

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月18日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0037

研究課題名(和文) 有機物の長期連用が土壤微生物群集に及ぼす影響の分子生態学的解明

研究課題名(英文) Molecular ecological analysis of impacts on soil microorganisms by long term organic substance application

研究代表者

池田 成志 (Ikeda, Seishi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター 大規模畑作研究領域・上級研究員

研究者番号：20396609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：堆肥施用が土壤細菌群集に与える影響について検討した結果、堆肥施用区は化学肥料施用区よりも各種多様性指数が高い傾向が観察された。一方、系統的多様性については、土壤の栽培管理に関わらず、Proteobacteria、Acidobacteria、Chlorofexi、Actinobacteria等が主要な菌群として検出され、門レベルにおいては大きな違いは認められなかった。有機質肥料の影響については化学肥料区は有機質肥料区よりもActinobacteriaやFirmicutes等のグラム陽性細菌群、Gemmatimonadetes、Nitrospirae等のグラム陰性細菌群が少ない傾向が観察された。

研究成果の概要(英文)：Impacts of long term animal manure application on soil bacterial diversity were analyzed. The results indicated that the manure application increased the values of diversity indexes, while phylogenetic composition at phylum level was not affected by animal manure application. Impacts of long term organic fertilizer application were also examined. the decrease of relative abundance for Actinobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, and Nitrospirae in the field of long term chemical fertilizer application, suggesting the loss of geochemical function by chemical fertilizers.

研究分野：微生物生態学

キーワード：堆肥 有機質肥料 土壤微生物 共生微生物 ハクサイ 化学肥料

### 1. 研究開始当初の背景

有機物施用は化学肥料などの無機物質の施用では得られない効果、即ち、有機物の微生物分解等を通して保水性・透水性・通気性等の土壌の物理性の改善、地力窒素や土壌の緩衝能の向上、リン酸固定の軽減等の化学性の改善、さらにこれらの物理的・化学的要因とも複雑に関係する土壌の生物性の改善への効果が期待されている。以上のような有機物の施用効果を評価するための長期運用圃場は、過去に土壌保全関係事業の中で基準点調査の試験として全国十数カ所に設置され、長年にわたり土壌の物理性や化学性について膨大な研究成果が蓄積されてきた。その結果、有機物の物理的・化学的效果に関しては多くの知見が当該研究分野のコンセンサスとして得られている。( )

有機物施用の物理・化学的效果の解明研究とは対照的に、有機物施用の土壌生物性への影響の詳細は現在もなお不明なままである。これは、有機物の施用は微生物による分解を通して土壌微生物相の多様性や機能性に非常に大きな影響を及ぼすと予想されながらも、土壌生物、特に土壌微生物の膨大な多様性と土壌生物間の複雑な相互作用を解明するための技術的な問題の解決が必要であったからである( )。しかしながら、土壌からの DNA 抽出法( )や植物共生微生物分析法( )などの培養に依存しない微生物遺伝子解析技術や、低コスト・迅速な遺伝子分析法が開発され、農耕地生態系の土壌や植物組織に生息する微生物群集の多様性や機能性を分子レベルで網羅的に解析することが比較的容易となった(次世代シーケンズ費用が1サンプル約1万円)。また、従来研究では困難であった細菌類、糸状菌類、線虫類、真核微生物の各分類単位で多層的な多様性解析も比較的容易に行うことが可能となり、現在は土壌微生物研究を加速するための一連の基盤技術が整ったと言える状況にあると考えた。

### 2. 研究の目的

有機物の施用が土壌微生物の多様性や機能性に及ぼす影響を評価するため、家畜ふん堆肥の長期運用圃場(牛糞・豚糞・鶏糞)(鹿児島県鹿屋市、鹿児島県農業開発総合研究センターの森清文氏(研究協力者)と連携)、有機質肥料の長期運用圃場(なたね粕、魚粕、蒸製骨粉)(茨城県土浦市、片倉コープアグリ株式会社筑波研究所の野口勝憲氏(研究協力者)と連携)を使用して、堆肥や有機肥料の施用後の非根圏土壌と根圏(根組織と土壌)の微生物の多様性・機能性と土壌の代謝成分の多様性の経時的変動を評価する。

