

納豆菌が植物の病害抑制にもたらす効果

寺竹 遥陽 濱口 夢 渡邊 愛琉

1. 要旨

私たちは、植物の免疫を高めることにより、植物病害を抑制できないかという点に着目し、植物の免疫について研究を進めた。その中で、ISR(誘導全身抵抗性)という植物の免疫システムがあることを知り、興味を持って調べてみたところ、ISRは植物の抵抗を働かせる抵抗誘導資材を植物の一部にのみ接種しても、植物全体に抵抗性が表れること、また、根圏細菌によって活性化される免疫システムであることが分かった。そこで、私たちは根圏細菌の中で最も身近な納豆菌に着目し、寒さや害虫に強く育てやすいレモンバームを使用して研究を行った。また、植物病害の抑制に納豆“菌”が有効に作用するのか、または、納豆に含まれるその他の成分による作用であるのかという点に疑問を抱き、レモンバームを供試植物として使用し、A:菌あり納豆液、B:滅菌納豆液、C:水のみを与える3つのグループに分けて栽培し、葉の枚数、成長度合い、植物病害(炭疽病)の発病度合いを比較しながら観察を行った。これにより、グループA、Bにおいて、グループCより発病の抑制が確認できた。

2. 研究目的・意義

近年、農業生産から家庭菜園に至るまで、多くの植物が植物病により多大な被害を受けている。現在の日本においても、国内で一万以上の植物病害が知られている。植物はもともと病害に対する防御能力を持っている訳ではなく、細菌やウイルスに感染することでその抵抗性を示すようになる。私たちはこのような植物の免疫システムについて興味を持ち調べていく中で、植物の誘導抵抗性には大きく分けて、サリチル酸の蓄積によって誘導されるSAR(Systemic Acquired Resistance)経路と、ジャスモン酸とエチレンによって誘導されるISR(Induced Systemic Resistance)経路が存在することが分かった。植物は病原菌の感染に際して過敏感反応を起こし、病原体の増殖を抑える。過敏感反応が契機となってシグナルが全身に伝わり誘導されるのがSARであり、病原体が植物体の他部位へと繁殖することを制限し、感染拡大を防ぐ。これに対しISRでは、外敵からの刺激ではなく根圏に生息する病原性のない細菌や真菌との相互作用が契機となり、植物全身の免疫システムが活性化することで、広範囲の病害や草食の昆虫に対する防御システムを強化する。つまり、抵抗誘導資材を植物の一部のみに接種した場合、SARは接種した部分のみに局所的に抵抗性が生じるが、ISRは植物全体に抵抗性が現れるということである。早急な抵抗誘導の必要がない場合は、ISRを活性化させておくことで将来の病害予防に効果的であると考えられる。そこで私たちは、根圏細菌を用いてこのISRを人為的に活性化させ、植物の免疫を高めることで植物病害を予防できるのではないかと考えた。近年では、農薬がもたらす環境への悪影響や、農作物に付着した薬品による健康被害などが問題視され、有機栽培や無農薬栽培が注目されている。そこで、薬品を使用せずに身近にあるものでISRを活性化させる方法が確立できれば、農家における農薬の使用量の節減につながり、コスト削減だけでなく環境にも優しい農業につながるのではないかと考えた。また、農業関係者だけでなく家庭菜園を行っている人など幅広い人の役に立つのではないかと考え、根圏細菌の一種である枯草菌のうち、日本人に最も身近な納豆菌(*Bacillus subtilis natto*)を用いて研究を行うことにした。

研究を始めるにあたり、先行研究を調べてみると、根圏細菌をキュウリの地下部に接種後、キュウリ炭疽病菌を葉に接種したところ顕著な病気抑制が確認されていた(百町満郎.1998)。また、正確な記録やデータがある訳ではないため信憑性には欠けるが、実際に炭疽病が蔓延したイチゴ農家において、納豆50gと水300mlで作成した納豆液を300倍に希釈し、農薬とともに定期的に散布したところ感染が抑制されたという記録が残っていた。同時に、炭疽病だけでなくうどん粉病にも効果的であるという記録も残っていた(細谷勇一.2021)。さらに病原菌の接種方法について、病原菌の孢子懸濁液を葉に噴霧することで植物に病気が感染することが報告されている(黄耿堂.1981)。本研究ではこれらの研究を参考に、病原菌を接種した3グループの植物の比較をもとに、納豆菌による植物病害抑制の可能性について研究を行った。

