

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07709

研究課題名(和文) 土壌窒素固定活性の評価法開発と竹粉碎資材ならびに微生物資材による活性化

研究課題名(英文) Development of evaluating methods for soil nitrogen-fixing activity and its activation by bamboo power and microbial fertilizers

研究代表者

前田 勇 (Maeda, Isamu)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10252701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：水稲栽培土壌の窒素固定活性すなわちアンモニア生産能を高めることで、化学肥料のアンモニアへの依存度低減に寄与することを目的とした。炭素源として竹粉、窒素源として牛糞堆肥を土壌に供給した。土壌の窒素固定細菌数と窒素固定活性は、灌水前は低く、水稲栽培期に最も高くなり、イネ収穫後に再び低下した。化学肥料と比較して牛糞堆肥を施用した土壌において高い活性が認められた。収穫後では牛糞堆肥を施用した土壌で竹粉による活性の増加傾向が認められた。土壌からDNAを抽出し土壌細菌叢の変化を解析した。細菌叢への影響は、灌水前から水稲栽培期にかけての季節変動が最も大きく、化学肥料と牛糞堆肥の違い、竹粉施用の有無と続いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究により水稲栽培において、7月のイネ栽培期に灌水前あるいは収穫後と比べ窒素固定細菌数が多く、かつ高いニトロゲナーゼ活性となり、灌水前から栽培期にかけて細菌叢の変化も最も顕著であることが示された。灌水、気温上昇、イネの栽培による環境条件の変化が土壌細菌の活性や菌叢に対する影響が非常に大きいことが明らかとなった。また、施用する資材は細菌叢やニトロゲナーゼ活性に変化をもたらすが、化学肥料と牛糞堆肥の違いが最も影響が大きく、竹粉施用の有無は牛糞堆肥との組み合わせで副次的な影響が認められることが明らかとなり、牛糞堆肥や竹粉の施用が水田のアンモニア生産能向上に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This study has been performed to contribute to reducing the dependence of ammonia in chemical fertilizers by increasing the nitrogen-fixing activity in rice-paddy fields. Bamboo powder as a carbon source and cow dung compost as a nitrogen source were supplied to the soil. Soil nitrogen-fixing bacterial counts and activities were low before irrigation, highest during paddy cultivation, and decreased again after rice harvest. The higher activity was observed in soil fertilized with cattle manure compared to chemical fertilizer. After harvest, the activity increased in the soil fertilized with cow dung compost by adding bamboo powder. Changes in soil bacterial communities were also analyzed. The influence on the bacterial community was the largest in seasonal variation from pre-irrigation to the rice cultivation periods, followed by the difference between soils fertilized with chemical fertilizer and cow dung compost and the difference whether or not bamboo powder was applied.

研究分野：応用微生物学

キーワード：非共生型窒素固定 竹粉 牛糞堆肥 ニトロゲナーゼ メタゲノム

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

窒素と水素からアンモニアを合成する化学的窒素固定は高温・高圧下で行われ、生成物の大半は肥料原料として利用される。したがって、農業生産において高い生産効率を達成するためには化石燃料の大量消費に依存せざるを得ないのが現状である。一方、生物学的窒素固定は特定の細菌が保有するニトロゲナーゼにより触媒され、常温・常圧の温和な条件下で空気中の窒素を基質としたアンモニア合成が進行する。したがって、生物学的窒素固定を介した植物への窒素供給量を増やすことができれば、化学合成された窒素肥料の使用量削減、さらには農業生産における化石燃料への依存度低下に結び付くと期待される。自然界では、化学的窒素固定で合成される量とほぼ同量のアンモニアが生物学的窒素固定により生成すると推定される。しかしながら、自然界で生成する量と比較した場合に生物学的窒素固定を農業生産に十分に活用しているとは言えないのが現状である。

