

令和 2 年 9 月 3 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07674

研究課題名(和文) かび毒分解細菌による収穫後の飼料用トウモロコシのデオキシニバレノール低減法の開発

研究課題名(英文) Development of a method to reduce deoxynivalenol in post-harvest forage corn by mycotoxin-degrading bacteria.

研究代表者

小板橋 基夫 (Koitabashi, Motoo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・スマート農業コーディネーター

研究者番号：10355662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：赤かび病菌の生産するデオキシニバレノールに対し、培地中での分解能を有する細菌株の飼料用トウモロコシ圃場での有効性を検証した。絹糸抽出10日後に、病原菌の分生子懸濁液を接種し、10日後から、10菌株の分解細菌を10日おきに4回、苞葉内部に流し込むように接種した(2017年、札幌)。子実を乾燥粉砕しDON濃度を測定した。無処理区のDON濃度は11.67 ppmであったが、*Nocardioides* sp.接種区では2.53 ppmに低減するなど、5菌株に有意な散布効果が認められた。これら5菌株について、2018～2019年に反復を行ったところ、3菌株にはいずれの試験でも有意な低減効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DON分解菌の圃場での効果を3年間にわたって検証し、3菌株に低減効果があることを確認した。これらの成果を基に、化学的防除手段のない飼料用トウモロコシにおける赤かび病によるかび毒低減に関する生物的防除技術開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The reduction effect of a bacterial strain that degrades deoxynivalenol produced by *Fusarium* head blight in a medium was verified in a corn field for feed. After 10 days of silking stage, conidial suspensions of the pathogens were inoculated, and after 10 days, 10 degradative bacteria were inoculated into the bracts 4 times every 10 days (2017, Sapporo). The grains were dried and ground to measure DON concentration. The concentration of DON was 11.67 ppm in the untreated group, but was reduced to 2.53 ppm in the inoculated group with *Nocardioides* sp. In addition, significant spraying effect was observed in 4 strains. When these 5 strains were repeated in 2018, 3 strains showed a significant reduction effect, and these strains also showed a significant reduction effect in the 2019.

研究分野：植物保護学

キーワード：かび毒分解菌 デオキシニバレノール 飼料用トウモロコシ

1. 研究開始当初の背景

植物病原菌である *Fusarium graminearum* とその類縁菌は、麦類やトウモロコシの穂に感染し、人畜に有害なトリコテセン系かび毒のデオキシニバレノール (DON) を産生し、その蓄積が世界的に問題となっている。家畜の飼料についても、平成 13 年に DON の暫定許容値が設定されたため調査が進み、トウモロコシサイレージから高頻度でかび毒が検出される事例が見受けられることが報告された。しかし、飼料用トウモロコシの赤かび病の防除のために、圃場に散布可能な登録農薬はないため、化学的防除は不可能となっている。また、DON は熱・化学安定性が高く、100°Cでも分解しないため、ひとたび蓄積されると加工過程での除去は困難である。そのため、圃場栽培中から飼料加工工程までにおける DON の分解技術の開発が望まれており、中でも DON 分解微生物による DON 分解は、飼料の栄養成分への影響が少ないことや、DON 代謝酵素による DON の選択的分解が可能と考えられることから有望視されている。

2. 研究の目的

飼料用トウモロコシの栽培において、赤かび病への罹病によって発生するかび毒デオキシニバレノール (DON) の蓄積が、飼料の安全性の観点から世界中で問題となっている。申請者らは、トウモロコシと同様にかび毒が蓄積されて問題となっているコムギについて、コムギ表面やその栽培されている土壌などの多様な環境から、DON 分解菌の分離を試み、16 菌株の DON 分解能を有する細菌を得ることができ、そのうちの一菌株に圃場散布による DON 低減効果が認められた。それらの 16 菌株の DON 分解菌のうち、14 菌株が飼料用トウモロコシに蓄積した DON の分解能を有することを室内実験で確認した。これらの分解菌について、DON 分解のための最適培養条件を明らかにし、圃場への散布を行ってかび毒分解効果を検証する。また、コムギで開発した集積培養による DON 分解菌の効率良い分離法を用いて、飼料で問題となっているサイレージ中の DON 分解菌の探索を行い、微生物による DON 濃度低減技術の開発のための基盤を構築する。

また、DON と同様に、サイレージ中の飼料に蓄積して問題となるフモニシンについて、その濃度を低減させる効果のある分解菌の選抜を行う。

3. 研究の方法

(1) 圃場における DON 分解菌散布効果の実証

試験は 2017~2019 年の 3 年間、北海道札幌市の農研機構・北海道農業研究センターの夏作飼料用トウモロコシに、DON 分解能を有した細菌を噴霧接種し、DON 濃度の測定を行って DON 低減効果を検討した (図 1. A, B)。各年度絹糸抽出 10 日後に、赤かび病菌 *F. graminearum* (MAFF 242587 株) の孢子懸濁液 0.1ml (10^7 /ml) をシルクチャンネル法で注入接種した。病原菌の接種 10 日後から 10 日おきに 4 回、10ml (10^8 /ml) の細菌培養液を雌穂先端から苞葉内部に流れ込むように接種した (図 1. C)。収穫後、各子実を乾燥させた後に粉碎し、得られた試料の DON 濃度をベラトックス DON5/5 を用いたエライザ反応によって測定した。



