

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14952

研究課題名（和文）水田細菌叢形成における土壌物理・化学・生物性の影響解析と支配的因子の特定

研究課題名（英文）Research on the Influence of Soil Physical, Chemical, and Biological Properties on Paddy Soil Bacterial Community Formation

研究代表者

鈴木 一輝（Suzuki, Kazuki）

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：40801775

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：水田土壌における細菌群集形成メカニズムについて検討した。その結果、水田細菌群集は一般的に農地に施用される堆肥や稲わら、土壌に長期間残存する難分解性の腐植酸といった有機物量の増加に対して比較的堅牢であり、化学性や物理性を反映する土壌型ごとに一定のバランスに収束していることが示唆された。また、土壌間に見られる細菌群集の違いがイネ生育に与える影響を評価するための2層構造ポットを開発し、土壌間での細菌群集の違いがイネ根共生微生物群集の形成にも直接的に影響し得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、水田土壌細菌群集の形成には有機物以上に何らかの化学的または物理的要因が支配的な影響を与えている可能性が示唆された。今後は細菌群集の生息域としての土壌の構造的な特徴に焦点を当てた研究が必要となると考えられる。また、土壌細菌群集の違いがイネ根の共生細菌群集の形成に直接的な影響を与えることが明らかとなり、土壌変化による細菌群集制御はイネ根共生細菌群集形成を介して水稻生産に貢献する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms of bacterial community formation in paddy soil were investigated. The results suggested that paddy soil bacterial communities are generally robust against increases in organic matter, such as compost and rice straw commonly applied to farmland, and not readily degradable humic acids that remain in the soil for long periods. These communities converge to a certain balance characteristic of each soil type, reflecting its chemical and physical properties. Additionally, a two-layer structure pot was developed to evaluate the impact of differences in bacterial communities between soils on rice growth. It was revealed that the differences in bacterial communities between soils could directly influence the formation of rice root endophytic communities.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：土壌微生物 水田細菌 微生物生態 エンドファイト 土壌型 土壌有機物 水田

## 1. 研究開始当初の背景

イネは世界の三大穀物に数えられており、水稻栽培の場である水田は我が国を含む東アジアモンスーン地域における重要な農地利用形態である。「麦は肥料でとり、稲は地力でとり」と言われるように、水田においては無・低窒素施肥でも比較的高い水稻収量が得られることが知られており、水田の窒素肥沃度は自律的に維持されている。これには土壤微生物群集（特に細菌および古細菌）の活動が強く関与していることが知られている。一方で、それらの微生物群集の形成メカニズムについては未だ不明な点が多い。これまでに、土壤化学性、有機物施用、イネ品種、気候や地域性などによる細菌叢の変動や、従属栄養性原生生物群の捕食作用による変動が報告されているが、各因子の影響力の大小については分かっていない。申請者らはこれまでに、水田における土壤細菌叢の環境中での多様性を研究してきた。まず、隣接する慣行・有機水田においてはイネ生育期間中に土壤細菌叢がそれぞれ異なる遷移を示すことを確認した (Suzuki et al. 2019)。次いで、長野、栃木、茨城、山梨、愛知、滋賀県の広範囲に渡り、黒ボク土、灰色低地土、灰色台地土、グライ土からなる慣行水田（化学肥料施用）、有機肥料施用水田、無施肥水田を対象に細菌叢解析を行ったところ、慣行・有機といった農法の違いだけでは説明ができない細菌叢の相違が認められ、むしろ土壤型ごとに細菌叢が類似することを見出した。さらに、黒ボク土、灰色台地土、グライ土を用いて細菌叢の交換試験を実施した結果、本来の細菌叢が大きく異なるにも関わらず、それらを培養した土壤型ごとに細菌叢が収束することが確認された。

以上の背景から、「土壤のいかなる性質が水田細菌叢を決定しているのか？」を本研究課題の核心をなす学術的「問い」として研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「土壤のいかなる性質が水田細菌叢を決定しているのか」を明らかにすることである。本研究では、マイクロコズム実験にて、土壤の物理性・化学性・生物性の3つの観点から細菌叢の形成メカニズムを明らかにするとともに、細菌叢形成に支配的な因子の特定を目指した。加えて、土壤型間に見られる潜在的な細菌叢と生態学的機能についても取りまとめ、水稻生育促進を目指した土壤細菌叢制御の可能性を探った。

