

# 納豆菌がオリーブに与える影響

川原 理佳子 来田 愛梨 宮脇 茉白

## 1. 動機と目的

野菜や果樹などの植物栽培において農薬が使用される場合があるが、その使用量が多くなるほど、環境汚染や生態系の崩壊に繋がる危険性も高まる。しかし、人口が増加し続ける現代社会において食糧問題の解決のためにも、効率よく多くの野菜や果樹を栽培できることは人類にとって最重要課題とも言えるのではないだろうか。さらにその方法が人体や自然環境に対する影響が少ないものならばなお良いのではと考えた。そこで、農薬を使用せずに植物を栽培する方法を模索し、上記のような問題の解決の一助となればと考えて、本研究を行った。

香川県の特産物であるオリーブは病気や害虫の被害を受けやすく、栽培時に使用する農薬量が多いことで知られているので、その代わりに植物の生育を促進する微生物を用いて病気や害虫からオリーブを守れないかと考えた。そこで本研究では、日本の食卓にもなじみ深い納豆菌を用いて病気に対する効果を調べることにした。

先行研究では、納豆菌培養液は野菜や果樹の栽培で利用されており、オリーブ栽培においても、成長を促し、病気の予防にも関わるのではないかと仮説を立てた。また、オリーブの葉エキスには抗菌作用があることが知られているが、納豆菌は他の細菌に比べてオリーブの葉エキスへの生存率が高いことが分かっている。よって、葉エキスの作用で納豆菌が死滅してしまう可能性は低いと考えられ、その効果の検証実験が可能だと考えた。今回行った実験Ⅰではオリーブの成長促進について、実験Ⅱでは病気予防について言及する。

## 2. 実験方法

まず、2023年8月上旬にオリーブを3株（大オリーブ）、9月下旬に9株（小オリーブ）を購入した。使用したオリーブはすべてルッカという品種である。



【図1】 大オリーブ

小オリーブ

本実験では葉や茎に筆で納豆菌培養液を与える処理（以下、葉処理）、土に納豆菌培養液を与える処理（以下、土処理）、何の処理もしない（以下、無処理）の三つの条件を設けて、オリーブを育てた。ただし、水やりはどの株も同様に行い、納豆菌を与えた日も同じである。



【図2】 葉処理

土処理

無処理

次に以下の方法で、納豆菌培養液を作成した。

### 予備実験：納豆菌培養液の作成

- ① 納豆3種類をそれぞれ0.5gずつと1.5Lの汲み置きした水をミキサーで混ぜる。納豆菌を3種類混合した理由は多様な遺伝情報をもつ納豆菌液のほうが菌がよく増えると考えたためである。
- ② 納豆菌を培養する栄養分として三温糖を水の量に対して2%加える。
- ③ 30°Cに保ちエアレーションを入れて1日放置する。

④ pH5.0～5.5 の状態となれば完成。

すぐに使用しない培養液は冷凍保存することで1か月程度は同じ状態を維持できる。

#### 納豆菌培養液の量の設定

葉処理と土処理で与える納豆菌量を以下の通りに設定した。

まず、水を使って葉1枚あたりに付着する液体の量を調べたところ、一枚あたり約0.16mlだと分かった。その量を踏まえて、大オリーブは約200枚、小オリーブは35枚の葉があったので、それをかけたものを葉処理一回の量とした。葉処理一回の量は大0.16ml×200枚=33.3ml、小0.16ml×35枚=5.8mlとなった。この設定値の納豆培養液を1週間に1回、葉に塗布した。

土処理は、葉処理と与える量を統一するために1ヶ月に一度、葉処理の4週間分を与えることとした。土処理一回の量は大→33.3ml×4回=133.2ml、小5.8ml×4回=23.2mlとなった。

### 3. 実験Ⅰ：納豆菌培養液がオリーブの成長に与える影響について

実験Ⅰでは、葉処理、土処理、無処理の3つの条件で細胞の成長にどのような影響を与えるかを調べた。その調査対象として、葉の内部組織の1つである、柵状組織に着目した。理由として、柵状組織には葉緑体が多く含まれており光合成が活発に行われる場である。そのため、柵状組織が厚くなるほど、有機物の生産量が増え、オリーブの成長が促進されると言える。よって、本研究で目標とするオリーブの農薬なしでの成長促進の方法を見つけることに繋がると考えた。葉の断面を顕微鏡で観察してみると、土処理で葉全体に占める柵状組織の割合が大きいことに気づいた。そこで試行回数を増やしてデータを収集した。

