

微生物を基盤とした土壌肥沃度指標 (SOFIX) の構築および農業への展開 Construction of Soil Fertile Index (SOFIX) Based on Microorganisms and Application for Agriculture

久保 幹*, 向 真樹, Dinesh Adhikari
MOTOKI KUBO*, MASAKI MUKAI and DINESH ADHIKARI

立命館大学生命科学部生物工学科 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

* TEL: 077-561-3901 FAX: 077-561-3901

* E-mail: kubo@sk.ritsumei.ac.jp

Department of Biotechnology, Faculty of Life Sciences, Noji-higashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

キーワード: 環境 DNA, 土壌細菌, 硝化菌, フィチン酸分解菌

Key words: environmental DNA, soil bacteria, nitrifying bacteria, phytic acid degrading bacteria

(原稿受付 2016 年 2 月 8 日 / 原稿受理 2016 年 2 月 15 日)

1. はじめに

土壌環境, 水圏環境, 大気環境は, 地球上の物質循環の場であり, これらの維持・保全は非常に重要である。土壌環境は, 植物成長・食料生産の場でもあり, 我々の生活に密接に関わっている。土壌環境保全の意識は, 水圏環境や大気環境と比べ随分遅れているのが現状である。これは, 水質汚染や大気汚染のように直接目で確認されにくいためであり, また法律面での整備が遅れたことも要因の一つである (水質汚濁防止法: 1970 年, 大気汚染防止法: 1968 年, 土壌汚染対策法: 2002 年)。

水質汚染を判断する基準は, COD (化学的酸素要求量) や BOD (生物学的酸素要求量) として確立され, 世界基準となっているが, 土壌環境は非常に複雑であり, 土壌状況を判断する基準を確立することは容易ではない。現在, 有害汚染物質の抽出・定量が基本となっている。また, 農地土壌の良し悪しの判断は, 経験的に行われているのが現状であり, 目で見える形での判断材料が望まれている。

本稿では, 複雑系である土壌環境のバイオセンシングの確立を目指し, 土壌微生物とそれらの動きを指標とした土壌肥沃度の研究について紹介する。

2. 土壌細菌解析法

2.1 土壌細菌定量法

環境状況と環境微生物は密接に連動しており, 環境微生物が環境評価の一つになるのではないかと考え, 土壌環境中の微生物の定量的解析を環境評価につなげていく研究を実施した。

土壌に棲息する微生物は環境微生物と呼ばれ, 無数の微生物が存在していると言われている。そのほとんどは, 寒天培地等で培養出来ないものである (VBNC; via-

ble but non-culturable)。現在, 地球上の環境微生物の 0.01% 程度しか分離・同定されていない⁶⁾。従って, 環境微生物の定量は非常に難しく, 正確な環境微生物を定量するためには, 培養法以外の方法を検討する必要がある。これまでに, 呼吸や ATP を指標とした環境微生物の定量方法が研究されてきたが, 再現性等の問題があり一般的な手法には到達できていない。

土壌中に存在する生物の中で細菌量は圧倒的に多く, 土壌中の細菌由来 DNA を正確に抽出・定量できれば, 土壌細菌数を正確に推定可能となる。土壌からの細菌遊離方法, 物理的損傷を低減した核酸抽出方法, また正確な DNA 定量方法等を検討した結果, 短時間で正確に土壌中の細菌数を定量する技術の構築を試みた。

図 1 と図 2 に土壌からの environmental DNA (eDNA) 抽出とその定量方法を示す。このように, 物理的損傷が少ない eDNA 量は, 直接検鏡 (DAPI 染色から検鏡定量) した結果と非常に強い相関があり, eDNA 量から環境中の細菌数を正確に定量することが可能となった。この一連の手法である, eDNA の抽出・定量, そして細菌数の推定は, 短時間 (約 2.5 時間) で行うことができる。このように土壌 1g から eDNA を抽出し細菌数を推定する「Slow stirring method」が開発された²⁾。

