

微生物を捕まえる高分子——新しい土壤病害防除法の可能性——

京都工芸繊維大学工芸学部物質工学科 かわ ばた なり よし
川 端 成 彬

はじめに

農作物の土壤病害の防除は農業の現場を悩ませている深刻な問題である。農薬を用いて殺菌する方法が一般的であるが、農薬が土壤に吸収されるので大量散布が必要である。連続使用によって農薬に耐性を示す病原菌が生まれるという難点もある。筆者らの研究グループでは全く新しい着想に基づいて土壤病害の防除を試みている。すなわち微生物を生きのまま捕まえる高分子を病原菌で汚染された土壤に混ぜ、病原菌をこの高分子の表面に捕まえ、病原菌を殺さずに農作物の根に触れる機会を減らすことによって病害を防除する試みである。この研究は緒についたばかりであるが、専門家によるご教示とご批判を広く承ることを願って植物病理学会大会で発表したところ（川端ら，1995 a）多大な反響を呼び、マスコミにも取り上げられて広く知られるところとなり（平成7年4月16日付京都新聞，5月8日付化学工業日報，5月15日付日本経済新聞など）、本誌から解説記事の執筆依頼を受けた。関心の高さに配慮してお引き受けしたがまだ論文投稿を行っていない段階であるため、実験結果については植物病理学会大会の講演要旨集に記載されている範囲に止めざるを得ないことをあらかじめご了解いただきたい。筆者らの研究室で開発した『微生物を生きのまま捕まえる高分子』は本誌の読者には馴染みがないと思われるので、この不思議な高分子の紹介を中心にして、新しい土壤病害防除法の可能性について述べたい。

I 微生物を生きのまま捕まえる高分子

ポリビニルピリジン塩化ベンジルまたは臭化ベンジルと反応させて得られるピリジニウム型高分子は、微生物細胞に対して特筆に値する並外れて強い親和性を示す（川端，1989 a；1992 a）。疎水性成分の割合を多くしたり、あるいは橋かけ構造を持たせて合成したピリジニウム型高分子は水に溶けない。水に溶けないピリジニウム型高分子は微生物細胞を生きのまま捕まえるという不思議な性質を示す（川端ら，1983）。図-1に示したのは、ビーズ状に合成したこの高分子の表面に捕まえた大腸菌細

胞の電子顕微鏡写真である。ビーズ状高分子の表面全体が微生物細胞で覆われる状態になるまで微生物が捕まえられる。この高分子の表面に捕まえられた微生物は生きていて、この状態で寒天培地や液体培地に加えて培養すると増殖する。微生物を培養する系にこの高分子を加えても微生物の増殖曲線はほとんど影響を受けない。この高分子が微生物細胞を捕まえる作用は非常に強力で、高分子表面から微生物細胞を剥がすことはほとんど不可能である。

疎水性成分の割合を少なくして、線状構造を持たせて合成したピリジニウム型高分子は水に溶ける。後で述べるが、水に溶けるピリジニウム型高分子は強力な殺菌作用及び微生物懸濁液に対する効果的な凝集沈殿作用を示す。水に溶けたこの高分子が微生物細胞の表面に絡みついたり、あるいは細胞壁を通過するためと考えられる。水に溶ける場合も溶けない場合も、微生物細胞に対する親和性が強いという点では共通していると考えられる。

水に溶けないピリジニウム型高分子が、微生物細胞を生きのまま捕まえるメカニズムはよく分からないが、この高分子はカチオン性で正の電荷を帯びているので、負の電荷を帯びている微生物細胞表面との間の静電的な相互作用が一つの重要な因子であると思われる（川端ら，1987）。この高分子は親水性が強く、極端な場合は潮解性を示すほどである。この強い親水性は微生物を捕ま