#### 〈実験Ⅰ：材料・実験用具〉

- ・条件ごとの葉
- ・ニワトコの茎を乾燥させたピス
- ・カバーガラス
- ・顕微鏡
- ・剃刀
- ・時計皿
- ・スライドガラス
- ・接眼マイクロメーター

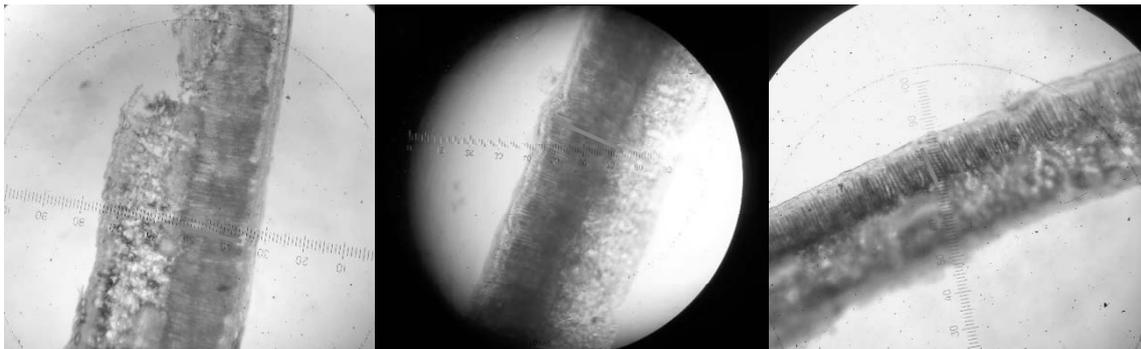
#### 〈実験Ⅰ：葉の薄片作成（の方法）〉

- ① ニワトコという植物の茎の中心部分を乾燥させたものであるピスに葉をはさみカミソリで薄くピスと一緒に時計皿の上に切っていく。
- ② うまく切れた薄片を選んでプレパラートを作る。
- ③ 顕微鏡で観察し、マイクロメーターで柵状組織の長さを測る。



