

論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成 14 年度 博士課程入学

氏 名 鈴木 千夏

指導教官 小柳津 広志

論文題目 分子生化学的手法による土壌機能の評価法に関する研究

土壌生物性を評価する試みは、B/F 値、バイオマス、微生物数の測定、土壌呼吸、各種酵素活性、ミミズ、線虫の計数などにより行われてきた。しかし、土壌診断が普及し、一般的になった現在でも、診断基準となりうる決定的な手法は確立されていない。土壌生物、特に土壌微生物は、農業生態系のなかで非常に重要な役割を果たしており、これを無視して土壌を診断、管理していくことは、不可能であるといつてよく、生物性を正確に把握することの出来る、新たな手法の開発が急務となっている。土壌微生物の多様性が、農業生態系の生産性、安定性をコントロールしている重要な因子の1つであるだろうことは、多くの研究者により示唆されている。しかし、従来手法による多様性の測定には限界があり、生態系内での微生物の果たす機能と多様性の中に、明確な関係を見出すことは出来ていない。そこで、本研究では、土壌微生物の多様性、生態系内での機能、その両方にかかわりを持つ **keystone species** を土壌微生物相の中から抽出し、土壌診断に応用することを目的に、研究を開始した。

作物収量に関わる **keystone species** の抽出

ランダムに選んだ土壌を用いて作物収量に関わる **keystone species** を抽出するためには、莫大な数の分析を要する。これに見合うだけのサンプルを収集、分析することは非常に難しいと考えられたため、本研究では、生産量に明らかな違いがあること、同じ作物を同時

期に栽培していること、なるべく多くの種類の作物を栽培していることの三つの条件を満たす茨城県農業総合センター 有機物連用試験ほ場、長野県中信農業試験場内、有機物連用試験ほ場の土壌を用いて解析を行った。

茨城県農業総合センター内の有機物連用試験ほ場は 16 区に別れており、それぞれ異なる施肥管理が 24 年間行われてきた。処理区間の物理性、化学性を比較すると、有機物の施肥により物理性が改善され、化学性が向上していることが確認された。また、化学性向上の効果を使用有機物ごとに比較すると、C/N 比が高く、養分含量の少ないわら堆肥よりも、養分を豊富に含む下水汚泥や堆きゅう肥を用いた場合の方がその効果は高く表れていた。FAME 解析、T-RFLP 解析により、微生物相の解析を行い、施肥法の違いが微生物相に与える影響を比較すると、有機物の施肥よりも化学肥料の施肥、特に窒素肥料の施肥が、微生物相に大きな影響を与えていることが明らかとなった。

長野県中信農業試験場内の有機物連用試験ほ場は、65 年間、連用試験を続けている。非常に長期にわたる連用試験のため、土壌本来の養分含量は著しく低下していた。このため、物理性、化学性では、施肥による影響と同様に、栽培作物の影響を強く受けていることが確認された。また、微生物性を FAME 解析、T-RFLP 解析により分析すると、有機物含量の低い土壌では、fungi の割合が高くなること、バクテリア相には化学肥料の施肥による影響が強く表れていることが明らかとなった。

茨城県農業総合センター、長野県中信農業試験場、それぞれの土壌で、土壌物理性、化学性、微生物性、収量と、すべてのパラメーターを用いて主成分分析 (PCA) を行った。得られた固有ベクトルをプロットすると、どちらの土壌を用いた場合にも、収量の近くに作物生育に重要であると考えられる土壌物理性、化学性の因子が集まっていたことから、収量のプロットの周辺には、作物収量に強い影響を与えている因子が集まっていると判断した。そこで、収量の周辺に位置していた 10 個の FAMES と 10 個の T-RFs を、作物収量に関わる keystone species として抽出した。茨城県農業総合センターでは、13:0 2OH、19:0 anteiso、21:0 iso 3OH、16:0 iso 3OH、16:1 w7c alcohol、15:0 iso F、14:0 anteiso、13:0 iso 3OH、SF1、18:3 w6,9,12c の FAMES と、457bp、459bp、460bp、469bp、480bp、481bp、482bp、483bp、484bp、486bp の T-RFs が抽出され、長野県中信農業試験場の土壌からは、10:0、10:0 2OH、11:0 anteiso、11:0 iso 3OH、13:0 2OH、14:1 w5c、16:0 N alcohol、16:1 2OH、19:0 anteiso、SF 6 の FAMES と、423bp、424bp、436bp、452bp、456bp、471bp、481bp、482bp、488bp、493bp の T-RFs が抽出された。抽出された FAMES には、特定の菌に特異的に含まれているものが存在しており、これを比較すると、どちらの土壌からも、様々な種類の菌由来の FAME が含まれていることが確認された。また、抽出された T-RFs について、クローン解析の結果を利用して系統解析を行うと、抽出された T-RFs も、多岐に渡った菌群に由来していることが明らかになった。抽出された FAMES と T-RFs を比較すると、同様の菌群に由来しているだろうと考えられるものも含まれていた。どちらの土壌を用いた場合にも、抽出された keystone species は多岐にわたった微生物に由来