2.2 土壌環境中の細菌数の分布

全国の農地を中心に細菌数を定量した (図 3)。その結果, 平均細菌数が 6.2×10^8 cells/g-soil であり, 幅広い分布があることが明らかとなった。また, 同じ地域でも地質や農法の違いにより, 細菌数が大きく異なっており, 細菌数が土壌環境の一つの評価基準になると思われる³⁾。さらに, 2×10^8 cells/g-soil 以下の土壌では, 土壌中のタンパク質の無機化がほとんど進まないことが明らかとなり, 土壌肥沃度の指標の一つになると判断された⁴⁾。

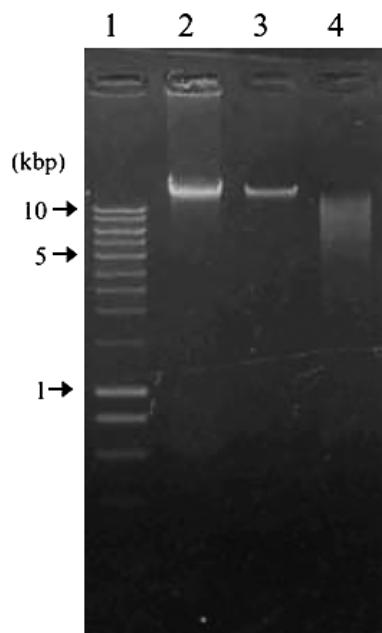


図1. 農地から抽出した eDNA の解析
1, Smart ladder 2, 農地 A 3, 農地 B 4, 農地 C

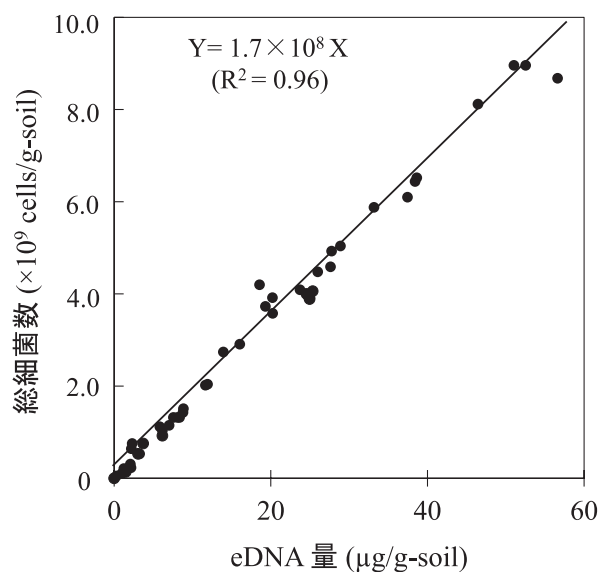


図2. DAPI 染色法によって検鏡された土壌細菌数と eDNA 量の関係解析

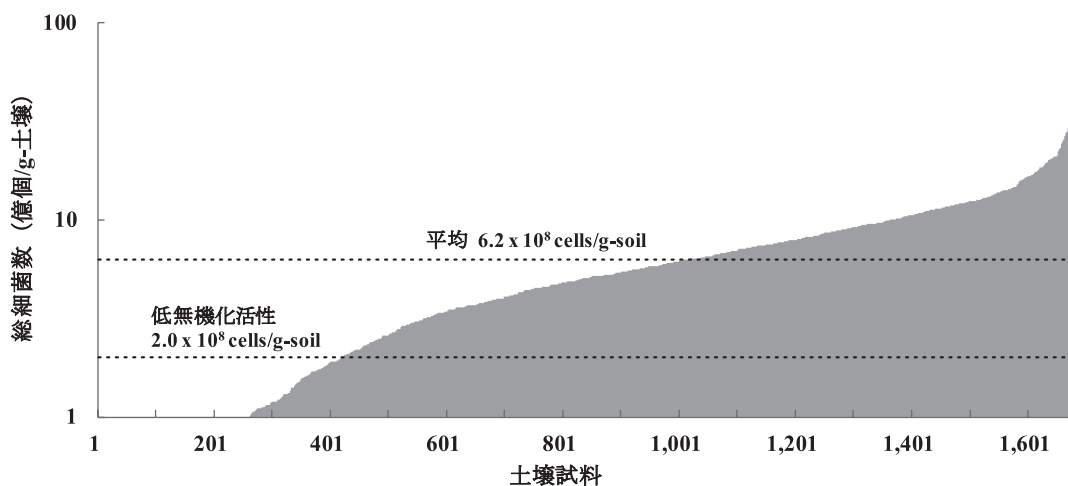


図3. 農地土壌における総細菌数の分布

3. 細菌数と物質循環

土壌中の細菌数が多いと、土壌環境中での物質循環が良好に行われることが予測される。しかしながら、偏った細菌叢の土壌環境であれば、十分な循環が行われない可能性がある。換言すると、土壌中の細菌数と共に、物質循環に関与する個別の細菌活性を解析することで、土壌中の物質循環活性を評価する必要がある。そこで、窒素循環とリン循環に焦点を当て、それぞれの活性を定量化する技術の構築を試みた。