微生物多様性解析の対象微生物群は農業生産上特に重要な細菌類、糸状菌類、線虫類の3群とし、異なる生物群間の相互作用も視野に入れた多様性解析を行う。代謝物の解析結果を参考にしながら、それらに対応する形

でメタゲノム解析とプロテオーム解析も重ねることにより有機物分解における土壌微生物群集の機能性の動態変化の解明を目指す。代謝物の解析については、土壌と根組織を解析対象とし、土壌や根に含まれる代謝成分(糖、アミノ酸、有機酸など)をNMR等のメタボロミクスで網羅的に分析する。

上記の解析に従来研究の土壌の物理性や化学性のデータを加え、各種有機物の施用による土壌微生物の多様性や機能性の変動法則を明らかにし、有機物施用の微生物的效果(土壌微生物の制御効果)を減化学肥料、土壌病害の軽減、農産物の品質向上等の持続的栽培技術の一部として位置づけるための基盤情報とする。

### 3. 研究の方法

代表的な有機物として堆肥に注目し、主要な家畜ふん堆肥の土壌微生物相への影響を評価するため、研究協力者の森清文氏の管理する鹿児島県農業総合開発センター・大隅支場の家畜ふん堆肥の長期運用圃場において、サツマイモ(コガネセンガン)を窒素・リン・カリウムの3つの化学肥料を施用したNPK区、リン・カリウムの化学肥料のみ施用したPK区、3種類の畜産糞尿を使った4つの堆肥運用区(牛糞堆肥区、豚糞堆肥区、鶏糞堆肥区、これら3種類の堆肥の混合区)の各条件で栽培し、一般的な圃場管理を行い、8月下旬に土壌微生物、共生微生物、植物代謝物当の分析のためのサンプリングを行った。除草作業、病虫害管理は慣行栽培と同様の管理を行った。土壌のサンプリングは1反復区あたり3サンプル、3反復区から合計9サンプルについて株間の作土層(表面から15cm程度)をコアとして抜き出した。土壌DNAについては市販キット(FastDNA SPIN Kit for Soil)を使用して調製した。共生細菌については細菌細胞濃縮法を利用して共生細菌群集DNAを調製した。得られたDNAを用いて16S rRNA遺伝子を標的としたパイロシーケンシングによる多様性解析を実施した。

有機質肥料の長期運用の影響評価試験として、片倉コープアグリ株式会社が茨城県に設置している有機質肥料の長期運用圃場(窒素、リン、カリウムの各化学肥料を施用したNPK区、無肥料のNF区、なたね粕区、魚粕区、蒸製骨粉区)において、平成27年度の冬季にサンプリングを行った土壌、及び平成28年度冬季にサンプリングを行ったハクサイ組織について微生物多様性解析を実施した。ハクサイ共生細菌については、外葉の緑色部と白色部、中心部の未展開葉の3部位に分けてサンプリングを行い、凍結保存後に細菌細胞濃縮法により共生細菌群集DNAを調製し、共生細菌群集の多様性を解析した。

植物代謝物の分析については塊根を中心に圃場でのサンプリングを行い、水洗により土壌を除いた後に直ちに凍結保存した。それらの凍結試料を凍結乾燥処理後に粉碎し、

H-NMR による分析を行い、有機質の施用が植物代謝物に及ぼす影響を評価した。

#### 4. 研究成果

鹿児島県農業総合開発総合センターの堆肥長期連用圃場の異なる肥培管理（NPK 区、PK 区、各種堆肥施用区等）が土壤細菌群集に与える影響について 16S rRNA 遺伝子を標的としたパイロシークエンシングによる分析を進めた結果、各種堆肥施用区（牛糞、豚糞、鶏糞由来の堆肥）の長期連用施用を行った土