## 3. 研究の方法

### (1) 本邦の水田土壤細菌叢の比較と菌叢制御因子の推定

長野、栃木、茨城、山梨、愛知、滋賀県から、黒ボク土、灰色低地土、灰色台地土、グライ土からなる慣行水田（化学肥料施用）、有機水田（有機肥料施用）、自然農法水田（無施肥）の計51水田から採取した土壤の理化学性を分析し、DNAの細菌16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンス解析結果との統計解析を実施した。

### (2) 活性アルミニウムおよび腐植酸含量が湛水土壤細菌叢形成に及ぼす影響

本邦の特徴的な水田土壤である黒ボク土を対照とし、その特徴である高い腐植含量および活性アルミニウム含量に着目し、マイクロコズム試験を実施した。供試土壤として黒ボク土 (39.6 mg-HA[humic acid]/g-soil, 34.9 mg-Al203/g-soil)、グライ土 (9.22 mg-HA/g-soil, 1.10 mg-Al203/g-soil)、灰色台地土 (3.54 mg-HA/g-soil, 0.90 mg-Al203/g-soil) を用いた。グライ土および灰色台地土に、フミン酸または活性アルミニウム含量が黒ボク土と同量または半量となるように添加したマイクロコズムを調製し、暗所・湛水条件で最大8週間培養した。添加したフミン酸には、黒ボク土から NAGOYA 変法で抽出したものと、市販のフミン酸およびフミン酸ナトリウム塩を用いた。活性アルミニウムとして水酸化アルミニウムゲルおよびアロフェン粉末を用いた。培養後、土壤DNAを16S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスに供した。

### (3) 土壤粒度が湛水土壤細菌叢形成に及ぼす影響

黒ボク土、グライ土、灰色台地土を供試土壤として用い、粒形2 mm以下（対照）、2~0.2 mm（粗砂）、0.2~0.02 mm（細砂）、0.02 mm以下（シルト・粘土）に分画し、それぞれをマイクロコズムとして暗所・湛水条件で最大8週間培養した。培養後、土壤DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンスに供した。

### (4) 土壤型と捕食性原生生物群集との関係

供試土壤として黒ボク土、グライ土、灰色台地土を用い、これらの滅菌土壤各19 gに対して、湛水条件で2週間嫌気培養した未滅菌土壤各1 gを微生物源として接種した。3種の土壤型について全ての組み合わせでマイクロコズムを作製した後、湛水条件で2, 4, 8, 16週にわたって暗所で嫌気培養を行った。培養後、土壤DNAを抽出し、細菌16S rRNA遺伝子および原生生物18S rRNA遺伝子を標的とするアンプリコンシーケンス解析を実施した。

### (5) 異なる土壤がイネ根共生細菌（エンドファイト）群集形成に及ぼす影響

土壤型間の細菌叢の違いがイネ根エンドファイト群集形成に及ぼす直接的な影響を明らかに

するため、土壌-植物非接触型の水耕栽培モデルを構築し、黒ボク土、グライ土、灰色低地土、灰色台地土、砂丘未熟土を用いた水耕栽培を実施した。土壌 40 g を不織布製の透水性袋に入れ、滅菌水中で 3 週間の培養を行い、水田環境を模した土壌細菌群集を形成させ、エンドファイトの接種源とした。2 層構造を有する水耕栽培ポットにイネ幼苗と土壌袋を互いに接触しないように設置し、人工気象器内で滅菌水を培地として栽培を行った。対照として等量の土壌を用いた土耕ポットも作成した。幼苗移植後 3 週間および 6 週間目に植物根の回収を行い、細菌 16S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンス解析に供した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 本邦の水田土壌細菌叢の比較と菌叢制御因子の推定

水田細菌叢は土壌型毎に類似しており、有機物施用といった肥培管理の違いも菌叢に有意な影響を与えたものの、その影響は比較的小さいものであった。細菌叢のベータ多様性 (weighted UniFrac 距離) と土壌理化学性との相関について Mantel 検定を行ったところ、土壌全炭素、全窒素、活性アルミニウムなどが強い相関を示した。この結果を受け、黒ボク土の特徴的に見られる高い腐植含量および活性アルミニウム含量が黒ボク土様の細菌叢を形成していると考え、(2) の試験を実施した。