3.1 窒素循環活性の定量化技術の構築

土壌環境中の窒素循環は、多くの細菌により行われていること、また硝化反応が律速になっていることがよく知られている^{6,11)}。化学肥料として使われている硫酸アンモニウム（窒素肥料）が肥料効果を有するには、この

硝化反応が不可欠であり、硝化反応とそれに関与する細菌を解析し、窒素循環活性の定量化技術を構築することは重要である^{8,9)}。

硝化反応を担う「アンモニア酸化細菌」と「亜硝酸酸化細菌」の活性を解析すること、また総細菌数を併せることで、窒素循環活性を評価することとした。最終的に、これらの指標をレーダーチャート化し、その面積から窒素循環活性（硝化活性）を定量的に評価する技術を構築した¹⁰⁾。この手法により窒素循環活性を測定したところ、幅広い分布が認められた（図4）。

3.2 リン循環解析の定量化技術の構築

土壌中のリンは、微生物の作用により有機リンからリン酸へと変換される。その後、一部のリン酸は土壌中に存在する金属イオンと化学吸着し循環している⁶⁾。このように、リン循環活性は、土壌中の細菌だけでなく、土

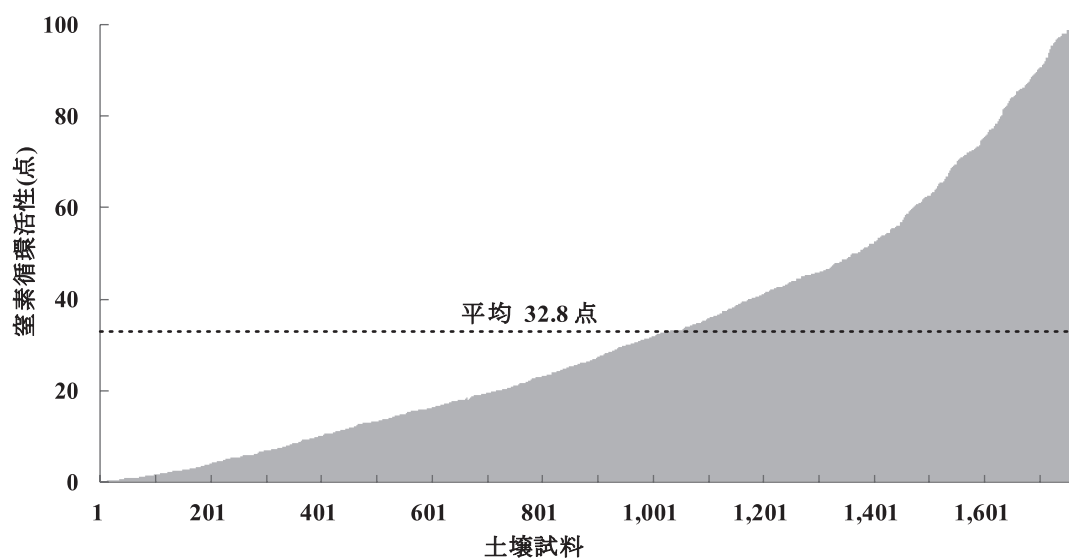


図4. 農地土壌における窒素循環活性の分布

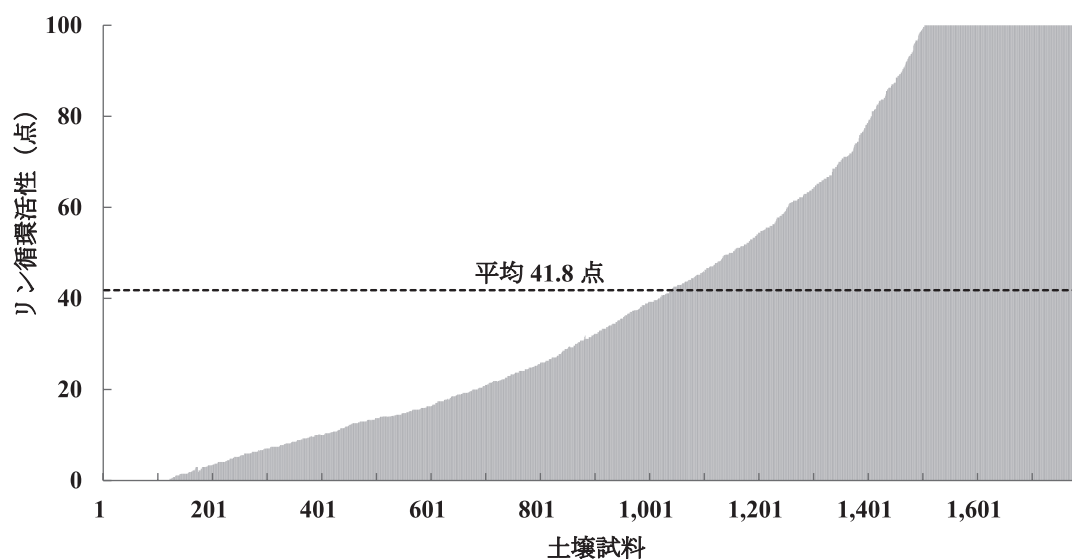


図5. 農地土壌におけるリン循環活性の分布

壤中に存在する金属イオン量にも影響を受けるため、土壌中の生物反応と化学反応の両方を考慮しなければならない。

土壌環境中に存在する有機態リンの約80%はフィチン酸であることから、フィチン酸を基質とし、土壌中に遊離してくるリン酸（遊離したリン酸から金属イオンと化学吸着したリン酸を除いたもの）を指標としたリン循環活性の定量化技術を構築した⁴⁾。この手法により全国の農地のリン循環活性を測定したところ、窒素循環と同様に幅広い活性分布が認められた（図5）。

3.3 全炭素と全窒素の量比で細菌は動く

土壌中での細菌の数を増やし、それらの活性を上昇させることは、物質循環を向上することにつながる。これまでの研究により、土壌中の総炭素量（TC）と総窒素量（TN）とその比を調整することにより、細菌の動きが活発になることが明らかとなった⁷⁾。図6にTCと