図 1. 分解菌の接種状況 A.圃場の状態
B・C. 接種方法

(2) 飼料からの細菌の分離と同定

分解菌処理区の試料から、接種した細菌が再分離されるかを確認するため、R2A 培地を用いた希釈平板法によって細菌の分離を行った。同時に、無処理区や培地のみ接種した試料からも分離を行い、飼料の細菌フローを調査した。本研究での各細菌株の同定は、16S rDNA の塩基配列の BLAST 解析により実施した。

(3) フモニシン分解菌の選抜

無機塩培地に唯一の炭素源としてフモニシン B1 を 100 μ g/ml 添加した液体培地に、那須や札幌で得られたフモニシン汚染飼料を加え、振とう培養 (30°C、140rpm、暗黒下) を行った。7 日後に、培地 1 μ l を新規のフモニシン添加培地 (10ppm) に加えて 3 回培養する集積培養を 36 サンプルで行った (図 2.)。

培養後のフモニシン濃度測定の結果、フモニシンが添加濃度より低減した 5 本のサンプルから R2A 平板培地を用いて細菌の単コロニー分離を行い、分解菌候補 168 菌株について

液体培地でのフモニシン分解能の有無を確認した。フモニシンの濃度はイムノクロマト法により、QuickScan フモニシン FLEX311 を用いたストリップテストで定量を行った。

また、サイレージ中で有効な嫌気性の分解菌を選抜するため、密封した高バリア条件で発酵させる過程のサイレージ 100g に 5ppm のフモニシン溶液 10ml を加えた試料からも分解菌を前述と同様に集積培養で選抜した。分解菌候補の 39 菌株について、分解の有無を確認した。

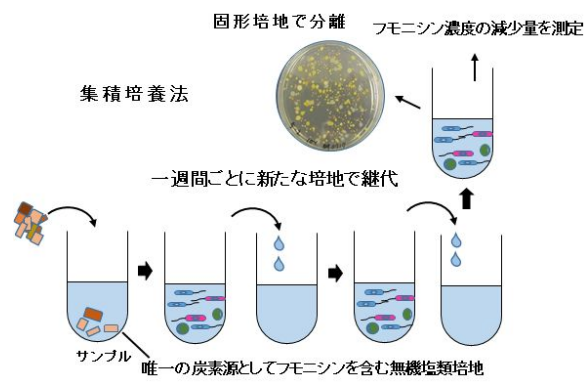


図 2. フモニシン分解菌の集積培養の方法

4. 研究成果

(1) 圃場における DON 低減効果

2017 年の北農研の圃場において、分解菌培養液を雌穂先端から苞葉内部に流し込むように接種した (10 菌株、1 区 5 株、n=3)。収穫後、各子実を乾燥粉碎して DON 濃度をエライザ反応で測定した結果、無処理区の飼料抽出液の DON 濃度が 11.67ppm であったところ、菌株によっては 2.53ppm に低減するなど、5 菌株に無処理区に対して有意な低減効果が認められた (表 1.)。

これらの 5 菌株については、2018 年に反復数を増加させ試験 (1 区 5 株、n=5) を行って効果の確認を行ったところ、*Devosia* sp. SS5 株、*Nocardioides* sp. YMN1 株、*Marmoricola* sp. MIM116 株の 3 種の分解菌に再度有意な DON 低減効果が認められた (表 2.)。

これらの 3 菌株については、2019 年にさらに反復数を増加させ試験 (1 区 5 株、n=6) を行って効果の再現性を調査したところ、再々度有意差が認められた (表 3.)。

本研究で選抜された 3 菌株の圃場での DON 低減効果が 3 年間にわたり確認され、散布効果があることが示された。このうち、*Marmoricola* sp. MIM116 株は先行研究のコムギ赤かび病の圃場での DON 低減効果が認められており、有望な菌株と考えられた。

(2) 処理区からの細菌の再分離

分解菌処理区からの細菌の分離により、散布菌が分離された例は、1 例も認められなかった (表 4. 5.)。DON 濃度の低減が認められた処理区においても、分解菌が収穫時まで定着している可能性は低いと推測される。粉碎した試料から分離された菌株は、*Escherichia* 属菌や *Pseudomonas* 属菌など腐生能力の高いものが多く含まれていた。

表 1. 分解菌散布による DON 低減効果 (2017 年)

菌株名	DON濃度 (ppm)	菌株名	DON濃度 (ppm)
<i>Nocardioides</i> sp.	5.27 ± 5.84**	<i>Nocardioides</i> sp.	2.53 ± 2.45*
<i>Nocardioides</i> sp.	6.90 ± 10.58	<i>Marmoricola</i> sp.	4.80 ± 6.76*
<i>Nocardioides</i> sp.	6.53 ± 5.48	<i>Sphingomonas</i> sp.	5.27 ± 5.31
<i>Devosia</i> sp.	6.17 ± 3.38	LB培地	5.60 ± 1.67
<i>Nocardioides</i> sp.	4.83 ± 3.97*	1/2R2A培地	7.47 ± 8.17
<i>Nocardioides</i> sp.	8.97 ± 2.25	殺菌水	5.73 ± 4.15
<i>Devosia</i> sp.	3.73 ± 3.4*	無処理	11.67 ± 4.37

