

令和元年6月6日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0146

研究課題名(和文) 微生物機能を活用した硝化反応モデルの構築と窒素循環型水耕栽培法への応用

研究課題名(英文) Construction of nitrification model utilizing microbial consortia and application to hydroponic culture

研究代表者

安藤 晃規 (Akinori, Ando)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10537765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：有機質肥料活用型栽培は、土壌と同様に有機物の無機化(硝化反応)を実現する栽培法である。我々は、硝化反応における窒素動態と菌叢推移を解析し、有機物の分解、引き続くアンモニア酸化、亜硝酸酸化に関わる菌群が比較的単純な菌叢で構成されることを明らかにした。この知見に基づき、*Bacillus badius*と硝化菌の3菌にて、有機物の無機化を実現した。また、難培養性である硝化菌の培養条件を精査した結果、短期間でのコロニー形成に成功し、土壌より37℃以上で活性を示すアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌の単離、また単離した硝化菌と従属栄養細菌との3菌共培養により有機物の良好な硝化を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで土壌の有機物を分解し無機養分を供給する機能を人工的に再現することはできなかった。土壌機能を再現するにはアンモニア酸化、硝酸酸化の微生物作用を再現する必要があるが、それらを担う硝化菌が有機物により容易に不活性化するため困難であった。本研究では、わずか3菌株だけで土壌機能のアンモニア酸化、硝酸酸化を再現することに成功した。本成果により、耕作不適合地での栽培や、人工物の土壌化などが可能になり、食料の増産、二酸化炭素削減など多様な効果が期待できる。また土壌機能として物理性、化学性、生物性の3条件を満たすことに成功し、再現性を担保できる科学的な解析対象としうる画期的な成果である。

研究成果の概要(英文)：An organic hydroponic is a cultivation method which contained multiple parallel mineralization of organic matter like soil. We analyzed the nitrogen and microbial transition in microbial mineralization of organic nitrogen into nitrate and clarified that microbial consortia related to ammonification and nitrification was not complicated compared to that of soil. Based on this finding, we designed microbial consortia to achieve ammonification and nitrification by only three strains, a heterotrophic microbe, ammonia-oxidizing bacteria (AOB), and nitrite-oxidizing bacteria (NOB) even under organic condition. Furthermore, we succeeded in colony formation of AOB and NOB even in a short period cultivation by evaluation of the culture conditions of nitrifying bacteria and isolated AOB and NOB which showed activities even under high temperature condition. In addition, we succeeded in ammonification and nitrification under organic condition at high temperature by co-culture of three strains.

研究分野：応用微生物学

キーワード：硝化細菌 硝化反応 アンモニア酸化菌 亜硝酸酸化菌 有機質肥料活用形養液栽培

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の植物工場に代表される水耕栽培系は、土壌を必要とせず、天候の影響も受けなため、計画的作物生産が可能であり、都市部での重要な食糧生産技術とみなされている。しかし、これまでの水耕栽培では化学肥料しか利用できず、また、土壌圏の生態系が排除されるため、病害に弱く無菌的な管理が必要であった。一方で、有機廃棄物は、土壌圏の複合的微生物の潜在能力を頼りにコンポスト化されてきたが、堆肥化としての利用に制限され積極的に利用されていない現状にあった。そこで「窒素循環」の観点から、微生物機能を活用した有機物の無機化を行い、変換した硝酸体窒素を有機水耕栽培に活用することで有機廃棄物の効率的な循環利用が見込める。すなわち、硝化微生物群の解析と、硝化微生物群のデザインによる源循環に基づいた植物生育促進を実現する有機養液栽培の基盤技術構築を目指した。

2. 研究の目的

生態系における窒素循環の重要過程の一つは、土壌における有機態窒素の無機態窒素への変換過程である。これまで、有機廃棄物中の含窒素有機化合物は土壌微生物の潜在力を頼りに無機化され利用されてきた。これら窒素変換微生物は、培養が困難であることや、複数の微生物が共同して代謝を行う複合系であることから、その理解は進んでいない。本申請では、食料安定供給の実現の基盤となる、有機態窒素の変換(硝化工程)に関わる菌群の解析に焦点をあて、土壌の維持や創生へと展開できる微生物要素の解析を行う。また、本検討を通して有機物を直接水耕栽培系に利用できる有機水耕栽培を開発し、資源循環型の新たな作物栽培法の提案を目的とする。