【図3】 葉の薄片作成の様子

【図3】は条件ごとの葉の断面の凡例写真であり、赤線の長さは柵状組織の幅を示している。



【図4】 条件ごとの葉の断面写真の凡例（総合倍率150倍）

葉処理

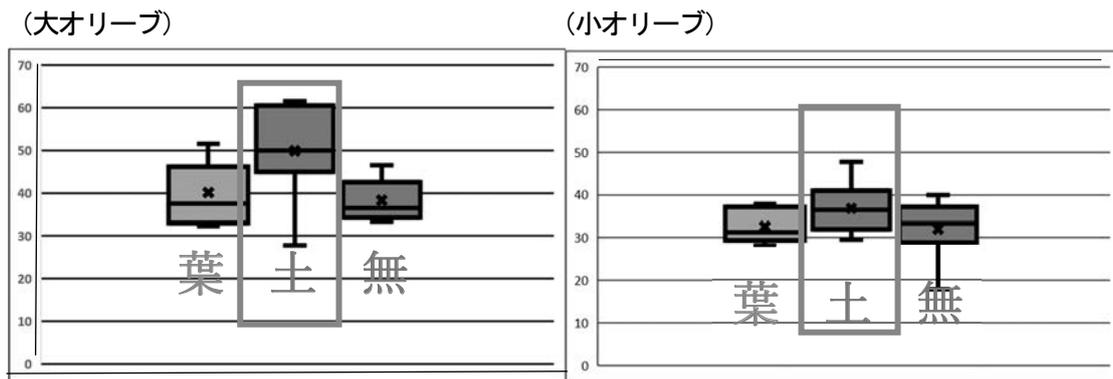
土処理

無処理

#### 〈実験Ⅰ：結果〉

葉全体における柵上組織の割合をまとめてグラフにした。【図5】

試行数は大オリーブ全38枚（内：葉処理13枚 土処理13枚 無処理12枚）、小オリーブは全24枚（内：葉処理6枚 土処理9枚 無処理9枚）である。



【図5】葉全体における柵状組織の割合

結果は大オリーブ，小オリーブのどちらでも土処理で最も柵状組織の発達が見られた。葉処理と無処理は大きな差が見られなかった。

#### 〈実験I：考察〉

実験Iより，土に納豆菌を与えたほうがオリーブの成長には効果があると考えられる。土処理において最も効果が見られた理由としては3つ考えられる。一つ目は，納豆菌を土に与えることにより有機物の分解が活発になり，土壌中の栄養分が豊富となって，結果的に葉の柵状組織が発達するのではないかといいものである。二つ目は，納豆菌が属するバチルス属は防カビ物質を産生することが分かっているため，土壌中の他の菌類の生育を抑えることでオリーブの生育環境をよくするのではないかというものである。三つ目は，納豆菌が植物ホルモンの生成に関与するためというものである。植物ホルモンは，細胞の伸長や種子の発芽など成長を促進するものであり，これが生成され，与えられたことで実験Iでの柵状組織の発達にも繋がったのではないかと考えた。植物ホルモンの中でも成長を促進するオーキシン，サイトカイニン，ジベレリン，ブラシノステロイドなどが可能性として考えられる。

#### 4. 実験II：炭疽病菌に対する葉の防カビ作用について

オリーブの病気の中で被害が最も大きい炭疽病は糸状菌というカビが原因である。そこで，香川県にある農業試験場小豆オリーブ研究所に炭疽病菌を培養した培地を提供していただき，オリーブの葉が持つ防カビ作用に納豆菌がどう影響するのかを調べる2つの実験を行った。

##### 〈実験II(1)：材料・実験用具〉

- ・条件ごとの葉
- ・はさみ（煮沸消毒済）
- ・炭疽病菌培地

##### 〈実験II(1)：方法〉

- ① 加熱消毒したはさみで葉を1cm×1cmに切る。
- ② そのまま炭疽病菌培地の上に乗せる。

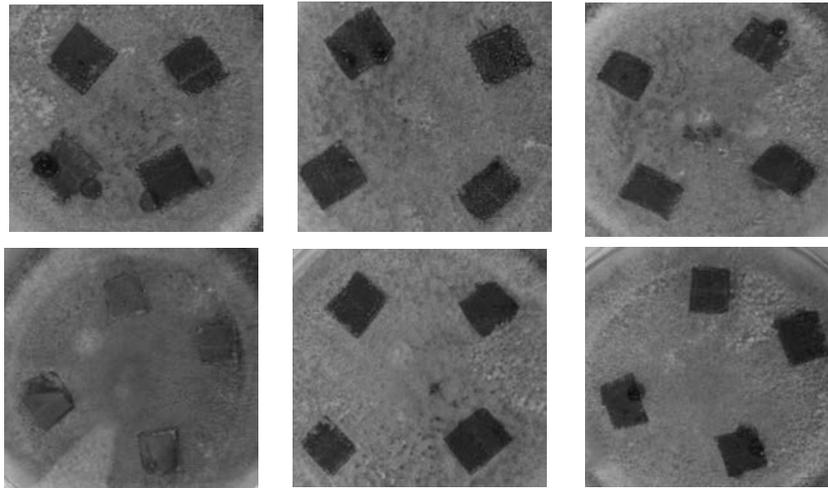
試行数は条件ごとに8個ずつとした。

##### 〈実験II(1)：結果〉

炭疽病菌の培地に葉を置いてから2週間放置し，観察を行った。【図7】見た目上は，どの条件でも大きな変化は見られなかった。



【図6】実験II(1)の図



【図7】 葉処理 土処理 無処理

〈実験II(1)：考察〉

炭疽病菌は主にオリーブの実に感染しやすいことから、葉自体には感染しにくく、感染するにも長い時間を要するためこのような結果となったのではないかと考えた。

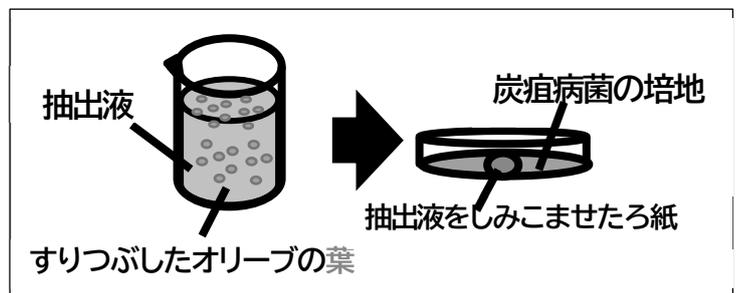
実験II(1)の結果から、オリーブの葉が持つ防カビ作用に納豆菌がどう影響するのかを調べる新たな実験方法を考える必要があった。そこで、葉を直接培地に置く実験から葉の抽出物を利用した実験に変更して、実験II(2)を行うこととした。

