

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2014～2016

課題番号：26520309

研究課題名(和文)植物系バイオマス資源と窒素固定細菌を活用した植物生産系への窒素供給システム構築

研究課題名(英文) Development of nitrogen supply system to agricultural soil using cellulosic plant biomass and nitrogen-fixing bacteria

研究代表者

境 雅夫 (SAKAI, Masao)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：20225775

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)：刈草(植物遺体)からの集積培養により、セルロースを炭素源として窒素固定を安定して発現する細菌集団を構築した。この培養系はセルロース分解および窒素固定を同時に発現し、次世代シーケンスによる16S rRNA遺伝子解析から11種の主要細菌種で構成されることを明らかにした。また、主要細菌の配列と一致する5種の窒素固定細菌を分離し、系統解析によりAzoarcus属、Pseudomonas(Azomonas)属、Azospira属、Azospirillum属、Rhizobium属に分類されることを明らかにした。これらは植物内生(共生)窒素固定細菌として知られており、分離源の植物との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We constructed the stable bacterial enrichment culture with functions of cellulose degradation and nitrogen fixation from cut grass residues. When a filter paper was added to the culture, paper degradation was observed within 6 days while simultaneously detecting the nitrogen fixation. The extract DNA from the culture was used for the community analysis. The next generation sequencing (NGS) of 16S rRNA genes showed that enrichment culture contained 11 genera as predominant bacterial groups included both nitrogen fixing and cellulose degrading bacteria. Based on the NGS information, we isolated five nitrogen-fixing bacteria, which sequences are corresponded with the major bacterial groups. The isolates were closely affiliated with genera Azoarcus, Pseudomonas (Azomonas), Azospira, Azospirillum and Rhizobium. They are commonly known as endophytic or symbiotic nitrogen-fixing bacteria. Thus, these nitrogen-fixing bacteria suggested to be key member in this bacterial consortia.

研究分野：土壌微生物学

キーワード：窒素固定 セルロース分解 植物遺体 細菌集団 集積培養

### 1. 研究開始当初の背景

窒素は、リンやカリウムとともに植物生産において欠くことのできない重要な肥料成分である。窒素を肥料として利用するためには、大気中の窒素 (N<sub>2</sub>) を固定化してアンモニアを合成する必要がある。アンモニアの世界需要は年間 1 億 6500 万トンにのぼり、肥料としての利用がその 80% を占めている。世界的な食料増産に伴う肥料需要の増加によって、アンモニアの需要も今後さらに高まることが予想される。

しかし、アンモニアの製造は、100 年前に開発されたハーバー・ボッシュ法が現在も工業的合成法として唯一の方法であり、大量の石油や天然ガスを消費してアンモニアを製造している。その結果、窒素肥料の製造のために、世界で使用されるエネルギーの数パーセントが消費されている。すなわち、窒素肥料は石油や天然ガスなしでは製造できず、持続可能な食料の安定的供給のためには化石燃料を用いない窒素肥料の製造法が要求される。

### 2. 研究の目的

本研究では、農耕地への窒素肥料の持続的供給システムの開発に貢献するため、化石燃料に依存しない「植物系バイオマス資源と窒素固定細菌を活用した植物生産系への窒素供給システムの構築」を研究目的とした。特に、セルロースを炭素・エネルギー源とした窒素固定細菌集団の生態と機能を明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) セルロースを炭素・エネルギー源とする窒素固定細菌の集積培養

セルロースを炭素・エネルギー源として窒素固定を行う細菌を選抜するため、集積培養を行った。試料として鹿児島市内から収集され、堆積された刈草 (植物遺体) を用いた。集積培地は、セルロース (ろ紙片) のみを炭素源とした無窒素液体培地 (NFC 培地) を使用した。採取した刈草試料を破砕機にて粉碎し、2mm の篩に通した。この粉碎試料 3g に滅菌水 27mL を加えて激しく攪拌して懸濁液を調製した。懸濁液 5mL を NFC 培地 50mL が入った 100mL 容バイアル瓶へ接種後、30 で 2~3 週間の静置培養を行った。これを集積培養の初代とし、目視にてろ紙片の分解が認められた培養は、アセチレン還元活性 (ARA) 測定法により、窒素固定活性を確認して、培養液の一部 (1~5mL) を NFC 培地に継代接種することを繰り返した。