* t検定で有意差あり p<0.05 ** t検定で有意差あり p<0.01

表 2. 分解菌散布による DON 低減効果 (2018 年)

菌株名	DON濃度 (ppm)	菌株名	DON濃度 (ppm)
<i>Nocardioides</i> sp. WSN05-2	4.73 ± 6.70	1/2 LB培地	2.82 ± 4.40
<i>Nocardioides</i> sp. LS2	10.28 ± 1.03	1/2 R2A培地	5.10 ± 7.43
<i>Devosia</i> sp. SS5	0.87 ± 0.84**	殺菌水	4.79 ± 4.73
<i>Nocardioides</i> sp. YMN1	2.04 ± 1.75**	無処理 (接種あり)	5.97 ± 4.26
<i>Marmoricola</i> sp. MIM116	1.40 ± 1.73*	無処理	0.30 ± 0.11

* t検定で有意差あり p<0.05 ** t検定で有意差あり p<0.01

表 3. 分解菌散布による DON 低減効果 (2019 年)

菌株名・処理名	DON濃度 (ppm)	処理名	DON濃度 (ppm)
<i>Devosia</i> sp. SS5	15.0 ± 0.36*	殺菌水	17.8 ± 0.27
<i>Nocardioides</i> sp. YMN1	15.5 ± 0.27**	無処理 (接種あり)	19.9 ± 0.06
<i>Marmoricola</i> sp. MIM116	16.4 ± 0.32*	無処理	15.5 ± 0.33
1/2 LB培地	18.1 ± 0.21		
1/2 R2A培地	19.5 ± 0.26		

* t検定で有意差あり p<0.05 ** t検定で有意差あり p<0.01

表 4. 各処理区から分離された細菌類

菌株名	分離菌
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Kosakonia</i> sp.
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Devosia</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Burkholderia</i> sp.
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Devosia</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Escherichia</i> sp.

表 5. 各処理区から分離された細菌類

菌株名	分離菌
<i>Nocardioides</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Escherichia</i> sp.
<i>Marmoricola</i> sp.	<i>Pantea</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Sphingobacterium</i> sp.
<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Sphingobacterium</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
1/2 R2A培地	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.
LB培地	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.
殺菌水	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Rahnella</i> sp. <i>Obesumbacterium</i> sp.
無処理	<i>Acinetobacter</i> sp.

(3) フモニシン分解菌の選抜

フモニシン汚染試料から分離されたフモニシン分解菌については、好気性でグラム陽性の *Bacillus* 属菌や、通性嫌気性でグラム陰性の *Enterobacter* 属菌など、特性の異なる菌株を得ることができた(表 6.)

サイレージ試料から 2 菌株の分解菌が分離された。それらについても、好気性の *Brevibacillus* 属菌(低減率 37%)および通性嫌気性の *Paenibacillus* 属菌(低減率

36%)などの、特性の異なる菌株を得ることができた。今後は、これらの菌株の圃場におけるフモニシン分解試験のなどの検討をする必要がある。

表 6. 飼料から分離されたフモニシン分解菌

属名(菌株名)	分離源	低減率	グラム反応
<i>Bacillus</i> sp. DF-69	2017年 札幌	77%	陽性
<i>Azospirillum</i> sp. DF-66	2017年 札幌	64%	陰性
<i>Enterobacter</i> sp. DF-79	2008年 那須	64%	陰性
<i>Pseudomonas</i> sp. DF-61	2017年 札幌	55%	陰性
<i>Klebsiella</i> sp. DF-88	2008年 那須	55%	陰性
<i>Enterobacter</i> sp. DF-89	2008年 那須	55%	陰性

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 Morimura Hiroyuki, Uesaka Kazuma, Ito Michihiro, Yoshida Shigenobu, Koitabashi Motoo, Tsushima Seiya, Sato Ikuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Deoxynivalenol-Degrading Actinomycete Nocardioides sp. Strain LS1, Isolated from Wheat Leaves in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01650-18	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小坂橋基夫・黄川田智洋・菅原幸哉・吉田重信・伊藤通浩・佐藤育男・對馬誠也
2. 発表標題 トウモロコシ赤かび病に罹病した飼料用 トウモロコシへのデオキシニバレノール 分解細菌の散布効果
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小坂橋 基夫、黄川田 智洋、菅原 幸哉、吉田 重信、伊藤通浩、佐藤育男、對馬誠也
2. 発表標題 コムギ赤かび病で有効性が確認されたデオキシニバレノール分解細菌の飼料用トウモロコシへの応用
3. 学会等名 日本植物病理学会報 83(3),202-202
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分 担 者	黄川田 智洋 (Kikawada Tomohiro) (90355131)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道 農業研究センター・主任研究員 (82111)	