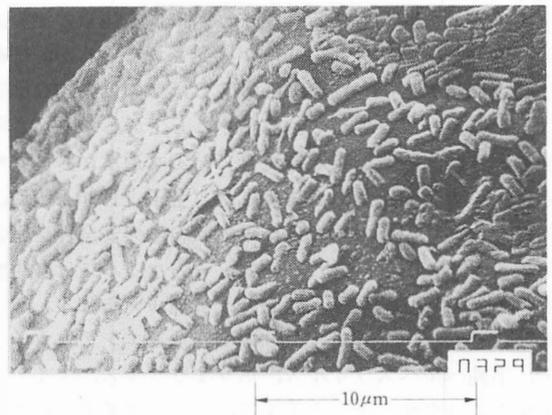


図-1 ビーズ状に合成したピリジニウム型高分子の表面に捕まえられた大腸菌の電子顕微鏡写真（川端，1992 a）。

Macromolecules that Capture Microorganisms—Possibility of a Novel Method for Control of Soil Born Plant Diseases—

By Nariyoshi KAWABATA

える性質と密接に関連していると考えられ、疎水性成分の割合が多くなると微生物を捕まえる性質が弱くなる(川端ら, 1986 a)。この高分子が微生物を捕まえる作用の強さは微生物の種類にも依存していて、微生物細胞の疎水性の強さが関係していると考えられる(川端ら, 1987)。

II 微生物汚染の防除への応用

飲料水の微生物汚染を防除して安全性を確保することは公衆衛生の重要な課題である。一般に塩素消毒法が用いられているが、この塩素処理に際してトリハロメタンなどの有機ハロゲン化合物が生成すること、これらの化学物質が発ガン性などの有害作用を示すこと、及び生物濃縮を受けて環境を汚染することなどが問題になっている。しかし水に溶けないピリジニウム型高分子の性質を利用すると、トリハロメタンのような有害物質の生成を伴わずに、飲料水の微生物汚染を防除することができる(川端ら, 1993 a)。この方法の難点は、この高分子が微生物を捕まえる性質が強すぎて、捕まえられた微生物を高分子表面から剝がすことがほとんど不可能であるため、この高分子を使用後に再生することができず使い捨てにしなければならないことである。筆者らの研究グループでは、少量のピリジニウム型高分子を表面にコーティングした不織布をフィルターとして用いたろ過方法を開発した(川端ら, 1992 b)。この方法を用いるとバクテリア細胞に限らず、カビの菌糸も胞子も効果的に除去される。

III ウイルス汚染の防除への応用

現在行われている塩素消毒法には、ウイルスが強く抵抗するという問題もある。ウイルスによる病気の治療には特効薬がない。種々の薬剤が開発されているが、細菌性疾患に対する抗生物質に匹敵するほどの効果的な薬剤はまだ発見されていない。飲料水としてのしかるべき処理を施され、残留塩素が含まれている水道水から病原性のウイルスを検出したと報告され(金子, 1986; 田口, 矢野, 1988)、現在の水処理技術で飲料水の安全性を確保できるのか疑問が持たれている。一方ウイルスは微生物よりも強くピリジニウム型高分子に捕まえらる。バクテリオファージ(川端ら, 1986 b)、及びエンテロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルス、エイズウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、アデノウイルス、ヒトロタウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルスなどの病原性動物ウイルスが効果的に除去された(川端ら, 1990 a)。ピリジニウム型高分子

子を表面にコーティングした不織布をフィルターとするろ過方法は、バクテリア及びカビの除去には効果的であったがウイルスの除去には十分な効果を示さなかった(川端ら, 1992 b)。ウイルスの大きさと比較して不織布の隙間が大き過ぎるためと思われる。しかしピリジニウム型高分子を一成成分として合成した、平均孔径 20 μm の複合膜をフィルターとするろ過方法がウイルスの除去に効果的であった(川端ら, 1996)。20 μm という孔径はウイルスよりもはるかに大きい、孔の内部表面のピリジニウム型高分子がウイルスを捕まえるものと思われる。