#### (2) 窒素固定活性の測定

集積培養の窒素固定活性はアセチレン還元活性 (ARA) 測定法により測定した。培養したバイアル瓶内部の空気をアセチレン濃度

が約 10% になるように調整し、30 で一定時間インキュベーションを行った後、バイアル瓶内のガスをシリンジで採取した。ガスサンプルに含まれるエチレンは FID 検出器ガスクロマトグラフ装置で検出・測定した。キャリアガスは N<sub>2</sub>、カラム充填剤は Gasukuropack 54 (80/100) を使用して分析を行った。

#### (3) セルロース分解活性の測定

集積培養のろ紙分解活性はセルロース分解率として測定した。培養前のろ紙片重量を 0 day のセルロース乾燥重量とし、培養後に残ったろ紙残渣をろ過して回収して乾燥重量を測定し X day のセルロース乾燥重量とした。X day のセルロース分解率を次のように計算した。

X day のセルロース分解率 (%) = (1 - X day のセルロース乾燥重量 g / 0 day のセルロース乾燥重量 g) × 100

#### (4) 細菌集団の分子生態学的解析

##### DNA 抽出

分子生物学的手法を用いて集積培養系の構成細菌について調査するために、培養液から直接 DNA の抽出を行った。集積培養の培養液を懸濁した後、5mL を回収して DNA 抽出用のサンプル溶液とした。サンプル溶液からの DNA の抽出・精製には、ISOIL for Beads Beating (NIPPON GENE CO., LTD.) キットを使用した。

##### DGGE 解析

継代培養の細菌の集積程度を確認するため、16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 解析を行った。異なる継代数の集積培養から前述の方法で DNA を抽出し、この DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅を行った。プライマーセットは 341f-GC

(5' -CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCAGCGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3' ) / 907r

(5' -ATTACCGCGGCTGCTGG-3' ) を使用した。PCR

反応は、95 2min、94 1min、54 1min、72 1min × 30cycles、72 10 min の条件で行った。増幅した PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動で確認の後、増幅した PCR 産物を DGGE に供試した。16S rRNA 遺伝子の DGGE は 30% から 60% の変性剤の濃度勾配をつけた 8% アクリルアミドゲルを用いて行った。約 600ng の増幅産物を供試し、DGGE 装置 (DCode) を用いて、60 、100V の条件で 14 時間泳動した。泳動後、ゲルは SYBER Gold を用いて染色し、UV トランスイルミネーター下で撮影し、バンドパターンを検出した。

##### 細菌集団群集構造のメタ 16S rRNA 解析

培養液から直接抽出した DNA について 16S rRNA 遺伝子の V3・V4 領域を対象とした配列解析を次世代シーケンサー MiSeq にて行った。得られた配列から QIIME を用いて 16S rRNA 遺伝子アンプリコンのメタ解析を行い、

構成細菌種と存在比を特定した。

#### (5) 活性の経時的変化

培養中の活性と培養液内環境の変化を確認するため、前培養した培養液 1mL を新しい NFC 液体培地 50mL を含むバイアル瓶に接種し、0~30 日間培養を行った。培養期間中のセルロース分解率、窒素固定活性、酸化還元電位 (ORP) を経時的に測定した。窒素固定活性、セルロース分解率は、前述の方法によってそれぞれ測定した。ORP は培養液に電極を挿入して電位差計を用いて測定した。

