

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 29日現在

機関番号：14301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23780077  
 研究課題名（和文） 硝化作用をモデルとした複合微生物解析と高機能化デザイン  
 研究課題名（英文） Analysis and design of microbial consortia for the nitrification process  
 研究代表者  
 安藤 晃規 (ANDO AKINORI)  
 京都大学・生理化学研究ユニット・助教  
 研究者番号：10537765

研究成果の概要（和文）：有機質肥料活用型養液栽培は、微生物源として水中に土壌を少量添加し、有機物の硝化を行う工程と、作物を栽培する工程で構成される。本研究では、微生物源として培養土のスクリーニングを行い、硝化工程を短縮できるバーク堆肥（微生物源）を選抜し、硝化終了後の微生物群を用いることで、簡便に有機溶液栽培が実現できる微生物剤の開発を行った。また、DGGE解析法を活用し、硝化工程の環境動態と菌相の遷移の可視化に成功し、土壌栽培時の硝化作用のモデルとして活用できることを明らかにした。

研究成果の概要

（英文）：

The organic hydroponics consists of following process a) nitrification process: constructing microbial ecosystem for degrading and nitrifying of an organic fertilizer b) cultivating process culturing plants with maintaining nitrifying microbial community. In this study, the author screened the bark compost that has effective nitrifying ability among 50 kinds of soils and revealed that microorganisms collected from completed nitrification process, which was detected only nitrate nitrogen as an inorganic nitrogen, could be used to nitrification process again as microbial consortia. Moreover, the author evaluated subcultivated microorganisms of nitrification process by using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) methods, and investigated the relations between the transition of microorganisms biota and environmental conditions through nitrification process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：硝化反応・有機質肥料活用型栽培・複合微生物・アンモニア酸化菌・亜硝酸酸化菌・DGGE解析

## 1. 研究開始当初の背景

従来、有機廃棄物はコンポスト化され、土壌の潜在力を頼りに施肥利用されてきた。本研究は、より積極的かつ計画的に有機廃棄物

を活用・循環すべく、量的・質的制御がより柔軟な作物生産形態である水耕栽培系への有機廃棄物の活用を目指す。植物工場に代表される水耕栽培系は、計画的作物生産が可能

であり、人口増加が予想される未来社会における重要な食糧生産技術である。しかし、これまでの水耕栽培系は、化学肥料を用いる無菌的な技術であり、有機質肥料の導入が困難であった。本研究は、有機廃棄物の積極的利用と循環を計画的作物生産を介して実現すべく、有機廃棄物を水耕栽培系にて利用できる形態に変換しうる微生物剤の開発を目指す。具体的には、有機態窒素の硝化を効率化し、かつ水耕栽培時の微生物剤の開発を行う。

## 2. 研究の目的

有機廃棄物の利用は家庭でのコンポスト化など社会に浸透しているが、土壌を利用する作物栽培にしか利用できなかった。一方、野菜工場に代表される水耕栽培は、作物の生産制御・管理が容易であるが、化学肥料を利用して無菌環境を維持せねばならず、環境負荷と施設維持コストの面で問題を有している。有機物廃棄物を水耕栽培に利用する有機養液栽培法は、上記問題を解決し計画的作物生産を実現し、かつ、自然本来の物質循環システムを構築できる技術である。養液中の根圏生態系の相互作用を微生物の観点から解析し、有機廃棄物の窒素循環に着目した効率利用と、植物生育促進のための基盤技術構築を目指す。特に、有機廃棄物コンポスト化の硝化過程に着目した微生物剤の開発に取り組むことで、有機廃棄物を活用する有機養液栽培を現実的な技術とする。

## 3. 研究の方法

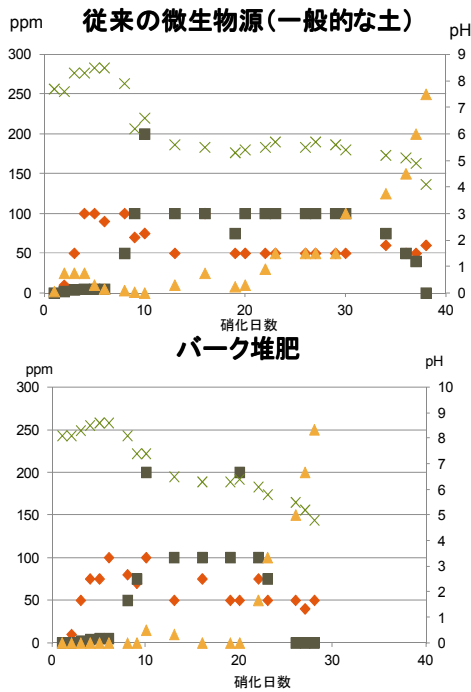
有機養液栽培は、水に微生物源として土壌を少量入れ、毎日適量の有機廃棄物を添加し、約2週間曝気を行う無機化（硝化）過程と、植物を定植後、養液内に病害に強い安定した生態系を構築しながら栽培を行う栽培過程に分けられる。いずれの過程も操作自体は極めて単純であるが、本栽培法を幅広く普及させ有機廃棄物の資源循環に貢献するた