IV バイオリクターへの応用

ピリジニウム型高分子の表面に捕まえた微生物細胞をバイオリクターにおける固定化生体触媒として利用することができる(川端ら, 1990 b; 川端ら, 1995 b)。バイオテクノロジーの進歩に伴って生体触媒を固定化する様々な方法が開発されているが、最近では酵素を単離して固定化する場合よりも、酵素を含む微生物細胞をそのまま固定化する場合が多い。高分子ゲルの微小な格子の中に包み込んだり、半透膜性の高分子皮膜で被覆する包括法が最も広く用いられている。ピリジニウム型高分子の表面に捕まえて固定化する方法には、微生物細胞と基質が直接接触するという、包括法にはない長所がある。分子状酸素の供給を必要とする生化学反応に包括法を適用することは難しいが(OHLSON et al., 1978)、ピリジニウム型高分子の表面に捕まえて固定化する方法を用いると高い収率で目的物が得られる(川端・中川, 1991)。

V バイオセンサーへの応用

ピリジニウム型高分子が微生物細胞を生きのまま捕まえるので、バイオセンサーの分野で微生物細胞を捕まえて固定化する材料として用いることができる。活性汚泥に含まれている微生物をこの高分子の表面に捕まえて、これを酸素電極に取り付けると BOD センサーができる(津島ら, 1994)。ここへ検水を注入すると、捕まえられた微生物が検水に含まれている有機物を資化する。このときの酸素の消費が電流値の減少として検知され、通常は 5 日間を要する BOD の測定が数分間で可能になる。

懸濁液中に存在する、生きた単細胞微生物の濃度を測定することは、微生物学の重要な課題である。通常は平板計数法(コロニー法)が用いられているが、少なくとも 12 時間の培養時間が必要で発酵槽を制御する際の生きた菌数のモニタリングには適さない。ピリジニウム型高分子を酸素電極に取り付けると、生きた単細胞微生物の濃度を迅速に測定するための生菌数センサーができる

(川端ら, 1992 c; 川端・寺本, 1992)。ここへ生きた微生物の懸濁液を一定速度で通液すると、この高分子の表面に微生物細胞が捕まえられ、一定速度で蓄積される。蓄積された微生物細胞が生きておれば酸素を消費する。酸素の消費は電流値の減少として検知され、電流値が一定速度で減少する。滅菌した微生物懸濁液を用いた場合も細胞は同じように蓄積されるが、酸素が消費されないために電流値の減少は観測されない。生菌数濃度が既知の試料を用いて検量線を作成しておけば、数分間の測定操作で電流値減少速度から生菌数濃度を求めることができる。

VI 水溶性ピリジニウム型高分子の殺菌作用

疎水性成分の割合が少なく線状構造を有するピリジニウム型高分子は水に溶けて殺菌作用を示す(川端, 1988; 川端・西口, 1988)。この高分子の殺菌作用は、広く用いられているオスバン及びヒピテンの殺菌作用と同程度で、フェノールやクレゾールよりもはるかに強力である。この高分子の殺菌作用は微生物の種類に依存し、グラム陽性バクテリアに対する作用は強いがグラム陰性バクテリアに対する作用は必ずしも強くない。この高分子の殺菌作用には顕著な高分子効果が認められ、対応する化学構造を有する低分子化合物と比較すると殺菌作用は著しく強い。この高分子は水に溶けた状態では殺菌作用を示すが、寒天培地の成分に加えた場合には殺菌作用を示さない。この高分子がカチオン性で正の電荷を示し、微生物細胞表面が負の電荷を示すので、この高分子が水中で微生物細胞表面に絡みついたり、あるいは細胞壁を通過して殺菌作用を示したのではないかと考えられる。

VII 水溶性ピリジニウム型高分子の微生物懸濁液に対する凝集沈殿作用

水に溶けるピリジニウム型高分子は、微生物懸濁液に対して凝集沈殿作用を示す(川端ら, 1989 b)。水中に懸濁している微生物を凝集沈殿法によって除去する試みが行われているが、これまでの報告結果では何らかの懸濁物質の併用が必要で、微生物は共沈殿によって除去される。しかし水に溶けるピリジニウム型高分子は、単独で用いても微生物懸濁液に対する凝集沈殿作用を示す。この作用も微生物細胞との強い親和性に基づくものと思われる。

