

# 納豆菌(Bacillus subtilis var. natto)によるイチゴの灰色かび病に対する抑制効果

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	橋本,俊祐 河村,郁恵 中島,雅己 阿久津,克己
発行元	日本植物病理學會
巻/号	78巻2号
掲載ページ	p. 104-107
発行年月	2012年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) によるイチゴの灰色かび病に対する抑制効果

橋本 俊祐<sup>1</sup>・河村 郁恵<sup>1</sup>・中島 雅己<sup>1\*</sup>・阿久津克己<sup>1</sup>

### ABSTRACT

HASHIMOTO, S.<sup>1</sup>, KAWAMURA, I.<sup>1</sup>, NAKAJIMA, M.<sup>1\*</sup> and AKUTSU, K.<sup>1</sup> (2012). Suppressive effects of some isolates of *Bacillus subtilis* var. *natto* against gray mold of strawberry. Jpn. J. Phytopathol. 78: 104–107.

The efficacy of *Bacillus subtilis* var. *natto*, a beneficial food microbe, was tested as a control for gray mold of strawberry. When five isolates of *Bacillus subtilis* var. *natto* were cultured with the gray mold fungus on potato sucrose agar plates, all isolates inhibited fungal growth. Isolate No. 2, which was the most inhibitory of the fungus *in vitro*, reduced disease progress in both detached leaves and flowers. These results suggest that isolate No. 2 of *B. subtilis* var. *natto* has potential as biological control agent of gray mold of strawberry plants.

(Received September 28, 2011; Accepted November 1, 2011)

**Key words:** biological control, *Bacillus subtilis* var. *natto*, gray mold, strawberry

バイオコントロール技術の導入により、化学農薬の使用を削減することができ、薬剤耐性菌の発生抑制などが期待される。しかし、バイオコントロール資材が利用されるかどうかは、その防除効果のみならず、「化学殺菌剤に替わる安全な方法である」と消費者に受け入れられるかにも影響される (Chalutz and Droby, 1998)。細菌、酵母、糸状菌を含む食品微生物と呼ばれる微生物は、歴史的にパン、リンゴ酒、ビール、ワインなどの特殊な食品や飲物を製造する場合、または天然防腐剤として発酵果物・野菜・肉・日用品に利用されており、このような有益な微生物は通常安全であるとみられ、消費者に長く受け入れられてきた。これまでに食品微生物を用いたバイオコントロールとしては、チーズ製造に用いる培養スターターから分離された *Bacillus amyloliquefaciens* C06 がモモのポストハーベスト病害である灰星病を効果的に抑制したことが報告されている (Zhou *et al.*, 2008)。日本の代表的な食品微生物の1つに納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) を挙げることができる。納豆菌は日本人が普段から口にしていない身近な細菌であることから、大きな抵抗感を感じることはない微生物である。さらに納豆菌が属している *B. subtilis* には、トマトやイチゴの灰色かび病やうどんこ病などの植物病害の生物的防除手段として生物農薬に用いられている種類も含まれている (ボトキラー水和剤, インプレッション水和剤)。

以上のことから、*B. subtilis* に属する納豆菌には植物病害の防除に利用できる可能性があり、かつ食品由来の微生物であることから安全で消費者に受け入れられやすい防除が可能になると考えられた。これまでに筆者らは納豆菌がカンキツ緑かび病, イチゴ炭疽病, キュウリ褐斑病に対し抑制効果を示すことを報告しているが (橋本ら, 2010a・2010b), これらの他に納豆菌による植物病害の防除に関する研究報告はない。本研究では、市販の納豆から分離された納豆菌株をバイオコントロール・エージェントの候補として用い、イチゴの灰色かび病に対する抑制効果を調査した。

**供試菌株** 本試験では、5種の市販納豆からそれぞれ単一コロニーを分離・培養後、細菌同定検査用キット API50CH (ビオメリュー社製) および納豆製造試験 (木内ら, 1987) によって同定された納豆菌 (*B. subtilis* var. *natto*) 5株 (No. 1～5) をバイオコントロール・エージェントの候補として用いた (橋本ら, 2010b)。納豆分離株 No. 1～5 の滅菌水懸濁液を Trypticase soy 寒天 (TSA) 平板培地 (DIFCO 社製) に塗布し、28°C の恒温器で培養後、4°C の冷蔵庫で培養した。

試験の際には、TSA 平板培地を用いて 28°C で 24 時間前培養した納豆分離株を Trypticase soy 液体 (TSB) 培地 (DIFCO 社製) に懸濁し、28°C, 100 rpm で 24 時間振とう培養を行った。振とう培養後、遠心分離 (3000 g, 10 分間, 24°C) によ