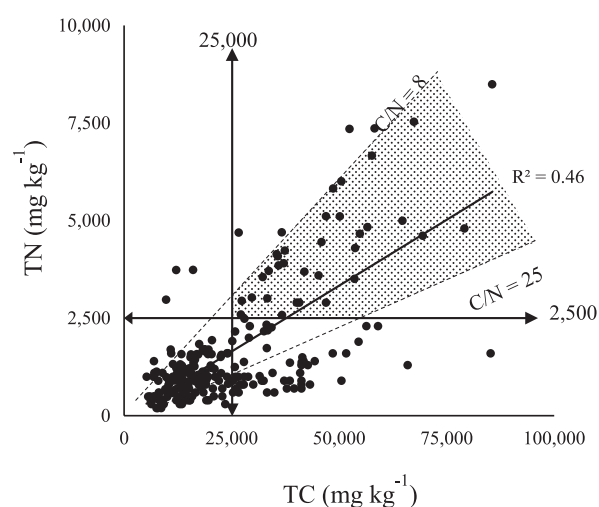


図6. 農地土壌におけるTCとTNの関係
網掛けの部分は高い窒素循環活性領域を示している。

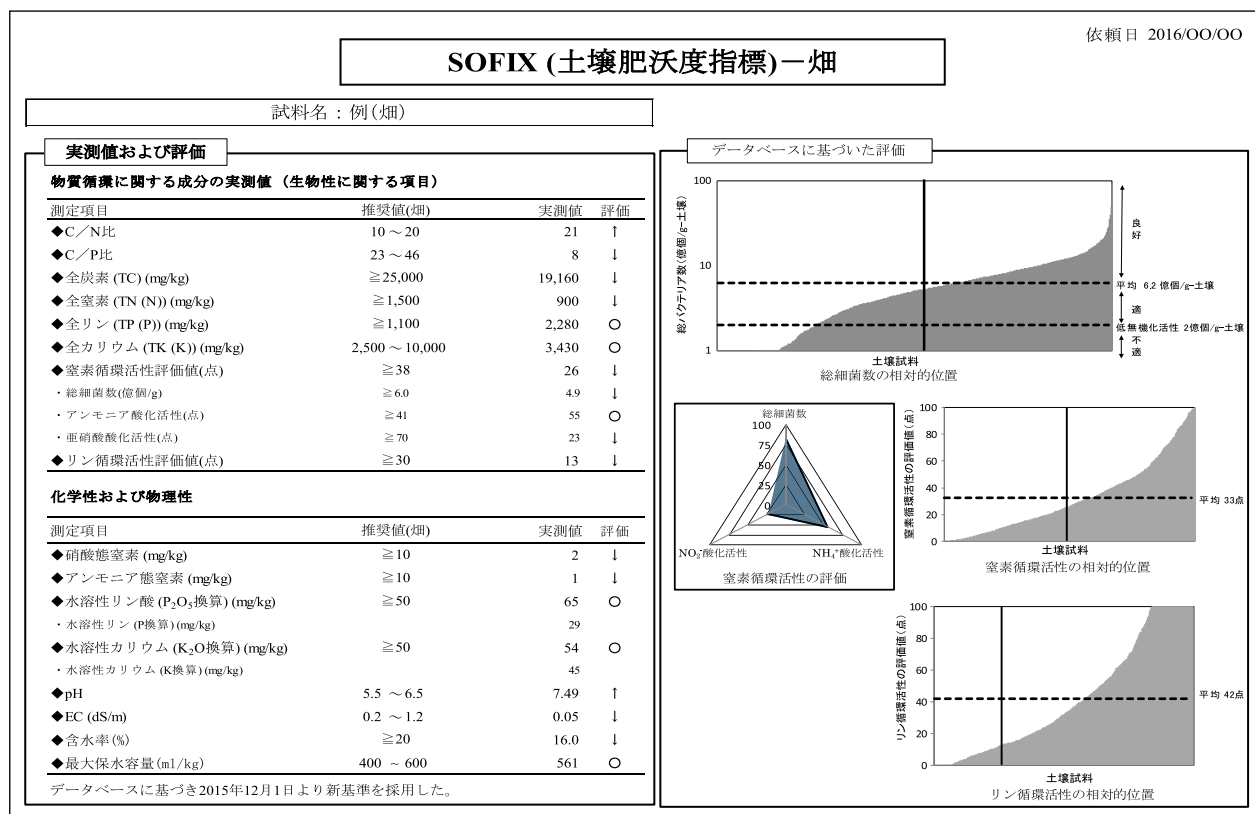


図7. 畑土壌における SOFIX 解析例

TN の分布、そして高い窒素循環活性領域を示している。網掛けの部分が高い窒素循環活性を示しており、TC と TN の量と C/N 比が細菌の動きと密接に連動していることが明らかとなった。この指標を基盤とし、土壌中の最適なバイオマス量に調整すれば、土壌中の生物活性が向上・維持できることとなった。

3.4 土壌肥沃度指標 (SOFIX)

総細菌数、窒素循環活性、リン循環活性、TC、TN、C/N 比等、土壌中の生物性に関連する項目を 19 項目に整理し、それぞれの最適値を表記した土壌肥沃度指標 (Soil Fertile Index; SOFIX) を構築した (図7)¹⁾。この SOFIX データにより、農地の現状を正しく把握することができ、また土壌中に棲息する細菌の活性を向上させるため、不足している成分を正確に知ることが可能である。

一方、不足している成分を補うため、堆肥等のバイオマス資材の分析も重要である。SOFIX 解析に準拠した堆肥品質指標 (MQI) や有機資材品質指標 (OQI) の解析技術も併せて開発し、SOFIX 解析に基づいた確実なバイオマス資材投与が可能となった。

