

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2020 年 07 月 06 日現在

機関番号：13101
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号：19H00305
研究課題名：従属栄養性原生動物をキャリアとする有用細菌の水稲根圏への効果的な接種法の検討
研究代表者
アシルオグル ムハンメット ラシット (Asiloglu Muhammet Rasit)
新潟大学農学部・特任助教

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：540,000円

研究成果の概要：

1) *Azospirillum* sp. B510 は原生生物の内部で成育・コロニー形成を行い、原生生物細胞から脱出することができ、土壤環境下での生存確率を高める可能性があることが明らかになった。2) バイオ炭が原生生物の群集組成をバイオ炭の原料および物理化学的特性に依存して変化させることが示された。3) 原生生物の細菌群集組成への影響はバイオ炭の施用により減少した。原生生物と応用バイオチャーは、細菌群集に異なる影響を与えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最初の研究は今も続いている。本研究は、原生生物群集に対するバイオ炭の効果と細菌群集組成に対する捕食効果を明らかにした最初の研究である。The journal of Soil Biology and Biochemistry に 2 本の論文が投稿された (under review)。本研究は、有機肥料が微生物の動態をどのように変化させるかについての理解を深めたと考えている。さらに、バイオ炭の適用が細菌と原生生物の間の相互作用に影響を与えることを示した。

研究分野：土壤生物学

キーワード：原生動物、キャリア、有用細菌

1. 研究の目的

これまでに、土壤原生生物が植物成長促進根圏細菌 (PGPR) であるアゾスピリラム属 (*Azospirillum* sp. B510) の生存率を高めることを示した(*)。本研究では、原生生物がアゾスピリラム sp. B510 を水田土壤に接種する際の担体として作用するかについて試験を行った。さらに、土壤改良が原生生物の群集組成や細菌に対する捕食にどのような影響を与えるかを理解するために、土壤改良材としてのバイオ炭が、1) 原生生物の群集組成と 2) 原生生物の捕食による根圏細菌群集の変化に与える影響を分析した。

*Asiloglu R, et al. 2020: Applied Soil Ecology, 154, 103599. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103599>

2. 研究成果

(1) 土壤原生生物は、アゾスピリラム sp. B510 を輸送し得る

本研究では、*Azospirillum* sp. B510 を赤色蛍光タンパク質 (Bs-Red) で標識し、原生生物存在下での挙動を顕微鏡で観察した。その結果、*Azospirillum* sp. B510 は原生生物の内部で成育・コロニー形成を行い、原生生物細胞から脱出することができ、土壤環境下での生存確率を高める可能性があることが明らかになった (図 1)。(COVID-19 のために研究に遅延があり、さらなる研究が必要である)

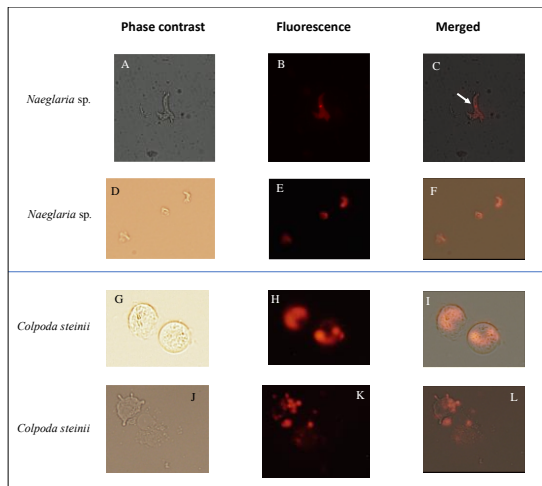


図1. *Naeglaria* sp. (A-F)と *Colpoda steinii* (G-L)の内部に生きたDsRed標識 *Azospirillum* sp. B510. J-Kは、原生細胞から脱出した *Azospirillum* sp. B510のコロニーを示す。

(2) バイオ炭は原生生物の分類学的・機能的群集組成に影響を与える

二種のバイオチャーを施用した場合のイネ根圏における原生生物群集組成の変化を、18S rRNA 遺伝子を対象としたアンプリコンシーケンス解析 (MiSeq) にて検討した。その結果、バイオ炭が原生生物の群集組成をバイオ炭の原料および物理化学的特性に依存して変化させることが示された。(図2と3)

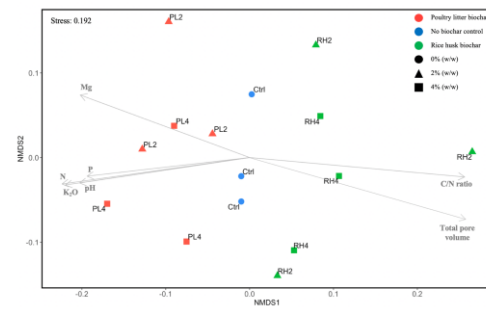


図2. 原生生物群集の構造と土壌物理化学的特性との間に有意な相関が見られた。赤色は腐葉バイオ炭処理 (PL2)、青色は稲刈バイオ炭処理 (Ctrl)、緑色は腐葉バイオ炭処理 (RH)、丸はバイオ炭無添加対照、三角は2%(w/w)、四角は4%(w/w)のバイオ炭処理。矢印は原生生物群集と環境パラメータ間の有意な相関を示す ($p < 0.05$)。