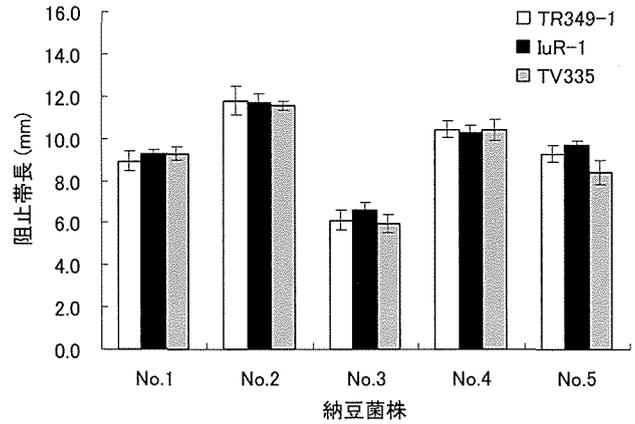
<sup>1</sup> 茨城大学農学部 (〒 300-0393 茨城県稲敷郡阿見町 3-21-1) Ibaraki University College of Agriculture, 3-21-1 Ami, Inashiki, Ibaraki 300-0393, Japan

\* Corresponding author (E-mail: mnakaji@mx.ibaraki.ac.jp)

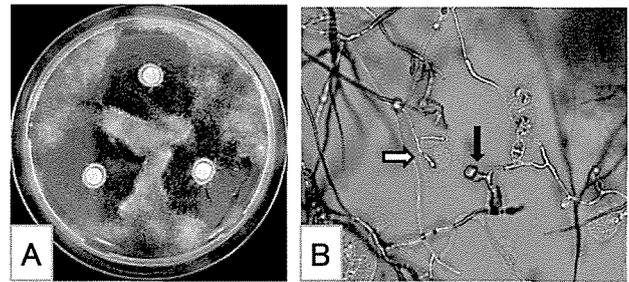
り培地成分を除き、滅菌水に懸濁し、分光光度計を用いて懸濁液を  $OD_{600} = 1.0$  に調整した。

対峙培養試験 灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) は薬剤感受性の異なる TR349-1 (ベノミル感受性, イプロジオン感受性), IuR-1 (ベノミル耐性, イプロジオン感受性), TV335 (ベノミル耐性, イプロジオン耐性) の3菌株を供試した。  $1.0 \times 10^5$  個/ml に調整した *B. cinerea* の分生子懸濁液 100  $\mu$ l を Potato sucrose 寒天 (PSA) 平板培地 (ジャガイモ 200 g, スクロース 20 g, 寒天 15 g, イオン交換水 1000 ml) に広げ、培地上の3ヵ所に滅菌ペーパーディスク (径 5 mm, ADVANTEC) を置床し、そこへ納豆菌懸濁液 5  $\mu$ l を滴下した。対照区では滅菌水を滴下したペーパーディスクを置床した。これを 25°C で2日間培養し、阻止帯長 (納豆菌コロニー先端から阻止帯先端までの長さ) を測定した。その結果、供試したすべての納豆菌処理区において明瞭な阻止帯が認められ、No. 2 株は最も大きな阻止帯を形成した (第1図, 第2図A)。また、阻止帯付近の *B. cinerea* の菌糸体を光学顕微鏡 (OLYMPAS BH-2) を用いて観察したところ、すべての納豆菌処理区で菌糸先端部の膨張や菌糸内容物の漏出が認められ (第2図B)、菌糸細胞壁に対する合成阻害か、あるいは分解作用が関与している可能性が考えられた。これまでに納豆菌の属する *B. subtilis* は環状ペプチド抗生物質 Iturin A, Surfactin などの抗菌物質を産生することが明らかにされている (Gueldner *et al.*, 1988; Hiraoka *et al.*, 1992)。抗真菌リポペプチド Iturin A は、酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞膜を損傷すること (Thimon *et al.*, 1995; Maget-Dana and Peypoux, 1994; Maget-Dana and Ptak, 1990)、またアカパンカビ (*Neurospora crassa*) の菌糸細胞壁の合成を阻害すること (村山ら, 2009) が報告されている。これらのことから、納豆分離株が示した *B. cinerea* に対する菌糸伸長抑制効果には、Iturin A による菌糸体の細胞膜損傷及び細胞壁合成阻害が関与している可能性が考えられた。今後、納豆分離株の Iturin A 産生・分泌について調査を進める予定である。

