5.9 ± 0.081	3.4 ± 0.0059

(2) カブロン酸がトマト萎凋病菌の生菌数に与える影響

カブロン酸がトマト萎凋病菌を完全に消毒できるかより詳細に検討するため、MES 緩衝液に懸濁したトマト萎凋病菌の分生子に種々の濃度のカブロン酸を添加し、生菌数を経時的に測定した(図 1)。その結果、3~5 mM のカブロン酸存在下でトマト萎凋病菌は 3 日 (pH5.0) から 7 日 (pH5.5) 以内に完全に消毒されることがわかった。同様の試験を青枯病菌を用いて行ったところ、同じく 3~5 mM のカブロン酸存在下で、7 日 (pH5.5) 以内に完全に消毒できた。これに対し、同濃度の酢酸や酪酸では青枯病菌は全く消毒されなかった。

(3) カブロン酸が低温条件下でトマト萎凋病菌の生育に与える影響

5 mM の酢酸、酪酸またはカブロン酸を含む GYP 寒天平板培地を調製し、その上にトマト萎凋病菌の培養液を静置し、15°C で 20 日間培養した(図 2)。酢酸と酪酸を添加した場合は、揮発性脂肪酸を添加しないコントロールとほとんど同じ生育を示した。これに対し、カブロン酸を添加した場合は、pH5.5 と pH5.0 ではコントロールとほぼ同様の生育を示したものの、pH4.5 と pH4.0 では有意な生育が認められなかった。以上のことから、カブロン酸は低温環境でもトマト萎凋病菌の生育を阻害できることが明らかとなった。