〈実験II(2)：材料・実験用具〉

- ・条件ごとの葉 ・すり鉢 ・乳鉢 ・ろ紙 ・炭疽病菌培地 ・ビーカー ・エタノール ・水

〈実験II(2)：方法〉

実験方法をペーパーディスク法に変更し、オリーブの葉が持つ防カビ作用に納豆菌がどのように影響するのかを調べた。ペーパーディスク法とは、寒天培地に試験対象微生物を全面塗抹し、その上に抗菌物質をしみこませたペーパーディスクを置き一定の温度や時間で培養する方法である。

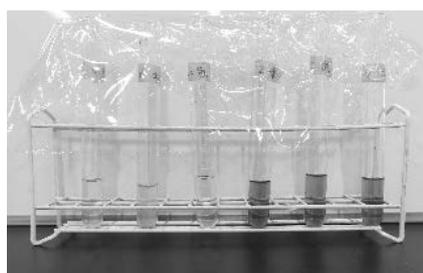


【図8】 実験IIの模式図

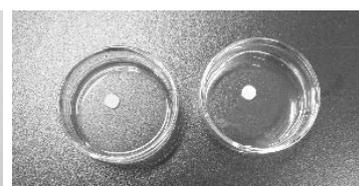
- ① 各条件の葉を煮沸消毒したはさみで1cm×1cmに切り、乳鉢と乳鉢で細かくすりつぶす。【図9】
- ② すりつぶした葉をエタノールまたは水に30分つける。  
先行研究では、水とエタノールを用いた抽出方法が多かったため、この2つを採用した。
- ③ 完成した抽出液をろ過する。【図10】
- ④ 直径5mmのろ紙に15分しみこませる。【図11】
- ⑤ ろ紙を炭疽病菌の培地の上に置く。



【図9】



【図10】



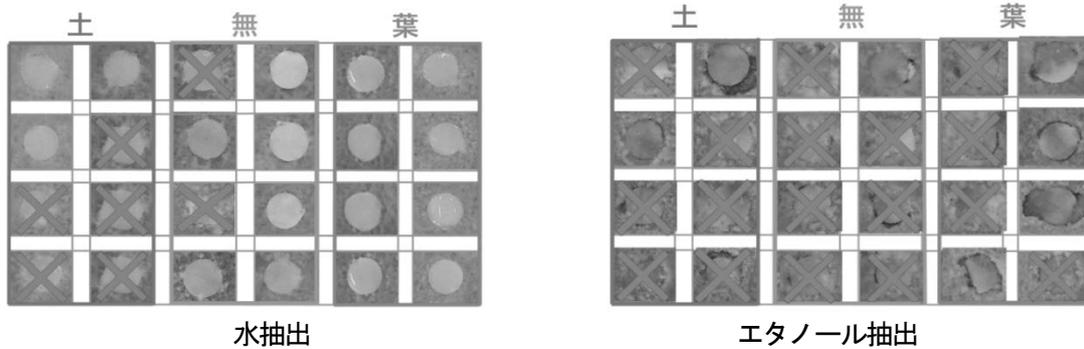
エタノール抽出 水抽出

【図11】

### 〈実験II(2) : 結果〉

水抽出とエタノール抽出のそれぞれの結果は【図 12】のようになった。本研究では、カビが生えていないろ紙を炭疽病菌発生の抑制をした防カビ作用があるものとし、カビが生えたものを炭疽病菌の発生を抑制しなかった、つまり防カビ作用がなかったものとして評価している。【図 12】では、ろ紙の上にカビが生えたものは防カビ作用が見られなかったとして×を表記している。試行数は条件ごとに8枚ずつとする。

水抽出では、土処理と無処理ではどちらも約半分の個体でカビの発生が見られた。対して葉処理のろ紙はすべてカビが生えなかった。エタノール抽出ではどの処理でもろ紙にカビが生えた。



【図 12】ろ紙を炭疽病菌培地においてから1週間後の写真

### 〈実験II(2) : 考察〉

エタノール抽出より水抽出のほうが高い防カビ作用が得られた理由として、3条件に共通して言えることは水抽出のほうが防カビ作用に関わる物質が抽出しやすいからだと考えた。オリーブの葉には防カビ作用があるポリフェノール類が豊富に含まれている。ポリフェノール類は水に溶けやすいため、水抽出で作成した抽出液のほうが高い防カビ効果が得られたと考えた。また葉処理においては、塗布した納豆菌により防カビ作用が得られていたからではないかと考えられる。納豆菌は栄養細胞状態と芽胞状態の2つのサイクルを持つという特徴がある。本実験で葉や土に与える際、環境条件は納豆菌に適した状態で、活発に活動する栄養細胞状態であったと考えられる。よって芽胞のようなバリアがなく、エタノールに耐えられなかったと推測した。