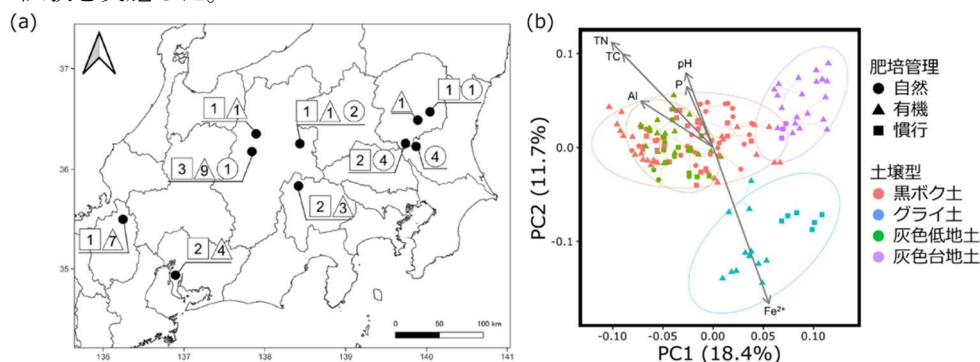


図 1. 水田土壌採取地点 (a) と土壌細菌叢の weighted-UniFrac 距離に基づくベータ多様性 (b)。□, 慣行水田 (化学肥料施用), △, 有機水田 (有機肥料施用), ○, 自然農法水田 (無施用)。数字は採取地点数を示す (suzuki et al. 2023 を一部改変)。

##### (2) 活性アルミニウムおよび腐植酸含量が湛水土壌細菌叢形成に及ぼす影響

グライ土および灰色台地土中のフミン酸および活性アルミニウム量を黒ボク土と同等まで上昇させたが、3 種の土壌中の細菌叢は依然として大きく異なっており、いずれも黒ボク土様の細菌叢形成の主要因ではないと考えられた。フミン酸添加の影響は土壌型ごとに異なり、グライ土では黒ボク土由来および市販の腐植酸の添加で Symbiobacteriales の増加、灰色台地土ではフミン酸ナトリウム塩の添加で Caloramatoraceae の減少が認められた。一方で、活性アルミニウム含量の上昇は、グライ土において Symbiobacteriaceae の相対存在量に増加傾向が見られたものの、水田細菌叢への影響は比較的小さいものであった。

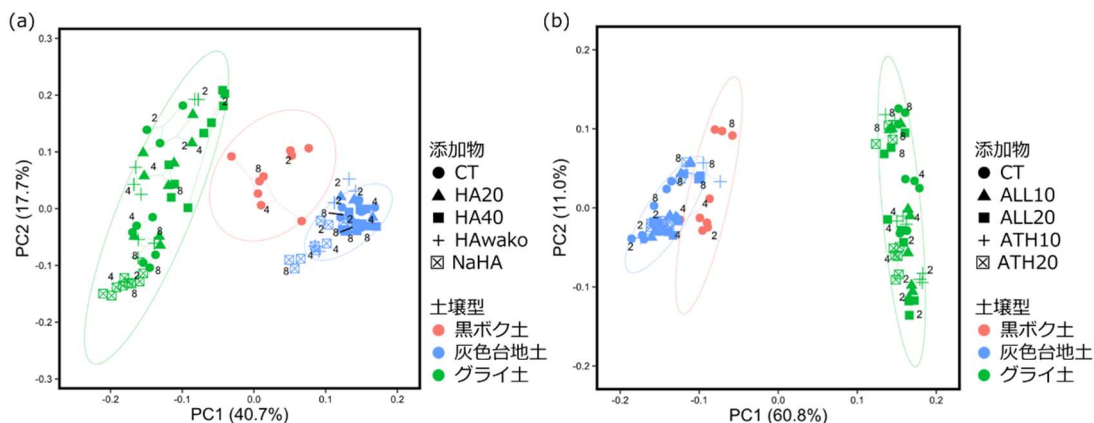


図 2. 腐植酸 (a) および活性アルミニウム (b) 添加が黒ボク土、灰色台地土、グライ土の湛水土壌細菌叢形成に及ぼす影響 (weighted-UniFrac 距離に基づく β 多様性)。数字は培養週を示す。CT: 対象, HA: 黒ボク土由来腐植酸, HAwako: 市販腐植酸, NaHA: 腐植酸ナトリウム, ALL: アロフェン, ATH: 活性アルミニウムゲル