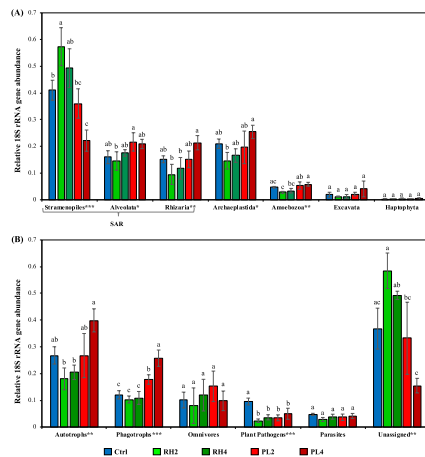


図3. 原生生物の分類学的スーパーグループ (A) と機能グループ (B) の比較。原生生物の豊富さの平均割合を示す棒グラフ。エラーバーは標準偏差を示す。異なる文字は、各分類群または機能群内での有意差を示す (Tukey's HSD)。分類群または機能群の名前の後のアスタリスクは、一方ANOVAの結果の有意因子を示す。*、 $p < 0.05$; **、 $p < 0.01$; ***、 $p < 0.001$ 。青色、非二炭対照処理 (Ctrl); 薄緑色、2%(w/w) 稲炭二炭処理 (RH2); 濃い緑色、4%(w/w) 稲炭二炭処理 (RH4); 薄赤色、2%(w/w) 腐葉二炭処理 (PL2); 濃い赤色、4%(w/w) 腐葉二炭処理 (PL4)。

(3) バイオ炭施用下における原生生物の細菌群集組成とイネの生育に及ぼす影響

本研究では、バイオ炭の施用により、原生生物が細菌や植物の生育に与える影響がどのように変化するかを理解することを目的とした。土壌原生生物による細菌群集の変化を、MiSeq による 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析で検討した。その結果、原生生物の細菌群集組成への影響はバイオ炭の施用により減少し (図4と5)、それに伴い細菌群集の機能性にも影響を及ぼすことが示唆された (図6)。イネの生育に及ぼす原生生物の影響は、バイオ炭の施用を行った場合と行わなかった場合とで一貫していた (図7)。

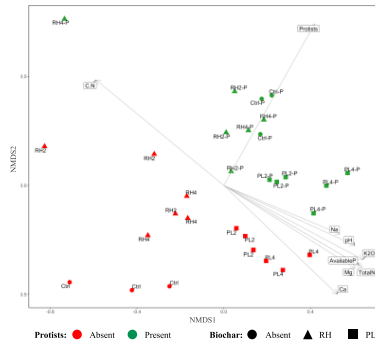


図4. 属レベルでのBray-Curtis dissimilarity indexに基づく非計量多次元スケーリング (NMDS) プロットを用いた処理群集の間の細菌群集組成の比較。矢印は、細菌群集組成と環境パラメータの間の有意な ($p < 0.05$) 相関を示す。緑はプロテスト処理、赤は無プロテスト処理、丸はバイオ炭を添加しないコントロール、三角は初級バイオ炭、四角は熟成バイオ炭。Ctrl, バイオ炭添加のコントロール、RH2とRH4、2%と4%(w/w)の初級バイオ炭、PL2とPL4、2%と4%(w/w)の家畜ターバイオ炭。

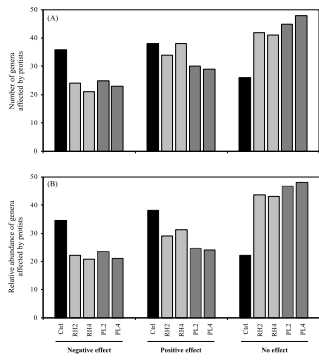


図5. 属レベルでの上位100種の細菌分類群に対する原生生物の有意な影響。各グループの原生生物の存在によって有意 ($p < 0.05$) 影響を受けた細菌分類の総数 (A) と相対的な存在量 (B)。ネガティブまたはポジティブな効果は、原生生物の存在によって細菌属の相対的な存在量が有意に減少または増加したことを示す。効果なしは、原生生物の存在が細菌属の相対的な存在量に有意な影響を与えなかったことを示す。各細菌属に対する原生生物の影響を、各群の原生生物の有無を比較して統計的に分析した (ANOVA, $p < 0.05$)。Ctrl (グレー色の塗りつぶし棒、無二炭対照処理)、RH2およびRH4 (水色および紺色の塗りつぶし棒、2%および4%(w/w)初級バイオ炭処理)、PL2およびPL4 (水色および紺色の塗りつぶし棒、2%および4%(w/w)家畜ターバイオ炭処理)の各群の原生生物の有無を比較して統計的に分析した。