2. 研究の目的

農業生産に貢献する生物学的窒素固定の代表例として、マメ科植物根粒中の根粒細菌とその宿主であるマメ科植物との共生関係の上で機能するものが挙げられる。マメ科植物から根粒細菌へは光合成産物が代謝されて生成するリンゴ酸が炭素源として供給され、根粒細菌からマメ科植物へは窒素固定により合成されたアンモニアが窒素源として供給される。このように、多くの共生型窒素固定は宿主から窒素固定細菌への炭素源供給と、窒素固定細菌から宿主への窒素源供給のバランスが取れた状態が保たれている。化学合成従属栄養細菌にとって炭素源は、同化代謝における炭素の供給源となるのみならず、ATP 合成のためのエネルギー源や、酸化還元反応に必須の電子、すなわち還元当量の供給源としても欠くことができない。一方、ニトロゲナーゼ酵素が触媒する窒素固定反応において、1 モルの窒素を還元し 2 モルのアンモニアを生成するために 16 モルの ATP と 8 モルの電子が消費される。このため化学合成従属栄養細菌が窒素固定を行うためには、化学エネルギーと還元当量の源となる炭素源の細胞への持続的な供給が必要不可欠となる。また、遊離のアンモニアやある種のアミノ酸合成系はニトロゲナーゼ活性に対しては遺伝子の転写や mRNA の翻訳後の各段階において抑制的に働くことが知られている。したがって、炭素源供給が十分に確保され、かつ無機態・有機態窒素が欠乏した環境条件、すなわち高 C/N 条件がニトロゲナーゼ活性を高く維持するために好ましいとされる。

近年、材料としての需要の低下から竹林の荒廃が全国的に進んでいる。竹は地下茎の広がりが多いため間伐されない場合には周縁部への侵食被害等も生じるため間伐材の新たな有効利用法の開発が急務となっている。竹は C/N が米糠の約 16 倍と非常に高いため、これらの資材を土壤に供給することで土着の非共生型窒素固定細菌が炭素源として利用して高いニトロゲナーゼ活性を維持するかどうか検討することとした。供給形態としては、竹材をマイクロメートル径になるように粉碎した竹粉を用いることとした。また、化学肥料の減量を目的として窒素肥料として牛糞堆肥を使用し竹粉と組み合わせて水稲栽培圃場に施用することで、化学肥料を施用した場合と比較し土壤窒素固定活性に及ぼす効果を評価することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

資材の施用と土壤採取は大学附属農場にて行った。耕作地面積 10 a あたり、竹粉は 50 kg、牛糞堆肥は 1 t、化学肥料は 30 kg をそれぞれ施用した。実験区は、2018 年は牛糞堆肥と竹粉の施用区、牛糞堆肥の施用区、化学肥料の施用区の 3 種類、2019 年は牛糞堆肥と竹粉の施用区、牛糞堆肥の施用区、化学肥料と竹粉の施用区、化学肥料の施用区の 4 種類を設定した。土壤の採取は、2018 年は水田に水を入れる灌水の前の 4 月、灌水を行った後のイネ栽培中の 7 月、そしてイネ収穫後の 11 月の 3 回行い、2019 年は 4 月と 7 月ならびにイネ収穫後の 9 月に、それぞれ 10 a 圃場当たり異なる 3 点から 5 点で採取を行った。

窒素固定細菌の生菌数は、窒素源を含まない平板培地に形成されるコロニーを計数することで調べた。実験には炭素源としてグルコースあるいはリンゴ酸を含む培地を用いた。30℃ で 7~9 日間培養を行い、形成されたコロニーを計数した。

ニトロゲナーゼ活性測定はアセチレン還元法により行った。土壤 10 g と炭素源としてグルコース、活性測定の基質としてアセチレンを封入した後、24 時間、30℃ でインキュベーションを行った。エチレン生成量を GC-FID で測定し活性を評価した。

土壤細菌叢について実験区間の比較と季節変動を調べた。土壤サンプルより DNA を抽出し 16SrRNA 遺伝子を標的とした PCR により、遺伝子の特定領域の増幅を行った。この PCR 産物を次世代シーケンサー MiSeq によるアンプリコン解析に供し、得られた塩基配列情報をバイオインフォマティクスソフトウェア Mothur により操作上の分類単位 OTU へと振り分けた。OTU の計数から主座標分析による菌叢解析を行った。

4. 研究成果

(1) 窒素固定活性に及ぼす竹粉と牛糞堆肥の影響

窒素固定細菌生菌数の評価は 2018 年に採取した土壤を用いて行った。炭素源としてリンゴ酸を用いた培地で形成されたコロニーから算出した生菌数を図 1A に示す。実験区に関係なく、窒素固定細菌生菌数は灌水前から栽培中にかけて増加し、栽培中から収穫後にかけて減少した。灌水前と栽培中では実験区の違いで差が認められず、収穫後には牛糞堆肥と竹粉の施用区、牛