4. SOFIX の農業への活用

4.1 化学肥料を使った農業

戦後、農業スタイルは激変した。地下資源から化学合成された肥料が次々と開発された。即効性のある化学肥料はまたたく間に世界中で受け入れられ、化学肥料を基

本とする農業が一般化し、慣行農法といわれるようになった。化学肥料を用いる化学農法は、飛躍的に収穫量を向上させ、農地の化学分析に基づいた適切な窒素、リン酸、カリウムの施肥量を容易に管理することが出来るようになった。また有機肥料と比べると施肥する量が少ないため、頻繁な追肥が必要であるが、農業労働の軽減に寄与した。

一方、化学肥料は水に溶けやすいため、環境流出が容易に起こる。過剰な化学肥料や化学農薬を使い続けると、流出した化学肥料や化学農薬による河川や湖沼、そして海洋の富栄養化が生じ、環境負荷を引き起こす。水圏環境における水草の大量発生や赤潮などの環境問題にも発展することもしばしば見られる。さらに化学肥料の連用により、土壌中のミネラル分が徐々に減少していき、農産物中のミネラル量が大幅に減少している。

4.2 環境保全型農業の現状

欧米では、健康や環境保全の観点から、有機農産物の需要が年々高まっており、作付面積も大きく拡大している。また有機農産物を専門に取り扱う店舗も賑わいを見せており、農業ビジネスの新しい潮流となっている。

日本では、有機肥料のみを使う有機農法や化学肥料や化学農薬の使用を減らした環境保全型農業が行われている。これらの取り組みは徐々に理解され、作付面積は少しずつ増えているが、日本の農業全体からみるとまだその割合はわずかである。

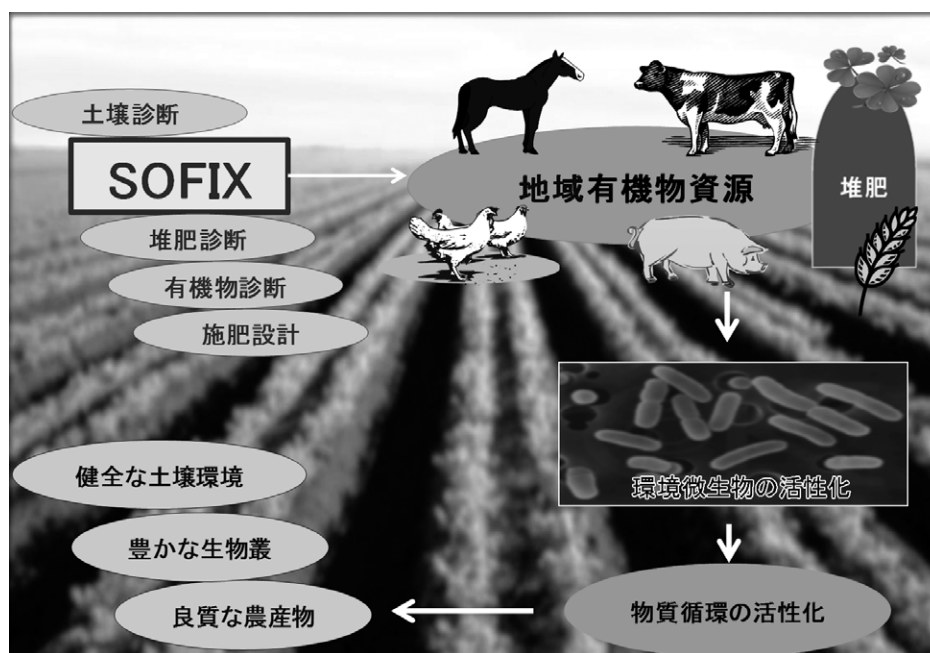


図 8. SOFIX 物質循環型農業のモデル

4.3 環境保全型農業の課題

有機肥料を主として使う環境保全型農業は、農産物のおいしさが向上することが認識されているが、化学農業（慣行農法）と比べると収獲量が低いと言われている。実際、慣行農法と比べ2割から3割程度低い収獲量であるという声が多く聞かれる。このように、環境保全型農業では収獲量を向上させていくことが大きな課題の一つである。

堆肥等の有機肥料使う農業現場において、化学肥料と比べると多くの量の有機資材を施肥する必要がある。施肥労働を軽減できる効率的な有機施肥システムの構築が求められている。また良質な有機資材の見極めや安定した供給体制の確立も重要な課題である。