3. 研究の方法

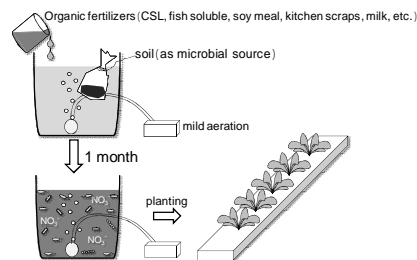


Fig. 1 Method of organic-hydroponics.

現在、土に依存しない作物栽培法として水耕栽培が活用されている。水耕栽培は、計画的な作物栽培を可能とし、来るべき人口増加、食糧問題を解決する手段として有望視されているが、無機態窒素のみを用いる栽培形態をとり、環境への負荷や安全性の点で問題があった。また、土壌様の微生物が排除されるため、有機物の直接利用は困難であった。水中での有機物の無機化に関しては、NASA 等を中心に検討されたが、有機物の分解と引き続く硝化を同時に行うことは不可能であった。一方で、我々は、研究協力者の篠原らと硝化工程に関わる菌群を少量

の有機物環境下で馴養培養することで、並行的な硝化を可能とする複合微生物系の構築し有機養液栽培を実現した。本栽培法は、有機物の無機化を行う耕水工程(硝化工程)と栽培工程で構成される。耕水工程は、微生物源として土壌を少量水槽に投入し、少量の有機物を添加、一定期間(約2週間から1ヶ月)通気することで、有機物を完全に硝酸に変換する複合微生物系を構築する過程で構成される(Fig. 1)。我々は、さらにこの耕水工程を効率化しうる複合微生物系のスクリーニングを行い、耕水期間を約1~2週間に短縮し、また、培養後の複合微生物系を種菌として用いることで、再現性よく耕水工程を行えること、種々の有機物に対しても効率的に無機化を行える柔軟性を備えた微生物群であることを明らかにした。また、ヒト病原性菌が存在せず、硝化工程や栽培中に混入した際にも、濃縮されることなく排除できることを確認している。さらには、根圏の植物病害抑制効果も有していることを明らかにした。

さらに、この複合微生物系における窒素動態と、それに伴う菌叢推移を DGGE 解析により明らかにし、大きくわけて3種類の菌群の機能で耕水工程が成り立っていることを示した。まず、有機物を好む従属細菌が増加し、有機物を分解する過程でアンモニアの蓄積が観察され、続いて、アンモニア酸化菌群が増加し、アンモニアを亜硝酸に変換する。その後、亜硝酸をエネルギー源として亜硝酸酸化菌群が増加し、最終的に亜硝酸を硝酸に変換する。有機物の無機化を担う主要な微生物群が土壌に一般的に存在する *Pseudomonas* 属や *Bacillus* 属や、一般的な硝化菌である *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi* のみで構成されていることを明らかにした。すなわち、それぞれの機能を分担する微生物を再構築することで、人工的にデザイン可能な複合微生物系を構築することが可能であることを示唆している。本研究では、これら知見に基づき、以下の研究項目に取り組む。

(1) アンモニア酸化菌と亜硝酸酸化菌を活用した効率的硝化を実現する従属栄養細菌のスクリーニング

有機物培地を用い、アンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌と従属栄養細菌の共培養を行い硝化反応の指標とした有用な従属栄養細菌を選抜する。

(2) 難培養微生物である硝化細菌の可培養化

アンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌を高 or 低 pH、温度など様々な環境の条件下にて集積培養を行い、様々環境にあった硝化細菌の単離を行う。

(3) 効率的な硝化反応を実現する微生物群の再構築

有機養液栽培への活用が想定される未利用有機物を想定し、先の検討で選抜したアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌、従属栄養細菌等を活用し、効率的な硝化反応を実現する組み合わせをデザインする。