##### (3) 土壌粒度が湛水土壌細菌叢形成に及ぼす影響

粒度別に分画した土壌を湛水培養したところ、いずれの粒度でも形成される細菌叢は各土壌型の特徴を維持していたものの、粒度が小さくなるにつれて形成される細菌叢の多様性が減少する傾向が認められた。また、グライ土のシルト・粘土画分を培養した場合に形成される細菌叢は黒ボク土の細菌叢にやや類似する傾向を示した。

##### (4) 土壌型と捕食性原生生物群集との関係

微生物叢交換後の、細菌群集および原生生物群集組成はそれを培養した土壌型ごとに類似していた。細菌叢は接種源よりも培養土壌型に大きく依存していることが明らかとなり、原生生物叢は細菌叢ほど明確ではないものの、黒ボク土で培養した場合には菌叢の類似性が高くなった。黒ボク土では Stramenopiles, グライ土では Excavata, 灰色台地土では Amoebozoa が増加傾向にあったが、細菌叢も明確に遷移しており、細菌-原生生物の被食-捕食の影響によるものか、土壌環境によるものなのかは現時点では明らかではない。

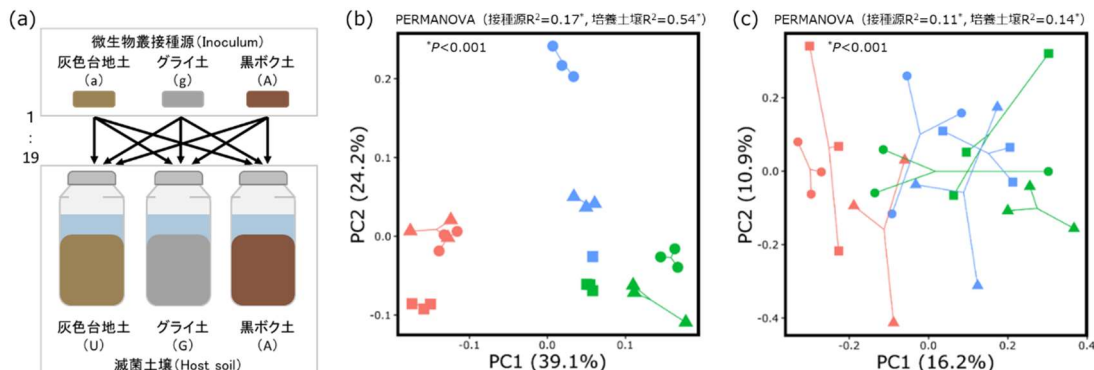


図3. 微生物叢交換マイクロコズム試験の模式図 (a) と湛水条件下で8週間培養後の細菌群集 (b) および原生生物群集 (c) のベータ多様性 (weighted UniFrac距離に基づく主座標分析)。シンボルは接種源の土壌型を (○:黒ボク土, △:グライ土, □:灰色台地土), 色は培養に用いた土壌型を示す (赤:黒ボク土, 緑:グライ土, 青:灰色台地土)。

### (5) 異なる土壌がイネ根共生細菌群集形成に及ぼす影響

根-土壌の接触は根エンドファイトの相対存在量, 特に *Pseudomonas* 属の相対存在量に影響を及ぼすものの, 相対存在量上位 20 位内のほとんどのエンドファイトは感染時に根-土壌の接触を必要としないことが示唆された。従って, 本研究で使用した 2 層構造ポットはイネエンドファイト研究に応用可能であると考えられる。この 2 層構造ポットを用いた水耕栽培で形成された根エンドファイト群集はいずれの土壌を用いても *Burkholderia* 属や *Xanthomonas* 属が優占していたが, その群集組成は土壌ごとに有意に異なっていた。黒ボク土を用いた場合に根エンドファイト群集は最大の種数・多様度を示し, 相対存在量でおよそ 20%を占める細菌群は黒ボク土でのみ検出された。一方で, イネ生育は黒ボク土を接種源としたものよりもグライ土を用いたものの方が良好であった。