表1. 堆肥長期連用施用の土壤細菌群集多様性に対する影響  
土壤管理条件

統計値	NPK	PK	牛糞	豚糞	鶏糞
OTU数	5684	6039	6575	6378	6586
Chao1	8282.8	8743.6	9720.3	9410.6	9618.9
Shannon	10.2	10.3	10.6	10.5	10.6

\*76869配列あたりの統計値を示す。

壤は化学肥料のみを長期施用した NPK 区の土壤と比べて種レベルでの OTU 数（97%の類似度でクラスタリングを行った場合に観察された OTU 数）が高い傾向が観察され、PK 区（リンとカリウムの化学肥料のみ施用した窒素無施用区）は堆肥の長期連用区と NPK 区の中間的な OTU 数となった（表1）。

同様に、各種の多様性指数（Chao 1、シャノン等）についても NPK 区は低く、堆肥の長期連用区は高く、PK 区は中間的な値となった。以上の結果から、NPK 区との比較において、有機物の施用が土壤細菌群集の多様性を増加させることが示唆された。また、NPK 区の多様性の低さは、主に窒素の化学肥料の施用により引き起こされると考えられた。

上記の土壤細菌群集について主座標分析を行った結果、各種堆肥の長期施用区は NPK 区とは明確に異なる群集構造を持つこと、PK 区は上述の各種の多様性指数と同様に、堆肥施用区と NPK 区の中間的な群集構造を持つことが明らかとなった。しかしながら、系統情報については、土壤の栽培管理に関わらず、プロテオバクテリアとアシドバクテリアがそれぞれ約 30%と 20%、クロロフェキシと放線菌類が約 10%前後を占め、細菌類の高次分類単位においては栽培管理土壤間の大きな違いは認められなかった（表2）。今後、種レベルを含めた詳細な系統解析を進める予定である。

表2. 堆肥長期連用施用が土壤細菌群集の系統的多様性に及ぼす影響  
土壤管理条件

Taxon (%)	NPK	PK	牛糞	豚糞	鶏糞
Proteobacteria	27.8	27.4	30.2	29	30.5
Acidobacteria	24.2	22.7	21.8	21.5	19.7
Chloroflexi	10.6	10.5	9.1	9.6	8.9
Actinobacteria	7.6	7.6	8.3	9.1	9.9
Others	29.8	31.8	30.6	30.8	31

有機質肥料の長期連用の影響については、上述の堆肥連用圃場の試験と同様に、土壤細菌の群集構造については NPK 区と有機質肥料施用区の間大きな群集構造の違いがあること、無肥料の NF 区は NPK 区と有機質肥料区の中間的な群集構造を持つことが明らかとなった。系統解析の結果、NPK 区は他の試験区よりも放線菌類や Firmicutes 等のグラ

ム陽性細菌群、Gemmatimonoadetes、Nitrospirae 等のグラム陰性細菌群の割合が少ない傾向が観察された。一方、有機質肥料施用区に比べて、NPK 区で多い菌群として Proteobacteria や Chloroflexi、Bacteroidetes 等が多い傾向が観察された。これらの結果から、化学肥料の施用により、土壤細菌群集が代謝が容易な化学物質に対して適応性の高い細菌群の割合の増加をもたらす、難分解性の物質代謝や地球化学的な物質循環に関与する細菌群の割合を低下させている可能性が考えられた。

ハクサイ共生細菌については、主座標分析の結果から、今回の実験条件下においては、共生細菌の群集構造に強い影響を与える要因としては組織の部位が土壤の施肥条件よりも大きいことが示唆された。系統解析の結果、サンプリングを行った反復個体間のバラツキがあるものの、Proteobacteria がハクサイ共生細菌の主要な割合を占めること、Alphaproteobacteria は Betaproteobacteria や Gammaproteobacteria と拮抗関係にあることが示唆された。

今後、上述の堆肥と有機質肥料の長期連用区のデータについて、より下位の分類単位において詳細な解析を進める。同時に、ハクサイ共生細菌群集については、H-NMR により明らかにされた代謝物との相関関係の検討等を通して有機物の長期連用施用が植物代謝を通して共生細菌群集に及ぼす影響を評価する予定である。