#### (6) 窒素固定細菌の分離

集積培養に存在する窒素固定細菌の分離を行うため、SMM-N 培地 (DL-malic acid disodium salt; 2.5g/L, Pyruvic acid sodium salt; 2.5g/L, Fumaric acid; 2.5g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.6g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.4g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.2g/L, NaCl; 0.1g/L, CaCl<sub>2</sub>; 0.02g/L, MnSO<sub>4</sub>; 0.01g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0.002g/L, Fe( )-EDTA; 0.066g/L, Vitamin mix; 10mL/L, Gellan Gum; 20g/L, pH6.8) を使用した。集積培養の培養液を段階的に希釈し、100 μL を SMM-N 平板培地に塗布した。その後、嫌気または好気条件下にて 30 で培養を行い、出現したコロニーから窒素固定細菌の単離を行った。得られた分離菌株は ARA 測定により窒素固定活性を確認した。また、カルボキシメチルセルロース (carboxymethyl cellulose) を添加した平板培地で培養することにより、各菌株のセルロース分解活性を調査した。

菌株の系統学的解析は、16S rRNA 遺伝子全長の塩基配列を決定し、MEGA ver. 7.0 プログラムを用いて近隣結合法により行った。

### 4. 研究成果

#### (1) セルロースを炭素・エネルギー源とする窒素固定細菌の集積培養

セルロースを唯一の炭素源とした無窒素液体培地を用いて窒素固定細菌の集積培養を行った結果、刈草を接種源として窒素固定を安定して発現する集積培養が得られた。継代初期では ARA にバラツキが見られたが、継代 8 回以降では安定した ARA 値を示した。そこで、各継代培養から DNA を直接抽出して 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR-DGGE 解析により細菌群の集積程度を確認した。その結果、図 1 に示すように集積培養には 10 種以上の細菌種の存在が確認され、単独でセルロースを炭素・エネルギー源として窒素固定を行う細菌は得られなかった。また、主要な構成細菌種は一定しており、継代を続けても変化はなく、これらの細菌種が維持されていた。すなわち、複数の細菌種からなるセルロースを炭素・エネルギー源として窒素固定を行う細菌集団の培養系 (CN 培養系) が確立できた。

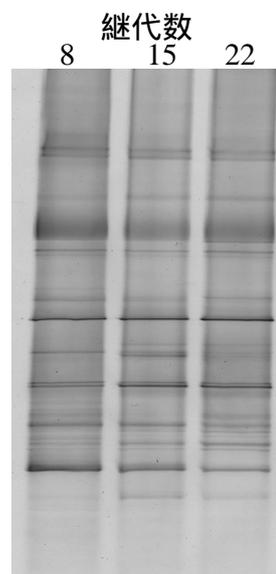


図 1 集積培養継代の DGGE 解析

#### (2) 細菌集団の群集構造の解析

刈草から得られたセルロースを炭素・エネルギー源として窒素固定を行う細菌集団を構成する細菌種を特定するために、CN 培養系の直接抽出 DNA について 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析を行った結果、この CN 培養系は 11 種の主要な細菌種 (存在比 1%以上) で構成されていることを明らかにした (表 1)。このことから、刈草の集積培養の安定した窒素固定活性は、これらの複数種の細菌集団によって発現されると考えられた。また、推定された構成細菌のうち、*Azoarcus* 属、*Azospira* 属、*Azospirillum* 属、*Rhizobium* 属の細菌は窒素固定細菌として知られており、複数の窒素固定細菌が存在することが推察された。さらに、これらの窒素固定細菌は植物内生あるいは共生窒素固定細菌として報告されており、接種源の植物との関連が示唆される。これらの窒素固定細菌以外の *Clostridium* 属などの細菌種はセルロースの分解、代謝に関与していることが推察された。

表 1 構成細菌種の特定と存在比

OTUs	Rate	Closest relatives	Similarity	Accession Number
1	32.2%	<i>Azospira oryzae</i> 6a3 <sup>T</sup>	100%	NR_024852.1
2	15.5%	<i>Clostridium hungatei</i> DSM 14427 <sup>T</sup>	100%	NR_117165.1
3	11.7%	<i>Clostridium alkalicellulosi</i> Z-7026 <sup>T</sup>	95%	NR_119284.1
4	10.5%	<i>Dysgonomonas oryzae</i> Dy73 <sup>T</sup>	100%	NR_113063.1
5	5.1%	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> AMX <sup>T</sup>	100%	NR_113973.1
6	4.4%	<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 <sup>T</sup>	100%	NR_114057.1
7	4.3%	<i>Acetanaerobacterium elongatum</i> Z7 <sup>T</sup>	98%	NR_042930.1
8	3.5%	<i>Pseudomonas flavescens</i> NBRC 103044 <sup>T</sup>	97%	EU177802.1
9	1.3%	<i>Pleomorphomonas koreensis</i> NBRC 100803 <sup>T</sup>	99%	NR_113942.1
10	1.2%	<i>Azoarcus indigenus</i> VB32 <sup>T</sup>	99%	NR_024851.1
11	1.0%	<i>Rhizobium selenitireducens</i> B1 <sup>T</sup>	100%	NR_044216.1