3. 研究方法

今回の実験では供試植物として、害虫や寒さに強く比較的育てやすいという観点からレモンバーム(*Melissa officinalis*)を用いた。実験を開始した時期とレモンバームの発芽の時期を過ぎてしまっていたため、苗を12株購入して実験で使用するまで同条件で栽培した。栽培途中ポット内で根詰まりが起こっていたため、ポットから

プランターに植え替えた。研究を始めるにあたって、納豆液を与えることで植物が肥料やけのように弱ってしまう可能性が考えられた。そこで納豆液を与えても植物は問題なく成長するのかを調べるためにオリジナル納豆液を作成し、実験 1-①を行った。

実験 1

<用いた材料>

- ・納豆
- ・蒸留水
- ・コーヒーフィルター・ビーカー
- ・乳棒、乳鉢（実験 1-②ではミキサー）
- ・メスシリンダー
- ・マイクロピペッター
- ・遠沈管
- ・漏斗
- ・レモンバーム×2 株（実験 1-①）
- ・レモンバーム×18 株（実験 1-②）
- ・100 倍希釈納豆液（実験 1-①のみ）
- ・300 倍希釈納豆液

実験 1-①では、栽培していたレモンバーム 12 株のうち 2 株を使用した。この実験は納豆液を与えることで植物に悪影響がないか確認することを目的としているため、2 株の成長の差には考慮していない。まず、市販の納豆 20 g に蒸留水 120 ml を加えながら納豆をすり潰し、コーヒーフィルターで濾過した。ここでは、納豆液を濾過する際に時間がかかる点、時間の経過とともにコーヒーフィルター内の納豆液の粘度が強くなり実験に使用しづらくなる点を考慮し、初めに濾過された 50 ml のみを実験に使用した。次に、濾過した液を、先行研究を参考に 300 倍に希釈した。また、納豆液の濃度によって植物の成長に差が出るのかを調べるため、100 倍に希釈した納豆液も作成した。ここで、100 倍に希釈した納豆液を与える株と 300 倍に希釈した納豆液を与える株に分け、それぞれ毎週 2 回水やりの際に 10ml ずつ与えた。この操作を約 1 ヶ月間継続し、様子を観察した。結果の記録後、2 株のみでは結果の信憑性が低くなると考え、個体数を増やしても実験 1-①と同様の結果が得られるかを確認するために、実験に使用する株数を増やして実験 1-②を行った。

その際、同条件で育てたレモンバームの株数を増やすために挿し木を行った。まず、葉の節が 3 節以上ある茎を探し 3 節目の少し下でカットした。次に 1 番上の節以外の葉を落とし、約 1 時間水を吸わせた後に赤玉土を入れたポットに挿し木した。1 週間室内で栽培した後、25℃の人工気象器に移動した。このとき人工気象器に移動するまで 1 週間期間を空けたのは、人工気象器内に害虫や病気を入れないようにするためである。人工気象器内では 24 時間光が当たる環境にした。しかしこの方法では全ての株が枯れてしまった。乾燥によるダメージが原因だと考えた。そこで、挿し木後のポットにビニール袋をかぶせた状態で、人工気象器には入れずに栽培した。その結果、人工気象器に入れた時より数日長く栽培できていたものの、上手くいかず全て枯れてしまった。

乾燥が和らぐと挿し木の成功率が上がるのではないかと、また、土の中に虫が発生した可能性を考え、次に水耕栽培を行った。まず挿し木の手順と同じように、葉の節が 3 節以上ある茎を探し 3 節目の少し下でカットした。次に 1 番上の節以外の葉を落とし、茎のカットした部分が水に浸かるようにし、室内で栽培した。その結果、挿し木よりも長期間、健康に栽培することができたが、それ以上成長することなく約 2 週間後枯れてしまった。