しており、作物にポジティブに作用すると考えられている菌のみでなく、ネガティブに作用するであろう菌、新たな菌群を形成するものなど、現段階で働きの明らかでない菌も数多く含まれていた。収量に関わる因子として、このように様々な菌に由来する因子が抽出されてきた事実は非常に興味深く、土壌微生物相の複雑さ、微生物の持つ能力の多様性とその重要性を再認識させられる。また、茨城県農業総合センター、長野県中信農業試験場のどちらの土壌においても抽出されてきた 13:0 2OH、19:0 anteiso、481bpT-RF、482bpT-RF は、非常に普遍性の高い因子であると考えられる。13:0 2OH は、*Streptococcus bovis* に特異的に、19:0 anteiso は、一部の *Bacillus thuringiensis* と *Staphylococcus* に特異的に含まれる脂肪酸である。また、481bp、482bp の T-RF は、どちらも γ -proteobacteria に属している。どちらの土壌からも γ -proteobacteria に属する *Pseudomonas species*、または *Xanthomonas species* に特異的に含まれる脂肪酸が抽出されていることから、*Pseudomonas species* や *Xanthomonas species*、*Bacillus thuringiensis* や *Streptococcus bovis* は、土壌タイプ、栽培作物によらず、普遍的に収量に影響を与えている菌群である可能性が示唆された。

土壌評価における **Keystone species** の有用性

抽出された keystone species を、土壌診断を行う際の微生物性の評価指標として応用することが可能かどうか、農業生産法人 茨城白菜栽培組合 連用試験ほ場をサンプルとして評価した。サンプルとして使用させていただいた茨城白菜栽培組合の土壌は、化学肥料 2 年連用区 (CF)、有機物 2 年連用区 (M-2)、有機物 9 年連用区 (M-9) に分かれている。各処理区間の物理性、化学性を比較すると、土壌物理性の評価指標である bulk density は、 $M-2 < CF$ となり、有機物施肥による物理性の改善効果が確認された。また、化学性について比較すると、そのほとんどが $CF < M-2 < M-9$ であったが、唯一無機態窒素量のみ、M-9 区が最も少ない値を示した。M-9 区は、有機物の施肥が行われた直後にサンプリングを行っていることから、有機物の分解に伴い、無機態窒素量が一時的に減少しているのだろう事が示唆された。微生物性について比較を行うと、CF 区、M-2 区では微生物相は未だ移行段階にあること、M-9 区ではバクテリア相が単純化していることが明らかとなった。

これらの土壌の土壌評価を、soil quality を用いて行った。微生物性の評価指標に、FAME 解析で算出された B/F 値を用いて解析すると、soil quality の値は $M-2 < CF < M-9$ となり、長野県中信農業試験場の土壌を用いて抽出された keystone species を用いて解析すると、 $M-9 < M-2 < CF$ となった。Keystone species を指標として土壌評価を行うと、従来の評価指標である B/F 値では指摘することのできなかつた、M-9 区のバクテリア相に潜む問題点を、土壌評価に反映させることが出来た。このことから、上記の手法で抽出された keystone species は土壌微生物性の評価指標として、有用であると判断することが出来た。

総括

本研究では、作物収量に関わりの深い微生物性の **keystone species** を抽出する方法を開発することができ、更に、抽出された **keystone species** の微生物性の評価指標としての有用性を確認することに成功した。このような方法で抽出された **keystone species** は、収量と相関を持つこと、さらに、バクテリア相、糸状菌相を、培養できない微生物まで含めた、幅広い範囲で反映させることが出来ることから、土壌微生物性の新しい評価指標としての可能性に期待がかかる。今後、さらに多くのデータを蓄積し、普遍性の高い **keystone species** を決定することで、新たな評価指標として使用されることを期待したい。