#### (3) 培養中の活性および環境の変化

CN 培養系のセルロース分解活性を測定した結果、セルロースの分解は培養 6 日目から発現し、12 日~15 日に急速に分解が進行し、その後、分解速度は緩やかに低下した (図 2)。培養期間中に添加したる紙の 30% 程度が分

解された。また、CN 培養系の窒素固定活性を経時的に測定した結果、培養 6 日目から徐々に活性が上昇し、培養の後半において高い窒素固定活性を示した(図 3)。

静置培養を行っているため、培地の酸化還元電位 (ORP) が細菌の増殖や活性に大きく影響を及ぼすと推察される。そこで、培養液中の ORP を経時的に測定した結果、底部の ORP は急速に低下し、3 日目には -200mV、6 日目には -300mV にまで低下し、24 日目に -400mV に達した。上部の ORP は緩やかに低下し、培養 30 日目に -300mV まで低下した(図 4)。このことから窒素固定細菌群は上部の好気条件下で窒素固定を行い、底部では *Clostridium* 属のような嫌気性細菌がおもにセルロースを分解する可能性が示唆された。

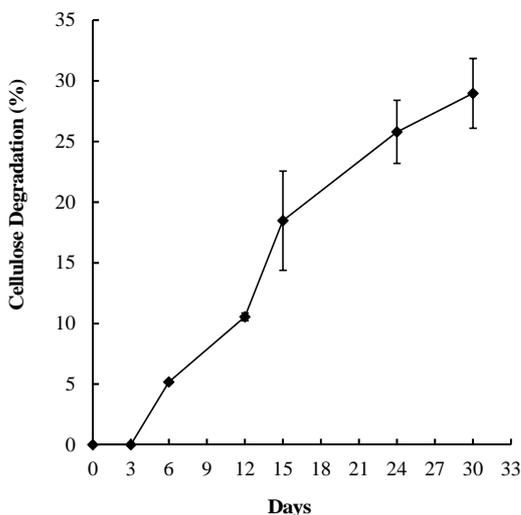


図 2 セルロース分解活性の変化

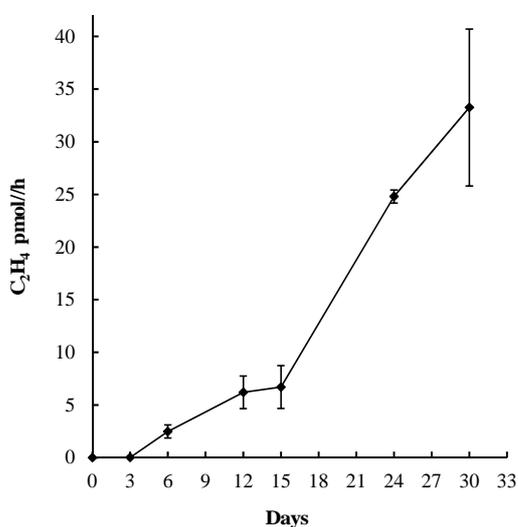


図 3 窒素固定活性 (ARA)