糞堆肥施用区，化学肥料施用区の順で生菌数が多い傾向となった．炭素源としてグルコースを用いた培地で形成されたコロニーから算出した生菌数を図 1B に示す．リンゴ酸の培地の結果と同様に灌水前から栽培中にかけて増加し，栽培中から収穫後にかけて減少した．牛糞堆肥と竹粉の施用区では灌水前に生菌数が牛糞堆肥施用区より少なかったのに対し，収穫後には同等の生菌数が認められた．いずれの培地においても，収穫後における生菌数は低下し，特に化学肥料施用区でその傾向が顕著であった．また，栽培中には生菌数には差が認められなかった．

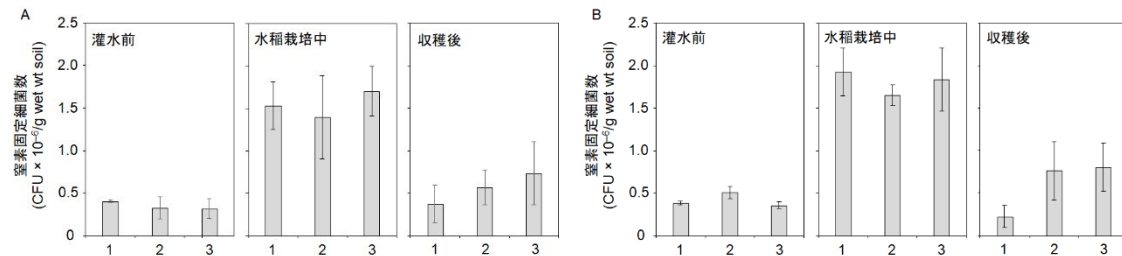


図 1 施用資材と採取時期の違いによる窒素固定細菌生菌数の変動.

滅菌水で希釈した土壌試料 (1, 化学肥料; 2, 牛糞堆肥; 3, 牛糞堆肥/竹粉) を，炭素源がリンゴ酸 (A) あるいはグルコース (B) の培地に移植し形成されたコロニー数を計数した．

一方，2018 年の採取土壌のニトロゲナーゼ活性は実験区に関係なく，灌水前から栽培中にかけて増加し，栽培中から収穫後にかけて低下した (図 2A)．化学肥料施用区では収穫後の活性低下が顕著であった．栽培中と収穫後には牛糞堆肥と竹粉の施用区で活性が高くなる傾向が見られた．2019 年に採取した土壌でもニトロゲナーゼ活性は，いずれの区画でも灌水前は低く，栽培中に最も高くなり，収穫後には再び低下した．栽培中と収穫後に採取した土壌では，化学肥料と比較して牛糞堆肥を施用した土壌において高い活性が認められた．竹粉施用は栽培中では活性に促進的には働かなかった．一方，収穫後では化学肥料，牛糞堆肥を施用した土壌共に竹粉による活性の増加傾向が認められた (図 2B)．収穫後土壌での竹粉によるニトロゲナーゼ活性の促進は，2018 年度の試験と同様の傾向となった．

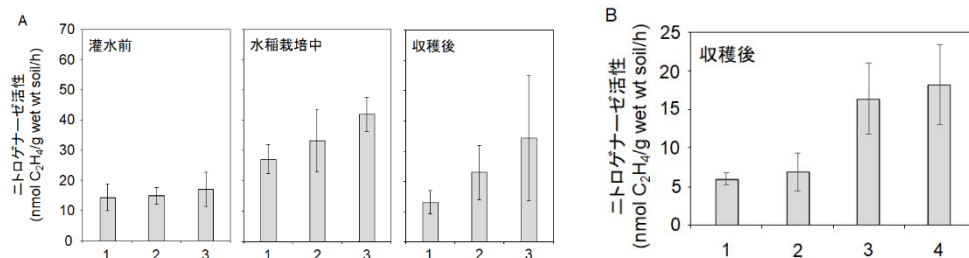


図 2 施用資材と採取時期の違いによるニトロゲナーゼ活性の変動.