納豆菌のイチゴ植物体上における灰色かび病に対する抑制効果 納豆菌によるイチゴ植物体上における灰色かび病に対する抑制効果について、前述の灰色かび病菌3菌株を供試し、培土 (スーパーミックス A) でポット (径 9 cm) 栽培した2~3週齢のイチゴ植物 (品種: さちのか) の2番目に新しい複葉を用いて調査した。滅菌水を注いだコニカルビーカー (100 ml) の口をパラフィルムで覆い、中央に直径 1 mm 程度の穴を開けた後にイチゴ複葉の葉柄を挿し、実験に供試した。納豆菌懸濁液 ( $OD_{600} = 1.0$ ) をイチゴ複葉に 5 ml 噴霧処理した後、これらをビニール袋で覆い、25°C、明期 12 時間/暗期 12 時間の人工気象器内で維持した。対照として、



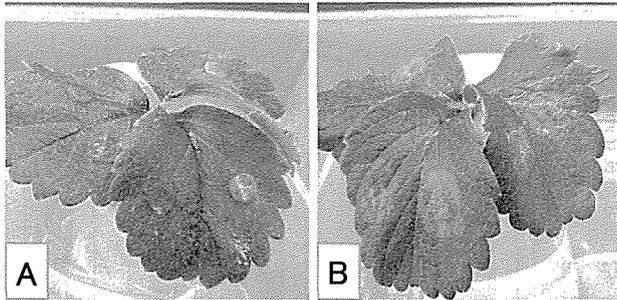
第1図 PSA 培地における対峙培養 2 日後の納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) 5 株 (No. 1 ~ No. 5) による灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) の生育阻害。



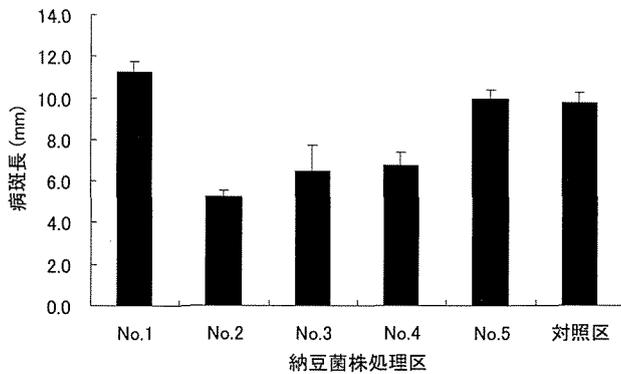
第2図 PSA 培地における対峙培養 2 日後の納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) No. 2 株による灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) 菌糸体の生育阻害。A: 灰色かび病菌の生育阻止帯, B: 生育阻止帯付近の灰色かび病菌菌糸体の光学顕微鏡写真 ( $\times 200$  倍), 黒矢印: 菌糸先端細胞の膨張, 白矢印: 菌糸先端細胞の内容物漏出。

納豆菌懸濁液の代わりに滅菌水を用いた区を設定した。納豆菌処理 24 時間後に PSA 培地で 6 日間培養した *B. cinerea* 菌糸体プラグ (径 5 mm) を葉上に接種し、水を張ったプラスチックトレーに置床して前述と同様に人工気象器内に維持した。接種 4 日後に病斑径を測定し、納豆菌による灰色かび病に対する抑制効果を調査した。試験は各処理区あたり 1 複葉 (3 小葉) を用いて、5 反復で行った。その結果、納豆分離株のうち No. 2 株処理区における抑制効果が最も高く、TR349-1 を接種した場合の病斑長が対照区で  $9.8 \pm 0.5$  mm に対して No. 2 株処理区では  $5.3 \pm 0.3$  mm であった (第3図, 第4図)。IuR-1 および TV335 を用いた接種試験においても同様の傾向が認められ、No. 2 株によるイチゴ葉上での灰色かび病に対する抑制効果が確認された。

次に、イチゴ植物の花器における No. 2 株の灰色かび病に対する抑制効果を調査した。No. 2 株の懸濁液を開花 1 日後のイチゴ花器に 3 ml 噴霧し風乾させた後、ビニール袋で覆

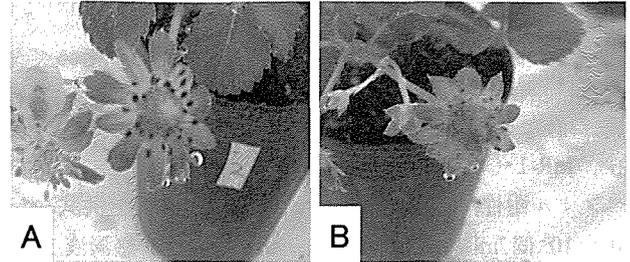


第3図 イチゴ葉における納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) No. 2株の噴霧処理による灰色かび病に対する抑制効果. A: No. 2株噴霧処理区, B: 対照区.