これらの方法が上手くいかなかったのは茎から根が生えるまでに時間がかかるからではないかと考え、根ごと株分けを行った。初めに、プランターからレモンバームの株全体を取り出し、根の部分をはぐしながら自然に分かれるようなところで 2 つ、または 3 つに分けた。次に、その株の古い葉や傷んでいる葉を取り除き、それぞれ別のポットに植え戻した。このとき、ポットの土はすべて“花と野菜の土”という培養土に入れ替えた。以上の株分け方法で問題なく栽培できるか、株分けした 1 株目を 1 週間栽培して確認した後、すべての株において同様に株分けを行った。その結果、実験 1-①で使用した 2 株を除いて合計 20 株まで株数を増やすことに成功した。

実験 1-②では実験 1-①で使用しなかった残りの 20 株のうち、同じ日に株分けした 18 株を用いた。実験 1-①と同様の手順ですべてのレモンバームに 300 倍に希釈した納豆液を与えて 1 ヶ月間様子を観察した。なお、実験 1-①の結果より実験 1-②以降の実験では使用する納豆液の濃度は先行研究に揃え、300 倍に統一した。

私たちは実験 1-①, ②で得られた結果から、納豆液には植物の成長に有効な作用があるのではないかと考えた。しかしこれは納豆菌によって免疫が活性化された効果でなく、納豆に含まれる納豆菌以外の成分が肥料のように

作用した可能性が考えられた。そこで、植物に与える納豆液内の納豆菌の有無が病害抑制効果にもたらす違いを調べるため、次のような手順で実験2を行った。

このとき、実験2に向けて実験株数を増やす必要があると考え、脱脂綿や寒天培地を用いて種子からレモンバームを栽培した。脱脂綿法では、まず直径約15cmのシャーレの上に脱脂綿を敷き詰め、レモンバームの種をある程度均等になるように散りばめた。これに水を噴霧してよく湿らせた後、25℃の人工気象器に入れて週3回水やりし、栽培した。乾燥を防ぐ目的で、シャーレには蓋を被せた。その結果、5日程度で発芽し始めほとんどの芽が1.5cm程まで成長し、根も伸びていた。しかし、シャーレ内の湿度が高くなったことが原因で脱脂綿の一部にカビが生え始めてしまったため、寒天培地での栽培に切り替えた。寒天培地の原液は水1Lにハイポネックスの粉末1.5g、グラニュー糖20g、粉寒天8gを入れ、よく混ぜ合わせて実験用ガラス瓶に入れたものを納豆液作成時と同様に121℃のオートクレーブで20分間加熱滅菌した。その後冷め切る前に300mlのビーカーに約100mlずつ注ぎ、菌の混入を防ぐために一時的にラップをかけて寒天を冷ました。できた寒天培地には脱脂綿で栽培していたレモンバームを消毒したピンセットで抜き取り、3株ずつ等間隔に植えた。このとき芽は培地から1cmから1.5cm出るようにした。滅菌状態を保つためアルミホイルで蓋をして輪ゴムで留め、25℃の人工気象器で栽培した。しかし、3日経過した時点で寒天培地にカビが生え始め、1週間後には培地全体がカビに覆われてしまった。脱脂綿法と寒天法のどちらにもカビが生えてしまった原因として、種子に菌が付着していた可能性が考えられた。そこで、寒天培地に滅菌水で洗浄した種子を滅菌水ごと滴下し、同様の手順で栽培したが、同じようにカビに覆われてしまいほとんどが発芽もしていなかった。他にも方法を探して実践しようとしたが、種子から栽培するには時間が足りない判断し、実験には今まで栽培していたものを使用した。