A は 2018 年採取土壌 (1, 化学肥料; 2, 牛糞堆肥; 3, 牛糞堆肥/竹粉) を，B は 2019 年採取土壌 (1, 化学肥料; 2, 化学肥料/竹粉; 3, 牛糞堆肥; 4, 牛糞堆肥/竹粉) をそれぞれ示す．

(2) 土壌細菌叢に及ぼす竹粉と牛糞堆肥の影響

図 3 に 2018 年採取土壌における細菌叢の主座標分析の結果を示す．灌水前の化学肥料施用区の土壌の一つは菌叢が他の土壌と菌叢が大きく異なっており，これを除外して解析した．主座標分析では，2 点間の軸 1 と軸 2 の数値の違いが大きくなればなるほど，それら 2 点に対応する菌叢は細菌の種類や構成比が異なることを示している．軸 1 の数値の違いは軸 2 の数値の違いよりも菌叢に及ぼす影響が大きくなる．化学肥料と牛糞堆肥の両施肥区共に，灌水前から栽培中にかけての軸 1 の数値の変動が大きいことから，この間の土壌環境の変化が最も大きく細菌叢に影響を及ぼしたことが明らかとなった．一方，栽培中から収穫後の顕著な変化は認められなかった．また，採取を行った全ての時期の土壌において，軸 2 の数値に顕著な違いが認められることから，化学肥料と牛糞堆肥の違いも菌叢の違いとして現れていることが分かる．牛糞堆肥の施用区における竹粉施用の有無の違いでは，化学肥料と牛糞堆肥の違いほど顕著ではないが栽培中と収穫後で菌叢の変化が認められた．

図 4 に 2019 年採取土壌における細菌叢の主座標分析の結果を示す．2018 年採取土壌の細菌叢の解析結果では，灌水前から栽培中にかけての菌叢の変化が大きかったため，栽培中から収穫後にかけての菌叢の変化が明瞭には示されていない．このため，2019 年採取土壌については栽培中と収穫後の土壌試料に絞って解析を行うこととした．その結果，各点の軸 1 に関する数値は化学肥料と牛糞堆肥の違いにより負と正に分かれ，一方各点の軸 2 に関する数値は 1 点ずつを除き栽培中か収穫後かの違いにより正と負に分かれることが示された．このことから，施用した化学肥料と牛糞堆肥の違いが，栽培中か収穫後かの環境条件の違いよりも細菌叢に及ぼす影響が大きいことが明らかとなった．また，化学肥料あるいは牛糞堆肥に竹粉を施与するか否かの違い

がどのように菌叢に影響するか調べた。化学肥料施用の場合は栽培中と収穫後共に竹粉施用の有無でプロットを結ぶ領域に重なりが見られたのに対し、牛糞堆肥施用の場合は栽培中と収穫後共にそのような領域に重なりが見られなかった。このことから、化学肥料施用土壌よりも牛糞堆肥施用土壌で竹粉施用が菌叢に及ぼす影響が大きいことが示された。また、採取土壌から窒素固定によるジアゾ栄養増殖に優れた *Microbacterium* sp. を単離し、好気条件下において高いニトロゲナーゼ活性を有することを確認した。本菌はジアゾ栄養条件において細胞外に高分子を分泌していることが示唆されたため、窒素固定と高分子分泌の関連性について解析していく予定である。