VIII 腐るプラスチックの開発への発展

筆者らの研究グループでは、水に溶けないピリジニウ

ム型高分子が活性汚泥に含まれている微生物によって消化されるという現象を偶然の機会に発見した(川端ら, 1994)。有機性廃水の好気性生物処理法の効率を改善する目的で、モデル下水と活性汚泥を用いた連続式処理実験をこの高分子の存在のもとに行った。活性汚泥に含まれている微生物をこの高分子の表面に捕まえて、安定な固定化生物膜として利用する計画であった。しかし処理水に含まれる有機物の濃度が処理前の濃度よりも高くなるという、期待とは逆の意外な結果が得られた。調べてみると、この高分子が活性汚泥に含まれている微生物によって消化されることがわかった。このように水に溶けないピリジニウム型高分子は生分解性を示す。土壤に混ぜて数か月経過すると姿が見えなくなるので、耕作地に散布しても環境を汚染する恐れは少ないと期待される。

一般にプラスチック類には生分解性がなく、腐らないゴミとして環境を汚染する目障りな存在になっている。筆者は上記の経験に基づいて、ピリジニウム型高分子の化学構造を腐らないプラスチック類の化学構造の一部に組み込んで生分解性を付与することを試みた。ポリメタクリル酸メチル(川端ら, 1994)及びポリ酢酸ビニル(川端ら, 1995 c)の主鎖にピリジニウム基を導入すると生分解性を示すことがわかった。化学構造の一部を修飾することによって合成高分子に生分解性を付与する新しい手法を開発することができた(川端, 1992 d; 1993 b)。

IX 土壤病害の防除への発展

筆者らの研究グループでは、微生物を生きたまま捕まえるピリジニウム型高分子の特性を活用して、全く新しい方法で農作物の土壤病害を防除する試みを始めた。土壤中の病原菌を皆殺しにしなくても、病原菌の密度を一定のレベル以下に抑えれば病害を防除できるといわれている。この考えを押し進めると、たとえ土壤中の病原菌の密度が変わらなくても、病原菌が植物の根に触れる機会を一定のレベル以下に抑えれば土壤病害を防除できるのではないかと期待される。この着想に基づいて、ピリジニウム型高分子を病原菌で汚染された土壤に混ぜ、病原菌を殺すのではなく、捕まえて植物の根に触れる機会を少なくすることによって病害を防除する試みを始めた。

筆者は高分子合成化学と有機合成化学を基盤とする研究を行ってきた。廃水の浄化に役立てる機能性高分子の合成を契機として環境化学とかかわりを持つようになった。微生物を生きたまま捕まえる高分子の発見を契機として、微生物学及び応用生物化学とかかわりを持つよう

引用文献

になった。しかし植物については全く門外漢なので、土壌病害防除に関する研究は京都大学農学部植物病理学研究室の古澤 巖教授のご指導を仰いで行っている。植物病理学会で報告した概要(川端ら, 1995 a)を、以下に述べる。

キュウリつる割病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) を病原菌として用いた。表面に 1.2 重量% のピリジニウム型高分子をコーティング処理したセルロース粉末を微生物捕捉剤として用いた。滅菌した土壌に 100 mg/kg の *Fusarium* 菌体を混合し、所定期間静置してモデル汚染土壌を調製した。第二葉期のキュウリ苗を移植し、人工気象器を用いて栽培し、病害の出現頻度を計測した。モデル汚染土壌に上記の微生物捕捉剤を 1 g/kg 加えると、病害の発生を約 80% 抑制することができた。例えば静置期間 4 週間の土壌を用いると 28 日の栽培期間中に 72% の苗が枯死したが、微生物捕捉剤を混合した場合は枯死した苗は 13% であった。3 週間静置した土壌を用いると 28 日の栽培期間中に 54% の苗が枯死したが、微生物捕捉剤を混合すると枯死した苗は 11% に低下した。

本研究の手法の特色は、病原微生物を殺さずに病害の防除を試みるところにある。水に溶けないピリジニウム型高分子は殺菌作用を示さないで、これを土壌に加えても生態系を乱す恐れは少ないだろうと期待している。この高分子には腐る性質があり、土壌に混ぜて数か月経過すると姿が見えなくなるので、耕作地に散布しても環境を汚染する恐れは少ないだろうと期待している。環境保全の立場から最近では生態系の保護を重視する意見が強くなっているが、本研究の手法をこの目的に役立つ一般的な土壌病害防除法に発展させたいと願っている。