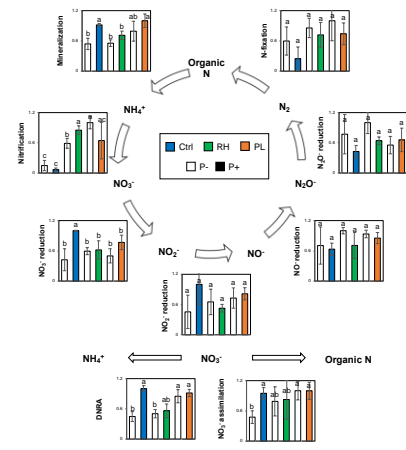


図6. PICRUStは、根圏における特定のNサイクルプロセスに関する細菌の16S rRNA遺伝子量を予測した。すべてのデータは、1に設定された個々のプロセスの基準値に正規化された。エラーバーは標準偏差を示す。異なる文字は有意差を示す ($p < 0.05$)。青色の棒は、バイオ炭を添加しないコントロール (Ctrl)、緑色の棒は、初級バイオ炭 (RH)、オレンジ色の棒は、熟成バイオ炭 (PL)、黒色の棒は、原生生物の不在 (P-)、塗りつぶしの棒は、原生生物の存在 (P+)。

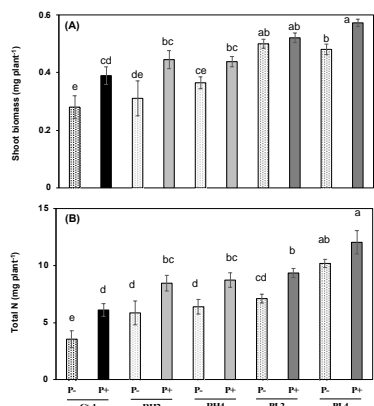


図7. 36日目の植物成長パラメータ% A) シュートバイオマス、B) 総窒素摂取量% Ctrl, バイオ炭4%添加しない(コントロール、RH2およびRH4、2%および4%(w/w)の初級バイオ炭、PL2およびPL4、2%および4%(w/w)の熟成バイオ炭、P-, プロテストなし処理、P+, プロテスト処理% エラーバーは標準偏差を示す。異なる3文字は有意差4%を示す ($p < 0.05$)。

3. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① 2020年09月10-12日・日本土壌肥料学会「2020年度岡山大会」・「オンライン」
Asiloglu R, Sevilir B, Samuel S, Aycan M, Akca MO, Suzuki K, Murase J, Turgay OC, Harada N: Effects of biochar amendment on community structure of protists and their predatory effects on bacterial community composition in a rice rhizosphere（口頭発表）
- ② 2019年11月03-08日・14th International Conference of the East and South-East Asia Federation of Soil Science Societies (ESAFS)・台北 台湾
Samuel S, **Asiloglu R**, Sevilir B, Aycan M, Akca MO, Suzuki K, Murase J, Turgay OC, Harada N: Protists enhanced short-term effects of biochar treatment on the growth of rice plants（ポスター）
- ③ 2019年06月15-16日・日本土壌微生物学会「2019年度大会」・札幌
Asiloglu R, Sevilir B, Samuel S, Aycan M, Akca MO, Suzuki K, Murase J, Turgay OC, Harada N: Effect of protists on bacterial community structure and mineralization of biochars（ポスター）
- ④ 2019年06月15-16日・日本土壌微生物学会「2019年度大会」・札幌
Shiroishi K, **Asiloglu R**, Suzuki K, Turgay OC, Murase J, Harada N: 従属栄養性原生生物によるPGPRのイネ (*Oryza sativa* L.) 生育促進効果の向上（ポスター）
- ⑤ 2019年05月15-17日・植物微生物研究会「5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation」・仙台
Asiloglu R, Sevilir B, Samuel S, Aycan M, Akca MO, Suzuki K, Murase J, Turgay OC, Harada N: Impact of protist grazing on bacterial community structure and rice plant growth in a biochar-treated paddy field soil（口頭発表）
- ⑥ 2019年05月15-17日・植物微生物研究会「5th Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation」・仙台
Shiroishi K, Suzuki K, Turgay OC, Murase J, Harada N, **Asiloglu R**. • Rice (*Oryza sativa* L.) Plant Growth Enhanced by Co-inoculation with Heterotrophic Protists and Azospirillum sp. strain B510（ポスター）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：

原田 直樹

村瀬 潤

Turgay O. Can

鈴木 一輝

※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。