

Clostridium 属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

天知 誠吾

千葉大学大学院 園芸学研究院 応用生命化学領域

研究の目的

病原菌の蓄積による作物の連作障害を防止する上で、土壌の消毒は必須の技術である。近年、刺激性や毒性の高い土壌くん蒸剤に代わって、安全かつ環境にやさしい土壌還元消毒 (Anaerobic Soil Disinfestation: ASD) が注目されている。ASD は米ぬかや糖蜜などの有機物を土壌に混和し、灌水後、土壌表面をプラスチックフィルムで被覆・密閉する。その過程で、土壌微生物により酸素が急激に消費され、各種有機酸や金属イオンが生成する。また、特定の嫌気性細菌の優占などが生じ、最終的に植物病原菌が消毒される。一方、ASD の消毒因子は未だ不明で、低温下での効果の不安定性や、コスト高と加えて、本技術の汎用性の妨げとなっている。申請者らは最近、ASD 処理中に顕著に優占する *Clostridium kluyveri* に近縁な E801 株の分離に成功し、本菌がカルボン酸の鎖長伸長反応により生産する中鎖脂肪酸 (カプロン酸: $C_6H_{12}O_2$) が、消毒因子の 1 つである可能性を見出した¹⁾。そこで本研究では、E801 株を用いて安価にカプロン酸を発酵生産し、その施用により低温下でも低コストに土壌消毒が可能か検討した。低温かつ低コストでの消毒が実現すれば、ASD は世界規模で普及可能な革新的な汎用技術となり、持続可能な農業生産の実現に大きく貢献できる。

方法

1. E801 株によるカプロン酸の発酵生産

E801 株を種々の濃度のエタノールと酢酸を炭素源として 30°C で嫌気培養し、酢酸と酪酸、カプロン酸の生産・消費量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により経時的に測定した。また、酵母エキスの添加効果や pH 制御培養の効果についても検討した。

2. カプロン酸の半身萎凋病菌に対する増殖抑制・消毒効果の検討

これまで、トマト萎凋病菌および青枯病菌に対するカプロン酸の消毒効果が確認されている¹⁾。本研究では、多犯性でかつ低温環境で病害を発症し、ASD による効果が得られにくい半身萎凋病菌 (*Verticillium dahliae*) に対するカプロン酸の効果を検討した。具体的には、菌糸の伸長抑制効果、分生子の増殖阻害効果、さらに微小菌核 (耐久生存体) に対する消毒効果も検討した。

3. 常温および低温におけるカプロン酸の土壌消毒効果

黒ボク土 360 g を蓋付きのガラス瓶に入れ、トマト萎凋病菌の孢子液を 10^5 孢子/g となるように接種した。ここに酢酸、酪酸またはカプロン酸を終濃度 10~20 mM となるように添加した後、30°C または 15°C で 2 週間程度インキュベートした。その後、トマト萎凋病菌の生菌数を寒天培地上で計数した。また、同様に処理した黒ボク土を一定期間乾燥させ、そこに予め育苗しておいたトマトの苗を植え、グロースチャンパー中で病害発生の有無を観察した。

結果

1. E801 株によるカプロン酸の発酵生産

エタノールと酢酸のモル比が 0.5、1、2、2.5、3、4、5、6 となるように添加した培地を調製し、E801 株を嫌氣的に培養したところ、モル比 2~5 の時に生育が最も良好で、2 週間で 100~120 mM 程度の高濃度カプロン酸を生成することがわかった (図 1)。一方、モル比が 0.5~1 あるいは酢酸のみやエタノールのみの中にはカプロン酸を全く生成しなかった。また、培養液に酵母エキスを添加してもカプロン酸の生成量は増加せず、pH 制御培養にも有意な効果は認められなかった。

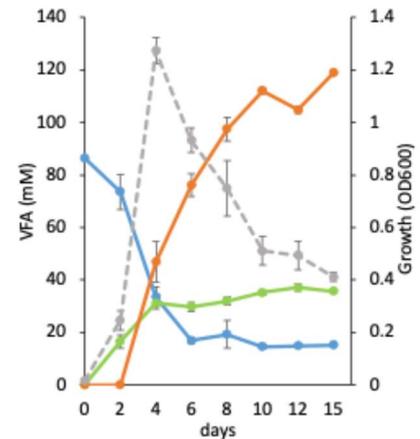


図 1. E801 株を 250 mM エタノールと 100 mM 酢酸を炭素源として嫌気培養した際の酢酸 (青)、酪酸 (緑)、カプロン酸 (オレンジ) の消長。点線は生育を示す。

2. カプロン酸の半身萎凋病菌に対する増殖抑制・消毒効果の検討

カプロン酸による分生子の増殖抑制効果を検討したところ、酢酸では有機酸無添加のコントロールと比べて有意な差は見出せなかった。酪酸は培養初期の増殖を遅延させる傾向があったが、培養 10 日目にはコントロールと比較して遜色ない生育を示した。これに対し、カプロン酸は 2.5 mM と 5 mM で明らかに生育が抑制され、コントロールと比較してそれぞれ 1/10 と 1/1,000 以下であった。また、10 mM のカプロン酸存在下では分生子は全く増殖できなかつた。次に半身萎凋病菌の微小菌核液を調製し、各種有機酸の消毒効果を検討した (図 2)。