- 1) 金子光美 (1986) : 水質汚濁研究 9 : 478~483.
- 2) 川端成彬ら (1983) : Appl. Environ. Microbiol. 46 : 203~210.
- 3) ———ら (1986 a) : Bull. Chem. Soc. Jpn. 59 : 2861~2863.
- 4) ———ら (1986 b) : Agric. Biol. Chem. 50 : 1551~1555.
- 5) ———ら (1987) : ibid. 51 : 1085~1090.
- 6) ——— (1988) : 高分子加工 37 : 574~577.
- 7) ———・西口雅行 (1988) : Appl. Environ. Microbiol. 54 : 2532~2535.
- 8) ——— (1989 a) : 日ゴム協誌 62 : 463~469.
- 9) ———ら (1989 b) : Reactive Polymers 10 : 269~273.
- 10) ———ら (1990 a) : Epidemiol. Infect. 105 : 633~642.
- 11) ———ら (1990 b) : Biotechnol. Bioeng. 35 : 1000~1005.
- 12) ———・中川和彦 (1991) : J. Ferment. Bioeng. 71 : 19~23.
- 13) ———・寺本健三 (1992) : ドーゼンニュース 62 : 11~13; バイオインダストリー 9 : 33~36.
- 14) ——— (1992 a) : Prog. Polymer Sci. 17 : 1~34.
- 15) ———ら (1992 b) : Epidemiol. Infect. 108 : 123~134.
- 16) ———ら (1992 c) : J. Microbiol. Methods 15 : 101~111.
- 17) ——— (1992 d) : 機能材料 12 (12) : 5~11.
- 18) ——— (1993 a) : 高分子論文集 50 : 809~820.
- 19) ——— (1993 b) : 日ゴム協誌 66 : 80~87.
- 20) ———ら (1994) : J. Appl. Polymer Sci. 51 : 33~42.
- 21) ———ら (1995 a) : 日植病報 61 (3) : 213.
- 22) ———ら (1995 b) : J. Ferment. Bioeng. 79 : 317~322.
- 23) ———ら (1995 c) : J. Appl. Polymer Sci. 56 : 509~516.
- 24) ———ら (1996) : ibid. 印刷中
- 25) OHLSON, S. et al. (1978) : Biotechnol. Bioeng. 20 : 1267~1284.
- 26) 田口文章, 矢野一好 (1988) : 防菌防黴 16 : 233~247.
- 27) 津島力雄ら (1994) : Biotechnol. Bioactive Polymers 201~206.

お知らせ

○報農会、平成7年度農家子弟に奨学金

財団法人報農会(吉田孝二理事長)は1月30日、平成7年度農家子弟への奨学金交付について審査委員会を開き、下記5名の農業大学校生に奨学金を贈ることに決めた。

この奨学金は、植物保護に関心をもち、かつ、農業後継者として科学的知識や技術を深めるために、県立農業大学校等に在籍して、優秀な研究を行った農家子弟に対して贈られるもので、1983(昭和58)年度に発足して以来、今回は13回目に当たる。受賞者は延べで58校、58名に及んでいる。なお、奨学金は各10万円で、それぞれの在籍大学校長から、賞状とともに授与される。

本年度の受賞者およびその調査研究課題は次のようである。

- 雨よけほうれんそうの立枯病、萎ちょう病に対するチェーンポット移植栽培の実用性について：北海道立農業大学校畑作園芸経営学科2年 麻下智基
- 大玉トマトの接ぎ木による土壌病害対策：埼玉県農業大学校園芸科施設野菜専攻2年 新井正史
- フェロモン剤を用いたモモ害虫の防除：奈良県農業大学校園芸課程果樹専攻2年 平島裕文
- ブドウにおける新農薬による効率防除の検討：島根県立農業大学校園芸課程果樹専攻2年 勝部将晃
- 佐賀県におけるキクの半身萎ちょう病の発生状況の調査：佐賀県農業大学校園芸課程花き専攻1年 江崎実枝子