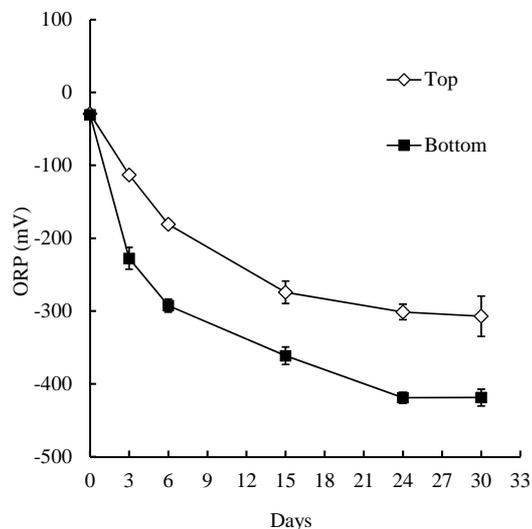


図 4 培地 ORP の変化

#### (4) 窒素固定細菌の分離

CN 培養系に存在する窒素固定細菌の分離を行った結果、細菌集団の群集構造解析によって得られた主要細菌の塩基配列と一致する 5 種の窒素固定細菌が得られた(表 2)。全て好気条件下で増殖し、窒素固定活性を示した。分離菌株の 16S rRNA 遺伝子による系統解析の結果、これらの窒素固定細菌は *Azoarcus* sp. M-1、*Pseudomonas* (*Azomonas*) sp. MG-3、*Azospira* sp. A-7、*Azospirillum* sp. P-D、*Rhizobium* sp. SE-1 に分類された(図 5)。

カルボキシメチルセルロース (CMC) の分解により分離菌株のセルロース分解能を確認した結果、いずれの菌株も CMC を分解できなかった(表 2)。すなわち、CN 培養系のセルロース分解はこれらの窒素固定細菌以外の細菌が行っており、窒素固定細菌群とセルロース分解細菌群が共存して、CN 培養系の機能を発現していることが示唆された。

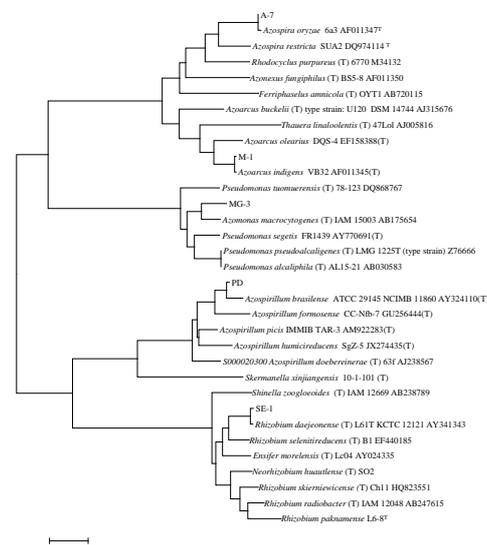


図 5 系統樹

表2 窒素固定分離菌株の特性 (ARA・CMC 分解)

Strains	N <sub>2</sub> fixation (ARA)	CMC dgradation
<i>Azoarcus</i> sp. M-1	+	-
<i>Pseudomonas</i> ( <i>Azomonas</i> ) sp. MG-3	+	-
<i>Azospira</i> sp. A-7	+	-
<i>Azospirillum</i> sp. P-D	+	-
<i>Rhizobium</i> sp. SE-1	+	-

以上の結果から、セルロースを炭素・エネルギー源として窒素固定を行う細菌集団が刈草のような植物遺体に生息していることが明らかとなり、この細菌集団を活用することにより未利用植物バイオマスを用いた農耕地への窒素肥料の供給の可能性を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

Tomohiro Kawauchi・Makoto Ikenaga・Masao Sakai, Bacterial community in enrichment culture of cut grass residue where simultaneously occurred both cellulose degradation and nitrogen fixation, The 9th Asian Symposium on Microbial Ecology, 2017年4月26日～4月28日 Busan Exhibition & Convention Center, Busan (Korea)

Tomohiro Kawauchi・Makoto Ikenaga・Masao Sakai, Bacterial community in enrichment culture of cut grass residue simultaneously occurred the cellulose degradation and nitrogen fixation, The 8th Asian Symposium on Microbial Ecology, 2016年9月30日～10月2日, National Taiwan University, Taipei (Taiwan)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

境 雅夫 (SAKAI, Masao)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授  
研究者番号: 20225775

### (2) 研究協力者

川内 智裕 (KAWAUCHI, Tomohiro)