一方、消費者にとって化学農法と有機農法で収穫された農産物の違いが十分にわからず、感覚的な印象で環境保全型農産物を捉えている消費者が多いと思われる。有機農産物品質の数値に基づく表示や認証システム等の導入も今後の課題である。

4.4 SOFIX の農業への活用

有機農業や環境保全型農業等、バイオマス資材を施用する農業には SOFIX 解析が有効であると考えている。図 8 に示すように、まず農地の状況を SOFIX 解析により把握し、地域に存在するバイオマス資源の内容物の分析を行う。物質循環活性を向上させるために必要なバイオマス量比を計算し、正確に施用することで肥沃な土壌が形成される⁹⁾。その農地で生育した農産物は、肥料供給が滞りなく行われるため、植物が健康に生育し、収獲量の向上も期待できる。例えば、大量摂取で健康被害をもたらす硝酸イオンが少ない葉菜類の収獲が可能となり、また収獲量も2~3割向上する。

5. おわりに

土壌環境の維持・管理は、農業等我々の生活にとって非常に重要な事項である。しかしながら、土壌環境のモニタリング・センシング解析は、その複雑系であるが故、水圏環境や大気環境と比べて大幅に遅れていた。本稿で紹介した SOFIX 解析は、土壌細菌が環境状況の変化で敏感に反応する特性を用いた、土壌環境のバイオセンシングである。また、土壌細菌数やその活性を指標とした土壌環境の維持・改善技術にもつながる。今後、土壌中のミネラル成分も微生物挙動に影響を及ぼすため、これらのバイオセンシングにもアプローチしていきたい。

文 献

- 1) Adhikari, D., T. Kai, M. Mukai, S.K. Araki, and M. Kubo. 2014. Proposal for a soil fertility index (SOFIX) for organic agriculture and construction of a SOFIX database for agricultural fields. *Current Topics in Biotechnol.* 8: 81–91.
- 2) Aoshima, H., A. Kimura, A. Shibutani, C. Okada, Y. Matsumiya, and M. Kubo. 2006. Evaluation of soil bacterial biomass by environmental DNA extracted by slow-stirring method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 875–880.
- 3) Fukuhara, Y., S. Horii, T. Matsuno, Y. Matsumiya, M. Mukai, and M. Kubo. 2013. Distribution of Hydrocarbon Degrading Bacteria in the Soil Environment and their Contribution to Bioremediation. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 170: 329–339.
- 4) Horii, S., T. Matsuno, J. Tagomori, M. Mukai, D. Adhikari, and M. Kubo. 2013. Isolation and identification of phytate degrading bacteria and their contribution to phytate mineralization in soil. *The Journal of Gen. and Appl. Microbiol.* 59: 353–360.
- 5) Kai, T., M. Mukai, S.K. Araki, D. Adhikari, and M. Kubo. 2015. Physical and biochemical properties of apple orchard soils of different productivities, *Open Journal of Soil Science.* 5: 149–156.

- 6) 久保 幹, 森崎久雄, 久保田謙三, 今中忠行. 2012. 環境微生物学. 化学同人.
- 7) Kubo, M., S. Horii, T. Matsuno, M. Mukai, and D. Adhikari. 2014. Evaluation of soil fertility for plant growth based on bacterial biomass and material circulation in soil environment, pp. 147–160. In J.N. Govil (ed.), Recent Development in Biotechnology, Fertilizer Technology II, Biofertilizer.
- 8) Matsumiya, Y., S. Horii, T. Matsuno, and M. Kubo. 2013. Soybean as a nitrogensupplier. In Teck, Edited by James E. Board. 49–60.
- 9) Matsumiya, Y., R. Taniguchi, and M. Kubo. Analysis of peptide uptake and location of root hair-promoting peptide accumulation in plant roots. *J. Peptide Science*. 18: 177–182.
- 10) 松野敏英, 堀井幸江, 福原優樹, 松宮芳樹, 久保 幹. 2012. 農地窒素循環の見える化—物質循環系を考えた土づくり—. *土づくりとエコ農業*. 6・7月号: 50–55.
- 11) Matsuno, T., S. Horii, T. Sato, Y. Matsumiya, and M. Kubo. 2013. Analysis of nitrification in agricultural soil and improvement of nitrogen circulation with autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* 169: 795–809.