実験2

<用いた材料>

- ・レモンバーム×18株
- ・水
- ・菌あり納豆液
- ・簡易温室
- ・滅菌納豆液
- ・病原菌懸濁液

まず、それまで栽培していたレモンバーム18株を成長の度合いが均等になるような3グループに分け、グループA、B、Cとした。また、この実験を行うにあたって、実験1-①と同じ方法で作った納豆液を“納豆菌あり納豆液”、実験結果が納豆菌による作用か、その他の成分による作用かを明確に判断するためにその納豆液を121℃のオートクレーブで20分間加熱滅菌したものを“滅菌納豆液”とした。この温度、時間で滅菌したのは、納豆菌を含む枯草菌は、死にそうになると耐熱性に優れた芽胞というカプセルを作り、熱の刺激をやり過ごすという特性があり、その芽胞を死滅させるためには121℃で20分以上加熱しなければならないからである。納豆菌あり納豆液を与えるものをグループA、滅菌納豆液を与えるものをグループBとし、グループCには何も与えず水やりのみの状態で栽培した。A、B、Cの全ての株に週2回水やりをし、その際にグループAとグループBにそれぞれの条件の納豆液を10mlずつ与える操作を約1ヶ月半継続した。次に、納豆液の投与期間の終了後、水やりの際、1株に1噴霧ずつ病原菌懸濁液を噴霧する操作を週3回2週間継続した。納豆液の投与期間の前後で気温が大きく上昇していたため水やり回数を変更した。

病原菌としては、非常に身近な植物病害の1つであること、細菌であるため科や属の異なる植物同士でも空気感染すること、感染した葉は黒い斑点ができ、感染拡大に伴い変色部分の面積も拡大していくため病気の広がり方が比較しやすいことなどの理由から炭疽病を使用することにした。病原菌懸濁液には炭疽病に感染している葉を使用しており、炭疽病に感染している葉の特徴をもとに探し、校庭のタイサンボク、クスノキなどから採取した。採取した葉の黒く変色している部分を切り取り、葉の表面を軽く擦りながら200mlの滅菌水と混ぜ、コーヒーフィルターで濾過することで作成した。使用した葉の変色部の総重量は2.03g、総面積は76.75cm²であった。この面積は、方眼紙に葉の変色部の型を録取り、総面積を計算することで求めた。また、病原菌懸濁液を噴霧接種する際、炭疽病はある程度湿度が高い方が感染しやすいことから簡易温室を作成した。グループごとに栽培しているバットの四隅に割り箸をマスキングテープで固定し、その上に適当な大きさに切ったポリ袋を被せた。水やり時以外は四隅をクリップで留めており、空気が出入りできる隙間は常に空くようにした。

病原菌懸濁液を噴霧接種する2週を終えた後に1週間、3グループの全ての株を水やりのみで栽培して最終日に感染状況を比較し、その結果を記録した。その際、時間経過による成長度合いや感染状況の変化を観察するため、噴霧接種を始めてから1週間ごとに各株の写真を撮った。結果の判断方法としては、葉1枚ごとの感染状

況をレベル0～4まで設定し、A、B、Cにおいてレベル毎の葉の枚数を記録し、葉の総枚数に占めるレベル毎の葉の枚数の割合を比較した。全く発病していない葉をレベル0、点のように小さく局地的に発病している葉をレベル1、レベル1より大きめの斑点や点状の発病が複数みられるものの、分布が局地的である葉をレベル2、葉全体に斑点が広がりつつあり斑点の色が薄めの葉をレベル3、葉全体に斑点が広がり斑点の色も濃く、あと少しで枯れそうな状態の葉をレベル4とした。数字が大きくなるにつれてより感染していることを表している(図1参照)。なお、葉の緑の部分の変色しているものに関しては葉焼けと判断し、葉の中心付近に見られる斑点のみを炭疽病として感染レベルを判別した。コンピュータを使用して比較することも検討したが、発病部位の面積や色の濃度などを総合的に判断できるようなツールを作成するには時間が足りないと判断した。よって今回は感染レベルを目視により確認した。そのため観察者の主観が結果に与える影響が大きくなると考え、研究班3名がそれぞれデータをとり、その値を平均したものをレベル毎の葉の枚数とした。

4. 結果

実験1-①において、どちらの株も実験前と比較すると葉の枚数が増え、葉の色が鮮やかな緑色になっていることを確認することができた(図2参照)。これにより、納豆液を与えても植物を問題なく栽培できることが分かった。また、どちらの濃度の納豆菌も成長の度合いにあまり差が見られなかった。実験1-②においても同様に、実験前と比較するとすべての株において著しい成長が確認できた(図3参照)。