第4図 納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) 5株 (No. 1 ~ No. 5) を噴霧処理したイチゴ葉における灰色かび病の病斑進展. 図中のバーは標準誤差を示す.

い, 25°C, 明期 12 時間/暗期 12 時間の人工気象器内で維持した. 対照として, 納豆菌懸濁液の代わりに滅菌水を噴霧した処理区を設けた. 処理 24 時間後に *B. cinerea* TR349-1 の分生子懸濁液 ( $1.0 \times 10^6$  個/ml) を 2 ml 噴霧接種した後, 前述と同様に人工気象器内で維持した. 接種 4 日後, 6 日後に発病程度, また 6 日後に花器 1 個当たりの分生子形成数を測定



第5図 イチゴ花器における納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) No. 2株の噴霧処理による灰色かび病に対する抑制効果. A: No. 2株噴霧処理区, B: 対照区.

した. 花器での発病程度は, 指数 0: 未発病, 1: 花器の 25% 以下の菌叢, 2: 花器の 50% 程度の菌叢, 3: 花器全体に菌叢, 4: 花器の腐敗の基準で評価した.

罹病花器における分生子形成に対する抑制効果については, 花器 1 個当たりの分生子形成数を下記の方法で算出して評価した. 各処理区の花器を水 2 ml 中でボルテックスミキサーを用いて 1 分間懸濁し, 懸濁液中に含まれる分生子数を血球計算盤を用いて測定した. 試験は各処理区当たり開花した 1 花器を持つ 3 株の苗を用い, 3 反復で行った. 試験の結果, 対照区における供試花はすべてが発病し, 接種後 4 日と 6 日で発病指数 3 以上を示した花数は 9 花中それぞれ 7 花と 8 花であった. 一方, No. 2 株処理区では 1 花のみであり, 対照区に比べて発病程度は有意 ( $P < 0.05$ ) に低かった (第 5 図, 第 1 表). また, 接種 6 日後に花器に形成された *B. cinerea* 分生子数を測定したところ, 対照区では  $44.0 \times 10^4$  個/花器であったが, No. 2 株処理区では  $10.3 \times 10^4$  個/花器であり, 対照区に比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に低い値を示した. イチゴ植物において灰色かび病菌の主要な感染部位であり, 発病後に第二次感染源となる分生子が大量に形成される花器で, No. 2 株による顕著な抑制効果が認められた. 以上の結果が

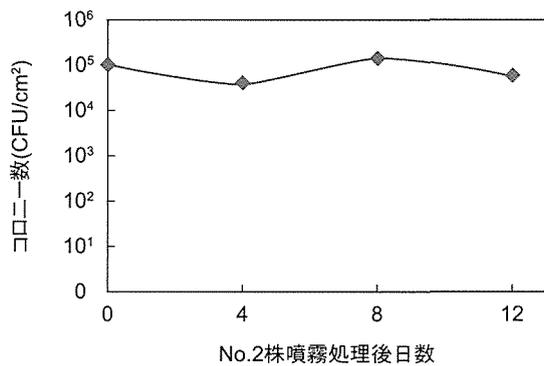
第1表 納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) No. 2株の噴霧処理によるイチゴ花器における灰色かび病抑制効果

接種後日数	試験区	供試花数	発病指数 <sup>a)</sup> 別花数					発病指数代表値 <sup>b)</sup>
			0	1	2	3	4	
4日	No. 2 処理区	9	7	1	0	1	0	0
	対照区	9	0	1	1	6	1	3
			有意性 <sup>c)</sup>					*
6日	No. 2 処理区	9	3	5	0	0	1	1
	対照区	9	0	0	1	1	7	4
			有意性					*

a) 発病指数はそれぞれ 0: 未発病, 1: 花器の 25% 以下の菌叢, 2: 花器の 50% 程度の菌叢, 3: 花器全体に菌叢, 4: 花器の腐敗

b) 中央値を示す

c) Mann-Whitney の U 検定により, \* は 5% 水準で有意差あり



第6図 イチゴ葉上に噴霧した納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) No. 2 株の生息密度推移。