また、葉に与えた納豆菌と防カビ作用を結びつける要因として、納豆菌が生成するチロシンというアミノ酸に着目した。納豆の表面で白いものがあるが、これはチロシンと呼ばれるアミノ酸の結晶である。引用文献よりこのチロシンが空気中で酸化されることで、サリチル酸になることが分かっている。このサリチル酸が気孔などから葉に入ることによって防カビ作用が向上したと考えた。病害への応答を行う植物ホルモンとして、サリチル酸やブラシノステロイドがあげられる。サリチル酸は病原体と戦う抵抗反応の誘導を行い、病原体の活動を抑制し、対して、ブラシノステロイドはストレス耐性を与えるものであるとわかっているため、本研究ではサリチル酸が炭疽病菌に反応する抗体を誘導するものに該当するのではないかと考えた。さらに調べたところ、納豆菌が属する枯草菌には真菌（カビ）の細胞壁を分解する酵素を生産する働きがあると分かった。そして細胞壁が分解されるとカビが細胞や組織を支えられなくなり、防カビ作用に繋がった可能性がある。

## 5. 結論

納豆菌をオリーブに与えることにより成長促進作用や炭疽病菌からの影響を軽減する効果があると言える。ただし、本実験では、オリーブの細胞（柵状組織）伸長成長を促すのは、土に納豆菌培養液を与えた条件の時であり、炭疽病菌の影響を最も軽減したのは葉に納豆菌培養液を与えた条件の時であった。このことから目的に応じて処理条件を変えることで効率よくオリーブの栽培ができたり、そこで必要な農薬の量を少しでも減らしたりすることができる結論付けた。

## 6. 今後の展望

使用したオリーブの個体差が大きく、条件ごとの比較が難しかった部分もあったため試行数を増やす必要がある。また、葉処理と土処理それぞれで考察した通りの物質が生成されているかの検証が必要である。そして実験IIIにおいては、培地のシャーレのふたを開けたときに別の菌が侵入している可能性がある。そのため、生えたカビが炭疽病菌であるかどうかの同定を行いたい。今回は3条件に分けての実験だったが、効果が見られた葉処理と土処理を同時に行い、その効果を検証したいとも考えている。

## 7. 引用文献

- ・農業に使おう！防除によい。土にも良い。納豆菌液の作り方（フルーツ童夢）
- ・Leaf Anatomy 光合成システムとしての葉（東北大学理学部生物学科）
- ・微生物資材「納豆菌の力」の効果！（amoni）  
→<https://amoni.iseki.co.jp>report>
- ・オリーブ農家が実践するオリーブの病気対策・炭疽病・梢枯病・がんしゅ病・立枯病（山田オリーブ園）
- ・オリーブ葉エキス（一般社団法人オーソモレキュラー栄養医学研究所）
- ・ポリフェノールについて  
→<https://www.shibaura-it.ac.jp/headline/detail/nid00001642.html>
- ・サリチル酸とチロシンについて  
→<https:saitodev.co/article/防御の植物ホルモン, サリチル酸>  
<https://www.zero-agri.jp/fertilizer-foliar-spray>
- ・葉面散布と葉による養分吸収（BSI 生物科学研究所）
- ・栄養細胞と芽胞について  
→<https://sonomono.jp>教えて！納豆博士>納豆・納豆菌>
- ・真菌細胞を分解する納豆菌について  
→[https://www.jstage.jst.go.jp/article/myco/66/1/66\\_37/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/myco/66/1/66_37/_article/-char/ja/)  
<https://kore-ena.com/nattoukin/#toc2>

## 8. 謝辞

今回の研究にあたり、フルーツ童夢さんと炭疽病菌の培地の提供をいただいた農業試験場小豆オリーブ研究所の皆様にお礼を申し上げます。また、今まで本研究をご指導して下さった担当の松山先生、前担当の鶴木先生、その他理数系の先生方に深く感謝を申し上げます。特に担当の松山先生、前担当の鶴木先生には普段の実験や研究発表の練習、論文作成などあらゆる場面でのご指導をしていただきました。心から感謝します。