実験2の結果を表1、図4に示す。表1は、グループA、B、Cそれぞれにおいて、設定した感染レベルごとの葉の枚数と、それが全体の葉の枚数に占める割合を示している。実験開始時はグループ間で成長の度合いに大差はなかったが、実験後、 $A > B > C$ と全体の葉の枚数に差が見られた。また、病気に感染していないレベル0の割合は、納豆液を与えたグループA、Bは約8割を占めていたが、水のみを与えたグループCは7割にも満たなかった。次に、図4は感染レベルごとの葉の枚数の割合をグループ別に表している。どのグループもレベル0の葉が過半数を占めており、レベル1からレベル4の割合が比較しづらかったため、ここではグラフを拡大して60%以上のところのみを表示している。病気に感染している葉で比較すると、グループCはどのレベルも他のグループより感染の割合が高いことや、重症度の高いレベル3、4の割合が唯一全体の1割を超えていることが読み取れる。また、表1と図4から、納豆菌あり納豆液を与えたグループAと滅菌した納豆液を与えたグループBでは、全体の葉の枚数以外に大きな差は見られなかった。

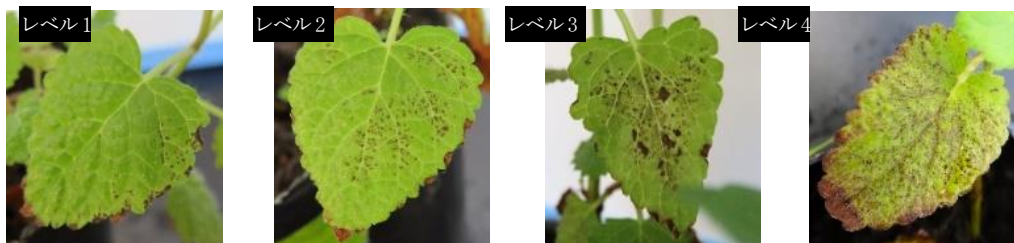


図 1



図 2

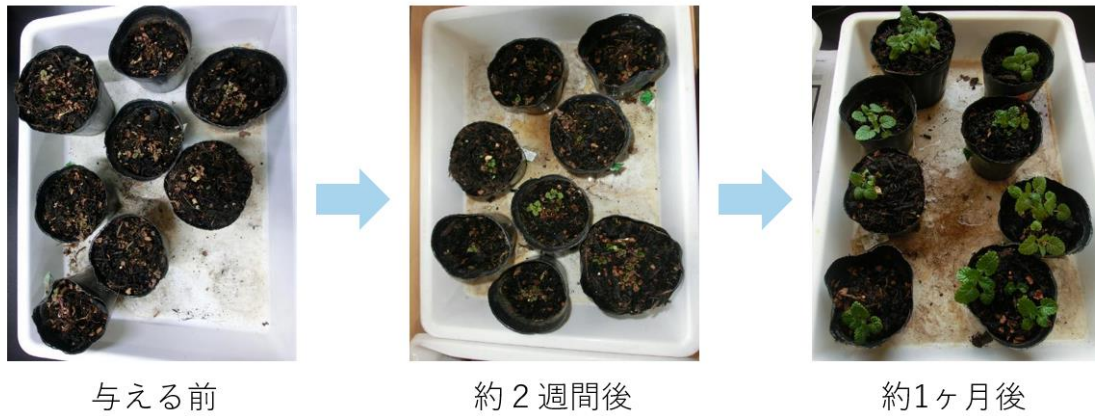


図 3

表 1 それぞれのグループにおけるレベルごとの葉の枚数[枚]

	レベル0	レベル1	レベル2	レベル3	レベル4	合計
A	179	17.7	12	10.7	2.7	222
B	137.3	14.3	14.3	7.7	2.3	176
C	93	16.7	17	12.7	4	143.7