ら、No. 2 株はイチゴ植物の花器において灰色かび病の発病および二次感染源となる分生子の形成を抑制する効果を有することが示された。

**No. 2 株のイチゴ葉上における生息密度** No. 2 株のイチゴ葉における定着性を調査した。No. 2 株の懸濁液 ( $OD_{600} = 1.0$ ) を、栽培 2~3 週間後のイチゴ苗の葉面上に 5 ml 噴霧し、風乾させた後、25°C、明期 12 時間/暗期 12 時間の人工気象器内で維持した。処理後 0, 4, 8, 12 日に葉を直径 1 cm のリーフパンチャーで打ち抜き、リーフディスクを滅菌水 1 ml 中で 1 分間攪拌した。懸濁液を希釈した後、100  $\mu$ l の各希釈液を TSA 培地に広げ 37°C で 15 時間培養した。培地上に形成されたコロニー数から葉における No. 2 株の生息密度を算出した。試験は 3 株の苗を用い、各調査日において各苗の葉から 3 枚のリーフディスクを打ち抜いて調査した。なお、未接種のイチゴ苗葉面上における *B. subtilis* の菌密度は検出限界以下 (20 cfu/cm<sup>2</sup> 未満) であった。試験の結果、処理 0 日後から 12 日後にかけて No. 2 株の生息密度は  $3.8 \times 10^4$  cfu/cm<sup>2</sup> から  $1.4 \times 10^5$  cfu/cm<sup>2</sup> を推移し、イチゴ葉上で安定的に維持されていることが明らかとなった (第 6 図)。また、試験を遂行する 12 日間でイチゴ葉における No. 2 株処理による影響は観察されなかった。本試験では、花器における No. 2 株の定着性の評価は行わなかったが、これまでにマルハナバチにより運搬された *B. subtilis* IK-1080 が訪花 21 日後まで増殖することが報告されており (田口ら, 2003)、また, Demoz and Korsten (2006) はアボカド花上で *B. subtilis* がアボカドの花の雌ざい表面に定着できることを報告していることから、本試験においても花器において No. 2 株が定着している可能性が高く、抑制要因の 1 つとなっていると考えられる。

以上の結果から、No. 2 株はイチゴ植物の葉および花器に

おいて灰色かび病の発生を抑制する効果を有することが示され、有用なバイオコントロール・エージェントに成り得る可能性が示唆された。また、本研究ではバイオコントロール・エージェントの候補として納豆菌 5 株のみを用いたが、さらに多種類の納豆菌株を用いることにより、より抑制効果の高い株が選抜される可能性も考えられる。

#### 引用文献

- Chalutz, E. and Droby, S. (1998). Biological control of postharvest disease. In *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. (Boland, G. J., Kuykendall, L. D., eds.). pp. 150-170, Marcel Dekker, New York.
- Demoz, T.B. and Korsten, L. (2006). *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogen. *Biol. Control* 37: 68-74.
- Gueldner, R.C., Reilly, C.C., Pusey, P.L., Costello, C.E., Arrenfale, R.F., Cox, R.X., Himmelshbach, D.S., Crumley, F.G. and Culter, H.G. (1988). Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of perch brown rot with *Bacillus subtilis*. *J. Agric. Food Chem* 36: 366-370.
- 橋本俊祐・中島雅己・阿久津克己 (2010a). 納豆菌 (*Bacillus subtilis*) によるイチゴ炭疽病とキュウリ褐斑病に対する抑制効果. *日植病報* 76: 218. (講要)
- 橋本俊祐・西野芳太郎・中島雅己・阿久津克己 (2010b). 納豆菌 (*Bacillus subtilis*) を用いた植物病害のバイオコントロールについて. *日植病報* 76: 40. (講要)
- Hiraoka H., Ano T. and Shoda M. (1992). Molecular cloning of a gene responsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. *J. Ferm. Bioeng* 75(5): 323-326.
- 木内 幹・田谷直俊・ジョコ スリスチョ・舟根和美 (1987). 市販納豆菌の分離と同定. *食総研報* 50: 18-21.
- Maget-Dana, R. and Peypoux, F. (1994). Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87: 151-174.
- Maget-Dana, R. and Ptak, M. (1990). Iturin lipopeptides: interactions of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1023: 34-40.
- 村山肇子・工藤俊輔・近藤久恵 (2009). 抗真菌リポペプチドを分泌する新規土壌細菌. *関東学院大学工総研報* 37: 41-47.
- 田口義広・百町満朗・杖田浩二・川根 太 (2003). *Bacillus subtilis* IK-1080 のマルハナバチへの付着方法とトマト灰色かび病の防除効果. *日植病報* 69: 94-101.
- Thimon, L., Peypoux, F., Wallach, J. and Michel, G. (1995). Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 1288: 101-106.
- Zhou, T., Schneider, K.E. and Li, X.Z. (2008). Development of biocontrol agents from food microbial isolates for controlling post-harvest peach brown rot caused by *Monilinia fructicola*. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 180-185.