4. 研究成果

我々は、有機質肥料活用型栽培の硝化工程における窒素動態と菌叢推移を DGGE 解析により明らかにし、従属栄養細菌による有機物の分解、引き続くアンモニア酸化、亜硝酸酸化に関わる大きく3種類の菌叢の機能で耕水工程が成り立っていることを示した。また硝化反応中の菌叢推移は、土壌の細菌叢に比べて比較的単純であることを明らかにした。この知見に基づき、入手可能な硝化菌である *Nitrosomonas europaea*, *Nitrobacter winogradskyi* を活用し、共培養時の硝化反応を指標に従属栄養細菌のスクリーニングを行ったところ、*Bacillusadius* と硝化菌の3菌系にて、有機物の効率的な硝化を実現した。さらに、これまで硝化が可能な有機物濃度は2 g/Lが上限であったが、新たに単離した従属栄養細菌 *Delftia* 属細菌を活用し、3菌系硝化反応を行うことで、10g/L (fish soluble) の高濃度有機物条件下においても硝化が可能であることを明らかにした。

また、既存の硝化菌を活用し、コロニーの肥大化の条件の精査を行った。その結果、培地固形基剤、培地量、培地組成、微量元素、菌体塗布量、温度、湿度、二酸化炭素濃度など最適な条件下で培養することで、釣菌に必要な培養時間を1ヶ月から2週間に短縮することに成功した。同時に硝化菌の安定した継代培養法を確立し、硝化菌の生残性の正確な評価が可能となった。さらに、見出したコロニー肥大化の条件のもと37℃以上で活性を示すアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌の単離に成功した。単離した硝化菌と従属栄養細菌との3菌系共培養によりこれまで困難であった37℃以上の条件において良好な硝化を実現した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Metzner, R. T. Nomura, N. Kitaoka, A. Ando, J. Ogawa, Y. Kato. Cobalt-dependent inhibition of nitrite oxidation in *Nitrobacter winogradskyi*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2019, in press.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.04.001>

Saijai, S., A. Ando, R. Inukai, M. Shinohara, J. Ogawa. Analysis of microbial community and nitrogen transition with enriched nitrifying soil microbes for organic hydroponics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有り 80(11), 2016, 2247-2254

<https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1200459>

〔学会発表〕(計23件)

JAMJAN MEEBOON, Makoto Shinohara, Kazuki Fujiwara, Kenji Miyamoto, Yasuo Kato, Akinori Ando, Jun Ogawa, Artificial creation of disease suppressive soil by using media immobilized with the microbial, 日本農芸化学会 2019 年度大会、2019

黄 穎、篠原 信、メツナーリチャード、加藤 康夫、安藤 晃規、小川 順、宮本 憲二、有機養液栽培に於ける側根成長促進物質の探索、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019

R. Metzner, T. Nomura, N. Kitaoka, K. Miyamoto, M. Shinohara, A. Ando, J. Ogawa, Y. Kato, Cobalt-dependent inhibition of nitrite oxidation in *Nitrobacter winogradskyi*, 日本農芸化学会 2019 年度大会、2019

Meeboon, J., Shinohara, M., Fujiwara, K., Miyamoto, K., Kato, Y., Ando, A., and Ogawa, J., A Development of disease suppressive soil by using synthetic medium immobilized microbes, 平成 31 年度日本植物病理学会大会、2019

篠原信、安藤 晃規、小川 順、宮本憲二、加藤康夫、土壌微生物を「デザイン」する・・・植物生長を最大化する基盤技術の登場、日本農芸化学会 2019 年度大会「植物生長促進微生物研究の新潮流」シンポジウム(招待講演)、2019

安藤 晃規、小川 順、硝化菌の可培養化を基盤とする硝化複合微生物群のデザイン、日本農芸化学会 2019 年度大会(招待講演)、2019

安藤 晃規、小川 順、水耕栽培系を活用した硝化菌群の解析と応用、植物の栄養研究会 第 4 回 研究交流会(招待講演)、2018

安藤 晃規、難培養性硝化菌の可培養化と応用展開、第 31 回さんわかセミナー「難培養・極限環境微生物研究の最前線」(招待講演)、2018

安藤 晃規、岡田 若子、Sakuntala Saijai、Tsai You-Shan、宮本 憲二、加藤 康夫、篠原 信、小川 順、アンモニア化成と硝酸化成に有用な微生物の探索ならびに硝化微生物コンソーシアの構築、第 70 回日本生物工学会大会、2018