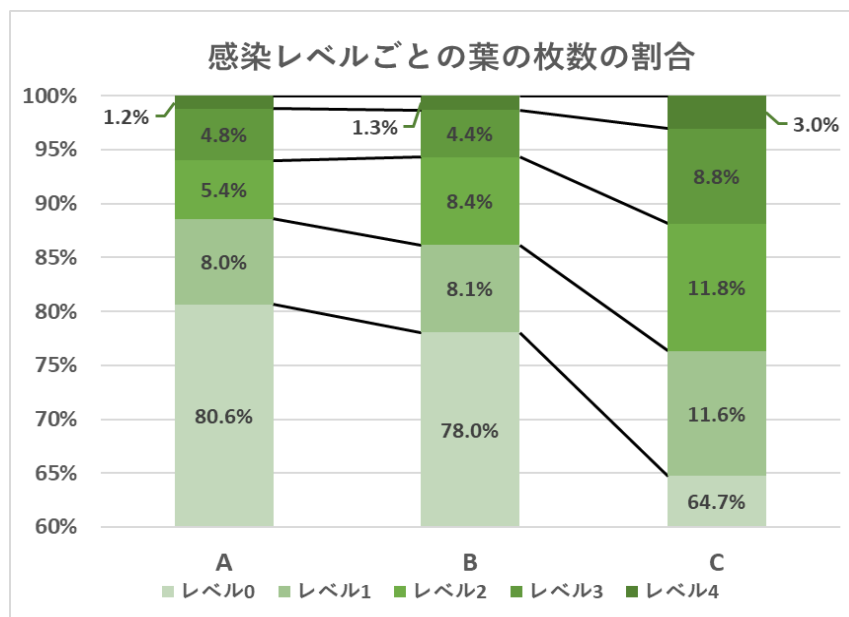


図 4

5. 考察

実験 1-①, ②で得られた結果から、納豆液には植物の成長に有効な作用があるのではないかと考えた。しかしここで得られた結果のみでは、納豆菌による免疫の活性化が植物の成長に作用したのかという判断は難しく、納豆に含まれる納豆菌以外の成分が肥料のように作用した可能性が考えられた。

実験 2 では、グループ A が合計の葉の枚数においてどのグループより多かったことから、病原菌懸濁液を与える前1ヶ月半栽培した際に、グループ A に与えた納豆菌あり納豆液の効果であると考えられる。グループ B よ

りもグループ Cの方が葉の枚数が増えていたのは、グループ Bに与えた滅菌納豆液に含まれる何らかの成分が、肥料のような働きをしたからだと考えている。インターネットで調べたところ、納豆にはナットウキナーゼ、カリウム、ビタミン K2 など多くの栄養素を含む成分が含まれていることが分かった。この中で、肥料の三要素の1つとも言われているカリウムや、熱に強いとされるビタミン K2 などが作用したのではないかと考えている。しかし、今回の実験では栽培前の葉の枚数を正確には記録できていなかったため、正確なデータとは言えない。グループ A、Bはグループ Cより感染割合が低く、感染していても軽度のものが多いことから、納豆液の投与は植物の病害抑制に良い影響を及ぼすと考えられる。また、グループ AとBで比較した際、病気に感染した葉の割合に大きな差が見られなかった。このことから、植物の病害抑制には、先ほど述べたような納豆に含まれる納豆菌以外の成分が作用していると考えられる。もしくはグループ Bの納豆液では121℃で20分加熱滅菌を行ったが、納豆菌の芽胞がすべて滅菌できておらず、実験が正確に行えていなかったという可能性もあり得る。

6. 今後の課題と展望

今回の実験であいまいな結果が得られた原因として、先ほど述べたようなグループ Bで使用する納豆液の滅菌や、炭疽病菌を噴霧する前の株の状態を正確に記録できていなかったことなどが挙げられる。特に滅菌に関しては、作成した納豆液をシャーレに垂らし培養するなどの方法で、少なくとも菌が存在していないかどうかを確認することはできたはずである。また、実験株が少なかったことによる個体差の影響も考える必要がある。これらのことを踏まえて、納豆液の滅菌方法を検討し直したり、実験株数を増やしたりすることで再度実験をする必要があると考えている。また、今回は炭疽病菌を使用したが、うどん粉病やモザイク病など農家や家庭菜園において頻繁にみられる病害を中心に、他の病原菌を使用しても納豆液が同じような効果を持つのかについても研究の余地がある。同時に、別科の植物における納豆液の効果についても研究できればと思う。

7. 参考文献

- ・黄耿堂, 松沢安秀, 阿久津克己, 梶川彰, 見里朝正. 数種うどんこ病菌の接種時における水分の影響. 1981
- ・手林慎一. 植物の誘導抵抗性の解明.
- ・百町満朗. 有用根圏微生物により誘導される植物の全身抵抗性. 1998
- ・細谷勇一. イチゴの炭疽病を抑えた納豆菌. 現代農業 WEB. 2021
- ・豆類/だいず/[納豆類]/食品詳細