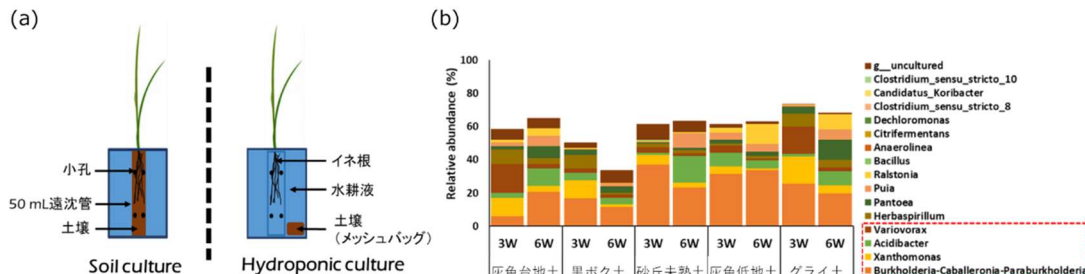


図4. イネ-土壌非接触型 2 層構造ポットの模式図 (a) および 5 種の土壌型を細菌叢接種源として用いて栽培したイネ根エンドファイト群集 (b) (上位 20 属) (Samuel et al. 2022 および Samuel et al. 2023 を一部改変)。

### まとめと今後の展望

本研究では, 水田細菌叢形成因子の特定を目的に, 実際の水田土壌 DNA の解析およびマイクロコズム試験を実施した。堆肥や稲わら等の有機物施用以上に細菌叢形成に大きく寄与すると考えられる土壌型に着目し, 黒ボク土を対照とした土壌化学性改変を試みたが, 腐植酸含量の改変は細菌叢形成にほとんど影響しなかった。このことから, 水田細菌組成は易分解性・難分解性いずれの有機物施用に対しても比較的堅牢であることが示唆された。今後は, 土壌細菌叢の生息域としての土壌の構造的特徴, 特に粒度や孔隙径, 表面荷電といった物理化学性に焦点を当てた研究が必要になると考えられる。また, 土壌型ごとに特徴的な細菌叢はイネ根エンドファイト形成にも直接的な影響を及ぼすことが示され, 土壌細菌叢制御はイネエンドファイト形成への影響を通じてイネ生育の制御に資する可能性が示唆された。

### 引用文献

- Suzuki et al. 2019. *Microbes and Environments* 34:108-111  
 Suzuki et al. 2023. *Microbial Ecology* 86:2552-2559  
 Samuel, Suzuki et al. 2022. *Biology and Fertility of Soils* 58:35-48  
 Samuel, Suzuki et al. 2023. *Biology and Fertility of Soils* 59:733-746

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Samuel Solomon Oloruntopa, Suzuki Kazuki, Asiloglu Rasit, Harada Naoki	4. 巻 59
2. 論文標題 Rice endophytic communities are strongly dependent on microbial communities specific to each soil	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology and Fertility of Soils	6. 最初と最後の頁 733 ~ 746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00374-023-01743-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Kazuki, Katashima Kana, Miki Takaaki, Igarashi Hajime, Xu Qicong, Ohkubo Shinji, Iwaishi Shinji, Harada Naoki	4. 巻 86
2. 論文標題 Bacterial Community Composition Under Paddy Conditions Is More Strongly Affected by the Difference in Soil Type than by Field Management	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Ecology	6. 最初と最後の頁 2552 ~ 2559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00248-023-02261-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Igarashi H, Katashima K, Asiloglu R, Harada N, Suzuki K
2. 発表標題 Factors in the formation of paddy soil bacterial communities
3. 学会等名 Global Symposium on Soils for Nutrition (FAO) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Samuel SO, Suzuki K, Asiloglu R, Harada N
2. 発表標題 Microbial source shapes the community of endophytic bacteria in rice roots
3. 学会等名 Global Symposium on Soils for Nutrition (FAO) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木一輝, Samuel OS, Asiloglu R, 原田直樹
2. 発表標題 イネ根エンドファイト形成における土壌 - 根接触の重要性と土壌型の影響
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2022年度東京大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木一輝, 片嶋夏菜, O. S. SAMUEL, 五十嵐一望, 三木孝明, 徐啓聡, 榊原健太郎, R. ASILOGLU, 原田直樹
2. 発表標題 異なる土壌型の菌叢の接種は水田細菌叢に影響を与えるか？
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2021年度北海道大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木一輝, 五十嵐一望, 片嶋夏菜, 原田直樹
2. 発表標題 フミン酸および活性アルミニウムの添加に対する水田土壌細菌叢の応答
3. 学会等名 日本土壌肥料学会2023年度愛媛大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------