めには、より再現性よく効率的な栽培法とする必要がある。本研究では、そのために必要な有機廃棄物の効率的硝化を実現する微生物剤の開発に取り組む。複合微生物の相互作用下で発現する機能の抽出・解析を有機水耕栽培の有機物の分解過程をモデルとして行う。本申請では生態系の有する安定性と柔軟性を制御しつつ、硝化反応の効率化を目標に研究展開する。各種農業資材を利用して(1)硝化微生物群のスクリーニングを行い、最適な(2)硝化条件の検討を行う。硝化に関わる(3)単一漕での微生物の遷移解析と(4)微生物相遷移と代謝物の関連性の解析を行い、(5)硝化効率に影響を与える因子の同定を行う。続いて、硝化の終了した培養槽より集菌した硝化菌群を希釈し、最低限の構成で様々な硝化特性を示す(6)硝化作用最小構成微生物のバリエーション化とライブラリーの構築を行う。単純化した硝化微生物群を用いて(7)遷移菌相のカラムへの固定化を誘導し、(8)代謝物依存的な最小構成微生物の分離を行う。さらに単純化できた微生物群の解析と硝化促進因子を前年度の情報に基づき統合を図る。また、機能ベースでカテゴライズした有用な菌群を統合し柔軟性を有したもの、あるいは特定の環境に応じたオンデマンドな(9)微生物剤の構築を行い、研究協力者の野菜茶業研究所の篠原氏に実証試験を委託する。一方で、廃水処理分野での硝酸態窒素の処理に関して、亜硝酸酸化菌の訓養、濃縮と、塩の製塩法の電気透析を活用し(10)硝酸性窒素肥料の連続発酵生産の検討を行う。

## 4. 研究成果

有機質肥料活用型養液栽培は、微生物源として水中に土壌を少量添加し、有機物の硝化反応を促す硝化工程と、構築した微生物生態系を維持しながら作物を栽培する工程で構

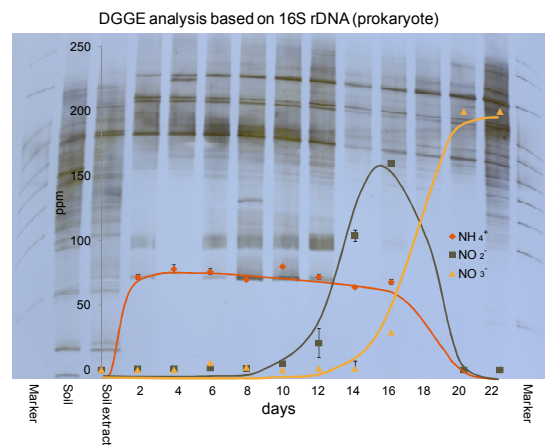
成される。微生物源として約 50 種類の肥料や、培養土のスクリーニングを行い、硝化工程を従来の 1 ヶ月から、2 週間に短縮できるバーク堆肥（微生物源）を選抜した。



また、硝化終了後の培養液から回収した微生物群を用いることで、再現性よく迅速な硝化を行えたことや、様々な有機物に対しても、硝化が可能であったことから柔軟性を有していることを明らかにし微生物剤としての利用の可能性を示せた。さらに硝化工程を繰り返し 10 世代行い、それぞれの世代の細菌相を DGGE 解析により確認した。硝化完了後の細菌相のパターンは硝化を繰り返しても一定の菌相に収斂することを明らかにした。



微生物群集を用いて作物栽培を検討した結果、土壌を微生物源として用いた際と同様の実績を示した。さらに、菌体の大量調製に成功し、その実用性、汎用性を高めた。以上、細菌相の再現性と安定性、硝化の柔軟性、栽培実績が確認できたことにより、本微生物剤が有機肥料活用型栽培における微生物剤として利用できると同時に、土壌栽培時の硝化作用のモデルとして活用できることを明らかにした。続いて、硝化作用の経時的な変化のモデル化の構築を検討し、経時的に菌体を分取することで環境動態と硝化反応の菌相推移を DGGE 解析により明らかにした。



有機質肥料活用型栽培に有用な微生物剤の調製に成功したことは、資源循環型作物栽培を推し進める成果であると同時に、微生物と植物の相互作用のモデルを提示できたと考えている。一方で、微生物剤には約 1 万種の菌が含まれるが、難培養性の菌も多数含まれる。今後、品質管理の面からもハンドリング可能な最小限の微生物のデザインが求められる。

### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 14 件）

① 犬飼龍矢、安藤晃規・「高施肥性・耐病性を備えた有機質肥料活用型養液栽培」アグリビジネス創出フェア「Agribusiness Creation

Fair 2011」2011年12月1日(金)千葉県・幕張メッセ

②安藤晃規「耕水を半分の日数で作成できる種菌の開発」有機質肥料活用型養液栽培研究会第2回大会(招待講演)三重県・アスト津・2011年11月28日

③中尾 英二、安藤 晃規、島 純、藤田 朋宏、小川 順「ウキクサから単離した微生物の同定と機能解析」日本農芸化学2012年年度大会・京都・京都女子大学・2012年3月22日(金)～26日(月)

④安藤晃規、犬飼龍矢、池本成美、島 純、宮本憲二、加藤康夫、篠原信、小川 順「有機養液栽培に有用な高い硝化活性を示す微生物群の解析」日本農芸化学2012年年度大会・京都・京都女子大学・2012年3月22日(金)～26日(月)

⑤小川 順、安藤晃規、犬飼龍矢、池本成美、島純、宮本憲二、加藤康夫、篠原信「硝化特性を指標とした有機養液栽培に有用な微生物群の探索」日本農芸化学2012年年度大会・京都・京都女子大学・2012年3月22日(金)～26日(月)

⑥種村竜太、遠藤昌伸、安藤晃規、篠原信「イチゴの有機質肥料活用型養液栽培技術の開発(第4報)有機質肥料と化学肥料との養分吸収特性の比較」土壤肥料学会2012年度大会・鳥取大学・2012年09月04日～2012年09月06日

⑦種村竜太、遠藤昌伸、安藤晃規、篠原信「イチゴの有機質肥料活用型養液栽培技術の開発(第6報)微生物資材処理方法の違いが初期生育と養分吸収に及ぼす影響」園芸学会平成

25年度春季大会・東京農工大学小金井キャンパス・2013年03月23日～2013年03月24日

⑧藤原 和樹、飯田 祐一郎、青山 ちひろ、安藤 晃規、小川 順、大西 純、高野 雅夫、寺見 文宏、篠原 信「有機質肥料活用型養液栽培におけるレタス根腐病に対する病害抑止効果の解析」平成25年度日本植物病理学会大会・岐阜大学・2013年03月27日～2013年03月29日

⑨小川 順、安藤 晃規「微生物で土壌を創るー複合微生物系の機能利用ー」日本化学会第93春季年会・立命館大学びわこ・くさつキャンパス・2013年03月22日～2013年03月25日

⑩篠原 信、岩井 喬、藤原 和樹、青山 ちひろ、小川順、安藤 晃規、加藤 康夫、宮本 憲二、高野 雅夫「人工土壌作出による有機質資源からの無機肥料製造技術と有機質肥料活用型養液栽培」日本農芸化学会2013年度大会・仙台・東北大学・2013年03月24日～2013年03月28日

⑪藤原 和樹、飯田 祐一郎、青山 ちひろ、大西 純、安藤 晃規、小川 順、加藤 康夫、宮本 憲二、高野雅夫、寺見 文宏、篠原 信「有機質肥料活用型養液栽培におけるFusarium oxysporum f. sp. lactucaeの動態解析」日本農芸化学会2013年度大会・仙台・東北大学・2013年03月24日～2013年03月28日

⑫犬飼 龍矢、安藤 晃規、池本 成美、島 純、青山ちひろ、吉田 昭介、宮本 憲二、加藤 康夫、藤原和樹、篠原 信、小川 順「有機質肥料活用型養液栽培における有機態窒素の硝化と菌相推移の解析」日本農芸化学会2013

年度大会・仙台・東北大学・2013年03月24日  
～2013年03月28日

⑬吉田 昭介、小野 瑞季、篠原 亘、榊原 康  
文、安藤晃規、小川 順、加藤 康夫、篠原 信、  
宮本 憲二「次世代シークエンサーによる有機  
養液栽培における微生物叢の網羅的解析」日  
本農芸化学会2013年度大会・仙台・東北  
大学・2013年03月24日～2013年03月28日

⑭安藤晃規、犬飼龍矢、溝渕久恭「有機質肥  
料を直接水耕栽培系に利用できる」アグリビ  
ジネス創出フェア2012・東京ビッグサイ  
ト・2012年11月14日～2012年11月16日

[その他]

2012年4月3日、日本農業新聞掲載

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 晃規 (ANDO AKINORI)

京都大学・生理化学研究ユニット・助教

研究者番号：10537765

### (3) 連携研究者

篠原 信 (SHINOHARA MAKOTO)

農業食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研  
究所・主任研究員

研究者番号：90326075