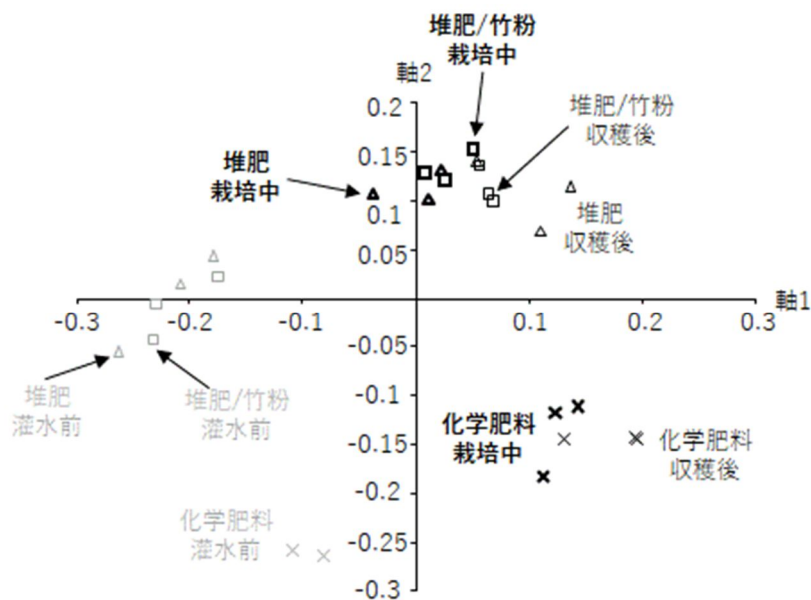


図3 資材と採取時期の異なる2018年採取土壌における細菌叢の主座標分析。

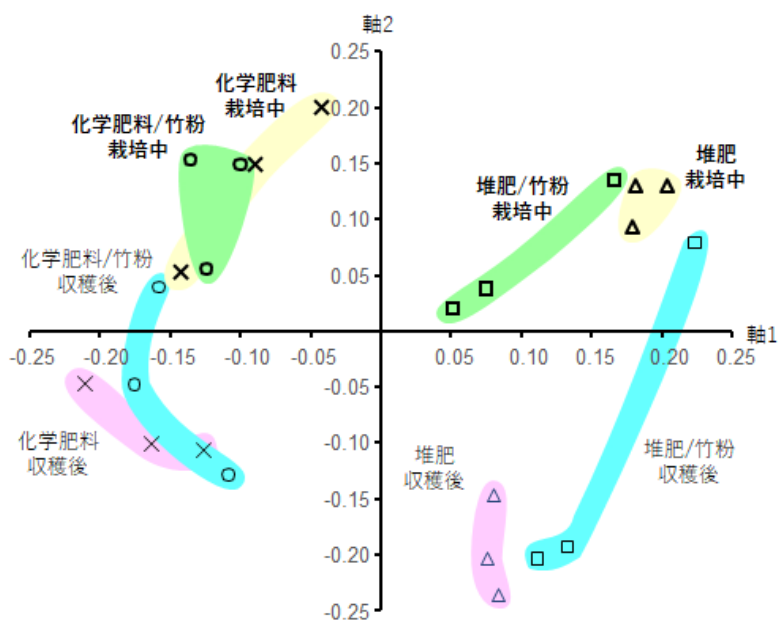


図4 資材と採取時期の異なる2019年採取土壌における細菌叢の主座標分析。

(3) まとめと今後の展望

実験区に関係なく、7月の栽培期に灌水前あるいは収穫後と比べ窒素固定細菌数が多く、かつ高いニトロゲナーゼ活性となった。灌水前から栽培期にかけて細菌叢の変化も最も顕著であったことから、灌水、気温上昇、イネの栽培による環境条件の変化は土壌細菌の活性や菌叢に対する影響が非常に大きいことが明らかとなった。また、施用する資材は細菌叢やニトロゲナーゼ活性に変化をもたらすが、化学肥料と牛糞堆肥の違いが最も影響が大きく、竹粉施用の有無は牛糞堆肥との組み合わせで副次的な影響が認められることが明らかとなった。今後は米の収量などの農業生産における総合的な評価を含めて、これら資材投入の影響を評価する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Haruka Arashida, Takumi Kugenuma, Masanori Watanabe, and Isamu Maeda	4. 巻 127
2. 論文標題 Nitrogen fixation in Rhodospseudomonas palustris co-cultured with Bacillus subtilis in the presence of air	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 589-593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.010	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田勇、嵐田遥、飯郷雅之、平井英明
2. 発表標題 竹粉の田面施用が土壌の細菌叢と窒素固定活性に及ぼす影響
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嵐田 遥、平井 英明、前田 勇
2. 発表標題 竹粉の田面施用が土壌の窒素固定活性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田勇、稲場克弘、Ao Zhalaga、平井英明
2. 発表標題 牛糞堆肥と竹パウダーを施用した水稲栽培土壌における細菌叢と窒素固定活性の季節変化
3. 学会等名 第71回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

土壌窒素固定活性の評価法開発と竹粉碎資材ならびに微生物資材による活性化
<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/jmicrobio/project.html>

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
研究分担者	平井 英明 (Hirai Hideaki) (20208804)	宇都宮大学・農学部・教授 (12201)	