#### <引用文献>

野口勝憲、有機質肥料による土づくりと土壤診断・施肥、肥料時報、Vol. 427、2007、pp. 4-44

Ikeda et al., Soil microbial community analysis in the environmental risk assessment of transgenic plants Plant Biotechnology, Vol. 23, 2006, pp. 137-151  
<https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.137>

Ikeda et al., Evaluation of Soil DNA from Arable Land in Japan Using a Modified Direct-extraction Method, Microbes Environ., Vol. 19, 2009, pp. 301-309  
<https://doi.org/10.1264/jms2.19.301>

S. Ikeda et al., (2009) Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. Microb. Ecol., 58: 703-714

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

関山恭代、池田成志、富田理、NMR による実践的な農業メタボロミクス研究に向けて 生産現場から生まれる成分多様性を見るために、化学と生物、査読有、Vol. 55、No. 6、2017、pp. 392-399、<https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu.55.392>

池田成志、植物共生科学から考える土壌病害の発生しにくい土づくり、土づくりとエコ農業、査読無、Vol. 49、No. 540、2017、pp. 33 - 39

T. Tomihama, Y. Nishi, K. Mori, T. Shirao, T. Iida, S. Uzuhashi, M. Ohkuma, S. Ikeda, Rice bran amendment suppresses potato common scab by increasing antagonistic bacterial community levels in the rhizosphere, *Phytopathology*, 査読有 Vol. 106, No. 7, 2016, pp. 719-728, <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0322-R>

池田成志、作物圏共生微生物の生態研究の現状と農業・食品産業への応用の可能性、日本土壤肥料学雑誌、査読有 Vol. 87、No. 5、2016、pp. 373-382、

大久保卓、池田成志、南澤究、植物共生細菌群集を利用した持続的農業、土と微生物、査読有、Vol. 70、No. 1、2016、pp. 10-16、

A. Kobayashi, Y. O. Kobayashi, N. Someya, S. Ikeda, Community analysis of root- and tuber-associated bacteria in field-grown potato plants harboring different resistance levels against common scab, *Microbes and Environments*, 査読有 Vol. 30, No. 4, 2015, pp. 301-309, <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/j sme2>

〔学会発表〕(計3件)

Y. Sekiyama, S. Ikeda, M. Mitsuboshi, J. Kikuchi, Y. Kioka, K. Noguchi, A 2-year NMR-based metabolic profiling study of Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) grown under a long-term organic farming system, 14th International Conference of the Metabolomics Society, 2018 (Seattle, USA)

池田成志、関山恭代、農業・食品分野における微生物科学とメタボロミクスの連携の可能性について、第11回メタボロームシンポジウム(招待講演) 2017、ホテル阪急エキスポパーク(大阪府吹田市)

池田成志、共生微生物学の視点から考える理想の土づくりと農業・食品産業の新展開、

日本土壤肥料学会北海道支部会シンポジウム(招待講演) 2016、とかちプラザ(北海道帯広市)

〔図書〕(計1件)

池田成志、大久保卓、鶴丸博人、南澤究、分担執筆(監修:服部正平) 植物共生細菌群集のメタゲノム解析(書名:メタゲノム解析実験プロトコール) 羊土社、2016、pp. 124-130、

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田成志 (IKEDA, Seishi)  
農研機構北海道農業研究センター・上級研究員  
研究者番号: 20396609

### (2) 研究分担者

関山恭代 (SEKIYAMA, Yasuyo)  
農研機構食品研究部門・上級研究員  
研究者番号: 60342804

### (5) 研究分担者

菊地淳 (KIKUCHI, Jun)  
理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー  
研究者番号: 00321753

### (6) 連携研究者

平藤雅之 (HIRAFUJI, Masayuki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授  
研究者番号: 00370495

### (7) 研究協力者

森清文 (MORI, Kiyofumi)  
鹿児島県農業開発総合研究センター大隅支場・環境研究室・室長

### (8) 研究協力者

野口勝憲 (NOGUCHI, Katsunori)  
片倉コープアグリ株式会社・技術顧問