安藤 晃規、岡田 若子、宮本 憲二、加藤 康夫、篠原 信、小川 順、硝化細菌の分離のための培養条件の検討、日本微生物生態学会 第 32 回大会、2018

安藤 晃規、食料生産・健康のために微生物に期待すること、プレ戦略イニシアティブ(研究拠点提案型)「微生物サステナビリティ研究拠点」シンポジウム(招待講演)、2018

R. Metzner、N. Kitaoka、T. Nomura、K. Miyamoto、M. Shinohara、A. Ando、J. Ogawa、Y. Kato、Comparative study of nitrification-promoting factors in designed microbial consortia、日本農芸化学会、2018

岡田 若子、安藤 晃規、宇佐美 晶子、Sakuntala Saijai、宮本 憲二、加藤 康夫、篠原 信、小川 順、高濃度の亜硝酸を酸化しうる硝化菌の単離と諸性質の解析、日本農芸化学会、2018

篠原 信、吉田 賢啓、岡田 若子、宇佐美 晶子、Sakuntala Saijai、安藤 晃規、宮本 憲二、加藤 康夫、小川 順、高野 雅夫、エレメンタル土壌微生物接種による非土壌媒体の土壌化、日本農芸化学会、2018

Y.-S. Tsai、S. Saijai、A. Ando、W. Okada、K. Miyamoto、Y. Kato、M. Shinohara、and J. Ogawa、A simple microbial co-culture for performing ammonification and nitrification of organic nitrogen、13th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology (ISBAB) (国際学会)、2017

Y.-S. Tsai、S. Saijai、A. Ando、W. Okada、K. Miyamoto、Y. Kato、M. Shinohara、J. Ogawa、Designing a microbial co-culture for ammonification and nitrification of organic nitrogen、第 69 回日本生物工学会、2017

篠原 信・藤原 和樹・河邑 ちひろ・安藤 晃規・宮本 憲二・加藤 康夫・小川 順・高野 雅夫、エレメンタル土壌微生物による土壌創出技術の開発、日本土壌肥料学会、2017

岡田 若子、Sakuntala Saijai、安藤 晃規、宮本 憲二、加藤 康夫、篠原 信、小川 順、アンモニア化成と硝酸化成に有用な硝化微生物コンソーシアの構築、第 2 回環境微生物系学会合同大会、2017

Akinori Ando、Future visions of applied-microbiology、The 3rd KU-KUGSA Bilateral Symposium (招待講演) (国際学会)、2017

安藤 晃規、有機養液栽培に大事な微生物とはなんだろう?、第 8 回有機質肥料活用型養液栽培研究会(招待講演)、2017

①岡田若子、Sakuntala Saijai、安藤 晃規、宮本 憲二、加藤 康夫、篠原 信、小川 順、アンモニア化成と硝酸化成に有用な硝化微生物モデルの構築、第 8 回 有機質肥料活用型養液栽培研究会、2017

②篠原 信、高田 惟名、河邑 ちひろ、藤原 和樹、安藤 晃規、宮本 憲二、加藤 康夫、小川 順、高野 雅夫、必要最小限の土壌微生物(エレメンタル土壌微生物)の有機物耐性、日本農芸化学会大会、2017

③サイジャイ サクンタラ、安藤 晃規、岡田 若子、宮本 憲二、加藤 康夫、篠原 信、小川 順、アンモニア化成、硝酸化成に有用な微生物培養系の構築、日本農芸化学会大会、2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小川 順

ローマ字氏名：OGAWA, Jun

所属研究機関名：京都大学

部局名：農学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 70281102

(2)研究協力者

研究協力者氏名：篠原 信

ローマ字氏名：SHINOHARA, Makoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。