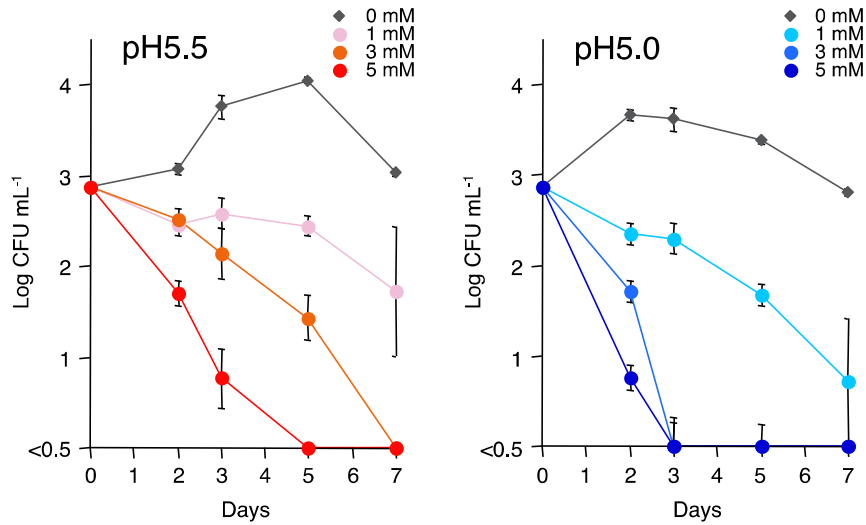


図 1. カブロン酸がトマト萎凋病菌の生菌数に与える影響

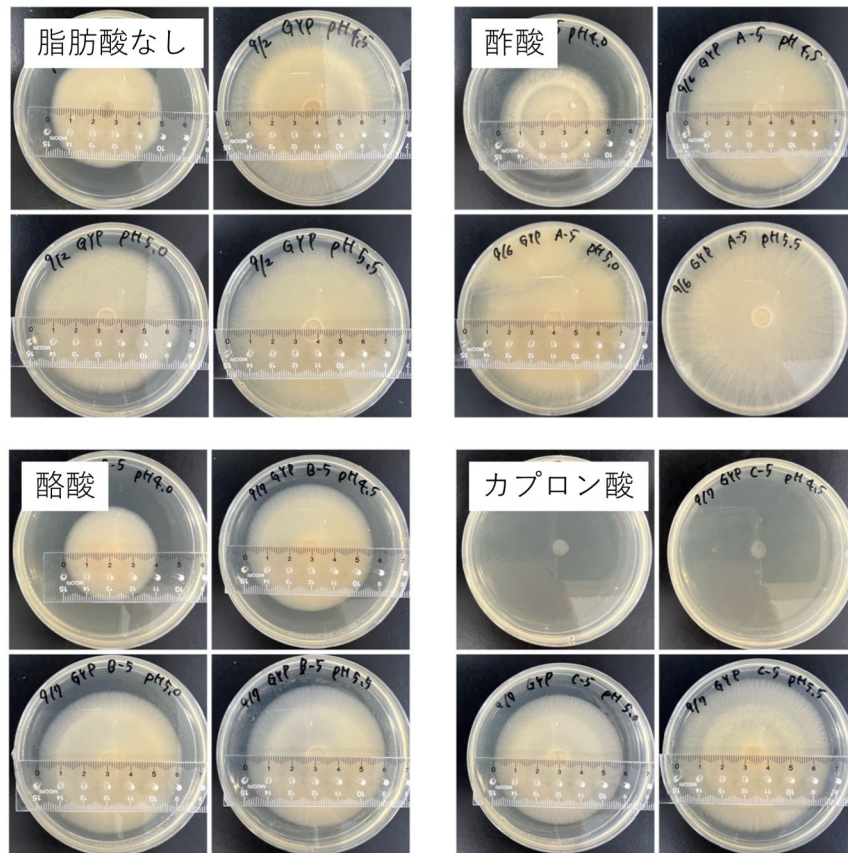


図 2. カブロン酸が低温条件下でトマト萎凋病菌の生菌数に与える影響
培地 pH は左上が 4.0、右上が 4.5、左下が 5.0、右下が 5.5

(4) カブロン酸を添加した土壌がトマト萎凋病菌の生菌数に与える影響

3 mM の酢酸、酪酸、またはカブロン酸をヤシ殻培地（ココピート）に添加し、トマト萎凋病菌の分生子を接種し 30°C で嫌氣的にインキュベートした（図 3）。実験開始時のトマト萎凋病菌の生菌数は 5.3 Log CFU g⁻¹ であった。脂肪酸の添加なし、酢酸添加、酪酸添加条件では類似した挙動が見られ、トマト萎凋病菌の生菌数は減少したものの、6 日間で 3.2~3.3 Log CFU g⁻¹ まで減少するにとどまった。これに対し、カブロン酸を添加した場合、2 日から 4 日の間に生菌数が急激に減少し、6 日目には全く検出されなくなった。同様の実験を、大学の実験圃場から採取した黒ボク土を用いて行ったところ、15 mM のカブロン酸存在下でトマト萎凋病菌を 2 週間で完全に消毒できることがわかった。

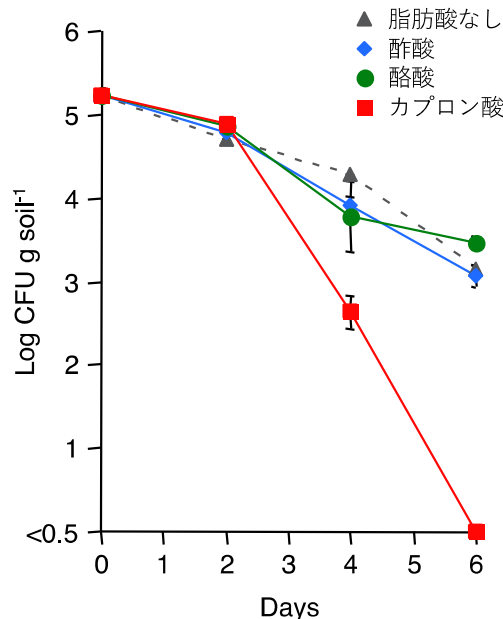


図 3. 各種揮発性脂肪酸を添加したヤシ殻培地におけるトマト萎凋病菌の生菌数

(5) E801 株によるカブロン酸生産の最適化

E801 株を無機塩培地中で種々の濃度の酢酸とエタノール存在下で嫌気培養に供し、最もカブロン酸濃度の高くなる条件を検討した。その結果、酢酸 100 mM とエタノール 250 mM を添加した際に、培養 14 日間で最大 120 mM のカブロン酸を生産することに成功した。

(6) 今後の展望

本研究により、*Clostridium* sp. E801 株の生産する揮発性脂肪酸の 1 種カブロン酸に、植物病原微生物に対する強い増殖抑制効果と消毒効果があることがわかった。E801 株は低濃度エタノールを炭素源として ASD 処理したヤシ殻培地から分離された。このため、E801 株のような嫌気性細菌が生産する揮発性脂肪酸が、実際の土壌中でも植物病原微生物の消毒に関与している可能性がある。一方、本研究により、カブロン酸を直接土壌に施用することで、簡便かつ低コストに植物病原微生物を消毒できる可能性が示された。今後 E801 株を用いて安価な酢酸とエタノールからさらに効率的にカブロン酸を発酵生産することで、革新的な土壌消毒法の開発に繋がるかもしれない。

農林水産省により策定された「みどりの食料システム戦略」では、2050 年までに化学農薬の使用量（リスク換算）を 50% 低減することが目標とされている。国内で登録されている農薬のうち、クロルピクリンや 1,3-ジクロロプロペン（D-D）といった土壌くん蒸剤のリスク換算値に占める割合は 54% と突出している。このため、持続可能な農業生産の実現には、これらの大幅な使用量削減が必須である。カブロン酸は低濃度であればヒトに対する毒性はなく、食品衛生法でも「人の健康を損なうおそれのない添加物」として定められている。また、農作物を含めた植物に対する毒性も報告されていない。既に述べたように、カブロン酸はエタノールや酢酸など安価な原材料から発酵生産が可能である。今後さらなる発酵条件の最適化（例えば培地 pH の制御など）により、高濃度カブロン酸を安価に生産できれば、従来の ASD や土壌くん蒸剤よりも安価な土壌消毒が可能になり、持続可能な農業生産の実現に大きく貢献できると期待される。さらに、本研究の多くの実験において、カブロン酸は好気的な条件でもトマト萎凋病菌を消毒できた。もし土壌においても灌水処理を伴わない好氣的消毒が可能なら、灌水ポンプや灌水チューブ、土壌被覆用フィルムなどにかかる初期コストを全て削減でき、飛躍的な普及拡大に繋がる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shirane Shota, Momma Noriaki, Usami Toshiyuki, Suzuki Chiharu, Hori Tomoyuki, Aoyagi Tomo, Amachi Seigo	4. 巻 13
2. 論文標題 Fungicidal Activity of Caproate Produced by Clostridium sp. strain E801, a Bacterium Isolated from Cocopeat Medium Subjected to Anaerobic Soil Disinfestation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 747 ~ 747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/agronomy13030747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白根正太、門馬法明、宇佐見俊行、青柳智、堀知行、天知誠吾
2. 発表標題 Clostridium属細菌の生産する有機酸の土壌還元消毒法への関与
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会（オンライン開催）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木ちはる、天知誠吾
2. 発表標題 Clostridium属細菌が生産する有機酸の土壌還元消毒への関与
3. 学会等名 第20回微生物研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天知誠吾、鈴木ちはる
2. 発表標題 嫌気性細菌の中鎖脂肪酸生産能を利用した革新的土壌消毒法の開発
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 土壌消毒剤および土壌消毒方法	発明者 天知誠吾、門馬法明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-171835	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------