酢酸は 20 mM で弱い消毒効果を示したが、これは微小菌核液に含まれる分生子に対する消毒効果と考えられた。酪酸は 20

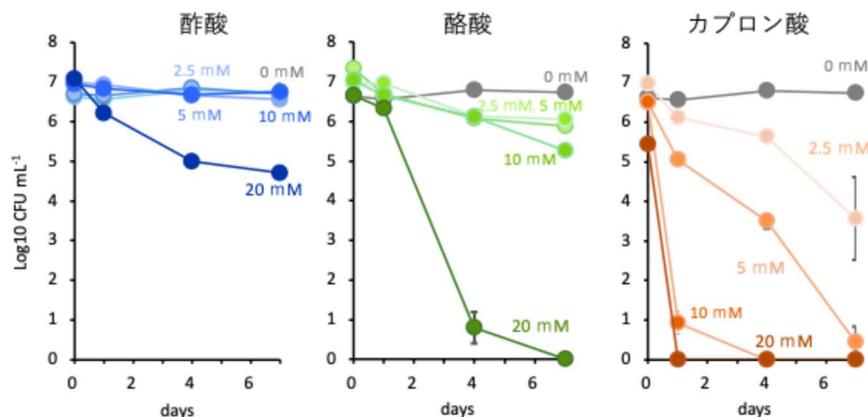


図 2. 半身萎凋病菌の微小菌核に対する各種有機酸の消毒効果

mM で1週間以内に生菌数が0となり、微小菌核に対する消毒効果が認められたが、2.5~10 mM では効果が確認できなかった。これに対し、カプロン酸は5~20 mM で1週間以内に生菌数がほぼ0となり、微小菌核に対する強い消毒効果が認められた。

3. 常温および低温におけるカプロン酸の土壌消毒効果

トマト萎凋病菌を接種した黒ボク土に各種有機酸(10mM)を添加し、30°Cでインキュベートしたところ、酢酸や酪酸でもある程度の消毒効果が認められたが、カプロン酸を添加した場合に最も強い消毒効果が確認された。有機酸を添加した土壌では酸化還元電位が低下していたため、土壌微生物がこれら有機酸を炭素源として一定程度還元化が進行したものと考えられた。一方、同様の実験を15°Cで行ったところ、酸化還元電位の低下はほとんど確認されず、土壌の還元化は進行していないと考えられた。本条件下においても、カプロン酸はトマト萎凋病菌に対し強い消毒効果を示し、培養14日後にはトマト萎凋病菌を完全に消毒した(図3)。これに対し、酢酸や酪酸ではほとんど消毒効果が認められなかった。30°Cで消毒した土壌にトマトの苗を植え病害の有無を確認したが、全ての土壌で病害が認められなかった。

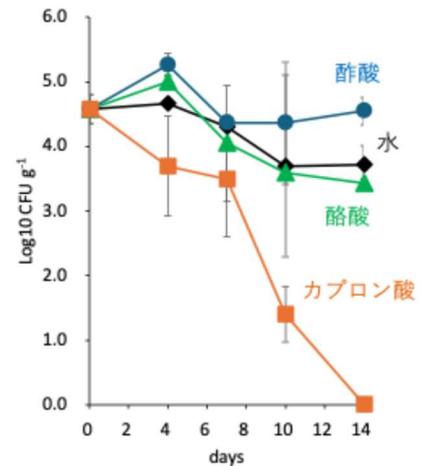


図3. 黒ボク土に接種したトマト萎凋病菌に対する各有機酸の消毒効果。温度は15°Cで行った。

結論

安価なエタノールと酢酸を炭素源として嫌気培養することにより、E801株は高濃度のカプロン酸を生産できることが明らかとなった。カプロン酸はトマト萎凋病菌や青枯病菌に加え、多犯性の半身萎凋病菌の分生子と微小菌核に対しても強い消毒効果を持つことが明らかとなった。また、土壌に接種したトマト萎凋病菌を低温下かつ好気条件下でも完全に消毒できた。以上のことから、E801株が発酵生産するカプロン酸を用いることで、低温下かつ低コストで植物病原菌の消毒が可能なが強く示唆された。今後は消毒後の土壌に各種作物を植栽し、病害を防除・抑制できることを示していく必要があると考えられる。

文献

- 1) Shirane, S., Momma, N., Usami, T., Suzuki, C., Hori, T., Aoyagi, T., and Amachi, S. (2023) Fungicidal activity of caproate produced by *Clostridium* sp. strain E801, a bacterium isolated from cocopeat medium subjected to anaerobic soil disinfestation, *Agronomy*, **13**: 747.